

黄河三角洲盐碱地大豆根瘤菌分离、鉴定与评价

郭捷^{1, 2, 3}, 杨芾^{1, 3}, 韩嘉诚¹, 韦善君^{2*}, 张晓霞^{1, 3*}

(1. 国家盐碱地综合利用技术创新中心, 山东 东营 257300; 2. 中央民族大学, 北京 100081; 3. 北方干旱半干旱耕地高效利用全国重点实验室, 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所, 北京 100081)

摘要: 为分离筛选盐碱地适生的大豆根瘤菌, 从山东省东营市黄河三角洲农业高新技术产业示范区中、重度盐碱地野大豆及主要栽培大豆品种的根瘤中分离共生根瘤菌, 鉴定其分类地位, 并评价其结瘤能力及促生功能。采用选择性培养基, 从不同大豆及野大豆根瘤样品中共分离获得 84 株纯培养物, 分属 3 个属 6 个种, 其中 96% 为剑菌属 (*Ensifer*)。功能评价结果表明, 所有菌株均能够产吡啶-3-乙酸 (IAA), 32 株可耐受 2% NaCl, 14 株具有产铁载体能力, 7 株能矿化有机磷, 14 株能溶解无机磷, 6 株产胞外多糖达 200 mg/L 以上。水培试验结果表明, 菌株 63-2-1-1、306-2-1-1 和 63-2-19-1 明显缓解了高盐对大豆幼苗胁迫作用。以上研究结果为开发大豆耐盐根瘤菌菌剂提供菌种资源, 对盐碱地大豆适生增产具有重要的实践价值。

关键词: 根瘤菌; 大豆; 分离鉴定; 盐胁迫; 促生能力

大豆 (*Glycine max*) 是重要的经济作物和油料作物, 我国大豆年均总消费量占据全球消费市场的 30%, 且近年来需求量仍在不断增大^[1]。我国是重要的大豆种植国, 也是大豆消费大国。联合国粮食与农业组织 (粮农组织) 统计显示, 2021 年大豆总产量中国位居世界第四^[2]。然而, 2021 年中国单位面积大豆产量相比前 21 年 (2000—2020 年) 平均产量仅增长 10.74%^[3]。因此, 我国大豆产量及单位面积产量的提高迫在眉睫。我国盐碱地面积达 3690 万 hm^2 , 仍然在持续增长^[4]。土壤盐渍化限制了我国农业持续发展, 是制约作物的产量与品质的主要非生物胁迫之一。当土壤中盐分含量超过 5 dS/m 时, 大豆生长就会受到抑制^[5]。盐碱地是我国重要的后备耕地资源, 利用盐碱地种植大豆, 是我国大豆产业发展的需要, 也是盐碱地合理开发利用的重要途径^[6]。挖掘改良盐碱地或者增强大豆耐盐性的方法成为解决这一问题的关键。

根瘤菌是一类广泛生活在土壤中的革兰氏阴

性细菌, 能够侵染豆科植物根部形成根瘤, 将空气中的氮转化为豆科植物可直接利用的氨, 提高土壤肥力, 从而提高豆科植物的产量^[7-9]。根瘤菌除具有固氮的作用外, 还有产吡啶-3-乙酸 (IAA)、胞外多糖 (EPS)、1-氨基环丙烷-1-羧酸脱氨酶 (ACC) 和铁载体活性, 以及溶磷和解钾等功能^[10-13]。大量研究表明, 接种根瘤菌不仅为豆科植物提供了充分的氮素, 同时研究表明, 分离自盐碱地的根瘤菌可以更好地缓解大豆盐胁迫, 提高盐碱地大豆产量, 具有良好的潜在应用价值^[14-17]。挖掘盐碱地根瘤菌资源, 充分发挥豆科根瘤菌的固氮作用, 是提高盐碱地产能、保障粮食安全的有效措施。基于此, 本研究针对性地以山东省东营市黄河三角洲的中、重度盐碱地大豆根瘤为分离源, 靶向分离筛选盐碱地适生的大豆根瘤菌, 对其进行功能评价, 最后通过水培试验考察根瘤菌增强大豆对 NaCl 胁迫的耐受能力, 为开发适用于盐碱地大豆根瘤菌菌剂提供优质种质资源, 也为进一步合理开发利用盐碱地奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要培养基及营养液

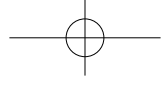
甘露醇酵母汁肉汤 (YMB): 甘露醇 10.0 g、酵母粉 1.0 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g、NaCl 0.1 g、 K_2HPO_4 0.5 g、 CaCO_3 3.0 g、蒸馏水 1 L。

收稿日期: 2024-09-11; 录用日期: 2024-10-27

基金项目: 中国农业科学院科技创新工程 (CAAS-ZDRW202407)。

作者简介: 郭捷 (1995-), 硕士, 研究方向为农业微生物资源利用。E-mail: gj319098470@163.com。

通讯作者: 韦善君, E-mail: wei.s.j@163.com; 张晓霞, E-mail: zhangxiaxia@caas.cn。



甘露醇酵母汁琼脂培养基 (YMA): YMB 培养基中加入琼脂 20.0 g。

TY 培养基: 胰蛋白胨 5.0 g、酵母粉 3.0 g、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.3 g、蒸馏水 1 L、琼脂 20.0 g。

蒙金娜无机磷培养基: 葡萄糖 10.0 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g、NaCl 0.2 g、KCl 0.2 g、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5.0 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.03 g、 FeSO_4 0.003 g、酵母粉 0.5 g、蒸馏水 1 L、琼脂 12 g。

