

兰州地区白三叶根瘤菌分离鉴定与筛选

兰晓君,金艳丽,姚拓,周恒,张建贵,李昌宁,杨晓玫,陈建纲

(甘肃农业大学 草业学院,草业生态系统教育部重点实验室,甘肃省草业工程实验室,中-美草地畜牧业可持续发展研究中心,甘肃 兰州 730070)

摘要:为了筛选出兰州地区白三叶(*Trifolium repens*)高效共生固氮的根瘤菌,从兰州市安宁区绿化带白三叶根瘤内分离出6株疑似根瘤菌。通过形态学、生理生化和16S rRNA序列的系统进化分析来确定这6株菌的分类地位,并对鉴定为根瘤菌的菌株通过回接试验筛选高效根瘤菌。结果表明,所分离的6株菌16S rRNA序列与*Rhizobium anhuiense*、*R. laguerreae*、*R. leguminosarum*和*R. sophorae*的相似性最高(99.77%~99.92%),且聚集在一个分支,是根瘤菌属的成员;回接试验显示,接种根瘤菌GAU-00001、GAU-00002、GAU-00005和GAU-00006的白三叶结瘤数分别是18.2、16.7、17.7和19.2;株高分别是(15.2±0.3)、(14.3±0.3)、(14.6±0.6)和(15.1±0.2) cm;鲜重分别是(0.324±0.002)、(0.318±0.005)、(0.315±0.005)和(0.321±0.027) g;干重分别是(0.06±0.007)、(0.062±0.027)、(0.06±0.01)和(0.062±0.01) g;粗蛋白含量分别是(21.27±0.49)%、(20.2±0.26)%、(20.7±0.31)%和(21.37±0.37)%;粗脂肪含量分别是(8.24±0.01)%、(8.11±0.16)%、(8.23±1.0)%和(8.25±0.23)% ,各项指标均显著高于CK、GAU-00003和GAU-00004的处理。由此,菌株GAU-00001和GAU-00006是最适宜接种兰州白三叶的根瘤菌菌株。

关键词:白三叶;根瘤菌;分离鉴定

中图分类号: S541 **文献标志码:** A **文章编号:** 1009-5500(2022)03-0132-07

DOI: 10.13817/j.cnki.cyyep.2022.03.016



白三叶(*Trifolium repens*)又名车轴草、白花三叶草、荷兰翘摇等,原产于欧洲、北非和亚洲西部等,是豆科车轴草属的重要牧草,因其建植成本低、产量高、品质优、适应性强(抗热抗寒性强,可在酸性土壤中旺盛生长,也可在砂质土中生长,在我国各地均有种植。除饲用外,还广泛用作城市绿化、绿肥、蜜源和药材等^[1]。兰州地区白三叶主要用于城市绿化,绿期长达250 d^[2]。

根瘤菌在氮限制条件下,与特定宿主植物形成共生关系,在宿主根部诱导根瘤的形成^[3]。在根瘤中,来

自大气的氮转化为氨,然后被氨化为氨基酸、核苷酸和其他细胞成分,宿主植物以根瘤菌固定的氨作为氮源,并为根瘤菌提供了碳源,因此根瘤菌与其宿主植物共生是互惠互利,在农业以及地球氮循环中都具有重要意义。

早前研究报道从白三叶根瘤中分离到的根瘤菌种有豌豆根瘤菌(*Rhizobium leguminosarum*)、安徽根瘤菌(*R. anhuiense*)、高卢根瘤菌(*R. gallicum*)、葡萄牙根瘤菌(*R. lusitanum*)、蚕豆根瘤菌(*R. fabae*)、*R. laguerreae*、放射根瘤菌(*R. radiobacter*)、洪特拉根瘤菌(*R. huantiense*)、蒙古根瘤菌(*R. mongolense*)、*R. phaseoli*、苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)、*Burkholderia phytofirmans*、*Burkholderiales bacterium*和中慢生根瘤菌属(*Mesorhizobium*)的菌种^[4],但有确切文献报道能与白三叶结瘤固氮的只有豌豆根瘤菌(*R. leguminosarum*)的菌株^[5-7],因此有必要研究和发

收稿日期:2020-01-20; **修回日期:**2020-04-07

基金项目:国家自然科学基金(31660688)

作者简介:兰晓君(1975-),男,河北宣化人,博士,助理研究员,研究方向为草地生物多样性。

E-mail:lanxj@st.gsau.edu.cn.

