

### 3种竹子内生固氮菌特征及多样性

冯歌林<sup>1,2</sup>, 高 竞<sup>1,2</sup>, 严淑娴<sup>1,2</sup>, 王 晶<sup>1,2</sup>, 梁辰飞<sup>1,2</sup>, 秦 华<sup>1,2</sup>, 陈俊辉<sup>1,2</sup>, 徐秋芳<sup>1,2</sup>

(1. 浙江农林大学 环境与资源学院, 浙江 杭州 311300; 2. 浙江农林大学 省部共建亚热带森林培育国家重点实验室, 浙江 杭州 311300)

**摘要:** 【目的】了解不同竹子内生固氮菌及其定殖土壤根区固氮菌的特征和生物多样性。【方法】以毛竹 *Phyllostachys edulis*、狭叶青苦竹 *Pleioblastus chino*、孝顺竹 *Bambusa multiplex* 叶部、根部及定植土壤为对象, 设计 *nifH* 固氮基因引物, 采用聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳 (PCR-DGGE) 和随机克隆技术, 通过聚类分析、Shannon 多样性指数分析构建系统发育树。【结果】不同竹子根区土壤之间、同一竹种根部与叶部之间、不同竹种同一器官之间、根区土壤与植物之间的固氮菌群落结构差异明显, 同一竹种叶部或根部的重复样品相似度均不高; 根部内生固氮菌种类总体多于叶部, 土壤固氮菌与根部内生固氮菌相似度高于叶部。不同竹种不同器官间固氮菌 Shannon 多样性指数差异显著, 孝顺竹叶部 (2.73) 与土壤 (2.70) 大于根部 (2.53) ( $P < 0.05$ ), 狭叶青苦竹根部和毛竹根部大于叶部和土壤 ( $P < 0.05$ )。植物样品随机克隆测序对比得到 83 株固氮菌, 仅 12 株为可培养固氮菌株, 分别属于慢生根瘤菌属 *Bradyrhizobium*、*Dechlorosoma*、固氮螺菌属 *Azospirillum*、肠杆菌属 *Enterobacter*、*Kosakonia*、变形杆菌属 *Gammaproteobacteria*、红长菌属 *Rubrivivax* 和 *Azohydromonas*。系统发育树结果表明: 3 种竹子内生固氮菌明显不同于其他植物。【结论】土壤环境、竹子种类及组织器官均能影响竹子内生固氮菌的结构特征和多样性, 定殖于根部的内生固氮菌多样性显著高于叶部。3 种竹子内生固氮菌种类与已报道的禾本科 Gramineae 植物差异显著。图 4 表 4 参 30

**关键词:** 竹子; 内生固氮菌; PCR-DGGE; 聚类分析; Shannon 多样性指数; 随机克隆; 系统发育树

中图分类号: S718.8 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2021)06-1203-10

### Characteristics and diversity of endophytic diazotrophs in three bamboo species

FENG Gelin<sup>1,2</sup>, GAO Jing<sup>1,2</sup>, YAN Shuxian<sup>1,2</sup>, WANG Jing<sup>1,2</sup>, LIANG Chenfei<sup>1,2</sup>,  
QIN Hua<sup>1,2</sup>, CHEN Junhui<sup>1,2</sup>, XU Qiufang<sup>1,2</sup>

(1. College of Environment and Resources, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China; 2. State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

**Abstract:** [Objective] The objective is to investigate the characteristics and biodiversity of endophytic diazotrophs in three bamboo species and in planting soil of root zones. [Method] Samples of leaves, roots and planting soil from *Phyllostachys edulis*, *Bambusa multiplex* and *Pleioblastus chino* were taken as the objects. The primers of *nifH* nitrogen fixation gene were designed. PCR-DGGE and random cloning technology were used to construct phylogenetic tree by cluster analysis and Shannon diversity index analysis. [Result] There were significant differences in community structure of diazotrophs among soils, between roots and leaves of the same bamboo species, between the same organs of different bamboo species, and between the soils of root zones and plants. The similarity of the same bamboo leaf or root was not high. More endophytic diazotrophs

收稿日期: 2020-10-10; 修回日期: 2021-06-24

基金项目: 浙江省自然科学基金重点资助项目 (LZ16C160002); 国家自然科学基金资助项目 (31570602)

作者简介: 冯歌林 (ORCID: 0000-0002-3069-0810), 从事农业资源与环境研究。E-mail: 492644070@qq.com。通信作者: 徐秋芳 (ORCID: 0000-0002-0959-8577), 教授, 博士, 博士生导师, 从事土壤与植物微生物研究。E-mail: xuqiufang@zafu.edu.cn

were detected in roots than in corresponding leaves. The similarity between diazotrophs in soil and those in roots was higher than that between soil and leaves. Significant differences of diazotrophs among plant species and plant tissues were observed by Shannon diversity index. The Shannon diversity index in leaf (2.73) and soil (2.70) of *B. multiplex* was higher than that in root (2.53) ( $P < 0.05$ ), and that in roots of *P. chino* and *Ph. edulis* was higher than that in leaf and soil ( $P < 0.05$ ). 83 strains of diazotrophs were obtained by random cloning and sequencing of plant samples, and only 12 strains were culturable, belonging to *Bradyrhizobium*, *Dechlorosoma*, *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Kosakonia*, *Gammaproteobacteria*, *Rubrivivax* and *Azohydromonas*. The sequences of phylogenetic tree indicated that the endophytic diazotrophs in the three bamboo species differed greatly from those in other plants. [Conclusion] The structural characteristics and diversity of diazotrophs in bamboo are affected by soil properties, species and plant tissues. The diversity of endophytic diazotrophs in roots is significantly higher than that in leaves, and the corresponding taxa are distinct from those of Gramineae reported previously. [Ch, 4 fig. 4 tab. 30 ref.]

