

糖蜜草 (*Melinis minutiflora* Beauv.) 内生固氮菌分离鉴定

王华荣^{1,2}, 彭桂香³, 张国霞^{1,2}, 侯 伟^{1,2}, 谭志远^{1,2,*}

(1. 广东省植物分子育种重点实验室, 广州 510642; 2. 华南农业大学 农学院, 广州 510642;

3. 华南农业大学 资源环境学院, 广州 510642)

摘要:糖蜜草 (*Melinis minutiflora* Beauv.) 是热带地区的一种优良牧草。采用选择性培养基在厌氧和好氧两种培养条件下, 从糖蜜草根、茎中都分离得到具有较强固氮酶活性的菌株。通过 SDS-PAGE 全细胞蛋白电泳技术快速聚类分析表明, 来源于糖蜜草中的菌株为同一类群。16S rDNA 序列分析和总 DNA 的 G + C % 含量进一步确定糖蜜草中所分离的菌株属于固氮螺菌属 (*Azospirillum*), 与产脂固氮螺菌 (*Azospirillum lipoferum*) 亲缘关系较近。BIOLOG 板测定结果显示, 糖蜜草菌株 TMCY243 对多种碳源具有很强的适应性, 与产脂固氮螺菌 (*A. lipoferum*) 的模式菌株 DSM 1691 存在着较大的差异。以上结果表明, 糖蜜草内生固氮菌为固氮螺菌属的一个新类群。

关键词:内生固氮菌; 糖蜜草; 固氮螺菌; BIOLOG; 系统发育

文章编号:1000-0933(2006)08-2566-06 **中图分类号:**S511 **文献标识码:**A

Characterization of endophytic diazotrophs isolated from molasses grass

WANG Hua-Rong^{1,2}, PENG Gui-Xiang³, ZHANG Guo-Xia^{1,2}, HOU Wei^{1,2}, TAN Zhi-Yuan^{1,2,*} (1. Guangdong Provincial Key Lab of Plant Molecular Breeding, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China; 2. College of Agriculture, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China; 3. College of Resources and Environment, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(8): 2566 ~ 2571.

Abstract: Molasses grass (*Melinis minutiflora* Beauv.) is a good fodder in tropical area. In this study, endophytic bacteria with high nitrogenase activity were isolated from the roots and stems of molasses grass grown in Guangdong province by using a selective medium under anaerobic or aerobic conditions. SDS-PAGE of whole-cell proteins clustered all the 15 isolates into a single group. 16S rDNA sequence analysis showed that these isolates belonged to the genus *Azospirillum*, and were closely related to *A. lipoferum*. BIOLOG test indicated that the representative strain, TMCY243, from molasses grass was able to utilize a wider range of carbon sources than the type strain DSM 1691 of *A. lipoferum*. Based on these results, we concluded that the endophytic diazotrophs isolated from molasses grass represented a new species of *Azospirillum*. This bacterium distributed widely in association with its host plant in the subtropic regions of China.

Key words: endophyte diazotroph; molasses grass (*Melinis minutiflora* Beauv.); *Azospirillum*; BIOLOG; Phylogeny

生物固氮为全球的植物提供 75% 的氮素, 是生命科学中的重大研究课题^[1]。Döbereiner 等^[2]人对禾本科植物共生固氮菌研究发现, 固氮螺菌 (*Azospirillum*) 大多聚集于植物根表, 部分侵入根的皮层或中柱内, 形成“原始”的共生, 是介于根际自生固氮和结瘤固氮的过渡类型, 称这种固氮类型为联合共生固氮 (associative

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (30300001, 30470002); 国家教育部科学技术研究重点资助项目 (205111); 华南农业大学校长基金资助项目

收稿日期:2005-05-28; **修订日期:**2006-03-15

作者简介:王华荣 (1980 ~), 男, 江苏昆山山人, 硕士生, 主要从事分子遗传育种研究. E-mail: wanghr1980@tom.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: zytan@scau.edu.cn

