



青海一株蚕豆根瘤菌的鉴定及抗旱性评价

李萍^{1,2}, 滕长才¹, 刘玉皎^{1,2}, 张金发³, 侯万伟¹, 何涛^{2*}, 张晓玲⁴, 王建忠⁵

- 1 青海大学农林科学院(青海省农林科学院), 青海 西宁 810016
- 2 青海大学省部共建三江源生态与高原农牧业国家重点实验室, 青海 西宁 810016
- 3 青海大学农牧学院, 青海 西宁 810016
- 4 青海省湟源县种子站, 青海 湟源 812100
- 5 青海省西宁市湟中区种子站, 青海 西宁 811606

李萍, 滕长才, 刘玉皎, 张金发, 侯万伟, 何涛, 张晓玲, 王建忠. 青海一株蚕豆根瘤菌的鉴定及抗旱性评价. 微生物学报, 2022, 62(10): 4030–4046.

Li Ping, Teng Changcai, Liu Yujiao, Zhang Jinfa, Hou Wanwei, He Tao, Zhang Xiaoling, Wang Jianzhong. Identification of *Vicia faba* Rhizobium and drought resistance verification in arid region of Qinghai. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(10): 4030–4046.

摘要:【目的】研究青海干旱地区蚕豆根瘤菌的遗传多样性, 获得与蚕豆品种共生匹配且具有耐旱性的根瘤菌株, 促进蚕豆耐旱根瘤菌在青海干旱地区生产中的应用。【方法】以分离自青海干旱地区一株菌株 QHCD22 为材料, 利用细菌形态学、生理生化指标鉴定、Biolog 细菌鉴定系统、16S rRNA 基因序列分析、全基因组分析等进行菌种鉴定和系统发育分析, 进一步通过 PEG6000 模拟干旱胁迫、盆栽回接干旱胁迫处理及早作田间接种验证试验对该菌株的耐旱性进行综合评价。【结果】QHCD22 菌株属快生型根瘤菌属(*Rhizobium*), *Rhizobium indicum* 种。随着 PEG6000 模拟干旱胁迫程度的加剧, 在 -0.6 mPa 这一更低渗透势时菌株存活数量增高, 浊度由 61.48% 上升到 69.42%, 表现出较强的耐旱性。盆栽试验表明, 接种根瘤菌处理(NA)的株高、植株鲜干比、根瘤数、根瘤鲜重、叶绿素含量(SPAD)、叶片相对含水量(RWC)、脯氨酸含量(PRO)、超氧化物歧化酶活性(SOD)、根系活力(TCC)均高于不接种根瘤菌处理(NN), 并且在正常供水条件下,

基金项目: 青海省科学技术厅项目(2020-ZJ-709); 青海省农林科学院创新基金(2019-NKY-04); 国家现代农业产业技术体系专项(CARS-08)

Supported by the Qinghai Provincial Department of Science and Technology Project (2020-ZJ-709), by the Innovation Fund Program of Qinghai Academy Agriculture and Forestry Science (2019-NKY-04) and by the National Technical System Construction of Modern Agriculture Industry (CARS-08)

*Corresponding author. E-mail: hetaoxn@aliyun.com

Received: 28 February 2022; Revised: 19 April 2022; Published online: 9 June 2022

NA 处理的各指标也均高于 NN 处理。旱作田间验证试验表明接种该菌株显著提高固氮酶活性, 青海 13 号蚕豆根瘤固氮酶活性由不接种的 $42.07 \text{ C}_2\text{H}_4 \text{ nmol}/(\text{g}\cdot\text{h})$ 显著增加到 $221.78 \text{ C}_2\text{H}_4 \text{ nmol}/(\text{g}\cdot\text{h})$, 青蚕 14 号蚕豆由 $40.60 \text{ C}_2\text{H}_4 \text{ nmol}/(\text{g}\cdot\text{h})$ 显著增加到 $109.78 \text{ C}_2\text{H}_4 \text{ nmol}/(\text{g}\cdot\text{h})$, 马牙蚕豆由 $33.41 \text{ C}_2\text{H}_4 \text{ nmol}/(\text{g}\cdot\text{h})$ 显著增加到 $643.15 \text{ C}_2\text{H}_4 \text{ nmol}/(\text{g}\cdot\text{h})$ 。接种根瘤菌对于增加产量具有促进作用, 其中青蚕 14 号的增产效果显著, 增产幅度达 32.3%。【结论】QHCD22 菌株可能为快生型根瘤菌属的一个种 *Rhizobium indicum*, 具有一定的耐旱性, 研究表明接种根瘤菌可以提高蚕豆的耐旱性, 尤其对干旱敏感型蚕豆品种增产效果显著, 具有潜在的应用前景。

关键词: 蚕豆; 根瘤菌; 系统发育; 抗旱性评价

Identification of *Vicia faba* *Rhizobium* and drought resistance verification in arid region of Qinghai

LI Ping^{1,2}, TENG Changcai¹, LIU Yujiao^{1,2}, ZHANG Jinfa³, HOU Wanwei¹, HE Tao^{2*}, ZHANG Xiaoling⁴, WANG Jianzhong⁵

1 Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Qinghai University, Xining 810016, Qinghai, China

2 State Key Laboratory of Plateau Ecology and Agriculture, Qinghai University, Xining 810016, Qinghai, China

3 College of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining 810016, Qinghai, China

4 Qinghai Huangyuan Seed Station, Huangyuan 812100, Qinghai, China

5 Qinghai Xining Huangzhong Seed Station, Xining 811606, Qinghai, China

Abstract: [Objective] To analyze the genetic diversity of *Vicia faba* *Rhizobium* in arid region of Qinghai, so as to obtain the *Rhizobium* strain with drought tolerance and matching *V. faba* varieties and thus promote the application of drought-tolerant *Rhizobium* of *V. faba* in arid region of Qinghai. [Methods] With the strain QHCD22 isolated from the arid region of Qinghai as the research subject, species identification and phylogenetic analysis were performed by morphology, physiological and biochemical characteristics, Biolog microbial identification system, 16S rRNA gene sequencing and whole genome analysis. Further, polyethylene glycol (PEG) 6 000 simulated drought stress, pot experiment and field plot trial were used to evaluate the drought resistance of the strain. [Results] Strain QHCD22 belonged to *Rhizobium indicum*. With the increased addition of PEG 6 000 to yeast mannitol agar (YMA) broth medium, the strain had an intermediate lethal osmotic potential under medium PEG concentration. But the number of viable strains increased under higher PEG concentration (osmotic potential of -0.6 mPa), and the turbidity of the strain rose from 61.48% to 69.42%, showing a strong drought tolerance. Pot experiment revealed that *V. faba* inoculated with the strain had higher plant height, GW/DW ratio, nodule number, nodule fresh weight, SPAD values, leaf relative water content (RWC), proline (PRO) content, superoxide dismutase (SOD) activity and root vitality (triphenyltetrazolium chloride, TTC) than that non-inoculated. In addition, under the condition of normal water, the indexes of the inoculated *V. faba* were higher than those of non-inoculated. The field plot trial indicated that the nitrogenase activity of strain QHCD22 was significantly elevated. Specifically, the nitrogenase activities of Qinghai 13 variety, Qingcan 14 variety and Maya variety

ranged from 42.07 to 221.78 C₂H₄ nmol/(g·h), 40.60 to 109.78 nmol C₂H₄ nmol/(g·h), and 33.41 to 643.15 C₂H₄ nmol/(g·h), respectively. *Rhizobium* inoculation promoted the increase of *V. faba* yield, with Qingcan 14 variety having a significant increase of 32.3%. **[Conclusion]** Strain QHCD22 belonged to *Rhizobium indicum*, which had certain drought-tolerant characteristics. The study confirmed that *Rhizobium* inoculation could improve the drought tolerance of *V. faba*, especially the drought-sensitive *V. faba* variety. Therefore the strain had potential application prospects.

