

研究报告

## 大豆根瘤菌 SCAUs8 的接种效果、促生性及系统发育研究

衡楠楠<sup>1</sup> 陈远学<sup>1</sup> 徐开未<sup>1\*</sup> 邹兰<sup>1</sup> 刘明<sup>1</sup> 彭丹<sup>1</sup> 黄莉平<sup>1</sup>  
冯伟进<sup>1</sup> 阳帆<sup>1</sup> 曾祥忠<sup>2</sup>

(1. 四川农业大学资源学院 四川 成都 611130)

(2. 四川省农业科学院土壤肥料研究所 四川 成都 610066)

**摘要:**【目的】大豆是我国重要的农作物,利用大豆-根瘤菌共生体系能有效减少化学氮肥的用量。将初筛的大豆根瘤菌 SCAUs8 在四川两个重要的大豆种植生态区进行田间接种验证试验,同时对该菌株进行分类地位研究。【方法】在四川丘陵区 and 攀西地区,采用大田试验调查接种大豆根瘤菌 SCAUs8 对大豆的增产效果。采用点接种法研究 SCAUs8 的抗逆性,用 Salkowski 比色法检测供试菌分泌吲哚乙酸(IAA)的能力。用多位点基因(16S rRNA, *atpD*, *recA*, *gln II*, *nodC*, *nifH*)序列分析对供试菌株 SCAUs8 进行分类地位的确定。【结果】大田试验表明,接种大豆根瘤菌 SCAUs8 后,大豆植株的产量、鲜重、干重等指标明显高于不接种对照(CK)处理,其中大豆植株产量比不接种 CK 增产 21.4%–29.7%,其差异达显著水平。对供试菌株 SCAUs8 进行的耐酸碱性、耐盐性、生长温度范围以及分泌 IAA 能力测定的结果表明,供试菌株 SCAUs8 能在 pH 5.0–10.0 正常生长,可耐受 NaCl 浓度为 0.5%,生长温度范围是 10–40 °C,能分泌 IAA。综合 16S rRNA、*atpD*、*recA*、*gln II*、*nodC*、*nifH* 基因的序列分析,发现供试菌株 SCAUs8 与 *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110<sup>T</sup> 相似性高达 100%。【结论】供试菌株 SCAUs8 是与四川主栽大豆品种共生匹配性较好的广谱菌株。该菌株耐盐性较差,但具有较强的耐酸碱性、较宽的生长温度范围及分泌 IAA 的能力。系统发育研究将供试菌株 SCAUs8 确定为 *B. diazoefficiens*。

**关键词:** 根瘤菌, 持家基因, IAA, 共生固氮

**Foundation item:** China National Tobacco Corporation Sichuan (No. SCYC201504); Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest of China (No. 201103005)

\*Corresponding author: E-mail: xkwei@sicau.edu.cn

**Received:** August 13, 2015; **Accepted:** November 04, 2015; **Published online** (www.cnki.net): January 22, 2016

基金项目: 中国烟草总公司四川省公司项目(No. SCYC201504); 公益性行业(农业)科研项目专项经费项目(No. 201103005)

\*通讯作者: E-mail: xkwei@sicau.edu.cn

收稿日期: 2015-08-13; 接受日期: 2015-11-04; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-01-22

## Field assessment of symbiotic efficiency, growth-promoting ability and phylogeny of soybean rhizobial strain SCAUs8

HENG Nan-Nan<sup>1</sup> CHEN Yuan-Xue<sup>1</sup> XU Kai-Wei<sup>1\*</sup> ZOU Lan<sup>1</sup> LIU Ming<sup>1</sup> PENG Dan<sup>1</sup>  
HUANG Li-Ping<sup>1</sup> FENG Wei-Jin<sup>1</sup> YANG Fan<sup>1</sup> ZENG Xiang-Zhong<sup>2</sup>

(1. College of Resource Sciences, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China)

(2. Soil and Fertilizer Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu, Sichuan 610066, China)

