

耐高氮优良大豆根瘤菌株的筛选与鉴定

柏宇, 关大伟, 李力, 姜昕, 马鸣超, 李俊

(中国农业科学院 农业资源与农业区划研究所/农业部微生物产品质量安全风险评估实验室, 北京 100081)

摘要: 采用高氮平板与蛭石盆栽相结合的方法, 以黑龙江省农业科学院 1979 年设立的黑土长期定位试验 7 种不同施肥处理中分离到的 254 株大豆根瘤菌为材料, 筛选耐高氮的优良大豆根瘤菌。高氮平板结果显示: 随着尿素浓度的增加, 可生长的菌株数量逐渐减少, 其中严重抑制菌株生长的尿素浓度为 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 该浓度条件下只有 11 株菌能够生长, 均来自连续施用氮肥的处理。进一步采用模拟高氮环境蛭石盆栽的方法, 将能在 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素条件下生长的 11 株菌进行复筛, 以植株干重、植株全氮量、根瘤干重和数量作为评价指标, 获得 1 株在高氮条件下具有结瘤固氮能力的菌株 5841。经 16S rDNA 序列系统发育分析, 初步确定该菌株属于日本慢生大豆根瘤菌 (*Bradyrhizobium japonicum*)。

关键词: 筛选; 大豆根瘤菌; 耐氮; 优良菌株

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

DOI: 10.11861/j.issn.1000-9841.2014.06.0861

Screening and Characterization of Superior Nitrogen-Tolerance Soybean Rhizobia

BAI Yu, GUAN Da-wei, LI Li, JIANG Xin, MA Ming-chao, LI Jun

(Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences/Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Microbial Products, Ministry of Agriculture, Beijing 100081, China)

Abstract: The superior nitrogen-tolerance rhizobia strains were screened from 254 strains of rhizobia, which were isolated from 7 different fertilization treatments in long-term black soil fertility and fertilizer efficiency experiment station adopting high-concentration nitrogen plate method and vermiculite pot. The black soil fertility and fertilizer efficiency experiment station were constructed by Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences in 1979. The results obtained from high-concentration nitrogen plate method indicated that increasing urea concentration had an increased bacteriostatic effect. Urea concentration which could seriously inhibit growth of strains was $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, only 11 strains could grow in this urea concentration, which were all isolated from continuous application of nitrogen fertilizer. In the subsequent high-concentration nitrogen vermiculite pot experiment, the best strain 5841 were selected according to the plant dry weight, number of nodules, dry weight of nodules and total N content of the plant, which had the ability of nodulation nitrogen fixation in high-concentration nitrogen. Based on 16S rDNA sequence phylogenetic analysis, the strain 5841 was identified as *Bradyrhizobium japonicum*.

Key words: Screening; Soybean rhizobia; Nitrogen-tolerance; Superior strain

根瘤菌-大豆共生体系固定的氮素可为大豆生长提供其所需氮素营养的 50%~90%^[1]。在巴西、美国、阿根廷等大豆主产国, 根瘤菌的接种应用面积已达到 50%~100%。然而在大豆的起源地中国, 由于大豆种植时长期施用化学氮肥, 忽视生物固氮作用, 大豆接种根瘤菌面积只占大豆种植总面积的 1%~2%^[2]。东北地区作为我国大豆主产区, 大豆生产中氮肥过量施用的情况尤为严重, 有研究表明东北大豆主产区碱解氮为高含量区 ($> 200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)^[3]。土壤中残存的过高氮素产生的“氮阻遏”效应, 大大降低了根瘤菌的固氮效率。虽然土壤残存的一定氮素含量能够满足大豆生长的基本需求,

但郭海龙等^[4]研究表明生物固氮是大豆结荚期、鼓粒期的主要氮源, 高效固氮结瘤的根瘤菌对大豆的产量和品质产生重要影响。因此, 筛选可耐高氮的优良大豆根瘤菌对于提高我国东北地区大豆产量、减少化学氮肥的施用及减轻环境污染具有重要意义。

本研究以黑龙江省农业科学院 1979 年设立的黑土肥力与肥效长期定位试验站 7 种不同施肥处理中分离的 254 株大豆根瘤菌为材料, 通过平板、蛭石盆栽相结合的方法, 以期从中筛选出耐氮优良菌株, 为东北高氮地区大豆根瘤菌应用提供材料支持。

