普通野生稻(*Oryza rufipogon*)内生固氮菌多样性及高固氮酶活性

谭志远, 彭桂香, 徐培智, 艾绍英, 唐拴虎, 张国霞, 曾凤云

广东省植物分子育种重点实验室, 华南农业大学农学院, 广州 510642;

华南农业大学资源环境学院, 广州 510642;

广东省农业科学院土壤肥料研究所, 广州 510642

E-mail: zytan@scau.edu.cn

2008-10-20 收稿, 2009-04-19 接受

国家自然科学基金(批准号: 30470002, 30770001)、教育部新世纪优秀人才支持项目(批准号: NCET-07-0315)和广东省农业攻关项目(批准号: 2007B020711004)资助

摘要 从广东博罗、惠来和海南陵水县普通野生稻中分离到 37 株内生固氮菌, 并测定其固氮酶活性. 经固氮酶基因(*nifH*)的 PCR 扩增检测, 37 株内生固氮菌均能扩增出固氮酶基因(*nifH*)片段. 在 80%相似性水平上, IS-PCR 指纹图谱聚类分析得到 8 个类群(~). SDS-PAGE 全细胞蛋白电泳聚类分析与 IS-PCR 的聚类结果相似. 对各类群相应代表菌株(Ls13, Ls8, BL1, BL12, HL6, Ls4)进行脂肪酸含量和成分比较, 结果表明, 这些菌株的脂肪酸成分和含量具有较大的差异. 16S rDNA 序列分析表明, 类群 ~ 的菌株均属于肠杆菌科(γ -变形菌纲), 其中类群 和 的菌株属于克雷伯氏菌属不同种群; 类群 菌株 Ls8 与成团泛菌(*Pantoea agglomerans*)的相似性为 96%, 可能代表该属内的一个新种或一个新属; 类群 和类群 的菌株代表肠杆菌属的不同种群; 类群 菌株 Ls4 和 Ls9 与无丙二酸柠檬酸杆菌(*Citrobacter amalonaticus*)有 98%的相似性; 类群 菌株 Ls15 与成团泛菌关系最近, 有 97%相似性, 属于泛菌属; 类群 属于 *Ideonella* 属(β -变形菌纲). 这些表明普通野生稻内生固氮菌具有较大的多样性, 且部分菌株具高固氮酶活性, 达 $42.52 \mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. 水稻接种实验表明内生固氮菌能明显促进水稻生长.

关键词

普通野生稻
内生固氮菌
多样性
固氮酶活性
聚类分析

内生细菌是植物组织中的天然宿居者, 在它们的部分或整个生活周期寄居在植物组织特别是营养繁殖的组织中生存、繁衍、传播而不会对植物引起明显的损害^[1,2]. 但对这些内生细菌在植物组织中的作用至今仍知之甚少, 1986 年, Baldani 等人^[3]和 Reinhold 等人^[4]相继从巴西甘蔗和巴基斯坦盐碱地先锋植物卡拉牧草根、茎、叶中分离到了 3 株内生固氮菌, 并对它们的特性进行了详尽的研究, 证明内生固氮菌与宿主植物之间形成一高效固氮系统, 在 1993 年召开的第五届国际非豆科植物固氮大会总结报告

中, 高度评价了内生固氮菌的发现, 它代表了一个新的不同于经典联合固氮的共生固氮系统, 并开辟了一条新的拓展生物固氮到其他作物的途径. 普通野生稻是栽培稻的祖先, 作为一种非常重要的野生种质资源, 是水稻育种和生物技术研究的基础. 由于普通野生稻长期的自然繁殖生长, 形成了抗病虫害、抗旱、耐瘠薄土壤等特性. 在长期进化过程中, 内生固氮菌与宿主植物关系密切.

本文对广东省博罗县、惠来县和海南省陵水县普通野生稻中分离的 37 株内生固氮菌的多样性进行了

引用格式: 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. 科学通报, 2009, 54: 1885~1893

Tan Z Y, Peng G X, Xu P Z, et al. Diversity and high nitrogenase activity of endophytic diazotrophs isolated from *Oryza rufipogon* Griff. Chinese Sci Bull, 2009, 54, doi: 10.1007/s11434-009-0408-8

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2009-54-13-1885>

研究,通过固氮酶基因 *nifH* 的扩增证明其固氮酶存在情况、采用 SDS-PAGE 进行聚类、利用毛细管柱气相色谱技术比较细胞脂肪酸成分以及 16S rDNA 序列分析,揭示了普通野生稻中内生固氮菌的多样性,丰富了微生物资源库,且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