**Abstract:** [Objective] Soybean is the important legume crops in China. We can reduce chemical nitrogen fertilizer effectively by soybean-rhizobia symbiosis. The former screened soybean rhizobial strain SCAUs8 was used in field inoculation to two important soybean planting regions, in Sichuan. In addition, we identified the taxonomic position of this strain. [Methods] Field experiments were conducted to investigate the effect on soybean production by inoculating soybean rhizobia strain SCAUs8 in Sichuan hilly area and Panxi area. We studied the stress-tolerance of SCAUs8 with the point inoculation method. Growth-promoting ability was determined through Salkowski colorimetric method. Multilocus sequence analyses (16S rRNA, *atpD*, *recA*, *gln II*, *nodC*, *nifH*) were amplified to identify the phylogenetic position of SCAUs8. [Results] Field experiments showed that plant fresh weight and dry weight inoculated with SCAUs8 were significantly higher than that of no inoculation control (CK). The yield increased significantly by 21.4%–29.7% compared with CK. The strain SCAUs8 could grow at pH 5.0–10.0. It could be resistant to 0.5% NaCl, and the growth temperature range was 10–40 °C. Growth-promoting capability of secreting heteroauxinc (IAA), was also be detected. By analyses of 16S rRNA, *atpD*, *recA*, *gln II*, *nodC* and *nifH* sequences, we found that SCAUs8 clustered closely to *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110<sup>T</sup> with 100% similarities. [Conclusion] SCAUs8 was a good candidate matching with main planting cultivars of Sichuan soybean. This strain had alkaline and acid tolerance, wide growth temperature range and could secrete growth-promoting IAA, although the salt tolerance of it was weak. Phylogenic study proved that strain SCAUs8 was assigned as *B. diazoefficiens*.

**Keywords:** Rhizobia, Housekeeping genes, IAA, Symbiotic nitrogen-fixing

大豆是重要的粮食和油料作物,深受中国人民的喜爱,食用方式多种多样,用途广泛,且具有极高的营养价值<sup>[1]</sup>。大豆和大豆根瘤菌的共生体系,是根瘤菌与豆科植物共生体系中的典型代表,许多国家已经在大力推广接种大豆根瘤菌技术,但我国接种大豆根瘤菌却并不常见,因此在我国开展优良大豆根瘤菌株筛选和应用技术研究工作非常有意义。东北大豆产区为我国最大大豆产区,黄淮海地区是我国大豆第二大产区,对这两大产区的主栽大豆品种与生态环境匹配的优良菌株的研究相对较多<sup>[1-4]</sup>。针对干旱的西北大豆产区,优良大豆根瘤菌的筛选也有报道<sup>[5]</sup>。但针对南方大豆产区的大豆品种和生态环境相匹配的优良根瘤菌研究鲜见报道。

大豆根瘤菌与大豆品种之间的共生结瘤和固

氮能力存在差异,即大豆根瘤菌和大豆品种之间存在一定的共生匹配关系<sup>[2]</sup>,且环境因素也会影响根瘤菌的有效性<sup>[6]</sup>。同时,在某个区域内最为有效的根瘤菌往往来自于本地区或者与本地区条件相似地区的菌株<sup>[7-8]</sup>。近年来,四川大力发展大豆生产,大豆已成为四川主要粮食作物之一,播种面积在全国排名第6位,国家发改委将川渝大豆纳入国家“十二五”主要粮食作物,四川大豆引起了国家及省各级政府的重视<sup>[9-10]</sup>。因此,筛选与四川大豆主栽品种匹配性好的优良菌株是提高根瘤菌应用效果的重要途径,也是四川大豆高产优质、环境友好生产的技术支撑。从四川分离的大豆根瘤菌 SCAUs8 与四川主栽的夏大豆品种(也作秋大豆品种)“贡选1号”、“南豆12号”,鲜食大豆“春丰早”匹配性好,

但与春大豆品种“南豆 8 号”匹配性不理想<sup>[11]</sup>, 然而四川近年及以后大力发展的大豆是夏大豆<sup>[12-13]</sup>, 因此, 在四川大豆生产中 SCAUs8 具有制成较好接种剂的潜能。为此, 本研究将 SCAUs8 在四川两个主要的生态区: 四川丘陵区(夏大豆主产区)和干热的攀西地区(四川鲜食大豆的重要产区)进行田间接种, 如果田间应用效果好, 再考察其抗逆性和促生性, 以及用多位点基因序列分析技术确定其分类地位。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试菌株: SCAUs8。该菌株是本课题组分离, 前期工作初步筛选的与四川主栽品种“贡选 1 号”、“南豆 12”、“春丰早”共生匹配性均好的菌株<sup>[11]</sup>。

