

## 攀枝花地区烤烟可培养内生固氮菌的多样性

陈静<sup>1,5</sup> 李斌<sup>2</sup> 曾庆宾<sup>3</sup> 罗定棋<sup>4</sup> 王昌全<sup>1</sup> 陈强<sup>1</sup> 刘松青<sup>5\*</sup> 辜运富<sup>1\*</sup>

(1. 四川农业大学资源学院 微生物学系 四川 成都 611130)

(2. 中国烟草总公司四川省公司 四川 成都 610017)

(3. 四川省烟草公司攀枝花市公司 四川 攀枝花 617026)

(4. 四川省烟草公司泸州市烟草公司 四川 泸州 646000)

(5. 成都师范学院化学与生命科学学院 四川 成都 611130)

**摘 要:**【目的】认识烤烟(Flue-cured tobaccos)内生固氮菌多样性,挖掘内生固氮菌资源,丰富内生固氮菌基因库。【方法】运用纯培养法、重复因子扩增(BOX-PCR)分析技术、16S rRNA 基因测序和系统发育分析对内生固氮菌多样性和系统发育进行研究,并测定分离菌株的固氮酶活性、溶磷溶钾特性、吲哚乙酸(IAA)含量等指标。【结果】通过 Ashby 培养基共分离得到 62 株固氮菌。基于 BOX-PCR 图谱选取 16 株代表菌株进行 16S rRNA 基因序列测定。16S rRNA 基因序列系统发育分析显示,62 株菌株分属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)、泛菌属(*Pantoea*)、短小杆菌属(*Curtobacterium*)等 3 个属,其中芽孢杆菌属(*Bacillus*)为优势菌属。62 株菌株中有 20 株菌株(占总分离菌株的 32.3%)具有固氮酶活性,8 株菌株(占总分离菌株的 12.9%)能产 IAA,有 4 株(占总分离菌株的 6.5%)表现溶磷活性,有 3 株(占总分离菌株的 4.8%)表现溶钾活性。【结论】攀枝花烤烟有较为丰富的内生固氮菌,具有潜在应用价值。

**关键词:** 烤烟, 内生固氮菌, 生物多样性, 16S rRNA 基因

**Foundation item:** Key Technology Project of Tobacco Companies of China National Tobacco Corporation Sichuan Company (No. SCYC201504)

**\*Corresponding authors:** LIU Song-Qing: E-mail: biosq@126.com

GU Yun-Fu: Tel: 86-28-86290982; E-mail: gungyf@163.com

**Received:** January 25, 2016; **Accepted:** May 23, 2016; **Published online** (www.cnki.net): June 08, 2016

基金项目: 中国烟草总公司四川分公司重点科技项目(No. SCYC201504)

**\*通讯作者:** 刘松青: E-mail: biosq@126.com

辜运富: Tel: 86-28-86290982; E-mail: gungyf@163.com

收稿日期: 2016-01-25; 接受日期: 2016-05-23; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-06-08

## Diversity of culturable endophytic diazotrophic bacteria in flue-cured tobacco in Panzhihua

CHEN Jing<sup>1,5</sup> LI Bin<sup>2</sup> ZENG Qing-Bin<sup>3</sup> LUO Ding-Qi<sup>4</sup> WANG Chang-Quan<sup>1</sup>  
CHEN Qiang<sup>1</sup> LIU Song-Qing<sup>5\*</sup> GU Yun-Fu<sup>1\*</sup>

(1. Department of Microbiology, College of Resource, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China)

(2. China National Tobacco Corporation, Sichuan Company, Chengdu, Sichuan 610017, China)

(3. Panzhihua Branch, Sichuan Tobacco Company, Panzhihua, Sichuan 617026, China)

(4. Luzhou Branch, Sichuan Tobacco Company, Luzhou, Sichuan 646000, China)

(5. College of Chemistry and Life Science, Chengdu Normal University, Chengdu, Sichuan 611130, China)

**Abstract:** [Objective] To study the diversity of endophytic diazotrophic bacteria in flue-cured tobacco, explore the resource of endophytic diazotrophic bacteria, and enrich the gene pool of endophytic diazotrophic bacteria. [Methods] Pure culture, transcription factor amplification (BOX-PCR), 16S rRNA gene sequencing, and phylogeny analysis were applied to study the diversity and phylogeny of endophytic diazotrophic bacteria strains isolated from flue-cured tobacco leaf. The nitrogenase activities, phosphorus and potassium solubilizing activities and indole-3-acetic acid (IAA) production of the isolates were also evaluated. [Results] Totally, 62 endophytic diazotrophic strains were isolated by using Ashby culture media. Based on the BOX-PCR patterns, 16 typical strains were selected for further 16S rRNA gene sequencing. Phylogeny analysis results based on the 16S rRNA gene sequences showed that the isolates were affiliated to 3 genera, including *Bacillus*, *Pantoea*, and *Curtobacterium*. *Bacillus* was the dominant species among all the isolates. 32.3% (20/62) of the isolates exhibited nitrogenase activities, 12.9% (8/62) showed abilities in producing IAA, 6.5% (4/62) had phosphate solubilizing activities and 4.8% (3/62) possessed potassium releasing activities. [Conclusion] Abundant culturable endophytic diazotrophic bacteria existed in flue-cured tobacco and showed a potential application prospect.

