



白刺花根瘤中分离细菌的物种多样性及其促生效应

任明霞[#], 李静[#], 艾加敏, 柳晓东, 姜影影, 邓振山^{*}

延安大学生命科学学院, 陕西 延安 716000

任明霞, 李静, 艾加敏, 柳晓东, 姜影影, 邓振山. 白刺花根瘤中分离细菌的物种多样性及其促生效应[J]. 微生物学报, 2024, 64(8): 2940-2954.

REN Mingxia, LI Jing, AI Jiamin, LIU Xiaodong, JIANG Yingying, DENG Zhenshan. Species diversity and plant growth-promoting effects of bacteria isolated from the root nodules of *Sophora davidii*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(8): 2940-2954.

摘要: 【目的】除根瘤菌外, 豆科植物的根瘤中还广泛存在大量的非根瘤菌。与植物其他组织中的内生细菌相比, 对根瘤中非根瘤菌的物种多样性尚缺乏系统研究, 它们存在的意义及其生态学作用更需深入研究和探讨。【方法】以陕北黄土丘陵沟壑区野生豆科固氮灌木白刺花为研究对象, 通过传统培养法对白刺花根瘤中根瘤菌和非根瘤菌的物种多样性开展全面系统的研究, 评价菌株的促生特性, 并验证其对小麦的促生效果。【结果】从陕北 6 个不同县区的白刺花根瘤中共筛选获得 320 株内生细菌, 16S rRNA 基因系统发育分析将它们鉴定为 4 门 7 纲 17 目 35 科 55 属, 其中假单胞菌属(*Pseudomonas*, 18.44%)、芽孢杆菌属(*Bacillus*, 17.81%)和中慢生根瘤菌属(*Mesorhizobium*, 11.56%)是白刺花根瘤中的优势菌属。回接试验表明, 中慢生根瘤菌属菌株和苍白杆菌属菌株 HL-2 均能与宿主植物白刺花共生形成根瘤。对宝塔区的 192 株白刺花根瘤内生细菌进行促生特性研究, 结果显示 115 株细菌具有固氮能力, 20 株细菌具有较好的溶磷能力, 78 株具有分泌吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)的能力, 18 株分泌铁载体。从中选取了 4 株优良菌株, 通过单菌及多菌混合接种, 测定它们对盆栽种植的小麦农艺的促生作用, 结果表明处理组 HIJ 对小麦的株高和鲜重分别提高了 49.65%和 140.00%, 处理组 HK 对小麦的根长提高了 45.84%, 处理组 IK 对小麦幼苗的叶绿素含量提高了 25.48%。【结论】白刺花根瘤中具有物种多样的非根瘤菌。本研究结果对进一步探明此类微生物资源在自然生态系统中的作用和丰富内生细菌资源库有重要的科学意义, 同时也为它们在陕北干旱区生态恢复中的应用提供理论依据。

关键词: 白刺花; 根瘤; 根瘤菌; 非根瘤菌; 物种多样性; 植物促生长效应

资助项目: 国家自然科学基金(32160003)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32160003).

[#]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding author. E-mail: zhenshandeng214@163.com

Received: 2024-01-23; Accepted: 2024-04-26; Published online: 2024-05-06

Species diversity and plant growth-promoting effects of bacteria isolated from the root nodules of *Sophora davidii*

REN Mingxia[#], LI Jing[#], AI Jiamin, LIU Xiaodong, JIANG Yingying, DENG Zhenshan^{*}

School of Life Sciences, Yan'an University, Yan'an 716000, Shaanxi, China

Abstract: [Objective] There are numerous non-rhizobia in addition to rhizobia in the root nodules of leguminous plants. Despite the extensive studies about the endophytic bacteria in other plant tissues, little attention has been paid to the species diversity of non-rhizobia in root nodules. Therefore, further research is needed to explore the significance and ecological roles of non-rhizobia. [Methods] The root nodules of wild *Sophora davidii* (Franch.) Skeels, a leguminous nitrogen-fixing shrub growing in the hilly-gully loess region of northern Shaanxi, were collected. The species diversity of rhizobia and non-rhizobia in the root nodules of *S. davidii* was systematically studied by the conventional culture method. The plant growth-promoting effects of the strains were evaluated and their growth-promoting effects on wheat seedlings were verified. [Results] A total of 320 strains of endophytic bacteria were isolated from the root nodules of *S. davidii* in six counties/districts in northern Shaanxi. The phylogenetic analysis based on the 16S rRNA gene sequences identified the strains into 55 genera, 35 families, 17 orders, 17 classes of 4 phyla. *Pseudomonas* (18.44%), *Bacillus* (17.81%), and *Mesorhizobium* (11.56%) were the dominant genera. The results of re-inoculation experiments showed that *Mesorhizobium* sp. and *Ochrobactrum* sp. HL-2 formed root nodules with the host plant. Furthermore, the plant growth-promoting characteristics of 192 strains isolated Baota District were studied. The results showed that 115, 20, 78, and 18 strains possessed the abilities of fixing nitrogen, solubilizing phosphorus, producing indole-3-acetic acid (IAA), and secreting siderophores, respectively. Four elite strains were selected and inoculated alone or in combination into the wheat seedlings in pots, and their growth-promoting effects on the agronomic traits of wheat seedlings were evaluated. The results indicated that the treatment HIJ increased the plant height and fresh weight of wheat seedlings by 49.65% and 140.00% respectively. The treatments HK and IK increased the root length and chlorophyll content by 45.84% and 25.48%, respectively. [Conclusion] There are diverse non-rhizobia in the root nodules of *S. davidii*. The results of this study have great scientific significance for exploring the role of such microbial resources in natural ecosystems and enriching the resource pool of endophytic bacteria. Additionally, the results provide a theoretical basis for the application of these strains in ecological restoration in the arid region of northern Shaanxi.

Keywords: *Sophora davidii*; root nodules; rhizobia; non-rhizobia; species diversity; plant growth-promoting effects

根瘤菌栖息在豆科植物根瘤内,其生物固氮作用在生态系统的氮循环中发挥特殊的作用^[1]。豆科植物以较低的额外碳成本^[2]向共生根瘤菌

换取氮素,以供植物生长发育与繁殖。接种根瘤菌不仅可以促进植物生长,还有许多环境治理价值,如提高土壤肥力^[3]、降解除草剂^[4]与重

金属^[5]、改善土壤酸化与板结^[6]等。目前的研究发现,除根瘤菌外,在根瘤内还存在大量非根瘤菌(non-rhizobia endophytes, NRE)^[7],它们生活史的部分或全部阶段生活于根瘤内,并且不会对宿主植物产生明显的损害作用,所以它们是生活在根瘤中的内生细菌^[8]。目前关于根瘤内生细菌的研究主要集中在根瘤菌的多样性及其功能,对根瘤内的非根瘤菌的研究较少,主要集中在非根瘤菌多样性等方面^[9],对其所发挥的生态作用,尤其是它们与根瘤菌之间互作关系及其机制还需要深入研究^[8-10]。

目前,已从多种豆科植物根瘤内筛选出不同种类的非根瘤菌,如拉恩氏菌属(*Rahnella*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、泛菌属(*Pantoea*)、土壤杆菌属(*Agrobacterium*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、伯克霍尔德氏菌属(*Burkholderia*)、草小螺菌属(*Herbaspirillum*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、根瘤内生杆菌属(*Endobacter*)、金黄杆菌属(*Chryseobacterium*)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)、固氮螺菌属(*Azospirillum*)、葡糖酸醋杆菌属(*Gluconacetobacter*)、贪噬菌属(*Variovorax*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、小单胞菌属(*Micromonospora*)、生丝微菌属(*Hyphomicrobium*)等^[8]。国内学者也在根瘤内非根瘤菌方面开展了一些研究^[11-17],根瘤内部的非根瘤菌的研究刚刚起步,我国学者发表了很好的综述^[9-10]。此外,根瘤内的这些非根瘤菌将根瘤作为其栖息和繁殖场所,同时,对宿主植物发挥着广泛的有益效应,包括通过产生生长激素和溶磷等方式对宿主植物的促生作用、固氮作用、铁载体介导的互作、提高宿主植物的抗逆能力、对多种植物病原菌有生物防治作用以及提高豆科植物的重金属耐受性等^[8,18]。因此,本着资源经济的原则,豆科植物招募的非根瘤菌的种类与数