大豆品种: “贡选 1 号”和“于氏 8 号”。“贡选 1 号”, 主要作为四川大豆主栽的夏大豆和秋大豆品种。“于氏 8 号”是攀西地区主种鲜食大豆品种。

供试地点及土壤理化性质: 大田试验在四川农业大学雅安校区农场以及攀枝花市仁和区大龙潭乡进行, 雅安校区农场土壤理化性质为紫色湿润雏形土(紫色大土), pH 6.7、有机质 35.4 g/kg、全氮 0.7 g/kg、有效磷 31.2 mg/kg、速效钾 54.4 mg/kg; 攀枝花市仁和区大龙潭乡土壤理化性质为 pH 6.4、有机质 10.8 g/kg、全氮 0.9 g/kg、有效磷 9.3 mg/kg、速效钾 109.4 mg/kg。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 大田试验:** (1) 丘陵区——在四川雅安市雨城区的田间接种试验。

试验共设两个处理, 接种根瘤菌 SCAUs8 和不接种对照处理(CK), 设 3 次重复, 采用完全随机区组设计。豆种选择四川主栽品种“贡选 1 号”。种植中未施任何化学肥料。试验于 2013 年 5 月至 9 月进行。采用拌种法接种, 阴干后穴播, 播种时先播 CK。窝距 33 cm、每窝播 6 粒、行距 35 cm, 定苗 3 株。在植株盛花期(生育期 64 d)采样, 测定植株株高、根瘤数、地上部分植株干重; 收获期(生育期

131 d)测定产量。期间的管理按农户种植大豆的常规管理执行。试验数据用 Excel 2007 和 SPSS 17.0 进行统计分析。

(2) 攀西地区——在四川攀枝花仁和区的田间接种。

豆种为当地主栽品种“于氏 8 号”, 共设两个处理, 接种根瘤菌 SCAUs8 和不接种对照(CK)处理, 设 3 次重复。试验于 2013 年 5 月至 9 月进行。接种和播种方法与丘陵区相同。在植株初荚期(生育期 67 d)采样, 测定植株株高、根瘤数、地上部分植株干重; 收获期(生育期 98 d)测定产量。期间的管理按当地农户种植大豆的常规管理执行。试验数据用 Excel 2007 和 SPSS 17.0 进行统计分析。

**1.2.2 抗逆性和促生性测定:** 对供试菌株抗逆性主要进行了耐酸碱性、耐盐以及生长温度范围的测定。以 YMA 培养基<sup>[14]</sup>为基础培养基。

(1) 耐酸碱和耐盐性: 将供试菌在 YMA 培养基上进行活化培养。用 NaOH、HCl 将 YMA 培养基 pH 调至 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0 以测定供试菌对酸碱的耐受性; 在含有 NaCl 的 YMA 平板上, NaCl 终浓度依次为 0.5%、1.0%、2.0%、3.0%、4.0%、5.0%检测供试菌株的耐 NaCl 能力。均以 pH 7.0 的 YMA 平板为阳性对照, 采用点接种法, 重复 3 次, 28 °C 培养观察 7 d。

(2) 生长温度范围: 分别设定 10、20、40、60 °C (60 °C 热激处理 30 min 后于 28 °C 培养) 4 个处理, 测定供试菌株在不同温度下的生长情况, 阳性对照、接种和结果观察方法与抗逆性测定相同。

(3) 促生能力: 采用 Salkowski 比色法对供试菌进行分泌植物生长素(IAA)能力的测定。测定培养基采用改良的刚果红液体培养基<sup>[15]</sup>。将菌株接种于盛有 50 mL 培养基的三角瓶中, 28 °C、125 r/min 摇床培养, 3 次重复, 培养 12 d 后, 取根瘤菌悬浮液 100  $\mu$ L 置于白色塑料比色板上, 加 100  $\mu$ L 的比色液, 15 min 后观察颜色变化, 并记录结果。粉红色为阳性, 表示菌株能够分泌 IAA, 粉红色颜色越

深表示分泌 IAA 能力越大; 无色为阴性, 表示菌株不能分泌 IAA。在比色液中分别加入 10、30、50 mg/L IAA 作对照(CK<sub>1</sub>, CK<sub>2</sub>, CK<sub>3</sub>)进行粉红色颜色深度的比较。

