•研究报告•

高秆野生稻内生固氮细菌多样性

刘丽平¹ 宋瑞凤¹ 张 馥^{1,3} 张秀香¹ 彭桂香^{2*} 谭志远^{1*}

1 (华南农业大学农学院, 广州 510642)

2 (华南农业大学资源环境学院, 广州 510642)

3 (河北省保定市乐凯中学, 河北保定 071051)

摘要: 高秆野生稻(*Oryza alta*)是一种重要的种质资源, 其组织中也蕴藏着非常宝贵的功能微生物资源。本实验采用无氮培养基, 从高秆野生稻中分离到43株内生固氮菌, 结合乙炔还原法测定其固氮酶活性。经固氮酶基因(*nifH*)的PCR扩增检测, 43株内生固氮菌代表菌株均能扩增出固氮酶基因片段。利用IS-PCR DNA指纹图谱和SDS-PAGE全细胞蛋白电泳图谱将获得的菌株聚类为6个类群(I、II、III、IV、V、VI)。对各个类群的代表菌株(ZF3, ZF8, ZF13, ZF15, ZF24, ZF43)进行16S rRNA基因序列测定, 结果表明, 类群I属于土生拉乌尔菌(*Raoultella terrigena*), 类群II属于类肺炎克雷伯氏菌类肺炎亚种(*Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae*), 类群III属于越南伯克氏菌(*Burkholderia vietnamiensis*), 类群IV的菌株代表肠杆菌属的一个类群(*Enterobacter* sp.), 类群V的菌株属于门多萨假单胞菌(*Pseudomonas mendocina*), 类群VI归属于固氮植物菌(*Phytobacter diazotrophicus*)。Biolog聚类结果与IS-PCR指纹图谱类型及SDS-PAGE全细胞蛋白聚类结果一致。Biolog板测定结果显示, 来自不同类群的代表菌株对碳源的利用差异显著, 说明野生稻内多样的内生固氮菌从环境中获取碳源和氮素的适应能力较强。

关键词: 内生固氮菌; 多样性; 全细胞蛋白电泳; 指纹图谱; 聚类分析

Diversity of endophytic diazotrophs isolated from *Oryza alta*

Liping Liu¹, Ruifeng Song¹, Fu Zhang^{1,3}, Xiuxiang Zhang¹, Guixiang Peng^{2*}, Zhiyuan Tan^{1*}

1 College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642

2 College of Resource and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642

3 Baoding Lucky Middle School, Hebei Province, Baoding, Hebei 071051

Abstract: Forty-three strains of endophytic nitrogen-fixing bacteria were obtained from wild rice *Oryza alta*, and grown on nitrogen-free medium. Their potential nitrogen-fixing ability was determined with the acetylene reduction method and a PCR amplification of the *nifH* gene fragment. The obtained isolates were grouped into six groups (I, II, III, IV, V, VI) based on their DNA patterns of IS-PCR and protein patterns of SDS-PAGE. The 16S rRNA gene sequence analysis identified representative strains, suggesting that group I belonged to *Raoultella terrigena*, group II to *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae*, group III to *Burkholderia vietnamiensis*, group IV to genus *Enterobacter*, group V to *Pseudomonas mendocina*, and group VI to *Phytobacter diazotrophicus*. A Biolog plate test showed strains from differing groups had significant differences in carbon source utilization, often clustering consistently within IS-PCR and SDS-PAGE patterns. The diversity of endophytic nitrogen-fixing bacteria in wild rice indicates that endophytic bacteria is strongly adaptable in obtaining both carbon and nitrogen from varying environments.

Key words: endophytic diazotrophs; diversity; eletrophoresis of whole cell protein patterns; fingerprinting patterns; clustering analysis

自Döbereiner等(1976)报道了与禾本科植物联合共生的固氮菌——固氮螺菌属(*Azospirillum*)后,

研究者又从多种植物如甘蔗(*Saccharum officinarum*)、(Paungfoo-Lonhienne et al, 2014; 史国英等, 2019)、

收稿日期: 2019-11-12; 接受日期: 2020-03-03

基金项目: 国家自然科学基金(31970001)、广东省科技计划项目(2018A050506075)、广东省科技创新战略专项资金(2018B020205003; 2018B020206001)和广东省植物分子育种重点实验室开放基金

* 共同通讯作者 Co-authors for correspondence. E-mail: gxpeng@scau.edu.cn; zytan@scau.edu.cn

