



滨海盐渍土野大豆根瘤菌分离筛选及其在大豆中的应用

杨晏哲, 梁静, 隋晓娜, 赵栋霖, 张成省, 郑艳芬*

中国农业科学院烟草研究所, 山东 青岛 266101

杨晏哲, 梁静, 隋晓娜, 赵栋霖, 张成省, 郑艳芬. 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.

YANG Yanzhe, LIANG Jing, SUI Xiaona, ZHAO Donglin, ZHANG Chengsheng, ZHENG Yanfen. *Glycine soja*-associated rhizobia: isolation from coastal saline soil and application in soybean[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(11): 4154-4166.

摘要:【目的】了解盐渍土野大豆根瘤菌的多样性, 筛选具有耐盐促生作用的菌株, 为栽培大豆耐盐菌剂的开发提供菌种资源。【方法】采用传统培养方法从滨海盐渍土野大豆中分离根瘤菌, 评价菌株的促生特性, 并验证其对野大豆和栽培大豆的促生效果。【结果】从野大豆根和根瘤样品中分离出 87 株根瘤菌, 主要为中华根瘤菌属(*Sinorhizobium*)、根瘤菌属(*Rhizobium*)和慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)。测定了 24 株代表性菌株的促生特性, 发现有 16 株根瘤菌具有产吲哚-3-乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)能力, 6 株能够产生 1-氨基环丙烷-1-羧酸(1-amino-cyclopropane-1-carboxylic, ACC)脱氨酶, 16 株具有溶磷活性, 6 株能够产生铁载体。根据以上促生特性, 选择了 11 株优良根瘤菌进行野大豆促生和结瘤能力评价, 发现美洲中华根瘤菌(*Sinorhizobium americanus*) DL3 的性能优于其他菌株。最后, 通过盆栽试验检测了菌株 DL3 对野大豆和栽培大豆耐盐能力的影响, 发现菌株 DL3 在盐胁迫下能促进野大豆和大豆的生长, 同时, 降低了叶片脯氨酸水平, 缓解了植物的盐胁迫程度。【结论】菌株 DL3 在提高植物耐盐性方面具有一定的作用, 对实现大豆的盐碱地种植具有重要的理论意义和实践价值。

关键词: 盐渍土; 野大豆; 根瘤菌; 根际促生菌; 盐胁迫

资助项目: 国家自然科学基金(32101289); 山东省自然科学基金(ZR2021QD026)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32101289) and the Shandong Provincial Natural Science Foundation (ZR2021QD026).

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-532-88702115, E-mail: zhengyanfen@caas.cn

Received: 2023-03-14; Accepted: 2023-05-05; Published online: 2023-05-10

Glycine soja-associated rhizobia: isolation from coastal saline soil and application in soybean

YANG Yanzhe, LIANG Jing, SUI Xiaona, ZHAO Donglin, ZHANG Chengsheng, ZHENG Yanfen*

Tobacco Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Qingdao 266101, Shandong, China

Abstract: [Objective] To investigate the rhizobial diversity of wild soybean (*Glycine soja*) in saline soil and screen out the salt-tolerant and plant growth-promoting strains for the cultivation of soybean. [Methods] We used the culture-dependent method to isolate rhizobia from wild soybean growing in coastal saline soil and then evaluated their growth-promoting characteristics and effects on wild soybean and cultivated soybean. [Results] A total of 87 rhizobial strains were isolated from the root and nodule samples of wild soybean, belonging to *Sinorhizobium*, *Rhizobium*, and *Bradyrhizobium*. Next, 24 strains of different species or from different samples were selected as representatives. Among the 24 strains, 16, 6, 16, and 6 strains had the abilities of producing indole-3-acetic acid (IAA), producing 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic (ACC) deaminase, dissolving phosphorus, and producing siderophores, respectively. According to the above growth-promoting characteristics, we evaluated the growth-promoting and nodulation effects of 11 strains on wild soybean. The performance of *Sinorhizobium americanus* DL3 was superior to that of other strains. Finally, pot experiments were carried out to examine the effects of strain DL3 on the salt tolerance of wild soybean and cultivated soybean. Strain DL3 promoted the growth and lowered the level of proline in leaves, thus alleviating the salt stress of wild soybean and cultivated soybean. [Conclusion] Strain DL3 improves the salt tolerance of plants, which has important theoretical and practical significance for soybean cultivation in saline soil.

Keywords: saline soil; *Glycine soja*; rhizobia; plant growth-promoting rhizobacteria; salt stress

大豆是我国重要的经济作物之一, 由于自然环境变化和人类活动的影响, 土壤盐渍化已经成为影响大豆产量的主要非生物胁迫因素之一^[1]。植物根际微生物在促进宿主生长、健康和提高胁迫耐受能力方面发挥着重要作用^[2]。其中, 豆科植物特有的根瘤菌能与其宿主植物形成共生系统, 提高土壤肥力, 促进植物生长^[3]。近年来, 通过挖掘根际有益微生物资源, 加工制成微生物菌剂或肥料, 被认为具有广阔的应用发展前景^[4]。

生存在植物根际范围内, 能够促进植物生长的有益菌被统称为植物根际促生菌 (plant

growth promoting rhizobacteria, PGPR)^[2]。研究发现, PGPR 可以通过多种机制提高植物的耐盐能力, 促进植物在盐胁迫下生长, 主要包括: (1) 调控相关激素含量, 促进植物生长, 增强植物的抗盐性^[5], 如吲哚-3-乙酸 (indole-3-acetic acid, IAA)^[6]。(2) 产生 1-氨基环丙烷-1-羧酸 (1-aminocyclopropane-1-carboxylate, ACC) 脱氨酶, 催化 ACC (乙烯合成前体) 转化为氨和 α -酮丁酸, 降低乙烯的浓度^[7], 促进根系的生长。(3) 诱导植物积累有机物质 (如脯氨酸、可溶性糖、有机酸等)^[8] 来提高细胞液浓度, 降低渗透压^[9]。

(4) 激发清除活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)酶的活性, 如超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、过氧化物酶(peroxidase, POD)等, 形成酶促抗氧化系统^[10]。(5) PGPR 还可以改善植物对 Na^+ 的排斥和 K^+ 的吸收, 从而增加 K^+/Na^+ 比率^[11]。

野大豆是栽培大豆的近缘野生种^[12], 具有抗盐碱、抗病、抗虫、耐旱等较强的抗逆性和环境适应性^[13], 因此具有很高的研究价值。朱梦卓等^[14]从野大豆根部分离出一株内生菌 YDX26 (假单胞菌属, *Pseudomonas* sp.), 发现其具有一定的耐盐性, 对水稻幼苗具有显著促生作用。张丹雨等^[15]从野生大豆根际土中分离到 2 株细菌 DB17 (伯克霍尔德菌属, *Burkholderia*) 和 DB58 (鞘氨醇单胞菌属, *Sphingomonas*), 对大豆根瘤的生长具有促进作用, 其中菌株 DB58 能显著促进大豆幼苗的生长。然而, 野大豆的根瘤菌资源及其在提高植物耐盐性方面的研究甚少, 野大豆根瘤菌应用于大豆上的研究也鲜有报道。

