

新疆豆科短命植物弯果胡卢巴根瘤与根瘤菌的特性

油天钰, 谭植, 谷丽丽, 李秀明, 姚世响, 兰海燕*, 张富春

(新疆大学生命科学与技术学院, 新疆生物资源基因工程重点实验室, 乌鲁木齐 830046)

摘要:【目的】对弯果胡卢巴根瘤增殖特性、根瘤显微结构、根瘤菌遗传聚类以及根瘤菌各种抗性进行观察、分析和鉴定。【方法】分别利用不同基质培养、石蜡切片和树脂半超薄切片以及 16S rRNA 基因序列扩增和序列分析等技术方法对弯果胡卢巴根瘤和根瘤菌进行研究。【结果】① 在混合土(营养土:白杨林下土:沙土=1:1:1)中有明显结瘤且植株结荚最多,多数根瘤呈掌状和姜形;② 显微结构显示根瘤由表及里分为表层、皮层、维管束、已侵染细胞与未侵染细胞几部分;③ 对根瘤菌 16S rRNA 基因全长序列(1377bp)测序并分析,结果显示其与苜蓿中华根瘤菌 16S rRNA 基因的同源性达 99.9%;④ 根瘤菌抗逆性鉴定结果显示,在温度为 4~60 (20 min)、pH 值为 6.0~12.0、NaCl 浓度为 0%~2% 的范围内根瘤菌均可正常生长;低浓度的卡那霉素、链霉素及头孢霉素等抗生素(25 μg/mL)就能完全抑制根瘤菌的生长,但仍能在 100 μg/mL 的氨苄青霉素中正常生长。【结论】弯果胡卢巴结瘤需要较好的土壤及通气条件;根瘤簇生,瘤内含大量被根瘤菌侵染的细胞;弯果胡卢巴根瘤菌与苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)同源性最高,是一类较耐高温和强碱的菌株。

关键词: 豆科短命植物;弯果胡卢巴;根瘤;根瘤菌;显微结构;16S rRNA 基因;抗逆性
中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 07-0917-07

短命植物于早春萌发,能于干旱季节来临之前迅速完成生活史以逃避严酷环境的胁迫,主要分布于中亚、西亚、地中海沿岸等温带干旱区。在我国,短命植物主要分布于新疆北部,是新疆干旱区植被中一类重要的特殊生态类型^[1]。弯果胡卢巴(*Trigonella arcuata* C.A.Mey) 属豆科(*Legume*)胡卢巴属(*Trigonella*)植物,生长期一般在 3 月下旬至 6 月初,是典型的短命植物^[2]。在我国弯果胡卢巴主要分布于新疆准噶尔盆地等荒漠和与其毗邻的平原地带。由于弯果胡卢巴存在吸氢酶体系,在低温干旱条件下仍能有效结瘤固氮且植株蛋白质含量高,因此是干旱区早春转场优良牧草的重要来源^[3]。目前对于弯果胡卢巴的研究主要集中在:不同发育时期结瘤固氮特性^[2-4]、部分抗逆生理^[5]、生殖生态学^[1]等方面,对其根瘤的形态、解剖

结构及分类地位方面还未见报导。因此本文针对以上问题,对弯果胡卢巴不同基质结瘤特性、根瘤石蜡切片进行了观察,并对分离纯化后的弯果胡卢巴根瘤菌进行了 16S rRNA 基因的测序并初步确定了分类地位。同时,对其温度耐受范围、耐酸碱性、耐盐性及抗生素抗性进行了测定,以期为今后弯果胡卢巴做为早春牧草的人工驯化栽培品种,以及固氮菌的进一步开发利用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 植物:弯果胡卢巴幼苗采自新疆农业大学试验田,为上一年秋季落种后自然萌发,于第 2 年 3 月挖出并移入不同土壤基质,移栽时植株已有 3~5 片真叶。

基金项目: 国家教育部留学回国人员启动基金(2006-2008); 新疆生物资源与基因工程重点实验室开放基金(XJDX0201-2005-03); 教育部科学技术基础条件平台建设项目(505016)

