

DOI:10.11686/cyxb2025254

http://cyxb.magtech.com.cn

刘媛媛, 杨俊锋, 崔棋雯, 等. 新疆喀什盐碱地田菁根瘤中菌株分离及其促生效应. 草业学报, 2026, 35(6): 155—165.

LIU Yuan-yuan, YANG Jun-feng, CUI Qi-wen, et al. Isolation and growth-promoting effects of rhizobia from the *Sesbania cannabina* seed trial area in saline-alkali land in Kashi, Xinjiang. Acta Prataculturae Sinica, 2026, 35(6): 155—165.

新疆喀什盐碱地田菁根瘤中菌株分离及其促生效应

刘媛媛^{1,2}, 杨俊锋^{1,2}, 崔棋雯^{1,2}, 李明源^{1,2}, 王继莲^{1,2*}

(1. 喀什大学生命与地理科学学院, 新疆喀什 844000; 2. 新疆帕米尔高原生物资源与生态自治区重点实验室, 新疆喀什 844000)

摘要:为丰富微生物肥料菌种资源, 研制适合于盐碱地田菁种植的根瘤菌剂, 从新疆喀什盐碱地田菁试种区根瘤中分离菌株, 基于 16S rRNA 基因扩增与系统发育分析对其进行鉴定, 并通过单菌及多菌混合接种验证其对盐碱土中田菁生长的影响。结果共分离到 17 株菌, 分属于剑菌属、肠杆菌属和布鲁氏菌属, 以剑菌属占优势。剑菌 B-3-1、剑菌 C-3-2、肠杆菌 A-5-1 和布鲁氏菌 C-4-1 兼具解有机磷和无机磷能力, 以此 4 株菌进行剑菌属单种及与其他菌株混合接种, 对田菁生长有积极作用, 株高、茎粗、地上干重、叶绿素含量和根干重分别提高了 21.2%~56.2%、22.3%~67.8%、4.5%~43.5%、26.8%~149.5% 和 18.2%~100.0%, 同时根系结瘤数量显著增加 ($P < 0.05$)。接种处理后的盐碱土壤特性也得到改善, pH、全盐、全磷和全钾含量分别降低了 2.4%~4.1%、23.6%~39.1%、23.3%~69.4% 和 2.2%~21.2%, 速效氮和速效磷含量增幅为 63.5%~98.4% 和 0.1%~9.0%。除接种剑菌 B-3-1 后速效钾含量低于对照, 其余处理提高了 8.4%~99.7%, 尤以混合菌系 E (剑菌 C-3-2、剑菌 B-3-1 和布鲁氏菌 C-4-1) 效果最佳。回接后分离的田菁根瘤菌株与初始接种菌株 B-3-1 和 C-3-2 高度同源, 证明接种菌株在宿主根际成功定殖。所得根瘤菌株对开发适用于盐碱地复垦和生态修复的微生物肥料有一定应用潜力。

关键词: 根瘤菌; 田菁; 盐碱地; 剑菌属; 微生物肥料

Isolation and growth-promoting effects of rhizobia from the *Sesbania cannabina* seed trial area in saline-alkali land in Kashi, Xinjiang

LIU Yuan-yuan^{1,2}, YANG Jun-feng^{1,2}, CUI Qi-wen^{1,2}, LI Ming-yuan^{1,2}, WANG Ji-lian^{1,2*}

1. The College of Life and Geographic Sciences, Kashi University, Kashi 844000, China; 2. Key Laboratory of Biological Resources and Ecology of Pamirs Plateau in Xinjiang Uygur Autonomous Region, Kashi 844000, China

Abstract: The aim of this work was to expand microbial fertilizer strain resources and develop rhizobial agents suitable for *Sesbania cannabina* cultivation in saline-alkali soils. To this end, *Rhizobium* strains were isolated from the root nodules of *S. cannabina* growing in a trial planting area in saline-alkali land in Kashi, Xinjiang. The isolates were identified based on 16S rRNA gene sequences amplified by polymerase chain reaction, and by phylogenetic analyses. The effects of the isolated strains, alone or in mixed combinations, on the growth of *S. cannabina* and the properties of salt-alkali soil were determined. A total of 17 strains were isolated, belonging to the genera *Ensifer*, *Enterobacter*, and *Brucella*, with *Ensifer* being the dominant genus. The strains *Ensifer* sp. B-3-1, *Ensifer* sp. C-3-2, *Enterobacter* sp. A-5-1, and *Brucella* sp. C-4-1 exhibited the ability to solubilize both organic and inorganic phosphorus. Inoculation of *Ensifer* as single strains or mixed with other strains positively affected the growth of *S.*

收稿日期: 2025-06-26; 改回日期: 2025-09-09

基金项目: 喀什地区科技计划项目 (KS2024001), 国家自然科学基金 (32160408) 和喀什大学高层次人才科研启动经费项目 (GCC2023ZK-001) 资助。

作者简介: 刘媛媛 (2003—), 女, 山东菏泽人, 在读本科。E-mail: lyyuan0710@163.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: wjilian0710@163.com

cannabina; the plant height, stem diameter, aboveground dry weight, chlorophyll content, and root dry weight were increased by 21.2%–56.2%, 22.3%–67.8%, 4.5%–43.5%, 26.8%–149.5%, and 18.2%–100.0%, respectively, and the number of root nodules was also significantly increased ($P<0.05$). The properties of salt-alkali soil were also improved by *Ensifer* strains, alone or in combinations; the pH value and total salt, total phosphorus, and total potassium contents were decreased by 2.4%–4.1%, 23.6%–39.1%, 23.3%–69.4% and 2.2%–21.2%, respectively, and the available nitrogen and available phosphorus contents were increased by 63.5%–98.4% and 0.1%–9.0%, respectively. After inoculation with *Ensifer* sp. B-3-1, the available potassium content in soil was lower than that of the control group, but inoculation with other *Ensifer* strains increased the available potassium content in soil by 8.4%–99.7%. Among the various tested combinations, the combination E (*Ensifer* sp. C-3-2, *Ensifer* sp. B-3-1, and *Brucella* sp. C-4-1) had the best effect. The strains re-isolated after inoculation were highly homologous to the inoculated strains B-3-1 and C-3-2, demonstrating their successful colonization of the host. The *Rhizobium* strains obtained in this study have potential applications in developing microbial fertilizers suitable for reclamation and ecological restoration of saline-alkali land.

