

DOI: 10.11686/cyxb2024163

http://cyxb.magtech.com.cn

李雪梅, 姚拓, 李昌宁, 等. 甘南野生天蓝苜蓿高效共生、抗逆根瘤菌筛选鉴定. 草业学报, 2025, 34(3): 134—143.

LI Xue-mei, YAO Tuo, LI Chang-ning, et al. Screening and identification of symbiotically efficient and stress-resistant rhizobia of wild *Medicago lupulina* in Gannan. Acta Prataculturae Sinica, 2025, 34(3): 134—143.

甘南野生天蓝苜蓿高效共生、抗逆根瘤菌筛选鉴定

李雪梅, 姚拓*, 李昌宁, 杨晓蕾, 王晚霞, 张怡忻

(甘肃农业大学草业学院, 草业生态系统教育部重点实验室, 甘肃兰州 730070)

摘要:为进一步挖掘高寒草地野生天蓝苜蓿根瘤菌资源, 筛选与宿主植物高效共生的菌株。本研究利用YMA刚果红培养基从野生天蓝苜蓿中分离根瘤菌, 通过菌落形态观察、产酸产碱反应结合16S rRNA基因序列分析进行菌株鉴定, 原宿主回接验证其促生特性, 离体耐酸、耐碱及温度耐受性测定菌株抗逆能力。结果表明:从野生天蓝苜蓿中分离得到4株菌株, 菌落形态和产酸产碱结果符合根瘤菌特性, 经鉴定菌株GNT1和GNT6为苜蓿中华根瘤菌, 菌株GNT2为吉氏副根瘤菌, 菌株GNT4为豆根副根瘤菌。4株根瘤菌回接后植株单株结瘤数、株高、根长及植株干重分别是不接种处理的2.06~3.64倍、0.75~3.17倍、0.21~0.38倍和0.55~2.82倍, 有效结瘤数和固氮酶活性分别为11.33~18.00个、5.71~10.97 $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, 不接种处理下根瘤为无效根瘤且不具有固氮酶活性。4株菌株均能在pH为11时生长, 以菌株GNT2生长最佳; 不同菌株对NaCl耐受能力不同, 其中菌株GNT6耐受5% NaCl, 且仅菌株GNT6在4℃低温下能够生长, 具有在高寒草地应用的潜力。因此, 筛选出的苜蓿中华根瘤菌GNT6可作为候选菌株为高寒草地的修复提供优良菌株资源。

关键词:天蓝苜蓿; 根瘤菌; 抗逆; 高效共生

Screening and identification of symbiotically efficient and stress-resistant rhizobia of wild *Medicago lupulina* in Gannan

LI Xue-mei, YAO Tuo*, LI Chang-ning, YANG Xiao-lei, WANG Wan-xia, ZHANG Yi-xin

Key Laboratory of Grassland Ecosystem, Ministry of Education, College of Prataculture, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China

Abstract: This research investigated the rhizobacterial resources of wild *Medicago lupulina* in alpine meadows, by screening for strains exhibiting efficient symbiosis with host plants. YMA Congo red medium was used to isolate rhizobacteria from wild *M. lupulina*, and strain identification was carried out through colony morphology observation and assessment of acid and alkali production, combined with 16S rRNA gene sequence analysis. Growth-promoting properties were verified by back-inoculation to the original host, and strain resilience was determined by evaluating *in vitro* acid, alkali and temperature tolerance. Four strains of interest were isolated from wild *M. lupulina* in this way, designated GNT1, GNT2, GNT4 and GNT6, and the colony morphology and acid and alkali production results were consistent with the characteristics of rhizobia. Strains GNT1 and GNT6 were identified as *Sinorhizobium meliloti*, GNT2 as *Pararhizobium giardinii*, and GNT4 as *Pararhizobium herbae*. Compared with a no-inoculation

收稿日期: 2024-05-06; 改回日期: 2024-06-17

基金项目: 甘肃省林业和草原局高寒退化草地植被恢复与土壤改良菌剂研发与示范项目(GSAU-TSYF-2021-011)和国家牧草产业体系金昌综合试验站(CARS-34)资助。

作者简介: 李雪梅(1998—), 女, 甘肃酒泉人, 在读硕士。E-mail: 1375765144@qq.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: yaotuo@gsau.edu.cn

treatment, rhizobium inoculation increased the number of plant nodules by 2.06–3.64 times, the plant height by 0.75–3.17 times, the root length by 0.21–0.38 times and the plant dry weight by 0.55–2.82 times. The effective nodule number and nitrogenase activity under inoculation treatments were 11.33–18.00 nodules per plant and 5.71–10.97 $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, respectively. The nodules under the non-inoculation treatment were ineffective nodules and did not have nitrogenase activity. The four strains could grow at pH 11, and the strain GNT2 grew best. The strains differed in their tolerance to NaCl. Strain GNT6 could tolerate 5% NaCl, and only strain GNT6 could grow at the low temperature of 4 °C. Hence, strain GNT6 was determined to have potential to be applied in alpine grassland, and is identified in this research as a candidate strain to provide improved rhizobial strain resources for the restoration of alpine grassland.

Key words: *Medicago lupulina*; rhizobium; strain resilience; efficient symbiosis

甘南草原地处我国青藏高原东北地带边缘,享有“亚洲第一牧场”美誉,在调节气候、改善生态环境及维持生物多样性等方面具有不可替代的作用^[1]。因其独特的地形及复杂的气候,不仅是当地重要畜牧生产基地,同时也是黄河和长江流域巨大的天然屏障^[2]。近年来,因人为和自然因素导致草地退化、生产力降低及草地植被结构发生变化成为普遍现象^[3]。草原退化严重会导致草地初级生产力氮素流失,而氮素被认为是限制草地营养转化的关键因素之一,外源氮素的输入对促进植物生长以及生态系统生产力具有重要作用^[4]。氮肥作为重要的外源氮素被广泛使用,近年来由于氮肥成本增加以及过度施肥导致水土失衡和能源消耗严重^[5],因此,生物固氮在减少氮肥使用、促进植物生长和最大限度地降低环境成本方面具有巨大潜力。