量是不同的,这受到植物种类及与根瘤菌亲缘关系^[16]的影响。然而,这些非根瘤菌在根瘤内定殖,也会对宿主植物和根瘤菌产生不同的影响。

白刺花[*Sophora davidii* (Franch.) Skeels]别名马蹄针,为豆科槐属植物,具有良好的抗旱适应性^[19],是陕北地区绿化和退耕还林的应用树种之一。白刺花在阳坡、半阳坡植物群落演替中处于中间灌丛阶段,为荒山的建群植物种之一,是生境演替先锋种^[20]。其庞大的根系可以改善黄土区土壤结构从而提高土壤抗剪强度^[21],是固土的理想材料。因此,白刺花在干旱区植物群落演替、维持物种多样性、改良土壤和控制土壤侵蚀等方面具有重要的生态价值。然而,除了对白刺花根瘤菌多样性的研究外,对该植物固氮营养群落的研究较少^[22]。

为探明非根瘤菌物种多样性及其与根瘤菌的协同进化关系,本研究以陕北乡土野生豆科固氮灌木白刺花及其根瘤为材料,采用培养法,分析根瘤内生细菌的物种多样性和系统发育地位,获得群落组成分布和物种丰度等信息,并对筛选到的菌株进行植物回接试验,验证内生细菌的促结瘤能力。最后对分离出的菌株测定其溶磷、固氮、产铁载体、产吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)的能力,并以接种小麦幼苗的方式,研究菌株的促生效应。本研究的开展在根瘤微生物学上具有重要意义,可为揭示非根瘤菌的起源、进化及与根瘤菌之间的协同进化关系提供理论依据,同时也为它们在陕北地区生态恢复中的应用及巩固退耕还林工程成果提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 培养基和试剂

营养琼脂(nutrient agar, NA)培养基(g/L): 蛋白胨 5.00, NaCl 5.00, 牛肉膏 3.00, pH 7.2, 用于细菌传代与培养。酵母甘露醇肉汤(yeast

extract mannitol broth, YMA)培养基(g/L): 甘露醇 10.00, 酵母粉 3.00, NaCl 0.10, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.20, K_2HPO_4 0.25, KH_2PO_4 0.25, pH 7.2, 用于培养根瘤菌。蛋白胨-酵母-葡萄糖肉汤(peptone yeast glucose broth, PYG)培养基(g/L): 蛋白胨 5.00, 葡萄糖 5.00, 酵母粉 0.20, NaCl 0.50, 牛肉膏 3.00, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.50, pH 7.2, 用于培养非根瘤菌。 R_2A 培养基(g/L): 酵母粉 0.50, 蛋白胨 0.50, 酪蛋白水解物 0.50, 葡萄糖 0.50, 可溶性淀粉 0.50, K_2HPO_4 0.30, MgSO_4 0.024, 丙酮酸钠 0.30, pH 7.5, 用于培养生长缓慢的细菌。马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基(g/L): 马铃薯 200.00, 葡萄糖 20.00, pH 自然, 用于分离培养放线菌与真菌。TY 培养基(g/L): 胰蛋白胨 5.00, 酵母粉 3.00, $\text{CaCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.70, pH 7.2, 用于制作接种剂。阿须贝氏无氮(Ashby's broth)培养基(g/L): 甘露醇 10.00, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.20, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.20, KH_2PO_4 0.20, NaCl 0.20, CaCO_3 5.00, pH 自然, 用于检测菌株固氮活性。Pikovaskaias 无机磷(Pikovaskaias inorganic phosphorus broth, PKO)培养基(g/L): 葡萄糖 10.00, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.50, NaCl 0.30, KCl 0.30, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.30, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.03, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5.00, pH 7.2, 用于检测菌株溶磷能力。金氏B肉汤(King's B broth, King B)培养基(g/L): 蛋白胨 20.00, K_2HPO_4 1.50, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.50, 丙三醇 10.00 mL/L, pH 7.2, 用于检测菌株产 IAA。嗜铁素检测培养基(chrome azurol S assay, CAS)培养基(g/L): 蔗糖 2.00, 酸水解酪素 3.00, CaCl_2 0.001 1, MgSO_4 0.002 4, pH 7.5。每 100.00 mL 未凝固的 CAS 培养基中, 加入 CAS 染液和磷酸盐缓冲液各 5.00 mL, 用于检测菌株产铁载体。以上培养基均于 121 °C 灭菌 20 min, 配制固体培养基时需另加入 15.00–20.00 g/L 琼脂粉。

Salkowski's 试剂: 1.00 mL 0.50 mol/L FeCl_3 加入 49.00 mL 35% HClO_4 溶液中, 用于检测菌株产 IAA。CAS 染液: a 液: 0.12 g CAS 溶解于 100.00 mL 无菌水中, 并加入 20.00 mL 1.00 mmol/L FeCl_3 溶液进行混合; b 液: 0.15 g 十六烷基三甲基溴化铵(hexadecyl trimethyl ammonium bromide, CTAB)溶解于 80.00 mL 无菌水中; 将 a 液缓慢加入 b 液中, 搅拌混匀即为 CAS 染液, 用于检测菌株产铁载体。

1.2 样品采集和处理

2021 年 5 月, 在陕西省延安市 6 个县区采集了开花期的白刺花根瘤, 包括黄陵县(HL)、富县(FX)、宝塔区(BT)、延长县(YC)、志丹县(ZD)和子长市(ZC)。每个县选取 3 个相隔距离大于 10 km 的采样点, 每个采样点选取 3 个相隔距离大于 1 km 的子点。在每个子点中随机选取 15 棵间距大于 30 m 的白刺花植株, 挖出根部。从每株植物侧根上选取 3–4 颗大小相近且无损伤的根瘤, 去除表面杂质, 放入有硅胶的 1.5 mL 无菌离心管中。具体采样地点信息及方法见参考文献[17]。部分根瘤用于内生细菌分离, 其余根瘤存储于 -80 °C, 送至北京诺禾致源生物科技有限公司进行高通量测序。

1.3 白刺花内生细菌分离和纯化

选取 3–5 个新鲜、健康、无损伤的根瘤, 用超声波清洗机将根瘤表面清洗干净, 于 95% 的乙醇中浸泡 1 min, 无菌水冲洗 5 次, 再用 3% NaClO 浸泡 5 min, 之后用无菌水冲洗 10 次。用无菌枪头将根瘤粉碎, 将根瘤汁液分别涂抹于 NA、YMA、 R_2A 以及 PYG 培养基上^[23], 于 28 °C 培养箱中培养 3–5 d。取最后一次冲洗的无菌水涂布于 PDA 培养基上作为对照, 置于 28 °C 培养箱中培养, 检验根瘤表面消毒是否彻底。对培养基中长出的菌落, 采用稀释平板和划线法进行分离纯化。待长出单菌落, 记录菌落形态特征并编

号后, 将平板保存于 4 °C 冰箱备用。

1.4 鉴定从根瘤分离的细菌

使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)提取菌株基因组 DNA。利用 PCR 扩增单菌落的 16S rRNA 基因序列, 引物为细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-CGGGATCCAGAGTTTGATCCTGGCTCAG AACGAACGCT-3')和 1492R (5'-CGGGATCCTA CGGCTACCTTGTTACGACTTCACCCC-3')。PCR 反应体系(25 μ L): 2 \times *Es Taq* MasterMix 12.5 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, DNA 模板 1 μ L, ddH₂O 9.5 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 35 个循环; 72 °C 终延伸 5 min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 16S RNA 基因扩增产物, 检测条件为 120 V、30 min。检测合格后的目的基因扩增产物送至北京擎科生物科技股份有限公司进行测序, 引物同每种基因 PCR 扩增保持一致。将获得的序列提交至 NCBI 的 GenBank 数据库, 得到菌株登录号。通过 BLAST 序列比对与已知序列进行同源性分析, 选用邻接(neighbor-joining, NJ)法在 MEGA X 软件中构建系统发育树。