**Keywords:** Flue-cured tobacco, Endophytic diazotrophic bacteria, Biodiversity, 16S rRNA gene

植物内生菌是指生活史中某一阶段生活在植物组织内, 对植物没有明显病害症状的一类微生物, 包括内生细菌、内生真菌和内生放线菌<sup>[1]</sup>。有研究表明, 植物内生菌和其宿主之间存在着相互依存或互惠的关系<sup>[2]</sup>。宿主植物产生的光合产物可为内生菌提供营养, 而内生菌产生的促生抗菌活性物质能够促进植物生长、发育, 提高植物抗逆性。内生菌产生丰富多样的次生代谢产物, 具有多种生物活性, 在农业和医药业具有重要的应用潜力。植物内生固氮菌是一类能定殖在植物内部, 并与植物宿主联合固氮, 对植物基本无害的微生物<sup>[3-4]</sup>。内生固氮菌占据着植物组织内有利于营养供应和微环境适宜的生态位, 避免了化合态氮的抑制及土著微生物的竞争, 较根外环境更有利于形成高效固氮体系, 进而促进作物的生长及

产量的提高<sup>[5-7]</sup>。

有关烤烟内生菌研究, 主要集中于烤烟和白肋烟内生真菌和内生细菌功能鉴定方面<sup>[8]</sup>。王万能等通过筛选分离到的烤烟内生细菌, 获得了对烟草黑胫病有很好防效的菌株, 在温室控病实验中发现, 这些内生菌不仅具有较广的抗菌谱, 而且表现出较好的烤烟促生长特点<sup>[9]</sup>。陈微等对旺长期烤烟中 K326 内生细菌多样性进行了研究, 分离获得 193 株内生细菌, 鉴定出微杆菌属 (*Microbacterium*) 等 34 个不同的属, 其中有 20 株菌具有淀粉酶活力、19 株菌有蛋白酶活力、27 株菌具有木聚酶活力<sup>[10]</sup>。奚家勤等以烤烟品种中 K326 为材料分离内生细菌, 并以烟草黑胫病菌 (*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*) 为靶标病原真菌, 筛选出 168 株拮抗菌, 对黑胫病菌的抑制率

在 12.54%–50.14% 之间, 这些内生细菌包括芽孢杆菌属(*Bacillus*)、短芽孢杆菌属(*Brevibacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*) 3 个属<sup>[11]</sup>。上述研究显示, 烤烟内生菌种群多样, 具有潜在应用价值, 是一个重要的微生物资源库。但迄今为止, 关于烤烟内生固氮菌的研究尚未见相关报道。

本研究通过纯培养手段和分子生物学手段 (BOX-PCR) 对烤烟内生固氮菌进行了分离及遗传多样性分析, 以期揭示烤烟烟叶内生固氮菌的多样性特征, 为丰富固氮微生物菌种资源库和开发利用烤烟内生固氮菌提供基础理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 采样点简介:** 攀枝花市位于 101°08′–102°15′E、26°05′–27°21′N, 中国西南川滇交界部, 金沙江与雅砻江汇合处。年均气温 20 °C, 降水充沛且多为夜雨, 日照充足, 全年无霜期 300 d 以上, 具有利于优质烤烟生长的良好气候和生态环境。攀枝花是四川省优质烤烟产区之一, 主要集中分布在仁和区和米易县。本次样品取自米易县云峰乡 (101°57′0.64″E、26°57′4.70″N)、新山乡 (102°09′57.26″E、26°50′28.11″N)、草场乡 (102°07′9.94″E、26°55′0.52″N) 和仁和区 (101°44′13.49″E、26°30′4.57″N)。取样地点为植烟时间 10 年以上, 且烟草质量、产量都较高的种植区。

**1.1.2 供试材料及采样方法:** 于 2014 年 7 月中旬, 以云 87 为供试材料, 在旺长期进行采样。在田间按“五点法”采集长势相近的烤烟植株下层叶片, 每点 10 株, 每株 5 叶, 共 50 片叶, 记录采样时烤烟的农艺性状。将叶片装入没有拆封的保鲜袋中, 贴上标签并封口, 置于 4 °C 保温箱中迅速带回实验室。

**1.1.3 培养基:** 内生固氮菌分离用 Ashby 培养基<sup>[12]</sup>、溶钾能力测定用溶钾筛选培养基<sup>[13]</sup>、溶磷能力测定用溶磷筛选培养基<sup>[14]</sup>。

**1.1.4 主要试剂和仪器:** 2×Taq PCR Master Mix, 天根生化科技(北京)有限公司; 硅藻土, 美国

Promega 公司; 各种引物, 上海生工生物工程股份有限公司; Thermo Scientific™ TRACE™ 1300 气相色谱仪, 美国 Thermo fisher 公司; UV-2100 紫外可见光光度计, 美国 Unicoh 公司; T100 PCR 仪, 美国 Bio-Rad 公司。

### 1.2 菌株分离

选取烤烟叶片各 5 g 进行表面消毒, 方法参考王泽等<sup>[15]</sup>的报道。研磨后将研磨液涂于 Ashby 培养基平板上, 以最后一遍的洗涤水作对照, 以检测表面消毒是否彻底。28 °C 倒置培养 3–4 d, 根据菌落大小、形态和色泽等表观特征挑取单菌落并进行划线纯化。

