

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (3) :292 - 298; 4 March 2014
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.03.006

水稻内生固氮菌 *Herbaspirillum seropedicae* DX35 的筛选及其促生特性

王秀呈¹, 曹艳花¹, 唐雪¹, 马晓彤¹, 高菊生^{1,2*}, 张晓霞^{1*}

¹ 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所, 农业部农业微生物资源收集与保藏重点实验室, 北京 100081

² 中国农业科学院红壤实验站, 湖南 祁阳 426182

摘要: 【目的】筛选水稻高效内生固氮菌, 并对其促生特性进行分析。【方法】从湖南祁阳中国农业科学院红壤实验站具 30 年长期稻-稻-绿肥轮作定位试验田中采集水稻根并分离内生细菌, 通过乙炔还原法测定其固氮酶活性, 筛选出固氮活性较高的菌株, 运用 16S rRNA 基因、*nifH* 基因以及脂肪酸分析确定其发育地位。同时采用 Salkowski 比色法测定其生长素的分泌能力, CAS 蓝色平板检测法测定产铁载体能力, 溶磷圈法测定溶磷性, 对其促生特性进行分析。【结果】共分离获得 48 株内生菌, 其中 DX35 固氮酶活性最高, 经鉴定属于 *Herbaspirillum seropedicae*, 其固氮酶活性为 181.21 nmol C₂H₄ / (mg protein · h), 约是参比菌株 *Azotobacter chroococcum* ACCC10006 的 10 倍。另外该菌株还具有一定的分泌铁载体能力和溶磷特性。【结论】DX35 属于 *H. seropedicae*, 是一种高效内生固氮菌, 具有很好的生产应用前景。

关键词: 内生固氮菌, 固氮酶活性, 鉴定, 促生特性

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2014) 03-0292-07

内生菌 (Endophyte) 概念是在 1866 年由 Bary 首先提出的, 是指那些在其生活史的一定阶段或全部阶段生活于健康植物的组织或器官内部的微生物。它们作为植物微生态系统的天然组分, 可通过多种方式直接或间接对植物产生促生作用, 主要方式有固氮作用、产生次生代谢物, 如生长素、铁载体、溶磷物质等促进植物生长^[1-3], 因此备受学者关注。*Herbaspirillum seropedicae* 作为一株专性内生固氮菌^[4], 国内外对其菌固氮机理的报道已有不少, 而对菌种的促生特性分析目前还未见报道, 也未在生产实际中得到应用。本研究以湖南祁阳具有 30 年

长期稻-稻-绿肥轮作定位试验田间采集水稻根为材料, 筛选出具有高效固氮酶活性的内生固氮菌。采用基于 16S rRNA 和 *nifH* 基因为基础的分子生物学方法和全细胞脂肪酸分析等生化方法对该菌的分类地位进行鉴定。并针对性地对该菌的溶磷性、产生生长素 (IAA)、产铁载体等促生功能进行研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试植物: 样品取材于湖南祁阳中国农业科

基金项目: “十二五”农村领域国家科技计划课题 (2013AA102802); 国家自然科学基金项目 (41271273); 公益性行业 (农业) 科研专项经费 “绿肥作物生产与利用技术集成研究与示范” (201103005)

* 通信作者。张晓霞, E-mail: xxzhang@caas.ac.cn; 高菊生, gaojusheng@caas.cn

作者简介: 王秀呈 (1989 -), 女, 山东曲阜人, 中国农业科学院硕士研究生, 主要从事植物内生固氮菌多样性及功能特性研究。

收稿日期: 2013-08-01; 修回日期: 2013-09-15

学院红壤实验站。以该站具有 30 年 (1982 - 2012) 长期稻-稻-绿肥轮作定位试验的水稻根为材料。

1.1.2 培养基: TSA 合成培养基, R₂A 合成培养基, YMA 培养基 (改良固氮酶活测定)^[5], MKB 液体培养基^[5], PKO 无机磷培养基^[6], 蒙金娜有机磷培养基^[7]。

