

研究报告



泓森槐可培养内生固氮细菌多样性与潜在促生长特性评价

付思远¹ 席雨晴¹ 赵鹏菲¹ 梁永健¹ 宋旭¹ 常华瑜¹ 彭桂香^{*2} 谭志远^{*1}¹ 华南农业大学农学院 广东 广州 510642² 华南农业大学资源环境学院 广东 广州 510642

摘要:【背景】泓森槐为豆科刺槐属的速生型落叶乔木，生长快，营养需求多。目前对于泓森槐内生固氮细菌的研究鲜有报道。【目的】研究泓森槐可培养内生固氮细菌的多样性及潜在促生长特性。

【方法】从表面消毒的泓森槐根、茎、叶及根瘤中进行内生固氮细菌的分离纯化，采用 IS-PCR 指纹图谱技术将分离得到的菌株进行聚类，对各类群代表菌株进行 16S rRNA 基因系统发育分析、生理生化试验、固氮酶活性测定、促生长特性试验。【结果】从泓森槐中分离出 56 株细菌，聚为 10 个类群，分别为 *Paenibacillus sabinae*、*Klebsiella michiganensis*、*Kosakonia radicincitans*、*Kosakonia pseudosacchari*、*Mesorhizobium erdmanii*、*Mesorhizobium huakuii*、*Mesorhizobium silamurunense*、*Pseudomonas geniculata*、*Burkholderia territorii* 和 *Devosia riboflavina*，其中 5 个类群为联合固氮菌、3 个类群为共生固氮菌、2 个类群为非固氮菌，表明泓森槐组织内生固氮细菌具有丰富的多样性。促生长特性试验表明 7 个类群具溶磷能力、6 个类群具解钾能力、6 个类群具有产生生长素能力、6 个类群具产铁载体能力、2 个类群具有产蛋白酶能力。【结论】泓森槐组织内生固氮细菌具有遗传多样性与促生长特性，其在农业微生物菌肥开发利用方面具有潜在价值。

关键词: 泓森槐，内生菌，固氮菌，促生长特性

Evaluating diversity and potential growth promoting characteristics of the culturable endophytic diazotrophic bacteria isolated from *Robinia pseudoacacia* ‘Hongsen’

FU Si-Yuan¹ XI Yu-Qing¹ ZHAO Peng-Fei¹ LIANG Yong-Jian¹ SONG Xu¹
CHANG Hua-Yu¹ PENG Gui-Xiang^{*2} TAN Zhi-Yuan^{*1}¹ College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China² College of Resource and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China

Abstract: [Background] *Robinia pseudoacacia* ‘Hongsen’ is a fast-growing deciduous tree of *Robinia* in *Leguminosae*. Endophytic diazotrophic bacteria of *Robinia pseudoacacia* ‘Hongsen’ is being researched

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31970001); Science and Technology Project of Guangdong Province (2018A050506075, 2018B020205003, 2018B020206001); Opening-fund of Guangdong Provincial Key Laboratory of Plant Molecular Breeding

***Corresponding authors:** E-mail: PENG Gui-Xiang: gxpeng@scau.edu.cn; TAN Zhi-Yuan: zytan@scau.edu.cn

Received: 06-11-2019; **Accepted:** 27-12-2019; **Published online:** 24-02-2020

基金项目: 国家自然科学基金(31970001); 广东省科技计划(2018A050506075, 2018B020205003, 2018B020206001); 广东省植物分子育种重点实验室开放基金

***通信作者:** E-mail: 彭桂香: gxpeng@scau.edu.cn; 谭志远: zytan@scau.edu.cn

收稿日期: 2019-11-06; **接受日期:** 2019-12-27; **网络首发日期:** 2020-02-24

little nowadays. **[Objective]** We studied the diversity and growth promoting characteristics of the culturable endophytic diazotrophic bacteria isolated from *Robinia pseudoacacia* 'Hongsen'. **[Methods]** Strains were isolated and purified from surface sterilized roots, stems, leaves and root nodules of *Robinia pseudoacacia* 'Hongsen', the isolates were clustered by using IS-PCR finger-printing, nitrogenase activity of the representative strain of each group was measured, we also conducted phylogenetic analysis of 16S rRNA gene, physiological and biochemical tests and growth promoting experiments of the representative strains. **[Results]** A total of 56 strains were isolated from *Robinia pseudoacacia* 'Hongsen', belonging to ten groups: *Paenibacillus sabinae*, *Klebsiella michiganensis*, *Kosakonia radicincitans*, *Kosakonia pseudosacchari*, *Mesorhizobium erdmanii*, *Mesorhizobium huakuii*, *Mesorhizobium silamurunense*, *Pseudomonas geniculate*, *Burkholderia territorii* and *Devosia riboflavina*, in which 5 groups were associative nitrogen-fixing bacteria, 3 groups were symbiotic nitrogen-fixing bacteria, 2 groups had not the nitrogen-fixing ability, which showed the rich diversity of endophytic diazotrophic bacteria of *Robinia pseudoacacia* 'Hongsen'. Growth promoting experiments showed that 7 groups had the function of phosphorus solubility, 6 potassium solubility, 6 auxin secretion, 6 siderophore production, and 2 proteases production. **[Conclusion]** Endophytic diazotrophic bacteria isolated from *Robinia pseudoacacia* 'Hongsen' have abundant genetic diversity and growth promoting characteristics, which have potential value in exploitation and utilization of agricultural microbial fertilizer.

Keywords: *Robinia pseudoacacia* 'Hongsen', Endophyte, Nitrogen-fixing bacteria, Growth-promoting characteristics

氮素是植物生长过程中主要的营养元素,土壤中可利用的氮素不足以最大程度地提升作物产量^[1]。长期使用氮肥会导致土壤肥力下降,污染环境,然而生物固氮可以为植物提供氮素,提升土壤肥力,由于生物固氮潜在的经济与环境重要性,已经吸引了很多学者的研究^[2-5]。在自然条件下,一些植物能够与不同种类的微生物建立对彼此有益的共生关系;植物与微生物之间的固氮关系分为共生固氮和联合固氮^[4]。研究者除了从豆科植物的根瘤中分离了各种各样的根瘤菌外,还从非豆科植物的根茎叶中分离了很多固氮细菌;植物为固氮微生物提供了丰富且多样的生态位^[3]。植物内生固氮菌是指在植物整个或部分生命周期定殖于植物健康组织中与宿主植物进行联合固氮的一类宿主微生物^[4]。内生固氮菌的固氮作用不需要与植物形成特异化的结构,可以在植物的各种营养器官内进行固氮作用,满足自身生长需求的同时又为宿主植物提供氮源,而且产生的某些代谢产物促进植物生长^[5]。根瘤菌是与豆科植物建立共生关系并有效固氮的革兰氏阴性细菌^[6]。根瘤是根瘤菌侵染豆科植

物根部而形成的并能够进行生物固氮的共生组织,大多数根瘤菌在体外固氮作用很弱或不能固氮^[7]。

泓森槐是豆科、刺槐属的一类优良速生用材树种,抗干旱,对养分需求量大,根系有根瘤,可以有效改善土壤肥力,兼具经济与生态价值。选取速生的泓森槐作为研究材料,从泓森槐根、茎、叶及根瘤分离可培养内生固氮细菌,探讨其内生固氮细菌多样性和氮素来源,对于生物菌肥的制备具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

