

研究报告



紫花苜蓿内生和非内生根瘤菌多样性及共生差异

康文娟¹ 周彤¹ 师尚礼^{*1,2,3,4} 苗阳阳¹

1 甘肃农业大学草业学院 甘肃 兰州 730070

2 草业生态系统教育部重点实验室 甘肃 兰州 730070

3 甘肃省草业工程实验室 甘肃 兰州 730070

4 中-美草地畜牧业可持续研究中心 甘肃 兰州 730070

摘要:【背景】对根瘤菌多样性的研究有助于推进根瘤菌种质资源的利用。【目的】研究紫花苜蓿内生和非内生根瘤菌的表型和遗传多样性,比较菌株在5个苜蓿品种上的共生效应,验证根瘤菌群体共生效应由苜蓿品种决定的假设。【方法】从甘肃省白银会宁旱作区、兰州安宁灌区、武威凉州灌区3个栽培区域的陇中、清水、WL168HQ、甘农3号、甘农9号等紫花苜蓿品种中分离内生(植株种子、花、叶、茎、根表皮、根中柱和根瘤)和非内生(根际土壤和田间土壤)根瘤菌菌株,通过表型数值分类、16S rRNA 基因限制性片段长度多态性(Restriction fragment length polymorphism, RFLP)、16S rRNA 基因测序、持家基因多位点序列分型(Multilocus sequence typing, MLST),以及结瘤基因 *nodC* 和固氮基因 *nifH* 片段序列测定,研究紫花苜蓿根瘤菌的表型和遗传多样性,并采用主成分分析研究根瘤菌菌株在5个紫花苜蓿品种上的共生效应差异。【结果】共分离得到43株内生根瘤菌和10株非内生根瘤菌,叶片和花中没有分离到根瘤菌菌株。53株根瘤菌以及对照菌株 R.GN5 和 S.12531 表型特征数值分类聚为8个群,菌株表型多样性丰富。经16S rRNA-RFLP 分析共形成22种RFLP 分型组合,基因型 I 分布最广泛(24),其次为基因型 XII (5)、XV (5)和 XIX (3),其余16株菌各代表1种基因型,菌株遗传多样性丰富。16S rRNA 基因测序和 MLST 分析将所有菌株划分为 *Rhizobium radiobacter*、*R. rosettiformans* 和 *Ensifer meliloti*。仅从7株 *E. meliloti* 代表菌株和对照菌株 S.12531 中扩增到 *nodC* 和 *nifH* 基因,说明 *E. meliloti* 菌株均能结瘤固氮。*E. meliloti* 菌株 G3L3 接种甘农3号, LP3、LL1 和 LL2 接种陇中, QL2 接种清水, LL1、LL2 和 WLP2 接种 WL169HQ 苜蓿均能显著促进植株的单株结瘤数、地上干重和粗蛋白含量。*E. meliloti* 菌株接种甘农3号、甘农9号和清水苜蓿品种后所有参数值在 PC1 轴上分别聚在-1-1 之间,在 PC3 轴上聚在-1.5-1.5 之间;接种陇中和 WL168HQ 苜蓿的参数值较分散,PC1 轴上分散在-1.5-4 之间,PC3 轴上分散在-3-4 之间。【结论】紫花苜蓿内生和非内生根瘤菌菌株多样性丰富,表型和遗传多样性与其来源没有直接关系。菌株 G3L3 与甘农3号, LP3、LL1、LL2 与陇中, QL2 与清水、LL1、LL2、WLP2 与 WL169HQ 苜蓿品种共生匹配和适应能力强。在甘农3号、甘农9号和清水紫花苜蓿品种上群体共生效应相似,在陇中和 WL168HQ 紫花苜蓿上共生效应差异明显。本研究内生和非内生根瘤菌菌株的群体共生效应根据苜蓿品种而定,根瘤菌菌株与苜蓿品

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (31560666)

*Corresponding author: E-mail: shishl@gsau.edu.cn

Received: 21-03-2018; Accepted: 15-06-2018; Published online: 25-06-2018

基金项目: 国家自然科学基金(31560666)

*通信作者: E-mail: shishl@gsau.edu.cn

收稿日期: 2018-03-21; 接受日期: 2018-06-15; 网络首发日期: 2018-06-25

种间的信号识别程度存在差异。

关键词: 紫花苜蓿, 根瘤菌, 表型多样性, 遗传多样性, 共生差异

Diversity and symbiotic difference of endophytic and non-endophytic rhizobia of alfalfa (*Medicago sativa* L.)

KANG Wen-Juan¹ ZHOU Tong¹ SHI Shang-Li^{*1,2,3,4} MIAO Yang-Yang¹

¹ College of Grassland Science, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China

² Key Laboratory of Grassland Ecosystem (Gansu Agricultural University), Ministry of Education, Lanzhou, Gansu 730070, China

³ Pratacultural Engineering Laboratory of Gansu Province, Lanzhou, Gansu 730070, China

⁴ Sino-U.S. Center for Grazingland Ecosystem Sustainability, Lanzhou, Gansu 730070, China

Abstract: [Background] Research on rhizobium diversity has paved the way for utilization of rhizobial germplasm resources. **[Objective]** To research the phenotypic and genetic diversity of endophytic and non-endophytic rhizobia of alfalfa (*Medicago sativa* L.), and verify the hypothesis that rhizobial symbiotic efficiency differed according to alfalfa variety by comparing their symbiotic difference on five alfalfa varieties. **[Methods]** Endophytic (seed, flower, leaf, stem, root epidermis, root stele, nodule) and non-endophytic (rhizosphere soil and field soil) bacteria isolates were collected from *M. sativa* cvs. Longzhong and Qingshui in arid crop area of Huining, Baiyin, *M. sativa* cv. WL168HQ in irrigated area of Anning, Lanzhou, and *M. sativa* cvs. Gannong No. 3 and Gannong No. 9 in irrigated area of Liangzhou, Wuwei, Gansu. Numerical analysis, 16S rRNA restriction fragment length polymorphism fingerprinting (RFLP), 16S rRNA gene sequencing, multilocus sequence typing (MLST) of concatenated sequences of *atpD*, *glnII*, and *recA* genes, and sequence analysis of symbiotic genes *nodC* and *nifH* were applied to study the phenotypic and genetic diversity of endophytic and non-endophytic rhizobia. A principal component analysis (PCA) was used to investigate their symbiotic differences on five alfalfa varieties as well. **[Results]** Totally 43 endophytes and 10 non-endophytic isolates were obtained. None were collected from flowers and leaves. The phenotypic diversity of these 53 isolates along with two reference strains (R.GN5 and S.12531) were abundant, with eight phenotypic clusters formed. Twenty-two RFLP patterns were produced after 16S rRNA-RFLP analysis, and the most widespread genotype among the isolates was that designated as genotype I (24). Three other genotypes (XII, XV and XIX) occurred less frequently in alfalfa symbionts (five, five and three). There were 16 genotypes specific to a single *M. sativa* isolate. According to the phylogenetic analyses of 16S rRNA gene and MLST, isolates were further classified into *Rhizobium radiobacter*, *R. rosettiformans*, and *Ensifer meliloti*. The *nodC* and *nifH* gene fragments were only amplified and sequenced from seven representative *E. meliloti* strains and reference strain S.12531, indicating that they were capable of nodulating alfalfa. The nodule number per plant, shoot dry weight and crude protein content of *M. sativa* cvs. Gannong No. 3 (inoculated with G3L3), Longzhong (inoculated with LP3, LL1 and LL2), Qingshui (inoculated with QL2), and WL168HQ (inoculated with LL1, LL2 and WLP2) were promoted simultaneously. The parameter values of *M. sativa* cvs. Gannong No. 3, Gannong No. 9, and Qingshui plants inoculated with the *E. meliloti* isolates clustered together, which ranged from -1 to 1 in PC1 axis and -1.5 to 1.5 in PC3 axis. Compared with these three alfalfa varieties, that of *M. sativa* cvs. Longzhong and WL168HQ plants dispersed greatly and ranged from -1.5 to 4 in PC1 axis and -3 to 4 in PC3 axis. **[Conclusion]** The phenotypic and genetic diversity of endophytic and non-endophytic rhizobia were abundant, and there was no direct relationship between diversity and strains' origins. Strong mutualistic symbiosis and adaptability were presented between G3L3 and *M. sativa* cv. Gannong No. 3, LP3, LL1, LL2 and *M. sativa* cv. Longzhong, QL2 and *M. sativa* cv. Qingshui, and LL1, LL2,

WLP2 and *M. sativa* cv. WL168HQ. The tested strains exhibited similar symbiotic efficiency when inoculated onto *M. sativa* cvs. Gannong No. 3, Gannong No. 9, and Qingshui plants, while an obvious symbiotic difference of rhizobial strains was observed in *M. sativa* cvs. Longzhong and WL168HQ plants. Their symbiotic efficiency varied according to alfalfa varieties, which manifested that the sensitivity of different alfalfa varieties to rhizobial strains may differ.

Keywords: Alfalfa, *Rhizobium*, Phenotypic diversity, Genetic diversity, Symbiotic difference

紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)是重要的豆科牧草, 具有很强的环境适应能力和丰富的粗蛋白含量。根瘤菌是有益的土壤细菌, 能够与苜蓿共生结瘤固氮, 促进苜蓿生长^[1-3]和增强土壤肥力^[4]。根瘤菌也能够植物组织内定殖, 增强植株的生物^[5]和非生物^[6]抗性。对紫花苜蓿内生和非内生根瘤菌多样性的研究以及共生效应的分析可以揭示紫花苜蓿不同品种间根瘤菌在群体结构和功能方面的差异, 有助于丰富根瘤菌资源, 加强对高效共生根瘤菌资源的利用。

关于根瘤菌多样性的研究已有很多, 目前已鉴定出属于 α -变形杆菌门的16个属和 β -变形杆菌门的4个属的菌株。与非内生微生物相比, 定殖在植物内部组织的内生菌几乎在已研究的所有植物中都有发现^[7-8]。研究表明自根瘤分离的内生细菌已超过129个种(54个属), 其中 *Bacillus*、*Pseudomonas*、*Agrobacterium*、*Enterubacterium* 是优势属^[9]。苜蓿种子内生根瘤菌抗逆性强, 能够溶解有机磷、无机磷以及分泌生长素(Indole-3-acetic acid, IAA)^[10]。李剑峰等研究发现根瘤菌能够在不同的苜蓿植株组织内沿着根部-茎叶-花-种子的通道运移和定殖^[11-12], 植物不同发育时期各组织内的数量分布也不同^[13]。对豆科植物内生和非内生根瘤菌的报道显示, 土壤类型和植物基因型是影响根瘤菌种群多样性的两个主要因素^[14-18]。根瘤菌与苜蓿的共生匹配关系受到共生和固氮基因水平转移现象的影响^[19], 根瘤菌-苜蓿共生体系的建立和发展依赖于二者之间无数的信号协调交换和监管途径。由植物种子或根部释放出的类黄酮等信号分子, 被根瘤菌产生的赖氨酸转录调控因子 NodD 蛋白识别^[20], 在低微极或纳米级的浓度下

诱导 *nod* 基因合成结瘤因子, 促进根瘤形成。植物与根瘤菌的识别能力越强, 根系分泌的类黄酮越多, 诱导结瘤因子合成和根瘤形成越多, 寄主植物的共生固氮效果则越强。

从苜蓿组织内部及其周围土壤中分离的大量 *Rhizobium* 和 *Ensifer* 菌株能够在大多数紫花苜蓿品种上结瘤^[21-22], 但是很少有研究聚焦在紫花苜蓿内生根瘤菌(来自种子、根、茎、叶和花等)和非内生根瘤菌(来自土壤)种群的多样性上。苜蓿根部在响应 *nod* 因子的过程中产生的信号分子类黄酮等是寄主专一性的主要植物决定因子^[20], 假设根瘤菌种群的共生效应由苜蓿品种决定, 那么菌株在不同苜蓿品种上的群体共生效应就会存在差异。本研究旨在分离和鉴定紫花苜蓿内生和非内生根瘤菌菌株, 并对其表型和遗传多样性进行研究, 分析根瘤菌种群在5个紫花苜蓿品种上的共生效应差异, 验证其共生效应由苜蓿品种决定的假设。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验地概况

采样时间为2014年5月和8月, 地点为甘肃省白银市会宁县会师镇牧草试验基地、武威市凉州区黄羊镇牧草试验站和甘肃农业大学兰州牧草试验站(表1)。

1.1.2 苜蓿品种

5个供试苜蓿品种均为紫花苜蓿(表1), 生长期2年, 分别为国内选育品种甘农3号(*M. sativa* cv. Gannong No. 3)和甘农9号(*M. sativa* cv. Gannong No. 9)、地方品种陇中(*M. sativa* cv. Longzhong)和清水(*M. sativa* cv. Qingshui)、引进