蒙金娜卵磷脂培养基: 葡萄糖 10 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g、NaCl 0.3 g、KCl 0.3 g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.03 g、蛋黄卵磷脂 (提前加热溶解于蒸馏水) 0.2 g、 CaCO_3 5.0 g、酵母粉 0.4 g、蒸馏水 1 L、琼脂 12 g。

松本哲良营养液^[18]: 组分 A: KH_2PO_4 8.8 g、KCl 62.0 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 100.0 g; 组分 B: CaCl_2 86.0 g; 组分 C: 柠檬酸铁 12.0 g; 组分 D: NaNO_3 12.0 g、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.4 g、 ZnSO_4 0.1 g、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g、 H_3BO_3 0.1 g、 Na_2MoO_4 0.02 g, 以上组分分别溶于 1 L 蒸馏水。使用时将各组分母液等体积混合后用蒸馏水稀释 200 倍。

1.2 根瘤采集

根瘤样品采自山东省东营市广饶县山东农业科学院现代农业综合实验示范基地 ($37^\circ 30' 75'' \text{N}$, $118^\circ 62' 69'' \text{E}$), 采集植物种类包括野大豆和齐黄 34、中黄 306、中黄 319、中黄 74、中豆 63、油豆 6019 等耐盐碱品种, 盛花期采集根瘤样品, 冷藏条件下转移至实验室 4°C 储存。

1.3 根瘤菌分离培养

将大豆根部的完整根瘤摘下, 放入无菌锥形瓶内, 流水冲洗过夜; 之后进行消毒处理: 先用 75% 酒精浸泡 30 s, 再用含 4% 有效氯的次氯酸钠溶液浸泡 4 min, 最后使用无菌水冲洗 10 次。用无菌镊子将根瘤夹破, 将创伤面粘贴于含有 1% 刚果红的 YMA 平板上, 28°C 培养 2 ~ 4 d。根据菌落形态、颜色、粘稠度和表面光滑程度等特征, 挑取疑似根瘤菌的单菌落进行划线纯化, 然后用 40% 甘油保存于 -80°C 冰箱中。

1.4 根瘤菌的分子鉴定

挑取适量菌体于装有 30 μL 无菌水的离心管中, 沸水浴 10 min, 然后置于 -20°C 冰箱中冷冻 30 min, 取出离心管化冻, 10000 r/min 离心 3 min, 取上清液为 PCR 模板。使用 16S 通用引物 27F ($5'-\text{AGAGTTTGATCMTGGCTCAG}-3'$) 和 1492R

($5'-\text{GGTTACCTTGTTACGACTT}-3'$) 对根瘤菌的 16S rRNA 基因序列进行 PCR 扩增。体系为 50 μL : $2 \times \text{Taq PCR StarMix}$ 25 μL , 上、下游引物各 2 μL , DNA 模板 4 μL , ddH₂O 17 μL 。反应程序为 94°C 预变性 3 min; 94°C 变性 30 s、 55°C 退火 30 s、 72°C 延伸 150 s, 30 个循环; 72°C 终延伸 10 min, 4°C 保存。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳测试合格后送往上海生物工程股份有限公司测序, 测序结果上传至 EzBioCloud 数据库 (<https://www.ezbiocloud.net/>) 进行在线比对, 明确菌株的分类地位。使用 MEGA X 软件对菌株分类地位进行分析; 首先将菌株的 16S rRNA 基因序列通过 MUSCLE 对齐, 随后采用最大似然法 (Maximum-likelihood, ML) 构建系统发育树, 自举值为 1000。

1.5 根瘤菌耐盐和促生能力评价

1.5.1 耐盐能力测定

供试菌株接种于盛有 10 mL TY 液体培养基的 20 mL 摇菌管中, 180 r/min、 28°C 培养 2 d, 调整菌液浓度至 OD_{600} (600 nm 的吸光度值) = 1 备用。设置 9 个 NaCl 浓度梯度 (0%、0.4%、0.8%、1.2%、1.6%、2%、2.4%、2.8% 和 3.2%) 的 YMA 液体培养基, 取 1 mL $\text{OD}_{600}=1$ 的菌液接种于 10 mL 不同浓度 NaCl 的 YMA 液体培养基的摇菌管中, 每个梯度 3 次重复, 180 r/min、 28°C 培养 2 d, 测定菌液 OD_{600} 值。

1.5.2 产吲哚-3-乙酸 (IAA) 能力测定

供试菌株接种于盛有 10 mL 含 0.2 g/L 色氨酸的 YMA 液体培养基的 20 mL 摇菌管中, 每个处理 3 个重复, 28°C 、180 r/min 培养 4 d。取培养菌悬液适量于 1.5 mL 离心管中, 8000 r/min、 4°C 离心 10 min。吸取 50 μL 上清液滴于白色瓷板上, 同时滴加 50 μL Salkowski 比色液, 以等量不接菌的培养基为空白对照; 避光显色 30 min 后观察颜色变化, 若颜色变成粉色, 表明该菌株能够产生 IAA。迅速测定发生颜色变化菌液在 530 nm 波长处的吸光度, 根据标准曲线计算 IAA 的含量, 以此对根瘤菌产 IAA 的能力进行初步定量分析。标准曲线采用分析纯的 IAA 标准品绘制而成^[19]。

