

紫云英优势根瘤菌的发掘与鉴定

李可¹, 赵泽洋¹, 杨柳¹, 杨国平², 张俊杰¹, 王风芹³

(1 郑州轻工业大学食品与生物工程学院, 河南 郑州 450000; 2 宁夏五丰农业科技有
限公司, 宁夏 银川 750021; 3 河南农业大学生命科学学院, 河南 郑州 450046)

摘要: 【目的】从不同省份分离得到的紫云英根瘤菌资源中筛选优势菌株, 为后续菌剂开发和应用奠定基础。【方法】采用人工气候室“双层钵”盆栽法, 对前期分离自河南、四川、广西、湖北和湖南省的 37 株紫云英根瘤菌代表菌株开展基于株高、结瘤数、叶片叶绿素含量和干质量等指标的共生效率测定和分析。挑选出共生固氮效率较好的菌株进行耐酸碱、耐盐和耐干旱的抗逆性检测, 并进行基于 16S rRNA、持家基因 (*atpD* 和 *glnII*) 和结瘤基因 *nodC* 的系统发育分析, 明确其分类地位。【结果】来自河南省的根瘤菌 WYCCWR 10750 和 WYCCWR 10704 为该省份具有最佳共生效果的菌株, 并且能够耐受 pH 值范围 4~11、质量分数 2% 的 NaCl 及质量分数 7% 的聚乙二醇; 来自四川省的菌株 WYCCWR 12312 和 WYCCWR 12365 共生效果最佳, 能够耐受 pH 值范围 4~11、质量分数 2% 的 NaCl 以及质量分数 5% 的聚乙二醇; WYCCWR 12508 和 WYCCWR 12418 为广西壮族自治区与紫云英共生效果最佳菌株, 能够耐受 pH 值范围 5~10、质量分数 2% 的 NaCl 以及质量分数 7% 的聚乙二醇; 来自湖北省的 WYCCWR 12656 和 WYCCWR 12542 为最佳菌株, 能够耐受 pH 值范围 5~10、质量分数 2% 的 NaCl 以及质量分数 7% 的聚乙二醇; 而来自湖南省的 WYCCWR 12123 和 WYCCWR 12091 是最佳菌株, 能够耐受 pH 值范围 5~10、质量分数 2% 的 NaCl 以及质量分数 7% 的聚乙二醇。上述 10 株菌为最终发掘的不同省份的紫云英优势根瘤菌。系统发育分析结果表明, 10 株优势菌均属于中慢生根瘤菌属 (*Mesorhizobium*), 且被鉴定为 *Mesorhizobium huakuii*、*Mesorhizobium qingshengii* 和 *Mesorhizobium jarvisii* 3 个种群, 同时结瘤基因型单一。【结论】发掘了 5 个不同省份的紫云英优势根瘤菌 10 株, 所有菌株均可耐受质量分数 2% 的 NaCl, 酸碱耐受性较广, 均具有一定的耐受聚乙二醇的能力, 且具有保守的结瘤基因。

关键词: 紫云英; 根瘤菌; 高效固氮; 抗逆性; 系统发育分析

中图分类号: S541⁺.3; TS261

文献标志码: A

收稿日期: 2025 - 04 - 07

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2021YFD1700200)

作者简介: 李可 (2000—), 女, 黑龙江北安人, 硕士研究生, 主要从事微生物分子生态学方面的研究, E-mail: lk23118122@163.com。

通讯作者: 张俊杰 (1984—), 男, 河南郑州人, 教授, 博士, E-mail: junjiezhang@zzuli.edu.cn; 王风芹 (1976—), 女, 河南郑州人, 教授, 博士, E-mail: wfengqin@163.com。

Isolation and identification of dominant rhizobia associated with *Astragalus sinicus*

LI Ke¹, ZHAO Zeyang¹, YANG Liu¹, YANG Guoping², ZHANG Junjie¹, WANG Fengqin³

(1.School of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450000, China;2.NingXia Wufeng Agrigultural Science and Technology Co. LTD, Yinchuan 750021, China;3.College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450046, China)

Abstract: **【Objective】** This study screened dominant strains from rhizobium resources isolated from *Astragalus sinicus* in different provinces, laying the foundation for subsequent inoculant development and application. **【Method】** Firstly, 37 representative rhizobial strains isolated from five provinces in China (Henan, Sichuan, Guangxi, Hubei, and Hunan) were evaluated for symbiotic efficiency using a "double-pot" method in a controlled climate chamber. Key indicators included plant height, root nodule number, leaf chlorophyll content, and dry biomass. Secondly, strains with high nitrogen-fixing efficiency were selected for stress tolerance tests under varying pH, salinity (NaCl), and drought (polyethylene glycol, PEG) conditions. Finally, phylogenetic analysis based on 16S rRNA, housekeeping genes (*atpD* and *glnII*), and the nodulation gene *nodC* was conducted to clarify their taxonomic status. **【Result】** Symbiotic efficiency and stress tolerance tests identified the following superior strains: (1) Henan Province: Strains WYCCWR 10750 and WYCCWR 10704 exhibited optimal symbiosis, tolerating pH 4–11, 2% NaCl (w/w), and 7% PEG (w/w). (2) Sichuan Province: Strains WYCCWR 12312 and WYCCWR 12365 showed the highest efficiency, tolerating pH 4–11, 2% NaCl, and 5% PEG. (3) Guangxi Province: Strains WYCCWR 12508 and WYCCWR 12418 demonstrated optimal symbiosis, tolerating pH 5–10, 2% NaCl, and 7% PEG. (4) Hubei Province: Strains WYCCWR 12656 and WYCCWR 12542 performed best, tolerating pH 5–10, 2% NaCl, and 7% PEG. And Hunan Province: Strains WYCCWR 12123 and WYCCWR 12091 were optimal, tolerating pH 5–10, 2% NaCl, and 7% PEG. All 10 strains tolerated 2% NaCl, exhibited broad pH adaptability, and showed moderate PEG tolerance. Phylogenetic analysis classified them into *Mesorhizobium huakuii*, *Mesorhizobium qingshengii*, and *Mesorhizobium jarvisii*, with conserved *nodC* genotypes. **【Conclusion】** Ten superior rhizobial strains suitable for Chinese milk vetch cultivation in five provinces were identified. These strains exhibited salt tolerance (2% NaCl), broad pH adaptability, and PEG tolerance, belonging to rhizobial species of *Mesorhizobium huakuii*, *Mesorhizobium qingshengii* and *Mesorhizobium jarvisii* with genetically conserved nodulation genes.

Keywords: *Astragalus sinicus*; *Rhizobium*; high efficient nitrogen fixation; stress resistance; phylogenetic analysis

氮肥对于植物生长和发育至关重要。然而，氮肥过量施用会造成农田面源污染^[1]、土壤板结、肥力下降^[2]和食品安全风险等问题。中国是生产和使用氮肥最多的国家，面临的相关问题尤为严峻^[3]。采用生物固氮技术部分替代氮肥是现代农业可持续发展的重要途径^[4]。生物固氮是指固氮菌在固氮酶作用下，把大气中的氮气转化为氨的过程，可以满足植物生长对氮素需求^[5]。其中，根瘤菌与豆科宿主之间共生固氮体系的固氮效率较高。充分利用该共生固氮作用，可以有效替代化肥施用，降低生产成本，减轻环境污染，提高生产效益。

紫云英 (*Astragalus sinicus* L.) 是中国广大水稻种植区的优质豆科绿肥作物，实施紫云英-水稻 (*Oryza sativa* L.) 轮作模式不仅能有效维持水稻稳产，还可显著降低化肥用量^[6-8]。这是因为紫云英与其共生根瘤菌形成的共生根瘤，能够通过共生固氮作用为紫云英提供氮素养分^[7]。在紫云英还田过程中，大量的氮素营养提供给轮作的水稻，使水稻中后期的干物质积累和养分吸收效率得到提升，进而优化水稻的经济性状表现，最终实现水稻产量的显著增长和农业可持续发展^[8-12]。研究表明，紫云英在盛花期氮素中生物固氮来源比例为 59%~85%，在典型生长季条件下，紫云英可通过与根瘤菌的共生固氮作用向稻田生态系统输入约 92.87 kg hm⁻² 的纯氮^[13-15]。接种高效根瘤菌可显著增强紫云英的固氮效率，为后茬主栽作物提供更丰富的氮素营养。因此，发掘紫云英优势根瘤菌种群意义重大。紫云英优势根瘤菌种群表现出明显的生物地理分布差异和特异性^[16]。早期 *Mesorhizobium huakuii* 被认为是与紫云英共生的唯一根瘤菌种群^[17-18]。然而，ZHENG 等^[19]在研究中国福建、江西和安徽 3 省的紫云英根瘤菌时发现，*M. huakuii* 是主要种群，同时首次分离鉴定和命名了一个新种群 *Mesorhizobium qingshengii*。自此，紫云英根瘤菌的共生根瘤菌种群增加到了 2 个。ZHANG 等^[20]在研究河南信阳地区的紫云英根瘤菌遗传多样性时，首次发现 *Mesorhizobium jarvisii* sv. *astragali* 为当地紫云英的主要优势根瘤菌种群，另有少数菌株属于 *M. huakuii*，使得紫云英根瘤菌的共生种群增加到了 3 个。

目前，在生态农业深入发展的引领下，传统农业正朝着节能、减排的绿色生产方式演进^[21-22]。为有效减少农田面源污染，促进农业绿色高质量发展，农业农村部出台“减药减肥”政策，而广泛推行紫云英-根瘤菌共生固氮体系与水稻的轮作，是落实“两减”政策的有力途径。在推广这个模式的过程中，收集不同地区的紫云英根瘤菌资源并筛选具有高效固氮效率的优势菌株，是充分发挥紫云英-根瘤菌共生固氮作用的重要措施。评价固氮效率最重要的指标是植株的干质量，其他指标还包括株高、叶绿素含量、结瘤数等^[23-24]。此外，长期种植水稻土壤的酸化现象^[25]、菌剂包衣后播种前要经历的干旱条件^[26]，以及过度施肥带来的土壤盐渍化问题^[27]，都要求加强对具有耐酸耐干旱耐盐等具有抗逆特性的根瘤菌资源的筛