表 1 供试苜蓿品种和样地概况

Table 1 Alfalfa varieties of *Medicago* and sampled sites

苜蓿品种 Alfalfa variety	地理区域 Site prospected	地理位置 Geographical position	海拔 Altitude (m)	土壤质地 Soil texture
甘农 3 号 <i>Medicago sativa</i> cv. Gannong No. 3	甘肃武威 Wuwei, Gansu	E102°50', N37°52'	1 650.0	灰棕砂土 Gray brown desert
甘农 9 号 <i>M. sativa</i> cv. Gannong No. 9	甘肃会宁 Huining, Gansu	E105°06', N34°40'	1 760.0	黄土、砂壤土 Loess sandy loam
陇中 <i>M. sativa</i> cv. Longzhong	甘肃兰州 Lanzhou, Gansu	E105°41', N34°05'	1 517.3	黄壤土 Loess loam
清水 <i>M. sativa</i> cv. Qingshui				
WL168HQ <i>M. sativa</i> cv. WL168HQ				

美国品种 WL168HQ (*M. sativa* cv. WL168HQ)。

1.1.3 培养基和营养液

根瘤菌菌株筛选采用无氮培养基、YMA 刚果红和 YMA 结晶紫培养基^[23]，培养采用 YMA 培养基^[24]，活化采用 TY 培养基，营养液采用 Hoagland 有氮和无氮营养液^[23]。

1.1.4 主要试剂和仪器

细菌 DNA 提取试剂盒和 PCR 扩增引物，生工生物工程(上海)股份有限公司；2×*Taq* Master Mix 和限制性内切酶，南京诺唯赞生物科技有限公司；琼脂糖，Sigma 公司；琼脂糖凝胶(50×TAE)，北京索莱宝科技有限公司。

高压蒸汽灭菌锅，SHENAN 公司；超净工作台，苏州安泰空气技术有限公司；凝胶成像仪，上海培清科技有限公司；梯度热循环 PCR 仪、电泳仪、电泳槽和凝胶成像仪，Bio-Rad 公司；移液器，Eppendorf 公司；气相色谱仪，滕州市艾伦分析仪器有限公司；可见分光光度计，上海精密科学仪器有限公司；流动分析仪，欧陆科仪(中国)有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 根瘤菌菌株分离及纯化

于 2014 年 5 月(初花期)在每个苜蓿品种样地内随机取 5 株植株，携带 10 cm 内根际土壤连根挖起，抖落根际土壤并取样；田间土壤取植株周围 50 cm、深度 20 cm 内的土壤；8 月(成熟期)田间收

集种子，并利用风力清选出饱满、粒重的种子。分别装于自封袋，标记，冰桶冷藏条件下带回实验室。清洗植株，晾干表面明水后用无菌剪刀将植株分为花、茎、叶、根瘤、根表皮和根中柱；将种子及以上组织各称取 1 g 置于无菌三角瓶内，加碘伏(0.45%–0.55%)溶液振荡灭菌 3 min^[25]，无菌水冲洗 5 次，加 2 mL 无菌水在研钵中研磨均匀^[12]。分别称取 10 g 根际土壤和田间土壤置于无菌三角瓶内，加入 90 mL 灭菌生理盐水，充分振荡。将组织研磨匀浆和土壤悬浮液转入 2 mL 离心管 4 000 r/min 离心 10 min，用无菌水依次配置成 10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵ 稀释液，取 0.2 mL 稀释平板法涂抹至无氮培养基进行初步筛选，每个处理 4 个重复。28 °C 培养 48 h 后挑取与根瘤菌形态相似的细菌单菌落依次划线接种至 YMA 刚果红培养基和 YMA 结晶紫培养基上进行筛选，最后将 YMA 结晶紫培养基上长出的单菌落接种至 YMA 培养基进行分离和纯化，纯化后的菌株经过形态特征和革兰氏染色检验，分别于斜面 4 °C 及 -80 °C 甘油管保存。

1.2.2 表型特性测定

以 YMA 固体平板培养基为基础培养基，对根瘤菌进行唯一碳氮源、抗逆性以及生理生化特性测定。唯一碳源测定项目包括苹果酸、肌醇、肌酸、甘露醇、蔗糖、葡萄糖、延胡索酸、琥珀酸、D-果糖和乳糖；唯一氮源包括 L-色氨酸、甘氨酸、精氨酸、L-组氨酸和苯丙氨酸；染料抗性

测定包括溴百里酚蓝、甲基红、甲基绿、溴酚蓝、亚甲基红、中性红、亚硝酸钠、孔雀石绿、溴甲基绿和刚果红; 唯一碳氮源利用和染料抗性测定设定浓度为 1%; 抗生素敏感性测定包括红霉素、氯霉素、卡纳霉素、氨基苄霉素、新霉素、链霉素和庆大霉素, 设置浓度梯度为 5、50、100 和 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$; NaCl 的浓度梯度为 2%、4% 和 6%, 耐酸碱碱性测定 pH 为 5.0、9.0 和 11.0, 生长温度范围测定包括 8、37 和 40 $^{\circ}\text{C}$ 。生理生化试验包括淀粉水解实验、明胶水解实验、产硫化氢实验、VP 实验、吡啶实验、接触酶反应、柠檬酸盐实验, 3-酮基乳糖反应和 BTB 产酸产碱反应。菌株接种均设有 3 个阳性重复和 1 个阴性对照, 除生长温度测定实验在 5–7 d 后记录菌体生长状况外, 其余所有菌株接种后均于 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养, 24–48 h 后记录菌体生长状况^[26]。均采用 1×10^5 Pa 灭菌 26 min。

对根瘤菌的表型特征进行数值分类分析。将测定的表型性状结果按阳性记为“1”, 阴性记为“0”进行编码后, 输入计算机。剔除全同性状, 利用 NTSYS-PC 2.0 软件, 采用平均连锁法(UPGMA)生成聚类树状图。

1.2.3 细菌 DNA 提取和 PCR 扩增

用细菌 DNA 提取试剂盒提取内生菌基因组 DNA, 方法参见试剂盒说明书。对细菌的 16S rRNA 基因^[27]、*atpD*、*glnII* 和 *recA* 持家基因^[28]、结瘤基因 *nodC*^[29] 和固氮基因 *nifH*^[30] 片段进行 PCR 扩增。所有引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 扩增引物见表 2。PCR 反应体系: $2 \times \text{Taq Master Mix}$ 13 μL , 上、下游引物(20 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 1 μL , 纯化的 DNA (20 $\text{ng}/\mu\text{L}$) 2 μL , ddH₂O 8 μL 。16S rRNA 基因 PCR 反应条件^[27]: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。*atpD*、*glnII* 和 *recA* 基因 PCR 反应条件^[28]: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 56 $^{\circ}\text{C}$ (*recA* 和 *atpD*) 或 58 $^{\circ}\text{C}$ (*glnII*) 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min。*nodC* 基因 PCR 反应条件^[29]: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。*nifH* 基因 PCR 反应条件^[30]: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 58 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。1.5% 琼脂糖凝胶(TAE) 100 V 电泳 30 min, UV 检测 16S rRNA 基因 PCR 扩增产物片段大小和产量; PCR 扩增产物于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

表 2 16S rRNA、*atpD*、*glnII*、*recA*、*nodC* 和 *nifH* 基因 PCR 扩增及测序引物

Table 2 Primers used for amplification and sequencing of 16S rRNA, *atpD*, *glnII*, *recA*, *nodC* and *nifH* genes

目的基因 Target gene	引物名称 Primers name	引物序列 Primers sequence (5'→3')	参考文献 References
16S rRNA	P1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGAACGAACGCT	[27]
	P6	TACGGCTACCTTGTTACGACTTCACCCC	[27]
<i>atpD</i>	<i>atpD</i> 255F	GCTSGGCCGCATCMTSAACGTC	[28]
	<i>atpD</i> 782R	GCCGACACTTCMGAACCNGCCTG	[28]
<i>glnII</i>	<i>glnII</i> 12F	YAAGCTCGAGTACATYTGCT	[28]
	<i>glnII</i> 689R	TGCATGCCSGAGCCGTTCCA	[28]
<i>recA</i>	<i>recA</i> 41F	TTCGGCAAGGGMTCGRTSATG	[28]
	<i>recA</i> 640R	ACATSACRCCGATCTTCATGC	[28]
<i>nodC</i>	<i>nodC</i> 540	TGATYGAYATGGARTAYTGGYT	[29]
	<i>nodC</i> 1160	CGYGACARCCARTCGCTRTTG	[29]
<i>nifH</i>	<i>nifH</i> F	TACGGNAARGGSGGNATCGGCAA	[30]
	<i>nifH</i> R	AGCATGTCYTCAGYTCNTCCA	[30]

1.2.4 16S rRNA 基因 PCR-RFLP

选用 4 种限制性内切酶 *Hinf* I、*Alu* I、*Hae* III 和 *Msp* I 对 16S rRNA 基因 PCR 扩增产物进行酶切^[31]。酶切反应体系为：16S rRNA 基因 PCR 扩增产物 3 μ L，内切酶 5 U，缓冲液 1 μ L，ddH₂O 补足至 10 μ L，于 37 $^{\circ}$ C 水浴酶切反应 12 h。3%琼脂糖凝胶(TAE) 200 V 电泳 40 min，UV 检测酶切结果，TIFF 格式保存。

1.2.5 序列测定分析

供试菌株 PCR 扩增产物委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。通过 EzBioCloud 鉴定服务网站 (<https://www.ezbiocloud.net/>)^[32] 获得与目的序列同源性最高的模式菌株 16S rRNA 基因序列；通过 NCBI 数据库(www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly)选择与目的序列同源性最高的模式菌株 *atpD*、*glnII*、*recA*、*nodC* 和 *nifH* 序列。用 MEGA 5.0 软件中的 ClustalW 进行序列相似性比对^[33]，选用 Neighbor-Joining 法进行 UPGMA 分析生成系统发育树，Bootstrap 法(1 000 次重复)检验发育树。

1.2.6 共生固氮能力测定

种子处理、育苗及根瘤菌菌液的制备参考文献[11]。在幼苗生长第 15 天将制备好的菌液加入幼苗根部，每管 4 mL，加棉塞无菌培养。以不含根瘤菌液为对照，每个菌株 4 个试管作为重复。培养第 22 天和 30 天，浇灌 Hoagland 无氮营养液，30 d 后去棉塞，每隔 5 d 浇灌一次 Hoagland 无氮营养液^[25]，每管 4 mL。所有处理均在无菌条件下进行。接种 45 d 后，收获苜蓿植株并清洗干净，用滤纸吸干水分。

接种效果测定：接种 45 d 后，收获苜蓿植株并清洗干净，用滤纸吸干水分。每管随机选取 3 株，测算单株根瘤数、根瘤直径、根瘤等级^[34]、单株有效根瘤重、固氮酶活性^[35]、株高、单株叶片数、地上鲜重、地上干重、叶绿素含量^[25]、粗蛋白含量^[34]、根长、地下鲜重和地下干重。

1.3 数据分析

采用 Excel 2007 制表；采用 SPSS 19.0 进行主

成分分析^[36]、统计分析和相关性分析；统计分析中，用平均值和标准误表示测定结果，分别对不同菌株接种处理进行单因素方差分析，Duncan 法对数据进行多重比较^[37]。

2 结果与分析

2.1 分离的菌株

根据伯杰氏细菌鉴定手册以及根瘤菌形态特征，从 103 株纯化的菌株中筛选出了 53 株根瘤菌菌株(表 3)。43 株内生根瘤菌分离自根瘤(33)、根表皮(4)、根中柱(4)、茎(1)和种子(1)，10 株非内生根瘤菌来自田间土壤(6)和根际土壤(4)。叶片和花中没有分离到根瘤菌。所有菌株在 YMA 培养基上呈圆形、光滑、乳白色透明状，有粘质胞外多糖，培养 24 h 后菌落直径达到 4–6 mm。菌体短杆状，革兰氏染色反应阴性。

2.2 表型特征数值分类分析

对 53 株紫花苜蓿初筛根瘤菌和对照菌株 R.GN5 (*Rhizobium mongolense*)和 S.12531 (*Ensifer meliloti*)进行 72 项生理生化性状测定，其中 22 项为全同性状，对存在差异的其余 50 项性状以 UPGMA 聚类建立树状图谱，结果(图 1)显示，在 76%的相似性水平上，所有菌株聚为 8 个群。群 i、ii、iii、iv、v 和 viii 分别包含 10、5、3、25、8 和 2 个菌株，群 vi 和 vii 分别仅包含 1 个菌株。