**Key words:** bamboo; endophytic diazotroph; PCR-DGGE; cluster analysis; Shannon diversity index; random cloning; phylogenetic tree

植物内生固氮菌是指定殖在健康植物体内、与宿主植物进行联合固氮活动的一类原核微生物，是植物微生物生态系统的天然组分<sup>[1]</sup>。研究发现<sup>[2]</sup>：因为存在固氮菌，某些亚热带地区稻田可以连续百年不施氮肥而土壤氮水平不下降。固氮微生物一般分为3类：自生固氮菌、与植物共生固氮的微生物、与植物联合固氮的微生物。共生固氮微生物常见于豆科 Leguminosae 植物中<sup>[3]</sup>，其固氮机制、菌肥开发等研究已相当成熟。联合固氮微生物最早由 DÖBEREINER<sup>[4]</sup> 从热带禾本科 Gramineae 牧草雀稗 *Paspalum thunbergii* 根际中分离获得，这种被命名为雀稗固氮菌 *Azotobacter paspali* 的微生物被认为是存在于根际的自由生活的固氮菌。它们可以部分入侵植物表层组织，依靠根系分泌物生存繁殖，不与宿主形成特异分化结构，因而固氮能力不及共生固氮菌，但这类固氮菌与植物关系密切。BARRAQUIO 等<sup>[5]</sup> 通过建立有效的水稻 *Oryza sativa* 内生固氮菌分离方法，测得水稻内生固氮菌数量为  $10^5 \sim 10^8$  CFU·g<sup>-1</sup>；袁梅等<sup>[6]</sup> 从湖南桂阳农田水稻分离出 19 株内生固氮菌，其中 13 株可抑制水稻苗期对镉的吸收；谭志远等<sup>[7]</sup> 从青香茅 *Cymbopogon caesius* 与五节芒 *Miscanthus floridulus* 中分离出 66 株内生固氮菌共 10 个类群；BALDANI 等<sup>[8]</sup> 发现玉米 *Zea mays* 茎内存在内生固氮菌肺炎克雷伯氏菌 *Klebsiella pneumoniae*，后者具有促进植物生长的作用。作为同属禾本科的木本植物，竹子内生固氮菌的报道较少。竹子是喜氮植物，对氮素要求较高；调查发现许多自然竹林没有氮肥补充但生长良好，提示竹子可能存在某种固氮菌，且后者具有较强的固氮潜能。顾小平等<sup>[9]</sup> 从浙江淡竹 *Phyllostachys glauca* 根际分离到 3 株活性较高的固氮菌，从毛竹 *Phyllostachys edulis* 根表面分离到 36 株固氮菌，分别为多黏芽孢杆菌 *Bacillus polymyxa* 和地衣芽孢杆菌 *Bacillus lincheniformis*<sup>[10]</sup>；侯伟等<sup>[11]</sup> 从籐竹 *Bambusa blumeana* 中分离到 40 株高效固氮酶活性菌株，分别属固氮螺菌属 *Azospirillum*、大肠埃希氏菌属 *Escherichias*、绿脓杆菌属 *Pseudomonas* 和水螺旋菌属 *Aquaspirillum*；同时从籐竹<sup>[12]</sup> 中分离到 5 株内生固氮菌，具有活性高、生长强势、可以通过自身代谢作用来适应环境酸碱变化等特征。目前，国内关于竹子内生固氮菌的研究甚少。本研究以毛竹（散生）、孝顺竹 *Bambusa multiplex*（丛生）和狭叶青苦竹 *Pleioblastus chino*（混生）为研究对象，利用分子生物技术研究不同生长型竹子根部及叶部的内生固氮菌、定殖土壤固氮菌的多样性和结构特征，探究不同竹种和不同器官间内生固氮菌多样性，探讨植株与定殖土壤内固氮菌多样性的关系，为竹子培育管理提供指导，也为开发有潜力的高效固氮菌，减少化学氮肥施用量、解决因化肥使用过度所造成的环境污染问题提供参考。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 样品采集

狭叶青苦竹、孝顺竹栽植于浙江农林大学竹种园内，毛竹栽植于浙江农林大学后山。所有林相均为

纯林, 所有土壤均为红黄壤。采集竹叶、细根及不同竹种根部定植土壤。被选植株要求生长力旺盛, 远离边缘地带, 未受到病虫害感染。每种竹子选取 3 株间隔约 15 m 的不同植株作为重复。土壤样品采自所选竹子根周, 深度为 0~30 cm。所有样品放入 4 °C 冰箱保存备用。

## 1.2 土壤基本化学性质测定

经风干、磨细、过筛后, 测定土样土壤化学性质。具体参考鲍士旦<sup>[13]</sup>的方法, 测定土壤含水量、pH、有机质、有效氮、速效磷、速效钾等指标。由表 1 可知: 3 种竹子定植土壤的 pH、有机质、有效氮、速效钾、速效磷等指标均未表现出显著性差异 ( $P>0.05$ ), 说明土壤样品的化学性质差异不影响固氮菌种类。

表 1 3 种土壤的基本化学性质

Table 1 Basic chemical properties of three soil

种类	pH	有机质/(g·kg <sup>-1</sup> )	有效氮/(mg·kg <sup>-1</sup> )	速效磷/(mg·kg <sup>-1</sup> )	速效钾/(mg·kg <sup>-1</sup> )
毛竹	4.32±0.24 a	33.01±7.04 a	58.20±16.46 a	5.40±0.85 a	79.00±8.80 a
孝顺竹	4.64±0.27 a	36.85±10.81 a	66.14±14.46 a	4.99±0.61 a	69.33±17.02 a
狭叶青苦竹	4.72±0.54 a	37.67±9.16 a	57.34±15.63 a	4.65±0.94 a	70.67±4.50 a

说明: 同列相同字母表示差异不显著( $P>0.05$ )

## 1.3 竹子内生微生物 DNA 提取

竹子叶与根的预处理参考谭致远等<sup>[7]</sup>方法。叶与根灭菌消毒后, 剪碎放入无菌研钵。用液氮充分研磨破碎植物样品, 参考高志民等<sup>[14]</sup>改良后的 CTAB 法提取植物内生微生物 DNA, -40 °C 冰箱保存备用。

## 1.4 土壤微生物 DNA 提取

土壤样品过 20 目筛, 按 Mobio 土壤微生物 DNA 试剂盒 (Powersoil kit, 美国) 提取土壤微生物 DNA。

## 1.5 固氮酶 *nifH* 基因扩增

固氮酶 *nifH* 基因采用聚合酶链式反应方法 (PCR) 扩增。第 1 轮正向引物 FGPH19: 5'-TACGGCAARGGTGGNATHG-3', 反向引物 polR: 5'-ATSGCATCATYTCRCCGGA-3'; 第 2 轮正向引物 AQER: 5'-GACGATGTAGATYTCCTG-3', 反向引物 polF-GC: 5'-TGCGAYCCSAARGCGBACTC-3'。扩增程序参考 DIALLO 等<sup>[15]</sup>。

## 1.6 固氮酶 *nifH* 基因的变性梯度凝胶电泳 (DGGE)

使用 DCode™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad, 美国) 对 PCR 产物进行变性梯度凝胶电泳, 用 GelDoc™ EQ 凝胶成像系统 (Bio-Rad, 美国) 拍照保存。

## 1.7 固氮酶 *nifH* 基因的随机克隆

用 polF(不含 GC) 与 AQER 引物扩增各竹种叶部、根部 DNA, PCR 产物用纯化试剂盒 (Takara) 纯化后与 pEASY-T3 Vector(全金式生物技术公司, 中国, 北京) 连接, 转化到 Trans1-T1 感受态细胞中, 涂在含有 X-Gal、IPTG、氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上进行蓝白斑筛选, 用菌落 PCR 方法检测阳性克隆子。阳性克隆菌液送上海生工生物技术公司进行测序, 序列通过 NCBI 进行 Blast 比对分析, 获取相近典型菌株序列<sup>[16]</sup>。