水稻(*Oryza sativa*) (Verma et al, 2001, Shabanamol et al, 2018)、玉米(*Zea mays*) (Palus et al, 1996, Mashiane et al, 2018)中分离到内生固氮菌。研究发现, 部分内生固氮菌不仅具有固氮功能, 还具有促进植物生长以及生物防治等多种功能(Palus et al, 1996, Mashiane et al, 2018), 因此对植物内生固氮菌的研究逐渐成为一个热点。

稻属(*Oryza*)分布在亚洲、非洲、大洋洲和美洲的77个国家和地区, 分布非常广泛的野生稻(*Oryza rufipogon*)是禾本科最重要的属之一, 目前在野生稻内已发现的固氮菌有31属74种(刘丽辉等, 2017), 所以野生稻是宝贵的微生物资源库。我国拥有丰富的野生稻资源, 广泛分布于南方地区, 若能够充分发掘这些野生稻中的内生固氮菌资源, 对内生固氮菌菌种资源库的丰富以及农业粮食生产都将具有很大的促进作用。

本文从高秆野生稻(*Oryza alta*)中分离的43株内生固氮菌进行了研究, 通过固氮酶基因 $nifH$ 的扩增证明其固氮酶存在情况, 分析了SDS-PAGE图谱类型、16S rDNA序列相似性以及碳源板的利用差异, 揭示了高秆野生稻中内生固氮菌的多样性, 获得了一些高固氮酶活性的菌株, 为将来进一步研究和应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料来源与培养基

高秆野生稻材料来源于华南农业大学野生稻种质资源圃。

改良Döbereiner无氮培养基(1 L): Sucrose 10 g; Malic acid 5 g; $K_2HPO_4 \cdot H_2O$ 0.1 g; $KH_2PO_4 \cdot H_2O$ 0.4 g; NaCl 0.1 g; $FeCl_3$ 0.01 g; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.002 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g (单独灭菌); $CaCl_2 \cdot H_2O$ 0.02 g (单独灭菌), 用NaOH调节pH值至 7.0 ± 0.2 。固体培养基中加入1.5%–2%的Agar, 半固体培养基中加入0.15%–0.2%的Agar。

1.2 菌株分离纯化及固氮酶活性的测定

参照刘鲁峰等(2019)的方法, 对新鲜的野生稻材料先用蒸馏水清洗, 然后再进行表面消毒后分别接种至Döbereiner改良无氮半固体及固体培养基分离纯化菌株。将纯化后的菌株接入盛有Döbereiner无氮半固体培养基的试管中, 用反口橡胶密封, 28℃人工培养箱中培养24 h, 整个过程均在无菌条件下

完成。待试管内长出菌体后, 向试管内注入1/10体积的10%乙炔气体(终浓度为1%), 相同条件下再培养24 h, 用乙炔还原法测定其固氮酶活性(北京天普分析仪器厂SP-2100气相色谱)。3次重复, 取平均值。从高秆野生稻样品中共分离出43株内生固氮菌。

1.3 固氮酶 $nifH$ 基因扩增

利用Zehr (Baldani et al, 1986)等设计的简并引物, 以正向引物Zehrf1: 5'-TGYGAYCCNAARGCN GA-3', 反向引物Zehrr2: 5'-ANDGCCATCATYTTCN CC-3'扩增 $nifH$ 基因片段。反应条件是: 97℃预变性3 min; 97℃变性1 min, 55℃复性50 s, 72℃延伸35 s; 变性、复性、延伸共32个循环; 反应完成后, 72℃延伸5 min。

1.4 IS-PCR指纹图谱

提取DNA的方法参照文献(Palus et al, 1996), IS-PCR (insertion sequence-based PCR)指纹图谱所用引物设计见王晓熙等^①的研究结果, 选用单向引物J3 (5'-GCTCAGGTCAGGTGG CCTGG-3')作为IS-PCR引物。PCR反应体系为 25.0 μ L: 10 $\times$ PCR buffer 2.5 μ L, 10 mM dNTPs 0.5 μ L, J3引物 (50.0 μ M) 0.25 μ L, ddH₂O 0.75 μ L, 模板DNA (20 ng/ μ L) 0.5 μ L, *Taq* polymerase (3 U/ μ L) 0.5 μ L。PCR反应条件参照文献(Loiret et al, 2004)。IS-PCR即插入序列指纹图谱, 用混合引物J3进行PCR扩增, 每个DNA得到的条带多少以及片段的大小都有一定的区别, 反应完成后用1.2%的琼脂糖电泳检测PCR产物, 进一步用高分辨率的聚丙烯酰胺凝胶电泳得到指纹图谱, 紫外成像仪观察照相, 将条带一致的归为一类。通过软件GIS 3.74凝胶图像处理系统进行分析, 获得电泳图谱的相似性矩阵, 用TREECONW软件进行UPGMA聚类。