本研究从东营滨海盐渍土生长的野大豆根和根瘤样品中分离纯化根瘤菌菌株, 通过 16S rRNA 基因序列检测鉴定其分类地位, 分析野大豆根瘤菌的多样性; 对代表性菌株进行促生潜力和共生结瘤能力测定, 以期筛选结瘤能力强、促生效果好的根瘤菌, 最后通过野大豆和大豆盆栽试验, 验证优良菌株的促生和抗盐效果, 并探索其作用机制, 以期为丰富野生大豆根际促生菌种资源, 提高盐渍土豆科植物抗逆性和改良盐碱土壤提供科学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 供试材料

1.1.1 种子及土壤

大豆种子: 齐黄 34。

野大豆种子: 从东营滨海盐渍土上生长的野生植物中收集。

土壤: 山东省青岛市即墨农田土壤(非盐渍土)。

1.1.2 主要培养基

营养肉汤(nutrient broth, NB) (g/L): 蛋白胨 10.0, 牛肉膏 3.0, NaCl 5.0, pH 值 7.0–7.4。

营养琼脂(nutrient agar, NA) (g/L): 蛋白胨 10.0, 牛肉膏 3.0, NaCl 5.0, 琼脂 20.0, pH 值 7.0–7.4。

酵母甘露醇肉汤(yeast mannitol broth, YMB) (g/L): 酵母提取物 20.0, 甘露醇 5.0, K_2HPO_4 5.0, MgSO_4 0.5, NaCl 0.186, CaCO_3 1.2, pH 值 6.8–7.2。

酵母甘露醇琼脂(yeast mannitol agar, YMA) (g/L): 酵母提取物 20.0, 甘露醇 5.0, K_2HPO_4 5.0, MgSO_4 0.5, NaCl 0.186, CaCO_3 1.2, 琼脂 20.0, pH 值 6.8–7.2。

改良 YMB 培养基(g/L): 酵母粉 1.0, 甘露醇 10.0, KH_2PO_4 0.5, MgSO_4 0.2, NaCl 0.1, 色氨酸 0.1, pH 值 6.8–7.2。

无机磷培养基(pikovakaya, PKO) (g/L): 葡萄糖 10.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, NaCl 0.2, KCl 0.2, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.003, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.03, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5.0, 酵母粉 0.5, 琼脂 20.0, pH 值 6.8–7.0。

蒙金娜有机磷培养基(g/L): 葡萄糖 10.0, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.03, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03, CaCO_3 5.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5, NaCl 0.3, KCl 0.3, 蛋黄卵磷脂 0.2, 酵母粉 0.4, 琼脂 20.0, pH 值 7.0–7.2。

1.2 样品采集

采样地点: 山东省农业科学院(东营)现代农业技术实验与示范基地、黄河三角洲东营海域沿岸, 共选取 16 个采样点(表 1)。

采样方法: 选择生长旺盛的野大豆, 将整棵植株带根挖出, 放入无菌密封袋, 在冷藏条件下运回实验室。

表 1 样品采集地点

Table 1 Sample collection sites

Sample	Latitude	Longitude	Sample	Latitude	Longitude
1	118.917 5°N	37.442 2°E	9	118.746 6°N	38.034 6°E
2	118.913 0°N	37.501 9°E	10	118.915 7°N	37.797 0°E
3	118.952 5°N	37.597 6°E	11	118.996 5°N	37.803 4°E
4	119.022 8°N	37.693 7°E	12	119.141 3°N	37.744 6°E
5	118.846 8°N	37.763 0°E	13	119.101 9°N	37.756 3°E
6	118.802 7°N	37.817 3°E	14	118.605 9°N	37.263 3°E
7	118.851 3°N	37.883 1°E	15	118.547 9°N	37.365 9°E
8	118.746 2°N	38.040 8°E	16	118.558 5°N	37.374 1°E

1.3 根瘤菌分离培养

根和根瘤样品用 95%乙醇浸泡 3 min, 0.5%次氯酸钠浸泡 1 min, 再用无菌水冲洗 5–7 次。样品用消毒研钵充分研磨, 组织匀浆稀释至 10^{-2} 。吸取 200 μL 分别涂布于 NA 和 YMA 平板上, 每个处理设置 3 个重复, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2–4 d。根据菌落形态、颜色和表面光滑度选择单菌落, 纯化 2–3 次后, 对菌落进行分类编号, 用 50%甘油在 -80°C 保存菌种。

1.4 根瘤菌分子鉴定

刮取菌落放入 100 μL TE 缓冲液中, 混匀后 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min, 然后立即 -20°C 冰浴 30 min。12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液作为 PCR 反应的模板。对细菌 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增, 扩增引物(5'→3')为 27F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG)和 1492R (GGTTACCTGTTACGACTT)^[16]。反应体系: 2×Taq Master Mix 13 μL , 上、下游引物(20 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL , 纯化的 DNA (20 ng/ μL) 2 μL , ddH₂O 8 μL 。反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 12 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳(100 V, 40 min)测试合格后送往青岛睿博兴科生物技术有限公司测序, 测序结果在 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)用 BLAST 软件在线比对, 确定菌株的分类地位。

1.5 根瘤菌促生指标测定

IAA 产生能力测定: 含 0.1 g/L 色氨酸的改良 YMB 培养基灭菌冷却后, 接种 1%活化后的待测菌株菌悬液, 以不接种菌株的空白培养基为对照, 28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养 3 d。培养液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 下离心 10 min。取 1 mL 上清液与 1 mL Salkowski 比色液在黑暗中混匀, 反应 30 min 后, 迅速用酶标仪测定 530 nm 波长处的吸光度, 根据标准曲线计算 IAA 的含量。标准曲线(0、20、40、60、80 和 100 mg/L)用纯吲哚-3-乙酸制作^[17]。Salkowski 比色液: 50 mL 35% HCl 加入 1 mL 0.5 mol/L FeCl₃^[18]。

ACC 脱氨酶活性测定: 参考 Penrose 等^[19]的方法进行测定。

产生铁载体能力测定: 取 1 mL 活化后的待测菌株菌悬液加入 100 mL YMB 培养基中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养 3 d, 培养液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 下离心 15 min, 取上清液, 加入等体积 CAS 检测液, 充分混匀后在黑暗中静置 30 min, 测定 630 nm 处吸光值(A_s), 蒸馏水为对照调零。空白培养基与 CAS 检测液等体积混匀, 测定 630 nm 处吸光值(A_r), 铁载体计算公式为 $[(A_r - A_s) / A_r] \times 100\%$ ^[20]。

