

四川地区结瘤大豆根际土壤中紫云英、苜蓿和三叶草根瘤菌的多样性分析*

李艳梅 钟宇舟 谭 渊 何中山 徐雯芳 陈 强 余秀梅**

四川农业大学资源环境学院微生物系 成都 610041

摘 要 为了解四川地区结瘤大豆根际土壤是否存在与紫云英、苜蓿和三叶草共生结瘤的根瘤菌及其多样性,从四川盆地采集不同种植模式下结瘤大豆根际土壤样品31份,利用紫云英、苜蓿和三叶草进行盆栽捕获试验以获得共生根瘤,从根瘤中分离纯化出根瘤菌,对其进行表型和分子鉴定;并将根瘤菌回接到紫云英、苜蓿、三叶草和大豆根际以检测根瘤菌的寄主范围。在捕获实验中,苜蓿和三叶草分别在6个土壤样品中共生结瘤,而紫云英只在2个土样中共生结瘤,并从共生根瘤中分离出14株根瘤菌;16S rDNA基因序列的相似性分析表明这14株根瘤菌均属于根瘤菌属(*Rhizobium*),且16S rDNA基因的系统发育树揭示它们分属于根瘤菌属的不同种;这14株根瘤菌在回接实验中都只能让捕获豆科植物结瘤,而不能让其他3种豆科植物结瘤。本研究结果表明,四川地区结瘤大豆根际土壤中的紫云英根瘤菌(*Rhizobium astragali*)、苜蓿根瘤菌(*R. meliloti*)和三叶草根瘤菌(*R. leguminosarum* var. *trifolii*)资源较少,其与大豆根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*)分属于不同的属,且根瘤菌的回接实验进一步证明了根瘤菌的寄主专一性。图1 表2 参33

关键词 根瘤菌;大豆根际土壤;紫云英;苜蓿;三叶草

CLC S154.381(271)

Diversity of rhizobia nodulating *Astragalus sinicus*, *Medicago sativa* and *Trifolium repens* in nodulated soybean rhizosphere soil in Sichuan*

LI Yanmei, ZHONG Yuzhou, TAN Yuan, HE Zhongshan, XU Wenfang, CHEN Qiang & YU Xiumei**

Department of Microbiology, College of Resource and Environmental Sciences, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China

Abstract This study collected thirty-one rhizosphere soil samples of nodulated soybean with different planting styles from the Sichuan Basin to analyze whether rhizobia nodulating with *Astragalus sinicus*, *Medicago sativa* and *Trifolium repens* appear around the nodulated soybean rhizosphere, and to understand their diversity. Three leguminous plants of *A. sinicus*, *M. sativa* and *T. repens* were planted in the 31 soil samples to capture rhizobia. Rhizobia strains were isolated from different root nodules, and then phenotype and molecule identification were performed for them. To test the nodulating host scope, rhizobia isolates were inoculated to *A. sinicus*, *M. sativa*, *T. repens* and *Glycine max*. The capture results showed that both *M. sativa* and *T. repens* were nodulated in six different soil samples, whereas *A. sinicus* was nodulated in two soil samples. All together 14 representative rhizobia strains were isolated from the 14 root nodule samples. Similarity analysis of 16S rDNA genes identified the 14 representative rhizobia strains as *Rhizobium* genus. Phylogenetic tree of 16S rDNA genes indicated that the 14 representative stains were different species of *Rhizobium* genus. Nodulation test for each leguminous plants showed that the rhizobia strains could nodulate only the original leguminous plant but not any other. The research result indicated limited resource of *Rhizobium astragali*, *R. meliloti* and *R. leguminosarum* var. *trifolii* in the nodulated soybean rhizosphere soil with rich *Bradyrhizobium japonicum* of Sichuan, and that the limited rhizobia strains are of different genus from *B. japonicum*. The host specificity of rhizobia is also confirmed by the nodulation test.

Keywords rhizobia; soybean rhizosphere soil; *Astragalus sinicus*; *Medicago sativa*; *Trifolium repens*

收稿日期 Received: 2014-08-20 接受日期 Accepted: 2014-10-21

*教育部博士点基金项目(20135103120003)、国家自然科学基金项目(31300461)、四川农业大学“人才引进项目”和四川农业大学大学生创新性实验计划项目和科研兴趣计划项目资助 Supported by the Doctoral Fund of Ministry of Education of China (20135103120003), the National Natural Science Foundation of China (31300461), the Research Foundation for the Introduction of Talent of Sichuan Agricultural University, and the Innovative Experiment and Research Interest Project for Undergraduates of Sichuan Agricultural University

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: yuxiumeicool@163.com)

根瘤菌 (*Rhizobia*) 是一类广泛分布于土壤中的革兰氏阴性细菌, 可以侵染豆科植物根部形成根瘤, 固定空气中的分子态氮形成氨, 为植物提供氮素营养, 所固定的氮约占生物固氮总量的65%^[1]. 早期的根瘤菌分类以互接种族和寄主范围及一些简单的形态和生理性状为依据^[2]. 随着现代分子生物学技术的迅速发展, 根瘤菌分类学不断地被补充与完善, 根瘤菌系统发育研究更加趋于系统化、科学化. 目前为止, 根瘤菌科已发展到13属90种^[3], 主要有根瘤菌属 (*Rhizobium*)、中华根瘤菌属 (*Sinorhizobium*)、中慢生根瘤菌属 (*Mesorhizobium*)、慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*)、固氮根瘤菌属 (*Azorhizobium*)、土壤杆菌属 (*Agrobacterium*)、叶瘤菌属 (*Phyllobacterium*) 等; 其中慢生根瘤菌是固氮体系中最主要的根瘤菌^[4]. 近年来, “可持续农业”和“绿色农业”的提出更使得科研工作者越来越重视生物氮肥的制造者——根瘤菌, 因此, 根瘤菌的属种分类还会逐渐增多.

大豆是世界上种植面积最大的油料作物和饲料作物之一, 我国是大豆的种植大国和大豆根瘤菌的发源地, 因此大豆根瘤菌的资源十分丰富^[5]. 四川是主要的种植大省之一, 大豆种植推广新型的种植模式, 其中“麦/玉/豆”和“麦/玉/豆+苕”模式是四川发展大豆生产的主要模式^[6]. 利用土著的大豆根瘤菌可以发展推广大豆与其他作物种植模式, 研究价值较大. 我国的土壤中含有与大豆共生结瘤的根瘤菌较多, 主要包括慢生根瘤菌属中的日本慢生根瘤菌 (*B. japonicum*)、辽宁慢生根瘤菌 (*B. liaoningense*)、圆明慢生根瘤菌 (*B. yuanmingense*) 和艾尔坎慢生根瘤菌 (*B. elkanii*), 中华根瘤菌属中的费氏中华根瘤菌 (*S. fredii*) 以及中慢生根瘤菌属中的天山中慢生根瘤菌 (*M. tianshanense*) 等^[3]. 1982年, Harold从大豆根瘤中分离出的快生型根瘤菌与慢生型大豆根瘤菌完全不一样, 但能够使大豆结瘤固氮^[7]. 快生型大豆根瘤菌 (*R. fredii*) 生长速度快, 耐盐、耐碱且有很强的结瘤竞争能力, 对大豆品种有明显的选择性, 但能与我国的栽培大豆有效共生, 当两者形成良好的共生体系后固氮效果可超过日本慢生根瘤菌, 并能够被很好地应用于农业生产中^[8].