生物固氮的总量占全球氮总量的70%,是世界上最大、最高效的“固氮工厂”^[6]。生物固氮以共生固氮、联合固氮和自生固氮3种方式进行;其中,根瘤菌与豆科植物共生固氮占生物固氮的70%^[7],通过将空气中的 N_2 转化为植物可吸收利用的 NH_3 ,在促进植物生长的同时,补充土壤中氮素水平,减少空气中氮素的浪费。研究表明,接种高效根瘤菌可刺激豆科植物根系发育,增加根瘤菌侵染位点,在减少氮肥施用量的同时,可大幅提高苜蓿(*Medicago sativa*)的干草产量,而低效或共生匹配性差的根瘤菌并没有表现出相同的趋势^[8]。因此,挖掘结瘤效果好、促生能力强的根瘤菌对环境保护和农业生产具有积极意义。豆科植物与根瘤菌共生关系的建立还受自然生态和地理环境的影响,不同区域地理环境具有不同的多样性特征^[9],如在盐碱、干旱或温度胁迫等不利环境下会限制根瘤菌的入侵和定殖及植物的生长^[10],而接种抗逆性强的根瘤菌可缓解这一不利影响^[11]。因此,对特定生境抗逆菌株的筛选是缓解逆境的有利策略。

野生豆科植物更适应极端土壤环境和气候条件,这与共生根瘤菌密切相关。在逆境条件下,耐受性强的菌株可作为良好竞争者,与豆科植物建立高效共生关系^[12]。天蓝苜蓿(*Medicago lupulina*)是豆科苜蓿属一年生或多年生野生草本植物,抗逆性强且分布广泛。因其匍匐生长和侵占性强,可与作物间作套种,肥沃土壤;又因其营养丰富,适口性好,可做优质牧草^[13]。目前,对天蓝苜蓿根瘤菌系统发育和多样性的研究报道主要在贵州岩溶山区^[14]、西北地区及部分尾矿区^[15–16],对高寒地区野生天蓝苜蓿根瘤菌的研究尚未见报道。

基于此,本研究从甘南高寒草甸采集野生天蓝苜蓿根瘤样品进行根瘤菌分离、纯化及鉴定;并通过原宿主回接试验以及菌株抗逆性测定,筛选出优良菌株,以期对特定生境修复提供有效的菌种资源,同时丰富我国的微生物菌种资源库。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 采样地概况及样品采集 根瘤样品于2023年7月中旬在甘肃省甘南藏族自治州玛曲县河曲马场(33°35′23″ N, 101°27′46″ E)采集。将生长健康、无病虫害、结瘤正常且呈粉红色的天蓝苜蓿根瘤样品,装入无菌密封袋中,低温运输至实验室,48 h内进行根瘤菌的分离。

样地为高原大陆性季风气候,年均气温2.3 °C,无绝对无霜期,年降水量633~782 mm,牧草生长期190 d。土

壤类型以高寒草甸土为主,植被以亚高山草甸和沼泽草地为主^[17],植物群落主要有嵩草属(*Kobresia*)、针茅属(*Stipa*)、披碱草属(*Elymus*)和早熟禾属(*Poa*)等。

1.1.2 供试培养基 YMA培养基^[8](甘露醇 10.0 g,酵母粉 0.5 g,NaCl 0.1 g,MgSO₄·7H₂O 0.2 g,K₂HPO₄ 0.2 g,琼脂 18.0 g,蒸馏水 1.0 L,pH 7.0)作为根瘤菌基础生长培养基;YMA刚果红培养基:在YMA培养基中添加5 mL 1%的刚果红溶液,用于根瘤菌的筛选。

1.1.3 供试种子 供试植物选用天蓝苜蓿,种子购买于甘肃创绿草业有限公司,发芽率为95%。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株的分离与纯化 从植物根系剪下饱满、粉色的根瘤,并带有一部分根系;在超净工作台中,用无菌水冲洗干净,依次在70%乙醇浸泡30 s、2%的NaClO溶液浸泡2 min、无菌水冲洗3次后,放入无菌研钵加2 mL无菌水研磨,吸取上清液进行梯度稀释;将10⁻³、10⁻⁴和10⁻⁵稀释液各吸取50 μL涂布于YMA刚果红培养基上,每个稀释梯度3次重复,在28℃培养箱培养5~7 d,挑取表面光滑、质黏且不吸收色素的单菌落进行划线,将纯化的菌株于4℃保存备用。

1.2.2 菌株的表型与基因鉴定 1)形态观察:将供试菌株接种于YMA培养基上,28℃培养3 d,观察记录各菌落形状、颜色及生长速度等特征。

2)产酸产碱测定:在YMA液体培养基中加入0.5%溴百里香酚蓝(bromothymol blue, BTB)溶液,用1 mol·L⁻¹的NaOH溶液调节pH为7.0,使培养基呈黄绿色;将供试菌株接种到培养基中,每个菌株3次重复,摇床上28℃、180 r·min⁻¹培养3~7 d观察培养基颜色。菌株产酸变黄,产碱变蓝。

3)16S rRNA分子生物学鉴定:以细菌试剂盒(OMEGA,美国)提取的菌株DNA为模板,用细菌16S rRNA基因通用引物27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和1492R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')进行PCR扩增。PCR反应体系为25 μL:DNA模板2 μL、正反向引物各1 μL、2×Tap PCR Master Mix 12.5 μL、dd H₂O 8.5 μL。PCR扩增产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳检测后送至上海生工生物工程股份有限公司测序。测序结果登录NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)网站和Ez Bio Cloud(<https://www.ezbiocloud.net/>)数据库进行比对分析。获取模式菌株的16S rRNA相近序列后,使用MEGA 7.0软件,选择邻近法(neighbor-joining, NJ)^[18]构建系统进化树,自展值为1000。

1.2.3 回接试验 将天蓝苜蓿种子在75%乙醇中浸泡30 s,用2% NaClO溶液浸泡2 min后,无菌水冲洗3遍,完成种子消毒。将种子接种于0.8% (w/v)水琼脂培养基,待种子发芽后(1~2 cm)在无菌条件下将幼苗移接到大试管中(40 mm×450 mm),每个试管移入3株,每个处理3个重复。基质采用灭菌的蛭石、沙子(体积比3:1)混合物200 g,幼苗移接前用无氮营养液浸湿。待幼苗长出第一片真叶后,接种根瘤菌菌悬液(OD₆₀₀为0.5~0.6)。对照为接入等体积的无菌水。置于生长室(25℃,光照14 h、黑暗10 h,湿度为60%~70%,光强度为4000 lx)培养,45 d后收获。

