

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
49(11): 1430–1437; 4 November 2009
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

先锋牧草-香根草联合固氮菌多样性

赵现伟¹, Chaudhary Hassan Javed¹, 何玉梅¹, 张志英¹, 彭桂香², 谭志远^{1*}

(华南农业大学, ¹ 农学院, 广东省植物分子育种重点实验室, ² 资源环境学院, 广州 510642)

摘要:【目的】香根草 (*Vetiver zizanioides*) 是一种多年生禾本科草本植物, 具有极强的生态适应性和抗逆能力, 可作饲料和水土保持用。通过研究香根草联合固氮菌多样性, 为进一步研究和应用打下基础。【方法】采用无氮培养基, 首次从香根草中分离到 47 株联合固氮菌, 分别应用 SDS-PAGE 全细胞蛋白质电泳、DNA 指纹图谱、唯一碳源和 16S rDNA 全序列测定等方法, 进行聚类 and 多样性分析。【结果】SDS-PAGE、IS-PCR 和 BIO-BIQA 碳源利用的聚类结果基本一致, 将供试菌株分为 6 个类群和 4 个单菌株; 16S rDNA 序列测定表明, 从香根草中分离的菌株包括了佛莱辛草螺菌 (*Herbaspirillum frisingense*)、中型假食酸菌 (*Pseudacidovorax intermedius*)、恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*)、荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*)、越南伯克氏菌 (*Burkholderia vietnamiensis*)、阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*)、路德维希肠杆菌 (*Enterobacter ludwigii*) 和松江壳聚糖降解菌 (*Mitsuaria chitosanitabida*) 等不同菌种。【结论】香根草联合固氮菌具有较大的资源多样性, 对固氮菌资源的扩展和将来牧草上的应用具有重要意义。

关键词: 香根草; 联合固氮菌; 多样性

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2009) 11-1430-08

20 世纪 70 年代, Döbereiner 等成功地从热带禾本科植物中分离出联合固氮菌株, 并提出根际联合固氮的概念。1986 年 Döbereiner^[1] 实验室和 Reinhold^[2] 实验室, 相继从巴西多种作物和巴基斯坦盐碱地先锋植物卡拉尔牧草中分离到内生固氮菌, 并对它们的特性进行了详尽的研究。随后人们陆续在水稻^[3-4]、玉米^[5-6]、甘蔗^[7]、牧草^[2] 等作物的组织中分离出植物固氮菌, 并对其进行了进一步的研究。

香根草 (*Vetiver zizanioides*) 又名岩兰草, 是一种适应性强、生物量大、易种好管的多年生禾本科草本植物, 属 C₄ 类。香根草根系有着良好的力学特性, 根系纵深可达 2–3 米, 可以减少土壤水分流失, 提高土壤剪切力, 使之成为固坡护堤的理想材料^[8]。

香根草对土壤中重金属 (Al³⁺ 可达 68%)、酸 (pH 4)、碱 (pH 11)、盐 (交换性盐浓度可达 33%) 有很高耐受特性^[9-12], 使得它成为矿区生态环境治理的理想植物。另外, 香根草在饲料、菌草及工艺编织品的开发利用、造纸和燃料使用等方面存在着巨大的应用潜力和价值。香根草的生物学特性、对不良环境的抗逆性以及在经济开发应用等方面的价值使得其备受关注。但香根草的这些特性和其体内的固氮菌是否有着某些直接或间接的关系, 目前尚不得而知, 也未见有关研究香根草固氮菌的报道。

蛋白质是基因表达的产物, 对蛋白质的组成成份进行分析, 可以反映生物间的相互关系。通过全细胞蛋白电泳, 可将细菌细胞中的各种蛋白组分进行分离并对电泳图谱进行聚类分析^[13]。利用

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

* 通信作者。Tel/Fax: +86-20-38604857; E-mail: zytan@scau.edu.cn

作者简介: 赵现伟 (1981–), 男, 河南省人, 硕士研究生, 研究方向为微生物学及分子生物学。E-mail: 2006215016@stu.scau.edu.cn

收稿日期: 2009-04-10; **修回日期:** 2009-08-14

Insertion Sequence-based PCR 插入序列指纹图谱的多样性^[14], 可以将不同细菌加以聚类分析。细菌能否利用某些化合物作为唯一碳源, 反映该细菌是否产生代谢这种含碳化合物有关的酶, 因此可以作为细菌分类鉴定的特征^[15-16]。16S rDNA 基因片段在生物进化过程中变化较慢, 是最适合的细菌系统发育和定属的关键指标, 已成为现代微生物学分子鉴定手段之一。

本文首次从香根草中分离出 47 株联合固氮菌, 并以此为研究材料, 通过全细胞蛋白质电泳分析、DNA 指纹图谱和菌株唯一碳源利用等不同的方法对菌株进行聚类和多样性分析, 并选取代表菌株进行 16S rDNA 序列分析, 揭示了香根草联合固氮菌多样性, 丰富了微生物资源库, 为将来进一步研究和应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料及培养基: 供试材料是多年生草本植物—香根草 (*Vetiver zizanioides*), 2008 年 4 月采集于广东省大宝山(130° 48' 13.82"E; 24° 28' 04.22" N; 海拔 138 m), 土壤 pH 值 4.5。实验采取了 2 个 pH 值梯度(pH4.5 和 pH7.0)的无氮培养基进行分离。无氮培养基成分如下:

Döbereiner 改良无氮培养基(1L): Sucrose 10 g; Malic acid 5 g; K₂HPO₄ · H₂O 0.2 g; KH₂PO₄ · H₂O 0.4 g; NaCl 0.1 g; FeCl₃ 0.01 g; Na₂MoO₄ 0.002 g; MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g(单独灭菌); CaCl₂ 0.02 g(单独灭菌), 用 NaOH 调节 pH 值至 7.0 ± 0.2, 4.5 ± 0.2。

Nfb 培养基(1L): Malic acid 5.0 g; K₂HPO₄ 0.5 g; MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g; NaCl 0.1 g; CaCl₂ 0.02 g; 0.5% bromthymol blue 2.0 mL; vitamin solution(维生素母液) 1.0 mL; micronutrient solution(微量元素母液) 2.0 mL; 1.64% Fe₍₃₎-EDTA 4.0 mL; KOH 4.5 g; pH = 7.0 ± 0.2, 4.5 ± 0.2。其中 vitamin solution: biotin(维生素 H) 100.0 mg/L; pyridoxol-HCl 200.0 mg/L。micronutrient solution(微量元素母液): CuSO₄ 0.4 g/L; ZnSO₄ · 7H₂O 0.12 g/L; H₂BO₃ 1.4 g/L; Na₂MoO₄ · 2H₂O 1.0 g/L; MnSO₄ 1.5 g/L。

VM-Ethanol 培养基(1 L): Döbereiner-basic 10 mL; Fe₍₃₎-EDTA(0.66%) 1 mL; Yeast Extract 1.0 g; Peptone 3.0 g; NH₄Cl 0.5 g; NaCl 1.0 g; 磷酸钾缓冲液 3.0 mL(分开灭菌); 无水乙醇 6.0 mL(分开

过滤灭菌)。其中 Döbereiner-basic(1 L): MgSO₄ · 7H₂O 20 g; NaCl 10 g; Na₂MoO₄ 0.2 g; MnSO₄ 10 g; CaCl₂ 2.64 g(分开灭菌)。

固体培养基中加入 1.7%(W/V)的琼脂, 半固体培养基中加入 0.2%(W/V)的琼脂。

1.1.2 主要仪器和试剂: PCR 仪(德国 eppendorf 公司), 恒温振荡加热器和离心机(德国 eppendorf 公司), 电泳仪(Bio-Rad 公司), 紫外成像仪(天能公司), 气相色谱(北京天普 SP-2100), 智能生化培养箱(宁波江南仪器厂), 电泳槽为北京六一厂生产。试剂 Tris(Amresco 产), EDTA-Na₂(Genview 产), Yeast Extract(酵母粉, Oxoid 产), Peptone(蛋白胨, Oxoid 产), 丙烯酰胺和甲叉丙烯酰胺(Genebase 产)为进口试剂, 其余试剂均为广州化学试剂厂生产。

1.2 菌株分离纯化及固氮酶活性测定

参照王华荣等^[17]的方法对香根草材料用蒸馏水洗净, 然后将根和茎剪成 2-3 cm 长, 并分别置于已灭菌的 2 个培养皿中, 用 3% 的双氧水(H₂O₂)浸泡 4 min(以除去根、茎表面的腐烂物质), 无菌水洗涤一次。再用 0.1% 的升汞(HgCl₂)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和茎用灭菌手术刀切碎, 分别穿刺接种到不同 pH 值(4.5-7.0)的 Döbereiner 和 Nfb 半固体培养基的试管中, 胶塞密封后, 置于 30℃ 的智能生化培养箱内进行培养, 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, 30℃, 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, 最后通过镜检进一步观察其形态及确定纯度。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 24 h, 测定其固氮酶活性。测定仪器为北京天普 SP-2100 气相色谱, 柱温 50℃, 进样器 120℃, FID(Flame Ionization Detector, 火焰离子化检测器) 180℃。N₂、H₂ 和干燥空气流速分别为 30 mL/min、30 mL/min 和 300 mL/min 按公式: $N = (hx \times C \times V) / (hs \times 24.9 \times t)$ 计算得到各菌株固氮酶活性^[18]。其

中, h_x 为样品峰值; h_s 为标准 C_2H_4 峰值; C 为标准 C_2H_4 浓度 [$nmol/(mL \cdot h)$]; V 为培养容器体积 (mL); t 为样品培养时间 (h); N 为产生的 C_2H_4 浓度 [$nmol/(mL \cdot h)$].