四川地区豆科植物较多, 作为饲料和肥料的紫云英、苕蓿和三叶草在部分地区也有小面积种植, 但不像大豆一样被推广. 紫云英不仅可以作为绿肥, 还具有较高的食用、饲用价值, 其根瘤菌的寄主范围较窄, 感染性比较专一, 接种根瘤菌在其种植成败中起着关键作用, 且多年种植紫云英的地区接种优良的根瘤菌也能促进地上部分的增产^[9]. 苕蓿是一种豆科牧草, 口感好, 营养高, 适合大面积饲料种植, 其根瘤菌的固氮能力与根瘤菌的结瘤能力有关, 接种筛选高效根瘤菌后, 固氮效率较高^[10]. 三叶草具有生长范围广的特点, 便于种植和管理, 且其优越的固氮性能对于草料产量的提高和畜牧业的发展尤为关键, 但其根瘤菌的研究相对较少^[11].

四川地区的土壤类型主要是紫色土壤, 主要分布在遂宁、绵阳、资阳、乐山、自贡等多地. 黄怀琼等人研究发现种植过大豆的紫色土壤中根瘤菌数量和种类明显多于种植非大豆植物紫色土壤, 同时证明了四川地区紫色土壤中含有丰富的大豆根瘤菌^[12]. 本研究实验采集的土壤样品主要是四川地区的结瘤大豆根际紫色土壤, 所以土样中含有丰富的土著根瘤菌. 目前, 虽有对四川地区三叶草和苕蓿根瘤菌多样性

分析的相关研究报道, 但尚未见到四川地区紫云英根瘤菌多样性的研究报道, 而且也没发现四川地区其他的豆科植物根瘤菌与三叶草、紫云英和苕蓿共生结瘤的相关报道. 鉴于此, 本研究通过盆栽捕获试验分析四川地区结瘤大豆根际土壤中是否存在与紫云英、苕蓿和三叶草共生结瘤的根瘤菌, 并分析其多样性, 旨在为在四川地区种植紫云英、苕蓿和三叶草提供可利用的菌株资源, 并为充分利用土地资源开展大豆与紫云英、苕蓿和三叶草等豆科植物的轮作种植提供依据.

1 材料与方法

1.1 材料

2012年8月从四川乐山、峨眉、绵阳、广安、南充、简阳、眉山等地采集31份结瘤大豆根际土壤 (表1). 大豆种植模式包括大豆、玉米-大豆套种、花生-大豆套种、红苕-大豆套种、玉米-大豆-红薯套作. 采集结瘤的大豆根际土壤 (根表面10 cm范围内) 装于无菌自封袋中, 带回实验室在室温黑暗条件下短期保存, 并尽快进行豆科植物盆栽捕获根瘤菌试验.

1.2 方法

1.2.1 豆科植物盆栽实验 选择紫云英、苕蓿和三叶草大小相近且完好无损的种子, 用纱布包裹于95%的酒精浸泡30 s, 0.1%的HgCl₂溶液浸泡灭菌5 min, 无菌水清洗5-6次^[13]; 撒在灭菌的琼脂糖固体培养基 (15 g L⁻¹) 上, 置于温室避光发芽. 将发芽的种子种在装有大豆根际土壤的花盆中, 深度3-4 cm, 放置在光照室培养3个月后, 调查并收集根瘤. 种植过程中, 每隔3-5 d补充灭菌的无氮营养液^[14] (MgSO₄·7H₂O 0.1 g L⁻¹, CaSO₄ 0.46 g L⁻¹, K₂HPO₄ 0.136 g L⁻¹, KCl 0.75 g L⁻¹, 柠檬酸铁0.075 g L⁻¹, H₂BO₃ 2.86 mg L⁻¹, MnSO₄ 1.81 mg L⁻¹, ZnSO₄ 2.2 mg L⁻¹, CuSO₄·5H₂O 0.8 mg L⁻¹, H₂MoO₄ 0.02 mg L⁻¹).

1.2.2 菌株的分离、纯化和保存 用蒸馏水洗净根瘤表面的土壤后, 用0.1%的升汞溶液表面灭菌3 min, 再用75%的乙醇溶液再次表面灭菌5 min, 然后用无菌水冲洗5次以确保根瘤菌表面无残留升汞和乙醇^[15]; 取3颗根瘤放置在牛肉膏培养基^[16] (牛肉膏5.0 g L⁻¹、蛋白胨10 g L⁻¹、NaCl 5.0 g L⁻¹、琼脂粉18 g L⁻¹, pH值为7.2-7.4) 平板上培养24h以检测表面灭菌是否彻底. 于无菌条件下, 选取表面灭菌彻底的根瘤放入无菌EP管中, 用无菌镊子压破根瘤后, 用无菌接种环沾取根瘤浆液, 在YMA培养基^[16] (甘露醇5.0 g L⁻¹, 酵母粉1.0 g L⁻¹, K₂HPO₄ 0.5 g L⁻¹, MgSO₄·7H₂O 0.2 g L⁻¹, NaCl 0.1 g L⁻¹, CaCO₃ 3.0 g L⁻¹, 琼脂粉18 g L⁻¹, pH 7.0) 上进行平板划线, 28 °C培养箱中培养3-12 d后, 挑取在YMA培养基上不吸刚果红色素呈乳白色略透明且有粘性的单菌落^[17], 观察菌体形态, 以获得表型似根瘤菌的菌株, 保种于YMA斜面上 (-20 °C) 和30%甘油管 (-80 °C) 中.