Foundation item: The project was supported by National Natural Science Foundation of China (No. 30300001, 30470002); Key Project of Chinese Ministry of Education (No. 205111) and Presidential Foundation of South China Agricultural University

Received date: 2005-05-28; **Accepted date:** 2006-03-15

Biography: WANG Hua-Rong, Master candidate, mainly engaged in molecular breeding of genetics. E-mail: wanghr1980@tom.com

symbiotic nitrogen fixation)。作为生物固氮的一部分-植物内生固氮菌的发现和研究发现了一个新的固氮系统,深化了根际联合共生固氮的研究。植物体内存在着大量细菌,它们的存在不但对宿主植物生长不造成危害,相反地,这些内生菌通过至少 3 个因素来进一步促进植物生长:植物生长调节剂的分泌、植物病原体的抗性以及生物固氮^[3-5]。其中植物内生固氮菌(Endophytic diazotrophs)定殖在植物体内,并能起固氮作用,为宿主提供氮元素^[6]。

随着对内生固氮菌的深入研究,人们已从多种植物中分离得到植物内生固氮菌,如甘蔗^[7,8]、水稻^[9]、玉米^[10]等非豆科植物。糖蜜草(*Melinis minutiflora* Beauv.)是热带地区的一种优良牧草,但迄今为止,未见有糖蜜草内生固氮菌的报道。本实验以糖蜜草作为研究对象,用无氮培养基分离得到了一群具有较高固氮酶活性的菌株,并对其做了 SDS-PAGE 全细胞蛋白电泳和生理生化实验(BIOLOG 板测定)。

1 材料和方法

1.1 材料来源

糖蜜草样本于 2004 年 7 月采集于珠海贫瘠山坡荒地。*Azospirillum lipoferum* 模式菌株 DSM 1691 购于德国 DSMZ 菌株保存中心。

1.2 菌株的分离、纯化

将采集的新鲜糖蜜草样本用蒸馏水洗净,然后剪下根、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),无菌水洗涤一次,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 5~10min,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 NFb 半固体培养基的试管中,胶塞密封后,置于 28℃ 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℃,湿度为 85% 条件下,进行厌氧(仪器为:YQX-1 型厌氧培养箱)及好氧培养。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。

NFb 培养基的主要成分:malic acid 5.0 g/L, K_2HPO_4 0.5 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g/L, NaCl 0.1 g/L, $CaCl_2$ 0.02 g/L, 0.5% bromthymol blue (in KOH 0.2 mol/L) 2.0 ml/L, vitamin solution 1.0 ml/L, micronutrient solution 2.0 ml/L, 1.64% Fe-EDTA 溶液 4.0 ml/L, KOH 4.5 g/L, pH = 6.8。其中 vitamin solution: biotin 100.0 mg/L, pyridoxol-HCl 200.0 mg/L; micronutrient solution: $CuSO_4$ 0.4 g/L, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.12 g/L, H_2BO_3 1.4 g/L, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 1.0 g/L, $MnSO_4$ 1.5 g/L。VM-Ethanol 培养基的主要成分:Döbereiner-basic 10.0 ml/L, $Fe(3)-EDTA(0.66\%)$ 10.0 ml/L, Yeast Extract 1.0 g/L, Peptone 3.0 g/L, NH_4Cl 0.5 g/L, NaCl 1.0 g/L, $K-PO_4$ -Buffer 3.0 ml/L (分开灭菌), Ethanol 6.0 ml/L (过滤灭菌)。Döbereiner-basic 组成: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 20.0 g/L, NaCl 10.0 g/L, $CaCl_2$ 2.64 g/L (分开灭菌), $MnSO_4 \cdot 2H_2O$ 1.0 g/L, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.2 g/L。

