

## 大豆根瘤菌 HD001 的分离鉴定及结瘤能力检测

王宏光<sup>1</sup>, 孙殿君<sup>2</sup>, 马忠强<sup>3</sup>, 辛大伟<sup>1</sup>, 王锦辉<sup>1</sup>, 刘春燕<sup>2</sup>, 胡国华<sup>2</sup>, 陈庆山<sup>1</sup>

(1. 东北农业大学 教育部大豆生物学重点实验室/农业部东北大豆生物学院遗传育种重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省农垦科研育种中心, 黑龙江 哈尔滨 150050; 3. 黑龙江垦丰种业有限公司, 黑龙江 哈尔滨 150088)

**摘要:**通过对绥农 14 根瘤菌的分离鉴定, 最终得到可以在绥农 14 上高效结瘤的寒地大豆根瘤菌, 命名为 HD001。III 型效应因子诱导分析表明 HD001 具有较特异的分泌谱带, 与 HH103 相比较至少具有 4 条带型差异。对根瘤菌的基因组和抗生素抗性进行了初步分析, 证明 HD001 具有羧苄青霉素 (Cb) 抗性。并在东北 218 份大豆种质资源上对其进行结瘤实验鉴定, 其中高效结瘤资源 10 份, 低效结瘤资源 11 份。这些资源对大豆与根瘤菌共生结瘤机制的深入研究具有重要意义。

**关键词:**大豆; 根瘤菌; 分离; 鉴定; 结瘤能力; 大豆种质

**中图分类号:**S565.1 **文献标识码:**A **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2014.03.0379

## Isolation and Identification of Rhizobium HD001 and Its Nodulation Capacity Test in Soybean Germplasm

WANG Hong-guang<sup>1</sup>, SUN Dian-jun<sup>2</sup>, MA Zhong-qiang<sup>3</sup>, XIN Da-wei<sup>1</sup>, WANG Jin-hui<sup>1</sup>, LIU Chun-yan<sup>2</sup>, HU Guo-hua<sup>2</sup>, CHEN Qing-shan<sup>1</sup>

(1. Chinese Education Ministry's Northeast Key Laboratory of Soybean Biology, Agricultural Ministry's Area Key Laboratory of Soybean Biology and Genetic Breeding, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 2. Land Reclamation Research and Breeding Centre of Heilongjiang, Harbin 150050, China; 3. Beidahuang Kenfeng Seed Corporation, Harbin 150088, China)

**Abstract:** In this study, the nodule of Suinong 14 were used to isolate new rhizobium strain. A cold field type rhizobium was isolated and identified. This rhizobium had high nodulation capacity in Suinong 14, which named as HD001. The secretome of type 3 effectors, support that HD001 is one special rhizobium of cold field area. Compared to HH103, there were 4 protein bands had difference at least. By the nodulation test on 218 soybean germplasm, the high nodule number and low nodule number phenotype varieties were identified. Ten high nodulation capacity germplasm and eleven low nodulation capacity germplasm were found. These germplasm had a good meaning for the further study of mechanism to the symbiosis of soybean and rhizobium.

**Key words:** Soybean; Rhizobium; Isolation; Identification; Nodulation; Soybean germplasm

豆科植物与根瘤菌通过共生关系将大气中的氮气转化成植物可以利用的氮源<sup>[1]</sup>。而大豆与根瘤的共生关系, 已经在农业生产中得到广泛的应用, 在美国、巴西和日本都已经实现了根瘤菌肥在农业生产上的大面积推广<sup>[2]</sup>。目前大豆中常用的根瘤菌有 HH103、USDA257、USDA138、USDA205 等<sup>[3]</sup>。近年来随着人们对农业生产环境的重视, 越来越多的根瘤菌被分离鉴定出来。同时其共生的分子机理研究也在逐步深入<sup>[4-7]</sup>。这样不仅可以解决根瘤菌在大豆和苜蓿这样豆科植物上的应用, 同时也为水稻等非豆科植物的共生固氮奠定了理论基础。