1.5 内生细菌促生特性测定

由于从宝塔区分离得到的 192 株根瘤内生细菌, 占陕北 6 县区共分离得到的总根瘤内生细菌的 60%, 因此选择从宝塔区白刺花根瘤中分离得到的内生细菌进行促生特性研究。

1.5.1 固氮能力测定

将以上 192 株根瘤内生细菌接种于 Ashby 液体培养基中, 以接种无菌水为对照, 以上处理均于 28 °C 静置培养, 7 d 后观察培养基是否浑浊, 若培养基出现明显浑浊, 则该菌株具有潜在的固氮活性。

1.5.2 溶磷能力测定

利用溶磷圈法检测菌株溶磷能力。在 PKO

固体培养基等距离三点接种以上菌株, 于 28 °C 培养 5–7 d, 观察菌落周围是否产生溶磷圈, 若有则表明该菌株具有溶磷能力, 记录溶磷圈直径 D 与菌落直径 d , 并计算其直径比 D/d 。

定量测定菌株溶磷含量, 选择解磷能力的菌株, 接种至 PKO 液体培养基, 于 28 °C、160 r/min 培养 7 d, 4 °C、10 000 r/min 离心 20 min, 用钼锑抗比色法测定上清液中溶磷含量^[24], 根据磷含量标准曲线计算菌株溶磷含量。

1.5.3 产 IAA 能力测定

使用 Salkowski's 比色法^[25]测定菌株产 IAA 能力。将以上菌株接种于含有色氨酸(1 g/L)的 King B 液体培养基中, 于 28 °C、180 r/min 培养 3 d, 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min, 取 2 mL 上清液和 4 mL Salkowski's 试剂并混匀, 室温避光显色 30 min, 观察混合液颜色是否变为粉色, 若混合液变为粉色, 则表明该菌株产生 IAA。

定量测定该菌株产 IAA 的量, 取 4 mL 显色完成且呈粉红色的混合液, 以未接种菌株的培养基为对照, 测量 OD_{535} 吸光值, 根据标准曲线计算菌株产 IAA 量。

1.5.4 产铁载体能力测定

使用 CAS 培养基定性检测菌株能否产生铁载体^[26]。在 CAS 平板的 3 个不同位置接种菌株, 于 28 °C 培养 3 d, 观察菌落周围是否出现黄绿色光晕, 若出现黄绿色光晕, 则表明该菌株可以产生铁载体。

1.5.5 菌株抑制病原真菌能力测定

选择有促生能力的菌株测定其抑制 3 株病原真菌的能力。选取木贼镰孢菌(*Fusarium equiseti*)、甜瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*)以及小麦木霉病菌(*Fusarium graminearum*)作为指示菌, 将 3 株指示菌的菌悬液分别涂布于 PDA 平板上, 然后于平板等距离 4 点接种各菌株。将平板置于 4 °C 过夜后, 转移至 28 °C 培养 2–3 d, 随后观察是否出现抑菌效果^[27]。观察菌落周围

是否产生抑菌圈,若有则表明该菌株具有抑菌能力,记录抑菌圈直径 D 与菌落直径 d ,并计算其直径比 D/d 。

1.5.6 促生菌株 16S rRNA 基因测序及分子鉴定

结合促生特性各项指标,选择 4 株促生特性良好的菌株 BT-229、BT-2、BT-108 和 BT-89 进行分子鉴定。

1.6 白刺花根瘤内生细菌的回接试验

用于回接试验的代表菌株从试验筛选获得的 55 个属 320 株内生细菌中选取(见附表 1,数据已提交国家微生物科学数据中心,编号为 NMDCX0000268)。具体的从假单胞菌属(*Pseudomonas*)、中慢生根瘤菌属(*Mesorhizobium*)、根瘤菌属(*Rhizobium*)、叶杆菌属(*Phyllobacterium*)、苍白杆菌属(*Ochrobactrum*)、德沃斯氏菌属(*Devosia*)和贪铜菌属(*Cupriavidus*) 7 个属中,每个种分类水平下选择一株代表菌株进行回接试验。其余 48 个属中,每个属对应选一株或几株代表菌株进行白刺花回接试验,供试菌株分组见附表 1。将供试菌株菌悬液接种至 TY 液体培养基中,于 28 °C、160 r/min 培养 2 d,即为接种剂。

将表面消毒后的白刺花种子放入装有湿润滤纸的无菌培养皿中,于 25 °C 催芽,待胚芽长至 2 cm 左右,播种于装有灭菌珍珠岩和蛭石体积比 1:2 的花盆中,每盆播种 10 颗种子。出苗后,每盆定苗 6 株。每周于处理组植株根部接种对应接种剂 30 mL,以不接菌的处理作为对照,以上处理组均做 3 个重复,放入光照培养箱(光照 16 h/黑暗 8 h,光照 28 °C/黑暗 20 °C)培养。定期交替灌溉无菌水和无氮培养液。90 d 后采集植株,统计结瘤数量与各项指标。

1.7 小麦幼苗促生长盆栽试验

选择 4 株促生特性良好的菌株 BT-229、BT-2、BT-108 和 BT-89 进行小麦盆栽试验,各接种剂处理见表 1。其中菌株 BT-229 属于根瘤

菌属(*Rhizobium*),其他 3 株菌株为非根瘤菌:BT-2 属于短芽孢杆菌属(*Brevibacillus*),菌株 BT-108 属于假单胞菌属(*Pseudomonas*),菌株 BT-89 属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)。

将表面消毒后的小麦种子于接种剂中浸种 4 h,之后转入无菌培养皿中,并加入无菌水,于 30 °C 催芽,待种子发芽后播种于装有珍珠岩和蛭石体积比 1:2 的盆钵(20 cm×20 cm)中,每只盆钵播种 20 颗种子,等小麦苗出齐,每盆定苗 10 株。每周于各花盆接种对应分组菌悬液 50 mL,定期用无菌水浇灌,保持盆体表面湿润。用于回接白刺花的菌体接种体系包括如下几种类型:

(1) 白刺花植株用根瘤菌属(*Rhizobium*)菌株 BT-229 与 1-3 种非根瘤菌的不同种类的混合物进行回接试验;(2) 只单独接种根瘤菌属(*Rhizobium*)菌株 BT-229;(3) 只单独接种 3 种非根瘤菌;(4) 1-3 种非根瘤菌组合的混合物进行回接试验,(5) 以无接种处理为空白对照,以上各处理组均为 3 个重复(表 1)。于 30 d 后收获植株,测定小麦苗农艺性状,包括株高、根长、干重、鲜重以及叶绿素含量,并对所得数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 多样性分析

2.1.1 白刺花根瘤内生细菌的分离及纯化结果

本研究从延安市 6 个县区的白刺花根瘤内共分离得到 320 株根瘤内生细菌,隶属于 4 门 7 纲 17 目 35 科 55 属,其中从宝塔区白刺花根瘤中,分离得到的 192 株根瘤内生细菌(附表 1)。

2.1.2 分子鉴定结果

选用 16S rRNA 基因通用引物对 320 株根瘤内生细菌进行菌落 PCR 扩增并测序,所得基因通过 NCBI 数据库进行比对。采用培养法获得的 320 株细菌分属 4 门,分别为放线菌门(*Actinobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、厚壁

表 1 接种菌剂的处理

Table 1 Inoculum treatments

Treatments	Strain combination	Phosphate solubilization	IAA producing	Produce siderophores	Nitrogen fixation
H	BT-89	+	-	-	-
I	BT-2	-	+	-	-
J	BT-108	-	-	+	-
K	BT-229	-	-	-	+
HI	BT-89+BT-2	+	+	-	-
HJ	BT-89+BT-108	+	-	+	-
HK	BT-89+BT-229	+	-	-	+
IJ	BT-2+BT-108	-	+	+	-
IK	BT-2+BT-229	-	+	-	+
JK	BT-108+BT-229	-	-	+	+
HIJ	BT-89+BT-2+BT-108	+	+	+	-
HIK	BT-89+BT-2+BT-229	+	+	-	+
HJK	BT-89+BT-108+BT-229	+	-	+	+
IJK	BT-2+BT-108+BT-229	-	+	+	+
HIJK	BT-89+BT-2+BT-108+BT-229	+	+	+	+
CK	H ₂ O	-	-	-	-

+: 该接种菌剂的某种促生特性最明显; -: 该接种菌剂不具备某种促生特性或促生特性较弱

+: Certain growth-promoting characteristic of the inoculant is the most obvious; -: Inoculum does not have a certain growth-promoting characteristic or has a weak growth-promoting characteristic.