1.5 SDS-PAGE全细胞蛋白电泳

收集对数生长期菌体于预称重的Eppendorf管离心管中后称重, 并用Sample buffer裂解细胞, 使其浓度达到150 mg/mL。将样品在95℃下加热10 min后, 7100 g条件下离心2 min, 放入–20℃冰箱中待用。采用DYCZ-24D双垂直电泳槽(北京六一仪器厂), 10%的分离胶, 5%的浓缩胶。电泳时恒流30 mA, 视其指示剂溴酚兰距胶的底端0.5 cm处时停止。电泳后染色, 紫外成像仪上照相观察(Tanon GIS-2008

① 王晓熙 (2007) 生物修复作用菌的竞争PCR检测方法的建立及其应用。硕士学位论文, 中国海洋大学, 山东青岛。

紫外成像仪),用Tanon软件进行聚类。溶液的配方及具体操作见谭志远和陈文新(1998)。

1.6 16S rDNA序列的扩增

正向引物25f (5'-AACT(G/T)AAGAGTTTGA TCCTGGCTC-3')和反向引物1492r (5'-TACGG(C/T) TACCTTGTTACGACTT-3'),反应体系及条件见参考文献(Tan et al, 2001);测序所用引物为35fc (5'-CTKAAGAGTTTGATCMTGGCTCAGATTGAA CG-3'), 342fc (5'-CTCCTACGGGAGGCAG-3')和 930fc (5'-GGTTAAACTYAAAKGAATTGACG GGGAC-3')。引物和序列测定均由北京三博远志生物技术有限责任公司完成。将所测序列与GenBank中序列比较,获得最相近菌种名称。

1.7 碳源利用测定

选取各类群代表菌株进行碳源利用Biolog板测

定。将供试菌株制备成菌悬液,使其OD600约为0.05,再用多通道移液器快速将菌悬液加入微孔测试板中,每孔150 μ L。28℃培养24 h后观察各孔颜色变化。Biolog (ECO)微孔板包括糊精等95个含碳源的彼此独立微孔,对照孔没有碳源,对氧化反应作用比较敏感的四唑染料在呼吸作用中被还原,在细胞中累积,然后微孔中显示出深浅不一的颜色。

2 结果

2.1 固氮酶活性测定及固氮酶*nifH*基因扩增

利用改良的Döbereiner无氮培养基进行选择培养,后采用划线平板法进行分离纯化,从高秆野生稻中分离到43株内生固氮菌,其中根部分离到11株,茎中分离到24株,叶部分离到8株(表1)。

在一定条件下,固氮酶将乙炔还原成乙烯的量

表1 高秆野生稻内生固氮菌来源及固氮酶活性测定(固氮酶活性为3次测定的平均值)

Table 1 Origin of isolates and nitrogenase activity from *Oryza alta* L. The activity of nitrogenase was the average value of three determinations.

