

## 四株红树林促生菌的遗传分析鉴定及其促生能力

陆俊钹<sup>1</sup>, 陈俊<sup>2</sup>, 康丽华<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 中国林业科学研究院热带林业研究所, 广州 510520)

(<sup>2</sup> 广州中山医医药有限公司, 广州 510600)

**摘要:**【目的】鉴定四株供试菌株的种属地位, 了解菌株所具有的促进植物生长能力。【方法】运用 *nifH* 与 16S rRNA 基因序列对供试菌株进行遗传分析, 采用钼锑抗比色法和乙炔还原法分别测定菌株的溶磷、固氮能力。通过接种试验验证菌株促进红树植物生长的能力。【结果】通过对菌株 *nifH* 与 16S rRNA 的同源性、系统发育树分析, HN011 与需钠弧菌 (*Vibrio natriegens*) 的相似性最高, SZ7-1、SZ7-2 与产酸克雷伯氏菌 (*Klebsiella oxytoca*) 的相似性最高。而 SZ002 在 16S rRNA 的系统发育分析中归属为类芽孢杆菌属 (*Paenibacillus* sp.), 却在 *nifH* 基因分析中与克雷伯氏菌 (*Klebsiella* sp.) 的相似性最高。供试菌株都具有较强的溶磷能力和高固氮酶活性。接种后植株有较好的生长表现, 部分接种植株在干重、全氮、全磷含量等方面较对照有显著地增加 ( $P < 0.05$ )。【结论】首次发现兼具溶磷-固氮两种能力的红树林植物促生菌, 接种试验也表现菌株具有良好的促生能力, 为红树林人工接种促生菌的应用提供了可靠的理论依据。

**关键词:** 红树林; 固氮; 溶磷; 植物促生菌

**中图分类号:** Q938      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2010) 10-1358-08

红树林是热带、亚热带兼具陆地性和海洋性特征的森林生态系统。在抗击台风海啸、净化海岸污水<sup>[1]</sup>、吸附重金属方面<sup>[2]</sup>, 红树林都起着不可替代的作用。其次, 红树林具备海洋动物栖息与觅食的理想生境, 也具有保护生物多样性方面的功能。随着人类活动的增多, 土地需求量日益增加, 使全球红树林面积锐减<sup>[3]</sup>。2004 年的印度洋海啸促使人类开始重视红树林的保护与恢复, 但红树植物造林低成活率和保存率一直是进行红树林保护和恢复的难题。

红树林生态系统中具有丰富的有机质, 但它却是一个缺乏营养的生态系统, 尤其缺乏植物生长所必需的氮与磷<sup>[4–6]</sup>。由于微生物(细菌、真菌)在红树林生态系统的营养转化、高效循环等方面起着重

要作用, 红树林也是最丰产的生态系统之一<sup>[7–8]</sup>。所以, 对红树林植物促生菌(Plant growth-promoting bacteria, PGPB)与红树林关系的研究显得尤为重要。有研究发现植物促生菌通过固氮、解磷作用为红树林提供了充足的氮源和磷源<sup>[4–6, 9]</sup>。Bashan 认为接种植物促生菌可成为人工恢复红树林的一种有潜力的手段<sup>[7]</sup>。

我国近年来有不少关于红树林微生物的报道<sup>[10–12]</sup>, 而对于红树林促生菌的促生能力研究相对较少。本文研究目的是: (1) 对实验室分离的红树林促生菌进行遗传分析, 探讨菌株的种属地位; (2) 了解菌株在溶磷、固氮方面的能力; (3) 检验供试菌株是否能有效地促进红树植物生长。

**基金项目:** 国家自然科学基项目“红树林 PGPR 与植物相互作用机理研究”(30671668)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-20-87029270; E-mail: sbliao@pub.guangzhou.gd.cn

**作者简介:** 陆俊钹 (1983–), 男, 广东广州人, 博士研究生, 森林培育专业。E-mail: lujunk@163.com

**收稿日期:** 2010-03-22; **修回日期:** 2010-04-28

# 1 材料和方法

## 1.1 材料

**1.1.1 菌株来源:**供试菌株为本实验室从红树植物木榄 (*Bruguiera gymnorhiza* (L.) Lamk)、秋茄 (*Kandelia candel* (L.) Druce) 根际分离的 4 株溶磷细菌。

**1.1.2 接种幼苗来源:**供试植物采集自海南东寨港红树林保护区,长度一致(约长 10 cm)的木榄胚轴。

**1.1.3 培养基:**细菌活化采用改良 SRSM 固体培养基<sup>[6]</sup>。固氮酶活性测定采用无氮蔗糖半固体培养基:g/L:蔗糖 20.0,磷酸氢二钠 10.4,磷酸二氢钾 3.4,琼脂粉 5.0;mg/L:柠檬酸铁 3.6,七水硫酸镁 30.0,二水氯化钙 6.0,硫酸锰 3.0,三水钼酸钠 7.6。