菌门(*Firmicutes*)和变形菌门(*Proteobacteria*)。分属 55 属, 其中 47 株属于中慢生根瘤菌属(*Mesorhizobium*)和根瘤菌属(*Rhizobium*), 其余 273 株细菌属于以下 53 个属: 不动杆菌属(*Acinetobacter*)、土壤杆菌属(*Agrobacterium*)、农球菌属(*Agrococcus*)、农霉菌属(*Agromyces*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、短杆菌属(*Brevibacterium*)、波氏菌属(*Bosea*)、小短杆菌属(*Brachybacterium*)、短芽孢杆菌属(*Brevibacillus*)、短波单胞菌属(*Brevundimonas*)、柄杆菌属(*Caulobacter*)、凯斯特纳菌属(*Kaistella*)、金黄微菌属(*Chryseomicrobium*)、柠檬球菌属(*Citricoccus*)、迪茨氏菌属(*Dietzia*)、微小杆菌属(*Exiguobacterium*)、薄层杆菌属(*Hymenobacter*)、栖白蚁菌属(*Isopterocola*)、溶杆菌属(*Lysobacter*)、马赛菌属(*Massilia*)、浮游单胞菌属(*Planctomonas*)、微杆菌属

(*Microbacterium*)、副芽孢杆菌属(*Metabacillus*)、微球菌属(*Micrococcus*)、莫拉氏菌属(*Moraxella*)、分枝菌酸小杆菌属(*Mycolicibacterium*)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)、类诺卡氏菌属(*Nocardioides*)、鸟氨酸微菌属(*Ornithinimicrobium*)、类节杆菌属(*Paenarthrobacter*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)、类谷氨酸杆菌属(*Paeniglutamicibacter*)、副球菌属(*Paracoccus*)、原小单胞菌属(*Promicromonospora*)、假节杆菌属(*Pseudarthrobacter*)、假棍状杆菌属(*Pseudoclavibacter*)、假黄单胞菌属(*Pseudoxanthomonas*)、拉氏杆菌属(*Rathayibacter*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、玫瑰单胞菌属(*Roseomonas*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、斯塔基氏菌属(*Starkeya*)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)、链霉菌属

(*Streptomyces*)、贪噬菌属(*Variovorax*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、叶杆菌属(*Phyllobacterium*)、苍白杆菌属(*Ochrobactrum*)、德沃斯氏菌属(*Devosia*)和贪铜菌属(*Cupriavidus*)。研究发现,通过培养法,在门水平上得到最多的是变形菌门,共172株,占比53.75%;在属水平上得到最多的是假单胞菌

属,共59株,占比18.44%,其次是芽孢杆菌属(57株,17.81%)和中慢生根瘤菌属(37株,11.56%)。

综上所述,白刺花根瘤内生细菌具有丰富的多样性。为了便于区分,每个属选择1株代表菌株,以邻接法通过MEGA X软件构建系统发育树(附表1,图1)。

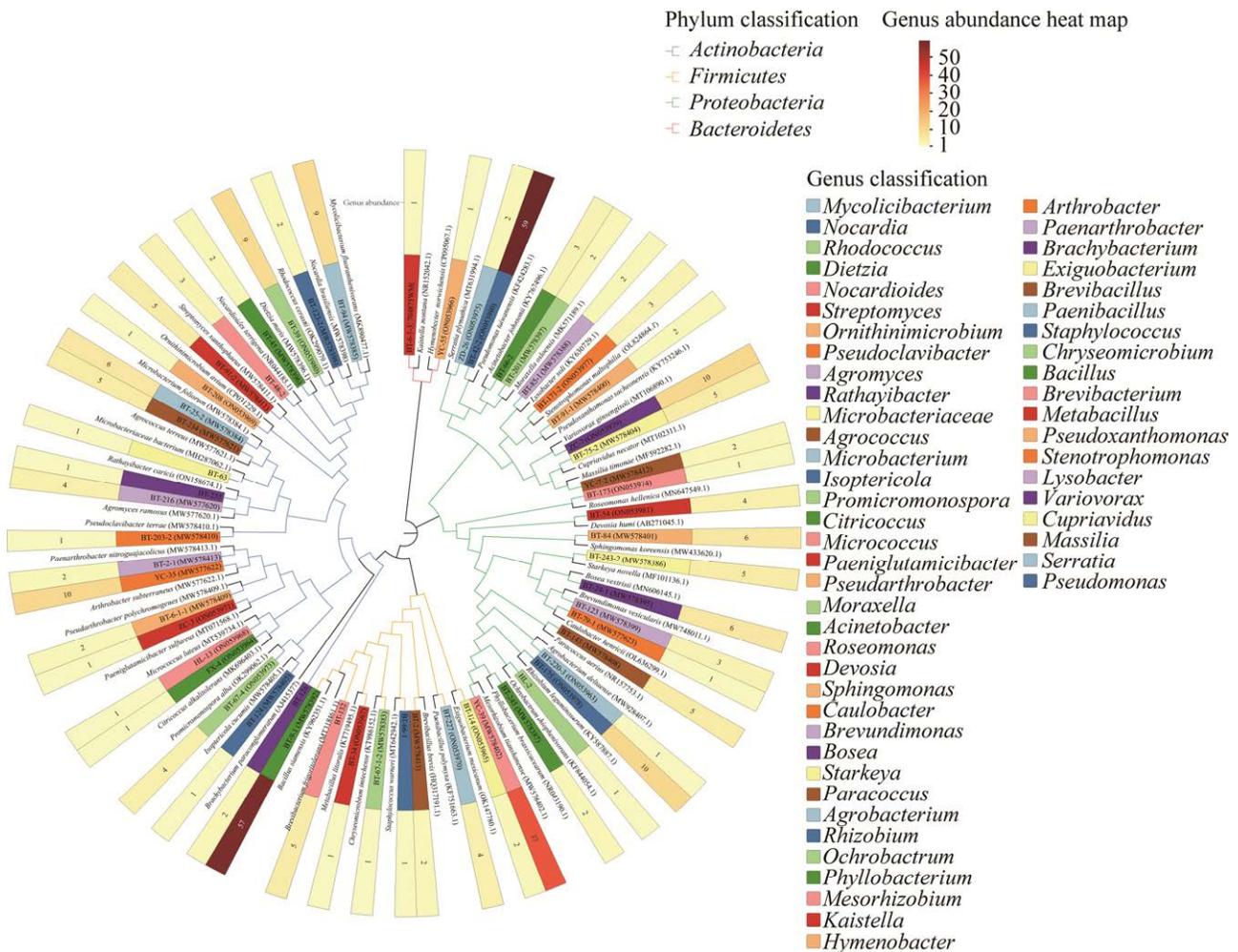


图1 代表菌株16S rRNA基因系统发育树与属水平物种丰度图 内圈为代表菌株16S rRNA基因系统发育树,外圈为代表菌株属水平分离菌株丰度

Figure 1 Phylogenetic tree of representative strain 16S rRNA gene and species abundance map at the genus level. The inner circle is the phylogenetic tree of the 16S rRNA gene of the representative strains, and the outer circle is the abundance of horizontally isolated strains of the genus to which the representative strains belonged.