() 培养基. Döbereiner 改良无氮培养基(1 L): 蔗糖, 10 g; 苹果酸, 5 g; $K_2HPO_4 \cdot H_2O$, 0.2 g; $KH_2PO_4 \cdot H_2O$, 0.4 g; NaCl, 0.1 g; $FeCl_3$, 0.01 g; Na_2MoO_4 , 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 pH 至 7.0 ± 0.2 . 固体培养基中加入 1.7% (质量体积比) 的琼脂, 半固体培养基中加入 0.2% (质量体积比) 的琼脂。

() 主要试剂和仪器. 试剂 Tris (Amresco), dNTPs (Roche), 酵母粉(Oxoid), 蛋白胨(Oxoid)为进口试剂, 其余试剂均为广州化学试剂厂生产, PCR 仪和离心机均购于德国 Eppendorf 公司, 电泳仪为 Bio-Rad 公司生产, 电泳槽为北京六一厂生产。

() 菌株分离纯化及固氮酶活性测定. 参照 Stoltzfus 等人^[5]及王华荣等人^[6]的方法对新鲜的野生稻材料用蒸馏水洗净, 然后剪下长度 2~3 cm 根、茎、叶并分别置于已灭菌的 3 个培养皿中, 用 3% 的双氧水(H_2O_2)浸泡 4 min (以除去根、茎、叶表面的腐烂物质), 无菌水洗涤 1 次. 再用 0.1% 的升汞($HgCl_2$)浸泡 5 min, 无菌水中振动洗涤 5~7 次, 每次 5~10 min, 并将最后一次洗涤液涂布于固体培养基, 以检测消毒是否彻底. 将表面消毒完全的根、茎、叶用灭菌手术刀切碎, 分别穿刺接种到 3 支装有 Döbereiner 半固体培养基的试管中, 胶塞密封后, 置于 28 °C 的人工培养箱内进行培养. 整个操作均在无菌条件下完成. 待长出菌体后, 向管内注入 1/10 体积 10% 乙炔气体(终浓度为 1%), 在相同条件下再培养 24 h, 测定其固氮酶活性(乙炔还原法). 将具有固氮酶活性的菌株从半固体管中接至相应的固体培养基上, 平板划线分离, 28 °C, 湿度为 85% 条件下培养. 再挑取单菌落分别接种至半固体培养基试管中, 以检测固氮酶活性, 再涂平板直到获得纯的菌株, 最后通过镜检, 革兰氏染色, 进一步观察其形态及确定纯化与否. 从广东省博罗县、惠来县和海南省陵水县普通野生稻(*O. rufipogon*)中共分离到 37 株内生固氮菌, 固氮酶活性测定方法参照文献^[3]. 分别将纯化后的内生菌接种于盛有 5 mL

半固体培养基的试管中, 待试管内的细菌生长到对数期时, 向管内注入乙炔气体(终浓度为 1%), 在相同条件下再培养 24h, 测定其固氮酶活性. 测定仪器为 SP-2100 气相色谱(北京北分天普仪器技术有限公司), 柱温 50 °C, 进样器 150 °C, FID (Flame Ionization Detector, 火焰离子化检测器) 180 °C. N_2 , H_2 和干燥空气流速分别为 30, 30 及 300 mL/min 按公式: $N = \frac{h_x \times C \times V}{h_s \times 24.9 \times t}$ (h_x , 样品峰面积; h_s , 标准 C_2H_4 峰面积; C , 标准 C_2H_4 浓度($\mu\text{mol/mL}$); V , 样品管体积; t , C_2H_2 反应时间(h); N , C_2H_4 浓度($\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)) 计算得到各菌株固氮酶活性^[7].

() 细菌总 DNA 的提取. 采用小量提取 DNA 方法: 待菌株培养至对数生长期时收集菌体, 溶菌酶破壁, 用酚/氯仿/异戊醇(购于广州化学试剂厂)抽提, 乙醇沉淀, 最后溶解在 50 μL TE (pH 8.0) 中, 储存于 -20 °C 冰箱中备用。

() 固氮酶 *nifH* 基因扩增. 利用 Zehr 等人^[8]设计的简并引物, 以正向引物 Zehrfl (5'-TGYGAYC-CNAARGCNGA-3') 和反向引物 Zehrr2 (5'-NDGCC-ATCATYTCNCC-3') 扩增 *nifH* 基因片段. 反应条件是 97 °C 预变性 3 min, 97 °C 变性 1 min, 55 °C 复性 50 s, 72 °C 延伸 35 s, 32 个循环. 反应完成后, 72 °C 延伸 5 min。

