

岑溪药用野生稻高效内生固氮菌分离及促生特性

尹坤¹ 阳洁¹ 顾文杰² 袁涛¹ 谭志远^{1*}

(1. 华南农业大学 农学院 广东 广州 510642)

(2. 广东省农业科学院农业资源与环境研究所 广东 广州 510640)

摘要:【目的】以广西岑溪市野生稻保护区的药用野生稻为材料,分离纯化内生细菌,筛选固氮酶活性较高和对作物促生效果较好的菌株。【方法】利用乙炔还原法检测固氮酶活性,采用 SDS-PAGE 全细胞蛋白电泳和 IS-PCR 指纹图谱技术对分离到的固氮菌进行聚类。利用 16S rRNA 基因和 *nifH* 基因确定其系统发育地位。采用钼锇抗比色法、Salkowski 比色法和 CAS 检测法分别测定菌株溶磷性、生长素的分泌能力和产铁载体能力。通过平板和盆栽试验检测其对水稻的促生作用。【结果】共分离得到 35 株内生固氮菌,分为 6 个类群。其中 CX24 固氮酶活性最高,经鉴定属于 *Klebsiella variicola*,其固氮酶活性为 298.64 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{h})$,为参比模式菌株 DSM15968 的 9 倍。另外该菌株还具有较高的溶磷性、分泌生长素和产铁载体能力,能够有效地促进水稻的萌发和生长。【结论】菌株 CX24 属于 *Klebsiella variicola*,是一株高效内生固氮菌,具有很好的生产应用前景。

关键词: 内生固氮菌, 固氮酶活性, 促生特性

Isolation and characterization of plant growth promotion of efficient endophytic diazotrophs from *Oryza officinalis* wall in Cenxi

YIN Kun¹ YANG Jie¹ GU Wen-Jie² YUAN Tao¹ TAN Zhi-Yuan^{1*}

(1. College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China)

(2. Institute of Agricultural Resources and Environment, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou, Guangdong 510640, China)

Abstract: [Objective] To screen efficient nitrogen fixation and plant growth promoting endophytes from *Oryza officinalis* wall in Cenxi, Guangxi. [Methods] The nitrogen-fixation ability of the isolates was tested by acetylene reduction assay. The SDS-PAGE patterns of the whole-cell protein electrophoresis and IS-PCR DNA finger-prints were used to group these isolates. Phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene and *nifH* gene was performed. The ability of indole acetic acid secretion and the production of siderophore were tested by the Salkowski colorimetric method and

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31370052); 广东省科技计划项目(No. 2013B060400020, 2014A030313459); 广东省引进创新科研团队项目(No. 2013S033)

*通讯作者: ✉: zytan@scau.edu.cn

收稿日期: 2014-10-25; 接受日期: 2014-12-03; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-03-16

the blue plate assay, separately, and the ability of phosphate solubilization also was detected. The property of plant growth promoting rice was tested by plate and potting. **[Results]** A total of 35 endophytic diazotrophs were isolated and classified into 6 groups, in which CX24 belonging to the *Klebsiella variicola* showed the highest nitrogenase activity. The nitrogenase activity (298.64 nmol/(mL·h)) was 9 times as much as the reference strain DSM15968. Besides the secreting siderophore, indole acetic acid and ability of solubilize phosphorus, the strain CX24 could also effectively promote the germination and growth of rice. **[Conclusion]** The strain CX24 belonging to *Klebsiella variicola*, was an efficient endophytic diazotroph and had a very good application prospect.

Keywords: Endophytic diazotroph, Nitrogenase activity, Plant growth promotion

植物内生固氮菌是指那些定殖在植物内部与植物宿主联合固氮的固氮菌^[1]。内生固氮菌的内生固氮作用不形成特异化的结构,几乎可以在宿主植物的各种营养器官内发挥固氮作用,为植物提供氮源。此外,它们产生的次生代谢物,如生长素、铁载体、溶磷物质等也可以促进植物生长^[2-3]。*Klebsiella variicola* 作为高效内生固氮菌,国内外对其固氮机理的研究较多,但对于其促生特性的研究还比较少。本研究以广西岑溪市野生稻保护区中的药用野生稻为材料,分离纯化内生固氮菌,利用乙炔还原法测定固氮酶活性,筛选固氮酶活性较高的菌株。利用 16S rRNA 基因和 *nifH* 基因对该菌的分类地位进行鉴定。并对该菌的溶磷性、产铁载体和分泌生长素的能力以及对生产实践中的栽培稻的促生效应进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试植物: 样品采集于广西岑溪市药用野生稻保护区中的药用野生稻,该保护区较偏僻,人为破坏程度小,自然生态系统比较完好。

水稻种子: 籼型三系杂交水稻天优 998, 由华南农业大学农学院作物栽培学实验室提供。

1.1.2 培养基: Döbereiner 改良无氮培养基(包括固体和半固体)^[4], CCM 培养基(包括固体和半固体)^[5], VM-Ethanol 固体培养基^[6], MKB 培养基^[7], PKO 无机磷培养基和蒙金娜有机磷培养基^[8]。

1.2 内生固氮菌的分离纯化

采用乙醇-升汞结合消毒的方式,对野生稻的根、茎、叶进行表面灭菌。将剪碎的组织材料接种

到 Döbereiner 改良无氮半固体培养基和 CCM 半固体培养基中。结合乙炔还原法和平板划线法纯化菌落,将纯化后的内生固氮菌保存于 15% 甘油, -20 °C 保藏备用。