*通讯作者。Tel: +86-991-8583259; Fax: +86-991-8583517; E-mail: lanhaiyan@xju.edu.cn

作者简介: 油天钰(1983-), 男, 山东人, 硕士研究生, 生物化学与分子生物学。E-mail: yty2002@163.com

收稿日期: 2007-12-18; 修回日期: 2008-04-08

1.1.2 菌株：从弯果胡卢巴根瘤中分离纯化，能生长于 YMA 刚果红平板培养基且不吸色的菌落。

1.1.3 主要试剂和仪器：Taq 酶、引物 (TaKaRa 公司)；显微镜(加拿大 Bock Optronics 公司)；离心机 (德国 SIGMA 公司)；PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)；凝胶成像仪 (美国 Alpha 公司)。

1.2 弯果胡卢巴在不同基质中的结瘤特性观察

从 3 月 20 日至 6 月 10 日期间，将弯果胡卢巴幼苗分别移栽至不同基质中：①自来水；②蛭石；③沙土(采自沙漠)；④混合土(营养花土 白杨林下土 沙土=1 1 1)。置于室外有充足光照的空地上自然生长。在生长初期和晚期浇灌 100 mL 1/2 MS 营养液。分别在幼苗晚期、开花期、结荚初期及末期挖出整株(尽量使根保持完整)进行观察和统计(包括拍照；测量植株高度、分支数、结荚数和根长，并统计不同基质的结瘤情况)。

1.3 弯果胡卢巴根瘤形态观察

将弯果胡卢巴根瘤挖出、洗净，观察根瘤形状、颜色，并用游标卡尺测量大小。测量方法：长度按生长纵长轴计算；宽度按根瘤伸展幅宽计算；厚度按与长和宽垂直处计算。

1.4 弯果胡卢巴显微结构观察

参照文献[6~9]方法制作石蜡切片和半超薄切片，用 Motic B5 专业系列光学显微镜(Bock Optronics Inc., Canada)观察并取像。

1.5 弯果胡卢巴根瘤菌的分离与纯化

将弯果胡卢巴根瘤洗净并进行彻底表面消毒，然后参照文献[10, 11]对根瘤菌进行分离纯化，并参照文献[12]对根瘤菌进行革兰氏染色观察。

1.6 弯果胡卢巴根瘤菌 16S rRNA 基因扩增与分析

参照文献[13]提取根瘤菌总 DNA。PCR 引物参考文献[14]报道设计：上游引物：5'-AGAGTTTGATC-CTGGCTCAG-3；下游引物：5'-TACGGCTACCTG-TTACGACTT-3。PCR 反应体系采用 20 μL；反应条件：① 95 4 min。② 95 50 s, 55 50 s；72 1 min, 35 个循环。③ 72 7 min。

将 16S rRNA 基因的 PCR 产物寄北京奥科生物公司(北京 AuGCT 公司)测序。根据测序结果，用 BLAST 软件与 GenBank 中已知的 16S rDNA 序列进行比对，选取相似性序列，利用 DNAMAN 进行序列聚类分析。

1.7 弯果胡卢巴根瘤菌的抗逆性鉴定

参照文献[4, 5, 15, 16]对根瘤菌温度生长范围、耐酸性、耐盐性及抗生素抗性进行测定。

1.8 数据分析

利用 SPSS 软件按单因素方差分析法(one-way ANOVA)对弯果胡卢巴在不同基质中的结瘤数进行统计学处理，P<0.05 为差异显著；P<0.01 为差异极显著。

2 结果

2.1 不同基质中弯果胡卢巴根瘤增殖情况

如图 1 所示，弯果胡卢巴植株矮小，呈丛生状(图 1-A)，具典型的黄色蝶形花(图 1-B)，聚生长角果呈镰刀型弯曲(图 1-C)。自然环境中的弯果胡卢巴植株通常 3 月萌发，4~5 月开花结果，6 月枯萎完成生活史。将其头年自然落种萌发形成的早期幼苗分别移至不同基质中，观察基质对根瘤增殖的影响情况。生长于水、沙土和蛭石中的植株从苗期至结荚后期，在整个根系上始终未观察到肉眼可见的根瘤。水培植株根系生长顺滑，上部植株也可正常开花，但分枝和结荚均很少；生长于蛭石和沙土中的植株根上普遍出现扭结，上部分枝和结荚状况均优于水培，且蛭石基质更好；在混合土中发育的根系上普遍观察到结瘤现象，且其上部植株结荚数平均每株达 40 个，显著高于其他三种基质中植株的结荚数(P<0.05)(表 1)。

