



张杰,陈永旗,施熠涵,等.寒区绿豆根瘤微生物组及优势慢生根瘤菌的分离、结瘤活性[J].黑龙江农业科学,2025(2):7-14.

寒区绿豆根瘤微生物组及优势慢生根瘤菌的分离、结瘤活性

张杰¹,陈永旗¹,施熠涵¹,刘文瑞¹,刘思宇¹,韩毅强¹,高亚梅^{1,2}

(1.黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院,黑龙江大庆163319;2.黑龙江省寒区环境微生物与农业废弃物资源化利用重点实验室,黑龙江大庆163319)

摘要:为探究寒区绿豆根瘤的微生物组并获得绿豆的本地根瘤菌资源,利用高通量测序方法分析了黑龙江省大庆市安达试验田绿豆根瘤的微生物组,并利用平板划线法从绿豆根瘤中分离、鉴定优势根瘤菌,并开展了回接结瘤试验,考察了结瘤植株的生长情况。结果显示,绿豆根瘤中共检测到113个OTU,主要微生物菌群来自变形菌门、蓝藻门、放线菌门和未分类细菌门,优势的慢生根瘤菌属占64.29%,其他为非根瘤菌属。网络分析显示慢生根瘤菌属与6种非根瘤菌存在相关性,并与假单胞菌属存在正相关性。分离获得的优势根瘤菌利用16S rDNA进行分子鉴定结果表明,该根瘤菌与慢生根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*)的相似性为99.93%。回接结瘤后的绿豆植株根长减少5.8%,但其株高以及鲜重增加39.7%和236.1%,地下鲜重提高111.4%。

关键词:绿豆;根瘤;微生物组;慢生根瘤菌;回接结瘤试验

绿豆[*Vigna radiate* (L.) Wilcaek]为豆科(Leguminosae)、蝶形花亚科(Papilionoideae)、豇豆属(*Vigna*)植物,生育期短,耐旱、耐瘠。绿豆在我国有两千多年的栽培历史^[1],其生长适应性极强,能生存在绝大多数的环境中,在我国东北、华北等地广泛种植^[2-3]。绿豆具有非常高的营养价值和医用药用价值^[4],自古便成方入药,据本草纲目记载,绿豆可用于治疗人类皮炎麻疹、痱子丹毒等多种人体湿热症状,以食入药可辅助治疗肾炎类、糖尿病、高血压、心血管等疾病并且可有效缓解视力减退及高血脂等症状^[5]。

我国是世界上主要的绿豆产出国。并且随着全球绿豆需求的不断提高,绿豆种植面积及产量也呈持续增长的趋势。FAO数据显示,2019年全球绿豆种植面积增长1%,绿豆产量增长3%。化学肥料的使用虽然提高了粮食产量,但是也给土壤造成不可逆的损害。土壤板结问题严重,东北黑土地退化,土壤微生物减少,病原微生物抗性增强。随着绿色农业理念的建立以及农业可持续发展战略的实施,生物农药、生物肥料渐渐成为主要研究方向。利用根瘤菌制成的微生物肥料,形成植物-微生物共生系统,提供植物所需的氮元素等必需营养成分,从而提高作物产量^[6]。

根瘤菌(Rhizobia)主要是与豆科植物互利共

生的一类细菌,根瘤菌形态多样,包含短棒状、梨型等,有抗性较强的外生荚膜。可利用鞭毛进行运动。不产生芽孢,通过二分裂进行繁殖,与豆科植物结合后形成类菌体。常见根瘤菌主要分为根瘤菌属和慢生根瘤菌属,两者均可与豆类植物共生。根瘤菌具有纤维素酶以及固氮酶活性,可以通过固氮作用固定空气中游离的氮为植物所用。根瘤菌分布广泛,除了熟知的豆类植物外,花生、苜蓿等植物也具有与根瘤菌共生的能力^[7]。生物固氮能够为作物生产提供一种可持续的、廉价且不破坏生态环境的方法。生物固氮贡献了全球大约60%的固氮量,化学肥料供给占植物总需氮量的25%^[8]。在农业系统中,豆科植物与根瘤菌的共生系统是最重要的氮肥来源。绿豆可以通过与根瘤菌建立共生关系的方式固定37~83 kg·hm⁻²的氮^[9]。根瘤固氮共生体系具有重要的生态价值和经济价值,在生态保护、农业生产和可持续发展中发挥着不可替代的作用^[10]。

豆科根瘤菌的研究在国外已开展了一百多年,基于以培养为基础的研究显示,慢生根瘤菌菌株在绿豆根瘤中占主导地位^[11-12]。我国从1950年开始根瘤菌的研究,以引进国外的根瘤菌剂应用为主。近年来我国生物固氮方面的研究有很大突破,为豆科根瘤菌的研究打下了良好基础,尤其对