2.2 促植物生长效应

2.2.1 菌株促生特性结果分析

本研究中 192 株白刺花根瘤内生细菌中, 共有 115 株可以在 Ashby 无氮培养基中正常生长, 并且有浑浊现象, 表明 60.00%左右的白刺花根瘤内生细菌具有潜在的固氮能力(图 2A、2B); 有 20 株具有溶磷能力, 占全部菌株的 10.42%, 其中 BT-89 的溶磷能力最高, 为 6.417 mg/L (图 2A、2B); 78 株具有分泌 IAA 的能力, 占全部菌株的 40.63%, 其中菌株 BT-2 产 IAA 的能力最强, 产量达 46.745 mg/L (图 2A、2B); 18 株能够较好地分泌铁载体, 其中菌株 BT-108 的晕圈最大, 定性显示其产铁载体的能力最强(图 2A、2B); 4 株能抑制 1-3 种病原真菌(图 2A-2C)。

将 4 株促生菌株的序列提交到 NCBI 的 GenBank 库中, 经序列比对, 采用 MEGA X 构建系统发育树, 结果显示, 菌株 BT-2 属于短芽孢杆菌属 (*Brevibacillus*), 与短短芽孢杆菌 (*Brevibacillus brevis*) 序列最大相似率为 99.29%; 菌株 BT-89 属于芽孢杆菌属 (*Bacillus*), 与蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 序列最大相似率为 99.58%; 菌株 BT-229 属于根瘤菌属 (*Rhizobium*), 与吉氏根瘤菌 (*Rhizobium giardinii*) 序列最大相似率达 100.00%; 菌株 BT-108 属于假单胞菌属 (*Pseudomonas*), 与地中海假单胞菌 (*Pseudomonas mediterranea*) 序列最大相似率达 99.29% (图 2D)。

2.2.2 根瘤内生细菌的回接试验对白刺花结瘤的影响

为了鉴定从白刺花根瘤中分离得到的根瘤内生细菌是否具有共生结瘤能力, 本研究将 55 个属的内生细菌分为 41 个处理组, 分别回接于白刺花植株。3 个月后, 对 41 组白刺花结瘤情况进行统计。共有 5 个处理组的白刺花有结瘤现象, 每株白刺花结瘤 1-2 个, 分别为处理组 36 (HL-2)、处理组 25 (YC-39)、处理组 27 (YC-2)、处理组 26 (BT-30) 和处理组 28 (ZC-5)。其中 HL-2

属于苍白杆菌属 (*Ochrobactrum*), 其余 4 组均属于中慢生根瘤菌属 (*Mesorhizobium*)。其余含有非根瘤菌的处理组和对照组均无结瘤现象。

2.2.3 小麦幼苗促生长盆栽试验

经验证, 本研究中选用的 4 株促生菌株之间均无拮抗反应, 可以用来组合作为复合接种剂, 研究其对小麦幼苗生长的促进效果。

各处理组与对照组相比, 小麦幼苗的株高、根长、叶绿素含量、鲜重和干重均有明显增加。其中对株高影响最大的处理组为 HIJ, 与对照组相比增加了 49.65%; 对株高影响最小的处理组为 HJK, 与对照相比增加了 15.19% (图 3A)。对根长影响最大的处理组为 HK, 与对照组相比增加了 45.84%; 对根长影响最小的处理组为 IJK, 与对照组相比增加了 8.69% (图 3B)。对叶绿素含量影响最大的处理组为 IK, 与对照组相比增加了 25.48%; 对叶绿素含量影响最小的处理组为 K, 与对照组相比增加了 7.30% (图 3C)。对鲜重影响最大的处理组为 HIJ, 与对照组相比增加了 140.00%; 对鲜重影响最小的处理组为 HJK, 与对照组相比增加了 60.00% (图 3D)。对干重影响最大的处理组为 HK, 与对照组相比增加了 100.00%; 对干重影响最小的处理组为 H, 与对照组相比增加了 50.00% (图 3E)。

综上所述, 无论哪种接种处理, 都会增加小麦幼苗的株高、根长、干重、鲜重与叶绿素含量, 但影响程度存在差异, 因此并不能说明单菌接种或多菌接种更具优势。其中处理组 HK、HIJ 与 IK 的促生长效果更加显著, 可对其进行深入研究, 作为开发微生物菌肥的菌株材料。这表明 H 代表的菌株 BT-89, 具有显著的溶磷能力, 能够明显增加植株根长; I 代表的菌株 BT-2, 具有显著的产 IAA 的能力, 能够明显增加植株叶绿素含量与鲜重; J 代表的菌株 BT-108 可以通过产生铁载体, 从而防治植物病害, 最终促进植株生长; K 代表的菌株 BT-229, 具有潜在的固氮能力, 能够明显增加植株干重。

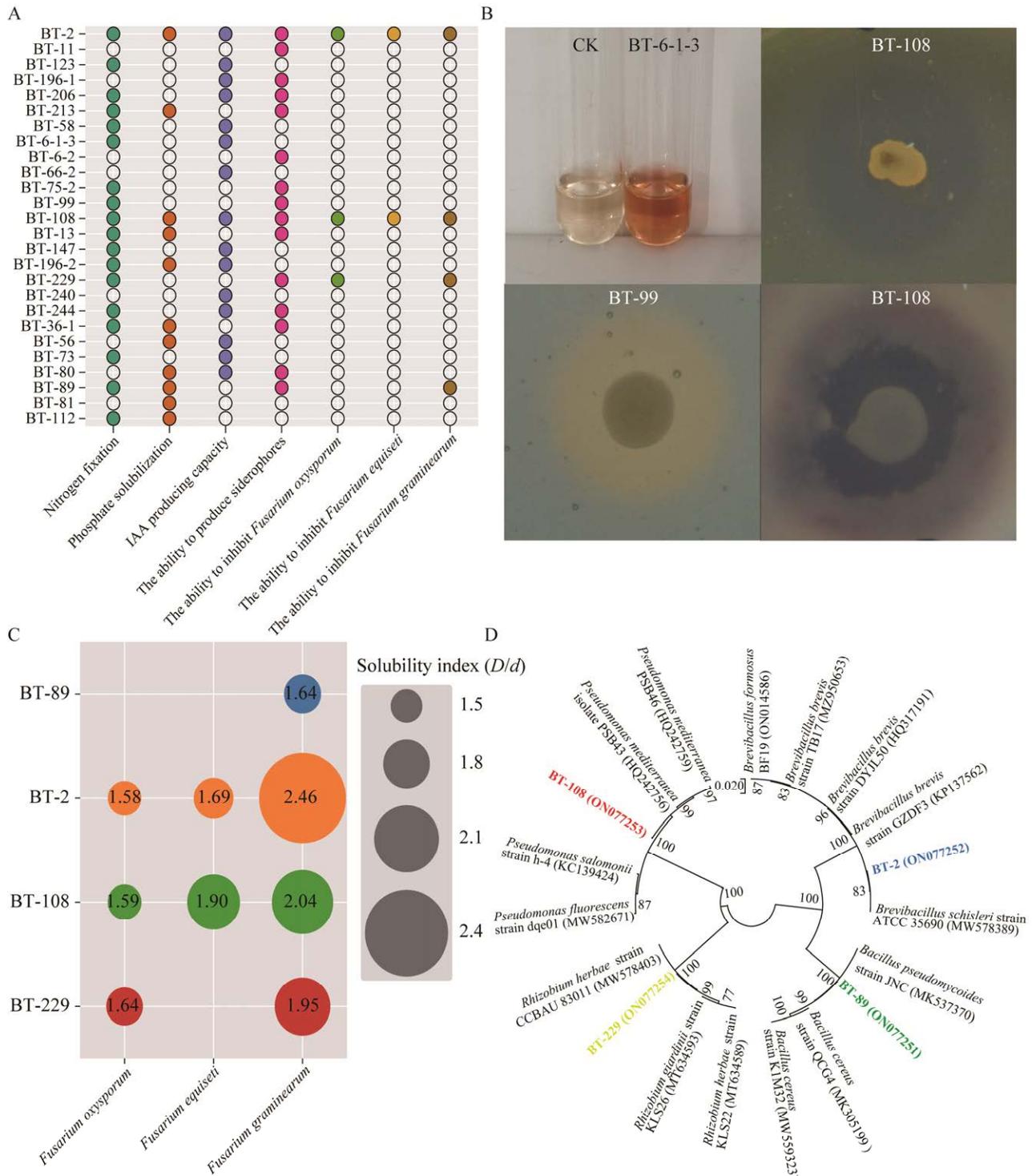


图2 白刺花根瘤内生细菌促生特性汇总 A: 内生细菌的7种促生长特性汇总. B: 部分菌株产生 IAA、产铁载体、磷溶性和抑菌作用. C: 四株促生长菌株的抑菌效果. D: 四株促生长菌株 16S rRNA 基因的系统发育树

Figure 2 Growth promoting effects of endophytic bacteria in root nodules of *Sophora davidii*. A: Summary of seven growth-promoting properties of endophytic bacteria. B: Some strains produced IAA, iron producing carriers, phosphorus soluble, and bacteriostasis. C: Bacteriostatic effects of four growth-promoting strains. D: Phylogenetic tree of 16S rRNA gene from four growth promoting strains.

