



两株耐盐碱大豆根瘤菌的分离及鉴定

耿思琦¹, 王洁琦^{1,2}, 魏煊格¹, 李 国¹, 徐存尧¹, 韩德志³, 袁 明⁴, 杜吉到^{1,2}

(1. 黑龙江八一农垦大学 农学院, 黑龙江 大庆 163319; 2. 黑龙江省盐碱地改良工程技术研究中心, 黑龙江 大庆 163319; 3. 黑龙江省农业科学院 黑河分院, 黑龙江 黑河 164300; 4. 黑龙江省农业科学院 齐齐哈尔分院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘 要:为筛选适宜盐碱地条件下应用的根瘤菌菌株,本研究选择安达市采取土样,以大豆品种满仓金和绥农 53 作为宿主,对根瘤菌进行分离与纯化,筛选出两株具有典型根瘤菌表型特征的菌株,随后,对这些菌株进行 16S rDNA 测序分析,最终成功分离出 2 个根瘤菌菌株,并将它们命名为 an28 和 an44。分别在各自捕获宿主上进行结瘤试验,来确定 an28 和 an44 的结瘤特征。抗生素抗性鉴定结果表明,an44 对浓度 $20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的红霉素(ERY)和浓度 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的羧苄青霉素(CAR)具有抗性,an28 对浓度 $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 ERY 具有抗性。耐盐性鉴定结果表明,an28 可以在 NaCl 浓度为 $600\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 TY 固体培养基上正常生长;而 an44 最高只能在 NaCl 浓度为 $200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时生长。耐碱性鉴定结果表明,an28 可以在 pH11.9 的 TY 固体培养基上正常生长,而 an44 的碱性生长环境只能达到 pH9.9。然后又分别在 8 种耐盐碱大豆种质(庆特 4 号、铁丰 8 号、牛眼睛、黑珍珠、齐农 5 号、合丰 50、黑河 49 和黑农 531)和 2 份不耐盐碱大豆品种(锦农 5 号和双宝 8 号)上分别接种 2 株根瘤菌进行结瘤鉴定,结果表明接种根瘤菌 an28 和 an44 在 10 个大豆种质上的结瘤数目变化范围分别为 2.00~8.67 和 5.67~35.67 个/株⁻¹。

关键词:大豆;根瘤菌;分离与鉴定;耐盐碱;回接鉴定

Isolation and Identification of Two Strains of Saline-tolerant Soybean Rhizobium

GENG Siqi¹, WANG Jieqi^{1,2}, WEI Xuange¹, LI Guo¹, XU Cunyao¹, HAN Dezhi³, YUAN Ming⁴, DU Jidao^{1,2}

(1. College of Agriculture, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China; 2. Research Center of Saline and Alkali Land Improvement Engineering Technology in Heilongjiang Province, Daqing 163319, China; 3. Heihe Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Heihe 164300, China; 4. Qiqihar Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Qiqihar 161006, China)

Abstract: In order to screen suitable rhizobia strains for application under saline alkali soil conditions, this study selected soil samples from Anda City and used soybean varieties Mancangjin and Suinong 53 as hosts to isolate and purify rhizobia. Two strains with typical rhizobia phenotype characteristics were screened. Subsequently, 16S rDNA sequencing analysis was performed on these strains, and two rhizobia strains were successfully isolated, named an28 and an44. Perform nodulation experiments on each captured host to determine the nodulation characteristics of an28 and an44. The results of antibiotic resistance identification showed that an44 was resistant to erythromycin (ERY) at a concentration of $20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and carbenicillin (CAR) at a concentration of $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, while an28 was resistant to ERY at a concentration of $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The salt tolerance identification results showed that an28 can grow normally on TY solid culture medium with a NaCl concentration of $600\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; And an44 can only grow at a maximum NaCl concentration of $200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. The results of alkali resistance identification indicate that an28 can grow normally on TY solid culture medium at pH11.9, while the alkaline growth environment of an44 can only reach pH9.9. Then, two strains of rhizobia were inoculated on eight salt alkali tolerant soybean germplasms (Qingte 4, Tiefeng 8, Niuyanjin, Heizhenzhu, Qinong 5, Hefeng 50, Heihe 49, and Heinong 531) and two salt alkali tolerant soybean varieties (Jinnong 5 and Shuangbao 8) for nodulation identification. The results showed that the range of nodulation numbers for inoculating rhizobia an28 and an44 on 10 soybean germplasms was 2.00-8.67 and 5.67-35.67 per plant, respectively.

Keywords: soybean; rhizobium; isolation and identification; saline-alkali tolerance; re-inoculation and identification

土壤盐碱化是限制植物生长和土地利用效率的主要因素之一,据统计,中国约有 9 913 万 hm^2 的盐碱地,约占国土面积的 1.03%^[1]。盐碱土表现为潮湿时黏、通气不良;干燥时硬、透水性差,土壤肥力低,抑制作物生长^[2]。在盐碱环境的影响下,植物种子萌发、生长发育及干物质积累受到影响,光合作用和蒸腾作用被抑制^[3]。如果土壤的 pH 过高,会影响植物对养分的吸收^[4],进而加重含氮中