收稿日期:2024-10-14

基金项目:2021年黑龙江省大学生创新创业项目(202110223053);黑龙江省面上基金项目(LH2021C065)。

第一作者:张杰(2000-),女,本科生,专业方向为农业微生物。E-mail:1419716457@qq.com。

通信作者:高亚梅(1977-),女,博士,教授,从事微生物资源挖掘与功能研究。E-mail:gaoym800@126.com。

绿豆根瘤菌固氮方向的试验提供了理论指导。根瘤菌的研究一般包括形态研究、结瘤特性、生理生化及分子鉴定等多个方面。多年来,根瘤菌的研究得益于大量先进技术的应用,包括但不限于分子遗传学、基因组学和系统生物学等^[13]。随着研究技术手段的发展人们逐渐清楚地认识和了解根瘤菌,为揭示高效结瘤共生固氮机理、探究进化分类、研究系统发育等奠定了基础。

本研究对取自黑龙江省大庆市安达试验田的绿豆根瘤进行了高通量测序,分析其微生物群落结构,并进行了根瘤菌分离,从分子水平鉴定获得的根瘤菌,随后开展了回接结瘤试验,考察结瘤植株的生长情况,分析根瘤菌回接对绿豆生长的影响,以期丰富黑龙江产区的绿豆根瘤菌资源,进一步为植株高效固氮应用提供菌种资源。

1 材料与方 法

1.1 材 料

2020年9月采集黑龙江省大庆市安达(46°01'N~47°01'N,124°53'E~125°55'E)试验田生长的绿豆根瘤。将采集的样品分装到无菌纸袋中带回实验室,暂存于4℃冰箱,并在48h内进行分离。回接试验所用绿豆品种为小明绿,来自黑龙江八一农垦大学农学院作物种质资源研究室。

1.2 方 法

1.2.1 绿豆根瘤内生微生物群落结构分析 在实验室超净工作台内选取个大而饱满的根瘤,放在清水中浸泡4~5min,洗去杂质,再用75%乙醇浸泡5min后,用浓度为5%的NaClO溶液表面灭菌5min,然后用无菌水冲洗10次。每个植株选择3~5个根瘤加入到30%甘油中,置于-80℃冰箱待用。取不同的3个植株的根瘤共3个重复,编号分别为n1、n2、n3。用FastDNA SPIN Kit For Soil试剂盒提取根瘤基因组DNA,并电泳检测合格,测定浓度。送到百迈客生物科技有限公司(北京)进行高通量测序分析。通过测定16S rDNA基因的v3+v4区域的序列确定微生物分类地位,分析根瘤内生微生物群落结构。PCR扩增并对其产物进行纯化、定量和均一化形成测序文库,建好的文库先进行文库质检,质检合格的文库用Illumina NovaSeq 6000进行测序。下机序列经质量过滤和DADA2去噪得到最终有效数据(Non-chimeric Reads)。按照微生物群落结构分析流程,在不同分类阶元分析各物种的丰度及Alpha多样性,根据各个物种在各个样品中的丰度以及变化情况构建相关性网络。

1.2.2 根瘤菌的分离、纯化与保存 绿豆根部根瘤处理方法同1.2.1。在无菌操作的情况下,将

单个根瘤夹破后在YAM(酵母甘露醇琼脂)培养基上划线,在28℃的温箱中培养3~5d后,挑取单菌落进行划线纯化,反复分离,直到菌落无分离为止^[14]。根瘤菌在刚果红YMA培养基上,28℃培养3~7d菌落不吸色。将所有根瘤菌用甘油管保藏于-80℃冰箱内。

1.2.3 根瘤菌形态观察与分子鉴定 根瘤菌点接在培养基上,观察菌落形状。革兰氏染色并拍照。将单菌落转接到YMA液体培养基中培养3d,离心取沉淀。用天根细菌基因组提取试剂盒提取根瘤菌总DNA,电泳检测合格后稀释到2ng·μL⁻¹作为PCR模板DNA。利用16S rDNA基因引物27F和1492R扩增根瘤菌的16S rDNA全长序列进行分子鉴定。PCR反应体系为50μL体系:2×PCR mix 25.0μL,Forward primer 27F+Reverse primer 1492R 2μL,模板DNA 1.0μL,ddH₂O 22.0μL。混合,瞬时离心。PCR扩增条件为:94℃预变性5min;94℃变性1min;50℃退火1min;再72℃延伸1min30s,共30个反应循环;最后72℃延伸10min,4℃终止反应。PCR扩增产物进行1%的琼脂糖凝胶电泳40min,经EB替代物染色后,在紫外凝胶成像系统观察。将PCR产物送往华大基因科技服务有限公司测序。

测序得到的序列拼接后去掉上下游引物序列后,将获得的序列在EZ BioCloud数据库上进行同源性比对分析。通过MEGA 5.1软件采用相邻法(Neighbor Joining, NJ)构建系统进化树,重复抽样1000次。

1.2.4 根瘤菌回接结瘤试验 回接试验于2021年10月在实验室的恒温植物温室内开展。采用双层蛭石法^[13],蛭石装袋灭菌2次,培养液采用Fahraeus无氮营养液。将分离所得菌株,在YMA液体培养基25~28℃培养2~3d得到根瘤菌菌液。

种子表面灭菌及催芽:选择大小均一饱满、无伤残的绿豆种子在75%酒精中消毒4~6min,然后用无菌水冲洗2~3次至无酒精残留后置于培养皿中,沸水浸种2~3min,再放入冷水中浸种2~3min。种子催芽采用培养皿法,于28℃条件下催芽2d,待绿豆根长到5~6mm时即可。