1.1.3 参比菌株: 固氮酶活性测定参比菌株圆褐固氮菌 *Azotobacter chroococcum* ACCC10006 来源于中国农业微生物菌种保藏中心 (ACCC)。

1.2 内生菌的分离与纯化

采用乙醇-次氯酸钠联合灭菌的方式对水稻根进行表面灭菌^[8]。R₂A 平板上 28℃ 培养 2 - 3 d。选取菌落数较多的平板, 依据不同形态选取单菌落, 将纯化后的根内生细菌菌株冷冻干燥法于 4℃ 保藏备用。

1.3 固氮酶活测定

固氮酶活性测定采用乙炔还原法^[9-10]。在 15 mm × 15 mm 螺口试管中加入 5 mL 改良 YMA 固氮培养基制成斜面, 接种复筛功能菌株, 28℃ 培养 72 h 后换橡胶塞, 注入乙炔气体使终浓度为 10%, 继续培养 72 h, 取 100 μL 反应气体, 用气相色谱仪测定乙烯生成量。蛋白含量的测定: 用 5 mL 生理盐水洗涤、收集上述固氮酶测定后的斜面菌体, 加入 3 mL 0.15 mol/L NaOH 煮沸 5 min, 加入 3 mL 0.15 mol/L HCl, 离心, 取上清 110 mL 加入 5 mL 考马斯亮蓝, 混合, 显色 3 min 测定 595 nm 处吸光值。根据牛血清白蛋白标准曲线计算菌体蛋白。

固氮酶活的公式固氮酶活性 [nmol / (mg protein · h)] = 1000 × C₂H₄ (nmol) / [菌体蛋白量 (mg) × 反应时间 (h)]。

1.4 分泌生长素性能测定

参照 Salkowski 比色法^[11], 培养基中需加入色氨酸。

1.5 产铁载体能力测定

采用 CAS 法进行铁载体的检测^[5]。

1.6 溶磷性测定

本试验采用无机磷 [Ca₃(PO₄)₂] 固体培养基和有机磷 (蛋黄卵磷脂) 溶磷圈法进行测定^[12]。

1.7 菌种鉴定

1.7.1 16S rRNA 序列扩增与序列分析: 采用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTACCTTGTACGACTT-3') 用于菌

株的 16S rDNA 部分片段的扩增。所得产物送北京宝瑞通公司进行测序, 所得序列在 EzTaxon-e server (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>) 中比对, 寻找具有较高同源性的 16S rRNA 序列, 初步确定其发育地位, 采用 mega5.0 软件进行多序列比对, 用邻近法构建 16S rRNA 系统发育树, Bootstrap 值为 1000。

1.7.2 功能固氮基因 *nifH* 的序列扩征与序列分析: 采用已报道过的的固氮基因常用引物 PolF/PolR (5'-TGCGAYCCSAARGCBGACTC-3' 和 5'-ATSGCCATCATYTCRCCGGA-3')^[13], 所得产物送北京宝瑞通公司进行测序, 所得序列在 NCBI 中比对, 寻找具有较高同源性的序列, 采用 mega5.0 软件进行多序列比对, 用邻近法构建系统发育树, Bootstrap 值为 1000。

1.7.3 DX35 菌株脂肪酸组成分析: 参照 Sasser M 法提取总脂^[14]。将收集的菌体进行皂化、甲基化处理后, 萃取上层有机相, 用 MIDI 微生物鉴定系统对 DX35 及其近缘菌株 DSM6445^T (*H. seropedicae*) 和 DSM12138^T (*H. rubrisubalbicans*) 进行脂肪酸组成 (GC) 分析。

2 结果和分析

2.1 内生菌分离结果

在表面灭菌的水稻根中分离到 48 株菌落或菌体形态有差异的菌株。

2.2 固氮酶活测定结果

固氮酶活性测定通常是在固氮作用的本质上给予的直接论证, 而气相色谱法能够准确测定菌体将乙炔还原成乙烯的量, 进而计算出固氮酶活性。通过气相色谱法测得 48 株功能菌株和参比菌株 *A. chroococcum* ACCC10006 乙烯生成量, 其中 DX35 菌株乙烯生成量最大, 峰值最高 (图 1)。