溶磷能力测定: PKO 培养基(测定溶解无机磷能力)和蒙金娜有机磷培养基(测定溶解有机磷能力)^[21]均制备成固体培养基, 把待测菌株点

接种于培养基中央, 28 °C 恒温培养 3 d, 通过观察是否产生溶磷圈来确定该菌株是否具有溶磷能力。

结瘤能力测定: 菌株接种到 YMB 液体培养基中, 28 °C、180 r/min 振荡培养 3 d 后, 于 4 °C、6 000 r/min 离心 10 min, 菌体经无菌水洗涤后重悬于无菌水中, 调节 OD_{600} 为 0.5。野大豆种子用 75% 酒精消毒 5 min 后, 无菌水清洗 5 次。在铺有无菌湿润滤纸的培养皿内均匀播种、保温催芽 48 h。每支试管加入 30 mL 霍格兰营养液, 灭菌冷却后加入 1 mL 菌液。用滤纸做成支架, 放置在试管中, 取个头均匀的幼苗移栽到 1.8 cm×18 cm 试管滤纸中间小口中。将幼苗放于 14 h/10 h 光照培养箱内培养, 24 d 后收获测量结瘤情况。

1.6 根瘤菌盆栽促生试验

将在山东省东营市采集的土壤样品, 灭菌分装于花盆中, 每盆种植野大豆 12 株, 于 14 h/10 h 光照培养箱中培养, 定期补充水分, 1 周后接种菌悬液, 2 d 后再接种 1 次。菌株接种到 YMB 液体培养基中, 28 °C、180 r/min 振荡培养 3 d 后, 于 4 °C、6 000 r/min 离心 10 min, 菌体经无菌水洗涤后重悬于无菌水中, 调节 OD_{600} 为 0.5。观察和记录野大豆的生长状况。盆栽试验的野大豆植株培养 3–4 周后停止培养, 测量各处理野大豆农艺性状(株高、根长、根瘤数)。

1.7 盐胁迫野大豆和大豆盆栽试验

将青岛市即墨农田土壤(非盐渍土), 分装于花盆中, 每盆 250 g 土, 种子消毒后, 每种处理种植 15 颗种子, 重复 3 次。菌株活化后接种到 YMB 液体培养基中, 28 °C、180 r/min 振荡培养 3 d 后, 于 4 °C、6 000 r/min 离心 10 min, 菌体经无菌水洗涤后重悬于无菌水中, 调节 OD_{600} 为 0.5。幼苗时期接种菌悬液, 间隔 2 d 再接种 1 次。第 2 次接种完毕 3 d 后进行 150 mmol/L

NaCl 处理, 观察野大豆和大豆的生长状况, 待长势出现差异, 取样测定植株生理活性指标。

1.8 盆栽植物生理指标测定

脯氨酸(proline)含量测定: 称取相同部位的叶片 0.2 g, 剪碎后放入具塞试管中, 加入 5 mL 3% 磺基水杨酸溶液。加塞后在沸水中反应 15 min, 冷却至室温后在 4 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 2 mL 备用。标准曲线制作: 制备 10 μg/mL 的脯氨酸母液 100 mL。7 只 10 mL EP 管加入脯氨酸母液 0、0.2、0.4、0.8、1.2、1.6 和 2 mL, 加入蒸馏水补齐至 2 mL。标准溶液与样品管中分别加入冰乙酸 2 mL, 显色液 2 mL (酸性茚三酮溶液: 60 mL 冰醋酸、16.4 mL 磷酸加蒸馏水定容至 100 mL, 再加入 2.5 g 茚三酮, 溶解后避光保存), 混合均匀后盖上盖子, 100 °C 水浴 30 min。取出后冷却至室温, 各管加入甲苯 4 mL, 振荡均匀, 静置等待分层后吸取上层甲苯层, 以蒸馏水为对照, 测定 520 nm 波长处的吸光度, 根据标准曲线计算叶片中脯氨酸的含量。

叶绿素(chlorophyll)含量测定: 取相同部位叶片 0.1 g, 剪碎放入研钵中, 加入适量石英砂和碳酸钙, 加入 95% 乙醇 3 mL, 研磨成匀浆。用 95% 乙醇冲洗研钵研棒, 并定容至 25 mL。在 4 000 r/min 下离心 10 min, 吸取上清液 200 μL, 分别在 440、649 和 665 nm 处测定吸光度值。计算公式为叶绿素 a 浓度(mg/L)= $12.71 \times A_{665} - 2.59 \times A_{649}$; 叶绿素 b 浓度(mg/L)= $22.88 \times A_{649} - 4.67 \times A_{665}$ 。

抗氧化酶活性测定: 粗酶液提取物制备如下: 取相同部位叶片 0.5 g, 剪碎放入研钵中, 加入适量液氮, 研磨成匀浆。用预冷的 0.05 mol 磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS, pH 值 7.8)冲洗研钵研棒并定容至 5 mL。在 4 °C、4 000 r/min 下离心 10 min, 上清液即为粗酶液提取物。采用氮蓝四唑(NBT)法测定超氧化物歧

化酶(SOD)活性, 具体方法为: 透明玻璃试管中依次加入 PBS 1.75 mL, 130 mmol/L 甲硫氨酸 (Met) 0.3 mL、750 μ mol/L 氮蓝四唑 (NBT) 0.3 mL、100 μ mol/L 乙二胺四乙酸二钠 (EDTA-2Na) 0.3 mL, 20 μ mol/L 核黄素 0.3 mL 以及待测酶液 0.05 mL, 混合均匀, 总反应体积为 3 mL。选择 2 支试管作为对照组, 用 PBS 代替酶液。其中 1 支试管用锡箔遮光, 其他试管全部透光, 在 4 000 lx 白光下等待光反应 20 min 后立即避光, 在避光状态下吸取 200 μ L 测定 560 nm 波长处的吸光度。以不加酶液的光反应管作为对照, 计算光化学反应被抑制的百分比, 以抑制 NBT 光化学反应的 50% 作为一个酶活力单位。采用愈创木酚法测定过氧化物酶 (POD) 活性: 在干净试管中加入 0.05 mL PBS, 2 mL 0.2% H_2O_2 , 0.95 mL 0.2% 愈创木酚溶液, 立即混匀, 然后加入 0.05 mL 待测酶液迅速混匀, 用分光光度计测定 470 nm 波长处的吸光度。以每分钟每毫克蛋白质吸光值变化的大小作为一个酶活力单位。过氧化氢酶 (CAT) 活性测定: 在干净试管中加入 1 mL 0.2% H_2O_2 (使用 pH 值 7.8 PBS 配置) 和 1.9 mL 蒸馏水, 然后加入 0.1 mL