50 项差异性状的鉴别特征结果(表 4)显示，群 i 的 10 株菌共有 23 个阳性反应和 2 个阴性反应；群 ii 中 5 株菌共有 21 个阳性反应和 10 个阴性反应；群 iii 的 3 株菌共有 23 个阳性反应和 11 个阴性反应；群 iv 的 25 株菌共有 22 个阳性反应和 6 个阴性反应；群 v 的 8 株菌在 30 个反应中呈阳性和 2 个阴性反应；群 viii 的 2 株菌共有 16 个阳性反应和 26 个阴性反应。各群的菌株也表现出不同的属性，群 i、ii、iii、iv、v 和 viii 的菌株分别有 25、19、16、22、18 和 8 个鉴别特征，菌株表型多样性丰富。表型聚群和多样性与其来源没有直接关系。

表 3 根瘤菌菌株

Table 3 Details of rhizobial bacteria

菌株 Strains	分离部位 Isolation spots on plant	苜蓿品种 Alfalfa variety
内生根瘤菌 Endophytic rhizobia		
G3G1, G3G2	根中柱 Stele	<i>Medicago sativa</i> cv. Gannong No. 3
G3P2	根表皮 Epidermis	
G3L1–G3L10, G3L12, G3L13	根瘤 Nodule	
G9L3–G9L8	根瘤 Nodule	<i>M. sativa</i> cv. Gannong No. 9
LP3, LP4	根表皮 Epidermis	<i>M. sativa</i> cv. Longzhong
LL1, LL2, LL5–LL8, LL10, LL11	根瘤 Nodule	
QL2, QL4, QL5	根瘤 Nodule	<i>M. sativa</i> cv. Qingshui
WLP2	根表皮 Epidermis	<i>M. sativa</i> cv. WL168HQ
WLL2, WLL3, WLL4, WLL5	根瘤 Nodule	
WLG1, WLG2	根中柱 Stele	
WLN3	种子 Seed	
WLJ3	茎 Stem	
非内生根瘤菌 Non-endophytic rhizobia		
G3T1, G3T2	根际土壤 Rhizosphere soil	<i>M. sativa</i> cv. Gannong No. 3
G9TT1, G9TT2, G9TT4, G9TT5	田间土壤 Field soil	<i>M. sativa</i> cv. Gannong No. 9
LT2, LT3	根际土壤 Rhizosphere soil	<i>M. sativa</i> cv. Longzhong
WTT4, WTT6	田间土壤 Field soil	<i>M. sativa</i> cv. WL168HQ

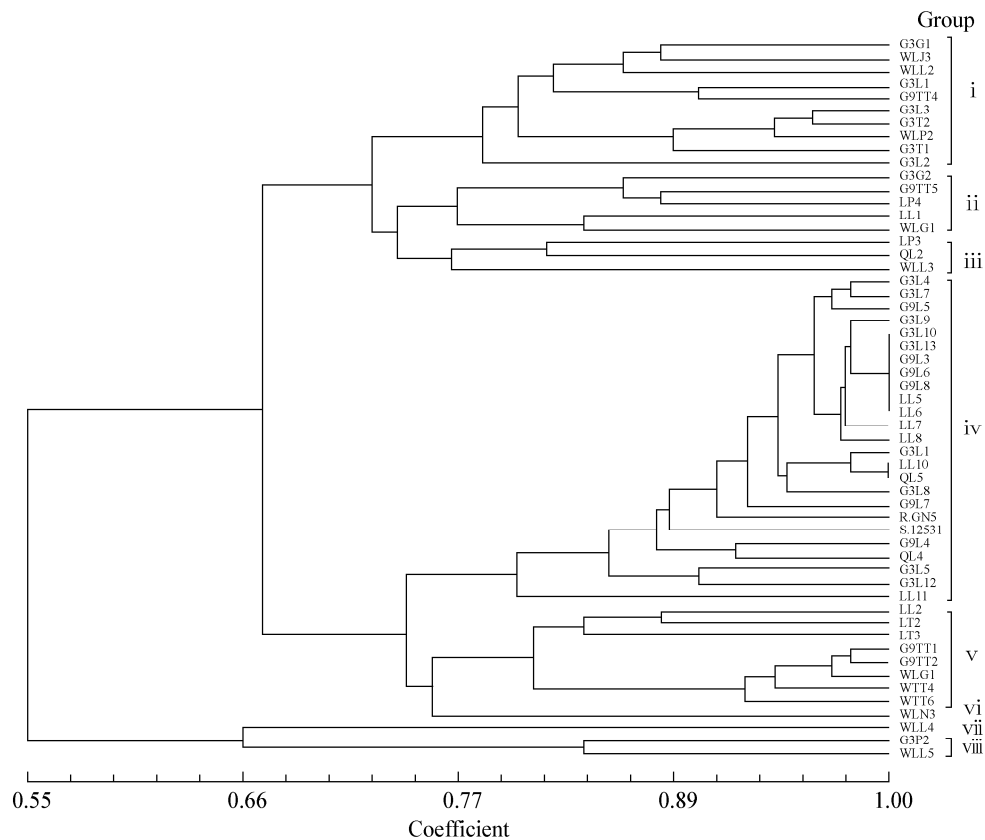


图 1 53 株根瘤菌和 2 株对照菌表型数值分类聚类

Figure 1 Dendrogram based on the phenotypic features of 53 isolates and two reference strains

表 4 根瘤菌菌株表型数值分类鉴别特征

Table 4 Characteristics distinguishing tested isolates

鉴别特征 Distinctive characteristics	i ^a (10) ^b	ii (5)	iii (3)	iv (25)	v (8)	vi	vii	viii (2)
唯一碳、氮源利用 Application of sole carbon and nitrogen sources (1%)								
苹果酸 Malic acid	+ ^c	+	+(2) ^d	+	+	+	+	+
D-果糖 D-fructose	+(9)	+(4)	+	+	+	+	+	+
L-色氨酸 L-tryptophan	+(6)	+	-	+(20)	+(1)	-	-	-
甘氨酸 Glycine	+	+(4)	+(1)	+(2)	+(1)	-	-	-
精氨酸 Arginine	+	+	+	+(2)	+(3)	+	-	+
L-组氨酸 L-histidine	+	+	+	+	+(3)	-	-	+
苯丙氨酸 Phenylalanine	+	+	+(2)	+	+(1)	+	-	-
抗生素耐性 Tolerance to antibiotics								
红霉素 Erythromycin[B] ^e	+	+	+	+	+	-	-	-
红霉素 Erythromycin[C]	+(9)	+(1)	+(1)	+	+(7)	-	-	-
红霉素 Erythromycin[D]	+(3)	-	-	+	+(1)	-	-	-
氯霉素 Chloromycetin[D]	+(9)	+	+	+	+	+	-	+(1)
卡那霉素 Kanamycin[A]	+(9)	+	+	+	+	+	+	-
卡那霉素 Kanamycin[B]	+(3)	-	+(1)	+(21)	+	+	-	-
卡那霉素 Kanamycin[C]	+(3)	-	-	+(24)	+(6)	-	-	-
卡那霉素 Kanamycin[D]	+(4)	-	-	+(24)	+	-	-	-
氨苄青霉素 Ampicillin[B]	+	+(4)	+	+(22)	+	+	+	-
氨苄青霉素 Ampicillin[C]	+(9)	+(1)	+	+(21)	+	+	+	-
氨苄青霉素 Ampicillin[D]	+	+(4)	+	+(23)	+	+	+	-
新霉素 Neomycin[A]	+	+	+	+	+	+	+	+(1)
新霉素 Neomycin[B]	+	-	+(1)	+(23)	+	+	+	-
新霉素 Neomycin[C]	+(9)	+(3)	+(1)	+(23)	+	+	+	+(1)
新霉素 Neomycin[D]	+(7)	+(2)	+(1)	+(24)	+	+	+	+(1)
链霉素 Streptomycin[A]	+	+(3)	+	+	+	+	+	+
链霉素 Streptomycin[B]	+(6)	+(2)	+(1)	+	+(5)	+	+	+
链霉素 Streptomycin[C]	+(9)	+(4)	+	+	+	+	+	+
链霉素 Streptomycin[D]	+(9)	+(3)	+	+(23)	+	+	+	+(1)
庆大霉素 Gentamycin[A]	+(9)	+	+(2)	+	+	+	+	-
庆大霉素 Gentamycin[B]	+(4)	-	-	+	+	+	-	-
庆大霉素 Gentamycin[C]	-	-	-	+	+	+	-	-
庆大霉素 Gentamycin[D]	-	-	-	+(23)	+(6)	-	-	-
染料抗性 Tolerance to dyes (1%)								
溴百里酚蓝 Bromothymol blue	+	+	+	+	+	+	+	+(1)
甲基红 Methyl red	+(8)	+	+	+(23)	+	+	+	+(1)
甲基绿 Methyl green	+	+	+	+(22)	+	+	+	+
溴酚兰 Bromphenol blue	+(9)	+(4)	+(2)	+	+	+	+	+

(待续)

(续表 4)								
亚甲基蓝 Methylene blue	+	+(2)	+(2)	+(20)	+(5)	+	-	-
中性红 Neutral red	+	+	+	+(22)	+	+	+	+
孔雀石绿 Malachite green	+	+	+	+	+(7)	-	+	+
抗逆性 Tolerance to NaCl (%), pH, temperature (°C)								
NaCl (6%)	+(5)	+(1)	+(1)	+	+(1)	-	-	+
pH 11.0	+	+	-	+	+	+	+	-
8 °C	+(9)	-	+(1)	+(24)	-	+	-	-
37 °C	+	+	+	+	+	+	-	+
40 °C	+	+	+	+(23)	+	+	-	+
其他 Others								
淀粉水解 Amylolysis	+	+(3)	+(2)	-	+(6)	+	+	+
明胶水解 Gelatin hydrolysis	+(8)	+	+(1)	-	+(4)	-	-	+(1)
产硫化氢 Sulfured hydrogen	+	+	+	-	+	+	+	+
VP 试验 Voges-Proskauer test	+(5)	-	-	-	-	-	-	-
吲哚产生 Indole production	+(3)	+(2)	+	-	+(3)	+	-	-
BTB 产酸 Acid production	+	+	+	+(20)	+	+	+	-
柠檬酸盐试验 Citrate utilization	+	+(3)	-	+(6)	+(1)	+	-	-
3-酮基乳糖产生 3-keto-lactose	+(1)	+(2)	-	-	+(1)	-	-	-

注: ^a: 菌株在 76% 的相似性水平上聚为 8 个群; ^b: 各群中菌株数量; ^c: 反应呈阳性的菌株数量. [A]、[B]、[C]和[D]代表抗生素浓度分别为 5、50、100 和 300 μg/mL. +: 菌株反应阳性; -: 菌株反应阴性.

Note: ^a: Cluster analysis of phenotypic features identified eight groups (i, ii, iii, iv, v, vi, vii, viii) at 76% similarity; ^b: Number of isolates in the group; ^c: Number of reactions in which strains were positive. [A], [B], [C] and [D] mean the concentrations of antibiotics are 5, 50, 100 and 300 μg/mL, respectively. +: Strains were positive; -: Strains were negative.

2.3 16S rRNA 基因 PCR-RFLP

为了阐明 53 株初筛根瘤菌菌株和对照菌株的系统发育关系和分类地位, 采用 4 种限制性内切酶对菌株 16S rRNA 基因扩增产物进行酶切, 所得出的 16S rRNA-RFLP 分型组合见表 5. *Msp* I 是最具鉴别能力的内切酶, 能产生 16 种限制性酶切条带类型; *Hae* III 和 *Hinf* I 均能产生 12 种限制性酶切条带类型; *Alu* I 仅产生 6 种限制性酶切条带类型. 所有菌株共产生 22 种 16S rRNA-RFLP 分型, 2 株对照菌株各代表 1 种 RFLP 分型(表 5). 53 株根瘤菌中基因型 I 分布最广泛, 包含 24 个菌株; 其次为基因型 XII 和 XV, 各包含 5 个菌株; 基因型 XIX 包含 3 个菌株; 其余 16 株菌各代表 1 种基因型, 所有根瘤菌菌株产生的基因型均与对照菌株不同.

2.4 根瘤菌 16S rRNA 基因测序分析

根据 16S rRNA 基因 PCR-RFLP 分析结果(表 5), 选择 22 个代表菌株进行 16S rRNA 基因部分序列测定(图 2). 结果表明 22 株代表菌株包含在 5 个群中, 群 1 中的 12 株菌(WLL2、WTT4、WLG2、G3P2、WLN3、G3T1、G3G1、G3L1、G3G2、G9TT1、LT3 和 LT2)均与模式菌株 *Rhizobium radiobacter* ATCC 19358^T 聚在一起, 序列相似性在 97.15%–98.72% 之间; 群 3 中的菌株 WTT6 与模式菌株 *Rhizobium rosettiformans* W3^T 聚在一起(100%); 群 5 中的菌株 G9L4、G3L4、WLP2、LL7、G3L7、LP3 和 G3L3 均与模式菌株 *Ensifer meliloti* LMG 6133^T 聚在一起, 序列相似性在 97%–100% 之间; 群 2 和群 4 分别代表对照菌株 R.GN5 和 S.12531, 没有与任何参比菌株聚群.