由广西南宁绿水青山公司提供泓森槐(*Robinia pseudoacacia* 'Hongsen')树苗,种植在华南农业大学农场。采用 DN 无氮培养基^[8]和改良 YMA 低氮培养基进行菌株的分离纯化。

改良 YMA 低氮固体培养基(g/L):甘露醇 10.0, $K_2HPO_4 \cdot H_2O$ 0.5, NaCl 0.1, 酵母粉 0.2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, $CaCO_3$ 3.0, pH 7.2, 琼脂 20.0。

1.2 主要试剂和仪器

2×Taq PCR Mix、DNA Marker, 生工生物工程

(上海)股份有限公司; 3-吡啶乙酸, 合肥博美生物公司。凝胶成像系统、PCR 仪, Bio-Rad 公司; 气相色谱仪, 北京北分天普仪器技术有限公司; 可见分光光度计, 上海美普达仪器有限公司。

1.3 根、茎、叶内生固氮菌株的分离与纯化

将泓森槐的根、茎、叶分别用无菌剪刀剪成 3 cm 的小段, 无菌水清洗表面灰尘, 用 70% 酒精浸泡 5 min, 无菌水清洗一遍, 用 0.1% 升汞浸泡 5 min, 表面消毒后, 用无菌水洗涤 10 次, 每次 10 min, 最后一次洗涤的无菌水涂布在 LB 平板上作为对照, 确定是否消毒彻底。把消毒后的根、茎、叶两端各剪去 1 cm, 用无菌剪刀剪成约 0.5 cm 小段, 无菌研磨器分别按压根、茎、叶, 用无菌镊子将根、茎、叶分别接种于半固体 DN 无氮培养基中, 待长出菌膜测定固氮酶活性后, 用平板划线法与稀释涂平板法在 DN 无氮培养基上进行分离纯化, 直至获得纯化菌株, 用 20% 甘油-80 °C 保存菌株。

1.4 根瘤内生固氮菌株的分离纯化

挑取泓森槐成熟根瘤, 先用无菌水冲洗干净, 再用 70% 酒精浸泡 5 min, 无菌水清洗一遍, 用 0.1% 升汞浸泡 3 min, 之后无菌水振荡洗涤 10 次, 每次 10 min, 最后一次洗涤的无菌水涂布在 LB 平板上作为对照, 确定是否消毒彻底。用无菌镊子夹破表面消毒的根瘤, 放入 1.5 mL 装有无菌水的离心管中让根瘤内部菌体充分进入无菌水中, 振荡混匀后 10 倍稀释 3 次, 吸取 3 个梯度的菌液各 50 μ L, 使用涂布平板法将其涂于 YMA 低氮固体培养基上, 每个梯度 3 个重复, 待平板长出单菌落, 挑取单菌落用平板划线法进行分离纯化至菌株纯化, 用 20% 甘油-80 °C 保存菌株。

1.5 IS-PCR 指纹图谱分析

采用(Insertion sequence-based PCR, IS-PCR)指纹图谱方法^[9], 选用单引物 J3 (5'-GCTCAGGTCAGGTGGCCTGG-3'), PCR 反应体系与反应条件参考文献[10], PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行条带分离, GIS 紫外凝胶成像系统拍照并进行聚类结果分析。

1.6 16S rRNA 基因序列分析

16S rRNA 基因扩增采用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')。PCR 反应体系与反应条件参考文献[11], 扩增产物送天一辉远生物科技有限公司测序。所得序列在 EzBioCloud 与 NCBI 数据库进行 BLAST 比对, 寻找具有较高相似性的 16S rRNA 基因序列, 采用 MEGA 7.0 软件进行多序列比对, 用临近法构建系统发育树, 确定其系统发育地位。

1.7 固氮酶活性测定

将各类群代表菌株活化待生长至对数生长期, 制成 OD_{600} 为 1.0 的菌悬液, 取 10 μ L 菌液接种于 3 mL 半固体 DN 无氮培养基的 8 mL 试管中, 剩余空气体积 5 mL, 反口胶塞密封。37 °C 培养, 待长出菌膜后, 向试管中注入剩余空气体积 1/100 的 100% 乙炔气体(使最终浓度为 1%), 相同条件下培养 24 h 后用气相色谱分析乙炔和乙烯含量, 设置阴性和阳性对照。按以下公式计算固氮酶活性, 单位: $\text{nmol-C}_2\text{H}_4/(\text{mL}\cdot\text{h})$ 。

$$EA = (58.0 \times 10^3 \times Se \times T \times Pe) / (Sb \times Te \times P \times t \times V)$$

式中, Se : 乙烯峰面积; T : 开氏绝对温度($T = 273.13 \text{ K}$); Pe : 实验条件下的大气压强; Sb : 乙炔峰面积; Te : 实验条件下温度(K); P : 绝对大气压强(Pa); t : 培养时间(h); V : 容器体积(mL)。

1.8 固氮酶 *nifH* 基因与结瘤 *nodA* 基因扩增

采用引物 Zehr-F (5'-TGYGAYCCNAARGCN GA-3')与 Zehr-R (5'-NDGCCATCATYTCNCC-3')进行 PCR 反应扩增 *nifH* 基因。采用引物 *nodA*-F (5'-TGCRGTGGAARNTRNNCTGGGAAA-3')与 *nodA*-R (5'-GGNCCGTCRTCRAASGTCARGAT-3', 其中 D: A、G 或 T; N: A、C、G 或 T; Y: C 或 T; R: A 或 G)进行 PCR 反应扩增 *nodA* 基因。PCR 反应体系和反应条件参考文献[12]。若菌株在体外检测有固氮酶活性, 而且具有固氮酶 *nifH* 基因, 不存在结瘤 *nodA* 基因, 则菌株为联合固氮菌; 若菌株在体外不具固氮酶活性, 而且同时存在固氮酶 *nifH* 基因与结瘤 *nodA* 基因, 则菌株为共生固氮菌。

1.9 菌株生理生化试验

革兰氏染色、过氧化氢酶试验、甲基红试验、乙酰甲基甲醇(V-P)试验、明胶液化试验、硝酸盐还原试验等参照赵斌与何绍江合著的《微生物学实验教程》^[13]。

1.10 菌株的促生特性

解钾能力定性试验: 将供试菌株点接在钾长石培养基^[4]平板上, 每个平板 3 个重复, 30 °C 恒温培养 7 d 后, 拍照记录实验结果^[4]。

可溶性磷定量测定: 各供试菌株采用钼锑抗比色法测定发酵液中可溶性磷的含量^[14]。

产铁载体功能验证: 将供试菌株接种于 MSA-CAS 液体培养基^[11]中, 37 °C、130 r/min 培养 5 d 后观察各样品培养液颜色变化, 颜色从蓝绿色变为粉红色、红色、紫红色、紫色即为阳性反应, 否则为阴性反应。

菌株产生长素含量测定: 采用 Salkowski 测定菌株培养液中生长素的含量, 具体方法参考文献^[15]。

产蛋白酶定性试验: 采用脱脂奶粉琼脂固体培养基(A 组分: 脱脂奶粉 35.0 g, 500 mL 蒸馏水; B 组分: 琼脂 20.0 g, 500 mL 蒸馏水。将 A、B 两个组分分开灭菌, 待冷却至 60 °C 混合倒平板), 将供试菌株点接在培养基中央, 培养 5 d 后, 有透明圈即是能产生蛋白酶的菌株。