收稿日期: 2014-03-04

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-04); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金 (2013-2); 国家高技术研究发展计划“863 计划” (2013AA102802-04)。

第一作者简介: 柏宇 (1988-), 男, 硕士, 主要从事生物固氮研究。E-mail: bby1116@163.com。

通讯作者: 李俊 (1965-), 男, 研究员, 主要从事农业微生物学资源和生物固氮研究。E-mail: jli@caas.ac.cn。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

黑龙江省农业科学院黑土肥力与肥效长期定位试验站位于黑龙江省哈尔滨市(45°40'N,126°35'E),属于典型的季风性气候,年平均气温3.0℃,年平均降水量575 mm,年平均蒸发量1 315 mm。长

期定位试验开始于1979年,试验设13个处理,按小麦-大豆-玉米顺序轮作,到2011年为33个生长季。

1.2 材料

1.2.1 供试菌株 选取在7种不同施肥处理中分离、回接鉴定的254株大豆根瘤菌。7个处理施肥种类、施用量及分离的菌株数量见表1。

表1 施肥处理施肥种类、施用量及菌株数量。

Table 1 The dose of different fertilization and the number of isolated stains

处理 Treatment	施肥种类 Fertilizer type	施用量 Dose of fertilization	菌株数量 Number of strains
对照(CK) Blank control	不施肥 No fertilizer		32
有机肥(M) Manure	马粪 Horse manure	18600 kg·hm ⁻²	32
氮 ₁ +有机肥(N ₁ +M) Nitrogen fertilizer & Manure	尿素+马粪 Urea & Horse manure	75 kg·hm ⁻² + 18600 kg·hm ⁻²	45
氮 ₁ (N ₁) Nitrogen fertilizer	尿素 Urea	75 kg·hm ⁻²	48
氮 ₂ (N ₂) Double nitrogen fertilizer	尿素 Urea	150 kg·hm ⁻²	41
氮 ₁ 磷 ₁ (N ₁ P ₁) Nitrogen & Phosphate fertilizer	尿素+过磷酸钙 Urea & Calcium superphosphate	75 kg·hm ⁻² + 150 kg·hm ⁻²	28
氮 ₂ 磷 ₂ (N ₂ P ₂) Double nitrogen & Phosphate fertilizer	尿素+过磷酸钙 Urea & Calcium superphosphate	150 kg·hm ⁻² + 300 kg·hm ⁻²	28

1.2.2 供试大豆品种 供试大豆品种为黑农63,由黑龙江省农业科学院土壤肥料与资源环境研究所提供。

1.2.3 培养基 固体和液体培养基均采用YMA培养基^[5]。

1.2.4 含氮营养液 氮含量为200 mg·kg⁻¹的营养液,在1 000 mL无氮营养液^[6]中添加0.571 g硝酸铵配制成。

1.3 试验方法

1.3.1 菌悬液的制备 将斜面活化好的根瘤菌菌株接种在YMA液体培养基中,在30℃、200 r·min⁻¹条件下摇床培养至培养液OD值在0.9(λ=600 nm)左右,其菌体浓度为10⁹ cfu·mL⁻¹。

1.3.2 平板初筛试验 平板筛选试验设尿素浓度分别为4.0,4.5,5.0,5.5,6.0 g·L⁻¹,每个浓度3次重复。将供试菌株菌悬液稀释10⁶倍,从中吸取200 μL涂布在含有尿素的YMA平板上,30℃培养7 d,以长出肉眼可见的单菌落为阳性。

1.3.3 蛭石盆栽复筛试验 张兴义等^[3]研究表明,东北地区碱解氮大于200 mg·kg⁻¹为高碱解氮含量区,因此本研究采用200 mg·kg⁻¹的碱解氮含量作为蛭石盆栽氮浓度指标。大豆种子经表面灭菌后,播种在装有蛭石的花盆中,每盆4粒,每粒接种供试根瘤菌菌液1 mL,以灭菌的YMA液体培养基为空白对照,每个处理3个重复。参照Leonard“bottle-jar”装置^[7],将花盆放置在装有含氮营养液