表 5 根瘤菌代表菌株 16S rRNA 基因 PCR-RFLP 和持家基因合并序列分型

Table 5 RFLP analysis of PCR-amplified 16S rRNA gene and concatenated housekeeping gene groups of 22 representative strains

菌株 Strains	16S rRNA 基因 4 种限制性酶切条带 Restriction enzymes types of 16S rRNA gene digested with four endonucleases ^a				16S rRNA-RFLP 组合 16S rRNA-RFLP groups ^b	16S rRNA-RFLP 分型 16S rRNA-RFLP genotypes ^c	合并序列分群 Group concatenated ^d
	<i>Hinf</i> I	<i>Alu</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Msp</i> I			
	WLP2	A	G	A	l	AGal	I (24)
G3L3	A	H	B	m	AHbm	II	5a
LP3	A	H	B	n	AHbn	III	5b
WTT6	B	I	C	o	BIco	IV	3
G3G1	D	K	E	q	DKeq	VII	1c
G3G2	D	L	F	r	DLfr	VIII	1a
G3L1	D	M	G	s	DMgs	IX	1a
G3P2	D	N	H	t	DNht	X	1d
G3T1	D	O	I	u	DOiu	XI	1d
G9TT1	D	P	F	v	DPfv	XII (5)	1a
LT2	D	Q	H	w	DQhw	XIII	1d
LT3	D	R	J	x	DRjx	XIV	1b
WLG2	D	R	H	y	DRhy	XV (5)	1d
WLL2	D	R	D	y	DRdy	XVI	1d
WLN3	D	O	K	z	DOkz	XVII	1c
WTT4	D	L	D	u	DLdu	XVIII	1d
G9L4	A	G	B	l	AGbl	XIX (3)	5a
LL7	A	G	B	a1	AGba1	XX	5a
G3L4	E	G	B	l	EGbl	XXI	5a
G3L7	F	G	A	l	FGbl	XXII	5a
S.12531	C	G	A	l	CGal	VI	4
R.GN5	A	J	D	p	AJdp	V	2

注: ^a: 字母(A-J, a-z)指菌株 16S rRNA 基因酶切条带类型; ^b: 字母组合代表由 4 种内切酶 *Alu* I、*Hae* III、*Hinf* I 和 *Msp* I 反应产生的 16S rRNA-RFLP 条带组合; ^c: 罗马数字表示由 4 种内切酶反应产生的 16S rRNA-RFLP 基因型; ^d: 基于 *atpD*、*glnII* 和 *recA* 基因合并序列系统发育树的菌株分群。

Note: ^a: Letters (A-J, a-z) refer to 16S rRNA-RFLP pattern types of tested strains detected with each restriction enzyme; ^b: Combinations of letters refer to restriction enzyme groups of tested strains detected by the combined RFLP analysis of 16S rRNA digested with *Alu* I, *Hae* III, *Hinf* I and *Msp* I endonuclease; ^c: Roman numerals refer to genotypes of tested strains identified by the combined analysis of 16S rRNA restriction profiles obtained with 4 endonucleases used; ^d: Group based on the phylogenetic tree of concatenated sequence of *atpD*, *glnII*, and *recA* genes.

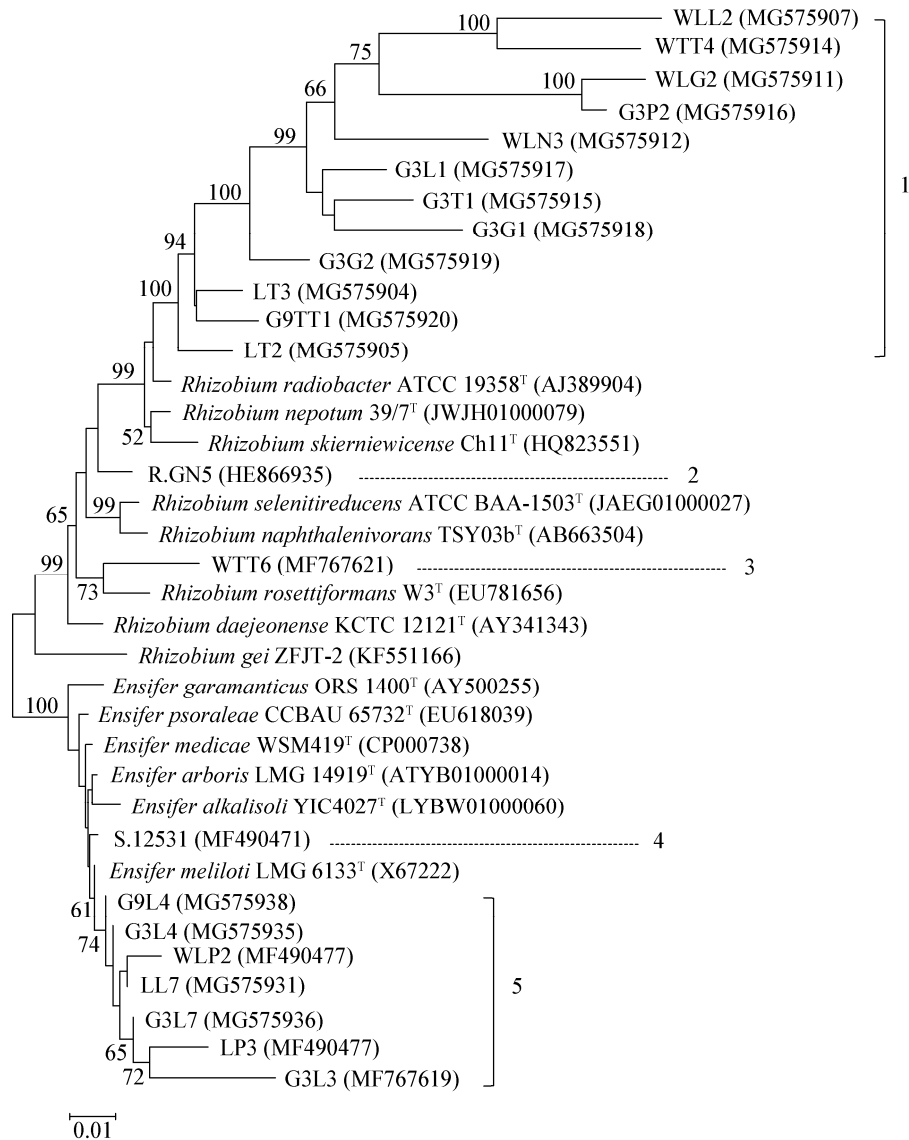


图 2 根瘤菌代表菌株和参比菌株 16S rRNA 基因序列系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of representative isolates and reference strains

注: 括号内为菌株序列号; 分支点上的数字表示 Bootstrap 百分比(1 000 次重复); 下同; 长度单位 0.01 表示 1% 的遗传距离。

Note: Gene sequence accession numbers of tested strains are shown within parentheses; Numbers at nodes indicate bootstrap percentages (based on 1 000 resampled datasets); The same as below; The length unit of 0.01 indicates 1% of the genetic distance.

2.5 根瘤菌 *atpD*、*glnII* 和 *recA* 基因合并序列 MLST 分析

基于 22 个根瘤菌代表菌株的持家基因 *atpD*、*glnII* 和 *recA* 系统发育树的拓扑结构表明菌株的系统发育地位不稳定, 进化地位存在差异。说明单个的持家基因系统发育分析不足以准确的对供试菌株进行分类。因此, 对持家基因合并序列进行

MLST 分析, 建立了 22 个代表根瘤菌菌株和对照菌株的系统发育树(图 3)。结果显示, MLST 分析系统发育树与 16S rRNA 基因序列拓扑结构基本一致, 所有代表菌株在 MLST 系统发育树中聚在 5 个大群。菌株 WTT6 系统发育地位与 16S rRNA 基因序列分析结果一致, 12 株 *R. radiobacter* 菌株分布在 4 个亚群, 1a (G3G2、

G3L1 和 G9TT1)、1b (LT3)、1c (G3G1 和 WLN3) 和 1d (LT2、WLL2、WTT4、WLG2、G3T1 和 G3P2) 分别与模式菌株 *R. radiobacter* CCBAU 75204^T、*R. radiobacter* LMG 140^T、*R. radiobacter* CCBAU 75229^T 和 *R. radiobacter* CCBAU 75221^T 聚在一起；7 株 *E. meliloti* 菌株分布在 2 个亚群，

5a (G9L4、G3L4、WLP2、LL7、G3L7、G3L3) 和 5b (LP3) 与模式菌株 *E. meliloti* LMG 6133^T 和参比菌株 *E. meliloti* SPT2-105a 聚在一起，菌株序列相似性≥97%。值得注意的是，5b 亚群中的菌株 LP3 在合并序列 MLST 系统发育树显示了独特的分类地位。

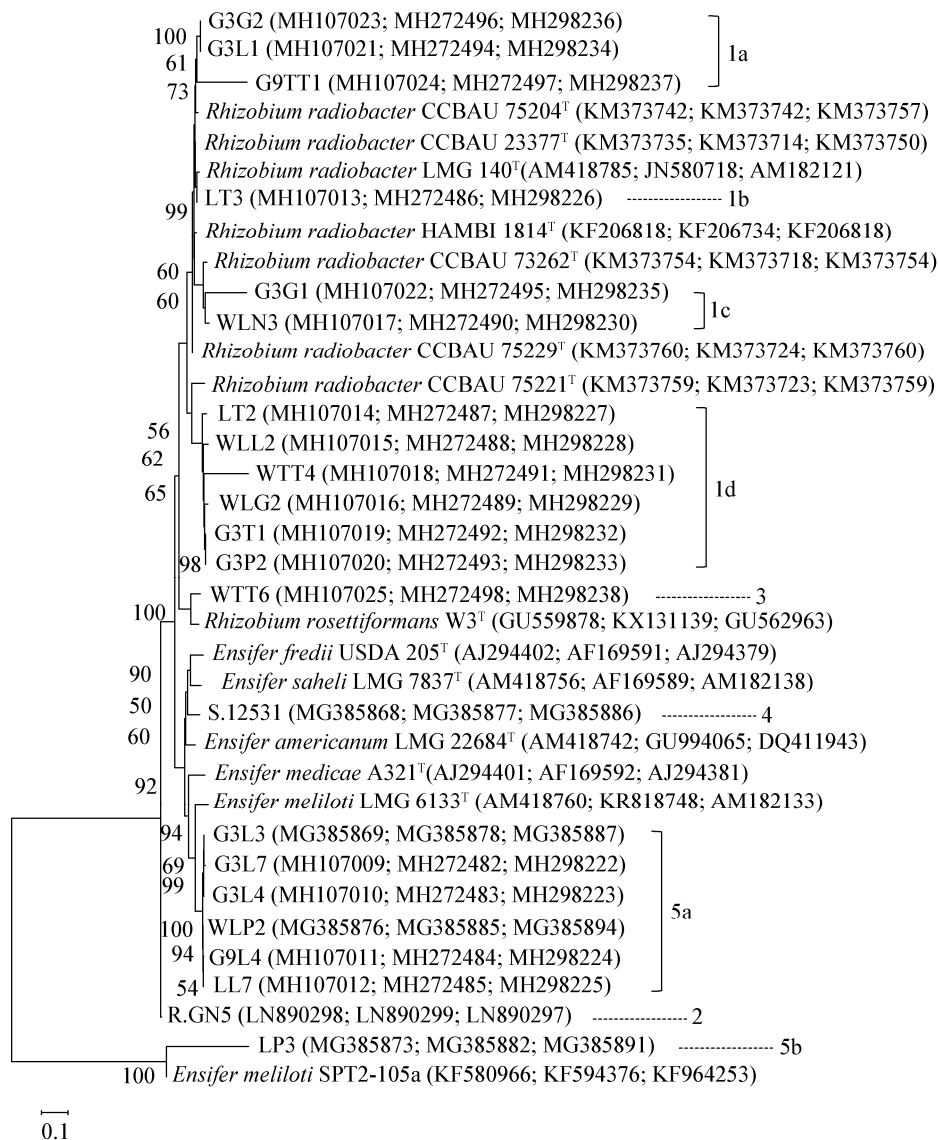


图 3 根瘤菌代表菌株和参比菌株 *atpD*、*glnII* 和 *recA* 基因多位点合并序列系统发育分析

Figure 3 Phylogenetic tree based on concatenated sequences of *atpD*, *glnII* and *recA* genes of representative isolates and reference strains

注：长度单位 0.1 表示 10% 的遗传距离。

Note: The length unit of 0.1 indicates 10% of the genetic distance.