1.3 固氮酶活性测定

采用乙炔还原法对各菌株的固氮酶活性进行测定。将保存的各菌株用 VM-Ethanol 固体培养基活化,挑少量菌体于灭菌离心管中,用无菌水稀释,按相同接种量接入装有 5 mL 相应半固体培养基的 10 mL 试管中,用橡胶塞密封。37 °C 培养 24 h 后,注入 1/10 体积的 10% 乙炔气体,继续培养 24 h,从试管中抽取 0.5 mL 气体注入气相色谱仪(北京天普分析仪器厂 SP-2100),测定乙炔、乙烯的含量。按下列公式计算固氮酶活性大小^[9]:

$$C=(h_x \times c \times V)/(24.9 \times h_s \times t)$$

其中, h_x 为样品峰面积值; h_s 为标准 C_2H_4 峰面积值; c 为标准 C_2H_4 浓度($\mu\text{mol/L}$); V 为培养容器体积(mL); t 为样品培养时间(h); C 为产生的 C_2H_4 浓度 [$\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{h})$]。

1.4 IS-PCR 指纹图谱扩增及分析

采用 Insertion sequence-based PCR (IS-PCR) 指纹图谱方法,根据王春连等^[10]的研究成果,选用单引物 J3 (5'-GCTCAGGTCAGGTGGCCTGG-3') 为引物,PCR 反应条件和体系参照文献^[11],反应体系总体积改为 25 μL ,其他条件相同。反应完毕,用高分辨率的聚丙烯酰胺凝胶电泳进行聚类分析。

1.5 SDS-PAGE 全细胞蛋白电泳聚类分析

菌株全细胞蛋白的提取参照谭志远等^[12]方法,将提取的菌株蛋白放 -20 °C 备用,用前于 95 °C 加

热 10 min, 并以 12 000 r/min 离心 5 min。选择 10% 分离胶、5% 浓缩胶进行 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶(Dodecyl sulfate sodium salt-polyacrylamide gel electrophoresis)电泳, 电泳条件为 60 V 恒压 30 min, 30 mA 恒流跑完分离胶, 方法参见文献[13]。

1.6 菌种鉴定

1.6.1 16S rRNA 基因序列分析: 采用细菌通用引物 25F (5'-AACTKAAGAGTTTGATCCTGGCTC-3') 和 1492R [5'-TACGG(C/T)TACCTTGTACGACT T-3'] 进行扩增。将扩增产物送中美泰和生物技术有限公司测序。所得序列在 GenBank 数据库中进行比对(BLAST), 寻找具有较高同源性的 16S rRNA 基因序列, 采用 TREECONW 软件进行多序列比对, 用临近法构建系统发育树, 确定其发育地位。

1.6.2 固氮酶 *nifH* 基因扩增与序列分析: 利用 Zehr 等^[14] 设计的简并引物, 以正向引物 Zehrfl (5'-TGYGAYCCNAARGCNGA-3') 和反向引物 Zehrr2 (5'-NDGCCATCATYTCNCC-3') 扩增 *nifH* 基因片段。*nifH* 的 PCR 体系(25 μ L)为: 10 \times PCR buffer 2.5 μ L, dNTPs (10 mmol/L) 0.5 μ L, Zherf (25 μ mol/L) 0.5 μ L, Zherr (25 μ mol/L) 0.5 μ L, *Taq* 酶(3 U/ μ L) 0.5 μ L, DNA 模板 0.5 μ L, ddH₂O 20 μ L。反应条件为: 97 $^{\circ}$ C 3 min; 97 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 50 s, 72 $^{\circ}$ C 35 s, 共 32 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。将扩增产物送中美泰和生物技术有限公司测序。所得序列在 GenBank 数据库中进行比对(BLAST), 寻找具有较高同源性的 *nifH* 基因序列, 初步确定其发育地位, 采用 TREECONW 软件进行多序列比对, 用临近法构建系统发育树。

1.7 促生特性研究

1.7.1 溶磷性测定: 采用无机磷 Ca₃(PO₄)₂ 固体培养基和蒙金娜有机磷固体培养基溶磷圈法进行定性测定, 采用钼锑抗比色法进行定量测定。

1.7.2 分泌生长素性能测定: 采用 Salkowski 比色法^[15] 进行分泌生长素的测定。

1.7.3 产铁载体能力测定: 采用 CAS 法^[16] 进行铁载体的测定。

1.7.4 水稻促生试验: (1) 平板水培促生试验。水

稻种子先用 75% 的酒精处理 3 min, 再用 3% 的次氯酸钠表面灭菌 8 min, 用无菌水反复冲洗后浸泡催芽 2 d, 放入菌株 CX24 的菌悬液(3 \times 10⁸ CFU/mL) 中浸泡 24 h (对照用无菌水), 倒掉菌液, 放于装有无菌水的平板中, 培养 10 d 后测定水稻的株高(植株茎基部至叶片顶端的垂直距离)及根长。数据分析采用 SPSS 17.0 软件。