1.5.3 产胞外多糖 (EPS) 能力测定

供试菌株接种于盛有 100 mL YMA 液体培养基的锥形瓶中, 180 r/min、 28°C 培养 4 d。取适量菌液 10000 r/min、 4°C 离心 10 min, 上清液即为根瘤菌胞外多糖粗提液^[20]。采用硫酸-蒽酮法测定 EPS 含量^[21]。

1.5.4 溶磷能力定性测定

供试菌株点接在蒙金娜无机磷培养基和蒙金娜卵磷脂培养基上,每株菌重复3次,28℃培养4 d,如果菌落周围有透明圈产生,表明该菌具有解磷能力^[22]。

1.5.5 产铁载体能力定性测定

供试菌株点接到CAS检测培养基上,每株菌重复3次,28℃培养2 d。菌落周围产生橙黄色晕圈,表明该菌株为产铁载体阳性菌^[23]。

1.6 大豆水培试验

试验用大豆种子购买自哈尔滨团贸食品有限公司。采用滤纸桥法^[24]进行水培试验。试管中加入60 mL 松本哲良营养液,用无菌棉密封管口后,于0.1 MPa、121℃条件下灭菌20 min。将供试菌株震荡制成 $OD_{600}=1.0$ 的菌悬液,置于4℃冰箱保藏备用。

选取大小均一的大豆种子进行种子表面消毒(消毒方法与根瘤消毒方法一致,见1.3),消毒后的种子用无菌水浸泡5 h,再点植于盛有琼脂(0.7%)的一次性塑料盒内,避光室温催芽48 h。取萌发状态基本一致的种子于无菌培养皿中,倒入10 mL 菌悬液,浸泡30 min。用一次性镊子将2粒种子播种于滤纸桥凹槽内,浸种后的菌液倒入试管中,棉花团轻塞住试管口,于25℃(光)/16℃(暗),光周期14 h的光照培养箱中培养。待大豆长出两片真叶时,将棉花团去掉,保留每支试管中长势相似的1株大豆。每个菌种设置15支试管。

培养至15、20、25 d时,将试管中的营养液更换为含0.4% NaCl的松本哲良营养液,对照处理为不含NaCl的松本哲良营养液。30 d后测量大豆的株高、地上部鲜重、地下部鲜重、地上部干重、地下部干重、根瘤数量、根瘤重量和结瘤率(结瘤率=结瘤植株数量/试验植株总数×100%)。

1.7 数据处理

对大豆促生长效应的试验数据采用Excel 2010分析,不同处理之间的差异采用SPSS 23.0的单因素方差分析法,图形采用GraphPad Prism 7绘制。

2 结果与分析

2.1 根瘤菌分离鉴定结果

从大豆根瘤样品中共分离出84株菌株,分属于假单胞菌门(*Pseudomonadota*)和芽孢杆菌门(*Bacillota*)的3个属和6个种(图1)。

从属水平上看,他们分属于剑菌属(*Ensifer*)、土壤杆菌属(*Agrobacterium*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*);优势属为剑菌属,占总数的96%。在种水平上,它们分属于碱土剑菌(*E. alkanisoli*)、弗氏剑菌(*E. fredii*)、黄豆剑菌(*E. sojae*)、康农杆菌(*A. fabrum*)、放射杆状土壤杆菌(*A. radiobacter*)、森林土类芽孢杆菌(*P. terreus*),其中弗氏剑菌占有菌株的74%,为优势菌种。

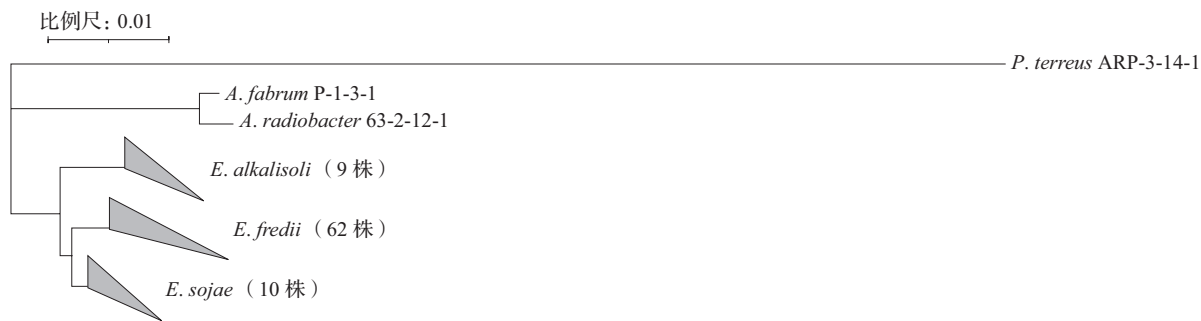


图1 分离菌株基于16S rRNA基因序列构建的最大似然法系统发育树

2.2 菌株耐盐性测定结果

对81株根瘤菌进行了耐盐性试验,根据菌株在盐梯度培养基中的生长情况,将所测试的菌株分为两组。第一组中包括32株菌株(占比38%),能够在浓度为0.4%~2.0%的NaCl条件下生长,当NaCl浓度 $\geq 2.4\%$ 时,生长受到显著抑制。图2a为该组代表菌株63-2-1-1的NaCl耐受曲线。第二组包括(占比62%)菌株49株,对NaCl相对敏感,当NaCl浓

度为0.4%时生长受明显的抑制作用,图2b为该组代表性菌株63-1-17-1的NaCl耐受曲线。耐盐组包括28株*E. fredii*、1株*E. alkanisoli*以及3株*E. sojae*,盐敏感组包括35株*E. fredii*、7株*E. alkanisoli*以及7株*E. sojae*。说明盐碱地根瘤菌耐盐性不仅在种水平上有差异,同一种不同分离株的耐盐能力也有显著分化。

