

达乌里胡枝子产铁载体根瘤内生细菌的鉴定及其促生抗逆效应

杨凯元^{1,2}, 韩玲娟^{1,2}, 梁银萍^{1,2}, 黄臣^{1,2}, 蒋霖^{1,2}, 赵祥^{*1,2}, 高鹏^{*1,2}

1 山西农业大学草业学院, 山西 晋中 030600

2 农业农村部饲草高效生产模式创新重点实验室, 山西 晋中 030600

杨凯元, 韩玲娟, 梁银萍, 黄臣, 蒋霖, 赵祥, 高鹏. 达乌里胡枝子产铁载体根瘤内生细菌的鉴定及其促生抗逆效应[J]. 微生物学通报, 2023, 50(10): 4413-4432.

YANG Kaiyuan, HAN Lingjuan, LIANG Yinping, HUANG Chen, JIANG Lin, ZHAO Xiang, GAO Peng. Siderophore-producing endophytic bacteria in the root nodules of *Lespedeza daurica*: identification and examination of growth-promoting effect and stress resistance[J]. Microbiology China, 2023, 50(10): 4413-4432.

摘要: 【背景】根瘤是植物-微生物共生的特殊结构, 蕴含丰富的微生物资源。产铁载体根瘤内生细菌对促进结瘤固氮具有重要作用, 但目前关于其是否对植物具有促生作用尚不明确。【目的】筛选鉴定达乌里胡枝子(*Lespedeza daurica*)根瘤产铁载体内生细菌, 明确其促生作用, 为丰富植物促生菌资源提供新的途径。【方法】利用铬天青(chrome azurol S, CAS)培养基初筛产铁载体根瘤内生细菌, 对目的菌株进行鉴定; 通过液体发酵试验确定其产铁载体能力; 利用促生功能培养基测定其他促生特性; 利用不同盐浓度(0.01%–9.00%)、不同 pH 值(3.0–12.0)的酵母甘露醇(yeast mannitol, YMA)液体培养基和不同培养温度(4–60 °C)确定其抗逆特性; 通过盆栽试验初步验证其对植物的促生作用。【结果】48 株根瘤内生细菌可产铁载体, 其中 9 株为高产铁载体细菌, 分别为 TG4、TG9、TG13、TG15、TG28、TG32、TG38、TG76 和 TG78, 铁载体相对表达量为 26%–93%; 经鉴定, 除了 TG28 为巨大普里斯特氏菌(*Priestia megaterium*), 其余 8 株菌均为耐寒短杆菌(*Brevibacterium frigoritolerans*); TG15、TG28、TG76 和 TG78 具有产生生长素(indole-3-acetic acid, IAA) (7.62–64.90 μg/mL)、1-氨基环丙烷-1-羧酸(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, ACC)脱氨酶和固氮能力; 而且在盐浓度 0.01%–5.00%、pH 4.0–12.0 和温度 4–37 °C 均可生长; TG15 和 TG28 显著提高了达乌里胡枝子的茎粗, 且 TG28 显著提高了株高。【结论】达乌里胡枝子根瘤中定殖有促生和抗逆效应较强的产铁载体细菌, 但对植株的促生作用仅表现在形态发育方面, 预测其分泌的铁载体等促生物质可能对共

资助项目: 国家自然科学基金(31870438); 山西农业大学科技创新基金(2018YJ37); 山西省 2021 年度研究生教育创新项目(2021Y344)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31870438), the Shanxi Agricultural University Science and Technology Innovation Fund (2018YJ37), and the Shanxi Education Innovation Program for Graduate in 2021 (2021Y344).

*Corresponding authors. E-mail: ZHAO Xiang, sxndzhaox@126.com; GAO Peng, zyjt_721@163.com

Received: 2023-02-10; Accepted: 2023-05-29; Published online: 2023-07-07

生的结瘤固氮细菌产生积极作用。

关键词：达乌里胡枝子；根瘤内生细菌；产铁载体细菌；促生；抗逆

Siderophore-producing endophytic bacteria in the root nodules of *Lespedeza daurica*: identification and examination of growth-promoting effect and stress resistance

YANG Kaiyuan^{1,2}, HAN Lingjuan^{1,2}, LIANG Yinping^{1,2}, HUANG Chen^{1,2}, JIANG Lin^{1,2}, ZHAO Xiang^{*1,2}, GAO Peng^{*1,2}

1 College of Grassland Science, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030600, Shanxi, China

2 Key Laboratory of Model Innovation in Forage Production Efficiency, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Jinzhong 030600, Shanxi, China

Abstract: [Background] As a special structure of plant-microorganism symbiosis, the root nodules of legumes contain abundant microbial resources. The siderophore-producing endophytic bacteria in the root nodules can promote nodulation and nitrogen fixation. However, it remains unclear whether these bacteria have a direct growth-promoting effect on plants. **[Objective]** To screen out, identify, and examine the growth-promoting effect of the siderophore-producing endophytic bacteria in the root nodules of *Lespedeza daurica*, so as to provide a new way for enriching plant growth-promoting bacterial resources. **[Methods]** The CAS medium was used for the preliminary screening of efficient siderophore-producing endophytic bacteria in the root nodules. The liquid fermentation was carried out to examine the siderophore production. The growth-promoting functional media were used to measure the growth-promoting effects of the strains. The stress resistance of the strains was determined with the YMA liquid medium with different salt concentrations (0.01%–9.00%), pH 3.0–12.0, and culture temperatures (4–60 °C). The pot experiment was carried out to preliminarily verify the direct growth-promoting effect. **[Results]** Forty-eight strains possessed siderophore-producing ability, including 9 efficient strains, which were TG4, TG9, TG13, TG15, TG28, TG32, TG38, TG76, and TG78, respectively. The siderophore production of the strains varied within 26%–93%. Except that TG28 was identified as *Priestia megaterium*, the other 8 strains were identified as *Brevibacterium frigoritolerans*. TG15, TG28, TG76, and TG78 could secrete indole-3-acetic acid (7.62–64.90 µg/mL) and ACC deaminase, fix nitrogen, and grow at 0.01%–5.00% NaCl, pH 4.0–12.0, and 4–37 °C. TG15 and TG28 significantly increased the stem diameter, and TG28 significantly increased the plant height of *L. daurica*. **[Conclusion]** There were siderophore-producing bacteria with growth-promoting effects and stress resistance in the root nodules of *L. daurica*. However, the growth-promoting effect on plants was only reflected on the morphological development. The results indicate that the growth-promoting substances such as siderophores may have a positive effect on the nitrogen-fixing bacteria.

Keywords: *Lespedeza daurica*; endophytic bacteria in root nodules; siderophore-producing bacteria; growth-promoting effect; stress resistance

铁(Fe)是植物和微生物生长发育必需的重要元素,参与细胞内多种关键蛋白的合成,在植物光合、呼吸及共生固氮等方面发挥着重要作用^[1]。虽然Fe在土壤中含丰富,但其主要以Fe³⁺形式存在,不易被植物吸收利用。Fe匮乏会造成叶片萎蔫枯黄和产量、品质降低^[2]。目前,施用微量元素肥料是提高土壤有效Fe的主要手段,然而长期不合理施用造成了农产品安全、资源枯竭及环境污染等问题^[3]。微生物菌剂具有调节植物生长、增加产量、改善品质和改良土壤、保护生态环境等功能,是绿色农业生产中的重要资源^[4]。微生物为满足自身对Fe的需求,在长期进化过程中形成了多种转运系统从环境中获取Fe,分泌铁载体(siderophore)是其吸收Fe³⁺的重要方式^[5]。其中这类可分泌铁载体的细菌即为产铁载体细菌(siderophore-producing bacteria)^[6]。其能够螯合周围环境中的Fe改善自身营养状况,并供给植物利用,还能与病原微生物竞争Fe营养,达到促生防病的目的^[7]。目前有关产铁载体细菌的研究多集中于植物根围,如:王东升等^[8]从龙葵(*Solanum nigrum*)根围分离到2株高产铁载体细菌;周波等^[9]从柠条属(*Caragana*)植物根围分离到14株产铁载体细菌,其中6株产铁载体能力较强。然而绝大部分根围细菌从生存环境较好的土壤中分离得到,促生作用易受外界条件影响,在实际生产中效果不稳定^[10]。植物内生细菌定殖于组织内部,与植物的互作更加直接、高效,且不受外界环境条件的影响。在胁迫条件下,其促生能力甚至比根围细菌更强^[11-12]。因此,挖掘应用产铁载体内生细菌是丰富植物促生菌资源、促进农业绿色可持续发展的新途径。

根瘤是植物-微生物共生的特殊结构,蕴含丰富的微生物资源,包括结瘤固氮细菌和非结瘤内生细菌(non-rhizobial endophytes, NRE)。结

瘤固氮细菌在腐生阶段,同土壤中的各类微生物竞争Fe等营养元素,共生阶段需要合成豆血红蛋白(leghemoglobin)所需的血红素^[13]和固氮所需的固氮酶,在低氧条件下发挥固氮作用,对Fe的需求量大^[14]。豌豆根瘤菌(*Rhizobium leguminosarum*)和苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)等能够利用内源性铁载体吸收Fe,并且其铁载体结构也被鉴定^[14]。然而Chatterjee等^[15]发现,大豆慢生根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*) USDA110无合成内源性铁载体的基因,但编码至少3个外膜铁载体转运蛋白和完整的供能系统,意味着除部分结瘤固氮细菌能够利用自身分泌的内源性铁载体,大豆慢生根瘤菌等还利用外源铁载体吸收Fe。

根瘤中还存在许多非结瘤内生细菌,目前已见报道的有20余属,包括叶杆菌属(*Phyllobacterium*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、泛菌属(*Pantoea*)、短杆菌属(*Brevibacterium*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、微枝形杆菌属(*Microvirga*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、伯克氏菌属(*Burkholderia*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)和不动杆菌属(*Acinetobacter*)等^[16-21]。这些非结瘤内生细菌在多种豆科植物根瘤中均有分布,如大豆(*Glycine max*)、花生(*Arachis hypogaea*)、苦豆子(*Sophora alopecuroides*)、紫花苜蓿(*Medicago sativa*)、紫云英(*Astragalus sinicus*)等^[22-26],其在根瘤内与寄主植物相互作用,能够建立多种互利共生关系,发挥着广泛的生物学作用(产铁载体、解磷、提高抗逆性等)^[27-29]。Thanuja等^[20]从黑吉豆(*Vigna mungo*)根瘤分离到2株产铁载体内生细菌,能够促进结瘤,经鉴定为光滑念珠菌(*Candida glabrata*)和热带念珠菌(*Candida tropicalis*); Pandya等^[30]对绿豆(*Vigna radiata*)的26株非结瘤内生细菌产铁载体能力进行研究发现,炭疽杆菌(*Bacillus anthracis*)的铁载体产量可达46.77 μg/mL。