1.3 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, $37^\circ C$ 溶菌酶破壁 30 min, 再加入 1.5 倍体积的十二烷基肌氨酸钠 (TE 溶解, 5% 浓度) $60^\circ C$ 保温半小时, 酚/氯仿/异戊醇抽提, 异丙醇沉淀, 70% 乙醇洗涤, 最后溶解在 $50 \mu L$ TE ($pH 8.0$) 中, 储存于 $-20^\circ C$ 冰箱中备用。

1.4 IS-PCR (Insertion Sequence-based PCR) 指纹图谱扩增及分析

采用 Insertion Sequence-based PCR (IS-PCR) DNA 指纹图谱方法^[14], 根据王春连等^[19]的研究成果, 选用单引物 J3 (5'-GCTCAGGTCAGGTGGCCTGG-3') 为引物, PCR 反应体系及反应条件见参考文献^[20], 但 PCR 反应体系总体积改为 $25 \mu L$, 其它条件相同。反应完毕, 先用 1.2% 的琼脂糖电泳初步聚类分析, 将条带一致的归为同一类群, 再用高分辨率的聚丙烯酰胺凝胶电泳进一步聚类。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 TREECON 软件进行 UPGMA 聚类。

1.5 SDS-PAGE 全细胞蛋白电泳

蛋白质样品的制备: 收集对数生长期菌株于 $1.5 mL$ 无菌离心管中, 4 倍上样缓冲液裂解细胞, 使其终浓度为 $150 mg/mL$, 放入 $-20^\circ C$ 冰箱中待用。临用前在 $95^\circ C$ 下加热 10 min, $7100 \times g$ 离心 2 min。

电泳: 采用聚丙烯酰胺凝胶 (5% 的浓缩胶, 12% 的分离胶) 在 DY CZ-24D 双垂直电泳槽中电泳。点样后, 先用 60 V 电压走样, 待溴酚兰指示剂到达分离胶前沿, 改用 28 mA (稳流)。

胶的染色和判读: 电泳结束后, 用考马斯亮蓝染色 30 min, 脱色液脱色遵循少量多次原则, 直到背景蓝色褪去, 把胶放在紫外成像仪上照相观察 (Tanon GIS-2008 紫外成像仪), 把条带相同的归为一类。溶液配方见参考文献^[21-22]。

1.6 唯一碳源利用板

此试验利用本实验室自己生产的 Bio-BIQA 试剂盒^[23] (唯一碳源利用板) 测定。将菌株 (其中类群 III 只选取 4 个代表菌株) 在 VM 平板上活化, 无菌水洗涤 1 遍后, 按菌株种子液与无菌半固体 (蒸馏水中加入 0.2% 的琼脂, 灭菌) 体积比 1:10 的比例, 稀释成 OD_{600} 约为 0.05 的半固体菌悬液。然后将菌悬液

分别加入 Bio-BIQA 试剂盒的各个孔中, 每孔的菌液量为 $150 \mu L$, $30^\circ C$ 培养 24 h 后, 观察各孔的混浊度并记录结果。以对照孔 (CK) 为标准, 凡颜色不变者记录为“-”; 与 CK 相比, 颜色变紫者记录为“+”。再用酶标仪测读结果, 滤光片波长为 600 nm, 和目测结果比较。然后用 TREECON 软件进行 UPGMA 聚类分析, 从生理生化水平分析这些菌株的相近水平和碳源利用情况。

1.7 16S rDNA 序列分析

16S rDNA 采用通用引物 25f (5'-AACTKAAGAGTTTGATCCTGGCTC-3') 和 1492r (5'-TACGG(C/T)TACCTTGTACGACTT-3') 进行扩增, 反应体系见参考文献^[24], PCR 反应条件为 $97^\circ C$ 预变性 3 min, $97^\circ C$ 变性 50 s, $56^\circ C$ 退火 45 s, $72^\circ C$ 延伸 90 s, 共进行 35 个循环, 结束后 $72^\circ C$ 延伸 5 min。测序所用引物为 35f (5'-TGATCMTGGCTCAGATTGA ACG-3')、342f (5'-CTCCTACGGGAGGCAG-3')、1492r (5'-TACGG(C/T)TACCTTGTTA CGACTT-3')。所测序列与 GenBank 中的序列进行比较, 获得最相关的菌株名称。

2 结果和讨论

2.1 香根草联合固氮菌的分离结果及固氮酶活性

在好氧及不同 pH 值 (7.0 和 4.5) 条件下, 以蔗糖和苹果酸为碳源, 用平板划线法, 从香根草的茎和根中共分离出 47 株联合固氮菌, 从根中分离到 8 株, 名字用 x_r 表示, 茎中分离到 39 株, 名字用 x_s 表示, 结果见表 1。从表 1 可以看出, 分离所得的 47 株联合固氮菌株的固氮能力有很大差异, 固氮酶活性数值在 $17.46 nmol C_2H_2/(mL \cdot h)$ 到 $1409.95 nmol C_2H_2/(mL \cdot h)$ 之间, 其中 x_{r11} 、 x_{r22} 、 x_{r31} 、 x_{s411} 、 x_{s422} 、 x_{s51} 和 x_{s424} 固氮酶活性大于 $1000 nmol C_2H_2/(mL \cdot h)$ 。本实验的菌株分离方法是分离植物内生固氮菌的方法, 由于还没有进行回接和再分离验证试验, 因此本文将从香根草中分离到的 47 株菌株称为联合固氮菌。

2.2 IS-PCR 指纹图谱

以 J3 为引物扩增 IS-PCR DNA 指纹图谱, 根据 IS-PCR 扩增 DNA 产物指纹带位的有无, 采用天能 (Tannon) 软件 GIS3.74 凝胶图像处理系统进行条带配对得到同源分析表, 再通过 TREECON 软件, 以类平均连锁法 (UPGMA) 对 47 株供试菌株进行聚类分析, 结果见图 1。

