



一株晋大 53 号大豆中慢生根瘤菌的分离鉴定及抗逆分析

秦 杰^{1,2},高振峰^{1,2},岳爱琴^{1,2},张永坡^{1,2},高春艳^{1,2},赵晋忠^{1,2},王 敏^{1,2},杜维俊^{1,2}

(1. 山西农业大学 农学院,山西 太谷 030801; 2. 山西省农业科学院 农产品贮藏保鲜研究所,山西 太原 030031)

摘 要:为筛选适于在山西省主栽品种晋大 53 号推广应用的根瘤菌资源,以晋大 53 号大豆根瘤为研究对象,采用组织块分离法、平板划线法、震荡培养法以及分子生物学方法,对根瘤菌进行分离、纯化和鉴定,并研究其产酸、碱能力、耐盐特性以及结瘤能力。结果表明:从晋大 53 号大豆根瘤中成功分离并纯化出 1 株根瘤菌,编号为 53-4,具有刚果红染料抗性,产酸快,可耐 5% 浓度 NaCl。测序获得该菌株的 16S rDNA 序列,经 NCBI 在线数据库比对后,发现 53-4 菌株同 *Rhizobia* sp. (HQ589024.1)、*Beijerinckia fluminensis* (NR 116306.1) 和 *Mesorhizobium* sp. (JN622153.1) 等具有高达 99% 的序列同源性。NJ 系统发育树显示该菌株同 *Mesorhizobium* sp. (JN622153.1) 聚为同一支,表明 53-4 菌株属于中慢生根瘤菌(*Mesorhizobium* sp.)。对该菌株结瘤基因 *nodA* 进行 PCR 扩增,经电泳检测能够扩增出明显条带,说明该菌株基因组中具有根瘤菌关键结瘤基因 *nodA*。回接 53-4 的晋大 53 号的株高、地上部鲜重、根鲜重、植株干重和根瘤鲜重均高于接种优良大豆共生根瘤菌株 USDA110,其中地上部鲜重和根瘤鲜重显著高于接种 USDA110 处理,分别提高 20.0% 和 85.4%。中慢生根瘤菌 53-4 的耐盐特性、产酸、碱能力以及共生效果均优于 USDA110,表明其在晋大 53 号大豆种植过程中具有较好的应用潜力。

关键词:晋大 53 号;分离鉴定;16S rDNA;中慢生根瘤菌;*nodA*;回接;抗逆

Isolation, Identification and Stress Resistance Analysis of A *Mesorhizobium* Isolated from Soybean Variety Jinda 53

QIN Jie^{1,2}, GAO Zhen-feng^{1,2}, YUE Ai-qin^{1,2}, ZHANG Yong-po^{1,2}, GAO Chun-yan^{1,2}, ZHAO Jin-zhong^{1,2}, WANG Min^{1,2}, DU Wei-jun^{1,2}

(1. College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China; 2. Farm Products Storage and Freshening Institute, Shanxi Academy of Agriculture Sciences, Taiyuan 030031, China)

Abstract: To screen the rhizobia resources suitable for the promotion and application on the main cultivar Jinda 53 in Shanxi Province, we took the root nodules of Jinda 53 soybean as the research object and separate and purified the rhizobia, and then studied the capacity of its acid or alkali, salt resistance property and nodular capacity with the methods of tissue separation, flat line, shake culture and molecular biology. The results showed that 1 strain of rhizobia, coded as 53-4, was successfully isolated and purified from Jinda 53 soybean root nodules. It was resistant to congo red dye and 5% NaCl salt concentration with fast acid production. The 16S rDNA sequence of the strain was sequenced and Blast by NCBI online database, and it was found that the strain 53-4 had a high sequence homology with *Rhizobia* sp. (HQ589024.1), *Beijerinckia fluminensis*. (NR 116306.1) and *Mesorhizobium* sp. (JN622153.1), with a homology of 99%. After constructing NJ phylogenetic tree with MEGA5.0, it was found that the strain was clustered into the same strain with *Mesorhizobium* sp. (JN622153.1), indicating that the strain 53-4 belonged to *Mesorhizobium* sp.. PCR amplification of nodulation gene *nodA* of the strain was performed, and bright bands were detected by electrophoresis, indicating that *nodA* was a key nodulation gene of rhizobia found in the genome of the strain. The results of re-inoculation experiments showed that the plant height, shoot fresh weight, root fresh weight, plant dry weight, nodule fresh weight of Jinda 53 soybean were higher than that of USDA110 inoculated. The shoot fresh weight and nodule fresh weight were significantly higher than that of USDA110 inoculation, increasing by 20.0% and 85.4%, respectively. Compared with USDA110, *Mesorhizobium* 53-4 also had better salt tolerance, acid or alkali production capacity and symbiotic effect, which indicated that it had good application potential in the planting of Jinda 53.