() IS-PCR 指纹图谱. 参照文献^[9]的方法提取 DNA, 采用 Insertion Sequence-based PCR (IS-PCR) DNA 指纹图谱方法^[10], 根据王春连等人^[11]的研究成果, 选用单向引物 J3 (5'-GCTCAGGTCAGGTGGCC-TGG-3') 作为 IS-PCR 引物. PCR 反应体系为 50.0 μL : 10 $\times$ PCR 缓冲液 5.0 μL , 10 mmol/L dNTPs 1.0 μL , J3 引物(50.0 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL , 超纯 H_2O 41.5 μL , 模板 DNA 1.0 μL (30 ng/ μL), *Taq* 酶(3 U/ μL) 1.0 μL . PCR 反应条件参照文献^[12]. 反应完成后用 1% 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, 紫外成像仪观察照相, 得到指纹图谱, 通过软件 GIS3.74 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。

() SDS-PAGE 全细胞蛋白电泳. 用预称重的 Eppendorf 管离心收集菌体(对数生长期), 称其重量, 并用样品缓冲液裂解细胞, 使其浓度达到 150 mg/mL, 将样品在 95 °C 下加热 10 min 后, 8000 r/min 离心 2 min, 放入 -20 °C 冰箱中待用. 采用 DYCZ-24D 双垂直电泳

槽(购于北京六一仪器厂), 10%的分离胶, 5%的浓缩胶。电泳时恒流 30 mA, 视其指示剂溴酚兰到达胶的底端 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 紫外成像仪), 用 Tanon 软件进行聚类。溶液的配方及具体操作见参考文献 [13,14]。

() 脂肪酸的提取。参考卢焱等人 [15] 的实验方法, 对样品的处理方法做了一些改进, 培养细菌至对数生长期, 取大约 40 mg 湿重的菌体放在 5 mL 带螺旋盖试管中(盖子内衬特弗龙(Teflon)密封垫), 向样品管中加入 15%(体积比)NaOH-甲醇 1 mL, 100 °C 水浴 30 min, 然后加入 25%(体积比) HCl-甲醇 2 mL, 80 °C 水浴 10 min, 冷却后加入正己烷-甲基叔丁基醚(体积比, 1:1) 1 mL 提取脂肪酸甲酯, 将提取物移入另一试管中加 12% NaOH 溶液进行洗涤 [16]。

() 毛细管柱气相色谱分析条件: 采用 SP-2100 型气相色谱仪(北京天普分析仪器厂生产)与微型计算机、N2000 色谱软件联用。30 m×0.22 mm×0.22 μm SE-54 弹性石英毛细管色谱柱, 检测器 FID, 进样口和检测器的温度是 250 和 270 °C, 程序升温分 4 个阶段进行, 进样时 120 °C 维持 2 min; 以 20 °C/min 速率上升至 180 °C, 维持 1 min; 然后以 5 °C/min 的速率上升至 240 °C, 维持 1 min; 继续以 10 °C/min 速率上升至 270 °C 维持 2 min。载气 N₂ 30 mL/min, H₂ 30 mL/min, 干燥空气 300 mL/min, 信号衰减倍数为 10。

() 16S rDNA 基因的扩增。正向引物 25f (5'-AACT(G/T)AAGAGTTTGATCCTGGCTC-3') 和反向引物 1492r (5'-TACGG(C/T)TACCTTGTTACGAC-TT-3'), 反应体系及条件见参考文献 [17]; 测序所用引物为 35fc (5'-CTKAAGAGTTTGATCMTGGCTCAG-ATTGAACG-3'), 342fc (5'-CTCCTACGGGAGGCAG-3') 和 930fc (5'-GGTTAAACTYAAAKGAATTGACGGG-GAC-3')。引物合成和序列测定均由 Invitrogen 生物技术有限责任公司完成。将所测序列与 GenBank 中序列比较, 获得最相关菌种名称。

() 菌株接种水稻实验。主要采用盆栽法把菌株回接粳型水稻华航 1 号, 根据水稻种子发芽的时间, 将菌株活化好(把保存的菌株先接活 2~3 次), 以保证菌株在对数生长期, 制成菌悬液 10⁸ 细胞/mL 浓度浸泡水稻苗根部 24 h。然后转接到装有水稻无氮营养液的装有水稻土的塑料盆里, 放在人工气候箱中培养(14000 lx, 光照 14 h), 设置对照, 3 个重复。并