**1.2.3 分类地位研究:** 采用 GUTC 法提取菌株 SCAUs8 总 DNA<sup>[16]</sup>, 对菌株 SCAUs8 分别进行 16S rRNA、*recA*、*atpD*、*glnII*、*nifH* 和 *nodC* 基因 PCR 扩增。以总 DNA 为模板, 采用通用引物 P1/P6、*recAF3/recAR3*、*atpDF3/atpDR*、GSII-1/GSII-2、*nifHF/nifHI*、*nodCFn/nodCR*, 并使用相应的扩增程序对供试菌株 SCAUs8 分别进行 16S rRNA、*recA*、*atpD*、*glnII*、*nifH* 和 *nodC* PCR 扩增<sup>[11]</sup>。PCR 扩增产用 Bio-Rad MyCycler™ 仪器, PCR 扩增产用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测后送英潍捷基(上海)公司进行序列测定。用软件 DNAMAN 6.0 进行基因序列相似度的计算。

测序得到 16S rRNA、*recA*、*atpD*、*gln II*、*nifH*、

*nodC* 基因序列, 在 NCBI 上获取代表菌株的方法及基因序列号的获得方法等参照文献[17]。用 MEGA 5.0 软件分别对测得的供试菌株各个基因序列与相似度高的模式菌株序列进行比对, 用邻接法(Neighbor-Joining)构建各个基因的系统发育树, 设定自展值(Bootstrap)为 1 000。

## 2 结果与分析

### 2.1 四川丘陵区的田间接种效果

在以雅安市雨城区为代表的丘陵区接种供试根瘤菌 SCAUs8 的效果见表 1。从表 1 可知, 接种 SCAUs8 的处理, 在盛花期植株干重与未接种 CK 的差异显著, 株高、根瘤数比 CK 高但其差异未达显著水平。接种 SCAUs8 处理的收获期产量为 2 955.87 kg/hm<sup>2</sup>, 比 CK 高 21.4%。可见, 接种的优良根瘤菌对植株盛花期以后生长的促进作用更明显。供试菌株 SCAUs8 是与主栽品种“贡选 1 号”匹

表 1 雅安市雨城区的田间接种效果  
Table 1 Effect of inoculating rhizobial SCAUs8 in Yucheng district Ya'an city

处理 Treatment	盛花期 Blooming stage			收获期 Harvest stage	
	株高 Plant height (cm)	植株干重 Dry weight (g/plant)	根瘤数 Number of nodules (per plant)	产量 Yield (kg/hm <sup>2</sup> )	比 CK 增产 The yield increased (%)
接种 SCAUs8 Inoculated with SCAUs8	75.58±2.08 <sup>ns</sup>	30.75±1.20*	24.5±4.5 <sup>ns</sup>	2 955.87±131.42*	21.4
对照 CK	70.64±3.66	20.39±1.98	22.2±2.3	2 435.76±96.04	

注: \*: 接种处理与相应对照之间的干重达 1% 的显著水平; <sup>ns</sup>: 接种处理与相应对照之间的干重未达显著水平。

Note: \*: Significant difference at 1% level; <sup>ns</sup>: No significant level.

表 2 攀枝花仁和区的田间接种效果  
Table 2 Effect of inoculating rhizobial SCAUs8 in Renhe district Panzhihua city

处理 Treatment	初荚期 Podding stage			收获期 Harvest stage	
	株高 Plant height (cm)	植株干重 Dry weight (g/plant)	根瘤数 Number of nodules (per plant)	产量 Yield (kg/hm <sup>2</sup> )	比 CK 增产 The yield increased (%)
接种 SCAUs8 Inoculated with SCAUs8	70.0±1.3**	18.61±0.62*	7.5±0.7	3 330.5±153.8**	29.7
对照 CK	60.6±3.3	14.63±0.94	4.4±0.9	2 567.2±58.7	

注: \*和\*\*分别表示接种处理与相应对照之间的干重达 1%、5% 的显著水平。

Note: \* and \*\* indicate significant difference at 1%, 5% level.