表 1 分离菌株、分离 pH 值及固氮酶活性

Table 1 pH of isolates and the nitrogenase activity					
Strain No.	pH	Nitrogenase activity C ₂ H ₂ nmol / (mL·h)	Strain No.	pH	Nitrogenase activity C ₂ H ₂ nmol / (mL·h)
xs21	7.0	85.99	xr21	4.5	818.19
xs22	7.0	60.55	xr22	4.5	1282.55
xs31	7.0	23.21	xr31	4.5	1249.55
xs41	7.0	259.56	xr32	4.5	543.36
xs42	7.0	63.93	xr41	4.5	816.81
xs5	7.0	378.76	xr42	4.5	575.94
xs71	7.0	71.94	xs100	4.5	100.93
xs72	7.0	99.61	xs2	4.5	46.30
xs73	7.0	47.49	xs311	4.5	221.71
xs11	7.0	139.32	xs312	4.5	108.86
xs210	7.0	143.41	xs321	4.5	188.03
xs310	7.0	31.52	xs322	4.5	66.63
xs43	7.0	146.24	xs33	4.5	153.21
xs441	7.0	86.83	xs411	4.5	1157.61
xs442	7.0	57.96	xs421	4.5	537.68
xs521	7.0	97.71	xs422	4.5	1148.94
xs110	4.5	486.15	xs423	4.5	913.81
xs12	4.5	319.20	xs51	4.5	1288.33
xs313	4.5	532.97	xs52	4.5	889.89
xs32	4.5	681.97	xs61	4.5	20.15
xs410	4.5	108.70	xs62	4.5	26.95
xs420	4.5	41.97	xs424	4.5	1072.06
xr11	4.5	1409.95			

由图 1 可知,在 80% 的水平上将供试菌株分为 6 个类群(以一个类群至少有 3 株菌株为准)和 4 个单菌株:其中 xs11、xs210、xs41 和 xs71 为单菌株;菌株 xs110、xs12、xs313、xs32、xs311、xs312、xs321、xs322 和 xs33 聚为类群 I,菌株 xs410、xs420、xs100、xs2、xs61 和 xs62 聚为类群 II,菌株 xr11、xr12、xr21、xr22、xr31、xr32、xr41、xr42、xs411、xs421、xs422、xs423、xs51、xs52 和 xs424 聚为类群 III,菌株 xs43、xs441、xs442 聚为类群 IV,菌株 xs1、xs5、xs42 和 xs310 聚为类群 V,菌株 xs21、xs22、xs31、xs72、xs73 和 xs521 聚为类群 VI,从分离的条件来看,类群 I、类群 II、类群 III 是从 pH 值为 4.5 的条件下分离出的菌株,类群 IV、类群 V、类群 VI 和 4 个单菌株(xs11、xs210、xs41 和 xs71)是从 pH 值为 7.0 的条件下分离的菌株,由此可见,在中性和酸性条件下分离出的菌株是不同的。因此,在分离植物固氮菌时应尽可能的结合材料本身的特性采取不同的分离条件,才可能分离出比较多的菌株。

