



大豆慢生根瘤菌 3 种标记载体构建与应用

王小倩^{1,2}, 钟永嘉², 廖红²

(1. 福建农林大学 生命科学院, 福建 福州 350002; 2. 福建农林大学 根系生物学研究中心, 福建 福州 350002)

摘要:大豆与根瘤菌的共生固氮是农业生态系统中主要的氮来源之一,研究其互作机制意义重大,但是由于根瘤菌个体小,转化难,目前尚缺乏高效、稳定标记根瘤菌的方法,限制了其在互利共生方面的研究。为开发用于大豆与慢生根瘤菌互作研究的根瘤菌标记方法,本研究通过改造原始载体 pMG103,构建高效表达 tdTomato、GUS、LUC 的标记载体,以高效固氮的慢生根瘤菌株系 *Bradyrhizobium elkanii* BXYP3 为试验菌株,采用电击转化法进行标记。利用显微镜、GUS 染液、化学成像仪观察标记的 *B. elkanii* BXYP3 根瘤菌在大豆不同时期不同部位的定殖情况。结果表明:成功获得了 tdTomato、GUS 及 LUC 标记的慢生根瘤菌转化菌株,携带不同标记的慢生根瘤菌株 *B. elkanii* BXYP3 能在大豆根表及根瘤内稳定定殖,并且可满足不同试验需求。本研究建立了较为稳定的表达多种标记蛋白的载体,且能较好地应用于慢生根瘤菌株系中,为直观研究大豆与慢生根瘤菌的互作提供有效的方法参考。

关键词:慢生根瘤菌;大豆;标记;共生固氮;tdTomato;GUS;LUC

Construction and Application of Three Labeling Vectors for *Bradyrhizobia* in Soybean

WANG Xiao-qian^{1,2}, ZHONG Yong-jia², LIAO Hong²

(1. College of Life Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. Root Biology Center, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: Symbiotic nitrogen fixation between soybean and rhizobia is one of the most important sources of nitrogen for agricultural ecosystems. And it is of great significance to study its interaction mechanism. However, rhizobia are small and difficult to be labeled by transformation and lack of efficient and stable method for rhizobial labeling. This study aimed to provide a method for rhizobial labeling to investigate the interaction between soybean and *Bradyrhizobia*. In this study, the original vector pMG103 was modified to construct a labeled vector that efficiently expressed tdTomato, GUS, and LUC. *Bradyrhizobium elkanii* BXYP3, a slow-growing rhizobia strain with high nitrogen fixation, was used as the experimental strain and labeled by electric shock conversion. Microscope, GUS staining and chemoluminescence were used for BXYP3 colonization visualization. Our results suggested BXYP3 rhizobia was successfully labeled with different tags and labeling signaling were stable in different compartments of roots for different intentions. In summary, this study established a relatively stable vector expressing a variety of marker proteins, which should be well applied to *Bradyrhizobia* strains, providing effective method for studying the interaction between soybean and *Bradyrhizobia*.

Keywords: *Bradyrhizobia*; soybean; label; symbiotic nitrogen fixation; tdTomato; GUS; LUC

氮是植物生长发育中需求量最大的矿质营养元素,对植物的生长、发育至关重要^[1]。然而土壤中的氮素往往不能满足植物的生长需求,在农业活动中,人们通常通过施用化肥来满足作物生长发育所需,但是由于不合理的化肥施用造成了许多生态环境问题^[2-4]。地球上大部分的氮主要是以氮气的形式存在,占空气的 78%,但是氮气并不能被生物直接利用^[5]。生物固氮是自然界存在的,通过微生物的固定作用直接将氮气还原为氨,是生态系统氮的重要来源^[6]。因此,利用生物固氮降低化肥施用是解决以上难题的重要潜在策略。共生固氮是固

氮效率最高的生物固氮形式,主要发生在豆科植物与根瘤菌之间^[7-9]。据统计,豆科植物与根瘤菌之间的共生固氮约占生物固氮总量的 60% 以上,其中,大豆与根瘤菌间的共生固氮是农业生态系统中主要的氮来源之一^[7]。同时,根瘤菌固定的氮素不仅供豆科生长所需,还能与其他植物所用,是一种环境友好型的重要植物^[10-13]。因此,研究和充分利用共生固氮是农业可持续发展的重要保障。

目前,在大豆与根瘤菌的互作中已经有许多研究,与分子对话、信号转导、根瘤发育等过程相关^[14-15]。大豆能够与快生型根瘤菌和慢生型根瘤

收稿日期:2022-11-08

基金项目:国家重点研发计划项目子课题“玉米、大豆互作调控养分协同高效的机制”(2021YFF1000504)。

第一作者:王小倩(1998—),女,硕士研究生,主要从事植物营养学方面的研究。E-mail:wxqian0612@163.com。

通讯作者:钟永嘉(1987—),男,博士,教授,主要从事植物营养学方面的研究。E-mail:yongjiazhong@fafu.edu.cn。

菌共生结瘤^[16-17],但是由于慢生型根瘤菌存在生长速度慢,标记难等问题,大部分的研究主要利用快生型根瘤菌进行研究^[17-18]。目前对根瘤菌的标记主要有荧光蛋白标记^[19-20]、化学发光标记^[21]和化学反应显色^[22-23]等方法。然而,大部分的标记主要是在快生型根瘤菌上实现的,由于质粒存在不稳定易丢失的特性,容易导致标记信号弱且不稳定等情况出现^[24-25]。基于此,本研究使用两个载体的复制起始位点 pHSG298 ori 和 pMG101 ori,启动子选用细菌内的强启动子 *NPTII* 的稳定高效表达的 *pRBC*,构建 tdTomato、GUS、LUC 不同标记的 *Bradyrhizobium elkanii* BXYD3,为后续可视化研究大豆与根瘤菌之间的相互作用提供更成熟的技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

