

商洛多花胡枝子根瘤菌生理生化特性和数值分类研究

冀玉良^{1,2}, 詹俊鹏², 韦革宏²

(1. 商洛学院生物医药工程系, 陕西 商洛 726000;

2. 西北农林科技大学生命科学院, 陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 选用分离自陕西商洛多花胡枝子的59株根瘤菌和15株参比菌,进行了125项表型性状测定和聚类分析。结果表明:未知菌能够利用的碳氮源比较广泛,生长的温度和pH范围较宽,对抗菌素、染料和重金属分别具有抗性的菌株以及产氧化酶菌株的数量比例较高,部分菌株具有耐高浓度盐或碱的性能,其中大约67%的菌株能耐受3.0%的NaCl,25%的菌株可在初始pH12的YMA培养基上生长。从数值分类树状图谱发现,在80.5%的相似性水平上,除CCNWSX0922外,供试菌株聚成8个表现群,群I包含6株未知菌和3株已知中慢生根瘤菌属参比菌,群II包含19株未知菌和6株中华根瘤菌属参比菌,群III包含1株未知菌和3株根瘤菌属参比菌,群IV和群V皆含根瘤菌属参比菌株。群VI、群VII和群VIII三个类群未能与参比菌株聚在一起,为新类群,其分类地位需进一步研究确定。

关键词: 多花胡枝子;根瘤菌;表型多样性

中图分类号: S144.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7601(2010)05-0097-07

多花胡枝子(*Lespedeza floribunda*)系豆科胡枝子属灌木植物^[1]。其根系发达,具有顽强的适应性和抗逆性,尤其能够在干旱、贫瘠的山地上生长,不仅可以用作绿肥和饲料以及药用,而且是水土保持和土壤改良的先锋树种^[2,3]。多花胡枝子这些优良特性和共生根瘤菌密切相关,可是目前关于其根瘤菌的研究甚少,关于商洛境内广泛分布的多花胡枝子的根瘤菌更无研究报道。本研究选用了分离自商洛地区的多花胡枝子根瘤菌59株,连同已知的根瘤菌一起进行了125项生理生化性状测定和数值聚类分析,旨在揭示多花胡枝子根瘤菌的表型多样性和分类地位,为筛选具有优良性能的菌株,为根瘤菌资源开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

选择商洛境内5个点采回新鲜的多花胡枝子根瘤,将根瘤经无菌水洗涤后,依次用95%酒精浸泡30 s,1 g/L升汞消毒5 min,无菌水冲洗6次,最后用镊子压瘤、在YMA培养基上按“之”字形划线涂平板,28℃培养后挑取单菌落划线分离、纯化,革兰氏染色镜检,得到斜面菌株并于4℃下保藏备用,采用

水培法回接,具体方法参见文献[4]。本试验共选用74株供试根瘤菌,其中59株为分离的未知根瘤菌,另外15株已知参比菌株分别属于 *Rhizobium*、*Sinorhizobium*、*Mesorhizobium* 和 *Agrobacterium*。未知菌株地理来源、海拔和生境见表1。

1.2 性状测定

测定前,先将供试菌株在YMA斜面上活化,接入YMB(即不加琼脂的YMA)液体培养基28℃摇床培养3 d。然后8 000 rpm离心5 min收集菌体,所收菌体以0.8%生理盐水离心洗涤后稀释成菌悬液,用多点接种器将菌悬液接种到已制好的各类培养基平板上,28℃培养,3 d后观察并记录结果的阴阳性。本研究测定了125项生理生化性状,每个性状设3次重复,各性状测定的培养基配制、对照设计、观察和试验方法见文献[5]。

1.3 聚类方法

将测定的性状结果转换成计算机可以识别的数值,阳性结果计为“1”,阴性结果计为“0”,采用平均连锁法(UPGMA),使用中国科学院微生物研究所的MINTS软件包进行聚类分析,聚类结果以树状图谱的方式表示^[6]。

收稿日期:2010-01-10

基金项目:陕西省教育厅科学技术研究项目(08JK280)