这表明豆科植物根瘤中存在具有产铁载体能力的内生细菌,对促进结瘤固氮具有重要作用,但其是否对植物具有直接促生作用尚不明确。

达乌里胡枝子是豆科(*Leguminomas*)胡枝子属(*Lespedeza*)的多年生草本植物,能与根瘤菌共生。其蛋白质含量高、茎叶鲜嫩、根系发达,是山西省的优良乡土草种和水土保持先锋植物^[31]。山西省土壤有效铁含量为 2.25–18.83 mg/kg,平均仅为 6.84 mg/kg,依据耕地土壤养分分级标准评价为 4 级,属较低水平^[32],不利于达乌里胡枝子的共生固氮及其生长。仅 Palaniappan 等^[33]从韩国的胡枝子属植物根瘤分离到 29 株具有产铁载体能力的内生细菌,有关胡枝子属植物产铁载体根瘤内生细菌的研究仍相对较少。鉴于此,本研究对达乌里胡枝子产铁载体根瘤内生细菌进行筛选和鉴定,测定其促生和抗逆特性,并结合盆栽试验分析其促生作用,以期为研发具有广泛适应性的根瘤微生物复合菌剂提供菌种资源,同时为丰富胡枝子属等豆科植物促生菌资源提供新的途径。

1 材料与方 法

1.1 供试菌株

供试菌株为 2021 年从山西省种植的‘晋农 1 号’达乌里胡枝子根瘤分离的 88 株纯化菌株,4 °C 低温保存于山西农业大学草业科学实验室^[34]。依据文献[17-28,35-38]区分形成根瘤的结瘤固氮细菌和非结瘤内生细菌。

1.2 培养基

酵母甘露醇琼脂(yeast mannitol agar, YMA)培养基、PKO (Pikovaskaia's)无机磷培养基、蒙金娜有机磷培养基参考文献[28]配制,酵母蛋白胨(tryptone yeast, TY)液体培养基参考文献[39]配制,铬天青(chrome azurol S, CAS)培养基参考

文献[40]配制,金氏 B (modified King B, MKB)液体培养基参考文献[41]配制,葡萄糖蛋白胨培养基参考文献[42]配制,解钾培养基、阿须贝无氮(Ashby's nitrogen-free)培养基、无氮(nitrogen free medium, NFM)培养基参考文献[43]配制,改良 DF (modified DF)培养基参考文献[44]配制。

1.3 主要试剂和仪器

PCR 扩增试剂盒,北京索莱宝公司;其余试剂均为国产分析纯。霉菌培养箱,上海一恒公司;振荡培养箱,上海知楚公司;培养基分装器,重庆江雪公司;回旋式振荡器,常州润华公司;紫外可见分光光度计,上海舜宇恒平公司;高速冷冻离心机,湖南湘仪公司;光学显微镜, Olympus 公司。

1.4 菌种活化及菌悬液的制备

将供试菌株从 4 °C 冰箱取出后,置于 37 °C 水浴热激 2 min,使其快速复苏。用无菌接种环将复苏菌株划线接种在 YMA 培养基上,28 °C 恒温培养 24 h。挑取单菌落接种在 TY 液体培养基,28 °C、180 r/min 恒温振荡培养 24 h。取 10 mL 上述培养液于 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min,倒去上清液,用无菌水冲洗 3 次,收集菌体。向获得的菌体中加入 5 mL 无菌水,充分混匀,调节 OD_{600} 分别为 0.1、0.5、0.8 和 2.0,备用。

1.5 达乌里胡枝子产铁载体根瘤内生细菌的初筛

吸取 1.4 中 OD_{600} 为 2.0 的菌悬液 5 μ L 接种在 CAS 培养基上,用于测定其产铁载体能力,每个菌株 4 次重复。接种后的培养基置于 28 °C 恒温条件下培养,在第 5 天采用“十字交叉法”测定透明圈直径(D)和菌落直径(d),并计算可溶性指数(D/d)。将可溶性指数 ≥ 3.0 的初筛菌株用于开展后续试验。

1.6 达乌里胡枝子产铁载体根瘤内生细菌的鉴定

1.6.1 形态特征观察

将活化的产铁载体根瘤内生细菌接种在 YMA 培养基上, 28 °C 恒温条件下培养, 第 2 天观察菌落形态特征, 测定直径; 参考文献[45]的方法对待测菌株进行革兰氏染色、芽孢染色, 显微镜下测量大小, 每个菌株测量 50 次, 扫描电镜观察菌体形态特征。

1.6.2 生理生化反应测定

参考文献[46]的方法对产铁载体根瘤内生细菌进行吲哚反应、接触酶反应、淀粉水解反应、明胶液化反应和甲基红反应的测定。

1.6.3 生长曲线和代时的测定

用移液枪吸取 196 μL TY 液体培养基于 96 孔板, 吸取 1.4 中 OD_{600} 为 0.1 的菌悬液 4 μL 接种于 TY 液体培养基, 每个菌株 3 次重复, 28 °C、180 r/min 恒温振荡培养。每 2 h 用酶标仪测定培养液 OD_{600} , 连续测定 30 h, 绘制生长曲线。

选取待测菌株对数生长期的数据点, 计算代时 G 。

$$G = \frac{(t_2 - t_1)}{3.322(A_2 - A_1)}$$

式中: G 为代时; A_1 、 A_2 为 t_1 、 t_2 时待测菌株菌悬液的 OD_{600} 值。

1.6.4 16S rRNA 基因序列相似性与系统发育分析

用无菌接种针挑取产铁载体根瘤内生细菌单菌落, 置于盛有 20 μL 无菌水的 PCR 八连排管中, 在 PCR 仪上 95 °C 加热 7 min, 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min 取上清液作为模板 DNA 备用。利用细菌 16S rRNA 基因通用引物 P1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAGAACGAACGCT-3')和 P6 (5'-TACGGCTACCTTGTACGACTTCACCCC-3')对模板 DNA 进行扩增。PCR 反

应体系: 2×*Taq* Master Mix 25 μL , 上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 2 μL , DNA 模板(10 ng/ μL) 2 μL , ddH₂O 19 μL 。PCR 反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 5 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测合格后, 送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。获得的 16S rRNA 基因序列用生物信息学分析软件 DNASTar 和 SeqMan 程序进行拼接和人工校对, 编辑后获得的序列提交 NCBI 数据库获得登录号, 并利用 EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/identify/>)进行序列比对。使用 MEGA 7.0 软件将序列与 EzBioCloud 数据库中的模式菌株序列进行系统发育分析, 采用邻接法(neighbor-joining method)构建系统发育树, 自展值(bootstrap)为 1 000 次。

1.7 达乌里胡枝子产铁载体根瘤内生细菌的铁载体相对表达量及产铁载体能力的测定

1.7.1 铁载体相对表达量

吸取 1.4 中 OD_{600} 为 0.5 的菌悬液 500 μL , 接种在 50 mL MKB 液体培养基, 以接种等量无菌水的培养基为对照, 每个菌株 3 次重复, 28 °C、180 r/min 恒温振荡培养 48 h。取 5 mL 培养液, 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min, 取 1 mL 上清液与等量 CAS 染液充分混匀, 静置反应 1 h, 在 630 nm 波长处测定吸光值(A_s)。以去离子水作为对照调零, 用相同方法测定接种无菌水的培养液吸光值作为参比值(A_r), 计算 SU 值^[41]。

$$SU(\%) = \left[\frac{A_r - A_s}{A_r} \right] \times 100$$

式中: SU 值表示铁载体相对表达量(%)。

1.7.2 产铁载体能力

对菌株产铁载体能力的划分, 按 A_s/A_r 的比值范围(1.0–0.0), 以 0.2 为一个间隔, 每减小 0.2 增加 1 个“+”, 产铁载体能力较强菌株的

A_s/A_r 一般低于 0.5, SU 值大于 50%^[47]。

1.8 达乌里胡枝子产铁载体根瘤内生细菌其他促生特性的测定

1.8.1 产生长素(indole-3-acetic acid, IAA)

采用 SalKowski 比色法^[43]测定菌株产 IAA 能力, 吸取 1.4 中 OD_{600} 为 0.5 的菌悬液 500 μL , 接种到 50 mL 含有 L-色氨酸(200 mg/L)的 YMA 液体培养基中, 每个菌株 3 次重复, 28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 恒温振荡培养 2 d。取 5 mL 培养液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 10 min, 取 1 mL 上清液与等量比色液充分混匀, 在 530 nm 波长下测定其吸光度。标准曲线采用 3-吲哚乙酸(3-indole acetic acid)标准品制作。

1.8.2 产有机酸

将活化的产铁载体根瘤内生细菌接种到葡萄糖蛋白胨培养基上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温条件下培养 3 d, 菌落周围形成透明圈为阳性^[42]。

1.8.3 解磷

将活化的产铁载体根瘤内生细菌分别接种到 PKO 无机磷培养基和蒙金娜有机磷培养基上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温条件下培养 7 d, 菌落周围形成透明圈为阳性^[28]。

1.8.4 解钾

将活化的产铁载体根瘤内生细菌接种到解钾培养基上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温条件下培养 7 d, 菌落周围形成透明圈为阳性^[43]。

1.8.5 固氮

将活化的产铁载体根瘤内生细菌分别接种到 NFM 无氮培养基和阿须贝无氮培养基上, 在 2 种培养基上连续转接 5 代都能正常生长的菌株视为具有固氮活性^[9]。

1.8.6 产 ACC 脱氨酶

将活化的产铁载体根瘤内生细菌接种到改良 DF 培养基上, 连续转接 5 代, 能以 ACC 为唯一氮源生长的菌株视为 ACC 脱氨酶阳性^[9]。

1.9 达乌里胡枝子产铁载体根瘤内生细菌抗逆性的测定

耐盐、耐酸碱测定: 分别制备 NaCl 含量为 0.01%、0.1%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%和 pH 值为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0 的 YMA 液体培养基, 用移液枪吸取 196 μL 不同 NaCl 含量和不同 pH 值的 YMA 液体培养基于 96 孔板中, 吸取 1.4 中 OD_{600} 为 0.1 的菌悬液 4 μL 接种到不同 NaCl 含量和不同 pH 值的 YMA 液体培养基, 每个菌株 3 次重复, 28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 恒温振荡培养 30 h, 酶标仪测定培养液 OD_{600} 。

高、低温耐受性测定: 吸取 1.4 中 OD_{600} 为 2.0 的菌悬液 5 μL , 接种在 YMA 培养基上, 每个菌株 3 次重复, 分别置于温度为 4、20、28、37 和 60 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温培养箱中培养, 在第 3 天测定菌落直径(D)。

1.10 产铁载体根瘤内生细菌对达乌里胡枝子的促生试验

综合铁载体相对表达量、耐盐性、耐酸碱性和高、低温耐受性及促生特性, 选取表现优良的 TG15、TG28、TG76 和 TG78, 参考李慧萍等^[48]的方法开展促生试验。挑选一批籽粒饱满、色泽形态一致的达乌里胡枝子种子(‘晋农 1 号’, 由山西农业大学草业科学实验室提供), 先用 75%的乙醇表面消毒 30 s, 无菌水冲洗干净后用 10% NaClO 溶液消毒 10 min, 最后用无菌水漂洗 6–8 次。用无菌镊子将表面消毒完全的种子播种到盛有无菌蛭石的花盆中, 每盆播种 10 粒, 在温度为 25 $^{\circ}\text{C}$ 、光照周期为 16 h/8 h (光照/黑暗)、相对湿度为 40%–50%的植物培养间中进行催芽, 期间定期补充无菌水。在培养 10 d 后间苗, 每盆留 3 株长势一致的达乌里胡枝子幼苗。培养期间每盆每周分别浇灌 50 mL 无菌水和 50 mL 霍格兰(Hongland)营养液, 保持基