2 结果与分析

2.1 泓森槐根、茎、叶及根瘤内生固氮细菌的分离与纯化

从泓森槐根瘤及根、茎、叶中共分离了 56 株菌株, 详细结果见表 1。根中分离了 15 株, 茎中 4 株, 根瘤中 37 株, 叶中未分离到。

2.2 IS-PCR 指纹图谱聚类分析

通过 IS-PCR 指纹图谱聚类分析, 由图 1 可以看出不同类群的指纹图谱聚类结果有明显差异。56 株菌被分为 10 个类群。类群 I (H11, H12, H13, H14, H15, H16, H17, H18), 类群 II (H21, H22,

表 1 泓森槐植株组织分离所得菌株统计表

Table 1 Strains isolated from <i>Robinia pseudoacacia</i> 'Hongsen'			
类群	菌株号	分离部位	培养基
Cluster	Strain No.	Origin	Culture medium
I	H11	根 Root	DN
	H12	根 Root	DN
	H13	根 Root	DN
	H14	根 Root	DN
	H15	根 Root	DN
	H16	根瘤 Root nodule	YMA
	H17	根瘤 Root nodule	YMA
	H18	根瘤 Root nodule	YMA
II	H21	茎 Stem	DN
	H22	茎 Stem	DN
	H23	茎 Stem	DN
	H24	茎 Stem	DN
III	H31	根 Root	DN
	H32	根 Root	DN
	H33	根瘤 Root nodule	YMA
	H34	根瘤 Root nodule	YMA
IV	H41	根 Root	DN
	H42	根 Root	DN
	H43	根瘤 Root nodule	YMA
	H44	根瘤 Root nodule	YMA
	H45	根瘤 Root nodule	YMA
	H46	根瘤 Root nodule	YMA
V	H51	根瘤 Root nodule	YMA
	H52	根瘤 Root nodule	YMA
	H53	根瘤 Root nodule	YMA
	H54	根瘤 Root nodule	YMA
	H55	根瘤 Root nodule	YMA
	H56	根瘤 Root nodule	YMA
	H57	根瘤 Root nodule	YMA
	H58	根瘤 Root nodule	YMA
VI	H61	根瘤 Root nodule	YMA
	H62	根瘤 Root nodule	YMA
	H63	根瘤 Root nodule	YMA
	H64	根瘤 Root nodule	YMA
	H65	根瘤 Root nodule	YMA
	H66	根瘤 Root nodule	YMA
VII	H71	根瘤 Root nodule	YMA
	H72	根瘤 Root nodule	YMA
	H73	根瘤 Root nodule	YMA
	H74	根瘤 Root nodule	YMA
	H75	根瘤 Root nodule	YMA
VIII	H81	根瘤 Root nodule	YMA
	H82	根瘤 Root nodule	YMA
	H83	根瘤 Root nodule	YMA
IX	H91	根 Root	DN
	H92	根 Root	DN
	H93	根 Root	DN
	H94	根瘤 Root nodule	YMA
	H95	根瘤 Root nodule	YMA
	H96	根瘤 Root nodule	YMA
	H97	根瘤 Root nodule	YMA
X	H101	根 Root	DN
	H102	根 Root	DN
	H103	根 Root	DN
	H104	根瘤 Root nodule	YMA
	H105	根瘤 Root nodule	YMA

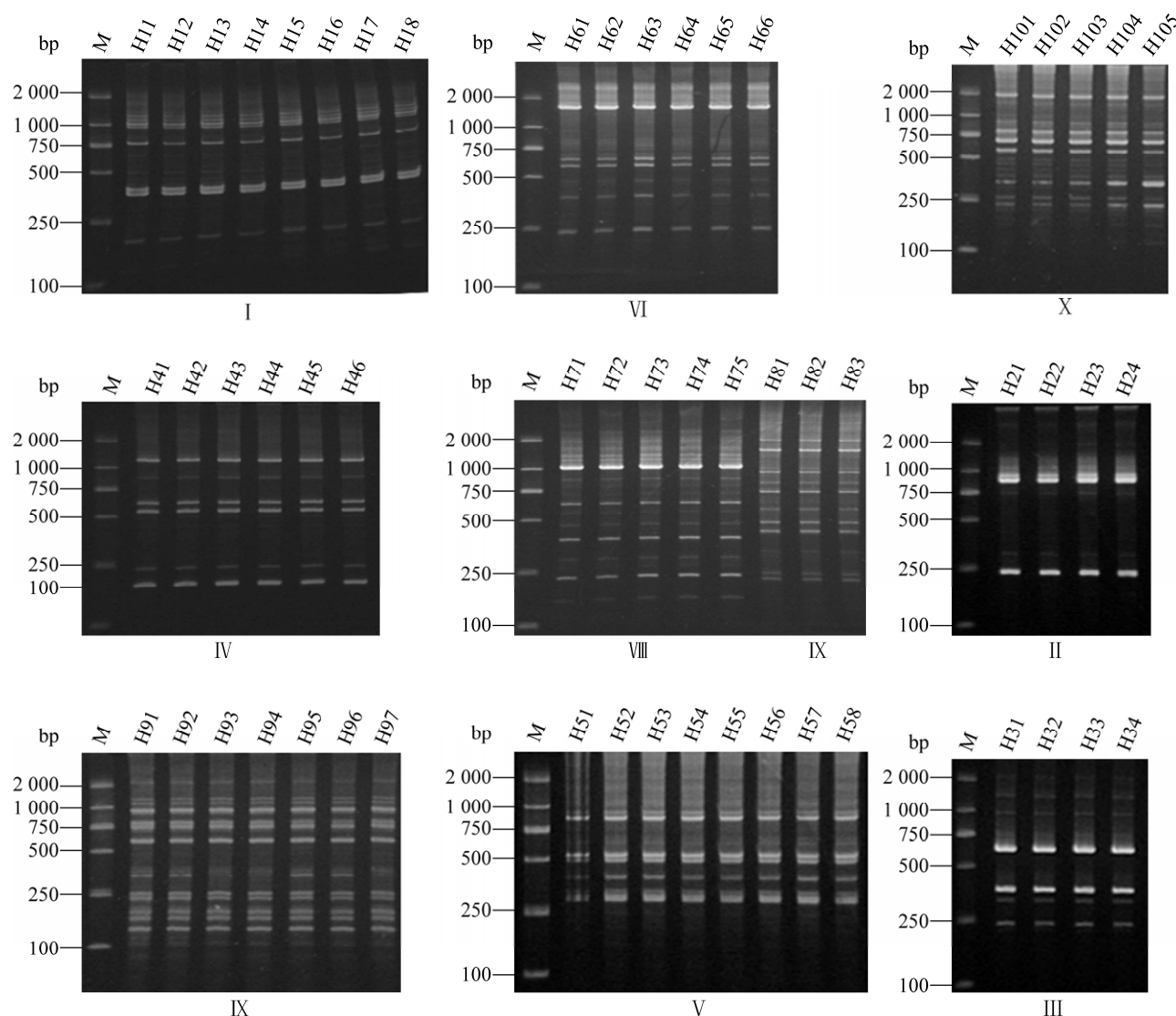


图 1 56 株菌株的 IS-PCR 指纹图谱电泳图

Figure 1 IS-PCR fingerprint patterns of the 56 strains

注: M: DL2000 分子量标准。

Note: M: DL2000 DNA Marker.