Keywords: *Vicia faba*; *Rhizobium*; phylogeny; drought tolerance evaluation

蚕豆(*Vicia faba* L.)属豆科蝶形花亚科野蚕豆族蚕豆属,作为粮食、蔬菜、副食、饲料和养地的“三养”作物在青藏高原农业经济生产和生态发展中占重要地位^[1-2],在绿色循环农业“碳中和”行动中发挥着重要的作用。根瘤菌(*Rhizobium*)是一类能够固定大气中游离态的氮与豆科植物建立共生固氮关系的革兰氏阴性 α -和 β -变形菌^[3],其与豆科作物相互作用形成的根瘤或茎瘤的共生体系为陆地生态系统固定60%以上的氮,为农业用地贡献30%–50%的氮素而被认为是生物固氮形式中最强的体系^[4]。蚕豆-根瘤菌构成的共生固氮体系的充分发挥可以极大程度地减少肥料氮的施用,增加土壤肥力,改良土壤团粒结构,为农业实现绿色低碳生态发展战略提供重要的生物资源。选择与宿主植物共生匹配且固氮效率高的根瘤菌是提高共生固氮的重要途径,而接种根瘤菌是有效方法之一^[5]。在农业生产中,大豆^[6-8]、菜豆^[9-10]、花生^[11]、苜蓿^[12-14]、豌豆^[15]等豆科植物通过接种根瘤菌发挥其共生固氮功能,增加豆科作物抗逆性,提高产量及品质,提升土壤肥力,减少氮肥的施用研究成果屡见报道,已成为重要的农业措施。

干旱是威胁农业生产和限制农业可持续发展的一个世界性问题,青海高原农业区旱情更为突出。研究表明寄主、根瘤菌以及根瘤菌与豆科作物的共生体系的建立对干旱胁迫都是敏感的,但与寄主植物相比较,根瘤菌株对土壤

的干燥环境却具有抵抗能力^[16],在这种环境中能孕育出耐干旱的根瘤菌,接种能增强宿主植物结瘤固氮能力,提高抗旱性^[17-19]。这不仅拓展了根瘤菌新功能,还为干旱等逆境地区生态植被恢复和农业生产能力提高提供了新的发展思路。某个区域内最有效的根瘤菌往往来自本地区或与本地区条件相似地区的菌株,因此在高效根瘤菌的筛选中,必须重视菌剂应用的地域适应性。目前在豆科作物上普遍推广接种高效根瘤菌的主要在大豆、苜蓿等豆科作物上,而对种植面积相对少的杂粮豆科作物蚕豆的高效根瘤菌推广应用鲜见报道,大部分集中在蚕豆根瘤菌的生物地理分布^[20]、遗传多样性及系统发育^[21-23]等方面,针对蚕豆根瘤菌抗逆性研究及回接提高蚕豆抗逆性的研究开展不深入^[24],特别是针对青海干旱地区蚕豆根瘤菌分类地位确定及抗逆性研究报道更少。本研究以课题组前期采集自青海干旱地区的一株蚕豆根瘤菌为材料^[25],对其形态特征、生理生化特征、分子生物学特性、基因组水平等进行综合分析确定其系统发育分类地位。进一步通过石英砂盆栽回接模拟干旱胁迫处理和旱作大田接种试验,对菌株的回接共生固氮效果和抗旱性进行验证,为丰富蚕豆根瘤菌的系统发育和抗旱性研究内容,提高青海干旱地区蚕豆根瘤菌在生产实践上的应用,发挥生物固氮的作用,推进农业可持续发展提供技术支撑。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

供试菌株: QHCD22, 该菌株是本课题组前期工作初步筛选获得的一株蚕豆根瘤菌株, 原代号 XN22^[25]。采样地信息: 青海省西宁市湟中县李家山镇纳家村, 海拔 2 619 m, 经度 101°32'54.8", 纬度 36°47'28.9", 采样地根际土壤理化指标如表 1。

旱作田间试验宿主材料蚕豆品种: “青海 13 号”是青海省雨养农业区主栽品种、“青蚕 14 号”是青海省灌溉农业区主栽品种, 均由青海省农林科学院作物所提供, “马牙蚕豆”是青海省农牧交错区半干旱农业区主栽品种, 由青海省湟源县种子站提供。

供试地点及土壤理化性质: 石英砂盆栽试验在青海省农林科学院作物所植物生理实验室人工智能气候箱中进行(型号: RDN-1000E-2), 工作参数白天光照 16 h, 光照强度为 90–100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 温度为 20–23 $^{\circ}\text{C}$; 夜间黑暗 8 h, 温度为 16–18 $^{\circ}\text{C}$; 田间试验在青海省农林科学院作物所试验基地进行, 土壤理化性质为 pH 8.13、有机质 16.65 g/kg、全 N 1.20 g/kg、全 P_2O_5 2.11 g/kg、全 K_2O 20.65 g/kg、碱解 N 82 mg/kg、速效 P 24.6 mg/kg、速效 K 178 mg/kg、全盐 0.62 g/kg。

1.2 菌株活化及菌悬液制备

取保存在 -80°C 、10%甘油中的菌种 1–2 环, 接种在含刚果红的 YMA 固体培养基上(甘露醇 10.0 g、酵母粉 1.0 g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g、 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g、NaCl 0.1 g、 CaCO_3 1.0 g, 加水定容至 1 000 mL, pH 7.0–7.2), 28 $^{\circ}\text{C}$ 暗培

养直至获得纯的单菌落。菌悬液制备见课题组前期的研究报道^[25]。

1.3 菌株表型鉴定

挑取单菌落在含有刚果红的 YMA 固体培养基上稀释划线培养, 3–5 d 后观察菌的形态、大小、透明度、粘稠度、颜色, 并进行革兰氏染色镜检, 深紫色为革兰氏阳性, 红色为革兰氏阴性。

1.4 菌株生理生化指标测定

采用“一般细菌常用鉴定方法”^[26]对根瘤菌株进行溴百里香酚蓝(broothymol blue, B.T.B)测定、全细胞脂肪酸组成、碳源利用等生理生化指标测定。

1.4.1 根瘤菌株快/慢生型测定

将分离纯化的菌株在含有 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溴百里香酚蓝的 YMA 固体培养基上划线培养进行快/慢生型根瘤菌的 B.T.B 检测。28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3–5 d 观察结果, 培养基(指示剂)变蓝色为产碱, 培养基(指示剂)变黄色为产酸。

1.4.2 根瘤菌株的脂肪酸组成检测

通过微生物脂肪酸快速鉴定系统(microbial fatty acid rapid identification system, MIDI)检测菌株的全细胞脂肪酸组成, 分析菌株全细胞脂肪酸特征。

1.4.3 根瘤菌株 Biolog 细菌鉴定

Biolog 微量分析技术是根据化能异养细菌对 95 种碳源的利用来进行细菌鉴定的系统, 采用该技术检测菌株对不同碳源的利用情况。

1.5 根瘤菌株 16S rRNA 基因序列分析

采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司)提取菌株 DNA, 检测浓度及纯度。以总 DNA 为模板, 用细菌 16S rRNA

表 1 采样地根际土壤理化指标

Table 1 The results of physical and chemical index of rhizosphere soil sampled

Total N/ (g/kg)	Total P_2O_5 / (g/kg)	Total K_2O / (g/kg)	Hydrolyzable N/ (mg/kg)	Avialble P/ (mg/kg)	Avialble K/ (mg/kg)	Organic matter/ (g/kg)	pH	Total salt/ (g/kg)
1.37	2.12	24.85	85.00	3.60	179.00	17.94	8.45	0.82

基因通用引物 27F 和 1492R^[27]测定 16S rRNA 基因序列,将测序后的序列与 Ezbiocloud 数据库中已报道的序列进行相似性比对,获得同源性相近的菌种序列。通过 Chromas 软件多重比对,采用 MEGA 7.0 软件进行聚类分析,利用最大似然法(maximum likelihood, ML)法构建进化树。

1.6 根瘤菌株基因组分析

采用 A5-MiSeq^[28]和 SPAdes^[29]对测序数据进行评估和比较, Pilon 软件^[30]进行碱基校正后使用 PGCGAP 软件对基因组草图序列进行 Prokka 注释,得到菌株基因组的基本特性;使用 JSpeciesWS 网站(<http://jspecies.ribohost.com/jspeciesws/#home>)对菌株进行全基因组平均核苷酸相似度(average nucleotide identity, ANI)值分析;使用 GGDC (genome-to-genome distance calculator 2.1, <http://ggdc.dsmz.de/ggdc.php#>)对菌株 DDH (DNA-DNA hybridization)值进行分析,综合基因组分析结果最终确定菌株分类地位。

1.7 根瘤菌株抗旱性评价

1.7.1 PEG 6000 模拟干旱胁迫耐旱性评价

采用聚乙二醇(PEG 6000)人工模拟干旱条件进行,方法见课题组前期研究报道^[25]。以中国农业微生物菌种保藏管理中心(ACCC)提供的菌株 ACCC15854 (*Rhizobium leguminosarum*)为对照菌株,考察模拟干旱胁迫 0—0.6 mPa 下各渗透势水平下的浊度及相对值(即各菌株在各水平下的 OD_{600} 值与相应 0 mPa 的 OD_{600} 值的比值),以此评判菌株的耐旱性。

1.7.2 根瘤菌接种盆栽抗旱性评价

精选蚕豆种子,75%的酒精溶液浸泡 5 min 后用蒸馏水冲洗 4—5 遍,用 1%的次氯酸钠溶液消毒 5 min,蒸馏水冲洗干净后将种子放置于铺有润湿滤纸的培养皿中 28 °C 温箱避光发芽。种子催芽长至 0.5—1.0 cm,接种根瘤菌处理(NA)的蚕豆种子用标准菌悬液浸泡 30 min 后播种于