作者简介:冀玉良(1965—),男,陕西洛南人,副教授、硕士研究生,主要从事微生物生理生化和分子生物学方面的研究。E-mail: jyl65@126.com。

通讯作者:韦革宏,博士,教授,博导,主要从事微生物多样性研究。E-mail: weigehong@yahoo.com.cn。

表 1 未知供试菌株一览表
Table 1 List of tested unknown strains

采样地点 Location of sampling	海拔(m) Elevation	生境 Environment of growth	菌株 Strain			
商州杨斜 Yangxie, Shangzhou	997	河岸土质山坡 (Riparian soil slopes)	CCNWSX0878	CCNWSX0879	CCNWSX0884	CCNWSX0887
			CCNWSX0880	CCNWSX0888	CCNWSX0893	CCNWSX0871
			CCNWSX0873	CCNWSX0874	CCNWSX0870	CCNWSX0886
			CCNWSX0872	CCNWSX0876	CCNWSX0882	CCNWSX0885
			CCNWSX0890	CCNWSX0889	CCNWSX0883	CCNWSX0891
商州板桥 Banqiao, Shangzhou	851	林木灌丛山坡 (Hill with forest and shrub)	CCNWSX0909	CCNWSX0905	CCNWSX0908	CCNWSX0914
			CCNWSX0919	CCNWSX0906	CCNWSX0903	CCNWSX0922
			CCNWSX0913	CCNWSX0915	CCNWSX0911	CCNWSX0910
			CCNWSX0916	CCNWSX0912	CCNWSX0920	CCNWSX0933
商州牧护关 Muhuguan, Shangzhou	1218	石质山坡 (Stony hill)	CCNWSX0925	CCNWSX0931	CCNWSX0928	CCNWSX0929
			CCNWSX0926	CCNWSX0924	CCNWSX0927	CCNWSX0944
			CCNWSX0935	CCNWSX0937	CCNWSX0948	CCNWSX0930
			CCNWSX0941			
商州黑山 Heishang, Shangzhou	1166	沙质山坡 (Sandy hill)	CCNWSX0948	CCNWSX0939	CCNWSX0945	CCNWSX0956
			CCNWSX0958	CCNWSX0946	CCNWSX0953	CCNWSX0960
商州二龙山 Erlongshan, Shangzhou	1069	石质山坡 (Stony hill)	CCNWSX0898	CCNWSX0899		

2 结果与分析

2.1 生理生化测定结果与分析

2.1.1 唯一碳源利用 共测定了 20 种碳源的利用情况,以 D-甘露糖,L-阿拉伯糖,肌醇,D(+)-半乳糖,棉子糖,D-果糖,麦芽糖,L-山梨糖,乳糖作为唯一碳源时,所有供试菌株都能生长;D(+)-木糖作为唯一碳源时,除来源于黑山的 0945(编号全称为 CCNWSX0945,略去代号前的 CCNWSX,下同)和 0960 及来源牧护关的 0935 和 0937 不能生长外,其余均可生长;以 D-核糖作为唯一碳源时仅来源于杨斜的 0879 和 0884,来源黑山的 0948 和 0946 不能生长;以(+)-蜜二糖作为唯一碳源时仅来源牧护关的 0939,0924,来源于杨斜的 0891 不能生长;在鼠李糖作为唯一碳源的培养基中仅 0924(来源牧护关),0953(来源于黑山)不能生长;在丙酮酸钠作为唯一碳源的培养基中仅来源牧护关的 0935,0937,来源于黑山的 0960 不能生长;在 D-山梨醇作为唯一碳源的培养基中仅来源于杨斜的 0878,0879,板桥的 0905,0908,牧护关的 0925,黑山的 0948 不能生长;在葡萄糖作为唯一碳源的培养基中仅 0935(来源牧护关),0960(来源黑山)不能生长。以上测试结果中大多数根瘤菌能利用全部碳源(占 73%),仅个别菌不能利用部分碳源,大多数菌分解利用碳源的范围比较宽,说明其生存能力比较强,这可能与该地