H23, H24), 类群III (H31, H32, H33, H34), 类群IV (H41, H42, H43, H44, H45, H46), 类群V (H51, H52, H53, H54, H55, H56, H57, H58), 类群VI (H61, H62, H63, H64, H65, H66), 类群VII (H71, H72, H73, H74, H75), 类群VIII (H81, H82, H83), 类群IX (H91, H92, H93, H94, H95, H96, H97), 类群X (H101, H102, H103, H104, H105)。

2.3 菌株 16S rRNA 基因序列比对及系统发育分析

通过 IS-PCR 指纹图谱聚类结果, 每个类群选出一株具有代表性的菌株进行 16S rRNA 基因的 PCR 扩增及测序, 测序结果用 DNASTar 软件进行序列拼接与校正, 将所得序列提交至 GenBank, 登录号分别为 H11 (MN841793)、H21 (MN841790)、H31 (MN841788)、H41 (MN841789)、

H51 (MN841797)、H61 (MN841796)、H71 (MN841795)、H81 (MN841792)、H91 (MN841791)、H101 (MN841794), 通过 EzBioCloud 数据库与 NCBI 数据库对比得到相似性最高菌株。对比结果如表 2 所示, 类群 I 与类芽孢杆菌属(*Paenibacillus sabinae* T27^T)相似性 98.6%, 类群 II 与克雷伯氏菌属(*Klebsiella michiganensis* W14^T)相似性 100%, 类群 III 与卡萨克尼亚氏菌属(*Kosakonia radicincitans* DSM16656^T)相似性 99.8%, 类群 IV 与卡萨克尼亚氏菌属(*Kosakonia pseudosacchari* JM387^T)相似性 99.4%, 类群 V 与中慢生根瘤菌属(*Mesorhizobium erdmanii* USDA3471^T)相似性 100%, 类群 VI 与中慢生根瘤菌属(*Mesorhizobium huakuii* IAM14158^T)相似性 99.8%, 类群 VII 与中慢生根瘤菌属(*Mesorhizobium silamurunense* CCBAU01550^T)相似性 100%, 类群 VIII 与假单胞菌属(*Pseudomonas geniculata* ATCC19374^T)相似性 100%。类群 IX 与伯克霍尔德菌属(*Burkholderia territorii* LMG28158^T)

相似性 99.8%。类群 X 与德沃斯氏菌属(*Devosia riboflavina* IFO13584^T)相似性 100%。用各类群代表菌株的 16S rRNA 基因序列与其相似菌株的 16S rRNA 基因序列构建系统发育树, 如图 2 所示, 各类群代表菌株皆与其最相近菌株聚在了一个分支上, 展现出了泓森槐植株组织内生固氮细菌的系统发育关系。

2.4 代表菌株的固氮酶活性测定

对各个类群的代表菌株进行 3 次体外固氮酶活性测定, 取平均值, 结果如表 3 所示。菌株 H11、H21、H31、H41、H101 在体外具有固氮酶活性。菌株 H11 的固氮酶活性最高达到 450.6 nmol-C₂H₄/(mL·h), 菌株 H101 的固氮酶活性最低。

2.5 固氮酶 *nifH* 基因与结瘤 *nodA* 基因扩增

挑选各类群代表菌株进行固氮酶 *nifH* 基因和结瘤 *nodA* 基因的扩增。结果如图 3 所示, *nifH* 基因扩增结果表示代表菌株 H11、H21、H31、H41、H51、H61、H71、H101 均能扩增出一条约 360 bp

表 2 代表菌株 16S rRNA 基因序列比对结果

Table 2 Comparison result with the 16S rRNA gene sequences of all representative strains

类群	代表菌株	最高相似性菌株	相似性
Group	Representative strain	Similarity with known species	Similarity (%)
I	H11	类芽孢杆菌 T27 ^T	98.6
II	H21	<i>Paenibacillus sabinae</i> T27 ^T	100
III	H31	克雷伯氏菌 W14 ^T	100
IV	H41	<i>Klebsiella michiganensis</i> W14 ^T	99.8
V	H51	卡萨克尼亚氏菌 DSM16656 ^T	99.8
VI	H61	<i>Kosakonia radicincitans</i> DSM16656 ^T	99.4
VII	H71	卡萨克尼亚氏菌 JM387 ^T	99.4
VIII	H81	<i>Kosakonia pseudosacchari</i> JM387 ^T	100
IX	H91	中慢生根瘤菌 USDA3471 ^T	100
X	H101	<i>Mesorhizobium erdmanii</i> USDA3471 ^T	99.8
		华葵中慢生根瘤菌 IAM14158 ^T	99.8
		<i>Mesorhizobium huakuii</i> IAM14158 ^T	100
		黄河中慢生根瘤菌 CCBAU01550 ^T	100
		<i>Mesorhizobium silamurunense</i> CCBAU01550 ^T	100
		弯曲假单胞菌 ATCC19374 ^T	100
		<i>Pseudomonas geniculata</i> ATCC19374 ^T	99.8
		伯克霍尔德菌 LMG28158 ^T	99.8
		<i>Burkholderia territorii</i> LMG28158 ^T	100
		核黄素德沃斯氏菌 IFO13584 ^T	100
		<i>Devosia riboflavina</i> IFO13584 ^T	100

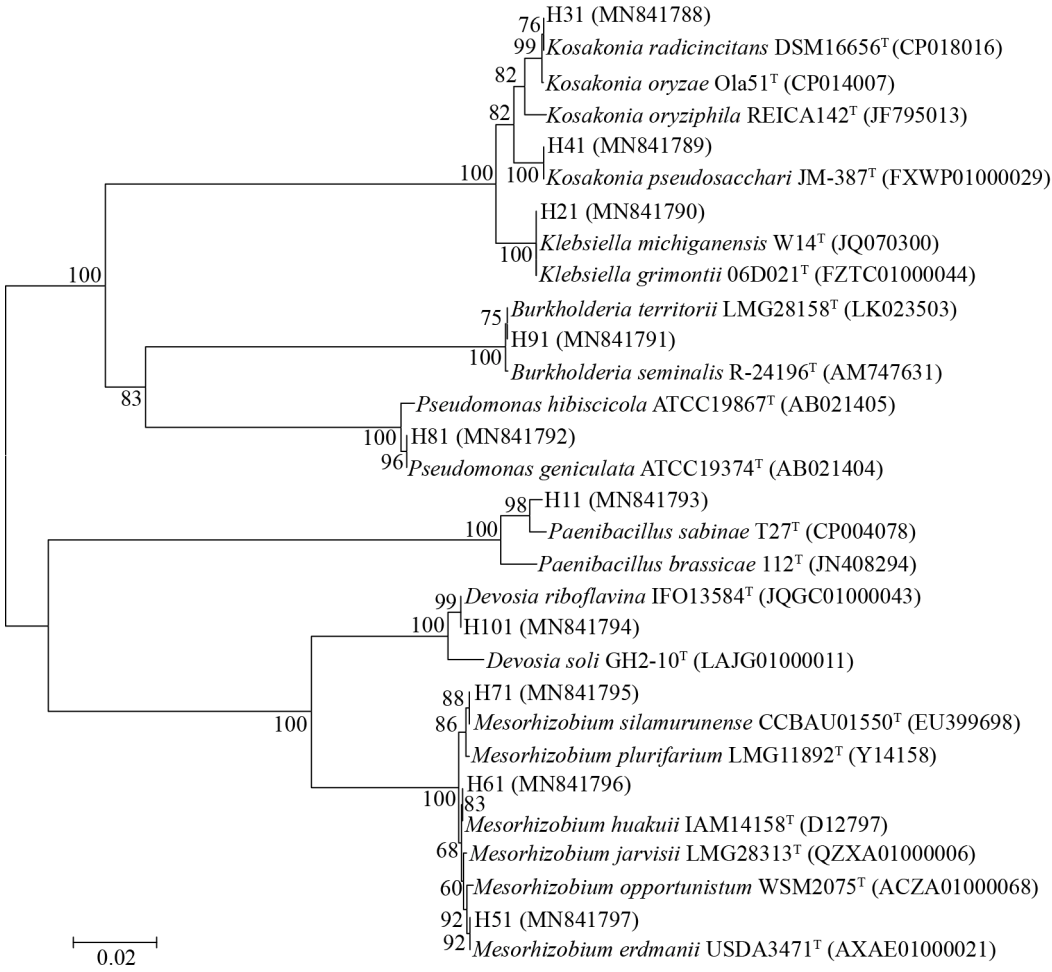


图 2 代表菌株基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of all representative strains