(2) 盆栽试验。水稻种子先用 75% 的酒精处理 3 min, 再用 3% 的次氯酸钠表面灭菌 8 min, 用无菌水反复冲洗后浸泡催芽 2 d, 放入到菌株 CX24 的菌悬液(3 \times 10⁸ CFU/mL) 中浸泡 24 h (对照用无菌水), 倒掉菌液, 将已发芽的种子移入到装有 250 g 供试土壤(已灭菌)的塑料杯中, 每杯放 1 粒种子。一周后再次接菌, 每株水稻接入 5 mL 菌液。室外自然生长 1 个月, 测定分蘖数、株高和叶绿素含量。数据采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 内生固氮菌分离结果

从野生稻的根茎叶中共分离内生固氮菌 35 株, 其中从根中分离到 20 株, 茎中 11 株, 叶中 4 株。

2.2 固氮酶活性测定结果

固氮酶除了具有还原分子氮的能力以外, 还可以将乙炔还原成乙烯, 从而建立了测定固氮作用的乙炔还原分析方法。此方法快速、灵敏度高。在一定条件下, 固氮酶将乙炔还原成乙烯的量与固氮酶活性的高低呈正相关^[17]。表 1 为 35 株内生固氮菌的固氮酶活性值, 从表 1 可以看出, 分离得到的内生固氮菌的固氮能力有较大差异, 其值分布在 23.06–298.64 μ mol/(L·h) 之间, 大部分菌株活性较低, 在所测得的数值中菌株 CX24 固氮酶活性最高, 为 298.64 μ mol/(L·h), 约为参比模式菌株 DSM15968 的 9 倍。

2.3 IS-PCR 指纹图谱聚类分析

通过 IS-PCR 指纹图谱分析, 可以区分不同种类的细菌。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, 由图 1 可知, 35 株内生固氮菌共分为 6 个类群。

表 1 所分离菌株固氮酶活性
Table 1 The nitrogenase activity of the isolates

菌株 Strains	酶活性 Nitrogenase activity ($\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/(\text{L}\cdot\text{h})$)	菌株 Strains	酶活性 Nitrogenase activity ($\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/(\text{L}\cdot\text{h})$)	菌株 Strains	酶活性 Nitrogenase activity ($\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/(\text{L}\cdot\text{h})$)
CX01	23.06	CX13	82.33	CX25	31.55
CX02	51.19	CX14	57.61	CX26	176.44
CX03	59.63	CX15	67.68	CX27	84.54
CX04	73.89	CX16	152.40	CX28	98.02
CX05	44.65	CX17	64.37	CX29	123.66
CX06	92.14	CX18	42.68	CX30	201.23
CX07	30.67	CX19	62.89	CX31	38.92
CX08	50.58	CX20	35.33	CX32	65.34
CX09	84.62	CX21	97.32	CX33	154.76
CX10	104.34	CX22	104.55	CX34	29.28
CX11	156.21	CX23	135.21	CX35	67.24
CX12	93.76	CX24	298.64	DSM 15968	32.46