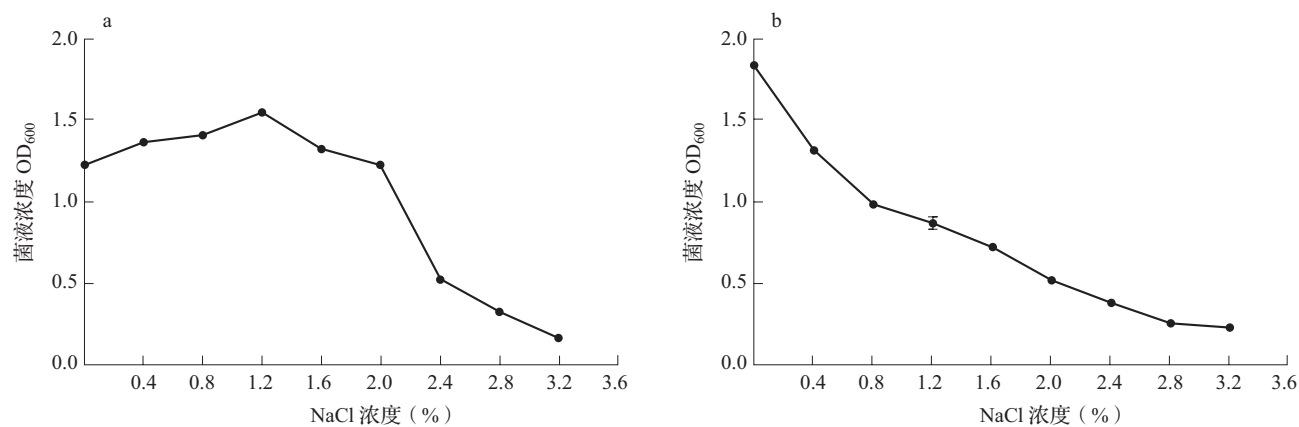


图2 代表菌株的 NaCl 耐受性曲线

注: a 为耐盐组, b 为敏感组。

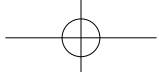
2.3 促生长功能鉴定结果

对 32 株耐盐组根瘤菌进行 IAA、EPS、铁载体、溶磷等功能评价结果见表 1。有 12 株菌株产 IAA 能力达到 20.00 mg/L 以上, 其中菌株 63-2-1-1 产 IAA 能力最强, 达到 29.90 mg/L; 产铁载体的有 14 株; 能够矿化有机磷的有 7 株, 能够溶解无机磷的有 14 株, 其中有 3 株菌兼具两

种解磷功能; 产 EPS 200.00 mg/L 以上的菌有 7 株, 其中菌株 ARP-3-12-1 产 EPS 最多, 达到 258.27 mg/L。综合以上指标检测结果, 菌株 63-2-1-1、63-2-19-1、63-3-4-1、306-2-1-1、AR-3-12-1、P-3-6-1 的功能评价优良, 值得进一步验证其对植物的促生长效应。

表 1 耐盐组菌株功能评价

菌株编号	菌株名称	产吡啶乙酸能力 (mg/L)	产胞外多糖能力 (mg/L)	产铁载体	溶磷	
					有机磷	无机磷
63-1-3-1	<i>E. fredii</i>	14.43	87.20	-	-	+
63-2-1-1	<i>E. fredii</i>	29.90	159.72	-	+	+
63-2-2-1	<i>E. fredii</i>	21.49	159.72	-	-	-
63-2-19-1	<i>E. fredii</i>	19.86	183.01	+	+	+
63-3-4-1	<i>E. fredii</i>	19.05	199.42	+	+	-
63-3-12-2	<i>E. fredii</i>	17.78	156.81	-	+	-
63-3-14-1	<i>E. fredii</i>	21.67	43.01	-	-	-
74-3-8-1	<i>E. fredii</i>	28.29	92.01	+	-	-
306-2-1-1	<i>E. fredii</i>	23.51	241.62	+	+	+
306-2-10-1	<i>E. fredii</i>	6.86	179.53	-	-	+
306-3-35-1	<i>E. fredii</i>	19.19	152.59	+	-	-
319-3-7-1	<i>E. fredii</i>	9.23	169.73	-	-	-
319-3-7-2	<i>E. fredii</i>	14.24	153.12	-	-	-
319-3-10-1	<i>E. fredii</i>	11.17	48.48	+	-	-



续表

菌株编号	菌株名称	产吲哚乙酸能力 (mg/L)	产胞外多糖能力 (mg/L)	产铁载体	溶磷	
					有机磷	无机磷
319-3-10-2	<i>E. fredii</i>	13.82	183.53	+	-	-
319-3-13-1	<i>E. fredii</i>	23.41	103.41	-	-	+
AR-1-1-1	<i>E. sojae</i>	10.51	46.96	+	-	-
AR-1-4-1	<i>E. fredii</i>	16.33	158.94	+	-	-
AR-1-5-1	<i>E. alkalisoli</i>	13.75	157.80	+	-	-
AR-1-8-1	<i>E. sojae</i>	10.25	166.95	+	-	-
AR-1-10-1	<i>E. sojae</i>	12.41	124.32	-	-	-
AR-3-18-1	<i>E. fredii</i>	10.11	103.30	+	-	-
ARP-3-12-1	<i>E. fredii</i>	20.04	258.27	+	+	+
CK-1-1-1	<i>E. fredii</i>	18.33	256.80	-	+	-
CK-3-15-1	<i>E. fredii</i>	21.84	177.17	-	-	+
F-2-5-2	<i>E. fredii</i>	8.96	165.39	-	-	-
P-1-1-1	<i>E. fredii</i>	25.80	229.01	-	-	+
P-2-8-1	<i>E. fredii</i>	26.80	172.68	-	-	+
P-3-2-1	<i>E. fredii</i>	17.61	211.10	-	-	+
P-3-6-1	<i>E. fredii</i>	20.76	225.59	+	-	+
P-3-7-1	<i>E. fredii</i>	6.96	221.15	-	-	+
P-3-9-1	<i>E. fredii</i>	3.50	158.76	-	-	+