Key words: rhizobia; *Sesbania cannabina*; saline-alkali land; *Ensifer*; microbial fertilizers

土壤盐碱化作为重要的非生物胁迫因素之一,不仅影响植物生长发育和生理代谢过程,而且阻碍土壤中各类营养物质的正常转化与传输,降低土壤养分有效性,严重威胁土壤生态系统的稳定和生物多样性^[1–2]。数据显示,我国盐碱化土地面积超过 3.6×10^{11} m²,其中盐碱化耕地面积高达 9.2×10^{10} m²^[3],土壤盐碱化已成为制约我国农牧业可持续发展和生态安全的关键因素。土壤生态退化的一个重要原因是土壤微生物群落结构的改变,微生物作为推动土壤养分循环和植物群落发展的主要驱动因子,被认为是土壤养分的“源”和“库”,同时也是土壤生态系统最敏感的指示信号。通过外源添加有益微生物对退化土壤中微生物群落进行调控,是实现退化土壤生态系统近自然恢复的有效干预措施^[4–5]。随着农业可持续发展理念的深入人心,国内外已有大批不同功能的微生物菌剂实现商品化,其在增强植物抗逆性,改善土壤性质和修复退化土壤生态方面取得了喜人成果^[6]。

根瘤菌是一类好氧型异养微生物,在生态系统的氮循环中扮演着关键角色,其独特之处在于能够与豆科植物建立专一共生关系,形成根瘤这一特殊结构。根瘤菌种类繁多,根据LPSN(list of prokaryotic names with standing in nomenclature)所示,目前根瘤菌科(Rhizobiaceae)已发表多个属^[7]。在根瘤内,根瘤菌凭借自身的固氮酶系统,将大气中原本植物无法直接利用的无机氮高效转化为氨态氮,为宿主植物生长提供不可或缺的氮源,促进植物生长发育。从形态特征看,根瘤菌多呈杆状,有鞭毛,赋予其运动能力,这利于根瘤菌在土壤环境中寻找宿主。部分根瘤菌还可与丛枝菌根真菌形成互惠互利的共生关系,在促进宿主植物生长的同时提高其抗胁迫及防御病原体能力^[8]。随着大量针对不同豆科植物的根瘤菌菌剂被商品化应用,人们已深刻认识到豆科植物与根瘤菌的共生固氮体系在可持续农牧业发展中的现实作用。该体系从源头上减少了化学氮肥的使用量,不仅降低了农业生产成本,还避免了因过度施用化肥造成的环境污染问题。同时,根瘤菌剂的施用能有效改善土壤微生物群落结构,对维持土壤生态稳定、提升土地生产力具有深远意义^[9]。这一共生体系的深入研究与广泛应用,为未来可持续农业发展提供了一条绿色、高效的新途径。

新疆南疆地区包括喀什、和田、克州和阿克苏地区,是全疆土地盐碱化最严重的区域,土地盐碱程度和类型堪称全国之最。自然条件的先天不足和生态环境的极端脆弱严重限制了南疆地区农牧业可持续发展。田菁(*Sesbania cannabina*)作为一种耐盐碱能力极强的优质豆科牧草和绿肥作物,在生物量积累、改善盐碱土壤结构和肥力、优化土壤微生物群落等方面具有巨大优势^[10–11]。在南疆推广种植田菁,不仅可作为优质牧草提高盐碱地利用率,还有助于盐碱地综合修复,达到生态治理与推动畜牧经济发展的双重目标。田菁的另一大突出特性在于可与根瘤菌建立共生关系,通过共生结瘤形成高效的固氮体系。鉴于这种天然的共生固氮基础,相关研究与实践表明,外源接种根瘤菌可在不同程度上提高宿主植物的结瘤固氮能力,这对促进植物生长及盐碱土壤改良具有重

要意义^[12-14]。基于此,本研究拟从新疆喀什地区盐碱地田菁试种区分离根瘤菌株,并通过回接试验评估其对盐碱土栽培田菁植株生长和土壤的改良作用,为开发适用于盐碱地复垦和生态修复的高效根瘤菌菌剂提供菌种资源。

1 材料与方法

1.1 样品采集

土壤样品采集自喀什市荒地乡盐碱地田菁试种区(75°56' E, 39°49' N)。2024年7月,选择生长良好的田菁植株,深挖取出整株根系并小心去除根部大块土壤,观察并计数根瘤情况。用剪刀将结有根瘤的根系小心剪下,装入无菌采样袋,于冰盒保存带回实验室。选取硕大成熟的田菁荚果收集种子,装入种子袋带回实验室备用。

取田菁试种区周边未开垦的盐碱地土壤用作盆栽试验,去除表层虚土后挖取10~40 cm土层的土壤。土壤pH 8.6,全盐含量 $1.83 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,速效氮、速效钾和速效磷含量分别为 $23.42 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $104.15 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $17.25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,有机质含量为 $15.30 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

1.2 培养基

根瘤菌筛选用YMA刚果红培养基^[15]: $\text{FeCl}_3\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ $0.004 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、甘露醇 $10.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、酵母粉 $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 NaCl $0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、刚果红 $0.025 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、琼脂 $18 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 H_2O 1000 mL, pH 6.8~7.0。

解有机磷能力测定用蒙金娜(Mongina's)培养基^[16]: 葡萄糖 $10.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 NaCl $0.3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{MnSO}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ $0.003 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.03 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.003 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 KCl $0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、大豆卵磷脂 $0.004 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、琼脂 $18.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、蒸馏水 1000 mL, pH 8.0~8.4。

解无机磷能力测定用NBRIP(National Botanical Research Institute's phosphate)培养基^[17]: 葡萄糖 $10.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 NaCl $0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 KCl $0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ $5.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、酵母粉 $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{MnSO}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ $0.002 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.002 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、琼脂 $18.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、蒸馏水 1000 mL, pH 8.0~8.4。

菌种保藏与活化采用LB(Luria-Bertani)培养基^[18]: 胰蛋白胨 $10.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、酵母粉 $5.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 NaCl $10.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、琼脂 $20.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.0。