弯果胡卢巴根瘤一般长在须根上，形状大部分为掌状和姜形(图 2)，通常在根瘤幼嫩期顶部为白色，中部为粉红色，基部为黄色；当根瘤逐渐变老其通体渐变为黄色。本研究中，室内栽培弯果胡卢巴果期根部所结不同形状根瘤的大小一般在：1.5 mm~4.5 mm(长)×1.5 mm~3.0 mm(宽)×2.0 mm~6.0 mm(厚)的范围之内(表 2)。

表 1 不同土壤基质对弯果胡卢巴植株生长及根瘤增殖的影响
Table 1 Effects of different soil matrixes on *T. arcuata* growth and nodule proliferation

Matrixes	Number of branches/plant	Number of pods/plant	Root nodules
Water	1.80±0.37	4.80±0.86	-
Vermiculite	4.50±0.50	9.50±1.50	-
Desert sands	1.50±0.50	6.00±0.00	-
Mixed soil ^a	5.20±0.37	40.00±9.95*	+

Values are given as the mean±SD of 10 measurements; -: non-nodulation; +: nodulation; *: P< 0.05 (mixed soil compared with the others). a: Mixed soil: nutritious garden soil poplar zone soil desert sands=1 1 1



图 1 弯果胡卢巴植株的外部形态

Fig. 1 The external morphology of *Trigonella arcuata*. A: The morphology of whole plant; B: The inflorescence; C: The fruits.



图 2 弯果胡卢巴根瘤根瘤的不同形态

Fig. 2 Different shapes of root nodules of *T. arcuata*. A: Digitations-like shape; B: Palm-like shape; C: Ginger-like shape.

表 2 不同形状根瘤的大小

Table 2 Sizes of different shapes of nodules

Digitations-like shape			Palm-like shape			Ginger-like shape		
Length /mm	Width /mm	Thickness /mm	Length /mm	Width /mm	Thickness /mm	Length /mm	Width /mm	Thickness /mm
1.84	1.91	2.20	2.40	2.13	3.31	4.42	2.80	5.50

Values are given as the mean±SD of 10 measurements.

2.2 弯果胡卢巴根瘤的显微结构

图 3 示弯果胡卢巴掌状根瘤幼嫩时期的纵切显微结构图。从图的整体(图 3-A)和局部(图 3-B,C,D,E)结构可看出,根瘤由表及里可分为:表皮(epidermis, E; 最外 1-2 层细胞,图中部分细胞已破裂)(图 3-E);皮层(cortex, C)或薄壁细胞层(parenchyma cell, PC)(位于紧接表皮和棕红色细胞区之间被染成绿色的组织)(图

3-E);微管束(vascular bundle, VB)(介于皮层和棕红色细胞间或棕红色细胞群之间,纵向或横向密集排布的小细胞群)(图 3-C,D);已感染细胞(Infected cell, IC)以及未感染细胞(uninfected cell, UIC)(被番红染成棕红色的细胞群以及相邻未被染细胞群)(图 3-B)。由于弯果胡卢巴根瘤菌为革兰氏阴性菌,能被番红染成红色,大量的根瘤菌感染具有中央大液泡的根瘤细胞后,使细胞体积明显

增大并使胞质呈现棕红色；而与感染细胞相邻的未感染区细胞液泡小而核大，且可能存在分生组织，其细胞的快速分裂和生长导致根瘤菌感染机率降低。图 3-A 还显示，除了皮层、维管组织及部分分生组织，根瘤中大部分细胞均被根瘤菌所感染。

为更清楚地显示根瘤菌在被感染细胞中的存在，我们制作了树脂半超薄切片（甲苯胺蓝-O 染色），观察结果如图 3F 所示。在感染细胞的胞质内，可观察到大量强着色颗粒存在，可能是聚羟基丁酸^[17, 18]，这通常被认为是根瘤菌中最常见的一类内含物^[19]。