### 1.3 固氮酶活性测定

固氮酶活性测定采用乙炔还原法<sup>[16]</sup>。将纯化后的内生固氮菌接种于 10 mL Ashby 半固体培养基的血清瓶中, 重复 3 次, 28 °C 培养 48 h, 在无菌条件下将血清小瓶盖换成橡胶塞, 用无菌注射器抽出 10% 的气体, 然后给每瓶注入 2 mL C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, 继续培养 24 h。从各培养瓶中取反应气体 10 μL, 注入气相色谱仪中, 测定 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 和 C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> 含量。以接种但未注入 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 的血清小瓶作为对照。按下列公式计算固氮酶活性  $N = (hx \times c \times V) / (hs \times \text{常数} \times t)$ 。式中,  $hx$  为样品峰值,  $hs$  为标准 C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> 峰值,  $c$  为标准 C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> 浓度 (mol/L),  $V$  为小瓶体积 (mL), 常数为标准 C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> 在测试时的体积 (mL),  $t$  为培养时间 (h),  $N$  为 C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> 浓度, 即固氮酶活, 单位: μmol·(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)/(h·mL)。

### 1.4 溶磷溶钾特性测定

为评价分离菌株的应用潜力, 采用培养基溶解圈法<sup>[13–14]</sup>测定菌株的溶磷溶钾特性。将分离菌株点接于筛选培养基上, 28 °C 培养 7 d, 观察接种菌株周围有无透明溶解圈形成。测定溶解圈直径, 计算 HD/CD 值 (其中 HD 为溶解圈直径, CD 为菌落直径) 来表征溶磷溶钾能力。每个菌株重复 4 次。

### 1.5 分泌吲哚乙酸 (IAA) 特性测定

采用 Salkowski 比色法<sup>[17]</sup>测定分离菌株分泌 IAA 能力。取培养到对数期的菌液 50 μL 于含 0.5 g/L 色氨酸的牛肉膏液体培养基中, 重复 3 次,

28 °C、140 r/min 培养到对数期(36 h)，每支试管取 50 μL 菌液于洗净白瓷板中，加入 100 μL Salkowski 显色剂，25 °C 下避光 30 min，如出现粉红色，表明产生 IAA。

定量测定上述分泌吲哚乙酸分离菌株的 IAA 产量。8 000 r/min 离心 5 min 获得培养物上清液 2 mL，加入 4 mL Salkowski 显色剂，25 °C 下避光 30 min 后，530 nm 下比色测定其吸光度 OD 值，重复 3 次。以空白培养基作对照，并以 IAA 的标准样品对应的光密度做标准曲线，计算 IAA 的产量(mg/L)=(OD 值-固定值 B)/系数 K。

1.6 DNA 提取及 BOX-PCR 分析

将菌株活化后接种于 Ashby 培养基，28 °C 培养 2 d，挑取单菌落采用硅藻土提取 DNA<sup>[18]</sup>，然后用 1%琼脂糖凝胶检测，-20 °C 保存。选取 BOX 引物 (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') 进行 PCR 扩增<sup>[19]</sup>。PCR 反应体系：2×Taq PCR Master Mix 12.5 μL，引物(10 μmol/L) 0.5 μL，模板 DNA (10 mg/L) 1 μL，加 ddH<sub>2</sub>O 补齐至 25 μL。PCR 反应条件：95 °C 4 min；95 °C 1 min，55 °C 1 min，65 °C 8 min，共 35 个循环；65 °C 16 min。扩增产物以 2 000 bp DNA ladder 作分子量标准，在 80 V 电压下经 1.0%琼脂糖凝胶电泳 60 min，用凝胶成像系统拍照检测。将 BOX-PCR 图谱中同一位置有带的记为“1”，无条带的记为“0”。采用软件 NTSYSpc 2.1 中的平均连锁聚类法(UPGMA)进行聚类分析并获得树状图谱。

1.7 16S rRNA 基因测序及系统发育树构建

基于菌落特征、溶磷溶钾能力和 IAA 产量以及 BOX-PCR 遗传分型综合结果，选取代表菌株以引物 1492r [5'-TACGG(C/T)TACCTTGTTACGACT T-3']和 25f (5'-AACTKAAGAGTTTGATCCTGGC TC-3')进行分离菌株 16S rRNA 基因片段的扩增<sup>[20]</sup>。PCR 反应体系：2×Taq PCR Master Mix 25 μL，引物(10 μmol/L)各 0.5 μL，模板 DNA (10 mg/L) 1 μL，加 ddH<sub>2</sub>O 补齐至 50 μL。PCR 反应条件：94 °C 5 min；94 °C 1 min，56 °C 1 min，72 °C 2 min，共 35 个循环；72 °C 10 min。扩增产物送上海生工生物工程股份有限公司测序。将所得序列上传到 NCBI 网站进行比对，利用 ClustalX 软件进行多序列比对<sup>[21]</sup>，用 MEGA 5.0 软件采用邻接法(Neighbor-Joining)构建系统发育树。序列信息查询号为：KU298550-KU298565。

2 结果与分析

2.1 烤烟旺长期农艺性状

攀枝花不同地区烤烟旺长期农艺性状见表 1。除云峰烤烟各指标值相对较大外，其他地区烤烟农艺性状间的差异不大。云峰烤烟的株高、叶面积系数、节距和茎围都比其他地区的烤烟植株要高，颜色表现正常；而仁和烤烟植株在株高、叶片数、叶面积系数和茎围等指标方面小于其他地区的烤烟植株，叶色为黄绿色，长势表现弱于其他地区烤烟植株。