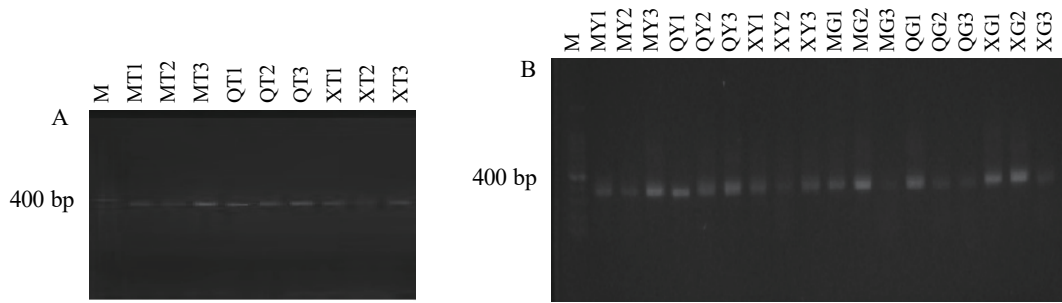
## 1.8 数据分析

利用 Quantity one 软件对 DGGE 电泳图进行指纹图谱分析, 根据条带对比结果, 通过未加权算术平均法进行聚类分析; 计算 Shannon 多样性指数, 使用 SPSS 软件进行单因素方差分析与两两比较 (Duncan 法); 使用 Mega 5.0, 采用邻接法进行系统发育树分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同来源固氮菌 PCR 产物

对土壤微生物、植物内生微生物 DNA 分别进行 2 轮巢氏 PCR, 获得土壤和植物固氮菌的 *nifH* 基因。由图 1A 和图 1B 可见: 400~500 bp 出现了一系列较为明亮的条带, 即为目标 *nifH* 基因。



M. Marker; MT. 毛竹土壤; QT. 狭叶苦青竹土壤; XT. 孝顺竹土壤; MY. 毛竹叶; QY. 狭叶青苦竹叶; XY. 孝顺竹叶; MG. 毛竹根; QG. 狭叶青苦竹根; XG. 孝顺竹根。1~3表示同个样品的不同重复

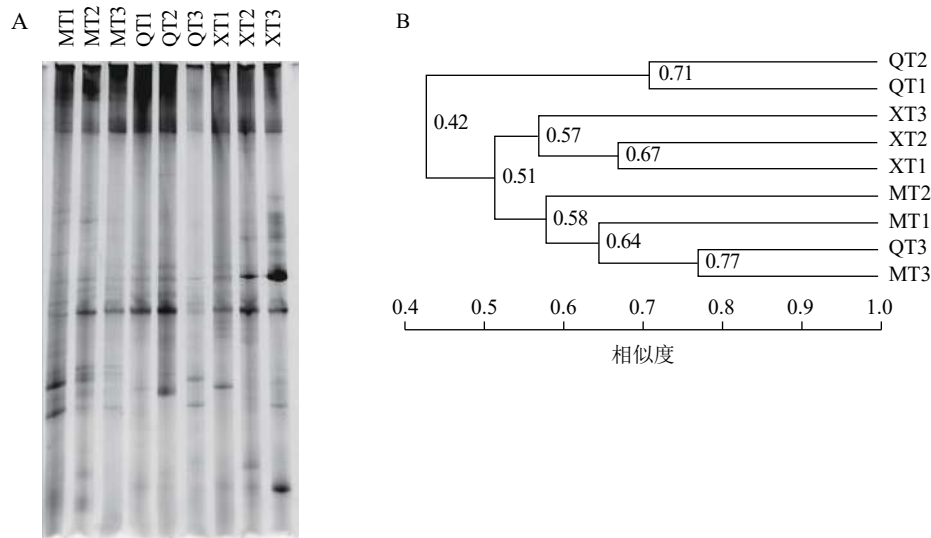
图1 土壤固氮菌(A)与植物固氮菌(B)*nifH*基因扩增

Figure 1 *nifH* gene's PCR products of soil azotobacteria (A) and plant endophytic diazotrophs (B)

### 2.2 土壤固氮菌 DGGE 分析

DGGE 图谱中, 条带数量代表样品所含固氮菌种类、多样性的丰富程度, 条带粗细代表该种菌的生物量的大小(图 2A)。使用 Quantity one 软件识别 DGGE 图中条带信息, 以毛竹土壤 3 号为基准进行相似度分析, 共识别出 17 个条带, 且不同土壤样品之间出现一定数量的共有条带。这表明不同竹子定植的土壤存在着一定数量相同种类的固氮菌。

聚类分析中各样品之间的分支点数值代表植物内生固氮微生物之间亲缘关系的远近, 数值越大越相似。由图 2B 可知: 不同竹种之间、同一竹种重复样品间土壤固氮菌相似度不高。一般认为相似度达到 0.60 及以上时说明群体间相似性好<sup>[17]</sup>。本研究中孝顺竹 3 个土壤样品重复聚在一起, 但整体相似度也仅为 0.57, 说明土壤中固氮菌群落的变异性较大。对于土壤微生物而言, 复杂的物质组成和空间结构导致微生物的变异性增加。虽然 3 种土壤的理化性质没有显著差异(表 1), 但土壤的固氮菌仍然存在较大差异。



MT. 毛竹土壤; XT. 孝顺竹土壤; QT. 狭叶青苦竹土壤。1~3表示同个样品的不同重复

图2 土壤固氮菌 *nifH* 基因片段 DGGE 指纹图谱(A)与聚类分析树(B)

Figure 2 The *nifH* gene DGGE fingerprint(A) and clustering analysis tree (B) of soil azotobacteria

### 2.3 竹子根部与叶部内生固氮菌 DGGE 分析

不同竹种、不同器官的内生固氮菌 *nifH* 基因 DGGE 指纹图谱如图 3A 所示。以毛竹土壤 3 号为参照, 毛竹叶与根、狭叶青苦竹叶、孝顺竹叶与根等 9 个样品出现了明亮且粗大的条带, 这些条带丰度较大, 为优势固氮菌种。研究发现<sup>[18]</sup>: 不同菌在组织内占有不同生态位, 它们相互作用建立一种生态平衡, 分离频率高的为植物体内数量大的优势种群, 相反则为稀有种群。图 3 中, 竹根的条带数明显多于