区土地十分贫瘠有关,长期共生选择的结果,根瘤菌只有具备较为宽泛的碳源利用能力才能生存下来。

2.1.2 唯一氮源利用 氮源利用测定了 17 种,所有供试菌株都能在以 L-胱氨酸,L-甲硫氨酸,L-丙氨酸,次黄嘌呤,L-酪氨酸,L-天冬氨酸,天冬酰胺,L-谷氨酸,L-天门冬酰胺,L-苏氨酸,L-白氨酸,L-苯丙氨酸为唯一氮源的培养基中生长;在 L-半胱氨酸为唯一氮源的培养基中,不能生长的菌株有来源于黑山的 0948,牧护关的 0930 和 0941;在以 L-色氨酸为唯一氮源的培养基中,不能生长的菌株有来源于牧护关的 0935,0937 和黑山的 0960;在以 DL-组氨酸为唯一氮源的培养基中,不能生长的菌株有来源于杨斜的 00879,0884,板桥的 0914,0903,0910,牧护关的 0937 和黑山的 0960;在腺嘌呤为唯一氮源的培养基中,不能生长的菌株有来源于牧护关的 0931,杨斜的 0910;L-精氨酸为唯一氮源的培养基中,仅来源于杨斜的 0871 不能生长。以上结果表明 17 种氮源中有 12 种所有未知菌都能利用(占 71%),说明根瘤菌对氮源的利用能力也比较强,比较宽泛,这可能也是该地区土地贫瘠特别是与氮素营养缺乏有关,长期共生选择的结果,根瘤菌只有具备较为宽泛的氮源利用能力才能存活下来,在某个氮源缺乏的情况下它就可以以另一种作为替代。

2.1.3 耐盐性试验 共设计了 5 个盐浓度梯度,测

定表明培养基 NaCl 浓度为 1%、2%、3%、4% 时,能够生长的菌株大约分别为 98%、80%、67% 和 25%,在 5% NaCl 浓度的培养基中,来自板桥的根瘤菌 0906 可以生长。可见测试菌中耐盐菌比例较高,0906 是一株比较耐高盐浓度的菌株。根据 Mchammad 等人的研究,根瘤菌的耐盐性与抗旱能力呈正相关^[7]。由耐盐可以初步推出,未知供试菌株普遍比较耐旱。未知菌这些特性与寄主生长于干旱的山坡相一致,根瘤菌寄生于这样的植物体内,长期选择进化也具有了较强的抗旱耐盐能力。

2.1.4 抗生素试验 测定抗生素 5 种,每种设 4 个浓度,共 20 个处理。培养基中磷霉素钠浓度为 4 $\mu\text{g/mL}$ 、40 $\mu\text{g/mL}$ 、80 $\mu\text{g/mL}$ 、240 $\mu\text{g/mL}$ 时,所有供试菌株都能够生长;其它抗生素随着在培养基中浓度的提高,能够生长的菌株越来越少。含青霉素钠为 4 $\mu\text{g/mL}$ 、40 $\mu\text{g/mL}$ 、80 $\mu\text{g/mL}$ 、240 $\mu\text{g/mL}$ 时,分别有 93%、87%、70%、40% 的供试菌株可以耐受;含链霉素为 4 $\mu\text{g/mL}$ 、40 $\mu\text{g/mL}$ 、80 $\mu\text{g/mL}$ 的培养基中,分别有 67%、33%、17% 的菌株能耐受,链霉素浓度为 240 $\mu\text{g/mL}$ 时只有来源于黑山的 0960 可以耐受。氨卞西林钠浓度为 4 $\mu\text{g/mL}$ 、40 $\mu\text{g/mL}$ 、80 $\mu\text{g/mL}$ 和 240 $\mu\text{g/mL}$ 时,分别有 98%、75%、55% 和 13% 的供试菌株可以耐受;红霉素浓度分别为 2 $\mu\text{g/mL}$ 、20 $\mu\text{g/mL}$ 和 40 $\mu\text{g/mL}$ 时,分别有 81%、50% 和 17% 的供试菌株可以耐受;红霉素浓度为 120 $\mu\text{g/mL}$ 时,来源于牧护关的菌株 0929 和黑山的菌株 0948 可以耐受,这是两株对抗生素有较强抗性的根瘤菌。由上述结果初步得出结论,未知供试菌株对抗菌素有较强的抗性,从中可以筛选出抗菌能力强的菌株。

2.1.5 重金属的耐受性测试 测定了 5 种重金属,每个设了 2 个浓度。所有供试菌株对 5 种重金属的耐受极限 (mmol/L) 为: Zn 1.6, Hg 0.10, Cu 0.4, Cd 0.2 及 Pb 3.0, 大于该值,供试菌均不生长。在含 Pb 分别为 1.0 mmol/L 、1.5 mmol/L 、2.0 mmol/L 的培养基中,所有供试菌株均能生长;在含 Zn 分别为 0.4 mmol/L 和 0.8 mmol/L 的培养基中,分别有 50%、61% 的供试菌株生长,在含 Zn 浓度为 1.2 mmol/L 时,CCNWSX0887 还能生长,这是一株耐 Zn 菌。分析发现在达到耐受极限前,耐 Pb 和 Zn 菌株数量比例高于耐其它重金属比例,测试根瘤菌对 Zn 和 Pb 的抗性较强,这可能是由于山区境内铅锌矿藏较多,根瘤菌长期进化适应环境的结果。