**1.1.4 主要试剂和仪器:**DNA 聚合酶(BBI),dNTP 混合物(Sangon),1 kb DNA 分子量标准(MBI),柱式 DNA 凝胶回收试剂盒(Sangon)。2720 热循环仪(ABI),Centrifuge 5417R 离心机(Eppendorf),UV-2100 紫外分光光度计(尤尼柯仪器有限公司),菌落计数仪 ASI(杭州迅数科技有限公司),6890M 气相色谱仪(Agilent)。

## 1.2 DNA 提取

参照快速提取法<sup>[13]</sup>提取供试菌株的 DNA。

## 1.3 *nifH* 基因的扩增

对 4 株的溶磷细菌进行 *nifH* 基因扩增。*nifH* 基因扩增的引物采用 Zehr 等<sup>[14]</sup>。

采用 25  $\mu$ L 反应体系,扩增条件:95℃ 变性 2 min;95℃ 变性 50 s,55℃ 退火 50 s,72℃ 延伸 30s,32 个循环;72℃ 延伸 5 min。

## 1.4 16S rRNA 基因的扩增

对 4 株溶磷细菌进行 16S rRNA 基因的扩增。引物采用通用引物 27F 与 1492R,反应体系与扩增条件按照陆俊锟等<sup>[15]</sup>。

## 1.5 基因测序

PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 产物由试剂盒纯化,最后送至生工生物工程(上海)有限公司进行 DNA 测序。

## 1.6 系统发育树的构建

将 *nifH* 基因、16S rRNA 基因的测序结果输入 GenBank(www.ncbi.nlm.nih.gov)中进行序列分析及同源性比较。应用 Clustal X 和 MEGA3.1 软件采用邻位相连法(Neighbor-joining)计算各个菌株之间

的遗传距离并构建系统发育树。所用参比菌株均来自 GenBank。

## 1.7 菌株溶磷能力的定量测定

菌株培养条件、测定方法按照陆俊锟等<sup>[15]</sup>,于培养第 1、2、4、5 天测定培养液中可溶性磷含量;不接种的改良 SRSM 液体培养基(含  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ )为对照(CK),溶磷量由扣除对照的值计算,每菌株均做 3 次重复。

## 1.8 菌株固氮酶活性测定

采用乙炔还原法(acetylene reduction assay, ARA)测定菌株的固氮酶活性。在改良 SRSM 固体培养基活化菌株,培养至对数生长期,收集菌株至已灭菌的 50 mL 管中,用双蒸水洗涤几次后震荡使之混合均匀,测定其 OD 值,保持菌液在  $10^7 - 10^8$  cfu/mL 范围内。在装有 5 mL 无氮蔗糖半固体培养基的 20 mL 小瓶中,加入 100  $\mu$ L 的菌液,套入胶塞,用 Parafilm 封口膜封紧,于 28 - 30℃ 下培养 24 h 后,向内注入 1/10 体积 10% 乙炔气体,在相同的条件下再培养 24 h,采用气相色谱仪测定峰值,每菌株 3 个重复,固氮酶活性计算公式如下:

$$N = (hx \times C \times V) / (hs \times 24.9 \times t)^{[16]}$$

其中, $hx$ :样品峰值; $hs$ :标准  $\text{C}_2\text{H}_4$  峰值; $C$ :标准  $\text{C}_2\text{H}_4$  浓度(nmol/mL); $V$ :培养容器体积(mL); $t$ :样品培养时间(h); $N$ :产生  $\text{C}_2\text{H}_4$  浓度(nmol  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>  $\cdot$  h<sup>-1</sup>)。

## 1.9 菌株接种试验

用无菌蒸馏水冲洗木榄胚轴后种植。基质采用河砂,经过多次蒸馏水冲洗,灭菌后装入 150 mm  $\times$  140 mm 的密封塑料盆中,并每盆加入 500 mL 的 Jensen 营养液( $\text{CaHPO}_4$  作为菌株溶磷的磷源)。菌株经液体培养基活化,培养至对数期,菌液接种量为 10 mL,每菌株接种 6 植株,以不接种为对照。接种试验安排在调控温室内进行,温度控制在 25 - 30℃。在培养期间,浇灭菌蒸馏水保持每盆植株的水位越过河砂表面。