2.3 全细胞蛋白电泳

关系密切的细菌在蛋白质组成上有一定的相似

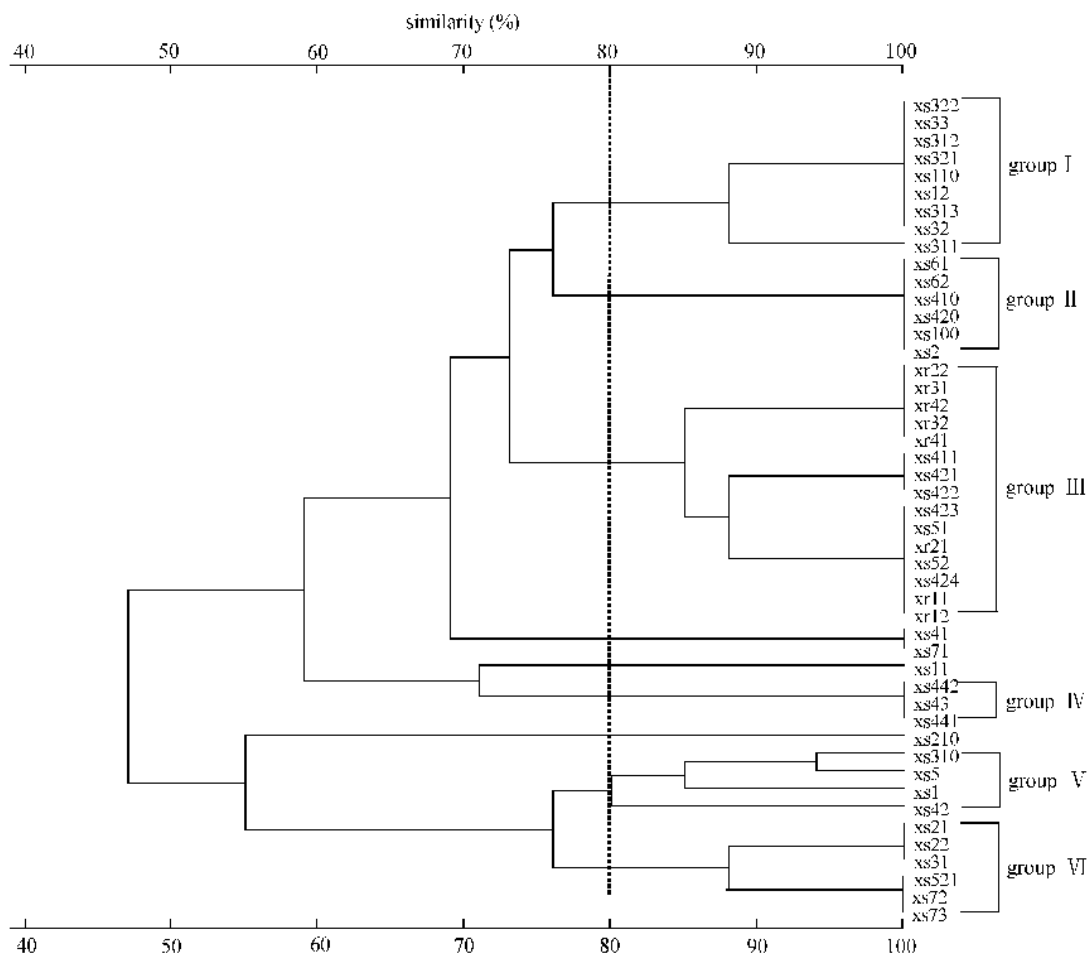


图 1 香根草联合固氮菌 IS-PCR 指纹图谱相似性聚类图

Fig. 1 Dendrogram of UPGMA showing clustering based on the similarity level of IS-PCR patterns of isolates.

性,通过 SDS-PAGE 全细胞蛋白电泳,可将细菌中各种蛋白质进行分离并对电泳图谱进行聚类分析^[25]。47 株供试菌株的 SDS-PAGE 全细胞蛋白电泳图分别为图 2 所示,从图中可以看到 47 个菌株聚为 6 类群和 5 个单菌株群(xs11、xs210、xs41、xs42 和 xs71)。在 6 个不同的类群中,各类群内菌株的蛋白质条带具有非常高的一致性,但也有个别类群内部的部分菌株之间存在着细微差异,如图 2 中类群 V 的 xs1、

xs310、xs5 和类群 VI 的 xs31、xs72。SDS-PAGE 全细胞蛋白电泳的聚类结果和 IS-PCR 指纹图谱聚类结果基本一致,但也存在微小差异。在 IS-PCR 指纹图谱聚类结果中类群 V 包括 4 个菌株(xs1、xs5、xs42 和 xs310),而在 SDS-PAGE 全细胞蛋白电泳的聚类结果中类群 V 只有 3 个菌株(xs1、xs5 和 xs310),xs42 被聚为单菌株,经 16S rDNA 序列分析可知菌株 xs42 和 xs1 都属于草螺菌属。