固体培养基中加入 1.7% 的 Agar, 半固体培养基中加入 0.15% ~ 0.25% 的 Agar。

1.3 气相色谱法测定固氮酶活性

将已纯化的菌株和菌株 DSM1691 分别接入盛有 NFb 半固体培养基的试管内,用胶塞密封。于温度 28℃ 下培养 24 h 后,向管内注入 1/10 体积 10% 乙炔气体(使其终浓度为 1%)。在同样条件培养箱内培养 24 h,用气相色谱测定其固氮酶活性(仪器为北京分析仪器厂生产 SP-2100 气相色谱)。计算方法参照文献^[11],按以下公式进行计算酶活。

$$EA1 = (58.0 \times Se \times T \times Pe) / (Sb \times Te \times P \times t) (\mu mol/h)$$

式中, Se 为乙烯峰面积; T : 开氏绝对温度 ($T = 273.13K$); Pe 为实验条件下的大气压强(Pa); Sb 为乙炔峰面积; Te 为实验条件下的温度(K); P 为绝对大气压强 ($P = 101324.72$ Pa); t 为培养时间 ($t = 24h$) 每株菌培养做 3 个重复,分别测定,再计算其平均值。

1.4 SDS-PAGE 全细胞蛋白电泳分析

将纯化后的菌株接入 5 ml VM-Ethanol 液体培养基中振荡预培养过夜,培养条件为 28℃,100 r/min。用无菌离心管 4000 r/min 离心收集菌体,弃上清。用 6 ml 灭菌的 PBS 缓冲液 (NaCl 8.0 g/L, KCl 0.2 g/L, Na₂HPO₄·2 H₂O 2.9 g/L, KH₂PO₄ 0.2 g/L, pH 7.2) 离心洗涤 1 次。再加入 6 ml 灭菌的 PBS 缓冲液,振动混匀细胞,取 2 ml 混悬液涂布于 VM-Ethanol 固体培养基上,28℃ 培养 36 h。将菌体收集于预称重的 1.5 ml Eppendorf 管中,加入 1.0 ml PBS 缓冲液,振动混匀,4000 r/min 离心,弃上清,用干净吸水纸吸干离心管壁周围水分,称重。按照 150.0 mg/ml 浓度加入 4 × extraction buffer,样品 -20℃ 贮存备用。4 × extraction buffer 组成为 glycerol 30ml (终浓度为 60%), SDS 0.46 g (终浓度为 9.2%), Tris-HCl (pH 6.8) 1.52 g 溶于 15 ml 去离子水中 (终浓度为 0.25 mol/L), bromphenol blue (溴酚蓝) 6.0 mg (慢慢加热,搅拌溶解,终浓度为 0.012%), β-mercaptoethanol (β-巯基乙醇) 2.5 ml (终浓度为 5%), 加去离子水到总体积 50 ml, -20℃ 贮存备用。电泳具体操作见参考文献^[12]。

1.5 碳源利用(BIOLOG 板)测定

糖蜜草分离物经 SDS-PAGE 快速聚类后,选取代表菌株和亲缘关系密切的产脂固氮螺菌 *A. lipoferum* 模式菌株 DSM 1691 进行 BIOLOG 板对比试验,测定其生理生化特性,主要比较碳源的利用情况。选用 BIOLOG GN2 板,基本按 BIOLOG GN2 板的操作步骤进行^[13],有所修改。为:菌株首先经 NFb 培养基平板活化,再于专用培养基 BUGM(BIOLOG Universal Growth Medium) 上划线培养(30℃, 12~18h); ②用无菌棉签小心刮取菌苔至盛有 18~20ml 预热的灭菌生理盐水的三角瓶中,涡旋振荡至均匀菌悬液,取部分菌悬液至 7230 分光光度计上比色测定浓度,调节 OD590 值为 0.25~0.30,采用 8 孔移液器加样,每孔 150 (L, 28℃ 培养,在接种 4h 后和 24h 后目测,以 A1 孔(内无碳源)为对照,凡与该孔颜色相近者记“-”,与此孔相比有明显紫色出现者记为“+”,不能分辨者记为“+/-”;培养 24h 后用 BIO-RAD Benchmark plus 酶标仪测读结果,滤光片波长为 590nm,和目测结果比较,以准确判断菌株在不同碳源下的生长状况。