供试大豆品种为 Williams 82。供试根瘤菌为慢生根瘤菌 *Bradyrhizobium elkanii* BXYD3 (本实验室保存),供试大肠杆菌为 DH5 α 。

根瘤菌 YMA 培养基:甘露醇 10 g·L⁻¹、MgSO₄·7H₂O 0.2 g·L⁻¹、NaCl 0.1 g·L⁻¹、酵母提取物 3 g·L⁻¹、K₂HPO₄ 0.25 g·L⁻¹、KH₂PO₄ 0.25 g·L⁻¹、琼脂 15 g·L⁻¹。大肠杆菌 LB 培养基:Tryptone 10 g·L⁻¹、酵母提取物 5 g·L⁻¹、NaCl 10 g·L⁻¹、琼脂 15 g·L⁻¹。大豆营养液参考艾文琴等^[26]的大豆全营养液配方,根据试验所需对含量进行调整。

1.2 试验设计

利用电转的方式将改造好的外源表达载体 pRBC-NPTIIpro-tdTomato、pRBC-NPTIIpro-GUS、pRBC-NPTIIpro-LUC 导入到受体菌 *B. elkanii* BXYD3 的感受态细胞。在卡那抗性 YMA 平板上对阳性克隆进行筛选并鉴定。

向 5 d 苗龄的大豆根系,分别接种携带有 pRBC-NPTIIpro-tdTomato、pRBC-NPTIIpro-LUC 和 pRBC-NPTIIpro-GUS 载体的标记 *B. elkanii* BXYD3。在大豆生长期间提供低氮(NH₄⁺/NO₃⁻:200 μ mol·L⁻¹)营养液。培养一定时间后,挖出大豆根系,去除蛭石,于共聚焦荧光变倍显微镜下观察大豆根毛部位 tdTomato 荧光信号;向大豆根系喷施荧光底物

D-Luciferin sodium,置于化学发光检测仪器上进行检测,观察根瘤菌在大豆根系的定殖情况;将大豆根系浸泡在 GUS 染液中进行显色反应,通过蓝色信号指示根瘤菌在根系、根瘤内的定殖。

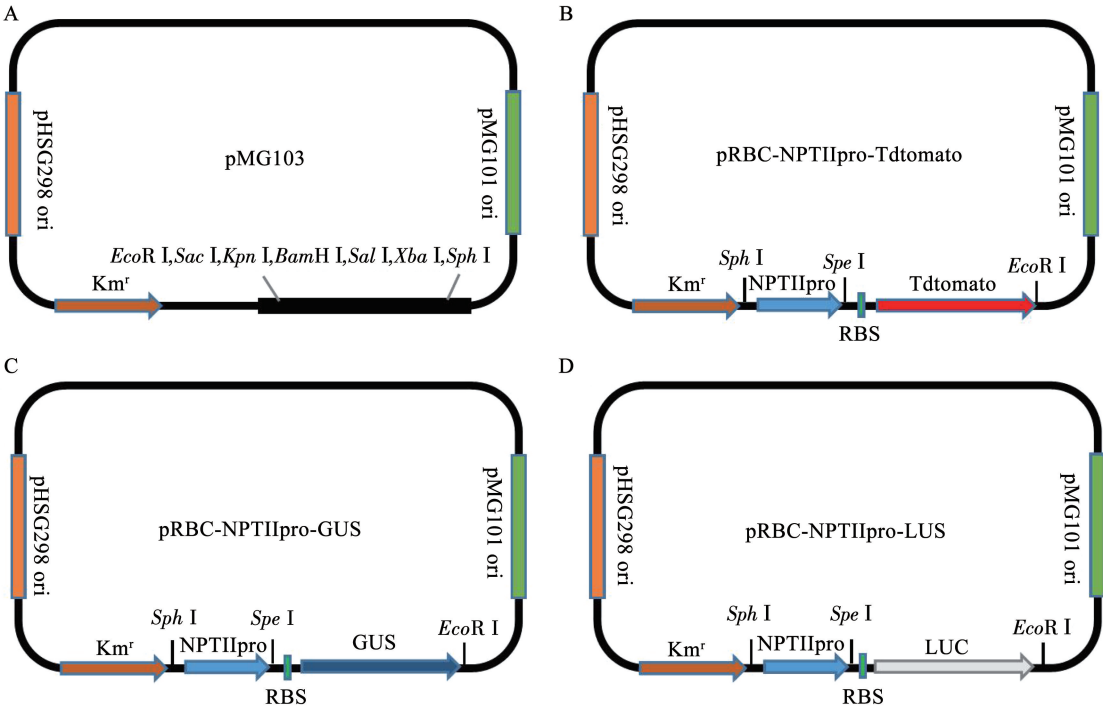
利用 pRBC-NPTIIpro-tdTomato 载体标记的 *B. elkanii* BXYD3,在激光共聚焦荧光变倍显微镜下观察根瘤菌在大豆成熟根瘤内细胞水平的定殖情况。