装有无菌石英砂的花盆中,每盆种植 3 粒,种子根部加入 2 mL 菌液。不接种处理(NN)用等量的无菌水浸泡后种植。以 NN 为阴性对照,以已知的蚕豆根瘤菌 ACCC15854 为阳性对照,每个处理 3 次重复。播种后的花盆放置于人工气候箱培养,培养条件:光照度 7 000—8 000 lx,温度为(24±5) °C/(16±3) °C(白天/黑夜),相对湿度为 70%±5%/55%±5%(白天/黑夜),期间视情况补加营养液。当蚕豆植株开花至 3 层时进行人工控水干旱胁迫处理,以正常供水为对照,干旱胁迫 3 d 后进行蚕豆植株形态及生理生化指标测定,形态指标包括:株高、植株鲜干比、根鲜重、根瘤数、根瘤鲜重;生理生化指标包括:植株全氮含量(%),叶绿素值(SPAD)、叶片相对含水量(relative water content, RWC)、脯氨酸(PRO)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、根系活力(triphenyltetrazolium chloride, TCC)。

1.7.3 田间验证试验

在青海省农林科学院作物所试验基地开展 QHCD22 菌株接种蚕豆共生固氮效果及提高抗旱性验证试验。将菌株的菌悬液与青海干旱农业区 3 个主栽蚕豆品种(青海 13 号、青蚕 14 号、马牙蚕豆)种子拌种,以 ACCC15854 为阳性对照,不接种菌剂为阴性对照(CK),随机区组设计,5 行区,行长 5.0 m,行距 35 cm,小区面积 8.75 m²(1.75×5),3 次重复。盛花期采样,测定株高、植株鲜干比、根鲜重、根瘤数、根瘤鲜重、固氮酶活性;成熟期每个处理随机取 5 株进行考种,考种指标为有效分枝数、单株荚数、单株粒数、结荚层数、双荚及以上、单株粒重和百粒重,取样后整个小区实收计产。整个生育期不进行人工灌溉,2021 年 6—8 月青海省降雨偏少,气温偏高,出现干旱气候,为蚕豆生长发育重要时期。

1.8 数据分析

数据分析采用 Excel 2013 和 SPSS19.0 软件

进行。并采用邓肯新复极差法进行差异显著性检验($P \leq 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 根瘤菌的分离鉴定

2.1.1 根瘤菌的分离鉴定

通过划线稀释法接种在含刚果红的 YMA 固体培养基上、28 °C 暗培养 3 d, 观察菌落发现, 分离纯化得到了乳白色、直径 3–5 mm、不透明圆形菌落, 表面湿润光滑, 在 YMA 平板上能产生大量粘稠的胞外多糖, 微微凸起。革兰氏染色显微镜观察, 菌体呈杆状, 红色, 为阴性。菌株形态和革兰氏染色特征与根瘤菌属 (*Rhizobium*) 的形态特征类似, 初步确定该菌株为根瘤菌属 (*Rhizobium*)。

2.1.2 菌株生理生化指标测定

对菌株进行 B.T.B 测定、全细胞脂肪酸组成、碳源利用等生理生化指标测定。B.T.B 测定结果表明, 菌株接种到含有 0.5% BTB 的 YMA 斜面上, 28 °C、暗培养后发现 BTB 呈黄色。培养基(指示剂)变蓝色表明菌株产碱, 培养基(指示剂)变黄色表明菌株产酸, 而快生根瘤菌在以甘露醇为碳源的培养基(如 YMA)上产酸, 判断此蚕豆根瘤菌 QHCD22 为快生型根瘤菌(附图 1)。

Biolog 微量分析技术是根据化能异养细菌对 95 种碳源的利用来进行细菌鉴定的系统, 该方法多被用于土壤微生物、植物叶际和根际微生物群落变化的研究^[31]。本研究采用 Biolog GENIII 细菌鉴定系统检测 QHCD22 根瘤菌对 95 种碳源的利用情况。结果表明, QHCD22 菌株能利用的碳源为 D-果糖-6-PO₄、葡糖醛酰胺、四唑紫、四唑蓝、亚碲酸钾、 β -hydroxy-D,L-丁酸、氨基南和丁酸钠, 反应均为阳性; 弱阳性反应的有 3 个, D-海藻糖、L-海藻糖和溴酸钠; 剩余的都是阴性反应, 分别为葡聚糖、D-麦芽

糖、D-海藻糖、D-纤维二糖、龙胆二糖、蔗糖、D-松二糖、水苏糖、pH 6、pH 5、D-蜜三糖、 α -D-乳糖、D-蜜二糖、 β -methyl-D 葡萄糖苷、D-水杨甙、N-acetyl-D 葡萄糖胺、N-acetyl- β -D 甘露糖胺、N-acetyl-D 半乳糖胺、N-acetyl 甘露糖胺丙酮酸、1% NaCl、4% NaCl、8% NaCl、 α -D-葡萄糖、D-甘露糖、D-果糖、D-半乳糖、3-methyl 葡萄糖、L-鼠李糖、肌苷、1% 乳酸钠、梭链孢酸、D-丝氨酸、D-山梨醇、D-甘露醇、D-阿拉伯醇、myo-肌醇、丙三醇、D-葡萄糖-6-PO₄、D-天冬氨酸、D-丝氨酸、醋竹桃霉素、利福霉素 SV、二甲胺四环素、明胶、Glycyl-L-脯氨酸、L-丙氨酸、L-精氨酸、L-天(门)冬氨酸、L-谷氨酸、L-组氨酸、L-焦谷氨酸、L-丝氨酸、洁霉素、盐酸胍、硫酸四癸钠、果胶、半乳糖醛酸、L-半乳糖酸、D-葡(萄)糖酸、葡萄糖醛酸、粘液酸、奎尼酸、D-葡糖二酸、万古霉素、p-hydroxy-苯乙酸、丙酮酸盐、D-乳酸甲酯、L-乳酸、柠檬酸、 α -keto-戊二酸、D-羟基丁二酸、L-羟基丁二酸、Bromo-琥珀酸、萘啶酮酸、氯化锂、吐温-40、 γ -amino-丁酸、 α -hydroxy-丁酸、 α -keto-丁酸、乙酰乙酸、丙酸、醋酸和甲酸。初步认为 QHCD22 菌株的特性符合根瘤菌属 (*Rhizobium*)。

2.1.3 根瘤菌细胞组水平鉴定

气相色谱检测技术可直接分析细胞中的脂肪酸、蛋白质、氨基酸等化学组成及代谢产物以确定微生物的特异化学标志成分^[32]。其中脂肪酸成分分析是较形态学鉴定更为简便和准确的细菌鉴定方法, 可以通过脂肪酸成分分析准确判断细菌的种属。从本研究中 QHCD22 菌体脂肪酸成分气相色谱分析结果(图 1)和脂肪酸气相色谱图(附图 2)可知, 菌体的主要脂肪酸 C_{16:0} 含量为 7.75%, C_{18:0} 含量为 5.11%, C_{19:0} cyclo ω 8c 含量为 4.34%, C_{18:0} 3OH 含量为 2.67%, 与根瘤菌属 (*Rhizobium*) 中其他近缘种在脂肪酸

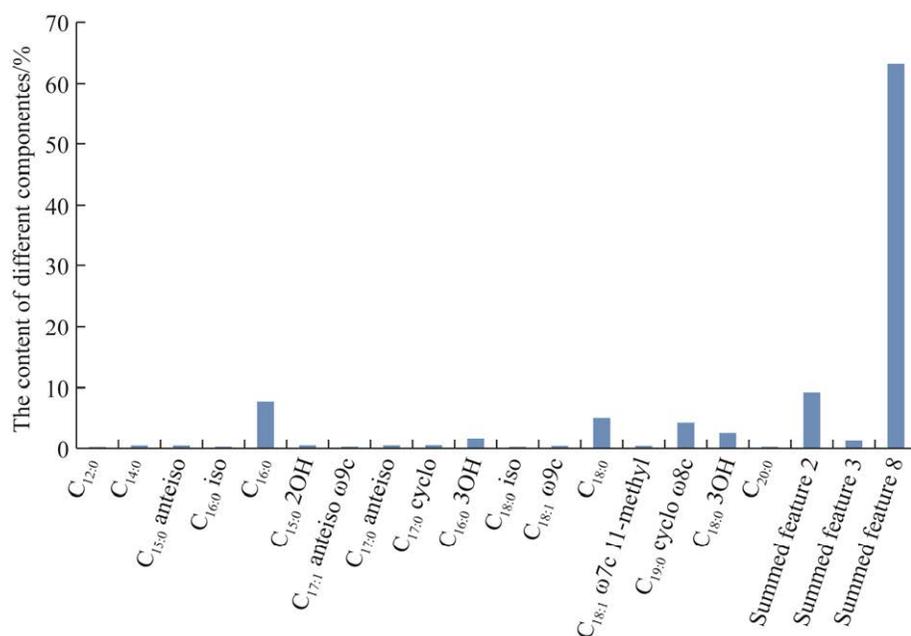


图 1 菌株脂肪酸组成成分

Figure 1 The fatty acid components of strain QHCD22.