1.2.4 回接试验指标测定 测定植株单株结瘤数、有效结瘤数、根瘤固氮酶活性以及植株株高、根长和干重。

根瘤固氮酶活性采用乙炔还原法^[18]测定:取粉红色的根瘤称重后装入10 mL的西林瓶中,盖上橡胶塞,用注射器从瓶中抽出1 mL气体同时注入1 mL纯C₂H₂气体,用封口膜密封;暗培养2 h后用微量进样器分别抽取50 μL混合气体快速注入气相色谱仪(GC7890,美国)气体进样柱内,记录并观察C₂H₄的出峰时间及峰面积,计算根瘤的固氮酶活性。

1.2.5 非生物耐受性试验 在NaCl含量为1%、3%和5%(w/v)的YMA固体培养基上进行菌株的耐盐性试验,28℃培养3~5 d后观察根瘤菌生长情况;用1 mol·L⁻¹的HCl和NaOH溶液分别调节pH为5、7、9和11的YMA液体培养基测试菌株耐酸碱能力,28℃、180 r·min⁻¹条件下培养3~5 d,测定各菌株OD₆₀₀值;在4、16、28和40℃的YMA固体培养基进行菌株温度耐受性试验,培养3~5 d后观察根瘤菌生长情况。各试验设3个重复。

1.3 数据处理

用EXCEL 2019软件进行数据整理,用SPSS 25.0软件进行单因素方差分析,用Origin 2022软件进行绘图。

2 结果与分析

2.1 菌株表型特征

从野生天蓝苜蓿根瘤中共分离得到4株菌株。通过观察菌落形态特征发现(图1),菌落为圆形,表面黏稠、凸起,半透明或不透明;菌株GNT6前期生长为灰白色,后期菌落呈淡黄色,其余菌株均为灰白色或乳白色,与根瘤菌的基本特征相符(表1)。经BTB染色后,4株菌株均产酸变黄(图2),且不同菌株产酸能力各不相同。其中,菌株GNT6为橘黄色,表明菌株产酸能力较强,对改变土壤pH值及降低土壤碱性有潜在作用。

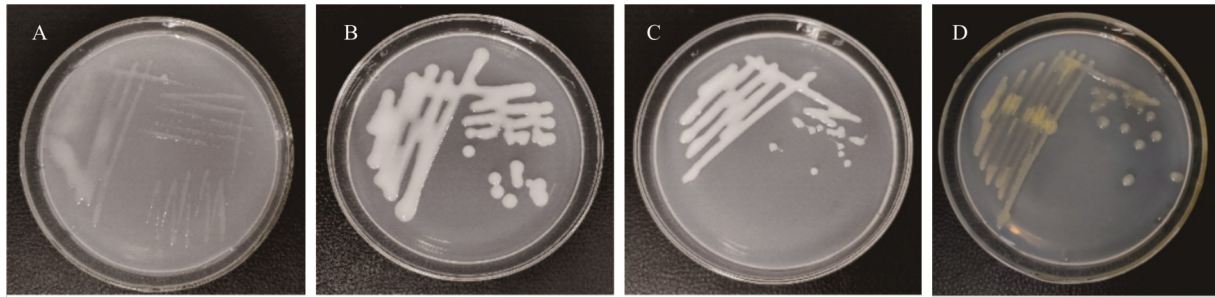


图1 不同菌株菌落形态

Fig. 1 Colony morphology of different strains

A: 菌株GNT1菌落形态 Colony morphology of strain GNT1; B: 菌株GNT2菌落形态 Colony morphology of strain GNT2; C: 菌株GNT4菌落形态 Colony morphology of strain GNT4; D: 菌株GNT6菌落形态 Colony morphology of strain GNT6.

表1 菌株菌落形态及产酸产碱能力

Table 1 Colony morphology and acid-alkali production capacity of strains

菌株编号 Strain number	菌落形态 Colony morphology	产酸产碱能力 Acid and alkali production
GNT1	灰白色圆形;菌落凸起、质黏,边缘整齐,半透明;生长速度较快。Grayish-white round; colony convex, slimy, neatly edged, translucent; growing fast.	+
GNT2	乳白色圆形;菌落凸起、质黏,边缘整齐,不透明;生长速度快。Milky-white round; colony convex, slimy, neatly edged, opaque; growing faster.	++
GNT4	乳白色圆形;菌落凸起、质黏,边缘整齐,不透明;生长速度快。Milky-white round; colony convex, slimy, neatly edged, opaque; growing faster.	+
GNT6	生长前期灰白色,后期黄色;菌落凸起、质黏,半透明;生长速度快。Pre-growth grayish-white, later yellow; colony convex, sticky, translucent; growing faster.	+++

菌株编号中,前2个字母GN代表采样点甘南,第3个字母T表示宿主植物天蓝苜蓿。Strain number: the first two letters GN represent the sampling site Gannan, and the third letter T represents the host plant *M. lupulina*. 下同 The same below. 产酸产碱反应,“+”淡黄色,表示产酸能力弱;“++”黄色,表示产酸能力较强;“+++”橘黄色,表示产酸能力强。In the acid and alkali production reaction, “+” light yellow, means acid-secreting weak; “++” yellow, means acid-secreting good; “+++” orange, means acid-secreting better.