姚拓为通讯作者。E-mail:yaotuo@gsau.edu.cn

现新的诱发白三叶结瘤固氮的根瘤菌种类和结瘤固氮能力突出的菌株。

本研究从兰州市黄河边绿化带种植的白三叶根瘤中分离出疑似根瘤菌菌株,通过形态学、生理生化和16S rRNA序列分析及构建系统进化树鉴定根瘤菌的种类,通过沙培法回接进行结瘤试验,测定对照及接种不同根瘤菌株白三叶的结瘤情况、生物量及营养指标,明确使兰州白三叶结瘤固氮的根瘤菌种类,筛选高效的白三叶共生根瘤菌菌株,为制作白三叶根瘤菌菌肥收集菌种资源。

1 材料和方法

1.1 样本的采集与处理

2016年9月从甘肃省兰州市北滨河路边绿化带(N36°09'67.6" N, E 103°69'89.3"),选择生长健壮的白三叶植株,从其根部收集粉色、饱满的根瘤,装入样品袋内,4℃运至实验室。同时收集白三叶的种子,以供回接试验使用。

1.2 培养基

基础培养基(YMA):10 g 甘露醇,0.5 g 酵母粉,0.3 g 磷酸氢二钾,0.2 g 无水硫酸镁,0.1 g 氯化钠,18 g 琼脂粉,1升双蒸水,pH值7.0^[8]。

筛选培养基(YMA刚果红培养基):YMA培养基灭菌后,1 L加入过滤灭菌的0.25%的刚果红溶液10 mL,摇匀后倒平板。

NA培养基购自BD Difco公司。

1.3 根瘤菌分离纯化与保存

用清水将根瘤表面杂质冲洗干净,无菌滤纸吸干水分。生物安全柜内,将根瘤样品先后浸入75%乙醇内1 min,次氯酸钠溶液(4%有效氯)1 min,75%乙醇1 min,无菌水冲洗6次,第6次冲洗后的水涂布在NA平板上进行根瘤表面灭菌效果评估;根瘤在无菌滤纸上吸干水分,取0.5 g放置在无菌研钵内,加入4.5 mL无菌水研磨,梯度稀释至 10^{-3} ,在筛选培养基上涂布 10^{-2} 和 10^{-3} 稀释液各20 μ L;28℃培养箱培养5 d,从平板上选取没有吸收刚果红的圆形、凸起、质黏、边缘整齐、略透明或半透明的典型菌落,在YMA培养基上四区划线分纯,纯化后的菌株接入YMA培养基斜面4℃短期保存,试验后有研究和应用价值的菌株与灭菌的20%甘油溶液混匀并分装至冻存管中-80℃长期

保存。

1.4 菌株形态学观察和生理生化特性检测

纯化后的菌株在YMA培养基上28℃培养5 d,观察菌落形态,使用Hucker法检测革兰氏反应^[9],光学显微镜放大1 000倍观察细胞形态,用压滴法观察细菌运动性。菌株接种在YMA培养基上,分别在4、8、10、16、20、25、30、35、40、42、45和50℃条件下培养10 d以检测菌株的温度耐受范围;调整YMA液体培养基,使该培养基氯化钠的含量分别为0.1%、0.25%、0.5%、0.75%、1%、1.25%、1.5%和2%,接入100 μ L待测菌液振荡培养10 d(200 r/min,28℃),测定氯化钠耐受范围;pH耐受试验是在基础培养基中加入如下的缓冲液:pH值5.0,HAC-NaAC;pH值6.0,NaOH-KH₂PO₄;pH值7.0,NaOH-KH₂PO₄;pH值8.0,NaOH-KH₂PO₄;pH值9.0,Borax-Boric acid;pH值10.0,Borax-NaOH;pH值11.0,Na₂HPO₄-NaOH;28℃振荡培养(200 r/min),每2天观察1次^[10]。氧化酶、接触酶、淀粉水解、纤维素分解、需氧性测定、碳源利用、氮源利用和柠檬酸盐利用等生化和生理指标检测参考《常见细菌系统鉴定手册》描述的方法^[11]。