配性好、适合本生态区(四川丘陵区)大豆生产接种用的优良根瘤菌。

## 2.2 四川攀枝花仁和区的田间接种效果

在四川攀枝花仁和区“于氏8号”大豆生产中接种供试菌株 SCAUs8 的效果列于表2。接种 SCAUs8 的处理,在初荚期的株高、植株干重、根瘤数均显著高于CK。收获期的产量比CK增加29.7%,达显著水平。可见,供试根瘤菌 SCAUs8 与四川攀西地区主栽大豆品种“于氏8号”匹配性好,是适合攀西生态环境大豆生产的优良根瘤菌。

在四川两个典型的生态区的田间接种试验研究发现,接种供试根瘤菌 SCAUs8 后,植株干重、根瘤数和产量均高于不接种对照,且有显著的增产效果,可增产21%以上。可见,供试根瘤菌 SCAUs8 在四川丘陵区的夏大豆和秋大豆、以及攀西地区的鲜食大豆生产中具有推广应用潜力。

## 2.3 抗逆性和促生性测定

耐酸碱试验表明菌株 SCAUs8 在 pH 5.0–12.0 均能生长,在 pH 10.0 生长情况良好,但 pH 11.0 和 pH 12.0 平板上的长势不及 YMA 平板上的阳性对照,其生长受到一定程度的抑制。供试菌株 SCAUs8 的生长温度范围为 10–40 °C,经 60 °C 热激处理 30 min 后在 28 °C 培养也能生长,说明该菌株的生长范围较广,且能耐受短时高温。菌株 SCAUs8 只能在 NaCl 浓度为 0.5% 的条件下正常生

长,说明供试菌株的耐盐能力较差。促生能力测定表明菌株 SCAUs8 能分泌 IAA,且其比色反应为粉红色,粉红色深度介于两个阳性对照 CK<sub>1</sub> (IAA 10 mg/L) 和 CK<sub>2</sub> (IAA 30 mg/L) 之间,即菌株 SCAUs8 分泌 IAA 的量介于 10–30 mg/L 之间。

## 2.4 系统发育分析

供试菌株 SCAUs8 的 16S rRNA 基因扩增获得 1.4 kb 片段,从图1可以看出,供试菌株 SCAUs8 与 *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110<sup>T</sup> 处于同一系统发育分支,且相似性高达 100%。通过对 SCAUs8 的其他持家基因(*glnII*、*recA*、*atpD*)序列的测定可知,SCAUs8 的 *glnII*、*recA*、*atpD* 的系统发育地位与 16S rRNA 基因完全一致,在这3个基因的系统发育树中,菌株 SCAUs8 与模式菌株 *B. diazoefficiens* USDA110<sup>T</sup> 的相似性均高达 100%。因此,可判断供试菌株为 *B. diazoefficiens*。

图2显示,供试菌 *B. diazoefficiens* SCAUs8 的共生基因 *nifH* 和 *nodC* 的系统发育关系是一致的,与模式菌株 *B. diazoefficiens* USDA110<sup>T</sup> 处于同一系统发育分支,且相似性均为 100%,也与检测的4个持家基因的系统发育地位完全一致。说明 *B. diazoefficiens* SCAUs8 的共生基因是垂直进化的。

## 3 讨论与结论

在大田试验中,我们用盛花期植株地上部分的

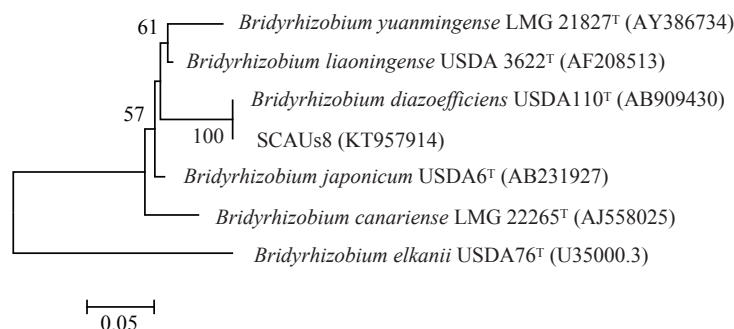


图1 SCAUs8 的 16S rRNA 基因系统发育分析

Figure 1 Phylogenetic relationship of 16S rRNA gene sequence of SCAUs8

Note: Bootstrap confidence  $\geq 50\%$  are given at the branching points. The scale bar represents 5% nucleotides substitutions. Sequence accession numbers are given in parentheses. Superscript<sup>T</sup> indicates the strains are type strains.

