

一株田菁根瘤菌新种的分离与鉴定

陈妍^{1,2#}, 王富强^{2,3#*}, 龙永³, 范鲁燕³, 任舒萌⁴, 宋显伟², 曹晓风^{2,3*}

- 1 海南大学 热带农林学院, 海南 海口
- 2 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京
- 3 海南省种业实验室, 海南 三亚
- 4 河南大学三亚研究院, 海南 三亚

陈妍, 王富强, 龙永, 范鲁燕, 任舒萌, 宋显伟, 曹晓风. 一株田菁根瘤菌新种的分离与鉴定[J]. 微生物学报, 2025, 65(8): 3301-3316.

CHEN Yan, WANG Fuqiang, LONG Yong, FAN Luyan, REN Shumeng, SONG Xianwei, CAO Xiaofeng. Isolation and identification of a new species of *Rhizobium* from *Sesbania cannabina*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(8): 3301-3316.

摘要:【目的】基于耐逆、高产的普通田菁材料筛选具有促生作用的根瘤菌, 为盐碱地田菁高效栽培提供根瘤菌资源。【方法】采用传统培养方法, 从‘中科菁1号’田菁新品系中分离内生根瘤菌。基于16S rRNA基因和全基因组测序鉴定菌株, 评价菌株的耐逆促生特性, 并验证其对原宿主及其他田菁材料的促生效果。【结果】从‘中科菁1号’田菁根瘤样品中分离出的根瘤菌, 经16S rRNA基因鉴定及系统发育分析确定为根瘤菌属。基于全基因组序列的ANI和dDDH值认定其为根瘤菌属的一个新种, 并将其命名为 *Rhizobium sesbaniae* ZK1^T。根瘤菌 ZK1^T 能够耐受2.0%的NaCl浓度, pH耐受范围为4.0-10.0, 并且具有溶解有机磷的能力。通过盆栽试验检测了根瘤菌 ZK1^T 对不同田菁材料促生结瘤能力的影响, 结果发现 ZK1^T 能够促进不同田菁材料的生长和结瘤, 且其与宿主田菁品系的共生关系更为高效。【结论】分离得到的田菁根瘤菌新种 ZK1^T 在提高田菁生长和结瘤方面具有显著作用, 能够耐受较严重的酸、碱和盐胁迫, 对实现边际土地植物-微生物高效改良具有重要的理论意义和实践价值。

关键词: 田菁; 根瘤菌; 分离鉴定; 耐逆性; 边际土地

资助项目: 海南省科技人才创新项目(KJRC2023D11); 海南省种业实验室自主部署项目(B23E10002); 中国科学院战略性先导科技专项(XDA28030000)

This work was supported by the Innovational Fund for Scientific and Technological Personnel of Hainan Province (KJRC2023D11), the Hainan Seed Industry Laboratory Project (B23E10002), and the Strategic Priority Research Program of Chinese Academy of Sciences (XDA28030000).

#These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors. E-mail: WANG Fuqiang, wangfuqiang1991@126.com; CAO Xiaofeng, xfcao@genetics.ac.cn

Received: 2025-01-21; Accepted: 2025-03-11; Published online: 2025-03-25

Isolation and identification of a new species of *Rhizobium* from *Sesbania cannabina*

CHEN Yan^{1,2#}, WANG Fuqiang^{2,3#*}, LONG Yong³, FAN Luyan³, REN Shumeng⁴, SONG Xianwei², CAO Xiaofeng^{2,3*}