1.3 方法

1.3.1 载体构建 对原始载体 pMG103(图 1A)多克隆位点进行改造。在 *Sph* I(GCATGC)和 *Eco*R I(GAATTC)酶切位点间,添加 1 个 *Spe* I(ACTAGT)的内切酶酶切位点,改造后的载体命名为 pRBC。利用内切酶 *Sph* I 和 *Eco*R I 切开 pRBC 载体,将卡那启动子 NPTIIpro 连接在 tdTomato 荧光蛋白(tdTomato Fluorescent Protein, GenBank: CVH74135.1)的基因表达框,置于 *Sph* I(GCATGC)和 *Eco*R I(GAATTC)酶切位点之间,构建 pRBC-NPTIIpro-tdTomato 载体(图 1B),大小为 7 427 bp。GUS(β -glucuronidase, GenBank: ABO39209.1)及 LUC(Luciferase, GenBank: AKA95351.1)标记载体构建方法同上, pRBC-NPTIIpro-GUS、pRBC-NPTIIpro-LUC 载体示意图如图 1C 和图 1D 所示。

1.3.2 慢生根瘤菌 *B. elkanii* BXYD3 感受态制备

使用灭菌的接种环,蘸取 *B. elkanii* BXYD3 菌液,在 YMA 固体培养基上划线,置于 30 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中倒置培养 2~3 d。挑取 *B. elkanii* BXYD3 克隆至含有 5 mL YMA 液体培养基的 50 mL 离心管中,30 $^{\circ}$ C 200 r·min⁻¹震荡培养 2~3 d。将培养好的菌液在超净工作台中以 1:100 的比例稀释至含有 100 mL YMA 液体培养基的三角瓶中,30 $^{\circ}$ C、200 r·min⁻¹震荡培养至对数生长期(OD₆₀₀ = 0.3~0.5)。在超净工作台中将菌液转移至无菌的 50 mL 离心管中,冰上静置 30 min,4 $^{\circ}$ C、7 000 r·min⁻¹离心 8 min,收集菌体。使用冰预冷的无菌去离子水重悬菌体,于 4 $^{\circ}$ C、6 000 r·min⁻¹离心 10 min,收集菌体。重复上一步 2~3 次,完全去除培养基后,将水分吸干净后加入 2 mL 冰预冷的甘油(10%)重悬菌体,分装至 1.5 mL 离心管中(每管 50 μ L),液氮速冻后保存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱。



注:A. 原始载体 pMG103 图谱;B. pRBC-NPTIIpro-tdTomato 载体图谱;C. pRBC-NPTIIpro-GUS 载体图谱;D. pRBC-NPTIIpro-LUC 载体图谱。

Note:A. Construct of vector pMG103;B. Construct of vector pRBC-NPTIIpro-tdTomato;C. Construct of vector pRBC-NPTIIpro-GUS;D. Construct of vector pRBC-NPTIIpro-LUC.

图 1 载体图谱

Fig. 1 Construction of vectors

1.3.3 电转标记 将分别携带有 pRBC-NPTIIpro-tdTomato、pRBC-NPTIIpro-GUS、pRBC-NPTIIpro-LUC 载体的大肠杆菌 DH5α 在含有卡那霉素(50 μg·mL⁻¹)的 LB 培养基中扩大培养。利用质粒提取试剂盒(北京全式金生物技术有限公司, EasyPure® Plasmid MiniPrep Kit)提取质粒 pRBC-NPTIIpro-tdTomato、pRBC-NPTIIpro-GUS、pRBC-NPTIIpro-LUC。取 *B. elkanii* BXD3 感受态置于冰上解冻,加入 3~5 μL 浓度约为 300 ng·μL⁻¹的质粒 DNA,轻轻混匀,冰上静置 10

~15 min。将含有质粒 DNA 的感受态转移至 -20 ℃ 预冷 2 h 的电击转化杯中,1.25 kV·cm⁻¹电击两次,向电击转化杯中加入 800 μL YMA 液体培养基,用移液枪充分吸打后将菌液转移至 2.0 mL 离心管中。30 ℃ 恒温培养箱震荡培养 2 h,离心收集菌体,预留 200 μL 上清重悬菌体,用涂布棒涂布于含有 50 μg·mL⁻¹卡那霉素的 YMA 固体培养基的培养皿上,于 30 ℃ 培养 7~10 d 后鉴定(图 2)。

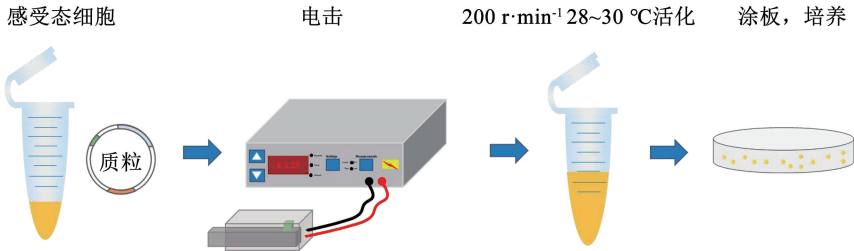


图 2 电击转化流程图

Fig. 2 Flow chart of electro-transformation assay

1.3.4 慢生根瘤菌接种液的制备 挑取转化有 pRBC-NPTIIpro-tdTomato、pRBC-NPTIIpro-GUS、pRBC-NPTIIpro-LUC 载体的 *B. elkanii* BXYD3 单克隆菌落至含有 1 mL YMA 的 2 mL 离心管中活化,3~5 d 后转移至含 500 mL YMA 的三角瓶中,培养至 OD₆₀₀ 约为 1.0,离心收集菌体。利用大豆低氮营养液将菌体,重悬配制 OD₆₀₀ 约为 0.3 的根瘤菌接种液。