培养 3 个月后,测定植株干重,以及植株的全氮、全磷含量。植株在 70℃ 下烘干至恒重,记录干重指标,干样研磨成粉末后采用凯氏定氮法测定全氮,钼锑抗比色法测定全磷。



从图 2 可以看出,HN011 与 *Vibrio* 属的各菌株归在同一个簇群里,其中与需钠弧菌(*V. natriegens* strain ATCC14048)序列同源性最高,达到 99.4%,这与 *nifH* 的分析结果一致。SZ7-1、SZ7-2 与 *Klebsiella* 属的 5 个种类归在一个簇群中,与产酸克雷伯氏菌(*K. oxytoca*)的序列同源性最高,分别达到 95.9% 和 98.3%,与 *nifH* 的分析结果基本符合。SZ002 经

NCBI 比对后,与类芽孢杆菌(*Paenibacillus* sp. GPTSA21)的同源性最高,达到 99.8%,与其余的 *Paenibacillus* 种类同源性都在 98% 以下;发育树也表明 SZ002 与 *Paenibacillus* sp. GPTSA21 的遗传距离最为相近,可以确定 SZ002 为 *Paenibacillus* 属,但与 *nifH* 的分析结果相差甚远。

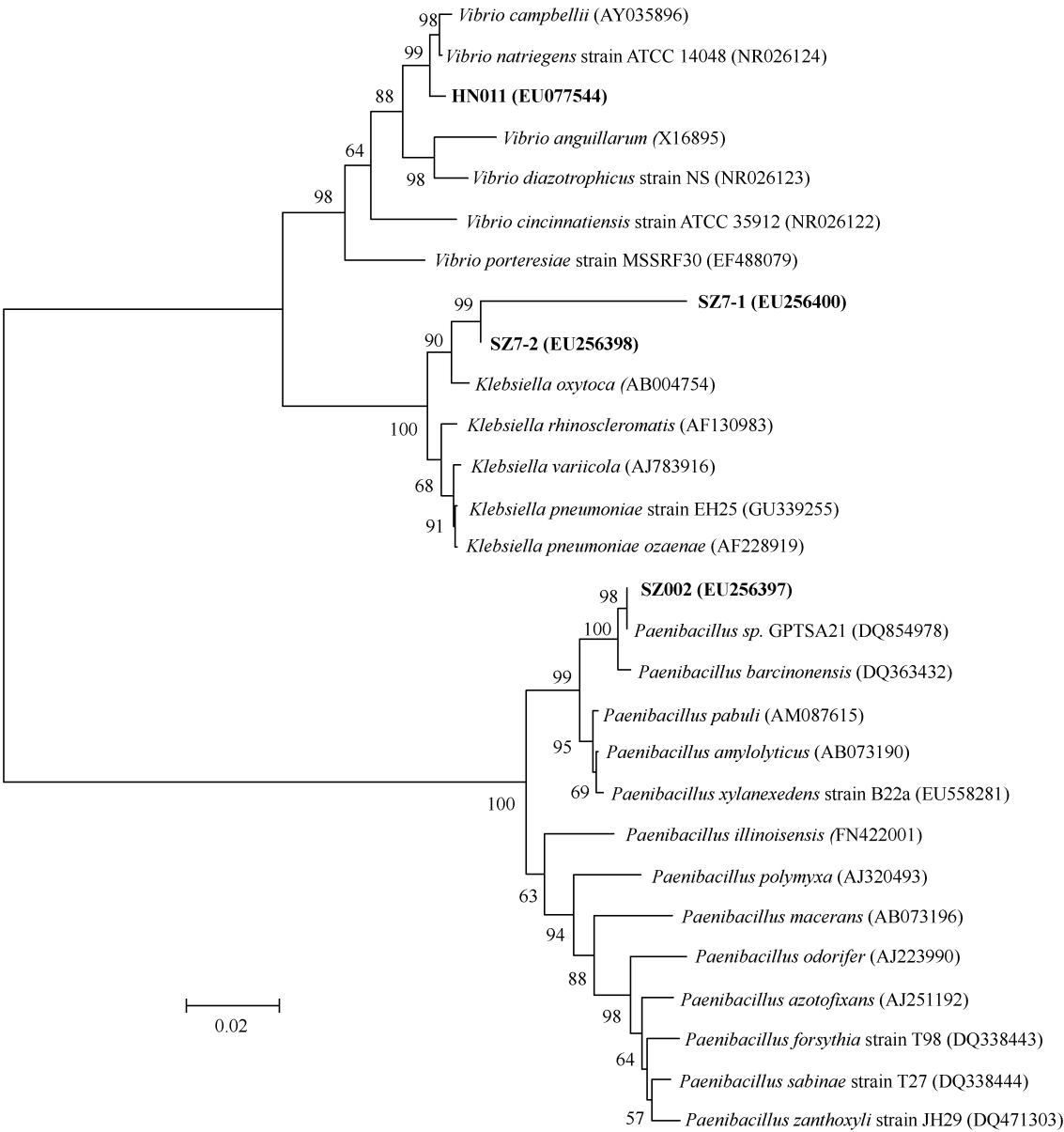


图 2 基于 16S rRNA 序列应用邻接法对 4 株植物促生菌构建的系统发育树

Fig. 2 Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence of PGPBs. The annotation was the same as in Fig. 1.