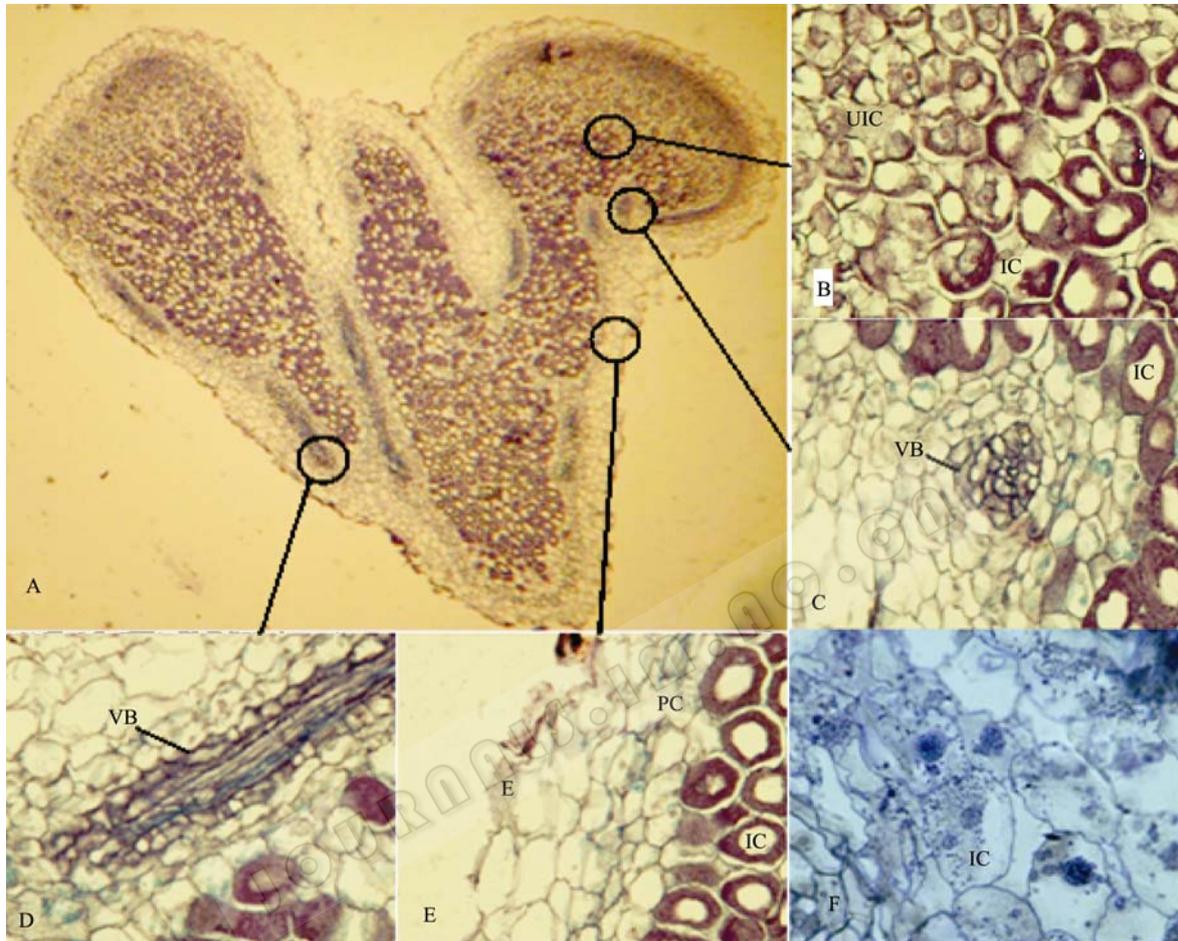


图 3 根瘤的显微结构

Fig. 3 The microstructure of root nodule of *Trigonella arcuata*. A. Longitudinal cut of the nodule (40×); B. Infected and uninfected cells (400×); C., D. Crosscut and longitudinal cut of vascular bundle (400×); E. Epidermis and cortex (400×); F. Inclusion particles (polyhydroxybutyric acid) in infected cells (1000×). A, B, C, D, E were paraffin sections, F was resin semi-ultrathin section.