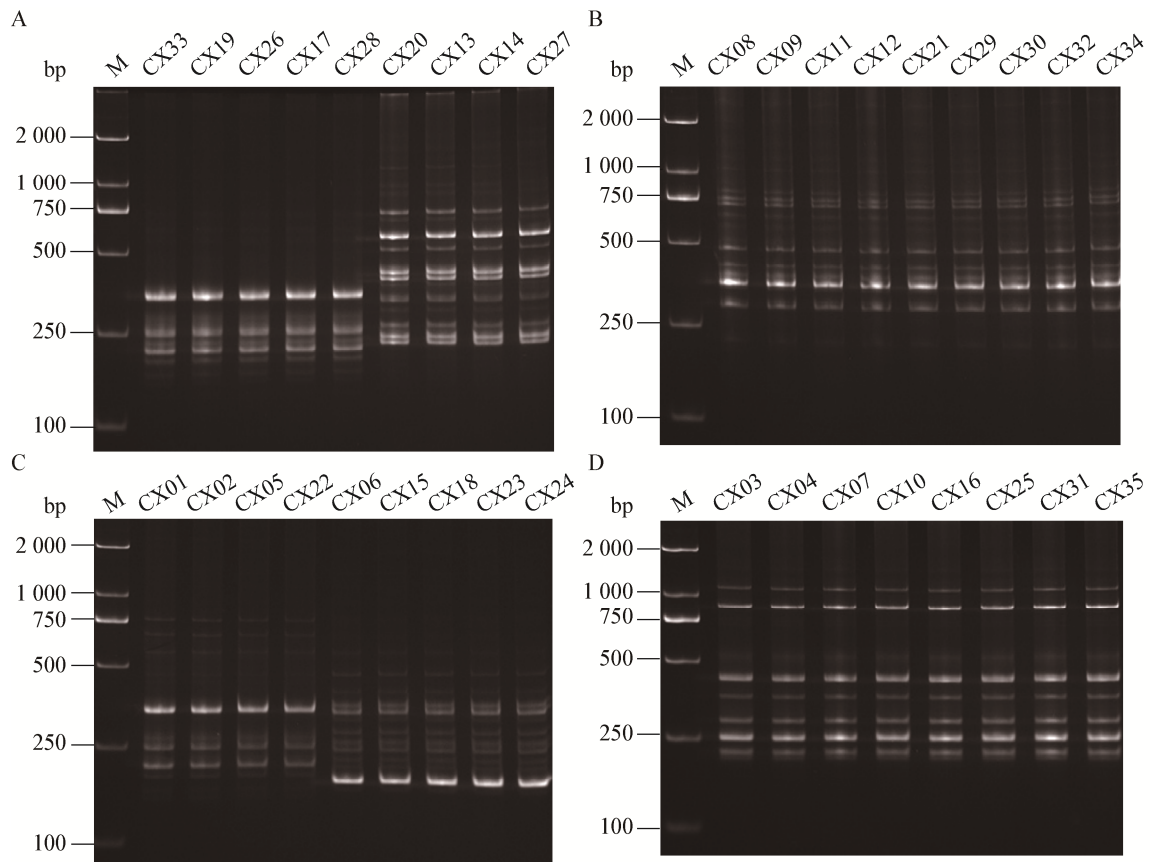


图 1 35 株内生固氮菌 IS-PCR 指纹图谱

Figure 1 Insertion sequence-based PCR patterns of 35 endophytic diazotrophs

Note: A: Group I and Group II; B: Group III; C: Group IV and Group V; D: Group VI.

2.4 SDS-PAGE 全细胞蛋白电泳图谱

根据图 1 的 IS-PCR DNA 指纹图谱聚类结果, 将各类群中的菌株集中一起, 进行 SDS-PAGE 全细胞蛋白电泳, 从蛋白质水平上对聚类结果进一步确证(图 2)。图 2 中, 各类群菌株在分子量 14.4–116.0 kD 范围内蛋白质条带具有较高相似性, 它们分别构成相应的类群, 35 株供试菌株的 SDS-PAGE 全细胞蛋白电泳聚类图与 IS-PCR 指纹图谱聚类结果一致。

2.5 菌种鉴定

2.5.1 16S rRNA 基因序列分析: 菌株 CX24 16S rRNA 基因序列扩增得到约 1 500 bp 的单一片段。测序后, 将测得的序列在 GenBank 数据库中进行比对(BLAST), 寻找具有较高同源性的 16S rRNA 基因序列, 初步确定其发育地位, 序列分析采用软件

CluStal X 进行比对后, 再用软件 GeneDoc 进行人工比对和格式转换, 最后用 TREECONW 软件进行临近法聚类分析并构建系统发育树。对比结果表明, 菌株 CX24 与 *Klebsiella variicola* 有 99% 的相似性, 属于变栖克雷伯氏菌。代表菌株 CX24 在系统发育树中的位置和遗传距离见图 3。

2.5.2 *nifH* 片段的扩增: 固氮酶有两部分构成, 一部分是铁蛋白, 一部分是钼铝铁蛋白, 其中编码钼铝铁蛋白的基因有 *nifD* 和 *nifK*, 编码铁蛋白的基因是 *nifH*。*nifH* 基因是约 360 bp 的特异性条带, 有比较保守的区域, 因此常用来鉴别固氮微生物。在 DNA 分子水平上, 对固氮酶 *nifH* 基因的保守区域进行 PCR 扩增, 结果如 4 图所示, 所得结果具有高度一致性, 条带大小为 360 bp 左右。