在应用过程中大豆品种与根瘤菌种的相互选择是制约大豆-根瘤菌共生关系推广应用的关键因素<sup>[8]</sup>。例如大豆品种 Hardee 不能够在根瘤菌 *Bradyrhizobium japonicum* USDA122 上结瘤, 大豆中 *Rj2* 基因的氨基酸替换直接影响着品种与根瘤菌的亲合性<sup>[9]</sup>。同样根瘤菌的 III 型分泌系统的突变也是限制根瘤菌在不同大豆品种上能否成功建立共生关系的关键。III 型分泌系统突变的根瘤菌 *Sinorhizobium fredii* USDA257 就可以在含有 *Rfg1* 遗传背景的大豆上成功建立共生关系<sup>[10]</sup>。III 型效应因子被认为是影响根瘤菌广宿主性的关键因素<sup>[11]</sup>。如根瘤菌 *Rhizobium* NGR234 中有至少 6 个 III 型效应因

收稿日期: 2013-10-31

**基金项目:** 黑龙江省高校青年学术骨干支持计划项目; 黑龙江省高校长江后备支持计划项目; 黑龙江省博士后基金 (LBH-Z12035, LBH-Z12045); 中国博士后基金 (2012M520030); 国家自然科学基金 (2006AA10Z1F4); 国家高技术研究发展计划“863 计划” (2013AA102602); 黑龙江省高校新世纪优秀人才支持计划项目 (1252-NCET-004)。

**第一作者简介:** 王宏光 (1986-), 男, 在读硕士, 主要从事作物遗传育种研究。E-mail: mafwhg-21@163.com。

**通讯作者:** 胡国华 (1951-), 男, 研究员, 博士生导师, 主要从事大豆生物技术研究。E-mail: hugh757@vip.163.com;

陈庆山 (1973-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事大豆生物技术研究。E-mail: qshchen@126.com。

子被鉴定出来,分别是 NopA、NopB、NopC、NopL、NopP 和 NopX。若将这些 III 型效应因子编码基因突变后,会封闭或者改变 NGR234 的共生互作能力<sup>[12-15]</sup>。

本研究从黑龙江省主栽大豆品种绥农 14 上分离鉴定出了大豆根瘤菌 HD001,并对其在东北 218 份的大豆资源上的结瘤情况进行了初步分析,为进一步研究根瘤菌与大豆共生分子机制奠定了坚实

的理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

大豆品种绥农 14 等共 218 份大豆种质资源,由中国农业科学院作物研究所邱丽娟研究员提供(表 1)。

表 1 参试大豆种质资源  
Table 1 Soybean germplasm of nodulation test

序号 No.	种质 Germplasm	序号 No.	种质 Germplasm	序号 No.	种质 Germplasm
1	绥农 10 号	74	合丰 35	147	N59
2	N66	75	黑稈食豆	148	艾卡 166
3	吉育 67	76	黑河 4 号	149	九农 21
4	L61-4094	77	Hitatsa	150	东农 01-1234
5	L67-166	78	垦鉴 23	151	SS202
6	小粒秣食豆	79	蒙豆 9 号	152	吉育 66
7	合丰 30	80	N31	153	L71-46
8	N62	81	北丰 9 号	154	L72-1198
9	Weber	82	N23	155	黑农 48
10	L68-560	83	Wilkin	156	昌吉黄豆 1
11	绥农 15	84	L59-731	157	L62-558
12	东农 163	85	黑河 17	158	吉育 57
13	公野 04L-141	86	吉育 93	159	黑河 13
14	和龙油太	87	Hodgson78	160	公野 5056
15	N09	88	合丰 29	161	L63-1097
16	丰地黄	89	东农 L202	162	Hoyt
17	合丰 40	90	黑河 11	163	黑交 01-1778
18	绥农 8 号	91	黑农 37	164	抗线 2 号
19	黑河 19	92	L63-1397	165	蒙豆 12
20	丰收 6 号	93	红丰 11	166	N68
21	Boige du lot et geronne	94	多马卡.托利萨	167	新大豆 1 号
22	辽仙 1 号	95	黑河 1 号	168	东农 44
23	合丰 39	96	黑龙江 41	169	吉林 39
24	Nattosan	97	N57	170	L72-1138
25	Nowa	98	蒙豆 14	171	SS201
26	Kato	99	L66-731	172	L70-4112
27	北丰 14	100	东农 434	173	合 02-1667
28	龙选 1 号	101	L67-1250	174	L64-1061
29	Maple Amber	102	T295H	175	Vinton
30	黑河 27	103	东农 42	176	L64-1067
31	60 天还仓	104	绥农 14	177	L69-4266
32	庆安黑豆	105	N29	178	吉林 30
33	青仁黑豆	106	小黄豆	179	石大豆 1 号