表 1 烤烟旺长期农艺性状						
Table 1 The agronomic traits of <i>Nicotiana tobacum</i> at rapid growth stage						
采样点	株高	叶片数	叶面积系数	节距	茎围	叶色
Sampling point	Plant height (cm)	Number of leaves	Leaf area index	Pitch (cm)	Stem diameter (cm)	Leaf colour
草场 Caochang	78.4	18	2.00	4.38	6.37	浅绿
新山 Xinshan	79.2	18	1.89	4.47	6.21	绿
云峰 Yunfeng	85.7	18	2.51	5.29	7.10	绿
仁和 Renhe	69.7	15	1.55	4.49	5.67	黄绿

## 2.2 内生固氮菌的分离

从攀枝花4个地区烤烟叶片中分离得到的内生固氮菌数量差异较大,其中从草场云烟87烟叶分离的固氮菌最多,为31株;其次从云峰烟叶分离到23株固氮菌,新山分离到6株;仁和烟叶分离的固氮菌最少,为2株。

## 2.3 固氮酶活性

经测定,62株内生固氮菌中有20株菌株的固氮酶活高于 $0.8 \mu\text{mol}/(\text{h}\cdot\text{mL})$ ,介于 $0.8\text{--}2.12 \mu\text{mol}/(\text{h}\cdot\text{mL})$ 之间,表现出明显的固氮酶活力(表2),其它42株菌未检测到明显固氮酶活性。20株内生固氮菌中分离自草场烟叶的有9株,云峰的6株,新山3株,仁和2株。具有明显固氮酶活的菌株中,酶活最高的是分离自米易云峰的YF13菌株,而最低的为分离自新山的XS3菌株。

## 2.4 内生固氮菌代表菌株产IAA、溶磷溶钾特性

菌株产IAA、溶磷溶钾特性指标结果(表3)表明:62株分离菌株中,有8株能产IAA,占分离菌株的12.9%;4株有溶磷能力,占分离菌株的6.5%;3株有溶钾能力,占分离菌株的4.8%。其中CC23、RH9和XS5都同时具有溶钾和溶磷的效果,这3个菌株的溶钾溶磷的功能相对较突出。

## 2.5 BOX-PCR分析与系统发育分析

为认识烤烟叶片内生固氮菌的遗传多样性,以BOX引物对供试固氮菌基因组进行PCR扩增,遗传图谱类型见表4,62株菌被分成16种不同的遗传图谱类型。

基于BOX遗传图谱,对16株代表菌株进行16S rRNA基因片段测序,片段长度约1500 bp。通过BLAST比对分析,按照匹配度最高的原则,鉴定菌株系统发育特征。其中谱带类型2的菌株数量最多,显示出它们的优势性。CC3与*Bacillus*中的*Bacillus aryabhattai* (KJ009467)相似性为100%。YF9与*Pantoea*中的*Pantoea* sp. (KF202777)相似性为91%(表4),YF4与*Bacillus*中的*Bacillus* sp. (LC065158)相似性为94%,其余菌株与匹配菌株的相似度均为99%。

利用ClustalX软件进行多序列比对,用MEGA 5.0软件构建系统发育树。系统发育分析结果(图1)表明,代表菌株分为革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌。革兰氏阳性菌有*Bacillus*和*Curtobacterium* 2个属,共13株菌,其中*Bacillus*是烤烟烟叶内生固氮菌的优势菌属,占代表菌株的62.5%。而革兰氏阴性菌只有*Pantoea*一个属,3株菌,占代表菌株的18.8%。

表2 攀枝花地区烤烟内生固氮菌的固氮酶活性

Table 2 Nitrogenase activities of the endophytic diazotrophs isolated from *Nicotiana tobacum* in Panzhihua

菌株编号 Strain code	固氮酶活性 Nitrogenase activity ( $\mu\text{mol}/(\text{h}\cdot\text{mL})$ )	分离源 Isolation resource	菌株编号 Strain code	固氮酶活性 Nitrogenase activity ( $\mu\text{mol}/(\text{h}\cdot\text{mL})$ )	分离源 Isolation resource
CC2	1.35	草场	RH9	1.93	仁和
CC3	1.29	草场	XS1	1.25	新山
CC9	1.60	草场	XS3	0.82	新山
CC12	0.97	草场	XS5	1.92	新山
CC13	1.43	草场	YF13	2.12	云峰
CC19	1.24	草场	YF1	1.67	云峰
CC1	1.53	草场	YF2	0.95	云峰
CC2	1.21	草场	YF7	1.30	云峰
RH7	2.03	仁和	YF9	1.49	云峰
CC4	0.83	草场	YF22	1.47	云峰

表 3 固氮菌代表菌株产 IAA、溶磷溶钾特性  
Table 3 IAA production, phosphate solubilizing and potassium releasing activities of representative strains of endophytic diazotrophs

菌株编号 Strain code	HD/CD		IAA 产量 Indole-3-acetic acid (IAA) production (mg/L)
	溶钾特性 Potassium solubilizing activities	溶磷特性 Phosphate solubilizing activities	
YF22 (KU298554)	Nd	Nd	0.194
CC3 (KU298555)	Nd	Nd	2.314
CC9 (KU298556)	Nd	Nd	3.940
YF4 (KU298558)	Nd	Nd	2.597
YF13 (KU298561)	Nd	Nd	0.459
CC4 (KU298565)	Nd	Nd	0.283
CC23 (KU298551)	2.50	2.50	Nd
RF9 (KU298552)	3.50	2.50	Nd
YF9 (KU298560)	Nd	Nd	0.371
XS5 (KU298564)	2.50	2.50	Nd
CC19 (KU298550)	Nd	Nd	1.643
XS3 (KU298553)	Nd	0.75	Nd

注: Nd: 未测定; HD: 溶解圈直径; CD: 菌落直径。

Note: Nd: Not detected; HD: Dissolution circle diameter; CD: Colony diameter.