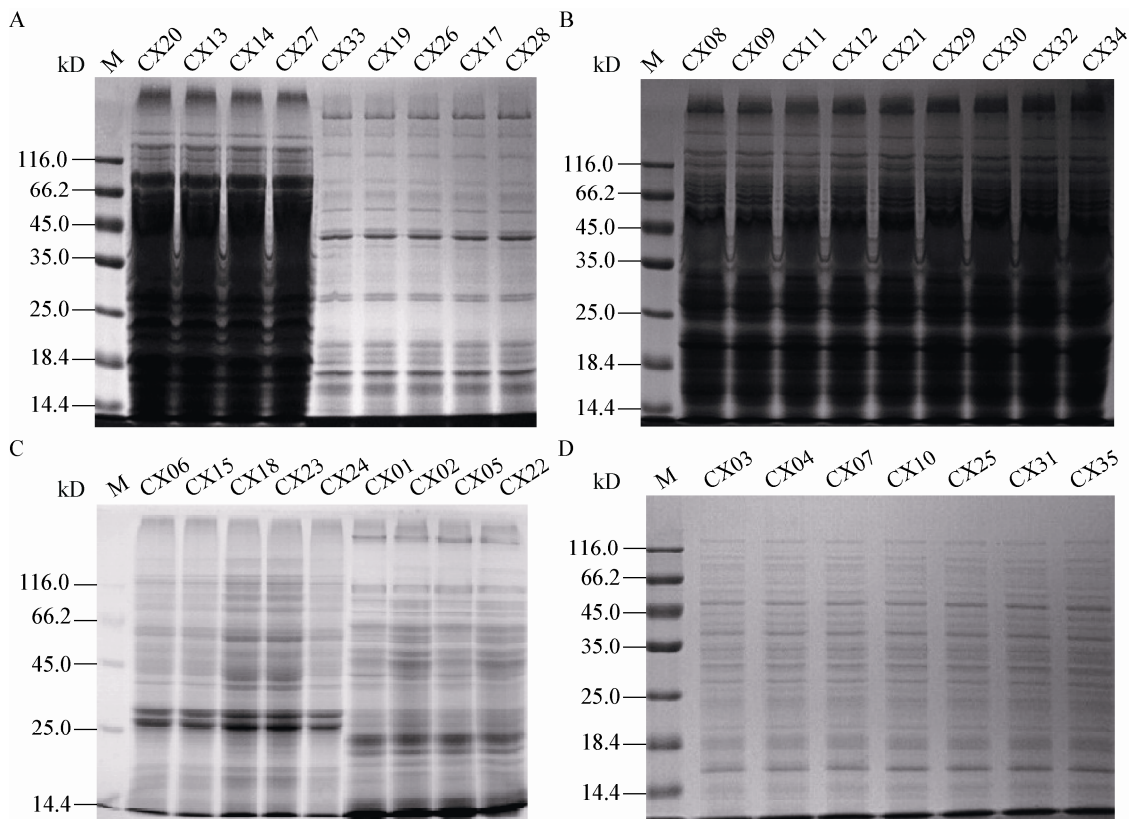


图 2 35 株内生固氮菌全细胞蛋白电泳图谱

Figure 2 SDS-PAGE whole-cell protein patterns of 35 endophytic diazotrophs

Note: A: Group I and Group II; B: Group III; C: Group IV and Group V; D: Group VI.

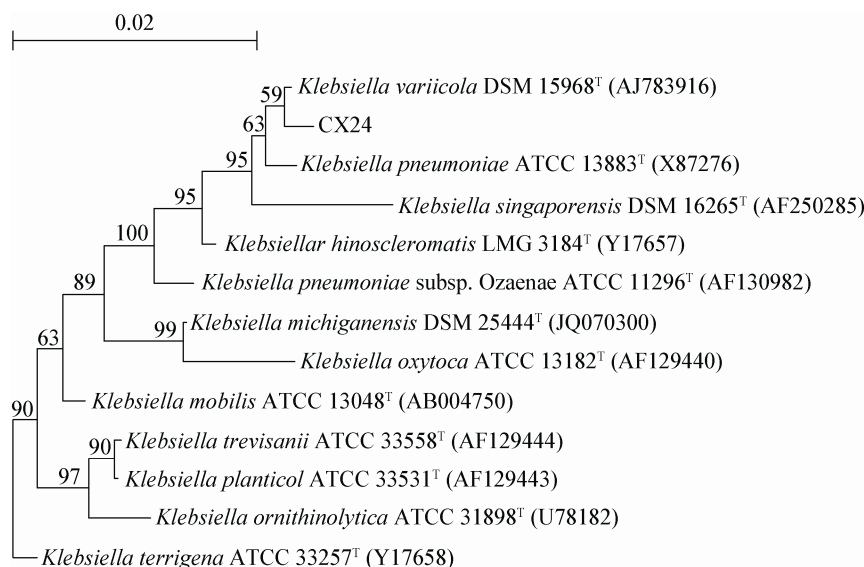


图 3 以菌株 CX24 的 16S rRNA 基因序列为基础的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence of strain CX24

注: 括号中的序号代表序列 GenBank 登录号; 分支点数字代表步长值; 标尺代表序列间分歧度。

Note: Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. Numbers at the nodes indicate the bootstrap values on Neighbor-Joining analysis of 1 000 resampled data sets. Bar 0.02 represents sequence divergence.

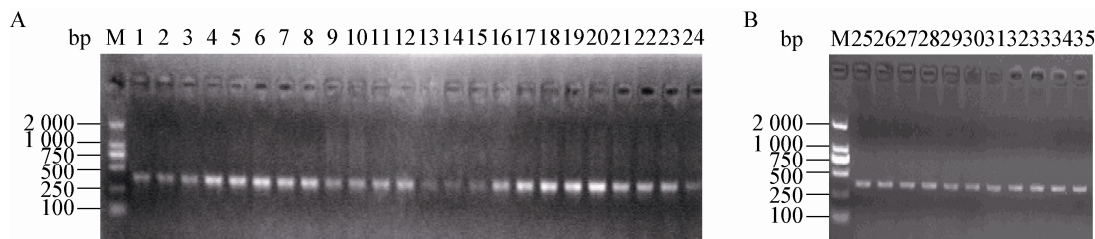


图 4 35 株内生固氮菌 *nifH* 基因片段 PCR 扩增产物电泳图

Figure 4 *nifH* gene PCR amplification product electrophoretogram of 35 endophytic diazotrophs

Note: 1.2% agarose electrophoresis. 1–35: Strain CX01–CX35.

2.5.3 *nifH* 基因序列分析: 经测序, 将所得菌株 CX24 *nifH* 序列在 NCBI 中进行比对, 挑选出序列相似性在 98% 以上的不同属种的代表菌种, 构建系统发育树, CX24 与 *Klebsiella variicola* 聚在了一起 (图 5), 这与 16S rRNA 基因分析结果相一致, 进一步说明 CX24 属于 *Klebsiella variicola*。

2.6 促生特性研究

2.6.1 溶磷能力测定: 研究表明, 具有溶磷能力菌株的溶磷能力 HD/CD (菌落的溶磷圈直径与菌落直径的比值) 值介于 1.00–2.00, 为溶磷能力中等菌株^[18]。试验菌株 CX24 在培养 2 d 后 HD/CD 不再

发生明显变化, 测定结果如表 2 所示。可以看出, 菌株 CX24 对有机磷和无机磷均能够溶解, 且属于中等溶磷能力菌株。

2.6.2 分泌生长素性能测定: 采用 Salkowski 比色法, 根据显色结果判断菌株是否分泌生长素。结果表明, 30 min 后菌株 CX24 的菌悬液可以与显色液结合呈现粉红色, 具有一定的分泌生长素能力。参照 Riberio 等^[19]的方法对菌株 CX24 做分泌生长素的定量测定, 菌株 CX24 分泌生长素定量检测结果见表 2。