2.2 菌株溶磷能力

菌株在筛选培养基中能产生透明的溶磷圈(图 3)。在溶磷定量试验中,各菌株能促使培养液中难溶的  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  溶解,使培养液中的可溶性磷含量增加,而不同菌株的溶磷能力也存在一定的差异

(图 4)。其中,HN011 的溶磷能力最强,在第 1 天测定的培养液可溶性磷就达到最高值,其余菌株在第 2 天测定时达到最高值,这可能与细菌的对数生长期有关。4 株菌株的溶磷规律都是在溶磷量达最高值后随之下降,原因有待进一步的研究。

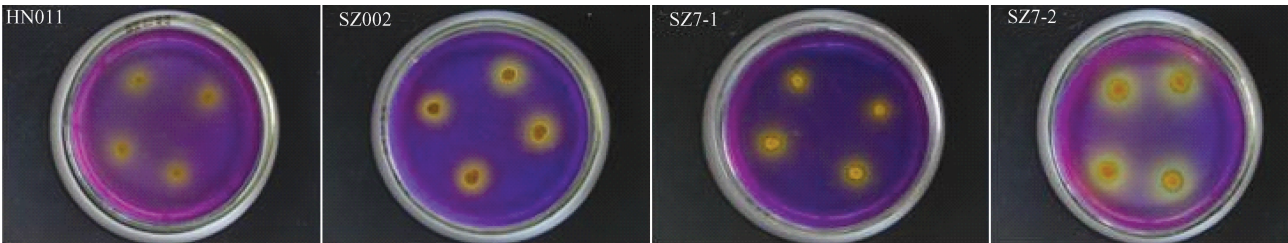


图3 菌株在含有磷酸三钙的培养基中产生的透明圈

Fig.3 PGPBs growing on medium rendered opaque by tricalcium phosphate. Halos indicate phosphate solubilization.

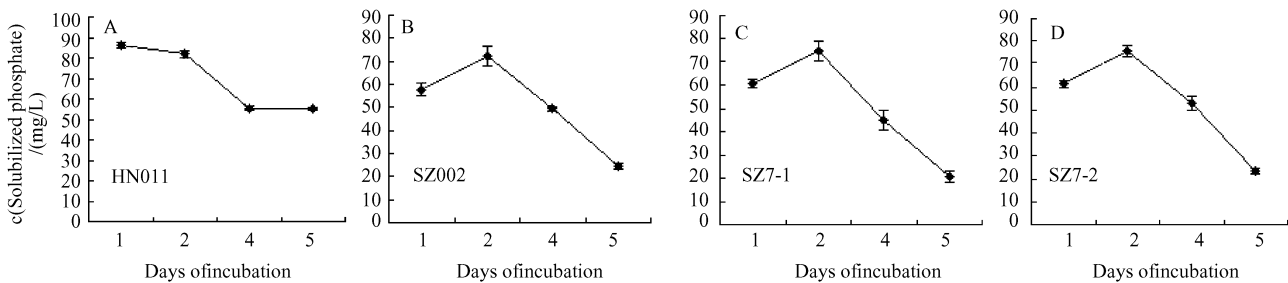


图4 菌株的溶磷能力

Fig.4 Phosphate solubilization of PGPBs in culture medium containing tricalcium phosphate. Bars represent standard errors.