选。因此，本研究通过对来自河南、四川、广西、湖北和湖南 5 省的紫云英根瘤菌进行共生固氮效率和抗逆性评价，分别筛选来自不同省份的优势紫云英优势根瘤菌菌株，并对优势菌株进行分类学鉴定，明确其分类地位，为相关地区引入紫云英—根瘤菌体系过程中特异性优势根瘤菌菌剂的开发与应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料来源

所使用的紫云英根瘤菌资源分离自河南、四川、广西、湖北和湖南省，保存于郑州轻工业大学食品与生物工程学院，如表 1 所示。所用紫云英品种为‘信紫一号’，种子购买自郑州华丰草业科技有限公司。

表 1 紫云英根瘤菌菌种来源
Table 1 The source of rhizobia species of *Astragalus sinicus*

来源 Strain origins	菌株编号 Strain number
河南省 Henan Province	WYCCWR10838、WYCCWR10750、WYCCWR10682、 WYCCWR10753、WYCCWR10779、WYCCWR10765 WYCCWR10758、WYCCWR10835、WYCCWR10668、 WYCCWR10727、WYCCWR10900、WYCCWR10884 WYCCWR10704、WYCCWR10785、WYCCWR10783
四川省 Sichuan Province	WYCCWR12267、WYCCWR12365、WYCCWR12312
广西壮族自治区 Guangxi Zhuang Autonomous Region	WYCCWR12385、WYCCWR12418、WYCCWR12489、 WYCCWR12375、WYCCWR12461、WYCCWR12508
湖北省 Hubei Province	WYCCWR12523、WYCCWR12618、WYCCWR12563、 WYCCWR12571、WYCCWR12610、WYCCWR12656 WYCCWR12542、WYCCWR12637
湖南省 Hu'nan Province	WYCCWR12136、WYCCWR12123、WYCCWR12077、 WYCCWR12091

1.2 培养基配方

YMA 培养基：甘露醇 10 g，酵母粉 3 g，磷酸二氢钾 0.25 g，磷酸氢二钾 0.25 g，无水硫酸镁 0.1 g，氯化钠 0.1 g，琼脂粉 20 g，去离子水定容至 1 L，pH 值 6.8~7.2，121 °C 灭菌 20 min。TY 培养基：无水氯化钙 0.53 g，胰蛋白胨 5 g，酵母粉 3 g，去离子水定容至 1 L，pH 值 6.8~7.2，121 °C 灭菌 20 min^[28]。

1.3 菌株的活化及接种用菌液的准备

将菌株涂布在 YMA 固体培养基上，在 28 °C 恒温培养箱（北京中兴伟业仪器制造有限公司，DH-600）中倒置培养活化 2~3 d。待长出菌落后，挑取单菌落接种到 5 mL TY 液体试管中，在 28 °C 恒温振荡器（上海智城分析仪器制造有限公司，ZWY-100H）中 $180\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养 2~3 d，将菌株培养至对数生长期。在进行紫云英接种前，调整所有供试菌液的 OD_{600} 值为 1.0。

1.4 紫云英根瘤菌共生效率检测

挑选紫云英种子，进行消毒、发芽及播种，待种子发芽后转移至特定的双层钵装置，在根部加入 1 mL 根瘤菌液，具体参考 ZHANG 等^[29]的方法。供试菌株共 37 株，每株菌设置 3 次重复，不接种对照则用 TY 液体培养基代替。紫云英生长 40 d 后，进行生长指标的测定，包括株高、叶片表型（叶绿素含量、叶片颜色）、结瘤数、干质量^[30]。其中，使用便携式叶绿素检测仪（SPAD-502 Plus）^[20]测定紫云英叶片的叶绿素含量，同时观察叶片颜色的变化；将各处理置于恒温 70 °C 下烘干至恒定质量后，称其干质量。经过 IBM SPSS Statistics 21 软件分别对单因素（叶绿素含量、结瘤数、干质量）进行显著性方差分析，并将紫云英根瘤菌共生指标可视化，采用叶绿素权重 25%、结瘤数权重 25%和植株的干质量权重 50%的评分方法^[31]，对各个紫云英根瘤菌代表菌株进行评分比较，利用 Origin 2024 软件分别对不同省份紫云英根瘤菌供试菌株评分作图，分析比较后选出不同省份共生效率较高的菌株，用于后续研究。

1.5 紫云英高共生效率根瘤菌抗逆性检测

1.5.1 耐酸碱检测 配制 pH 值梯度（4~11）的 YMA 固体培养基，以 pH 值 7 为对照。灭菌后，在各 pH 值平板上接种筛选出的不同省份紫云英高共生效率根瘤菌，设 3 次重复，28 °C 倒置培养 2~3 d。正常生长的菌落记为生长阳性（+），微弱生长的记为弱阳性（w+），不能生长的则为阴性（-）^[32-34]。

1.5.2 耐盐检测 将紫云英高共生效率根瘤菌分别接种于含不同 NaCl 质量分数（1%、2%、3%、4%、5%）的 YMA 平板，以 NaCl 质量分数 0.01%为对照，3 次重复，28 °C 培养 2~3 d 后观察。正常生长菌落的记为生长阳性（+），微弱生长的记为弱阳性（w+），不能生长的则为阴性（-）^[32-33]。

1.5.3 耐干旱检测 采用 PEG 6000 模拟干旱胁迫，在 YMA 培养基中设置 3%、5%、7%和 10%的 PEG 质量分数梯度。以 0%为对照，将筛选出紫云英高共生效率根瘤菌点接于各平板，28 °C 培养 2~3 d 后观察生长状况。正常生长记为阳性（+），微弱生长为弱阳性（w+），不

生长的则为阴性（-），以评估菌株的耐旱能力^[35]。

根据检测结果，在高共生效率根瘤菌中，挑选抗逆性较好的菌株，作为紫云英优势根瘤菌，用于后续研究。

1.6 紫云英优势根瘤菌的系统发育分析

1.6.1 16S rRNA 基因的 PCR 扩增及系统发育分析 用正向引物 P1/反向引物 P6 进行 16S rRNA 的 PCR 扩增^[36]。对扩增产物用质量分数 1%琼脂糖凝胶电泳检测，电泳参数为 100 V、30 min。将检测合格的 PCR 样品送生工生物工程（上海）股份有限公司测序，双向测序。对测序结果用 MEGA 7.0 进行系统发育分析，bootstrap 值为 500，同时，将测序序列存入 GenBank 数据库，下同。

1.6.2 持家基因的 PCR 扩增及系统发育分析 分别用正向引物 *atpD* 225F/反向引物 *atpD* 782R 和正向引物 *glnII* 12F/反向引物 *glnII* 689R 进行 *atpD* 基因（编码膜蛋白 ATP 合成酶 β 亚基）和 *glnII* 基因（编码谷氨酰胺合成酶 II）片段的 PCR 扩增^[36]。对扩增产物用质量分数 1%琼脂糖凝胶电泳检测，电泳参数为 100 V、30 min。将检测合格的 PCR 样品送生工生物工程（上海）股份有限公司测序，正向测序。对测序结果用 MEGA 7.0 进行系统发育分析，bootstrap 值为 500。

1.6.3 结瘤基因 *nodC* 的 PCR 扩增及系统发育分析 利用共生基因 *nodC*（N-乙酰氨基葡萄糖转移酶）作为根瘤菌宿主特异性的分子标记。用正向引物 *nodC* for540/反向引物 *nodC* rev1160 进行 *nodC*（结瘤基因）片段的 PCR 扩增。对扩增产物用质量分数 1%琼脂糖凝胶电泳检测，电泳参数为 100 V、30 min。将检测合格的 PCR 样品送生工生物工程（上海）股份有限公司测序，正向测序。对测序结果用 MEGA 7.0 进行系统发育分析，bootstrap 值为 500。

1.7 数据分析

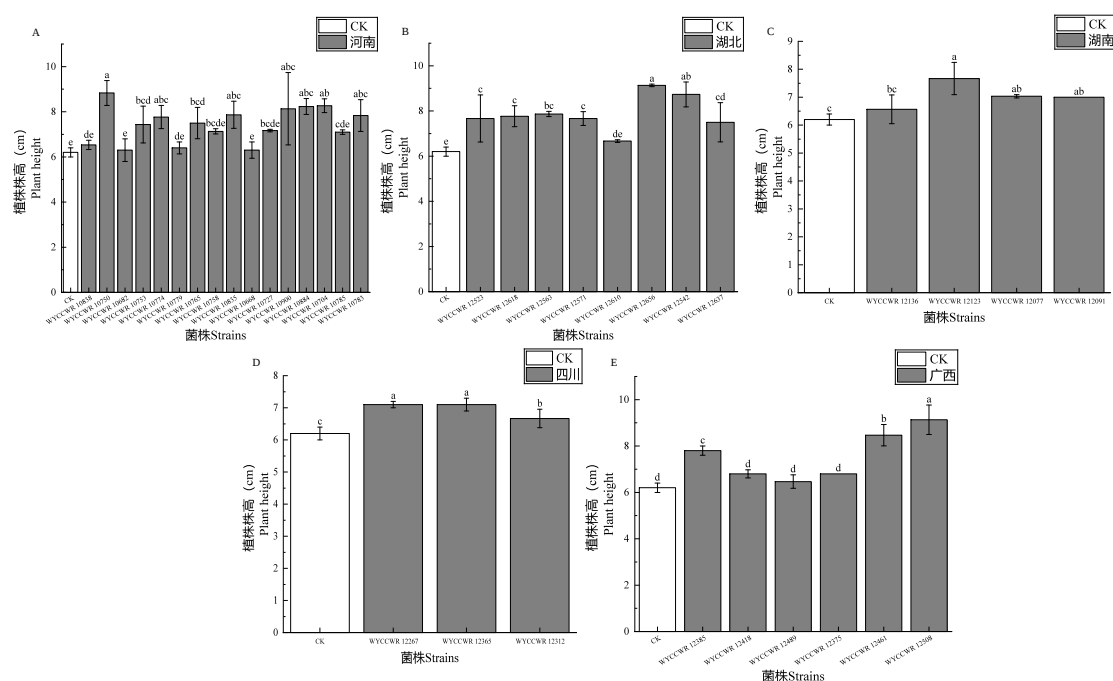
利用 MEGA 7 软件进行系统发育分析。多重比较采用单因素方差分析（ANOVA），考察在 0.05 水平上统计学意义。