2 结果与分析

2.1 分离纯化结果

从糖蜜草中分离纯化得到 TMCY055, TMCY023, TMCY225, TMCY0551, TMCY0831, TMCY025, TMCY24, TMCY0832, TMCY0256, TMCY255, TCMY41, TMCY0552, TMCY243, TMCY244, TMCY066 共 15 株内生固氮菌株。

2.2 固氮酶活性的测定

对以上 15 株菌进行固氮酶活性测定,其值在 48.55~54.65 μmol/h,而 *Azospirillum lipoferum* 模式菌株的活性为 49.13 μmol·h⁻¹,也在这个范围之内。在一定条件下,乙炔还原活性与固氮酶对氮气的固定活性呈正相关^[10],表 1 结果表明这些菌株具有较强的固氮活性。

表 1 糖蜜草各菌株及模式菌株 DSM1691 固氮酶活性测定结果
Table 1 Test of nitrogenase activity of isolates and type strain DSM 1691

菌株编号 Strain No.	固氮酶活性 Nitrogenase activity(μmol·h ⁻¹)	菌株编号 Strain No.	固氮酶活性 Nitrogenase activity(μmol·h ⁻¹)
DSM1691	49.13	TMCY0832	53.6
TMCY055	48.55	TMCY0256	49.39
TMCY023	53.11	TMCY255	48.69
TMCY225	48.74	TMCY41	51.94
TMCY0551	51.28	TMCY0552	52.36
TMCY0831	52.32	TMCY243	49.68
TMCY025	54.65	TMCY244	50.36
TMCY24	50.23	TMCY066	49.61

2.3 SDS-PAGE 全细胞蛋白电泳分析

SDS-PAGE 全细胞蛋白电泳分析在菌株聚类的分析中具有简单快速的特点^[14]。闫爱民等^[15]在对于旱地

区几种豆科植物根瘤菌的数值分类和 SDS-PAGE 全细胞蛋白电泳分析中证实了蛋白分析的聚类结果与数值分类结果比较近似。将来源于糖蜜草的内生固氮菌进行 SDS-PAGE 全细胞蛋白电泳聚类(图 1)。图 1 中,来源于糖蜜草菌株 TMCY055, TMCY023, TMCY255, TMCY0551, TMCY0831, TMCY025, TMCY24, TMCY0832, TMCY0256, TMCY225, TCMY41, TMCY0552, TMCY243, TMCY244, TMCY066 蛋白电泳图谱基本是一致的,说明分离所获得的菌株是属于同一种蛋白质图谱类群。根据蛋白质聚类结果,选取了 3 株代表菌株 TMCY41, TMCY243 和 TMCY244 进行 16S rRNA 基因全序列分析^[16]。序列分析表明, TMCY41, TMCY243 和

TMCY244 具有很高的同源性,与 GenBank 中同源序列搜索比较,其亲缘关系最近的菌株为产脂固氮螺菌(*Azospirillum lipoferum*),二者具有 97% 的相似性。进一步将糖蜜草分离物与产脂固氮螺菌(*A. lipoferum*)模式菌株 DSM 1691 的蛋白质图谱类型进行比较,它们的图谱类型具有一定的相似性,但又有一定的差异。说明来源于糖蜜草的内生固氮菌有可能为一新的内生固氮菌类群。

2.4 菌落形态和培养特征

参考《一般细菌常用鉴定方法》^[17],在 Nfb 固体培养基上为无色透明,边缘光滑且具有粘液的圆形菌落。在培养过程中,能使含溴百里酚蓝的 pH6.8 培养基有绿色变为蓝色,说明菌株在生长过程中产碱。革兰氏染色均为阴性,杆状,(1.0~2.0)μm×(2.0~3.0)μm。最适生长温度 28℃,37℃能正常生长,最适生长 pH6.0~7.0,兼性好氧。

2.5 碳源的利用(BIOLOG 测定)