1.2.3 菌株的生理生化鉴定 为了进一步证明分离菌株为根瘤菌, 将分离保存的根瘤菌进行部分生理生化实验^[18]: 首先, 进行3-酮基乳糖反应, 用无菌接种环点种菌株在3-酮基乳糖培养基上, 置于28 °C培养箱培养2 d, 长出明显的菌落后, 加本迪尼克特试剂掩盖菌落, 室温放置1 h, 观察菌落的颜色变化, 菌落周围未出现黄褐色沉淀的则可初判定为根瘤

表1 结瘤大豆根际土样信息及紫云英、苜蓿和三叶草捕获分离的根瘤菌
Table 1 Characteristics of soil samples from nodulated soybean rhizosphere and the rhizobia strains captured by *Astragalus sinicus*, *Medicago sativa* and *Trifolium repens*

土样 Soil sample	采集地点 Collection site	经纬度 Longitude and latitude	大豆种植模式 Planting pattern of soybean	紫云英 <i>Astragalus sinicus</i>	苜蓿 <i>Medicago sativa</i>	三叶草 <i>Trifolium repens</i>
SR1	仁寿县 Renshouxian	29°55'07.0 N, 104°08' 31.8 E	I	-	-	-
SR2	井研县 Jingyanxian	29°34'58.6 N, 104°03' 02.0 E	I	HR1	-	-
SR3	贡井区 Gongjingqu	29°23'24.5 N, 104°34' 11.5 E	II	-	-	HR11
SR4	富顺县 Fushunxian	29°10'56.8 N, 104°57' 10.3 E	V	-	-	-
SR5	翠屏区 Cuipingqu	28°45'18.0 N, 104°41' 28.7 E	I	-	-	-
SR6	长宁县 Changningxian	28°40'20.5 N, 104°58' 51.7 E	III	-	-	HR14
SR7	江安县 Jianganxian	28°45'55.3N, 105°16' 19.9 E	III	-	-	-
SR8	龙马潭 Longmatan	28°56'27.6N, 105°26' 46.9 E	III	-	-	-
SR9	泸县 Luxian	29°08'19.5N, 105°22' 28.2 E	III	-	-	-
SR10	东兴区 Dongxingqu	29°23'30.3N, 105°04'58.1 E	III	-	-	-
SR11	资中县 Zizhong	29°49'49.3N, 104°43'10.2 E	III	-	-	-
SR12	安岳县 Anyuexian	30°08'53.3N, 105°21'51.8 E	III	-	-	HR9
SR13	安岳县 Anyuexian	29°57'16.5N, 104°36'51.3 E	IV	-	-	HR10
SR14	简阳市 Jianyangshi	30°20'51.3N, 104°35'19.5 E	II	-	HR5	-
SR15	简阳市 Jianyangshi	30°18'23.4N, 104°45'59.2 E	V	-	-	-
SR16	乐至县 Lezhixian	30°09'56.4N, 105°10'13.2 E	I	-	-	-
SR17	船山区 Chuanshanqu	30°34'20.2N, 105°37'02.0 E	I	-	-	-
SR18	蓬溪县 Pengxixian	30°28'17.4N, 105°49'13.0 E	I	-	-	-
SR19	武胜县 Wushengxian	30°22'08.0N, 106°20'19.5E	III	-	HR8	-
SR20	岳池县 Yuechixian	30°40'12.1N, 106°27'26.4E	III	-	-	-
SR21	蓬安县 Penganxian	31°01'12.7N, 106°27'34.9E	I	-	-	-
SR22	仪陇县 Yilongxian	31°17'37.6N, 106°28'01.9E	I	-	HR3	-
SR23	南部县 Nanbuxian	31°12'46.9N, 106°11'53.8E	I	-	-	HR12
SR24	西充县 Xichongxian	31°09'01.9N, 105°50'49.4E	I	-	-	-
SR25	盐亭县 Yantingxian	31°13'18.7N, 105°17'37.7E	I	HR2	-	-
SR26	三台县 Santaixian	31°08'42.1N, 105°06'14.6E	III	-	-	-
SR27	中江县 Zhongjiangxian	31°05'00.2N, 104°46'43.6E	I	-	HR6	-
SR28	梓潼县 Zitongxian	31°36'24.0 N, 103°06'36.0E	I	-	-	HR13
SR29	峨眉山 Emeishan	29°35'34.7 N, 103°22' 38.0 E	III	-	HR7	-
SR30	峨眉山 Emeishan	29°35'56.9 N, 103°17' 29.6 E	III	-	-	-
SR31	峨眉山 Emeishan	29°34'47.4N, 103°26'34.7E	III	-	HR4	-

-: 豆科植物在盆栽捕获实验中未结瘤, 因而无分离纯化的根瘤菌. 大豆种植模式: I, 玉/豆套种; II, 玉/豆+苕套种; III, 大豆单种; IV, 苕/豆套种; V, 花生/豆套种.
-: No rhizobia strains isolated because the leguminous plants did not nodulate in the capture experiment. Planting patterns of soybean: I, Corn/Soybean; II, Corn/Soybean/ Sweet potota; III, Soybean; IV, Sweet potota/Soybean; V, Peanut/Soybean.

菌; 然后, 将3-酮基乳糖反应结果显示为疑似根瘤菌的菌株进行牛肉膏蛋白胨反应测试, 即将菌株接种于牛肉膏蛋白胨液体培养基中35℃培养72 h, 不接菌的做空白对照, 如果接种菌株不能在试管中生长, 与空白试管一样清澈, 则是根瘤菌, 反之则不是根瘤菌.

1.2.4 根瘤菌DNA的提取 根瘤菌DNA提取采用异硫氰酸胍(GUTC)法^[19]: 即接种根瘤菌到YMB菌液中, 在28℃150 r min⁻¹的摇床中培养2-3 d, 收集菌液到灭菌的Eppendorf管(1.5 mL)中, 再将Eppendorf管置于离心机(Centrifuge 5804R, 北京博仪恒业科技发展有限公司)内以转速8 000 r min⁻¹离心 5 min, 弃去上清液收集菌体. 首先, 往收集好菌体的离心管中加入10 μL的溶菌酶置于37℃的控温箱裂解菌体30 min, 再加入300 μL的4 mol L⁻¹ GUTC充分混匀后10 000 r min⁻¹离心1 min, 转移上清液加入硅藻土吸附液30 μL, 静置15 min后10 000 r min⁻¹离心1 min, 弃上清液; 再加200 μL 4 mol L⁻¹ GUTC, 离心后弃上清液; 先用洗涤缓冲液300 μL洗涤硅藻土沉淀3次, 再用200 μL 70%酒精洗涤1次, 10 000 r min⁻¹离心3 min弃上清液, 37℃烘干40 min, 加入40 μL 1×TE缓冲液

(Tris-HCl 0.024 22 g, EDTA 0.074 55 g, 先用超纯水溶解, 待溶解后用超纯水定容至200 mL), 55℃水浴10 min, 取上清液进行琼脂糖凝胶电泳检测后保存于-20℃冰箱.