菌株编号 Strain no.	部位 Organ	固氮酶活性 Nitrogenase activity (nmol C ₂ H ₂ /mL·h)	菌株编号 Strain no.	部位 Organ	固氮酶活性 Nitrogenase activity (nmol C ₂ H ₂ /mL·h)
ZF1	根 Root	10.82 ± 0.15	ZF23	叶 Leave	72.63 ± 0.93
ZF2	叶 Leave	26.19 ± 0.19	ZF24	叶 Leave	57.67 ± 0.45
ZF3	茎 Stem	15.76 ± 0.31	ZF25	茎 Stem	59.60 ± 0.41
ZF4	茎 Stem	10.72 ± 0.24	ZF26	茎 Stem	13.18 ± 0.18
ZF5	茎 Stem	15.39 ± 0.28	ZF27	茎 Stem	184.15 ± 1.05
ZF6	茎 Stem	20.22 ± 0.39	ZF28	叶 Leave	67.17 ± 0.79
ZF7	叶 Leave	76.00 ± 0.45	ZF29	根 Root	10.91 ± 0.22
ZF8	根 Root	254.31 ± 4.51	ZF30	根 Root	5.44 ± 0.15
ZF9	根 Root	26.09 ± 0.29	ZF31	茎 Stem	257.42 ± 1.57
ZF10	茎 Stem	506.46 ± 3.63	ZF32	叶 Leave	29.41 ± 0.33
ZF11	茎 Stem	1.23 ± 0.11	ZF33	茎 Stem	1.82 ± 0.17
ZF12	根 Root	69.44 ± 0.65	ZF34	茎 Stem	43.62 ± 0.43
ZF13	茎 Stem	17.20 ± 0.16	ZF35	茎 Stem	87.18 ± 0.55
ZF14	叶 Leave	41.82 ± 0.39	ZF36	茎 Stem	132.52 ± 0.66
ZF15	茎 Stem	59.84 ± 0.48	ZF37	根 Root	90.59 ± 0.48
ZF16	根 Root	94.03 ± 0.57	ZF38	茎 Stem	33.36 ± 0.34
ZF17	根 Root	107.85 ± 1.11	ZF39	茎 Stem	9.67 ± 0.19
ZF18	茎 Stem	33.02 ± 0.43	ZF40	根 Root	98.96 ± 0.51
ZF19	茎 Stem	11.74 ± 0.21	ZF41	叶 Leave	35.50 ± 0.43
ZF20	茎 Stem	108.38 ± 0.67	ZF42	茎 Stem	38.05 ± 0.42
ZF21	根 Root	64.74 ± 0.71	ZF43	茎 Stem	80.49 ± 0.59
ZF22	茎 Stem	20.50 ± 0.23			

与固氮酶活性高低呈正相关, 该结果与胡文哲等(2016)的结果一致。对筛选到的43株菌株进行固氮酶活性的测定, 其值分布在10.82 nmol C₂H₂/(mL·h) (菌株ZF1)–506.46 nmol C₂H₂/(mL·h) (菌株ZF10)之间, 表明菌株的固氮酶活性差异较大(表1)。

利用乙炔还原法筛选到43株来源于高秆野生稻的内生固氮菌后, 在DNA水平上通过PCR进一步检测固氮酶*nifH*基因。在各个类群选取2–3株代表菌株均扩增出约360 bp的固氮酶*nifH*基因片段。

2.2 IS-PCR指纹图谱

采用高分辨率的聚丙烯酰胺凝胶电泳, 可以清晰区分IS-PCR指纹图谱类型。在80%的相似性水平上, 43株内生固氮菌聚成6个类群, 从DNA水平上对分离的菌株进行聚类, 初步反映了菌株具较高的多样性。类群I–V的菌株数较多, 每个类群有6–9个菌

株, 类群VI菌株数为3个(图1)。

2.3 SDS-PAGE蛋白电泳聚类分析

蛋白质是基因表达的产物, 亲缘关系近的细菌在蛋白质组成上有一定的相似性, 这是蛋白质电泳分析用于细菌分类的理论基础。根据IS-PCR将所得的43株内生固氮菌的初步聚类结果, 根据图谱条带一致归为一类的原理, 将SDS-PAGE图谱进行比较分析, 共得到6个类群。各类群菌株在分子量14.4–116.0 kDa范围内蛋白质条带具有较高的相似性, 它们分别构成相应的类群。

2.4 16S rDNA序列相似性分析

根据IS-PCR指纹图谱及SDS-PAGE全细胞蛋白电泳的图谱类型结果, 在不同类群中分别选取代表菌株进行16S rRNA基因序列测定, 将测定结果在GenBank的数据库中进行比对, 得到各自亲缘关系

图1 高秆野生稻43株内生固氮菌(菌株编号及特征见表1)的IS-PCR指纹图谱聚类(UPGMA)
Fig. 1 Dendrogram obtained by UPGMA method showing the similarity of IS-PCR patterns of 43 endophytic diazotrophs isolated from *Oryza alta* . The strain numbers and characters of isolates see Table 1.