2.2 菌株鉴定

从野生天蓝苜蓿根瘤分离的4株菌株经16S rRNA鉴定(表2),同源序列比对分析发现(图3),菌株GNT1和GNT6的16S rRNA基因序列与苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*) LMG-6311的相似度分别为99.41%和99.48%;菌株GNT2的16S rRNA基因序列与吉氏副根瘤菌(*Pararhizobium giardinii*) H152的相似度为99.85%,菌株GNT4的16S rRNA

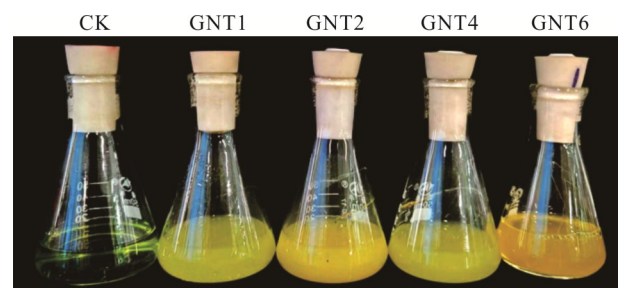


图2 菌株溴百里香酚蓝检测情况

Fig. 2 Bromothymol blue detection of strains

表2 分离菌株分子生物学鉴定

Table 2 Molecular biology identification of isolated strains

菌株 Strains	片段长度 Length (bp)	同源性最高序列的菌株 Strains with the highest homology sequence	相似度 Similarity (%)
GNT1	1359	苜蓿中华根瘤菌 <i>S. meliloti</i> LMG-6311 (X67222)	99.41
GNT2	1374	吉氏副根瘤菌 <i>P. giardinii</i> H152 (ARBG01000149)	99.85
GNT4	1346	豆根副根瘤菌 <i>P. herbae</i> CCBAU 83011 (GU565534)	99.62
GNT6	1377	苜蓿中华根瘤菌 <i>S. meliloti</i> LMG-6311 (X67222)	99.48

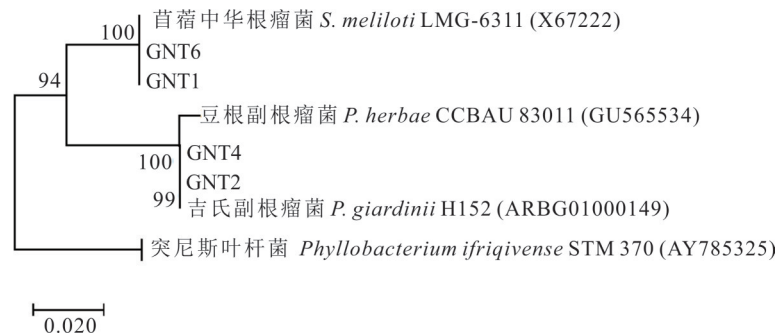


图3 分离菌株 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree constructed based on 16S rRNA gene sequences of screening strains

基因序列与豆根副根瘤菌(*Pararhizobium herbae*) CCBAU 83011的相似度为99.62%。

结合2.1菌株表型特征,将菌株GNT1和GNT6初步鉴定为苜蓿中华根瘤菌,菌株GNT2初步鉴定为吉氏副根瘤菌,菌株GNT4初步鉴定为豆根副根瘤菌。

2.3 菌株回接试验

2.3.1 菌株对天蓝苜蓿单株结瘤数、有效结瘤数及固氮酶活性的影响 通过与原宿主回接试验发现,4株根瘤菌均能诱导天蓝苜蓿结瘤,建立共生关系,并对植株有不同的促生效果(图4)。根瘤菌诱导宿主植物单株结瘤数为14~21个,有效结瘤数为11~18个,其中,以菌株GNT4共生结瘤效果最佳;根瘤为指状,顶端球形并呈现淡粉色(图5)。对照也出现结瘤现象,单株结瘤数为4个,根瘤呈短棒状,白色,无固氮酶活性。各接菌处理诱导形成的根瘤固氮酶活性为5.71~10.97 $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$,其中,以菌株GNT4共生固氮效果最佳,菌株GNT1次之。

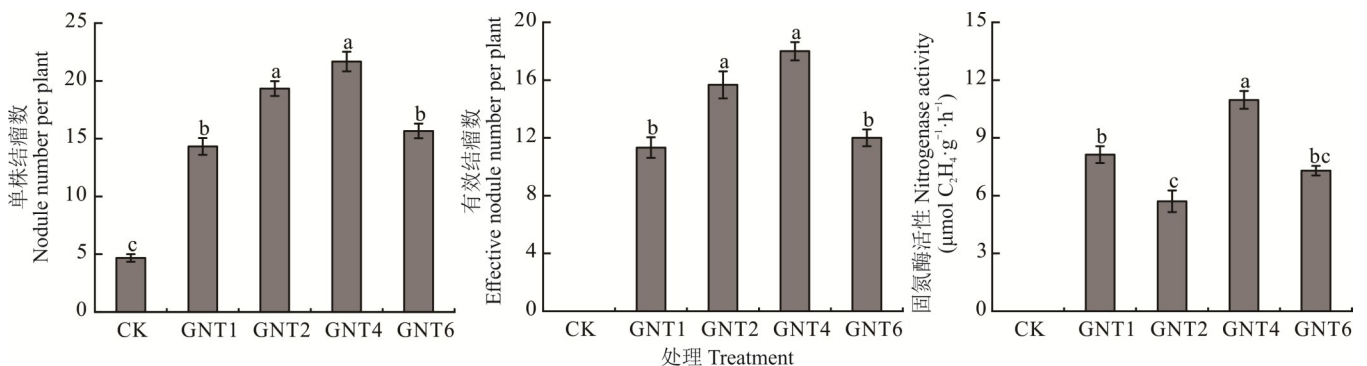


图4 菌株处理对天蓝苜蓿单株结瘤数、有效结瘤数及固氮酶活性的影响

Fig. 4 Effects of strain treatment on nodule number, effective nodule number and nitrogenase activity of *M. lupulina*

不同小写字母表示不同菌株处理间差异显著($P < 0.05$)。Different lowercase letters indicated that there was a significant differences among different strains ($P < 0.05$). 下同 The same below.

2.3.2 菌株对天蓝苜蓿株高、根长及干重的影响
天蓝苜蓿接种根瘤菌后,株高与对照之间差异显著($P < 0.05$)。株高为 6.36~26.55 cm,其中以菌株 GNT6 效果最佳,较 CK 提升了 4.2 倍,菌株 GNT1 次之(图 6)。接种根瘤菌对植株根长也有一定促进作用,除接种菌株 GNT4 外各处理均显著高于对照($P < 0.05$)。植株干重变化趋势与株高相同,均表现为菌株 GNT6 有较好促生效果,较 CK 提升了 2.8 倍,菌株 GNT1 次之。