2.3 菌株固氮能力

从表2可以看出,4株促生菌都具有高固氮酶活性,但不同菌株之间有很大的差异。SZ002、HN011、SZ7-2的固氮酶活性都在1005.99-1159.52 nmol C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>·mL<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>范围之内,而SZ7-1则高达132555.22 nmol C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>·mL<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>。

表2 菌株固氮酶活性

Table 2 Nitrogenase activities of PGPBs

Strain	Nitrogenase activity (nmol C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> ·mL <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )	
HN011	1159.52±214.41	A*
SZ002	1039.16±13.82	A
SZ7-1	132555.22±8015.41	B
SZ7-2	1005.991±50.59	A

\* Numbers in the same row denoted by a different letter differ significantly at P<0.01 in single factor ANOVA.

2.4 菌株对植物的促生能力

木榄幼苗接种促生菌3个月后,植株的总干重,地上部与根部的全氮、全磷含量见表3。结果表明,接种促生菌的幼苗较对照处理(CK)有较好的生长表现。除SZ7-2处理的植株外,接种菌株HN011、SZ002以及SZ7-1处理的植株总干重均显著高于对照处理(P<0.05);其中,SZ002、SZ7-1处理的植株总干重较对照处理分别提高了42.70%和32.23%。除HN011处理植株的地上部全磷含量外,其余接种促生菌的木榄幼苗在地上部与根部的全氮、全磷含量都显著高于对照处理(P<0.05)。

表3 木榄幼苗接种菌株后植株的干重及全氮、全磷含量

Table 3 Dry weight, total N and P of seedlings of *B. gymnorhiza* after inoculation with PGPBs

Strain	Total dry weight/g (n=4)	Shoot (n=3-5)		Root (n=3-5)	
		Total N/%	Total P/%	Total N/%	Total P/%
HN011	11.56 bc*	1.13 ab	0.088 bc	0.68 b	0.069 b
SZ002	12.80 c	1.18 a	0.099 a	0.75 a	0.071 ab
SZ7-1	12.04 bc	1.02 c	0.090 b	0.71 b	0.072 a
SZ7-2	8.57 ab	1.08 b	0.098 a	0.69 b	0.065 c
CK	8.97 a	0.96 d	0.086 c	0.62 c	0.060 d

\* Numbers in the same row denoted by a different letter differ significantly at P<0.05 in single factor ANOVA.

3 讨论

红树林促生菌具有丰富的多样性,种类也有明显的地域性特征,但仍未发现红树林促生菌的种类与红树植物的种类具有明显的专一性<sup>[5]</sup>。Sengupta从不同红树植物的土壤沉淀物、根际、根表分离出固氮螺菌属(*Azospirillum*),固氮菌属(*Azotobacter*),根瘤菌属(*Rhizobium*),梭菌属(*Clostridium*)和克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)等固氮菌<sup>[5]</sup>。在墨西哥的3种红树植物中(*Rhizophora mangle*, *Avicennia germinans*, *Laguncularia racemosa*)分离出的固氮菌有坎氏弧菌(*Vibrio campbelli*),鳗利斯顿氏菌(*Listonella anguillarum*),河口弧菌(*Vibrio aestuarianus*)和叶杆菌(*Phyllobacterium* sp.)<sup>[17]</sup>。从墨西哥红树植物的根部分离了解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*),萎缩芽孢杆菌(*B. atrophaeus*),

地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*), 浸麻类芽孢杆菌 (*Paenibacillus macerans*), 黄色杆菌 (*Xanthobacter agilis*), 解蛋白弧菌 (*Vibrio proteolyticus*), 产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*), 泰勒肠杆菌 (*E. taylorae*), 阿氏肠杆菌 (*E. asburiae*), 栖冷克吕沃尔菌 (*Kluyvera cryocrescens*), 浅黄金色单胞菌 (*Chryseomonas luteola*) 和施氏假单胞菌 (*Pseudomonas stutzeri*) 等 12 种解磷细菌<sup>[6]</sup>。本研究中的 4 株促生菌的种属都是以往红树林促生菌研究中普遍存在的种类。经过 *nifH* 和 16S rRNA 两种保守基因的分析, HN011 与需钠弧菌 (*Vibrio natriegens*) 的同源性最高, SZ7-1 和 SZ7-2 与产酸克雷伯氏菌 (*Klebsiella oxytoca*) 的同源性最高, 可认定 HN011 为 *Vibrio* 属, SZ7-1、SZ7-2 为 *Klebsiella* 属, 而种类的鉴定需进行 DNA 杂交进行深入验证。SZ002 的 *nifH* 基因的同源性、系统发育分析都与 *Klebsiella* 属的菌株较为接近, 与 16S rRNA 分析为 *Paenibacillus* 属的结果存在明显的差异, 初步认为造成此现象的原因是由基因转移 (Gene transfer) 引起的, 不过尚需深入的研究加以论证。