及时观察, 添加水。培养观察至 14 d 即可照相、测定高度和称鲜重。将具强荧光活性的 *gfp* 基因 [18] 转入含 Kan⁺ 和 Amp⁺ 抗性的 TOPO 克隆载体, 培养基中加入 IPTG (isopropyl β-D-thiogalactopyranoside) 诱导 *gfp* 基因表达。将该质粒 (含 *gfp* 基因、Kan⁺ 和 Amp⁺ 抗性) 分别转化内生固氮菌代表菌株, 获得转化子并测固氮酶活性, 按上述方法回接水稻。生长 14 d 后, 按上述步骤在含 IPTG, Kan⁺ 和 Amp⁺ 抗性的无氮培养基上, 检测标记菌株。

2 结果和分析

2.1 菌株的固氮酶活性测定及固氮酶 *nifH* 基因扩增

利用 Döbereiner 改良无氮培养基, 采用平板划线法, 从广东省博罗县、惠来县和海南省陵水县普通野生稻中分别分离纯化得到 10、5 和 22 株内生固氮菌, 菌株编号分别为 BL、HL 和 Ls, 其中从根部分离到 15 株, 叶部分离到 22 株(表 1)。

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高低呈正相关 [19]。对以上 37 株内生固氮菌的固氮酶活性测定, 其值分布在 0.93 μmol C₂H₄·mL⁻¹·h⁻¹ (菌株 BL11) 至 42.52 μmol C₂H₄·mL⁻¹·h⁻¹ (菌株 Ls16) 之间, 表明菌株的固氮酶活性差异较大(表 1), 菌株 Ls20 和 Ls16 的具有高固氮酶活性, 分别为 36.89 和 42.52 μmol·mL⁻¹·h⁻¹ C₂H₄(表 1)。

利用乙炔还原法筛选到 37 株来源于普通野生稻 (*Oryza rufipogon*) 的内生固氮菌后, 在 DNA 分子水平上通过 PCR 进一步检测固氮酶 *nifH* 基因(图 1)。所有菌株均扩增出约 360bp 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, 37 株内生固氮菌聚成 8 个类群, 初步反映了菌株具较大的多样性。类群 Ⅰ至类群 Ⅷ 的菌株数较多, 每个类群有 4~7 个菌株, 进一步的研究工作主要针对这 6 个类群, 类群 Ⅱ和类群 Ⅲ 菌株数均为 2 个(图 2)。

2.3 SDS-PAGE 蛋白电泳聚类分析

根据图 2 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 3)。图 3 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的相似性, 它们分别构成相应的类群, 与 IS-PCR 指纹图谱聚类结果一致。

表 1 菌株来源及固氮酶活性测定

菌株编号	分离部位	固氮酶活性/ $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	菌株编号	分离部位	固氮酶活性/ $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
BL1	叶	2.37	BL23	叶	1.53
BL4	叶	1.95	BL29	根	1.67
BL5	叶	2.15	HL 6	叶	1.68
BL7	叶	1.80	HL19	叶	0.85
BL8	叶	1.50	HL26	叶	1.60
BL11	叶	0.93	HL31	叶	1.55
BL12	根	1.72	HL32	叶	1.44
BL15	根	1.53	Ls1	根	0.96
Ls2	根	2.34	Ls14	根	3.60
Ls4	根	3.31	Ls15	根	6.86
Ls5	叶	2.96	Ls16	根	42.52
Ls6	根	4.45	Ls17	根	3.71
Ls7	根	4.64	Ls18	叶	5.50
Ls8	叶	8.62	Ls19	叶	2.03
Ls9	根	7.09	Ls20	根	36.89
Ls10	叶	2.40	Ls21	根	1.90
Ls11	叶	5.41	Ls22	叶	9.51
Ls12	叶	1.78	Ls23	叶	8.94
Ls13	叶	6.21

图 1 37 株内生固氮菌的固氮酶 *nifH* 基因片段 PCR 扩增产物电泳图(1.2%琼脂糖电泳)

泳道 1~37 分别是菌株 Ls1, Ls2, Ls4~Ls23, BL1, BL4, BL5, BL7, BL8, BL11, BL12, BL15, BL23, BL29, HL6, HL19, HL26, HL31, HL32 *nifH* 基因 PCR 产物, CK 是产脂固氮螺菌 *Azospirillum lipoferum* DSM 1691^T 固氮酶 *nifH* 基因的 PCR 产物

2.4 脂肪酸含量分析

采用高效毛细管气相色谱法在相同实验条件下对类群 ~ 的代表菌株的全细胞脂肪酸进行了测定, 用目测法^[20]初步比较了 6 个代表菌株的脂肪酸成分和含量(图 4).