收稿日期:2024-03-02
基金项目:黑龙江省“双一流”新一轮建设学科协同创新成果建设项目(LJGXCG2022-111);黑龙江八一农垦大学“三纵科研支持计划”-青创人才(ZRCQC202301);黑龙江八一农垦大学市校融合项目(SXRH2022-03);黑龙江八一农垦大学研究生创新科研项目(YJSCX2022-Y03)。
第一作者:耿思琦(1999—),女,硕士研究生,主要从事大豆耐盐碱根瘤菌筛选研究。E-mail:15765233363@163.com。
通讯作者:杜吉到(1973—),男,博士,教授,主要从事作物种质资源耐逆鉴定研究。E-mail:djdynd@163.com;
王洁琦(1995—),女,博士,讲师,主要从事大豆-根瘤菌共生机制研究。E-mail:jieqi0719@126.com。

间代谢物的积累,对植物细胞产生毒性,在极端盐碱程度的地区,几乎没有植物生长^[5]。我国目前受盐碱环境影响的土地逐年增多,严重阻碍农业发展^[6]。大豆是中度耐盐植物,但是,当长期生长在高盐土壤中时,渗透势、氨基酸代谢及糖代谢会发生改变,严重影响大豆的产量和品质^[7]。

大豆(*Glycine max*)是一种在全球范围内普遍种植的重要经济作物,人类可在大豆上获取丰富的油脂和植物蛋白^[8],是重要的粮、油、饲兼用豆科作物。氮是植物需求量最大的元素,也是植物生长和发育所必需的^[9]。然而,目前我国土壤中的氮素无法满足大豆的生长和发育需求,因此在生产过程中常常需要施用氮肥^[10],氮肥施用量的增加,引发了严重的环境问题,例如土壤板结、水体富营养化和重金属富集等^[11]。因此,为了减少过度施用氮肥造成的危害,找到经济环保的氮源获取途径迫在眉睫。

根瘤菌(*Rhizobia*)是一类与豆科植物互利共生的革兰氏阴性菌,它能够感染豆科植物的根部,形成根瘤并为植物提供营养^[12]。多年的研究表明,根瘤菌的接种在减少对氮肥的需求、提高农作物产量和促进农业发展方面具有重要潜力^[13]。大豆-根瘤菌共生体系不仅能为豆科植物提供充足的氮,还能增强豆科植物的抗逆性进而提高大豆产量^[14]。根瘤菌在生命周期内会分泌有机氮到土壤中,此外,根瘤在植物生长结束时自然脱落,显著提高土壤的肥力,进而减少氮肥施用、降低环境污染。充分发挥大豆-根瘤菌的共生固氮作用,是保障粮食安全、促进农业和环境可持续发展的有效措施。不同的豆科植物需要与不同种类的根瘤菌进行共生,但是有些土壤中缺乏与豆科植物形成共生关系的根瘤菌,所以,在种植豆科植物时,常常接种根瘤菌,以促进结瘤的形成,此外,土壤环境在根瘤菌结瘤固氮能力方面起着关键作用,土壤类型、pH 值及其他理化性质等因素都影响根瘤菌接种的效果,进而导致固氮能力的减弱^[15]。因此,为了获得最佳效果,有必要根据不同地区的土壤特性和大豆品种选择适宜的根瘤菌菌株。

基于目前严峻的土壤盐碱发生现状,提高作物的盐碱胁迫耐受性、保障作物产量及效益十分重要。本研究旨在分离和鉴定黑龙江省安达市试验基地土壤中存在的耐盐碱根瘤菌,并对其进行分析研究,包括 16S rDNA 分析、抗生素抗性分析、耐盐性分析、耐碱性分析以及对 10 份大豆品种上的结瘤特性分析。研究旨在筛选适宜的根瘤菌菌种资源,

为在黑龙江省有效推广和应用大豆根瘤菌奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试大豆 大豆品种:庆特 4 号、铁丰 8 号、牛眼睛、黑珍珠、齐农 5 号、合丰 50、黑河 49 及黑农 531 为耐盐碱品种;满仓金、绥农 53、锦农 5 号及双宝 8 号为不耐盐碱品种,种子均由黑龙江八一农垦大学农学院种质资源创新团队提供。

1.1.2 供试土壤 土壤采自黑龙江省安达市试验基地(125°21'E,46°24'N),类型为草甸土,有机质含量较高,腐殖质层较厚,土壤团粒结构较好,pH 7.6,电导率 42.3 $\mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$ 。

1.1.3 供试根瘤菌 根瘤菌 *Sinorhizobium fredii* HH103,由东北农业大学辛大伟研究员提供。

1.1.4 培养基与试剂 YMA 培养基(1 L):甘露醇 10 g, K_2HPO_4 0.5 g, MgSO_4 0.2 g,酵母粉 0.5 g,刚果红 0.2 g,固体需加琼脂粉 15 g,蒸馏水定容至 1 L (pH 6.8~7.0)。

TY 培养基(1 L):胰蛋白胨 5 g,酵母粉 3 g, CaCl_2 0.4 g,固体需加琼脂粉 15 g,蒸馏水定容至 1 L。

LB 培养基(1 L):胰蛋白胨 10 g,酵母粉 5 g, NaCl 10 g,固体需加琼脂粉 15 g,蒸馏水定容至 1 L。

于全式金生物技术(北京)有限公司购买 EasyTaq® DNA Polymerase、pEASY-T1、*E. coli* Trans1-T1 Phage Resistant;天根生化科技(北京)有限公司购买细菌基因组 DNA 提取试剂盒;诺唯赞生物科技(南京)有限公司购买胶回收试剂盒。