微生物对碳源利用的不同,能反映微生物不同的生理生化代谢途径,从而区分不同类群的微生物。同时微生物利用碳源进行呼吸时,会将四唑类氧化还原染色剂从无色还原成紫色,从而在微生物鉴定板上形成该微生物特征性的反应模式或“指纹”,通过纤维光学读取设备-读数仪来读取颜色变化,并将该反应模式或“指纹”与数据库相比就可以得到鉴定结果。选取来源于糖蜜草内生固氮菌代表菌株 TMCY 243 和产脂固氮螺菌(*A. lipoferum*)模式菌株 DSM 1691 进行碳源利用比较。二者都能很好地利用糊精、D-纤维二糖、龙胆二糖、m-肌醇、麦芽糖、松二糖、D-半乳糖醛酸、D-葡萄糖酸、D-葡萄糖醛酸、L-丙氨酰甘氨酸、L-天氨酰氨酸、L-天门冬氨酸、L-谷氨酸、L-脯氨酸、D-丝氨酸、N-乙酰基-D-葡萄糖胺、L-阿拉伯糖、D-果糖、D-甘露醇、D-甘露糖、L-棉子糖、D-山梨醇、D-海藻糖、D-丙氨酸、丙三醇、吐温 40、乳果糖、蔗糖、β-羟基苯乙酸、奎尼酸、吐温 80、D, L-乳酸、L-丝氨酸作为唯一碳源;二者都不能利用甲酸、L-鸟氨酸、L-苯丙氨酸、L-焦谷氨酸、2-氨基乙醇、乙酸、丙酸、葡萄糖醛酸胺、衣康酸、尿刊酸等作为唯一碳源。碳源利用差异结果见表 2。表 2 中如 TMCY 243 以 D-蜜二糖、D-棉子糖为碳源的培养基上生长旺盛,而在以赤藻糖醇、木糖醇为碳源的培养基上无法生长,但对产脂固氮螺菌(*A. lipoferum*) DSM 1691 而言情况恰恰相反。

3 小结与讨论

植物内生固氮菌的发现展现了一个新的固氮系统,为植物实现生物固氮开辟了一条新的途径。因为内生固氮菌定殖于植物体内部,在木质部的导管区域进行固氮作用,而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,还避免了化合态氮的抑制及土著微生物的竞争,固定的氮又可直接供给植物吸收,因而表现出更高的固氮效率^[18~20]。对于内生固氮菌的分离,应该考虑到内生固氮菌的生长条件,首先是宿主植物属 C3 还是 C4 型植株,因为 C3 与 C4 植株所能提供的碳源是不同的。其次,氧分压的高低直接影响着内生固氮菌固氮酶活性的高低,而且一般情况下,氧分压越高则对固氮酶活性抑制作

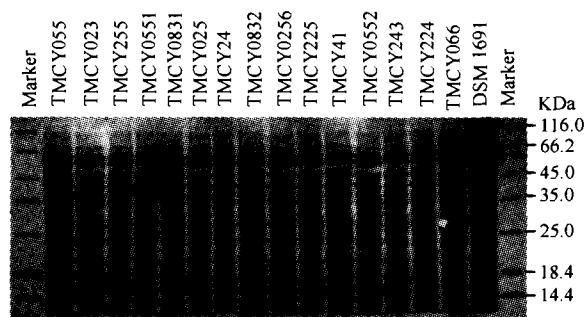


图 1 糖蜜草内生固氮菌及产脂固氮螺菌 DSM1691 的 SDS-PAGE 全细胞蛋白电泳图谱

Fig.1 The protein patterns of endophytic diazotrophs isolated from molasses grass and *Azospirillum lipoferum* DSM1691 by SDS-PAGE analysis

表 2 糖蜜草内生固氮菌代表菌株 TMCY 243 与产脂固氮螺菌 (*A. lipoferum*) 模式菌株 DSM 1691 的碳源利用差异Table 2 The different carbon utilization by representative strain TMCY 243 isolated from molasses grass and type strain DSM 1691 of *A. lipoferum*