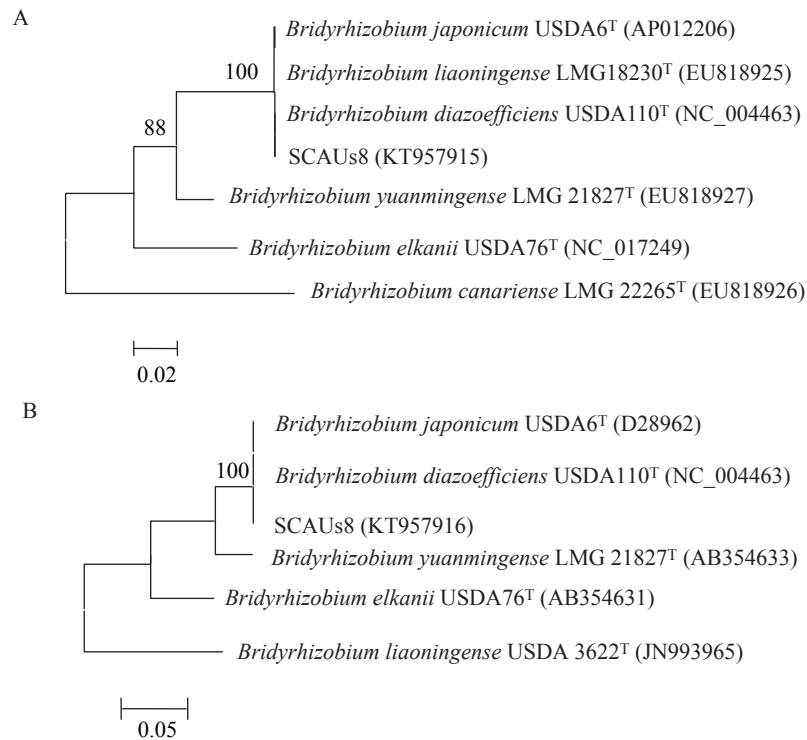


图 2 SCAUs8 的共生基因 *nifH* (A)、*nodC* (B) 系统发育关系

Figure 2 Phylogenetic relationship of *nifH* (A), *nodC* (B) gene sequence of SCAUs8

Note: Bootstrap confidence  $\geq 50\%$  are given at the branching points. The scale bar represents 2% (A), 5% (B) nucleotides substitutions. Sequence accession numbers are given in parentheses. Superscript <sup>T</sup> indicates the strains are type strains.

鲜重、干重等指标来检验菌株与宿主的共生固氮效果<sup>[18]</sup>。本试验供试菌株 SCAUs8 在雅安大田试验中盛花期植株鲜重、干重与对照相当或略有增加,并未达到显著水平。周涛等研究表明菌株 SCAUs8 在水培及盆栽试验中固氮效果均较好<sup>[18]</sup>,可初步排除供试菌株 SCAUs8 的低效是受宿主及土著根瘤菌的影响,而引起供试菌株 SCAUs8 盛花期低效的原因可能是,盆栽试验与大田试验的土壤理化性质和肥力不同使前期固氮效果受到了一定程度的抑制;到了收获期,高效菌株的固氮效果得以显著体现,接种 SCAUs8 菌剂的产量显著高于未接种(CK),增产 21.4%。在攀枝花地区大田试验中初荚期植株的干重、鲜重以及收获期的产量均比对照明显增加,收获期产量增产 29.7%。在大田试验中,两个地区所用的大豆品种并不一样,可见 SCAUs8 能够与四川地区两大主栽品种形成良好的共生体系。前文已提

到不同的外界环境会影响根瘤菌的有效性<sup>[6]</sup>,而供试菌株 SCAUs8 在两个不同地区均体现出高效性,充分说明 SCAUs8 能够适应不同的生态区。

根瘤菌在土壤中要发挥共生固氮作用,受到生物因素和非生物因素的双重影响。这就要求不仅要选育能与各类豆科作物高效共生的根瘤菌株,而且要考虑该菌株的抗逆性状及促生能力。一般根瘤菌最适生长的 pH 值为 6.7–7.5,过酸或过碱都会影响到根瘤菌的正常生长,供试菌株 SCAUs8, pH 生长范围为 5.0–12.0;生长温度范围较宽,能够在 10–40 °C 条件下正常生长,且 60 °C 热激处理 30 min 后,该菌株仍能够在 YMA 培养基上继续生长,可见供试菌株能够短时耐受高温。SCAUs8 能分泌 IAA,但耐盐能力较差,只能在不超过 0.5% NaCl 的条件下生长。