通过对乙烯生成量的测定进而计算出固氮酶活性, 对初筛促生功能较好的 48 株内生细菌进行测定, 其酶活性在 2.52 - 181.21 nmol C₂H₄ / (mg protein · h) 之间 (表 1), 参比菌株为圆褐固氮菌 ACCC10006, 固氮酶活性为 19.17 nmol C₂H₄ / (mg protein · h)。大部分菌株活性较低, 在所测得的数值中菌株 DX35 固氮酶活性最高, 为 181.21 nmol C₂H₄ / (mg protein · h)。

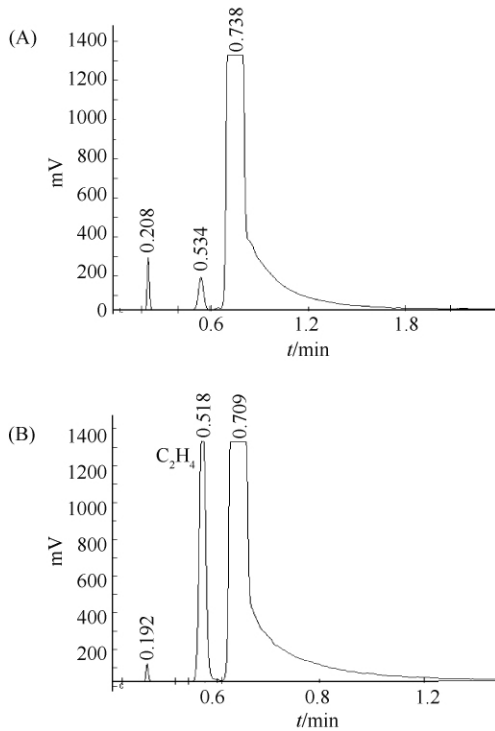


图 1. 气相色谱法测得的固氮酶活性图谱

Figure 1. The nitrogenase activity measured by gas chromatography.

A: strain ACCC10006; B: strain DX35.

2.2 溶磷能力测定

根据已有的研究结果,将具有溶磷能力的菌株溶磷能力 HD/CD 值范围介于 1.00 - 2.00,为溶磷能力中等菌株^[15]。试验菌株 DX35 在培养 5 d 后菌落的溶磷圈直径与菌落直径的比值(HD/CD)不再发生明显变化,测定结果如表 2。可以看出,DX35 菌株能够溶解无机磷,属于溶磷能力中等菌株。

溶解有机磷能力测定结果表明,该菌株在蒙金娜培养基上均生长良好,培养 5 d 的菌落直径大小为 0.20 - 1.20 cm,但均未形成溶磷圈,HD/CD 值为 1.00,表明供试菌株不能溶解有机磷。

2.3 产铁载体能力测定

2.3.1 产铁载体定性检测:产生铁载体的菌株表现为在菌苔周围形成橙红色晕圈,检测结果十分直观。供试菌株培养 5 天后,发现供试菌株在检测平板上明显有铁载体产生。

2.3.2 产铁载体定量检测:铁载体常用的定量检测方法是 A/Ar(Ar 为对照吸光值)比值大小比较各种菌株产铁载体的能力。A/Ar 比值越小,反映铁载体的产量越大。DX35 的铁载体定性及定量检测结果见表 2。依据铁载体测定参考标准:A/Ar:0.6 -

表 1. 所分离菌株与参比菌株 *Azotobacter chroococcum* ACCC10006 的固氮酶活性 (nmol C₂H₄ / (mg protein·h))