2 结果与分析

2.1 紫云英根瘤菌共生效率研究结果

2.1.1 根瘤菌对紫云英株高的影响 如图 1 所示，接种不同省份的根瘤菌对紫云英株高有不同程度的提升作用。其中，河南的 9 个菌株株高较不接种对照处理有显著的提升，其中菌株 WYCCWR 10750 为提升最显著的菌株；湖北的供试菌中，除了菌株 WYCCWR 12610 外，

接种其余菌株紫云英株高均显著高于不接种对照处理，其中接种 WYCCWR 12656 和 WYCCWR 12542 效果最佳；接种湖南的菌株 WYCCWR 12123 株高最高，且显著高于不接种对照处理；接种四川的菌株后紫云英株高均显著高于不接种对照处理，且 WYCCWR12267 和 WYCCWR12365 效果最好；而接种广西的菌株 WYCCWR 12508 和 WYCCWR12461 的紫云英株高显著高于其他处理。综合分析，不同省份接种效果较好的菌株，接种后紫云英株高达到了不接种对照处理组株高的 1.145~1.473 倍。



注：A、B、C、D、E 分别代表河南省、湖北省、湖南省、四川省和广西壮族自治区 5 个省份的分析结果。不同的小写字母代表差异性显著 ($p < 0.05$)。下同。

Note: A,B,C,D and E represent the analysis results from Henan Province, Hubei Province, Hunan Province, Sichuan Province and Guangxi Province, respectively. Different lowercase letters indicate significant differences ($p < 0.05$). The same as below.

图 1 接种不同省份根瘤菌的紫云英株高比较

Fig.1 Comparison of the shoot height of *Astragalus sinicus* inoculated with rhizobia from different provinces

2.1.2 根瘤菌对紫云英结瘤数的影响 结瘤数的计算是比较植株固氮能力的最常用方法之一，结瘤数越多，植株的固氮能力就越强^[37]。由图 2 可知，不接菌处理的紫云英不结根瘤，同时也表明在种植过程中没有染菌的现象。接种不同省份根瘤菌的紫云英均能结瘤，且为粉红色椭圆形的有效根瘤。利用 IBM SPSS Statistics 21 软件进行显著性方差分析并通过 Origin 2024 软件绘图分析可知，接种河南省的菌株 WYCCWR 10704 结瘤数显著高于该省的其他菌株（图 2A）；而接种湖北省的菌株 WYCCWR 12656、湖南省的菌株 WYCCWR 12901

和四川省的菌株 WYCCWR 12312 后紫云英结瘤数分别显著高于所在省的其他菌株(图 2B、2C、2D)；接种广西壮族自治区的菌株 WYCCWR 12508 后紫云英结瘤数最多（图 2E）。这说明上述根瘤菌在结瘤数方面表现出良好的共生效果。

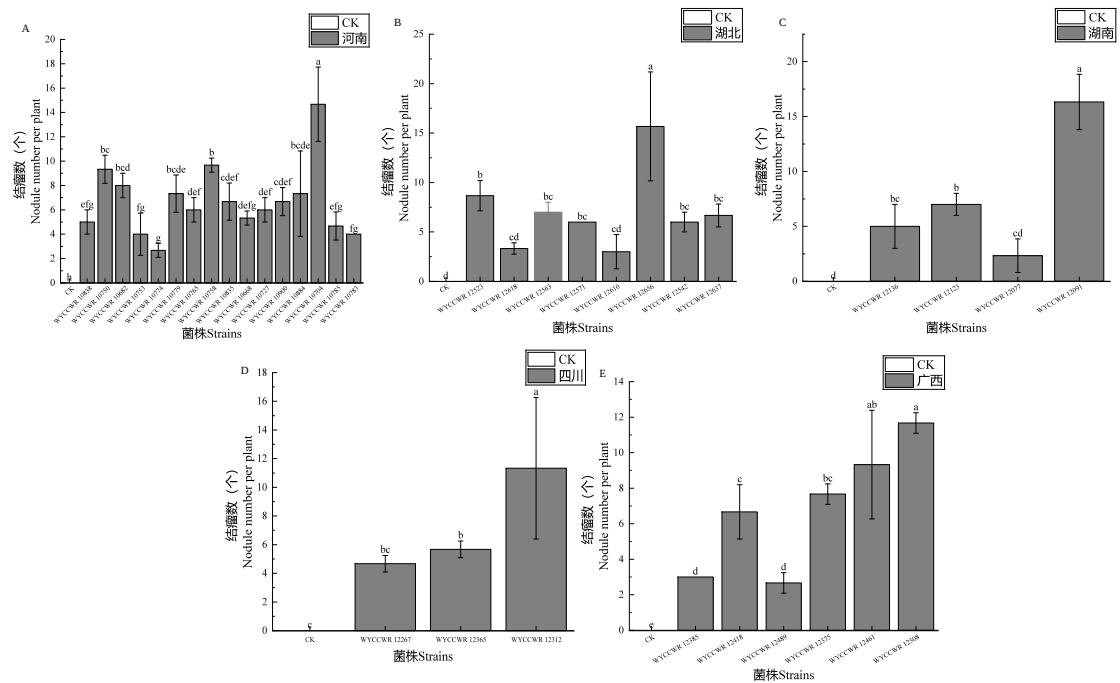


图 2 接种不同省份根瘤菌的紫云英结瘤数比较

Fig.2 Comparison of nodule numbers of *Astragalus sinicus* inoculated with rhizobia from different provinces

2.1.3 根瘤菌对紫云英叶片表型的影响 如图 3 与图 4 可知，接种不同省份的根瘤菌与不接种的紫云英在叶片表型上存在显著差异。与不接种处理相比，接种根瘤菌的紫云英叶片没有出现明显黄化现象，且叶片尺寸较大（图 3）。利用 IBM SPSS Statistics 21 软件进行显著性方差分析并绘图可知，每个省份接种根瘤菌处理的紫云英叶片叶绿素含量均显著高于不接种对照组（图 4）。其中，接种河南省的菌株 WYCCWR 10750（图 4A）、湖北省的菌株 WYCCWR12571 和 WYCCWR 12542(图 4B)、湖南省的菌株 WYCCWR 12091 和 WYCCWR 12123(图 4C)、四川省的菌株 WYCCWR 12365(图 4D)及广西壮族自治区的菌株 WYCCWR 12375（图 4E）的紫云英平均叶绿素含量，是不接种对照处理的 2.27~2.96 倍。这说明上述根瘤菌和紫云英在叶绿素表型方面共生效果较好，且接种根瘤菌对紫云英叶绿素含量均具有显著的提升作用。



图 3 接种不同省份根瘤菌的紫云英叶片表型比较

Fig.3 Comparison of leaf phenotype of *Astragalus sinicus* inoculated with rhizobia from different provinces

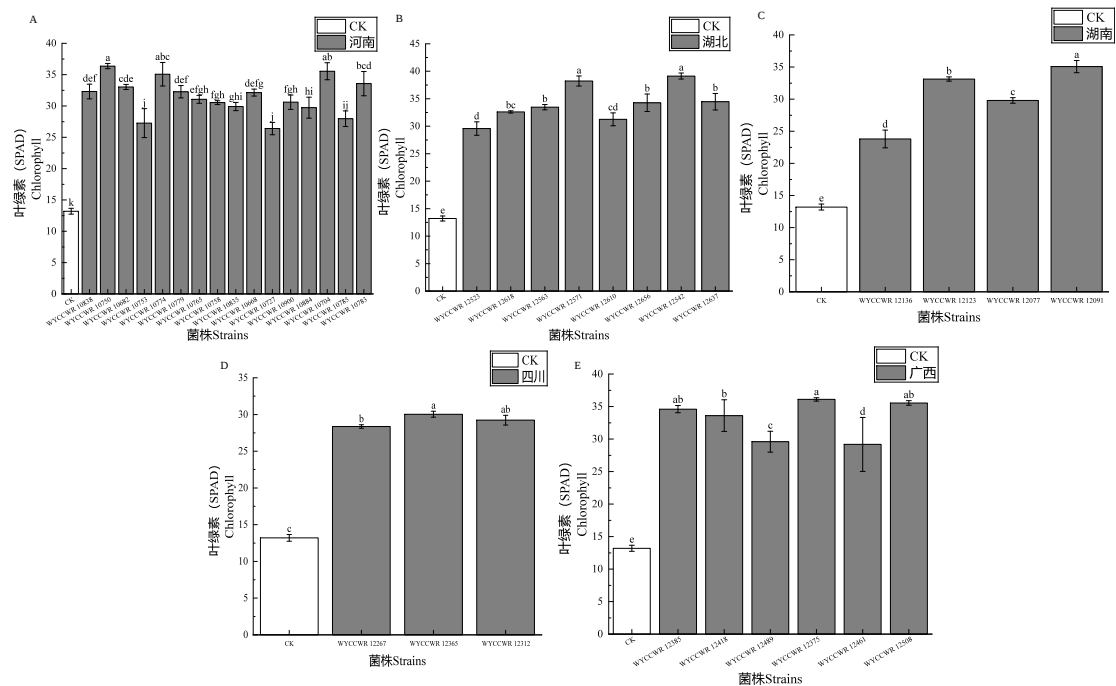


图 4 接种不同省份根瘤菌的紫云英叶绿素含量比较

Fig.4 Comparison of chlorophyll content of *Astragalus sinicus* inoculated with rhizobia from different provinces