待测酶液, 立即混匀, 用分光光度计测定 240 nm 波长处的吸光度。酶活性以每分钟每毫克蛋白质的吸光度变化值表示。

2 结果与分析

2.1 野大豆根瘤菌多样性

从野大豆植株的根与根瘤样品中共分离出根瘤菌 87 株, 均属于变形菌门 (*Proteobacteria*), 包括 α -变形菌纲 (*Alphaproteobacteria*) 和 β -变形菌纲 (*Betaproteobacteria*), 分属于 4 个属 10 个种。其中, 4 个属分别为中华根瘤菌属 (*Sinorhizobium*)、根瘤菌属 (*Rhizobium*)、慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*) 和松江菌属 (*Mitsuaria*); 优势属为中华根瘤菌属, 所占比例高达 95%。在种水平上, 包括美洲中华根瘤菌 (*S. americanus*)、盐碱中华根瘤菌 (*S. alkalisoli*)、莫雷洛斯中华根瘤菌 (*S. morelensis*)、刺槐松江菌 (*M. noduli*)、豌豆根瘤菌 (*R. leguminosarum*)、日本慢生根瘤菌 (*B. japonicum*)、黏着剑菌 (*E. adhaerens*)、田菁剑菌 (*E. sesbaniae*) 等, 其中美洲中华根瘤菌 (*S. americanus*) 占有菌株的 79%, 为优势种 (图 1)。

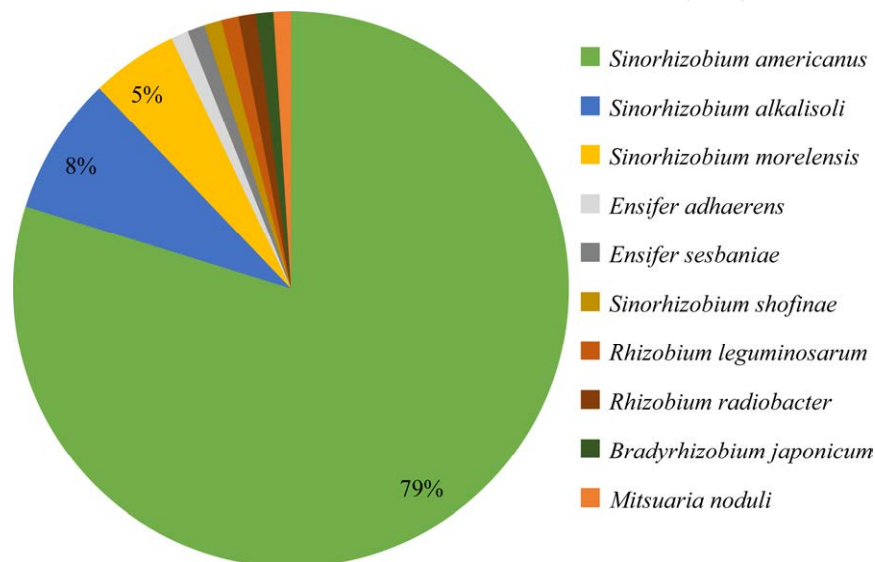


图 1 根瘤菌种水平上的分布

Figure 1 Rhizobial population at the species level.

2.2 根瘤菌促生能力测定

根据根瘤菌种类以及分离地点的不同, 选取了 24 株根瘤菌作为代表性菌株。通过对代表性菌株 IAA、ACC 脱氨酶、铁载体、溶磷等活性的测定, 发现有 16 株根瘤菌产 IAA 能力达到 20 mg/L 以上, 其中菌株 114、126-10 和 71-17 产 IAA 达到 25 mg/L 以上。具有 ACC 脱氨酶活性的菌株有 6 株, 具有溶磷活性的有 16 株, 产生铁载体的有 6 株(表 2)。综合以上指标, 选出菌株 20-1、20-16、94-19、112、126-12、127-11、DL1、DL3、DL7、DL14 和 YING2 共计 11 株

根瘤菌进行盆栽试验, 检测菌株对野大豆生长和共生结瘤能力的影响。结果发现, 只有接种根瘤菌 DL3 后, 野大豆株高显著高于对照组, 而接种其他菌株的野大豆植株株高与对照相比无显著差异(图 2A)。接种根瘤菌 YING2 后, 野大豆根长显著高于对照, 接种其他菌株后野大豆根长略高于对照, 但不显著(图 2B)。在共生结瘤方面, 与对照相比, 10 株菌能够显著提高野大豆结瘤数, 其中接种根瘤菌 DL3 后结瘤数最多(图 2C, 图 3)。综合以上指标, 本研究选择 DL3 (鉴定为美洲中华根瘤菌)作为后续试验菌株。

表 2 代表性菌株各项生理指标

Table 2 Physiological indexes of representative strains

No.	Species	c(IAA)/(mg/L)	ACC deaminase	Siderophore production	Phosphate solubilizing
112	<i>Mitsuaria noduli</i>	7.35	-	-	-
114	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	31.90	-	-	+
121	<i>Sinorhizobium americanus</i>	22.83	-	-	+
126-10	<i>Sinorhizobium alkalisoli</i>	25.87	-	+	-
126-12	<i>Sinorhizobium americanus</i>	19.61	-	-	+
127-1	<i>Sinorhizobium americanus</i>	22.80	-	-	+
127-11	<i>Sinorhizobium morelensis</i>	4.33	+	-	+
127-20	<i>Sinorhizobium morelensis</i>	5.37	+	-	+
20-1	<i>Sinorhizobium alkalisoli</i>	19.37	-	-	+
20-16	<i>Sinorhizobium morelensis</i>	9.75	+	-	-
71-17	<i>Sinorhizobium alkalisoli</i>	28.57	-	+	-
94-19	<i>Ensifer sesbaniae</i>	5.90	+	-	-
DL1	<i>Sinorhizobium americanus</i>	22.37	-	-	+
DL10	<i>Sinorhizobium americanus</i>	23.28	+	-	+
DL14	<i>Sinorhizobium alkalisoli</i>	22.48	-	+	-
DL3	<i>Sinorhizobium americanus</i>	21.13	-	+	+
DL7	<i>Sinorhizobium morelensis</i>	6.92	+	-	+
DL9	<i>Sinorhizobium americanus</i>	20.86	-	-	+
GL11	<i>Sinorhizobium alkalisoli</i>	20.75	-	+	-
GL11-1	<i>Sinorhizobium alkalisoli</i>	23.11	-	+	-
GL4	<i>Sinorhizobium americanus</i>	20.18	-	-	+
SL14	<i>Sinorhizobium americanus</i>	20.11	-	-	+
SL19-1	<i>Sinorhizobium shofinae</i>	21.08	-	-	+
YING2	<i>Sinorhizobium americanus</i>	22.31	-	-	+

+: The strain has this ability; -: The strain does not have this ability. The species in bold are the rhizobia selected for pot experiment.