1.2 方法

1.2.1 根瘤菌的分离 将大豆品种满仓金、绥农 53 分别种植在盆栽中,土壤来自安达试验基地,培养 28 d(三叶期)后挖出大豆的根部分离根瘤。根部取出后用清水洗净并取下根瘤,将根瘤浸泡在 75% 的酒精中 1~2 min 进行表面消毒,然后用无菌水冲洗 3 次,选取外形新鲜饱满,切面为红色的根瘤在 YMA(含刚果红)固体培养基平板上划线培养,置于 28℃ 恒温培养箱中培养,经过多次分离纯化得到乳白色圆形或椭圆形、边缘整齐、表面湿润且有光泽的单克隆菌落。

1.2.2 根瘤菌基因组提取及测序结果比对 按照 TIANGEN 公司提供的 TIANamp Bacteria DNA Kit 提取试剂盒说明,进行细菌基因组 DNA 提取。根瘤菌

的基因组信息在 NCBI 网站上下载,网址为 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/3067>。16S rDNA 保守序列上、下游引物:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3', 扩增产物片段长度约 1 500 bp。

PCR 反应体系:2 μ L DNA 模板,正反引物各 2 μ L,25 μ L EasyTaq[®] DNA polymerase,最后无菌水补至 50 μ L。

PCR 反应条件:首先在 95 $^{\circ}$ C 下进行热启动,持续 5 min,然后进行 95 $^{\circ}$ C 的变性步骤,持续 15 s,接下来在 55 $^{\circ}$ C 下进行退火步骤,持续 15 s,随后进行 72 $^{\circ}$ C 的延伸步骤,持续 90 s,最后在 72 $^{\circ}$ C 下进行终延伸步骤,持续 5 min,整个反应设置 30 个循环。反应完成后,将 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,检测完毕后,将凝胶切割并回收,然后连接 pEASY-T1 载体,连接完成后,转化至 *E. coli* Trans1-T1 Phage Resistant 感受态细胞中,经过 1 h 37 $^{\circ}$ C 孵育后,均匀的将菌液涂布在 LB 固体培养基上,倒置放入恒温培养箱中,以 37 $^{\circ}$ C 恒温培养过夜后,选择单克隆菌落接种到含有卡那抗生素的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C、160 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇菌后,将菌液送往上海生工生物工程股份有限公司进行测序,测序结果在 NCBI 数据库进行详细分析,在线数据库网址为 <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>,并通过 MEGA7 软件构建系统发育树。

1.2.3 根瘤菌抗生素抗性鉴定 分别在含有浓度 20,50,75 和 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 抗生素[卡那霉素(Km)、氯霉素(Cm)、利福平(Rif)、壮观霉素(Spe)、庆大霉素(Gm)、红霉素(Ery)、新霉素硫酸盐(Neo)、羧苄青霉素(Car)]的 TY 固体培养基上,将 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中的 an28 和 an44 取出进行平板划线,以不加抗生素的培养基作为对照,将培养皿密封好,倒置在恒温培养箱中,以 28 $^{\circ}$ C 恒温培养 5~7 d,在此过程中,随时观察菌落生长情况。

1.2.4 根瘤菌耐盐性鉴定 分别在含有浓度 50,100,200,300,400,500 和 600 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 的 TY 固体培养基上,将 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中的 an28 和 an44 取出进行平板划线,以不含 NaCl 作为对照,在 28 $^{\circ}$ C 恒温培养 5~7 d,在此过程中,随时观察菌落生长情况。

1.2.5 根瘤菌耐碱性的评价 分别在 pH 为 7,8,9,10,11 和 12 的 TY 固体培养基上,挑取单菌落 an28 和 an44 进行平板划线,以 pH7 作为对照,恒温培养箱设置 28 $^{\circ}$ C,持续培养 5~7 d,在此过程中,随

时观察菌落生长情况。

1.2.6 结瘤能力鉴定 将根瘤菌划线于含有相应抗生素抗性的固体 TY 培养基上,28 $^{\circ}$ C 培养 5~7 d 后挑取单克隆于 600 μL 的 TY 液体培养基中培养菌至浑浊,取 200 μL 菌液转移到新鲜的 TY 液体培养基中进一步培养,OD₆₀₀ 值为 0.6 左右时,4 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,然后将上清液倒掉,用浓度为 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的无菌 MgSO_4 重悬菌块,重复 3 次,将菌液的 OD₆₀₀ 值调至 0.2 即可。将根瘤菌 an28 和 an44 分别与 8 个耐盐碱品种(庆特 4 号、铁丰 8 号、牛眼睛、黑珍珠、齐农 5 号、合丰 50、黑河 49 及黑农 531)及 2 个不耐盐碱品种(锦农 5 号及双宝 8 号)进行接种结瘤鉴定,以快生菌模式菌株 HH103 作为对照。在大豆对生真叶完全展开时,使用移液枪进行根瘤菌的接种,每株大豆接种菌液 2 mL,接种至土壤内部根系附近。接种后 28 d,统计结瘤数目。试验进行 3 次生物学重复,采用盆栽试验法,盆栽所选用的无孔塑料分隔箱直径为 9 cm,高 9 cm,置于大庆市国家杂粮工程技术研究中心的盆栽场地旱棚内。