1 School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan, China

2 Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China

3 Hainan Seed Industry Laboratory, Sanya, Hainan, China

4 Sanya Institute of Henan University, Sanya, Hainan, China

Abstract: [Objective] To screening stress-tolerant and high-yielding rhizobia with growth-promoting effects on *Sesbania cannabina* and provide rhizobia resources for efficient cultivation of *S. cannabina* in saline-alkali soil. [Methods] The culture method was used to isolate endophytic rhizobia from *S. cannabina* ‘Zhongkejing 1’. Based on 16S rRNA gene and whole genome sequencing, the strains were identified, and their stress tolerance and plant growth-promoting characteristics were evaluated. Their growth-promoting effects on the original host variety and other materials of *S. cannabina* were verified. [Results] The rhizobia isolated from the root nodule samples of *S. cannabina* ‘Zhongkejing 1’ were identified as a species belonging to *Rhizobium*. Based on the ANI and dDDH values of the whole genome sequence, the strain was identified as a new species of *Rhizobium* and named *Rhizobium sesbaniae* ZK1^T. *R. sesbaniae* ZK1^T can tolerate a NaCl concentration of 2.0% and survive within the range of pH 4.0–10.0, and it had the ability to dissolve organophosphorus compounds. Pot experiments were conducted to evaluate the effects of *R. sesbaniae* ZK1^T on the growth and nodulation of different materials of *S. cannabina*. The results revealed that *R. sesbaniae* ZK1^T promoted the growth and nodulation of these materials, while it had a more efficient symbiotic relationship with the host variety. [Conclusion] The isolated new species *R. sesbaniae* ZK1^T plays a role in promoting the growth and nodulation of *S. cannabina* and can tolerate severe acid, alkali, and salt stress. The findings have important theoretical significance and a practical value for the efficient improvement of plant-microorganism interactions in marginal land.

Keywords: *Sesbania cannabina*; rhizobia; isolation and identification; stress tolerance; marginal land

土壤盐碱化是制约粮食安全生产和提高土地利用效率的主要因素。目前,全球约有 10 亿 hm² 盐碱地^[1-2]。2019 年第 3 次全国国土调查数据显示,耕地面积与 2009 年相比减少 0.08 hm²,仅剩 1.28 亿 hm² ([https://www.gov.cn/xinwen/2021-](https://www.gov.cn/xinwen/2021-08/26/content_5633490.htm)

[08/26/content_5633490.htm](https://www.gov.cn/xinwen/2021-08/26/content_5633490.htm))。针对我国人口众多、耕地资源有限的实际国情,盐碱地的治理开发和利用是科学保护耕地红线的重要组成部分。因此,开发和利用盐碱地对于缓解耕地紧张以及保障我国粮食安全具有重要意义^[3-4]。

田菁 [*Sesbania cannabina* (Retz.) Poir.] 是豆科田菁属一年生绿肥作物, 具有耐盐、耐碱、耐酸、耐涝、高产以及适应土壤贫瘠的能力^[5-8], 是改良盐碱地的先锋植物^[9-10]。田菁植株养分丰富, 地下根系生物量大, 能够显著改善土壤结构和肥力^[11-12]。国内外已有多项研究报道了田菁在改善土壤肥力和降低盐分方面的优异表现^[13-15]。

1913年, Haber-Bosch 发明了在高温、高压条件下催化 N_2 转化为 NH_3 的化学方法来生产氮肥。然而, 化肥的过量使用带来了一系列问题, 例如化肥利用率低, 仅达 35% 或更低, 导致环境污染、土壤板结和肥力下降, 并给能源供给带来巨大压力^[16]。根瘤菌是一类生活在土壤中的革兰氏阴性杆状细菌。在合适条件下, 根瘤菌能够侵染豆科植物并与其共生结瘤固氮, 将空气中游离态的氮转化为植物可以利用的化合态氮。生物固氮可满足豆科植物 60%–70% 的氮素需求。与工业固氮相比, 生物固氮不仅固氮量巨大, 而且廉价、无污染, 能够减少化肥用量并节约能源, 是未来农业生产节本增效的有效手段, 也是现代化农业生产的重要氮源之一^[17]。

田菁耐逆性强, Luo 等^[5]研究发现, 田菁可在 pH 9.0–9.5 的东北苏打盐碱地和 0.4%–0.6% 的滨海盐碱地较好生长, 并形成固氮根瘤, 翻压还田后消障提质作用明显。由于其突出的耐逆特性和潜在的高蛋白饲草价值, 近年来作为开发边际土地的重要工具备受关注。接种根瘤菌能够促进田菁生长, 增强其改良盐碱地的效果, 田菁-根瘤菌共生体系在盐碱地改良中具有广阔的应用前景^[18]。然而, 与优异种质资源高效匹配的根瘤菌株资源匮乏。