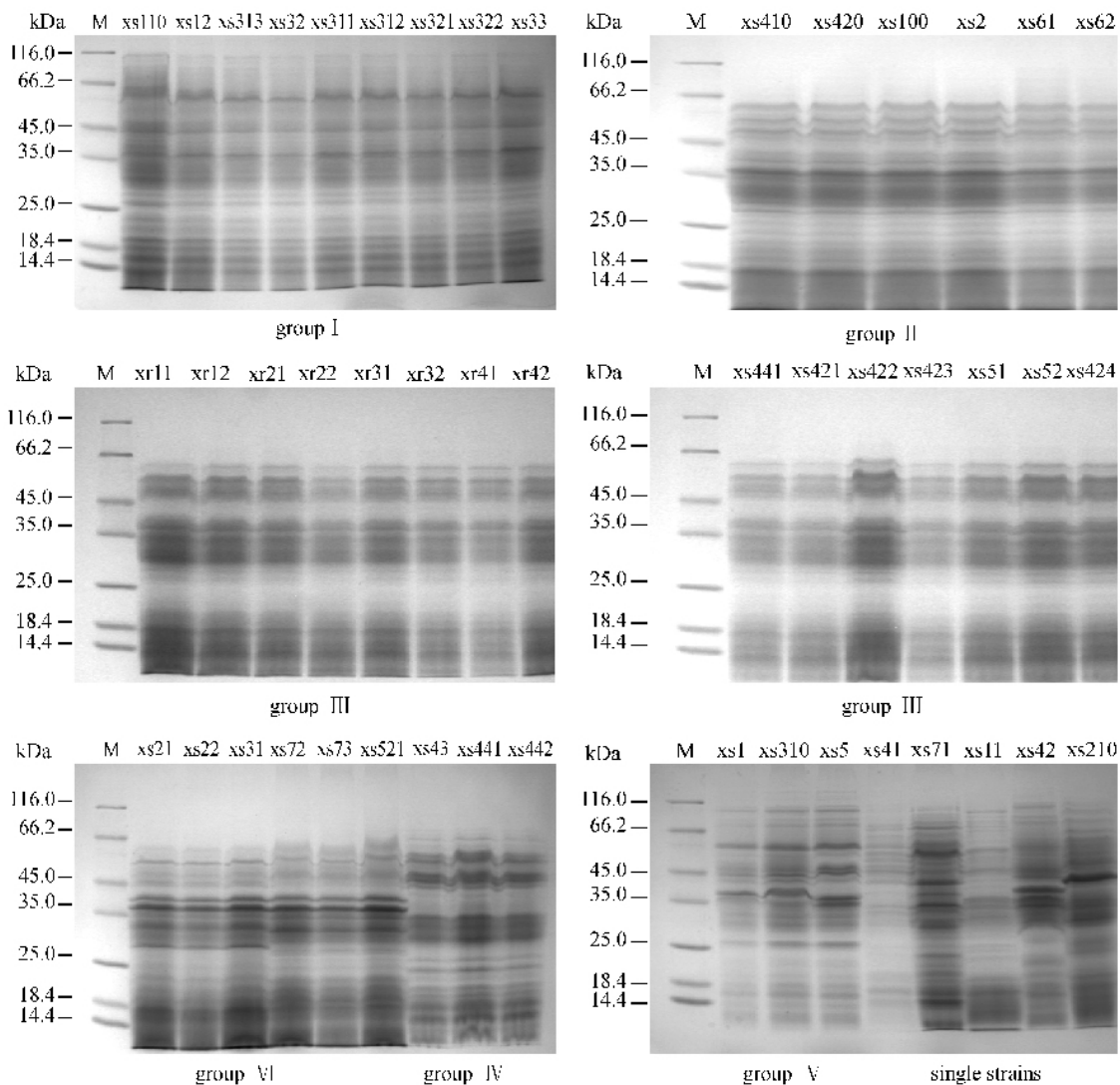


图 2 香根草联合固氮菌全细胞蛋白电泳图

Fig.2 SDS-PAGE patterns of isolates' whole-cell protein.

2.4 唯一碳源利用测定

Bio-BIQA 唯一碳源利用板用酶标仪进行测定(波长 600 nm),将测定结果转换为 1 或 0,用 TREECON 进行 UPGMA 聚类分析,结果见图 3。从图 3 中可以看出,在 80%的水平上供试菌株被分为 6 个类群(类群 III 只选取 4 个代表菌株 xs421、xs422、

xs51、xs52)。Bio-BIQA 聚类结果和 DNA 指纹图谱聚类结果一致,和全细胞蛋白电泳聚类结果基本一致。

以上 3 种不同的聚类方法,从不同的水平对香根草联合固氮菌的多样性进行了分析,分别从蛋白质、DNA 和生理生化水平显示了香根草联合固氮菌的多样性。Bio-BIQA 唯一碳源利用板对香根草联合

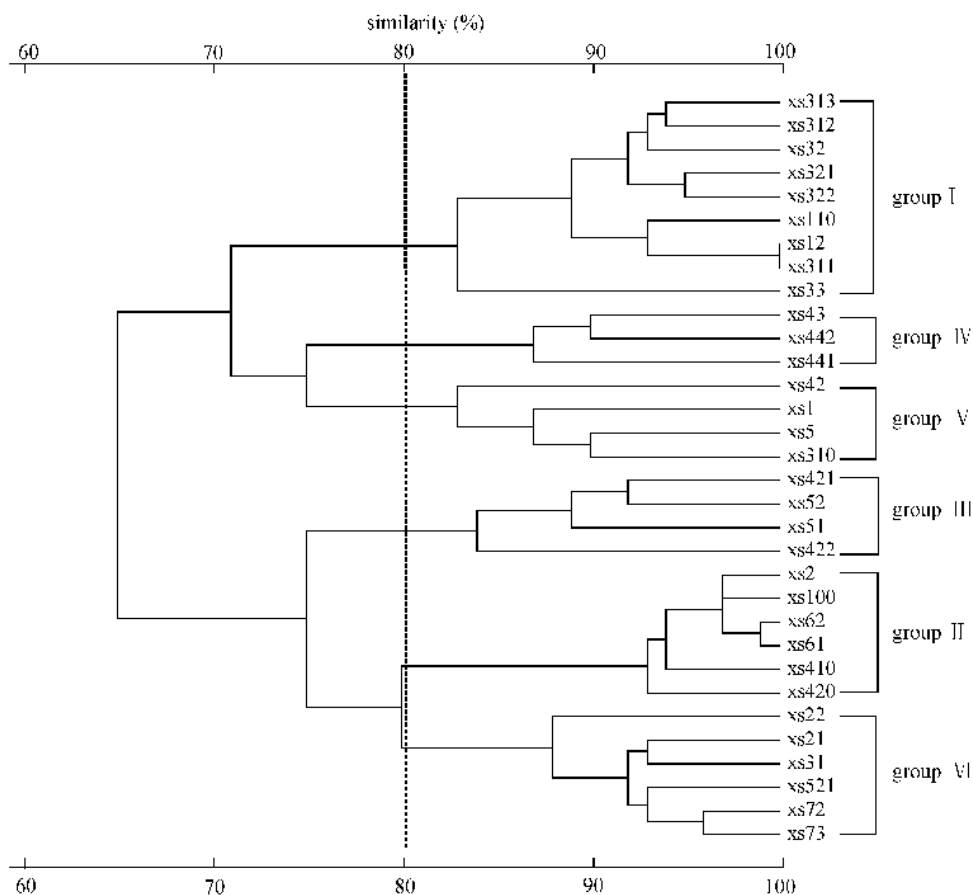


图3 香根草联合固氮菌唯一碳源利用相似性聚类图

Fig.3 Dendrogram of UPGMA showing clustering based on the similarity level of Bio-BIQA patterns of isolates.