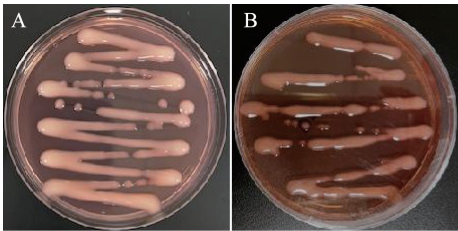
1.3 数据分析

试验数据整理使用 Excel 2016;结瘤数目统计分析使用 SPSS 15.0 软件;差异显著性分析使用 Duncan 法。

2 结果与分析

2.1 根瘤菌的形态鉴定

通过平板划线法将分离得到的根瘤菌划线到 YMA 固体培养基上,经反复分离、纯化后,观察菌落形态,呈现圆形或椭圆形、表面湿润且有光泽、乳白色、边缘齐整、稍有凸起,研究结果的生长表型与根瘤菌典型的个体形态和菌落特征相符合,经过多轮筛选,在满仓金大豆品种中分离得到一个符合根瘤菌形态特征的菌落命名为 an28,在绥农 53 大豆品种中分离得到的菌株命名为 an44(图 1)。



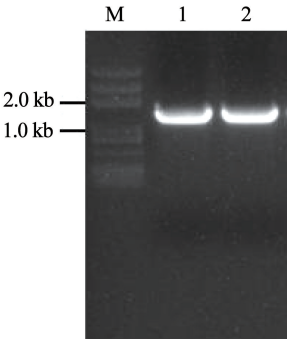
注: A. an28; B. an44
Note: A. an28; B. an44

图 1 YMA(刚果红)培养基上的单克隆菌落特征
Fig. 1 Phenotypic characters of rhizobial single colony on YMA (congo red) medium

2.2 根瘤菌分子鉴定

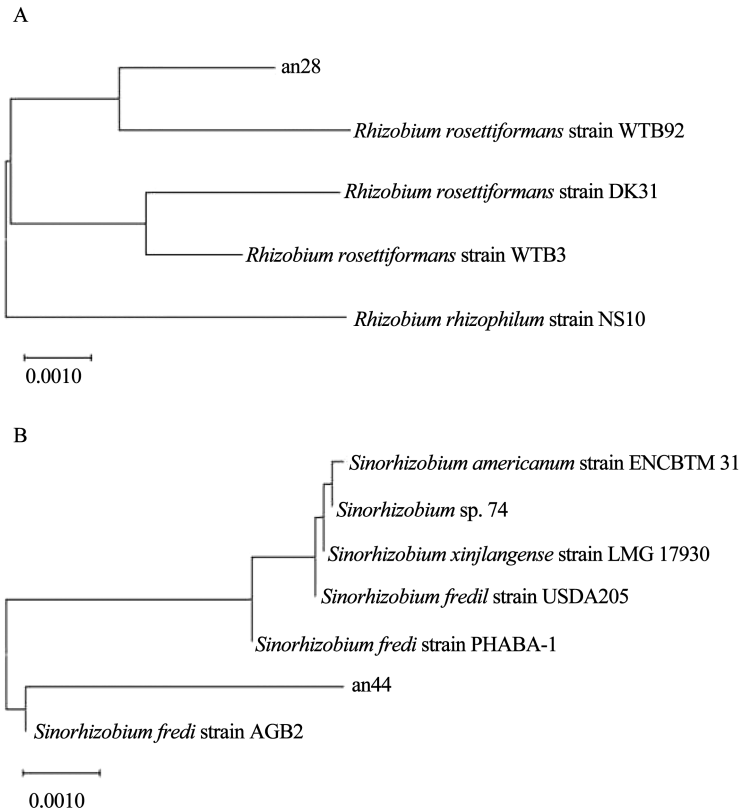
在进行琼脂糖凝胶电泳后,选择高质量的根瘤菌基因组总 DNA 作为 PCR 检测的模板,扩增根瘤菌 an28 和 an44 中的 16S rDNA 保守基因序列,预计扩增长度约为 1 500 bp。研究结果表明,根瘤菌 an28 和 an44 中扩增出的 16S rDNA 序列大小也为 1 500 bp,条带清晰特异(图 2)。此外,将得到的 PCR 产物进行胶回收,并将回收产物连接 pEASY-T1 克隆载体进行测序,测序结果通过 NCBI 在线数据库的 Blast 工具与已知物种序列进行比对。结果表明:以满仓金为寄主植物分离得到的菌株 an28 的 16S rDNA 保守序列与根瘤菌属(*Rhizobium* sp.)相似度为 99.86%;以绥农 53 为寄主植物分离得到的菌株 an44 的 16S rDNA 保守序列与费氏中华根瘤菌(*Sinorhizobium fredii*)相似度为 99.79%;通过构建

系统发育树,分析两株根瘤菌分别与相似度前几的菌株的亲缘关系,表明 an28 属于慢生根瘤菌属,an44 属于中华根瘤菌属(图 3)。



注: M. Trans2K Plus DNA Marker; 1. an28; 2. an44
Note: M. Trans2K Plus DNA Marker; 1. an28; 2. an44

图 2 根瘤菌的 16S rDNA PCR 鉴定
Fig.2 16S rDNA PCR identification of rhizobium



注: A. an28; B. an44
Note: A. an28; B. an44

图 3 根瘤菌 16S rDNA 序列系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of 16S rDNA sequence of rhizobia