本研究从团队培育的耐逆性强、适应性好的‘中科菁 1 号’田菁新品系中筛选出能够与其高效共生结瘤的根瘤菌, 并评估其耐逆性及促进植物生长的能力, 以期为提高盐碱地上田菁种植效率的技术发展提供科学依据和支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试田菁

本团队自主选育的耐盐碱高产田菁新品系‘中科菁 1 号’具有耐盐碱、耐涝、固氮、高产等特性, 在 pH 值 9.0 以上的东北苏打盐碱地上示范应用效果显著。前期发现其在盆栽和田间无接菌处理条件下均能自发少量结瘤, 因此作为分离内生根瘤菌的供试材料。

1.1.2 主要培养基

酵母甘露醇琼脂(yeast mannitol agar, YMA) 固体培养基(g/L): 甘露醇 10.0, 酵母粉 0.4, K_2HPO_4 0.5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, NaCl 0.1, 琼脂 15.0, pH 7.0。121 °C 灭菌 15 min。酵母甘露醇肉汤(yeast extract mannitol broth, YEM)用于根瘤菌的液体培养。

蒙金娜有机磷培养基(g/L): 葡萄糖 10.0, $(NH_4)_2SO_4$ 0.5, NaCl 0.3, KCl 0.3, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.03, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.03, 蛋黄卵磷脂 0.2, $CaCO_3$ 5.0, 酵母膏 0.4, 琼脂 18.0, pH 7.0–7.2, 121 °C 灭菌 15 min。

解钾培养基(g/L): 蔗糖 5.0, $FeCl_3$ 0.005, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5, Na_2HPO_4 2.0, $CaCO_3$ 0.1, 300 目钾长石粉 1.0 (去离子水清洗 5 次), 琼脂 18.0, pH 调节为 7.0–7.5, 121 °C 灭菌 15 min。

固氮菌培养基(nitrogen free medium, NFM) (g/L): 苹果酸 5.0, KOH 4.5, K_2HPO_4 0.5, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.02, NaCl 0.1, $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.002, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, 生物素 1.0×10^{-5} , 琼脂 20.0, pH 7.0, 121 °C 灭菌 15 min。

1.1.3 主要试剂和仪器

Hoagland's modified 营养液购自北京酷来搏科技有限公司; PCR 扩增所用试剂和引物 27F、1492R 均购自生工生物工程(上海)股份有限公司; *2×Easy Taq PCR SuperMix* 购自北京全式金生物技术有限公司。

PCR 仪器购自赛默飞世尔科技(中国)有限公

司; 灭菌锅购自天美(中国)科学仪器有限公司; 相机购自佳能(中国)有限公司。

1.2 田菁种子内生根瘤菌的分离培养

用 75% 乙醇将‘中科菁 1 号’的种子消毒 2 遍后, 种在灭菌的蛭石中, 用灭菌去离子水浇灌。取生长 55 d 的植株, 用无菌水冲洗干净, 取裸露的淡粉色或粉红色饱满根瘤进行分离纯化培养。在超净工作台中用 75% 乙醇处理根瘤 30 s, 2.5% NaClO 处理 10 min, 再用无菌水冲洗 3–4 次, 晾干表面水分, 用灭菌过的研磨棒将根瘤研磨至匀浆, 加入 1 mL 无菌水。梯度稀释 10–100 倍后涂布于 YMA 培养基平板, 置于 28 °C 恒温培养箱中倒置培养 2–4 d。经多次纯化后得到乳白色圆形或椭圆形、边缘齐整、表面湿润且有光泽的单克隆菌落, 采用甘油法保藏并鉴定。