1.2.5 16S rDNA扩增和序列分析 PCR扩增引物为16S rDNA的基因通用引物对^[20] P1(5'-CGGGATCCAGAGTTTGATCCTGGCTCAGA ACGAACGCT-3')和P6(5'-CGGGATCCTACGGCTACCTTGTTCAGACTTCA CCCC-3'), 引物由深圳华大基因公司合成; PCR扩增采用50 μL体系^[21], 其中Reaction Buffer(10×) 5.0 μL, dNTPs(10 mmol/L) 1.0 μL, P1(10 μmol/L) 1.0 μL, P6(10 μmol/L) 1.0 μL, Taq聚合酶(5 U/μL) 0.5 μL, 模板DNA(50 ng) 1.0 μL, ddH₂O 40.5 μL(PCR扩增试剂均购置于上海生工生物技术有限公司). PCR扩增程序^[22]为: 94℃预变性5 min, 94℃变性1 min, 56℃退火1 min, 72℃延伸1.5 min, 共进行30个循环, 然后72℃延伸10 min. PCR产物用含EB的1%琼脂糖凝胶电泳检测, 并将阳性PCR产物进行测序(华大基因, 深圳). 16S rDNA基因序列在GenBank数据库里进行BLAST分析^[23], 获得16S rDNA基因的序列相似性及同源基因. 然后, 用MEGA5.0软件采用邻

接 (Neighbour-Joining) 对根瘤菌的16S rDNA构建系统发育树^[24]。

1.2.6 根瘤菌的回接实验 根瘤菌回接试验采用改进的Leonard's Jar装置^[25]来进行种植,即称取一定量的蛭石装入啤酒瓶中,用无氮营养液润湿基质,并在下方的塑料底瓶中加入无氮营养液,用透气封口膜密封瓶口上方,在灭菌锅内 1×10^5 Pa 121 °C灭菌30 min.将紫云英、苜蓿、三叶草和大豆4种豆科植物的种子按照上述1.2.1的方法灭菌催芽,在无菌操作台里将表面灭菌催芽的紫云英、苜蓿、三叶草和大豆种子播种在已灭菌并冷却后的啤酒瓶的蛭石内,并密封瓶口,置于温室中培养;待植物长出土表2-3 cm后,接种根瘤菌菌悬液(10^8 个细胞)1 mL于植物根围,并在表面铺上已灭菌并干燥石英砂防止杂菌进入装置。每个处理3个重复,并以不接菌的处理作为对照,在光照室(25 °C光照17 h和17 °C黑暗7 h)中培养35 d后调查植株结瘤情况。

2 结果与分析

2.1 盆栽捕获实验和菌株的分离纯化

紫云英在2个土壤样品(SR2和SR25)中结瘤,苜蓿在6个土壤样品(SR14, SR19, SR22, SR27, SR29和SR31)中结瘤,三叶草在6个土壤样品(SR3, SR6, SR12, SR13, SR23和SR28)中结瘤。挑选每个结瘤植株根系较大的3颗根瘤进行表面灭菌后破瘤,将根瘤浆液在刚果红YMA平板上进行划线分离培养3-12 d后,平板上面长出均匀的乳白色鼻涕状单菌落。每个样品挑取2-3个单菌落进行纯化镜检,并选择革兰氏染色为阴性的短杆状细菌,最后获得35株菌株。

2.2 菌株的生理生化鉴定

3-酮基乳糖反应实验表明,这35个分离纯化的菌株中有19株菌株菌落不能在3-酮基乳糖培养基上形成黄褐色沉淀,从而排除这19株菌株是土壤杆菌的可能性;进而对这19株菌株进行牛肉膏蛋白胨反应,结果只有14株菌株(表1)不能在牛肉膏蛋白胨培养基中生长,推测其为根瘤菌;其中,紫

云英根瘤菌2株(HR1和HR2),苜蓿根瘤菌6株(HR3, HR4, HR5, HR6, HR7和HR8),三叶草根瘤菌6株(HR9, HR10, HR11, HR12, HR13和HR14)。

2.3 根瘤菌16S rDNA基因的序列相似性分析

将这14株菌株的16S rDNA的PCR扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测,其扩增条带均(约1 400 bp)与根瘤菌16S rDNA序列大小一致,且进行PCR产物测序。并对14株菌株的16S rDNA基因序列在GenBank数据库BLAST比对分析,其与GenBank数据库内根瘤菌属的16S rDNA相似度达到99%-100%(表2)。因此,推测这14株根瘤菌菌株均属于根瘤菌属。提交这14个根瘤菌的16S rDNA基因序列到GenBank数据库获得相应的序列编号(KM276556-KM276569)(表2)。

2.4 根瘤菌16S rDNA基因的系统发育树

利用软件MEGA5.0的邻接法(Neighbour-Joining)对14株捕获的根瘤菌和根瘤菌属中的69个不同种标准菌株的16S rDNA构建系统发育树(图1)。结果表明,这14株根瘤菌在16S rDNA的系统发育树上被聚为3个大类,分处于不同的进化位置上,与标准菌株的相似度各不相同。其中,来自苜蓿的6株菌株(HR3, HR4, HR5, HR6, HR7, HR8)和来自三叶草的2株菌株(HR13和HR14)在系统发育树上同处于一个分支上面,且与*R. pusense*和*R. larrymoorei*遗传距离最近;而来自三叶草的另外4株菌株(RH9, RH10, RH11和RH12)和*R. nepotum*和*R. radiobacter*被聚类在同一个大的分支上面,说明他们的遗传距离最近,而*Rhizobium* sp. HR11和HR10处于一个独立的小分支上面,说明他们与另外两株菌株的16S rDNA还有不同之处;紫云英捕获的两株根瘤菌(RH1和RH2)与*R. phaseoli*、*R. trifolii*、*R. pisi*、*R. leguminosarum*、*R. laguerreae*和*R. fabae*同处与一个分支上,说明他们的相似度最高,遗传距离最近。

2.5 根瘤菌的回接实验

为进一步验证根瘤菌的寄主范围,将盆栽捕获的14株根瘤菌分别接种到紫云英、苜蓿、三叶草和大豆根际。结果表

表2 根瘤菌的16S rDNA基因序列信息及相似性分析

Table 2 16S rDNA gene sequence information and similarity analysis of rhizobia isolates