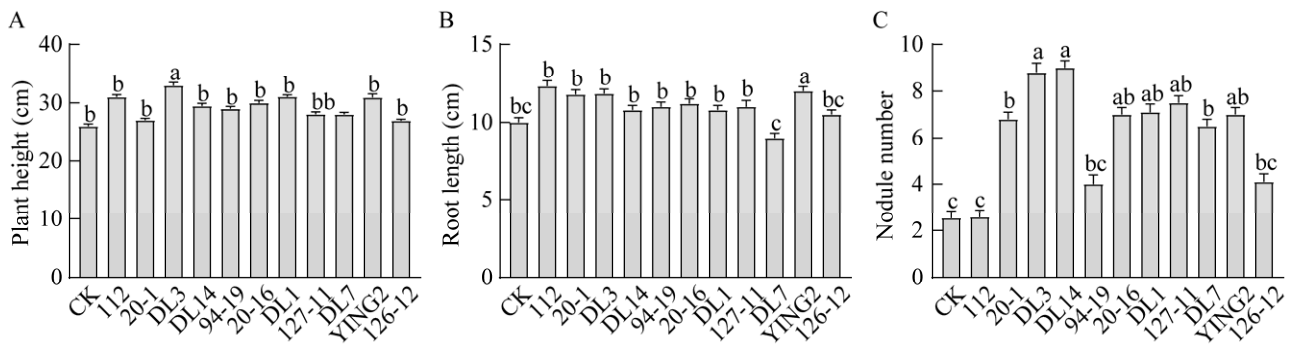


图 2 接种不同根瘤菌对野大豆植株株高(A)、根长(B)、根瘤数(C)的影响

Figure 2 Effects of inoculating different rhizobia on plant height (A), root length (B) and nodule number (C) of *Glycine soja*. Different letters in panels a, b and c indicate statistically significant differences between treatments as determined by Student's *t*-test ($P < 0.05$).

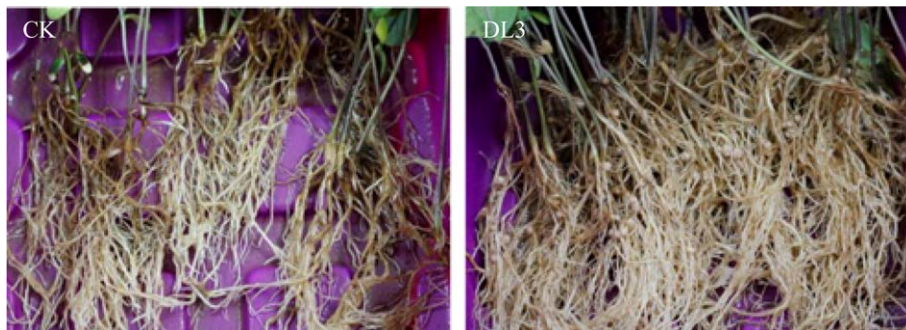


图 3 接种 DL3 后野大豆结瘤效果

Figure 3 Nodulation effect of DL3 inoculation.

2.3 盐胁迫下供试菌株 DL3 对野大豆生长的影响

盐胁迫下, 与对照组(CK)相比, 接种 DL3 的植株脯氨酸含量显著降低, 降至非盐胁迫水平(图 4A), 说明菌株 DL3 缓解了高盐带来的胁迫反应。叶绿素 a 含量明显降低, 叶绿素 b 含量没有显著变化(图 4B、4C)。非盐胁迫下接种菌株 DL3 明显提高了叶片 SOD 酶活性, 而在盐胁迫下, 接种菌株 DL3 后 SOD 酶活性与 CK 相比无显著差异(图 4D)。无论是否盐胁迫, 与 CK 相比, 接种 DL3 均提高了叶片 CAT 酶活, 但差异不显著(图 4E)。2 种处理下, 接种 DL3 后叶片 POD 酶活均没有显著变化(图 4F)。

2.4 供试菌株 DL3 对大豆抗盐促生能力的影响

随后检测了菌株 DL3 对大豆生长的影响。结果发现, 与对照组相比, 非盐胁迫下接种 DL3 对大豆植株鲜重没有显著性提高(图 5A), 而在盐胁迫下, 接种 DL3 显著提高了植株鲜重(图 5B), 说明 DL3 能够在盐胁迫下促进大豆的生长。非盐胁迫下接种菌株 DL3 对叶片脯氨酸含量没有显著性影响(图 6A), 而盐胁迫下接种 DL3 显著降低了叶片脯氨酸含量(图 6B), 说明菌株 DL3 缓解了高盐对大豆带来的胁迫反应。无论是否盐胁迫, 接种 DL3 后叶绿素含量均无显著变化(图 6C-6F)。对大豆叶片抗氧化酶活性