Table 1. The nitrogenase activity of the isolates and comparison of *Azotobacter chroococcum* (ACCC10006)

strains	nitrogenase activity / [nmol C ₂ H ₄ / (mg protein·h)]	strains	nitrogenase activity / [nmol C ₂ H ₄ / (mg protein·h)]
DX6	12.46	ZYY78	21.43
DX10	6.24	ZYY88	2.52
DX11	13.24	ZYY93	7.92
DX17	15.37	ZYY94	8.61
DX22	6.19	ZYY98	9.43
DX35	181.21	ZYY100	10.27
DX40	24.95	ZYY106	11.99
DX47	16.19	ZYY107	75.23
DX50	19.38	ZYY125	8.09
DX68	8.38	ZYY127	3.68
DX70	13.28	ZYY136	12.18
DX73	17.92	ZYY145	19.89
DX78	14.61	ZYY146	8.99
DX80	8.46	ZYY147	17.07
DX87	9.77	ZYY148	20.42
ZYY5	9.03	ZYY149	8.29
ZYY7	12.72	ZYY154	8.41
ZYY10	38.05	ZYY159	9.42
ZYY11	8.77	ZYY160	7.07
ZYY37	4.31	ZYY169	6.42
ZYY40	7.93	ZYY170	15.41
ZYY41	5.55	ZYY171	14.52
ZYY43	11.11	ZYY172	9.52
ZYY56	18.92	CK	0.56
ZYY71	15.14	ACCC10006	19.17

Note: All data were derived from the laboratory determination.

0.8: + + (中等); A/Ar: 0.8 - 1.0: + (较弱)。从表 2 中可以看出,DX35 的 A/Ar 值为 0.822,能产生铁载体,但产铁载体能力较弱。

2.4 分泌植物生长激素能力测定

2.4.1 分泌生长素性能定性检测:由于色氨酸是 IAA 合成的前体物质,因此在细菌产生 IAA 的过程中,色氨酸发挥了重要作用,供试菌株需要有色氨酸作为前提,检测 IAA 的合成。测定结果显示 DX35 不能够分泌生长素。

2.5 菌种鉴定结果

2.5.1 16S rRNA 基因序列分析:DX35 16S rRNA 基因序列扩增,得到一条约 1.5 kb 的单一一条带。经测序,并将测得的序列在 EzTaxon-e server 中进行比对,比对结果显示菌株 DX35 属于 *Herbaspirillum*,与 *H. seropedicae* DSM 6445^T 的序列相似性最高

(99.48%), 在系统发育树中也与 DSM6445^T 聚在一起 (图 2)。

表 2. DX35 铁载体、溶磷圈 HD/CD 值和分泌生长素能力检测

Table 2. Quantitative detection of siderophore, the HD/CD ratio and the ability to secrete IAA of the different tested strains of DX samples

siderophore		dissolving inorganic phosphorus			dissolving Organophosphorus			IAA
Qualitative	Quantitate A/Ar	HD	CD	HD/CD	HD	CD	HD/CD	Qualitative
+	0.822	0.60	0.40	1.50	0.32	0.32	1.00	-

Note: The reference standard of siderophore determination, A/Ar: 0.6-0.8: ++ (medium), A/Ar: 0.8-1.0: + (weak); HD: the diameter of dissolving phosphorus circles, CD: the diameter of bacterium, HD/CD: the larger the better; IAA: “-” without colour change.