2.6 结瘤基因和固氮基因序列分析

对 22 个根瘤菌代表菌株进行 *nodC* 和 *nifH* 基因序列系统发育分析, 仅有 7 株 *E. meliloti* 代表菌株和对照菌株 S.12531 能够扩增 *nodC* 和 *nifH* 基因并进行测序。在 *nodC* 基因序列拓扑结构中(图 4A), 所有 *E. meliloti* 代表菌株和对照菌株 S.12531 均与模式菌株 *E. meliloti* CCBAU 65135^T 聚在一个分支。与 *nodC* 基因系统发育树相比, 菌株在 *nifH* 基因序列拓扑结构中分散在不同的分支。如图 4B 所示, 对照菌株 S.12531 与模式菌株 *E. meliloti* CCBAU 65135^T 聚在一个分支; 菌株 G9L4、WLP2、LL7、G3L7 和 G3L4 的 *nifH* 基因序列分别与 *E. meliloti* SMX21-1、SMX23-1、CCBAU 15508^T、CCBAU 83493^T 和 SAM26 相似性最近; 菌株 G3L3 和 LP3 聚在一个分支, 其 *nifH* 基因序

列均与 *E. meliloti* RP254 最近, 但他们形成两个分支; 所有 *nifH* 基因序列相似性大于 99%。中华根瘤菌 *nifH* 基因多样性高于 *nodC* 基因。对照菌株 R.GN5、1 株 *R. rosettiformans* 代表菌株(WTT6)和 12 株 *R. radiobacter* 代表菌株(WLL2、WTT4、WLG2、G3P2、WLN3、G3T1、G3G1、G3L1、G3G2、G9TT1、LT3 和 LT2)均未扩增到 *nodC* 和 *nifH* 基因。

2.7 主成分和共生差异分析

基于 *nodC* 和 *nifH* 基因扩增结果, 筛选能够在紫花苜蓿上结瘤的 32 株 *E. meliloti* 菌株和对照菌株 S.12531 进行共生效应研究。就个体共生效应而言, 所有根瘤菌菌株均能在 5 个苜蓿品种上结瘤, 但是对不同品种紫花苜蓿结瘤能力、地上生物量和粗蛋白含量的促进作用差异明显(表 6-8)。

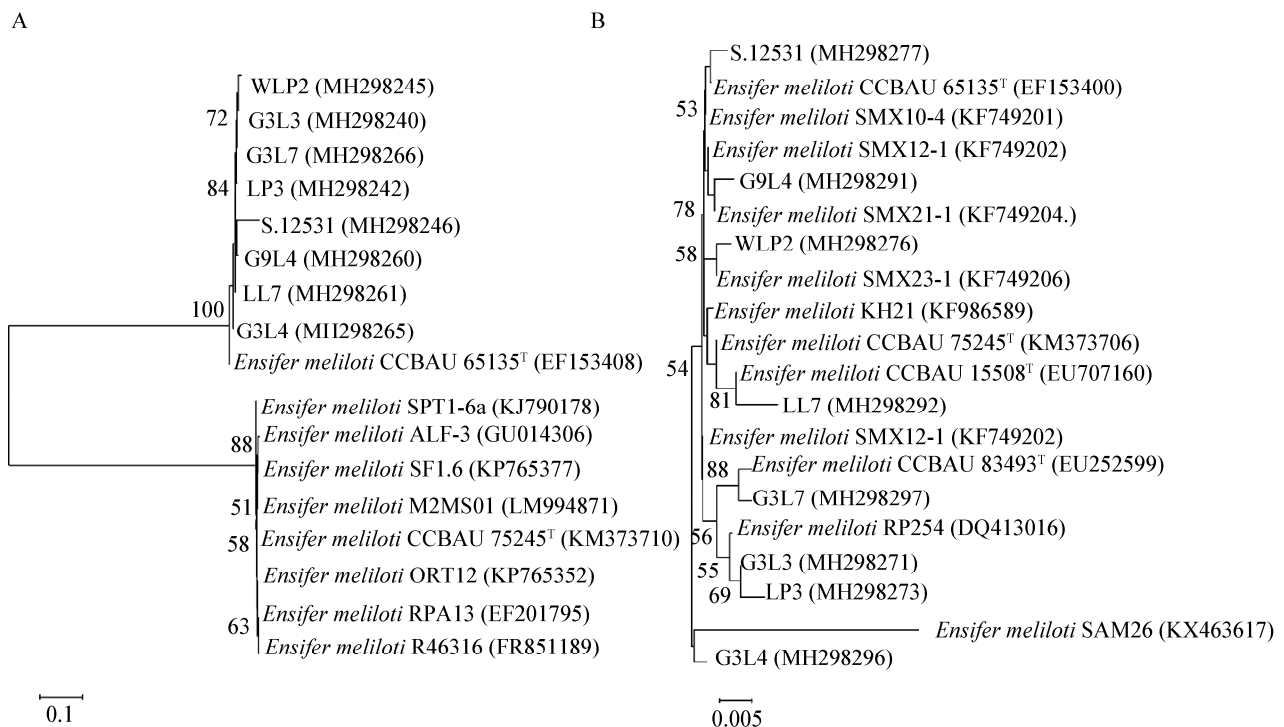


图 4 根瘤菌代表菌株 *nodC* (A)和 *nifH* (B)基因序列系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree based on sequences of *nodC* (A) and *nifH* (B) genes of representative isolates

注: A: *nodC* 基因序列系统发育树; B: *nifH* 基因序列系统发育树; 长度单位 0.1 和 0.005 表示 10%和 0.5%的遗传距离。

Note: A: Phylogenetic tree based on sequences of *nodC* gene; B: Phylogenetic tree based on sequences of *nifH* gene; The length units of 0.1 and 0.005 indicate 10% and 0.5% of the genetic distance.

表 6 *Ensifer meliloti* 菌株接种 5 个苜蓿品种植株单株结瘤数Table 6 Nodule number per plant of *Ensifer meliloti* strains on five *Medicago sativa* varieties

菌株 Strains	甘农 3 号 <i>M. sativa</i> cv. Gannong No. 3	甘农 9 号 <i>M. sativa</i> cv. Gannong No. 9	陇中 <i>M. sativa</i> cv. Longzhong	清水 <i>M. sativa</i> cv. Qingshui	<i>M. sativa</i> cv. WL168HQ
G3L2	12.33±0.882a	6.00±1.528cdef	8.33±1.856ab	8.00±2.000bcd	10.33±1.202de
G3L3	10.67±0.667a	11.67±2.667a	7.00±1.528abc	14.00±3.055a	16.33±2.728cd
G3L4	6.67±0.667bcd	6.67±0.882cdef	3.33±0.333efg	2.33±0.333ef	4.00±0.520ef
G3L5	3.00±0.577fgh	5.00±0.577def	3.33±0.333efg	5.67±0.667de	2.58±0.220ef
G3L6	6.00±0.577bcde	4.67±0.333def	2.67±0.333fgh	6.33±1.764cde	2.33±0.220ef
G3L7	7.67±0.333b	6.67±1.202cdef	1.83±0.083gh	5.67±0.882de	3.00±0.577ef
G3L8	2.00±0.000hi	5.33±0.333def	5.00±1.000cdefg	6.33±1.453cde	1.92±0.220ef
G3L9	5.33±0.333cdef	7.00±1.155cde	3.67±0.333defg	6.33±0.882cde	4.25±0.144ef
G3L10	3.33±0.333fgh	7.67±0.333bcd	5.00±0.577cdefg	6.00±1.155cde	3.33±0.167ef
G3L12	6.00±0.000bcde	6.00±0.000cdef	4.67±0.882cdefg	7.00±0.577cde	3.17±0.167ef
G3L13	4.67±1.333defg	4.00±1.000ef	5.00±0.577cdefg	6.33±0.882cde	3.33±0.726ef
G3T2	12.00±1.155a	5.00±0.577def	7.00±1.000abc	5.67±1.202de	13.00±3.512cd
G9L3	5.33±0.333cdef	5.00±0.577def	3.67±0.333defg	5.67±0.667de	3.08±0.220ef
G9L4	8.00±0.577b	4.67±0.333def	4.00±0.577cdefg	4.33±0.333def	3.58±0.363ef
G9L5	5.33±0.333cdef	5.00±0.577def	3.33±0.333efg	4.33±0.333def	3.33±0.300ef
G9L6	7.33±0.882bc	4.67±0.882def	3.00±0.577fgh	5.00±0.577def	3.00±0.250ef
G9L7	6.33±0.882bcd	6.33±0.882cdef	3.67±0.882defg	5.67±1.856de	3.17±0.441ef
G9L8	3.33±0.333fgh	6.67±0.882cdef	1.83±0.083gh	5.00±1.000def	2.75±0.500ef
LL1	4.00±0.577efgh	9.33±2.848abc	7.00±0.577abc	9.67±1.202abcd	15.00±4.000cd
LL2	7.00±0.577bcd	10.67±2.333ab	6.33±0.882abcde	11.33±1.856abc	29.00±9.074a
LL5	5.33±1.202cdef	4.00±1.155ef	4.00±0.577cdefg	6.00±0.577cde	3.58±0.167ef
LL6	5.33±0.882cdef	7.67±0.333bcd	3.67±0.333defg	5.67±0.333de	3.25±0.289ef
LL7	4.67±0.333defg	5.00±0.577def	4.33±0.882cdefg	5.67±1.333de	3.17±0.333ef
LL8	6.00±0.577bcde	6.67±0.882cdef	3.00±0.577fgh	6.00±0.577cde	3.00±0.144ef
LL10	3.00±0.577fgh	4.33±0.333def	1.83±0.083gh	6.00±1.155cde	2.08±0.220ef
LL11	5.00±0.577def	4.67±0.667def	3.00±0.577fgh	6.33±1.453cde	3.25±0.000ef
LP3	3.33±0.333fgh	5.33±0.333def	9.33±1.667a	8.00±3.786bcd	13.67±4.055cd
QL2	4.67±0.667defg	5.67±0.333def	5.67±2.186bcdef	12.33±5.044ab	25.67±4.096ab
QL4	5.33±0.333cdef	5.00±0.577def	5.00±1.528cdefg	2.33±0.333ef	2.42±0.220ef
QL5	2.67±0.333ghi	4.33±0.333def	3.33±0.333efg	5.67±0.667de	1.83±0.083f
WLG1	6.00±0.577bcde	4.67±0.667def	6.67±2.028abcd	6.00±1.528cde	25.67±2.906ab
WLP2	3.67±0.333fgh	3.33±0.333f	5.33±1.333bcdef	7.00±1.528cde	19.67±5.840bc
CK	0.67±0.333i	0.33±0.333g	0.00±0.000h	0.00±0.000f	0.00±0.000f
S.12531	8.00±1.528b	6.67±0.667cdef	2.67±0.667fgh	6.00±1.155cde	4.42±0.333def

注：同列不同小写字母表示菌株处理间差异显著水平($P<0.05$)，下同。

Note: Different lower case letters within the same column indicate significant differences among strain treatments at 0.05 level, the same as below.