主要成分上具有一致性, 如 *R. leguminosarum* USDA2370^T、西藏根瘤菌(*R. tibeticum*)。可见该菌株为根瘤菌属(*Rhizobium*)的典型脂肪酸类型。

2.1.4 根瘤菌 16S rRNA 基因分析

16S rRNA 基因在细菌中普遍存在, 由于其功能稳定, 进化速率缓慢而具有高度保守性, 对其进行序列分析和系统发育分析被认为是菌种属鉴定和分类的一种稳定可靠的方法。供试菌株 QHCD22 的 16S rRNA 基因扩增获得 1 477 bp 的基因片段, GenBank 基因库登录号为 3AZHJUEV016。通过网站(<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon/>)与已知模式菌株进行序列比对(附表 1), 显示该菌株与已知模式种 *R. leguminosarum* USDA 2370^T、*R. laguerreae* FB206^T、*Rhizobium anhuiense* CCBAU 23252^T、*R. indicum* JKLM12A2^T 等相似度均为 100%, 系统发育树将该菌株与上述模式种聚为一类, 初步确定菌株 QHCD22 为

根瘤菌属(*Rhizobium*) (图 2)。

2.1.5 根瘤菌的基因组分析

采用 A5-MiSeq 和 SPAdes 对去除接头序列的测序数据进行从头拼装, 构建 contigs 和 scaffolds。对得到的拼装结果进行评估和比较, 并使用 Pilon 软件进行碱基校正。使用 PGCGAP 软件对基因组草图序列进行 Prokka 注释。注释完成后获得菌株 QHCD22 的基因组大小为 7 592 996 bp, GenBank 基因库登录号为 gil1111589425, GC 含量为 60.8% (表 2), 基因组特性与根瘤菌属(*Rhizobium*)基本一致。

使用 JSpeciesWS 网站(<http://jspecies.ribohost.com/jspeciesws/#home>)对菌株进行 ANI 值分析(附表 2), 可以得出菌株 QHCD22 与已知种 *Rhizobium indicum* FA23^T 的 ANI 值为 95.10%。通常讲, 同一物种菌株间的 ANI 值 $\geq 95\%$ 。因此, 菌株 QHCD22 与 *R. indicum* 为同一种。使用 GGDC (genome-to-genome distance

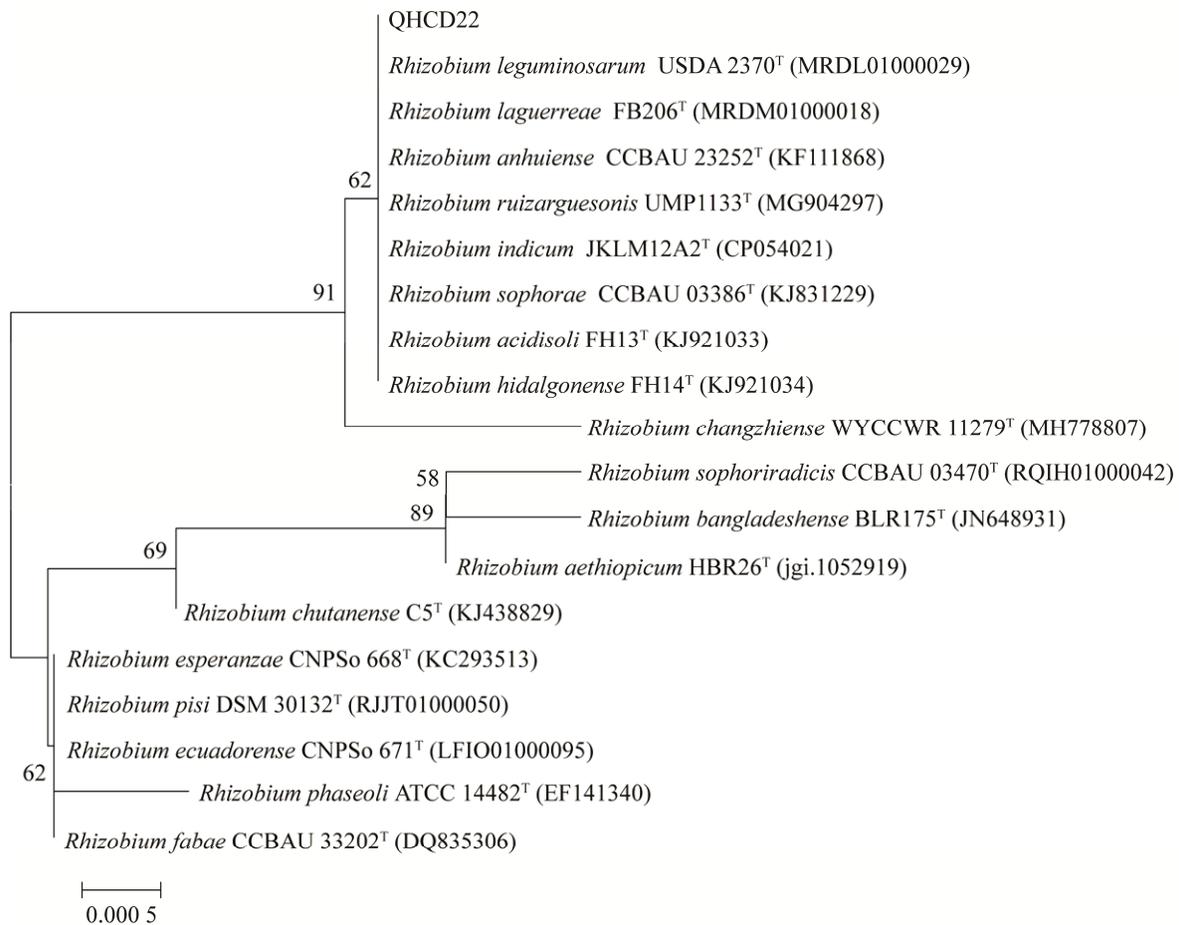


图 2 基于 ML 法构建的 16S rRNA 基因序列系统发育树状图

Figure 2 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences using ML method. Only bootstrap values ≥ 50 are shown above nodes. The serial numbers of strains are in parentheses. The number on the branch is bootstrap. Scale for evolutionary distance.

表 2 根瘤菌株全基因组相关信息

Table 2 Genome-wide information of the rhizobia strain

Feature	Contigs	Total bases/bp	GC/%	CDS	mRNA	tRNA	rRNA
Total	130	7 592 996	60.8	7 237	1	49	3

calculator 2.1, <http://ggdc.dsmz.de/ggdc.php#>)分析, 同一个物种间的 DDH 值 $\geq 70\%$ 为同一种, 菌株 QHCD22 与已知模式种 *R. indicum* MCC 3961^T 的基因组序列比较的 DDH 值为 79.2% (附表 3), 同时与不同物种模式菌的全基因组系统进化树显示(图 3), 该菌株与模式菌株 *R. indicum* MCC 3961^T 聚为同一分支, 进一步证实菌株 QHCD22

属于 *R. indicum*。

2.2 菌株抗旱性评价

2.2.1 菌株 PEG 6000 耐旱性测定

菌株在 PEG 6000 渗透势下能否增殖为划分根瘤菌耐旱标准, 评判菌株的耐旱性。以中国农业微生物菌种保藏管理中心(ACCC)提供的菌株 ACCC15854 (*Rhizobium leguminosarum*)

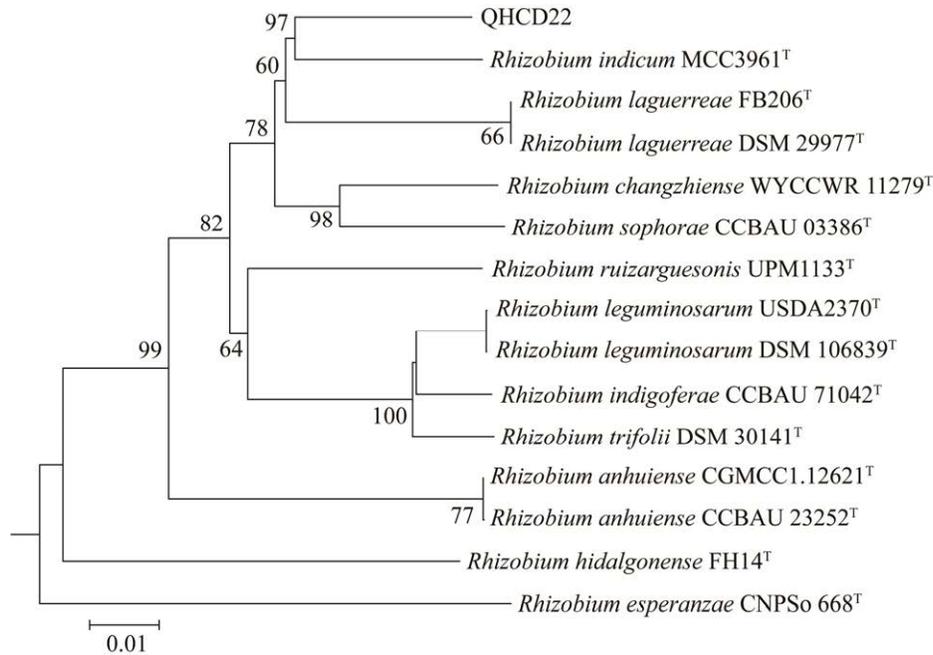


图3 根瘤菌株全基因组系统发育树状图

Figure 3 Genome-wide phylogenetic tree of the rhizobia strain. Bootstrap confidence $\geq 50\%$ are given at the branching points. The scale bar represents 1% nucleotides substitutions. Branch point number stand for reliabilities. Superscript T indicates the strains are type strains.