2.6.3 产铁载体能力测定: 产铁载体的菌株在其菌落周围能够形成橙红色晕圈, 检测结果非常直观。菌株 CX24 培养 2 d 后, 发现检测平板上有铁载体产生。通常是以 OD_{630} 的 A/A_r 值(A 和 A_r 分别为接菌和未接菌上清反应液在 630 nm 波长处的吸光值)来确定菌株产铁载体的能力, A/A_r 比值越小, 表明产铁载体能力越大。菌株 CX24 的产铁载体定性及定量检测结果见表 2。从表 2 中可以看出, 菌株 CX24 的 A/A_r 值为 0.683, 产铁载体能力中等。

2.6.4 水稻促生试验: (1) 平板水培促生试验。将

分别接种 CX24 菌悬液与不接菌空白对照的水稻种子置于 9 mm 的平板中培养 10 d, 实验结果如表 3 所示。与空白对照相比, CX24 有效地促进了水稻的萌发生长。

(2) 盆栽试验。与不接菌的空白对照盆栽水稻相比, CX24 菌液显著地提高了水稻的分蘖数、株高和叶绿素含量(表 4), 分蘖数的增加率达 70.67%, 株高的增加率为 19.34%, 叶绿素含量的增加率为 49.34%。试验表明, 菌株 CX24 是一株高效的内生促生菌。

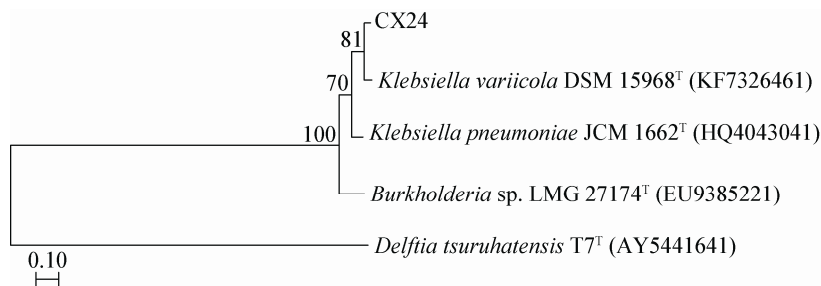


图 5 菌株 CX24 *nifH* 基因系统发育树

Figure 5 Phylogenetic tree based on *nifH* sequence of strain CX24

注: 括号中的序号代表序列 GenBank 登录号; 分支点数字代表步长值; 标尺代表序列间分歧度。

Note: Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. Numbers at the nodes indicate the bootstrap values on Neighbor-Joining analysis of 1 000 resampled data sets. Bar 0.02 represents sequence divergence.

表 2 菌株 CX24 溶磷圈 HD/CD 值、分泌生长素能力和铁载体能力检测

Table 2 Detection of the HD/CD ratio, the ability to secrete IAA and siderophore of the strain CX24

菌株 Strain	生长素 IAA		溶解无机磷 Dissolving inorganic phosphorus			溶解有机磷 Dissolving organic phosphorus			铁载体 Siderophore	
	Qualitative	Quantitative (mg/L)	HD (cm)	CD (cm)	HD/CD	HD (cm)	CD (cm)	HD/CD	Qualitative	Quantitative (A/A_r)
CX24	+	19.12	1.06	0.86	1.23	1.70	0.70	2.43	+	0.683

注: +: 颜色变化。

Note: +: Colour change.

表 3 平板限菌条件下 CX24 菌液对水稻种子的促生作用

Table 3 The promotive effect of the CX24 suspension on the rice seed under aseptic condition

处理 Treatment	根数 Root number	增加率 Increment rate (%)	根长 Root length (cm)	增加率 Increment rate (%)	苗高 Seeding height (cm)	增加率 Increment rate (%)
无菌水 Sterile water	6±0.42 ^a	—	4.10±0.23 ^a	—	8.05±0.25 ^a	—
CX24 菌液 Suspension	10±0.57 ^b	66.7	5.60±0.31 ^b	36.6	9.78±0.18 ^b	21.4

注: 同列肩注不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: In the same column, values with different small letter superscripts mean significant difference ($P < 0.05$).

表 4 盆栽条件下 CX24 菌液对水稻的促生作用
Table 4 The promotive effect of the CX24 suspension on the rice under the potted condition

处理 Treatment	分蘖数 Tiller number	增加率 Increment rate (%)	株高 Plant height (cm)	增加率 Increment rate (%)	叶绿素 Chlorophyll (SPAD)	增加率 Increment rate (%)
无菌水 Sterile water	3.75±0.25 ^a	—	44.73±1.65 ^a	—	30.32±1.18 ^a	—
CX24 菌液 Suspension	6.40±0.51 ^b	70.67	53.38±1.79 ^b	19.34	45.28±1.23 ^b	49.34

注: 同列肩注不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

Note: In the same column, values with different small letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$).