2.1.6 染料和化学药物的抗性测定 测定了 10 种染料每种设了 2 种浓度,全部菌株均能耐受 0.1% 的曙红 Y, 苯酚红和溴百里香酚兰;均能耐受 0.2%

的溴甲酚紫,番红花 T, 石蕊,甲基橙和苏丹黑 B;对 0.1% 的结晶紫,0.2% 的孔雀石绿,全部菌株都不能耐受;对 0.2% 的曙红 Y, 苯酚红,溴百里香酚兰和 0.1% 的孔雀石绿,分别有 95%、97%、98% 和 25% 的菌株能够耐受。在化学药物耐受性试验中,供试菌对 0.2% 的去氧胆酸钠和 NaNO_2 均具抗性。可见这一地区多花胡枝子根瘤菌对染料普遍具有较强的抗性,在清除环境污染物方面有巨大的应用潜力。

2.1.7 其它测定 初始 pH 生长范围测试表明,供试菌株在初始 pH 为 5 时都能生长,在初始 pH 为 9、10、11、12 时分别有 50%、42%、40%、25% 的供试菌株生长良好。说明该地区的根瘤菌适应 pH 范围比较宽,普遍较能耐酸,而且耐碱菌数量比例较高。

在生长温度范围测定试验中,经 10℃ 和 40℃ 下处理 10 min 后置于 28℃ 下培养,供试菌株全部都能生长,4℃ 和 60℃ 下的处理,分别有 37% 和 15% 的供试菌株能够生长。说明这一地区的根瘤菌适应温度的范围也比较宽,尤其是有耐高温的菌株。

另外,有 20% 的菌株在 BTB 试验中产酸产碱;有 75% 的菌株能够利用肉汁蛋白胨进行生长;苯丙氨酸脱氢酶测定试验显示有 12% 的菌株能分解苯丙氨酸;有 60% 的菌株能产生氧化酶;65% 的菌株能产生过氧化氢酶。这些结果说明多花胡枝子根瘤菌的呼吸代谢类型多样,生物氧化能力强。

2.2 聚类结果与分析

除去 125 项生理生化指标中 68 项全同性状,对其余 57 个相异性状采用平均连锁法进行聚类分析,获得供试菌株的数值分类树状图(见图 1)。一般认为,数值分类中 80% 左右的相似性水平为种的区分水平^[8],在数值分类图中,全部供试菌株在 62% 的相似水平上聚在一起。在大约 80.5% 的相似水平上,除来自板桥的 0922 未能与其它菌相聚成群外,其余供试菌株聚成 8 个表观群,图中参比菌可以按照种的不同彼此很好地分开,证明本实验在生理生化性状和数值分类方面的测定结果可靠。

在聚类图中群 I 由 3 株参比菌和 6 株未知菌株组成,参比菌株为 *M. septentrionale* SDW014, *M. amorphae* ACC19665 和 *M. chaoconense* LMG19008,未知菌有来自杨斜的 0878、0879、0884,来自板桥的 0905,来自牧护关的 0925,来自黑山的 0948。

群 II 共包括 25 株菌,6 株参比菌株分别是 *S. morelense* LC04, *S. medica* USDA1037, *S. meliloti* USDA1002, *S. fredii* USDA205, *S. arboris* HAMBI1552, *S. xinjiangense* CCBAU110,未知菌有 11 株来自杨斜,分别是 0887、0870、0876、0890、0920、0872、0882、

0891,0889,0871,0883;有 5 株来自板桥,分别为 0927,0926;有 1 株来自黑山,为 0946。
0909,0908,0916,0912 和 0903;有 2 株来自牧护关,