1.3 根瘤菌株分离纯化

将田菁根系在生物安全柜中用无菌水清洗去除表面泥土,用75%酒精消毒,经3%次氯酸钠溶液消毒5 min,最后用无菌水冲洗干净。用滤纸吸干根系表面水分,称取1.0 g根瘤样本在无菌研钵中充分研磨,加入9 mL生理盐水混匀后适度稀释,涂布于YMA刚果红培养基上,25℃培养2~3 d观察菌落生成情况。根据菌落形态、大小、颜色、黏度等特征,反复划线纯化得到纯菌株,4℃保存备用。

1.4 菌株生长特性及解磷能力测定

将菌株按2%接种量转接至含不同NaCl浓度(4%~8%)及不同pH(pH 5~11)的YMA液体培养基(不含刚果红和琼脂)中,28℃、 $180 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养48 h,测定培养液 OD_{600} 值,分析菌株耐盐性和耐碱性^[19-20]。将菌株用接种环接种到NBRIP和Mongina's培养基中,28℃培养2~3 d,观察菌落周围溶磷圈形成情况,有溶磷圈即被定性为具解磷能力。将阳性菌株按1%接种量分别接种至NBRIP和Mongina's液体培养基中,28℃振荡培养7 d。培养液经 $13000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min,取上清按1:20(v/v)加入 $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaHCO_3 溶液浸提30 min,通过钼锑抗比色法定量分析菌株解磷能力,根据磷标准曲线计算上清液中有效磷含量^[21]。

1.5 16S rRNA基因扩增及系统发育分析

挑取少量单菌落至50 μL 裂解液(lysis buffer for microorganism to direct PCR, TaKaRa)中,金属浴98℃热解10 min, $3000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心30 s,取上清作为DNA模板。以通用引物27F(5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3')和1492R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')扩增16S rRNA基因。用1%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,合格后送由生工生物工程(上海)股份有限公司测序。测序结果提交EzBioCloud数据库进行比对,利用MEGA 11.0软件进行多序列比对,采用邻接法(neighbor-joining)构建系统发育树,Bootstrap值为1000。

1.6 根瘤菌回接验证

1.6.1 种子催芽与接菌处理 土壤经高温湿热灭菌后烘干,与花卉基质按4:1混匀后装盆,花盆大小为口径21 cm、底径14 cm、高17 cm,用无菌水调整土壤含水量至70%~80%后播种。选取颗粒饱满的田菁种子先用75%酒精浸泡30 s,然后用5%次氯酸钠溶液浸泡5 min,无菌水冲洗干净后平铺于湿润滤纸上,28℃催芽5~7 d。挑选芽长一致的种子,每盆播种3~4粒,待幼苗长至2~3片叶时进行接种处理。依据菌株分类地位和促生特性,以剑菌B-3-1、剑菌C-3-2、肠杆菌A-5-1和布鲁氏菌C-4-1共4株多功能菌株进行田菁回接试验。试验分为剑菌单种A(C-3-2)、剑菌单种B(B-3-1)及与其他菌株等比例混合接种C(C-3-2,B-3-1)、D(C-3-2,B-3-1,A-5-1)、E(C-3-2,B-3-1,C-4-1)、F(C-3-2,B-3-1,A-5-1,C-4-1)共6个处理,对照组(CK)接种等量YMA液体,每个处理4个重复。供试菌液浓度统一调为 1×10^9 CFU·mL⁻¹,每8 d以灌根方式接菌1次,每次5 mL。将花盆置于光照培养室中25℃、光照14 h/黑暗10 h培养,定期统一补水并调换位置,确保管理一致。

1.6.2 田菁植株生长指标及土壤理化性质测定 培养70 d后收获植株,用卷尺测量田菁株高,用游标卡尺测量土面上方10 cm处茎粗。将植株地上部分与根系分开,小心清洗根系泥土后用根系扫描分析仪(MRS-3200A3L,上海中晶科技有限公司)分析根长、根直径、根体积、根表面积等指标,并详细统计不同处理组根系结瘤情况。地上/地下部分经105℃杀青15 min后于70℃烘干至恒重,分别称量地上/地下干物质重量。采用乙醇浸提法测定叶绿素含量^[22-23]。参照《土壤农化分析》^[24]测定田菁回接前后土壤理化指标,包括pH、全盐、速效氮、全钾、速效钾、全磷、速效磷。

1.7 根瘤菌株再分离

为确定所分离的菌株是否为目标根瘤菌株,基于不同处理组田菁结瘤情况,选取新鲜根瘤同1.3与1.5所述方法重新分离根瘤菌并鉴定,分析其与初始接种根瘤菌株的遗传关系。

1.8 数据处理

采用SPSS 24.0进行数据处理和方差分析,基于Duncan's新复极差法进行多重比较($P < 0.05$),利用GraphPad Prism 9.5绘图。图表数据为平均值±标准误。

2 结果与分析

2.1 菌株分离及特征分析

采用YMA刚果红培养基,从田菁根瘤中共分离到17株形态、颜色和大小各异的菌株。将菌株分别接种于不同盐碱浓度的YMA液体培养基中,结果如表1所示,在含盐量为4%~5%时所有菌株均能正常生长,但含盐量高于5%时生长逐渐变缓。菌株C-4-1、B-3-1、B-5-1、B-4-1、C-3-2和A-5-1在8%的含盐量下仍能微弱生长。耐碱试验中,所有菌株在pH 7~9时正常生长,pH高于10时多数菌株生长受限。菌株C-4-1、B-3-1、B-5-1、A-5-1、C-6-1、C-3-2、C-2-1可耐受5~11的pH宽范围。综上,17株菌均具有一定耐盐碱胁迫能力。

解磷能力分析表明,菌株C-3-2、B-3-1、A-5-1和C-4-1兼具解有机磷和无机磷能力(图1)。依据磷标准曲线方程 $y = 0.0556x + 0.0229$ ($R^2 = 0.9976$),4株菌的解无机磷量分别为365.86、568.00、536.72和208.48 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,以B-3-1能力最高;解有机磷量分别为20.56、22.72、17.32和21.01 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,同样以B-3-1能力最强。