1.5 菌株16S rRNA扩增与系统进化分析

使用细菌基因组DNA提取试剂盒(北京艾莱德生物科技有限公司)提取细菌基因组DNA,使用细菌16S rRNA通用引物:27F(5'-GAGTTTGGATCCTGGCTCAG-3')和1492r(5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3')进行扩增,PCR扩增条件:94℃预变性10 min;94℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸1 min,共35个循环;72℃延伸5 min,4℃∞;扩增产物送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。测序结果在EzBioCloud网站(<https://www.ezbiocloud.net/>)与NCBI的Genbank数据库中的模式菌株序列比对分析,并获取序列相近模式菌株的16S rRNA序列,使用MEGA7.0软件,邻近法构建系统进化树,自展值为1 000^[12-15]。

1.6 根瘤菌回接试验

以石英砂(灭菌)为基质装入塑料杯后放入盛有Hoagland无氮营养液的容器中,选取饱满的白三叶种子用75%的乙醇和次氯酸钠(4%有效氯)表面灭菌,将灭菌后的种子放置在底部铺有无菌滤纸的培养皿内,26℃培养至发芽,后移栽至塑料杯内,每杯10株。

待长出3片真叶后接种浓度为 10^8 cfu/mL的根瘤菌菌液,以加无菌液为对照,45 d后检测植株结瘤情况。

1.7 菌株接种效果测定

接种根瘤菌菌液45 d后测定植株结瘤数、株高、每株地上部分鲜重和干重、粗蛋白、粗脂肪和粗纤维含量等指标;粗蛋白含量采用凯氏定氮法,粗脂肪含量采用索氏脂肪提取器提取法,粗纤维含量采用酸性洗涤剂法^[16-17]。

1.8 根瘤固氮酶活性测定

将剪下的根瘤称重后置于10 mL的西林瓶内,硅胶塞封口后用注射器从瓶内抽出1 mL气体再注入1 mL纯乙炔气体,1 h后采用乙炔还原法测定固氮酶活性^[18],每个样本3次重复。

1.9 统计分析

使用SPSS 19.0统计软件对回接试验数据进行显

著性分析。

2 结果与分析

2.1 细菌形态与生理生化特征

本研究共分离到疑似根瘤菌菌株6株,编号为GAU-00001~GAU-00006。6株菌株之间形态学与生理生化特性差别不大。pH耐受范围:菌株GAU-00001和GAU-00006略宽于其余菌株;菌株GAU-00006能够利用D-果糖和丙酮酸盐为唯一碳源,而其他菌株不能;所有菌株都表现出一定的耐盐特性(能够在氯化钠含量 $\leq 1\%$ 的培养基中生长)。菌株具体特性见表1。

2.2 菌株16S rRNA序列系统进化分析

分离的6株疑似根瘤菌16S rRNA序列之间相似性大于99.9%,这些序列在EzBiocloud网站中与

表1 菌株的形态学与生理生化特性

Table 1 Morphological and physiological and biochemical characteristics of strains

特性	GAU-00001	GAU-00002	GAU-00003	GAU-00004	GAU-00005	GAU-00006
菌落形态	半透明、乳白色、凸起、粘稠	半透明、乳白色、凸起、粘稠	半透明、乳白色、凸起、粘稠	半透明、乳白色、凸起、粘稠	半透明、乳白色、凸起、粘稠	半透明、乳白色、凸起、粘稠
细胞形态	短杆状	短杆状	短杆状	短杆状	短杆状	短杆状
细胞大小/ μm	$(0.4\sim 0.5)\times(0.8\sim 1.0)$					
需氧或厌氧	需氧	需氧	需氧	需氧	需氧	需氧
运动性	+	+	w	w	+	+
革兰氏染色	-	-	-	-	-	-
生长温度/ $^{\circ}\text{C}$	10~40	10~40	10~40	10~40	10~40	10~40
耐受pH值	5~9	6~9	6~9	6~9	6~9	5~9
耐受氯化钠含量/%	≤ 1					
氧化酶	+	+	+	+	+	+
过氧化氢酶	+	+	+	+	+	+
淀粉	-	-	-	-	-	-
纤维素	-	-	-	-	-	-
D-甘露醇	+	+	+	+	+	+
D-葡萄糖	+	+	+	+	+	+
D-果糖	-	-	-	-	-	+
D-阿拉伯糖	-	-	-	-	-	-
D-半乳糖	+	+	+	+	+	+
柠檬酸盐	-	-	-	-	-	-
丙酮酸盐	-	-	-	-	-	+
L-精氨酸	+	+	+	+	+	+
L-半胱氨酸	+	+	+	+	+	+
L-谷氨酸	+	+	+	+	+	+
α -丙氨酸	+	+	+	+	+	+