续表 1

序号 No.	种质 Germplasm	序号 No.	种质 Germplasm	序号 No.	种质 Germplasm
34	Nattawa	107	Maple Arrow	180	嘟噜豆
35	Hodgson	108	公野 04-L15	181	Wea
36	Maple Ridge	109	L73-105	182	吉育 71
37	绥 02-339	110	L64-2139	183	L65-756
38	L84-337	111	金元 1 号	184	Hack
39	绿滚豆	112	L61-1069	185	CN210
40	黑河 35	113	凤交 66-22	186	L72-1241
41	黄宝珠	114	嫩丰 15	187	LS201
42	四粒黄	115	北见白	188	绥 02-336
43	N02	116	铁 5621	189	猫眼豆
44	龙品 03-311	117	吉林 35	190	L67-3090
45	L66-707	118	吉林 20	191	L65-1058
46	L85-144	119	Harosoy	192	94-15
47	Vinton81	120	压迫车	193	Hark
48	L62-364	121	L64-2489	194	L65-1274
49	L68-758	122	黑河 25	195	L69-6095
50	L69-4318	123	L61-5047	196	L69-4428
51	L90-4711	124	Magnolid(美)	197	L65-60
52	L66-704	125	锦豆 33	198	L62-801
53	吉 94	126	L67-971	199	94-12-9
54	L63-1612	127	元宝金	200	铁丰 29
55	合 00-23	128	L81-4075	201	油黄豆
56	L67-1687	129	IL1	202	Century lx13
57	L70-4136	130	杜纳吉卡	203	薄地高
58	公野 03-5570	131	9748-9750	204	L65-34
59	L73-1543	132	Maple Presto	205	铁荚子
60	荆山璞	133	Proto	206	通农 13
61	L72-1140	134	L67-225	207	L83-4387
62	L63-1212	135	铁荚四粒黄	208	L65-540
63	茶秣食豆	136	L67-234	209	Beeson
64	L72D-4045	137	黑农 35	210	L73-79
65	合丰 24	138	赤 382	211	怀德白花大粒
66	牛毛黄	139	克北 1 号	212	锦州 4-1
67	合丰 25	140	青豆	213	焉耆黄豆
68	龙泉大豆	141	茶色豆	214	花绿黄豆
69	绥农 1 号	142	紫花 2 号	215	黄脐
70	合丰 37	143	黑农 2 号	216	倪丁花眉豆
71	方正秣食豆	144	小粒秣食豆	217	天鹅蛋
72	大粒黑豆	145	白城秣食豆	218	小黄豆
73	吉林茶里花	146	L67-38		

## 1.2 试验方法

**1.2.1 根瘤菌的分离** 大豆根瘤菌的分离参照 Peter 等<sup>[16]</sup>的方法进行。首先将根瘤从 V4~V5 期的绥农 14 上分离。在超净台中用酒精消毒后切开,然后在含有刚果红的培养基中划线分离根瘤菌,然后在 28℃ 恒温培养箱中培养 3~7 d 直到清晰菌落出现。依据根瘤菌的形态特征,对分离得到的候选根瘤菌克隆进行 3~5 次划线纯化,最终获得候选根瘤菌 HD001 进行回接绥农 14,进行结瘤鉴定。

**1.2.2 HD001 的表型鉴定** 对候选根瘤菌克隆在含有刚果红的 YMA 培养基上长出的菌落进行表型观察。

**1.2.3 HD001 的抗性鉴定** 在含有 20, 50 和 100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  抗生素[羧苄青霉素(Cb)、利福平(Rif)、壮观霉素(Spe)和头孢菌素(Cm)]的 TY 固体培养基上,均匀涂抹  $\text{OD}_{600}=0.2$  的根瘤菌 200  $\mu\text{L}$ ,对照为无抗 TY 固体培养基,然后至于 28℃ 恒温培养箱中培养 3~7 d 直到对照有清晰菌落出现。

**1.2.4 HD001 的分子鉴定** 根据已有根瘤菌中 III 型效应因子和 16S rDNA 的序列信息设计兼并引物(表 2),对根瘤菌的基因组进行扩增,检测目的基因。同时根据根瘤菌的表型特征对分离的根瘤菌进行表型鉴定和抗性鉴定。PCR 反应体系为 20  $\mu\text{L}$ ,取候选根瘤菌基因组 DNA 50 ng 作为 PCR 反应模板,10  $\times$  LA PCR buffer 2  $\mu\text{L}$ ,dNTP Mixture (各 2.5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 0.8  $\mu\text{L}$ ,上、下游引物各 (10  $\text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 0.6  $\mu\text{L}$ ,LA Taq 0.5  $\mu\text{L}$  (1 U),灭菌去离子水补充至 20  $\mu\text{L}$ 。扩增 16S rDNA 的 PCR 反应条件为 94℃ 预变性 5 min,35 个循环:94℃ 变性 30 s,56℃ 引物复性 30 s,72℃ 延伸 90 s。72℃ 终延伸 10 min。其中 NodA 的引物延伸是 40 s,NifH 的引物延伸是 50 s,其余的反应条件与扩增 16S rDNA 相同。