表 7 *Ensifer meliloti* 菌株接种 5 个苜蓿品种植株地上干重Table 7 Shoot dry weight of *Ensifer meliloti* strains on five *Medicago sativa* varieties (mg/plant)

菌株 Strains	甘农 3 号 <i>M. sativa</i> cv. Gannong No. 3	甘农 9 号 <i>M. sativa</i> cv. Gannong No. 9	陇中 <i>M. sativa</i> cv. Longzhong	清水 <i>M. sativa</i> cv. Qingshui	<i>M. sativa</i> cv. WL168HQ
G3L2	24.90±3.538cde	64.17±16.441d	75.87±15.264e	56.57±22.123cdefg	88.97±3.580cdefghij
G3L3	37.17±13.886abc	47.63±3.993d	173.77±11.419a	54.83±31.976cdefg	107.57±19.890bcdef
G3L4	10.00±0.404ef	81.73±2.348d	26.93±2.849fg	29.97±5.193fgh	76.89±26.966defghij
G3L5	5.50±0.929f	48.77±4.520d	43.90±6.125f	23.80±3.460h	34.08±1.220j
G3L6	7.07±0.982f	407.53±181.037bc	97.03±3.295de	19.93±3.152h	119.87±45.354abcde
G3L7	6.80±1.308f	60.17±1.822d	24.67±1.913fg	43.00±2.155defgh	42.18±0.765ghij
G3L8	7.17±1.417f	639.67±123.776a	20.27±1.364fg	18.07±3.550h	175.83±30.468a
G3L9	7.63±0.555f	56.53±6.595d	36.47±2.601fg	30.27±8.767fgh	39.92±3.273hij
G3L10	8.37±0.825ef	254.27±180.556cd	22.60±4.524fg	25.57±2.842h	86.15±44.859cdefghij
G3L12	8.33±1.475ef	73.73±6.389d	29.40±2.219fg	24.10±1.528h	40.78±0.911hij
G3L13	8.17±2.267ef	64.30±7.328d	29.27±6.405fg	22.87±1.372h	66.98±30.356efghij
G3T2	19.03±2.921def	57.23±1.367d	91.83±13.638de	55.63±7.851cdefg	106.63±9.093bcdef
G9L3	6.67±0.348f	75.60±6.972d	27.73±3.061fg	43.20±2.571defgh	46.08±0.361fghij
G9L4	7.27±0.426f	49.43±5.500d	22.80±4.952fg	32.77±1.255fgh	38.47±1.974hij
G9L5	7.37±2.569f	66.23±1.048d	38.43±1.866fg	28.33±0.524gh	42.56±0.859ghij
G9L6	8.73±1.073ef	59.57±1.299d	18.77±1.273fg	37.27±3.289efgh	39.16±2.237hij
G9L7	7.17±1.369f	53.83±7.052d	24.57±5.002fg	22.87±2.140h	34.57±3.233j
G9L8	5.90±1.249f	67.63±3.227d	30.07±1.317fg	32.03±0.809fgh	40.94±2.183hij
LL1	18.40±1.587def	52.90±7.465d	130.97±8.203b	96.23±15.288a	140.47±15.010abc
LL2	30.23±4.694bcd	65.93±11.860d	121.25±12.731bc	57.97±3.627cdef	134.40±3.550abcd
LL5	6.20±1.249f	326.67±240.277c	36.10±3.365fg	28.70±8.796gh	105.55±61.047bcdefg
LL6	7.50±0.361f	519.33±8.667ab	33.30±4.341fg	30.90±1.079fgh	154.68±0.910ab
LL7	7.47±1.135f	52.33±7.449d	38.47±1.789fg	41.17±0.933defgh	43.93±2.961fghij
LL8	5.87±1.097f	53.20±4.140d	31.00±0.666fg	29.13±1.073gh	36.04±1.580ij
LL10	4.43±1.192f	68.67±10.132d	25.47±4.378fg	35.20±2.303fgh	40.93±3.981hij
LL11	6.10±0.252f	81.70±7.524d	44.23±10.993f	30.93±2.379fgh	48.40±5.570fghij
LP3	30.23±2.728bcd	49.13±4.021d	144.35±0.779b	75.43±12.445abc	80.90±7.562cdefghij
QL2	46.77±19.567a	49.03±2.196d	100.43±12.899cd	65.23±6.388bcd	99.67±16.458bcdefghi
QL4	10.30±1.401ef	53.00±4.291d	26.50±2.173fg	31.27±4.932fgh	34.18±2.387j
QL5	8.13±1.071ef	43.30±0.643d	19.70±1.097fg	44.50±1.966defgh	102.10±2.538bcdefgh
WLG1	42.73±14.909ab	61.60±2.433d	123.33±14.372b	63.03±3.538bcde	139.43±15.820abcd
WLP2	11.57±2.410ef	36.53±3.435d	97.97±22.984de	84.03±6.014ab	124.37±20.435abcde
CK	4.10±0.635f	40.47±1.167d	12.30±0.611g	16.43±3.493h	29.93±0.981j
S.12531	17.15±0.029def	63.43±1.313d	33.77±2.186fg	33.00±3.636fgh	47.24±0.426fghij

表 8 *Ensifer meliloti* 菌株接种 5 个苜蓿品种植株粗蛋白含量Table 8 Crude protein content of *Ensifer meliloti* strains on five *Medicago sativa* varieties (%)

菌株 Strains	甘农 3 号 <i>M. sativa</i> cv. Gannong No. 3	甘农 9 号 <i>M. sativa</i> cv. Gannong No. 9	陇中 <i>M. sativa</i> cv. Longzhong	清水 <i>M. sativa</i> cv. Qingshui	<i>M. sativa</i> cv. WL168HQ
G3L2	24.30±3.473b	5.37±0.632lm	6.15±1.061ghijklm	11.39±0.064d	18.52±1.345ab
G3L3	16.00±4.193cd	16.88±0.329c	9.57±1.163d	8.87±0.087fg	17.41±1.287bc
G3L4	9.41±0.113klmnop	12.66±0.439h	5.29±0.012hijklmno	4.97±0.084op	6.11±0.159s
G3L5	6.97±0.620opq	14.55±0.136fg	8.72±0.029def	4.38±0.020p	8.66±0.121lmnop
G3L6	8.19±0.678lmnopq	12.80±0.072h	6.00±0.006ghijklmn	3.31±0.104q	7.57±0.179pqr
G3L7	6.88±0.031opq	13.92±0.087g	3.65±0.009op	3.04±0.066q	6.87±0.032qrs
G3L8	7.70±0.270nopq	18.21±0.121b	4.05±0.107mno	9.36±0.127ef	9.83±0.156ijkl
G3L9	9.57±0.013jklmnop	9.91±0.046j	5.12±0.061ijklmno	7.49±0.052ijk	8.02±0.035opq
G3L10	6.36±0.263pq	20.65±0.084a	6.32±0.015ghijk	7.84±0.372hi	10.30±0.052hij
G3L12	11.29±0.091ghijkl	12.66±0.081h	7.85±0.961defg	2.78±0.017q	8.64±0.234lmnop
G3L13	17.10±0.173c	16.01±0.130de	6.72±0.032fghij	5.70±0.075mn	11.38±0.000fgh
G3T2	35.67±0.012a	7.34±0.043k	5.37±0.003hijklmno	7.19±0.372jkl	18.48±0.956ab
G9L3	7.42±0.323opq	16.37±0.064cd	4.73±0.038jklmno	8.81±0.009fg	9.33±0.075jklmno
G9L4	13.14±0.030defghi	15.69±0.248de	4.69±0.182jklmno	6.69±0.009l	10.05±0.026hijk
G9L5	7.89±0.463mnopq	15.22±0.121ef	7.23±0.032efghi	4.53±0.006p	8.72±0.078klmnop
G9L6	8.52±0.045lmnopq	14.68±0.020fg	6.29±0.006ghijkl	8.98±0.165fg	9.62±0.055ijklm
G9L7	12.84±0.338defghij	11.54±0.020i	5.26±0.087ijklmno	7.14±0.147jkl	9.20±0.139jklmno
G9L8	12.62±0.135efghijk	14.60±0.029fg	7.13±0.049efghi	6.95±0.075jkl	10.33±0.049hij
LL1	14.19±0.419cdefg	15.93±0.257de	22.44±0.104ab	12.16±0.924c	18.89±0.831a
LL2	15.60±0.162cdef	12.49±1.091h	20.88±0.000b	12.20±0.257c	16.96±0.202c
LL5	13.66±0.407defgh	15.53±0.006de	16.01±0.069c	7.52±0.032ij	13.18±0.092de
LL6	12.64±0.283efghijk	21.07±0.113a	4.08±0.006lmno	5.85±0.078m	10.91±0.064ghi
LL7	9.33±0.558klmnop	12.72±0.110h	4.70±0.127jklmno	5.20±0.075no	7.99±0.153opq
LL8	9.33±0.356klmnop	7.71±0.043k	4.34±0.003klmno	12.05±0.026c	8.36±0.107mnop
LL10	10.80±0.482hijklmn	9.18±0.029j	3.45±0.003op	4.81±0.020op	8.06±0.144nopq
LL11	9.88±0.829ijklmno	17.92±0.225b	7.44±0.064efgh	6.85±0.006kl	10.52±0.280ghij
LP3	8.01±0.026lmnopq	5.73±0.170lm	23.49±0.078a	8.41±0.052gh	12.21±0.072ef
QL2	15.94±1.149cde	5.60±0.162lm	9.83±2.374d	24.77±0.052a	16.77±0.110c
QL4	11.19±0.041ghijklm	9.77±0.084j	4.65±0.043jklmno	11.26±0.006d	9.22±0.023jklmno
QL5	13.48±0.002defgh	12.52±0.084h	4.52±0.075jklmno	6.95±0.029jkl	9.37±0.046jklmno
WLG1	15.24±0.603cdef	5.79±0.043l	3.85±1.697no	13.82±0.338b	9.44±0.629jklmn
WLP2	12.26±0.341fghijk	9.57±0.173j	4.10±1.426lmno	14.07±0.072b	13.77±0.473d
CK	6.86±0.574opq	4.91±0.219m	1.75±0.723p	2.73±0.095q	6.54±0.150rs
S.12531	13.37±0.046defgh	16.17±0.188cd	9.06±0.447de	10.89±0.110d	10.88±0.107ghi

甘农3号苜蓿上, G3L2、G3T2和G3L3接种处理单株结瘤数显著大于其余所有处理($P<0.05$); 就地上干重而言, 菌株QL2、WLG1和G3L3接种共生效率最高; G3T2、G3L2、G3L13和G3L3接种粗蛋白含量与参比菌株S.12531差异显著($P<0.05$)。G3L3和LL2接种甘农9号苜蓿单株结瘤数最高, 显著大于参比菌株S.12531($P<0.05$), 个别菌株接种对其地上干重(G3L8、LL6、G3L6和LL5)和粗蛋白含量(LL6、G3L10、G3L8、LL11)促进作用强, 与CK和参比菌株S.12531差异显著($P<0.05$)。就陇中苜蓿而言, 菌株LP3、G3L2、G3L3、G3T2、LL1、LL2和WLG1接种, 植株单株结瘤数与CK和参比菌株S.12531差异显著($P<0.05$); 菌株G3L3、LP3、LL1、WLG1、LL2、G3L2、G3L6、G3T2、QL2和WLP2接种对植株地上干重的促进作用显著高于CK和参比菌株S.12531($P<0.05$); 就粗蛋白含量而言, 菌株LP3、LL1、LL2和LL5接种共生效应最强($P<0.05$)。部分菌株接种清水苜蓿对单株结瘤数(G3L3和QL2)、地上干重(LL1、LP3、WLP2、QL2和WLG1)和粗蛋白含量(QL2、WLP2、WLG1、LL2、LL1和LL8)促进作用显著大于CK和参比菌株S.12531($P<0.05$)。WL168HQ苜蓿上, LL2、QL2、WLG1、WLP2、G3L3、LL1、LP3和G3T2接种处理单株结瘤数显著大于其余所有处理($P<0.05$), 部分菌株接种地上干重(G3L8、G3L6、LL1、LL2、LL6、WLG1和WLP2)和粗蛋白含量(LL1、G3L2、G3T2、G3L3、LL2、QL2、WLP2、LL5和LP3)与CK和参比菌株S.12531差异显著($P<0.05$)。

基于14个变量的主成分分析表明, 在标准化变量中第一主成分解释了总变异的52.84%, 第三主成分解释了10.38%的标准方差。应用所有参数的标准化值做散点图, 每一种颜色代表一个苜蓿品种(图5)。就群体共生效应而言, 33株根瘤菌接种后甘农3号、甘农9号和清水苜蓿的所有参数值在PC1轴上聚在-1-1之间, 在PC3轴

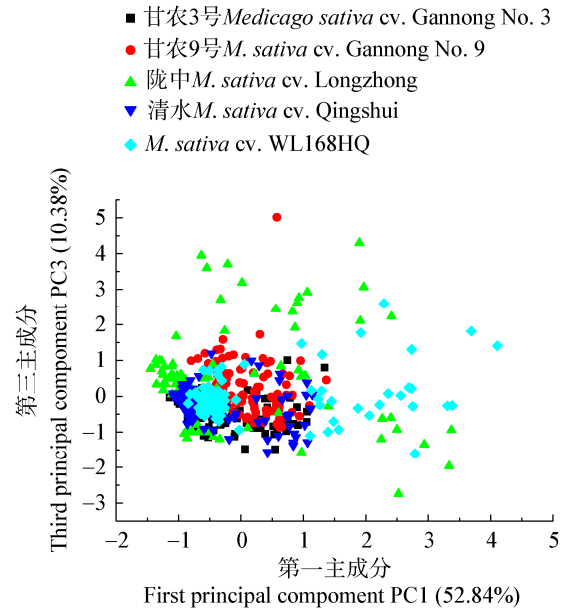


图5 基于所有变量标准化值的散点图

Figure 5 Scatter diagram based on the standardized values of all parameters

注: 第一主成分解释了总体方差的52.84%, 第三主成分解释了总体方差的10.38%。

Note: First principal component (PC1) accounted for 52.84% of the overall variance, and the third principal component (PC3), for 10.38% of the overall variance.