碳源 Carbon source	生长状况 Growth		碳源 Carbon source	生长状况 Growth	
	TMCY243	DSM1691		TMCY243	DSM1691
D-阿拉伯糖	+	+/-	侧金盏花醇	+/-	+
L-果糖	+	+/-	单甲基琥珀酸	+/-	+
D-半乳糖	+	+/-	丙二酸	+/-	+
顺-乌头酸	+	+/-	L-亮氨酸	+/-	+
D-葡萄糖二酸	+	+/-	L-苏氨酸	+/-	+
L-丙氨酸	+	+/-	肌苷	+/-	-
羧基-L-脯氨酸	+	+/-	溴丁二酸	-	+
丁二胺	+	+/-	环糊精	-	+
尿苷	+	+/-	赤藻糖醇	-	+
胸腺嘧啶核苷	+	+/-	木糖醇	-	+
6-磷酸葡萄糖	+	+/-	癸二酸	-	+
D-蜜二糖	+	-	琥珀酰胺酸	-	+
D-棉子糖	+	-	D, L-肉碱	-	+
L-组氨酸	+	-	2, 3-丁二醇	-	+
1-磷酸葡萄糖	+	-	D-葡萄糖胺酸	-	+/-
甲基丙酮酸	+	-	N-乙酰基-D-半乳糖胺	-	+/-
柠檬酸	+	-	阿洛酮糖	-	+/-
淀粉	+/-	+	琥珀酸	-	+/-
D-乳糖酸内酯	+/-	+	苯乙胺	-	+/-

- , 不生长 Strain can not grow; + , 生长 Strain can grow; +/- , 微弱生长 Strain can grow slightly

用越强^[21]。也就是说,在纯培养条件下,如果能给内生固氮菌低氧分压,使其生长良好,这样就有利于其更好地分离与纯化。本研究对优良牧草-糖蜜草 (*Melinis minutiflora* Beauv.) 进行分离纯化时,选择苹果酸(malic acid)作为碳源,并采用厌氧和好氧条件分别进行培养,最终分离得到一群内生固氮菌株。由于 NFb 培养基只有苹果酸(malic acid)作为唯一碳源,不一定适合于其它存在于糖蜜草植株中内生固氮菌的生长,在分离过程中其他种类的内生固氮菌有可能被“淘汰”了。将采用其它碳源作培养基,进一步分离糖蜜草中有可能存在的其它种类的内生固氮菌。对分离得到的菌株,通过气相色谱法测定其具较高固氮酶活性的前提下,先经过 SDS-PAGE 全细胞蛋白电泳快速聚类,确定分离所得的菌株为同一蛋白质图谱类型。再测定原核生物中保守的 16S rDNA 序列和总 DNA 的 G + C % 含量,初步确定来源于糖蜜草中内生固氮菌株为固氮螺菌属 (*Azospirillum*) 的新类群,并与产脂固氮螺菌 (*A. lipoferum*) 模式菌株 DSM 1691 具有 97 % 相似性。进行碳源利用实验后进一步说明来源于糖蜜草的内生固氮菌为一新的内生固氮菌类群。还需要利用如插入序列指纹图谱分析 (IS-PCR)^[15] 和脂肪酸成分分析等多相分类手段来确证其是否为一新种。

References:

- [1] Han W W, Shen S H, Jing Y X. Proteomics in Biological Nitrogen Fixation. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2004, 12(4):464 ~ 469.
- [2] Döbereiner J, Day J M. Associative symbioses and nitrogen-fixing sites. In: Newton W E, Nyman C J, eds. *International Symposium on Nitrogen fixation*. Washington: Washington State University, 1975.518 ~ 538.
- [3] Bashan Y, Holguin G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990 ~ 1996). *Can. J. Microbiol*, 1997, 43:103 ~ 121.
- [4] Benhamou N, Kloepper J W, Quadt-Hallmann A, et al. Induction of defense related ultra structural modification in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria. *Plant Physiol*, 1996, 112:919 ~ 929.
- [5] Van Buren A M, Andre C, Ishimaru C A. Biological control of the bacterial ring root pathogen by endophytic bacteria isolated from potato. *Phytopathology*, 1993, 83:1406.
- [6] Baldani J I, Olivares F L, Hemery A S, et al. Nitrogen-fixing endophytes: recent advances in the association with graminaceous plants grown in the tropics. In: Elmerich C, Kordoski A, Newton W E eds. *Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1997, 203 ~ 206.