2.3 弯果胡卢巴根瘤菌的分离及 16S rRNA 基因序列的聚类分析

从弯果胡卢巴根瘤中分离纯化的根瘤菌，经革兰氏染色为阴性菌。随后提取根瘤菌基因组 DNA，利用原核生物通用引物对弯果胡卢巴 16S rRNA 基因进行了扩增和测序，获得全序列 1377 bp。目前此序列已提交 GenBank，并获得国际基因库接受号 (Accession No.) EU183346。

用 BLAST 软件将以上序列与 GenBank 中已知的 16S rRNA 基因进行了同源性和聚类分析，结果显示

弯果胡卢巴与苜蓿中华根瘤菌 (*Sinorhizobium meliloti*) 聚类在一起 (图 4)，且其 16S rRNA 基因的同源性达 99.9%。据报导，苜蓿中华根瘤菌属于抗逆性较强的一类根瘤菌^[4, 5]。

2.4 根瘤菌的抗逆性鉴定

为了更详细地了解弯果胡卢巴根瘤菌对各种环境因素的耐受性，我们对此菌株进行了温度、NaCl、pH 值及各种抗生素的影响实验。不同温度范围实验表明，根瘤菌在 4 ~60 之间均可生长，但 4 时生长十分缓慢 (约 7~8 d 才出现肉眼可见菌落) 且菌