表 4 内生固氮菌代表菌株的鉴定结果  
Table 4 The identification results of representative strains of the endophytic diazotrophs

种/属 Species/genus	代表菌株 Representative strain (accession No.)	谱带类型(菌株数量) rDNA type (strain number)	16S rRNA 基因比对分析 16S rRNA gene BLAST analysis	
			近缘菌株 Nearest type strain (accession No.)	相似性 Similarity (%)
Bacillaceae	YF22 (KU298554)	1 (5)	<i>Bacillus megaterium</i> (KC311342)	99
	CC3 (KU298555)	16 (1)	<i>Bacillus aryabhattai</i> (KJ009467)	100
	CC9 (KU298556)	13 (1)	<i>Bacillus megaterium</i> (KC311342)	99
	CC13 (KU298557)	12 (5)	<i>Bacillus</i> sp. (HM567010)	99
	YF4 (KU298558)	9 (1)	<i>Bacillus</i> sp. (LC065158)	94
	YF7 (KU298559)	14 (1)	<i>Bacillus aryabhattai</i> (KJ009464)	99
	YF13 (KU298561)	10 (2)	<i>Bacillus</i> sp. (JX575605)	99
	CC12 (KU298563)	3 (1)	<i>Bacillus aryabhattai</i> (KF208489)	99
	XS5 (KU298564)	5 (1)	<i>Bacillus</i> sp. (KC466112)	99
	CC4 (KU298565)	11 (1)	<i>Bacillus megaterium</i> (KR150755)	99
<i>Pantoea</i>	CC23 (KU298551)	4 (2)	<i>Pantoea</i> sp. (KP704412)	99
	RH9 (KU298552)	6 (1)	<i>Pantoea ananatis</i> (KF254658)	99
	YF9 (KU298560)	7 (1)	<i>Pantoea</i> sp. (KF202777)	91
<i>Curtobacterium</i>	CC19 (KU298550)	15 (1)	<i>Curtobacterium</i> sp. (KR906477)	99
	XS3 (KU298553)	2 (36)	<i>Curtobacterium luteum</i> (JX437941)	99
	CC24 (KU298562)	8 (2)	<i>Curtobacterium</i> sp. (KR906477)	99

注: 图谱类型根据 BOX-PCR 扩增条带片段来划分。

Note: rDNA types were defined based upon the amplification fragment of BOX-PCR.



图 1 内生固氮菌代表菌株 16S rRNA 基因序列的系统发育分析

Figure 1 Phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequences of representative strains of the endophytic diazotrophs

注：左下端标尺表示碱基置换频率，括号中的序号表示序列查询号。

Note: The scale of lower left means substitution frequency, numbers in brackets means query number of sequence information.

### 3 讨论

烤烟是茄科(Solanaceae)烟草属(*Nicotiana*)一年生或多年生草本植物。它是我国经济作物中一项重要的农产品,是卷烟生产的主要原料,也是我国出口的大宗农产品之一<sup>[22]</sup>。有研究表明,烤烟内生菌具有促进烤烟生长、防治病虫害的作用,具有潜在应用价值<sup>[23-25]</sup>。

内生固氮菌能够为宿主植物提供氮源、产生植物激素类物质、促进内根际的生理变化及溶磷等生态学作用<sup>[26-29]</sup>。罗菲等<sup>[30]</sup>以东乡野生稻(*Oryza rufipogon*)为材料,探究其根际可培养细菌多样性及其植物促生活性,结果表明东乡野生稻根际蕴含着丰富的固氮、溶磷和产 IAA 等生物活性细菌,其中溶磷菌以芽孢杆菌属(*Bacillus*)、泛菌属(*Pantoea*)和鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)为主,产 IAA 菌以泛菌属为主。周怡等<sup>[31]</sup>对大豆内生芽孢杆菌的分离和促生菌株的筛选及鉴定进行了研究,分离到的 40 株内生芽孢杆菌大部分表现出促进大豆发芽生长的能力,其中 SN<sub>10</sub>E<sub>1</sub> 菌株使豆芽长度增长 41%,百株鲜重增长 28%。通过表型测定、生理生化及 16S rRNA 基因序列分析,确定 SN<sub>10</sub>E<sub>1</sub> 菌株为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megatherium*)。谭志远等<sup>[32]</sup>从普通野生稻(*Oryza rufipogon*)中分离到 37 株内生固氮菌,并测定固氮酶活性,其值分布在 0.93  $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/(\text{h}\cdot\text{mL})$ 至 42.52  $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/(\text{h}\cdot\text{mL})$ 之间。本实验分离到的内生固氮菌表现出了明显的溶磷溶钾特性和产 IAA 能力及固氮酶活,分离菌株中有 2 株泛菌、1 株芽孢杆菌显示出溶钾活性;2 株泛菌、1 株短小杆菌属和 1 株芽孢杆菌显示出溶磷活性;8 株菌产 IAA;大部分菌株的固氮酶活较低,固氮酶酶活最高的菌株是 RH7 和 YF13,固氮酶活分别为 2.03  $\mu\text{mol}/(\text{h}\cdot\text{mL})$ 和 2.12  $\mu\text{mol}/(\text{h}\cdot\text{mL})$ 。同时,内生固氮菌分离数最多的烟株在农艺性状方面也表现最佳,显示烤烟内生固氮菌在烤烟生产上存在潜在应用价值。