2.2 16S rRNA基因扩增及系统发育分析结果

系统发育分析显示(图2),17株菌株分属于3个属,其中剑菌属(*Ensifer*)12株,占绝对优势;肠杆菌属(*Enterobacter*)有4株;布鲁氏菌属(*Brucella*)有1株。经EzBioCloud数据库比对,B-3-1归属于剑菌属,与剑菌*Ensifer* sp. MK824371相似度超过99.33%;C-3-2同样归属于剑菌属,与剑菌*Ensifer* sp. KX348458相似度为99.85%;C-4-1归属布鲁氏菌属,与中间布鲁氏菌*Brucella intermedia* MN611377相似度超过99.15%;A-5-1归属肠杆菌属,与阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae* MT734390)聚为一枝。

2.3 根瘤菌回接试验

2.3.1 根瘤菌对田菁植株生长的影响 选取4株兼具解有机磷与无机磷能力的多功能菌株,开展剑菌属单菌及混合菌系接种试验。结果显示,在所有接种处理中,无论是单菌接种还是混合菌系接种,均对田菁植株生长有

表 1 菌株耐盐和耐碱试验

Table 1 Salt and alkali resistance tests of the strains

菌株编号 Strain number	NaCl 含量 Sodiumchloride content					pH						
	4%	5%	6%	7%	8%	5	6	7	8	9	10	11
C-4-1	++	++	++	++	+	++	++	+++	++	+	+	+
B-2-1	++	++	+	+	-	+	+	++	++	+	-	-
B-3-1	++	++	++	+	+	++	++	+++	+++	++	+	+
A-2-1	++	++	+	+	-	+	+	++	++	++	+	-
B-5-1	++	++	+	+	+	+	++	+++	++	++	+	+
A-1-1	++	++	+	+	-	+	++	++	++	++	+	-
A-5-1	++	++	++	+	+	++	++	+++	+++	++	+	+
B-4-1	++	++	+	+	+	+	+	++	++	+	-	-
C-6-1	++	++	+	+	-	++	++	++	++	+	+	+
C-3-2	++	++	++	++	+	++	++	+++	+++	++	++	+
C-1-1	++	++	+	+	-	+	+	++	++	+	-	-
B-1-1	++	++	+	+	-	+	+	++	++	+	-	-
A-4-1	++	++	++	+	-	++	++	+++	++	++	+	-
B-6-1	++	++	+	+	-	+	+	++	++	+	-	-
C-2-1	++	++	++	+	-	++	++	++	++	+	+	+
C-5-1	++	++	+	+	-	+	+	++	++	++	+	-
A-6-1	++	++	++	+	-	+	+	++	++	+	+	-

+++表示 OD₆₀₀ 为 1.0 以上; ++表示 OD₆₀₀ 为 0.5~1.0; +表示 OD₆₀₀ 为 0~0.5; -表示菌落基本不生长。+++ means OD₆₀₀ is above 1.0, ++ indicates that OD₆₀₀ ranges from 0.5 to 1.0, + indicates that OD₆₀₀ ranges from 0 to 0.5, and - means the colony is barely growing.

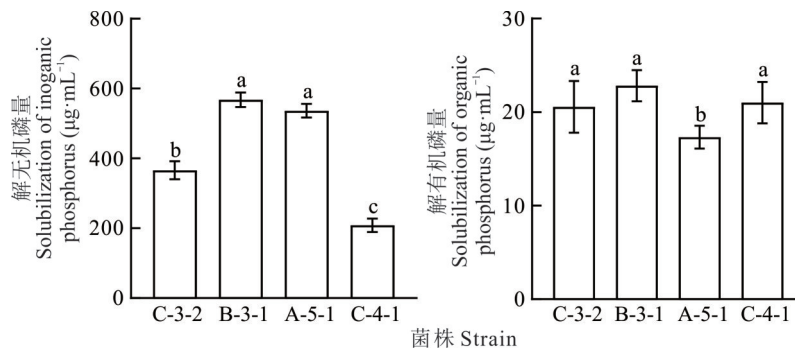


图 1 菌株解磷能力测定

Fig. 1 Determination of phosphate-solubilizing ability of strain

不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 下同。Different small letters indicate significant differences among the treatments at $P < 0.05$, the same below.

积极影响。相较之下,混合菌系的接种效果较单菌更明显(图 3 和图 4)。接种处理提高了田菁株高、茎粗、叶绿素含量和地上干重,增幅分别为 21.2%~56.2%、22.3%~67.8%、26.8%~149.5% 和 4.5%~43.5%,其中混合菌系 E 组对株高、茎粗、地上干重的促进能力最强,而混合菌系 C 组对叶绿素影响最大。

接种处理显著影响了田菁根系根瘤数量 ($P < 0.05$)。对照组在整个试验周期内几乎无根瘤形成,其平均根瘤数量趋近于 0,而单菌或混合菌组的根瘤数量呈不同程度的增长,尤以混合菌 E 组数量最多,每株均值达 77.5 个。除此之外,接种处理对根干重也表现出积极作用,增幅为 18.2%~100.0%,以混合菌系 F 组的影响最大。综合看,混合菌系 E 对田菁生长促进作用最强。



图2 基于分离菌株 16S rRNA 基因的系统发育树
 Fig. 2 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene of the isolated rhizobial strains

2.3.2 接种根瘤菌对盐碱土壤性质的影响 对盆栽后的田菁盐碱土壤性质进行测定,接种单菌或混合菌系相对对照组对土壤性质的影响不同(表2)。总体上看,接种处理明显降低了土壤pH、全盐、全磷和全钾含量,分别降低了2.4%~4.1%、23.6%~39.1%、23.3%~69.4%和2.2%~21.2%。混合菌系D组对土壤pH的影响最明显,而混合菌系C组对全盐影响最大,单菌B组对全磷含量作用最明显。除接种单菌B组导致速效钾含量低于对照(-20.8%),其他处理均有促进作用,提高了8.4%~99.7%,尤以混合菌系F组的影响最大。接种后的土壤速效氮和速效磷含量增幅为63.5%~98.4%和0.1%~9.0%,以混合菌系E组对土壤速效氮影响最明显。总体而言,混合菌系E组对田菁栽培盐碱土壤改良效果更明显,具有进一步开发应用潜力。



图 3 根瘤菌回接对田菁植株生长的影响

Fig. 3 Effects of rhizobium inoculation on the growth of *S. cannabina*

A 图分别为 A、B、C、D、E、F 和对照组的田菁促生效果；B、C 图分别为混合菌 E 组和对照组处理的根系结瘤情况。Figure A showed the growth-promoting effects of *S. cannabina* in A, B, C, D, E, F and the control group. Figure B and C showed the root nodulation treated with combination E and CK, respectively.