Keywords: Jinda 53; Separation and identification; 16S rDNA; *Mesorhizobium*; *nodA*; Re-inoculation; Stress resistance

收稿日期:2020-04-04

基金项目:山西省重点研发计划(201703D221004-5,201803D221020-2);山西省重点研发计划重点项目(201703D211001);山西省自然科学基金(201801D121247)。

第一作者简介:秦杰(1996-),男,硕士,主要从事作物遗传育种研究。E-mail:1521263561@qq.com。

通讯作者:王敏(1981-),女,博士,副教授,主要从事大豆分子遗传与基因工程研究。E-mail:wangmin3502@126.com;

杜维俊(1968-),女,博士,教授,主要从事大豆遗传育种研究。E-mail:duweijun68@126.com。

根瘤菌作为一类革兰氏阴性细菌,广泛分布于土壤中,可与豆科植物共生在其根部或茎部形成根瘤或茎瘤,固定空气中的氮气,并将其转化为植物可以利用吸收的化合态氮(NH_4^+)供宿主植物吸收^[1]。据联合国粮农组织(FAO)统计,在农业生产中生物固氮总量的 60% 是由豆科植物与根瘤菌共生体系贡献的^[2]。因此,豆科作物与根瘤菌共生固氮体系在氮素循环中发挥着重要作用。其结瘤过程由根瘤菌的感染与根瘤器官的形成两个过程相互协调,涉及多种信号分子的识别与调控,如类黄酮、结瘤因子、 Ca^{2+} 、miRNAs、tRFs 等,源于双方的信号分子互相调节,是一个非常复杂的基因调控网络^[3-4]。

中国是大豆的起源地,又有 3 000 多年的种植历史,具有丰富的大豆及根瘤菌种质资源^[5-6]。不同的大豆主产区有适宜各自环境的栽培品种和农家品种^[7]。相同菌株在不同的大豆品种间表现出了显著的结瘤和固氮差异,而同一大豆品种与不同地理来源的根瘤菌共生特性差别也很大^[8]。大豆与根瘤菌的共生固氮效应与根瘤菌的结瘤固氮能力、大豆品种的匹配性、土壤理化特性等环境因素密切相关^[9]。因此,每个地区应根据当地土壤条件筛选适宜自身的根瘤菌资源,然后与栽培大豆品种通过研究获得结瘤固氮效果好的高效菌株。

目前,巴西、美国、阿根廷等大豆主产国接种根瘤菌比例为 50% ~ 100%^[10-11]。在中国,只有不到 2% 的大豆种植面积使用了根瘤菌剂,黄淮海大豆种植区几乎没有使用^[12-13]。大豆根瘤菌的研究与应用在促进植物生长、提高大豆产量和品质、增加土壤肥力和减少氮肥使用量等方面具有重要意义,能够为农业的可持续发展助力^[14]。而根瘤菌的生存能力和竞争力仍然是根瘤菌菌种在植物上广泛应用的主要障碍^[15]。筛选已经适应当地条件的土著根瘤菌和寻找高效菌株作为接种剂是克服接种失败的一个有效策略^[16]。周涛等^[17]采用无氮水培、盆栽、田间区组试验筛选出与四川主栽大豆品种贡选 1 号共生匹配性最佳的土著根瘤菌菌株 S152 和 S150,大豆产量分别比不接菌显著增加 33.5% 和 18.5%。程凤娴等^[18]在华南地区典型的酸性缺磷土壤上进行田间试验中,接种 3 株土著根瘤菌株系混合制成的根瘤菌剂,与供试华春 2、3、4 号大豆品种的结瘤率为 100%,不仅能形成较多根瘤,而且能

显著提高大豆地上部生物量和产量。

目前,山西省土著根瘤菌的筛选与应用研究鲜有报道。山西的大豆种植面积近几年保持在 20 万 hm^2 左右,由于氮肥的使用,使得当地大豆根部的根瘤数量较少,甚至没有,而过多施用氮肥反而会降低大豆产量。因此,土著根瘤菌的使用对进一步提高山西大豆产量具有重要意义。在对山西省根瘤菌资源的研究中发现 *Sinorhizobium fredii* 为优势种,约占土著大豆根瘤菌的 99.4%,并分离到 *Bradyrhizobium japonicum* 与 *Bradyrhizobium liaoningense*^[19-20]。本研究从山西农业大学大豆种植试验田采集主栽品种晋大 53 号的根瘤,分离耐逆性好和适应性强的根瘤菌,旨在丰富在山西地区适于配合主栽品种晋大 53 号使用的根瘤菌剂资源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 分离自山西农业大学大豆种植区晋大 53 号大豆根瘤的根瘤菌菌株,以及中国农业大学 CCBAU 提供的 *Bradyrhizobium japonicum* USDA110(以下简称 USDA110),该菌株为公认的优良大豆共生根瘤菌株^[21]。

1.1.2 供试培养基 YMA 固体培养基:甘露醇 10 g,酵母粉 3 g,磷酸氢二钾 0.2 g,磷酸二氢钾 0.2 g,硫酸镁 0.18 g,氯化钠 0.1 g,琼脂 15 g,蒸馏水 1 000 mL,pH7.0。