接种和幼苗的培养条件:将小明绿绿豆种子放入相应根瘤菌菌液浸泡30min,阴性对照处理加等量的无菌水浸泡30min,然后播入灭菌后的蛭石中。每株加菌悬液1mL,对照加等量的无菌水。将钵体放在温室培养,温度25~30℃,空气相对湿度60%,光照强度5000lx,每7d浇无氮

营养液 100 mL, 生长 43 d 后测定每株绿豆的有效根瘤个数, 根长、鲜重及根瘤大小。

2 结果与分析

2.1 绿豆根瘤内生微生物群落结构分析

2.1.1 高通量数据特征 来自绿豆根瘤的 3 个样品, 共获得 239 452 对 Reads, 双端 Reads 质控、拼接后共产生 222 311 条 Clean Reads, 每个样品至少产生 73 881 条 Clean Reads, 平均产生 74 104 条 Clean Reads。由图 1 可知, 3 个样品测序稀释曲线均表现为先急剧上升, 然后随着测序条数的增加曲线趋于平缓, 表示各样品物种并不会随测序数量的增加而显著增多, 说明测序的结果较为合理。以 97% 相似性为标准, 3 个样品分别检测到 64, 31 和 18 个 OTU。

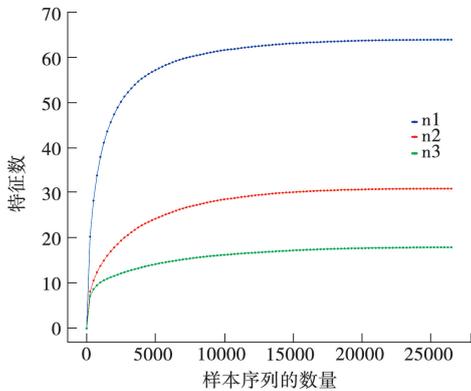


图 1 绿豆根瘤微生物组高通量测序稀释曲线

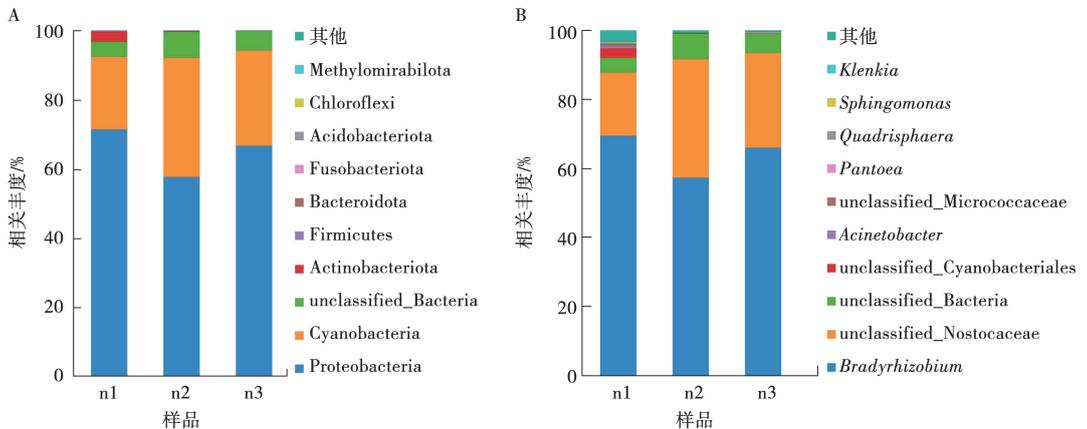


图 2 3 个样品在门水平(A)和属水平(B)的内生细菌群落结构

2.1.3 根瘤微生物菌群相关性分析 为获得物种在环境样本中的共存关系, 开展了斯皮尔曼(Spearman)秩相关分析并筛选相关性大于 0.1 且 P 值小于 0.05 的数据构建相关性网络(图 3)。网络图显示慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*) (节点 38)与假单胞菌属(*Pseudomonas*) (节点 3)、乳

杆菌(*Ligilactobacillus*) (节点 6)正相关关系($P=0$), 与未分类念珠藻科(unclassified_Nostocaceae) (节点 1)、未分类细菌(unclassified_Bacteria) (节点 2)、亚硫酸杆菌(*Sulfitobacter*) (节点 4)、未分类哈里菌科(unclassified_Halieaceae) (节点 5)存在负相关关系($P=0$)。

2.1.2 根瘤群落组成 以 SILVA 为参考数据库使用朴素贝叶斯分类器对特征序列进行分类学注释, 得到各水平(phylum, class, order, family, genus, species)绿豆根瘤内生菌群落组成。门水平: 3 个样品的内生细菌优势群落为变形菌门(Proteobacteria)(71.50%、57.74%和 66.76%), 蓝藻门(Cyanobacteria) (20.95%、34.41%和 27.46%), 未分类细菌(unclassified Bacteria)(4.35%、7.49%和 5.73%), 放线菌门(Actinobacteriota) (2.77%、0.16%和 0)。另外还检测到厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidota)、梭杆菌门(Fusobacteriota)、酸杆菌门(Acidobacteriota)、绿弯菌门(Chloroflexi)和(Methylomirabilota), 占比很少, 有些门仅在一个样品中检测到(图 2A)。