注：“+”表示结果阳性；“-”表示结果阴性。字体加粗表示用于水培试验的菌株。

2.4 促大豆生长效应

不同处理的大豆幼苗在 0.4% NaCl 胁迫下培养 30 d 后农艺性状如图 3 所示。结果表明，除处理组 ARP-3-12-1 外（图 3a），其余 5 组菌株处理大豆幼苗的株高显著高于对照组（ $P<0.05$ ）；菌株 63-2-1-1 的处理对大豆幼苗株高的影响最为明显，相比对照增加了 41.29%。所有处理组大豆植株地上部鲜重的积累较对照均具有显著升高，其中 63-2-1-1、63-2-19-1 和 63-3-4-1 处理组最优，分别增加了 82.83%、84.77% 和 83.89%（图 3b）。所有处理组大豆植株地下部鲜重均高于对照组，但只有 4 个处理组（63-2-1-1、63-2-19-1、306-2-1-1 和 ARP-3-12-1）与对照组相比具有显著性差异（ $P<0.05$ ），分别增加了 16.17%、35.99%、50.83% 和 39.62%（图 3c）；其中 306-2-1-1 处理组与其

他处理组相比差异极显著（ $P<0.01$ ），能够极大地促进植株地下部鲜重的积累。除处理组 ARP-3-12-1 的大豆植株地上部干重无显著差异外，其余 6 个处理组均极显著（ $P<0.01$ ）高于对照组，与株高结果具有一致性；63-3-4-1 处理组相比对照组增加了 43.89%，植株地上部干重的积累量最为显著（图 3d）。7 个处理组的大豆植株地下部干重的增加范围为 6.16% ~ 40.94%（图 3e），其中 63-2-1-1、306-2-1-1、ARP-3-12-1 处理组最为明显，与对照组相比差异显著（ $P<0.05$ ）。

大豆植株结瘤情况统计见表 2。盐胁迫下，6 个处理组大豆植株结瘤率为 100%。其中 63-2-1-1 的处理组根瘤数量最多，与其他处理组有极显著差异（ $P<0.01$ ）。各处理之间的根瘤鲜重没有显著性差异。