固氮菌碳源利用情况的测定结果显示:xs441能利用的碳源数量最少,只有25种;xs110能利用的碳源数量最多,达到54种;xs310和xs72能利用的碳源数量均为27种;xs62能利用41种碳源;xs421能利用34种碳源。由此可以看出,香根草联合固氮菌有广泛的碳源利用能力,但各类群菌株的唯一碳源利用能力范围有所不同。

2.5 16S rDNA 序列相似性分析

根据全细胞蛋白电泳、DNA 指纹图谱、菌株唯一碳源利用的聚类结果,在各类群中分别选择1个代表菌株及部分单菌株进行16S rDNA全序列测定。测定结果在GenBank数据库中搜索同源性序列,由搜索到的最大相似性结果可知:代表菌株xs322(类群I)与越南伯克氏菌(*Burkholderia vietnamiensis*)、xs100(类群II)与路德维希肠杆菌(*Enterobacter ludwigii*)、xs43(类群IV)与荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、xs1(类群V)与佛莱辛草螺菌(*Herbaspirillum frisingense*)、xs11(单菌株)与松江壳聚糖降解菌(*Mitsuaria chitosanitabida*)、xs210(单菌株)与中型假食酸菌(*Pseudacidovorax intermedius*)、

xs71(单菌株)与恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)的相似性均为99%。菌株xs72(类群VI)与*Pantoea ananatis*的关系最近,有98%的相似性,属于泛菌属。菌株xs41(类群III)与*Enterobacter cloacae*的相似性为97%,属于阴沟肠杆菌。可见,香根草联合固氮菌具有较广泛的多样性,对固氮菌资源的扩展和将来牧草上的应用具有重要意义。

我们从DNA水平、蛋白质水平和生理生化特性对来源于香根草的联合固氮菌进行了多样性分析,各方法所获得的结果基本一致,均将47株菌分为6个类群。但也存在着一定差别,在IS-PCR和唯一碳源利用测定中,类群V都包括4个菌株(xs1、xs5、xs42和xs310),在全细胞蛋白电泳中,类群V只包括3个菌株(xs1、xs5、xs310)。经16S rDNA序列分析,代表菌株xs42和xs1的序列相似性为99%,都属于草螺菌属。

由本实验的结果可以推测:香根草的多种联合固氮菌可能和其自身特性有着紧密的关系,在贫瘠恶劣的环境中,香根草的多种联合固氮菌协调作用可以为其提供氮素等营养元素,调节香根草的生理

生化机制,对外界不利的环境条件产生抗逆性,使得香根草的内环境趋向有利于自身生长的环境条件,这些推测还需要进行验证。本实验只局限于偏酸性和无氮条件下分离的香根草联合固氮菌,可能还有其他多种联合固氮菌,这需要在不同的条件下才能分离得到。因此,要想搞清楚香根草联合固氮菌的多样性及其对香根草的影响还需要进一步的实验进行验证。

参考文献

- [1] Baldani VLD, Alvarez I, Baldani JJ, et al. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in the roots of field grown wheat and sorghum. *Plant and Soil*. 1986, 90: 35 - 46.
- [2] Reinhold B, Hurek T, Fendrik I, et al. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth). *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1987, 37(1): 43 - 51.
- [3] Barraquio WL, Revilla L, Ladha JK. Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. *Plant and Soil*. 1997, 194: 15 - 24.
- [4] Loganathan P, Nair S. *Swaminathania salitolerans* gen. nov., sp. nov., a salt-tolerant, nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing bacterium from wild rice (*Porteresia coarctata* Tateoka). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2004, 54: 1185 - 1190.
- [5] Dong YM, Iniguez AL, Ahmer B, et al. Kinetics and strain specificity of rhizosphere and endophytic colonization by enteric bacteria on seedlings of *Medicago sativa* and *Medicago truncatula*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003, 69(3): 1783 - 1790.
- [6] Estrada P, Mavingui P, Courmoyer B, et al. A N_2 -fixing endophytic *Burkholderia* sp. associated with maize plants cultivated in Mexico. *Canadian Journal of Microbiology*, 2002, 48(4): 285 - 294.
- [7] Gillis M, Kersters K, Hoste B, et al. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1989, 39(3): 361 - 364.
- [8] 张国发,姜旭红,崔玉波. 香根草研究与应用进展. 草业科学(*Pratacultural Science*), 2005, 22(01): 73 - 78.
- [9] 方长久,张国发. 采石场不同堆垫物的理化性质及其对香根草生长的影响. 土壤(*Soils*). 2004, 36(01): 107 - 109.
- [10] 龙健,黄昌勇,滕应,等. 天台铅锌矿区香根草(*Vetiveria zizanioides*)等几种草本植物的重金属耐性. 应用与环境生物学报(*Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*). 2003, 9(03): 226 - 229.
- [11] 夏汉平,束文圣. 香根草和百喜草对铅锌尾矿重金属的抗性与吸收差异研究. 生态学报(*Acta Ecologica Sinica*), 2001, 21(07): 1121 - 1129.
- [12] 夏汉平,王庆礼,孔国辉. 垃圾污水的植物毒性和植物净化效果之研究. 植物生态学报(*Acta Phytoecologica Sinica*). 1999, 23(04): 289 - 301.
- [13] 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(*Microbiology*). 1996, 23(3): 131 - 134.
- [14] Weiner M, Dacko J, Osek J. Insertion element IS3 PCR-based method for molecular analysis of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from suckling piglets with diarrhoea. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 2004, 48(3): 241 - 246.
- [15] Adams L, Boopathy R. Isolation and characterization of enteric bacteria from the hindgut of Formosan termite. *Bioresource Technology*. 2005, 96(14): 1592 - 1598.
- [16] 赵友福,魏亚东,高崇省,等. 利用 BIOLOG 鉴定系统快速鉴定菜豆萎蔫病菌的研究. 植物病理学报(*Acta Phytopathologica Sinica*), 1997, 27(02): 139 - 144.
- [17] 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(*Acta Ecologica Sinica*). 2006, 26(08): 2566 - 2571.
- [18] 姚拓,张德罡,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(*Acta Prataculturalae Sinica*). 2004, 13(2): 106 - 111.
- [19] 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(*Chinese Journal of Rice Science*), 2001, 15(2): 131 - 136.
- [20] 彭桂香,王华荣,张国霞,等. 糖蜜草内生固氮菌 IS-PCR 和 16SrRNA 基因全序列分析. 华南农业大学学报(*Journal of South China Agricultural University*). 2005, 26(4): 73 - 76.
- [21] Tan ZY, Kan FL, Peng GX, et al. *Rhizobium yanglingense* sp. nov., isolated from arid and semi-arid regions in China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2001, 51: 909 - 914.
- [22] 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(*Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*). 1998, 4(1): 65 - 69.
- [23] 谭志远,张武,彭桂香. 一种细菌鉴定试剂盒及其制备方法与应用. 专利号:200710032119.7.