刚果红抗性测定培养基:YMA 培养基中加入 0.1% 刚果红,pH7.0。

产酸产碱鉴定培养液:YMA 液体培养基中加入 0.01% 溴百里香酚蓝(BTB),pH7.0。

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离、纯化及表型鉴定 将采集到的大豆根瘤用自来水冲洗 10 min 后于超净工作台中进行表面消毒,表面消毒参照 Cynthia 等^[22]消毒程序。采用组织块分离法、划线纯化法对晋大 53 号大豆根瘤中细菌进行分离纯化用无菌手术刀对根瘤进行切割,并用无菌镊子将破损组织置于 YMA 平板中(破损面紧贴培养基),随后倒置于 28 ℃ 恒温培养箱中培养,待长出菌落后依据细菌形态、颜色,采用划线法进行纯化,直至菌落形态单一。将纯化的单菌落划线接种至刚果红抗性平板上,并于 28 ℃ 恒温培养 24 h 后观察根瘤菌生长情况及菌落形态,以不被染色为阳性,以被染色为阴性。

1.2.2 根瘤菌分子生物学鉴定 根瘤菌基因组DNA提取参照 Gao 等^[23]方法。

选用细菌 16S rDNA 通用引物 27F/1492R,以该菌株基因组 DNA 为模板,进行根瘤菌 16S rDNA 序列 PCR 扩增。PCR 反应体系为:premix *Taq* 12.5 μL, 27F 引物 0.5 μL, 1492R 引物 0.5 μL, 模板 DNA 0.5 μL, ddH₂O 补足至 25 μL。PCR 反应程序参照 Gao 等^[23], 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 45 s, 55 ℃ 复性 45 s, 72 ℃ 延伸 1.5 min, 30 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min。PCR 扩增产物送交北京六合华大进行测序,测序结果经 NCBI 数据库比对后,选择近缘种的 16S rDNA 序列,采用 MEGA 5.0 软件构建 NJ 系统发育树进行根瘤菌鉴定。

根瘤菌结瘤基因验证选用结瘤基因 *nodA* 引物 *nodA*-1/ *nodA*-2^[24]进行 PCR 扩增,并用 1.2% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。PCR 反应体系与 16S rDNA 序列扩增相同, PCR 反应程序为: 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 40 s, 55 ℃ 复性 30 s, 72 ℃ 延伸 45 s, 30 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min。

1.2.3 结瘤回接鉴定 将蛭石与珍珠岩按体积比 2:1 混匀灭菌,装入 10 cm × 10 cm 的塑料杯中。将晋大 53 号大豆用 70% 的无水乙醇表面消毒 5 min,再用 5% 的 NaClO 消毒 5 min,之后用无菌水清洗 3 次。放入装有滤纸的培养皿中发芽,在未长出侧根前,挑选下胚轴长度一致的大豆,移栽到塑料杯中,每个杯子 1 株大豆植株。放置于光照培养箱中培养,光照时间 16 h,温度 25 ℃,黑暗时间 8 h,温度 16 ℃,光照强度 10 000 Lx。用无氮营养液浇灌,待长出第一片真叶时,每株大豆接 10 mL 菌液 (OD₆₀₀ = 0.5), 21 d 后观察其结瘤情况,测定每个植株的株高、地上部分鲜重、根鲜重、植株干重、根瘤数和根瘤鲜重。以接种 USDA110 作参照处理,以不接菌作对照处理,3 次重复。

1.2.4 根瘤菌产酸/碱鉴定 在超净工作台中,用接种环挑取 1 环活化后的菌株接种至装有 200 mL YMA 培养液 (含 BTB) 的 500 mL 锥形瓶中,并于 28 ℃、160 r·min⁻¹ 的恒温震荡培养箱中进行培养。USDA110 每隔 1 d 观察并记录培养液变色情况, 53-4 每隔 12 h 观察并记录培养液变色情况,培养液颜色变黄说明菌株产酸,颜色变蓝说明菌株产碱。

1.2.5 耐盐特性检测 将 USDA110 分别接种至含有 NaCl 浓度为 0% (CK)、0.5%、2% 和 5% 的 YMA

培养液中,将分离根瘤菌分别接种至含有 NaCl 浓度为 0% (CK)、0.5%、2%、5%、7%、10% 和 15% 的 YMA 培养液中,28 ℃、160 r·min⁻¹ 分别恒温震荡培养 5 d, 24 h 后观察根瘤菌的生长情况,并用紫外分光光度计在 600 nm 下,以未接菌的培养液做空白对照,测定各 NaCl 浓度下根瘤菌培养液的浑浊度,从而确定根瘤菌的耐盐特性。每个浓度重复 3 次。

1.3 数据分析

采用 SPSS 17.0 和 MEGA 5.0 对数据进行分析,采用 CS 6.0 对试验图片进行编辑。

2 结果与分析

2.1 根瘤菌的分离、纯化及表型鉴定

晋大 53 号大豆根瘤各破损组织块附近均有菌落生长,且各细菌菌落形态及颜色一致。从较大的单菌落中挑选到 1 株不被刚果红染色的细菌,编号为 53-4。菌落表面湿润、不透明、乳白色、微微凸起 (图 1),这些生长特点均与根瘤菌的基本特征^[25]相符,初步判断该菌株为根瘤菌。



图 1 根瘤菌 53-4 表型及刚果红抗性
Fig. 1 Phenotype and the resistance to congo red of rhizobium 53-4