从图 4 可知, 菌株 Ls13, Ls8, BL1, BL12, HL6, Ls4 图谱存在较大的差异, 特别是 Ls8 与 Ls13, BL12, Ls4, HL6 相比, 脂肪酸图谱中峰出现的时间及面积(成分含量)差别很大. Ls13 与 HL6, Ls8 与 BL1, BL12 与 Ls4 菌株间的脂肪酸图谱在峰出现的相对时间有

的接近,但峰面积(成分含量)有较大的差异,进一步证明菌株 Ls13, Ls8, BL1, BL12, HL6, Ls4 属于不同

的类群.

2.5 16S rDNA 序列相似性分析

对各类群的代表菌株 16S rDNA 的序列进行了测定,将测定结果在 GenBank 数据库中进行检索,结果见表 2. 类群 I 中菌株 Ls2 和 Ls13 的 16S rDNA 序列几乎一致,与 *Klebsiella* sp 有 99% 的相似性,属于克雷伯氏菌属;类群 II 菌株 Ls8 和类群 III 菌株 Ls15 与成团泛菌(*Pantoea agglomerans*)关系最近,分别有 96% 和 98% 的相似性,属于泛菌属;类群 IV 的菌株 BL1 的最相近菌株为克雷伯氏肺炎杆菌(*Klebsiella pneumoniae*), 97% 相似性;类群 V 的菌株 BL12 与类群 VI 的菌株 HL6 分别与阿氏肠杆菌(*Enterobacter asburiae*)和阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)有 98% 的相似性;类群 VII 菌株 Ls4, Ls9 和 Ls20 的 16S rDNA 序列高度相似,与无丙二酸柠檬酸杆菌(*Citrobacter amalonaticus*)有 98% 的相似性,属于柠檬酸杆菌属;类群 VIII 的菌株 BL11 属于 *Ideonella* 属. 其中菌株 Ls8 (类群 II) 与成团泛菌(*Pantoea agglomerans*)的相似性为 96%, 有可能代表该属内的一个新种或一个新属. 所测类群 I ~ VIII 的菌株都属于 γ 变形菌纲肠杆菌科,类群 I 的 2 株菌 BL11 和 HL19 属于 *Ideonella* 属 (β - 变形菌纲).

图 2 普通野生稻中 37 株内生固氮菌的 IS-PCR 指纹图谱聚类(UPGMA)

图 3 普通野生稻内生固氮菌全细胞蛋白电泳图谱

图 4 类群 ~ 代表菌株 Ls13, Ls8, BL1, BL12, HL6, Ls4 的脂肪酸测定图谱

表 2 各类群代表菌株 16S rDNA 序列相似性结果			
类群	代表菌株	最相似菌株名称	相似性(%)
	Ls13	<i>Klebsiella</i> sp.	99
	Ls2	<i>Klebsiella</i> sp.	99
	Ls8	<i>Pantoea agglomerans</i>	96
	BL1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	97
	BL12	<i>Enterobacter asburiae</i>	98
	HL6	<i>Enterobacter cloacae</i>	98
	Ls4	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	98
	Ls9	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	98
	Ls20	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	98
	Ls15	<i>Pantoea</i> sp.	98
	BL11	<i>Ideonella</i> sp.	99

2.6 菌株接种水稻实验

内生固氮菌定殖于植物体内部，在植物细胞内、细胞间隙、木质部导管进行固氮作用^[21,22]。这个部位不仅可满足细菌生长和固氮所需的足够的能源、低氧分压以及交换代谢产物的微环境，也避免了土壤溶液对固氮酶活性的抑制及土著微生物的竞争，固定的氮可直接供给植物吸收，促进植物生长。菌株接种水稻经盆栽培养 14 d 后，照相、测量株高并称重其鲜重，结果分别见图 5（以菌株 Ls20 和 Ls16 为例）和表 3。图 5 可见，接种内生固氮菌 Ls16 和 Ls20 菌株的水稻株高明显高于没接种的对照水稻苗。水稻接种各菌株后的株高和鲜重见表 3。表 3 中大部分菌株接种