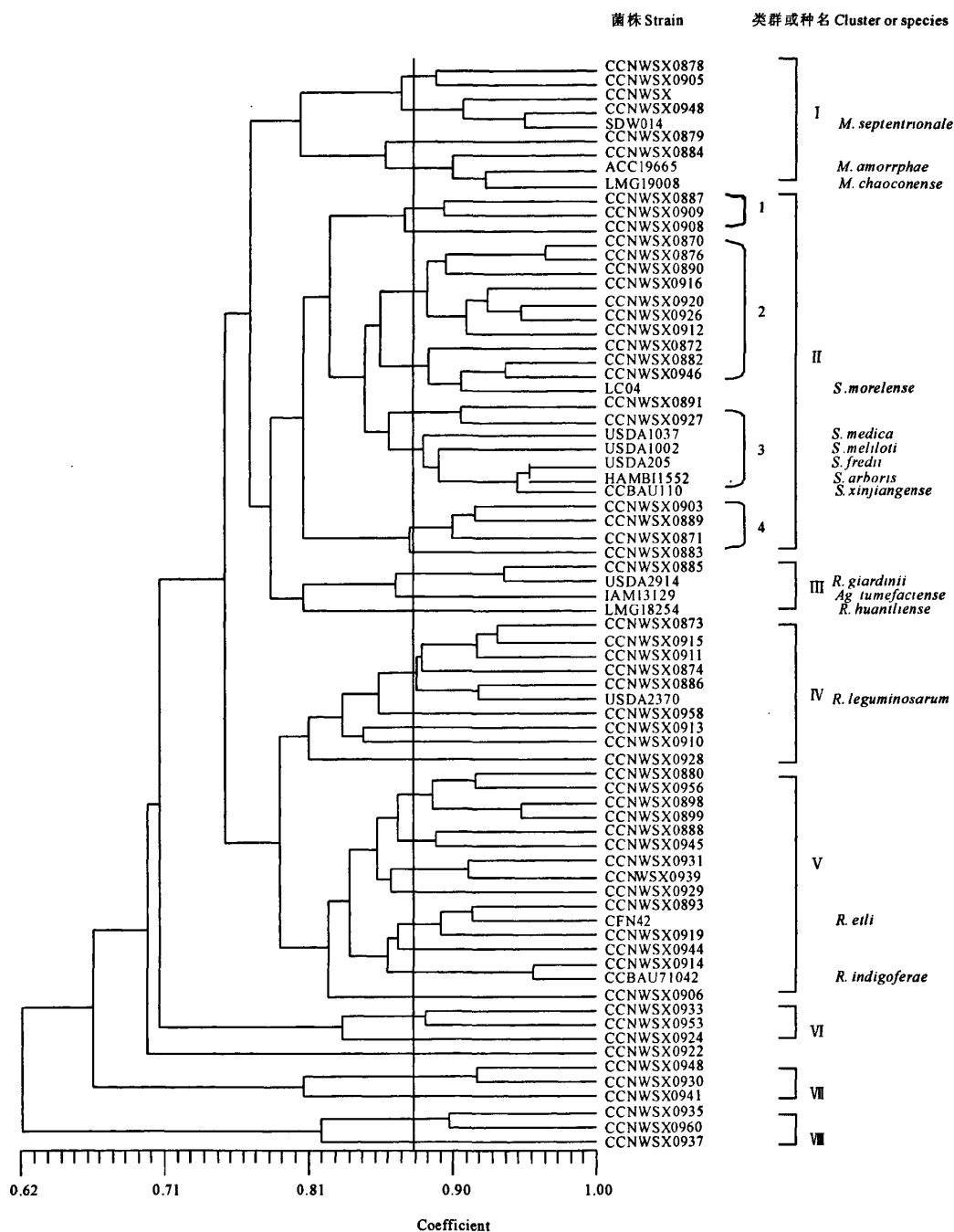


图 1 数值分类图

Fig. 1 Dendrogram of numerical taxonomy of rhizobial strains

群 II 进一步分成 4 个亚群。亚群 1 约在 88.5% 的相似水平上相聚而成,包括来自杨斜的 0887,来自板桥的 0909 和 0908 共 3 株菌;亚群 2 约在 86.5%

的相似水平上相聚而成,包括来自杨斜的菌株 0870,0876,0890,0920,0872,0882,来自板桥的 0916,0912,来自牧护关的 0926,来自黑山的 0946 和参比

菌 *S. morelense* LC04 共 11 株菌;亚群 3 约在 87.5% 的相似水平上相聚而成,包括来自杨斜的菌株 0891,来自牧护关的菌株 0927 和 5 株中华根瘤菌参比菌 *S. medica* USDA1037, *S. meliloti* USDA1002, *S. fredii* USDA205, *S. arboris* HAMB1552 与 *S. xinjiangense* CCBAU110;亚群 4 约在 89% 的相似水平上相聚而成,由来自商州杨斜的 0889,0871,0883 和来自板桥的 0903 组成。