2.2 根瘤菌 16S rDNA 序列分析

对 53-4 菌株的 16S rDNA 扩增序列 NCBI 在线数据库比对结果显示,菌株 53-4 同 *Rhizobia* sp. (HQ589024.1)、*Beijerinckia fluminensis* (NR 116306.1) 和 *Mesorhizobium* sp. (JN622153.1) 等具有较高的序列同源性,同源性均为 99%。NJ 系统发育树显示,该菌株同菌株 *Mesorhizobium* sp. (JN622153.1) 聚为同一支,说明菌株 53-4 同 *Mesorhizobium* sp. (JN622153.1) 具有较近的同源关系,属于中慢生根瘤菌属 (图 2)。

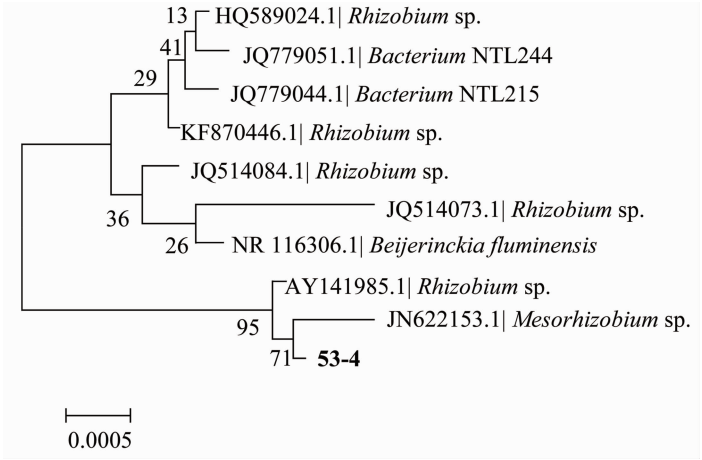


图 2 根瘤菌 53-4 菌株 16S rDNA 序列 NJ 系统发育树

Fig. 2 NJ phylogenetic tree of rhizobium 53-4 based on the sequence of 16S rDNA

2.3 根瘤菌结瘤基因扩增

nodA 结瘤基因 PCR 扩增结果表明:可在根瘤菌 53-4 菌株 DNA 中有效扩增出 1 条分子量约为 475 bp 的明亮条带(图 3),说明根瘤菌 53-4 具有一定的结瘤能力,有待回接并进一步判断其结瘤固氮能力。

2.4 根瘤菌的回接鉴定

回接结果显示,接种 USDA110 的晋大 53 号大豆的地上部分鲜重、植株干重、根瘤数和根瘤鲜重显著高于不接菌对照;回接根瘤菌 53-4 的晋大 53 号大豆的株高、地上部分鲜重、根鲜重、植株干重和根瘤鲜重均高于不接菌处理和接种 USDA110 处理,其中地上部分鲜重和根瘤鲜重显著高于接种根瘤菌 USDA110,分别提高 20.0% 和 85.4%(表 1)。回接根瘤菌 53-4 还能促进晋大 53 根生长,使其根系更加发达(图 4)。总体而言,接种 53-4 处理的促进

效果要好于 USDA110 处理,可以确定 53-4 是具有结瘤能力的根瘤菌。

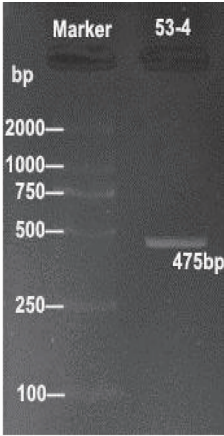


图 3 根瘤菌 53-4 结瘤基因 *nodA* 电泳检测结果

Fig. 3 The electrophoretic result of *nodA* gene of rhizobia 53-4

表 1 根瘤菌回接后大豆生长情况

Table 1 Soybean growth after re-inoculation of rhizobia

处理 Treatment	株高 Plant height /cm	地上部分鲜重 Shoot fresh weight/g	根鲜重 Root fresh weight /g	植株干重 Plant dry weight /g	单株根瘤数 Nodule number per plant	根瘤鲜重 Nodule fresh weight/mg
USDA110	27.91 ± 4.62 ab	1.80 ± 0.14 b	1.27 ± 0.06 a	0.53 ± 0.05 b	30.3 ± 10.7 b	51.09 ± 15.57 b
53-4	33.50 ± 1.71 b	2.16 ± 0.06 c	1.60 ± 0.20 b	0.58 ± 0.04 b	16.0 ± 0.8 ab	94.72 ± 17.35 c
CK	24.39 ± 1.01 a	1.34 ± 0.05 a	1.11 ± 0.10 a	0.40 ± 0.03 a	2.3 ± 1.2 a	10.82 ± 4.96 a

不同字母表示不同处理间在 $P < 0.05$ 水平差异显著。下同。

Different letters represent significant differences in the level of $P < 0.05$ between treatments. The same below.