1.3.5 不同标记的慢生根瘤菌鉴定 利用蔡司共聚焦荧光变倍显微镜鉴定 tdTomato 荧光标记的 *B. elkanii* BXYD3,观察单克隆菌落是否散发出红色荧光。

从转化 pRBC-NPTIIpro-GUS 和 pRBC-NPTIIpro-LUC 载体的细菌培养基平板上随机挑选单克隆菌落(以未转化的根瘤菌为对照),转移至 YMA 液体培养基中进行扩繁,培养至 OD₆₀₀ >0.5。

吸取 30 μL LUC 标记的 *B. elkanii* BXYD3 菌液与 LUC 底物(D-Luciferin sodium)等比例混匀,黑暗条件下反应 5 min,于全自动化学发光图像分析仪(Tannon5200)下检测并拍摄 LUC 荧光。选取荧光强度较强的单克隆根瘤菌进行保存。

吸取 30 μL GUS 标记的 *B. elkanii* BXYD3 菌液与 GUS 染液等比例混匀后,放置在 37 ℃ 恒温培养箱中,显色反应 30 min 左右,以未转化的根瘤菌为对照,观察菌液是否变蓝,未转化的根瘤菌对照不显蓝色,阳性克隆根瘤菌显蓝色。

1.3.6 荧光标记的慢生根瘤菌定殖观察 将大豆萌发所需的蛭石及小红盆进行高温高压(121 ℃、20 min)灭菌处理,种子经 70% 乙醇表面消毒后种植在蛭石中。将以上制备好的菌接种物(OD₆₀₀ = 0.3),每盆接种 50 mL,生长期间提供低氮(100 μmol·L⁻¹)大豆营养液下继续在蛭石中培养。培养 5 d,将接种携带 tdTomato 标记的 *B. elkanii* BXYD3 的大豆根系从蛭石中取出,去除蛭石,在蔡司激光共聚焦荧光

变倍显微镜下通过 RFP 荧光通道观察 *B. elkanii* BXYD3 在大豆根毛上的定殖情况。培养至 14 d 时将接种携带 LUC 标记的 *B. elkanii* BXYD3 的大豆根系从蛭石中取出,去除蛭石,在全自动化学发光图像分析仪(Tannon5200)下观察 *B. elkanii* BXYD3 在大豆根系的定殖情况。培养至 20 d 时从蛭石中取出接种携带 GUS 标记的 *B. elkanii* BXYD3 的大豆根系,浸泡在 GUS 染液中,37 ℃ 恒温培养箱中染色,观察根瘤是否有变蓝现象。取接种 30 d 携带 tdTomato 标记的 *B. elkanii* BXYD3 的大豆根瘤,将根瘤进行切片,利用蔡司激光共聚焦荧光变倍显微镜鉴定观察根瘤内荧光信号。

2 结果与分析

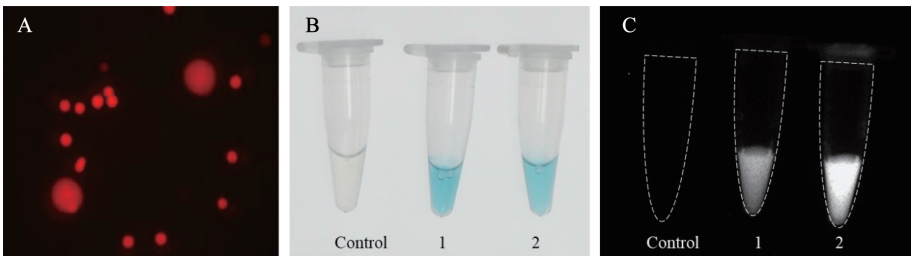
2.1 慢生根瘤菌 *B. elkanii* BXYD3 标记结果检测

如图 3A 所示,转化有 tdTomato 荧光标记的慢生根瘤菌 *B. elkanii* BXYD3 单克隆菌落在荧光的激发下产生了不同程度的红色荧光信号。

如图 3B 所示,将转化有 pRBC-NPTIIpro-GUS 载体的慢生根瘤菌 *B. elkanii* BXYD3 单克隆菌进行扩繁及 GUS 显色反应,未转化的根瘤菌对照不显现蓝色,而阳性根瘤菌克隆产生明显的蓝色,说明挑选的单克隆根瘤菌已经被 GUS 成功标记。

如图 3C 所示,从转化 pRBC-NPTIIpro-LUC 载体的细菌培养基平板上挑选单克隆菌落(以未转化的根瘤菌为对照),进行扩繁及显色反应,未标记的根瘤菌中检测不到明显的发光信号,而阳性根瘤菌克隆产生了明显的信号,说明挑选的单克隆根瘤菌已经被 LUC 成功标记。

以上的结果表明通过电转的方式成功使 *B. elkanii* BXYD3 携带以上 3 种标记,可用于后续研究。



注:A. tdTomato 荧光图;B. GUS 染色图;C. LUC 荧光图。
Note: A. tdTomato fluorescence map; B. GUS staining map; C. LUC fluorescence map.