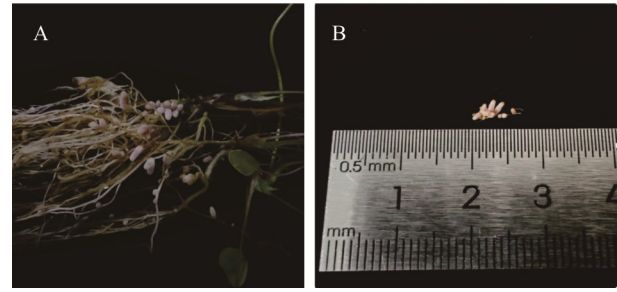


图 5 菌株 GNT4 回接结瘤(A)、单个根瘤大小(B)情况
Fig. 5 Nodulation (A) and single nodule size (B) of strain GNT4

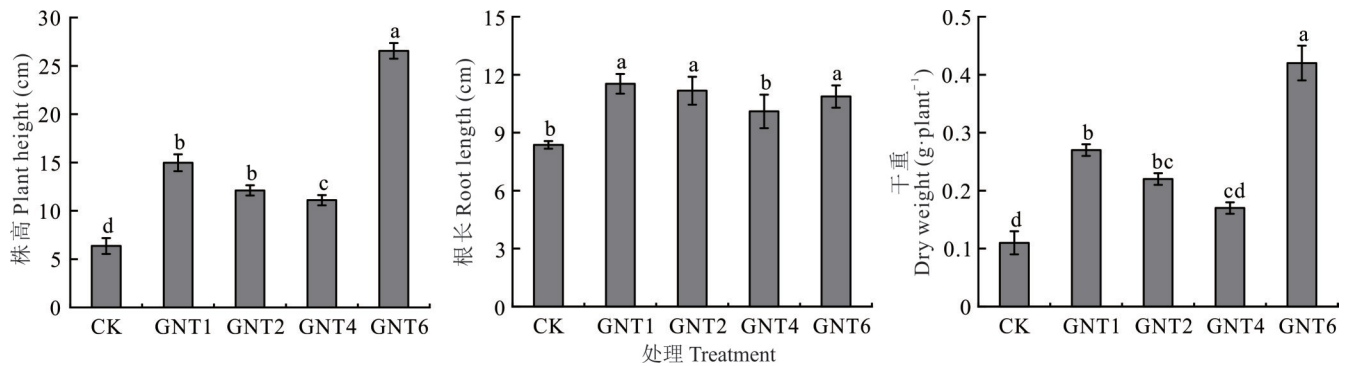


图 6 菌株处理对天蓝苜蓿株高、根长及干重的影响
Fig. 6 Effects of strain treatment on plant height, root length and dry weight of *M. lupulina*

可见,在无氮生长条件下接种根瘤菌对植株的株高、根长及干重均有一定的促进作用。

2.4 菌株非生物耐受性试验

2.4.1 菌株对 NaCl 的耐受能力 菌株耐盐性测定发现,4 株菌株对 NaCl 有不同耐受能力(表 3),其中,菌株 GNT2 和 GNT4 耐受 1%~3% NaCl,且在 NaCl 浓度为 1% 时生长最好;菌株 GNT1 和 GNT6 耐受 1%~5% NaCl,且在 5% NaCl 浓度下,菌株 GNT6 较 GNT1 具有更好的生长能力(图 7),可作为耐盐菌株进一步测定其耐盐能力。

2.4.2 菌株对不同温度耐受能力 菌株温度耐受性试验发现,不同菌株有不同温度生长范围(表 4)。菌株 GNT1 和 GNT2 能够在 16~40 °C 生长,且以 28 °C 生长最佳;菌株 GNT4 生长温度范围相对较窄,仅能在 16~28 °C 范围内生长;菌株 GNT6 能在 4~40 °C 较广泛的温度范围内生长,且在 4 °C 低温下,菌株仍有生长能力,具有在高寒草地应用的潜力。

2.4.3 菌株对不同 pH 耐受能力 耐酸耐碱试验发现(图 8),4 株菌株均能在 pH 为 5~11 时生长。菌株 GNT1 在 pH 为 11 时 OD₆₀₀ 值骤降,说明菌株对碱耐

表 3 菌株 NaCl 耐受性

Table 3 NaCl tolerance of the strain

菌株编号 Strain number	氯化钠浓度 NaCl concentration		
	1%	3%	5%
GNT1	+++	+	+
GNT2	+++	+	-
GNT4	+++	+	-
GNT6	+++	+++	+++

“-”表示不生长,“+”表示生长,“++”表示生长良好,“+++”表示生长较好。“-” indicates no growth, “+” indicates growth, “++” indicates good growth, “+++” indicates better growth. 下同 The same below.

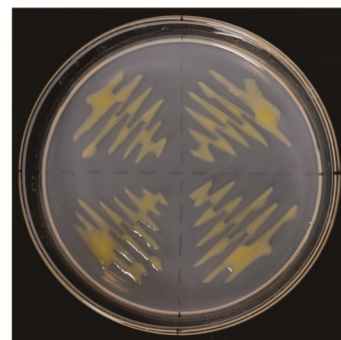


图 7 菌株 GNT6 在 5% NaCl 条件下的生长状态
Fig. 7 Growth status of strain GNT6 under 5% NaCl stress

受能力较差。菌株 GNT2 随着 pH 值的增大, OD_{600} 值呈缓慢下降趋势, 且在 pH 为 5 和 11 时, OD_{600} 值显著高于其他 3 株菌株 ($P < 0.05$), 表明该菌株具有较好的耐酸碱能力。

3 讨论

3.1 野生天蓝苜蓿根瘤菌的筛选鉴定

通过对根瘤菌多样性的研究、分类地位的确定以及种群分布规律的了解, 可为优势资源的发掘和菌剂的制备与应用奠定基础^[19]。目前在豆科植物种植过程中, 共生根瘤菌的选用都是陈旧或单一的菌株, 与豆科植物共生根瘤菌资源匮乏密切相关。研究表明^[14-15], 野生天蓝苜蓿分离筛选到的根瘤菌以中华根瘤菌属 (*Sinorhizobium*) 为优势属, 苜蓿中华根瘤菌为优势种, 本研究结果与其一致, 说明天蓝苜蓿与苜蓿中华根瘤菌有较强的共生专一性。目前, 关于吉氏副根瘤菌的宿主植物报道包括杂花苜蓿 (*Medicago varia*)^[20]、多花木蓝 (*Indigofera amblyantha*)^[21] 和菜豆 (*Phaseolus vulgaris*)^[22] 等; 对豆根副根瘤菌的宿主植物报道主要有红豆草 (*Onobrychis viciaefolia*)^[18] 和扁蓿豆 (*Medicago ruthenica*)^[23], 尚未见报道宿主涉及天蓝苜蓿的相关研究。本研究首次从天蓝苜蓿分离得到豆根副根瘤菌和吉氏副根瘤菌, 回接试验后, 菌株均能诱导天蓝苜蓿结瘤, 从而拓展了其宿主范围。因此, 天蓝苜蓿很有可能是豆根副根瘤菌和吉氏副根瘤菌的一个新生物型, 这一结果需要后续的试验重复验证。