图4 根瘤菌 53-4 回接结果

Fig. 4 Re-inoculation result of rhizobia 53-4

2.5 根瘤菌产酸/碱测定

以溴百里香酚蓝(BTB)为酸碱指示剂对根瘤菌产酸、碱能力进行测定的结果显示:USDA110 培养第4天开始产碱,导致黄绿色的培养液开始变蓝,培养第5天,开始大量产碱,导致培养液蓝色加深;根

瘤菌 53-4 培养 12 h 后开始产生酸性物质,导致培养液蓝色变浅,震荡培养 36 h 后产生大量酸性物质使培养液蓝色消失(图 5),说明根瘤菌 53-4 不仅产酸快,而且具有很强的产酸能力。

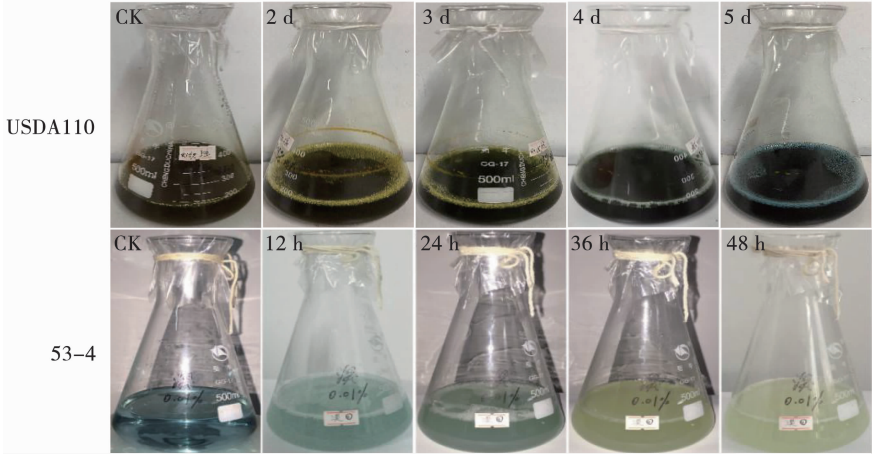


图5 根瘤菌产酸/碱测试

Fig. 5 The production capacity of acid or base of rhizobia 53-4

2.6 根瘤菌耐盐特性测定

根瘤菌耐盐性研究结果表明:USDA110 耐盐性不强,在 0.5% NaCl 浓度下,生长就受到明显抑制,基本不生长,与对照相比差异显著。根瘤菌 53-4 在不同 NaCl 浓度发酵液中生长差异明显,当 NaCl 浓度≤2% 时根瘤菌 53-4 生长量同对照相比差异不显

著;当 NaCl 浓度 >5% 后根瘤菌 53-4 生长量受到明显抑制,同对照相比差异显著;浓度 5% 时虽 OD₆₀₀ 显著低于对照但仍可稳定生长(表 2、图 5)。说明根瘤菌 53-4 具有良好的耐盐特性,可在 NaCl 浓度≤2% 的环境中稳定生长。

表2 不同 NaCl 浓度下根瘤菌 OD₆₀₀ 值

Table 2 The OD₆₀₀ values of rhizobia at different NaCl concentrations

菌株 Rhizobia	NaCl 浓度 NaCl concentration						
	CK	0.5%	2%	5%	7%	10%	15%
USDA110	0.63 ± 0.02 a	0.08 ± 0.01 b	0.08 ± 0.01 b	0.08 ± 0.01 b	—	—	—
53-4	2.11 ± 0.07 a	2.13 ± 0.06 a	2.09 ± 0.08 a	1.58 ± 0.04 b	0.38 ± 0.03 c	0.36 ± 0.02 c	0.36 ± 0.03 c