关于烤烟内生菌研究,裴洲洋<sup>[33]</sup>以河南省主栽烤烟品种的根、茎、叶为试验材料,对 9 个烤烟

品种的内生真菌多样性及变化规律进行了研究,共获得 977 个菌株,其中 943 株产孢,分属于 15 个属,准确鉴定到种的有 23 种,其中链格孢菌属(*Alternaria*)和毛壳属(*Chaetomium*)是烟草内生真菌的优势属。云南省烟草农业科学研究院相关研究人员以云南省主栽烤烟品种的根、茎、叶为试验材料,系统地完成了烟草内生菌资源收集、分离、鉴定和多样性特征研究,共分离、鉴定和保藏烟草内生细菌 1 393 株,分属芽孢杆菌属(*Bacillus*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)等 30 多个属,51 个种<sup>[34]</sup>。黄晓辉等对 4 个烟草品种进行了内生菌的分离计数、初步分类与拮抗筛选研究,结果表明烟草中有大量的内生细菌存在,而且以革兰氏阴性菌为主<sup>[35]</sup>。与前人研究相似,本试验分离到的内生固氮菌属于 *Bacillus*、*Pantoea*、*Curtobacterium* 等 3 个属,其中 *Bacillus* 为优势菌属,为革兰氏阳性细菌。

综上,本文对烤烟烟叶进行了可培养内生固氮菌多样性及固氮酶活性、溶磷溶钾、促生功能分析。分离菌株分属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)、泛菌属(*Pantoea*)、短小杆菌属(*Curtobacterium*)等 3 个属,以芽孢杆菌属(*Bacillus*)内生固氮菌为优势种,表现出潜在应用价值。

### 参 考 文 献

- [1] Deng MY, Wang BC, Yang ZC, et al. The application of techniques of molecular biology in classification and identification of endophytes[J]. Amino Acids & Biotic Resources, 2006, 28(3): 9-14 (in Chinese)  
邓墨渊, 王伯初, 杨再昌, 等. 分子生物学技术在植物内生菌分类鉴定中的应用[J]. 氨基酸和生物资源, 2006, 28(3): 9-14
- [2] Chen L, Liang ZN, Zhu H. Research advances in the studies of plant entophytic[J]. Biotechnology Bulletin, 2015, 31(8): 30-34 (in Chinese)  
陈龙, 梁子宁, 朱华. 植物内生菌研究进展[J]. 生物技术通报, 2015, 31(8): 30-34
- [3] Qin LP, Huang SL, Li YR. Research progress in endophytic diazotroph[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2005, 21(2): 150-152 (in Chinese)  
覃丽萍, 黄思良, 李杨瑞. 植物内生固氮菌的研究进展[J]. 中国农学通报, 2005, 21(2): 150-152
- [4] Prakamhang J, Minamisawa K, Teamtaisong K, et al. The communities of endophytic diazotrophic bacteria in cultivated rice (*Oryza sativa* L.)[J]. Applied Soil Ecology, 2009, 42(2): 141-149
- [5] Sturz AV, Christie BR, Nowak J. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production[J].