2.1.4 根瘤菌对紫云英干质量的影响 由图 5 可知，利用 IBM SPSS Statistics 21 软件进行显

著性方差分析，并通过 Origin 2024 软件绘图可知，接种不同省份根瘤菌的紫云英干质量有着明显的差异。其中，接种河南省的菌株中有 5 个能使得植株干质量显著高于其他所有处理，其中接种菌株 WYCCWR 10765 后植株干质量最高（图 5A）；接种湖北省的所有菌株中，除了菌株 WYCCWR12523 外，其余菌株均显著高于不接种对照处理，其中菌株 WYCCWR12656 接种效果最佳（图 5B）；接种湖南省的菌株 WYCCWR 12123 和 WYCCWR 12091 植株干质量显著高于不接种对照处理（图 5C）；而接种四川省的菌株 WYCCWR 12312 效果最好（图 5D）；接种广西壮族自治区的菌株 WYCCWR 12508 获得最佳的紫云英植株干质量。这说明上述根瘤菌和紫云英在干质量方面的共生效果较好。

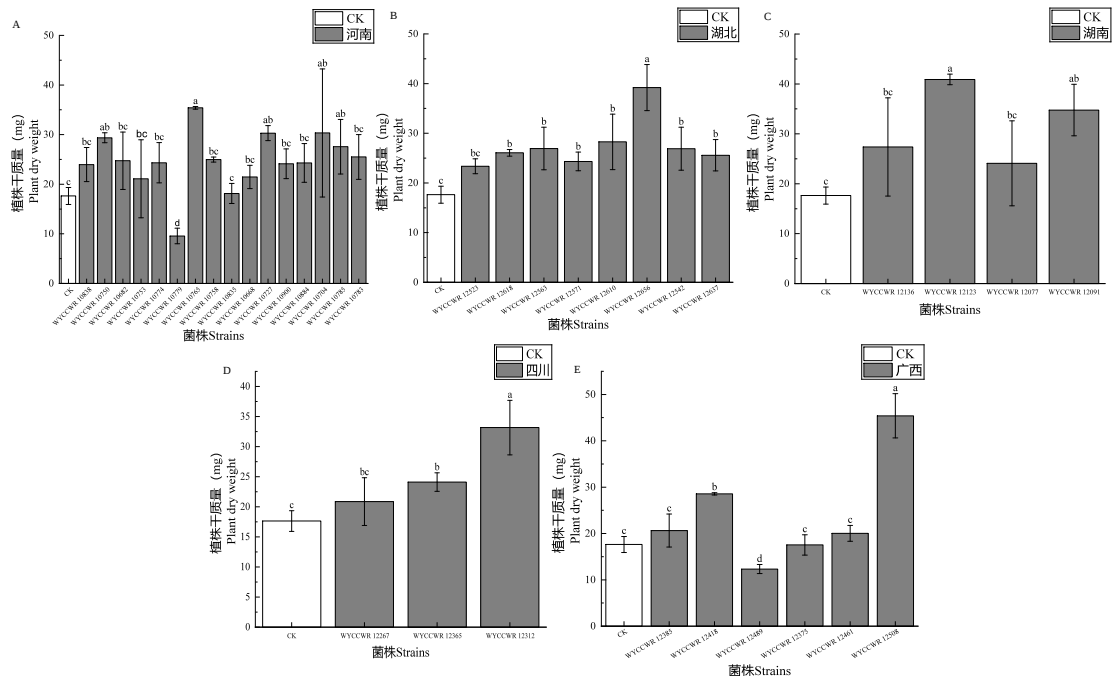


图 5 接种不同省份根瘤菌的紫云英干质量比较

Fig.5 Comparison of the dry weight of *Astragalus sinicus* inoculated with rhizobia from different provinces

如图 6 所示，将紫云英根瘤菌共生指标变得可视化，采用叶绿素权重 25%、结瘤数权重 25%和植株的总干质量权重 50%的评分方法^[31]，将各个紫云英根瘤菌代表菌株进行评分测评，结果表明，接种紫云英根瘤菌的植株共生指标要显著性高于不接种根瘤菌菌株的阴性对照组 ($P < 0.05$)。从中评价出了适宜不同省份的 10 株共生效率较高的紫云英根瘤菌，河南省的 WYCCWR 10750 和 WYCCWR 10704、四川省的 WYCCWR 12312 和 WYCCWR

12365、广西壮族自治区的 WYCCWR 12508 和 WYCCWR 12418、湖北省的 WYCCWR 12656、WYCCWR 12542 及湖南省 WYCCWR 12123 和 WYCCWR 12901。

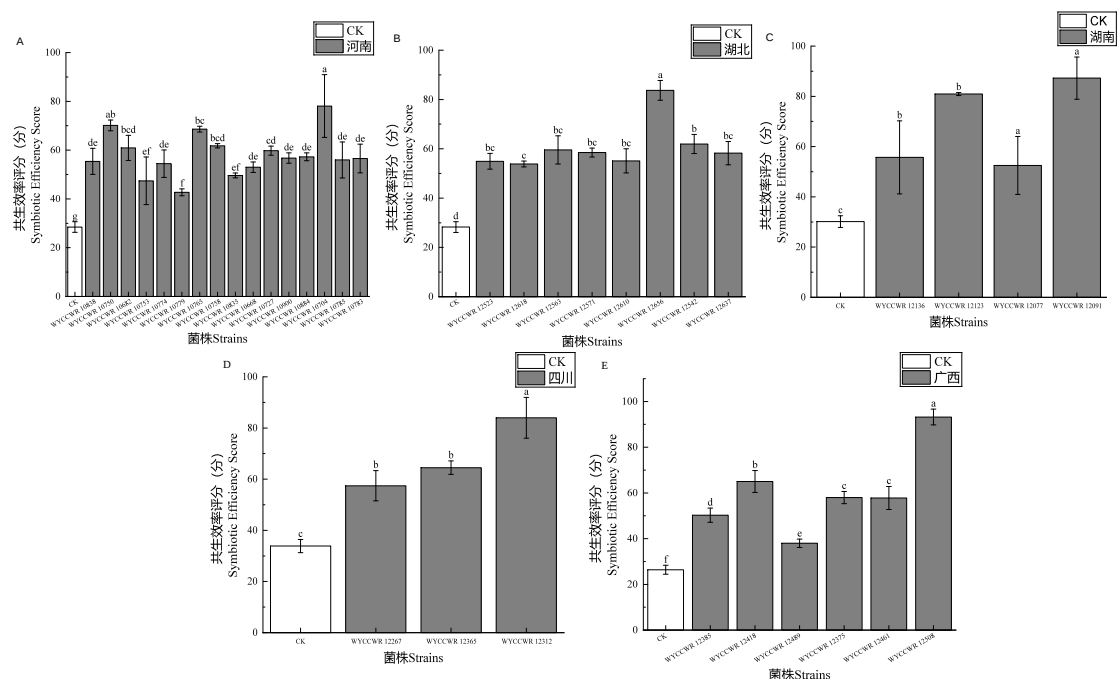


图 6 接种不同省份根瘤菌的紫云英共生效率评分比较

Fig.6 Comparison of the symbiotic efficiency score content of *Astragalus sinicus* inoculated with rhizobia from different provinces

2.2 紫云英高共生效率根瘤菌的抗逆性分析

2.2.1 紫云英高共生效率根瘤菌耐酸碱性分析 由表 2 可知, 10 株不同省份紫云英高共生效率根瘤菌表现出明显的 pH 适应性差异。在酸性环境 (pH 值 4) 下, 6 株菌呈现微量生长, 其余 4 株不能生长; 在弱酸性至弱碱性范围 (pH 值 5~9) 内, 所有菌株均能正常生长; 在较强碱性条件 (pH 10) 下, 6 个菌株能正常生长, 4 个表现为微量生长; 而在强碱性环境 (pH 11) 中, 仅 1 株菌能正常生长, 4 株菌微量生长, 剩余 5 株则不能生长。这表明供试根瘤菌在 pH 值 5~9 时均能耐受, 但是在极端酸碱环境下 (尤其是强碱性条件) 表现出显著的生长抑制。

表 2 不同 pH 值下紫云英高共生效率根瘤菌生长状态

Table 2 The growth status of high symbiotic efficiency rhizobia of <i>Astragalus sinicus</i> under different pH values								
菌株编号 Strain number	pH 值 pH value							
	4	5	6	7	8	9	10	11
WYCCWR10750	w+	+	+	+	+	+	+	w+

WYCCWR10704	w+	+	+	+	+	+	+	+
WYCCWR12312	w+	+	+	+	+	+	w+	-
WYCCWR12365	w+	+	+	+	+	+	w+	-
WYCCWR12508	-	+	+	+	+	+	+	w+
WYCCWR12418	w+	+	+	+	+	+	w+	-
WYCCWR12656	-	+	+	+	+	+	+	w+
WYCCWR12542	-	+	+	+	+	+	w+	-
WYCCWR12123	w+	+	+	+	+	+	+	w+
WYCCWR12091	-	+	+	+	+	+	+	-

注：w+，生长微弱；+，与阳性对照（pH=7）生长状态相同；-，不生长。

Note: w+, weak growth; +, growth similar to the positive control (pH=7); -, no growth.

2.2.2 紫云英高共生效率根瘤菌耐盐检测分析 由表 3 可知，10 株不同省份紫云英高共生效率根瘤菌在 NaCl 质量分数为 0.01%（CK）、1%和 2%的平板上均能正常生长，但随着 NaCl 质量分数的增加，根瘤菌耐盐性降低，在 NaCl 质量分数为 3%及以上的平板上均不能生长。

表 3 不同 NaCl 质量分数下紫云英高共生效率根瘤菌生长状态
Table 3 The growth status of high symbiotic efficiency rhizobia of *Astragalus sinicus* under different NaCl mass fractions

菌株编号 Strain number	NaCl 质量分数/% NaCl mass fraction					
	0.01	1	2	3	4	5
WYCCWR10750	+	+	+	-	-	-
WYCCWR10704	+	+	+	-	-	-
WYCCWR12312	+	+	+	-	-	-
WYCCWR12365	+	+	+	-	-	-
WYCCWR12508	+	+	+	-	-	-
WYCCWR12418	+	+	+	-	-	-
WYCCWR12656	+	+	+	-	-	-
WYCCWR12542	+	+	+	-	-	-
WYCCWR12123	+	+	+	-	-	-
WYCCWR12091	+	+	+	-	-	-

注：w+，生长微弱；+，与阳性对照（NaCl 质量分数 0.01%）生长状态相同；-，不生长。

Note: w+, weak growth; +, growth similar to the positive control (NaCl mass fraction 0.01%); -, no growth.