群Ⅲ包含根瘤菌 *R. giardinii* USDA2914, *R. huanliense* LMG18254 和土壤杆菌 *Ag. tumefaciens* IAM13129 这 3 株参比菌和来自杨斜的未知菌 0885。

群Ⅳ由 9 株未知菌和参比菌豌豆根瘤菌 *R. leguminosarum* UWEQ2370 聚在一起,未知菌有来自杨斜的 0873,0874,0886,来自商州牧护关的 0928,来自商州板桥的 0915、0911、0913、0910 和来自黑山的

0958。

群Ⅴ由 14 株未知菌与参比菌菜豆根瘤菌 *R. elii* CFN42 和木兰根瘤菌 *R. indigoferae* CCBAU71042 聚在一起。未知菌中有来自杨斜的 0880,0888,0893,来自商州牧护关的 0931,0939,0929,0944,来自商州板桥的 0919,0914,0906,来自黑山的 0956,0945,来自二龙山的 0898 和 0899。

群Ⅵ包括 3 株未知菌,由来自牧护关的 0933,0924 和来自黑山的 0953 组成;群Ⅶ由来自牧护关的 3 株未知菌 0948,0930 和 0941 组成;群Ⅷ由来自牧护关的未知菌 0935,0937 和来自黑山的 0960 组成。此 3 群菌未能与各参比菌聚在一起,说明它们与各参比菌相似度低,为新类群,这 3 个新类群是否为新的分类单元,有待进一步研究。

2.3 各类群的鉴别特征

表 2 各类群之间的鉴别特征
Table 2 Characteristics of identification among clusters

项目 Item	群 I Cluster I	群 II Cluster II	群 III Cluster III	群 IV Cluster IV	群 V Cluster V	群 VI Cluster VI	群 VII Cluster VII	群 VIII Cluster VIII
山梨糖 Sorbose	30%	+	+	+	+	+	+	+
NaCl(4%)	-	50%	-	-	-	-	-	-
青霉素 Penicillin (80 μg/mL)	+	90%	25%	20%	60%	+	-	-
链霉素 Streptomycin (80 μg/mL)	-	-	-	-	80%	-	-	-
温度 Temperature(4℃)	-	10%	-	-	-	+	-	+
红霉素 Erythromycin (20μg/mL)	50%	60%	-	10%	85%	30%	60%	30%
曙红 Y Eosin Y(0.2%)	+	+	+	+	+	-	+	+

注: + 表示阳性反应; - 表示阴性反应; % 表示显现阳性反应的菌株占未知菌株的百分数。
Note: + indicates positive action; - indicates negative action; and % means percentage of positive action strains.

从表 2 各类群的鉴别特征统计结果可以看出:类群 I 有 30% 的菌株能利用山梨糖作为唯一碳源,其它各类群全部菌株则都可以利用;类群 II 的菌株有 50% 能在含 4% NaCl 的 YMA 培养基上生长,而其它各类群都不能生长;在含青霉素为 80 μg/mL 的培养基上类群Ⅶ和类群Ⅷ不能生长,类群 I 和类群Ⅳ全部菌能生长;在含链霉素为 80 μg/mL 的培养基上类群 V 有 80% 的菌株能生长,其它各类群菌均不能生长;经 4℃ 的温度处理 10 min 后培养,类群Ⅵ菌株能生长,类群 II 有 10% 的菌株能生长,其余各类群菌株都不能生长;在红霉素浓度为 20 μg/mL 的 YMA 培养基上类群Ⅲ菌株不能生长,其它各类群菌能生长的比例各不一样;在含 0.2% 曙红 Y 的 YMA 培养基上类群Ⅵ菌株不能生长,其余各群菌都可以生长。以上这些鉴别特征是它们独立成群的主要依据。