质湿润。在每株幼苗茎基部接种 1.4 中 OD_{600} 为 0.8 的菌悬液 1 mL (活菌数为 4×10^8 CFU/mL), 以接种等量无菌水的幼苗为对照, 每隔 7 d 再次接种, 共接种 3 次。在第 1 次接种 60 d 后取样, 利用直尺测定植株的垂直株高、根长, 利用游标卡尺测定茎粗, 用剪刀将植株地上部与地下部分离后, 利用分析天平分别测定干、鲜重(生物量)。

1.11 数据分析

利用 Microsoft Excel 2019 整理数据, 并利用 SPSS 26.0 进行数据分析, 对达乌里胡枝子产铁载体根瘤内生细菌的可溶性指数、铁载体相对表达量、其他促生特性和株高、根长、茎粗和生物量等指标进行单因素方差分析和最小显著性差异法(least-significant difference, LSD) 多重比较($P < 0.05$)。利用 Origin 2021 统计软件绘制产铁载体根瘤内生细菌的生长曲线、可溶性指数、铁载体相对表达量和接种对株高、根长、茎粗和生物量积累影响的柱状图。

2 结果与分析

2.1 达乌里胡枝子产铁载体根瘤内生细菌初筛结果

88 株内生细菌中有 48 株具有产铁载体能力, 在 CAS 培养基上的可溶性指数为 1.13–6.81。其中, 可溶性指数 ≥ 3.0 的菌株有 9 株, 分别为 TG4、TG9、TG13、TG15、TG28、TG32、TG38、TG76 和 TG78, 确定为高产铁载体细菌(图 1)。

2.2 达乌里胡枝子产铁载体根瘤内生细菌的分类地位

2.2.1 形态特征

在 YMA 培养基生长 48 h 后, 9 株高产铁载体根瘤内生细菌的菌落直径为 3.47–12.19 mm。菌落均为圆形、白色, 表面无隆起且质地黏稠。TG9 和 TG76 的菌落边缘呈波状, 其余 7 株菌的菌落边缘整齐(图 2A)。

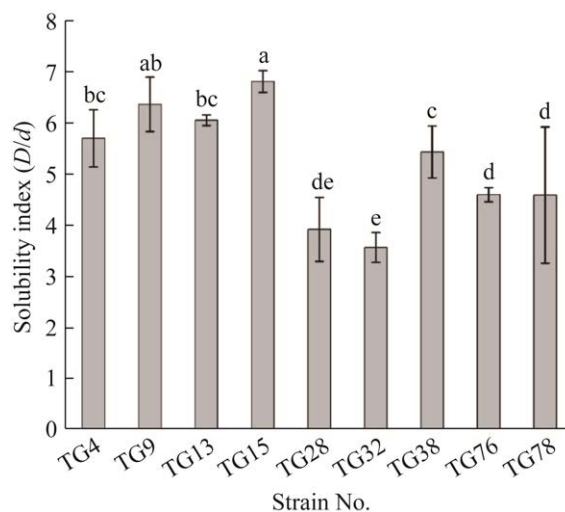


图 1 达乌里胡枝子高产铁载体根瘤内生细菌的可溶性指数 图中不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Figure 1 Solubility index of efficient siderophore-producing nodule endophytic bacteria of *Lespedeza daurica*. Different lowercase letters indicate significant difference at 0.05 level.

九株高产铁载体根瘤内生细菌的革兰氏染色均为阳性, 无芽孢。其中 TG4、TG9、TG13、TG15、TG32、TG38、TG76 和 TG78 的菌体短杆状, 大小为 $(0.35-1.59) \mu\text{m} \times (1.38-4.95) \mu\text{m}$; TG28 的菌体直杆状, 大小为 $(0.53-0.81) \mu\text{m} \times (2.53-6.36) \mu\text{m}$ (图 2B)。

2.2.2 生理生化特性

九株高产铁载体根瘤内生细菌的吲哚反应呈阴性, 过氧化氢酶反应呈阳性; TG15 的淀粉水解反应呈阳性, 其余 8 株细菌淀粉水解反应呈阴性; TG28 和 TG78 明胶液化反应呈阴性, 其余 7 株细菌明胶液化反应呈阳性; TG28 的甲基红反应呈阳性, 其余 8 株细菌的甲基红反应呈阴性。

2.2.3 生长曲线及时

菌株 TG4、TG15 和 TG32 在接种 0–8 h 内生长处于迟缓期, 在培养 8 h 后进入快速生长期, 其中, TG4 在培养 24 h 后进入稳定期, TG15 在

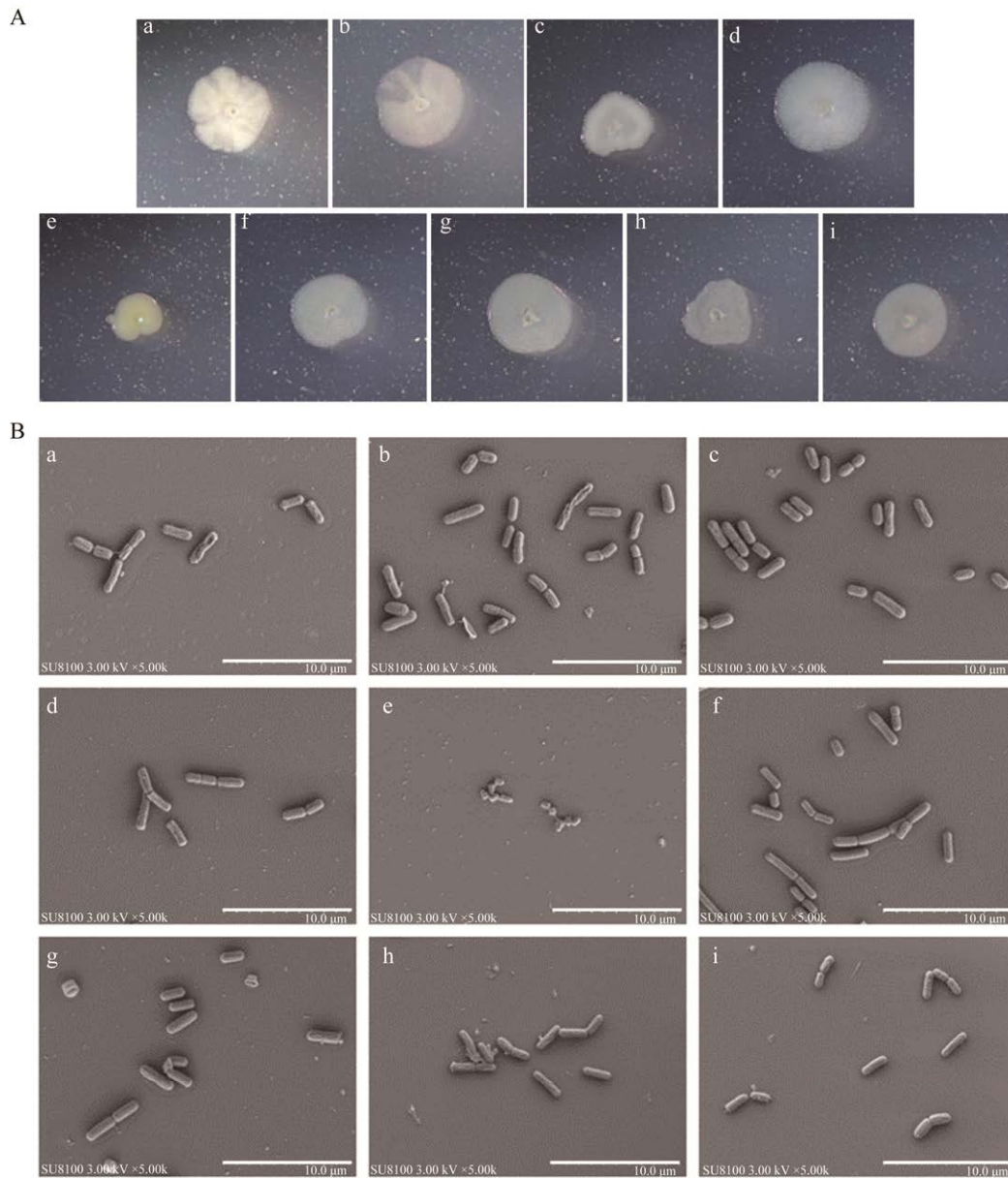


图2 达乌里胡枝子高产铁载体根瘤内生细菌的菌落(A)和菌体形态特征(B) a-i 分别为 TG4、TG9、TG13、TG15、TG28、TG32、TG38、TG76 和 TG78. 标尺=10 μm

Figure 2 Colony (A) and cell morphological characteristics (B) of efficient siderophore-producing nodule endophytic bacteria of *Lespedeza daurica*. a-i show the colonies of TG4, TG9, TG13, TG15, TG28, TG32, TG38, TG76 and TG78, respectively. Scale=10 μm.

培养 14 h 后进入稳定期, TG32 在培养 20 h 后进入稳定期; TG9、TG13 和 TG76 在接种 0-2 h 内生长处于迟缓期, 在培养 8 h 后进入快速生长期, 其中, TG9 在培养 14 h 后进入稳定期,

TG13 在培养 28 h 后进入稳定期, TG76 在培养 20 h 后进入稳定期; TG28 在接种 0-10 h 内生长处于迟缓期, 在培养 10 h 后进入快速生长期; TG38 在接种 0-6 h 内生长处于迟缓期, 在培养

6 h 后进入快速生长期, 在培养 20 h 后进入稳定期; TG78 在接种 0–4 h 内生长处于迟缓期, 在培养 4 h 后进入快速生长期, 在培养 16 h 后进入稳定期, 在培养 26 h 后进入衰退期(图 3)。

九株高产铁载体根瘤内生细菌的代时为 0.74–4.16 h。其中, TG9、TG13、TG15 和 TG32 的代时较短, 为 0.74–1.47 h, 显著低于其余菌株($P<0.05$), 生长速度较快; TG76 的代时最长, 为 4.16 h, 显著高于其余菌株($P<0.05$), 生长速度较慢(图 4)。

2.2.4 16S rRNA 基因序列相似性与系统发育分析

菌株 TG4、TG9、TG13、TG15、TG28、TG32、TG38、TG76 和 TG78 的 16S rRNA 基因序列 GenBank 登录号为 OP413030–OP413038, 16S rRNA 基因序列长度分别为 1 456、1 456、1 446、1 457、1 445、1 457、1 453、1 462 和 1 464 bp。通过 EzBioCloud 数据库比对和系统发育分析, TG4、TG9、TG13、TG15、TG32、TG38、TG76 和 TG78 与模式菌株耐寒短杆菌(*Brevibacterium frigiditolerans*) DSM 8801^T (GenBank 登录号为

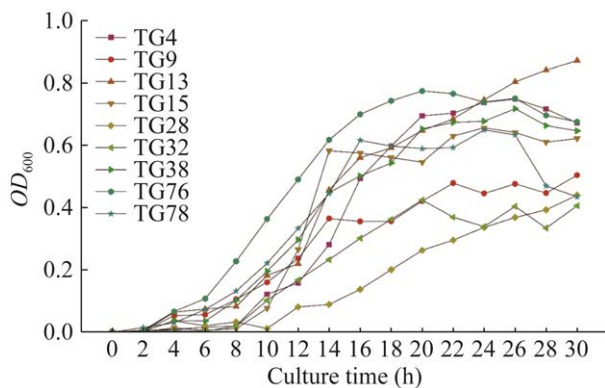


图 3 达乌里胡枝子高产铁载体根瘤内生细菌的生长曲线

Figure 3 Growth curve of efficient siderophore-producing nodule endophytic bacteria of *Lespedeza daurica*.