在中国分布最广的大豆根瘤菌是 *B.*

*japonicum*, 其次是 *S. fredii*, *B. elkanii* 在我国热带和亚热带分布较广, 还有一些分类地位不确定的 *Rhizobium* 菌株<sup>[8]</sup>。如黄土高原地区的大豆根瘤菌以 *S. fredii* 为主, 华北平原大豆根瘤菌主要有两个属: *Bradyrhizobium* 和 *Sinorhizobium*, 其中 *S. fredii* 占 68%<sup>[19-20]</sup>。*S. fredii* 和 *B. diazoefficiens* 是四川大豆根瘤菌的两个优势种<sup>[21-22]</sup>, 菌株经 16S rRNA、*glnII*、*recA*、*atpD* 多位点基因的系统发育研究得知供试菌株 SCAUs8 为 *B. diazoefficiens*, 并具有较强的环境适应性。综上, SCAUs8 在四川地区夏、秋大豆生产中具有较好的推广应用价值。

## 参 考 文 献

- [1] Dai XM, Liu YJ, Ye XM, et al. Soybean yield response to inoculation with genetically engineered strain LMG101 of *Sinorhizobium fredii*[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2003, 36(1): 66-70 (in Chinese)  
戴小密, 刘彦杰, 叶小梅, 等. 接种大豆根瘤菌 (*Sinorhizobium fredii*) 遗传工程菌株 LMG101 对大豆的增产效应[J]. 中国农业科学, 2003, 36(1): 66-70
- [2] Gao YG, Na JH, Gu H, et al. Characteristic analysis of climate change in Heilongjiang province during 1961-2003[J]. Journal of Northeast Forestry University, 2007, 35(5): 47-50 (in Chinese)  
高永刚, 那济海, 顾红, 等. 黑龙江省气候变化特征分析[J]. 东北林业大学学报, 2007, 35(5): 47-50
- [3] Wang CJ, Xu R, Zhang LF, et al. The situation of promotion soybean variety and trend of breeding development in region of Huang-Huai[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2006(5): 14-16 (in Chinese)  
王彩洁, 徐冉, 张礼凤, 等. 黄淮海地区大豆推广品种的状况与育种发展趋势[J]. 山东农业科学, 2006(5): 14-16
- [4] Li T, Guan DW, Li J, et al. Screening of superior soybean rhizobial strains and approach to inoculation methods for region of Huang Huai Hai[J]. Soybean Science, 2010, 29(4): 645-650 (in Chinese)  
李涛, 关大伟, 李俊, 等. 黄淮海地区优良大豆根瘤菌株的筛选与接种方式研究[J]. 大豆科学, 2010, 29(4): 645-650
- [5] Li J, Liu Q, Luo RP, et al. Survey of soil quality and soybean nodulation in Shanxi and Ningxia soybean production areas[J]. Soybean Science & Technology, 2010(5): 51-53 (in Chinese)  
李俊, 刘琦, 罗瑞萍, 等. 陕西、宁夏大豆产区土壤质量和大豆根瘤情况调查[J]. 大豆科技, 2010(5): 51-53
- [6] Serraj R, Sinclair TR, Purcell LC. Symbiotic N<sub>2</sub> fixation response to drought[J]. Journal of Experimental Botany, 1999, 50(331): 143-155
- [7] Jia RZ, Tian CF, Man CX, et al. Screening of high effective alfalfa rhizobial strains with a comprehensive protocol[J]. Annals of Microbiology, 2008, 58(4): 731-739
- [8] Chen WX, Wang ET. Rhizobium in China[M]. Beijing: Science Press, 2011 (in Chinese)  
陈文新, 汪恩涛. 中国根瘤菌[M]. 北京: 科学出版社, 2011
- [9] Zhang MR, Wu HY, Wu X, et al. Development status, problems and countermeasures of the major producing areas of soybean in Sichuan[J]. Soybean Science & Technology, 2009(5): 6-8 (in Chinese)  
张明荣, 吴海英, 吴迅, 等. 四川大豆主产区产业现状、存在的问题及发展对策[J]. 大豆科技, 2009(5): 6-8
- [10] Zhang MR, Wu HY, Liang JQ, et al. Current situation and future development of soybean production in Sichuan during 2011[J]. Soybean Science & Technology, 2012(4): 44-47 (in Chinese)  
张明荣, 吴海英, 梁建秋, 等. 2011年度四川大豆生产情况调研及发展对策[J]. 大豆科技, 2012(4): 44-47