上聚在-1.5-1.5之间; 接种陇中和WL168HQ苜蓿的参数值则比较分散, PC1轴上分散在-1.5-4之间, PC3轴上分散在-3-4之间。这表明根瘤菌株在甘农3号、甘农9号和清水苜蓿上的共生效应差异较小, 在陇中和WL168HQ苜蓿上共生差异程度较大。

3 讨论与结论

本试验从甘肃省3个栽培区域的5个紫花苜蓿品种的9个部位共分离得到53株根瘤菌, 作为根瘤菌定殖的主要部位, 根瘤中分离的菌株最多(62%), 但16S rRNA-RFLP分型多样性比较低; 其次为田间土壤(11%), 根际土壤、根表皮和根中柱分离的菌株数量相同, 共占总菌株的23%, 菌株16S rRNA-RFLP分型种类丰富。根瘤、根中柱和根表皮以及地上组织内的菌株种群多样性丰富^[8], 并且相比根瘤, 植物根系表面尤其是表皮

和中柱的根瘤菌种群多样性要更丰富^[38], 来自茎和种子的菌株最少(4%)。有研究报道植物地上组织尤其是叶片包含复杂并高度多样化的细菌种群^[39], 但本研究没有从植物叶片中分离到根瘤菌菌株。内生细菌种群的构成主要依赖于植物和细菌基因型, 其次为非生物和生物环境因子^[6]。不同植物组织中微环境的差异会影响根瘤菌菌株在各种生态位中的存在^[40]。此外, 内生菌株的低分离率也可能是由于自然生长的苜蓿植株未经接种, 根瘤菌含量较低^[16]。同时试验地样本采集和室内细菌分离之间的较长时间延误可能也是导致样本内细菌失活或可培养性降低的一个原因。

本研究采用数值分类、16S rRNA-RFLP、16S rRNA 基因测序, 以及 *atpD*、*glnII* 和 *recA* 基因合并序列 MLST 分析相结合的方法探讨不同苜蓿组织中根瘤菌的多样性。16S rRNA 基因测序分析表明, 53 株菌分别属于 *Rhizobium* 和 *Ensifer*。MLST 分析证实了 16S rRNA 基因序列分析结果, 并且更详细地阐明了供试菌株的系统发育地位, 将菌株进一步划分为 3 个种, 分别为 *E. meliloti* (32)、*R. radiobacter* (20) 和 *R. rosettiformans* (1)。72 项表型特征数值分类分析将所有菌株聚为 8 个群, 每个群都包含来自不同栽培区域、苜蓿品种和部位组织的根瘤菌菌株, 菌株表型多样性丰富。表型数值分类中同一个聚群的根瘤菌菌株产生的 16S rRNA-RFLP 分型组合不同, 表明相同表型的根瘤菌菌株基因型有差异, 反之亦然^[41]。32 株 *E. meliloti* 菌株中有 7 种 16S rRNA-RFLP 分型组合, 20 株 *R. radiobacter* 菌株中有 12 种 16S rRNA-RFLP 分型组合, 表明同一个属的根瘤菌菌株遗传多样性丰富。

根瘤菌种群的多样性受到土壤类型、植物基因型、同一品种不同植株、相同种不同菌株以及土壤管理策略的影响^[42], 然而本研究根瘤菌菌株的表型聚类分析和 16S rRNA-RFLP 分型与其来源没有直接关系。丰富的表型多样性是菌株在不同

环境条件下良好生存的必要因素, 同时它也有利于菌株适应不断变化着的土壤条件^[43], 来源于存在本土植物区域的根瘤菌种群包含大量生理上多样的菌株^[44-45]。本研究中根瘤菌菌株在唯一碳氮源利用、抗逆性、抗生素和染料耐性方面存在很大差异, 说明环境的变异, 例如土壤和内共生环境, 是出现较大生理代谢差异的原因之一^[21]。同时根瘤菌基因组的结构和功能也会造成本地根瘤菌种群内部多样化^[46]。这些可能性解释了菌株多样性与其来源没有直接关系的现象。

本研究 53 株根瘤菌菌株中, *E. meliloti* (32 株) 为优势种群, 占总菌株的 60%。在对土壤和植物地上组织内 *E. meliloti* 种群结构的研究^[8]和对紫花苜蓿根瘤内根瘤菌的研究^[47]中均对中华根瘤菌 *E. meliloti* 进行了报道。本研究中 *E. meliloti* 菌株主要分布在地下(根际土壤、根瘤、根表皮和根中柱)而不是地上(花、茎、叶和种子)组织, 并且种内共产生 7 种 16S rRNA-RFLP 分型组合, 说明这个根瘤菌种在各微环境内(土壤、根瘤、根表皮、根中柱和其他地上组织)的定殖互作相对比较简单, 遗传物质的随机漂移对种群结构的影响较小^[8]。*E. meliloti* 代表菌株和参比菌株 S.12531 的结瘤基因和固氮基因系统发育分析结果与 16S rRNA 基因和持家基因 *atpD*、*glnII* 和 *recA* 合并序列 MLST 分析相似。来自 5 个苜蓿品种的菌株 *nodC* 基因序列均与模式菌株 *E. meliloti* CCBAU 65135^T 最相近, *nifH* 基因序列分别与不同的 *E. meliloti* 参比菌株高度相似, 结合 MLST 分析结果, 这些菌株属于苜蓿共生变体(*E. meliloti* bv. *meliloti*), 能够在苜蓿上结瘤^[48]。这种 *nodC* 和 *nifH* 基因的高度保守性表明同一个种不同紫花苜蓿品种间的共生基因来源相同, 它们均是在不同时期从单一祖先水平转移到本研究根瘤菌中, 而且 *Ensifer* 物种的祖先可能已经与豆类植物(或紫花苜蓿)进行了互作, 这种共生基因在 *Ensifer* 物种进化过程中是垂直遗传的。在对甘草 *Mesorhizobium* 共生体(*M. amorphae*、*M. septentrionale* 和 *M.*

ciceri)的 *nodC*、*nodA*、*nodH* 和 *nifH* 基因系统发育分析中已经观察到了这种模式^[44]。有研究认为 α 根瘤菌中 *Ensifer* 和 *Rhizobium* 根瘤菌的结瘤基因是与携带结瘤基因的共生质粒操纵子共同进化的^[49]，因此 *E. meliloti* 种内共生基因的水平转移可能是菌株共生能力传播的重要机制。*E. meliloti* 种内 *nifH* 基因多样性高于 *nodC* 基因，说明 *nifH* 基因更适合用于研究本试验根瘤菌菌株共生特性的遗传基础^[50]。

作为本研究中多样性最丰富的根瘤菌种群，*R. radiobacter* 组成了总菌株的 38%，分布在除花和叶以外的其余所有部位(20 株)。由 12 种 16S rRNA-RFLP 分型组合产生的代表菌株在 16S rRNA 基因序列系统发育树中与 *R. radiobacter* ATCC 19358^T 聚群，在合并序列 MLST 分析中却与不同的 *R. radiobacter* 模式菌株聚群并且形成不同的小分支。虽然它们都被定种为 *R. radiobacter*，然而也不能排除有好几个物种存在的可能性。早期的分类体系将 *R. radiobacter* 归于 *Agrobacterium* 属，即 *Agrobacterium radiobacter*。*A. radiobacter* DSM 30147^T 于 1902 年首次分离自腐生土壤^[51-52]，在 1942 年被 Conn^[53] 划分到 *Agrobacterium* 属之前曾被归到 *Bacterium*、*Rhizobium*、*Achromobacter* 和 *Alcaligenes*^[54]。因此 *R. radiobacter* 菌株不能结瘤固氮，不能扩增到 *nodC* 和 *nifH* 基因。

2011 年 Kaur 等提出 *R. rosettiformans* W3^T 是 *Rhizobium* 的一个新种(模式菌 W3^T=CCM 7583^T=MTCC 9454^T)，并且从 W3^T 中扩增到了编码固氮酶还原酶的 *nifH* 基因，但是未能检测到 *nodA*、*nodC* 和 *nodD* 基因^[55]。Burbano 等研究也表明分离自甘蔗和云杉根部的 *R. rosettiformans* 菌株与固氮作用有关，但不能在寄主植物上结瘤^[56]。本试验未从 *R. rosettiformans* 菌株 WTT6 中扩增到 *nodC* 基因，与以上研究结果一致。Estrella 等^[50]和 Aserse 等^[19]的报道指出，由于菌株间共生基因的差异会导致扩增所用引物上的核苷酸与目

的菌株 *nodC* 和 *nifH* 基因的核苷酸不匹配，所以即使应用了各种不同的引物组合，也不能从 *Rhizobium* 属、*Mesorhizobium* sp. ERR6 和 *Rhizobium* sp. IAR30 根瘤菌中扩增到 *nodC* 和 *nifH* 基因。相似地，与其他根瘤菌菌株在结瘤基因和固氮基因方面的差异也是本试验 *R. rosettiformans* 代表菌株未扩增到 *nifH* 基因以及对照菌株 R.GN5 未扩增到 *nodC* 和 *nifH* 基因的可能原因之一。我们仅用了表 2 所列出的引物扩增 *nodC* 和 *nifH* 基因，或许选用其他不同的引物组合会得到更好的扩增结果。

根瘤菌的基因多样性会导致可遗传的变异，产生与共生相关的表型结果^[46]，然而由它所引起的表型改变也是自然选择的底物^[57]。相同基因型的菌株表现出不同的表型特征，这可能是菌株在多个不同的环境中生存的结果^[57]。表型的形成过程很复杂，这个过程会影响新的和有益的表型的首次产生，以及进化适应和创新的可能性^[58]。表型的多样性因此也会导致根瘤菌菌株对苜蓿品种共生适应性的差异。本研究选择了能够在苜蓿上结瘤固氮的 32 株 *E. meliloti* 菌株和对照菌株 S.12531，通过单株结瘤数、地上干重和粗蛋白含量分析菌株对不同品种紫花苜蓿结瘤和生长的影响，并讨论了根瘤菌菌株群体共生效应。菌株接种后单株结瘤数、地上干重和粗蛋白含量 3 个指标两两中度正相关($r=0.51-0.56$, $P<0.001$)，与 Wang 等^[48]用根瘤菌菌株接种苜蓿植株单株结瘤数与地上干重中度正相关($r=0.51$, $P<0.001$)的结论相符。菌株 G3L3 接种甘农 3 号，LP3、LL1 和 LL2 接种陇中，QL2 接种清水，LL1、LL2 和 WLP2 接种 WL169HQ 苜蓿对植株结瘤能力、生物量和粗蛋白含量均有显著促进作用，说明根瘤菌菌株 G3L3 与甘农 3 号，LP3、LL1、LL2 与陇中，QL2 与清水，LL1、LL2、WLP2 与 WL169HQ 苜蓿品种共生匹配和适应能力更强。不同菌株接种甘农 9 号苜蓿分别仅提高结瘤能力(G3L3 和 LL2)或同时促进生物量和粗蛋白含量(G3L8 和 LL6)，

说明这些菌株与甘农 9 号苜蓿品种匹配适应能力较弱。33 株根瘤菌接种甘农 3 号、甘农 9 号和清水苜蓿后所有参数值聚在一起, 具有相似的共生效应。根瘤菌与这 3 个苜蓿品种的共生具有强烈的品种效应, 它们的共生效应根据苜蓿品种而不是根瘤菌菌株而变, 与我们的假设一致。相反, 根瘤菌菌株在陇中和 WL168HQ 苜蓿上的共生效应差异明显。在根瘤菌-寄主互作体系中, 植物基因型对细菌共生体的选择具有更大的影响^[42], 当植物的基因型对细菌分子信号敏感的时候菌株才会表现出显著的共生效应^[59]。说明根瘤菌菌株与陇中苜蓿和 WL168HQ 苜蓿品种间依赖于黄酮类物质的识别过程更充分、更强烈。有研究指出发生在寄主植物基因变异中心的根瘤菌与紫花苜蓿品种共生伙伴是共同进化的^[60-61], 而分离自本研究的 33 株根瘤菌种群遗传分析为此提供了合理的支持。