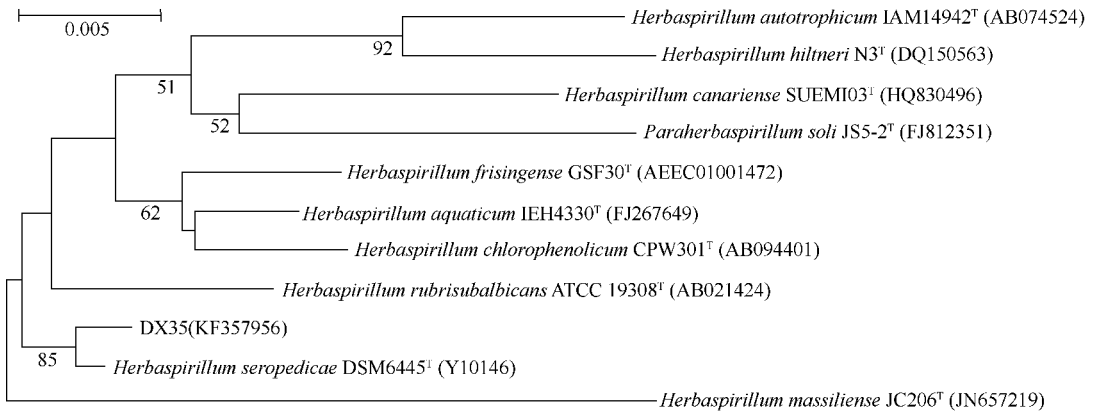


图 2. 邻接法构建 DX35 的 16S rRNA 基因序列系统发育树

Figure 2. Phylogenetic tree based on 16 S rRNA sequences of DX35. Numbers in the parentheses indicate the GenBank accession numbers; Numbers at branch points are percentage bootstrap (values based on 1000 replicates); Bar 0.005 corresponds to 0.5% levels of the sequence divergence.

2.5.2 *nifH* 基因序列分析: DX35 经 *nifH* 基因序列扩增得到一条 360 bp 左右的条带。经测序并到 NCBI 中进行比对, 挑选出序列相似性在 97% 以上的不同属种的代表菌种, 构建系统发育树, 得到的结

果如下图所示, DX35 与 *Herbaspirillum* (草螺菌属) 聚在了一起 (图 3), 这与 16S rRNA 基因分析结果相一致, 进一步说明 DX35 属于 *Herbaspirillum*。

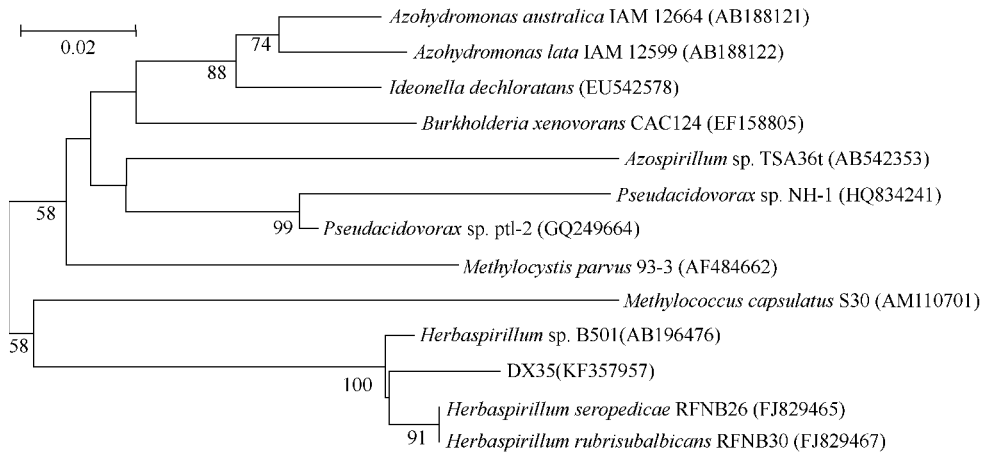


图 3. 邻接法构建的 DX35 *nifH* 基因序列系统发育树

Figure 3. Phylogenetic tree based on *nifH* gene sequences of DX35. Numbers in the parentheses indicate the GenBank accession numbers; Numbers at branch points are percentage bootstrap (values based on 1000 replicates); Bar 0.02 corresponds to 2% levels of the sequence divergence.