- [11] Chen YX, Zhou T, Penttinen P, et al. Symbiotic matching, taxonomic position, and field assessment of symbiotically efficient rhizobia isolated from soybean root nodules in Sichuan, China[J]. Biology and Fertility of Soils, 2015, 51(6): 707-718
- [12] Yong TW, Yang WY, Ren WJ, et al. Promotion of soybean industry by popularization of relay-planting soybean in Sichuan province[J]. Crops, 2007(6): 5-8 (in Chinese)  
雍太文, 杨文钰, 任万军, 等. 发展套作大豆促进四川大豆产业发展[J]. 作物杂志, 2007(6): 5-8
- [13] Xiang DB, Guo K, Lei T, et al. Effects of phosphorus and potassium on stem characteristics and lodging resistance of relay cropping soybean[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2010, 32(3): 395-402 (in Chinese)  
向达兵, 郭凯, 雷婷, 等. 磷钾营养对套作大豆茎秆形态和抗倒性的影响[J]. 中国油料作物学报, 2010, 32(3): 395-402
- [14] Vincent JM. A manual for the Practical Study of the Root-nodule bacteria[M]. UK: Blackwell Scientific, Oxford, 1970
- [15] Xue XY, Feng RH, Guan DW, et al. Screening and analysis for efficient co-inoculation system of soybean rhizobia and plant growth-promoting rhizobacteria[J]. Soybean Science, 2011, 30(4): 613-619 (in Chinese)  
薛晓昀, 冯瑞华, 关大伟, 等. 大豆根瘤菌与促生菌复合系筛选及机理研究[J]. 大豆科学, 2011, 30(4): 613-619
- [16] Chen Q, Zhang XP, Li DY, et al. Isolation of DNA from the root nodule of legume plant[J]. Microbiology China, 2002, 29(6): 63-67 (in Chinese)  
陈强, 张小平, 李登煜, 等. 从豆科植物的根瘤中直接提取根瘤菌 DNA 的方法[J]. 微生物学通报, 2002, 29(6): 63-67
- [17] Xu KW, Penttinen P, Chen YX, et al. Symbiotic efficiency and phylogeny of the rhizobia isolated from *Leucaena leucocephala* in arid-hot river valley area in Panxi, Sichuan, China[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(2): 783-793
- [18] Zhou T, Chen YX, Zou YL, et al. Screening and preliminary application of high efficient soybean rhizobia strains in Sichuan province[J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2012, 18(1): 227-233 (in Chinese)  
周涛, 陈远学, 邹依霖, 等. 四川高效大豆根瘤菌的筛选及初步应用研究[J]. 植物营养与肥料学报, 2012, 18(1): 227-233
- [19] Zhang HX, Feng RH, Li J, et al. Genetic diversity and phylogeny of soybean rhizobia isolated from the regions of Loess Plateau in China[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2010, 50(11): 1466-1473 (in Chinese)  
张红侠, 冯瑞华, 李俊, 等. 黄土高原地区大豆根瘤菌的遗传多样性和系统发育[J]. 微生物学报, 2010, 50(11): 1466-1473
- [20] Zhang YM, Li Jr Y, Chen WF, et al. Biodiversity and biogeography of rhizobia associated with soybean plants grown in the North China Plain[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(18): 6331-6342
- [21] Xiong F, Chen YX, Zhang SL, et al. Genetic diversity and phylogeny of soybean rhizobia isolated from the Hilly Area of Central Sichuan in China[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2014, 54(6): 616-623 (in Chinese)  
熊峰, 陈远学, 张思兰, 等. 川中丘陵地区大豆根瘤菌遗传多样性与系统发育关系[J]. 微生物学报, 2014, 54(6): 616-623
- [22] Xiong F. Genetic diversity and phylogeny of soybean rhizobia in Sichuan, China[D]. Chengdu: Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2014 (in Chinese)  
熊峰. 四川大豆根瘤菌遗传多样性和系统发育研究[D]. 成都: 四川农业大学硕士学位论文, 2014