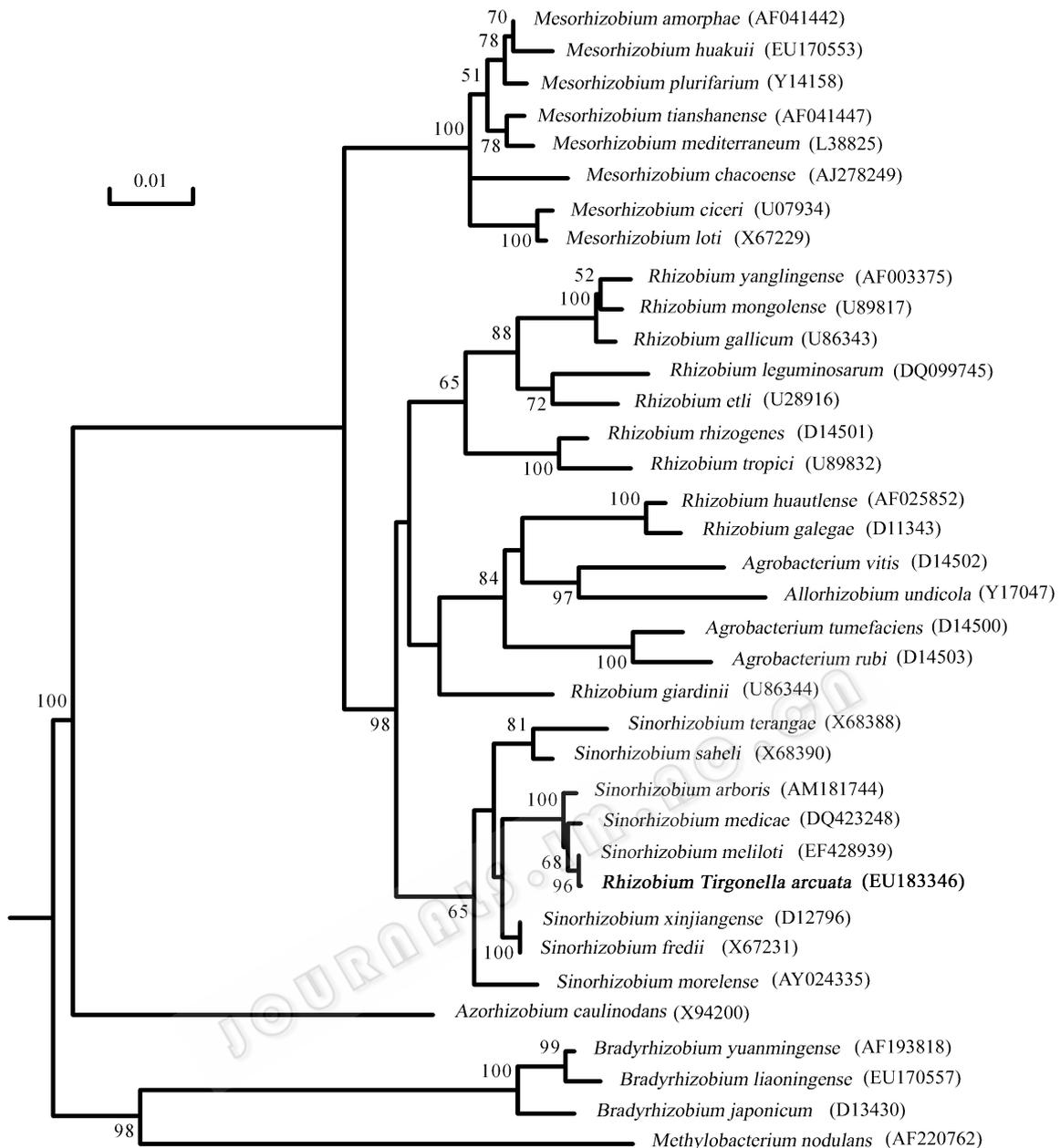


图4 供试菌株16S rRNA基因序列分子进化遗传分析

Fig. 4 Genetic analysis of *Rhizobium Trigonella arcuata* 16S ribosomal RNA gene sequence. The numbers at each branch points indicate the percentage supported by bootstrap, and in parentheses after each bacterial name are 16S rRNA gene accession numbers in GenBank. Bar(0.01): 1% sequence divergence.

落稀少;在 50 放置 35 min 再转入 28 培养,有部分菌落生长良好;但在 50 放置 40 min 以上则无菌落出现。当温度增至 60 后,此菌可持续 20 min,当超过 25 min 后,菌落则无法正常生长。

与干旱区土壤特点相适应,此环境下生长的根瘤菌通常都会对盐离子和酸碱表现一定的耐受性。本实验中弯果胡卢巴根瘤菌能在 0.4%~2%NaCl 的培养基上正常生长,但超过 3%时,菌则无法生长。酸碱耐

性测定结果显示:弯果胡卢巴根瘤菌在 pH6.0~12.0 范围均能生长,其中在 pH 7.0~10.0 之间菌的生长状态无显著差异,当 pH 值高于 11.0 时,菌落生长比对照稍慢;但低于 6.0 时菌落数明显减少且菌落变小。

根瘤菌对抗生素的敏感性是分群的重要生理生化指标。本研究对弯果胡卢巴进行了卡那霉素、氨苄青霉素、链霉素及头孢霉素四种抗生素的耐受性测定,实验结果表明,在浓度为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,根瘤菌在卡那霉素、

链霉素及头孢霉素培养基上均不能生长,而氨基青霉素浓度达 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,仍能观察到菌落生长,但随氨基青霉素浓度的增大,菌落数减少且生长状态不良。

3 讨论

弯果胡卢巴是广泛分布于新疆北部的一种豆科短命植物,它不仅是早春牧草短缺时的优良牧草,而且生活史短暂,是研究根瘤固氮的好材料^[20]。本研究在前人研究基础上^[1, 3],对弯果胡卢巴在不同基质中的结瘤特性、根瘤的形态和显微结构、根瘤菌的聚类及各种抗性进行了初步研究。从不同基质根瘤增殖实验结果初步分析,弯果胡卢巴在本实验的混合土(营养花土 白杨林下土 沙土=1 1 1)中获得了最高的结瘤和结荚数,而蛭石中的植株结荚数多于沙土,尽管未发现结瘤(表 1)。这意味着,尽管弯果胡卢巴生长的环境通常较恶劣^[3],但良好的土壤基质结构或疏松度及营养成分的持续供给对促进植株根瘤的增殖以及提高结实率有较显著影响。

本实验获得的根瘤在外形上多呈掌状或姜状。荚果中期的根瘤中约 1/3 根瘤中部呈粉红色,2/3 通体呈姜黄色,而粉红色根瘤通常具有最高固氮活性^[3]。对粉红色根瘤的显微结构观察显示:在各种组织中感染细胞占大部分,其细胞质中布满了聚羟基丁酸强着色颗粒,此物质是根瘤菌最常见的内含物,且在感染初期大量出现^[17, 18, 19],这意味着在粉红色根瘤中大量有根瘤菌的存在使其具有较高固氮活性。