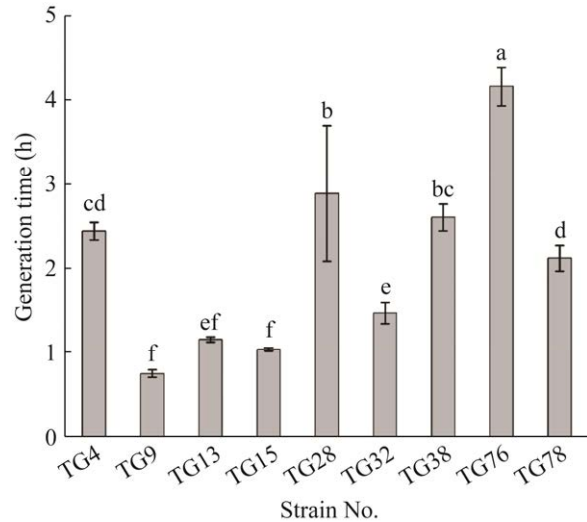


图 4 达乌里胡枝子高产铁载体根瘤内生细菌的代时 图中不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)

Figure 4 Generation time of efficient siderophore-producing nodule endophytic bacteria of *Lespedeza daurica*. Different lowercase letters indicate significant difference at 0.05 level.

AM747813)的相似性分别为 99.59%、99.45%、99.52%、99.11%、99.38%、99.24%、98.84%和 98.77%; TG28 与模式菌株巨大普里斯特氏菌(*Priestia megaterium*) NBRC 15308^T (GenBank 登录号为 JJMH01000057)的相似性为 99.45% (图 5)。结合菌株生理生化特性及培养特征, 确定 TG4、TG9、TG13、TG15、TG32、TG38、TG76 和 TG78 为耐寒短杆菌, TG28 为巨大普里斯特氏菌。

2.3 达乌里胡枝子产铁载体根瘤内生细菌的铁载体相对表达量及产铁载体能力

九株高产铁载体根瘤内生细菌在 MKB 液体培养基培养 2 d 后, 铁载体相对表达量为 26.15%–93.03%。其中, TG9 的铁载体相对表达量显著低于其他菌株($P<0.05$), 为 26.15%。TG4、TG13、TG15、TG28、TG32、TG38 和 TG78 产铁载体能力较强, TG9 产铁载体能力较弱(表 1)。

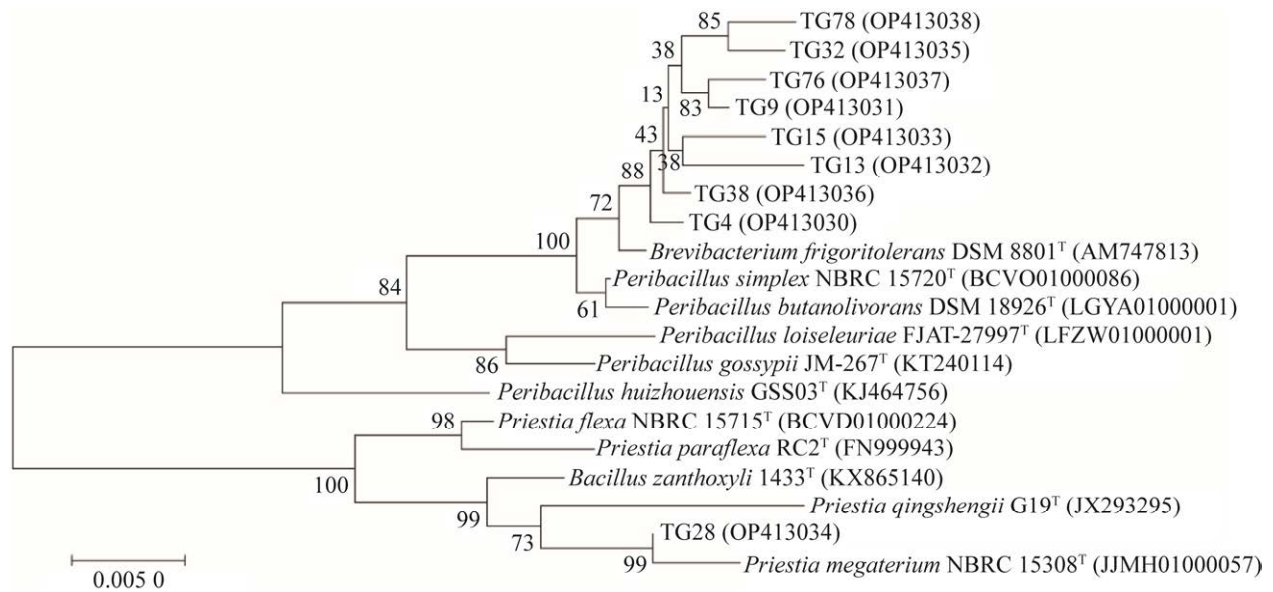


图 5 达乌里胡枝子高产铁载体根瘤内生细菌基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 括号内为 GenBank 登录号；分支点上数字代表可信度；标尺 0.005 0 代表进化距离

Figure 5 Phylogenetic tree of efficient siderophore-producing nodule endophytic bacteria of *Lespedeza daurica* based on 16S rRNA gene sequence. The serial numbers in parentheses are GenBank accession numbers; The numbers on the nodes indicates the credibility; The scale data 0.005 0 represents the evolutionary distance.

表 1 达乌里胡枝子高产铁载体根瘤内生细菌的铁载体相对表达量及其产铁载体能力

Table 1 Siderophore production and siderophore producing ability of efficient siderophore-producing nodule endophytic bacteria of *Lespedeza daurica*

Strain No.	Siderophore production	Siderophore producing ability
TG4	85.25±6.40b	+++++
TG9	25.15±4.38d	++
TG13	88.49±4.51ab	+++++
TG15	90.84±0.81ab	+++++
TG28	88.98±3.29ab	+++++
TG32	76.11±1.11c	+++++
TG38	91.65±0.25ab	+++++
TG76	74.53±7.13c	++++
TG78	93.03±0.67a	+++++

表中数据为平均值±标准差；同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)；+：菌株产铁载体能力，按 A_s/A_r 的比值范围(1.0–0.0)，以 0.2 为一个间隔，每减小 0.2 增加 1 个“+”
The data in the table is the mean±standard deviation; Different lowercase letters at the same row indicates significant difference at 0.05 level. +: Siderophore production ability, according to A_s/A_r (1.0–0.0), with 0.2 as an interval, each decrease of 0.2 increases by one “+”.

2.4 达乌里胡枝子产铁载体根瘤内生细菌的其他促生特性

除 TG4 外，其余 8 株细菌均可产 IAA。其中，TG15 产 IAA 量显著高于其他菌株($P<0.05$)，为 64.90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；所有菌株均无产有机酸和解磷能力；TG28 具有解钾能力；TG15、TG28、TG76 和 TG78 具有固氮能力；TG4、TG9、TG15、TG28、TG38、TG76 和 TG78 具有产 ACC 脱氨酶能力(表 2)。

2.5 达乌里胡枝子产铁载体根瘤内生细菌的抗逆特性

2.5.1 耐盐性

九株高产铁载体根瘤内生细菌的生长量均随盐浓度的升高而下降。其中，TG4、TG9、TG13、TG15、TG28、TG38 和 TG78 耐盐性较好，在盐浓度为 9% 的培养基上仍可生长；TG32 可在盐浓度为 8% 的培养基上生长；TG76 耐盐性较差，其最大耐受量为 5% (表 3)。

表 2 达乌里胡枝子高产铁载体根瘤内生细菌的其他促生特性

Table 2 Other plant growth-promoting characteristics of efficient siderophore-producing nodule endophytic bacteria of *Lespedeza daurica*

Strain No.	IAA secretion ability (µg/mL)	Organic acid secretion ability	Phosphate-solubilizing ability	Potassium solubilizing ability	Nitrogen-fixing ability	ACC deaminase production ability
TG4	–	–	–	–	–	+
TG9	47.25±1.50c	–	–	–	–	+
TG13	9.23±0.20e	–	–	–	–	–
TG15	64.90±1.23a	–	–	–	+	+
TG28	46.45±1.98c	–	–	+	+	+
TG32	59.68±0.76b	–	–	–	–	–
TG38	2.48±0.76f	–	–	–	–	+
TG76	40.77±0.90d	–	–	–	+	+
TG78	7.62±0.53e	–	–	–	+	+

表中数据为平均值±标准差; 同列不同小写字母表示差异显著(P<0.05). +: 阳性反应; -: 阴性反应

The data in the table is the mean±standard deviation. Different lowercase letters at the same row indicates significant difference at 0.05 level. +: Positive reaction; -: Negative reaction.

表 3 达乌里胡枝子高产铁载体根瘤内生细菌在不同盐浓度下的生长量

Table 3 Growth of efficient siderophore-producing nodule endophytic bacteria of *Lespedeza daurica* under different salt concentrations (OD_{600})

Salt resistance (%)	Strain No.								
	TG4	TG9	TG13	TG15	TG28	TG32	TG38	TG76	TG78
0.01	1.12±0.12a	1.12±0.11a	0.89±0.05a	1.11±0.12a	1.02±0.17a	0.88±0.18a	0.78±0.21a	1.03±0.22a	1.33±0.01a
0.1	0.66±0.08b	0.74±0.03b	0.60±0.06b	0.67±0.12b	0.67±0.04b	0.68±0.08b	0.63±0.07b	0.71±0.06b	0.94±0.17b
1	0.56±0.03bc	0.52±0.02c	0.49±0.05c	0.56±0.02b	0.56±0.03bc	0.56±0.04bc	0.55±0.06bc	0.64±0.02b	0.86±0.22b
2	0.45±0.11c	0.44±0.08c	0.47±0.13c	0.43±0.03c	0.42±0.09c	0.47±0.09c	0.44±0.06c	0.58±0.10b	0.61±0.05c
3	0.18±0.03d	0.18±0.01d	0.22±0.03d	0.19±0.02d	0.18±0.02d	0.17±0.02d	0.14±0.01d	0.21±0.03c	0.20±0.02d
4	0.14±0.03de	0.13±0.07de	0.14±0.01d	0.10±0.01de	0.08±0.01de	0.13±0.04d	0.11±0.02d	0.21±0.10c	0.13±0.13d
5	0.12±0.03de	0.10±0.01de	0.03±0.03e	0.17±0.03d	0.11±0.00de	0.10±0.00d	0.10±0.00d	0.09±0.01c	0.15±0.03d
6	0.14±0.01de	0.15±0.06de	0.02±0.02e	0.14±0.01de	0.09±0.02de	0.13±0.03d	0.14±0.02d	–	0.15±0.00d
7	0.10±0.05de	0.11±0.02de	0.01±0.01e	0.10±0.05de	0.06±0.01de	0.10±0.05d	0.06±0.00d	–	0.13±0.01d
8	0.03±0.01e	0.07±0.04de	0.01±0.00e	0.03±0.01e	0.05±0.05de	0.02±0.01d	0.05±0.02d	–	0.12±0.06d
9	0.02±0.02e	0.05±0.03e	0.01±0.00e	0.01±0.00e	0.01±0.00e	–	0.01±0.01d	–	0.06±0.04d

表中数据为平均值±标准差; 同列不同小写字母表示差异显著(P<0.05); -: 菌株不能生长. 下同

The data in the table is the mean plus standard deviation; Different lowercase letters at the same row indicates significant difference at 0.05 level; -: Strain cannot grow. The same below.