1.3 根瘤菌 16S rRNA 基因鉴定及系统发育分析

刮取菌落放入 100 μ L TE 缓冲液中, 混匀后 100 °C 水浴 10 min, 然后立即置于 -20 °C 冰浴 30 min。12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液作为 PCR 反应模板。使用 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取菌株 DNA。采用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') 对 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: 2 \times Easy Taq MasterMix 25 μ L, DNA 模板 1 μ L, 正、反向引物 (0.2 μ mol/L) 各 1 μ L, 双蒸水 22 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 90 s, 30 次循环; 72 °C 10 min。将 PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 然后送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

根据 EzBioCloud 数据库的比对结果, 选择相似菌株并下载对应的 16S rRNA 基因序列, 利用 MEGA 11.0 结合邻接法 (neighbor-joining

method, NJ) 构建系统发育树^[19-20], 并设置自展值 (bootstrap) 为 1 000。本研究选用 *Bradyrhizobium japonicum* LMG 6138^T 作为外群。

1.4 根瘤菌全基因组测序分析

将提取的菌株 DNA 送至武汉希望组生物科技有限公司的 PacBio 平台进行测序。采用 fastp v0.23.1 对原始 reads 进行质量控制, 去除低质量数据, 获得 clean reads^[21]。采用 Canu 软件对质控后的数据进行组装^[22]。同时, 将质控后的 fastq 格式 reads 文件用 minimap2 软件比对到组装好的基因组上, 用 samtools 软件的 depth 功能统计各个位点的测序深度^[23-24]。采用 Prokka 对组装好的基因组进行基因注释和预测^[25]。分别使用 tRNAscan-SE 和 RNAmmer 对 tRNA 和 rRNA 基因进行预测^[26-27]。

1.5 数字 DNA-DNA 杂交值、平均核苷酸一致性和全基因组系统发育分析

从 NCBI 数据库和 JGI 数据库下载相似菌株的全基因组序列。由于在数据库中未检索到 *Rhizobium yanglingense* SH 22623^T、*Rhizobium sullae* IS123^T 和 *Rhizobium acidisoli* FH13^T 的全基因组序列, 因此选择这些物种的非模式菌株的全基因组序列作为替代。采用 FastME 软件构建全基因组系统发育树^[28]; 使用 JSpeciesWS 软件计算 ZK1^T 和参考菌株之间的平均核苷酸一致性 (average nucleotide identity, ANI)^[29]; 用 GGDC (genome to genome distance calculator) 计算数字 DNA-DNA 杂交值 (digital DNA-DNA hybridization, dDDH)^[30], 从而进一步确定菌株 ZK1^T 的分类地位。

1.6 根瘤菌耐盐性、耐酸碱性评价

将生长良好的 ZK1^T 菌株按照体积分数为 5% 的接种量分别接种到 NaCl 浓度梯度为 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、3.0%、4.0% 的 YEM 培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 24 h, 并测定其 OD_{600} 值。同时采用相同接种量和盐浓度梯度

接种于 YMA 培养基中, 37 °C 培养 24 h, 并拍照。

将纯化的 ZK1^T 菌株按照体积分数为 5% 的接种量分别接种到使用 1 mol/L 氢氧化钠或 1 mol/L 浓盐酸(超净工作台中抽滤后使用)调节 pH 为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、10.0、11.0 的 YEM 培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 24 h, 并测定其 OD_{600} 值。同时采用相同接种量和 pH 梯度(将 YEM 液体培养基和琼脂分别高温高压灭菌, 灭菌后的 YEM 液体培养基和琼脂混匀, 使用抽滤后的 1 mol/L 氢氧化钠或 1 mol/L 浓盐酸调节至相应 pH)接种于 YMA 固体培养基中, 37 °C 培养 24 h, 并拍照。

1.7 ZK1^T 接种促生效果

将根瘤菌划线于 YMA 培养基上, 28 °C 培养 2–3 d 后, 挑取单克隆于 300 mL 的 YEM 培养基中培养 1 d 至 OD_{600} 值为 1.045 左右时, 14 000 r/min 离心 10 min, 重复 2 次, 倒掉上清液体, 用无菌水冲洗 2 遍, 再用无菌水重悬菌块, 将菌液 OD_{600} 值调为 0.1。