竹叶, 说明根部内生固氮菌种类多于叶部。刘丽辉等<sup>[19]</sup>发现普通野生稻 *Oryza rufipogon* 内生固氮菌在水稻根部分布最多, 茎叶中偏少, 呈自下而上逐级递减规律, 与本研究一致。且竹根部内生固氮菌种类远多于土壤, 说明竹子根部固氮菌不仅来源于土壤, 还通过其他途径进入植株, 如 KLUEPFEL 等<sup>[20]</sup>认为细菌是通过植物自然开口(水孔、气孔、皮孔和蜜腺等)和伤口(根磨损、动物摄食及收割多年植物等)进入植物体内的。

聚类分析结果(图 3B)表明: 不同植物样品整体相似度不高, 但大部分叶与根样品明显区分, 竹子叶与根分别聚在不同组, 表明竹子器官差异是影响内生固氮定殖的重要因素。毛竹土壤样品(MT3)和根部样品聚集, 但相似值仅有 0.48, 进一步说明了植株内生固氮菌仅有部分通过土壤进入, 且大多定殖在根部, 少部分扩散到叶部。以相似度大于 0.60 为群体间相似性很好的标准判断<sup>[17]</sup>, 同一品种同部位重复样品间的相似度均不高, 除狭叶苦青竹 1 号与狭叶苦青竹 2 相似值达 0.77 外, 其他样品 3 个重复都未能聚集, 说明内生固氮菌种类与植物种类关系不大, 遗传因子没有起到决定性作用。植物内生固氮菌的捕获具有一定的偶然性。

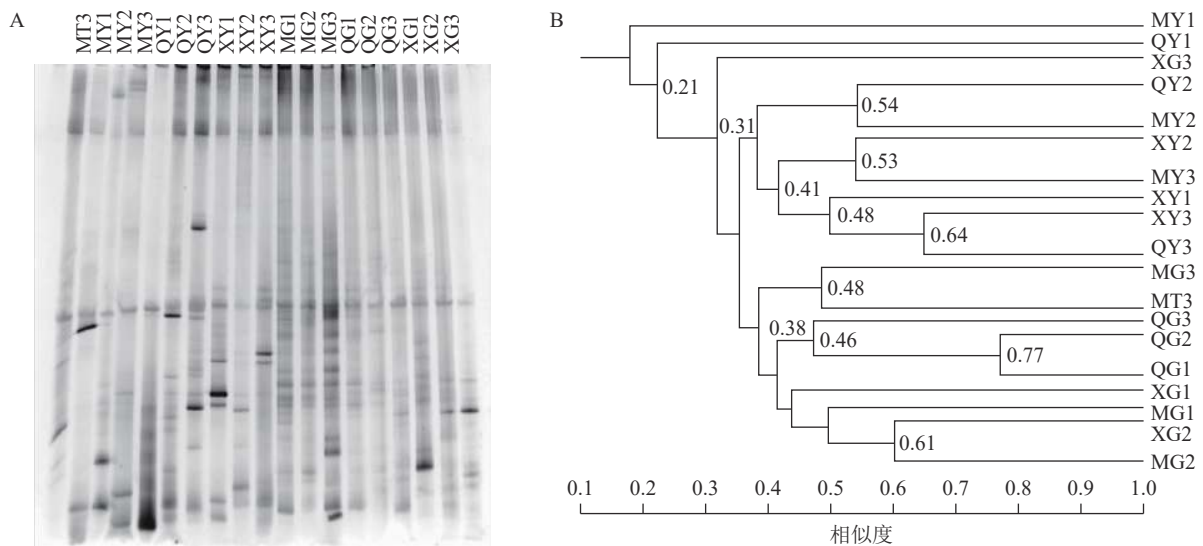


图 3 竹子叶与根内生固氮菌 *nifH* 基因 DGGE 指纹图谱 (A) 与聚类分析树 (B)  
 MT3. 毛竹土壤 3 号样品; MY. 毛竹叶; QY. 狭叶青苦竹叶; XY. 孝顺竹叶; MG. 毛竹根; QG. 狭叶青苦竹根; XG. 孝顺竹根。1~3 表示同个样品的不同重复

图 3 竹子叶与根内生固氮菌 *nifH* 基因 DGGE 指纹图谱 (A) 与聚类分析树 (B)

Figure 3 DGGE fingerprint of *nifH* gene endophytic diazotroph(A) and clustering analysis tree (B) in bamboo's leaves and roots

## 2.4 不同来源固氮菌 Shannon 多样性指数分析

以指纹图谱信息为依据计算各个样品的 Shannon 多样性指数可以评价群落多样性。如表 2 所示: 狭叶青苦竹根部内生固氮菌多样性最为丰富, 显著高于叶部与土壤 ( $P < 0.05$ )。毛竹固氮菌多样性依次为根部 (2.98)、土壤 (2.75)、叶部 (2.30), 毛竹根部和土壤间无显著差异, 但两者显著大于毛竹叶部 ( $P < 0.05$ ), 说明土壤固氮菌与根部内生固氮菌多样性都比叶部要丰富。孝顺竹叶部、根部内生固氮菌、土壤固氮菌间多样性差异不显著 ( $P > 0.05$ )。不同竹种不同部位固氮菌多样性不同, 狭叶青苦竹和毛竹以叶部最低, 孝顺竹叶部最高, 这可能与竹子的生长繁殖方法有关; 孝顺竹为丛生竹, 竹子在某一个固定位置生长更新, 根部和土壤中的固氮菌容易进入叶子; 毛竹为散生竹, 狭叶青苦竹虽然是混合型竹子, 但以散生的居多, 随着地下鞭的延伸更新, 这些竹子不断改变着生地点, 其本身的固氮菌可能也少, 通过地下鞭和地上部分的通道到达叶子中的固氮菌便更少。

对不同竹种相同部位内生菌多样性分析发现: 孝顺竹叶部内生菌多样性显著高于狭叶青苦竹和毛竹

表 2 不同来源固氮菌 Shannon 多样性分析

Table 2 Shannon indexes of the three bamboos' leaves, roots and soil

种类	叶部	根部	土壤
狭叶青苦竹	2.43±0.30 Bb	2.89±0.12 ABa	2.36±0.09 Bb
毛竹	2.30±0.28 Bb	2.98±0.19 Aa	2.75±0.17 Aa
孝顺竹	2.73±0.10 Aa	2.53±0.26 Ba	2.70±0.15 Aa

说明: 大写字母表示同列间差异显著 ( $P < 0.05$ ), 小写字母表示同行间差异显著 ( $P < 0.05$ )

( $P < 0.05$ ), 根部则显著低于狭叶青苦竹和毛竹 ( $P < 0.05$ ); 毛竹和孝顺竹土壤固氮菌多样性显著高于狭叶青苦竹 ( $P < 0.05$ ); 说明对于毛竹与狭叶青苦竹而言, 固氮菌群落更偏爱在根部定殖, 对于孝顺竹而言, 固氮菌群落更喜爱在叶内定殖。