为对照菌株,在模拟干旱胁迫 0--0.6 mPa 下各渗透势水平的浊度及相对值(即各菌株在各水平下的 OD_{600} 值与相应 0 mPa 的 OD_{600} 值的比值)进行分析,评判菌株 QHCD22 的耐旱性。结果表明,该菌株的 OD 值下降率明显低于对照菌株,以 0% PEG 6000 培养液为对照,在不同胁迫条件下该菌株主要表现的的生长模式为:该菌株一方面存在一个中间致死渗透势,即菌株在 -0.4 mPa 渗透势时存活数量减少或增殖能力减弱,而在 -0.6 mPa 这一更低渗透势时存活数量又增高,表现出较强的耐旱性(图 4)。

2.2.2 菌株回接盆栽抗旱性评价

接种根瘤菌对蚕豆生长有促进作用,以不接种根瘤菌处理(NN)为阴性对照,接种 ACCC15854 菌株为阳性对照,考察 QHCD22 菌株接种蚕豆植株的耐旱性表现。盛花期以接

种根瘤菌并激活处理(NA)根瘤菌全部转变为粉色为准,选取生长均一的蚕豆植株进行盆栽人工控水模拟干旱胁迫。结果表明,与不接种(NN)相比,蚕豆接种菌株(NA)在正常供水(CK)和干旱胁迫(DS)下表现出差异性(表 3)。接种根瘤菌可增加蚕豆的株高,且在干旱胁迫下

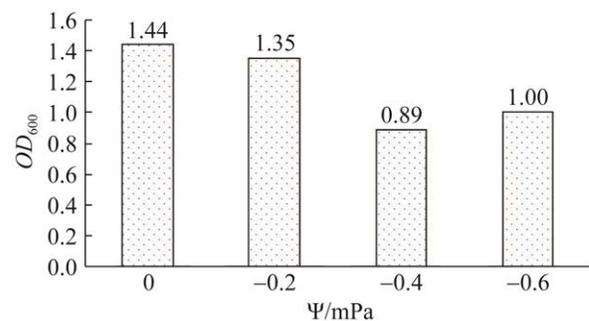


图4 菌株生长模式

Figure 4 Growth model of the rhizobia strain.

表 3 干旱胁迫下菌株回接蚕豆形态及生理指标测定

Table 3 Morphology and physiological index of rhizobia inoculation on faba bean under drought stress

Treatment	Plant height/cm	GW/D W ratio	Fresh root weight/g	Number of nodules (per plant)	Fresh root nodule/g	Plan total N/%	SPAD	RWC/%	PRO/(U/mg·prot)	SOD/(U/mg·prot)	TCC/[mg·(g·h)]	
NN	CK	79.33 ^{ab}	6.54 ^{bc}	5.80 ^c	13.00 ^{cd}	0.34 ^{bc}	23.11 ^b	32.40 ^{cd}	78.48 ^a	67.15 ^{bc}	609.72 ^{bc}	0.002 8 ^b
	DS	67.13 ^b	6.14 ^c	3.10 ^d	5.33 ^d	0.27 ^c	16.34 ^d	25.85 ^d	56.52 ^b	50.14 ^c	535.78 ^c	0.001 0 ^c
QHCD22	CK	80.30 ^{ab}	7.12 ^{ab}	11.07 ^a	55.67 ^a	0.55 ^a	25.68 ^a	38.88 ^{bc}	78.56 ^a	94.88 ^{abc}	726.75 ^a	0.008 6 ^a
	NA	80.33 ^{ab}	7.56 ^a	7.77 ^b	45.67 ^{bc}	0.47 ^{ab}	19.36 ^c	49.20 ^a	78.75 ^a	115.19 ^{abc}	737.45 ^a	0.003 0 ^b
ACCC	CK	80.00 ^{ab}	7.68 ^a	7.90 ^b	31.67 ^b	0.51 ^a	28.64 ^a	39.15 ^b	74.27 ^a	118.60 ^{ab}	621.99 ^{bc}	0.008 1 ^a
	15854	DS	82.77 ^a	7.63 ^a	5.60 ^c	27.00 ^{bc}	0.43 ^{ab}	18.08 ^c	43.86 ^{ab}	76.62 ^a	151.91 ^a	650.36 ^{ab}

NA

NN: non-nodulated; NA: nodulated+active; CK: water; DS: drought stress; SPAD: SPAD values; RWC: relative water content; PRO: proline; SOD: superoxide dismutase; TCC: triphenyltetrazolium chloride. The same letter in the same column indicates no significant difference, different letters in the same column indicate significant difference, small letters indicate significant difference at 0.05 level.

NA 处理的株高均高于 NN 处理。鲜干比是植株鲜重与干重的比例, 反映蚕豆植株的干物质积累程度。接种根瘤菌可显著提高干旱胁迫下蚕豆的植株鲜干比。干旱胁迫严重抑制蚕豆根瘤数量和根瘤鲜重, 而 NA 处理能降低干旱条件下根瘤数减少的程度, 维持一定的根瘤鲜重, 使根瘤菌共生固氮发挥作用, 蚕豆植株全氮含量得以提高。干旱胁迫不仅影响叶绿素的生物合成, 而且促进已形成的叶绿素加速分解, 导致叶绿素含量减少。接种根瘤菌处理使蚕豆对叶绿素含量的变化对于抵御抗旱性是有贡献的, 结果显示干旱胁迫条件下, NA 处理的植株叶绿素含量均高于 NN 处理, 差异显著($P \leq 0.05$), 说明接种根瘤菌能够降低干旱胁迫对植株叶绿素的破坏, 维持正常的光合作用, 保证蚕豆植株生长。植物在遭受干旱胁迫的时候, 植物会脱水而影响其生理生化过程, 最明显的表型就是脱水萎蔫的程度(图 5), 进一步的生理生化检测发现 NA 处理的蚕豆植株 RWC 值高于 NN 处理的蚕豆植株, 较高的细胞含水量可以减轻由于干旱造成细胞脱水而引起的膜系统损失, 提高蚕豆的抗旱性。植物遭受干旱胁迫时通过积累

脯氨酸(PRO)等渗透调节物质来抵御干旱胁迫, NN 处理增加了蚕豆叶片的 PRO 含量, PRO 积累可以起到对抗氧化胁迫的作用, 使其具有更强的渗透调节能力, 呈现出较强的抗旱性。SOD 是植物体内重要的抗氧化酶, 与植物的抗旱性有关, SOD 活性的增加能增强植物抵御氧化胁迫的能力, 结果表明 SOD 的变化趋势与 PRO 含量变化一致, 指标测定结果中 NA 处理比 NN 处理的 SOD 活性高, 这表明 NN 处理的蚕豆在干旱胁迫下受到了严重的氧化损伤, NA 处理能够减少氧化胁迫的积累, 保护干旱胁迫下的蚕豆生长。根系活力(TCC)是表征植物生长发育状况的重要指标之一, 接种根瘤菌可以提高蚕豆根系活力, 虽然干旱胁迫蚕豆根系生长受到抑制活力减小, 但与不接种根瘤菌相比较, 根系活力仍然较高。

2.2.3 田间验证试验

根瘤数、根瘤鲜重、根瘤固氮酶活性作为衡量豆科植物与根瘤菌共生固氮能力的重要指标, 它们的综合表现更能准确反映蚕豆与根瘤菌的结瘤固氮能力。在旱作田间试验中, 我们考察盛花期植株根瘤数、根瘤鲜重、固氮酶活性等指标来检验菌株与宿主的共生固氮效果和



图 5 不同根瘤菌处理对蚕豆生长影响

Figure 5 Effects of rhizobia inoculation on the growth of faba bean. NA-a: faba bean inoculated of *Rhizobium*; NA-b: root of faba bean inoculated of *Rhizobium*; NN-a: faba bean non-inoculated of *Rhizobium*; NN-b: root of faba bean non-inoculated of *Rhizobium*; DS: drought stress 3 d; CK: normal water.