表 2 根瘤菌分子鉴定所使用的 PCR 引物

Table 2 PCR primer for the identification of rhizobium

引物名称 Primer	引物序列信息 Sequence data of primer (5'→3')
16S rDNA F	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG
16S rDNA R	TAC GGC TAC CTT CTT GTT AC
NodA F	TGC RGT GGA ATN TRN NCT GGG AAA
NodA R	GGN CCG TCR TCR AAW GTC ATG TA
nifH F	TAC GGNAAR GGS GGN ATC GGC AA
nifH R	AGC ATG TCY TCS AGY TCN TCC A

**1.2.5 HD001 的 III 型效应因子诱导表达分析** 将根瘤菌在 200 mL 含有 50  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  羧苄青霉素 (Cb) 液体培养中,28℃ 培养至  $\text{OD}_{600}=0.2$ ,加入 100  $\mu\text{mol}$  类黄酮诱导 40 h,后 4 000 g 离心 30 min 收集上清,然后 10 000 g 离心 30 min 进一步去除上清

中杂质,将上清收集在一个灭菌的锥形瓶中,加入 10% w/v 三氯乙酸过夜沉淀蛋白,10 000 g 离心 30 min 收集蛋白,丙酮洗脱 2~3 次后进行 SDS 电泳,电泳方法参照已有方法<sup>[11]</sup>。

**1.2.6 HD001 的结瘤试验** 大豆种子的表面消毒和出苗参照 Yang 等的方法<sup>[7]</sup>。移苗后待大豆对生真叶初步展开时,每株于大豆子叶节下的根部接种 2 mL ( $10^7\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 根瘤菌 HD001。温度 18~24℃,光照 16 h 培养。接种后 5 周,调查根部结瘤数目,参试资源详见表 1。

## 2 结果与分析

### 2.1 根瘤菌 HD001 的分离鉴定

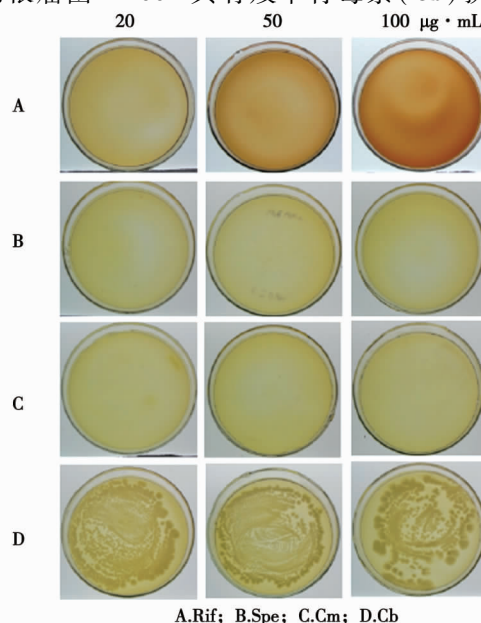
**2.1.1 表型鉴定** 通过划线分离观察根瘤菌的表型发现,所得到的克隆表面湿润表明可以分泌多糖类物质,同时菌落圆形,不透明,乳白色,微微凸起,这些表型符合根瘤菌的基本特征(图 1)。