2.5.3 脂肪酸组分分析:根据 MIDI 微生物鉴定系统分析结果. 菌株 DX35 的细胞脂肪酸组成主要特征峰值有第三特征峰值 ($C_{16:1} \omega 7c / C_{16:1} \omega 6c$)、 $C_{16:0}$ 和第八特征峰值 ($C_{18:1} \omega 7c$ 或 $C_{18:1} \omega 6c$) 分别占全细胞组分的 28.3%、21.8% 和 14.7%。与 DSM6445^T 和 KCTC12138^T 主要特征峰一致 (表 3)。

表 3. DX35 菌株及近缘种脂肪酸的组成比较 (>1%)

Table 3. Cellular fatty acid contents (%) of strain DX35 and type strains of closely related species of the

genus *Herbaspirillum* (>1%)

peak name	1	2	3
$C_{12:0}$	3.02	Tr	Tr
$C_{14:0}$	2.69	4.34	3.82
$C_{16:0}$	21.8	22.2	25.73
$C_{17:0}$	1.38	Tr	Tr
$C_{18:0}$	3.55	4.26	2.69
$C_{19:0}$	1.18	Tr	Tr
$C_{20:0}$	2.65	Tr	Tr
$C_{12:0} 2OH$	-	1.99	1.22
$C_{14:0}$ anteiso	1.95	1.16	Tr
$C_{15:0}$ anteiso	1.19	Tr	Tr
$C_{16:1} 2OH$	1	Tr	Tr
$C_{17:0}$ cyclo	Tr	1.44	1.32
$C_{12:0} 3OH$	3.28	3.52	3.06
$C_{14:0} 2OH$	2.82	1.36	1.18
Summed Feature 3	28.03	32.09	36.33
Summed Feature 8	14.7	18.03	16.5

Note: 1. DX35; 2. *Herbaspirillum Seropedicae* DSM6445^T; 3. *Herbaspirillum rubrisubalbicans* 12138^T. “-”: not detectable, Tr: Trace. Summed features are groups of two or three fatty acids that can not be separated by GLC using the MIDI system. Summed feature 3 comprises $C_{16:1} \omega 7c / C_{16:1} \omega 6c$ and/or $C_{16:1} \omega 6c / C_{16:1} \omega 7c$, Summed feature 8 is $C_{18:1} \omega 7c$ and/or $C_{18:1} \omega 6c$.

3 讨论

笔者从湖南祁阳中国农业科学院红壤实验站具有 30 年长期稻-稻-绿肥轮作定位试验田中水稻的根部分离出一株具有高效固氮酶活的菌株 DX35。经 16S rDNA 和 *nifH* 基因序列鉴定及脂肪酸组分分析, 确认其归属于赛鲁普蒂卡草螺菌属 (*H. seropedicae*)。经文献报道 *H. seropedicae* 是一种专性内生固氮菌^[1], 已报道有很多亚种, 其固氮机理的研究已经十分广泛和深入。*H. seropedicae* 的菌株 SmR1 已完成基因组测序, SmR1 基因组有 4804 个基因。基因组序列分析表明 SmR1 是一株多功能微生物菌株, 具有高效的碳源和氮源代谢系统, 并且还具具有能够指导 IAA 合成, 磷溶解, 铁载体分泌等的

基因^[16]。DX35 在 NCBI 中 Blast 结果表明, 与 SmR1 有最高的序列相似性, 相似度高达 99%。本研究从 DX35 代谢产物的定性定量检测, 证实了 DX35 为一株高效内生固氮菌, 其固氮酶活性是参比菌株圆褐固氮菌 ACCC10006 的 10 倍, 固氮酶活性达到了 181.21 nmol C_2H_4 / (mg protein · h)。还证实了该菌株具有一定的分泌铁载体的能力和溶磷特性, 但不具有分泌 IAA 的能力, 其原因可能是因为有些基因只有在特殊的环境胁迫下才会表达, 也可能是菌株间的差异。

秦宝军 (2010) 在高效固氮菌筛选与土壤培肥研究中用乙炔还原法测定土壤中分离的 35 株固氮菌, 其酶活性在 5 - 72 nmol C_2H_4 / (mg protein · h) 之间, 参比菌株为圆褐固氮菌, 固氮酶活性为 15.64 ± 2.16 nmol C_2H_4 / (mg protein · h), 与本研究所得数值较为接近。ACCC10006 是我国在微生物肥料生产中应用最为广泛的固氮菌, 因此, 具有高固氮酶活并见有分泌铁载体和溶磷能力的菌株 DX35 在固氮菌肥开发方面具有非常大的应用潜力。