注：建树方法为邻接法；括号内为菌株 16S rRNA 基因在 GenBank 中的登录号；节点处的数字为 Bootstrap 值；标尺代表 0.02 的核酸差异。

Note: Constructed using the neighbour-joining method; The GenBank accession numbers are given in parentheses; Numbers at nodes are bootstrap values; Bars indicate 0.02 nucleotide divergence.

表 3 菌株的固氮酶活性

Table 3 Nitrogenase activity of strains

菌株号	固氮酶活性
Strain No.	Nitrogenase activity (nmol-C ₂ H ₄ /(mL·h))
H11	450.6
H21	171.1
H31	364.2
H41	310.3
H101	68.7

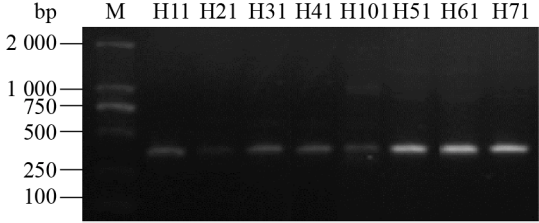


图 3 部分菌株固氮酶 *nifH* 基因 PCR 扩增产物电泳图

Figure 3 PCR products of the nitrogenase *nifH* gene of related strains

注：M：DL2000 分子量标准。

Note: M: DL2000 DNA Marker.

的条带,表明这些菌株具有固氮酶 *nifH* 基因。如图 4 所示,*nodA* 基因扩增结果显示仅有 H51、H61、H71 扩增出一条 660 bp 左右的条带,表明 H51、H61、H71 具有结瘤 *nodA* 基因。综合固氮酶 *nifH* 基因、结瘤 *nodA* 基因扩增结果及体外固氮酶活性测定结果,表明 H11、H21、H31、H41、H101 为联合固氮菌,H51、H61、H71 为共生固氮菌,H81、H91 为非固氮菌。

2.6 代表菌株的生理生化鉴定

各个类群代表菌株生理生化实验见表 4,H21、H31、H41、H51、H61、H71、H81、H91、H101 与它们的最相似菌株生理生化实验结果^[16-23]一致,H11 与其最相似菌株生理生化结果^[24]有差异。

2.7 菌株的促生长特性

对各类群代表菌株进行产铁载体能力试验、可溶性磷定量测定、解钾定性试验、产蛋白酶定性试验、产生长素定量试验。结果如表 5 所示,表明菌株 H11、H21、H31、H41、H71、H91 具有解钾能力(图 5A),菌株 H21、H31、H41、H81、H91、H101 具有产铁载体能力(图 5B),菌株 H21、H31、H41、H71、H81、H91、H101 具有溶磷能力,H91 的溶磷能力最强达 78.5 mg/L。菌株 H81、H91 具有产蛋白酶能力(图 5C),菌株 H21、H51、H61、H71、H81、H101 具有产生长素的能力。

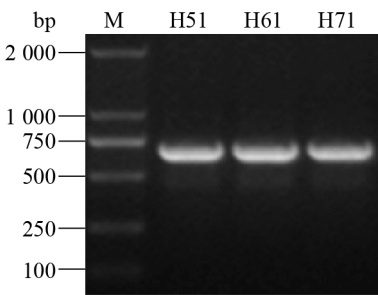


图 4 部分菌株结瘤 *nodA* 基因 PCR 扩增产物电泳图
Figure 4 PCR products of the nodulation *nodA* gene of related strains

注: M: DL2000 分子量标准.
Note: M: DL2000 DNA Marker.

表 4 代表菌株生理生化试验
Table 4 Physiological and biochemical properties of the representative strains

项目	H11	H21	H31	H41	H51	H61	H71	H81	H91	H101
Items										
革兰氏染色	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gram stain										
甲基红试验	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
Methylred										
乙酰甲基甲醇试验	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
V-P reactions										
过氧化氢酶试验	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase										
硝酸盐还原试验	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+
Nitrate reduction										
明胶液化试验	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Gelatin										
脲酶试验	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+
Urease										
吲哚生成	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+
Indole production										

注: +: 阳性反应; -: 阴性反应.
Note: +: Positive; -: Negative.

表 5 菌株的促生长特性
Table 5 Growth promoting characteristics of strains

项目	H11	H21	H31	H41	H51	H61	H71	H81	H91	H101
Items										
可溶性磷含量	0.0	22.4	14.2	17.6	0.0	0.0	28.7	8.91	78.5	52.3
Soluble P content (mg/L)										
生长素	0.0	10.6	0.0	0.0	1.75	2.58	2.61	6.84	0.0	15.6
IAA (mg/L)										
产铁载体	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
Siderophore production										
产蛋白酶	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Proteinase production										
解钾能力	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-
Potassium dissolving										

注: +: 阳性反应; -: 阴性反应.
Note: +: Positive; -: Negative.

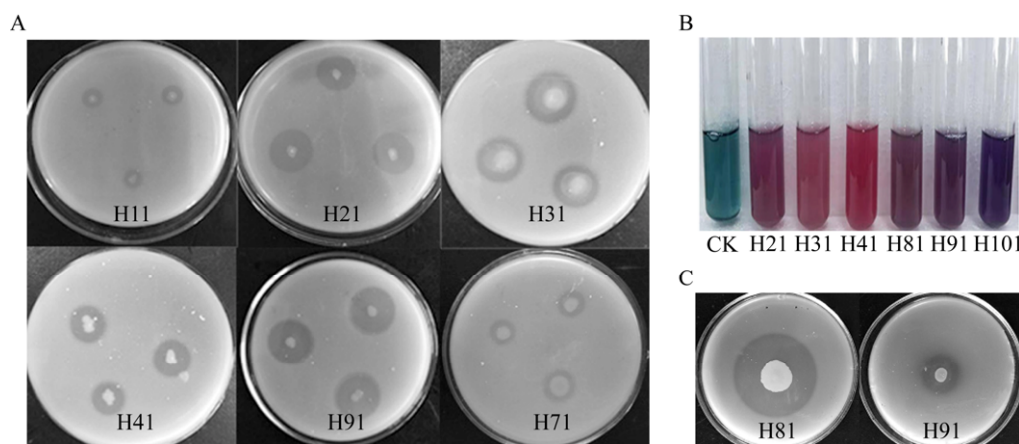


图 5 部分代表菌株促生长特性效果图

Figure 5 The results of growth promoting characteristics of related strains

注: A: 解钾效果图; B: 产铁载体能力图; C: 菌株 H81 和 H91 产蛋白酶能力图.