注:“+”为阳性,“-”为阴性,“w”为弱阳性

NCBI 数据库中模式菌株比对结果显示与 *R. anhuiense*、*R. laguerreae*、*R. leguminosarum* 和 *R. sophorae* 的相似性最高 (99.77%~99.92%), 临近法构建的系统进化树 (图 1) 显示 6 株疑似根瘤菌聚类在一起与 *R. anhuiense*、*R. laguerreae*、*R. leguminosarum* 和 *R. sophorae* 构成一个分支, 表明这 6 株疑似根瘤菌是根瘤菌属的成员。

2.3 回接试验

接种菌株 GAU-00001、GAU-00002、GAU-00005 和 GAU-00006 的白三叶根系结瘤, 对照 (CK) 及接种菌株 GAU-00005 和 GAU-00006 的植株根系没有结瘤 (表 2)。

2.4 菌株接种效果测定

接种菌株 GAU-00001、GAU-00002、GAU-00005 和 GAU-00006 的白三叶根系根瘤检测出固氮酶活

性, 4 个菌株接种后形成的根瘤数量没有明显差异, 但根瘤的固氮酶活性表现为接种 GAU-00001 和 GAU-00006 的明显高于接种 GAU-00002 和 GAU-00005; 接种菌株 GAU-00001、GAU-00002、GAU-00005 和 GAU-00006 的植株其株高、鲜重、干重、粗纤维和粗脂肪含量之间没有明显差异, 但优于对照和接种 GAU-00003 和 GAU-00004 的植株; 接种菌株 GAU-00001 和 GAU-00006 的植株粗蛋白含量明显高于对照组接种其他根瘤菌株 (表 2)。

3 讨论

本研究从白三叶根瘤内所分离的 6 株菌, 菌落形态表现为凸起、质黏、乳白色、半透明、在 YMA 刚果红培养基上生长不吸收刚果红, 符合典型根瘤菌的菌落特征; 另外 16S rRNA 测序结果与根瘤菌属的模式菌

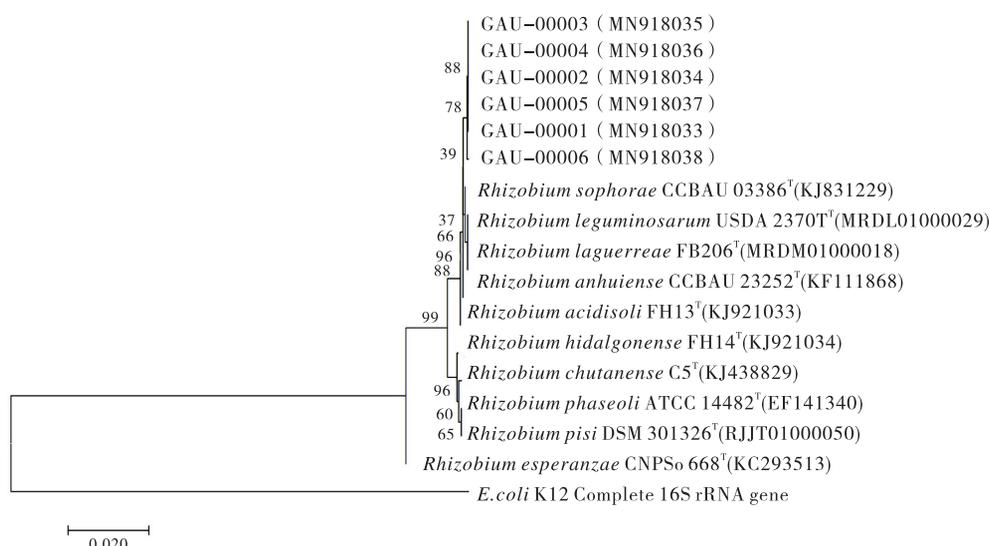


图 1 6 个菌株与其相关根瘤菌属模式菌株 16S rRNA 序列基于邻近法构建的系统进化树

Fig. 1 Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16SrRNA gene sequences showing the relationships among six strains and closely related species of the genus *Rhizobium*