属水平: 3 个样品的主要细菌群落主要分布在慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*) (69.53%、57.30%和 66.04%), 未分类念珠藻科(unclassified Nostocaceae) (18.24%、34.41%和 27.46%), 未分类细菌(unclassified Bacteria) (4.35%、7.49%和 5.73%), 其他菌属占比较少, 包括未分类蓝细菌目(unclassified Cyanobacteriales)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、未分类微球菌科(unclassified Micrococcaceae)、泛菌属(*Pantoea*)、*Quadrisphaera*、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、*Klenkia* 和其他(图 2B), 有些属仅在一个样品中检测到。

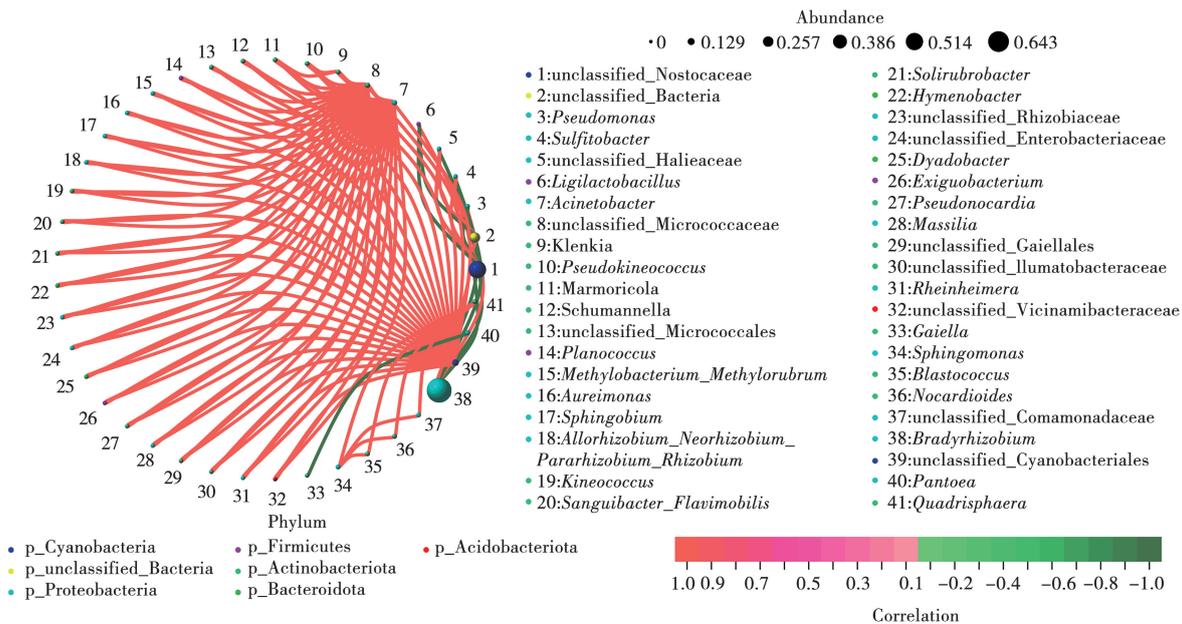


图3 根瘤内生菌的相关性网络图

2.2 根瘤菌的分离纯化

从绿豆根瘤中以选择性培养基利用平板划线法分离纯化根瘤菌。待菌株稳定后进行观察,在YMA培养基上根瘤菌呈半透明乳白色,圆形且边缘整齐、中间略有隆起、边缘光滑,有粘性(图4)。根瘤菌经革兰氏染色后在显微镜下呈现出红色杆状,为革兰氏阴性菌(图5)。



图4 在YMA培养基分离获得的根瘤菌

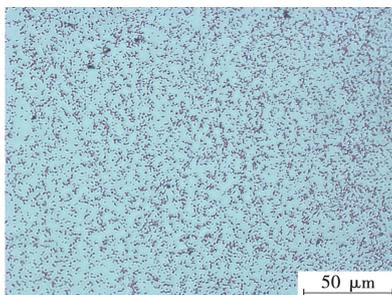


图5 根瘤菌菌株经革兰氏染色后镜检情况

2.3 基于16S rDNA的根瘤菌分子鉴定

利用16S rDNA的扩增引物27F和1492R进行PCR扩增,PCR扩增产物在1%琼脂糖凝胶电泳经EB替代物染色后,在紫外凝胶成像系统观察结果如图6所示。16S rDNA测序得到的序列在EZ BioCloud数据库中进行同源性比对分析,使用MEGA 5.1构建系统发育树(图7)。该系统发育树中1为测序样本,外类群为结核分枝杆菌H37Rv株。由系统发育树及同源性比对分析结果可知该菌株与慢生根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*)具有同源关系且相似性为99.93%。该根瘤菌初步鉴定为慢生根瘤菌。