图 3 *B. elkanii* BXYD3 标记结果
Fig. 3 Results of *B. elkanii* BXYD3 labeling

2.2 标记的 *B. elkanii* BXYD3 在大豆上定殖

如图 4A 所示, pRBC-NPTIIpro-tdTomato 载体标记的 *B. elkanii* BXYD3 在大豆根系的根表上以及大豆的根毛上可以检测到荧光信号, 特别是在因受到侵染而发生形变卷曲的根毛上有较强的荧光信号, 说明根瘤菌在此形成了微克隆, 表明 tdTomato 标记的 *B. elkanii* BXYD3 能用于观察慢生根瘤菌在大豆根系上的定殖情况。

如图 4B 所示, 在大豆根系的根基部和主根上检测到强烈的 pRBC-NPTIIpro-LUC 载体标记的 *B. elkanii* BXYD3 的 LUC 荧光信号, 而在基根和侧根上的信号相对较弱, 表明在大豆苗期, *B. elkanii* BXYD3 主要在大豆的根基部及主根部位大量定殖。结果说明 LUC 标记的 *B. elkanii* BXYD3 可以用于在组织和器官水平上观察根瘤菌在整体根系上的

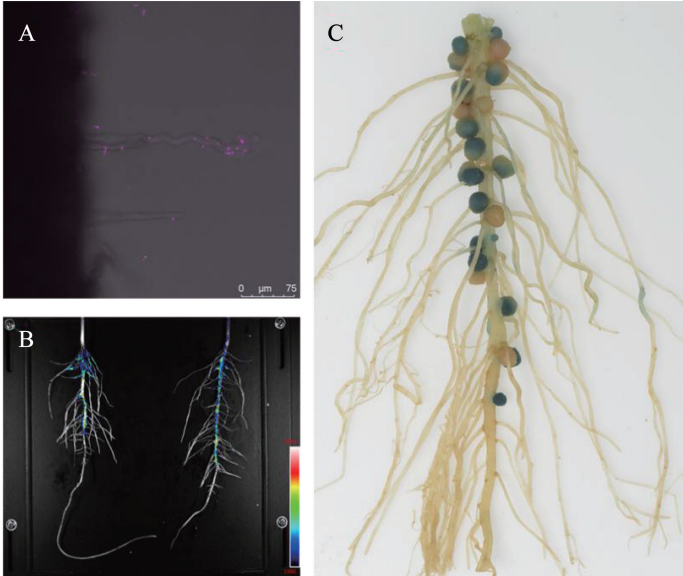
不同部位的定殖情况。

如图 4C 所示, 低氮培养 20 d 后, 接种携带 GUS 标记的 *B. elkanii* BXYD3 的大豆根系形成的根瘤上具有明显的蓝色信号, 在部分侧根和主根部分也具有少量的蓝色信号。

以上结果说明, 携带 tdTomato、LUC、GUS 标记的 *B. elkanii* BXYD3 可用于观察慢生根瘤菌在大豆根系及根瘤的定殖情况。

2.3 标记的 *B. elkanii* BXYD3 根内定殖情况

如图 5 所示, 在 tdTomato 红色荧光标记的 *B. elkanii* BXYD3 接种大豆之后, 在无抗生素存在的条件下, 经过多代的繁殖, 在大豆根瘤内仍然能够检测到强烈的红色荧光信号, 表明 tdTomato 标记的 *B. elkanii* BXYD3 能够稳定的表达 tdTomato 荧光蛋白, 可用于在根瘤细胞水平观察根瘤菌定殖。



注: A. 大豆根毛 tdTomato 荧光图; B. 大豆根系 LUC 荧光图; C. 大豆根瘤 GUS 染色图。

Note: A. tdTomato fluorescence map of soybean root hair; B. LUC fluorescence map of soybean root system; C. GUS staining map of soybean root nodules.