16S rRNA 基因序列具有保守性、可变性及长度适中的特征,其数据库信息量大,是原核生物分类鉴定的重要手段^[21]。本实验对弯果胡卢巴根瘤菌的 16S rRNA 基因测序结果显示,其与苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*) 16S rRNA 基因序列同源性非常高(99.9%)。由于胡卢巴属(*Trigonella*) 在分类上与苜蓿属(*Medicago*)同属于车轴草族(*Trifolieae*),有的研究者就把弯果胡卢巴(*Trigonella arcuata*)置于苜蓿属中,定名为 *Medicago medicaginoides*。已有报道指出苜蓿根瘤菌的一些菌株也能够草木犀和胡卢巴上结瘤^[22]。本研究从干旱区弯果胡卢巴中分离的根瘤菌 16S rRNA 基因全序列与苜蓿中华根瘤菌的相似性如此之高,则有可能同属于苜蓿中华根瘤菌,而确定的结果还有待进一步的实验证实。

与他人相比^[4],本实验所分离的弯果胡卢巴根瘤菌具有更广泛的温度生长范围,这可能是此菌长期适

应新疆早春至初夏悬殊的温差环境的结果。在耐酸碱度方面,弯果胡卢巴根瘤菌显示了很强的耐碱能力(pH 6.0~12.0),与新疆和西北其他地区豆科植物根瘤菌相比,耐酸性以及耐盐性稍弱^[4, 5, 23],这也与新疆早春降水量丰富土壤盐度降低,而土壤质地偏碱性特点相适应。各种抗生素抗性的差异是根瘤菌分类的一项重要指标。本研究所分离的根瘤菌在四种抗生素鉴定中只表现出对氨基青霉素有较强抗性,这也与苜蓿中华根瘤菌的抗生素抗性相似^[24],而与其他新疆根瘤菌对链霉素表现出的高抗性有所不同^[4]。

致谢 本文作者对新疆农业大学谭敦炎教授为本实验提供的弯果胡卢巴材料表示衷心感谢。

参 考 文 献

- [1] 姚红, 谭敦炎. 胡卢巴属 4 种短命植物个体大小依赖的繁殖输出与生活史对策. 植物生态学报(*Acta Phytoecologica Sinica*), 2005, 29(6): 954-960.
- [2] 王卫卫, 关桂兰. 新疆地区结瘤固氮的豆科植物调查. 植物生理学通报(*Plant Physiology Communications*), 1992, 28 (2): 148-154.
- [3] 关桂兰, 李仲元, 杨玉锁, 等. 新疆干旱区短命豆科植物弯果胡卢巴结瘤固氮的研究. 干旱区研究(*Arid Zone Research*), 1988, 4: 1-6.
- [4] 王卫卫, 关桂兰, 李仲元. 新疆根瘤菌抗性研究. 干旱区研究(*Arid Zone Research*). 1989, 4: 9-17.
- [5] 阚凤玲, 陈文新. 西部某些根瘤菌的数值分类和 16S rDNA PCR-RFLP 分析. 微生物学通报 (*Microbiology*), 2002, 29(3): 1-8.
- [6] 何一, 蔡霞, 王卫卫. 白车轴草和紫花苜蓿根瘤的显微及超微结构. 西北植物学报(*Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*), 2003, 23(3): 369-373.
- [7] 章宁, 黄维南. 超结瘤大豆根瘤的亚显微结构. 亚热带植物通讯(*Subtrop. Plant Res. Commun*), 1997, 26(1): 25-28.
- [8] 韩素芬, 黄金生, 甘习华, 等. 刺槐根瘤发生的超微结构研究. 南京林业大学学报(*Journal of Nanjing Forestry University*), 1996, 20(4): 17-18.
- [9] 蒋虎祥, 田金仙. 植物电镜技术. 南京: 南京大学出版社, 1990.
- [10] 王卫卫, 陈菊英, 董文彩, 等. 甘肃宁夏根瘤菌的分离及回接鉴定. 干旱区研究(*Arid Zone Research*), 1996, 13(4): 42-46.
- [11] 上海植物生理学会. 植物生理学实验手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1985.
- [12] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验. 第三版. 北京: 高等