表 2 根瘤菌回接试验测定指标

Table 2 Experimental data of the white clove inoculated the stains GAU-00001 to GAU-00006

处理	每株结瘤数	固氮酶活性/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	株高/cm	地上部分鲜重/g	地上部分干重/g	粗纤维含量%	粗脂肪含量/%	粗蛋白含量/%
CK	0		4.9±0.1 ^b	0.076±0.003 ^b	0.012±0.001 ^b	28.90±0.66 ^b	3.64±0.57 ^b	4.97±0.11 ^c
GAU-00001	18.2	6.32±0.01 ^b	15.2±0.3 ^a	0.324±0.002 ^a	0.060±0.007 ^a	19.46±0.30 ^a	8.24±0.10 ^a	21.27±0.49 ^{ab}
GAU-00002	16.7	5.92±0.03 ^a	14.3±0.3 ^a	0.318±0.005 ^a	0.062±0.027 ^a	19.65±0.30 ^a	8.11±0.16 ^a	20.20±0.26 ^b
GAU-00003	0		4.6±0.2 ^b	0.075±0.003 ^b	0.013±0.001 ^b	28.31±0.66 ^b	4.39±0.25 ^b	5.16±0.48 ^c
GAU-00004	0		4.7±0.3 ^b	0.078±0.004 ^b	0.013±0.002 ^b	27.59±0.32 ^b	4.24±0.17 ^b	4.99±0.13 ^c
GAU-00005	17.7	5.94±0.04 ^a	14.6±0.6 ^a	0.315±0.005 ^a	0.060±0.010 ^a	19.88±0.42 ^a	8.23±1.00 ^a	20.70±0.31 ^b
GAU-00006	19.2	6.33±0.01 ^b	15.1±0.2 ^a	0.321±0.027 ^a	0.062±0.010 ^a	19.16±0.78 ^a	8.25±0.23 ^a	21.37±0.37 ^{ab}

注: 同列不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

株相似性最高,且与 *R. anhuiense*、*R. laguerreae*、*R. leguminosarum* 和 *R. sophorae* 共同构成一个分支(图1),说明6株菌株属于根瘤菌属,但由于6株菌株和4株模式菌的任何一株都没有形成单独的分支,因此不能确定这6株菌是4个模式菌株中的哪一个种;以系统进化分析而言,这6株菌株更可能构成一个单独的分类单元。16S rRNA 虽然是细菌进化的分子钟,但毕竟信息量有限(1 600 bp),对于部分细菌分类无法明确到种的水平,虽然有研究表明一些看家基因(*RecN*, *GyrB*, *rpoB*, *SodA*, *ThrC*, *DnaK* 和 *GroEL* 等)能够对种水平的鉴定有所帮助,但精准的鉴定更有赖于全基因组杂交来证实。

4种模式根瘤菌中,只有 *R. leguminosarum* 能使白三叶结瘤固氮^[19],没有 *R. sophorae* 与 *R. anhuiense* 不能使白三叶结瘤^[20-21],*R. laguerreae* 能否使白三叶结瘤固氮的报道,因此根瘤菌与宿主结瘤固氮的专一性是某种根瘤菌自身的重要特性但不是鉴别根瘤菌种的必要特性;此外文献报道 *R. sophorae* 能使菜豆(*Phaseolus vulgaris*)和苦参(*Sophoraflavescens*)结瘤固氮^[20],*R. laguerreae* 被证实能使蚕豆(*Vicia faba*)结瘤固氮^[22],*R. anhuiense* 能使豌豆(*Pisum sativum*)和蚕豆结瘤固氮^[21],因此本研究所分离的菌株有使菜豆、苦参、蚕豆和豌豆这4种豆科植物结瘤的可能,有必要进一步的研究以确定这6株根瘤菌的宿主范围。