红树林沉淀物中, 磷酸盐常与间隙水中大量的阳离子形成植物难以利用的磷<sup>[7]</sup>, 而红树林溶磷菌通过溶磷作用为红树植物提供生长所需的磷源。Vazquez 等发现红树林溶磷菌解蛋白弧菌 (*Vibrio proteolyticus*) 在 24 h 后, 可使培养液中可溶性磷含量达到 480 mg/L。多数研究发现红树林真菌的溶磷能力普遍强于细菌<sup>[6, 18]</sup>。本研究的 4 株促生菌溶磷能力为 71.95—86.32 mg/L, 与其他研究的结果相比属于中等水平, 但溶解难溶性磷源的机理尚需深入研究。由于菌株培养液的 pH 值较低 (数据未公布), 所以通过分泌有机酸造成溶磷的可能性较高。

固氮作用普遍存在于红树林中。从红树林的落叶<sup>[19]</sup>、气生根<sup>[20]</sup>、根际<sup>[4]</sup>、树皮<sup>[21]</sup> 中均能检测到固氮酶活性, 这明显是与细菌所产生的固氮作用有关。UCHINO 从日本的红树林树皮分离了 4 株固氮菌, 它们 48 h 的固氮酶活性在 33—141 nmol C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> · bottle<sup>-1</sup><sup>[21]</sup>。在采用乙炔还原法测定菌株固氮能力时, 当乙烯生成量达到 500 nmol C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> · mL<sup>-1</sup> · h<sup>-1</sup>, 该菌株可认为具有较高的固氮酶活性<sup>[22]</sup>。本研究中的 4 菌株都具有非常强固氮酶活性, 尤以 SZ7-1 最高, 达 132555.22 nmol C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> · mL<sup>-1</sup> · h<sup>-1</sup>。

过去接种红树林促生菌的研究都表明红树植物接种固氮菌后都能增加植株的全氮含量, 证明了固

氮菌通过固氮作用为植株供给充足的氮源<sup>[23-24]</sup>。固氮菌接种在红树植物根部后, 短时间内能大量定殖在根部表面, 但定殖的方式有所不同<sup>[25]</sup>。本研究中, 菌株 SZ7-1、HN011 分别具有高固氮酶活性和强溶磷能力, 在接种试验中却没能表现出为植株供给更多的氮源和磷源, 这可能是促生菌在接种试验中受到各种生物因素、环境因素的影响, 制约其对植物的促生能力造成的。而菌株的固氮酶活、溶磷能力的试验是在具有培养基、适宜温度等优越条件下进行的, 确切的影响因子有待今后进行深入地探究。Holguin 曾发现从红树林根际分离出来的固氮菌鳗利斯顿氏菌 (*Listonella anguillarum*), 在与非固氮菌葡萄球菌 (*Staphylococcus* sp.) 共同培养后, 较单独培养时固氮能力增加了 17%, 表明红树林根际的固氮作用并非由某个单独菌株所产生, 而是由整个根际微生物群落相互作用的结果<sup>[4]</sup>。有研究证明了混合接种的确能更有效地增加植株的氮含量<sup>[26-27]</sup>。本试验证明了所分离菌株的促生能力, 但所涉及的接种试验仅以单种菌株作为接种材料, 在今后开展后续研究中, 需结合混合接种进行试验, 从而获得更有利于红树植物生长的接种模式, 服务于红树林人工恢复的应用。