- Critical Reviews in Plant Sciences, 2000, 19(1): 1-30
- [6] Yuan HJ, Yan H, Yang F, et al. Molecular characterization and phylogenetic analysis of endophytic nitrogen molecular characterization and phylogenetic analysis of endophytic nitrogen fixing bacteria in *Oryza australiensis*[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2014, 20(4): 571-577 (in Chinese)  
原红娟, 严慧, 杨芳, 等. 澳洲野生稻(*Oryza australiensis*)内生固氮菌的分子鉴定及发育分析[J]. 应用与环境生物学报, 2014, 20(4): 571-577
- [7] Gupta G, Panwar J, Jha PN. Natural occurrence of *Pseudomonas aeruginosa*, a dominant cultivable diazotrophic endophytic bacterium colonizing *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.[J]. Applied Soil Ecology, 2013, 64: 252-261
- [8] Li WG, Xi JQ, Xue CQ, et al. Study and application of tobacco endophytes[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2010, 26(7): 225-228 (in Chinese)  
李伟观, 奚家勤, 薛超群, 等. 烟草内生菌研究概况及其应用[J]. 中国农学通报, 2010, 26(7): 225-228
- [9] Wang WN, Quan XJ, Xiao CG. The disease-controlling and growth-promoting effects of endophytic bacteria in tobacco[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2005, 22(4): 426-431 (in Chinese)  
王万能, 全学军, 肖崇刚. 烟草内生细菌防治烟草黑胫病及促生作用研究[J]. 植物学通报, 2005, 22(4): 426-431
- [10] Chen W, Yang Y, Chen X, et al. A study on biodiversity and functional enzymes of tobacco K326 endophytes in most productive growth period[J]. Journal of Yunnan University (Natural Sciences Edition), 2013, 35(6): 874-884 (in Chinese)  
陈微, 杨莹, 陈兴, 等. 旺长期烤烟 K326 内生细菌多样性及部分菌株的酶活筛选[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2013, 35(6): 874-884
- [11] Xi JQ, Feng YL, Xue CQ, et al. Isolation, screening and phylogenetic analysis of antagonistic endophytic bacteria against *phytophthora parasitica* var. *nicotianae* from flue-cured Tobacco Variety K326[J]. Tobacco Science & Technology, 2013(3): 77-82 (in Chinese)  
奚家勤, 冯云利, 薛超群, 等. 烤烟品种 K326 内生细菌分离、抗黑胫病菌株筛选及种群组成分析[J]. 烟草科技, 2013(3): 77-82
- [12] Zhang Y, Liao Y, Chen SW, et al. Isolation, preliminary identification and nitrogen-fixation activity of endophytes from roots of one-and two-year-old *Xanthoceras sorbifolia* plants[J]. Chinese Journal of Plant Ecology, 2010, 34(7): 839-844 (in Chinese)  
张烨, 廖怡, 陈尚武, 等. 文冠果一、二年生植株根系内生菌的分离、鉴定和固氮活性[J]. 植物生态学报, 2010, 34(7): 839-844
- [13] Zhou YF, Luo YX, Liu HZ, et al. Separation and purification of the potassium-releasing bacteria[J]. Journal of Hubei Institute for Nationalities (Natural Science Edition), 2009, 27(3): 285-288 (in Chinese)  
周毅峰, 罗云霞, 刘华中, 等. 解钾菌的筛选[J]. 湖北民族学院学报: 自然科学版, 2009, 27(3): 285-288
- [14] Yu XM, Shen QB, Li BL, et al. Establishment of a screening method for phosphorus solubilizing bacteria in the soil[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2008, 29(3): 321-325 (in Chinese)  
余贤美, 沈奇宾, 李炳龙, 等. 土壤解磷细菌分离和筛选方法的建立[J]. 热带作物学报, 2008, 29(3): 321-325
- [15] Wang Z, Xu Q, Yuan M, et al. Isolation and functional characterizations of spinach endogenous nitrogen-fixing bacteria[J]. Soil and Fertilizer Sciences in China, 2015(5): 116-121 (in Chinese)  
王泽, 徐齐, 袁梅, 等. 菠菜内生固氮菌的分离及其功能特性研究[J]. 中国土壤与肥料, 2015(5): 116-121
- [16] Lu BL, Wang WL, Li J, et al. Nitrogen fixation ability of azotobacter and its effect on growth of spring wheat[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2009, 17(5): 895-899 (in Chinese)  
卢秉林, 王文丽, 李娟, 等. 自生固氮菌的固氮能力及其对春小麦生长发育的影响[J]. 中国生态农业学报, 2009, 17(5): 895-899
- [17] Bric JM, Bostock RM, Silverstone SE. Rapid *in situ* assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 57(2): 535-538
- [18] Chen Q, Zhang XP, Li DY, et al. Isolation of DNA from the root nodule of legume plant[J]. Microbiology China, 2002, 29(6): 63-67 (in Chinese)  
陈强, 张小平, 李登煜, 等. 从豆科植物的根瘤中直接提取根瘤菌 DNA 的方法[J]. 微生物学通报, 2002, 29(6): 63-67
- [19] Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes[J]. Nucleic Acids Research, 1991, 19(24): 6823-6831
- [20] Peng GX, Chen WX, Tan ZY. Identification and phylogenetic analysis of closely related rhizobium species by rRNA gene intergenic spacer sequence[J]. Journal of South China Agricultural University, 2004, 25(4): 58-62 (in Chinese)  
彭桂香, 陈文新, 谭志远. rRNA 基因间隔区序列用于亲缘关系密切的根瘤菌种群鉴定及系统发育分析[J]. 华南农业大学学报, 2004, 25(4): 58-62
- [21] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, et al. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24): 4876-4882
- [22] Xing Y, Zhang X, Hao ZP, et al. Biodiversity of endophytes in tobacco plants and their potential application—a mini review[J]. Microbiology China, 2015, 42(2): 411-419 (in Chinese)  
邢颖, 张幸, 郝志鹏, 等. 烟草内生菌资源及其应用研究进展[J]. 微生物学通报, 2015, 42(2): 411-419
- [23] Chen ZB, Yang YH, Xia ZY, et al. Screening of growth-promoting endophytic bacteria in tobacco and its application in floating seedling practice[J]. Acta Tabacaria Sinica, 2013, 19(1): 70-75 (in Chinese)  
陈泽斌, 杨跃华, 夏振远, 等. 烟草内生促生细菌的筛选及在漂浮育苗中的应用效果[J]. 中国烟草学报, 2013, 19(1): 70-75
- [24] Press CM, Wilson M, Tuzun S, et al. Salicylic acid produced by *Serratia marcescens* 90-166 is not the primary determinant of induced systemic resistance in cucumber or tobacco[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1997, 10(6): 761-768
- [25] Press CM, Loper JE, Kloepper JW. Role of iron in rhizobacteria-mediated induced systemic resistance of cucumber[J]. Phytopathology, 2001, 91(6): 593-598
- [26] Zhang LM, Fang P, Zhu RQ. Research of gramineae joint nitrogen-fixing and its application situation[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2004, 15(9): 1650-1654 (in Chinese)  
张丽梅, 方萍, 朱日清. 禾本科植物联合固氮研究及其应用现状展望[J]. 应用生态学报, 2004, 15(9): 1650-1654
- [27] Cojho EH, Reis VM, Schenberg ACG, et al. Interactions of *Acetobacter diazotrophicus* with an amylolytic yeast in nitrogen-free batch culture[J]. FEMS Microbiology Letters, 1993, 106(3): 341-346
- [28] Cavalcante VA, Dobereiner J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane[J]. Plant and Soil, 1988, 108(1): 23-31
- [29] Zhang GX, Mao Q, He ZY, et al. Detection of nitrogenase activity and phosphorus dissolving ability of endophytic isolates from *Oryza rufipogon* in Lingshui[J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2006, 12(4): 457-460 (in