图5 高固氮酶活性菌株 Ls20 和 Ls16 接种籼型水稻华航 1 号的生长情况
CK, 没接种的水稻苗作对照

表3 不同菌株接种 14 d 后的水稻苗的株高(cm)和鲜重(g)^{a)}

菌株	株高/cm	鲜重/g	菌株	株高/cm	鲜重/g
CK	19.07±0.09	0.06±0.00	Ls20	49.06±1.21	0.47±0.08
Ls1	25.90±2.57	0.21±0.01	Ls21	40.73±0.09	0.404±0.07
Ls2	40.23±1.96	0.38±0.02	Ls22	40.33±0.41	3.14±0.01
Ls4	42.43±0.32	0.38±0.03	Ls23	44.90±2.60	0.41±0.06
Ls5	32.77±1.35	0.18±0.01	BL1	38.03±0.64	0.39±0.05
Ls6	36.83±2.60	0.36±0.06	BL4	41.88±3.37	0.39±0.04
Ls7	30.55±2.20	0.25±0.01	BL5	43.30±1.88	0.35±0.02
Ls8	38.90±4.40	0.38±0.01	BL7	42.37±0.98	0.46±0.02
Ls9	35.43±1.34	0.35±0.01	BL8	39.30±1.3	0.34±0.03
Ls10	19.20±1.12	0.11±0.01	BL11	29.73±1.56	0.28±0.03
Ls11	23.03±0.26	0.22±0.01	BL12	25.10±0.66	0.16±0.00
Ls12	39.13±0.87	0.32±0.04	BL15	25.77±0.67	0.20±0.02
Ls13	34.50±1.33	0.31±0.01	BL23	39.40±1.99	0.39±0.02
Ls14	40.60±0.81	0.38±0.03	BL29	31.97±0.29	0.28±0.02
Ls15	41.53±3.42	0.44±0.08	HL 6	43.87±2.18	0.39±0.08
Ls16	48.57±1.30	0.53±0.03	HL19	36.70±1.05	0.33±0.01
Ls17	42.20±0.62	0.36±0.01	HL26	16.83±1.63	0.13±0.08
Ls18	43.20±1.07	0.38±0.04	HL31	40.81±1.41	0.41±0.04
Ls19	40.55±1.93	0.38±0.02	HL32	39.28±0.70	0.33±0.02

a) 数据均为 3 次重复

水稻后, 水稻的株高和鲜重比对照明显增加, 说明内生固氮菌对水稻具有促生作用。但也有个别菌株 (HL26) 对水稻生长无促进作用。同时将 *gfp* 基因标记的部分代表菌株 Ls8 (类群), BL1 (类群), BL12 (类群), HL6 (类群) 和 LS20 (类群) 分别接种水稻, 对水稻材料表面进行消毒后, 将组织压碎, 涂布于含 IPTG 诱导剂, Kan⁺和 Amp⁺抗性的无氮培养基上, 观察到标记菌株的生长(图 6)。用 ARA 测定确认具固氮酶活性, 并随机挑选了 3 个菌落测定其 16S rRNA 基因序列, 与原始菌序列一致。

图6 荧光蛋白 *gfp* 基因标记菌株接种水稻后, 将水稻组织液涂布于含 Kan⁺和 Amp⁺抗性 IPTG 诱导剂的无氮平板上, 观察生长情况

3 讨论

自从内生固氮菌发现以来, 已有学者对于内生固氮菌在栽培稻上的分布进行了研究, 如 Stoltzfus 等人 [5] 对 8 个水稻栽培品种的内生固氮菌进行分离纯化共获得 133 株内生固氮菌, 通过 DNA 指纹图谱分析可划分为多个类群。安千里等人 [23] 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, 沈德龙等人 [24] 对水稻内生优势菌-成团肠杆菌进行了研究。通过不同地区来源的普通野生稻内生固氮菌研究发现, γ 变形菌纲肠杆菌科 *Klebsiella*, *Pantoea*, *Enterobacter*, *Citrobacter* 属的细菌是优势类群细菌, 与栽培稻的优势内生固氮菌研究结果一致 [24,25], 但 *Ideonella* 属 (β -变形菌纲) 的菌株未见报道。栽培稻是从野生稻进化而来, 内生细菌优势菌群随着进化保存下来。