Note: A: The results of dissolving potassium; B: Siderophore production; C: Protease production of strains H81 and H91.

3 讨论

本研究以泓森槐根、茎、叶及根瘤为材料,共分离得到 56 株菌株。DNA 指纹图谱聚类分析是当代学者常用的细菌聚类分析方法,可信性高,其中 J3 引物的多态性较好^[25-26]。采用 IS-PCR 指纹图谱法做聚类分析,将 56 株细菌分为 10 个类群,7 个属 10 个种,其中 5 个类群为联合固氮菌,3 个类群为共生固氮菌,2 个类群为非固氮菌,反映了泓森槐内生固氮细菌具有丰富的遗传多样性。

本文分离的固氮类芽孢杆菌 H11 与 Ma 等^[24]发现的固氮类芽孢杆菌属新种 T27^T 的 16S rRNA 基因序列相似性最高为 98.6%,但生理生化指标有一定差异。刘丽辉等^[4]从落地生根中分离出类芽孢杆菌属的内生固氮菌,与 H11 是不同种。何建清等^[27]从砂生槐根瘤内也分离到了具有促生效果的固氮类芽孢杆菌,表明固氮类芽孢杆菌属在多种植物组织中存在。本研究从泓森槐茎中分离的菌株 H21 兼具解钾、溶磷、产生长素、产铁载体、联合固氮多种促生长特性。孙峰^[28]从芒草中分离到具有多种促生长特性的克雷伯氏菌株。毛晓洁^[29]从玉米中也分离到与 H21 同种的克雷伯氏菌株,并对其促生长特性进行了研究,表明 H21 是具有多种促生长特性的内生固氮菌。*Kosakonia* 属的菌株

多数具有固氮能力,对植物有促生作用^[30]。菌株 H31 与 H41 同属于 *Kosakonia* 属,具有高固氮酶活性,兼具解钾、溶磷、产铁载体功能。段如雁^[31]通过高通量测序技术分析不同地区花榈木根瘤内细菌的多样性,表明 *Kosakonia* 属在根瘤中聚集较多。Sun 等^[32]在玉米根际发现了具有联合固氮促生功能的 *Kosakonia* 菌株,测定固氮酶活性为 232.94 nmol-C₂H₄/(mL·h),并成功在荧光显微镜下观察到了菌株在黄瓜根中的定殖,菌株 H31 与之相似性最高,但具有更高的固氮酶活性为 364.2 nmol-C₂H₄/(mL·h)。Kämpfer 等^[17]首次从玉米根中分离的内生固氮菌新种 JM387^T 与菌株 H41 相似性最高。本研究中的菌株 H51、H61、H71 为中慢生根瘤菌的 3 个种,在泓森槐根瘤中分离得到,扩增出了它们的固氮酶 *nifH* 基因和结瘤 *nodA* 基因,从分子水平上验证了它们为共生固氮菌。然而泓森槐作为刺槐的亚种,在选择根瘤固氮方面二者可能具有相似性。刘振山^[33]从西北地区刺槐根瘤中分离出根瘤菌属、中慢生根瘤菌属和中华根瘤菌属 3 个属,表明中慢生根瘤菌为优势种群。冀玉良等^[34]从陕西商洛地区刺槐根瘤内分离根瘤菌 68 株,各类群代表菌株皆与中慢生根瘤菌属聚在一个分支,表明陕西商洛地区刺槐主要选择与中慢生根瘤

菌结瘤, 结合本研究结果表明泓森槐与刺槐都优先选择中慢生根瘤菌结瘤。此外, 冀玉良^[35]从刺槐分离的部分根瘤菌具有溶磷和分泌生长素的能力, 本文中 H51、H61、H71 具有产生长素能力, H71 具备溶磷与解钾能力, 表明刺槐与泓森槐在其根瘤菌促生长特性上具有相似性。菌株 H81 为弯曲假单胞菌, 为非固氮菌, 具有溶磷、产生长素、产铁载体、产蛋白酶等促生长特性。李艳星等^[36]在块根类作物中也分离到弯曲假单胞菌, 顾沛雯等^[37]从豆科植物苦豆子的根中也发现了具有抑菌活性的弯曲假单胞菌, Gopalakrishnan 等^[38]从鹰嘴豆根瘤中分离出具有植物促生功能的弯曲假单胞菌, 说明弯曲假单胞菌是广泛存在于植株组织中的促生菌株。菌株 H91 无固氮功能, 具解钾、产铁载体、产蛋白酶能力且溶磷能力很强, 孙峰^[28]从芒草中分离到与 H91 相同具有促生功能的伯克霍尔德内生菌。保朱寿能^[39]从紫茎泽兰根中分离内生固氮菌, 其报道的能够在无氮培养基中生长的德沃斯氏菌与 H101 为同种菌, 本文进一步用乙炔还原法测定了 H101 的固氮酶活性为 68.7 nmol-C₂H₄/(mL·h)。Rivas 等^[40]发现德沃斯氏属中有能够使豆科植物结瘤的菌种, 而且 *nodD* 基因序列与热带根瘤菌的亲缘关系很近, 本文中的德沃斯氏菌 H101 是联合固氮菌而非共生固氮菌。在自然界的固氮体系中, 共生固氮主要存在于豆科植物与根瘤菌、非豆科植物与弗兰克氏放线菌形成的根瘤及蓝细菌与红萍或某些地衣形成的两大类共生体^[41]。联合固氮菌在自然界中的存在较共生固氮菌更为广泛, 管琴澜等^[42]从乐山不同地区不同豆科植物中分离了 52 株联合固氮菌并测定了固氮酶活性。本文研究材料泓森槐为抗旱、速生且需大量营养的豆科植物, 研究结果表明泓森槐组织中具有多种固氮菌, 体现出泓森槐氮素营养来源的多样性。对于分离得到的 3 种中慢生根瘤菌 H51、H61、H71, 因泓森槐的种子难以获得及时间原因, 我们没有进行回接试验验证它们的结瘤能力及测定回接所得根瘤的固氮能力。此外, 植株内生固氮细菌的组成受植株所生长的时

期、环境、季节等多种因素影响^[43-45]。本研究因时间和条件限制仅采集了幼龄期的泓森槐根、茎、叶及根瘤进行可培养内生固氮细菌的分离, 后续实验还可以利用高通量测序与生物信息学技术在不同时期、不同生长环境下进行不可培养的内生固氮菌菌群的探究, 以期全面了解泓森槐组织内生固氮菌的群落组成。

4 结论

从泓森槐根、茎、叶及根瘤分离的可培养内生固氮细菌具有丰富的多样性及促生长特性。菌株 H11 为类芽孢杆菌属, 固氮酶活性为本研究中的最高, 具有解钾能力且类芽孢杆菌具芽孢, 适应环境的能力强; H31 与 H41 为卡萨克尼亚氏菌, 具有高固氮酶活性、溶磷解钾、产铁载体能力; H51、H61、H71 为中慢生根瘤菌属, 具有固氮酶 *nifH* 基因和结瘤 *nodA* 基因。各类群菌株具备固氮、产铁载体、产生长素、溶磷、解钾、产蛋白酶等潜在促生长特性, 可以作为潜在的工程菌株进一步研究和利用, 这为生物肥料制备提供了菌种资源与理论基础。