将‘中科菁 1 号’(ZK1)、‘中科菁 2 号’(ZK2)、‘中科菁 6 号’(ZK6)、‘中科菁 10 号’(ZK10, 毛萼田菁)、‘鲁菁 5 号’(LJ5)的种子预先用浓硫酸处理 8–10 min 后, 无菌水洗 3 次, 再用氯气(100 mL 次氯酸钠+5 mL 浓盐酸)过夜灭菌消毒 12–15 h。取出种子, 在超净台吹风 30–60 min。将灭菌后的蛭石装入灭菌托盘盒子中, 浇入灭菌的 Hoagland’s modified 液体营养液, 待蛭石充分吸收后进行播种。播种 10 d 后接种分离得到的根瘤菌, 观察表型。根瘤菌接种 24 d 后统计结瘤数目。

1.8 数据分析

采用 Excel 2021 和 SPSS 19.0 软件进行数据处理和方差分析, GraphPad Prism 9.0 软件作图, MEGA 11.0 构建系统发育树。FastME 软件构建全基因组系统发育树, JSpeciesWS 软件计算平均核苷酸一致性。

2 结果与分析

2.1 根瘤菌的形态鉴定

通过平板划线法将分离得到的根瘤菌划线到 YMA 固体培养基上, 经反复分离、纯化后观察菌落形态, 呈现圆形或椭圆形、表面湿润且有光泽、乳白色、边缘齐整、稍有凸起。分离菌株的生长表型与根瘤菌典型的个体形态和菌落特征相符合。经过多轮筛选, 在‘中科菁 1 号’品系中分离得到一个符合根瘤菌形态特征的菌落, 初步命名为 ZK1^T(图 1)。

2.2 根瘤菌 16S rRNA 基因鉴定及系统发育分析

通过测序得到长度为 1 385 bp 的 16S rRNA 基因序列。将序列上传至 EzBioCloud 数据库进行比对, 发现菌株 ZK1^T 与最相似的菌株分别为 *Rhizobium mesosinicum* CCBAU 25010^T、*Rhizobium alarii* GBV016^T 和 *Rhizobium viscosum* LMG 16473^T, 相似度分别为 99.26%、99.06% 和 98.41% (图 2)。因此, 可判定 ZK1^T 隶属于根瘤菌属。将 ZK1^T 的 16S rRNA 基因序列上传至 NCBI 数据库, 获得 GenBank 登录号 PQ803796。基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树表明, 菌株 ZK1^T 与 *R. mesosinicum*



图1 YMA培养基上的单克隆菌落特征

Figure 1 Phenotypic characters of rhizobial single colony on YMA medium.