近年来, 对根瘤菌高效菌株的筛选往往通过回接试验进行验证^[11,24], 李艳梅等^[25] 将 14 株根瘤菌接种到紫云英 (*Astragalus sinicus*)、苜蓿、三叶草 (*Trifolium repens*) 和大豆 (*Glycine max*) 4 种豆科植物根际检测其寄生范围, 结果显示, 根瘤菌均只能与原宿主共生结瘤, 不能诱导其他 3 种豆科植物结瘤。本研究回接试验进一步验证根瘤菌的宿主专一性。但从生产应用角度出发, 应筛选寄主识别范围广、结瘤固氮能力强的根瘤菌, 后续应进行分离菌株与其他豆科植物共生匹配性的研究。

回接试验中, 对照 (不接菌) 也发生了结瘤现象, 究其原因, 可能与种子内生根瘤菌相关^[26]。种子萌发时胚根因先接触内生根瘤菌从而影响外源根瘤菌接种效果^[27]。因此对种子灭菌不彻底可能是种子内生根瘤菌与宿主共生结瘤的原因之一; 而在实际生产过程中, 通常对种子不进行消毒处理, 且本研究发现, 种子内生根瘤菌诱导植物结瘤数较少且均为白色根瘤, 不具有固氮酶活性, 其效果远不如接种根瘤菌。

回接试验中, 对照 (不接菌) 也发生了结瘤现象, 究其原因, 可能与种子内生根瘤菌相关^[26]。种子萌发时胚根因先接触内生根瘤菌从而影响外源根瘤菌接种效果^[27]。因此对种子灭菌不彻底可能是种子内生根瘤菌与宿主共生结瘤的原因之一; 而在实际生产过程中, 通常对种子不进行消毒处理, 且本研究发现, 种子内生根瘤菌诱导植物结瘤数较少且均为白色根瘤, 不具有固氮酶活性, 其效果远不如接种根瘤菌。

3.2 野生天蓝苜蓿根瘤菌的促生、抗逆能力

豆科植物和根瘤菌的共生作用在恢复土壤肥力和实现农业可持续方面被广泛认可^[19]。株高和干重作为反映植物生长和产量的重要指标之一, 在本研究中, 与未接种处理相比, 接种根瘤菌后均有提升。表明接种的根瘤菌通过提高养分向茎部的转移, 促进植物生长; 同时根瘤菌还具备分泌吲哚乙酸 (3-indoleacetic acid, IAA)、溶磷和产有机酸等多种促生特性, 从而提高植株产量^[28]。固氮酶作为催化氮转化的一类特殊蛋白, 是根瘤菌与豆科植物共生系统不可缺少的一部分。本研究中, 4 株根瘤菌回接后均能与天蓝苜蓿共生结瘤, 其中以豆根副根瘤菌 GNT4 固氮酶活性最佳, 表明不同根瘤菌与特定植株的共生适配性存在差异。这与常单娜等^[29] 的研究结果一致。且已有研究发现, 固氮酶活性较高的根瘤菌其共生固氮能力较强^[30]。

在实际生产应用时, 还应考虑菌株对环境的适应性。在高寒地区接种根瘤菌时, 常因菌株抗逆性不强, 在土

表 4 菌株温度耐受性

Table 4 Temperature tolerance of the strain

菌株编号 Strain number	4 °C	16 °C	28 °C	40 °C
GNT1	—	+	+++	+++
GNT2	—	+	+++	+
GNT4	—	+	+++	—
GNT6	+	+	+++	+++

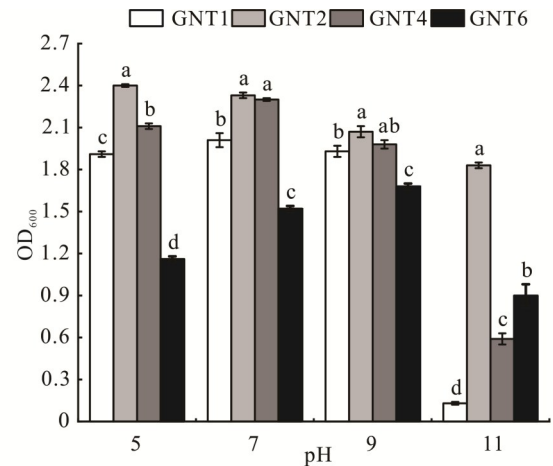


图 8 不同 pH 对菌株 OD_{600} 的影响

Fig. 8 The effect of different pH on the strain OD_{600}

壤中存活率降低,导致接种效果不佳^[31]。如低温通过冻结和收缩细胞膜,减少原生质流动和电解质运输等,从而导致细胞损伤^[12],而接种耐低温根瘤菌可有效保护寄主植物膜系统,积累更多脯氨酸、可溶性蛋白和可溶性糖提升植物在温度胁迫下的耐受性^[32],还能促进苜蓿在低温条件下的生长^[33]。本研究中,苜蓿中华根瘤菌 GNT6 能够在 4℃ 下生长,推测该菌株可协助植物适应环境,并在高寒草地修复中具有较好的应用潜力。

土壤盐碱含量过高会限制根瘤菌的生存,即使豆科植物与根瘤菌建立共生关系后,仍会抑制根瘤的发育和共生固氮。而耐盐碱根瘤菌处于这种高渗环境下,通过细胞内相似化合物的积累,从而增强其抵抗逆境的能力^[34]。Song 等^[35]研究也表明,苜蓿接种耐盐碱根瘤菌后,通过上调耐胁迫基因,增加相关酶的产生,进一步增强苜蓿对盐碱的耐受性。本研究中,菌株 GNT1 和 GNT6 不仅能耐受 5% NaCl,还能在 pH 5~11 条件下生长,表明分离的根瘤菌有较好的耐盐性和耐酸碱特性。代金霞等^[36]对荒漠柠条(*Caragana korshinskii*)根瘤菌抗逆性研究表明,62 株根瘤菌中 70.8% 能耐受 4% 的 NaCl,在 pH 5.0~11.0 条件下仍具有生活力。表明根瘤菌在抵御外界胁迫时可能比根际其他微生物更具优势^[37]。