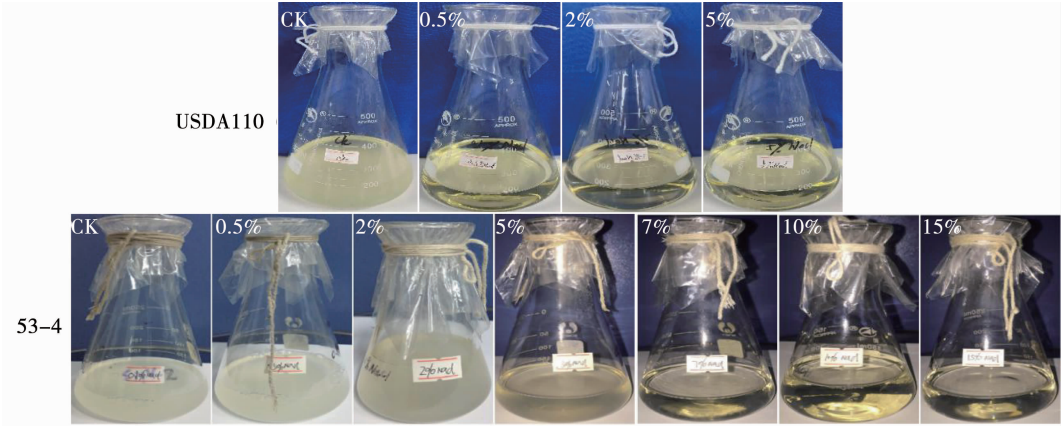


图 6 根瘤菌耐盐特性

Fig. 6 The salt tolerance of rhizobia

3 讨 论

本研究从晋大 53 号大豆根瘤中成功分离出 1 株根瘤菌,编号为 53-4。分离结果同高亚梅等^[24](从安达县大豆农家种中分离到 2 株,从垦农 4 号中分离到 2 株,从黑河 19 中分离到 1 株)、王宏光等^[25](从绥农 14 中分离到 1 株)和冀照君等^[26](从鲁黄 1 号大豆中分离到 29 株)的分离菌株数量存在一定异同。研究结果与前人分离结果存在差异的原因可能与地域、土壤理化性质、大豆品种、采样时间以及消毒方法等有关。53-4 单菌落呈圆形、表面光滑湿润、不透明、乳白色并微微凸起,不能被刚果红染色。这些生长表型和根瘤菌的基本特征相符,与王宏光等^[25]和张怡等^[27]研究结果一致。目前 16S rDNA 的系统发育已广泛应用于根瘤菌种属的分类。对该菌株的 16S rDNA 保守序列测序并构建进化树,发现其同菌株 *Mesorhizobium* sp. (JN622153.1) 具有较近的亲缘关系,聚为同一支,说明菌株 53-4 属于中慢生根瘤菌 (*Mesorhizobium* sp.)。根据报道,现已发现能够与大豆共生固氮的根瘤菌包括 *Bradyrhizobium japonicum*、*B. diazoefficiens*、*B. liaoningense*、*B. elkanii*、*B. yuanmingense*、*B. canariense*、*B. huanghuaihaiense*、*B. daqingense*、*Sinorhizobium fredii*、*S. sojae*、*Mesorhizobium tianshanense* 和 *Rhizobium tropici*^[28]。*M. tianshanense* 是 1995 年 Chen 等^[29]在新疆地区分离的可以与大豆共生的中慢生根瘤菌菌株,之后再未发现能与大豆共生的中慢生根瘤菌。而中慢生根瘤菌属的寄主植物多为百脉根、紫云英和鹰嘴豆等豆科植物^[30]。Zhang 等^[31]通过 *rpoB* 高通量测序研究了河北和山东等地的大豆根际土壤中的根瘤菌,发现主要存在

4 种根瘤菌属,分别为 *Bradyrhizobium*、*Mesorhizobium*、*Sinorhizobium* 和 *Rhizobium*。根瘤菌的分布具有显著的生物地理特征,其中黄淮海地区的根瘤菌多样性最高,是大豆根瘤菌的分化中心^[32]。本研究丰富了从大豆根瘤分离根瘤菌的类型,说明山西地区大豆根瘤菌具有丰富的多样性。

根瘤形成过程中,根瘤菌结瘤基因 *nodABC* 等的表达是结瘤因子合成的关键,结瘤因子是起始根瘤形成的一个关键信号分子,它诱发根瘤形成的一系列初始症状,如根毛卷曲、侵染线形成和根皮层的细胞分裂等^[33]。但发现两株基因组上没有 *nodA* 或 *nodC* 基因的光合慢生根瘤菌 BTai1 和 ORS278,无法合成结瘤因子,却能与一种热带豆科植物合萌属 (*Aeschynomene* Linn.) 共生结瘤^[34]。其它根瘤菌尚未发现此类现象,与寄主植物共生仍需要结瘤基因^[35]。因此,对结瘤基因 *nodA* 的扩增可以初步判断菌株的结瘤能力。对菌株 53-4 的 *nodA* 基因进行的扩增,在 475 bp 位置出现明亮的条带,说明菌株 53-4 基因组中含有根瘤菌结瘤关键基因 *nodA*。回接到晋大 53 号大豆后,该菌株能够与原宿主结瘤,而且共生效果总体好于公认的优良菌株 USDA110,说明该菌株具备结瘤能力。

Chen 等^[36]研究了 58 株根瘤菌(33 株属于中华根瘤菌属,25 株属于根瘤菌属、慢生型根瘤菌、土壤杆菌属)的耐盐性,发现大多数根瘤菌可以在 1% NaCl 的培养基上生长,不能在 1.5% NaCl 的培养基上生长,少数可以在 4.5% NaCl 的培养基上生长。本研究结果表明菌株 53-4 可耐 5% 的 NaCl 浓度,具有很好的耐盐特性,同 *Mesorhizobium alhagi* CCNWXJ12-2^T 具有相似的耐盐特性^[37]。据报道,慢生型根瘤菌的核心基因组在脂质和次级代谢方面

存在不均衡的富集,而中华根瘤菌特异性地具有渗透保护和耐碱性的基因簇^[38],可能是不同菌株存在巨大的耐盐性差异的原因。并且菌株 53-4 产酸快,培养 12 h 后开始产生酸性物质,产酸能力强,培养 36 h 后产生大量酸性物质,使含有 BTB 的培养液蓝色消失。研究结果说明该菌株在盐碱地大豆种植区的生产以及生态恢复中具有一定的应用潜力。

4 结 论

本研究从晋大 53 号大豆根瘤中分离出 1 株中慢生根瘤菌,编号为 53-4,可耐浓度 5% 的 NaCl,产酸快,产酸能力强,从该菌株中可以克隆出结瘤关键基因 *nodA*。回接试验中该菌株能够与原宿主结瘤,促进植株生长效果显著,可以作为晋大 53 号大豆的菌剂资源进行开发利用。

参考文献

[1] 张小平,李阜棣. 根瘤菌的遗传多样性与系统发育研究进展[J]. 应用与环境生物学报,2002(3): 325-333. (Zhang X B, Li F D. Genetic diversity and phylogenetic development of rhizobia[J]. Journal of Applied and Environmental Biology, 2002(3): 325-333.)

[2] David F H, Mark B P, Robert M B. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems[J]. Plant and Soil, 2008, 311(1-2): 1-18.