2.3 根瘤菌 an28 和 an44 回接试验的结瘤表型

接种根瘤菌 an44 在宿主大豆上的结瘤数目高于接种 an28,并且根毛数量多、根系茂盛(图 4),分析根瘤数目可知,接种根瘤菌 an28 和 an44 的结瘤数目差异显著,an44 是 an28 的 4.96 倍(表 1);分析

根瘤直径可知,接种根瘤菌 an28 和 an44 直径大于 2 mm 的根瘤数目相差不大,an44 是 an28 的 1.43 倍;但在直径小于 2 mm 的根瘤数目上差异显著,且 an44 是 an28 的 15.20 倍,说明根瘤菌 an44 能够形成更多的根瘤器官且固氮能力可能要强于 an28;进

一步通过有效根瘤数目进行比较分析,接种根瘤菌 an44 形成的有效根瘤的能力显著高于 an28。通过

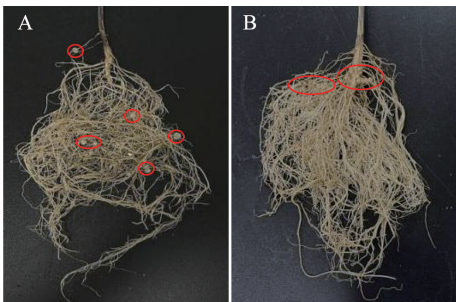
在不同宿主上接种根瘤菌,发现根瘤菌 an44 在结瘤能力和固氮能力上都要优于根瘤菌 an28。

表 1 不同根瘤菌回接大豆表型数据表

Table 1 Phenotype data table of soybean re-inoculated with different rhizobia					
根瘤菌	根瘤数目	直径 >2 mm 根瘤数目	直径 <2 mm 根瘤数目	有效根瘤数目	无效根瘤数目
Rhizobium	Nodule number	Diameter >2 mm nodule number	Diameter <2 mm nodule number	Effective nodule count	Number of inactive nodule
an28	19.50 ± 4.43 b	14.50 ± 4.73 a	5.00 ± 1.63 b	16.50 ± 4.65 b	3.00 ± 0.82 b
an44	96.75 ± 24.76 a	20.75 ± 8.92 a	76.00 ± 29.75 a	88.00 ± 21.24 a	8.75 ± 4.50 a

注: 不同的小写字母表示各个处理之间差异显著 ($P < 0.05$), 下同。

Note: Different lowercaseletters indicate significant difference between treatments ($P < 0.05$), the same below.



注: A. an28; B. an44。

图 4 回接根瘤菌诱导大豆植株形成的根系形态

Fig. 4 Root phenotype of soybean re-inoculated with different rhizobia

2.4 根瘤菌 an28 及 an44 的抗生素抗性分析

培养 7 d 后,根瘤菌 an28 和 an44 在卡那霉素 (Km)、壮观霉素 (Spe)、氯霉素 (Cm)、利福平 (Rif)、庆大霉素 (Gm)、新霉素硫酸盐 (Neo) 的培养基上均不能正常生长 (表 2),表明根瘤菌 an28 和 an44 对所检测的 6 种抗生素不具有抗性,但在红霉素 (Ery) 浓度为 $20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 TY 固体培养基上可以生长,an28 在 ERY 的生长上限浓度为 $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,另外 an44 可以在羧苄青霉素 (Car) 浓度 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 下正常生长。

表 2 不同根瘤菌在不同抗生素的生长情况

根瘤菌	抗生素浓度 Antibiotics concentration/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)															
	卡那霉素 Km				壮观霉素 Spe				氯霉素 Cm				利福平 Rif			
	20	50	75	100	20	50	75	100	20	50	75	100	20	50	75	100
an28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
an44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	红霉素 Ery				庆大霉素 Gm				新霉素硫酸盐 Neo				羧苄青霉素 Car			
	20	50	75	100	20	50	75	100	20	50	75	100	20	50	75	100
	an28	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
an44	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

注: +. 生长; -. 不生长; 下同。

Note: +. Grow; -. Stop growing; the same below.

2.5 根瘤菌 an28 和 an44 的盐胁迫抗性鉴定

如表 3 所示:培养 7 d 后,发现根瘤菌 an28 能够在 NaCl 浓度 $550\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 以下的培养基上正常生长,NaCl 浓度达到 $600\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,繁殖速度变慢,但依然可以生长,表明 an28 具有较高的耐盐特

性;根瘤菌 an44 能够在 $150\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的培养基上正常生长,当 NaCl 浓度增加到 $200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,菌株的生长明显受到抑制,但菌株仍能缓慢增长。这一结果说明 an28 较 an44 具有更高的耐盐性。

表 3 不同根瘤菌盐胁迫抗性鉴定

Table 3 Identification of salt stress resistance of different rhizobia

根瘤菌 Rhizobium	盐浓度 NaCl concentration/(mmol·L ⁻¹)							
	0	50	100	200	300	400	500	600
an28	+	+	+	+	+	+	+	+
an44	+	+	+	+	-	-	-	-

2.6 根瘤菌 an28 和 an44 的碱胁迫抗性鉴定

土壤盐化与碱化经常同时存在,植物耐碱的研究相比于植物耐盐的研究还处在起步阶段。因此进一步对根瘤菌 an28 和 an44 进行了耐碱性鉴定。如

表 4 所示,培养 7 d 后,根瘤菌 an28 能够在 pH11.9 下正常生长,且生长趋势没有减退,具有较高的耐碱特性。然而,根瘤菌 an44 仅能够在 pH9.9 下正常生长。说明 an28 较 an44 具有更强的耐碱性。