4 结论

本研究主要得出以下结论:1)从野生天蓝苜蓿分离得到 4 株根瘤菌,首次从天蓝苜蓿中分离出吉氏副根瘤菌和豆根副根瘤菌。2)原宿主回接后对植株株高、根长、地上干重、有效根瘤数及固氮酶活性均有促进作用,且对不同非生物胁迫有一定耐受性,其中菌株 GNT6 效果最佳,可为后期高寒草地的修复提供优良的菌种资源。

参考文献 References:

- [1] Zhang C J, Wang X Y, Yao B H, *et al.* Diet composition and trophic niche characteristics of three rodents in Gannan meadow. *Acta Agrestia Sinica*, 2021, 29(7): 1484–1490.
张彩军,王小燕,姚宝辉,等.甘南草原3种啮齿动物的食性及其营养生态位特征.草地学报,2021,29(7):1484–1490.
- [2] Guo W W, Jin L, Li W, *et al.* Assessing the vulnerability of grasslands in Gannan of China under the dual effects of climate change and human activities. *Ecological Indicators*, 2023, 148(3): 110100.
- [3] Li Y C, Hou M J, Ge J, *et al.* NDVI changes and driving factors of grassland vegetation in Gannan prefecture and northwest Sichuan region. *Acta Agrestia Sinica*, 2020, 28(6): 1690–1701.
李元春,侯蒙京,葛静,等.甘南和川西北地区草地植被 NDVI 变化及其驱动因素研究.草地学报,2020,28(6):1690–1701.
- [4] Hasi M, Zhang X Y, Niu G X, *et al.* Soil moisture, temperature and nitrogen availability interactively regulate carbon exchange in a meadow steppe ecosystem. *Agricultural and Forest Meteorology*, 2021, 304(9): 108389.
- [5] Gu S S, Zhou X L, Yu H, *et al.* Microbial and chemical fertilizers for restoring degraded alpine grassland. *Biology and Fertility of Soils*, 2023, 59(8): 911–926.
- [6] Li X X, Xu R N, Liao H. Contributions of symbiotic nitrogen fixation in soybean to reducing fertilization while increasing efficiency in agriculture. *Soybean Science*, 2016, 35(4): 531–535.
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.大豆科学,2016,35(4):531–535.
- [7] Oleńska E, Małek W, Wójcik M, *et al.* Beneficial features of plant growth-promoting rhizobacteria for improving plant growth and health in challenging conditions: A methodical review. *Science of the Total Environment*, 2020, 743(46): 140682.
- [8] Lagunas B, Richards L, Sergaki C, *et al.* Rhizobial nitrogen fixation efficiency shapes endosphere bacterial communities and *Medicago truncatula* host growth. *Microbiome*, 2023, 11(1): 146.
- [9] Ji Z J, Yan H, Cui Q G, *et al.* Competition between rhizobia under different environmental conditions affects the nodulation of a legume. *Systematic and Applied Microbiology*, 2017, 40(2): 114–119.
- [10] Zahran H H. Conditions for successful *Rhizobium*-legume symbiosis in saline environments. *Biology and Fertility of Soils*, 1991, 12(1): 73–80.
- [11] Atieno M, Lesueur D. Opportunities for improved legume inoculants: enhanced stress tolerance of rhizobia and benefits to agroecosystems. *Symbiosis*, 2019, 77(3): 191–205.
- [12] Megu M, Paul A, Deb C R. Isolation and screening of stress tolerant and plant growth promoting root nodulating rhizobial bacteria from some wild legumes of Nagaland, India. *South African Journal of Botany*, 2024, 168(5): 260–269.