表2 高秆野生稻各类群代表菌株16S rDNA序列相似性分析结果

Table 2 Similarity of 16S rDNA sequences of representative strain of each group isolated from *Oryza alta*

类群 Groups	代表菌株 Representative strain	最相似菌株名称(GenBank登录号) Closely related strain (GenBank accession number)	相似性 Similarity (%)
I	ZF3	土生乌拉尔菌 <i>Raoultella terrigena</i> ATCC33257 ^T (NR_114503)	99.79
II	ZF8	类肺炎克雷伯氏菌肺炎亚种 <i>Klebsiella quasipneumoniae</i> subsp. <i>quasipneumoniae</i> 01A030 ^T (HG933296)	99.86
III	ZF13	越南伯克霍尔德氏菌 <i>Burkholderia vietnamiensis</i> LMG10929 ^T (AF097534)	99.93
IV	ZF15	肠杆菌 <i>Enterobacter</i> sp. R4-368 (CP005991_s)	99.59
V	ZF24	门多萨假单胞菌 <i>Pseudomonas mendocina</i> NBRC14162 ^T (BBQC01000018)	99.03
VI	ZF43	固氮植物菌 <i>Phytobacter diazotrophicus</i> LS8 ^T (DQ821583.2)	99.37

图2 基于16S rRNA基因序列的高秆野生稻各类群代表菌株的Neighbor-joining树(分支数字代表自展支持率, 标尺代表核苷酸碱基差异为2%, 随机抽样计算次数为1,000)

Fig. 2 Neighbor-joining tree based on the 16S rRNA gene sequences of representative strains of each group isolated from *Oryza alta*. Branch numbers represent the support rate of self-development. Scales represent the difference of nucleotide bases, which is 2%. The number of random sampling calculations is 1,000.

图3 高秆野生稻代表菌株碳源利用测定结果的UPGMA聚类分析

Fig. 3 A UPGMA clustering analysis of the carbon sources of representative strains isolated from *Oryza alta*

最近的菌株, 结果见表2。各类群之间的系统发育关系树见图2, 类群I、II、IV、VI的亲缘关系比较近, 类群III、V的亲缘关系比较远。

2.5 碳源利用(Biolog板)测定结果

对6个类群的代表菌株ZF3、ZF8、ZF13、ZF15、ZF24、ZF43进行碳源利用测定, 结果显示: 在95种碳源中, 6种菌株能够共同利用的有16种, 分别为: 蔗糖、D-甘露醇、D-半乳糖、D-果糖、龙胆二糖、甘露醇、山梨糖醇、葡萄糖酸钠、柠檬酸钠、乳酸

钠、甘油、D-葡萄糖醛酸盐、半乳糖醛酸盐、N-乙酰葡萄糖胺、L-丙氨酸、组氨酸; 6种菌株都不能利用的有5种, 分别为: D-阿拉伯糖、D-阿糖醇、木糖醇、水杨酸钠、肌苷。其中有74种碳源不同菌株之间利用存在明显的差异, 表明高秆野生稻的内生固氮菌具有多样性。通过菌株对碳源利用的差异, 对菌株进行聚类分析, 在78%的相似性水平上, 可以区分为6个不同类群(图3)。Biolog聚类图揭示的6株菌之间的类群关系与16S rRNA基因的聚类的类

群关系高度相似(图3)。

3 讨论

采用无氮培养基从高秆野生稻中分离纯化了43株内生固氮菌, 它们的固氮酶活性随宿主来源及其分离部位不同而显示出一定的差异, 分布在10.82–506.46 nmol C₂H₂/(mL·h)之间。田宏等(2005)从禾本科草坪草根际分离到10株固氮酶活性较高的菌株, 其值分布在37.78–180.20 nmol C₂H₂/(mL·h)之间。相比之下, 本文测得的菌株固氮酶活性范围更广一些, 这可能与本文分离得到的固氮菌种类更多、固氮效率更多样有关。编码固氮酶铁蛋白组分结构基因*nifH*核苷酸序列具有高度的保守性, 可证明这些固氮菌的存在。从图1中可以看出: 这43株内生固氮菌代表菌株均扩增出*nifH*基因, 这与用乙炔还原法测定这些菌株均有固氮酶活性的结果一致。

蛋白质是基因表达的产物, 通过对蛋白质的组成成分进行分析, 可以反映出生物间的相互关系。通过SDS-PAGE全细胞蛋白电泳, 可将细菌细胞中的各种蛋白组分进行分离并对电泳图谱进行聚类分析。谭志远和陈文新(1998)利用SDS-PAGE对不同的根瘤菌菌株进行了聚类。取自不同地点的宿主植物, 其内生固氮菌的种群和数量也不一样, 如Malik等(1993)从巴基斯坦不同地点的水稻根际分离获得固氮菌21种(6个属)。本研究采用高分辨率的聚丙烯酰胺凝胶电泳对IS-PCR多态性指纹图谱检测, 结果表明IS-PCR指纹图谱结果与蛋白质图谱类型结果一致, 从DNA分子水平上证实了这43株内生固氮菌属于6个不同的类群。IS-PCR指纹图谱聚类分析、SDS-PAGE全细胞蛋白电泳图谱与16S rDNA部分序列测定的结果具有较好的一致性。