3 讨论

菌株分离结果与分离所采用的培养基成分、植物种类、土壤类型等多种因素有关。在相同生长条件下, 本试验为了尽可能多地分离到多属种的内生固氮菌, 应用了 2 种无氮选择性培养基进行分离、纯化, 分离的菌株大部分来自茎和根, 极少数来自叶部, 这与其他植物分离内生固氮菌结果^[20]基本一致。自从内生固氮菌发现以来, 已有学者对内生固氮菌在野生稻上的分布进行了研究, 如谭志远等^[21]对来自 3 个不同地方的野生稻的内生固氮菌进行分离纯化, 通过 DNA 指纹图谱分析可划分为多个类群。安千里等^[22]对固氮菌 *Klebsiella oxytoca* SA₂ 在水稻根内定殖并表达固氮酶活性进行了描述。沈德龙等^[23]对水稻内生优势菌-成团肠杆菌进行了研究。本文通过乙炔还原法对从野生稻中分离的菌株 CX24 固氮酶活性进行测定, 发现其固氮酶活性约为参比模式菌株 DSM 15968 的 9 倍, 达到 298.64 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{h})$ 。证实菌株 CX24 具有溶磷、产铁载体和分泌生长素的特性, 并且能够促进水稻幼苗根的生长和促进水稻的分蘖。因此, 菌株 CX24 在研究固氮菌肥开发方面具有很大的应用潜力。

关于植物内生菌的促生作用国内外已有较多报道, 如许明双等^[24]对水稻内生菌 K12G2 菌株作了鉴定及其促生特性研究, Zhang 等^[25]从小麦中分离得到根际促生菌并对其作了促生研究。Mayak 等^[26]研究了植物促生菌对马铃薯的耐盐拮抗作用, Rodrigues 等^[27]研究了接种 *Azospirillum*

amazonense 对水稻的促生作用。本试验菌株 CX24 经 16S rRNA 基因和 *nifH* 基因序列鉴定, 确认其属于变栖克雷伯氏菌 *Klebsiella variicola*。有关 *Klebsiella variicola* 的研究国内外有过相关报道, Rosenblueth 等^[28]鉴定了一个新种 *Klebsiella variicola*, 并扩增出了 *nifH* 基因, 但没有研究其促生特性。魏春燕等^[29]将变栖克雷伯氏菌接种到甘蔗根部, 从氮代谢关键酶活性和硝态氮含量及矿质元素吸收的影响研究了其促生效应。本文从高固氮酶活性、产铁载体、溶磷性和分泌生长素以及接种水稻等方面研究变栖克雷伯氏菌的促生效应, 为后期研究固氮菌肥等投入生产应用做好基础。

参考文献

- [1] Dobereiner J, Baldani VL. Selective infection of maize roots by streptomycin-resistant *Azospirillum lipoferum* and other bacteria[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1979, 25(11): 1264-1269
- [2] 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
- [3] 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
- [4] Xie GH, Su BL, Cui ZJ. Isolation and identification of N₂-fixation strains of *Bacillus* in rice rhizosphere of the Yangtze Valley[J]. Acta Microbiologica Sinica, 1998, 38(6): 480-483 (in Chinese)
谢光辉, 苏宝林, 崔宗均. 长江流域水稻根际芽孢杆菌属固氮菌株的分离与鉴定[J]. 微生物学报, 1998, 38(6): 480-483