菌株 GAU-00001、GAU-00002、GAU-00005 和 GAU-00006 使白三叶结瘤且所结根瘤检测出固氮酶活性,对应植株的生理特征、生物量和营养成分含量也优于对照和接种 GAU-00003 和 GAU-00004 的植株;菌株 GAU-00001 和 GAU-00006 所诱导产生的根瘤固氮酶活性高于菌株 GAU-00002 和 GAU-00005,对应植株的粗蛋白含量也表现出同样的特点。因此菌株 GAU-00001 和 GAU-00006 表现出优良根瘤菌的特性。从接种的总体效果来看,本研究中接种根瘤菌的植株与 CK 相比,株高、鲜重、干重和部分营养指标差异显著,与前人的研究一致^[5]。对于菌株 GAU-00003 和 GAU-00004 没有与白三叶识别并结瘤固氮,可能的原因是这两株根瘤菌缺失相关的共生基因或者共生基因发生突变而导致无法合成或分泌结瘤因子与白三叶根部分泌的信号分子相互识别,但这一推

测有待于进一步的研究论证。

4 结论

(1)从兰州白三叶根瘤内分离的6株根瘤菌均鉴定为 *Rhizobium* sp.

(2)菌株 GAU-00001 和 GAU-00006 为可使白三叶结瘤固氮的优良高效根瘤菌菌株,可用于白三叶菌肥的生产。

参考文献:

- [1] 李艺妆,赵敏,赵一军,等. 退化禾草/白三叶草地植被和土壤特征[J]. 草原与草坪,2020,40(1):28-34.
- [2] 张海峰,杨忠琴. 兰州地区白三叶草坪的建植与养护[J]. 甘肃科技,2009,25(18):151-152.
- [3] Wang Q, Yang S H. Host-secreted antimicrobial peptide enforces symbiotic selectivity in *Medicago truncatula* [J]. PNAS,2017,114(26):6854-6859.
- [4] 韦兴迪,曾庆飞,谭玉兰,等. 贵州部分地区野生白三叶根瘤菌资源调查与区系分析[J]. 作物杂志,2018(2):35-43.
- [5] 凌瑶,潘明洪,彭燕. 四川高效白三叶根瘤菌筛选 16S rDNA 鉴定[J]. 草地学报,2015,23(6):1265-1271.
- [6] Callaham D A, Torrey J G. The structural basis for infection of root hairs of *Trifolium repens* by *Rhizobium* [J]. Canadian Journal of Botany,1981,59(9):1647-1664.
- [7] Gareth J. D. Symbiotic variation of *Rhizobium trifolii* with S. 100 nomark white clover (*Trifolium repens* L.) [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture,1963,14(10):740-743.
- [8] 马骥毓,张英,马文彬,等. 黄芪根际促生菌(PGPR)筛选与特性研究[J]. 草业学报,2017,26(1):149-159.
- [9] Cowan S T, Steel K J. Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria[M]. Cambridge: Cambridge University Press,1974.
- [10] 陈春兰,张建华,张靖,等. 1株分离自矽肺合并肺部感染患者痰液中 *Empedobacter falseni*5-1 的鉴定[J]. 甘肃医药,2017,36(7):528-531.
- [11] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001.
- [12] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution[J]. 1987,4(4):406-425.
- [13] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An ap-

- proach using the bootstrap [J]. *Evolution*, 1985, 39(4): 783–791.
- [14] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1980, 16(2): 111–120.
- [15] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33(7): 1870–1874.
- [16] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法 [M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.
- [17] 李昌宁, 李政璇, 曹全熙, 等. 5 株植物根际促生菌对紫花苜蓿生长和品质的影响 [J]. *草原与草坪*, 2018, 38(3): 29–34.
- [18] Sun G Z, Yao T, Feng C J, et al. Identification and biocontrol potential of antagonistic bacteria strains against *Sclerotinia sclerotiorum* and their growth-promoting effects on *Brassica napus* [J]. *Biological Control*, 2017, 104: 35–43.
- [19] Frioni L, Sicardi M. Competition for nodule occupancy between introduced and native strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2010, 46(4): 419–425.
- [20] Jiao Y S, Yan H, Ji Z J, et al. *Rhizobium sophorae* sp. nov. and *Rhizobium sophoriradicis* sp. nov., nitrogen-fixing rhizobial symbionts of the medicinal legume *Sophora flavescens* [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2015, 65(2): 497–503.
- [21] Zhang Y J, Zheng W T, Everall I, et al. *Rhizobium anhuiense* sp. nov., isolated from effective nodules of *Vicia faba* and *Pisum sativum* [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2015, 65(9): 2960–2967.
- [22] Saïdi M, Ramírez-Bahena M H, Santillana N. *Rhizobium laguerreae* sp. nov. Nodulates *Vicia faba* on several continents [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2014, 64(1): 242–247.