在固氮生物进化过程中, 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, 它经常被用来证明固氮菌的存在 [26]。例如, Franke 等人 [27] 在一些纯培养物中扩增到了 *nifH* 固氮酶基因; Widmer 等人 [28] 在土壤中分离到的固氮菌中扩增到了 *nifH* 基因; Ueda 等人 [29] 和 Lovell 等人 [30] 在植物固氮菌中得到了 *nifH* 基因; Zehr 等人 [31] 与 Ohkuma 等人 [32] 分别在白蚁和海洋微生物中得到 *nifH* 基因。从图 1 中可以看出, 这 37 株内生固氮菌均扩增出 *nifH* 基因, 这与用乙炔还原法测定这些菌株均有固氮酶活性结果一致。但是也有研究认为并不是所有的固氮微生物中

均能扩增到 *nifH* 基因片段. Loiret 等人^[33] 只在部分固氮菌中扩增到了 *nifH* 基因片段. 细菌的蛋白质具有高度的保守性, 很多学者利用 SDS-PAGE 对不同的菌株进行聚类, 谭志远等人^[14]、许晓东^[34] 等利用 SDS-PAGE 对不同的根瘤菌菌株进行了聚类. 从图 2 和 3 以及序列分析可以看出, 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, 聚类结果可相互验证. 近年来越来越多的研究者把脂肪酸组成成分分析作为细菌分类的一种工具. 如卢焱等人^[15]、周方等人^[20]、张国霞等人^[35] 用气相色谱法分别区分炭疽杆菌和一些病原菌的鉴定, Tighe 等人^[36] 对根瘤菌科不同属、种的细胞脂肪酸成分进行了比较和鉴定. 普通野生稻中 6 个类群的代表菌株进行的脂肪酸成分分析表明, 它们的脂肪酸成分和含量都不一样, 属于不同的

类群, 进一步证明了内生固氮菌的多样性. 可见细胞脂肪酸成分分析和 SDS-PAGE 全细胞蛋白电泳都可用于区分不同种类细菌. 菌株 Ls8 的 16S rDNA 序列与 GenBank 中成团泛菌的同源性最为接近, 为 96%. 一般情况下, 16S rDNA 序列同源性小于 97%, 则可以认为属于不同种, 而同源性小于 95%, 则可以认为属于不同属^[37]. 菌株 Ls8 很可能代表一个新种或新属, 有待进一步研究. 从来源不同的普通野生稻中仅用一种培养基分离到 37 株内生固氮菌, 经研究属于 β -变形菌纲和 γ -变形菌纲的多个不同属中, 说明野生稻内生固氮菌具有多样性. 水稻盆栽接种实验表明, 大部分内生固氮菌接种水稻后, 对水稻具有明显促生作用, 尤其是部分固氮酶活性高的菌株, 说明这些菌株具有潜在的农业应用价值.

参考文献

- 1 Döbereiner J. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: Endophytic N_2 fixing bacteria. *Ciencia e Cultura*, 1992, 44: 310—313
- 2 Döbereiner J. History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants. *Symbiosis*, 1992, 13: 1—13
- 3 Baldani V L D, Alvarez M A, Baldani J I, et al. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. *Plant Soil*, 1986, 90: 35—46^[doi]
- 4 Reinhold B, Hurek T, Niemann E G, et al. Close association of *Azospirillum* and diazotrophic rods with different root zones of Kallar grass. *Appl Environ Microbiol*, 1986, 52: 520—526
- 5 Stoltzfus J R, So R, Malarvithi P P, et al. Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. *Plant Soil*, 1997, 194: 25—36^[doi]
- 6 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. *生态学报*, 2006, 26: 2566—2571
- 7 姚拓, 张德昱, 胡自治. 高寒地区燕麦根际联合固氮菌研究 I: 固氮菌分离及鉴定. *草业学报*, 2004, 13: 106—111
- 8 Zehr J P, McCreynolds L A. Use of degenerate oligonucleotides for amplification of the *nifH* gene from the marine cyanobacterium *Trichodesmium thiebautii*. *Appl Environ Microbiol*, 1989, 55: 2522—2526
- 9 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. *华南农业大学学报*, 2004, 25: 58—62
- 10 Hurek T, Wagner B, Reinhold-Hurek B. Identification of N_2 -fixing plant- and fungus-associated *Azoarcus* species by PCR-based genomic fingerprints. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(11): 4331—4339
- 11 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. *中国水稻科学*, 2001, 15: 131—136
- 12 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. *华南农业大学学报*, 2005, 26: 73—76
- 13 Tan Z Y, Kan F L, Peng G X, et al. *Rhizobium yanglingense* sp. nov., isolated from arid and semi-arid regions in China. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001, 51: 909—914
- 14 谭志远, 陈文新. 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*, 1998, 4: 65—69
- 15 卢焱, 叶萍, 王靖, 等. 铜绿假单胞菌全细胞脂肪酸气相色谱分析及应用. *中华医院感染学杂志*, 1997, 7: 7—10
- 16 Sasser M. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. Microbial ID, Inc., Newark, DE, USA. JF-MIDI Technical Note#101, 1990, 101: 101
- 17 Tan Z, Hurek T, Vinuesa P, et al. Specific detection of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* strains colonizing rice (*Oryza sativa*) roots by 16S—23S ribosomal DNA intergenic spacer-targeted PCR. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67: 3655—3664^[doi]
- 18 Cramer A, Whitehorn E A, Tate E, et al. Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nat Biotechnol*, 1996, 14: 315—319^[doi]