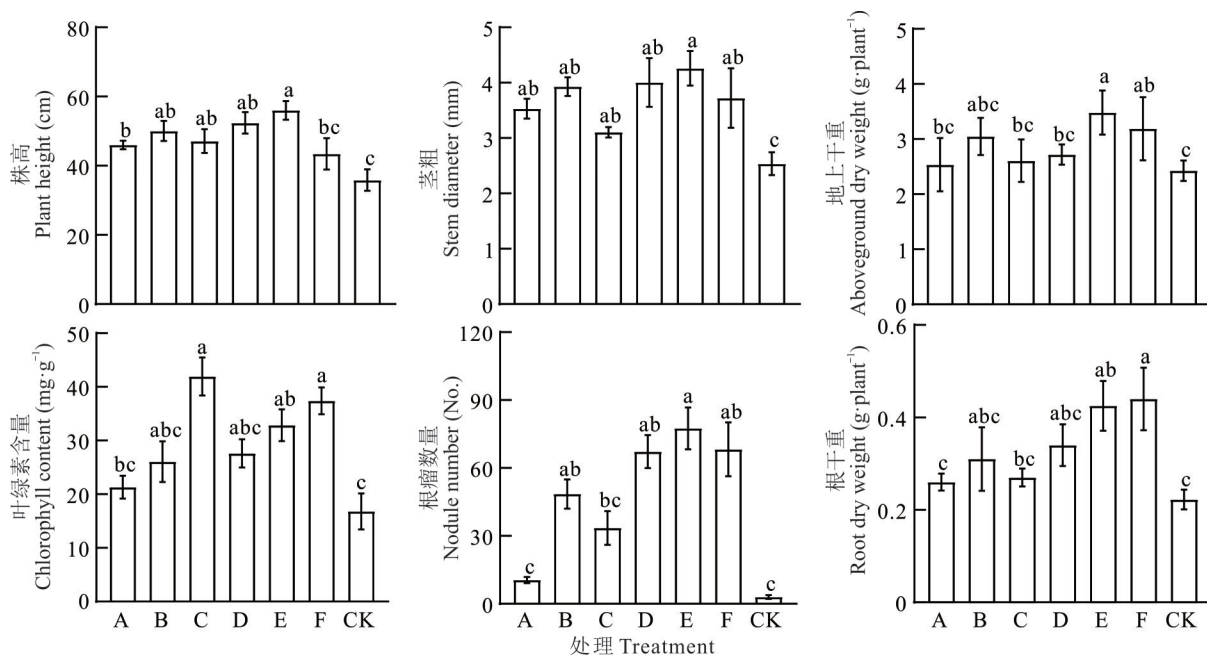


图 4 不同处理对田菁植株的促生效果

Fig. 4 The growth-promoting effects of different treatments on *S. cannabina*

表 2 根瘤菌回接对田菁栽培土壤性质的影响

Table 2 Effects of rhizobium inoculation on soil properties in *S. cannabina* cultivation

处理 Treat- ment	pH	全盐 Soil salinity (g·kg ⁻¹)	速效氮 Available nitrogen (mg·kg ⁻¹)	全钾 Total potassium (g·kg ⁻¹)	速效钾 Available potassium (mg·kg ⁻¹)	全磷 Total phosphorus (g·kg ⁻¹)	速效磷 Available phosphorus (mg·kg ⁻¹)
A	8.05±0.02c	1.02±0.04c	37.30±0.85c	12.20±0.81b	288.50±42.19d	2.14±0.29d	14.95±0.73b
B	8.11±0.03b	1.02±0.14c	42.83±1.32b	11.90±0.61b	210.75±29.39e	1.10±0.12e	15.56±0.63ab
C	8.13±0.02b	0.98±0.02c	41.99±0.88b	14.00±0.82a	296.25±44.02d	2.80±0.33b	15.79±0.89ab
D	7.99±0.02d	1.10±0.06c	42.15±1.02b	15.55±1.18a	379.00±59.23c	2.76±0.43b	16.29±1.11a
E	8.03±0.03c	1.07±0.06c	45.26±2.71a	14.55±1.71a	429.00±48.46bc	2.73±0.70bc	15.73±0.31ab
F	8.02±0.01c	1.23±0.05b	43.27±1.74b	11.73±1.41b	531.75±68.94a	3.60±0.50a	15.45±0.70ab
CK	8.33±0.04a	1.61±0.03a	22.81±1.13d	14.88±0.56a	266.25±23.84de	2.70±0.14bcd	14.94±0.49b

同列不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。Different small letters within the same column indicate significant differences among the treatments ($P < 0.05$).

2.3.3 根瘤菌的再分离 对混合菌系E处理的田菁根瘤样品再次进行根瘤菌分离,结果共得到5株菌,其在刚果红YMA培养基上均形成质黏、不吸收色素的单菌落,革兰氏染色结果均为阴性。16S rRNA基因多重序列比对分析表明(表3),菌株H₁、H₃、H₄与试验接种菌种B-3-1同源性较高,而H₂、H₅与接种菌种C-3-2同源性较高,均属剑菌属。