## 2.5 竹子根部与叶部内生固氮菌的随机克隆

对不同竹种根部/叶部的内生固氮菌 DNA 作随机克隆并测序 (表 3), 在培养基上共得到 484 个蓝色斑点, 经验阳后送测 121 个, 序列经 BLAST 数据库对比, 得到 83 株菌株, 其中 12 株为可培养固氮菌, 归属于 8 种菌属, 其余 71 株为不可培养固氮菌 (来源于毛竹叶 8 株, 毛竹根 14 株, 孝顺竹叶 7 株, 孝顺竹根 14 株, 狭叶青苦竹叶 8 株, 狭叶青苦竹竹根 20 株), 尚未被命名, 不可培养的比例高达 86%; 推测原因可能是不可培养固氮菌在竹子内生固氮菌中处于优势地位, 也可能是竹子中某些可培养的内生固氮菌尚未在其他植物中被分离鉴定, 这也进一步说明了该类固氮菌的特殊性。12 株可培养的固氮菌大部分为根组织内生菌 (表 4), 除 *Immundisolibacter* 和红长命菌属 *Rubrivivax* 外, 均已报道具有固氮基因<sup>[19, 21-28]</sup>。8 个菌属中, 慢生根瘤菌属 *Bradyrhizobium* 出现频率最高, 一般是从大豆 *Glycine max* 根部分离得到, 如 XU 等<sup>[21]</sup> 从大豆和野大豆 *Glycine soja* 根瘤中分离出了与大豆结瘤的超慢生辽宁大豆根瘤菌 *Bradyrhizobium liaoningense*。固氮螺菌属 *Azospirillum* 具有明显的固氮功能, 在植物根、茎、叶中广泛存在<sup>[19]</sup>; 此外, 翟超男<sup>[22]</sup>, 周建娇<sup>[23]</sup> 分别从海滨雀稗 *Paspalum vaginatum* 和白菜 *Brassica pekinensis* 根发现具有固氮功能的肠杆菌 *Enterobacter* sp.; 李洁琼等<sup>[24]</sup> 从玉米根际中分离出具有促生作用的 *Kosakonia radicincitans* strain YD4 同样具有固氮功能, 而 *Kosakonia* 是从肠杆菌属 *Enterobacter* 中分离出来的新属。TAN 等<sup>[25]</sup> 通过南方杂交法与乙炔还原法发现 *Dechlorosoma suillum* 中具有 *nifH* 基因; 唐

表 3 基于 *nifH* 序列的不可培养固氮菌分布情况 (相似度 98% 以上)

Table 3 Distribution of unculturable bacteria based on *nifH* gene (The similarity is more than 98%)

样品来源	相似菌株基因
毛竹叶	HP-46 nitrogenase ( <i>nifH</i> ) gene、HP-76 nitrogenase ( <i>nifH</i> ) gene、 <i>nifH</i> gene for nitrogenase iron protein、nitrogen-fixing bacterium clone b1-HA3-1 nitrogenase iron protein ( <i>nifH</i> ) gene、isolate DGGE gel band 5 nitrogenase iron protein ( <i>nifH</i> ) gene、J19I(16) nitrogenase ( <i>nifH</i> ) gene、HP-12 nitrogenase ( <i>nifH</i> ) gene、TNO_elv_99f12 dinitrogenase reductase ( <i>nifH</i> ) gene
毛竹根	<i>nifH</i> gene for nitrogenase iron protein、HP-27 nitrogenase ( <i>nifH</i> ) gene、HP-84 nitrogenase ( <i>nifH</i> ) gene、HP-84 nitrogenase ( <i>nifH</i> ) gene、CI(12) nitrogenase ( <i>nifH</i> ) gene、HP-14 nitrogenase ( <i>nifH</i> ) gene、TII(5) nitrogenase ( <i>nifH</i> ) gene、HP-48 nitrogenase ( <i>nifH</i> ) gene、HP-75 nitrogenase ( <i>nifH</i> ) gene、J19I(12) nitrogenase ( <i>nifH</i> ) gene、TNO_elv_81h1 dinitrogenase reductase ( <i>nifH</i> ) gene、TNO_elv_81h1 dinitrogenase reductase ( <i>nifH</i> ) gene、HP-46 nitrogenase ( <i>nifH</i> ) gene、HP-75 nitrogenase ( <i>nifH</i> ) gene
孝顺竹叶	HP-215 nitrogenase ( <i>nifH</i> ) gene、HP-5 nitrogenase ( <i>nifH</i> ) gene、HP-218 nitrogenase ( <i>nifH</i> ) gene、CY1-01 nitrogenase iron protein ( <i>nifH</i> ) gene、HP-56 nitrogenase ( <i>nifH</i> ) gene、HP-226 nitrogenase ( <i>nifH</i> ) gene、HP-157 nitrogenase ( <i>nifH</i> ) gene
孝顺竹根	isolate DGGE gel band 18 nitrogenase iron protein ( <i>nifH</i> ) gene、isolate DGGE gel band 12 nitrogenase iron protein ( <i>nifH</i> ) gene、HP-226 nitrogenase ( <i>nifH</i> ) gene、partial <i>nifH</i> gene for dinitrogenase reductase、HP-90 nitrogenase ( <i>nifH</i> ) gene、partial <i>nifH</i> gene for dinitrogenase reductase、HP-237 nitrogenase ( <i>nifH</i> ) gene、HP-246 nitrogenase ( <i>nifH</i> ) gene、HP-246 nitrogenase ( <i>nifH</i> ) gene、HP-51 nitrogenase ( <i>nifH</i> ) gene、C13L7NH26 dinitrogenase reductase ( <i>nifH</i> ) gene、isolate DGGE gel band 20 nitrogenase iron protein ( <i>nifH</i> ) gene、b1-HA3-1 nitrogenase iron protein ( <i>nifH</i> ) gene、431 nitrogenase iron protein ( <i>nifH</i> ) gene
狭叶青苦竹叶	TC30 <i>NifH</i> ( <i>nifH</i> ) gene、C12L6CK9 dinitrogenase reductase ( <i>nifH</i> ) gene、C13L6NH2 dinitrogenase reductase ( <i>nifH</i> ) gene、C12L7NH35 dinitrogenase reductase ( <i>nifH</i> ) gene、 <i>nifH</i> gene for nitrogenase iron protein (partial cds)、C13L10NH15 dinitrogenase reductase ( <i>nifH</i> ) gene、C13L8CK17 dinitrogenase reductase ( <i>nifH</i> ) gene、HP-75 nitrogenase ( <i>nifH</i> ) gene
狭叶青苦竹根	isolate DGGE gel band 14 nitrogenase iron protein ( <i>nifH</i> ) gene、Rb3_ <i>NifH</i> _48 nitrogenase gene、C12L8CK4 dinitrogenase reductase ( <i>nifH</i> ) gene、WK-A5 nitrogenase iron protein ( <i>nifH</i> ) gene、486 nitrogenase iron protein ( <i>nifH</i> ) gene、C13L8NL22 dinitrogenase reductase ( <i>nifH</i> ) gene、C13L6CK40 dinitrogenase reductase ( <i>nifH</i> ) gene、99 nitrogenase iron protein ( <i>nifH</i> ) gene、HP-201 nitrogenase ( <i>nifH</i> ) gene、HP-2 nitrogenase ( <i>nifH</i> ) gene、243 nitrogenase iron protein ( <i>nifH</i> ) gene、C12L10NL20 dinitrogenase reductase ( <i>nifH</i> ) gene、C13L10NL22 dinitrogenase reductase ( <i>nifH</i> ) gene、isolate DGGE gel band 11 nitrogenase iron protein ( <i>nifH</i> ) gene、C12L7CK25 dinitrogenase reductase ( <i>nifH</i> ) gene、HP-159 nitrogenase ( <i>nifH</i> ) gene、HP-215 nitrogenase ( <i>nifH</i> ) gene、HP-90 nitrogenase ( <i>nifH</i> ) gene、C12L7NH35 dinitrogenase reductase ( <i>nifH</i> ) gene、b1-HA3-1 nitrogenase iron protein ( <i>nifH</i> ) gene