[24] Tan ZY, 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. *Applied and Environmental*

Microbiology. 2001, 67(8): 3655 – 3664.

[25] 韦革宏, 朱铭莪. 分子生物学新方法在根瘤菌分类中的应用. 西北农业大学学报(*Acta University Agricultural Boreali-occidentalis*). 1999, 27(02): 85 – 89.

Diversity of associated nitrogen-fixing bacteria isolated from the pioneer plants-*Vetiver zizanioides*

Xianwei Zhao¹, Chaudhary Hassan Javed¹, Yumei He¹, Zhiying Zhang¹, Guixiang Peng², Zhiyuan Tan^{1*}

(¹ Guangdong Provincial Key Lab of Plant Molecular Breeding, College of Agriculture, ²College of Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: [**Objective**] *Vetiver zizanioides* is a perennial grass of the *Poaceae* family, known of its silage, soil and water conservation role. The aim of the study was to collect and identify the resources of the nitrogen-fixing bacteria associated with *Vetiver zizanioides*. [**Methods**] Associated nitrogen-fixing bacteria isolated from *Vetiver zizanioides* were studied by SDS-PAGE whole-cell protein patterns, insert sequence (IS)-PCR finger printing, utilization of sole carbon sources and 16S rRNA gene sequence analysis. [**Results**] Based on the results of finger printing analysis, protein patterns and biological test, isolates were grouped into 6 clusters, except 4 single strains. Phylogenetic analysis of 16S rDNA sequences indicated that isolates belonged to *Herbaspirillum frisingense*, *Enterobacter ludwigii*, *Pseudacidovorax intermedius*, *Mitsuaria chitosanitabida*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia vietnamiensis* and *Enterobacter cloacae*. [**Conclusion**] The nitrogen fixers associated with *Vetiver zizanioides* showed great diversity and may have a potential application for the grass forage and agriculture.

Keywords: *Vetiver zizanioides*; associated nitrogen-fixing bacteria; diversity

(本文责编 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30470002, 30770001); the Program for New Century Excellent Talents in University (NCET-07-0315); Guangdong Province Key Research Project of Agriculture (2007B020711004)

* Corresponding author. Tel/Fax: + 86-20-38604857; E-mail: zytan@scau.edu.cn

Received: 10 April 2009/Revised: 14 August 2009

《微生物学报》关于署名

经过本刊审查通过后即将发表的稿件,作者在修改时,如果对“作者或单位的署名”进行变更,与最初的投稿不同,本刊要求:作者必须再提供有关证明,否则不能生效! 此项规定早已公布在本刊的网页上、并且在本刊的纸质出版物中也多次公布。请作者登陆本刊网页(<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>),在首页内、“常见问题”中有显示,点开左侧的“署名”,其中有详细的说明和办理方法。

- (1) 如变单位署名顺序,需要原研究内容所属单位(通常是第一署名单位)的证明信,证明内容:原署名顺序→现署名顺序→盖章。
- (2) 如变更作者署名顺序,需要通讯作者和第一作者同意的签字证明。证明内容:原作者姓名及顺序→修改之后的作者姓名及顺序。
- (3) 将此证明信返回编辑部(邮寄原件或扫描后 E-mail 发来),新的变更即可生效。