- Chinese)
- 张国霞, 茅庆, 何忠义, 等. 陵水普通野生稻(*Oryza rufipogon*)内生菌的固氮及溶磷特性[J]. 应用与环境生物学报, 2006, 12(4): 457-460
- [30] Luo F, Wang Y, Zeng QG, et al. Diversity and plant growth promoting activities of the cultivable rhizobacteria of Dongxiang wild rice (*Oryza rufipogon*)[J]. Biodiversity Science, 2011, 19(4): 476-484 (in Chinese)
- 罗菲, 汪涯, 曾庆桂, 等. 东乡野生稻根际可培养细菌多样性及其植物促生活性分析[J]. 生物多样性, 2011, 19(4): 476-484
- [31] Zhou Y, Mao L, Zhang TT, et al. Isolation of endophytic bacillus from soybean seed and screening and identification of promoting strain[J]. Soybean Science, 28(3): 503-506 (in Chinese)
- 周怡, 毛亮, 张婷婷, 等. 大豆内生芽孢杆菌的分离和促生菌株的筛选及鉴定[J]. 大豆科学, 28(3): 503-506
- [32] Tan ZY, Peng GX, Xu PZ, et al. Diversity and high nitrogenase activity of endophytic diazotrophs isolated from *Oryza rufipogon* Griff[J]. Chinese Science Bulletin, 2009, 54(16): 2839-2848 (in Chinese)
- 谭志远, 彭桂香, 徐培智, 等. 普通野生稻(*Oryza rufipogon*)内生固氮菌多样性及高固氮酶活性[J]. 科学通报, 2009, 54(16): 2839-2848
- [33] Pei ZY. Studies of population diversity on endophytic fungi of tobacco and selection of biocontrol endophyte to tobacco brown spot disease[D]. Zhengzhou: Master's Thesis of Henan Agricultural University, 2009 (in Chinese)
- 裴洲洋. 烟草内生真菌种群多样性及烟草赤星病生防内生菌的筛选[D]. 郑州: 河南农业大学硕士学位论文, 2009
- [34] Yunnan Academy of Tobacco Agricultural Sciences. Research and application of endophytes in tobacco[J]. Acta Tabacaria Sinica, 2013, 19(1): 101 (in Chinese)
- 云南省烟草农业科学研究院. 烟草内生菌研究与应用[J]. 中国烟草学报, 2013, 19(1): 101
- [35] Huang XH, Yang YC, Tan ZJ, et al. Distribution characteristic of endophytic microbes in four different tobacco species[J]. Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(12): 6827-6833 (in Chinese)
- 黄晓辉, 杨友才, 谭周进, 等. 四个品种烟草内生微生物的分布特征[J]. 生态学报, 2009, 29(12): 6827-6833

## 科技信息摘录

### 人工合成 DNA 创造“全新微生物”

英国《自然》杂志 1 月 7 日公布的一项合成生物学研究显示, 科学家首次将人工合成碱基对插入大肠杆菌的 DNA 中, 且并未影响其生长和复制过程。这一成果向利用合成技术“订制”特定生物组织迈进一步。

美国研究人员构建出一种自然界不存在的生物体, 它稳定包含一种代号为“X-Y”的人工碱基对。

在最新研究中, 研究人员合成了一段包含天然碱基对和人工碱基对的 DNA, 将其插入大肠杆菌细胞中。研究的突破之一是发现了一种特殊的转运分子, 这种由一种微藻生成的三磷酸转运蛋白, 能够运输人造碱基对进入细胞。结果显示, DNA 能以适当的速度和准确度进行复制, 被改造的大肠杆菌细胞仍继续生长, 人工碱基对也没有被去除。研究负责人、斯克里斯普斯研究所的罗姆斯伯格介绍说, 虽然此次研究中的人工碱基对还不能参与制造新型蛋白质, 但从理论上说, 引入 X-Y 碱基对可将构成蛋白质的氨基酸提升到 172 种, 而目前生物体内的蛋白质是由 20 种基本氨基酸构成的。

合成生物学近年来的一大研究焦点就是通过化学手段合成人工碱基对, 在其中加入特定的遗传信息, 希望最终能制造出具有特定功能的蛋白质乃至生物组织, 用于生物医疗等领域。

北京时间 1 月 25 日消息, 据国外媒体报道, 美国加州斯克里斯普斯研究所(Scripps Research Institute)的研究人员近日用一段延伸的遗传密码创造了一种“全新”的生命形式。科学家向大肠杆菌中引入了一些该细菌中本不存在的 DNA 分子。虽然修改后的大肠杆菌遗传密码中多了两个片段, 但仍能像正常细菌一样生长和复制, 这为科学家创造全新的人造生命奠定了一定基础。

研究人员称这些经过修改的微生物为科学家提供了“创造拥有全新特征属性的微生物”的契机。未来科学家可能会着手研发能够生产新型蛋白质的微生物, 这或许能帮助我们发明新药物, 并取得纳米技术的重大突破。接下来, 科学家希望证明细胞中人工合成的 DNA 也能转录成 RNA 分子, 并参与细胞中的蛋白质合成过程。

——摘自《中国生物技术信息网》2017-02-03  
<http://www.biotech.org.cn/information/145232>