- 19 Palus J A, Borneman J, Ludden P W, et al. A diazotrophic bacterial endophyte isolated from stems of *Zea mays* L. and *Zea luxurians* Illis and Doebley. *Plant Soil*, 1996, 186: 135—142[doi]
- 20 周方, 王菊英, 王绍山, 等. 裂解气相色谱法区分炭疽杆菌及其类属菌. *科学通报*, 1984, 22: 1394—1397
- 21 Sprent J I, James E K. N₂-fixation by endophytic bacteria: questions of entry and operation. In: Fendrik I, Del Gallo M, Vanderleyden J, et al. eds. *Azospirillum* VI and Related Microorganism: Genetics, Physiology, Ecology. Berlin: Springer-Verlag, 1995. 15—30
- 22 安千里, 李久蒂. 植物内生固氮菌. *植物生理学通讯*, 1999, 35: 265—272
- 23 安千里, 匡柏健, 母锡金, 等. 固氮菌 *Klebsiella oxytoca* SA2 在水稻根内定殖并表达固氮酶. *自然科学进展*, 1999, 9: 1262—1267
- 24 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. *自然科学进展*, 2000, 10: 949—952
- 25 冯永君, 宋未. 水稻内生优势成团泛菌 GFP 标记菌株的性质与标记丢失动力学. *中国生物化学与分子生物学报*, 2002, 18: 85—91
- 26 Terakado-Tonooka J, Ohwaki Y, Yamakawa H, et al. Expressed *nifH* genes of endophytic bacteria detected in field-grown sweet potatoes (*Ipomoea batatas* L.). *Microbes Environ*, 2008, 23: 89—93[doi]
- 27 Franke I, Fegan M, Hayward A, et al. Nucleotide sequence of the *nifH* gene coding for nitrogen reductase in the acetic acid bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *Lett Appl Microbiol*, 1998, 26: 12—16[doi]
- 28 Widmer F, Shaffer B T, Porteous L A, et al. Analysis of *nifH* gene pool complexity in soil and litter at a Douglas fir forest site in the Oregon cascade mountain range. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65: 374—380
- 29 Ueda T, Suga Y, Yahiro N, et al. Remarkable N₂-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. *J Bacteriol*, 1995, 177: 1414—1417
- 30 Lovell C R, Piceno Y M, Quattro J M, et al. Molecular analysis of diazotroph diversity in the rhizosphere of the smooth cordgrass, *Spartina alterniflora*. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66: 3814—3822[doi]
- 31 Zehr J P, Mellon M T, Zani S. New nitrogen-fixing microorganisms detected in oligotrophic oceans by amplification of Nitrogenase (*nifH*) genes. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64: 3444—3450
- 32 Ohkuma M, Noda S, Usami R, et al. Diversity of nitrogen fixation genes in the symbiotic intestinal microflora of the termite *reticulitermes speratus*. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62: 2747—2752
- 33 Loiret F G, Ortega E, Kleiner D, et al. A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. from sugarcane. *J Appl Microbiol*, 2004, 97: 504—511[doi]
- 34 许晓东, 陈文新. 天山根瘤菌(*Rhizobium tianshanense*)全细胞蛋白电泳和多位点酶电泳分析. *微生物学通报*, 1996, 23: 131—134
- 35 张国赏, 吴文鹃, 潘仁瑞. 气相色谱-质谱法检测细胞脂肪酸及其在细菌鉴定上的应用. *合肥联合大学学报*, 2000, 10: 92—96
- 36 Tighe S W, De Lajudie P, Dipietro K, et al. Analysis of cellular fatty acids and phenotypic relationships of *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* species using the Sherlock Microbial Identification System. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2000, 50: 787—801
- 37 Young J P W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: Stacey G, ed. *Biological Nitrogen Fixation*. New York: Chapman and Hall, 1992. 43—86