类群I的土生拉瓦尔菌(*Raoultella terrigena*)的最初名称为*Klebsiella terrigena*, 与类群II的类肺炎克雷伯氏菌类肺炎亚种(*Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae*)属于同一个属(Drancourt et al, 2001)。其中类群I、II、IV及VI的菌株都属于肠杆菌科的菌株。

类群III的越南伯克氏菌(*Burkholderia vietnamiensis*)最初报道是从越南含硫的酸性土壤栽培水稻(*Oryza sativa*)中分离的(Trân et al, 1996), 但也出现在香根草植物内生菌(赵现伟等, 2010)中, 是马来

西亚麻拉果(*Napa palm*, *Nypa fruticans*)根组织中的主要内生固氮细菌(Tang et al, 2010)。除促进植物生长及固氮、解磷、解钾等作用, 也是植物的生物防控菌(陈凯等, 2008), 还产生杀线虫活性物质(王贻莲等, 2014), 由于是条件型致病菌, 它在农业生产中的应用受到限制。

类群VI的固氮植物菌*Phytobacter diazotrophicus*是我们与从普通野生稻中分离到并于2008年发表的新属、新种(Zhang et al, 2008), 具有固氮和促进水稻生长的作用, 这次我们又从高秆野生稻(*Oryza. alta*)中分离到该类群, 说明它有可能是野生稻的常宿内生固氮菌。

类群V的门多萨假单胞菌(*Pseudomonas mendo-cina*)也是条件型的致病菌(Ruggiero et al, 2016)。该类群的菌株能够降解如3-羟基丁酸-co-3-羟基戊酸共聚物(PHBV) (高佳等, 2013), 还能产脂肪酶(王建荣等, 2013)。

微生物对不同碳源利用的偏好性可以用碳代谢指纹图谱来表示。碳代谢指纹图谱也是对微生物群落宏基因组碳代谢能力的一种评估(Belviso et al, 2014; Gryta et al, 2014), 同时也是一种数学映射, 并且在环境因子确定的条件下, 这种映射是双射, 即微生物群落的碳代谢指纹图谱是受微生物群落宏基因组决定的, 这正是碳代谢指纹图谱对微生物群落遗传结构聚类分析的理论依据, 碳源代谢的多样性反映了微生物从环境获取碳源能力的多样性及对环境变化的适应能力。野生稻内生固氮菌多样性说明野生稻内生固氮菌从环境中获取碳源和氮素的适应能力可能较强。

本研究通过对菌株固氮酶活性测定、*nifH*基因的扩增、SDS-PAGE全细胞蛋白电泳图谱类型、IS-PCR指纹图谱分析及Biolog板碳源利用测定结果聚类分析, 结果表明来自高秆野生稻组织中内生菌的种类具有多样性, 为扩大植物内生固氮菌种的资源库及野生稻与相关植物固氮菌方面的研究打下了一定基础。

参考文献

- Baldani VLD, Alvarez MA, Baldani JI (1986) Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. *Plant & Soil*, 90, 35–46.
Belviso S, Giordano M, Ambrosoli R, Minati JL, Bertolino M,

Zeppa G (2014) Assessment of lactic acid bacteria sensitivity to terpenoids with the Biolog methodology. *Dairy Science & Technology*, 94, 195–203.

Chen K, Li JS, Yang HT, Wei YL, Huang YJ, Zhou HZ (2008) Biocontrol and yield-increasing effects of *Burkholderia vietnamiensis* recombinant strain B418-37 in greenhouse. *Shandong Agricultural Sciences*, (7), 58–60. (in Chinese with English abstract) [陈凯, 李纪顺, 杨合同, 魏艳丽, 黄玉杰, 周红姿 (2008) 越南伯克霍尔德氏工程菌株 B418-37 的温室防病增产效果. *山东农业科学*, (7), 58–60.]

Döbereiner J, Day JM (1976) Associative symbioses in tropical Grasses: Characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: *Proceedings of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation* (eds Newton WE, Nyman CJ), pp. 518–538. Washington State University Press, Pullman.