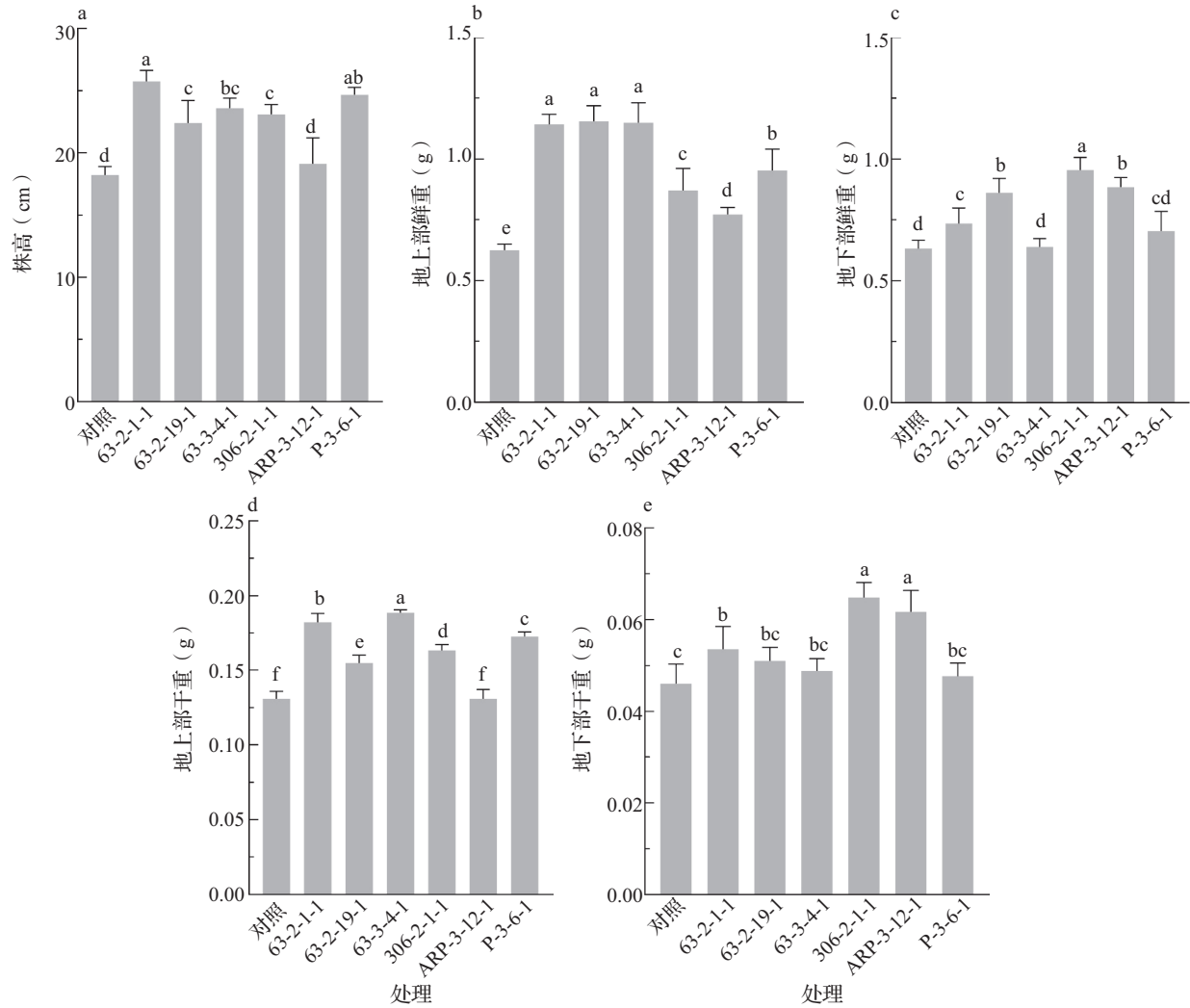


图3 盐胁迫下不同处理大豆幼苗农艺性状的比较

注: 不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$)。下同。

表2 接种不同根瘤菌对盐胁迫下大豆结瘤的影响

菌株编号	根瘤数量 (个)	根瘤鲜重 (g)	结瘤率 (%)
63-2-1-1	9.33 ± 1.53a	0.019 ± 0.006a	100
63-2-19-1	6.50 ± 0.56b	0.021 ± 0.002a	100
63-3-4-1	6.67 ± 2.08b	0.017 ± 0.003a	100
306-2-1-1	7.00 ± 1.00b	0.020 ± 0.007a	100
ARP-3-12-1	2.33 ± 0.58c	0.019 ± 0.001a	100
P-3-6-1	3.83 ± 0.75c	0.018 ± 0.011a	100

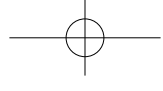
3 讨论

本研究从山东省东营市黄河三角洲地区中、重度盐碱地野大豆和栽培大豆的根瘤中分离培养了81株根瘤菌菌株,16S rRNA 基因序列分析表明其分属剑菌属3个种。通过耐盐、EPS、溶磷、产铁载体和产 IAA 能力测定,以及大豆水培试验等综

合评价,获得了6株功能评价良好且具有缓解大豆 NaCl 胁迫功能的根瘤菌株。

根瘤菌作为豆科植物的共生菌,对豆科植物吸收氮元素和适应环境有重要作用。从植物根瘤中能够分离培养获得大量的根瘤菌资源,可用于豆科植物微生物肥料生产。王晓丽等^[25]从不同大豆品种根瘤中分离出203株菌,其中快生型中华根瘤菌属占比85%;杨晏哲等^[26]从滨海地区大豆根瘤中分离的中华根瘤菌属占比95%,具有绝对优势。有研究证实中华根瘤菌属(*Sinorhizobium*)等快生型根瘤菌在碱性土壤中占据优势,慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)在中性土壤中则更为丰富^[27]。本研究结果也发现,快生型根瘤菌剑菌属为东营滨海型盐碱地区野生大豆和栽培大豆根瘤中的绝对优势类群,该结果印证了根瘤菌优势属因土壤性质不同而有较大差异。

对豆科植物接种根瘤菌,是目前国际上公认



的实现豆科作物高效种植的有效方式^[28]。相较于化肥,豆科植物与根瘤菌的有机结合更符合成本节约、利用高效、环境友好的“绿色农业”要求^[29]。已有研究表明,豌豆(*Pisum sativum*)和鹰嘴豆(*Cicer arietinum*)等豆科植物接种根瘤菌后,萌发率、株高、产量抗逆性等指标得到显著提高^[30]。接种能够分泌 IAA 的日本慢生根瘤菌可以使绿豆幼苗生物量显著提高^[31]。朱瑞芬等^[32]从紫花苜蓿根瘤中分离出的根瘤菌具有溶磷能力,回接植物后能显著提高地上部生物量。对豆科植物接种 EPS 产量高的根瘤菌株能够有效改善盐胁迫条件下作物的形态、理化特性^[33]。本研究对 32 株耐 2% NaCl 的根瘤菌进行功能评价,获得了一批 IAA 和 EPS 产量高、产铁载体、溶有机磷与无机磷的菌株。具有耐盐特性的根瘤菌的应用,不仅能提高土壤氮素的利用率,同时也能增加植物的生物量,减少盐胁迫对植物的伤害^[34]。刘谢香等^[35]建立了一种以成苗率、株高、地上部鲜重、根鲜重、地上部干重和根干重为鉴定指标的大豆出苗期耐盐性评价方法。本研究采用此方法评价了接种根瘤菌后对大豆盐胁迫的缓解作用,结果表明,有 6 株根瘤菌在盐胁迫条件下具有明显的大豆幼苗促生作用。根瘤菌与豆科植物之间的共生效应受双方面遗传因素调控,涉及多个关键功能基因^[36]。例如,高虹^[37]对紫花苜蓿共接种根瘤菌 GL1+LJL-11,转录组和代谢组联合分析结果表明,类黄酮生物合成、植物激素信号转导等差异基因上调,黄酮类化合物和碳水化合物等代谢物含量增加,促进了根瘤菌的定殖和根瘤的固氮能力,初步揭示了接种根瘤菌后紫花苜蓿耐盐性提高的机制。黄巧玥等^[38]通过超高效液相色谱和实时荧光定量技术,从多胺代谢方面挖掘了根瘤菌提高野生大豆耐盐性的生理机制。本研究从东营盐碱地获得了 3 株耐盐促生长效应效果良好的根瘤菌,它们与大豆的互作机制值得进一步研究。此外,本研究还发现,同一盐碱地根瘤菌的盐敏感度有明显差异,进一步探究盐敏感性不同菌株之间的遗传差异将有助于培育更优质的根瘤菌。