2.2.3 紫云英高共生效率根瘤菌耐干旱检测分析 由表 4 可知，不同省份紫云英高共生效率

根瘤菌在聚乙二醇 6000 质量分数为 0%（CK）与 3%时均能正常生长；随着质量分数的提升，当聚乙二醇 6000 质量分数为 5%时，有 7 株菌能够正常生长，其余 3 株菌能够微量生长；当聚乙二醇 6000 质量分数为 7%时，有 7 株菌能够正常生长，其余 3 株菌不能生长；当聚乙二醇 6000 质量分数为 10%时，所有根瘤菌均不能生长。

表 4 不同聚乙二醇 6000 质量分数下紫云英高共生效率根瘤菌生长状态
Table 4 The growth status of high symbiotic efficiency rhizobia of *Astragalus sinicus* under different PEG6000 mass fractions

菌株编号 Strain number	聚乙二醇 6000 质量分数/% PEG 6000 mass fraction				
	0	3	5	7	10
WYCCWR10750	+	+	+	+	-
WYCCWR10704	+	+	+	+	-
WYCCWR12312	+	+	w+	-	-
WYCCWR12365	+	+	w+	-	-
WYCCWR12508	+	+	+	+	-
WYCCWR12418	+	+	w+	-	-
WYCCWR12656	+	+	+	+	-
WYCCWR12542	+	+	+	+	-
WYCCWR12123	+	+	+	+	-
WYCCWR12091	+	+	+	+	-

注：w+，生长微弱；+，与阳性对照即不添加聚乙二醇 6000 时生长状态相同；-，不生长。
Note: w+, weak growth; +, growth equivalent to the positive control (without PEG 6000); -, no growth.

综上所述，河南省的 WYCCWR 10750 和 WYCCWR 10704、四川省的 WYCCWR 12312 和 WYCCWR 12365、广西壮族自治区的 WYCCWR 12508 和 WYCCWR 12418、湖北省的 WYCCWR 12656、WYCCWR 12542 及湖南省 WYCCWR 12123 和 WYCCWR 12091，均表现出较好的抗逆特性，这 10 株菌株最终分别被确定为五个省份的紫云英优势根瘤菌。

2.3 紫云英优势根瘤菌的分类鉴定

2.3.1 紫云英优势根瘤菌 16S rRNA 基因系统发育分析 对代表菌株进行 16S rRNA 的 PCR 扩增，并将 PCR 产物送往生工生物（上海）股份有限公司测序，得到的测序结果经 MEGA7.0 分析，所用模型为 K2+G+I，构建系统发育树（如图 7 所示）。由系统发育树可知，优势根瘤菌被聚为 2 个大分支，Group1 中的供试菌株 WYCCWR12091 与模式菌株 *Mesorhizobium*

qingshengii CCBAU 33460^T 聚在一起, 相似性为 100%; Group2 中的 9 株供试菌株与 *Mesorhizobium huakuii* CCBAU 2609^T 聚在一起, 相似性为 99.9%~100%, 10 株优势根瘤菌被鉴定属于 *Mesorhizobium*。

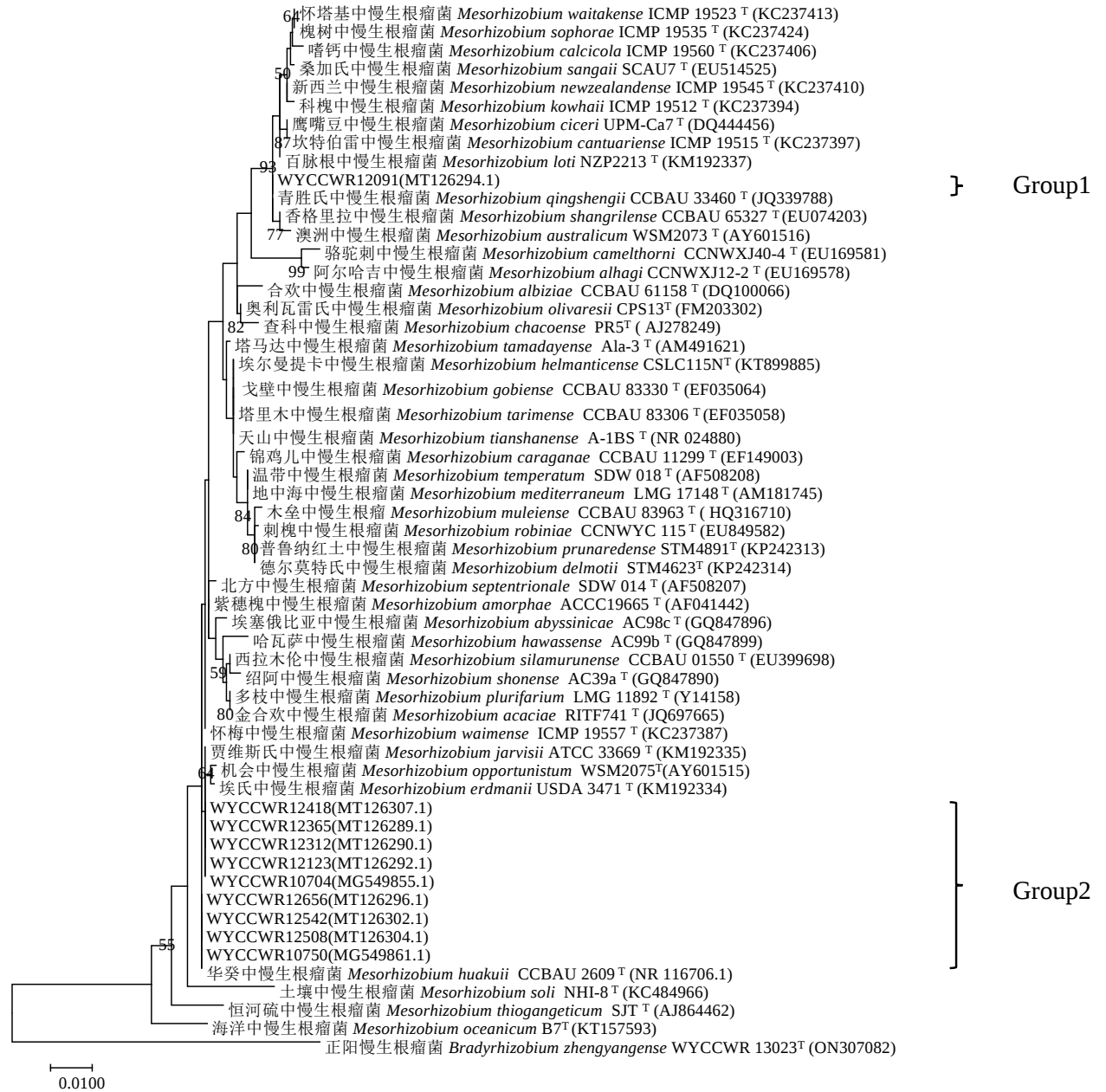


图 7 紫云英优势根瘤菌 16S rRNA 系统发育树

Fig. 7 Phylogenetic analysis of 16S rRNA of dominant rhizobia

2.3.2 紫云英优势根瘤菌持家基因的系统发育分析 持家基因 *atpD* 系统发育分析所用模型为 T92+G+I, 结果如图 8 所示, 所有优势根瘤菌被分为 3 个 group, 其中, Group1 中的 4 株供试菌株与已知模式菌株 *Mesorhizobium huakuii* USDA 4779^T 聚在一起, 相似性为 99.4%~99.7%; Group2 中的 5 株供试菌株与 *Mesorhizobium jarvisii* ATCC 33669^T 聚在一起, 相似性为 99.1%; 菌株 WYCCWR12091 与 *Mesorhizobium qingshengii* CCBAU 33460^T 聚在一起, 相似性为 97.8%。而持家基因 *glnII* 的系统发育分析所用模型为 T92+G+I, 结果如图 9 所示, 所有优势根瘤菌被分为 3 组, 与 *Mesorhizobium huakuii* USDA 4779^T、*Mesorhizobium jarvisii* ATCC 33669^T 和 *Mesorhizobium qingshengii* CCBAU 33460^T 的相似性分别为 98.9%~100%、100%和 100%, 与 *atpD* 的系统发育分析结果一致。

结合 2 个持家基因系统发育分析结果, 可以将优势根瘤菌株 WYCCWR12091 鉴定为种群 *Mesorhizobium qingshengii*; 将菌株 WYCCWR12656、WYCCWR12508、WYCCWR10750 和 WYCCWR12542 鉴定属于种群 *Mesorhizobium huakuii*; 而菌株 WYCCWR12312、WYCCWR124189、WYCCWR12365、WYCCWR12123 和 WYCCWR10704 则最终被鉴定为种群 *Mesorhizobium jarvisii*。