Drancourt M, Bollet C, Carta A, Rousselier P (2001) Phylogenetic analyses of *Kebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 925–932.

Gao J, Jiang HS, Wang ZY (2013) The degradation of PHBV by *Pseudomonas mendocina* DS04-T. *Journal of Liaoning University of Petroleum & Chemical Technology*, 33(3), 4–7. (in Chinese with English abstract) [高佳, 姜虎生, 王战勇 (2013) 门多萨假单胞菌DS04-T对PHBV降解性能研究. *辽宁石油化工大学学报*, 33(3), 4–7.]

Gryta A, Frąc M, Oszust K (2014) The application of the Biolog ecoplate approach in ecotoxicological evaluation of dairy sewage sludge. *Applied Biochemistry & Biotechnology*, 174, 1434–1443.

Hu WZ, Tan ZW, Wang Y, Xu XW, Tan ZY (2016) Isolation, identification and phylogenetic analysis of endophytic diazotrophs from *Oryza officinalis* grown in Tengxian County. *Biotechnology Bulletin*, 32(6), 111–119. (in Chinese with English abstract) [胡文哲, 谭泽文, 王勇, 徐美微, 谭志远 (2016) 藤县药用野生稻内生固氮菌分离鉴定及系统发育分析. *生物技术通报*, 32(6), 111–119.]

Liu LF, Cun HC, He PF, Di YN, Wu YX, He LL, Li FS, He YQ (2019) Isolation, identification and multiple function analyses of sugarcane endophytes. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 40, 1144–1152. (in Chinese with English abstract) [刘鲁峰, 寸海春, 何鹏飞, 狄义宁, 吴毅歆, 何丽莲, 李富生, 何月秋 (2019) 甘蔗内生菌分离鉴定及功能多样性研究. *热带作物学报*, 40, 1144–1152.]

Liu LH, Jiang HM, Wang PX, Tang XY, Peng GX, Tan ZY (2017) Research progress on diversity of endophytic diazotrophs in wild rices. *Current Biotechnology*, 7, 567–579. (in Chinese with English abstract) [刘丽辉, 蒋慧敏, 王佩旋, 唐小钰, 彭桂香, 谭志远 (2017) 野生稻内生固氮菌多样性研究进展. *生物技术进展*, 7, 567–579.]

Malik K, Rasul G, Hassan U, Mehnaz S, Ashraf M (1993) Role of N₂-fixing and growth hormone producing bacteria in improving growth of wheat and rice. In: *The Sixth International Symposium on Nitrogen Fixation with Non-legumes* (eds Hegazi NA, Fayez M, Monib M), The American University in Cairo Press, Cairo.

Mashiane AR, Adeleke RA, Bezuidenhout CC, Chirima GJ (2018) Community composition and functions of endophytic bacteria of Bt maize. *South African Journal of Science*, 114, 88–97.

Palus JA, Borneman J, Ludden PW, Triplett EW (1996) A diazotrophic bacterial endophyte isolated from stems of *Zea mays* L. and *Zea luxurians* Iltis and Doebley. *Plant Soil*, 186, 135–142.

Paungfoo-Lonhienne C, Lonhienne TG, Yeoh YK, Webb RI, Lakshmanan P, Chan CX, Lim PE, Ragan MA, Schmidt S, Hugenholtz P (2014) A new species of *Burkholderia* isolated from sugarcane roots promotes plant growth. *Microbial Biotechnology*, 7, 142–154.

Ruggiero NA, Chang M, Brown S (2016) *Pseudomonas mendocina* bacteremia: A case study and review of literature. *Infectious Diseases in Clinical Practice*, 24, 314–317.

Shabanamol S, Divya K, George TK, Rishad KS, Sreekumar TS, Jisha MS (2018) Characterization and in plant nitrogen fixation of plant growth promoting endophytic diazotrophic *Lysinibacillus sphaericus* isolated from rice (*Oryza sativa*). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 102, 46–54.

Shi GY, Zeng Q, Nong ZM, Ye XL, Cen ZL, Li YR, Hu CJ (2019) Identification of an endophytic nitrogen-fixing bacterium NN08200 from sugarcane and its growth promotion of sugarcane. *Microbiology China*, 46, 1336–1345. (in Chinese with English abstract) [史国英, 曾泉, 农泽梅, 叶雪莲, 岑贞陆, 李杨瑞, 胡春锦 (2019) 一株高效甘蔗内生固氮菌NN08200的鉴定及其对甘蔗的促生长作用. *微生物学通报*, 46, 1336–1345.]