的塑料桶中,营养液能够通过花盆底部的脱脂棉吸收到蛭石中,以确保蛭石内营养液初始氮浓度为200 mg·kg⁻¹。在每天光照8 h,白天28~30℃、夜间15~20℃的温室中培养。出苗后每盆保留苗3株,培养45 d后测定地上部分植株干重、植株全氮量、根瘤干重及数量。显著性分析采用SPSS 19.0软件。

1.3.4 耐氮大豆根瘤菌的鉴定 采用硅藻土法提取根瘤菌的DNA^[8],PCR扩增按照Yue^[9]的方法进行。16S rDNA产物送至上海生工生物工程技术服务有限公司测序。从GenBank中获取参比菌株的16S rDNA序列,序列的比对和系统发育树的构建通过MEGA5.1软件完成。序列比对采用Clustal W,系统发育树的构建采用Neighbor-Joining模型。自展分析采用1 000次重复,并采用DNAMAN(version 6.0.3.99)计算供试菌株及参比菌株序列的相似性值。菌株的16S rDNA序列提交GenBank,并获得相应编号。

2 结果与分析

2.1 耐氮大豆根瘤菌初筛

由表2可知:当尿素浓度为4.0和4.5 g·L⁻¹时,7个施肥处理均有成活的菌株,分别为210和74株,占供试菌株的83%和29%。当尿素浓度增至5.0 g·L⁻¹时只有11株菌能够生长,且都来自施氮肥处理,其中有1株菌株来自N₁+M处理,4株菌来

自 N_1 处理,6 株菌来自 N_2 处理;而当尿素浓度达到 5.5 和 $6.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,则没有菌株能够生长。结果表明,化学氮素对根瘤菌生长有抑制作用,随着氮浓度的增加,抑制作用逐渐增大,严重抑制菌株生长

尿素浓度为 $5.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。5833 等 11 株菌株可在 $5.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素浓度环境下生长,说明这 11 株菌能耐较高的氮浓度,可作为下一步复筛的材料。

表 2 各施肥处理耐受不同尿素浓度的菌株数量

Table 2 The number of N-tolerance strains in different treatments

处理 Treatment	尿素浓度 Urea concentration/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$				
	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0
CK	23	7	0	0	0
M	21	4	0	0	0
$N_1 + M$	31	9	1	0	0
N_1	44	13	4	0	0
N_2	37	22	6	0	0
N_1P_1	25	6	0	0	0
N_2P_2	28	12	0	0	0

2.2 耐氮大豆根瘤菌复筛

将初筛获得的 11 株大豆根瘤菌接种黑农 63, 进行蛭石盆栽模拟高氮 ($200 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 条件下的复筛试验。从表 3 可看出,在高氮条件下,11 个菌株均能与供试大豆结瘤,不同菌株间结瘤数量及瘤干重存在差异。其中接种菌株 5833 的大豆根瘤数目最多,接种菌株 5841 的大豆根瘤干重最高。

从植株干重结果可看出,与 CK (不接种对照) 相比,接种菌株 5833、5837、5835、5842、5841、5840 处理的大豆地上植株干重增加显著 ($P < 0.05$)。其中接种菌株 5841 的大豆植株平均地上植株干重最

高,比对照提高 29.8%。

进一步对大豆植株全氮进行测定,结果表明:10 个接菌处理其大豆地上植株全氮量高于对照。其中接种菌株 5833、5836、5837、5839、5840、5841、5842 处理的植株全氮显著增加 ($P < 0.05$),接菌 5841 的植株全氮量最高,比对照提高 60.8%。

综合分析以上结果,接种菌株 5841 的植株虽然其根瘤数目并非最多,但根瘤干重、植株干重和植株全氮量最高,说明该菌在高氮条件下具有较好的结瘤固氮和促进植株生长的能力,是耐高氮的优良大豆根瘤菌菌株。

表 3 在高氮条件下黑农 63 接种不同耐高氮根瘤菌的生长和结瘤情况

Table 3 Growth and nodulation of Heinnong63 inoculated with different N-tolerance rhizobia strains