表 4 不同根瘤菌碱胁迫抗性鉴定

Table 4 Identification of resistance to alkaline stress of different rhizobia

根瘤菌 Rhizobium	pH										
	5	6	7	8	9	9.5	9.9	10	11	11.5	11.9
an28	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
an44	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

2.7 根瘤菌 an28 和 an44 的结瘤能力鉴定

如表 5 所示,根瘤菌 an28 和 an44 都能在 10 个大豆品种上正常结瘤,说明 2 个根瘤菌具有广泛的共生结瘤能力,此外,观察根瘤的切面,均呈现粉红色,说明 2 个根瘤菌能够在这 10 个大豆种质上发挥固氮作用。从根瘤数目来看,除大豆品种齐农 5 号、合丰 50 及黑农 531,根瘤菌 an44 的结瘤数目均显著高于根瘤菌 an28 的结瘤数目,数目变化范围分别为 21.67~35.67 和 2.00~12.00 个·株⁻¹,根瘤菌 HH103

的结瘤数目变化范围为 9.00~26.67 个·株⁻¹,其中大豆品种庆特 4 号与根瘤菌 an44 组合结瘤效果更好,结瘤数目最多(35.67 个·株⁻¹)。在大豆品种合丰 50 和黑农 531 中,接种 an28 和 an44 的根瘤数目均显著低于接种 HH103,但根瘤干重无显著差异(表 6)。上述结果表明,同一品种,不同根瘤菌处理,其大豆的结瘤数目不同;同一根瘤菌,处理不同大豆品种,其大豆的结瘤数目也不一样。由此可知,大豆与根瘤菌的匹配性受共生双方控制。

表 5 不同品种接种根瘤菌的根瘤数目

Table 5 Number of nodules inoculated with rhizobia on different varieties

单位:个·株⁻¹

大豆品种 Soybean cultivar	HH103	an28	an44
庆特 4 号 Qingte 4	11.66 ± 3.51 b	8.00 ± 2.65 b	35.67 ± 7.02 a
锦农 5 号 Jinnong 5	19.33 ± 4.93 a	8.00 ± 1.73 b	26.00 ± 2.83 a
铁丰 8 号 Tiefeng 8	26.67 ± 5.77 a	12.00 ± 2.83 b	35.33 ± 5.77 a
牛眼睛 Niuyanjing	13.67 ± 3.79 b	7.33 ± 1.53 b	23.00 ± 6.24 a
黑珍珠 Heizhenzhu	9.00 ± 3.61 b	10.50 ± 2.12 b	21.67 ± 4.73 a
齐农 5 号 Qinong 5	17.67 ± 3.21 a	2.33 ± 1.15 c	11.00 ± 3.61 b
双宝 8 号 Shuangbao 8	21.33 ± 5.03 a	2.00 ± 1.00 b	23.33 ± 4.16 a
合丰 50 Hefeng 50	9.33 ± 3.21 a	2.67 ± 1.54 b	7.00 ± 2.00 ab
黑河 49 Heihe 49	11.00 ± 3.46 b	8.67 ± 2.08 b	27.00 ± 4.24 a
黑农 531 Heinong 531	12.67 ± 3.79 a	5.67 ± 1.15 b	11.00 ± 2.83 ab

表 6 不同品种接种根瘤菌的根瘤干重变化
Table 6 Nodule dry weight inoculated with different varieties of rhizobia

大豆品种 Soybean cultivar	HH103	an28	an44
庆特 4 号 Qingte 4	0.07 ±0.02 a	0.04 ±0.02 a	0.05 ±0.01 a
锦农 5 号 Jinnong 5	0.06 ±0.02 a	0.07 ±0.01 a	0.06 ±0.02 a
铁丰 8 号 Tiefeng 8	0.05 ±0.02 b	0.07 ±0.01 ab	0.08 ±0.01 a
牛眼睛 Niuyanjing	0.07 ±0.01 a	0.04 ±0.00 b	0.08 ±0.01 a
黑珍珠 Heizhenzhu	0.01 ±0.01 b	0.05 ±0.02 a	0.06 ±0.01 a
齐农 5 号 Qinong 5	0.09 ±0.01 a	0.06 ±0.01 b	0.06 ±0.01 b
双宝 8 号 Shuangbao 8	0.03 ±0.01 b	0.03 ±0.00 b	0.08 ±0.01 a
合丰 50 Hefeng 50	0.03 ±0.01 a	0.03 ±0.02 a	0.05 ±0.02 a
黑河 49 Heihe 49	0.05 ±0.00 b	0.06 ±0.01 b	0.10 ±0.01 a
黑农 531 Heinong 531	0.03 ±0.01 c	0.07 ±0.01 a	0.04 ±0.01 b

3 讨论

本研究采集安达市试验基地的土壤进行盆栽试验,以满仓金和绥农 53 为宿主大豆进行根瘤菌的分离培养和鉴定,对分离纯化的菌株进行了形态鉴定、分子鉴定以及回接结瘤鉴定,结果得到了两株根瘤菌,一株为根瘤菌属 (*Rhizobium* sp.) 命名 an28,一株为费氏中华根瘤菌 (*Sinorhizobium fredii*) 命名 an44。在先前的研究中,从多种植物根瘤中也获得了大量根瘤菌资源。例如:王晓丽等^[16]在不同大豆品种上共分离出根瘤菌 203 株,其中快生型根瘤菌 172 株,慢生型根瘤菌 15 株;王海瑾等^[17]从贵州尾矿区野生豆科牧草根瘤中分离的根瘤菌,根瘤菌属为优势属,达 54.93%。以上研究报道的根瘤菌菌属不同,可能与植物品种和地理环境有关。