Isolation, identification and screening of rhizobium strains from white Clover in Lanzhou

LAN Xiao-jun, JIN Yan-li, Yao Tuo, Zhou Heng, Zhang Jian-gui, Li Chang-ning,
Yang Xiao-mei, Chen Jian-gang

(College of Pratacultural Science, Gansu Agricultural University/Key Laboratory of Grassland Ecosystem/Ministry of Education/Pratacultural Engineering Laboratory of Gansu Province/Sino-U. S. Center for Grassland Ecosystem Sustainability, Lanzhou 730070, China)

Abstract: In order to screen out high-efficiency of nitrogen-fixation rhizobia with Lanzhou white clover, six strains of candidate rhizobia were isolated from white clover nodules in the green belt of Anning District, Lanzhou. The taxonomic status of these six strains was determined by morphological, physiological, biochemical and systematic evolution analysis of 16S rRNA sequences; the strains identified as Rhizobia were screened for their efficiency by inoculation experiment. The results showed that the 16S rRNA sequences of the six strains had the highest similarity (99.77%~99.92%) with *Rhizobium anhuiense*, *R. laguerreae*, *R. leguminosarum*, and *R. sophorae*, and clustered together. All six strains were members of the genus *Rhizobium*. The inoculation experiment showed that the number of nodules inoculated with GAU-00001, GAU-00002, GAU-00005, and GAU-00006 were 18.2, 16.7, 17.7, and 19.2, respectively; the plant heights were (15.2±0.3), (14.3±0.3), (14.6±0.6), and (15.1±0.2) cm, respec-

tively; fresh weight were (0.324 ± 0.002) , (0.318 ± 0.005) , (0.315 ± 0.005) , and (0.321 ± 0.027) g, respectively; dry weight were (0.06 ± 0.007) , (0.062 ± 0.027) , (0.06 ± 0.01) , and (0.062 ± 0.01) g, respectively; crude protein were $(21.27 \pm 0.49)\%$, $(20.2 \pm 0.26)\%$, $(20.7 \pm 0.31)\%$, and $(21.37 \pm 0.37)\%$, respectively; crude fat were $(8.24 \pm 0.01)\%$, $(8.11 \pm 16)\%$, $(8.23 \pm 1.0)\%$, and $(8.25 \pm 0.23)\%$, respectively. All indicators were significantly higher than CK, inoculated with rhizobia GAU-00003 and GAU-00004. Therefore, the strains GAU-00001 and GAU-00006 were the most efficient rhizobium strains for Lanzhou white clover.

Key words: white clover; rhizobium; isolation and identification

(上接 131 页)

Physiological response of Caucasian clover to different cooling modes

MOU Dan¹, Yang Fan¹, KAZHUO Cai-rang², XIHE Duo-jie², XU Chen-chen¹,
XIE Jiu-xiang¹, LI Xi-lai¹

(1. College of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining 810016, China; 2. Forestry Station of Natural Resources Bureau of Henan Mongolian Autonomous County, Huangnan 811599, China)

Abstract: In order to explore the physiological response of Caucasian clover to different cooling modes, non-cold acclimation (NA) and cold acclimation (CA) were applied to Caucasian clover at -6°C . The leaf morphology was observed, and six physiological indexes were measured. Principal component analysis was used to screen the physiological indexes suitable for evaluating the cold resistance of Caucasian clover under different cooling modes. The results showed that the leaves of NA group and CA group maintained normal morphology after being exposed to -6°C for 2 h. Most of the leaves returned to normal morphology within 24 hours. After 7 days of recovery, all the tested plants started to grow new leaves again. With the increase in the time duration of cold stress, the MDA content, SOD activity, soluble protein content and soluble sugar content were significantly higher in CA group than those in NA group. The POD activity, MDA content and soluble sugar content could be used as cold-resistance indexes of NA group, while soluble protein content, SOD activity and chlorophyll content could be used as cold-resistance indexes of CA Group. In summary, Caucasian clover could deploy different physiological response to different cooling mode, and demonstrated strong ability of cold resistance. It has the potential to be introduced and cultivated in alpine grassland.

Key words: Caucasian clover; cold resistance; introduction and cultivation; alpine grassland; legumes