图 4 *B. elkanii* BXYD3 在大豆根系/根瘤上的定殖情况

Fig. 4 Colonization of *B. elkanii* BXYD3 on soybean roots and nodules

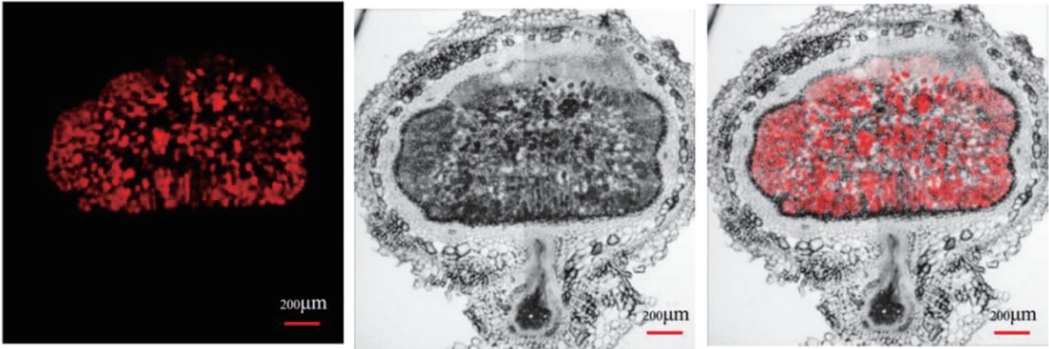


图 5 大豆根瘤切片荧光检测

Fig. 5 Fluorescence detection of soybean nodule sections

3 讨论

随着大豆与根瘤菌互作研究的深入,特别是在结瘤、共生固氮方面尤为突出^[27-29]。虽然通过显色标记的方式来研究大豆与根瘤菌之间的相互作用已有部分报道,但是目前荧光标记载体大多采用单个复制起始位点,如刘伟等^[30]和琚慧敏等^[31]研究中所构建的荧光表达载体均只采用一个复制起始位点。其他研究表明解淀粉芽孢杆菌和溶磷草木樨中华根瘤菌中所用的绿色荧光蛋白标记载体携带有两个复制起始位点,遗传稳定性较好^[32-34]。本研究改造的载体也采用了两个复制起始位点,相比于单个复制起始位点的载体而言,一定程度上能够增加质粒的拷贝数,降低细胞分裂导致的质粒丢失概率。此外,本研究中供试载体使用的是细菌卡那抗性基因的启动子 NPTII 启动子,NPTII 启动子是细菌内的强启动子,能够持续地激活下游基因转录,增强标记基因表达。本研究中在成熟的根瘤内依然观察到较强的荧光信号,证明本研究的载体具有较强的信号优势。

本研究中对于不同显色标记对探究大豆与根瘤菌互作的应用表明,LUC 标记的 *B. elkanii* BXYD3 可用于细菌在不同部位上的定殖情况的整体观察,例如在植物的根基部、中段、侧根及根尖等,可应用于研究不同试验处理对该菌在根系上定殖的影响。对 GUS 标记的 *B. elkanii* BXYD3 大豆根瘤进行染色后可以看到明显的变蓝现象,可广泛应用于根际微生物竞争方面的研究。tdTomato 标记的 *B. elkanii* BXYD3 在根瘤内荧光强度高、持续时间长,可直接观察。但以上 3 种显色标记也均存在一定缺陷,如 tdTomato 标记存在一定的背景荧光,LUC、GUS 的显色是通过与底物进行反应实现的。后期可以进一步改造并构建一个半衰期更短、检测效率更高的 LUX 标记根瘤菌,通过自身携带的 *lux* (CDABE) 基因簇编码合成荧光素酶及其相应的发光底物而产生独特的光信号,免去添加荧光底物的操作,从而直接在全自动化学发光图像分析仪观察到荧光信号^[35-37]。

综上,携带本研究中 3 种不同标签标记的慢生根瘤菌 BXYD3 均可用于豆科植物与根瘤菌之间互作的研究。本研究仅在大豆的苗期进行了初步验证,在大豆的成熟期以及在大田情况下是否可行仍

需更多的试验验证。另外,该载体目前只在慢生根瘤菌 BXYD3 单一菌种中使用,在其他细菌中的适用性还有待进一步探究。

4 结论

本研究通过载体改造的方式构建了能够稳定表达不同标签的载体 (pRBC-NPTIIpro-tdTomato、pRBC-NPTIIpro-GUS、pRBC-NPTIIpro-LUC) 并电转方式转化慢生根瘤菌 *B. elkanii* BXYD3,成功获得了 tdTomato、GUS 及 LUC 标记的慢生根瘤菌转化菌株,并且能在大豆根表及根瘤内稳定定殖。研究结果为后续大豆 - 慢生根瘤菌互作研究提供了方法和技术参考。

参考文献

[1] 贾志荣, 张美俊, 杨武德. 施氮对套作玉米氮素吸收利用的影响[J]. 山西农业科学, 2017, 45 (12) : 1960-1964, 2031. (JIA Z R, ZHANG M J, YANG W D. Effects of nitrogen fertilizer on nitrogen uptake and utilization of intercropped maize [J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2017, 45 (12) : 1960-1964, 2031.)

[2] 周丽萍, 戚瑞生. 不合理施肥对土壤性质的影响及其防治措施探讨[J]. 甘肃农业科技, 2017(1) : 74-78. (ZHOU L P, QI R S. Effect of unreasonable fertilizer on soil property and its controlling measures [J]. Gansu Agricultural Science and Technology, 2017(1) : 74-78.)

[3] 姜晶晶. 过量施肥对土壤微生物群落结构的影响[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2017. (JANG J J. Effects of excessive fertilization on soil microbial community structure [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2017.)

[4] 刘芳, 刘帅. 化肥施用量对中国粮食产量的影响分析[J]. 中国农机化学报, 2021, 42(8) : 92-100. (LIU F, LIU S. Analysis of the effect of chemical fertilizer application on grain yield in China [J]. Journal of Chinese Agricultural Mechanization, 2021, 42(8) : 92-100.)

[5] 徐亚同, 史家梁, 张大鹏. 废水处理 第八篇 生物脱氮[J]. 上海化工, 1998(20) : 40-42. (XU Y T, SHI J L, ZHANG D P. Waste water treatment-bio-denitrification [J]. Shanghai Chemical Industry, 1998(20) : 40-42.)

[6] BRUIJN F J, HUNGRIA M. Biological nitrogen fixation [M] // DE BRUIJN F J, SMIDTH, COCOLIN L S, et al. Good microbes in medicine, food production, biotechnology, bioremediation, and agriculture; Chapter 37. Hoboken: John Wiley & Sons Ltd, 2022 : 466-475.