进行测定,发现非盐胁迫下接种 DL3 显著提高了大豆叶片的 SOD、POD 和 CAT 酶活性(图 6G、

6I、6K),而在盐胁迫下抗氧化酶活性变化不显著(图 6H、6J、6L)。

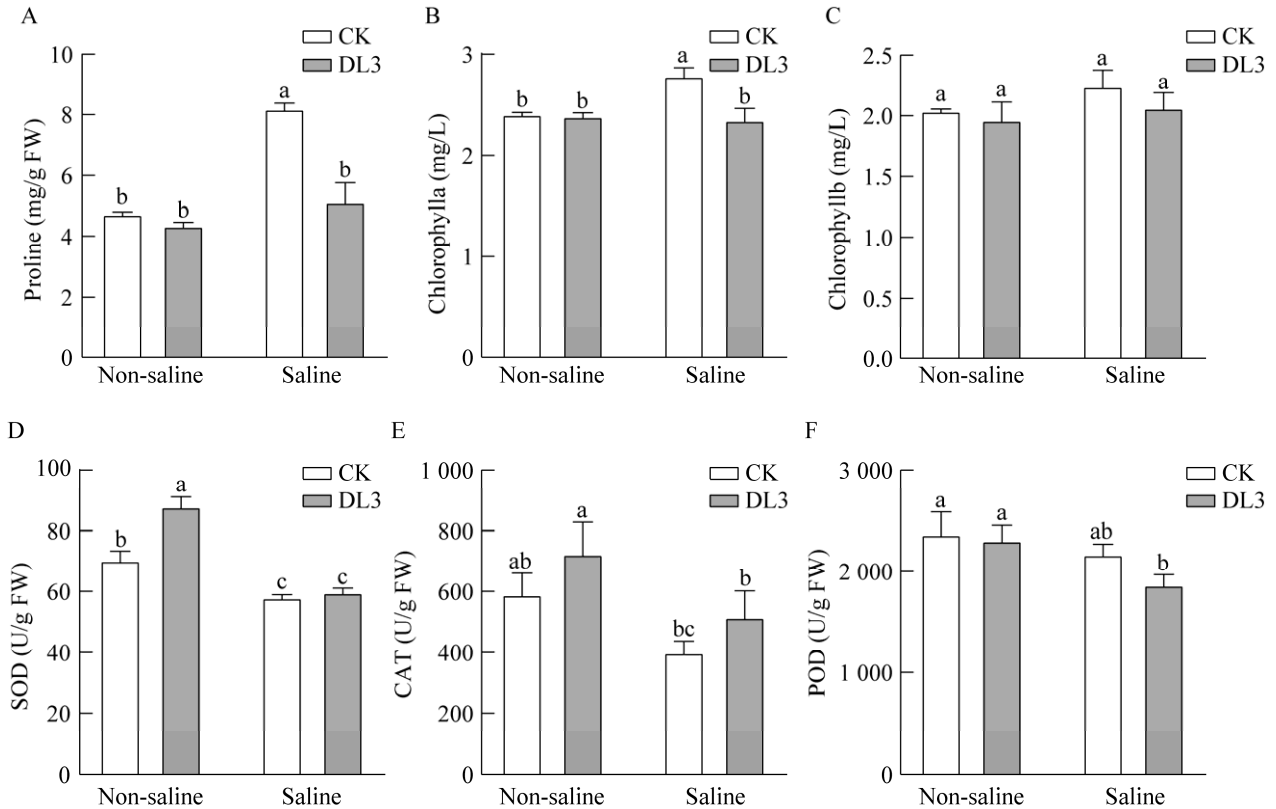


图 4 盐胁迫下接种 DL3 对野大豆生长的影响

Figure 4 Effects of inoculating DL3 on growth of *Glycine soja* under salt stress. Different letters in panels A, B, C, D, E and F indicate statistically significant differences between treatments as determined by Student's *t*-test ($P < 0.05$).

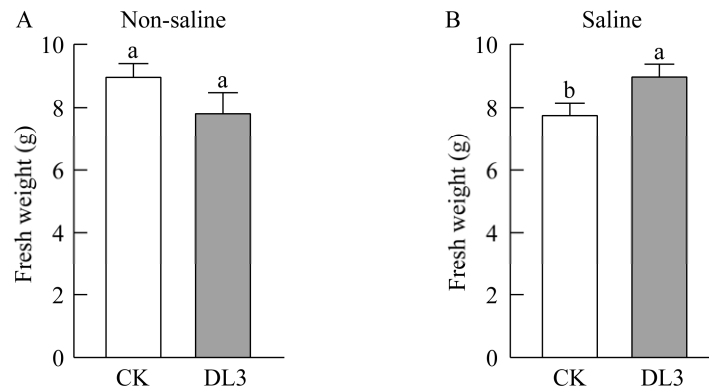


图 5 非盐胁迫(A)和盐胁迫(B)条件下接种菌株 DL3 对大豆植株鲜重的影响

Figure 5 The effects of inoculating strain DL3 on plant fresh weight under normal (A) and salt stress (B) conditions. Different letters in panels a and b indicate statistically significant differences between treatments as determined by Student's *t*-test ($P < 0.05$).

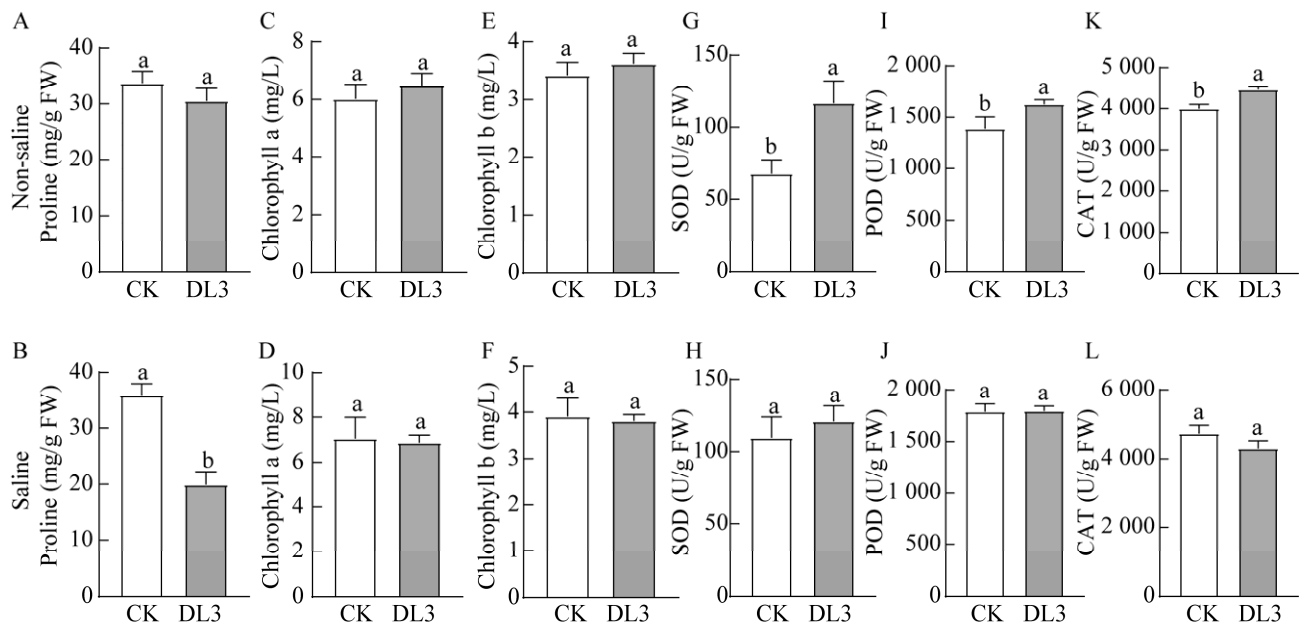


图 6 非盐胁迫(A、C、E、G、I 和 K)和盐胁迫(B、D、F、H、J 和 L)条件下接种菌株 DL3 对大豆植株生理指标的影响

Figure 6 The effects of inoculating strain DL3 on physiological indexes of soybean plants under normal (A, C, E, G, I, and K) and salt stress (B, D, F, H, J, and L) conditions. Different letters in panels A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, and L indicate statistically significant differences between treatments as determined by Student's *t*-test ($P < 0.05$).

3 讨论与结论

本研究采集了滨海盐渍土野大豆的根和根瘤样品,进行了根瘤菌分离培养和鉴定,并对其促生活性进行了检测。结果共分离出 87 株根瘤菌,均属于变形菌门,其中 α -变形菌纲为主要优势类群;在属水平上,中华根瘤菌属占优势地位。先前的研究中,从多种植物根瘤中也获得了大量根瘤菌资源。例如,王晓丽等^[22]从山西大豆根瘤中分离出 203 株菌,其中 172 株快生型根瘤菌为中华根瘤菌属。从大豆品种徐豆 24 根瘤中分离的根瘤菌,中华根瘤菌属占 75%,也是优势菌属^[23]。然而,从贵州尾矿区野生豆科牧草根瘤中分离的根瘤菌,根瘤菌属为优势属,达 54.93%^[24]。从葛藤根瘤中分离纯化的根瘤菌,优势属为慢生根瘤菌属^[25]。以上研