4 结论

本研究从山东省东营市黄河三角洲地区中、重度盐碱地野大豆和栽培大豆的根瘤中分离获得根瘤菌 81 株,其中 32 株可耐受 2% 的 NaCl,菌株 63-2-1-1、306-2-1-1 和 63-2-19-1 可有效减缓高

盐对大豆幼苗的胁迫作用。本研究结果为进一步开发大豆盐碱适生的微生物肥料提供资源储备,将有助于盐碱地大豆产量提升。

参考文献:

- [1] 刘梅芳,樊琦. 中国大豆消费、生产和进口现状及存在的问题[J]. 粮食科技与经济, 2021, 46(6): 28-35.
- [2] FAO.FAOSTAT: crops and livestock products [EB/OL]. [2024-1-5]. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>.
- [3] FAO.FAOSTAT: food and agriculture organization of the United Nations [EB/OL]. [2022-1-5]. <https://www.fao.org/faostat/zh/#data/QCL>.
- [4] 杨劲松,姚荣江,王相平,等. 中国盐渍土研究: 历程、现状与展望[J]. 土壤学报, 2022, 59(1): 10-27.
- [5] Chen H T, Cui S Y, Fu S X, et al. Identification of quantitative trait loci associated with salt tolerance during seedling growth in soybean (*Glycine max* L.) [J]. Australian Journal of Agricultural Research, 2008, 59(12): 1086-1091.
- [6] Wang G Z, Ni G, Feng G, et al. Saline-alkali soil reclamation and utilization in China: progress and prospects [J]. Frontiers of Agricultural Science and Engineering, 2024, 11(2): 216-228.
- [7] Rafique M, Naveed M, Mustafa A, et al. The combined effects of gibberellic acid and rhizobium on growth, yield and nutritional status in chickpea (*Cicer arietinum* L.) [J]. Agronomy, 2021, 11(1): 105.
- [8] Graham P H, Vance C P. Legumes: importance and constraints to greater use [J]. Plant Physiology, 2003, 131(3): 872-877.
- [9] Umar W, Ayub M A, Rehman M Z, et al. Nitrogen and phosphorus use efficiency in agroecosystems [J]. Springer, 2020, 213-257.
- [10] 胡倡,李慧明,伍惠,等. 解磷菌和根瘤菌复合接种对大豆和紫云英共生固氮的影响[J]. 华中农业大学学报, 2020, 39(4): 38-45.
- [11] 甄涛,周舒扬,赵晓宇. 大豆根瘤菌胞外多糖含量与结瘤的关系研究[J]. 黑龙江科学, 2019, 10(22): 34-35, 39.
- [12] Halimursyadah H, Syafruddin S, Syamsuddin S, et al. Screening of indigenous rhizobacteria isolates from patchouli rhizosphere producing HCN, siderophores and chitinolytic enzymes [J]. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2023, 1183(1): 012096.
- [13] Veerasamy P L, Zakry F A A, King W S, et al. Indole-3-acetic acid production by rhizobacteria *Bacillus* spp. To various abiotic stress factors [J]. Journal of Phytology, 2021, 13: 85-90.
- [14] Cecilia P I, Ivana T P, Miguel A, et al. Effects of inoculation with stress-tolerant rhizobia on the response of alfalfa (*Medicago sativa* L.) to combined salinity and cadmium stress [J]. Plants, 2023, 12(23): 3972.
- [15] Ayuso C M, Flores F J D, Amaro F, et al. Effect of rhizobium mechanisms in improving tolerance to saline stress in lettuce plants [J]. Chemical and Biological Technologies in Agriculture, 2023, 10: 1-12.