[7] HERRIDGE D F, PEOPLES M B, BODDEY R M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems[J]. Plant and

- Soil, 2008, 311(1): 1-18.
- [8] 张秋磊, 林敏, 平淑珍. 生物固氮及在可持续农业中的应用[J]. 生物技术通报, 2008(2): 1-4. (ZHANG Q L, LIN M, PING S Z. Biological nitrogen fixation and its application in sustainable agriculture[J]. Biotechnology Bulletin, 2008(2): 1-4.)
- [9] SESSITSCH A, HOWIESON J G, PERRET X, et al. Advances in rhizobium research[J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 2002, 21(4): 323-378.
- [10] 刘丽, 马鸣超, 姜昕, 等. 根瘤菌与促生菌双接种对大豆生长和土壤酶活的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2015, 21(3): 644-654. (LIU L, MA M C, JIANG X, et al. Effect of rhizobia and PGPR co-inoculant on soybean characteristics and soil enzyme activities[J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizer, 2015, 21(3): 644-654.)
- [11] 郭丽琢, 马剑, 黄高宝. 根瘤菌接种对豌豆产量及根际微生物数量的影响[J]. 农业现代化研究, 2010, 31(5): 630-633. (GUO L Z, MA J, HUANG G B. Effect of rhizobia inoculation on pea yield and microbial number in pea rhizosphere soil [J]. Research of Agricultural Modernization, 2010, 31(5): 630-633.)
- [12] 郑永美, 杜连涛, 王春晓, 等. 不同花生品种根瘤固氮特点及其与产量的关系[J]. 应用生态学报, 2019, 30(3): 961-968. (ZHENG Y M, DU L T, WANG C X. Nitrogen fixation characteristics of root nodules in different peanut varieties and their relationship with yield[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2019, 30(3): 961-968.)
- [13] 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. Contributions of symbiotic nitrogen fixation in soybean to reducing fertilization while increasing efficiency in agriculture [J]. Soybean Science, 2016, 35(4): 531-535.)
- [14] QIN L, ZHAO J, TIAN J, et al. The high-affinity phosphate transporter GmPT5 regulates phosphate transport to nodules and nodulation in soybean [J]. Plant Physiology, 2012, 159(4): 1634-1643.
- [15] LI X, ZHOU H, CHENG L, et al. Shoot-to-root translocated GmNN1/FT2 a triggers nodulation and regulates soybean nitrogen nutrition[J]. PLoS Biology, 2022, 20(8): e3001739.
- [16] 丑敏霞, 魏新元. 豆科植物共生结瘤的分子基础和调控研究进展[J]. 植物生态学报, 2010, 34(7): 876-888. (CHOU M X, WEI X Y. Review of research advancements on the molecular basis and regulation of symbiotic nodulation of legumes [J]. Chinese Journal of Plant Ecology, 2010, 34(7): 876-888.)
- [17] 郭慧娟. 大豆快生根瘤菌共生基因的遗传分化及快慢生根瘤菌对土壤微生物的影响比较[D]. 北京: 中国农业大学, 2014. (GUO H J. Replicon-dependent differentiation of symbiosis-related genes in *Sinorhizobium* strains and the effect on soil microbial community of *Sinorhizobium* and *Bradyrhizobium* [D]. Beijing: China Agricultural University, 2014.)
- [18] 汤晖, 隋新华, 陈文新. 高效快生型大豆根瘤菌的筛选及分子标记[J]. 大豆科技, 2007(4): 35-38. (TANG H, SUI X H, CHEN W X. Screening of high efficient symbiotic fast-growing rhizobia strains of soybean and molecular markers [J]. Soybean Science & Technology, 2007(4): 35-38.)
- [19] 杨晓玫, 周彤, 阿芸, 等. 苜蓿根瘤菌绿色荧光蛋白标记株的构建及对菌株结瘤固氮能力的影响[J]. 草原与草坪, 2018, 38(1): 44-49, 56. (YANG X M, ZHOU T, A Y, et al. Establishment and nodular nitrogen fixation effect of green fluorescent protein labeled strains of alfalfa rhizobia[J]. Grassland and Turf, 2018, 38(1): 44-49, 56.)
- [20] 王浩, 绳志雅, 隋新华, 等. 用 *gfp* 基因标记法研究大豆根瘤菌在大豆根部定殖结瘤情况[J]. 微生物学杂志, 2006(2): 1-4. (WANG H, SHENG Z Y, SUI X H, et al. Adoption of *gfp* marker gene method to study soybean rhizobium and the state of nodulation residence on soybean root [J]. Journal of Microbiology, 2006(2): 1-4.)
- [21] 罗明云, 张小平, 李登煜, 等. 用发光酶基因 (*luxAB*) 标记法研究慢生花生根瘤菌的竞争结瘤能力[J]. 生态学报, 2003(2): 278-283. (LUO M Y, ZHANG X P, LI D Y, et al. The competitiveness of *Bradyrhizobium* sp. (*Arachis*) studied by using *luxAB* marker gene technique [J]. Acta Ecologica Sinica, 2003(2): 278-283.)
- [22] 梁善范. 接种根瘤菌 HN01 及其突变株 GXHN100 对大豆根系结瘤及微生物生态的影响[D]. 南宁: 广西大学, 2007. (LIANG S F. Nodulation and microbial ecology of soybean endorhizosphere affected by inoculated rhizobial HN01 and mutant GXHN100 [D]. Nanning: Guangxi University, 2007.)
- [23] DIOUF A, SPENCER M M, GUEYE M. Use of the *gusA* gene marker in a competition study of the rhizobium strains nodulating the common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Senegal soils [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2000, 16(4): 337-340.
- [24] 孟颂东, 张忠泽. 应用 *GUS* 基因研究弗氏中华根瘤菌的结瘤及效果[J]. 应用生态学报, 1997(6): 595-598. (MENG S D, ZHANG Z Z. Studies on nodulation and efficiency of *S. fredii* using *GUS* gene [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 1997(6): 595-598.)
- [25] 廖何斌, 徐磊, 杨国淋, 等. 构建化学发光-绿色荧光稳定标记的鼠伤寒沙门氏菌[J]. 微生物学杂志, 2018, 38(5): 84-89. (LIAO H B, XU L, YANG G L, et al. The construction of stable chemiluminescence-green fluorescent marked *Salmonella typhimurium* [J]. Journal of Microbiology, 2018, 38(5): 84-89.)
- [26] 艾文琴, 姜瀚原, 李欣欣, 等. 一种高效研究大豆根瘤共生固氮的营养液栽培体系[J]. 植物学报, 2018, 53(4): 519-527. (AI W Q, JIANG H Y, LI X X, et al. An efficient nutrient solution system to study symbiotic nitrogen fixation in soybean [J]. Chinese Bulletin of Botany, 2018, 53(4): 519-527.)
- [27] REN B, WANG X, DUAN J, et al. Rhizobial tRNA-derived small