2.5.2 耐酸碱性

九株高产铁载体根瘤内生细菌的生长量均随 pH 值的升高呈先升高后下降的趋势。其中, TG4、TG9、TG13、TG15、TG28、TG32

和 TG38 耐酸碱性较好, 在 pH 3.0 和 pH 12.0 的培养基上仍可生长; TG78 可在 pH 12.0 的培养基上生长; TG76 耐受的 pH 值范围为 5.0–10.0 (表 4)。

2.5.3 高、低温耐受性

九株高产铁载体根瘤内生细菌在 60 °C 均未生长, 不耐高温。除 TG4 和 TG13 外, 其余菌株在 4 °C 仍可生长, 具有一定的耐低温能力。所有菌株在 20–37 °C 生长良好(表 5)。

2.6 达乌里胡枝子产铁载体根瘤内生细菌的促生作用

2.6.1 产铁载体根瘤内生细菌对达乌里胡枝子生长的影响

接种 TG28 后, 植株的株高显著增加($P<0.05$),

比对照增加 22.3% (图 6, 图 7A)。接种 TG76 后, 植株根长显著降低($P<0.05$), 比对照下降 27.0%, 其余各接种处理对根长无显著影响(图 6, 图 7B)。接种 TG15 和 TG28 后, 植株的茎粗显著增加($P<0.05$), 分别比对照增加 26.3% 和 30.5% (图 6, 图 7C)。

2.6.2 产铁载体根瘤内生细菌对达乌里胡枝子生物量积累的影响

接种 TG15、TG28、TG76 和 TG78 后, 达乌里胡枝子的根系鲜、干重有所提高, 但与对照无显著差异(图 8)。

表 4 达乌里胡枝子高产铁载体根瘤内生细菌在不同 pH 条件下的生长量

Table 4 Growth of efficient siderophore-producing nodule endophytic bacteria of *Lespedeza daurica* under different pH (OD_{600})

Acid-alkali resistance	Strain No.								
	TG4	TG9	TG13	TG15	TG28	TG32	TG38	TG76	TG78
pH 3.0	0.02±0.01f	0.01±0.00e	0.02±0.00e	0.02±0.01e	0.02±0.01e	0.01±0.00e	0.01±0.00c	–	–
pH 4.0	0.06±0.03ef	0.03±0.01e	0.01±0.00e	0.07±0.01e	0.07±0.01de	0.07±0.01de	0.10±0.01c	–	0.05±0.01e
pH 5.0	0.16±0.02e	0.39±0.13d	0.35±0.05d	0.14±0.00e	0.17±0.03d	0.23±0.06d	0.16±0.01c	0.25±0.08c	0.28±0.04d
pH 6.0	0.61±0.04c	0.59±0.07c	0.57±0.01c	0.56±0.20c	0.64±0.07b	0.71±0.06b	0.67±0.08b	0.78±0.07b	0.97±0.17b
pH 7.0	1.12±0.12a	1.12±0.11a	0.89±0.05a	1.11±0.12a	1.02±0.17a	0.88±0.18ab	0.78±0.21b	1.03±0.22a	1.33±0.01a
pH 8.0	0.98±0.13b	1.00±0.06b	0.73±0.22b	0.95±0.01b	0.91±0.04a	0.95±0.12a	1.01±0.13a	0.99±0.08a	1.19±0.03a
pH 9.0	0.52±0.03cd	0.45±0.05d	0.54±0.01c	0.42±0.06d	0.43±0.13c	0.49±0.25c	1.02±0.05a	0.73±0.17b	0.90±0.20b
pH 10.0	0.46±0.02d	0.40±0.04d	0.39±0.02d	0.41±0.02d	0.43±0.05c	0.43±0.08c	0.67±0.26b	0.62±0.08b	0.47±0.04c
pH 11.0	0.03±0.02f	0.06±0.01e	0.01±0.00e	0.06±0.03e	0.05±0.03de	0.08±0.04de	0.05±0.04c	–	0.01±0.01e
pH 12.0	0.05±0.01f	0.04±0.02e	0.03±0.02e	0.02±0.01e	0.04±0.00de	0.03±0.01e	0.04±0.02c	–	0.03±0.01e

表 5 达乌里胡枝子高产铁载体根瘤内生细菌在不同温度条件下的菌落直径

Table 5 Colony diameter of efficient siderophore-producing nodule endophytic bacteria of *Lespedeza daurica* under different temperature (mm)

Strain No.	High and low temperature resistance				
	4 °C	20 °C	28 °C	37 °C	60 °C
TG4	–	3.42±0.13c	6.91±0.77a	5.77±0.11b	–
TG9	1.02±0.20d	5.78±0.71c	11.51±1.45a	7.36±0.35b	–
TG13	–	5.24±0.62a	4.91±0.01a	2.49±0.75b	–
TG15	1.47±0.30c	7.32±0.71b	9.16±1.23a	9.20±0.29a	–
TG28	1.47±0.23c	3.86±0.73b	3.23±0.29b	7.38±1.25a	–
TG32	1.26±0.05d	4.49±0.74c	9.19±1.46b	14.13±0.59a	–
TG38	1.02±0.06d	5.05±0.18c	13.57±1.16a	10.15±1.89b	–
TG76	1.60±0.08d	3.69±0.22c	5.02±0.15b	7.55±0.26a	–
TG78	1.41±0.17d	5.29±0.64b	4.64±0.29c	11.89±0.26a	–

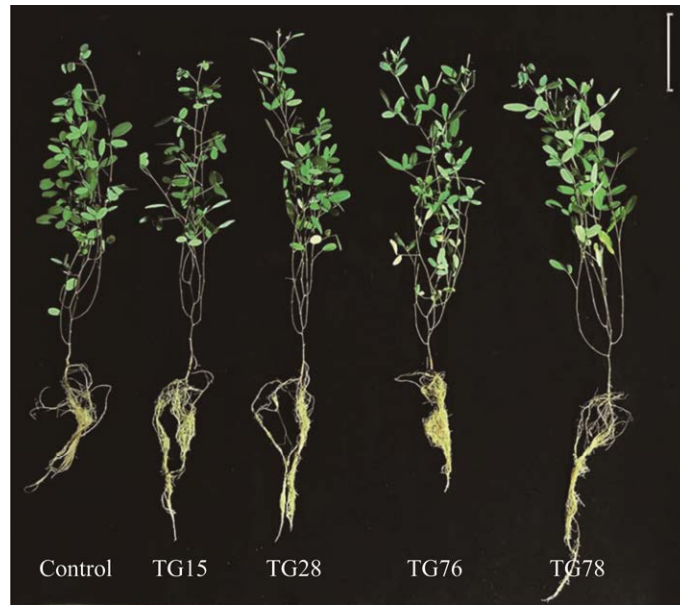


图 6 产铁载体根瘤内生细菌对达乌里胡枝子生长的影响 标尺=10 cm

Figure 6 Effects of siderophore-producing nodule endophytic bacteria on the growth of *Lespedeza daurica*. Scale=10 cm.

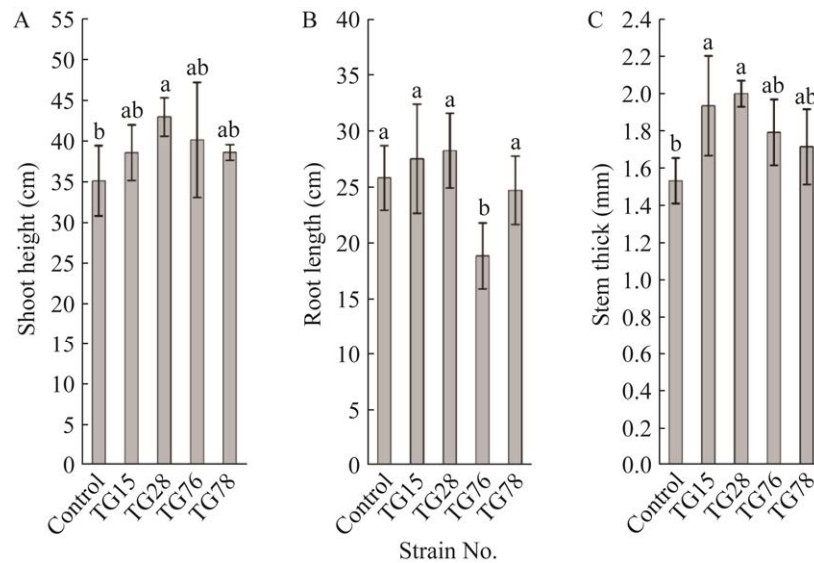


图 7 产铁载体根瘤内生细菌对达乌里胡枝子株高、根长和茎粗的影响 A: 产铁载体根瘤内生细菌对达乌里胡枝子株高的影响. B: 产铁载体根瘤内生细菌对达乌里胡枝子根长的影响. C: 产铁载体根瘤内生细菌对达乌里胡枝子茎粗的影响. 图中不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)

Figure 7 Effects of siderophore-producing nodule endophytic bacteria on the shoot height (A), root length (B) and stem thick (C) of *Lespedeza daurica*. A: Effects of siderophore-producing nodule endophytic bacteria on the shoot height. B: Effects of siderophore-producing nodule endophytic bacteria on the root length. C: Effects of siderophore-producing nodule endophytic bacteria on the stem thick. Different lowercase letters indicate significant difference at 0.05 level.