- 2023, 10 (1): 89–108.
- [16] Palma M S, Mógor Á F, Mógor G, et al. Microalga added to *Bradyrhizobium* inoculant improve soybean tolerance to salt stress [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2022, 34 (5): 2489–2505.
- [17] Win K T, Wasai H S, Tanaka F, et al. Synergistic N₂-fixation and salt stress mitigation in soybean through dual inoculation of ACC deaminase-producing *Pseudomonas* and *Bradyrhizobium* [J]. *Scientific Reports*, 2023, 13 (1): 17050.
- [18] 王雪翠, 马晓彤, 韩梅, 等. 青海箭筈豌豆根瘤菌的筛选及其共生体耐盐性研究 [J]. *草业学报*, 2016, 25 (8): 145–153.
- [19] 郭英, 杨萍, 张丹雨, 等. 野大豆多功能根际促生菌的筛选鉴定和促生效果研究 [J]. *生物技术通报*, 2018, 34 (10): 108–115.
- [20] 殷爱华, 韩素芬. 豆科树种凝集素和根瘤菌胞外多糖结合反应与结瘤的关系 [J]. *南京林业大学学报 (自然科学版)*, 2005 (5): 88–90.
- [21] 谢心文, 门磊, 孙怡, 等. 蕙酮-硫酸法测定复方木鸡颗粒中粗多糖 [J]. *中成药*, 2019, 41 (7): 1685–1687.
- [22] 陈苏, 简敏菲, 张晓, 等. 东乡野生稻根际促生菌分离筛选及其促生作用的研究 [J]. *中国土壤与肥料*, 2022 (10): 222–230.
- [23] 热孜亚·吐尔逊. 鄯善地区黑果枸杞根际微生物特征及耐盐促生菌的筛选和促生特性研究 [D]. 乌鲁木齐: 新疆师范大学, 2022.
- [24] 梁静. 黄河三角洲野大豆根瘤菌多样性及耐盐促生菌株筛选 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2021.
- [25] 王晓丽, 秦杰, 王敏, 等. 山西大豆根瘤菌的分离、鉴定及共生匹配性筛选 [J]. *生物技术通报*, 2022, 38 (3): 59–68.
- [26] 杨晏哲, 梁静, 隋晓娜, 等. 滨海盐渍土野大豆根瘤菌分离筛选及其在大豆中的应用 [J]. *微生物学报*, 2023, 63 (11): 4154–4166.
- [27] Ming Y Z, Ying L, Feng W C, 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.
- [28] 全紫曼, 陈远学, 刘明, 等. 成都平原蚕豆高效根瘤菌的筛选及其促生功能初步评价 [J]. *植物营养与肥料学报*, 2019, 25 (6): 943–952.
- [29] Telles T S, Nogueira M A, Hungria M. Economic value of biological nitrogen fixation in soybean crops in Brazil [J]. *Environmental Technology and Innovation*, 2023, 31: 103158.
- [30] 谭雪艳, 李成义, 刘书斌, 等. 豆科药用植物与根瘤菌共生体系研究进展 [J]. *中药材*, 2024 (3): 767–773.
- [31] Kiruthika S, Arunkumar M, Agbodjato N A, et al. A comprehensive study on IAA production by *Bradyrhizobium japonicum* and *Bacillus subtilis* and its effect on *Vigna radiata* plant growth [J]. *Indian Journal of Agricultural Research*, 2021, 55 (5): 570–576.
- [32] 朱瑞芬, 刘杰淋, 王建丽, 等. 黑土区紫花苜蓿根瘤菌特性研究与促生能力分析 [J]. *草地学报*, 2017, 25 (6): 1317–1323.
- [33] Liu X T, Chai J L, Zhang Y C, et al. Halotolerant rhizobacteria mitigate the effects of salinity stress on maize growth by secreting exopolysaccharides [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2022, 204: 105098.
- [34] Irshad A, Rehman R N U, Abrar M M, et al. Contribution of rhizobium-legume symbiosis in salt stress tolerance in *Medicago truncatula* evaluated through photosynthesis, antioxidant enzymes, and compatible solutes accumulation [J]. *Sustainability*, 2021, 13 (6): 3369.
- [35] 刘谢香, 常汝镇, 关荣霞, 等. 大豆出苗期耐盐性鉴定方法建立及耐盐种质筛选 [J]. *作物学报*, 2020, 46 (1): 1–8.
- [36] 高运来, 吕浩, 孙雨田, 等. 大豆耐盐根瘤菌的分离鉴定及宿主结瘤特性分析 [J]. *分子植物育种*, 2021, 12 (23): 1–11.
- [37] 高虹. 共接种根瘤菌和 PGPR 对盐碱胁迫下紫花苜蓿产量和品质的影响研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨师范大学, 2023.
- [38] 黄巧玥, 李陈亚, 程聪, 等. 预接种根瘤菌提高野生大豆幼苗耐盐性与多胺代谢的关系 [J]. *南京农业大学学报*, 2025, 48 (2): 337–347.

Isolation, identification, evaluation of soybean rhizobia from saline-alkali soil in Yellow River Delta

GUO Jie^{1, 2, 3}, YANG Fu^{1, 3}, HAN Jia-cheng¹, WEI Shan-jun^{2*}, ZHANG Xiao-xia^{1, 3*} (1. Construction of the National Saline-alkali Soil Comprehensive Utilization Technology Innovation Center, Dongying Shandong 257300; 2. Minzu University of China, Beijing 100081; 3. State Key Laboratory of Efficient Utilization of Arable Land in China, Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: To isolate and screen soybean rhizobia suitable for promoting growth, soybean symbiotic rhizobia were isolated and screened from the wild and major cultivated soybean varieties in moderate to severe saline-alkali soil of the Yellow River Delta agricultural high-tech industrial demonstration zone, Dongying City, Shandong Province. Their nodulation and growth promoting functional characteristics were evaluated. A total of 84 pure cultures were isolated from the nodule samples of soybean, which belong to three genera and six species, and 96% of them belong to *Ensifer*. The results of functional testing showed that all of them can produce indole-3-acetic acid (IAA), 32 strains could tolerate 2% NaCl, 14 strains could produce iron carriers, 7 strains could mineralize organic phosphorus, 14 strains could dissolve inorganic phosphorus, and 6 strains could produce organophosphorus of over 200 mg/L. The results of hydroponic experiments showed that strains 63-2-1-1, 306-2-1-1, and 63-2-19-1 could significantly alleviate the degree of salt damage to soybean seedlings. This study not only provided strain resources for the development of salt-tolerant microbial agents for soybeans in saline-alkali soil but also had important theoretical and practical significance for the growth and yield increase of soybeans in saline-alkali soil.

Key words: rhizobia; soybean; isolation and identification; salt stress; growth-promoting ability