3 讨论

豆科植物与根瘤菌的共生固氮体系能有效改善盐碱地导致的土壤结构劣化和养分匮乏问题,但当前市场尚无田菁专用的商业化根瘤菌菌剂,针对其耐盐、促生、结瘤等关键功能菌株的开发也严重不足。现有菌剂因菌种特性及适应性局限,缺乏广谱的盐碱耐受能力,也难以在盐碱区域推广应用,亟须开发具备广谱耐盐碱特性的田菁根瘤菌菌剂,以支撑其作为“绿肥”在盐碱地改良与土壤培肥中的应用。本研究从新疆喀什盐碱地田菁根瘤中分离的菌株以剑菌属占优势,区别于前人报道的以新根瘤菌属(*Neorhizobium*)和根瘤菌属(*Rhizobium*)为主的群落组成^[25]。剑菌属的优势地位暗示其可能通过基因进化或代谢途径优化,特异性适应了当地高盐碱胁迫环境,其与宿主田菁的共生关系很可能是长期地域环境选择压力驱动的结果。值得注意的是,根瘤微生态中除剑菌属等典型根瘤菌外,还存在多株非根瘤菌,它们与根瘤菌协同进化,虽不具备固氮能力,却通常具有解磷、产嗜铁素、合成植物激素或降解有机物等功能。这种功能特化不仅避免了生态位的直接竞争,还能与根瘤菌的固氮作用形成协同增效机制,共同优化宿主植物的氮磷营养平衡。本研究分离到了具有解磷功能的非根瘤菌株肠杆菌和布鲁氏菌,它们在根瘤中栖息繁殖,可能与根瘤菌的固氮作用形成协同增效机制。

接种剑菌单菌及混合菌系后,田菁植株的各项生长指标明显提升,证实根瘤菌在盐碱胁迫下对植物具有促生作用。进一步分析表明,混合菌系的促生效果优于单菌种,尤以E组效果最突出,这可能源于混合菌系中不同菌株之间的协同增效机制。一方面,混合菌剂通过不同功能菌株的互补作用增强了植物的营养获取与抗逆能力,如固氮菌与解磷菌联合接种能够同步改善氮、磷元素的供应状况,从而全面改善植株营养水平^[26]。另一方面,不同菌株在根际微环境中形成生态位分区,减少了直接竞争,提高了整体定殖效率和生存稳定性,从而更有效地发挥联合促生作用。Dilfuza等^[27]对大豆(*Glycine max*)接种根瘤菌与植物促生菌也发现,菌株的共同接种可提高结瘤效率,进一步支持混合菌剂的协同效应。但需注意的是,菌种组合的适配性比菌株数量更为关键,本研究中包含4株菌的混合菌系F的促生效果反而不如3株菌组合的E组,与常雅迪^[28]、Arafat等^[29]的研究结果相符,说明并非菌株越多效果越好。造成这一现象的原因可能是多方面的,如多个菌株在根系有限生态位中的竞争加剧,导致对营养资源和附着位点的争夺抑制了关键功能菌株的丰度与活性,影响其功能表达;同时菌株间如果功能冗余但胁迫响应策略不一致,会在逆境条件下增加植物的代谢负担,造成能量浪费和生理调控失衡,反而抵消了联合接种的潜在收益。因此,构建高效复合菌剂的关键并不在于菌株数量的简单叠加,而应侧重于筛选具有功能互补、生态位分化且胁迫响应协调的优质菌株组合,以实现稳定、高效且可持续的促生效果。

土壤养分循环与转化深刻影响作物生长发育过程与品质,混合菌系E组的接种使盐碱土壤中全氮、速效氮、全磷、速效磷及速效钾含量均得到明显改善。分析其原因,一方面可能是根瘤菌通过与田菁建立共生固氮体系,将大气中的分子氮转化为可被植物直接吸收利用的铵态氮,显著提高了土壤中有效氮含量。同时在菌系代谢活动过程中产生的有机酸等物质有效中和了土壤碱性,降低了pH,促进了难溶性磷的活化,从而使全磷与速效磷含量显著上升^[30]。尽管土壤全钾含量总体变化不大,但速效钾却明显提高,这可能是由于菌系代谢促进了矿物钾的释放与转化,增强了钾的有效性,而全钾含量更多受原始成土矿物和土壤类型的制约,短期内不易发生显著变化。与其他报道相比^[31-32],本研究在磷、钾有效性的提升方面表现出不同趋势。推测原因可能与所用菌株的功能特异性、宿主植物田菁的互作偏好性及盐碱土壤特有的环境背景有关。混合菌系E兼具固氮、解磷能力,其在田菁一

表3 田菁根瘤中根瘤菌的再分离

Table 3 Re-isolation of rhizobia from *S. cannabina* root nodules

菌株 Strain	最相似菌株 Most similar strain	相似度 Similarity (%)
H ₁	附着剑菌 <i>E. adhaerens</i> Casida AT(JNAE01000171)	99.74
H ₂	田菁剑菌 <i>E. sesbaniae</i> CCBAU 65729T(JF834143)	99.35
H ₃	附着剑菌 <i>E. adhaerens</i> Casida AT(JNAE01000171)	99.74
H ₄	附着剑菌 <i>E. adhaerens</i> Casida AT(JNAE01000171)	99.35
H ₅	田菁剑菌 <i>E. sesbaniae</i> CCBAU 65729T(JF834143)	99.35

盐碱土这一特定系统中的适应性更强,功能表达更为充分,从而在多个养分指标上表现出更一致的改良效果。这表明微生物接种效应高度依赖于菌株—植物—土壤三者的互作关系,也凸显了在针对具体农业生产系统开发微生物肥料时,开展本土化菌株筛选与组合验证的重要性。

再分离试验证实,剑菌菌株 B-3-1 与 C-3-2 能够在田菁根系中成功定殖,分离菌株 H₁、H₂ 等与其具有遗传一致性,这说明特定剑菌属根瘤菌能在盐碱这一特殊胁迫环境下与田菁建立起稳定的共生体系,暗示其可能演化出独特的耐盐碱机制。其次,菌株在田菁根瘤中的定殖揭示了盐碱环境对根瘤菌群落的选择压力,该压力可能通过调控结瘤因子(*Nod* 因子)的结构修饰,或者促使宿主植物免疫应答路径发生适应性调整来实现^[33]。但目前本研究仅明确了菌种定殖这一现象,对定殖过程中根瘤菌与宿主植物间复杂的信号交流、物质交换及基因表达调控等共生机制尚未深入探究。后续需深入解析根瘤菌与田菁在盐碱环境下的共生分子机制,通过转录组学、蛋白组学等多组学技术,全面揭示二者在互作过程中的基因和蛋白表达变化。另一方面,可从微生物生态与功能基因组学角度,探究混合菌剂中功能互补菌株(如固氮菌与解磷菌)的协同增效机制,结合代谢组学揭示菌群互作网络。此外,还需关注菌株定殖后可能引发的生态风险,如土著微生物群落结构扰动或抗生素抗性基因水平转移,为盐碱地微生物修复技术的生态安全性评估提供理论支撑。