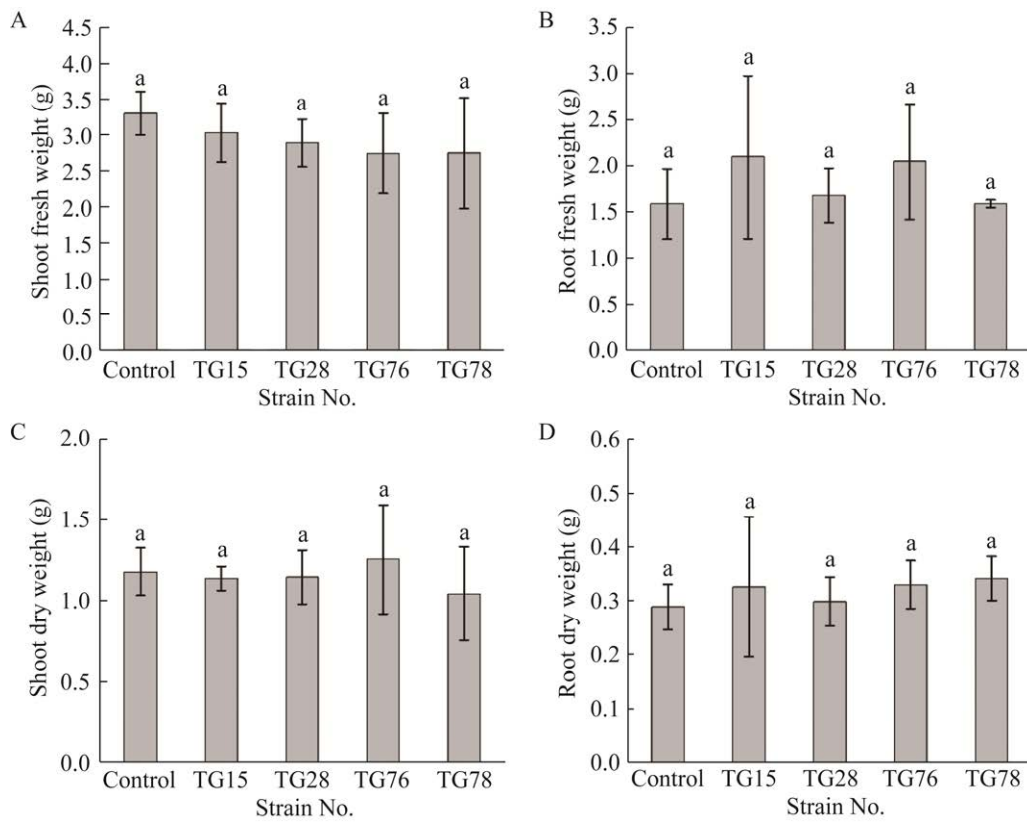


图 8 产铁载体根瘤内生细菌对达乌里胡枝子生物量积累的影响 A: 产铁载体根瘤内生细菌对达乌里胡枝子地上部鲜重的影响. B: 产铁载体根瘤内生细菌对达乌里胡枝子根系鲜重的影响. C: 产铁载体根瘤内生细菌对达乌里胡枝子地上部干重的影响. D: 产铁载体根瘤内生细菌对达乌里胡枝子根系干重的影响. 图中不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)

Figure 8 Effects of siderophore-producing nodule endophytic bacteria on the biomass accumulation of *Lespedeza daurica*. A: Effects of siderophore-producing nodule endophytic bacteria on the shoot fresh weight. B: Effects of siderophore-producing nodule endophytic bacteria on the root fresh weight. C: Effects of siderophore-producing nodule endophytic bacteria on the shoot dry weight. D: Effects of siderophore-producing nodule endophytic bacteria on the root dry weight. Different lowercase letters indicate significant difference at 0.05 level.

3 讨论与结论

目前针对胡枝子属植物产铁载体根瘤内生细菌的研究十分有限, 仅 Palaniappan 等^[33]从韩国的胡枝子属植物根瘤分离的伯克氏菌属、根瘤菌属、慢生根瘤菌属、芽孢杆菌属和微杆菌属具有产铁载体能力。本研究中, 48 株根瘤内生细菌具有产铁载体能力, 分属 8 个属, 其中

根瘤菌属和芽孢杆菌属已有报道。此外, 农杆菌属、短杆菌属、近芽孢杆菌属、普里斯特氏菌属、叶杆菌属和泛菌属也具有产铁载体能力(未发表数据), 与前人研究存在差异。其原因可能是地理环境和植物物种的不同对胡枝子属植物的根瘤内生细菌种类和功能产生了影响。例如, Gu 等^[49]对我国热带和亚热带地区胡枝子属植物根瘤菌的多样性和地理分布进行研究发

现, 胡枝子生长的地理位置和环境因子是影响根瘤菌多样性的主要因素。而且 Zúñiga-Dávila 等^[50]研究发现, 豇豆(*Vigna unguiculata*)根瘤内生细菌的多样性主要受气候和土壤因素(土壤 pH、养分等)的影响。

铁载体相对表达量是衡量产铁载体细菌促生特性的重要指标^[51]。本研究中 9 株高产铁载体菌的铁载体相对表达量为 26%–94%, 分属耐寒短杆菌和巨大普里斯特氏菌。Srt 等^[52]从黑吉豆根瘤分离到 8 株产铁载体内生细菌, 铁载体相对表达量为 10%–16%, 分属芽孢杆菌属、类芽孢杆菌属和根瘤菌属。钟宇舟等^[53]对四川地区大豆根瘤内生细菌的产铁载体能力进行研究, 芽孢杆菌属、慢生根瘤菌属、中华根瘤菌属、肠杆菌属和假单胞菌属的铁载体相对表达量为 7%–34%。这表明在不同地区、不同豆科植物根瘤中, 产铁载体细菌的种类和产铁载体能力存在差异。与前人研究相比, 本研究有 8 株细菌铁载体相对表达量在 74%以上, 产铁载体能力为“++++”或“+++++”, 属于高产铁载体范畴。此外, 耐寒短杆菌为首次从达乌里胡枝子根瘤中分离, 丰富了胡枝子属植物根瘤内生细菌资源。目前, 短杆菌属已在草木樨属(*Melilotus*)和黄花棘豆(*Oxytropis ochrocephala*)等^[54]豆科植物根瘤中发现, 在芦荟(*Aloe vera*)根围^[55]、线叶嵩草(*Kobresia capillifolia*)组织^[56]以及藏北退化草地土壤^[57]中也有报道, 具有产铁载体、IAA 和 ACC 脱氨酶等多种促生功能, 可作为研发微生物复合菌剂的菌种资源。普里斯特氏菌属能够分泌 IAA、有机酸等代谢产物, 具有多种促生功能和良好的抗逆性^[28], 是豆科植物根瘤中常见的内生菌^[38]。综上所述, 本研究丰富了胡枝子属植物根瘤内生细菌资源, 为开发植物促生菌资源提供了新的途径。

根瘤中非结瘤内生细菌具有产铁载体、

IAA、ACC 脱氨酶以及解磷、解钾等促生特性^[27]。在植物促生菌的促生效应研究中, 菌株的实际回接应用是检验其促生能力的重要方法。本研究将 4 株兼具产 IAA、ACC 脱氨酶、解钾、固氮等促生功能的高产铁载体根瘤内生细菌单独回接到达乌里胡枝子根围, 发现仅 TG15 和 TG28 分别对植株茎粗和株高有显著的促进作用, 而对生物量无影响, 这可能与菌株分泌 IAA 促进了茎的生长有关。钟宇舟等^[53]将具有产铁载体能力的根瘤内生细菌回接大豆也得到了相似的结果, 变形假单胞菌(*Pseudomonas plecoglossicida*) DB6-3 显著提高了大豆株高, 但对生物量无显著影响, 甚至对根长产生了抑制作用。Camacho 等^[58]研究也发现, 将一株具有良好促生特性的芽孢杆菌属根瘤内生细菌接种到植物后并无促生效果, 反而对其产生了有害影响。这表明, 虽然非结瘤内生细菌分泌的促生物质与促进植物生长有关, 但在环境相对封闭的根瘤内, 各种微生物之间存在复杂的相互作用, 非结瘤内生细菌促生作用的发挥可能与共生的结瘤固氮细菌密切相关。艾加敏等^[59]研究表明, 非结瘤内生细菌能够通过分泌促生物质与结瘤固氮细菌互作, 改善其生长状况, 这进一步证实了上述观点。后续将进行产铁载体根瘤内生细菌与结瘤固氮细菌的复合接种试验, 研究其在与结瘤固氮细菌互作以及在结瘤固氮过程中发挥的作用, 进而调控植物生长发育的途径。

由于地理位置、环境因子以及地形的共同作用, 山西省盐碱地面积高达 $2.62 \times 10^5 \text{ hm}^2$, 存在严重的土壤盐碱化问题^[60]。这是影响结瘤固氮细菌侵染植物根系、形成根瘤和共生固氮效率的主要因素^[61]。在盐碱条件下, 非结瘤内生细菌与能够结瘤固氮细菌互作, 提高其抗逆性并促进生长^[59]。本研究 9 株高产铁载体根瘤内生细菌中, 有 4 株细菌的耐盐性、耐酸碱性

以及高、低温耐受性较好。赵龙飞等^[28,62]对河南地区大豆根瘤内生细菌耐盐性和耐酸碱性进行研究,筛选菌株的最大耐盐量为 9%, pH 耐受范围为 pH 5.0–11.0, 与本研究相似,说明豆科植物根瘤中存在具有较强抗逆性的内生细菌,预示结瘤固氮细菌在侵染植物根系过程中可能会招募抗逆能力强的微生物共同进入根瘤,形成复合菌群提高自身对逆境的耐受性。综上可知,本研究的高产铁载体根瘤内生细菌具有较强的抗逆性,可用于研发根瘤微生物复合菌剂,提高结瘤固氮细菌对不良环境的耐受能力,进而推广其应用范围。

本研究盆栽试验选取的巨大普里斯特氏菌(TG28)和耐寒短杆菌(TG15、TG76 和 TG78)的铁载体相对表达量最大相差达 19%,表明不同细菌甚至是相同种的不同菌株之间产铁载体能力存在较大差异。此外,在测定菌株抗逆特性时,发现菌株 TG15、TG28、TG76 和 TG78 在 pH 7.0–8.0、温度 20–37 °C 条件下生长良好,而许佳露等^[63]研究表明,黑曲霉(*Aspergillus niger*) RL1 生存的最佳条件为 pH 5.0 和 20 °C。葛淼淼等^[64]发现在 pH 5.0–8.0、25–30 °C 条件下,菌株 ARSB02 和 CNRSB01 能够较好发挥其生态功能。这与本研究存在一定差异,表明外界生态条件(pH 和温度等)也是影响产铁载体细菌发挥生态功能的重要原因。因此,建议在之后有关产铁载体细菌的研究中,充分考虑细菌自身特性以及外界生态条件共同对其促生作用的影响。

本研究得到以下结论:(1) 达乌里胡枝子根瘤存在产铁载体内生细菌,其中部分菌株(TG15、TG28、TG76 和 TG78)具有较强的产铁载体能力和促生抗逆特性,经鉴定为巨大普里斯特氏菌和耐寒短杆菌;(2) 菌株 TG15 和 TG28 对植物的促生作用仅表现为对形态发育的影响,预示其分泌的铁载体等促生物质可能对共

生的结瘤固氮细菌产生积极作用。本研究丰富了胡枝子属植物根瘤内生细菌资源,为根瘤内生细菌对植物促生作用的研究提供了数据支撑和理论依据。后续将进一步通过与结瘤固氮细菌的双接种试验探讨其在根瘤形成以及共生固氮过程中发挥的作用和机制。