- 教育出版社, 1999.
- [13] Wen PC, Tsong TK. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Research*, 1993, 21(9): 2260.
- [14] Weissburg WG, Barns SM, Peletier DA, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetics study. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(2): 697-703.
- [15] 何恒斌, 贾昆峰, 贾桂霞, 等. 沙冬青根瘤菌的抗逆性. 植物生态学报(*Acta Phytoecologica Sinica*), 2006, 30(1): 140-146.
- [16] 关桂兰, 郭沛新, 王卫卫, 等. 新疆干旱地区根瘤菌资源研究 II. 根瘤菌抗逆性及生理生化反应特性. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 1992, 32(5): 346-352.
- [17] 蔡霞, 何一, 王卫卫. 沙打旺根瘤超微结构研究. 西北大学学报(自然科学版)(*Journal of Northwest University(Natural Science Edition)*), 2004, 34(6): 695-697.
- [18] 龚明福, 韦革宏, 吕双庆, 等. 骆驼刺根瘤菌的超微结构研究. 西北植物学报(*Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*), 2005, 25(5): 932-936.
- [19] 韩善华. PHB 颗粒在红豆草根瘤细菌发育中的动态变化. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 1995, 35(2): 136-140.
- [20] 毛祖美, 张佃民. 新疆北部早春短命植物区系纲要. 干旱区研究(*Arid Zone Research*), 1994, 11(3): 1-26.
- [21] 刘文强, 贾玉萍, 赵宏坤. 16S rRNA 在细菌分类鉴定研究中的应用. 动物医学进展(*Progress In Veterinary Medicine*), 2006, 27(11): 15-18.
- [22] 林榕姗, 杜秉海, 李小红, 等. 一株能在大豆上结瘤的苜蓿中华根瘤菌. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 2004, 44(6): 729-733.
- [23] 祁娟, 师尚礼. 苜蓿种子内生根瘤菌抗逆能力评价与筛选. 草地学报(*Acta Agrestia Sinica*), 2007, 15(2): 138-141.
- [24] 黄玲. 新疆优良苜蓿根瘤菌株 CX103 和 CX107 的生理生化特性. 新疆农业科学(*Xinjiang Agricultural Sciences*), 1995, 4: 173-174.

Characterization of root nodule and rhizobium of a leguminosae ephemeral plant- *Trigonella arcuata* C.A.Mey in Xinjiang

Tianyu You, Zhi Tan, Lili Gu, Xiuming Li, Shixiang Yao, Haiyan Lan*, Fuchun Zhang

(Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China)

Abstract: [Objective] We studied root nodule proliferation, nodule microstructure, genetic cluster and stress resistance of the rhizobium of *Trigonella arcuata*. [Methods] We characterized root nodule and rhizobium with various soil matrixes cultivation, paraffin section, resin semi-ultrathin section techniques, and 16S rRNA gene cluster analysis. [Results] ① Plants grew in mixed soil (nutritious garden soil poplar zone soil desert sands=1 1 1), had the most nodule proliferation and bore the most pods. The shapes of nodule were palm- or ginger-like; ② Microstructure of the nodule revealed five different parts differentiated within the nodule: epidermis(E), cortex(C), vascular bundle(VB), infected cells(IC) and uninfected cells(UIC); ③ Genetic cluster analysis of the full length 16S rRNA gene sequence (1377 bp) indicated that the rhizobium isolated shared the highest identities with *Sinorhizobium meliloti*; ④ The rhizobium could grow between 4 and 60 (20 min), pH 6.0~12.0 and 0~2%NaCl. For the antibiotic sensitivity, the rhizobium could not grow normally in medium with 25 µg/mL Kanamycin, Streptomycin or Cephalothin, except for 100 µg/mL Ampicillin. [Conclusion] Good conditions of soil matrixes were important for nodulation of *T. arcuata*; A large quantity of cells in fascicular nodules were infected by rhizobia; 16S rRNA gene sequence of *T. arcuata* shared the highest identities with that of *Sinorhizobium meliloti*, and this strain was able to tolerate relatively higher temperature and alkaline.

Keywords: leguminosae ephemeral plant; *Trigonella arcuata* C.A.Mey; root nodule; rhizobium; microstructure; 16S rRNA gene; stress resistance

Supported by the Chinese Ministry of Education's Program for Returned Overseas Scholars (2006-2008), the Open Fund of Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering (XJDX0201-2005-03) and the Basic Science Research Platform Construction of Ministry of Education (505016)

*Corresponding author. Tel: +86-991-8583259; Fax: +86-991-8583517; E-mail: lanhaiyan@xju.edu.cn

Received: 18 December 2007/ Revised: 8 April 2008