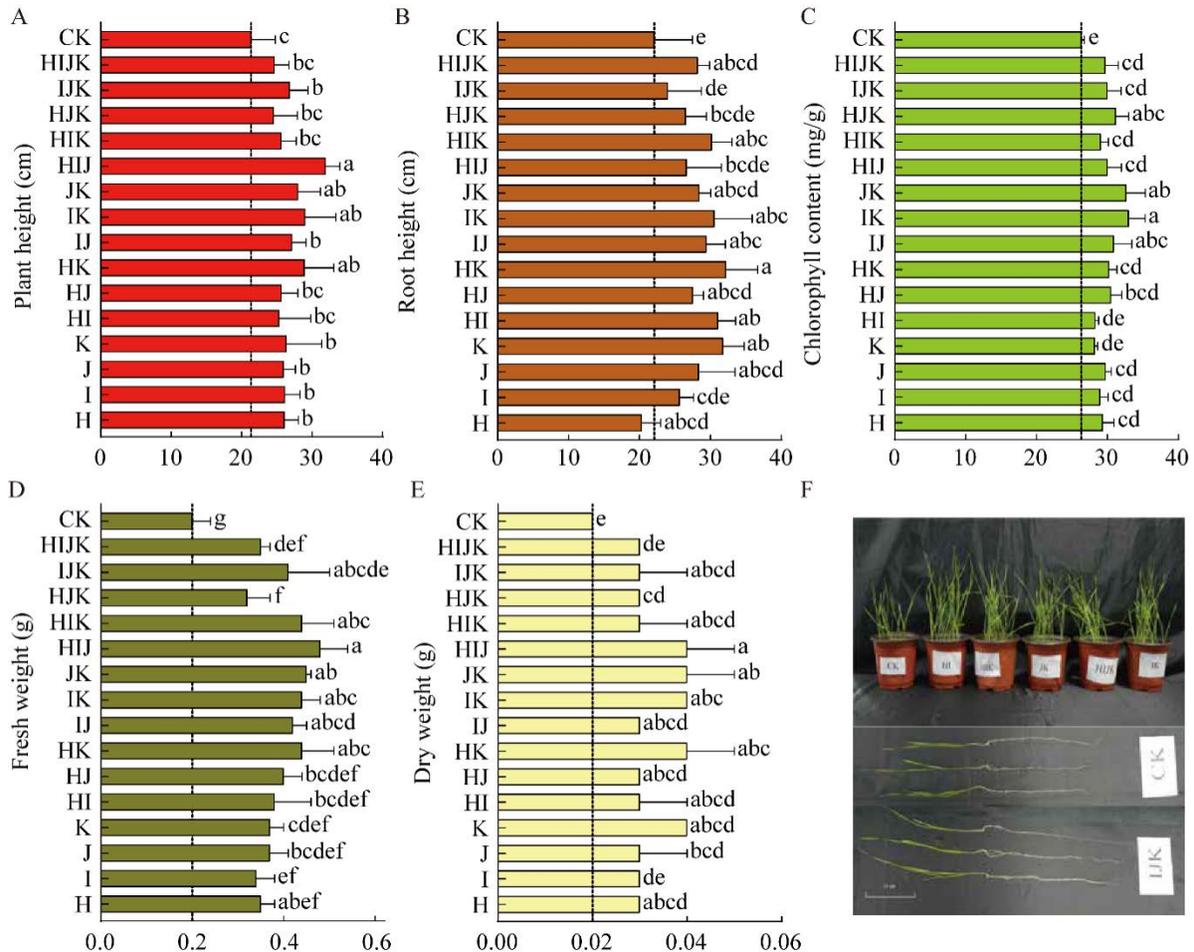


图 3 各处理对小麦幼苗生长的影响 各接种剂对小麦株高(A)、根长(B)、叶绿素含量(C)、鲜重(D)、干重(E)的影响。F: 部分接种剂对小麦的促生效果

Figure 3 The effects on wheat seedling growth inoculated with different treatments. The effects of various inoculants on wheat plant height (A), root length (B), chlorophyll content (C), fresh weight (D), and dry weight (E). F: The promoting effects of some inoculants on wheat growth. Different letters a, b, c, d, e, and f indicate significant statistically differences between treatments as determined by Student's *t*-test ($P < 0.05$).

3 讨论

本研究采用了多种培养基从白刺花根瘤内分离得到 320 株内生细菌, 隶属于 4 门 7 纲 17 目 35 科 55 属, 这其中包括大量的非根瘤菌, 并表现出丰富的物种多样性。通过 16S rRNA 基因初步明确了分离菌株的系统发育地位, 物种多样性与丰度。通过白刺花回接试验, 验证了分离菌株的结瘤能力。通过小麦盆栽试验, 发掘出一批对

植物有明显促生效应的菌株。

豆科植物能够招募大量的非根瘤菌定殖于根瘤, 可对宿主植物产生广泛的有益效应。通过 16S rRNA 基因扩增子测序鉴定从白刺花根瘤内分离培养得到的内生细菌发现, 在门水平上, 变形菌门占优势地位; 属水平上假单胞菌属和芽孢杆菌属占优势地位, 这与其优良的促生特性相关。从宝塔区白刺花根瘤内分离得到的 192 株内生细菌, 其中 60% 的菌株具有一种至多种促生

特性: 有 115 株细菌具有固氮能力, 有 20 株细菌具有较好的溶磷能力, 有 78 株具有分泌 IAA 的能力, 有 18 株能够较好地分泌铁载体。从中选出 4 株(3 株非根瘤菌与 1 株根瘤菌)促生效果较好的内生细菌 BT-2、BT-108、BT-89 和 BT-229, 通过单菌接种和多菌混合接种的方式, 对盆栽种植的小麦农艺性状进行测定, 结果显示, 处理组 HIJ 对小麦的株高和鲜重促生效果最好, 与对照组相比分别增加了 49.65% 和 140.00%; 处理组 HK 对小麦的根长促生效果最好, 与对照组相比增加了 45.84%; 处理组 IK 对小麦幼苗的叶绿素含量促生效果最好, 与对照组相比增加了 25.48%。小麦盆栽试验表明, 不同菌剂处理均能促进小麦幼苗生长, 这与前人的研究一致, 芽孢杆菌(*Bacillus*)^[28]、短芽孢杆菌(*Brevibacillus*)^[29]、假单胞菌(*Pseudomonas*)^[30]、根瘤菌(*Rhizobium*)^[31]均可促进植物生长, 这也符合构建生防菌剂^[32]或合成菌肥^[33]的标准, 即菌株需要具备解磷、产 IAA、产铁载体与抑制病原菌等能力。通过分析各项农艺指标发现, 接种方式不同对小麦幼苗不同农艺性状具有不同程度贡献, 例如, IK 处理组能够促进更高的叶绿素积累, HK 处理组对小麦根长有最大的促生效果, HIJ 处理组能够促进植株积累更多的鲜重。对比单菌接种、两菌接种与三菌接种效果, 发现三菌接种并不比单菌接种和两菌接种更有利, 例如, HJK 处理组与所有单菌接种和两菌接种处理组相比, 对植物鲜重积累的影响最低, 出现这种现象的原因可能是由于多株菌混合后产生了某种物质, 从而抑制了菌株产生的促生长因子发生效应。结合以上分析以及各组处理对小麦幼苗的促生效果, 结果表明与只单独接种根瘤菌相比较, 小麦幼苗在根瘤菌与非根瘤菌混菌接种剂后, 对小麦幼苗的各项生长参数均表现出更高的促进效果。关于非根瘤菌如何影响植物生长, 以及它们与根瘤菌之间的相互关系、作用机理等问题, 已成为了微生物分子生