REFERENCES

- [1] Shabanamol S, Divya K, George TK, et al. Characterization and in planta nitrogen fixation of plant growth promoting endophytic diazotrophic *Lysinibacillus sphaericus* isolated from rice (*Oryza sativa*)[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2018, 102: 46-54
- [2] Zhang GX, Peng GX, Wang ET, et al. Diverse endophytic nitrogen-fixing bacteria isolated from wild rice *Oryza rufipogon* and description of *Phytobacter diazotrophicus* gen. nov. sp. nov.[J]. *Archives of Microbiology*, 2008, 189(5): 431-439
- [3] Fang K, Bao ZSN, Chen L, et al. Growth-promoting characteristics of potential nitrogen-fixing bacteria in the root of an invasive plant *Ageratina adenophora*[J]. *PeerJ*, 2019, 7: e7099
- [4] Liu LH, Peng GX, Huang SF, et al. Diversity and growth promotion of endophytic diazotrophic bacteria isolated from *Bryophyllum pinnatum*[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(10): 2538-2547 (in Chinese)
刘丽辉, 彭桂香, 黄淑芬, 等. 落地生根内生固氮菌多样性和促生特性[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(10): 2538-2547

- [5] He CM, Wu GR, Tang Z, et al. Endophytic diazotroph and its application in green agricultural construction and production[J]. Chinese Journal of Microecology, 2013, 25(3): 358-361 (in Chinese)
何彩梅, 吴桂容, 唐政, 等. 植物内生固氮菌在绿色农业生产建设中的应用[J]. 中国微生态学杂志, 2013, 25(3): 358-361
- [6] Cheng JL, Chen DS, Li YG. Whole genome sequencing of highly nitrogen-fixing strain *Sinorhizobium fredii* SMH12 and genome comparative analysis[J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2020, 26(1): 1-13 (in Chinese)
成家龙, 陈大松, 李友国. 高效固氮大豆根瘤菌 SMH12 的全基因组测序及比较基因组分析[J]. 应用与环境生物学报, 2020, 26(1): 1-13
- [7] Qi WJ, He DH, Xia ZJ, et al. Research on biological characteristics and genetic diversity of rhizobia of *Glycine soja* in the Yellow River Delta[J]. Shandong Science, 2012, 25(1): 32-37 (in Chinese)
齐文静, 何冬华, 夏志洁, 等. 黄河三角洲地区野大豆根瘤菌生物学特性及其遗传多样性研究[J]. 山东科学, 2012, 25(1): 32-37
- [8] 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
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(13): 1885-1893
- [9] Peng GX, Wang HR, Zhang GX, et al. Molecular study of endophytic nitrogen fixing bacteria isolated from *Melinis minutiflora*[J]. Journal of South China Agricultural University, 2005, 26(4): 73-76 (in Chinese)
彭桂香, 王华荣, 张国霞, 等. 糖蜜草内生固氮菌 IS-PCR 和 16S rRNA 基因全序列分析[J]. 华南农业大学学报, 2005, 26(4): 73-76
- [10] Hu WZ, Tan ZW, Wang Y, et al. Isolation, identification and phylogenetic analysis of endophytic diazotrophs in Tengxian medical-use *Oryza officinalis*[J]. Biotechnology Bulletin, 2016, 32(6): 111-119 (in Chinese)
胡文哲, 谭泽文, 王勇, 等. 藤县药用野生稻内生固氮菌分离鉴定及系统发育分析[J]. 生物技术通报, 2016, 32(6): 111-119
- [11] Huang SF, Chang HY, Gu LC, et al. Diversity of endophyte isolated from *Ocimum basilicum* L. and biological function[J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2020, 26(1): 1-14 (in Chinese)
黄淑芬, 常华瑜, 顾李成, 等. 九层塔内生细菌系统发育分析及生物学功能[J]. 应用与环境生物学报, 2020, 26(1): 1-14
- [12] Yuan T, Liu LH, Huang SF, et al. *Rhizobium wuzhouense* sp. nov., isolated from roots of *Oryza officinalis*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2018, 68(9): 2918-2923
- [13] Zhao B, He SJ. Microbiology Experiment Course[M]. Beijing: Higher Education Press, 2013 (in Chinese)
赵斌, 何绍江. 微生物学实验教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 2013
- [14] Qiao ZW, Teng FL, Shao XG. Screening, identification and characteristic analysis of phosphorus solubilizing bacteria *Burkholderia* sp. in yellow soil[J]. Journal of Shanxi Agricultural University (Natural Science Edition), 2019, 39(1): 1-6 (in Chinese)
乔志伟, 腾飞龙, 邵晓贵. 黄壤伯克氏溶磷细菌的筛选鉴定及溶磷特性[J]. 山西农业大学学报: 自然科学版, 2019, 39(1): 1-6
- [15] Gao C, Huang SF, Hu L, et al. Diversity and plant growth promotion of endophytic bacteria isolated from *Oryza nivara*[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2018, 24(1): 33-38 (in Chinese)
郜晨, 黄淑芬, 胡莉, 等. 尼瓦拉野生稻内生菌多样性和促生作用[J]. 应用与环境生物学报, 2018, 24(1): 33-38
- [16] Saha R, Farrance CE, Verghese B, et al. *Klebsiella michiganensis* sp. nov., a new bacterium isolated from a tooth brush holder[J]. Current Microbiology, 2013, 66(1): 72-78
- [17] Kämpfer P, McInroy JA, Doijad S, et al. *Kosakonia pseudosacchari* sp. nov., an endophyte of *Zea mays*[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2016, 39(1): 1-7
- [18] Kämpfer P, Ruppel S, Remus R. *Enterobacter radicincitans* sp. nov., a plant growth promoting species of the family *Enterobacteriaceae*[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2005, 28(3): 213-221
- [19] Jarvis BDW, van Berkum P, Chen WX, et al. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov.[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1997, 47(3): 895-898
- [20] Nakagawa Y, Sakane T, Yokota A. Transfer of “*Pseudomonas riboflavin*” (Foster 1944), a gram-negative, motile rod with long-chain 3-hydroxy fatty acids, to *Devosia riboflavina* gen. nov., sp. nov., nom. rev.[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1996, 46(1): 16-22
- [21] De Smet B, Mayo M, Peeters C, et al. *Burkholderia stagnalis* sp. nov. and *Burkholderia territorii* sp. nov., two novel *Burkholderia cepacia* complex species from environmental and human sources[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2015, 65(7): 2265-2271
- [22] Zhao CT, Wang ET, Zhang YM, et al. *Mesorhizobium silamurunense* sp. nov., isolated from root nodules of