致谢: 感谢甘肃农业大学草业学院提供试验器材; 感谢师尚礼教授在论文设计和撰写方面给与的指导; 感谢苗阳阳和周彤同学在试验操作方面提供的帮助。

REFERENCES

- [1] Senthilkumar M, Anandham R, Madhaiyan M, et al. Endophytic bacteria: perspectives and applications in agricultural crop production[A]//Maheshwari DK. Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems[M]. Berlin, Heidelberg: Springer, 2011: 61-96
- [2] Tanuja BSC, Mishra PK. Ascending migration of endophytic *Bacillus thuringiensis* and assessment of benefits to different legumes of N.W. Himalayas[J]. European Journal of Soil Biology, 2013, 56: 56-64
- [3] Beltran-Garcia MJ, White JF Jr, Prado FM, et al. Nitrogen acquisition in *Agave tequilana* from degradation of endophytic bacteria[J]. Scientific Reports, 2014, 4: 6938
- [4] Mabood F, Zhou XM, Smith DL. Microbial signaling and plant growth promotion[J]. Canadian Journal of Plant Science, 2014, 94(6): 1051-1063
- [5] Pavlo A, Leonid O, Iryna Z, et al. Endophytic bacteria enhancing growth and disease resistance of potato (*Solanum tuberosum* L.) [J]. Biological Control, 2011, 56(1): 43-49
- [6] Miliute I, Buzaite O, Baniulis D, et al. Bacterial endophytes in agricultural crops and their role in stress tolerance: a review[J]. Zemdirbyste-Agriculture, 2015, 102(4): 465-478
- [7] Lodewyckx C, Vangronsveld J, Porteous F, et al. Endophytic bacteria and their potential applications[J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 2002, 21(6): 583-606
- [8] Bacon CW, Hinton DM. Bacterial endophytes: the endophytic niche, its occupants, and its utility[A]//Gnanamanickam SS. Plant-Associated Bacteria[M]. Dordrecht: Springer, 2006: 155-194
- [9] Romdhane SB, Trabelsi M, Aouani ME, et al. The diversity of rhizobia nodulating chickpea (*Cicer arietinum*) under water deficiency as a source of more efficient inoculants[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2009, 41(12): 2568-2572
- [10] Qi J. Screening endogenous rhizobia from alfalfa seeds and their promoting alfalfa seedlings growth property[D]. Lanzhou: Doctoral Dissertation of Gansu Agricultural University, 2006 (in Chinese)
祁娟. 苜蓿种子内生根瘤菌筛选及其促生能力研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学博士学位论文, 2006
- [11] Li JF, Zhang SQ, Shi SL, et al. Position and quantity of endogenous rhizobia in alfalfa plant[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2009, 17(6): 1200-1205 (in Chinese)
李剑峰, 张淑卿, 师尚礼, 等. 苜蓿内生根瘤菌分布部位与数量变化动态[J]. 中国生态农业学报, 2009, 17(6): 1200-1205
- [12] Zhang SQ. Migration of rhizobia inside alfalfa plants and influencing factors[D]. Lanzhou: Doctoral Dissertation of Gansu Agricultural University, 2012 (in Chinese)
张淑卿. 根瘤菌在苜蓿植株体内的运移及影响因素[D]. 兰州: 甘肃农业大学博士学位论文, 2012
- [13] Miao YY, Shi SL, Zhang JG, et al. Migration, colonization and seedling growth of rhizobia with matrine treatment in alfalfa (*Medicago sativa* L.)[J]. Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Soil & Plant Science, 2018, 68(1): 26-38
- [14] Muresu R, Polone E, Sulas L, et al. Coexistence of predominantly nonculturable rhizobia with diverse, endophytic bacterial taxa within nodules of wild legumes[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2008, 63: 383-400
- [15] Deng ZS, Zhao LF, Kong ZY, et al. Diversity of endophytic bacteria within nodules of the *Sphaerophysa salsula* in different regions of Loess plateau in China[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2011, 76(3): 463-475
- [16] Aserse AA, Räsänen LA, Aseffa F, et al. Phylogenetically diverse groups of *Bradyrhizobium* isolated from nodules of *Crotalaria* spp., *Indigofera* spp., *Erythrina brucei* and *Glycine max* growing in Ethiopia[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2012, 65(2): 595-609
- [17] Xu L, Zhang Y, Wang L, et al. Diversity of endophytic bacteria associated with nodules of two indigenous legumes at different altitudes of the Qilian mountains in China[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2014, 37(6): 457-465
- [18] Qi CM. The study on biodiversity and phylogenesis of rhizobia isolated from *Trifolium* and *Medicago*[D]. Chengdu: Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2004 (in Chinese)
齐春梅. 苜蓿、三叶草根瘤菌生物多样性和系统发育地位的研究[D]. 成都: 四川农业大学硕士学位论文, 2004
- [19] Aserse AA, Räsänen LA, Aseffa F, et al. Diversity of sporadic symbionts and nonsymbiotic endophytic bacteria isolated from nodules of woody, shrub, and food legumes in Ethiopia[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(23): 10117-10134

- [20] Cooper JE. Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 103(5): 1355-1365
- [21] Silva C, Kan FL, Martínez-Romero E. Population genetic structure of *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* isolated from nodules of *Medicago* spp. in Mexico[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 60(3): 477-489
- [22] Torres TG, Rogel MA, Ormeño-Orrillo E, et al. *Rhizobium favelukesii* sp. nov. isolated from the root nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.)[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2016, 66(11): 4451-4457
- [23] Huo PH. Antimicrobial-resistant rhizobia screening and effect verification of undesired microbe control in the prepared rhizobia inoculant[D]. Lanzhou: Doctoral Dissertation of Gansu Agricultural University, 2014 (in Chinese)
霍平慧. 耐抑菌剂根瘤菌筛选及耐药菌株制备菌剂抑杂菌效果研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学博士学位论文, 2014
- [24] Qi J, Shi SL. Preliminary Study on the ability of phosphorus-solubilizing and IAA-secreting of endogenous rhizobia in seeds of different alfalfa varieties[J]. *Grassland and Turf*, 2006(5): 18-20,25 (in Chinese)
祁娟, 师尚礼. 不同品种紫花苜蓿种子内生根瘤菌溶磷和分泌生长素能力[J]. *草原与草坪*, 2006(5): 18-20,25
- [25] Huo PH, Li JF, Shi SL, et al. Effect of seed ultra-drying storage on growth and resistance of the *Medicago sativa* seedlings affected by alkaline salt stress[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2014, 47(13): 2643-2651 (in Chinese)
霍平慧, 李剑峰, 师尚礼, 等. 碱性盐胁迫对超干贮藏苜蓿种子幼苗生长及抗性的影响[J]. *中国农业科学*, 2014, 47(13): 2643-2651
- [26] Zhang XF, Shi SL, Nan LL, et al. Phenotype diversities of alfalfa rhizobium strains collected in different ecological regions in Gansu Province[J]. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2009, 44(3): 106-111 (in Chinese)
张小甫, 师尚礼, 南丽丽, 等. 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, 44(3): 106-111
- [27] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(2): 697-703
- [28] Vinuesa P, Silva C, Lorite MJ, et al. Molecular systematics of rhizobia based on maximum likelihood and Bayesian phylogenies inferred from *rrs*, *atpD*, *recA* and *nifH* sequences, and their use in the classification of *Sesbania* microsymbionts from Venezuelan wetlands[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2005, 28(8): 702-716
- [29] Sarita S, Sharma PK, Priefer UB, et al. Direct amplification of rhizobial *nodC* sequences from soil total DNA and comparison to *nodC* diversity of root nodule isolates[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2005, 54(1): 1-11
- [30] Laguerre G, Nour SM, Macheret V, et al. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts[J]. *Microbiology*, 2001, 147(4): 981-993
- [31] Wang ET, van Berkum V, Beyene D, et al. *Rhizobium huautlense* sp. nov., a symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1998, 48(3): 687-699
- [32] Yoon SH, Ha SM, Kwon S, et al. Introducing ezbiocloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2017, 67(5): 1613-1617
- [33] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731-2739
- [34] Shetta ND, Alshahrani TS. The symbiotic efficiency of legume tree rhizobia for host range legumes in central Saudi Arabia[J]. *International Journal of Agriculture & Biology*, 2016, 18(4): 851-857
- [35] Zaid KA, Kosba ZA, Nassef MA, et al. Induction of *Rhizobium* inoculants harboring salicylic acid gene[J]. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 2009, 3(2): 1386-1411
- [36] Tang Z, An H, Deng L, et al. Effect of desertification on productivity in a desert steppe[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 27839
- [37] Boukhatem ZF, Domergue O, Bekki A, et al. Symbiotic characterization and diversity of rhizobia associated with native and introduced acacias in arid and semi-arid regions in Algeria[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2012, 80(3): 534-547
- [38] Sachs JL, Kembel SW, Lau AH, et al. In situ phylogenetic structure and diversity of wild *Bradyrhizobium* communities[J]. *Applied Environmental Microbiology*, 2009, 75(14): 4727-4735
- [39] Mengoni A, Pini F, Huang LN, et al. Plant-by-plant variations of bacterial communities associated with leaves of the nickel hyperaccumulator *Alyssum bertolonii* desv[J]. *Microbial Ecology*, 2009, 58(3): 660-667
- [40] Arnold AE. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers[J]. *Fungal Biology Reviews*, 2007, 21(2/3): 51-66
- [41] Nandwani R, Dudeja SS. Molecular diversity of a native Mesorhizobial population of nodulating chickpea (*Cicer arietinum* L.) in Indian soils[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2009, 49(5): 463-470
- [42] Leite J, Fischer D, Rouws LFM, et al. Cowpea nodules harbor non-rhizobial bacterial communities that are shaped by soil type rather than plant genotype[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 7: 2064
- [43] Gnat S, Wójcik M, Wdowiak-Wróbel S, et al. Phenotypic characterization of *Astragalus glycyphyllos* symbionts and their phylogeny based on the 16S rDNA sequences and RFLP of 16S rRNA gene[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2014, 105(6): 1033-1048
- [44] Wielbo J, Marek-Kozaczuk M, Mazur A, et al. Genetic and metabolic divergence within a *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii population recovered from clover nodules[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(14): 4593-4600
- [45] Wielbo J, Marek-Kozaczuk M, Mazur A, et al. The structure and metabolic diversity of population of pea microsymbionts isolated from root nodules[J]. *British Microbiology Research Journal*, 2011, 1(3): 55-69
- [46] Wielbo J. Rhizobial communities in symbiosis with legumes:

- genetic diversity, competition and interactions with host plants[J]. Central European Journal of Biology, 2012, 7(3): 363-372
- [47] Tindall BJ. The genus name *Sinorhizobium* chen *et al.* 1988 is a later synonym of *Ensifer casida* 1982 and is not conserved over the latter genus name, and the species name '*Sinorhizobium adhaerens*' is not validly published. opinion 84[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, 58(Pt 8): 1973
- [48] Wang XL, Cui WJ, Feng XY, et al. Rhizobia inhabiting nodules and rhizosphere soils of alfalfa: a strong selection of facultative microsymbionts[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2018, 116: 340-350
- [49] Amadou C, Pascal G, Mangenot S, et al. Genome sequence of the β -rhizobium *Cupriavidus taiwanensis* and comparative genomics of rhizobia[J]. Genome Research, 2008, 18(9): 1472-1483
- [50] Estrella MJ, Munoz S, Soto MJ, et al. Genetic diversity and host range of rhizobia nodulating *Lotus tenuis* in typical soils of the Salado River Basin (Argentina)[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(4): 1088-1098
- [51] Beijerinck MW, van Delden A. Ueber die Assimilation des freien Stickstoffs durch Bakterien[J]. Zentbl Bakt Parasitenk Infekt, 1902, 2: 3-43
- [52] Tindall BJ. *Agrobacterium radiobacter* (Beijerinck and van Delden 1902) Conn 1942 has priority over *Agrobacterium tumefaciens* (Smith and Townsend 1907) Conn 1942 when the two are treated as members of the same species based on the principle of priority and Rule 23a, Note 1 as applied to the corresponding specific epithets. Opinion 94[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014, 64(Pt 10): 3590-3592
- [53] Conn HJ. Validity of the genus *Alcaligenes*[J]. Journal of Bacteriology, 1942, 44(3): 353-360
- [54] Young JM, Pennycook SR, Watson DRW. Proposal that *Agrobacterium radiobacter* has priority over *Agrobacterium tumefaciens*. Request for an opinion[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2006, 56(2): 491-493
- [55] Kaur J, Verma M, Lal R. *Rhizobium rosettiformans* sp. nov., isolated from a hexachlorocyclohexane dump site, and reclassification of *Blastobacter aggregatus* Hirsch and Muller 1986 as *Rhizobium aggregatum* comb. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2011, 61(Pt 5): 1218-1225
- [56] Burbano CS, Liu Y, Rösner KL, et al. Predominant *nifH* transcript phylotypes related to *Rhizobium rosettiformans* in field-grown sugarcane plants and in Norway spruce[J]. Environmental Microbiology Reports, 2011, 3(3): 383-389
- [57] Fortuna MA, Zaman L, Ofria C, et al. The genotype-phenotype map of an evolving digital organism[J]. PLoS Computational Biology, 2017, 13(2): e1005414
- [58] Salazar-Ciudad I, Marín-Riera M. Adaptive dynamics under development-based genotype-phenotype maps[J]. Nature, 2013, 497(7449): 361-364
- [59] Fridgen JL, Varco JJ. Dependency of cotton leaf nitrogen, chlorophyll, and reflectance on nitrogen and potassium availability[J]. Agronomy Journal, 2004, 96(1): 63-69
- [60] Martínez-Romero E. Coevolution in rhizobium-legume symbiosis?[J]. DNA and Cell Biology, 2009, 28(8): 361-370
- [61] Doyle JJ. Phylogenetic perspectives on the origins of nodulation[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2011, 24(11): 1289-1295