究报道的根瘤菌优势菌属不同,可能与植物品种和地理环境有关。

植物根际细菌在高盐浓度下会通过一系列途径来促进植物生长,如产生 IAA、产 ACC 脱氨酶、产铁载体、溶磷^[26-29]。本研究测定了 24 株代表性根瘤菌菌株的促生特性,结果发现,有 16 株根瘤菌具有产 IAA 能力,6 株能够产生 ACC 脱氨酶,16 株具有溶磷活性,6 株能够产生铁载体。前人研究发现,从紫花苜蓿根瘤中分离出的根瘤菌均具有生长素分泌能力和溶磷能力,且溶磷能力与植株地上生物量呈显著相关性^[30]。综合以上促生指标,从中筛选出 11 株根瘤菌进行野大豆促生和结瘤试验,发现菌株 DL3 (鉴定为美洲中华根瘤菌)能显著提高植株的株高和结瘤数,因此选择 DL3 为供试菌株进行下一步研究。

通过盆栽试验, 研究盐胁迫下回接供试菌株 DL3 促进野大豆和大豆生长的作用机制。结果表明, 与正常条件相比, 野大豆叶片脯氨酸含量在盐胁迫下显著增加, 然而, 接种供试菌株 DL3 后, 脯氨酸含量降至非盐胁迫水平(图 4A)。研究表明, 脯氨酸可以表征植物受环境胁迫的程度^[31]。因此, 本研究中接种菌株 DL3 使植物脯氨酸含量降低, 说明该菌株缓解了盐胁迫对野大豆的伤害。本研究进一步将供试菌株 DL3 接种至栽培大豆根际, 发现该菌株在盐胁迫下显著提高了大豆植株的鲜重, 具有一定的促生作用。王梦亮等^[32]对大豆根际施加适量浓度根瘤促生剂, 发现其有助于提高植株干重。此外, 与野大豆相同, 盐胁迫下接种菌株 DL3 同样降低了叶片脯氨酸含量, 缓解了大豆盐胁迫程度。Abdelaziz 等^[33]发现接种印度梨形孢(*Piriformospora indica*)能够促进番茄在盐胁迫下的生长, 并降低了叶片脯氨酸和脱落酸水平, 维持了植株离子稳态。

综上所述, 从耐盐植物野大豆中分离出的根瘤菌 DL3, 对野大豆和大豆均具有促生作用。将祖先植物的微生物资源应用于驯化栽培品种是一种新兴的资源开发策略, 能够为发展盐土农业和实现大豆等作物在盐碱地的种植贡献力量。

参考文献

- [1] JAMIL A, RIAZ S, ASHRAF M, FOOLAD MR. Gene expression profiling of plants under salt stress[J]. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2011, 30(5): 435-458.
- [2] 井大炜, 马海林, 刘方春, 杜振宇, 马丙尧, 管林生, 贾海慧, 郭英华, 丁洪星. 盐胁迫环境下接种根际促生细菌对白蜡树根际生物学特征及其生长的影响[J]. *水土保持通报*, 2018, 38(1): 76-81.
JING DW, MA HL, LIU FC, DU ZY, MA BY, ZAN LS, JIA HH, GUO YH, DING HX. Effects of inoculating plant growth-promoting rhizobacteria on biological characteristics of rhizosphere and growth of *Fraxinus chinensis* under salt stress[J]. *Bulletin of Soil and Water Conservation*, 2018, 38(1): 76-81 (in Chinese).
- [3] 赵叶舟, 王浩铭, 汪自强. 豆科植物和根瘤菌在生态环境中的地位和作用[J]. *农业环境与发展*, 2013, 30(4): 7-12.
ZHAO YZ, WANG HM, WANG ZQ. The role of leguminous plants and *Rhizobium* in ecological environment[J]. *Agro-Environment and Development*, 2013, 30(4): 7-12 (in Chinese).
- [4] 邵秋雨, 董醇波, 韩燕峰, 梁宗琦. 植物根际微生物组的研究进展[J]. *植物营养与肥料学报*, 2021, 27(1): 144-152.
SHAO QY, DONG CB, HAN YF, LIANG ZQ. Research progress in the rhizosphere microbiome of plants[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2021, 27(1): 144-152 (in Chinese).
- [5] KANG SM, RADHAKRISHNAN R, KHAN A L, KIM MJ, PARK JM, KIM BR, SHIN DH, LEE IJ. Gibberellin secreting rhizobacterium, *Pseudomonas putida* H-2-3 modulates the hormonal and stress physiology of soybean to improve the plant growth under saline and drought conditions[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2014, 84: 115-124.
- [6] EGAMBERDIEVA D, KUCHAROVA Z. Selection for root colonising bacteria stimulating wheat growth in saline soils[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2009, 45(6): 563-571.
- [7] SANTOYO G, MORENO-HAGELSIEB G, DELC OROZCO-MOSQUEDA M, GLICK BR. Plant growth-promoting bacterial endophytes[J]. *Microbiological Research*, 2016, 183: 92-99.
- [8] AHMAD ANJUM S, ASHRAF U, ZOHAIB A, TANVEER M, NAEEM M, ALI I, TABASSUM T, NAZIR U. Growth and developmental responses of crop plants under drought stress: a review[J]. *Zemdirbyste-Agriculture*, 2017, 104(3): 267-276.
- [9] 纪超, 王晓辉, 刘训理. 盐胁迫环境下植物促生菌的作用机制研究进展[J]. *生物技术通报*, 2020, 36(4): 131-143.
JI C, WANG XH, LIU XL. Research progress on the action mechanism of plant growth-promoting bacteria under salt stress[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2020, 36(4): 131-143 (in Chinese).
- [10] ABDELKRIM S, JEBARA SH, JEBARA M. Antioxidant systems responses and the compatible solutes as contributing factors to lead accumulation and tolerance in *Lathyrus sativus* inoculated by plant