另外植物内生菌种类繁多, 促生特性也不尽相同, 但用于实际生产的却少之又少。国外已有文献报道将 *H. seropedicae* 与其他不同种类的内生菌联合接种在植物体内, 对番茄等植物具有更好的促生能力^[17]。国内草螺菌属已被报道多次, 但大多是在菌种多样性研究中被提到, 在生产应用方面国内迄今未见报道。我们针对这一问题首先对 DX35 的各项促生特性进行了检测, 为下一步如何促进 DX35 菌株的促生功能的高效表达以及投入生产应用打好基础。在土壤环境恶化, 优先发展生态农业的今天, 如何将像 DX35 这类具有多种促生功能的内生菌投入生产中去是亟待解决的问题。

参考文献

- [1] Wang LH. Research Advance on Plant Endophyte. *Chemistry & Bioengineering*, 2011, (3): 5-7. (in Chinese)
王莉衡. 植物内生菌研究进展. *化学与生物工程*, 2011, (3): 5-7.
- [2] He CM, Wu GR, Tang Z, Hu YF. Endophytic diazotroph and its application in green agriculture construction and production. *Chinese Journal of Microecology*, 2013, 25 (3): 358-361. (in Chinese)
何彩梅, 吴桂容, 唐政, 胡月芳. 植物内生固氮菌在

- 绿色农业生态建设中的应用. 中国微生态学杂志, 2013, 25 (3): 358-361.
- [3] Sturz AV, Christie BR, Nowak J. Bacterial endophytes: Potential role in developing sustainable systems of crop production. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2000, 19 (1): 1-30.
- [4] Luo M, Lu Y. Advance in Endophytic Diazotroph. *Journal of Microbiology*, 2005, (25): 82-87. (in Chinese)
罗明, 卢云. 植物内生固氮菌研究进展. 微生物学杂志, 2005, (25): 82-87.
- [5] Machuca A, Milagres AMF. Use of CAS-agar plate modified to study the effect of different variables on the siderophore production by *Aspergillus*. *Letters in Applied Microbiology*, 2003, (36): 177-181.
- [6] Gull M, Hafeez FY, Saleem M. Phosphorus uptake and growth promotion of chickpea by co-inoculation of mineral phosphate solubilising bacteria and a mixed rhizobial culture. *Animal Production Science*, 2004, 44 (6): 623-628.
- [7] Zhang Y, Zhu Y, Yao T. Characteristics of phosphate dissolving and IAA secretion of Phosphate-solubilizing bacteria Isolated from *Trifolium*. *Acta Agrestia Sinica*, 2009, 17 (2): 259-263. (in Chinese)
张英, 朱颖, 姚拓. 红三叶根际溶磷菌分离及其溶磷机制初探. 草地学报, 2009, 17 (2) 259-263.
- [8] Jiang XY, Gao JS, Xu FH, Cao YH, Tang X, Zhang XX. Diversity of endophytic bacteria in rice seeds and their secretion of indole acetic acid. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53 (3): 269-275. (in Chinese)
姜晓宇, 高菊生, 徐凤花, 曹艳花, 唐雪, 张晓霞. 水稻种子内生细菌多样性及其分泌植物生长素能力的测定. 微生物学报, 2013, 53 (3): 269-275.
- [9] Sun JG, Xu J, Hu HY, Zhang YC, Wang WB, Sun YH, Liu J. Collection and investigation on asymbiotic nitrogen-fixing microbial resources from 13 provinces over China. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2009, 15 (6): 1450-1465. (in Chinese)
孙建光, 徐晶, 胡海燕, 张燕春, 王文博, 孙燕华, 刘君. 中国十三省市土壤中非共生固氮微生物菌种资源研究. 植物营养与肥料学报, 2009, 15 (6): 1450-1465.
- [10] Sun JG, Zhang YC, Xu J, Hu HY. Lation and biological characteristic investigation on efficient nitrogen-fixing bacilli. *Scientia Agricultura Sinica*, 2009, (42): 2043-2051.
- [11] Glickmann E, Dessaux Y. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, (2): 793-796.
- [12] Li YE, Yao T, Rong LY. Characteristics of IAA Secretion and Phosphate Dissolving of Phosphate-solubilizing Bacteria and Its Effect on Alfalfa Growth. *Acta Agrestia Sinica*, 2010, 18 (1): 84-88. (in Chinese)
李玉娥, 姚拓, 荣良燕. 溶磷菌溶磷和分泌 IAA 特性及对苜蓿生长的影响. 草地学报, 2010, 18 (1): 84-88.
- [13] Franck P, Lionel R. Comparison of *nifH* gene pools between soils and between soil microenvironments of contrasting properties. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, (67): 2225-2267.
- [14] Sasser M. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. MIDI Technical Note Newark, DE: MIDI Inc, 1990.
- [15] Qi J, Shi SL. Preliminary study on the ability of phosphorus-solubilizing and IAA-secreting of endogenous rhizobia in seed of different alfalfa varieties. *Grassland and Turf*, 2006, (5): 18-25. (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. 草原与草坪, 2006, (5): 18-25.
- [16] Pedrosa FO, Monteiro RA, Wasseem R. Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1 a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. *PLoS Genetics*, 2011, 7 (5): e1002064
- [17] Botta AL, Santacécilia A, Ercole C, Cacchio P, Del Gallo M. In vitro and in vivo inoculation of four endophytic bacteria on *Lycopersicon esculentum*. *New Biotechnology*, 2013, doi: 10.1016/j.nbt.2013.01.001.