态学研究的一个热点。已有研究发现, 一些非根瘤菌可以帮助根瘤菌扩大其宿主范围^[34], 也能提高豆科植物共生根瘤菌的结瘤和固氮能力^[35], 还能够参与豆科植物-根瘤菌的共生结瘤过程, 包括结瘤信号的建立、根瘤菌-豆科植物识别以及根瘤菌的定殖等^[36]。此外, 微生物物种间的代谢交换在自然群落中广泛存在, 其互作关系是通过互养(*cross-feeding*)方式呈现^[37]。然而, 关于非根瘤菌与根瘤菌之间的协同进化及互养关系仍不清楚, 还需要下一步进行深入研究。综合比较盆栽小麦农艺性状, 结果显示, 处理组 HK、IK 和 HIJ 的促生效果更为显著, 因此可选用这 3 组复合菌剂作为材料进一步研究, 将其开发为微生物菌肥供植物生长, 以期微生物菌肥的开发奠定了良好的基础。然而, 这最终还需对其在大田应用中进行菌种活性检测, 并对实际的促生效果等做进一步深入研究, 进而应用于实际大田农作物上, 以发挥最大的促生效应。

综上所述, 本研究采用传统培养法, 对白刺花根瘤中内生细菌的物种多样性开展了全面系统的研究, 明确了其系统发育学地位, 通过分析非根瘤菌和根瘤菌对植物生长的影响, 初步探究了内生细菌的促生效应。由于大量不可培养菌和难培养菌的存在以及培养基的富营养化, 培养条件单一等原因, 使用传统培养法会导致培养富集物样本量降低, 因此不足以反映群落的绝大部分特征^[38-40]。为了更好地深入了解根瘤中内生细菌群落结构及其物种多样性, 需要一种更有效的技术。近年来, 作为不依赖传统培养方法的分子技术, 高通量 16S rRNA 基因测序解决了这一问题。关于非根瘤菌与根瘤菌之间的协同进化关系仍不清楚, 下一步将利用高通量测序技术对白刺花根瘤中的非根瘤菌的多样性开展研究, 以探明根瘤这个特殊生境中非根瘤菌群落组成分布和物种丰度。关于非根瘤菌多样性的维持机制与根瘤菌的互作的机制有待于下一步进行深入研究。

4 结论

本研究表明豆科植物白刺花根瘤的内生细菌具有丰富的物种多样性,除根瘤菌外,还存在着大量的非根瘤菌。值得注意的是,部分非根瘤菌对白刺花和小麦表现出较强的促生特性,能够影响植株株高、根长与叶绿素含量等多项农艺指标。本研究结果为今后扩展根瘤菌的研究视野提供理论依据,还能为科学地利用某些具有良好生态适应性和抗逆特性的非根瘤菌,开发出可以提高根瘤菌持久生物活性的复合接种菌剂提供科学依据。

参考文献

- [1] PRAKAMHANG J, TITABUTR P, BOONKERD N, TEAMTISONG K, UCHIUMI T, ABE M, TEAUMROONG N. Proposed some interactions at molecular level of PGPR coinoculated with *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 and *B. japonicum* THA6 on soybean symbiosis and its potential of field application[J]. *Applied Soil Ecology*, 2015, 85: 38-49.
- [2] PATE JS, LAYZELL DB, ATKINS CA. Economy of carbon and nitrogen in a nodulated and nonnodulated (NO_3 -grown) legume[J]. *Plant Physiology*, 1979, 64(6): 1083-1088.
- [3] 何国兴, 宋建超, 温雅洁, 刘彩婷, 祁娟. 不同根瘤菌肥对紫花苜蓿生产力及土壤肥力的综合影响[J]. *草业学报*, 2020, 29(5): 109-120.
- [4] HE GX, SONG JC, WEN YJ, LIU CT, QI J. Effects of different rhizobium fertilizers on alfalfa productivity and soil fertility[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2020, 29(5): 109-120 (in Chinese).
- [5] ROMDHANE S, DEVERS-LAMRANI M, MARTIN-LAURENT F, CALVAYRAC C, ROCABOY-FAQUET E, RIBOUL D, COOPER JF, BARTHELMEBS L. Isolation and characterization of *Bradyrhizobium* sp. SR1 degrading two β -triketone herbicides[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, 23(5): 4138-4148.
- [6] RAKLAMI A, OUBANE M, MEDDICH A, HAFIDI M, MARSCHNER B, HEINZE S, OUFDOU K. Phytotoxicity and genotoxicity as a new approach to assess heavy metals effect on *Medicago sativa* L.: role of metallo-resistant rhizobacteria[J]. *Environmental Technology & Innovation*, 2021, 24: 101833.
- [7] 陈文新, 陈文峰. 发挥生物固氮作用减少化学氮肥用量[J]. *中国农业科技导报*, 2004, 6(6): 3-6.
- [8] CHEN WX, CHEN WF. Exertion of biological nitrogen fixation in order to reducing the consumption of chemical nitrogenous fertilizer[J]. *Review of China Agricultural Science and Technology*, 2004, 6(6): 3-6 (in Chinese).
- [9] de MEYER SE, de BEUF K, VEKEMAN B, WILLEMS A. A large diversity of non-rhizobial endophytes found in legume root nodules in Flanders (Belgium)[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, 83: 1-11.
- [10] MARTÍNEZ-HIDALGO P, HIRSCH AM. The nodule microbiome: N_2 -fixing rhizobia do not live alone[J]. *Phytobiomes Journal*, 2017, 1(2): 70-82.
- [11] 刘杰, 汪恩涛, 陈文新. 豆科植物根瘤内生细菌的发现及其研究进展[J]. *微生物学报*, 2011, 51(8): 1001-1006.
- [12] LIU J, WANG ET, CHEN WX. Discovery and research progress of endophytic bacteria in the root nodules of legumes: a review[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(8): 1001-1006 (in Chinese).
- [13] 王志伟, 陈永敢, 王庆臻, 纪燕玲. 中国植物内生微生物研究的发展和展望[J]. *微生物学通报*, 2014, 41(3): 482-496.
- [14] WANG ZW, CHEN YG, WANG QC, JI YL. Progresses and perspectives of studies on plant endophytic microbes in China[J]. *Microbiology China*, 2014, 41(3): 482-496 (in Chinese).
- [15] LI JH, WANG ET, CHEN WF, CHEN WX. Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang Province of China[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 40(1): 238-246.
- [16] DENG ZS, ZHAO LF, KONG ZY, YANG WQ, LINDSTRÖM K, WANG ET, WEI GH. Diversity of endophytic bacteria within nodules of the *Sphaerophysa salsula* in different regions of Loess Plateau in China[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2011, 76(3): 463-475.
- [17] LI L, SINKKO H, MONTONEN L, WEI GH, LINDSTRÖM K, RÄSÄNEN LA. Biogeography of symbiotic and other endophytic bacteria isolated from medicinal *Glycyrrhiza* species in China[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2012, 79(1): 46-68.