[3] Roy S, Liu W, Nandety R S, et al. Celebrating 20 years of genetic discoveries in legume nodulation and symbiotic nitrogen fixation[J]. Plant Cell, 2020, 32(1): 15-41.

[4] Ren B, Wang X T, Duan J B, et al. Rhizobial tRNA-derived small RNAs are signal molecules regulating plant nodulation[J]. Science, 2019, 365(6456): 919-922.

[5] Li Y H, Guan R X, Liu Z X, et al. Genetic structure and diversity of cultivated soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] landraces in China[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2008, 117(6): 857-871.

[6] 伍惠. 优良大豆根瘤菌株的分离、鉴定及应用研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2017. (Wu H. Isolation, identification and application of excellent soybean rhizobia strains[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2017.)

[7] 文自翔,赵团结,郑永战,等. 中国栽培和野生大豆农艺品质性状与 SSR 标记的关联分析 I. 群体结构及关联标[J]. 作物学报,2008, 34(7): 1169-1178. (Wen Z X, Zhao T J, Zheng Y Z, et al. Correlation analysis of agronomic quality traits and SSR markers of cultivated and wild soybean in China I. Population structure and associated markers[J]. Acta Agronomica Sinica, 2008, 34(7): 1169-1178.)

[8] 江木兰,张学江,徐巧珍,等. 大豆—根瘤菌的固氮作用[J].

中国油料作物学报,2003(1): 52-55, 60. (Jiang M L, Zhang X J, Xu Q Z, et al. Nitrogen fixation of soy-rhizobia[J]. Chinese Journal of Oil and Materials, 2003(1): 52-55, 60.)

[9] Haag A F, Arnold M F, Myka K K, et al. Molecular insights into bacteroid development during rhizobium-legume symbiosis[J]. Federation of European Microbiological Societies, 2013, 37(3): 364-383.

[10] 陈文新,陈文峰. 发挥生物固氮作用 减少化学氮肥用量[J]. 中国农业科技导报,2004(6): 3-6. (Chen W X, Chen W F. Biological nitrogen fixation to reduce the amount of chemical nitrogen fertilizer[J]. Journal of Chinese Agricultural Science and Technology, 2004(6): 3-6.)

[11] 燕永亮,李力,李俊. 根际固氮微生物功能基因组及微生物肥料研究进展[J]. 中国农业科技导报,2011, 13(5): 93-101. (Yan Y L, Li L, Li J. Research progress on functional genomes of nitrogen-fixing microorganisms and microbial fertilizers in rhizosphere[J]. Journal of Agriculture Science and Technology, 2011, 13(5): 93-101.)

[12] 王浩,刘伟,姜妍,等. 不同氮素水平下接种根瘤菌对大豆生长的影响[J]. 大豆科技,2012(1): 14-17. (Wang H, Liu W, Jiang Y, et al. Effects of rhizobia inoculation on soybean growth at different nitrogen levels[J]. Soybean Science and Technology, 2012(1): 14-17.)

[13] 李涛,关大伟,李俊,等. 黄淮海地区优良大豆根瘤菌株的筛选与接种方式研究[J]. 大豆科学,2010, 29(4): 645-650. (Li T, Guan D W, Li J, et al. Screening and inoculation methods of excellent soybean rhizobia strains in Huanghuaihai area[J]. Soybean Science, 2010, 29(4): 645-650.)

[14] 李欣欣,许锐能,廖红. 大豆共生固氮在农业减肥增效中的贡献及应用潜力[J]. 大豆科学,2016, 35(4): 531-535. (Li X X, Xu R N, Liao H. Contribution and application potential of soybean symbiotic nitrogen fixation in agricultural weight loss and synergies[J]. Soybean Science, 2016, 35(4): 531-535.)

[15] 焦健,田长富. 根瘤菌共生固氮能力的进化模式[J]. 微生物学通报,2019, 46(2): 388-397. (Jiao J, Tian C F. Evolutionary model of symbiotic nitrogen fixation capacity of rhizobia[J]. Journal of Microbiology, 2019, 46(2): 388-397.)

[16] Amaral M C, Stephen K, Maria F G, et al. Isolation, characterization and selection of indigenous *Bradyrhizobium* strains with outstanding symbiotic performance to increase soybean yields in Mozambique[J]. Agriculture, Ecosystems and Environment, 2017, 246: 291-305.

[17] 周涛,陈远学,邹依霖,等. 四川高效大豆根瘤菌的筛选及初步应用研究[J]. 植物营养与肥料学报,2012, 18(1): 227-233. (Zhou T, Chen Y X, Zou Y L, et al. Screening and preliminary application of efficient soybean rhizobia in Sichuan[J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2012, 18(1): 227-233.)

[18] 程凤娟,曹桂芹,王秀荣,等. 华南酸性低磷土壤中大豆根瘤菌高效株系的发现及应用[J]. 科学通报,2008(23): 2903-

2910. (Cheng F X, Cao G Q, Wang X R, et al. Discovery and application of efficient soybean rhizobia strains in acidic low-phosphorus soils of South China[J]. Chinese Science Bulletin, 2008(23): 2903-2910.)