Rice endogenous nitrogen fixing and growth promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* DX35

Xiucheng Wang¹, Yanhua Cao¹, Xue Tang¹, Xiaotong Ma¹, Jusheng Gao^{1,2*},
Xiaoxia Zhang^{1*}

¹Key Laboratory of Microbial Resources Collection and Preservation, Ministry of Agriculture, Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

²Qiyang Agro-ecosystem of National Field Experimental Station, Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Qiyang 426182, China

Abstract: [Objective] To screen efficient nitrogen fixation endophytes from rice and to analyze their growth-promoting properties. [Method] We isolated strains from the roots of rice in the field where it has a rice-rice-green manure rotation system for 30 years. Efficient strains were screened by acetylene reduction assay. Phylogenetic analysis is based on 16S rRNA gene, *nifH* gene and the composition of fatty acid. In addition, we also detected the ability of indole acetic acid secretion through the Salkowski colorimetric method, measured the production of siderophore through the blue plate assay and detected phosphate solubilization, to analyze the growth-promoting properties. [Result] A total of 48 strains were isolated, in which DX35 has the highest nitrogenase activity. It belongs to *Herbaspirillum seropedicae* after identification. Its nitrogenase activity (181.21 nmol C₂H₄ / (mg protein • h)) was 10 times as much as the reference strain *Azotobacter chroococcum* ACCC10006. In addition, it also can secrete siderophore and solubilize phosphorus. [Conclusion] Strain DX35, belonging to *Herbaspirillum seropedicae*, is an efficient nitrogen fixation endophytes.

Keywords: nitrogen fixation endophytes, nitrogenase activity, *Herbaspirillum seropedicae*, growth-promoting properties

(本文责编:张晓丽)

Supported by the “Twelfth Five” Project in Rural Areas of National Science and Technology plan (2012AA101403), by the National Natural Science Foundation of China (41271273) and by the Public Sector (Agriculture) Research and Special Funds “Green Manure Crop Production and Utilization of Technology Integration Research and Demonstration” (201103005)

* Corresponding authors. Tel/Fax: +86-10-82108236; E-mail: xxzhang@caas.ac.cn

Received: 1 August 2013 / Revised: 15 September 2013