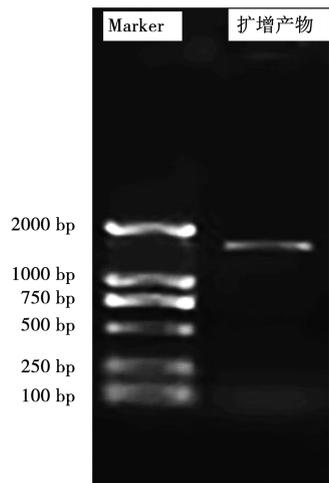


图6 根瘤菌菌株16S rDNA的PCR扩增产物的电泳检测

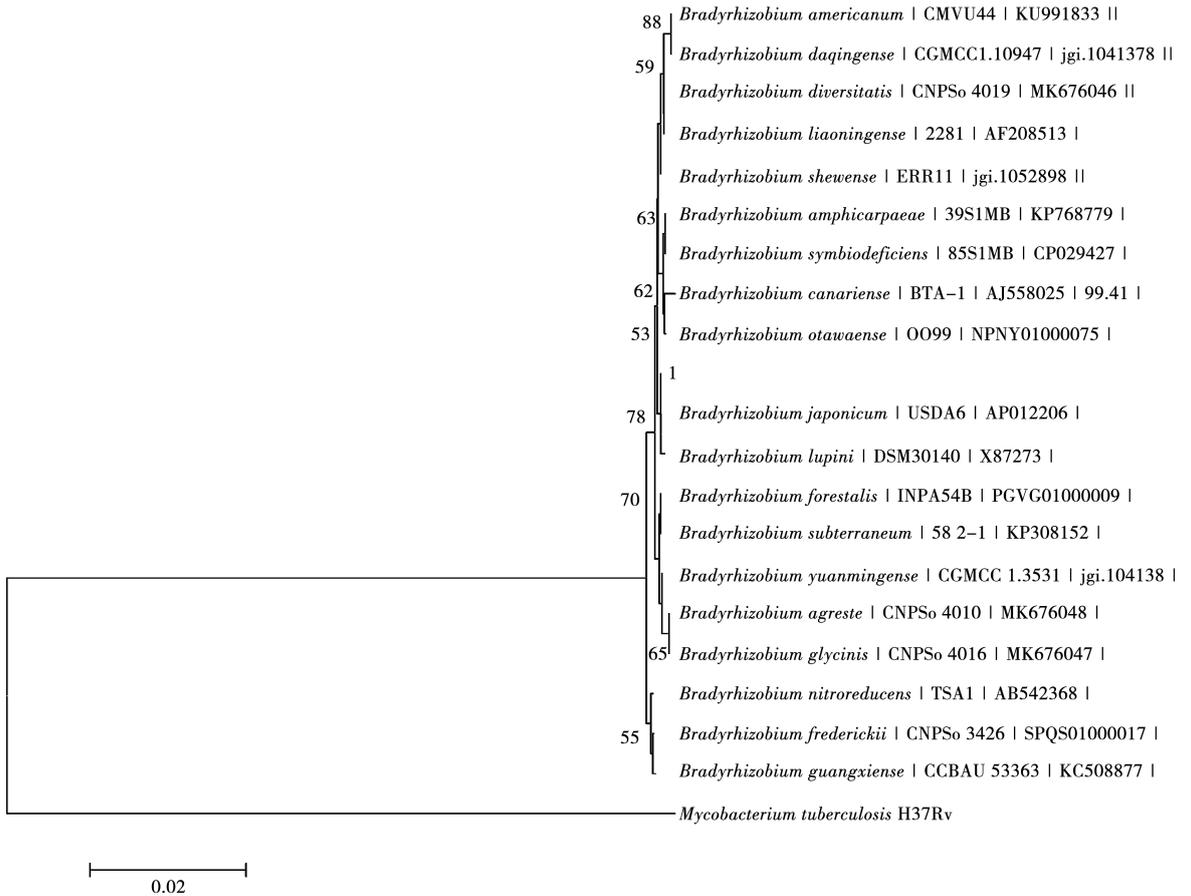


图 7 基于 16S rDNA 的序列构建的 NJ 系统发育树

注: 1 为分离的菌株, 外类群为 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, 标尺表示每个核苷酸位点有 0.02 个替换。

2.4 根瘤菌回接对绿豆生长的影响

将分离纯化出的根瘤菌菌株进行回接结瘤试验, 对生长 43 d 后两组绿豆植株的各项生长情况进行比对, 接种根瘤菌的处理组叶片即使在浇灌无氮营养液的情况下依然保持绿色, 而对照组则叶片发黄, 明显缺氮(图 8)。试验组结瘤效果显

著(图 9)。另外, 处理组的根长减少 5.8%(图 10A), 但是处理组的株高以及鲜重显著增加 39.8%和 236.1%(图 10B、C), 地下部鲜重显著提高 111.4%(图 10D), 以此判断回接对绿豆生长起促进作用。