收获期接种根瘤菌对蚕豆产量构成因素指标的影响。在不接种根瘤菌处理中，虽然根系有新鲜根瘤，但根瘤为白色或者根瘤剖面为绿色，没有固氮能力，为无效根瘤。从表 4 中可知，盛花期与 NN 处理相比较，NA 处理在根瘤数、根瘤鲜重、固氮酶活性等指标均有不同程度的增加，并且不同蚕豆品种接种根瘤菌的植株形态、生理生化指标变化响应不同。根瘤菌接种青海 13 号蚕豆在株高、根鲜重、根瘤数、根瘤鲜重与不接种相比略有增加，但未达到显著水平，而根瘤固氮酶活性增加幅度较大，差异达到显著水平($P \leq 0.05$)；根瘤菌接种青蚕 14 号蚕豆在株高、根鲜重、根瘤鲜重等指标与不接种处理比较均增加，且差异显著($P \leq 0.05$)；而根瘤菌接种马牙蚕豆在根鲜重、根瘤数显著高于不接种处理。在收获期，接种根瘤菌的共生固氮作用和提高蚕豆产量的效果得以显著体现，不同蚕豆品种表现的差异不同，以青蚕 14 号蚕豆的差异最为显著，产量增加差异显著($P \leq 0.05$)。

3 讨论

蚕豆生长发育所需要的氮素一方面靠土壤提供，另一方面靠化学肥料和生物固氮提供。

生物固氮是蚕豆生长发育和产量形成的重要氮素来源之一，根瘤菌可为蚕豆植株提供生长所需 80% 的氮源。而在影响蚕豆与根瘤菌的共生固氮因素中，干旱是一个重要的因素。土壤干旱缺水不仅影响植株根毛的生长减少根瘤菌感染的机会，而且根瘤菌繁殖受到抑制难以与蚕豆共生结瘤，根瘤数和固氮效率下降，生物固氮作用在该地区不能得到充分发挥。土壤中有效根瘤菌的数量是决定豆科作物产量的重要因素，而接种根瘤菌可以有效地提高土壤中根瘤菌数量^[33]。众多国内外研究学者对大豆^[33]、豌豆^[34]、紫花苜蓿^[35-36]、花生^[37]等豆科作物进行研究发现，从逆境环境的土壤中可以筛选出抗逆菌株，将其接种到宿主植物可以增强其抗逆能力，提高生物产量。因此，在青海干旱地区分离具有耐旱、固氮优良特性的根瘤菌菌株，利用形态水平、生理生化水平、细胞组分水平、核酸分子水平综合分析确定菌株的分类地位，充实蚕豆根瘤菌研究内容。表型特征是细胞遗传特性的表现形式，通过表型分析比较可以综合地反映根瘤菌的表型多样性。我们对 QHCD22 菌株的表型特征进行分析发现，该菌株在刚果红 YMA 培养基上 28 °C 培养 3 d 即出

表 4 菌株回接蚕豆形态及田间考种

Table 4 Morphology and physiological index of rhizobia inoculation on faba bean under drought stress

Varieties	Treatment	Blooming stage				Harvest stage								
		Plant height/cm	Fresh root weight/g	Number of nodules/(per plant)	Fresh nodule weight/g	Fresh nodule C ₂ H ₄ nmol/(g·h)	Effective branch	Pods/plant	Seeds/plant	Pod number	Double pod	Seed weight/plant/g	100-seed weight	Yield/(kg/area)
Qinghai 13	QHCD22	73.98^a	8.89 ^a	56.44^a	2.97 ^a	221.78^a	2.67^a	13.11^a	30.33^a	4.33^{ab}	3.67^a	21.98^a	72.48^a	1.26^a
	ACCC15854	71.14 ^a	10.82 ^a	38.44 ^a	2.68 ^a	158.72 ^a	2.56 ^a	12.33 ^{ab}	23.00 ^a	4.78 ^a	3.33 ^a	14.42 ^{ab}	68.76 ^a	1.66 ^a
	NN	69.19 ^a	7.32 ^a	35.44 ^a	1.43 ^a	42.07 ^b	1.89 ^a	8.89 ^b	20.78 ^a	3.56 ^b	2.67 ^a	6.38 ^b	59.15 ^a	0.93 ^a
Qingcan 14	QHCD22	113.92^a	14.04^a	64.67^a	5.62 ^a	109.78^a	2.56^a	11.11^a	21.67^a	5.33^a	0.22^a	33.68^a	149.77^a	3.93^a
	ACCC15854	108.53 ^a	13.52 ^a	59.11 ^a	3.40 ^b	78.82 ^a	2.56 ^a	10.11 ^a	19.67 ^a	4.89 ^a	0.00 ^a	27.23 ^a	137.44 ^a	3.64 ^{ab}
	NN	85.29 ^b	8.13 ^b	61.89 ^a	2.78 ^b	40.60 ^b	1.44 ^b	8.67 ^a	17.22 ^a	4.67 ^a	0.22 ^a	22.43 ^a	131.51 ^a	2.97 ^b
Maya	QHCD22	88.11^a	10.22^a	72.67^{ab}	1.74^a	643.15^a	2.11^a	11.56^a	19.78^a	5.56^a	2.44^a	25.78^a	131.32^a	1.11^a
	ACCC15854	96.17 ^a	11.88 ^a	88.56 ^a	1.77 ^a	99.00 ^b	3.11 ^a	13.00 ^a	22.67 ^a	3.67 ^a	3.56 ^a	28.16 ^a	125.10 ^a	1.57 ^a
	NN	70.56 ^a	7.02 ^b	44.11 ^b	0.96 ^a	33.41 ^c	1.56 ^a	9.56 ^a	18.11 ^a	4.11 ^a	2.67 ^a	19.36 ^a	120.22 ^a	1.01 ^a

NN: non-nodulated. The same letter in the same column indicates no significant difference, different letters in the same column indicate significant difference, small letters indicate significant difference at 0.05 level.

现肉眼可见的单菌落,菌落呈半透明乳白色、圆形且边缘整齐、中间略有隆起、有粘液、较黏稠,菌落不吸色,这些特征属根瘤菌(*Rhizobium*)典型形态特征。而该菌株在 BTB 反应中呈黄色,产酸,说明 QHCD22 菌株为快生型根瘤菌。生理生化测定是通过菌株特有表现反映其本质特征,从而将不同类群的微生物分开。通过利用气相色谱技术对微生物培养、皂化、衍生化等过程分析脂肪酸成分,进而与数据库中的微生物信息进行比对完成鉴定,可以准确地反映细菌间的差别,从而可以对未知菌株进行鉴定和亲缘关系分析。具有 MIDI 软件的气相层析(GC)分析系统是当前通用的方法, Li 等^[38]和 Zhao 等^[39]均采用微生物鉴定系统(MIDI)对研究的目标菌株进行了根瘤菌种属的鉴定,获得了理想的结论。本研究利用微生物脂肪酸快速鉴定系统(MIDI)对菌株 QHCD22 的脂肪酸组成进行检测,结果表明该菌株的主要脂肪酸为 C_{16:0}、C_{18:0}、C_{19:0} cyclo ω8c 和 C_{18:0} 3OH, 陈文新等^[5]在蚕豆根瘤菌种的特征描述中指出,蚕豆根瘤菌具有根瘤菌属(*Rhizobium*)的特征脂肪酸: C_{16:0}、C_{18:0}、C_{19:0} cyclo ω8c。而根瘤菌属(*Rhizobium*)中其他近缘种如 *Agrobacterium tumefaciens* 的细胞脂肪酸组成是 C16:1、C18:1 acids、C17:0 cyclo, 可见 QHCD22 菌株符合根瘤菌属(*Rhizobium*)的主要细胞脂肪酸特征。Biolog GENIII 细菌鉴定系统检测表明:该菌株能利用 D-果糖-6-PO₄、葡糖醛酰胺、四唑紫、四唑蓝、亚碲酸钾、β-hydroxy-D,L-丁酸、氨曲南和丁酸钠作为唯一碳源。综合以上结论初步确定 QHCD22 菌株属快生型根瘤菌属。

近年来,随着多相分类方法在根瘤菌分类中的应用和分子生物学技术的日新月异,对微生物的鉴定技术已不再局限于普通的形态学、细胞组分和生理生化特性等鉴定上,而是深入

到核酸水平,在分子水平上实现了根瘤菌的快速鉴定,为根瘤菌的鉴定及应用提供理论依据。本研究中 16S rRNA 基因序列分析的系统发育学和基因组分析与表型特征的相关性较好。16S rRNA 基因序列分析表明菌株 QHCD22 与 *Rhizobium indicum* JKLM12A2^T 在内的 4 种已知模式种相似度为 100%, 使用 PGCGAP 软件对基因组草图序列进行 Prokka 注释,基因组特性与根瘤菌属(*Rhizobium*)基本一致。ANI 值分析是基于物种全基因组序列,通过分析比较同源基因序列来判定物种间的遗传关联性的重要参数^[40], ANI 与 16S rRNA 基因基于序列的同源性相关,本研究中也得到相同的结论, ANI 值分析结果表明菌株 QHCD22 与 *Rhizobium indicum* 应为同一种。构建的全基因组系统进化树将该菌株与模式菌株 *Rhizobium indicum* MCC 3961^T 聚为同一分支,进一步证实菌株 QHCD22 属于 *Rhizobium indicum*。有关 *Rhizobium indicum* 的相关报道甚少, NCBI 检索表明 *Rhizobium indicum* 是根瘤菌科 α-变形菌门的一种, Rahi 等^[41]在利用 16S rRNA、*atpD* 和 *recA* 基因对从印度跨喜马拉雅地区的豌豆 (*Pisum sativum* L.) 有效根瘤中分离得到的 3 株根瘤菌进行的鉴定中发现,其中 2 个菌株为新种根瘤菌(*Rhizobium indicum*)。本研究中鉴定的菌株 QHCD22 是否也可以确定为 *Rhizobium indicum* 还需要后期更深入的分析才能确定。