菌株编号 Strain number	寄主植物 Host plant	序列编号 Accession number	长度(bp) Length	16S rDNA相似性分析 Similarity analysis of 16S rDNA			
				分类类群 Class group	序列编号 Accession number	同源性 Similarity	属名 Genus name
HR1	紫云英 <i>Astragalus sinicus</i>	KM276556	1345	II	EF549398	100%	<i>Rhizobium</i> sp.
HR2	紫云英 <i>Astragalus sinicus</i>	KM276557	1350	II	KC462456	100%	<i>Rhizobium</i> sp.
HR3	苜蓿 <i>Medicago sativa</i>	KM276558	1363	I	KF008226	99%	<i>Rhizobium</i> sp.
HR4	苜蓿 <i>Medicago sativa</i>	KM276559	1276	I	KF008225	99%	<i>Rhizobium</i> sp.
HR5	苜蓿 <i>Medicago sativa</i>	KM276560	1300	I	KF542923	100%	<i>Rhizobium</i> sp.
HR6	苜蓿 <i>Medicago sativa</i>	KM276561	1361	I	KF008226	99%	<i>Rhizobium</i> sp.
HR7	苜蓿 <i>Medicago sativa</i>	KM276562	1354	I	KF542923	99%	<i>Rhizobium</i> sp.
HR8	苜蓿 <i>Medicago sativa</i>	KM276563	1240	I	KF542923	100%	<i>Rhizobium</i> sp.
HR9	三叶草 <i>Trifolium repens</i>	KM276564	1316	I	KF170820	100%	<i>Rhizobium</i> sp.
HR10	三叶草 <i>Trifolium repens</i>	KM276565	1206	I	KF465964	99%	<i>Rhizobium</i> sp.
HR11	三叶草 <i>Trifolium repens</i>	KM276566	1153	I	AB809378	99%	<i>Rhizobium</i> sp.
HR12	三叶草 <i>Trifolium repens</i>	KM276567	1254	I	KF170820	100%	<i>Rhizobium</i> sp.
HR13	三叶草 <i>Trifolium repens</i>	KM276568	1241	I	KF542923	99%	<i>Rhizobium</i> sp.
HR14	三叶草 <i>Trifolium repens</i>	KM276569	1322	I	KF542923	99%	<i>Rhizobium</i> sp.

分类类群来源于系统发育树16S rDNA(图1)。

Class groups are from the phylogenetic tree of 16S rDNA (Fig. 1).

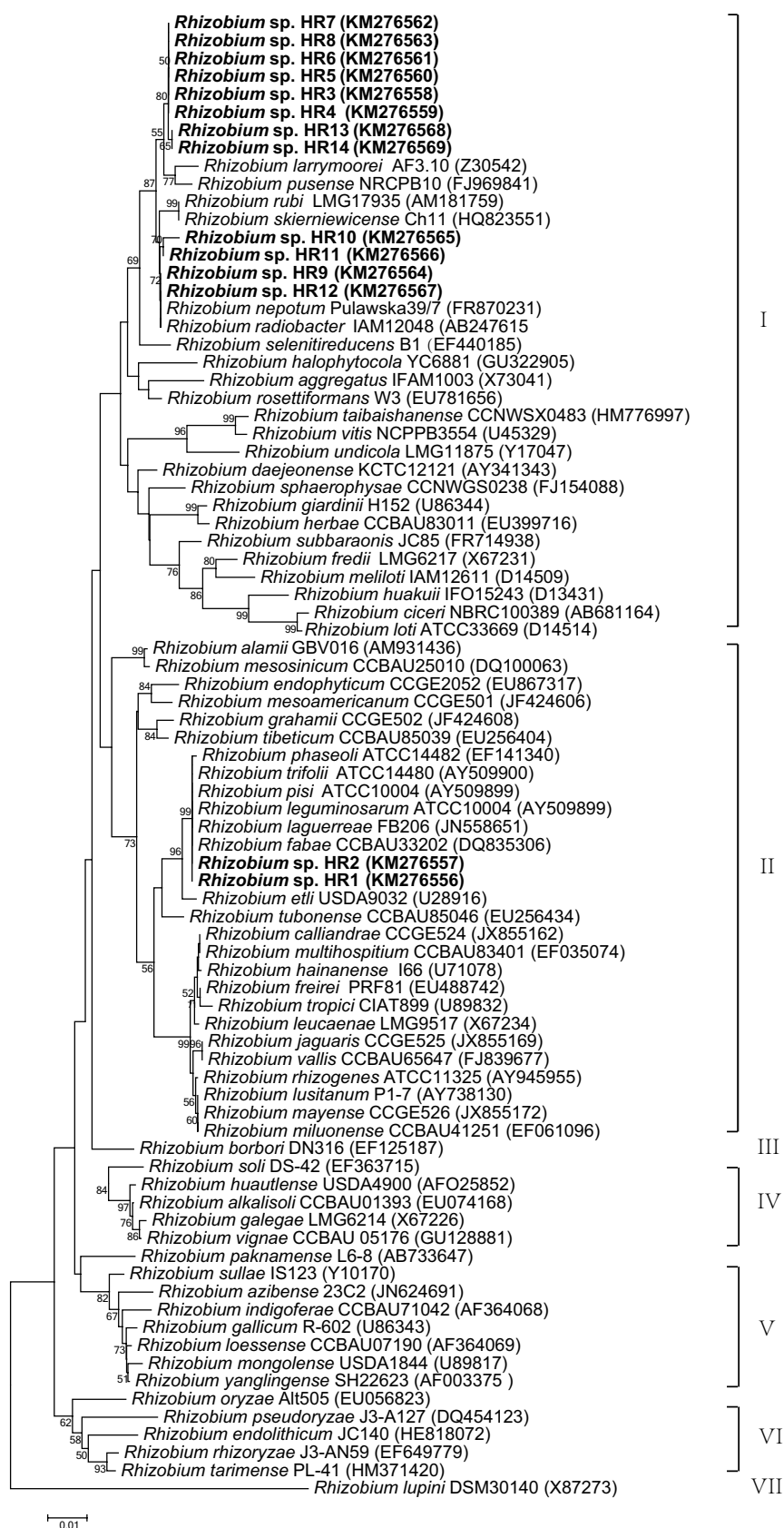


图1 根瘤菌16S rDNA基因序列的邻接系统发育树. 粗体: 捕获根瘤菌菌株. 参比菌株: 根瘤菌属的标准菌株.

Fig. 1 Neighbour-Joining phylogenetic tree of 16S rDNA gene sequence for rhizobia isolates. Bold font: captured rhizobia strains. Reference strains: standard strain of *Rhizobium* genus.