- growth promoting rhizobacteria[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018, 166: 427-436.
- [11] HAN QQ, LÜ XP, BAI JP, QIAO Y, PARÉ PW, WANG SM, ZHANG JL, WU YN, PANG XP, XU WB, WANG ZL. Beneficial soil bacterium *Bacillus subtilis* (GB03) augments salt tolerance of white clover[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5: 525.
- [12] 徐萌, 王宇楠, 李滢璟, 李梦雪, 王兰兰, 于翠梅, 马莲菊. 一株野生大豆内生真菌 YD-25 的筛选鉴定及其抗重金属活性研究[J]. *大豆科学*, 2019, 38(2): 258-266.
- XU M, WANG YN, LI YJ, LI MX, WANG LL, YU CM, MA LJ. Screening and identification of a wild soybean endophytic fungus YD-25 and its anti-heavy metal activity[J]. *Soybean Science*, 2019, 38(2): 258-266 (in Chinese).
- [13] 陈林楠, 岳琳. 野生大豆资源利用研究综述[J]. *种子科技*, 2022, 40(11): 15-18.
- CHEN LN, YUE L. Review on utilization of wild soybean resources[J]. *Seed Science & Technology*, 2022, 40(11): 15-18 (in Chinese).
- [14] 朱梦卓, 孙洋洋, 赵晓妍, 董芮萌, 朱森, 汪雅楠, 王兰兰, 于翠梅, 马莲菊. 野大豆内生假单胞菌 YDX26 的鉴定及促生抗逆特性[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(11): 4100-4110.
- ZHU MZ, SUN YY, ZHAO XY, DONG RM, ZHU M, WANG YN, WANG LL, YU CM, MA LJ. Identification of endophytic *Pseudomonas* sp. YDX26 in *Glycine soja* and its growth-promoting and stress-resistant characteristics[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(11): 4100-4110 (in Chinese).
- [15] 张丹雨, 曲甜甜, 刘莹莹, 郭英, 卜宁. 2 株野生大豆根际促生菌抑菌促生作用研究[J]. *大豆科学*, 2019, 38(4): 563-569.
- ZHANG DY, QU TT, LIU YY, GUO Y, BU N. Antibacterial function and promoting effect of two plant growth promoting rhizobial from *Glycine soja*[J]. *Soybean Science*, 2019, 38(4): 563-569 (in Chinese).
- [16] WEISBURG WG, BARNES SM, PELLETIER DA, LANE DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(2): 697-703.
- [17] 郭英, 杨萍, 张丹雨, 刘莹莹, 马莲菊, 卜宁. 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.
- GUO Y, YANG P, ZHANG DY, LIU YY, MA LJ, BU N. Screening, identification and growth-promoting effect of multi-function rhizosphere growth-promoting strain of wild soybean[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2018, 34(10): 108-115 (in Chinese).
- [18] 陈越, 李虎林, 朱诗苗, 闫寒, 郎彬, 姬文秀. 产吲哚乙酸(IAA)促生菌的分离鉴定及对烟草种子萌发和幼苗生长发育的影响[J]. *作物杂志*, 2020(2): 176-181.
- CHEN Y, LI HL, ZHU SM, YAN H, LANG B, JI WX. Isolation and identification of IAA-producing rhizobacteria and its effects on seed germination and seedling growth of tobacco[J]. *Crops*, 2020(2): 176-181 (in Chinese).
- [19] PENROSE DM, GLICK BR. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria[J]. *Physiologia Plantarum*, 2003, 118(1): 10-15.
- [20] 周亚男, 韩小斌, 魏可可, 苟剑渝, 王先勃, 张成省, 郑艳芬. 烟草根际可培养微生物多样性及防病促生菌的筛选[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(12): 4649-4663.
- ZHOU YN, HAN XB, WEI KK, GOU JY, WANG XB, ZHANG CS, ZHENG YF. The culturable microbial diversity in tobacco rhizosphere and their plant growth-promoting and biocontrol properties[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(12): 4649-4663 (in Chinese).
- [21] 漫静, 唐波, 邓波, 李佳欢, 何玉娟, 张佳良. 羊草根际促生菌的分离筛选及促生作用研究[J]. *草业学报*, 2021, 30(1): 59-71.
- MAN J, TANG B, DENG B, LI JH, HE YJ, ZHANG JL. Isolation, screening and beneficial effects of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in the rhizosphere of *Leymus chinensis*[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2021, 30(1): 59-71 (in Chinese).
- [22] 王晓丽, 秦杰, 王敏, 王利祥, 杜维俊. 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.
- WANG XL, QIN J, WANG M, WANG LX, DU WJ. Isolation, identification and symbiotic matching of soybean rhizobia from Shanxi Province[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2022, 38(3): 59-68 (in Chinese).
- [23] 李彦连, 王传雷, 徐保民, 张修国, 魏祥圣, 杨升辉. 徐豆 24 大豆根瘤菌共生匹配性筛选及应用[J]. *大豆科学*, 2020, 39(4): 612-620.
- LI YL, WANG CL, XU BM, ZHANG XG, WEI XS, YANG SH. Screening and application of suitable symbiotic combination between rhizobia and soybean

- cultivar xudou 24[J]. *Soybean Science*, 2020, 39(4): 612-620 (in Chinese).
- [24] 王海瑾, 曾庆飞, 韦兴迪, 王佳楚函, 韦鑫, 陈超. 贵州尾矿区野生豆科牧草根瘤菌及其抗性测定[J]. *草地学报*, 2022, 30(12): 3253-3262.
WANG HJ, ZENG QF, WEI XD, WANG J, WEI X, CHEN C. The rhizobia of wild legume forage in Guizhou tailings areas and determination of resistance[J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2022, 30(12): 3253-3262 (in Chinese).
- [25] 吉玉玉, 曾庆飞, 王海瑾, 王佳楚函, 欧二凌, 韦兴迪, 韦鑫, 龙忠富. 贵州喀斯特山区野生葛藤根瘤菌的资源利用[J]. *耕作与栽培*, 2022, 42(6): 35-41.
JI YY, ZENG QF, WANG HJ, WANG J, OU EL, WEI XD, WEI X, LONG ZF. Rhizobia of *Pueraria lobata* in Karst mountainous area of Guizhou and the resource utilization[J]. *Tillage and Cultivation*, 2022, 42(6): 35-41 (in Chinese).
- [26] LIU SF, HAO HT, LU X, ZHAO X, WANG Y, ZHANG YB, XIE ZK, WANG RY. Transcriptome profiling of genes involved in induced systemic salt tolerance conferred by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 10795.
- [27] GLICK BR, CHENG ZY, CZARNY J, DUAN J. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2007, 119(3): 329-339.
- [28] VERBON EH, TRAPET PL, STRINGLIS IA, KRUIJS S, BAKKER PAHM, PIETERSE CMJ. Iron and immunity[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2017, 55: 355-375.
- [29] AUGÉ RM, TOLER HD, SAXTON AM. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and osmotic adjustment in response to NaCl stress: a meta-analysis[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5: 562.
- [30] 朱瑞芬, 刘杰淋, 王建丽, 申忠宝, 韩微波, 陈积山. 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.
ZHU RF, LIU JL, WANG JL, SHEN ZB, HAN WB, CHEN JS. Aanalysis of above ground biomass and biological characteristic of *Rhizobium* of alfalfa[J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2017, 25(6): 1317-1323 (in Chinese).
- [31] CLAUSSEN W. Proline as a measure of stress in tomato plants[J]. *Plant Science*, 2005, 168(1): 241-248.
- [32] 王梦亮, 张蕊, 王俊宏, 张婧. 根瘤促生剂对大豆促生结瘤的影响[J]. *大豆科学*, 2011, 30(2): 246-249.
WANG ML, ZHANG R, WANG JH, ZHANG J. Soybean growth and nitrogen fixation affected by different concentration of nodule growth-promoting agent[J]. *Soybean Science*, 2011, 30(2): 246-249 (in Chinese).
- [33] ABDELAZIZ ME, ABDELSATTAR M, ABDELDAYM EA, ATIA MAM, MAHMOUD AWM, SAAD MM, HIRT H. *Piriformospora indica* alters Na⁺/K⁺ homeostasis, antioxidant enzymes and LeNHX1 expression of greenhouse tomato grown under salt stress[J]. *Scientia Horticulturae*, 2019, 256: 108532.