[19] 史清亮, 白成云, 温月香, 等. 山西省费氏中华根瘤菌数量分布及特性探析[J]. 中国生态农业学报, 2007, 15(3): 120-122. (Shi Q L, Bai C Y, Wen Y X, et al. Quantitative distribution and character analysis of *Sinorhizobium fredii* in Shanxi Province[J]. Chinese Journal of Ecological Agriculture, 2007, 15(3): 120-122.)

[20] 张红侠, 冯瑞华, 关大伟, 等. 黄土高原地区优良大豆根瘤菌的筛选与接种方式研究[J]. 大豆科学, 2010, 29(6): 996-1002. (Zhang H X, Feng R H, Guan D W. Screening of superior soybean rhizobial strains and analyzing of different inoculation methods in loess plateau region of China[J]. Soybean Science, 2010, 29(6): 996-1002.)

[21] Liu Y H, Wang E T, Jiao Y S, et al. Symbiotic characteristics of Bradyrhizobium diazoefficiens USDA 110 mutants associated with shrubby sophora (*Sophora flavescens*) and soybean (*Glycine max*) [J]. Microbiological Research, 2018, 214: 19-27.

[22] Cynthia G, Sanjay K J, Stephen K, et al. Identification and distribution of microsymbionts associated with soybean nodulation in Mozambican soils[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2018, 41(5): 506-515.

[23] Gao Z F, Zhang B J, Liu H P, et al. Identification of endophytic *Bacillus velezensis* ZSY-1 strain and antifungal activity of its volatile compounds against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea* [J]. Biological Control, 2017, 105: 27-39.

[24] 高亚梅, 韩毅强, 王景伟, 等. 大豆根瘤菌的分离与分子鉴定[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2007(5): 16-19. (Gao Y M, Han Y Q, Wang J W, et al. Isolation and molecular identification of soybean rhizobia[J]. Journal of Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2007(5): 16-19.)

[25] 王宏光, 孙殿君, 马忠强, 等. 大豆根瘤菌 HD001 的分离鉴定及结瘤能力检测[J]. 大豆科学, 2014, 33(3): 379-384. (Wang H G, Sun D J, Ma Z Q, et al. Isolation and identification of soybean rhizobia HD001 and detection of its nodule formation ability[J]. Soybean Science, 2014, 33(3): 379-384.)

[26] 冀照君, 王非梦, 王素阁, 等. 鲁黄1号大豆与根瘤菌的共生匹配性[J]. 应用生态学报, 2014, 25(12): 3573-3579. (Ji Z J, Wang F M, Wang S G, et al. Symbiotic compatibility between soybean and rhizobia[J]. Journal of Applied Ecology, 2014, 25(12): 3573-3579.)

[27] 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 rhizobia in Zhoukou area[J]. Journal of North China Agriculture, 2017, 32(4): 98-102.)

[28] Chen Y X, Zhou T, Xu K W, et al. Symbiotic matching, taxonomic position, and field assessment of symbiotically efficient rhizobia isolated from soybean root nodules in Sichuan, China[J]. Biology and Fertility of Soils, 2015, 51(6): 707-718.

[29] Chen W X, Wang E T, Wang S Y, et al. Characteristics of *Rhizobium tianshanense* sp. nov., a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang, People Republic of China[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1995, 45(1): 153-159.

[30] 史晓霞, 师尚礼, 杨晶, 等. 豆科植物根瘤菌分类研究进展[J]. 草原与草坪, 2006(1): 12-17. (Shi X X, Shi S L, Yang J, et al. Progress in the classification of legume rhizobia[J]. Grassland and Grassland, 2006(1): 12-17.)

[31] Zhang X X, Guo H J, Jiao J, et al. Pyrosequencing of *rpoB* uncovers a significant biogeographical pattern of rhizobial species in soybean rhizosphere[J]. Journal of Biogeography, 2017, 44(7): 1491-1499.

[32] 张星星. 大豆慢生根瘤菌分子进化学分析及土著大豆根瘤菌生物地理分布的高通量研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2014. (Zhang X X. Molecular evolutionary analysis of slow-growing soybean rhizobia and high-throughput study on the biogeographic distribution of indigenous soybean rhizobia [D]. Beijing: China Agricultural University, 2014.)

[33] Radutoiu S, Madsen L H, Madsen E B, et al. Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases[J]. Nature, 2003, 425(6958): 585-592.

[34] Giraud E, Moulin L, Vallenet D, et al. Legumes symbioses: Absence of Nod genes in photosynthetic bradyrhizobia [J]. Science, 2007, 316(5829): 1307-1312.

[35] D’Haeze W, Holsters M. Nodfactor structures, responses, and perception during initiation of nodule development [J]. Glycobiology, 2002, 12(6): 79-105.

[36] Chen W X, Yan G H, Li J L, Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1988, 38(4): 392-397.

[37] Zhou M L, Chen W M, Chen H Y, et al. Draft genome sequence of *Mesorhizobium alhagi* CCNWXJ12-2^T, a novel salt-resistant species isolated from the desert of northwestern China[J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(5): 1261-1262.

[38] Tian C F, Zhou Y J, Zhang Y M, et al. Comparative genomics of rhizobia nodulating soybean suggests extensive recruitment of lineage-specific genes in adaptations [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(22): 8629-8634.