表 4 基于 *nifH* 序列的可培养固氮菌分布情况

Table 4 Distribution of culturable bacteria of <i>nifH</i> gene			
类群	样品来源	NCBI中最相近菌种(登录号)	序列相似性/%
慢生根瘤菌属 <i>Bradyrhizobium</i>	MG38	<i>Bradyrhizobium</i> sp.(KC356360.1)	98
	QG11	<i>Bradyrhizobium</i> sp.(AB079616.1)	99
	QG255	<i>Bradyrhizobium</i> sp.(LT859959.1)	99
	XG32	<i>Bradyrhizobium</i> sp.(CU234118.1)	99
<i>Dechlorosoma</i>	MG31	<i>Dechlorosoma suillum</i> (CP003153.1)	98
固氮螺菌属 <i>Azospirillum</i>	XG434	<i>Azospirillum canadense</i> strain(GU256446.1)	99
肠杆菌属 <i>Enterobacter</i>	XY47	<i>Enterobacter</i> sp.(KC989924.1)	99
<i>Kosakonia</i>	MG6	<i>Kosakonia sacchari</i> strain(KR075981.1)	99
	XG52	<i>Kosakonia sacchari</i> strain(KR075959.1)	99
变形杆菌属 <i>Gammaproteobacteria</i>	XG255	<i>Immundisolibacter cernigliae</i> strain (CP014671.1)	99
红长菌属 <i>Rubrivivax</i>	MG16	<i>Rubrivivax gelatinosus</i> strain(KF800058.1)	98
<i>Azohydromonas</i>	XG66	<i>Azohydromonas australica</i> (AB188121.1)	100

凯等<sup>[26]</sup>在研究浑善达克沙地苔藓 *Bryophyta* 结皮下层土壤细菌时发现 *Azohydromonas* 具有固氮功能。红长命菌可以氨为氮源,是目前发现的唯一能分泌蛋白酶的光合细菌<sup>[27]</sup>, *Immundisolibacter* 是变形杆菌的一种新细菌,具有降解多环芳香烃的功能<sup>[28]</sup>。本研究从毛竹根部和孝顺竹根部鉴定出的红长命菌和 *Immundisolibacter* 中存在固氮基因,推测此 2 种菌很可能是具有固氮能力的新种。

孙建光等<sup>[29]</sup>从小麦 *Triticum aestivum*、水稻、白菜、玉米、芹菜 *Apium* sp.等 5 种农作物中分离到 25 个属的内生固氮菌。本研究选取伯克霍尔德里氏菌 *Burkholderia* sp. strain STM678、假单胞菌 *Pseudomonas corrugata*、芽孢杆菌 *Bacillus aryabhattai* strain B8W22 和克雷伯氏菌 *Klebsiella variicola* 等 4 个优势种作为参照,与 3 种竹子中筛选出的克隆序列构建系统发育树。由图 4 可见,除 1 株来源于狭叶青苦竹的菌株(不可培养)与伯克霍尔德里氏菌聚在一起外,其他菌株均远离参照菌株。具体来看,慢生根瘤菌属位于发育树中部位置,红长命菌属、*Kosakonia*、肠杆菌属、脱氮菌属 *Dechlorosoma*、固氮螺菌属亲缘关系接近, *Immundisolibacter cernigliae* 位于发育树的偏顶端位置,亲缘关系远离以上 5 个属。牛艳芳<sup>[30]</sup>对内蒙古植被主要建群植物的根际固氮菌进行分离时发现:6 个地区的固氮菌类群存在显著差异,有些固氮菌分布具有区域性。推测这种大区域环境差异造成的固氮菌类群差异,可能也是竹子内生固氮菌与其他作物内生固氮菌存在较大区别的原因。

### 3 结论

不同竹种定植的土壤中存在一定数量的同种固氮菌,但整体区系的相似度不高。同一竹种不同器官(根与叶)之间、不同竹种相同器官之间、土壤与植物之间的固氮菌群落结构差异显著;同种竹叶部或根部的重复样品相似度均不高。3 种竹子根部内生固氮菌种类总体显著多于叶部,土壤固氮菌群落结构与根部内生固氮菌相似度高于叶部;不同竹种、不同器官之间固氮菌群落 Shannon 多样性指数差异显著,孝顺竹叶部与土壤大于根部,狭叶青苦竹和毛竹根部大于叶部和土壤。植物样品随机克隆测序 BLAST 对比得到 83 株固氮菌,其中 12 株为可培养固氮菌株,分别属于慢生根瘤菌属、*Dechlorosoma*、固氮螺菌属、肠杆菌属、*Kosakonia*、变形杆菌属、红长菌属、*Azohydromonas* 等 8 个属,与已报道对竹子内生固氮菌研究相比,仅与侯伟等<sup>[12]</sup>从箬竹中分离得到了相同的固氮螺菌,但未发现其他相同种属。系统发育树结果表明 3 种竹子内生固氮菌显著不同于其他植物中分离得到的内生固氮菌。