进一步进行种质资源鉴定,两株根瘤菌均能与所试的 10 个大豆品种进行结瘤,并行使正常的固氮功能,说明使用满仓金和绥农 53 两个大豆品种作为宿主分离出的根瘤菌是有效的。但是根据结瘤性状来看,根瘤菌 an28 在不同大豆品种上的结瘤特征明显不同于根瘤菌 an44,说明大豆与根瘤菌两者之间相互依赖,建立共生关系时存在着互相选择机制^[18]。从根瘤数目及干重来看,根瘤菌 an44 与庆特 4 号的组合结瘤数目最多,但根瘤干重与其他两个菌株差异并不显著,在大豆品种黑农 531 中,根瘤数目越多,根瘤干重反而越小,以上结果可能与根瘤大小有关,此外瘤干重接近的前提下瘤数多并不代表固氮能力好,需要固氮酶活性和生物量的佐证,但由于本试验主要针对结瘤能力展开分析,缺少对固氮酶活性及生物量的研究,不足以证明两株根瘤菌的固氮能力,后续试验还需继续深入探究。高运来等^[19]研究显示,植株结瘤数量能够影响植株

的生物量,结瘤数量过多或过少都会对生物量的增加有不利影响。因此,在选择根瘤菌时,考察菌种与大豆品种之间能否形成良好的共生关系是必要的。

大豆根瘤菌是一种内生细菌,存在于豆科植物的根部,与宿主植物建立共生关系,从而促进植物生长并增强其抗逆境能力^[20]。在抗性方面,根瘤菌 an44 可以在盐浓度 200 mmol·L⁻¹、pH9.9 环境下正常生长,根瘤菌 an28 可以在盐浓度 600 mmol·L⁻¹、pH11.9 环境下正常生长,结果筛选出耐盐碱根瘤菌对大豆在盐碱地上的广泛种植起着关键作用;在指导根瘤菌增强大豆耐盐碱性方面具有极大的实际意义。根瘤菌 an28 的环境适应性要强于 an44,但在 10 个供试大豆种质结瘤鉴定表现上不如根瘤菌 an44,由于缺乏后期的盐碱条件下接种根瘤菌全生育期的观察,很难评价盐碱环境下所得的根瘤菌与哪个大豆品种更为适合,为解决这一问题,今后需要进行大量精准的盐碱鉴定工作。

4 结论

本研究从不同大豆宿主中分离纯化出根瘤菌菌株通过表型鉴定、分子鉴定以及回接结瘤验证,最终命名为根瘤菌 an28 和 an44,an28 可以在 NaCl 浓度为 600 mmol·L⁻¹,pH11.9 的 TY 固体培养基上正常生长;而 an44 可以在 NaCl 浓度为200 mmol·L⁻¹,pH9.9 的 TY 固体培养基上正常生长;并通过结瘤能力鉴定,两株耐盐碱根瘤菌对 10 种耐盐碱不同的供试大豆种质均具有共生固氮作用,其中匹配性好的最佳组合是根瘤菌 an44 与庆特 4 号,本研究结果丰富了黑龙江省大豆根瘤菌的资源,进一步为大豆在盐碱地的种植奠定基础。

参考文献

[1] 葛瑶, 栾明鉴, 张雪楠, 等. 中国盐生植物分布与盐碱地类型的关系[J]. 齐鲁工业大学学报, 2021, 35(2): 14-20. (GE Y, LUAN M J, ZHANG X N, et al. The relationship between the distribution of halophytes in China and the types of saline-alkali land[J]. Journal of Qilu University of Technology, 2021, 35(2): 14-20.)

[2] 刘倩, 高娅妮, 柳旭, 等. 混合盐碱胁迫下接种丛枝菌根真菌和根瘤菌对紫花苜蓿生长的影响[J]. 生态学报, 2018, 38(17): 6143-6155. (LIU Q, GAO Y N, LIU X, et al. Effects of inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia on growth of *Medicago sativa* under saline-alkaline stress[J]. Acta Ecologica Sinica, 2018, 38(17): 6143-6155.)

[3] 曹晶晶. 极耐盐碱固氮菌的分离鉴定与固氮特性研究[D]. 银川: 宁夏大学, 2021. (CAO J J. Isolation and identification of extremely salt-tolerant *Azotobacter* and nitrogen-fixing characteristics[D]. Yinchuan: Ningxia University, 2021.)

[4] 孙兆军. 银川平原盐碱荒地改良模式研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2011. (SUN Z J. Amelioration models for saline-alkali wasterland in Yinchuan Plain [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2011.)

[5] 张悦. 植物促生菌对盐胁迫下大豆生长的调控作用研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2023. (ZHANG Y. Regulation of plant growth promoting bacteria on soybean growth under salt stress[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2023.)

[6] 马凯, 饶良懿. 我国土壤盐碱化问题研究脉络和热点分析[J]. 中国农业大学学报, 2023, 28(11): 90-102. (MA K, RAO L Y. Research lineage and hot spot analysis of soil salinization in China[J]. Journal of China Agricultural University, 2023, 28(11): 90-102.)