诸多研究表明干旱环境中可以筛选出具有耐旱性的菌株,而接种根瘤菌能够改善干旱胁迫在内的非生物胁迫条件下作物的生长状况,提高作物的产量及抗逆性。我们以中国农业微生物菌种保藏管理中心(ACCC)提供的菌株 ACCC15854 (*Rhizobium leguminosarum*) 为对照菌株,对菌株 QHCD22 的抗旱性进行了评价。在 PEG 6000 模拟干旱胁迫,该菌株在高渗透环

境下表现出较强的耐旱性, 并将该菌株回接到蚕豆植株上进行盆栽人工控水和旱作大田试验发现, 根瘤菌接种蚕豆的形态指标与生理生化指标与不接种根瘤菌表现出差异性。叶绿素含量的变化对于作物抵御抗旱性是有贡献的, 干旱胁迫不仅影响叶绿素的生物合成, 而且促进已形成的叶绿素加速分解, 导致叶绿素含量减少。本研究结果表明, 干旱胁迫条件下, 接种根瘤菌处理的植株叶绿素含量均高于不接菌处理, 表明接种根瘤菌能够降低干旱胁迫对植株叶绿素的破坏, 但差异不显著。接种根瘤菌能维持较高的叶片相对含水量以减轻由于干旱造成细胞脱水而引起的膜系统损失, 积累的脯氨酸含量起到对抗氧化胁迫的作用使其具有更强的渗透调节能力, SOD 活性提高减少了氧化胁迫的积累, 保护干旱胁迫下的蚕豆生长。总之, 在干旱胁迫下, 根瘤在抵御干旱胁迫上具有重要作用, 接种根瘤菌可以减少因干旱缺水而造成的细胞膜损伤, 维持植物细胞稳定性, 显示出较强的渗透调节能力和活性氧防御能力, 提高蚕豆的抗旱性。豆血红蛋白是由珠蛋白和血红素组成的, 血红素结合一个 Fe 原子, 因此, 豆科植物形成的根瘤一般为红色, 没有根瘤固氮能力或者衰老的根瘤会表现出白色或者绿色。旱作田间验证试验中没有接种根瘤菌处理的植株根系虽然有结瘤, 但根瘤呈白色或者绿色, 无根瘤固氮能力, 视为无效根瘤。QHCD22 菌株能与青海干旱地区 3 个主栽蚕豆品种共生结瘤固氮, 但共生固氮和提高蚕豆产量效果根据蚕豆品种耐旱性不同而表现不同。蚕豆品种具有耐旱性, 如青海 13 号蚕豆, 接种根瘤菌虽然能增加指标但差异不显著, 而耐旱性较差的品种, 如青蚕 14 号蚕豆, 接种根瘤菌能显著提高指标。值得一提的是, 个别指标在不接种处理下, 与接种根瘤菌相比没有减少或略有增加,

这可能是由于土壤中存在土著根瘤菌, 在共生固氮中发挥了一定的作用。可见, 根瘤菌在土壤上要发挥共生固氮作用, 受到宿主本身和土壤环境的双重影响。而接种根瘤菌株在田间试验中的占瘤率情况没有进行深入研究, 需在后续的研究中加以重视。

4 结论

本研究综合细菌形态学、生理生化指标鉴定、Biolog 细菌鉴定系统、16S rRNA 基因序列分析、全基因组分析鉴定表明, QHCD22 菌株可能为快生根瘤菌属 (*Rhizobium*) 的一个种 *Rhizobium indicum*, 干旱胁迫下的盆栽试验和大田试验表明该菌株接种蚕豆表现出较强的渗透调节能力和活性氧防御能力, 植株全氮含量增加, 根系活力增强, 提高蚕豆的抗旱性; 与青海干旱地区 3 个主栽品种均匹配且固氮酶活性显著提高, 蚕豆产量增加, 是青海干旱地区蚕豆高效根瘤菌剂研制的优良菌株资源。

参考文献

- [1] 叶茵. 中国蚕豆学. 北京: 中国农业出版社, 2003.
- [2] 李萍, 侯万伟, 刘玉皎. 青海高原耐旱蚕豆品种青海 13 号响应干旱胁迫蛋白质组学分析. 作物学报, 2019, 45(2): 267–275.
Li P, Hou WW, Liu YJ. Proteomic analysis of drought stress response on drought resistance for *Vicia faba* L. variety 'Qinghai 13' in Qinghai Plateau of China. *Acta Agronomica Sinica*, 2019, 45(2): 267–275. (in Chinese)
- [3] Stefan A, Van Cauwenberghe J, Rosu CM, Stedela C, Labroud NE, Flemetakise E, Efroze RC. Genetic diversity and structure of *Rhizobium leguminosarum* populations associated with clover plants are influenced by local environmental variables. *Systematic and Applied Microbiology*, 2018, 41(3): 251–259.
- [4] Herridge DF, Peoples MB, Boddey RM. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant and Soil*, 2008, 311(1/2): 1–18.

- [5] 陈文新, 汪恩涛. 中国根瘤菌. 北京: 科学出版社, 2011.
- [6] 胥雅馨, 徐玥, 李玲, 吴全忠, 陈国栋, 黄兴军, 翟云龙. 接种根瘤菌对南疆春大豆结瘤和生长的影响. *大豆科学*, 2021, 40(1): 98–105.
Xu YX, Xu Y, Li L, Wu QZ, Chen GD, Huang XJ, Zhai YL. Effects of rhizobia inoculation on nodulation and growth of spring soybean in southern Xinjiang. *Soybean Science*, 2021, 40(1): 98–105. (in Chinese)
- [7] 马家斌, 于晓波, 吴海英, 张明荣. 接种根瘤菌对西南地区大豆光合性能和固氮能力的影响. *中国油料作物学报*, 2020, 42(1): 102–108.
Ma JB, Yu XB, Wu HY, Zhang MR. Effects of inoculation of different *Rhizobium* on photosynthetic characteristics and nitrogen fixation of soybean. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2020, 42(1): 102–108. (in Chinese)
- [8] 王敏, 秦杰, 杨万明, 岳爱琴, 赵晋忠, 张永坡, 高春艳, 杜维俊. 晋大 88 高匹配性强耐盐根瘤菌筛选. *大豆科学*, 2021, 40(3): 385–393.
Wang M, Qin J, Yang WM, Yue AQ, Zhao JZ, Zhang YP, Gao CY, Du WJ. Screening of salt-tolerant and well symbiotic matching soybean rhizobia strains for jinda 88. *Soybean Science*, 2021, 40(3): 385–393. (in Chinese)
- [9] Sofi PA, Saba I, Amin Z. Root architecture and rhizobial inoculation in relation to drought stress response in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Applied & Natural Science*, 2017, 9(1): 502–507.
- [10] Yanni Y, Zidan M, Dazzo F, Rizk R, Mehesen A, Abdelfattah F, Elsadany A. Enhanced symbiotic performance and productivity of drought stressed common bean after inoculation with tolerant native rhizobia in extensive fields. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 2016, 232: 119–128.
- [11] 刘佳, 张杰, 秦文婧, 谢杰, 王芳东, 项兴佳, 刘光荣, 徐昌旭. 施氮和接种根瘤菌对红壤旱地花生生长及氮素累积的影响. *核农学报*, 2016, 30(12): 2441–2450.
Liu J, Zhang J, Qin WJ, Xie J, Wang FD, Xiang XJ, Liu GR, Xu CX. Effects of nitrogen application and rhizobia inoculation on peanut growth and nitrogen accumulation in red soil upland. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2016, 30(12): 2441–2450. (in Chinese)
- [12] 张慧敏, 高永, 程波, 樊璐, 通旭芳, 万芳, 刘雅婧. 接种根瘤菌后 3 个紫花苜蓿品种耐盐性综合评价. *东北林业大学学报*, 2020, 48(2): 40–46.
Zhang HM, Gao Y, Cheng B, Fan L, Tong XF, Wan F, Liu YJ. Comprehensive evaluation of salt tolerance of 3 *Medicago sativa* L. cultivars inoculated with *Rhizobium*. *Journal of Northeast Forestry University*, 2020, 48(2): 40–46. (in Chinese)
- [13] Kumar N, Srivastava P, Vishwakarma K, Kumar R, Kuppala H, Maheshwari SK, Vats S. The *Rhizobium*-plant symbiosis: state of the art. *Plant Microbe Symbiosis*, 2020: 1–20. DOI: 10.1007/978-3-030-36248-5_1
- [14] Noori F, Etemasi H, Najafi Zaeini H, Khoshkholgh-Sima N A, Hosseini Salekdeh G, Alishahi F. Mining alfalfa (*Medicago sativa* L.) nodules for salinity tolerant non-rhizobial bacteria to improve growth of alfalfa under salinity stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018, 162: 129–138.
- [15] 马蕾, 李胜, 马绍英, 陈桂平, 柴强, 杨晓明. 豌豆根瘤共生植株生长和光合荧光特性对水分胁迫的响应. *西北农业学报*, 2020, 29(4): 537–551.
Ma L, Li S, Ma SY, Chen GP, Chai Q, Yang XM. Response of growth and photosynthetic fluorescence characteristics of *Rhizobium* symbiosis plants to water stress. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2020, 29(4): 537–551. (in Chinese)
- [16] Williams PM, Sicardi De Mallorca M. Effect of osmotically induced leaf moisture stress on nodulation and nitrogenase activity of *Glycine max*. *Plant and Soil*, 1984, 80(2): 267–283.
- [17] Rejili M, Mahdhi M, Fterich A, Dhaoui S, Guefrachi I, Abdeddayem R, Mars M. Symbiotic nitrogen fixation of wild legumes in tunisia: soil fertility dynamics, field nodulation and nodules effectiveness. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2012, 157: 60–69.
- [18] 刘旭艳, 石凤翎, 刘昊, 王瑞峰, 石凤玲. 接种根瘤菌对苜蓿生长及土壤养分的影响. *中国草地学报*, 2016, 38(6): 45–52.
Liu XY, Shi FL, Liu H, Wang RF, Shi FL. Effects of *Rhizobium* on the growth of alfalfa and the soil nutrient content. *Chinese Journal of Grassland*, 2016, 38(6): 45–52. (in Chinese)
- [19] Furlan AL, Bianucci E, Castro S, Dietz KJ. Metabolic features involved in drought stress tolerance mechanisms in peanut nodules and their contribution to biological nitrogen fixation. *Plant Science*, 2017, 263: 12–22.
- [20] 熊惠洋. 蚕豆土著根瘤菌的生物地理分布及其形成机制. 中国农业大学博士学位论文, 2017.