REFERENCES

- [1] LURTHY T, PIVATO B, LEMANCEAU P, MAZURIER S. Importance of the rhizosphere microbiota in iron biofortification of plants[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 744445.
- [2] AHMADI H, MOTESHAREZADEH B, DADRASNIA A. Iron chlorosis in fruit stone trees with emphasis on chlorosis correction mechanisms in orchards: a review[J]. *Journal of Plant Nutrition*, 2023, 46(5): 782-800.
- [3] 李本银, 汪鹏, 吴晓晨, 李忠佩, 周东美. 长期肥料试验对土壤和水稻微量元素及重金属含量的影响[J]. *土壤学报*, 2009, 46(2): 281-288.
LI BY, WANG P, WU XC, LI ZP, ZHOU DM. Effect of long-term fertilization experiment on concentration of micronutrients and heavy metals in soil and brown rice[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2009, 46(2): 281-288 (in Chinese).
- [4] 李俊, 姜昕, 马鸣超. 新形势下微生物肥料产业运行状况及发展方向[J]. *植物营养与肥料学报*, 2020, 26(12): 2108-2114.
LI J, JIANG X, MA MC. Situation and development direction for microbial fertilizer industry in the near future of China[J]. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2020, 26(12): 2108-2114 (in Chinese).
- [5] RATLEDGE C, DOVER LG. Iron metabolism in pathogenic bacteria[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2000, 54: 881-941.
- [6] SAHA M, SARKAR S, SARKAR B, SHARMA BK, BHATTACHARJEE S, TRIBEDI P. Microbial siderophores and their potential applications: a review[J]. *Environmental Science and Pollution Research International*. 2016, 23(5): 3984-3999.
- [7] BREAR EM, DAY DA, SMITH PMC. Iron: an essential micronutrient for the legume-rhizobium symbiosis[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2013, 4: 359.
- [8] 王东升, 王立立, 李取生, 周婷, 周雪芳, 高琼. 产铁载体菌对龙葵修复土壤 Cd 污染的促进效应[J]. 环

- 境工程学报, 2018, 12(8): 2311-2319.
- WANG DS, WANG LL, LI QS, ZHOU T, ZHOU XF, GAO Q. Enhancing effect of siderophore-producing bacteria on remediation of cadmium-contaminated soil by *Solanum nigrum* L.[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2018, 12(8): 2311-2319 (in Chinese).
- [9] 周波, 代金霞. 柠条根际产铁载体促生菌的分离鉴定及其促生特性[J]. 北方园艺, 2017(21): 122-129.
- ZHOU B, DAI JX. Isolation and identification of siderophore-producing rhizobacteria from rhizosphere soil of *Caragana* spp. and its growth-promoting effects[J]. Northern Horticulture, 2017(21): 122-129 (in Chinese).
- [10] 孙韵雅, 陈佳, 王悦, 程济南, 韩庆庆, 赵祺, 李惠茹, 李慧萍, 何傲蕾, 缙晶毅, 吴永娜, 牛舒琪, 索升州, 李静, 张金林. 根际促生菌促生理理及其增强植物抗逆性研究进展[J]. 草地学报, 2020, 28(5): 1203-1215.
- SUN YY, CHEN J, WANG Y, CHENG JN, HAN QQ, ZHAO Q, LI HR, LI HP, HE AL, GOU JY, WU YN, NIU SQ, SUO SZ, LI J, ZHANG JL. Advances in growth promotion mechanisms of PGPRs and their effects on improving plant stress tolerance[J]. Acta Agrestia Sinica, 2020, 28(5): 1203-1215 (in Chinese).
- [11] 陈丽莹, 方荣祥, 吴建祥, 张莉莉. 植物内生细菌测定方法的研究进展[J]. 微生物学通报, 2022, 49(3): 1105-1119.
- CHEN LY, FANG RX, WU JX, ZHANG LL. Research progress in the detection methods of endophytic bacteria[J]. Microbiology China, 2022, 49(3): 1105-1119 (in Chinese).
- [12] RAJKUMAR M, SANDHYA S, PRASAD MV, FREITAS H. Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation[J]. Biotechnology Advances, 2012, 30(6): 1562-1574.
- [13] FRUSTACI JM, O'BRIAN MR. Characterization of a *Bradyrhizobium japonicum* ferrochelatae mutant and isolation of the *hemH* gene[J]. Journal of Bacteriology, 1992, 174(13): 4223-4229.
- [14] 焦健, 刘克寒, 田长富. 根瘤菌铁转运代谢及其调控机制研究进展[J]. 生物技术通报, 2019, 35(10): 7-17.
- JIAO J, LIU KH, TIAN CF. Advances in mechanisms and regulation of iron uptake and metabolism in rhizobia[J]. Biotechnology Bulletin, 2019, 35(10): 7-17 (in Chinese).
- [15] CHATTERJEE A, O'BRIAN MR. Rapid evolution of a bacterial iron acquisition system[J]. Molecular Microbiology, 2018, 108(1): 90-100.
- [16] MEYER D, SOFIE E, BEUF D, KRISTOF, VEKEMAN, BRAM, WILLEMS, ANNE. A large diversity of non-rhizobial endophytes found in legume root nodules in Flanders (Belgium)[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2015, 83: 1-11.
- [17] GOPALAKRISHNAN S, VADLAMUDI S, SAMINENI S, SAMEER KUMAR CV. Plant growth-promotion and biofortification of chickpea and pigeonpea through inoculation of biocontrol potential bacteria, isolated from organic soils[J]. SpringerPlus, 2016, 5(1): 1-11.
- [18] SREEVIDYA M, GOPALAKRISHNAN S, KUDAPA H, VARSHNEY RK. Exploring plant growth-promotion actinomycetes from vermicompost and rhizosphere soil for yield enhancement in chickpea[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2016, 47(1): 85-95.
- [19] DHOLE A, SHELAT H. Non-rhizobial endophytes associated with nodules of *Vigna radiata* L. and their combined activity with *Rhizobium* sp.[J]. Current Microbiology, 2022, 79(4): 1-13.
- [20] THANUJA KG, ANNADURAI B, THANKAPPAN S, UTHANDI S. Non-rhizobial endophytic (NRE) yeasts assist nodulation of *Rhizobium* in root nodules of blackgram (*Vigna mungo* L.)[J]. Archives of Microbiology, 2020, 202(10): 2739-2749.
- [21] BAKHTIYARIFAR M, ENAYATIZAMIR N, KHANLOU KM. Biochemical and molecular investigation of non-rhizobial endophytic bacteria as potential biofertilisers[J]. Archives of Microbiology, 2021, 203(2): 513-521.
- [22] MURESU R, POLONE E, SULAS L, BALDAN B, TONDELLO A, DELOGU G, CAPPUCCINELLI P, ALBERGHINI S, BENHIZIA Y, BENHIZIA H, BENGUEDOUAR A, MORI B, CALAMASSI R, DAZZO FB, SQUARTINI A. Coexistence of predominantly nonculturable rhizobia with diverse, endophytic bacterial taxa within nodules of wild legumes[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2008, 63(3): 383-400.
- [23] IBÁÑEZ F, ANGELINI J, TAURIAN T, TONELLI ML, FABRA A. Endophytic occupation of peanut root nodules by opportunistic *Gammaproteobacteria*[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2009, 32(1): 49-55.
- [24] 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.
- [25] RAMÍREZ-BAHENA MH, TEJEDOR C, MARTÍN I, VELÁZQUEZ E, PEIX A. *Endobacter medicaginis* gen. nov., sp. nov., isolated from alfalfa nodules in an acidic soil[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2013, 63(5): 1760-1765.
- [26] CHEN WM, SUN LL, LU JJ, BI LL, WANG ET, WEI GH. Diverse nodule bacteria were associated with *Astragalus* species in arid region of northwestern China[J]. Journal of Basic Microbiology, 2015, 55(1): 121-128.
- [27] 邱并生. 根瘤内生细菌[J]. 微生物学通报, 2013, 40(3): 544.
QIU BS. Nodule endophytic bacteria[J]. Microbiology China, 2013, 40(3): 544 (in Chinese).
- [28] 赵龙飞, 徐亚军, 曹冬建, 李源, 厉静杰, 吕佳萌, 朱自亿, 秦珊珊, 贺学礼. 溶磷性大豆根瘤内生菌的筛选、抗性及其系统发育和促生[J]. 生态学报, 2015, 35(13): 4425-4435.
ZHAO LF, XU YJ, CAO DJ, LI Y, LI JJ, LV JM, ZHU ZY, QIN SS, HE XL. Screening, resistance, phylogeny and growth promoting of phosphorus solubilizing bacteria isolated from soybean root nodules[J]. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(13): 4425-4435 (in Chinese).
- [29] MARTÍNEZ-HIDALGO P, HIRSCH AM. The nodule microbiome: N₂-fixing rhizobia do not live alone[J]. Phytobiomes Journal, 2017, 1(2): 70-82.
- [30] PANDYA M, RAJPUT M, RAJKUMAR S. Exploring plant growth promoting potential of non rhizobial root nodules endophytes of *Vigna radiata*[J]. Microbiology, 2015, 84(1): 80-89.
- [31] 赵祥, 董宽虎, 张垚, 朱慧森, 杨武德, 杨美红. 达乌里胡枝子根解剖结构与其抗旱性的关系[J]. 草地学报, 2011, 19(1): 13-19.
ZHAO X, DONG KH, ZHANG Y, ZHU HS, YANG WD, YANG MH. Drought resistance and root anatomy of *Lespedeza davurica* (Laxm.) Schindl[J]. Acta Agrestis Sinica, 2011, 19(1): 13-19 (in Chinese).
- [32] 刘蝴蝶, 赵国平, 李晓萍, 李旭恋, 张娜. 山西主要耕作土壤微量元素现状及变化规律[J]. 农业技术与装备, 2009(03X): 13-16.
LIU HD, ZHAO GP, LI XP, LI XL, ZHANG N. Status and variation of microelements in main cultivated soils of Shanxi[J]. Agricultural Technology & Equipment, 2009(03X): 13-16 (in Chinese).
- [33] PALANIAPPAN P, CHAUHAN PS, SARAVANAN VS, ANANDHAM R, SA TM. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacterial isolates from root nodule of *Lespedeza* sp.[J]. Biology and Fertility of Soils, 2010, 46(8): 807-816.
- [34] 杨凯元, 黄臣, 高鹏, 梁银萍, 韩玲娟, 赵祥. ‘晋农1号’达乌里胡枝子根瘤内生解磷菌的鉴定及特性研究[J]. 草地学报, 2022, 30(12): 3241-3252.
YANG KY, HUANG C, GAO P, LIANG YP, HAN LJ, ZHAO X. Identification and characteristics of phosphate-solubilizing endophytic bacteria from root nodules of *Lespedeza daurica* ‘Jinnong No.1’[J]. Acta Agrestis Sinica, 2022, 30(12): 3241-3252 (in Chinese).
- [35] 蒲强, 谭志远, 彭桂香, 李永涛, 刘丽辉, 张海春, 曹禺. 根瘤菌分类的新进展[J]. 微生物学通报, 2016, 43(3): 619-633.
PU Q, TAN ZY, PENG GX, LI YT, LIU LH, ZHANG HC, CAO Y. Advances in rhizobia taxonomy[J]. Microbiology China, 2016, 43(3): 619-633 (in Chinese).
- [36] de LAJUDIE PM, ANDREWS M, ARDLEY J, EARDLY B, JUMAS-BILAK E, KUZMANOVIĆ N, LASSALLE F, LINDSTRÖM K, MHAMDI R, MARTÍNEZ-ROMERO E, MOULIN L, MOUSAVI SA, NESME X, PEIX A, PUŁAWSKA J, STEENKAMP E, STĘPKOWSKI T, TIAN CF, VINUESA P, WEI GH, et al. Minimal standards for the description of new Genera and species of rhizobia and agrobacteria[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2019, 69(7): 1852-1863.
- [37] DAVID FLORES-FÉLIX J, MENÉNDEZ E, PEIX A, GARCÍA-FRAILE P, VELÁZQUEZ E. History and current taxonomic status of genus *Agrobacterium*[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2020, 43(1): 126046.
- [38] 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.
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).
- [39] 苗阳阳, 周彤, 师尚礼, 康文娟, 张运婷. 硼对根瘤菌在紫花苜蓿体内运移和定殖及对幼苗生长的影响[J]. 草业学报, 2017, 26(4): 120-133.
MIAO YY, ZHOU T, SHI SL, KANG WJ, ZHANG YT. Effect of boron on migration and colonization by rhizobia and seedling growth in *Medicago sativa*[J].