Tan ZY, Chen WX (1998) SDS-PAGE of whole cell protein of new rhizobial groups and 16S rDNA sequencing of their representatives. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 4, 65–69. (in Chinese with English abstract) [谭志远, 陈文新 (1998) 根瘤菌新类群的全细胞蛋白电泳及 16S rDNA全序列分析. *应用与环境生物学报*, 4, 65–69.]

Tan ZY, Hurek T, Vinuesa P, Mueller P, Ladha JK, Reinhold-Hurek B (2001) Specific detection of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* strains colonizing rice (*Oryza sativa*) roots by 16S–23S ribosomal DNA intergenic spacer-targeted PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 3655–3664.

Tang SY, Hara S, Melling L, Kah-Joo G, Hashidoko Y (2010) *Burkholderia vietnamiensis* isolated from root tissues of nipa palm (*Nypa fruticans*) in Sarawak, Malaysia, proved to be its major endophytic nitrogen-fixing bacterium. *Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan*, 74, 1972–1975.

Tian H, Zhang DG, Yao T, Xi LQ (2005) Isolation and chara-

- cteristics of nitrogen fixation bacteria in rhizosphere of turfgrass. Grassland of China, 27(5), 49–54. (in Chinese with English abstract) [田宏, 张德罡, 姚拓, 席琳乔 (2005) 禾本科草坪草固氮菌株筛选及部分特性初步研究. 中国草地, 27(5), 49–54.]
- Trân VV, Berge O, Balandreau J, Kê SN, Heulin T (1996) Isolation and nitrogenase activity of *Burkholderia vietnamiensis*, a nitrogen-fixing bacterium associated with rice (*Oryza sativa* L) on a sulphate acid soil of Vietnam. Agronomie, 16, 479–481.
- Verma SC, Ladha JK, Tripathi AK (2001) Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. Journal of Biotechnology, 91, 127–141.
- Wang JR, Chen LZ, Luo CC, Zhong KX, Nie JM, Li YY (2013) Cloning of the lipase gene of *Pseudomonas mendocina* P10 and its expression in *Pichia pastoris*. Science and Technology of Food Industry, 34(12), 169–172. (in Chinese with English abstract) [王建荣, 陈丽芝, 罗长财, 钟开新, 聂金梅, 李阳源 (2013) 门多萨假单胞菌 *Pseudomonas mendocina* P10 脂肪酶基因的克隆及其在酵母中的表达. 食品工业科技, 34(12), 169–172.]
- Wang YL, Chen K, Li Z, Wu YZ, Guo K, Li JS, Yang HT (2014) Isolation and identification of nematocidal active substance from *Burkholderia vietnamiensis* B418. Plant Protection, 40(4), 65–69. (in Chinese with English abstract) [王贻莲, 陈凯, 李哲, 吴远征, 郭凯, 李纪顺, 杨合同 (2014) 越南伯克霍尔德氏菌 B418 杀线虫活性产物的分离鉴定. 植物保护, 40(4), 65–69.]
- Wei GH, Zhu ME (1999) Applications of molecular biological methods on taxonomy of rhizobia. Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry (Natural Science Edition), 27(2), 3–5. (in Chinese with English abstract) [韦革宏, 朱铭莪 (1999) 分子生物学新方法在根瘤菌分类中的应用. 西北农业大学学报, 27(2), 3–5.]
- Zhang GX, Peng GX, Wang ET, Yan H, Yuan Q H, Zhang W, Lou X, Wu H, Tan ZY (2008) Diverse endophytic nitrogen-fixing bacteria isolated from wild rice *Oryza rufipogon* and description of *Phytobacter diazotrophicus* gen. nov. sp. Nov. Archives of Microbiology, 189, 431–439
- Zhao XW, Peng GX, Zhang ZY, Qiu YX, Zhang ZM, Zhang GQ, Tan ZY (2010) A novel grouping method: ddT clustering assessment of the diversity of associated nitrogen-fixing bacteria isolated from *Vetiveria zizanioides*. Chinese Science Bulletin, 55, 562–571. (in Chinese with English abstract) [赵现伟, 彭桂香, 张志英, 邱永雄, 张泽民, 张桂权, 谭志远 (2010) 细菌聚类新方法: ddT 聚类技术分析香根草联合固氮菌多样性. 科学通报, 55, 562–571.]

(责任编辑: 东秀珠 责任编辑: 时意专)