- [21] 路敏琦, 李俊, 姜昕, 李力, 沈德龙, 曹凤明. 我国蚕豆根瘤菌的多样性和系统发育研究. 应用与环境生物学报, 2007, 13(1): 73–77.
Lu MQ, Li J, Jiang X, Li L, Shen DL, Cao FM. Diversity and phylogeny of rhizobia isolated from the nodules of broad bean (*Vicia faba* L.) in China. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2007, 13(1): 73–77. (in Chinese)
- [22] 韩梅, 马晓彤, 曹卫东, 张宏亮, 王雪翠. 青海蚕豆根瘤菌的系统发育与多样性研究. 青海大学学报: 自然科学版, 2015, 33(5): 5–9.
Han M, Ma XT, Cao WD, Zhang HL, Wang XC. Phylogeny and diversity of broad bean *Rhizobium* in Qinghai. *Journal of Qinghai University: Natural Science Edition*, 2015, 33(5): 5–9. (in Chinese)
- [23] 张小娟. 青海省不同生态区蚕豆根瘤菌 16S rDNA 分析. 干旱地区农业研究, 2018, 36(4): 259–263.
Zhang XJ. 16S rDNA gene of *Rhizobium* isolated from faba bean of different ecotopes in Qinghai province. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 2018, 36(4): 259–263. (in Chinese)
- [24] 邹兰, 王科, 钟坤仲, 周涛, 杨玲, 杨华, 徐开未. 攀西地区蚕豆根瘤菌抗逆性研究. 湖北农业科学, 2013, 52(11): 2516–2518, 2523.
Zou L, Wang K, Zhong KZ, Zhou T, Yang L, Yang H, Xu KW. Research on stress tolerance of faba bean rhizobia in Panxi. *Hubei Agricultural Sciences*, 2013, 52(11): 2516–2518, 2523. (in Chinese)
- [25] 李萍, 滕长才, 丁宝军, 刘玉皎, 侯万伟, 何涛. 青海干旱地区蚕豆根瘤菌耐旱性研究. 江西农业大学学报, 2021, 43(6): 1241–1249.
Li P, Teng CC, Ding BJ, Liu YJ, Hou WW, He T. A study on drought tolerance of rhizobia strains of faba bean (*Vicia faba* L.) isolated from drought regions in Qinghai plateau. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2021, 43(6): 1241–1249. (in Chinese)
- [26] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [27] Yoon SH, Ha SM, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H, Chun J. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2017, 67(5): 1613–1617.
- [28] Coil D, Jospin G, Darling AE. A5-miseq: an updated pipeline to assemble microbial genomes from Illumina MiSeq data. *Bioinformatics*, 2014, 31(4): 587–589.
- [29] Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology*, 2012, 19(5): 455–477.
- [30] Walker BJ, Abeel T, Shea T, Priest M, Abouelliel A, Sakthikumar S, Cuomo CA, Zeng QD, Wortman J, Young SK, Earl AM. Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. *PLoS One*, 2014, 9(11): e112963.
- [31] 马晓彤. 苜蓿根瘤菌与苜蓿品种共生匹配优良组合筛选的研究. 中国农业科学院硕士学位论文, 2009.
- [32] 姚延轩, 接伟光, 杜燕, 赵冬梅, 阎秀峰. 根瘤菌的分类、鉴定及应用技术研究现状. 中国农学通报, 2020, 36(15): 100–105.
Yao YX, Jie WG, Du Y, Zhao DM, Yan XF. Taxonomy, identification and application of *Rhizobium*. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2020, 36(15): 100–105. (in Chinese)
- [33] 郑浩宇, 黄炳林, 王孟雪, 金喜军, 张玉先, 胡国华. 氮肥减施与接种根瘤菌对大豆光合与产量的影响. 大豆科学, 2019, 38(3): 413–420.
Zheng HY, Huang BL, Wang MX, Jin XJ, Zhang YX, Hu GH. The effect of nitrogen fertilizer reduction and *Rhizobium* inoculation on soybean photosynthesis and yield. *Soybean Science*, 2019, 38(3): 413–420. (in Chinese)
- [34] 马蕾, 马绍英, 陈贵平, 柴强, 李胜. 豌豆与根瘤共生对水分胁迫的生理响应. 草业学报, 2019, 28(9): 96–109.
Ma L, Ma SY, Chen GP, Chai Q, Li S. Physiological responses of pea and nodule symbiosis to water stress. *Acta Prataculturae Sinica*, 2019, 28(9): 96–109. (in Chinese)
- [35] 程波, 王健, 石红标, 张慧敏, 张瑞强, 甄超, 翟波. 草甘膦和根瘤菌对紫花苜蓿品质及固氮能力的影响. 中国草地学报, 2021, 43(2): 47–53.
Cheng B, Wang J, Shi HB, Zhang HM, Zhang RQ, Zhen C, Zhai B. Effects of glyphosate and *Rhizobium* on the quality traits and nitrogen fixation of *Medicago sativa*. *Chinese Journal of Grassland*, 2021, 43(2): 47–53. (in Chinese)
- [36] Noor F, Etemasi H, Zaeini HN, Khoshkholgh-Simaet NA, Salekdeh GH, Alishah F. Mining alfalfa (*Medicago sativa* L.) nodules for salinity tolerant non-rhizobial bacteria to improve growth of alfalfa under salinity stress. *Ecotoxicology and Environmental*

Safety, 2018, 162: 129–138.

- [37] 刘鹏, 田颖哲, 钟永嘉, 廖红. 酸性土壤上花生高效根瘤菌的分离及应用. *中国农业科学*, 2019, 52(19): 3393–3403.
- Liu P, Tian YZ, Zhong YJ, Liao H. Isolation and application of effective *Rhizobium* strains in peanut on acidic soils. *Scientia Agricultura Sinica*, 2019, 52(19): 3393–3403. (in Chinese)
- [38] Li Y, Lei XQ, Xu YT, Zhu H, Xu MY, Fu LJ, Zheng W, Zhang JL, Zheng TL. *Rhizobium albus* sp. nov., isolated from lake water in Xiamen, Fujian province of China. *Current Microbiology*, 2017, 74(1): 42–48.
- [39] Zhao JJ, Zhang J, Zhang RJ, Zhang CW, Yin HQ, Zhang XX. *Rhizobium rhizosphaerae* sp. nov., a novel species isolated from rice rhizosphere. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2017, 110: 651–656.
- [40] Chan JZM, Halachev MR, Loman NJ, Constantinidou C, Pallen MJ. Defining bacterial species in the genomic era: insights from the genus *Acinetobacter*. *BMC Microbiology*, 2012, 12: 302.
- [41] Rahi P, Giram P, Chaudhari D, DiCenzo GC, Kiran S, Khullar A, Chandel M, Gawari S, Mohan A, Chavan S, Mahajan B. *Rhizobium indicum* sp. nov., isolated from root nodules of pea (*Pisum sativum*) cultivated in the Indian trans-Himalayas. *Systematic and Applied Microbiology*, 2020, 43(5): 126–127.

补充材料

附图 1 根瘤菌 B.T.B 检测

本文补充材料见网络版 <http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>。补充材料为作者提供的原始数据，作者对其学术质量和内容负责。

附图 2 菌株脂肪酸气相色谱图

本文补充材料见网络版 <http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>。补充材料为作者提供的原始数据，作者对其学术质量和内容负责。

附表 1 16S rRNA 基因序列比对分析

本文补充材料见网络版 <http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>。补充材料为作者提供的原始数据，作者对其学术质量和内容负责。

附表 2 根瘤菌株 ANI 分析

本文补充材料见网络版 <http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>。补充材料为作者提供的原始数据，作者对其学术质量和内容负责。

附表 3 根瘤菌株 DDH 分析

本文补充材料见网络版 <http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>。补充材料为作者提供的原始数据，作者对其学术质量和内容负责。