图 1 大豆根瘤菌的平板划线分离

Fig. 1 Screening separation of soybean rhizobia on plate

**2.1.2 抗性鉴定** 进一步的抗性鉴定表明,所分离到的根瘤菌 HD001 具有羧苄青霉素 (Cb) 抗性,而



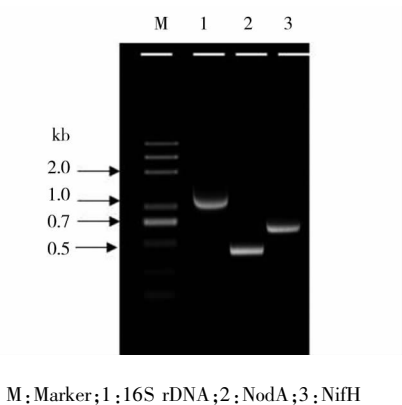
A.Rif; B.Spe; C.Cm; D.Cb

图 2 根瘤菌抗性鉴定

Fig. 2 Resistance identification of rhizobium

不具有利福平 (Rif)、壮观霉素 (Spe) 和头孢菌素 (Cm) 抗性(图 2)。

2.1.3 分子鉴定 对根瘤菌的 16S rDNA、NodA 和 NifH 保守基因进行扩增后,各个基因的目的片段都和已知的基因大小相似,进一步对片段进行回收测序后,所扩增的片段分别和已知的 16S rDNA、NodA 和 NifH 基因序列高度同源(图 3)。证实鉴定的菌株在分子水平属于根瘤菌属。



M:Marker;1:16S rDNA;2:NodA;3:NifH

图 3 根瘤菌保守基因扩增结果

Fig.3 Rhizobium conserved gene amplification results

2.1.4 III 型效应因子的诱导表达 分析表明 HD001 具有与根瘤菌 HH103 完全不同的蛋白谱带,

指示 HD001 是一个相对比较独特的寒地根瘤菌(图 4)。

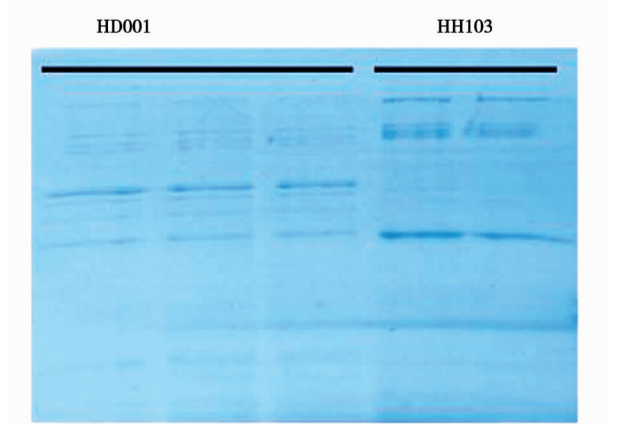


图 4 SDS-PAGE 分析异黄酮诱导根瘤菌分泌 III 型效应因子

Fig.4 SDS-PAGE analysis of isoflavone-induced secretion of Rhizobium type III effectors

2.2 HD001 在大豆核心种质资源上的结瘤鉴定

为了鉴定 HD001 在不同大豆资源上的结瘤效果。从大豆核心种质中选择了 218 份资源进行可结瘤验证。如表 3 所示,不同资源上接种 HD001 后的结瘤数量存在明显的差异。结瘤数目从 0 到 100 不等。对比绥农 14 平均 43 个的结瘤数量,这些资源具有进一步的研究价值(表 3)。

表 3 部分大豆资源接种 HD001 后的结瘤情况

Table 3 HD001 nodulation results with soybean germplasm			
种质 Germplasm	根瘤总数 Nodule number	种质 Germplasm	根瘤总数 Nodule number
绥农 10 号 Suinong 10	95 ± 18	绥农 14 Suinong 14	43 ± 4
N66	87 ± 7	Century lx13	5 ± 0
东农 44 Dongnong 44	83 ± 54	L65-34	4 ± 1
吉育 67 Jiyu 67	79 ± 4	L83-4387	3 ± 1
黑河 18 Heihe 18	77 ± 29	通农 13 Tongnong13	3 ± 0
L67-166	77 ± 1	铁荚子 Tiejiazi	3 ± 0
小粒秣食豆 Xiaolimoshidou	75 ± 11	L65-540	2 ± 0
合丰 30 Hefeng 30	74 ± 7	Beeson	0 ± 0
N62	74 ± 4	L73-79	0 ± 0
合丰 40 Hefeng 40	72 ± 11	薄地高 Baodigao	5 ± 1
油黄豆 Youhuangdou	5 ± 3	牛毛黄 Niumaohuang	5 ± 2

3 讨 论

大豆根瘤菌与大豆建立的共生关系,是农业生产中氮源的有效补充。共生关系分子机制的研究

可以促进根瘤菌在农业生产上的应用。本研究分离得到的大豆根瘤菌 HD001,是在我国寒地生态环境条件下分离得到的大豆根瘤菌,其在东北主要大豆资源上的结瘤效果表明其具有很好的广宿主性。