- Acta Prataculturae Sinica, 2017, 26(4): 120-133 (in Chinese).
- [40] 王平, 董飏, 李阜棣, 胡正嘉. 小麦根圈细菌铁载体的检测[J]. 微生物学通报, 1994, 21(6): 323-326.
WANG P, DONG B, LI FD, HU Z. Detection and determination of the siderophores produced by wheat rhizobacteria[J]. Microbiology, 1994, 21(6): 323-326 (in Chinese).
- [41] 王亚军, 冯炬威, 李雅倩, 虞方伯. 高产铁载体菌 *Burkholderia vietnamiensis* YQ9 促生特性研究及其对重金属胁迫条件下种子萌发的影响[J]. 环境科学学报, 2022, 42(2): 430-437.
WANG YJ, FENG JW, LI YQ, YU FB. Studies on growth-promoting properties of an efficient siderophore producing bacterium, *Burkholderia vietnamiensis* YQ9, and its effects on seed germination under heavy metal stress[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2022, 42(2): 430-437 (in Chinese).
- [42] 康宏, 郭艾琳, 马梦彪, 曹凤麟, 李胜贤, 杨光, 王靖然. 产有机酸采油菌的筛选及产酸情况的分析[J]. 生物技术, 2011, 21(4): 89-93.
KANG H, GUO AL, MA MB, CAO FL, LI SX, YANG G, WANG JR. Screening of organic acid yielding strain and analysis of result of producing organic acid[J]. Biotechnology, 2011, 21(4): 89-93 (in Chinese).
- [43] 曹晶晶, 熊恂梓, 钞亚鹏, 赵盼, 汪志琴, 仲乃琴. 极耐盐碱固氮菌的分离鉴定及固氮特性研究[J]. 微生物学报, 2021, 61(11): 3483-3495.
CAO JJ, XIONG MZ, CHAO YP, ZHAO P, WANG ZQ, ZHONG NQ. Isolation and identification of extremely salt-tolerant azotobacter and its nitrogen-fixing characteristics[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(11): 3483-3495 (in Chinese).
- [44] 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).
- [45] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 106-120.
DONG XZ, CAI MY. Common Bacterial System Identification Manual[M]. Beijing: Science Press, 2001: 106-120 (in Chinese).
- [46] 沈萍, 陈向东. 微生物学[M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社, 2006: 85-92.
SHEN P, CHEN XD. Microbiology[M]. 2nd ed. Beijing: Higher Education Press, 2006: 85-92 (in Chinese).
- [47] 林天兴, 唐梅, 黄明远, 管岑澜, 龚明福. 高产铁载体棉田土壤细菌 SS05 的筛选与鉴定[J]. 微生物学通报, 2012, 39(5): 668-676.
LIN TX, TANG M, HUANG MY, GUAN QL, GONG MF. Screening and identification of a high yield siderophores-producing bacteria SS05 isolated from cotton soil[J]. Microbiology China, 2012, 39(5): 668-676 (in Chinese).
- [48] 李慧萍, 甘雅楠, 韩庆庆, 姚丹, 陈佳, 张明旭, 何傲蕾, 张金林, 赵祺. 祁连山云杉林土壤溶磷细菌的分离及对白三叶的促生效应[J]. 草地学报, 2022, 30(4): 879-888.
LI HP, GAN YN, HAN QQ, YAO D, CHEN J, ZHANG MX, HE AL, ZHANG JL, ZHAO Q. Isolation of phosphate solubilizing bacteria from soil of spruce forest in the Qilian Mountains and their growth promotion effects in white clover[J]. Acta Agrestia Sinica, 2022, 30(4): 879-888 (in Chinese).
- [49] GU CT, WANG ET, SUI XH, CHEN WF, CHEN WX. Diversity and geographical distribution of rhizobia associated with *Lespedeza* spp. in temperate and subtropical regions of China[J]. Archives of Microbiology, 2007, 188(4): 355-365.
- [50] ZÚÑIGA-DÁVILA D, GONZÁLEZ-ANDRÉS F, ORMEÑO-ORRILLO E. Microbial Probiotics for Agricultural Systems: Advances in Agronomic Use[M]. Cham: Springer International Publishing, 2019.
- [51] 陈伟, 王小利, 付薇, 曾庆飞, 陈莹, 舒健虹. 黑麦草根际产铁载体细菌 HMGY6B 的筛选鉴定及对病原菌的拮抗作用[J]. 微生物学通报, 2016, 43(10): 2207-2215.
CHEN W, WANG XL, FU W, ZENG QF, CHEN Y, SHU JH. Screening, identification and antagonistic against the pathogens of a siderophore-producing bacteria HMGY6B from rhizosphere of ryegrass[J]. Microbiology China, 2016, 43(10): 2207-2215 (in Chinese).
- [52] SRT R, THANGAPPAN S, UTHANDI S. Non-rhizobial nodule associated bacteria (NAB) from blackgram (*Vigna mungo* L.) and their possible role in plant growth promotion[J]. Madras Agricultural Journal, 2019, 106(7-9): 451-459.
- [53] 钟宇舟, 余秀梅, 陈强, 谭渊, 刘汉军, 陈翠平, 李艳梅, 赵燕. 四川盆地大豆根瘤内生细菌的分离鉴定及促生效果[J]. 应用与环境生物学报, 2017, 23(1): 46-53.

- ZHONG YZ, YU XM, CHEN Q, TAN Y, LIU HJ, CHEN CP, LI YM, ZHAO Y. Isolation, identification and plant growth promotion ability evaluation of the endophytic bacteria isolated from soybean root nodule in Sichuan Basin[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2017, 23(1): 46-53 (in Chinese).
- [54] MAHESHWARI DK, DHEEMAN S. Field Crops: Sustainable Management by PGPR[M]. Cham: Springer International Publishing, 2019.
- [55] MEENA, TARA N, SAHARAN BS. Plant growth promoting traits shown by bacteria *Brevibacterium frugitolerans* SMA23 Isolated from *Aloe vera* rhizosphere[J]. Agricultural Science Digest-A Research Journal, 2017, 37(3): 226-231.
- [56] WANG Y, YANG CD, YAO YL, WANG YQ, ZHANG YF, XUE L. The diversity and potential function of endophytic bacteria isolated from *Kobresia capillifolia* at alpine grasslands on the Tibetan Plateau, China[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2016, 15(9): 2153-2162.
- [57] 何敏, 王秀璞, 李彦, 戴志聪, 王从彦, 杜海, 杜道林. 两株耐寒 PGPB 的分离及其对藏北当地牧草生长的影响[J]. 广西植物, 2021, 41(9): 1425-1432.
- HE M, WANG XP, LI Y, DAI ZC, WANG CY, DU H, DU DL. Isolation of two cold-tolerant PGPB strains from northern Tibetan soil and effects on growth of local grass[J]. Guihaia, 2021, 41(9): 1425-1432 (in Chinese).
- [58] CAMACHO M, SANTAMARÍA C, TEMPRANO F, RODRIGUEZ-NAVARRO DN, DAZA A. Co-inoculation with *Bacillus* sp. CECT 450 improves nodulation in *Phaseolus vulgaris* L.[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2001, 47(11): 1058-1062.
- [59] 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).
- [60] 车文峰, 李帅, 穆光远. 山西省盐碱地资源调查研究及其开发利用[J]. 科技情报开发与经济, 2012(1): 106-109.
- CHE WF, LI S, MU G. Survey research and development/utilization of saline-alkaline land resources in Shanxi Province[J]. Sci-Tech Information Development & Economy, 2012(1): 106-109 (in Chinese).
- [61] 张昆, 康俊梅, 龙瑞才, 杨青川, 郭文山, 赵忠祥, 徐玉鹏, 闫旭东, 张铁军. 盐碱胁迫条件下中苜 3 号紫花苜蓿高效共生根瘤菌筛选[J]. 中国草地学报, 2018, 40(1): 9-16.
- ZHANG K, KANG JM, LONG RC, YANG QC, GUO WS, ZHAO ZX, XU YP, YAN XD, ZHANG TJ. Screening of highly-effective rhizobial strains in alfalfa (*Medicago sativa* L. cv. 'Zhongmu No.3') under salinity and alkalinity stresses[J]. Chinese Journal of Grassland, 2018, 40(1): 9-16 (in Chinese).
- [62] 赵龙飞, 徐亚军, 常佳丽, 李敏, 张艳玲, 党永杰, 王梦思, 程亚稳, 张斌月. 具 ACC 脱氨酶活性大豆根瘤内生菌的筛选、抗性及其促生作用[J]. 微生物学报, 2016, 56(6): 1009-1021.
- ZHAO LF, XU YJ, CHANG JL, LI M, ZHANG YL, DANG YJ, WANG MS, CHENG YW, ZHANG BY. Screening, resistance and growth-promoting effect of endophytic bacteria with ACC deaminase activity isolated from soybean nodules[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2016, 56(6): 1009-1021 (in Chinese).
- [63] 许佳露, 张平, 李美芳, 廖柏寒, 彭佩钦, 李靖, 梅金星. 产铁载体菌株的分离、培养条件优化及初步应用[J]. 微生物学通报, 2022, 49(3): 1004-1016.
- XU JL, ZHANG P, LI MF, LIAO BH, PENG PQ, LI J, MEI JX. Isolation, culture condition optimization, and preliminary application of siderophore-producing strains[J]. Microbiology China, 2022, 49(3): 1004-1016 (in Chinese).
- [64] 葛森森, 薄永琳, 刘宸, 刘方春, 解秀祥, 董玉良, 任丽英. 土壤产铁载体细菌的筛选及其对铁氧化物的活化与利用[J]. 微生物学通报, 2023, 50(3): 1062-1072.
- GE MM, BO YL, LIU C, LIU FC, XIE XX, DONG YL, REN LY. Screening of soil siderophore-producing bacteria and their activation and utilization of iron oxide[J]. Microbiology China, 2023, 50(3): 1062-1072 (in Chinese).