- [13] Ren H L, Wei Z W, Chen X. Cross-species markers developed from genome sequencing in *Medicago truncatula*, *Medicago lupulina* and *Medicago polymorpha*. *Acta Prataculturae Sinica*, 2017, 26(4): 188–195.
任海龙, 魏臻武, 陈祥. 蒺藜苜蓿、天蓝苜蓿、金花菜基因组 SNP 穿梭标记开发. *草业学报*, 2017, 26(4): 188–195.
- [14] Zeng Q F, Wei X D, Wei X, *et al.* Research on resource exploration, nitrogen fixation characteristics and diversity of rhizobia of *Medicago lupulina* in karst mountainous area of Guizhou. *Acta Agrestia Sinica*, 2022, 30(7): 1891–1899.
曾庆飞, 韦兴迪, 韦鑫, 等. 贵州岩溶山区野生天蓝苜蓿根瘤菌资源发掘、固氮特性及其多样性研究. *草地学报*, 2022, 30(7): 1891–1899.
- [15] Ma N. Phenotypic diversity and analysis of 16S rDNA RFLP on rhizobia isolated from leguminous plants in some mining areas of northwest China. Yangling: Northwest A&F University, 2010.
马宁. 西北部分矿区豆科植物根瘤菌表型多样性及 16S rDNA RFLP 分析. 杨凌: 西北农林科技大学, 2010.
- [16] Feng C S. Phylogeny of rhizobium isolated from *Medicago lupulina* in northwest of China. Yangling: Northwest A&F University, 2008.
冯春生. 西北地区天蓝苜蓿根瘤菌系统发育研究. 杨凌: 西北农林科技大学, 2008.
- [17] Li S L. Soil physicochemical properties of alpine grasslands under different desertification degrees in Maqu, Gansu, China. *Journal of Desert Research*, 2022, 42(6): 44–52.
李世龙. 青藏高原东缘玛曲沙化高寒草地土壤理化性质. *中国沙漠*, 2022, 42(6): 44–52.
- [18] Lan X J. Screening and evaluation of PGPR resources from 6 Gansu native grass and research on growth promoting mechanism. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2022.
兰晓君. 六种甘肃乡土草根际促生菌资源筛选、评价及促生机理研究. 兰州: 甘肃农业大学, 2022.
- [19] Raghupathy S, Arunachalam S. Trends in legume-rhizobia symbiosis in remediation of mercury-contaminated agricultural soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 2024, 55(6): 916–930.
- [20] Yan W. The screening and application research of plant growth promoting rhizobacteria of alfalfa in the salinized area of Tumochuan plain. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2023.
闫伟. 土默川平原盐碱化区域苜蓿根际促生菌的筛选及应用研究. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2023.
- [21] Wei X D. Investigation and floristic analysis of rhizobial resources of natural leguminous grass in Guizhou Province. Guiyang: Guizhou University, 2019.
韦兴迪. 贵州天然豆科牧草根瘤菌资源调查与区系分析. 贵阳: 贵州大学, 2019.
- [22] Wang L, Cao Y, Wang E T, *et al.* Biodiversity and biogeography of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Shaanxi Province. *Systematic and Applied Microbiology*, 2016, 39(3): 211–219.
- [23] Gan Y N. Screening of PGPR strains of typical leguminous on alpine grassland and construction of synthetic microbial communities. Lanzhou: Lanzhou University, 2024.
甘雅楠. 高寒草地典型豆科植物 PGPR 菌株筛选及合成菌群的构建. 兰州: 兰州大学, 2024.
- [24] Wang X C, Ma X T, Han M, *et al.* Screening of rhizobia of common vetch (*Vicia sativa*) in Qinghai, and assessment of symbiont salt tolerance. *Acta Prataculturae Sinica*, 2016, 25(8): 145–153.
王雪翠, 马晓彤, 韩梅, 等. 青海箭筈豌豆根瘤菌的筛选及其共生体耐盐性研究. *草业学报*, 2016, 25(8): 145–153.
- [25] Li Y M, Zhong Y Z, Tan Y, *et al.* Diversity of rhizobia nodulating *Astragalus sinicus*, *Medicago sativa* and *Trifolium repens* in nodulated soybean rhizosphere soil in Sichuan. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2015, 21(2): 234–241.
李艳梅, 钟宇舟, 谭渊, 等. 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. *应用与环境生物学报*, 2015, 21(2): 234–241.
- [26] Chen D M, Zeng Z H, Sui X H, *et al.* Screening of high efficient symbiotic rhizobium on alfalfa. *Pratacultural Science*, 2002, 19(6): 27–31.
陈丹明, 曾昭海, 隋新华, 等. 紫花苜蓿高效共生根瘤菌的筛选. *草业科学*, 2002, 19(6): 27–31.
- [27] He L, Shi S L, Kang W J, *et al.* Location and sterilization of endogenous rhizobia in alfalfa seeds. *Acta Agrestia Sinica*, 2022, 30(11): 2892–2898.
何龙, 师尚礼, 康文娟, 等. 紫花苜蓿种子内生根瘤菌定位及灭菌方法研究. *草地学报*, 2022, 30(11): 2892–2898.
- [28] Kumar P S, Rangasamy G, Gayathri K V, *et al.* *Rhizobium mayense* sp. Nov., an efficient plant growth-promoting nitrogen-fixing bacteria isolated from rhizosphere soil. *Environmental Research*, 2023, 220(5): 115200.
- [29] Chang D N, Ma X T, Zhou G P, *et al.* Symbiotic compatibility of different rhizobia strains with important Chinese milk vetch (*Astragalus sinicus*) cultivars. *Acta Prataculturae Sinica*, 2022, 31(12): 171–180.

- 常单娜, 马晓彤, 周国朋, 等. 不同根瘤菌与紫云英主栽品种的共生匹配性. 草业学报, 2022, 31(12): 171—180.
- [30] Buckel W, Thauer R K. Flavin-based electron bifurcation, a new mechanism of biological energy coupling. *Chemical Reviews*, 2018, 118(7): 3862—3886.
- [31] Zhang W H, Hou L Y, Yang J, *et al.* Establishment and management of alfalfa pasture in cold regions of China. *Chinese Science Bulletin*, 2018, 63(17): 1651—1663.
张文浩, 侯龙鱼, 杨杰, 等. 高寒地区苜蓿人工草地建植技术. 科学通报, 2018, 63(17): 1651—1663.
- [32] D' Amours E, Bertrand A, Cloutier J, *et al.* Selection of effective and competitive *Sinorhizobium meliloti* strains that nodulate alfalfa under low temperature. *Rhizosphere*, 2024, 29(1): 100860.
- [33] Li S S, Zhang Z Q, Wang Y F, *et al.* Effect of symbiotic rhizobium in alfalfa on physiological change under cold stress. *Acta Agrestia Sinica*, 2016, 24(2): 377—383.
李莎莎, 张志强, 王亚芳, 等. 根瘤菌共生对低温胁迫下紫花苜蓿抗寒生理变化的影响. 草地学报, 2016, 24(2): 377—383.
- [34] Chen L Y, Zhang H L, Zhou Z Y. Technical detection of RAPD molecule maker and saline alkali tolerance experiments on rhizobia. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 2010, 28(6): 212—216.
陈利云, 张海林, 周志宇. 根瘤菌的 RAPD 分子标记技术检测和耐盐碱筛选. 干旱地区农业研究, 2010, 28(6): 212—216.
- [35] Song T T, Sun N, Dong L, *et al.* Enhanced alkali tolerance of rhizobia-inoculated alfalfa correlates with altered proteins and metabolic processes as well as decreased oxidative damage. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2021, 159(2): 301—311.
- [36] Dai J X, Wang Y J, Guo J J, *et al.* Analysis of stress resistance and phylogenesis of rhizobia isolated from *Caragana* spp.. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 2011, 29(4): 223—227.
代金霞, 王玉炯, 郭晶静, 等. 荒漠植物柠条根瘤菌的抗逆性及其系统发育分析. 干旱地区农业研究, 2011, 29(4): 223—227.
- [37] Kang W J, Shi S L, Wang Z Y, *et al.* Analysis of functional differences among three *Medicago sativa* endophytic rhizobial strains. *Pratacultural Science*, 2018, 35(7): 1614—1623.
康文娟, 师尚礼, 王泽一, 等. 3 株紫花苜蓿内生根瘤菌功能差异性分析. 草业科学, 2018, 35(7): 1614—1623.