3 讨论

通过数值聚类,59 株多花胡枝子根瘤菌聚成的类群和亚群较多,揭示了多花胡枝子根瘤菌有着丰富的表型多样性。同时分析发现,不同采集点的地理环境境虽然有明显差异,但未知菌并未按照地理来源区分开来,同一类群的菌株可以来源于不同的采集点,而同一个采集点分离到的菌株也可以聚在不同类群中。可见多花胡枝子根瘤菌的类群和地理环境之间没有确定的对应关系。上述现象再次表明,根瘤菌与豆科植物之间的共生结瘤关系比较复杂,受多种因素影响。区域地理环境的差异会影响到根瘤菌的种类及分布,但不是唯一原因。根瘤菌与豆科植物的共生关系涉及细菌、植物及环境三方面的相互作用。这一结果与陈文新等(2004)的观点相吻合^[9],和目前有关胡枝子根瘤菌研究的一些报

道结果一致^[10,11]。

近几年国内外的研究证明,根瘤菌在清除环境污染物和土壤修复方面具有很大的应用潜力。本研究的生理生化性状测定显示,商洛多花胡枝子根瘤菌的表型性状比较丰富,大多数都能利用全部碳氮源,适应温度和 pH 的范围较宽,这些都有利于它在不同地域环境下推广应用。未知菌中抗菌素、耐盐、耐染料、耐重金属,产氧化酶菌株的数量比例也较高,有一些菌株在抗性耐性方面表现出了优良的性能,如耐高盐、耐高温和耐高碱特性等。所有这些都体现出这一地区的根瘤菌具有较强的代谢能力、适应性能和抗逆性能,值得进一步研究、筛选和推广应用。

本研究对多花胡枝子根瘤菌生理生化特性的测定,为筛选适合山区生态环境且能与植物高效匹配的优良菌株提供了依据。根据 Herrera 等的研究,根瘤菌的抗逆性是豆科植物与根瘤菌能否形成有效共生体的限制因素^[12],也是根瘤菌生态适应范围和固氮能力的一项重要指标。一般来说,根瘤菌的抗逆性越强它就越比较容易与豆科植物形成共生体。商洛地区地处秦岭南麓,总体气候较好。但由于土地贫瘠,耕地十分有限,20 世纪 80 年代对土地的掠夺式经营和林木的大量砍伐,已造成生态环境明显退化。在山区多年退耕还林还草生态建设中一直存在效果不佳的问题,究其原因主要是山地干旱和氮素含量不足。因此可以在造林中推广接种抗逆性强的根瘤菌剂以促进植株在贫瘠山坡上生长,改善植被,促进育林。

同对商洛多花胡枝子根瘤菌所作的 16S rDNA - RFLP 分析^[13]结果相比较,由 59 株多花胡枝子根瘤菌生理生化聚类得到的类群和亚群则更为细密复杂。这可能是因为生理生化测定的性状很多都与细菌的细胞质和质粒有关,多为数量性状,如对抗生素和染料的抗性、对盐浓度和酸碱的耐性以及生长温度范围等性状。通过生理生化测定能够将 16S rDNA 基因以外的区别显现出来。根据本实验中多花胡枝子根瘤菌较为丰富的表型多样性和一些抗性耐性菌株的出现,下一步应从遗传物质上进行研究,如