[7] 邢易梅, 董理, 战力峰, 等. 混合接种摩西球囊霉和根瘤菌对紫花苜蓿耐碱能力的影响[J]. 草业学报, 2020, 29(9): 136-145. (XING Y M, DONG L, ZHAN L F, et al. Effect of mixed inoculation of *Glomus mosseae* and *Sinorhizobium melilotis* on alkali resistance of alfalfa[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2020, 29(9): 136-145.)

[8] 刘函西, 吕浩, 郭广雨, 等. 大豆根瘤菌 HH103 *rhcN* 突变对结瘤能力的影响[J]. 中国农业科学, 2021, 54(6): 1104-1116. (LIU H X, LÜ H, GUO G Y, et al. Effect of *rhcN* gene mutation on nodulation ability of soybean *Rhizobium* HH103[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2021, 54(6): 1104-1116.)

[9] 高山. 大豆种质资源的结瘤性状鉴定及不同大豆生态区土著根瘤菌的分离鉴定[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2018. (GAO S. Identification of nodulation characters of soybean germplasm and isolation and identification of indigenous rhizobia from different soybean ecosystems [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2018.)

[10] 姬月梅, 赵志刚, 罗瑞萍, 等. 不同施氮量条件下大豆品种接种根瘤菌筛选[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(23): 80-83. (JI Y M, ZHAO Z G, LUO R P, et al. Screening of soybean varieties inoculated with rhizobia under different nitrogen application rates [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2017, 45(23): 80-83.)

[11] 李昌贵. 施氮对小麦、番茄产量与品质及旱地土壤氮素淋失的影响[D]. 扬州: 扬州大学, 2010. (LI C G. Effects of nitrogen application on yield and quality of wheat and tomato and nitrogen leaching from dryland soil [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2010.)

[12] EL ZAHAR HAICHAR F, SANTAELLA C, HEULIN T, et al. Root exudates mediated interactions belowground[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2014, 77: 69-80.

[13] 曹克璠, 刘嘉伟, 索荣臻, 等. 接种根瘤菌对‘蒙农三叶草 1 号’结瘤固氮及生长的影响[J]. 草地学报, 2023, 31(12): 3876-3886. (CAO G F, LIU J W, SUO R Z, et al. Effect of inoculation with rhizobium on nodule fixation and growth of *Trifolium ambiguum* Bieb. ‘Mengnong No. 1’ [J]. Journal of Grassland Science, 2023, 31(12): 3876-3886.)

[14] 王敏, 秦杰, 杨万明, 等. 晋大 88 高匹配性强耐盐根瘤菌筛选[J]. 大豆科学, 2021, 40(3): 385-393. (WANG M, QIN J, YANG W M, et al. Screening of salt-tolerant and well symbiotic matching soybean rhizobia strains for Jinda 88 [J]. Soybean Science, 2021, 40(3): 385-393.)

[15] 窦新田, 李晓明, 林海, 等. 大豆根瘤菌不同菌系与大豆品种和土壤类型的适应性[J]. 黑龙江农业科学, 1986(1): 27-31. (DOU X T, LI X M, LIN H, et al. Adaptability of different strains of soybean rhizobia to soybean varieties and soil types[J]. Heilongjiang Agricultural Sciences, 1986(1): 27-31.)

[16] 王晓丽, 秦杰, 王敏, 等. 山西大豆根瘤菌的分离、鉴定及共生匹配性筛选[J]. 生物技术通报, 2022, 38(3): 59-68. (WANG X L, QIN J, WANG M, et al. Isolation, identification and symbiotic matching of soybean rhizobia from Shanxi Province [J]. Biotechnology Bulletin, 2022, 38(3): 59-68.)

[17] 王海瑾, 曾庆飞, 韦兴迪, 等. 贵州尾矿区野生豆科牧草根瘤菌及其抗性测定[J]. 草地学报, 2022, 30(12): 3253-3262. (WANG H J, ZENG Q F, WEI X D, et al. The rhizobia of wild legume forage in Guizhou tailings areas and determination of resistance [J]. Acta Agrestia Sinica, 2022, 30(12): 3253-3262.)

[18] WONGDEE J, YUTTAVANICHAKUL W, LONGTHONGLANG A, et al. Enhancing the efficiency of soybean inoculant for nodulation under multi-environmental stress conditions[J]. Polish Journal of Microbiology, 2021, 70(2): 257-271.

[19] 高运来, 吕浩, 孙雨田, 等. 大豆耐盐根瘤菌的分离鉴定及宿主结瘤特性分析[J/OL]. 分子植物育种: 1-11 [2023-08-29]. HTTP: // KNS. CNKI. NET/KCMS/DETAIL/46. 1068. S. 20211223.0853.002. HTML. (GAO Y L, LV H, SUN Y T, et al. Isolation and identification of salt-tolerant rhizobium of soybean and analysis of host nodulation characteristics[J/OL]. Molecular plant breeding: 1-11 [2023-08-29]. HTTP: // KNS. CNKI. NET/KCMS/DETAIL/46. 1068. S. 20211223.0853.002. HTML.)

[20] 张怡, 张超, 杨艳杰, 等. 周口地区大豆根瘤菌的分离与分子鉴定[J]. 华北农学报, 2017, 32(4): 98-102. (ZHANG Y, ZHANG C, YANG Y J, et al. Isolation and molecular identification of soybean *Rhizobium* in Zhoukou [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2017, 32(4): 98-102.)