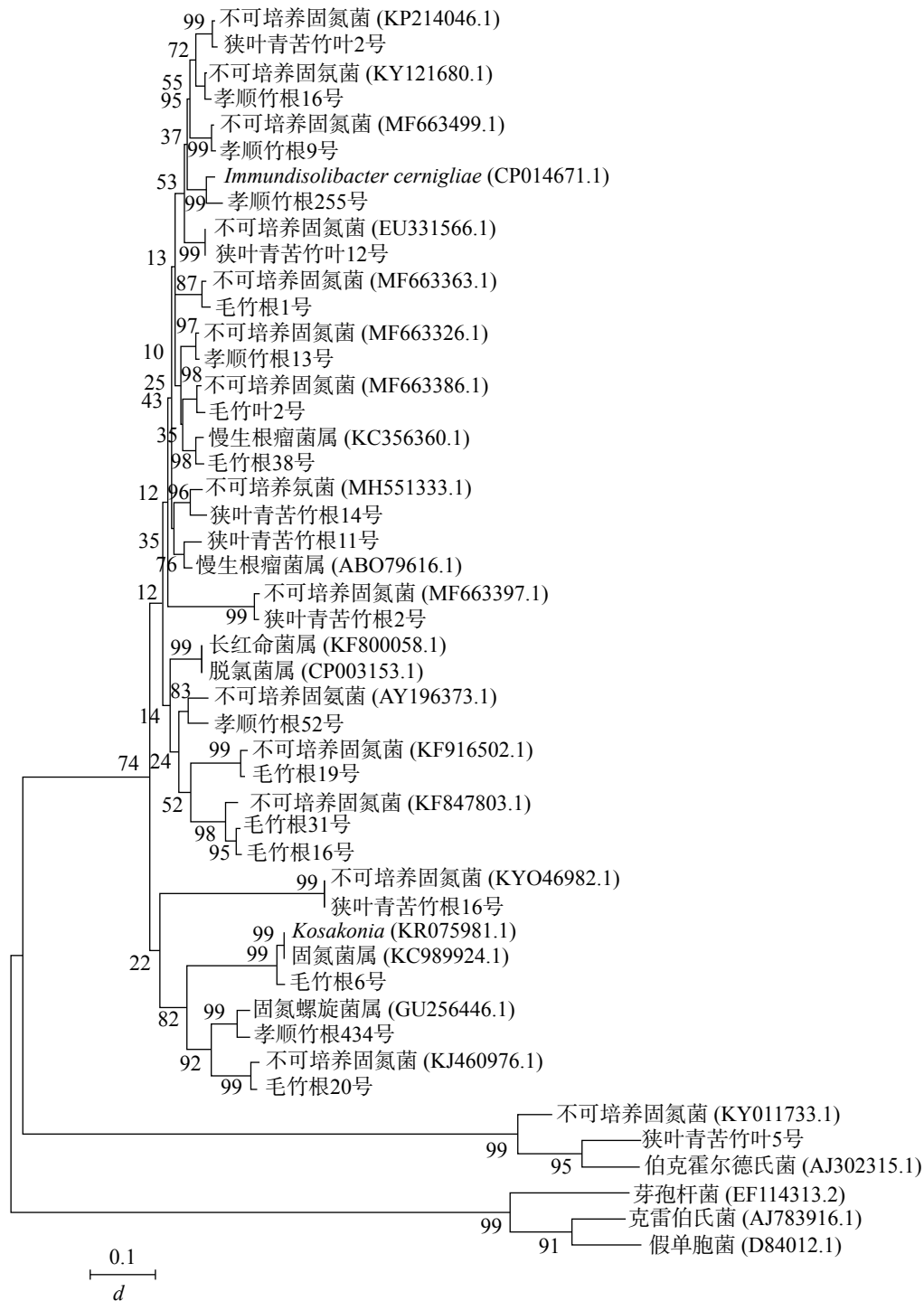


图4 邻接法构建的内生固氮菌序列系统发育树

Figure 4 System phylogenetic tree of endophytic diazotrophs by using neighbor-joining method

## 4 参考文献

- [1] 王志伟, 纪燕玲, 陈永敢. 植物内生菌研究及其科学意义[J]. 微生物学通报, 2015, 42(2): 349 - 363.  
WANG Zhiwei, JI Yanling, CHEN Yonggan. Studies and biological significances of plant endophytes [J]. *Microbiol China*, 2015, 42(2): 349 - 363.
- [2] PITTOL M, DURSO L, VALIATI V H, *et al.* Agronomic and environmental aspects of diazotrophic bacteria in rice fields [J]. *Ann Microbiol*, 2016, 66(2): 511 - 527.
- [3] 罗明, 卢云. 植物内生固氮菌研究进展[J]. 微生物学杂志, 2005, 25(1): 82 - 88.  
LUO Ming, LU Yun. Advance in endophytic diazotrophs [J]. *J Microbiol*, 2005, 25(1): 82 - 88.