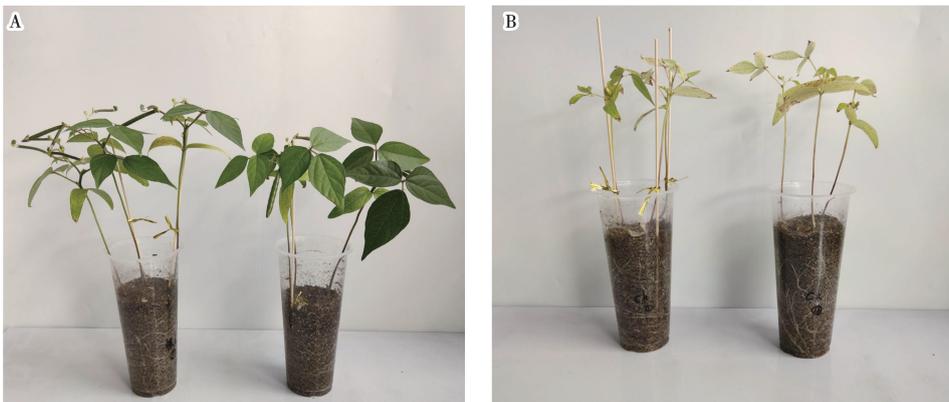


图 8 回接后试验组(A)和对照组(B)部分植株

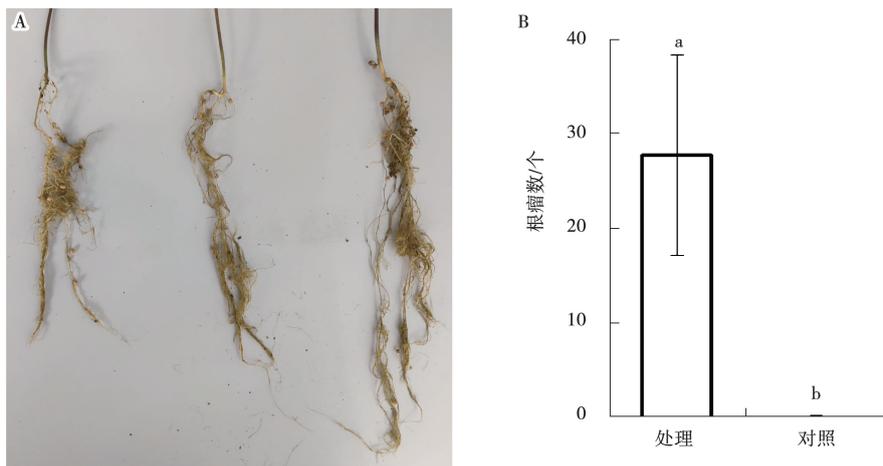


图9 回接试验组植株结瘤情况(A)及根瘤数(B)

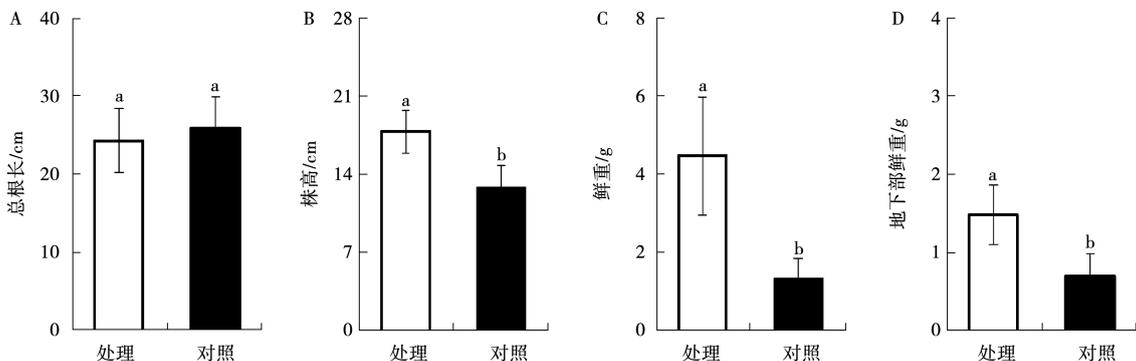


图10 回接后植株的根长(A)、株高(B)、鲜重(C)和地下部鲜重(D)

注: 图上不同小写字母表示处理间在 $P < 0.05$ 水平差异显著。下同。

3 讨论

生物固氮对豆科植物的生产发挥着重要作用,根瘤菌为世界农业的可持续发展贡献了重要作用。但是相比于其他豆科植物(大豆、花生等),关于绿豆根瘤及根瘤菌的研究却仍然不多。本研究利用高通量测序首先解析了黑龙江省大庆市安达试验田中绿豆根瘤的内生细菌群落结构,并通过平板划线法从绿豆根瘤中分离根瘤菌,基于16S rDNA的序列进行分子鉴定,该菌株与慢生根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*)具有同源关系且相似性为99.93%,初步鉴定获得的菌株为慢生根瘤菌。该根瘤菌回接试验也证明了其显著促进绿豆结瘤和生长。

根瘤是根瘤菌与豆科植物共生固氮的场所,很多研究发现豆科植物根瘤内除根瘤菌外,还存在着非根瘤内生细菌^[15]。Hakim等^[13]利用16S rRNA标签高通量测序研究了Pakistan不同地区的绿豆根瘤的微生物组,发现3个地点82%~