同时,不同资源对接根瘤菌后的反应表型有着明显的区别。一方面可能是根瘤菌的遗传背景影响着宿主的专一性,像 III 型效应因子这些信号分子。同时也可能是不同大豆遗传背景的种质资源对根瘤菌的选择性不同,如存在不同的识别基因和抗性基因等。同时不同的大豆种质资源,对根瘤菌 HD001 的反应效果不同,这可能是由于不同种质的遗传背景差异造成的。

HD001 的抗性筛选只有单一的抗生素抗性,这为进一步研究根瘤菌的 III 型效应因子对其与大豆共生结瘤的影响提供了有力支持,因为根瘤菌 III 型效应因子的研究,需要对根瘤菌 III 型效应因子的编码基因进行插入突变。一般选择插入抗生素编码基因,使突变后的根瘤菌具有额外的抗性。这样就需要野生型根瘤菌不能拥有太多的抗生素抗性。同时如果根瘤菌没有抗性的话,也不利于根瘤菌种的保存,多步操作会导致根瘤菌被其他杂菌污染。根瘤菌具有某种抗性则避免了这一现象的出现。

## 参考文献

- [1] Michael U, Philip S P. Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses [J]. Annual Review of Plant Biology, 2013, 64: 781-805.
- [2] Marie C, Broughton W J, Deakin W J. Rhizobium type III secretion systems; legume charmers or alarmers? [J]. Current Opinion of Plant Biology, 2001, 4(4): 336-42.
- [3] Okazaki S, Kaneko T, Sato S, et al. Hijacking of leguminous nodulation signaling by the rhizobial type III secretion system [J]. Proceeding of Natural Academic Science of USA, 2013. doi/10. 1073/pnas. 1302360110.
- [4] Bartsev A V, Deakin W J, Boukli N M, et al. An effector protein of rhizobium sp. NGR234, thwarts activation of plant defense reactions [J]. Plant Physiology, 2004, 134: 871-879.
- [5] Dai W J, Zeng Y, Xie Z P, et al. Symbiosis-promoting and deleterious effects of NopT, a novel type 3 effector of rhizobium sp. strain NGR234 [J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190: 5101-5110.
- [6] Deakin W J, Marie C, Saad M M, et al. NopA is associated with cell surface appendages produced by the type III secretion system of rhizobium sp. strain NGR234 [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2005, 18: 499-507.
- [7] Yang F J, Cheng L L, Zhang L, et al. Y410 of rhizobium sp. strain NGR234 is a symbiotic determinant required for symbiosome differentiation [J]. Journal of Bacteriology, 2009, 191: 735-746.
- [8] Saad M M, Kobayashi H, Marie C, et al. NopB, a type III secreted protein of rhizobium sp. strain NGR234, is associated with pilus-like surface appendages [J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187: 1173-1179.
- [9] Yang S, Tang F, Gao M, et al. R gene-controlled host specificity in the legume-rhizobia symbiosis [J]. Proceeding of Natural Academic Science of USA, 2010, 107(43): 18735-18740.
- [10] Deakin W J, Broughton W J. Symbiotic use of pathogenic strategies; Rhizobial protein secretion systems [J]. Natural Review of Microbiology, 2009, 7(4): 312-320.
- [11] Xin D W, et al. Functional analysis of NopM, a novel E3 ubiquitin ligase (NEL) domain effector of rhizobium sp. strain NGR234 [J]. PLoS Pathogens, 2012, 8(5): e1002707.
- [12] Krause A, Doerfel A, Göttfert M. Mutational and transcriptional analysis of the type III secretion system of *Bradyrhizobium japonicum* [J]. Molecular Plant-microbe Interactions, 2002, 15 (12): 1228-1235.
- [13] Saad M M, Staehelin C, Broughton W J, et al. Protein-protein interactions within type III secretion system-dependent pili of rhizobium sp. strain NGR234 [J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190 (2): 750-754.
- [14] Skorpil P, Saad M M, Boukli N M, et al. NopP, a phosphorylated effector of rhizobium sp. strain NGR234, is a major determinant of nodulation of the tropical legumes *Flemingia congesta* and *Tephrosia vogelii* [J]. Molecular Microbiology, 2005, 57: 1304-1317.
- [15] Viprey V, Del Greco A, Golinowski W, et al. Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in rhizobium [J]. Molecular Microbiology, 1998, 28: 1381-1389.
- [16] Peter M G, Barry G R. Viability of rhizobium bacteroids isolated from soybean nodule protoplasts [J]. Planta, 1978, 142: 329-333.