菌株 Strains	地上植株干重 Dry weight per plant/g	总瘤数 Nodules per plant	瘤干重 Nodules dry weight per plant/mg	地上植株全氮量 Total N content per plant/mg
CK	3.182 c	0 e	0 e	117.112 d
5833	4.004 ab	75.0 a	93.0 c	179.346 a
5834	3.141 c	47.0 bc	110.0 b	119.364 d
5835	3.893 ab	50.0 bc	87.0 c	164.941 b
5836	3.441 bc	33.0 cd	113.0 b	127.387 cd
5804	3.002 cd	18.3 d	46.0 d	113.060 d
5837	3.999 ab	32.0 cd	81.0 c	155.190 b
5838	2.830 d	46.0 bc	79.0 c	125.016 cd
5839	3.407 bc	48.3 bc	83.0 c	136.153 c
5840	3.707 b	65.7 ab	125.0 a	136.848 c
5841	4.130 a	55.7 b	129.0 a	188.307 a
5842	3.813 b	39.3 c	108.0 bc	149.582 b

各列不同小写字母代表各处理在 5% 水平下显著。

Different lowercase letters indicate significant different at 5% probability level.

2.3 耐氮大豆根瘤菌的鉴定

测定了耐高氮大豆根瘤菌 5841 的 16S rDNA 基因序列,提交 Genbank 数据库,获得的编号为 KF995119。利用 MEGA 5.1 对代表菌株和参比菌株的 16S rDNA 基因序列进行 Neighbor-Joining 分

析,得到系统发育树状图(图 1)。由系统发育树状图可知,菌株 5841 与日本慢生根瘤菌 (*B. japonicum*) USDA 6^T 进化距离最近,二者 16S rDNA 核苷酸序列相似为 99.31%。

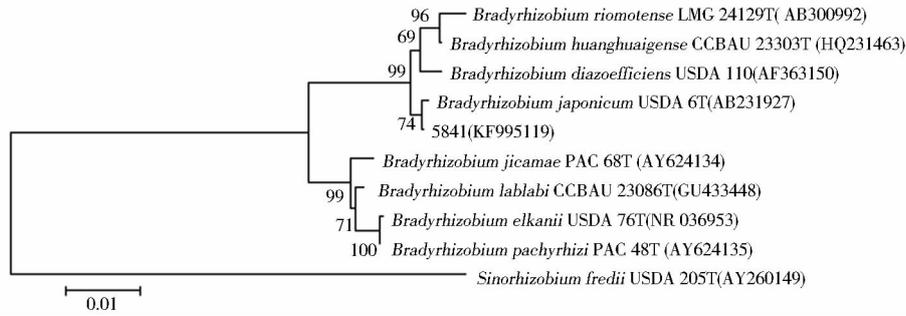


图 1 菌株 5841 的 16S rDNA 系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic trees of 5841 based on 16S rDNA analysis

3 结论与讨论

有研究表明,人为因素和土壤类型^[10-13]对大豆根瘤菌的分布及种群结构有显著影响。本研究中高氮平板初筛获得的 11 株大豆根瘤菌菌株分别来自 33 年连续施用氮肥(N₁)、有机肥(N₁+M)和双倍氮肥(N₂)的处理,而在不施氮处理中未分离出耐高氮菌株。这暗示菌株的耐高氮能力可能与长期施用氮肥有关。其原因可能是长期施用氮肥提高了土壤氮素含量,使耐高氮根瘤菌成为优势菌群,从而在分离中更易获得。这提示在今后进行耐高氮根瘤菌的分离时,宜选择施用高氮的农田作为取样地。

化学氮肥会抑制根瘤菌的结瘤和固氮,现有研究表明,化学氮肥对根瘤菌-豆科植物共生作用的抑制主要有两个方面:一方面,土壤中氮素严格调控豆科植物与根瘤菌的固氮结瘤过程,如硝态氮可诱导植物根部产生信号分子,可被根部的受体激酶所识别从而抑制根瘤形成^[14-15],铵态氮在根毛变形之前便可抑制根瘤的形成^[16];另一方面,氮素还影响根瘤菌与结瘤相关基因的表达,从而抑制结瘤^[17]。本研究结果表明,较高含量的化学氮素对根瘤菌生长有明显的抑制作用,而且随着氮浓度的增加,其抑制作用逐渐增大,这可能也是高氮影响根瘤菌-豆科植物共生作用的因素。从而也说明了在高氮条件下接种耐氮根瘤菌的必要性。