94%的菌为慢生根瘤菌,有4个地点99.9%是*Ensifer* (*Sinorhizobium*)。非根瘤菌属包括不动杆菌属(*Acinetobacter*),还分离到*Microbacterium*和*Pseudomonas*。Favero等^[16]利用高通量测序研究了10种植于巴西热带土壤中的2个绿豆基因型的根瘤的微生物组,发现除了有机农业生态系统的土壤中包含*B. japonicum*,其他土壤中与*Bradyrhizobium elkanii*相近的OTUs是优势根瘤菌,另外还发现了假单胞菌属(*Pseudomonas*)。同样利用高通量测序方法解析了寒区绿豆根瘤的微生物组,发现*B. japonicum*是该地区绿豆根瘤的主要根瘤菌类群,内生细菌还包括占比较多的未分类念珠藻科 unclassified Nostocaceae和未分类细菌 unclassified Bacteria,也检测到比例较低的假单胞菌属。绿豆根瘤的形状、大小呈现多样性,因此重复之间也表现出非根瘤菌的内生细菌群落结构组成的多样性。经网络相关性分析发现,根瘤菌属和假单胞菌属存在正相关关系。Dhole等^[17]将根瘤菌和假单胞菌共接种证明可促

进结瘤,对绿豆生长和产量具有积极作用。根瘤菌菌群的分析为进一步研究根瘤菌和非根瘤菌的相互作用和组装机制提供了基础。以根瘤菌杀菌剂为代表的微生物制剂在提高土壤肥力、节约成本、提高肥料利用率、提高作物品质、减少作物病害等方面具有独特的作用,已成为发展绿色生态农业不可替代的投入^[18]。

根瘤菌在豆科植物根瘤中占优势,我国的绿豆根瘤菌由于地理位置和品种差异导致具有多样性。在我国主要生态区与绿豆共生的根瘤菌以慢生根瘤菌(*Bradyrhizobium*)为主^[19]。除了优势的慢生根瘤菌,也包含了部分快生根瘤菌(*Rhizobium*)和中华根瘤菌(*Sinorhizobium*)^[20-21]。分离的绿豆根瘤菌也属于 *Bradyrhizobium japonicum*,与其他地区发现大部分绿豆根瘤菌类型相同。检测到的其他内生菌的分离将成为今后菌种资源挖掘的工作之一。

绿豆与根瘤菌互利共生形成根瘤^[22],根瘤菌与豆科植物共生体系的固氮能力最强^[23-24],虽然目前分离了一些根瘤菌,但是仍缺乏对菌种耐受性、活性、持久性等方面的了解^[25]。研发适合当地的绿豆的根瘤菌接种剂对于有效减少化肥的使用与污染,改善土壤结构和生态环境质量,提高农业作物的产量和品质,对我国可持续农业的发展将发挥重要的作用。

本研究对于优势的根瘤菌进行了分离、鉴定,并开展了该根瘤菌的回接试验,所得的慢生根瘤菌表现出了明显的促生和促结瘤效果,但是对于筛选出适宜黑龙江省土壤条件的高效固氮的根瘤菌并开发本地适用的根瘤菌剂仍需要开展更多的工作,包括研究该根瘤菌在田间对绿豆结瘤和产量提升影响的大面积试验。另外,绿豆根瘤微生物组中发现的其他微生物与根瘤菌相互关系的研究也是今后重要的研究方向。

4 结论

本研究揭示了寒区绿豆根瘤微生物组的群落结构,主要包括变形菌门、蓝藻门、放线菌门和未分类细菌门,慢生根瘤菌是主要的优势共生固氮菌。由绿豆根瘤内分离、鉴定的慢生根瘤菌具有明显促生和促结瘤能力。

参考文献:

[1] 周素梅,李若凝,唐健,等. 绿豆营养功能特性及其在植物基食品开发中的应用[J]. 粮油食品科技, 2022, 30(2): 16-23, 12.

[2] 刘峰. 黑龙江省绿豆产业现状及技术对策[J]. 杂粮作物, 2010(2): 151-153.

[3] 王上,李康利,聂江文,等. 华北平原春绿豆-夏玉米种植模式经济效益和碳足迹评价[J]. 中国生态农业学报(中英文), 2020, 28(6): 910-919.

[4] 张海均,贾冬英,姚开. 绿豆的营养与保健功能研究进展[J]. 食品与发酵科技, 2012, 48(1): 7-10.

[5] 王明海,徐宁,包淑英,等. 绿豆的营养成分及药用价值[J]. 现代农业科技, 2012(6): 341-342.

[6] LUGTENBERG B. Principles of plant-microbe interactions [M]. Cham: Springer Cham, 2014.

[7] ROY S, LIU W, NANDETY R S, et al. Celebrating 20 years of genetic discoveries in legume nodulation and symbiotic nitrogen fixation[J]. The Plant Cell, 2020, 32(1): 15-41.

[8] OHYAMA T. Advances in biology and ecology of nitrogen fixation [M]. London: Intech Open, 2014.

[9] MOHAMMAD W, SHEHZADI S, SHAH S M, et al. Effect of tillage and crop residues management on mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) crop yield, nitrogen fixation and water use efficiency in rainfed areas [J]. Pakistan Journal of Botany, 2010, 42(3): 1781-1789.

[10] 陈文新,汪恩涛,陈文峰. 根瘤菌-豆科植物共生多样性与地理环境的关系[J]. 中国农业科学, 2004, 37(1): 81-86.