4 结论

从新疆喀什盐碱地田菁根瘤中分离到的菌株分属于剑菌属、肠杆菌属和布鲁氏菌属,以剑菌属占绝对优势。剑菌 B-3-1、剑菌 C-3-2、肠杆菌 A-5-1 和布鲁氏菌 C-4-1 兼具解有机磷和无机磷能力,为多功能促生菌。以此 4 株菌进行剑菌单菌和混合接种对盐碱土栽培田菁植株生长和土壤改良有不同程度的促进作用,尤以混合菌系 E(剑菌 C-3-2、剑菌 B-3-1 和布鲁氏菌 C-4-1)效果更优,可为后续研发适用于盐碱地田菁专属根瘤菌菌剂提供优良菌种资源。

参考文献 References:

- [1] Basu A, Prasad P, Das S N, *et al.* Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as green bioinoculants: Recent developments, constraints, and prospects. *Sustainability*, 2021, 13(3): 1140.
- [2] Egamberdieva D, Wirth S J, Bellingrath-Kimura S D, *et al.* Salt-tolerant plant growth promoting rhizobacteria for enhancing crop productivity of saline soils. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2791.
- [3] Lv N, Shi L, Dai Y Y, *et al.* Reclamation of saline-alkali soils in Xinjiang: A review. *Journal of Irrigation and Drainage*, 2024, 43(12): 1–10.
吕宁, 石磊, 戴昱余, 等. 新疆盐碱地治理利用研究回顾与启示. *灌溉排水学报*, 2024, 43(12): 1–10.
- [4] Zhang W X, Shen Z F, Shao Y H, *et al.* Soil biota and sustainable agriculture: A review. *Acta Ecologica Sinica*, 2020, 40(10): 3183–3206.
张卫信, 申智锋, 邵元虎, 等. 土壤生物与可持续农业研究进展. *生态学报*, 2020, 40(10): 3183–3206.
- [5] Dai J X, Tian P Y, Shen C, *et al.* Screening of rhizosphere bacteria from salt tolerant plants and their growth promoting effects. *Journal of Environmental Sciences*, 2021, 30(5): 968–975.
代金霞, 田平雅, 沈聪, 等. 耐盐植物根际促生菌筛选及促生效应研究. *生态环境学报*, 2021, 30(5): 968–975.
- [6] Liu J Y, Li X L, Jin Q. Research progress in saline-alkali remediation of agricultural soil. *Soil Science*, 2023, 11(3): 122–126.
刘婧怡, 李雪玲, 金前. 农业土壤盐碱化修复治理研究进展. *土壤科学*, 2023, 11(3): 122–126.
- [7] Nemanja K, Camilla F, Alessio M, *et al.* Taxonomy of Rhizobiaceae revisited: Proposal of a new framework for genus delimitation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2022, 72(3): 005243.
- [8] Duan H X, Shi Q, Kang S P, *et al.* Advances in research on the interactions among arbuscular mycorrhizal fungi, rhizobia, and plants. *Acta Prataculturae Sinica*, 2024, 33(5): 166–182.
段海霞, 师茜, 康生萍, 等. 丛枝菌根真菌和根瘤菌与植物共生研究进展. *草业学报*, 2024, 33(5): 166–182.
- [9] Roy S, Liu W, Nandety R S, *et al.* Celebrating 20 years of genetic discoveries in *Legume nodulation* and symbiotic nitrogen fixation. *Plant and Cell*, 2020, 32(1): 15–41.
- [10] Zheng Y F, Liang J, Zhao D L, *et al.* The root nodule microbiome of cultivated and wild halophytic legumes showed similar