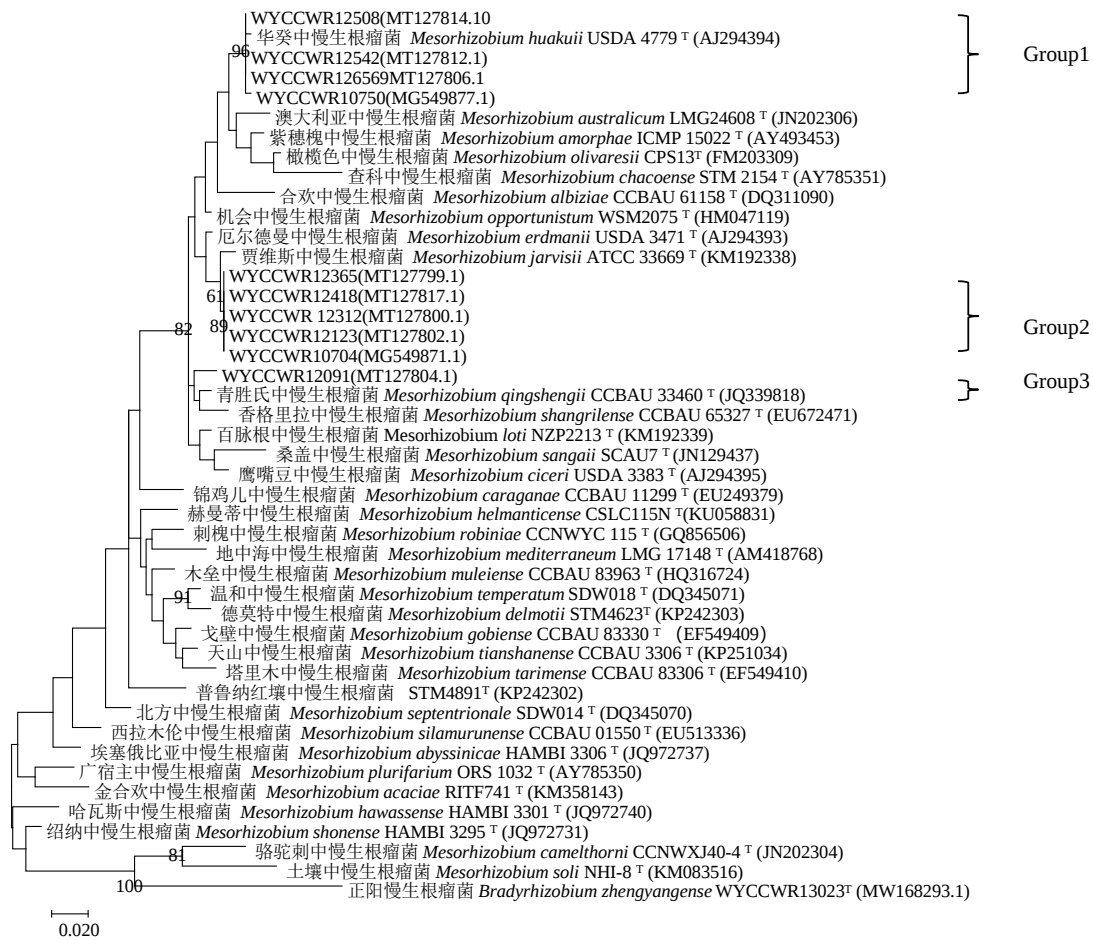


图 8 紫云英优势根瘤菌持家基因 *atpD* 系统发育树

Fig. 8 Phylogenetic analysis of the housekeeping gene *atpD* in dominant rhizobia

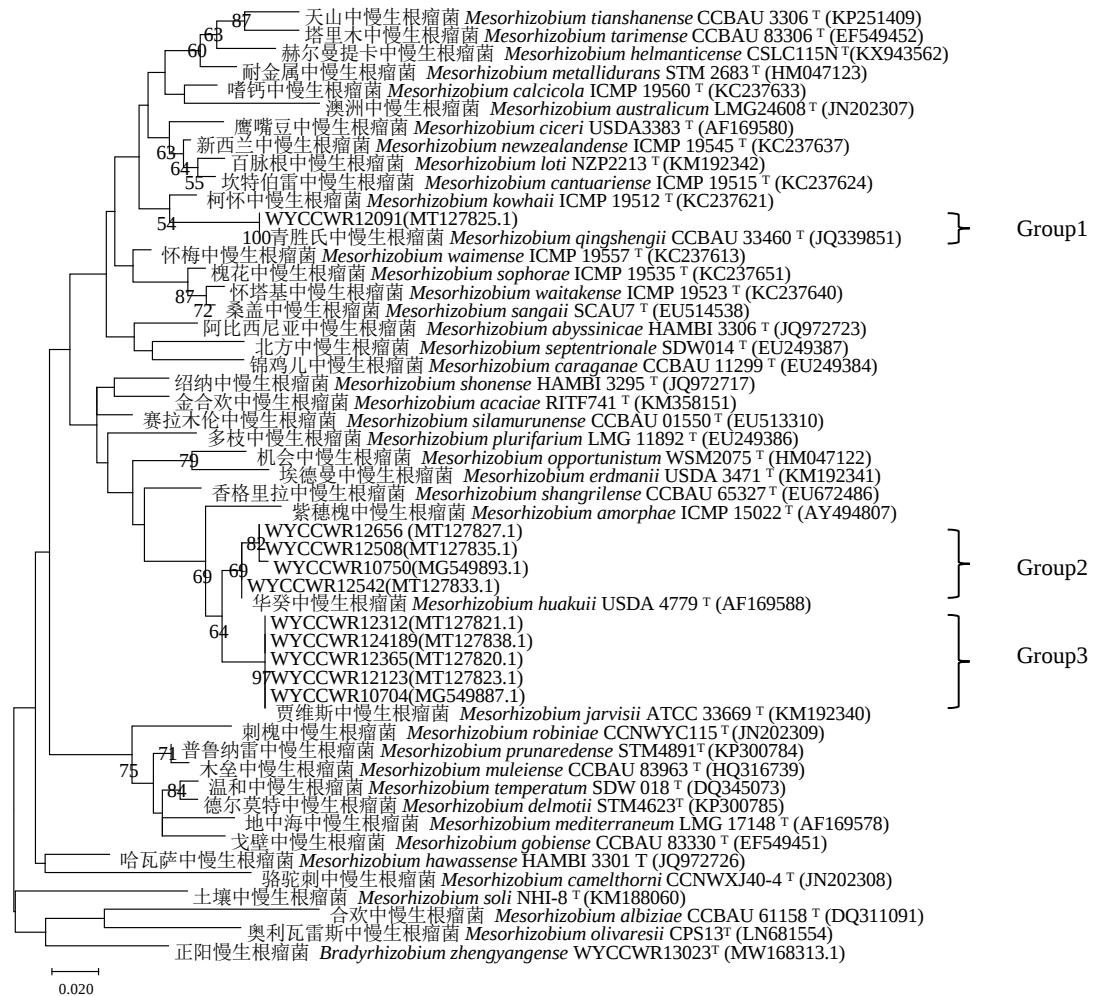


图9 优势根瘤菌持家基因 *glnII* 系统发育树

Fig.9 Phylogenetic analysis of the housekeeping gene *glnII* in dominant rhizobia

2.3.3 紫云英优势根瘤菌结瘤基因 *nodC* 系统发育分析 如图 10 所示,不同省份紫云英优势根瘤菌的 *nodC* 基因被划分为 1 个基因型, 与 *Mesorhizobium qingshengii* CCBau 33460^T 的相似度为 99.7%~100%, 其原始宿主为紫云英, 表明紫云英优势根瘤菌具有严格的宿主专一性。