[11] 林德球,黄文芳. 旋扭山绿豆根瘤菌的分离与回接[J]. 华南师范大学学报(自然科学版), 1985, 17(1): 102-106.

[12] 赵龙飞,徐亚军,徐珂,等. 我国绿豆根瘤菌多样性的研究进展[J]. 广东农业科学, 2012, 39(8): 31-34.

[13] HAKIM S, MIRZA B S, IMRAN A, et al. Illumina sequencing of 16S rRNA tag shows disparity in rhizobial and non-rhizobial diversity associated with root nodules of mung bean (*Vigna radiata* L.) growing in different habitats in Pakistan[J]. Microbiological Research, 2020, 231: 126356.

[14] 高亚梅,韩毅强,王景伟,等. 大豆根瘤菌的分离与分子鉴定[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2007, 19(5): 16-19.

[15] 艾加敏. 白刺花根瘤中非根瘤菌与根瘤菌组装、演替及其互作关系研究[D]. 延安: 延安大学, 2023.

[16] FAVERO V O, CARVALHO R H, MOTTA V M, et al. *Bradyrhizobium* as the only rhizobial inhabitant of mung bean (*Vigna radiata*) nodules in tropical soils: a strategy based on microbiome for improving biological nitrogen fixation using bio-products[J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 11: 602645.

[17] DHOLE A M, SHELAT H N, PATEL H K, et al. Evaluation of the co-inoculation effect of *Rhizobium* and plant growth promoting non-rhizobial endophytes on *Vigna radiata*[J]. Current Microbiology, 2023, 80(5): 167.

[18] 刘丽,马鸣超,姜昕,等. 根瘤菌与促生菌双接种对大豆生长和土壤酶活的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2015, 21(3): 644-654.

[19] 袁天英,杨江科,张伟涛,等. 我国主要生态区域绿豆慢生根瘤菌的遗传多样性和系统发育研究[J]. 微生物学报, 2006, 46(6): 869-874.

- [20] 张勇法,王风芹,陈文新.我国豇豆和绿豆根瘤菌的数值分类及16SrDNA-PCR-RFLP研究[J].微生物学报,2006,46(6):861-868.
- [21] ZHANG Y F, WANG E T, TIAN C F, et al. *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium yuanmingense* and *Bradyrhizobium japonicum* are the main rhizobia associated with *Vigna unguiculata* and *Vigna radiata* in the subtropical region of China[J]. FEMS Microbiology Letters, 2008, 285(2): 146-154.
- [22] 周雨佳.豆科绿肥接种根瘤菌在与茶树间作、草莓轮作中对作物生长及田间减肥减药效果的研究[D].南京:南京农业大学,2020.
- [23] 陈文新,李阜棣,闫章才.我国土壤微生物学和生物固氮研究的回顾与展望[J].世界科技研究与发展,2002,24(4):6-12.
- [24] XU L M, GE C, CUI Z, et al. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1995, 45(4): 706-711.
- [25] 王晶,许修宏.根瘤菌与大豆在不同类型土壤中的生态适应性研究[J].中国土壤与肥料,2009(5): 72-76.

Nodules Microbiome of Mung Bean in Cold Regions and Isolation, Re-Inoculate Activity of Dominant *Bradyrhizobium japonicum* from Mung Bean Nodules

ZHANG Jie¹, CHEN Yongqi¹, SHI Yihan¹, LIU Wenrui¹, LIU Siyu¹, HAN Yiqiang¹, GAO Yamei^{1,2}

(1. College of Life Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China; 2. Key Laboratory of Environmental Microbiology and Agricultural Waste Resource Utilization in Cold Regions of Heilongjiang Province, Daqing 163319, China)

Abstract: In order to investigate the nodules microbial community of mung bean in cold regions and obtain local rhizobium resources for mung beans, nodules microbiome of mung bean was analyzed using high-throughput sequencing methods, and a rhizobia was isolated and identified from nodules of mung bean in Anda experimental field, Daqing City, Heilongjiang Province by the plate streaking method. Moreover, we conducted a reinoculate test to investigate the growth of plants. The results showed that 113 OTUs were detected in the nodules of mung bean and the dominant phyla included Proteobacteria, Cyanobacteria, Actinobacteria, and Unclassified Bacteria; The dominant *Bradyrhizobium* genus accounted for 64.29%, while the others are non-rhizobia genera. The network analysis showed a correlation between *Bradyrhizobium* and six non-rhizobia, and a positive correlation between *Bradyrhizobium* and *Pseudomonas*. The molecular identification based on 16S rDNA showed the rhizobia had a 99.93% similarity with *Bradyrhizobium japonicum*. After nodulation, the root length of mung bean decreased by 5.8%, but the plant height and fresh weight increased by 39.7% and 236.1%, respectively. The underground fresh weight increased by 111.4%. This study analyzed the endophytic community structure of mung bean nodules and obtained a dominant *Bradyrhizobium japonicum* with growth promoting ability from the nodules.

Keywords: mung bean; nodule; Microbiome; *Bradyrhizobium japonicum*; reinoculate test

欢迎关注本刊微信公众号