明,这14株根瘤菌只能与来源寄主豆科植物共生结瘤,而对其他的寄主豆科植物不能结瘤;结瘤率为100%,根瘤颜色为红色,结瘤植株长势高大,叶片为深绿色;未接根瘤菌对照豆科植物和其他非来源寄主豆科植物都不能共生根瘤,植株长势相对较为矮小,且叶片出现黄化现象。

3 讨论与结论

大豆是四川地区的主要粮食作物之一,至2011年大豆年种植面积达42万 hm^2 ,且播种面积还在逐年扩大。近年来,四川地区大面积推广“玉/豆”和“玉/豆+苕”的种植模式^[26]。本研究采集的31份大豆根际土壤来自于“玉/豆套种”、“玉/豆+苕套种”、“花生/豆套种”、“苕/豆套种”、“大豆独种”的种植模式,包括了四川地区大豆的主要种植模式,且土壤样品采集范围广。因此,土壤样品的来源和环境条件各不相同。据调查发现,四川大部分地区种植的大豆都能与土著根瘤菌共生结瘤,说明四川地区土壤中含有丰富的大豆根瘤菌;而作为牧草和饲料的三叶草在四川地区种植较为普遍,紫云英在四川盆地的部分地区有少量种植,而苕蓿是近年新引进西南地区的豆科牧草。目前,我们还不清楚四川盆地土壤是否像大豆一样含有丰富的三叶草、苕蓿和紫云英根瘤菌。为了确保土壤中含有根瘤菌且土壤环境适合根瘤菌生长,以及探索大豆与其他豆科植物的轮作模式的可行性,本研究主要采集了四川盆地结瘤大豆根际土壤来进行盆栽捕获实验,分析四川盆地结瘤大豆根际土壤中是否也含有丰富的紫云英、苕蓿和三叶草根瘤菌,这将为这3种豆科植物在四川地区的推广种植以及其与大豆的轮作种植提供理论依据。

盆栽捕获实验结果显示紫云英、苕蓿和三叶草只能在31个大豆根际土壤样品中的14个土壤样品中结瘤,说明含有丰富大豆根瘤菌土壤中含有的紫云英、苕蓿和三叶草根瘤菌较少;苕蓿和三叶草在6个不同土壤样品中结瘤来,紫云英只在2个土壤样品中结瘤,说明紫云英根瘤菌不及苕蓿根瘤菌和三叶草根瘤菌资源丰富。据报道,豆科植物能与一种根瘤菌或一种根瘤菌的几个菌株共生结瘤,而不能与其他根瘤菌共生结瘤,且一种根瘤菌只能浸染一定范围的豆科植物,产生有效根瘤,这表明豆科植物-根瘤菌共生体系的建立具有选择性和寄主专一性^[27]。本研究中的14个结瘤样品中并没有出现两种以上豆科植物在同一土壤样品中结瘤,也表明了豆科植物的根瘤菌具有寄主专一性。陈文新等通过对中国多个地区大量根瘤菌的研究,发现根瘤菌与豆科植物共生体系的建立不只是由细菌与植物两者之间的关系决定,而是根瘤菌、植物及环境三方相互作用的结果,豆科植物只有与适应环境条件下的根瘤菌才能够建立共生体系^[28]。本研究中的盆栽实验是在温室大棚模拟自然环境来完成的,与自然条件下农田种植环境存在着一定的差异。因此,紫云英、苕蓿和三叶草只在少数几个土壤样品结瘤有可能受到外界环境的影响。然而,这14个结瘤样品又证明了盆栽实验条件是可行的,且温室盆栽种植保障了实验条件的一致性和匹配性,因此,豆科植物的盆栽捕获实验结果是可靠的。

16S rDNA由于基因序列的保守性已经被广泛应用于细菌分类鉴定,主要包括16S rDNA的相似性分析和系统发育树

的构建。本研究捕获的14株根瘤菌的16S rDNA基因序列与根瘤菌属高度同源(99%-100%),说明他们都属于根瘤菌属菌株(*Rhizobium* sp.)。虽然只分析16S rDNA基因序列不能十分准确地揭示出根瘤菌的分类地位,但还是能初步确定这些根瘤菌在分类学中属的位置,对比很多确定菌株种属的方法,16S rDNA序列测定分析更合适确定属及属以上分类单位的亲缘关系^[29]。从16S rDNA基因系统发育树上看,根瘤菌属中所有种的根瘤菌被分为了7大类,其中12株苕蓿和三叶草根瘤菌属于I类,2株紫云英根瘤菌属于II类,但这14株根瘤菌在系统发育树的进化地位是不同的。其中,2个紫云英根瘤菌与三叶草根瘤菌、豌豆根瘤菌和蚕豆根瘤菌等遗传距离最近;苕蓿捕获不同土壤中的6个根瘤菌和三叶草捕获的2个根瘤菌(RH13和RH14)同处于一个分支上面,与来自鹰嘴豆根际的根瘤菌遗传距离最近;另外4株三叶草根瘤菌(RH9, RH10, RH11和RH12)与放射根瘤菌遗传距离最近;6个三叶草根瘤菌在系统发育树上处于3个不同的分支上面,说明它们虽然相似度很高,都集中于I类大分支上面,但是他们还是有所不同,这可能与来源和环境不同有关。

盆栽捕获的14株根瘤菌对紫云英、苕蓿、三叶草和大豆4种植物的回接实验结果显示,其只能与来源寄主豆科植物共生结瘤,而对其他的寄主豆科植物不能结瘤,这说明了根瘤菌的寄主专一性。大豆根际土著根瘤菌不一定与其他豆科植物结瘤固氮,也说明了大豆根瘤菌的寄主范围较窄以及寄主的专一性^[30]。陈文新等研究江西、湖北、安徽、四川和浙江等5省的67株待测菌株,发现三叶草根瘤菌主要分属于快生根瘤菌属、中华根瘤菌属、中慢生根瘤菌属和慢生根瘤菌属^[31];吕飞等研究发现新疆、陕西三叶草根瘤菌主要属于三叶草根瘤菌、豌豆根瘤菌(*R. leguminosarum*)^[11];这说明了不同属种的根瘤菌存在地区分布上的局限性和专一性。本研究从四川地区捕获的三叶草根瘤菌都属于根瘤菌属,也揭示了四川地区三叶草根瘤菌的局限性。冯春生对西北地区天蓝苕蓿的67株根瘤菌进行16S rDNA RFLP分析,发现苕蓿根瘤菌菌株分别归属于中华根瘤菌属、根瘤菌属的卢根瘤菌(*R. gallicum*)、豌豆根瘤菌属、内蒙古根瘤菌属(*R. mongolense*)和土壤杆菌属^[32]。管风贞利用16S rDNA进行序列分析,确定紫云英根瘤菌的系统发育地位分属于中慢生根瘤菌属、黄单孢菌属(*Xanthomonas*)、土壤杆菌属、根瘤菌属等^[13]。本研究捕获到14株根瘤菌都属于根瘤菌属,与前人报道的紫云英、苕蓿和三叶草根瘤菌都包含有根瘤菌属菌株是一致的,说明四川地区耕作土壤中根瘤菌属菌株资源相对较为丰富。回接实验中结瘤的豆科植物长势好,叶片发绿,结瘤的颜色为红色,比未接根瘤菌对照豆科植物和其他非来源寄主豆科植物长势较好。李阜新等人的研究发现,有效瘤的颜色为肉色,是由于根瘤中含有与固氮作用密切相关的红色的豆血红蛋白,是固氮的先决条件^[33]。因此,本研究回接实验中结瘤豆科植物的红色根瘤是有效瘤,可以帮助豆科植物进行生物固氮提供氮素营养。