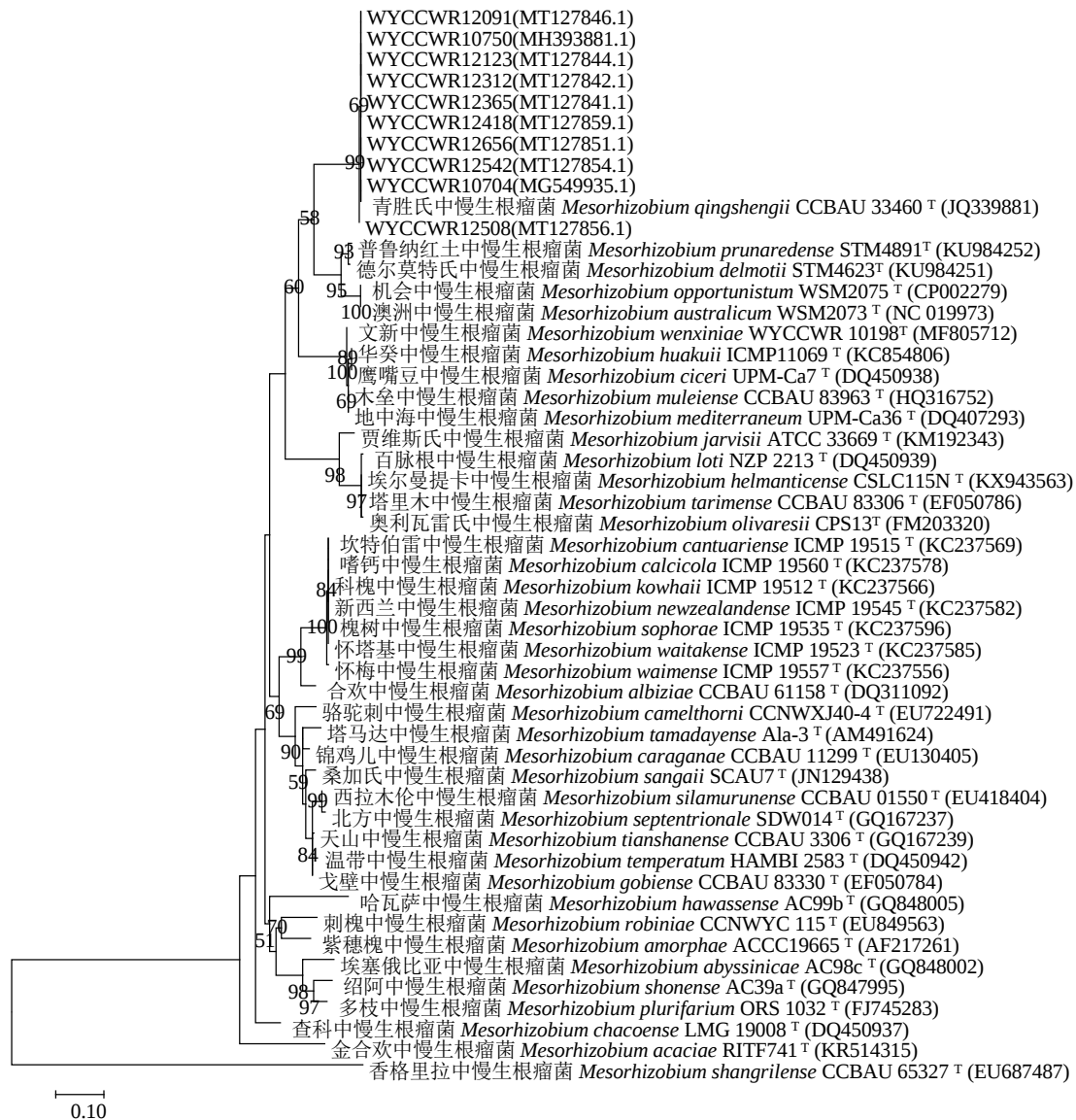


图 10 紫云英优势根瘤菌结瘤基因 *nodC* 系统发育分析

Fig.10 Phylogenetic analysis of the nodulation gene *nodC* in dominant rhizobia

3 结论与讨论

本研究对分离自河南省、四川省、广西壮族自治区、湖北省和湖南省 5 个省份的 37 株紫云英根瘤菌进行共生效率检测, 结果表明, 所选 10 株优势菌接种后的紫云英植株干质量显著高于不接种对照组, 而干质量反映了植物生物量的积累与资源分配效率, 高干质量表明更多碳源和氮素被高效利用, 既支持根瘤菌定殖, 又通过固氮作用增强植物生长, 是衡量共生系统综合效益的最关键指标^[38]。同时, 接种根瘤菌后紫云英叶片叶绿素含量得到显著提升, 而以往的研究表明叶绿素含量提升可以进一步提高光合作用效率, 从而为根瘤菌固氮活动提供充足的光合产物, 驱动固氮酶活性, 同时固氮产生的氮素反馈促进叶绿素合成, 形成碳-氮代谢的正反馈循环^[39-40], 结果与干质量一致。结瘤数直接体现宿主与菌株的相容性, 适度结瘤可优化固氮能力与碳源消耗的平衡^[41]。叶绿素含量、干质量和结瘤数通过碳-氮代谢循环、资源分配及宿主-菌株互作共同决定根瘤菌共生系统的效率^[42]。特别是曾经尝试对相关指标进行加权评分分析^[31], 结果能够较好反映菌株的共生效率整体水平, 因此本研究根据共生效率相关指标加权评分结果, 并结合单一指标的比较结果, 经过综合分析, 最终筛选出分离自不同省份共生效率较高的紫云英根瘤菌 10 株, 分别为河南省的 WYCCWR 10750 和 WYCCWR 10704、四川省的 WYCCWR 12312 和 WYCCWR 12365、广西壮族自治区的 WYCCWR 12508 和 WYCCWR 12418、湖北省的 WYCCWR 12656 和 WYCCWR 12542 和湖南省的 WYCCWR 12123 和 WYCCWR 12091。对筛选出的不同省份紫云英高共生效果根瘤菌株进行抗逆性检测, 结果发现, 这 10 株根瘤菌均表现出较好的耐盐、耐酸碱和耐干旱等抗逆特性, 这些抗逆性特性对于根瘤菌在特定条件下的生存与共生固氮至关重要^[43-45]。由此, 最终选择这 10 株菌为 5 个省份的紫云英优势根瘤菌。

对优势根瘤菌株进行 16S rRNA 基因鉴定得知, 优势根瘤菌均属于中慢生根瘤菌属 (*Mesorhizobium*), 进一步进行持家基因 *atpD* 和 *glnII* 的系统发育分析将 10 株优势根瘤菌鉴定为 *Mesorhizobium huakuii*、*Mesorhizobium qingshengii* 和 *Mesorhizobium jarvisii* 这 3 个种群, 其中 *M. jarvisii* 为主导类群, 这与之前的研究结果保持一致^[15], 继 2013 年江西省首次报道能与紫云英共生结瘤的根瘤菌 *M. qingshengii* 后, 本研究再次发现 *M. qingshengii* 在湖南地区的分布, 这一发现表明该种群具有一定的区域适应性^[19]。进行 *nodC* 结瘤基因分析发现 10 株菌均与已知的紫云英根瘤菌种群聚在一起, 表现出严格的宿主专一性。

根瘤菌与植物共生固氮受当地环境的影响, 如环境温度、土壤营养、土壤湿度以及酸碱度等, 因此研究适合特定环境的根瘤菌菌剂十分重要^[42]。选择固氮能力高且抗逆性好的根瘤菌制备菌剂, 通过接种能提高宿主豆科植物的共生固氮能力, 减少氮肥的投入。土壤肥力是决定土壤生产力的主要因素, 是众多土壤理化及生物属性综合作用的表征^[43]。后期研究

也可以选用 pH 值、有机质、全氮、碱解氮、全磷、速效磷、全钾和速效钾计算的土壤综合肥力指数(IFI)^[44]，来综合表征配施菌剂对土壤肥力的影响特征。

尽管通过本研究筛选出了分离自不同省份的优势紫云英根瘤菌菌株，但是能否制备成根瘤菌剂，并因地制宜应用，还需要对相关菌株在特定地区土壤中的适应性和共生固氮能力等进行大田试验验证，并且要研究相关菌株的发酵特性，确保具备产业化的特征^[45]。

参考文献 References

- [1] 李秀芬, 滕应, 骆永明, 等. 多氯联苯污染土壤的紫云英-根瘤菌联合修复效应[J]. 土壤, 2013, 45(1): 105-110.
- LI X F, TENG Y, LUO Y M, et al. Combined remediation effects of *Astragalus sinicus* L. inoculated with *Rhizobium huakuii* on PCBs contaminated soils[J]. Soils, 2013, 45(1): 105-110.
- [2] 龙安华, 倪才英, 曹永琳, 等. 土壤重金属污染植物修复的紫云英调控研究[J]. 土壤, 2007, 39(4): 545-550.
- LONG A H, NI C Y, CAO Y L, et al. Effect of *Astragalus sinicus* L. on phytoremediation of heavy-metals-polluted soil[J]. Soils, 2007, 39(4): 545-550.
- [3] 燕永亮, 田长富, 杨建国, 等. 人工高效生物固氮体系创建及其农业应用[J]. 生命科学, 2021, 33(12): 1532-1543.
- YAN Y L, TIAN C F, YANG J G, et al. Establishment of artificial efficiency biological nitrogen fixation system and its agricultural application[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2021, 33(12): 1532-1543.
- [4] 张秋磊, 林敏, 平淑珍. 生物固氮及在可持续农业中的应用[J]. 生物技术通报, 2008, 24(2): 1-4.
- ZHANG Q L, LIN M, PING S Z. Biological nitrogen fixation and its application in sustainable agriculture[J]. Biotechnology Bulletin, 2008, 24(2): 1-4.
- [5] 宋延静, 马兰, 李萌, 等. 黄河三角洲芦苇根际固氮微生物的空间分布特征[J]. 河南农业大学学报, 2020, 54(6): 1026-1032.
- SONG Y J, MA L, LI M, et al. Spatial distribution of nitrogen-fixing microbes in rhizosphere soil of *Phragmites australis* in Yellow River Delta[J]. Journal of Henan Agricultural University, 2020, 54(6): 1026-1032.
- [6] 常单娜, 马晓彤, 周国朋, 等. 不同根瘤菌与紫云英主栽品种的共生匹配性[J]. 草业学报, 2022, 31(12): 171-180.
- CHANG D N, MA X T, ZHOU G P, et al. Symbiotic compatibility of different rhizobia strains with important Chinese milk vetch (*Astragalus sinicus*) cultivars[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2022, 31(12): 171-180.
- [7] VOISIN A S, GUÉGUEN J, HUYGHE C, et al. Legumes for feed, food, biomaterials and bioenergy in Europe: A review[J]. Agronomy for Sustainable Development, 2014, 34(2): 361-380.
- [8] 张磊, 杜锦涛, 范倩玉, 等. 紫云英生物固氮对土壤肥力及根瘤菌的响应特征[J]. 草业学报, 2025, 34(5): 51-63.
- ZHANG L, DU J T, FAN Q Y, et al. Response of biological nitrogen fixation by milk vetch to soil fertility and *Rhizobium* inoculation[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2025, 34(5): 51-63.
- [9] 陈静蕊, 秦文婧, 王少先, 等. 化肥减量配合紫云英还田对双季稻产量及氮肥利用率的影响[J]. 水土保持学报, 2019, 33(6): 280-287.
- CHEN J R, QIN W J, WANG S X, et al. Effects of reduced chemical fertilizer combined with Chinese milk vetch (*Astragalus sinicus* L.) incorporation on rice yield and nitrogen use efficiency in double-rice cropping system[J]. Journal of Soil and Water Conservation, 2019, 33(6): 280-287.
- [10] 马艳芹, 钱晨晨, 邓丽萍, 等. 紫云英配施氮肥对双季稻产量、干物质量及氮素吸收利用的影响[J]. 核

农学报, 2017, 31(12): 2399-2407.

MA Y Q, QIAN C C, DENG L P, et al. Effects of combining Chinese milk vetch with nitrogen fertilizer on grain and dry matter yield, nitrogen absorption and utilization of double-cropping rice[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2017, 31(12): 2399-2407.

[11] 王建红, 曹凯, 张贤. 紫云英翻压量对单季晚稻养分吸收和产量的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2014, 20(1): 156-163.

WANG J H, CAO K, ZHANG X. Effects of incorporation amounts of Chinese milk vetch on nutrient uptake and yield of single cropping late rice[J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizer, 2014, 20(1): 156-163.

[12] GALLOWAY J N, TOWNSEND A R, ERISMAN J W, et al. Transformation of the nitrogen cycle: Recent trends, questions, and potential solutions[J]. Science, 2008, 320(5878): 889-892.

[13] YANG L, NIE J, XU C X, et al. Biological nitrogen fixation of Chinese Milk Vetch (*Astragalus sinicus* L.) as affected by exogenous carbon and nitrogen input[J]. Symbiosis, 2021, 85(1): 69-77.