- [14] XIAO X, CHEN WM, ZONG L, YANG J, JIAO S, LIN YB, WANG ET, WEI GH. Two cultivated legume plants reveal the enrichment process of the microbiome in the rhizocompartments[J]. *Molecular Ecology*, 2017, 26(6): 1641-1651.
- [15] ZHANG BG, DU NN, LI YJ, SHI P, WEI GH. Distinct biogeographic patterns of rhizobia and non-rhizobial endophytes associated with soybean nodules across China[J]. *The Science of the Total Environment*, 2018, 643: 569-578.
- [16] 艾加敏, 李静, 任明霞, 余天飞, 郑超超, 柳晓东, 姜影影, 赵瑞华, 邓振山. 白刺花根瘤菌与非根瘤菌在不同培养条件下互作模式的转变[J]. *微生物学报*, 2022, 62(9): 3558-3575.
- AI JM, LI J, REN MX, YU TF, ZHENG CC, LIU XD, JIANG YY, ZHAO RH, DENG ZS. Transformation of the interaction pattern between rhizobia and non-rhizobia of *Sophora davidii* under different culture conditions[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(9): 3558-3575 (in Chinese).
- [17] 李静. 陕北地区白刺花根瘤内生菌遗传多样性及其促生特性研究[D]. 延安: 延安大学硕士学位论文, 2022.
- LI J. Genetic diversity and growth promoting characteristics of endophytic bacteria from *Sophora davidii* (Franch.) Skeels root nodules in northern Shaanxi[D]. Yan'an: Master's Thesis of Yan'an University, 2022 (in Chinese).
- [18] EGAMBERDIEVA D, WIRTH SJ, SHURIGIN VV, HASHEM A, ABD ALLAH EF. Endophytic bacteria improve plant growth, symbiotic performance of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and induce suppression of root rot caused by *Fusarium solani* under salt stress[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1887.
- [19] 王海珍, 梁宗锁, 郝文芳, 韩路. 白刺花(*Sophora viciifolia*)适应土壤干旱的生理学机制[J]. *干旱地区农业研究*, 2005, 23(1): 106-110.
- WANG HZ, LIANG ZS, HAO WF, HAN L. Physiological mechanism of *Sophora viciifolia* to adapt to soil drought[J]. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 2005, 23(1): 106-110 (in Chinese).
- [20] 薛智德, 侯庆春, 韩蕊莲, 王胜琪. 黄土丘陵沟壑区白刺花促进生态恢复的研究[J]. *西北林学院学报*, 2002, 17(3): 26-29.
- XUE ZD, HOU QC, HAN RL, WANG SQ. Trails and research on ecological restoration by *Sophora viciifolia* in gullied rolling loess region[J]. *Journal of Northwest Forestry College*, 2002, 17(3): 26-29 (in Chinese).
- [21] 王莉茹, 康永祥, 巫翠华, 李华, 申旭芳. 黄土高原陡坡土坎植被根-土复合体抗剪强度研究[J]. *西北林学院学报*, 2021, 36(2): 17-23.
- WANG LR, KANG YX, WU CH, LI H, SHEN XF. Shear strength of root-soil composite of vegetation on steep slope ridge of Loess Plateau[J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2021, 36(2): 17-23 (in Chinese).
- [22] CAO Y, TIE D, ZHAO JL, WANG XB, YI JJ, CHAI YF, WANG KF, WANG ET, YUE M. Diversity and distribution of *Sophora davidii* rhizobia in habitats with different irradiances and soil traits in Loess Plateau area of China[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2021, 44(4): 126224.
- [23] 邹兰. 四川蚕豆根瘤菌系统发育研究及高效菌株的初步筛选[D]. 雅安: 四川农业大学硕士学位论文, 2016.
- ZOU L. Symbiotic effectiveness and phylogeny of rhizobia isolated from root nodules of faba bean (*Vicia faba* L.) in Sichuan, China[D]. Ya'an: Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [24] 张祥胜. 发酵液有效磷含量测定方法研究[J]. *湖州职业技术学院学报*, 2008, 6(3): 1-3.
- ZHANG XS. A study of factors affecting the determined value by Mo-Sn-vc method of organic phosphobacteria[J]. *Journal of Huzhou Vocational and Technological College*, 2008, 6(3): 1-3 (in Chinese).
- [25] FAHSI N, MAHDI I, MESFIOUI A, BISKRI L, ALLAOUI A. Plant growth-promoting rhizobacteria isolated from the Jujube (*Ziziphus lotus*) plant enhance wheat growth, Zn uptake, and heavy metal tolerance[J]. *Agriculture*, 2021, 11(4): 316.
- [26] BAAKZA A, VALA AK, DAVE BP, DUBE HC. A comparative study of siderophore production by fungi from marine and terrestrial habitats[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2004, 311(1): 1-9.
- [27] HE H, HAO X, ZHOU W, SHI N, FENG J, HAN L. Identification of antimicrobial metabolites produced by a potential biocontrol *Actinomycete* strain A217[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2020, 128(4): 1143-1152.
- [28] 王国磊. 防病促生长复合微生物有机肥的开发及应用效果研究[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2023.
- WANG GL. Development and application of compound microbial organic fertilizer for disease prevention and growth promotion[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2023 (in Chinese).

- [29] 厉彦芳, 王春阳, 谢菁菁, 赵秀香. 侧孢短芽孢杆菌 B8 抑制植物病毒及促进番茄生长作用研究[J]. 中国植保导刊, 2019, 39(7): 11-16.
LI YF, WANG CY, XIE JJ, ZHAO XX. Study on inhibition of *Brevibacillus laterosporus* B8 against plant virus and promotion of tomato growth[J]. *China Plant Protection*, 2019, 39(7): 11-16 (in Chinese).
- [30] 刘诚, 张钰, 余梦林, 唐梦君, 倪红. 多功能菌株假单胞菌的溶磷和解磷效果及其应用[J]. 湖北大学学报(自然科学版), 2018, 40(5): 457-461, 469.
LIU C, ZHANG Z, SHE ML, TANG MJ, NI H. Multifunctional pseudomonas with degrading organophosphorus and phosphate-solubilizing and its application[J]. *Journal of Hubei University (Natural Science)*, 2018, 40(5): 457-461, 469 (in Chinese).
- [31] 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 YZ, LIANG J, SUI XN, ZHAO DL, ZHANG CS, ZHENG YF. *Glycine soja*-associated rhizobia: isolation from coastal saline soil and application in soybean[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(11): 4154-4166 (in Chinese).
- [32] DU CJ, YANG D, YE YF, PAN LF, ZHANG J, JIANG SB, FU G. Construction of a compound microbial agent for biocontrol against *Fusarium* wilt of banana[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 1066807.
- [33] 白文斌, 冯家璇, 高振峰. 高粱根际高亲和性解磷复合菌系的构建及溶磷、促生效果[J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2023, 43(5): 70-82.
BAI WB, FENG JX, GAO ZF. Construction of high-affinity phosphate-solubilizing microbial consortia in sorghum rhizosphere and their phosphate solubilization and growth promoting effects[J]. *Journal of Shanxi Agricultural University (Natural Science Edition)*, 2023, 43(5): 70-82 (in Chinese).
- [34] LIU J, WANG ET, REN DW, CHEN WX. Mixture of endophytic *Agrobacterium* and *Sinorhizobium meliloti* strains could induce nonspecific nodulation on some woody legumes[J]. *Archives of Microbiology*, 2010, 192(3): 229-234.
- [35] PEIX A, RAMÍREZ-BAHENA MH, VELÁZQUEZ E, BEDMAR EJ. Bacterial associations with legumes[J]. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2015, 34(1/2/3): 17-42.
- [36] KANDEL SL, JOUBERT PM, DOTY SL. Bacterial endophyte colonization and distribution within plants[J]. *Microorganisms*, 2017, 5(4): 77.
- [37] McNALLY CP, BORENSTEIN E. Metabolic model-based analysis of the emergence of bacterial cross-feeding via extensive gene loss[J]. *BMC Systems Biology*, 2018, 12(1): 69.
- [38] 于子良. 基于多种培养策略的海洋难培养微生物的分离培养[D]. 济南: 山东大学硕士学位论文, 2022.
YU ZL. Isolation and cultivation of difficult-to-culture marine microorganisms based on multiple culture strategies[D]. Jinan: Master's Thesis of Shandong University, 2022 (in Chinese).
- [39] LI S, LIAN WH, HAN JR, ALI M, LIN ZL, LIU YH, LI L, ZHANG DY, JIANG XZ, LI WJ, DONG L. Capturing the microbial dark matter in desert soils using culturomics-based metagenomics and high-resolution analysis[J]. *npj Biofilms and Microbiomes*, 2023, 9: 67.
- [40] LI J, HU WZ, HUANG XJ, XU YP. Investigation of yeast population diversity and dynamics in spontaneous fermentation of Vidal blanc icewine by traditional culture-dependent and high-throughput sequencing methods[J]. *Food Research International*, 2018, 112: 66-77.