紫云英、苕蓿和三叶草可作为肥料或饲料,且苕蓿还可作为水土保持植物,防止水土流失,改善生态环境,因此应用价值和潜力较大,值得进行大面积地推广种植。本研究结果说明四川地区耕作土壤中紫云英、苕蓿和三叶草根瘤菌较

少,因此要在四川地区种植作为饲料或肥料原材料的豆科植物(紫云英、苜蓿和三叶草)还需补充氮素营养,而仅仅利用土著根瘤菌来供给生长氮素营养所需是远远不够的;本研究捕获的根瘤菌菌株资源可以被开发成为共生固氮豆科植物的生物菌肥,可在种植过程中增施到植物根际,为其生长发育提供氮营养,并可逐渐改善土壤中这些根瘤菌资源缺乏的问题。同时,由于四川地区土壤中大豆根瘤菌十分丰富,而苜蓿、三叶草和紫云英根瘤菌比较少,因此可推广大豆与这3种植物的轮作,可以使紫云英、苜蓿和三叶草间接利用大豆与土著根瘤菌共生固氮补给土壤中的氮素营养,从而减少它们在种植过程中工业氮肥的施用量;此外还可以充分利用大豆种植前后的土地闲置期来合理地轮作大豆、紫云英、苜蓿和三叶草等,达到充分利用土地资源的目的。

参考文献 [References]

- 赵宇枢,段玉玺,王媛媛,陈立杰,尹丽娜. 辽宁省大豆根瘤菌资源抗逆性及生防潜力研究[J]. 大豆科学, 2009, 28 (1): 113-117 [Zhao QS, Duan YQ, Wang YY, Chen LJ, Yi LN. Stress resistance and biocontrol potential of soybean rhizobia resources isolated from Liaoning Province [J]. *Soybe Sci*, 2009, 28 (1): 113-117]
- 雷霞,陈文华,隋新华,陈文新. 根瘤菌多相分类的研究进展[J]. 微生物杂志, 2007, 27 (6): 77-80 [Lei X, Chen XH, Sui XH, Chen WX. The research progress of polyphonic taxonomy of rhizobia resumptively [J]. *J Microbiol*, 2007, 27 (6): 77-80]
- 陈文新,汪恩涛. 中国根瘤菌[M]. 北京: 科学出版社, 2011: 66-71 [Chen WX, Wang ET. Chinese rhizobia [M]. Beijing: Science Press, 2011: 66-71]
- 冯瑞华. 慢生型大豆根瘤菌的遗传多样性研究[J]. 应用与环境生物学报, 2000, 6 (2): 176-181 [Feng RH. Study on genetic diversity of slow-growing rhizobia of glycine max [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2000, 6 (2): 176-181]
- 何庆元,王永雄,吴萍,王松华,何华奇,周燕. 安徽地区大豆根瘤菌遗传多样性研究[J]. 激光生物学报, 2008, 17 (4): 514-518 [He QY, Wang YX, Wu P, Wang SH, He HQ, Zhou Y. Study on genetic diversity of soybean rhizobia isolate Anhui areas [J]. *Acta Laser Biol Sin*, 2008, 17 (4): 514-518]
- 张明荣,吴海英. 四川间套作大豆生产现状与发展分析[N]. 中国种业, 2009, 10: 16-18 [Zhang MR, Wu HY. Sichuan intercropping soybean production present situation and the development analysis [N]. *Chin Seed Ind*, 2009, 10: 16-18]
- Keyser HH, Bohlool BB, Hu TS, Weber DF. Fast-growing rhizobia isolated from root nodules of soybean [J]. *Science*, 1982, 215 (4540): 1631-1632
- 梁绍芬,姜瑞波,关妙姬. 快生型大豆根瘤菌(*Rhizobium fredii*)与我国栽培大豆共生有效性研究[J]. 中国农业科学, 1995, 28 (5): 14-21 [Liang SF, Jiang RB, Guan MJ. Studies on symbiotic effects between *Rhizobium fredii* strains & Chinese soybesn cultivars [J]. *Sci Agric Sin*, 1995, 28 (5): 14-21]
- 张学贤,李阜棣,曹燕珍,陈华癸. 紫云英根瘤菌分子遗传学研究进展[J]. 华中农业大学报, 2003, 22 (1): 77-83 [Zhang XX, Li PL, Cao YZ, Chen HG. Molecular genetics of *Astragalus sincus* rhizobia [J]. *J Huazhong Agric Univ*, 2003, 22 (1): 77-83]
- 曾昭海,隋新华,胡跃高,陈文新,陈丹明,邵瑞路. 紫花苜蓿一根瘤菌高效共生体筛选及田间作用效果[J]. 草业科学, 2004, 13 (5): 95-100 [Zeng ZH, Sui XH, Hu YG, Chen WX, Chen DM, Hu RL. Screening of highly-effective *Sinorhizobium meliloti* strains for *Medicago sativa* cultivars and their field inoculation [J]. *Pratal Sci*, 2004, 13 (5): 95-100]
- 吕飞,蒋欣,徐佳洁,朱博,韦革宏. 新疆和陕西三叶草属根瘤菌16S rDNA多生态及系统发育研究[J]. 草业学报, 2009, 5 (17): 304-309 [Lv F, Jiang X, Xu JJ, Wei GH. 16S rDNA polymorphism and phylogeny of rhizobia isolated from *Trifolium* in Xinjiang Uygur Autonomous Region and Shaanxi Province [J]. *Acta Agrestia Sin*, 2009, 5 (17): 304-309]
- 黄怀琼,曾玉霞,龙碧华,周冬冬,周岷江. 四川紫色土壤中土著大豆根瘤菌的资源分布[J]. 西南农业学报, 2000, 13 (3): 39-44 Huang HQ, Zeng YX, Long BH, Zhou DD, Zhou MJ. Investigation on the distribution of the indigenous soybean nodulating rhizobial resources in Sichuan purple soils [J]. *SW China J Agric Sci*, 2000, 13 (3): 39-44]
- 管凤贞,钟少杰,邱宏端,林荣斌,张辉,陈济琛,林新坚. 紫云英根瘤菌的分离与鉴定[J]. 福建农业学报, 2012, 7 (5): 524-532 [Guan FZ, Zhong SJ, Qiu HR, Lin RB, Zhang H, Chen JT, Lin XJ. Isolating and indentification of rhizobial strains of Chinese Milk Vetch [J]. *Fujian J Agric Sci*, 2012, 7 (5): 524-532]
- 马宗琪,邱念伟. 植物营养液的配制与应用[J]. 生物学教学, 2012, 37 (2): 57-58 [Ma ZQ, Qiu NW. The preparation and application of plant nutrient solution [J]. *Biol Teach*, 2012, 37 (2): 57-58]
- 魏爽. 含羞草根瘤菌物种资源多样性及系统发育研究[D]. 河北: 河北大学, 2012: 11-13 [Wei S. Studies on mimosa species diversity and phylogenies of beta-rhizobia isolated from *Mimosa* spp. [D]. Baoding: Hebei University, 2012: 11-13]
- Vincent JM. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria [M]. Oxford: Blackwell Scientific, 1970
- 高晓杰,刁治民,范建平,鲍敏,杜军华. 青海胡卢巴根瘤菌形态特征的研究[J]. 江苏农业科学, 2010 (4): 358-359 [Gao XJ, Diao ZM, Fan JP, Bao M, Du JH. Study on morphological characteristics of hu lu ba rhizobia in Qinghai province [J]. *Jiangsu Agric Sci*, 2010 (4): 358-359]
- 马丹丹. 野生豆科牧草根瘤菌及其固氮活性的研究[D]. 吉林: 东北师范大学. 2006: 14-23 [Ma DD. Studies on the wild legume herbage rhizobia and nitrogen fixation ability [D]. Jilin: Northeast Normal University, 2006: 14-23]
- 陈强,张小平,李登煜,陈文新, Lindstrm K, Terefework Z. 从豆科植物的根瘤中直接提取DNA的方法[J]. 微生物学报, 2002, 29 (6): 63-67 [Chen Q, Zhang XP, Li DY, Chen WX, Lindstrm K, Terefework Z. Isolation of DNA from the root nodule of legume plant [J]. *Acta Microbiol Sin*, 2002, 29 (6): 63-67]
- Fabiana GSP, Mariangela H, Fábio MM. Polyphasic characterization of Brazilian *Rhizobium tropici* strains effective in fixing N₂ with common bean [J]. *Soil Biol Biochem*, 2007, 39 (4): 1851-1864
- Pueppke SG, Broughton WJ. *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges [J]. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1999, 12 (4): 293-318
- 李永春,孔令如,王焱,孔文尧,杨统一,邹爱兰,戚金亮,杨永华. 酸性土壤中大豆优势根瘤菌的分离、鉴定及其生物学特性[J]. 中国油料作物学报, 2011, 33 (4): 384-389 [Li YC, Kong LR, Wang Y, Kong