- [7] James E K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crops Research*, 2000, 65:197 ~ 209.
- [8] Cavalcante V A, Döbereiner J. A new acid — tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and Soil*, 1988, 108:23 ~ 31.
- [9] Verma S C, Ladha J K, Anil K, *et al.* Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *Journal of Biotechnology*, 2001, 91: 127 ~ 141.
- [10] Palus J A, Borneman J, Ludden P W, *et al.* A diazotrophic bacterial endophyte isolated from stems of *Zea mays* L. and *Zea luxurians* Iltis and Doebley. *Plant Soil*, 1996, 186: 135 ~ 142.
- [11] Yang C F, Wang S J, Chen J, *et al.* The isolation and identification of abigenous azotobacter. *Journal of Huaihai Institute of Technology*, 1999, 3: 56 ~ 58.
- [12] Tan Z Y, Chen W X. SDS-Page of whole-cell protein of new rhizobial groups and 16S rDNA sequencing of their representatives. *Chin J Appl Environ Biol*, 1998, 4(1): 65 ~ 69.
- [13] Instruction for use of the BIOLOG Microplate TM, Biolog Inc, 1993.
- [14] Xu X D, Chen W X. Analysis on rhizobium Tianshannense by whole-cell protein electrophoresis and multilocus enzyme electrophoresis. *Microbiology*, 1996, 23(3): 131 ~ 134.
- [15] Yan A M, Chen W X. SDS-PAGE analysis of whole cell protein and numerical taxonomy of Rhizobia of some legumes growing in arid region. *Chin J Appl Environ Biol*, 1998, 4(4): 354 ~ 359.
- [16] Peng G X, Wang H R, Zhang G X, *et al.* Molecular study of endophytic nitrogen fixing bacteria isolated from molasses grass. *J South China Agric Univ*, 2005, 26(4):73 ~ 76.
- [17] *The group of systematic bacteriology in the Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences. Method of common identification of bacteria.* Beijing: Science Press, 1978.
- [18] Li J D, An Q L. Advances in associated nitrogen fixation research. *Chin Bull Bot*, 1997, 14(3): 14 ~ 21.
- [19] Reis V M, Olivares F L, Döbereiner J. Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophs* and confirmation of its endophytic habitat. *World J Microbial Biotechnol*, 1994, 10: 401 ~ 405.
- [20] Stephan M P, Oliveira M, Teixeira K R S, *et al.* Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicu*. *FEMS Microbiol Lett*, 1991, 77: 67 ~ 72.
- [21] Lauren D B, Humberto J O, Fabio O, *et al.* Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses nif genes in gramineous plants. *Microbiology Ecology*, 2003, 45: 39 ~ 47.

参考文献:

- [1] 韩威威, 沈世华, 荆玉祥. 生物固氮研究中的蛋白质组学. *农业生物技术学报*, 2004, 12(4):464 ~ 469.
- [11] 杨从发, 王淑军, 陈静, 等. 自生固氮菌的分离鉴定. *淮海工学院学报*, 1999, 3: 56 ~ 58.
- [12] 谭志远, 陈文新. 根瘤菌新类群的全细胞蛋白电泳及 16SrDNA 全序列分析. *应用与环境生物学报*, 1998, 4(1): 65 ~ 69.
- [14] 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(3): 131 ~ 134.
- [15] 闫爱民, 陈文新. 干旱地区几种豆科植物根瘤菌的数值分类和 SDS-PAGE 全细胞蛋白电泳分析. *应用与环境生物学报*, 1998, 4(4): 354 ~ 359.
- [16] 彭桂香, 王华荣, 侯伟, 张国霞, 袁清华, 谭志远. 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(4):73 ~ 76.
- [17] 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法. 北京: 科学出版社, 1978.
- [18] 李久蒂, 安千里. 联合固氮研究进展. *植物学通报*, 1997, 14(3): 14 ~ 21.