在模拟高氮盆栽试验中复筛获得的优良耐氮菌株菌株 5841 在高氮条件下具有较强的结瘤固氮能力,其能够提高大豆苗期植株的干重和全氮量,说明在高氮条件下接种耐氮根瘤菌的可行性,但是否能够提高大豆产量还需田间试验进一步验证。

参考文献

- [1] 李俊,沈德龙,林先贵. 农业微生物研究与产业化进展[M]. 北京:科学出版社,2011:289. (Li J, Shen D L, Lin X G. Agricultural microbial research and industrialization progress[M]. Beijing: Science Press, 2011:289.)
- [2] 葛城. 微生物肥料生产及其产业化[M]. 北京:化学工业出版社,2007. (Ge C. Microbial fertilizer production and industrialization[C]. Beijing: Chemical Industry Press, 2007.)
- [3] 张兴义,王树奎,隋跃宇. 东北农田黑土碱解氮现状评价[J]. 农业系统科学与综合研究,2005,21(4):305-309. (Zhang X Y, Wang S K, Sui Y Y. Evolution of alkali dispelled nitrogen of black

soil in Northeast China[J]. System Sciences and Comprehensive Studies in Agriculture, 2005, 21(4):305-309.)

- [4] 郭海龙,马春梅,董守坤,等. 春大豆生长中对不同氮源的吸收利用[J]. 核农学报,2008,22(3):338-342. (Guo H L, Ma C M, Dong S K, et al. Absorption and utilization of different nitrogen sources during the growth of soybean plant[J]. Journal of Nuclear Sciences, 2008, 22(3):338-342.)
- [5] 王卫卫. 东北地区大豆根瘤菌遗传多样性和适中低温菌株筛选及其生长机理研究[D]. 北京:中国农业科学院,2013. (Wang W W. Genetic diversity, screening of medium and low temperature-adapting strains and growth mechanism study of soybean rhizobia isolated from northeast regions[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2013.)
- [6] Rigaud J, Puppo A. Indole-3-acetic acid catabolism by soybean bacteroids[J]. Journal of General Microbiology, 1975, 88:223-228.
- [7] Vincent J M. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria[M]. London: Blackwell Scientific Publications, 1970.
- [8] Terefework Z, Kaijalainen S, Lindstrom K. AFLP Fingerprinting as a tool to study the genetic diversity of *Rhizobium galegae* isolated from *Galega orientalis* and *Galega officinalis*[J]. Journal of Biotechnology, 2001, 41:169-180.
- [9] Yue L C, Jing Y W, En T W, et al. *Bradyrhizobium lablabi* sp. nov. isolated from effective nodules of *Lablab purpureus* and *Arachis hypogaea*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010, 61(10):2496-2502.
- [10] Ferreira M C, Andrade D S, Chueire L M O. Tillage method and crop rotation effects on the population sizes and diversity of *Bradyrhizobium* nodulating soybean[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2000, 32:627-637.
- [11] Hungria M, Vargas M A T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil[J]. Field Crops Research, 2000, 65:151-164.
- [12] Wang H, Man C X, Wang E T, et al. Diversity of rhizobia and interactions among the host legumes and rhizobial genotypes in an agricultural-forestry ecosystem[J]. Plant Soil, 2009, 314:169-182.
- [13] Han L L, Wang E T, Han T X. Unique community structure and biogeography of soybean rhizobia in the saline-alkaline soils of Xinjiang, China[J]. Plant Soil, 2009, 324:291-305.
- [14] Ferguson G P, Indrasumunar A, Hayashi S, et al. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2010, 52:61-76.
- [15] Magori S, Kawaguchi M. Long-distance control of nodulation: Molecules and models[J]. Molecular Cells, 2009, 27:129-134.
- [16] Barbulova A, Rogato A, D'Apuzzo E, et al. Differential effects of combined N sources on early steps of the nod factor-dependent transduction pathway in *Lotus japonicus*[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2007, 20(8):994-1003.
- [17] Patriarca E J, Tate R, Iaccarino M. Key role of bacterial NH₄⁺ metabolism in *Rhizobium*-plant symbiosis[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2002, 66:203-222.