## 参考文献

- [1] 郑康振, 陈耿, 郑杏雯, 陈桂珠. 人工红树林湿地系统净化污水研究进展. 生态学杂志 (*Chinese Journal of Ecology*), 2009, 28(1): 138-145.
- [2] 程皓, 陈桂珠, 叶志鸿. 红树林重金属污染生态学研究进展. 生态学报 (*Acta Ecologica Sinica*), 2009, 29(7): 3893-3900.
- [3] Toledo G, Bashan Y. Monitoring of black mangrove restoration with nursery-reared seedlings on an arid coastal lagoon. *Hydrobiologia*, 2001, 444: 101-109.
- [4] Holguin G, Guzman MA, Bashan Y. Two new nitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of mangrove trees; their isolation, identification and in vitro interaction with rhizosphere *Staphylococcus* sp. *FEMS Microbiology Ecology*, 1992, 101: 207-216.
- [5] Sengupta A, Chaudhuri S. Ecology of heterotrophic dinitrogen fixation in the rhizosphere of mangrove plant community at the Ganges river estuary in India. *Oecologia*, 1991, 87: 560-564.
- [6] Vazquez P, Holguin G, Puente ME, Lopez-Cortes A, Bashan Y. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a

- semiarid coastal lagoon. *Biology and Fertility of Soils*, 2000, 30: 460-68.
- [ 7 ] Bashan Y, Holguin G. Plant growth-promoting bacteria: a potential tool for arid mangrove reforestation. *Trees*, 2002, 16: 159-166.
- [ 8 ] Holguin G, Vazquez P, Bashan Y. The role of sediment microorganism in the productivity, conservation, and rehabilitation of the mangrove ecosystem: an overview. *Biology and Fertility of Soils*, 2001, 33: 265-278.
- [ 9 ] Holguin G, Bashan Y. Nitrogen-fixation by *Azospirillum brasilense* Cd is promoted when co-cultured with a mangrove rhizosphere bacterium *Staphylococcus* sp. *Soil Biology and Biochemistry*, 1996, 28: 1651-1660.
- [10] 陆俊锟, 康丽华, 陈俊, 吕成群, 黄宝灵, 江业根. 华南三地红树林土壤微生物及其与土壤化学性质的相关性研究. *林业科学研究 (Forest research)*, 2008, 21 (4): 523-527.
- [11] 王岳坤, 洪葵. 红树林土壤细菌群落 16S rDNA V3 片段 PCR 产物的 DGGE 分析. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2005, 45(2): 201-204.
- [12] 张瑜斌, 林鹏, 庄铁诚. 九龙江口红树林土壤微生物的时空分布. *厦门大学学报 (自然科学版) (Journal Xiamen University, Natural Science)*, 2007, 46 (4): 587-592.
- [13] Wen-ping C, Tsong-teh K. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Research*, 1993, 21(9): 2260.
- [14] Zehr JP, Mellon MT, Zani S. New Nitrogen-Fixing Microorganisms Detected in Oligotrophic Oceans by Amplification of Nitrogenase (*nifH*) Genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(9): 3444-3450.
- [15] 陆俊锟, 陈俊, 康丽华, 杨振德. 华南红树林溶磷菌 16S rDNA PCR-RFLP 分析及其溶磷能力. *林业科学 (Scientia Silvae Sinicae)*, 2009, 45(5): 137-142.
- [16] 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 Prataculturae Sinica)*, 2004, 13: 106-111.
- [17] Holguin G, Bashan Y, Mendoza-Salgado RA, Amador E, Toledo G, Vazquez P, Amador A. Microbiology of mangroves forests in the frontier between land and sea. *Ciencia Desarrollo*, 1999, 144: 26-35.
- [18] 陈俊, 陆俊锟, 康丽华, 杨振德. 红树林溶磷菌的初步鉴定、溶磷能力测定及其优化培养. *微生物学通报 (Microbiology)*, 2009, 36(8): 1183-1188.
- [19] Mann FD, Steinke TD. Biological nitrogen fixation (acetylene reduction) associated with decomposing *Avicennia marina* leaves in the Beachwood Mangrove Nature Reserve. *South African Journal of Botany*, 1992, 58: 533-536.
- [20] Toledo G, Bashan Y, Soeldner A. *Cyanobacteria* and black mangroves in Northwestern Mexico: colonization, and diurnal and seasonal nitrogen fixation on aerial roots. *Canadian Journal of Microbiology*, 1995, 44: 999-1011.
- [21] Uchino F, Hambali GG, Yatazawa M. Nitrogen-Fixing Bacteria from Warty Lenticellate Bark of a Mangrove Tree, *Bruguiera gymnorhiza* (L.) Lamk. *Applied and Environmental Microbiology*, 1984, 47: 44-48.
- [22] Hafeez FY, Malik KA. *Manual on Biofertilizer Technology*. Pakistan: NIBGE, 2000.
- [23] Bashan Y, Puente ME, Myrold DD, Toledo G. In vitro transfer of fixed nitrogen from diazotrophic filamentous cyanobacteria to black mangrove seedlings. *FEMS Microbiology Ecology*, 1998, 26: 165-170.
- [24] Toledo G, Bashan Y, Soeldner A. In vitro colonization and increase in nitrogen fixation of seedling roots of black mangrove inoculated by a filamentous cyanobacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 1995, 41: 1012-1020.
- [25] Puente ME, Holguin G, Glick BR, Bashan Y. Root-surface colonization of black mangrove seedlings by *Azospirillum halopraeferens* and *Azospirillum brasilense* in seawater. *FEMS Microbiology Ecology*, 1999, 29: 283-292.
- [26] Rojas A, Holguin G, Glick BR, Bashan Y. Synergism between *Phyllobacterium* sp. ( $N_2$ -fixer) and *Bacillus licheniformis* (P-solubilizer), both from a semiarid mangrove rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, 35: 181-187.
- [27] Bashan Y, Moreno M, Troyo E. Growth promotion of the seawater-irrigated oilseed halophyte *Salicornia bigelovii* inoculated with mangrove rhizosphere bacteria and halotolerant *Azospirillum* spp. *Biology and Fertility of Soils*, 2000, 32: 265-272.