提取不同类群的质粒和特殊性能菌株的质粒进行酶解分析,对固氮基因和结瘤基因进行研究等,进一步揭示根瘤菌的类群关系。

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1995, 41: 131—159.
- [2] 陈默君, 李昌林, 祁永. 胡枝子生物学特性和营养价值研究[J]. 自然资源, 1997, 2: 74—81.
- [3] ZHAO Y, CHEN X Y, PIAN R Q. Research advance of *Lespedeza Michx*[J]. *Journal of North west Forestry University*, 2006, 21(2): 71—75.
- [4] WEI G H, LIU H Q, SUN K J. Phenotypic feature diversities of rhizobia isolated from Henan Province[J]. *Northwest Sci - Tech Univ. of Agri. And For. : (Nat. Sci. Ed)*, 2002, 30(3): 71—75.
- [5] WEI G H, CHEN W X, ZHU M E. A study on taxonomy of rhizobia isolated from *Kummeria* sp. and *Indigofera* sp[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 1999, 5: 387—395.
- [6] KAN F L, CHEN W X. Comparative analysis of numerical taxonomy and 16S rDNA PCR - RFLP of fast - growing rhizobia isolated from Western China[J]. *Microbiology Aviso*, 2002, 29(3): 1—8.
- [7] JANET JANSSON. Effect of heat stress on cell activity and cell morphology of the tropical Rhizobium, *Sinorhizobium arboris*[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, 34: 267—278.
- [8] 韩素贞, 陈文新. 分离自抗子梢等 3 个宿主的根瘤菌的表型分析[J]. 微生物学通报, 2003, 30(2): 4—11.
- [9] CHEN W X, WANG E T, CHEN W F. The relationship between the symbiotic promiscuity of rhizobia and legumes and their geographical environments[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2004, 37: 81—86.
- [10] TAN Z Y, CHEN W X. SDS - PAGE of whole cell protein of new rhizobial groups and 16S rDNA sequencing of their representatives[J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 1998, 4(1): 65—69.
- [11] PENG X C, ZHANG X P, XU K W, et al. Diversity and phylogeny of rhizobial strains isolated from root nodules of *Lespedeza Michx* in arid - hot valley of Jinsha River[J]. *ACTA ECOLOGICA SINICA*, 2008, 11: 5469—5481.
- [12] HERRERA M A, SALAMANCA C P, BAREA J. Inoculation of woody legumes with selected arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia to recolonize desertified Mediterranean ecosystems[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 56(1): 129—133.
- [13] 冀玉良, 韦革宏. 商洛多花胡枝子根瘤菌 16S rDNA - RFLP 分析及系统发育研究[J]. 西北植物学报, 2010, 30(5): 0925—0932.

Study on physiological and biochemical characters and numerical taxonomy of rhizobia isolated from *Lespedeza floribunda* in Shangluo Region of Shaanxi

JI Yu-liang^{1,2}, ZHAN Jun-peng², WEI Ge-hong²

(1. Department of Biological and Medical Engineering, Shangluo University, Shangluo, Shaanxi 726000, China;

2. College of Life Sciences, Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 59 unknown rhizobia strains isolated from *Lespedeza floribunda* in Shangluo, Shaanxi Province and 15 reference strains were analyzed with 125 phenotypic features and numerically classified. The result showed that the unknown strains could use the majority of all the carbon and nitrogen sources and adapt to a wide range of temperature and pH. The proportion of unknown strains which could be resistant to antibiotic, dye and heavy metals and could produce oxidase was relatively high. Some strains had endurance property to high concentrations of salt or alkali, in which about 67% strains could be resistant to 3.0% NaCl and 25% strains could grow in YMA medium with pH12. Numerical taxonomy showed that, in addition to strain CCNWSX0922, other test strains were clustered into 8 clusters at 80.5% similarity level. Clusters I contained 6 unknown strains and 3 reference strains of *Mesorhizobium*. Cluster II had 19 unknown strains and 6 reference strains of *Sinorhizobium*. Cluster III consisted of 1 unknown strain and 3 reference strains of *Rhizobium*. Cluster IV and V all included reference strains of *Rhizobium*. Clusters VI, VII and VIII may be new groups, which were not clustered into the reference strains, and their taxonomic status must be confirmed by further measurements.

Keywords: *Lespedeza floribunda*; rhizobia; phenotypic diversity

(上接第96页)

Effects of nodule bacteria inoculation on growth of pea/maize system

ZHANG Hu-tian¹, GUO Li-zhuo¹, CHAI Qiang¹, HE Ya-hui¹, HOU Li-juan²

(1. College of Agronomy, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China; 2. College of Plant Protection and Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: A pot experiment was conducted to investigate the effects of nodule bacteria inoculation (Non-inoculation, Inoculating XC3.1, Inoculating ACCC16101) and N application levels (Non-N, 0.3 gN/kg soil) on pea and maize growth and N content in different cropping patterns (pea and maize sole, pea/maize intercropping). The results showed that inoculating selected strain XC3.1 increased effectively nodules number and weight by 79.5% ~ 131.6% and 174.1% ~ 205.4% respectively, and improved N nutrition status of intercropped maize and pea in two cropping patterns. The improvement of N nutrition resulting from XC3.1 was better than that from strain ACCC16101. Inoculating XC3.1 promoted pea biomass in mono- and intercropping system by 22.0%, so did intercropped maize under non-N applying condition by 123.1%. More effective pea nodules were formed in intercropping system than that in mono-cropping system. Intercropped pea accumulated less dry matter than mono-cropped pea at the same N level, and the average rate of decrease was 13.7%. Inoculating XC3.1 increased significantly not only the competition of maize to pea, but also the resistance of pea to maize.

Keywords: inoculation; nodule bacteria; pea; maize; nodule; nitrogen