RNAs are signal molecules regulating plant nodulation [J]. Science, 2019, 365(6456): 919-922, 389.

[28] 张亚梅. 盐胁迫对陇黄品种大豆-根瘤菌共生体系及其微生物群落影响的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2022. (ZHANG Y M. Effects of salt stress on the Longhuang variety soybean-rhizobia symbiosis system and its microbial community [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2022.)

[29] 王晓丽, 王敏, 岳爱琴, 等. 氮素营养和根瘤菌接种对大豆结瘤固氮和生长的影响[J]. 华北农学报, 2022, 37(1): 95-102. (WANG X L, WANG M, YUE A Q, et al. Effects of nitrogen nutrition and rhizobium inoculation on nodulation and nitrogen fixation and growth of soybean[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2022, 37(1): 95-102.)

[30] 刘伟, 王杰, 幸永明, 等. 绿色荧光蛋白标记 *SOX9* 基因慢病毒载体的构建及在兔骨髓间充质干细胞中的表达[J]. 中国实验诊断学, 2017, 21(1): 140-145. (LIU W, WANG J, XING Y M, et al. Construction of a *SOX9* gene recombinant lentivirus vector marked by green fluorescent protein and it's expression in rabbit bone marrow derived mesenchymal stem cells [J]. Chinese Journal of Laboratory Diagnosis, 2017, 21(1): 140-145.)

[31] 据慧敏, 杨键, 张偲, 等. 荧光标记珊瑚组织来源细菌及其与虫黄藻相互作用的显微观察[J]. 微生物学通报, 2021, 48(2): 351-361. (JU H M, YANG J, ZHANG S, et al. Labeling a coral tissue-derived bacterium with stable fluorescence and microscopic observation of the interaction between the labeled strain and Symbiodiniaceae[J]. Microbiology China, 2021, 48(2): 351-361.)

[32] 田涛, 亓雪晨, 王琦, 等. 芽孢杆菌绿色荧光蛋白标记及其在小麦体表定殖的初探[J]. 植物病理学报, 2004(4): 346-351. (TIAN T, QI X C, WANG Q, et al. Colonization study of GFP-tagged *Bacillus* strains on wheat surface[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2004(4): 346-351.)

[33] 杨潇湘, 黄小琴, 张蕾, 等. 绿色荧光蛋白标记解淀粉芽孢杆菌 Bam22 在油菜体内的定殖[J]. 中国农学通报, 2022, 38(1): 125-130. (YANG X X, HUANG X Q, ZHANG L, et al. Colonization of GFP-labelled *Bacillus amyloliquefaciens* Bam22 in *Brassica napus*[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2022, 38(1): 125-130.)

[34] 任嘉红, 刘辉, 姜楠, 等. GFP 标记溶磷草木樨中华根瘤菌 CHW10B 及其定殖[J]. 林业科学, 2015, 51(1): 74-79. (REN J H, LIU H, JIANG N, et al. Sinorhizobium meliloti CHW10B strain GFP-labelling and its colonization associated with *Taxus chinensis* var. *mairei*[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2015, 51(1): 74-79.)

[35] 王靖. *lux* 基因重组铜绿假单胞菌的发光特性、抑菌评估和生物膜形成机理探究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2020. (WANG Q. Studies on luminescence characteristics, bacteriostatic evaluation, and exploration of biofilm formation mechanism of *lux*-tagged recombinant luminescent *Pseudomonas aeruginosa* [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2020.)

[36] 刘健, 李俊, 姜昕, 等. 巨大芽孢杆菌 *luxAB* 标记菌株的根际定殖研究[J]. 微生物学通报, 2001(6): 1-4. (LIU J, LI J, JIANG X, et al. Study on root colnization of wheat by *luxAB* genes-marked *Bacillus megaterium* ATCC1458 [J]. Microbiology China, 2001(6): 1-4.)

[37] ZOTTA T, GUIDONE A, IANNIELLO R G, et al. Temperature and respiration affect the growth and stress resistance of *Lactobacillus plantarum* C17[J]. Journal of Applied Microbiology, 2013, 115(3): 848-858.

协 办 单 位

中国作物学会大豆专业委员会
东北农业大学大豆研究所
吉林省农业科学院大豆研究所
南京农业大学大豆研究所
辽宁省农业科学院作物研究所
河北省农林科学院粮油作物研究所