- WR, Yang TY, Zhou AL, Qi JL, Yang YH. Isolation identification and biological characteristics of predominant rhizobia associated with soybean in acidic soil [J]. *Chin J Oil Crop Sci*, 2011, **33** (4): 384-389]
- 23 Cho YG, Ishii T, Temnykh S, Chen X, Lipovich L, McCouch SR, Park WD, Ayres N, cartinhour S. Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Theor Appl Genet*, 2000, **100** (5): 713-722
- 24 Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Mol Biol Evol*, 2011, **28** (4): 2731-2739
- 25 Prakamhanga J, Tittabutra P, Boonkerda N, Teamtisongb K, Uchiumic T, Abec M, Teaumroonga N. Proposed some interactions at molecular level of PGPR coinoculated with *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 and *B. japonicum* THA6 on soybean symbiosis and its potential of field application [J]. *Appl Soil Ecol*, 2015, **85** (2): 38-49
- 26 吴海英, 梁建秋, 于秀波, 张明荣. 2013年四川大豆生产技术指导意见[J]. 大豆科技, 2013, **4**: 23-25 [Wu HY, Liang JQ, Yu XB, Zhang MR. Sichuan soybean production technical guidance in 2013 [J]. *Sci Technol*, 2013, **4**: 23-25]
- 27 张小甫, 师尚礼, 南丽丽, 陈积山, 满荣元. 甘肃不同生态区域苜蓿根瘤菌表型多样性分析[J]. 甘肃农业大学学报, 2009, **6** (3): 106-111 [Zhang XP, Shi SL, Nan LL, Chen JS, Man RY. Phenotype diversities of alfalfa rhizobium strains collected in different ecological regions in Gansu Province [J]. *J Gansu Agric Univ*, 2009, **6** (3): 106-111]
- 28 陈文新, 汪恩涛, 陈文峰. 根瘤菌—豆科植物共生多样性与环境的
关系[J]. 中国农业科学, 2004, **37** (1): 81-86 [Chen WX, Wang ET, Chen WF. The relationship between the symbiotic promiscuity of rhizobia and Legumes and their geographical environments [J]. *Sci Agric Sin*, 2004, **37** (1): 81- 86]
- 29 都立辉, 刘芳. 16S rRNA基因在细菌菌株鉴定中的应用[J]. 乳业科学与技术, 2006, **5**: 207-209 [Dou LH, Liu F. Application of 16S rRNA gene in identification of Bacteria [J]. *Dairy Sci Technol*, 2006, **5**: 207-209]
- 30 Musiyiwaa K, Mpeperekia S, Gille KE r. Symbiotic effectiveness and host ranges of indigenous rhizobia nodulating promiscuous soybean varieties in Zimbabwean soils [J]. *Soil Biol Biochem*, 2005, **37** (6): 1169-1176
- 31 刘晓云, 陈文新. 三叶草、猪屎豆和含羞草植物根瘤菌16S rDNA PCR-RFLP分析和数值分类研究[J]. 中国农业大学学报, 2003, **8** (3): 1-6 [Liu XY, Chen WX. 16S rDNA PCR-RFLP analysis and numerical taxonomy for rhizobia isolated from *Trifolium*, *Crotalaria* and *Mimosa* [J]. *J Chin Agric Univ*, 2003, **8** (3): 1-6]
- 32 冯春生, 郭军康, 位秀丽, 李香香, 韦革宏. 西北地区天蓝苜蓿根瘤菌16S rDNA RFLP分析[J]. 西北植物学报, 2008, **28** (5): 940-945 [Feng CS, Guo JK, Wei XL, Li XX, Wei GH. 16S rDNA RFLP analysis of Rhizobia isolated from *Medicago lupulina* in Northwestern China [J]. *Acta Bot Bor-Occid Sin*, 2008, **28** (5): 940-945]
- 33 李阜新, 胡玉嘉. 微生物学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 246-260 [Li FX, Hu YJ. Microbiology [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2000: 246-260]