- diversity but distinct community structure in Yellow River Delta saline soils. *Microorganisms*, 2020, 8(2): 207.
- [11] Lv Z, Su A, Hu F Y, *et al.* Effects of sesbania on chlorimuron-ethyl removal and soil microbial community in farmland. *Chinese Journal of Ecology*, 2024, 43(9): 2750–2757.
律泽, 苏澳, 胡芳雨, 等. 田菁对农田氯嘧磺隆去除及土壤微生物群落的影响. *生态学杂志*, 2024, 43(9): 2750–2757.
- [12] Chang D N, Ma X T, Zhou G P, *et al.* Symbiotic compatibility of different rhizobia strains with important Chinese milk vetch (*Astragalus sinicus*) cultivars. *Acta Prataculturae Sinica*, 2022, 31(12): 171–180.
常单娜, 马晓彤, 周国朋, 等. 不同根瘤菌与紫云英主栽品种的共生匹配性. *草业学报*, 2022, 31(12): 171–180.
- [13] Lu J Y, Zhang H S, Tian H, *et al.* Research progress on effects of nitrogen deposition on soil nitrogen cycling in grassland ecosystems. *Acta Prataculturae Sinica*, 2022, 31(6): 221–234.
陆姣云, 张鹤山, 田宏, 等. 氮沉降影响草地生态系统土壤氮循环过程的研究进展. *草业学报*, 2022, 31(6): 221–234.
- [14] Jian S L, Li S X, Liu S Q, *et al.* Research advances of cover crops and their important roles. *Acta Agronomica Sinica*, 2022, 48(1): 1–14.
蹇述莲, 李书鑫, 刘胜群, 等. 覆盖作物及其作用的研究进展. *作物学报*, 2022, 48(1): 1–14.
- [15] Ren M X, Li J, Ai J M, *et al.* Species diversity and plant growth-promoting effects of bacteria isolated from the root nodules of *Sophora davidii*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2024, 64(8): 2940–2954.
任明霞, 李静, 艾加敏, 等. 白刺花根瘤中分离细菌的物种多样性及其促生效应. *微生物学报*, 2024, 64(8): 2940–2954.
- [16] Man J, Tang B, Deng B, *et al.* Isolation, screening and beneficial effects of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in the rhizosphere of *Leymus chinensis*. *Acta Prataculturae Sinica*, 2021, 30(1): 59–71.
漫静, 唐波, 邓波, 等. 羊草根际促生菌的分离筛选及促生作用研究. *草业学报*, 2021, 30(1): 59–71.
- [17] Li C, Liu R, Yu Y K, *et al.* Screening of efficient phosphate-solubilizing bacteria capable of promoting maize growth from black soil. *Microbiology China*, 2025, 52(3): 1101–1117.
李畅, 刘锐, 于运凯, 等. 黑土高效解磷菌的筛选及其对玉米的促生效果. *微生物学通报*, 2025, 52(3): 1101–1117.
- [18] Li J, Li M Y, Zhang T, *et al.* Screening of phosphate-solubilizing bacteria from halophytes and their growth-promoting effects. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2023, 37(7): 1470–1479.
李静, 李明源, 张甜, 等. 盐生植物解磷菌的筛选及促生效应研究. *核农学报*, 2023, 37(7): 1470–1479.
- [19] Liu X P, Zang S Y, Zhi G, *et al.* Isolation for plant-growth promoting halotolerant bacteria from alkali-saline soil. *Chinese Journal of Soil Science*, 2022, 53(3): 567–576.
柳鑫鹏, 臧淑英, 智刚, 等. 盐碱土耐盐碱细菌筛选及其植物促生能力研究. *土壤通报*, 2022, 53(3): 567–576.
- [20] Liu K Y, Ning X B. Screening and enzymatic properties of salt-tolerant alkaline protease strain LK-3. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2024, 43(3): 46–53.
刘可玉, 宁喜斌. 耐盐碱性蛋白酶菌株 LK-3 的筛选及酶学性质. *食品与生物技术学报*, 2024, 43(3): 46–53.
- [21] Cheng X Y, Wang J L, Mairiyangu·Yasheng, *et al.* Isolation and growth-promoting characteristics of rhizobacteria producing indole-3-acetic acid from the rhizosphere soil of *Kalidium foliatum*. *Acta Prataculturae Sinica*, 2024, 33(4): 110–121.
程鑫宇, 王继莲, 麦日艳古·亚生, 等. 盐爪爪根际土壤产 IAA 菌株分离及促生特性分析. *草业学报*, 2024, 33(4): 110–121.
- [22] Li T, Yu J, Qiao Y F, *et al.* Effect of short-term low temperature on seedling growth and nodule nitrogen fixation in soybean. *Chinese Journal of Agrometeorology*, 2024, 45(2): 159–169.
李天, 余洁, 乔云发, 等. 短期低温对大豆苗期生长和结瘤固氮的影响. *中国农业气象*, 2024, 45(2): 159–169.
- [23] Wang X Y, Liu Y X, Sui X Q, *et al.* Effect of spray injection on leaf cells, agronomic traits and seed yield formation in alfalfa. *Acta Agrestia Sinica*, 2025, 33(6): 1972–1981.
王鑫尧, 刘沂欣, 隋晓青, 等. 喷施缩节胺对紫花苜蓿叶片细胞、农艺性状及种子产量形成的影响. *草地学报*, 2025, 33(6): 1972–1981.
- [24] Bao S D. *Soil agrochemical analysis (3rd edition)*. Beijing: China Agriculture Press, 2000: 42–116.
鲍士旦. *土壤农化分析(第3版)*. 北京: 中国农业出版社, 2000: 42–116.
- [25] Li X Y. Genetic diversity, screening and application of high efficient symbiotic rhizobia isolated from *Sesbania cannabina* in the Yellow River Dalta. Yantai: University of Chinese Academy of Sciences, 2015.
李项岳. 黄河三角洲田菁根瘤菌遗传多样性、高效菌株筛选及应用. 烟台: 中国科学院大学, 2015.
- [26] Hao Z W, Ren M X, Ai J M, *et al.* Research progress of non-rhizobia in leguminous root nodules. *Acta Microbiologica Sinica*, 1–19[2025-09-06]. <https://doi.org/10.13343/j.cnki.wsxb.20250369>.

- 郝紫微, 任明霞, 艾加敏, 等. 豆科植物根瘤中的非根瘤菌研究进展. 微生物学报, 1-19[2025-09-06]. <https://doi.org/10.13343/j.cnki.wsxb.20250369>.
- [27] Dilfuza J, Annapurna K, Kakhramon D, *et al.* Co-inoculation of rhizobacteria promotes growth, yield, and nutrient contents in soybean and improves soil enzymes and nutrients under drought conditions. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 22081.
- [28] Chang Y D. Screening of rhizobial combinations and nitrogen fixation mechanism of 'F-wild Soybean Hybrid S007'. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2024.
常雅迪. '蒙农 S007 饲用大豆' 根瘤菌组合筛选与固氮机理研究. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2024.
- [29] Arafat R, Max M, Cassandra N, *et al.* Competitive interference among rhizobia reduces benefits to hosts. *Current Biology*, 2023, 33(14): 2988-3001.
- [30] Liu L S, Yu Y X, Guo L, *et al.* Utilization of different forms of phosphorus by *Sinorhizobium meliloti*. *Acta Prataculturae Sinica*, 2015, 24(7): 60-67.
刘卢生, 王永雄, 郭蕾, 等. 苜蓿根瘤菌对不同形态磷利用效率的研究. 草业学报, 2015, 24(7): 60-67.
- [31] Liu X Y, Shi F L, Liu H, *et al.* Effects of rhizobium on the growth of alfalfa and the soil nutrient content. *Chinese Journal of Grassland*, 2016, 38(6): 45-52.
刘旭艳, 石凤翎, 刘昊, 等. 接种根瘤菌对苜蓿生长及土壤养分的影响. 中国草地学报, 2016, 38(6): 45-52.
- [32] Zeng C L, Liu L, Tian X T, *et al.* Effects of tillage management and rhizobia inoculation on soil fertility, pea yield and quality. *Journal of Jiangnan University (Natural Science Edition)*, 2021, 49(2): 66-75.
曾长立, 刘丽, 田雪婷, 等. 耕作方式与接种根瘤菌对土壤肥力及豌豆产量与品质的影响. 江汉大学学报(自然科学版), 2021, 49(2): 66-75.
- [33] Jiao J, Tian C F. Evolution of rhizobial nodulation and nitrogen fixation. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 46(2): 388-397.
焦健, 田长富. 根瘤菌共生固氮能力的进化模式. 微生物学通报, 2019, 46(2): 388-397.