- [5] Ji WL, Li WZ, Tian YS. Investigation and study of the application status of the lawn in Xi'an[J]. Journal of Northwest Forestry University, 1999, 14(4): 104-108 (in Chinese)
吉文丽, 李卫忠, 田养森. 西安市草坪应用现状调查研究[J]. 西北林学院学报, 1999, 14(4): 104-108
- [6] 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 Application and 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
- [7] Wang P, Dong B, Li FL, et al. Detection and determination of the siderophores produced by wheat rhizobacteria[J]. Microbiology China, 1994, 21(6): 323-326 (in Chinese)
王平, 董飏, 李阜棣, 等. 小麦根圈细菌铁载体的检测[J]. 微生物学通报, 1994, 21(6): 323-326
- [8] Zhao XR, Lin QM, Sun YX, et al. The methods for quantifying capacity of bacteria in dissolving phosphorus compounds[J]. Microbiology China, 2001, 28(1): 1-4 (in Chinese)
赵小蓉, 林启美, 孙焱鑫, 等. 细菌解磷能力测定方法的研究[J]. 微生物学通报, 2001, 28(1): 1-4
- [9] Edited by Beijing Kasetsart University microbiology. Microbiology Experiment Guidance[M]. Beijing: Beijing Kasetsart University press, 1986 (in Chinese)
北京农业大学微生物专业编. 微生物实验指导[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1986
- [10] 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, 2(15): 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, 2(15): 131-136
- [11] Wang HR, Peng GX, Zhang GX, et al. Characterization of endophytic diazotrophs isolated from molasses grass[J]. Acta Ecologica Sinica, 2006, 46(8): 2566-2571 (in Chinese)
王华荣, 彭桂香, 张国霞, 等. 糖蜜草(*Melinis minutiflora* Beauv.)内生固氮菌分离鉴定[J]. 生态学报, 2006, 46(8): 2566-2571
- [12] Tan ZY, Fu QM, Peng GX, et al. Identification and characterization of endophytic diazotrophs isolated from *Cymbopogon caesius* and *Miscanthus floridulus*[J]. Chinese Journal of Application and Environmental Biology, 2013, 19(4): 643-649 (in Chinese)
谭志远, 傅琴梅, 彭桂香, 等. 青香茅和五节芒内生固氮菌的分离与生理生化鉴定[J]. 应用与环境生物学报, 2013, 19(4): 643-649
- [13] 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
- [14] Zehr JP, McCreynolds LA. Use of degenerate oligonucleotides for amplification of the *nifH* gene from the marine cyanobacterium *Trichodesmium thiebautii*[J]. Applied Environmental Microbiology, 1989, 10(55): 2522-2526
- [15] Glickmann E, Dessaux Y. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria[J]. Applied Environmental Microbiology, 1995, 61(2): 793-796
- [16] Machuca A, Milagres AM. Use of CAS-agar plate modified to study the effect of different variables on the siderophore production by *Aspergillus*[J]. Letters Applied Microbiology, 2003, 36(3): 177-181
- [17] Yang CF, Wang SJ, Chen J, et al. Isolation and identification of endophytic nitrogen fixing bacteria[J]. Journal of Huaihai Institute of Technology (Natural Science Edition), 1999, 8(3): 56-58 (in Chinese)
杨从发, 王淑军, 陈静, 等. 内生固氮菌的分离鉴定[J]. 淮海工学院学报: 自然科学版, 1999, 8(3): 56-58
- [18] Qi J, Shi SL. The ability of indole acetic acid secretion and phosphate solubilization of endophytic rhizobia of different varieties of *Medicago sativ* seeds[J]. Grassland and Turf, 2006(5): 18-20, 25 (in Chinese)
祁娟, 师尚礼. 不同品种紫花苜蓿种子内生根瘤菌溶磷和分泌生长素能力[J]. 草原与草坪, 2006(5): 18-20, 25
- [19] Ribeiro CM, Cardoso EJB. Isolation, selection and characterization of root-associated growth promoting bacteria in Brazil Pine (*Araucaria angustifolia*)[J]. Microbiological Research, 2012, 167(2): 69-78
- [20] Hou W, Peng GX, Xu ZJ, et al. Diversity of endophytic diazotrophs isolated from *Bambusa blumeana* in Guangdong Province[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2007, 2(15): 290-294 (in Chinese)
侯伟, 彭桂香, 许志钧, 等. 广东省刺竹内生固氮菌多样性[J]. 农业生物技术学报, 2007, 2(15): 290-294
- [21] Tan ZY, Peng GX, Xu PZ, et al. Diversity and nitrogenase activity of endophytic diazotrophs isolated from *Oryza rufipogon*[J]. Chinese Science Bulletin, 2009, 54(13): 1885-1893 (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(13): 1885-1893
- [22] An QL, Kuang BJ, Mu XJ, et al. Endophytic diazotrophs:

- Klebsiella oxytoca* SA_2 colonization in rice roots and expression of nitrogenase[J]. Progress in Natural Science, 1999, 9(S1): 113-119 (in Chinese)
- 安千里, 匡柏健, 母锡金, 等. 固氮菌*Klebsiella oxytoca* SA_2 在水稻根内定殖并表达固氮酶[J]. 自然科学进展, 1999, 9(S1): 113-119
- [23] Shen DL, Song W, Dong XZ, et al. Identification and phylogenetic analysis of rice endophytic superior strain of *Enterobacter agglomerans*[J]. Progress in Natural Science, 2000, 10(10): 87-90 (in Chinese)
- 沈德龙, 宋未, 东秀珠, 等. 水稻内生优势菌—成团肠杆菌的鉴定及其系统发育学分析[J]. 自然科学进展, 2000, 10(10): 87-90
- [24] Xu MS, Sheng JP, Guo ST, et al. Identification of rice endophytic strain K12G2 and research on plant growth promoting traits[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2014, 30(9): 66-70 (in Chinese)
- 许明双, 生吉萍, 郭顺堂, 等. 水稻内生菌K12G2菌株的鉴定及其促生特性研究[J]. 中国农学通报, 2014, 30(9): 66-70
- [25] Zhang J, Liu J, Meng L, et al. Isolation and Characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from wheat roots by wheat germ agglutinin labeled with fluorescein isothiocyanate[J]. The Journal of Microbiology, 2012, 2(50): 191-198
- [26] Mayak S, Tirosh T, Glick BR. Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2004, 42(6): 565-572
- [27] Rodrigues EP, Rodrigues LS, de Oliveira ALM, et al. *Azospirillum amazonense* inoculation: effects on growth, yield and N₂ fixation of rice (*Oryza sativa* L.)[J]. Plant and Soil, 2008, 302(1/2): 249-261
- [28] Rosenblueth M, Martinez L, Silva J, et al. *Klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant-associated isolates[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2004, 27(1): 27-35
- [29] Wei CY, Xin YX, Lin L, et al. Growth-promoting effect of inoculating *Klebsiella variicola* DX120E on different sugarcane cultivars[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2014, 25(7): 2085-2092 (in Chinese)
- 魏春燕, 邢永秀, 林丽, 等. 接种变栖克雷伯氏菌DX120E对不同甘蔗品种的促生效应[J]. 应用生态学报, 2014, 25(7): 2085-2092

编辑部公告

《微生物学通报》英文刊名

《微生物学通报》之前使用的英文刊名“Microbiology”因在国际上有重名,造成了本刊在被国内外作者引用以及国外数据库收录时英文刊名的混乱,这大大影响了本刊在国际上的传播,也不利于对我刊引用数据的统计。经本刊编委会讨论,以及主办单位批准,本刊英文刊名自2010年起变更为“Microbiology China”,缩写为“Microbiol. China”,请各位作者、读者和数据库引用时注意使用。