- [4] DÖBEREINER J. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: endophytic N<sub>2</sub> fixing bacteria [J]. *Ciencia E Cult*, 1992, **44**(5): 310 – 313.
- [5] BARRAQUIO W L, REVILLA L, LADHA J K. Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice [J]. *Plant Soil*, 1997, **194**(1/2): 15 – 24.
- [6] 袁梅, 谭适娟, 孙建光. 水稻内生固氮菌分离鉴定、生物特性及其对稻苗镉吸收的影响[J]. *中国农业科学*, 2016, **49**(19): 3754 – 3768.  
YUAN Mei, TAN Shijuan, SUN Jianguang. Isolation and biological properties of endophytic diazotrophs from rice and their influences on rice seeding Cd accumulation [J]. *Sci Agric Sin*, 2016, **49**(19): 3754 – 3768.
- [7] 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.  
TAN Zhiyuan, FU Qinmei, PENG Guixiang, *et al.* Identification and characterization of endophytic diazotrophs isolated from *Cymbopogon caesius* and *Miscanthus floridulus* [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2013, **19**(4): 643 – 649.
- [8] BALDANI J I, OLIVARES F L, HEMERLY A S, *et al.* Nitrogen-fixing endophytes: recent advances in the association with graminaceous plants grown in the tropics[C]//ELMERICH C, KONDOROSI W A, NEWTON E. *Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century*. Paris: Institut Pasteur, 1997.
- [9] 顾小平, 吴晓丽. 毛竹及浙江淡竹根际联合固氮的研究[J]. *林业科学研究*, 1994, **7**(4): 618 – 623.  
GU Xiaoping, WU Xiaoli. A study on associative nitrogen fixation of bamboo rhizosphere [J]. *For Res*, 1994, **7**(4): 618 – 623.
- [10] 顾小平, 吴晓丽. 毛竹根际分离的地衣芽孢杆菌固氮特性研究[J]. *竹子研究汇刊*, 1998, **17**(4): 59 – 63.  
GU Xiaoping, WU Xiaoli. Study on nitrogen fixation characteristics of several *Bacillus licheniformis* strains from *Phyllostachy pubescens* roots [J]. *J Baboom Res*, 1998, **17**(4): 59 – 63.
- [11] 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, **15**(2): 290 – 294.  
HOU Wei, PENG Guixiang, XU Zhijun, *et al.* Diversity of endophytic diazotrophs isolated from *Bambusa blumeana* in Guangdong Province [J]. *J Agric Biotechnol*, 2007, **15**(2): 290 – 294.
- [12] 侯伟, 彭桂香, 许志钧, 等. 广东箬竹内生固氮菌生理特性及促生效果研究[J]. *林业科学研究*, 2008, **21**(1): 101 – 105.  
HOU Wei, PENG Guixiang, XU Zhijun, *et al.* Growth promoting effects and physiological proper of endophytic diazotrophs isolated from Guangdong bamboo (*Bambusa blumeana*) [J]. *For Res*, 2008, **21**(1): 101 – 105.
- [13] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [14] 高志民, 范少辉, 高健, 等. 基于 CTAB 法提取毛竹基因组 DNA 的探讨[J]. *林业科学研究*, 2006, **19**(6): 725 – 728.  
GAO Zhimin, FAN Shaohui, GAO Jian, *et al.* Extract genomic DNA from *Phyllostachys edulis* by CTAB-based method [J]. *For Res*, 2006, **19**(6): 725 – 728.
- [15] DIALLO M D, WILLEMS A, VLOEMANS N, *et al.* Polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the N<sub>2</sub>-fixing bacterial diversity in soil under *Acacia tortilis* ssp. *raddiana* and *Balanites aegyptiaca* in the dryland part of Senegal [J]. *Environ Microbiol*, 2004, **6**(4): 400 – 415.
- [16] 何冬华, 陈俊辉, 徐秋芳, 等. 集约经营对毛竹林土壤固氮细菌群落结构和丰度的影响[J]. *应用生态学报*, 2015, **26**(10): 2961 – 2968.  
HE Donghua, CHEN Junhui, XU Qiufang, *et al.* Effects of intensive management on abundance and composition of soil N<sub>2</sub>-fixing bacteria in *Phyllostachys heterocyclus* stands [J]. *Chin J Appl Ecol*, 2015, **26**(10): 2961 – 2968.
- [17] 王奇赞, 徐秋芳, 姜培坤, 等. 天目山毛竹入侵阔叶林后土壤细菌群落 16s rDNA V3 区片段 PCR 的 DGGE 分析[J]. *土壤学报*, 2009, **46**(4): 662 – 669.  
WANG Qizhan, XU Qiufang, JIANG Peikun, *et al.* DGGE analysis of PCR of 16s rDNA V3 fragment of soil bacteria community in soil under natural broadleaf forest invaded by *Phyllostachy pubescens* in Tianmu Mountain Natural Reserve [J]. *Acta Pedol Sin*, 2009, **46**(4): 662 – 669.
- [18] FISHER P J, PETRINI O, SCOTT H M L. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.) [J]. *New Phytol*, 1992, **122**(2): 299 – 305.
- [19] 刘丽辉, 蒋慧敏, 王佩旋, 等. 野生稻内生固氮菌多样性研究进展[J]. *生物技术进展*, 2017, **7**(6): 567 – 579.  
LIU Lihui, JIANG Huimin, WANG Peixuan, *et al.* Research progress on diversity of endophytic diazotrophs in wild rices [J].

- Curr Biotechnol*, 2017, 7(6): 567 – 579.
- [20] KLUEPFEL D A. The behavior and tracking of bacteria in the rhizosphere [J]. *Ann Rev Phytopathol*, 1993, 31(1): 441 – 472.
- [21] XU L M, GE C, CUI Z, *et al.* *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 1995, 45(4): 706 – 711.
- [22] 翟超男. 内生固氮菌在海滨雀稗中的多样性和生理功能研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2016.  
ZHAI Chaonan. *Endophytic Diazotrophs Diversity and Physiological Function from Seashore Paspalum*[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2016.
- [23] 周建娇. 促生菌筛选及蔬菜内生固氮菌研究[D]. 北京: 中国农业科学研究院, 2013.  
ZHOU Jianjiao. *Screen for Plant Growth Promoting Bacteria and Investigations on Endophytic Nitrogen-fixers in Vegetables*[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2013.
- [24] 李琼洁, 程杰杰, 孙帅欣, 等. 玉米联合固氮菌 *Kosakonia radicincitans* GXGL-4A 的分离鉴定与固氮特性研究[J]. 微生物学通报, 2016, 43(11): 2456 – 2463.  
LI Qiongjie, CHEN Jiejie, SUN Shuaixin, *et al.* Isolation, identification and characterization of associative nitrogen-fixing endophytic bacterium *Kosakonia radicincitans* GXGL-4A in maize [J]. *Microbiol China*, 2016, 43(11): 2456 – 2463.
- [25] TAN Zhiyuan, REINHOLD-HUREK B. *Dechlorosoma suillum* Achenbach *et al.* 2001 is a later subjective synonym of *Azospira oryzae* Reinhold-Hurek and Hurek 2000 [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2003, 53(4): 1139 – 1142.
- [26] 唐凯, 高晓丹, 贾丽娟, 等. 浑善达克沙地生物土壤结皮及其下层土壤中固氮细菌群落结构和多样性[J]. 微生物学通报, 2018, 45(2): 293 – 301.  
TANG Kai, GAO Xiaodan, JIA Lijuan, *et al.* Community structure and diversity of diazotrophs in biological soil crusts and soil underneath crust of Hunshandake deserts [J]. *Microbiol China*, 2018, 45(2): 293 – 301.
- [27] 陶雪英. 光合细菌的分离鉴定及胶状红长命菌分泌的蛋白水解酶生化性质的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2010.  
TAO Xueying. *Isolation and Identification of Photosynthetic Bacteria and Preliminary Study of Proteinase Secreted from Rubrivivax gelatinosus* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2010.
- [28] CORTESELLI E M, AITKEN M D, SINGLETON D. Description of *Immundisolibacter cernigliae* gen. nov., sp. nov., a high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium within the class *Gammaproteobacteria*, and proposal of *Immundisolibacterales* ord. nov. and *Immundisolibacteraceae* fam. nov [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2017, 67(4): 925 – 931.
- [29] 孙建光, 罗琼, 高森, 等. 小麦、水稻、玉米、白菜、芹菜内生固氮菌及其系统发育[J]. 中国农业科学, 2012, 45(7): 1303 – 1317.  
SUN Jianguang, LUO Qiong, GAO Miao, *et al.* Isolation and phylogeny of nitrogen-fixing endophytic bacteria in wheat, rice, maize, Chinese cabbage and celery [J]. *Sci Agric Sin*, 2012, 45(7): 1303 – 1317.
- [30] 牛艳芳. 内蒙古森林植被主要建群树种根际固氮菌多样性及生物特性[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2017.  
NIU Yanfang. *Diversity and Biological Characteristics of Nitrogen Fixing Bacteria in Rhizosphere of Constructive Species of Forest Vegetation in Inner Mongolia*[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2017.