[14] CAI S Y, PITTELKOW C M, ZHAO X, et al. Winter legume-rice rotations can reduce nitrogen pollution and carbon footprint while maintaining net ecosystem economic benefits[J]. Journal of Cleaner Production, 2018, 195: 289-300.

[15] 张俊杰, 彭姗姗, 尚益民, 等. 湖南益阳地区紫云英根瘤菌的遗传多样性研究[J]. 河南农业大学学报, 2020, 54(3): 480-487.

ZHANG J J, PENG S S, SHANG Y M, et al. Study on genetic diversity of rhizobia associated with *Astragalus sinicus* L. from Yiyang, Hunan Province[J]. Journal of Henan Agricultural University, 2020, 54(3): 480-487.

[16] ZHANG X X, TURNER S L, GUO X W, et al. The common nodulation genes of *Astragalus sinicus* rhizobia are conserved despite chromosomal diversity[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(7): 2988-2995.

[17] NUSWANTARA S, FUJIE M, YAMADA T, et al. Phylogenetic position of *Mesorhizobium huakuii* subsp. *rengei*, a Symbiont of *Astragalus sinicus* cv. Japan[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 1999, 87(1): 49-55.

[18] CHEN W X, LI G S, QI Y L, et al. *Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1991, 41(2): 275-280.

[19] ZHENG W T, LI Y, WANG R, et al. *Mesorhizobium qingshengii* sp. nov., isolated from effective nodules of *Astragalus sinicus*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2013, 63(Pt 6): 2002-2007.

[20] ZHANG J J, SHANG Y M, WANG E T, et al. *Mesorhizobium jarvisii* sv. *astragali* as predominant microsymbiont for *Astragalus sinicus* L. in acidic soils, Xinyang, China[J]. Plant and Soil, 2018, 433(1): 201-212.

[21] 杜如宇, 范莹, 栗滢超, 等. 河南省农村劳动力转移、农地规模经营与农业生态环境耦合协调性研究[J]. 河南农业大学学报, 2019, 53(3): 480-487.

DU R Y, FAN Y, LI Y C, et al. Study on the coupling and coordination of rural labor transfer, farmland scale management and agricultural eco-environment in Henan province[J]. Journal of Henan Agricultural University, 2019, 53(3): 480-487.

[22] 张俊杰, 彭姗姗, 余辉, 等. 正阳县花生根瘤菌遗传多样性及其共生特性研究[J]. 河南农业大学学报, 2021, 55(3): 495-503.

ZHANG J J, PENG S S, YU H, et al. Genetic diversity and symbiosis characteristics of peanut *Rhizobium* in Zhengyang County[J]. Journal of Henan Agricultural University, 2021, 55(3): 495-503.

[23] 郑春风, 刘春增, 李本银, 等. 喷施矮壮素和多效唑对紫云英生长发育及结实性状的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2020, 26(10): 1917-1922.

ZHENG C F, LIU C Z, LI B Y, et al. Effects of chlormequat chloride and paclobutrazol on growth and

development and seed setting characteristics of Chinese milk vetch (*Astragalus sinicus* L.)[J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizers, 2020, 26(10): 1917-1922.

[24] 钟少杰, 林诚, 李文霞, 等. 不同紫云英品种与根瘤菌匹配对结瘤固氮的影响[J]. 福建农业学报, 2014, 29(7): 691-697.

ZHONG S J, LIN C, LI W X, et al. Effect of matching *Astragalus sinicus* L. with *Rhizobium* on nodule formation and nitrogen fixation[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2014, 29(7): 691-697.

[25] 汪榕. 酸性土壤改良剂在水稻—油菜轮作上的应用效果[D]. 武汉: 华中农业大学, 2014.

WANG R. Rong. Improvement of amendment to acidic soil and the application in rice-rapeseed rotation system[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2014.

[26] 李萍, 滕长才, 丁宝军, 等. 青海干旱地区蚕豆根瘤菌耐旱性研究[J]. 江西农业大学学报, 2021, 43(6): 1241-1249.

LI P, TENG C C, DING B J, et al. A study on drought tolerance of rhizobia strains of faba bean (*Vicia faba* L.) isolated from drought regions in Qinghai Plateau[J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2021, 43(6): 1241-1249.

[27] 王敏, 秦杰, 杨万明, 等. 晋大 88 高匹配性强耐盐根瘤菌筛选[J]. 大豆科学, 2021, 40(3): 385-393.

WANG M, QIN J, YANG W M, et al. Screening of salt-tolerant and well symbiotic matching soybean rhizobia strains for jinda 88[J]. Soybean Science, 2021, 40(3): 385-393.

[28] 尚益民. 我国豆科绿肥共生根瘤菌多样性分析与优势菌种资源挖掘[D]. 郑州: 郑州轻工业大学, 2020. SHANG Y M. The diversity analysis of legume green manure symbiotic rhizobia and mining of dominant species resources in China[D]. Zhengzhou: Zhengzhou University of Light Industry, 2020.

[29] ZHANG J J, SHANG Y M, PENG S S, et al. *Rhizobium sophorae*, *Rhizobium laguerreae*, and two novel *Rhizobium* genospecies associated with *Vicia sativa* L. in Northwest China[J]. Plant and Soil, 2019, 442(1): 113-126.

[30] 沈媛媛. 不同水分胁迫对核桃叶片 SPAD 及光合特性的影响研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2017.

SHEN Y Y. SPAD and photosynthetic characteristics of *Juglans regia* L leaves under different water stress[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2017.

[31] 冯煜锋. 云南豌豆主产区优势共生根瘤菌资源发掘[D]. 郑州: 郑州轻工业大学, 2024.

FENG Y F. Exploration of superior symbiotic rhizobia resources in the major pea-producing region of Yunnan[D]. Zhengzhou: Zhengzhou University of Light Industry, 2024.

[32] 韩梅, 马晓彤, 曹卫东, 等. 青海蚕豆根瘤菌的系统发育与多样性研究[J]. 青海大学学报(自然科学版), 2015, 33(5): 5-9.

HAN M, MA X T, CAO W D, et al. Phylogeny and diversity of broad bean *Rhizobium* in Qinghai[J]. Journal of Qinghai University (Natural Science Edition), 2015, 33(5): 5-9.

[33] 李乔仙, 张斌, 戴燕燕, 等. 南苜蓿根瘤菌生理生化特性研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(22): 10365-10369.

LI Q X, ZHANG B, DAI Y Y, et al. Study on physiological and biochemical characters of rhizobia isolated from nodules of *Medicago polymorpha*[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2009, 37(22): 10365-10369.

[34] 王京琪. 云南省菜豆优势共生根瘤菌的发掘[D]. 郑州: 郑州轻工业大学, 2024.

WANG J Q. Exploration of dominant symbiotic rhizobia for common bean in Yunnan Province[D]. Zhengzhou: Zhengzhou University of Light Industry, 2024.

[35] 王金生, 王君, 吴俊江, 等. 基于 GGE-biplot 的大豆根瘤菌抗逆性资源筛选[J]. 大豆科学, 2017, 36(6): 894-899.

WANG J S, WANG J, WU J J, et al. Screening the resistance resources of *Rhizobium japonicum* based on GGE-biplot[J]. Soybean Science, 2017, 36(6): 894-899.

- [36] 张俊杰. 新疆鹰嘴豆根瘤菌的生物学特征研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2013.
- ZHANG J J. Biological characterization of the chickpea rhizobia from Xinjiang[D]. Beijing: China Agricultural University, 2013.
- [37] 甘兴国, 周学军. 紫云英接种根瘤菌剂的应用效果研究[J]. 安徽农学通报, 2020, 26(10): 105-106.
- GAN X G, ZHOU X J. [Study on the application effect of Chinese milk vetch inoculated with rhizobia](#)[J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2020, 26(10): 105-106.
- [38] POITOUT A, MARTINIÈRE A, KUCHARCZYK B, et al. Local signalling pathways regulate the *Arabidopsis* root developmental response to *Mesorhizobium loti* inoculation[J]. Journal of Experimental Botany, 2017, 68(5): 1199-1211.
- [39] UDVARDI M, POOLE P S. Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses[J]. Annual Review of Plant Biology, 2013, 64: 781-805.
- [40] SULIEMAN S, TRAN L P. Legume nitrogen fixation in a changing environment[M]. Cham: Springer International Publishing, 2015.
- [41] OLDROYD G E D, DOWNIE J A. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes[J]. Annual Review of Plant Biology, 2008, 59: 519-546.
- [42] 杨瑾瑾, 王宏伟, 刘朋飞, 等. 紫花苜蓿(*Medicago sativa*)高效根瘤菌菌剂研究[J]. 安徽农业科学, 2020, 48(12): 42-45.
- YANG J J, WANG H W, LIU P F, et al. Study on high efficient *Rhizobium* agent for *Medicago sativa*[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2020, 48(12): 42-45.
- [43] 李敏, 梁伟健, 付时丰, 等. 花生缓释专用肥配施根瘤菌菌剂的肥效和增产增效作用研究[J]. 花生学报, 2022, 51(2): 32-38.
- LI M, LIANG W J, FU S F, et al. Effects of slow-release peanut fertilizer combined with *Rhizobium* agent on efficiency of fertilizer and yield of peanut[J]. Journal of Peanut Science, 2022, 51(2): 32-38.
- [44] MOSUPIEMANG M, BAREELENG K, CHIDUWA M S, et al. Stimulation of soybean (*Glycine max*) growth and yield using *Bradyrhizobium* inoculants in the semi-arid environment of Botswana[J]. Legume Research - an International Journal, 2021: 44(10): 1186-1191.
- [45] 张俊杰, 王楠, 李硕, 等. 一种花生高效复合微生物菌剂及其应用[J]. 花生学报, 2022, 51(2): 86-92.
- ZHANG J J, WANG N, LI S, et al. An efficient composite microbial agent and its application on peanut[J]. Journal of Peanut Science, 2022, 51(2): 86-92.