# Genotypic analysis and plant growth-promoting ability of four plant growth-promoting bacteria from mangrove

Junkun Lu<sup>1</sup>, Jun Chen<sup>2</sup>, Lihua Kang<sup>1\*</sup>  
(<sup>1</sup> Research Institute of Tropical Forestry, CAF, Guangzhou 510520, China)  
(<sup>2</sup> Guangzhou Zhongshanyi pharmaceutical co. ltd. , Guangzhou 510600, China)

**Abstract:**[ **Objective**] We identified four strains of plant growth-promoting bacteria (PGPB) and their plant growth-promoting ability. [ **Methods**] Four PGPB strains were genetically analyzed by PCR detection of *nifH* and 16S rRNA gene. Phosphate-solubilizing and nitrogen-fixation capacity were examined by spectrophotometric quantification and acetylene reduction assay, respectively. Effect of strain inoculation on plant growth was also evaluated. [ **Results**] Phylogenetic analysis based on *nifH* and 16S rRNA gene sequences indicated that strain HN011 was mostly related to *Vibrio natriegens*, and SZ7-1 and SZ7-2 resembled *Klebsiella oxytoca*. Although similarity of 16S rRNA sequence showed that SZ002 belongs to *Paenibacillus* sp. , *nifH* gene of SZ002 had high sequence similarity with *Klebsiella* genus. Phosphate solubilization showed that insoluble phosphate was well solubilized in the liquid medium by all four strains of PGPB, which also had high nitrogen-fixation capacity. Plant dry weight, total N and total P were higher in some inoculated than in the non-inoculated plants ( $P < 0.05$ ). [ **Conclusion**] Our results showed that all four strains of PGPB isolated from mangrove had both phosphate solubilization and nitrogen fixation ability, resulting in beneficial effects on growth.

**Keywords:** mangrove; nitrogen fixation; phosphate solubilization; plant grow-promoting bacteria

( 本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30671668)  
\* Corresponding author. Tel/Fax: +86-20-87029270; E-mail: sblliao@pub.guangzhou.gd.cn  
Received:22 March 2010/Revised: 28 April 2010

## 系统发育树的构建方法

- 构建系统树是为了鉴定菌株的分类学地位,应该使用正确的方法构建。具体要求如下:
1. 将鉴定菌的 16S rRNA 序列递交 GenBank,用 Blast 软件搜索相似的 16S rRNA,然后一起构树。
  2. 采用能反应分支长度的软件(如 NJ 法),并用 Bootstrap 值分析分支聚类的稳定性。
  3. 用国际较为通用的一些建树方法,如 Neighbour – Joining 等,这样结果就更为可靠,更直观。
  4. 请严格按照下列具体要求写作[参见:微生物学报,2004,44(2):143.]
    - ① 系统树中:菌名应列出全称,且属和种名应斜体,名称后再加括号,其内含序列号。
    - ② 图注(本刊的图注要求用英文写作):应表明"树"上所有的内容,包括:括号中的序号、分支点上的数字涵义、0.01 代表的意义。
    - ③ 作图要求:要求达到印刷清晰,字体为"Time New Roman",字号为"8p"。可以选用两种方式——(A)文件格式为"\*.Tif",分辨率为 600 线;(B)文件格式为"word",画出树,输入文字。