- Astragalus* species[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2012, 62(9): 2180-2186
- [23] Martínez-Hidalgo P, Ramírez-Bahena MH, Flores-Félix JD, et al. Revision of the taxonomic status of type strains of *Mesorhizobium loti* and reclassification of strain USDA 3471^T as the type strain of *Mesorhizobium erdmanii* sp. nov. and ATCC 33669^T as the type strain of *Mesorhizobium jarvisii* sp. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2015, 65(6): 1703-1708
- [24] Ma YC, Xia ZQ, Liu XM, et al. *Paenibacillus sabinae* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere soils of shrubs[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(1): 6-11
- [25] Lin L, Ji GH, Ma GZ, et al. Genotypic diversity analysis of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* in southwest China by Rep-PCR[J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2011, 33(2): 264-269 (in Chinese)
林琳, 姬广海, 马改转, 等. 西南地区水稻细菌性条斑病菌的遗传多样性分析[J]. 江西农业大学学报, 2011, 33(2): 264-269
- [26] Wang CL, Zhang Q, Zhou YL, et al. Genetic diversity of pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* from southern regions of Yangtze River in China[J]. Chinese Journal of Rice Science, 2001, 15(2): 131-136 (in Chinese)
王春连, 章琦, 周永力, 等. 我国长江以南地区水稻白叶枯病原菌遗传多样性分析[J]. 中国水稻科学, 2001, 15(2): 131-136
- [27] He JQ, Zhang GJ, Zhao WJ, et al. Study on diversity and growth promotion potential of endophytic bacteria in *Sophora moorcroftiana* root nodule[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2019, 47(12): 297-301 (in Chinese)
何建清, 张格杰, 赵伟进, 等. 砂生槐根瘤内生细菌多样性及其促生潜力研究[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(12): 297-301
- [28] Sun F. Analysis of bacterial community in endophytic and rhizosphere soils of *Miscanthus* and determination of its growth promoting characteristics[D]. Nanyang: Master's Thesis of Nanyang Normal University, 2019 (in Chinese)
孙峰. 芒草内生、根际土壤细菌群落分析及其促生特性测定[D]. 南阳: 南阳师范学院硕士学位论文, 2019
- [29] Mao XJ. Diversity of endophytic diazotrophs from different varieties of maize in Songliao area and their growth-promoting characteristics[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2018 (in Chinese)
毛晓洁. 松辽地区不同品种玉米内生固氮菌多样性比较及其促生特性研究[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2018
- [30] Li YY. Systematic taxonomy of bacteria belonging to the genus *Kosakonia* based on the whole genome sequences[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2016 (in Chinese)
李媛媛. 基于全基因组序列系统分类 *Kosakonia* 属的细菌[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2016
- [31] Duan RY. Diversity of rhizobium in *Ormosia henryi* prain and screening of excellent strains[D]. Guiyang: Doctoral Dissertation of Guizhou University, 2019 (in Chinese)
段如雁. 花榈木根瘤菌多样性及优良菌株筛选[D]. 贵阳: 贵州大学博士学位论文, 2019
- [32] Sun SX, Chen YP, Cheng JJ, et al. Isolation, characterization, genomic sequencing, and GFP-marked insertional mutagenesis of a high-performance nitrogen-fixing bacterium, *Kosakonia radicincitans* GXGL-4A and visualization of bacterial colonization on cucumber roots[J]. Folia Microbiologica, 2018, 63(6): 789-802
- [33] Liu ZS. Genetic diversity and population differentiation of rhizobia isolated from *Robinia* in northwest China[D]. Xianyang: Master's Thesis of Northwest Agriculture and Forestry University, 2012 (in Chinese)
刘振山. 西北地区刺槐根瘤菌遗传多样性及其群体分化[D]. 咸阳: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2012
- [34] Ji YL, Li DS, Zhao LF, et al. Genetic diversity and phylogeny of rhizobia isolated from *Robinia pseudoacacia* in several regions of Shaanxi Shangluo[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2013, 21(11): 1373-1383 (in Chinese)
冀玉良, 李堆淑, 赵龙飞, 等. 陕西商洛部分地区刺槐根瘤菌的遗传多样性和系统发育[J]. 农业生物技术学报, 2013, 21(11): 1373-1383
- [35] Ji YL. Characteristics of dissolving phosphate and secreting IAA of rhizobia in *Robinia pseudoacacia*[J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2014, 26(6): 34-37, 41 (in Chinese)
冀玉良. 刺槐根瘤菌溶磷和分泌植物生长素特性的研究[J]. 江西农业学报, 2014, 26(6): 34-37, 41
- [36] Li YX, Guo PY, Sun JG. Isolation, identification, phylogeny and growth promoting characteristics of endophytic diazotrophs from tuber and root crops[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2017, 50(1): 104-122 (in Chinese)
李艳星, 郭平毅, 孙建光. 块根块茎类作物内生固氮菌分离鉴定、系统发育与促生特性[J]. 中国农业科学, 2017, 50(1): 104-122
- [37] Gu PW, Hu MJ, Zhou XC. Isolation, screening and activity identification of endophytic bacteria in *Sophora alopecuroides* L.[J]. China Plant Protection, 2013, 33(7): 9-12, 8 (in Chinese)
顾沛雯, 胡美娟, 周星辰. 苦豆子内生细菌的分离、筛选及活性鉴定[J]. 中国植保导刊, 2013, 33(7): 9-12, 8
- [38] Gopalakrishnan S, Srinivas V, Prakash B, et al. Plant growth-promoting traits of *Pseudomonas geniculata* isolated

- from chickpea nodules[J]. 3 Biotech, 2015, 5(5): 653-661
- [39] Bao ZSN. Isolation and growth-promoting effects of *Ageratina adenophora* root endophytic nitrogen-fixing bacteria[D]. Kunming: Master's Thesis of Yunnan University, 2017 (in Chinese)
保朱寿能. 紫茎泽兰(*Ageratina adenophora*)根内生固氮菌的分离及促生效应研究[D]. 昆明: 云南大学硕士学位论文, 2017
- [40] Rivas R, Willems A, Subba-Rao NS, et al. Description of *Devosia neptuniae* sp. nov. that nodulates and fixes nitrogen in symbiosis with *Neptunia natans*, an aquatic legume from India[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2003, 26(1): 47-53
- [41] Zhang W, Yang L, Wang ZJ. Advance and development trend of biological nitrogen fixation research[J]. Journal of Yunnan Agricultural University, 2015, 30(5): 810-821 (in Chinese)
张武, 杨琳, 王紫娟. 生物固氮的研究进展及发展趋势[J]. 云南农业大学学报, 2015, 30(5): 810-821
- [42] Guan QL, Tang M, Zhang ZJ, et al. Isolation and screening of endophytic diazotrophs from legumes[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2012, 40(9): 70-71 (in Chinese)
管岑澜, 唐梅, 张智锦, 等. 豆科植物内生固氮菌的分离与筛选[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(9): 70-71
- [43] Gu LC, Huang CY, Huang SF, et al. Comparison, identification, and characterization of endophytic bacteria from Chinese flowering cabbage (*Brassica parachinensis*) using soil and soilless culture[J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2019, 25(6): 1420-1427 (in Chinese)
顾李成, 黄彩怡, 黄淑芬, 等. 土壤栽培和无土栽培菜心中内生细菌比较及分离鉴定[J]. 应用与环境生物学报, 2019, 25(6): 1420-1427
- [44] Lin BS, Fan JL, Song ZZ, et al. Endophytic diazotrophs composition of *Pennisetum* sp. at different growth stages[J]. Microbiology China, 2018, 45(7): 1479-1490 (in Chinese)
林标声, 范锦琳, 宋昭昭, 等. 巨菌草不同生长时期的内生固氮菌群组成分析[J]. 微生物学通报, 2018, 45(7): 1479-1490
- [45] Wang BX, Wang XD, Duan GL. Screening and identification of arsenic-resistant endophytic bacteria from different rice tissues (*Oryza sativa* L.) in different growth stages[J]. Environmental Science, 2018, 39(5): 2464-2471 (in Chinese)
王伯勋, 王学东, 段桂兰. 水稻不同生长时期不同组织中抗砷内生菌的筛选与鉴定[J]. 环境科学, 2018, 39(5): 2464-2471