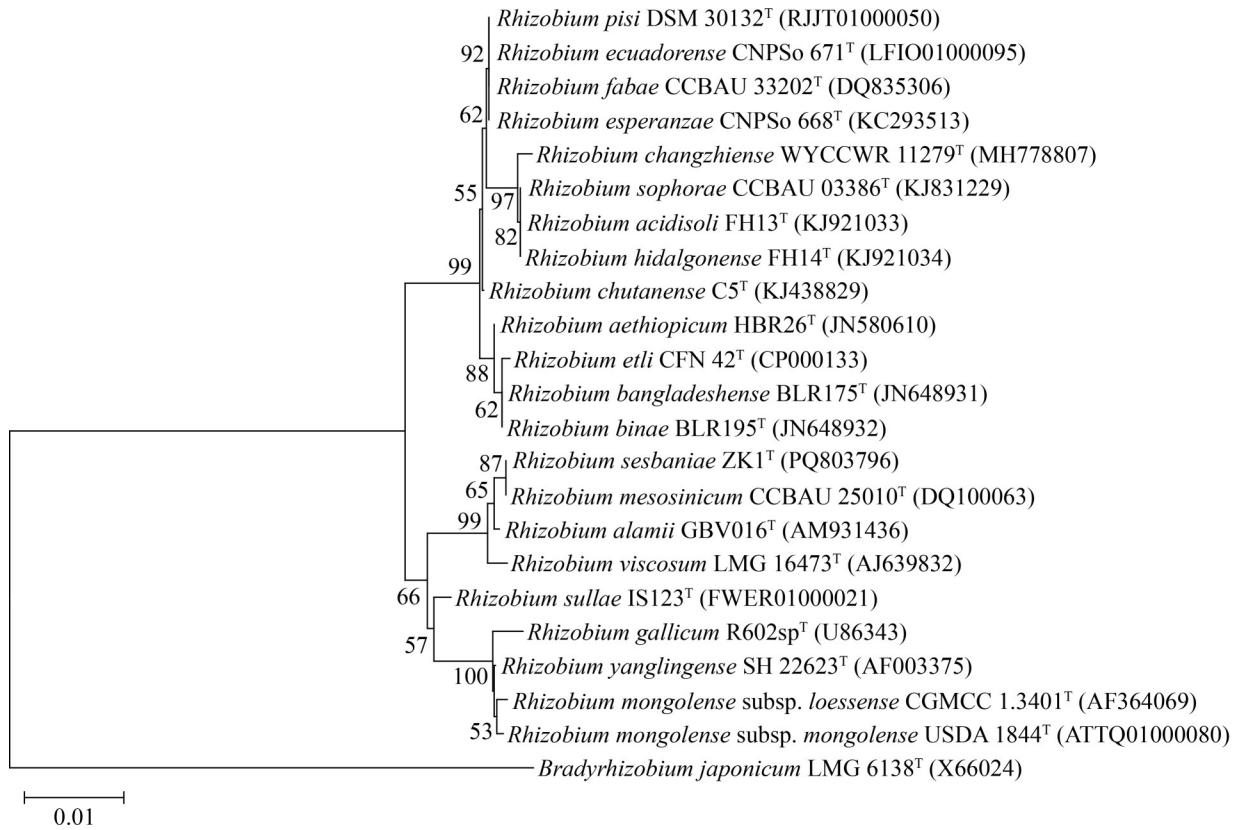


图2 基于16S rRNA基因序列构建的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree of ZK1^T based on 16S rRNA gene sequence.

CCBAU 25010^T, *R. alamii* GBV016^T和 *R. viscosum* LMG 16473^T 聚类到同一个进化分支, 并具有较高的自展值, 这与 16S rRNA 基因序列相似性比对结果一致(图 2)。

2.3 ZK1^T 菌株全基因组特征

菌株 ZK1^T 经过 PacBio 平台测序后, 共产出原始数据 1 460 606 857 bp, 质控后的数据量为 1 460 606 857 bp。对质控后的数据进行基因组组装、校正和优化后, 得到大小为 7 145 565 bp 的基因组序列, 整个基因组的平均 G+C 含量为 60.04% (表 1)。

基因组由 3 个 contig 组成, 包含 1 条环状染色体和 2 条环状质粒(图 3)。染色体和质粒的大小分别为 4 499 453、2 244 590 和 401 522 bp。染色体、质粒 1 和质粒 2 的测序深度分别为

表1 菌株ZK1^T基因组特征

Table 1 Genomic characteristics of strain ZK1^T

Characteristics	Value
Genome size (bp)	7 145 565
G+C content (%)	60.04
Chromosome	1
Plasmid	2
tRNA	54
rRNA	9
Coding sequence (CDS)	6 929

201.77×、204.65×和 206.09×, G+C 含量分别为 60.25%、59.77%、59.08%。基因组预测结果表明, 菌株 ZK1^T 共有 6 929 个编码序列(coding sequences, CDS), 包括 54 个 tRNA 和 9 个 rRNA。将菌株 ZK1^T 的全基因组序列上传至 NCBI 数据库, 获得 BioProject 登录号 PRJNA1202577。

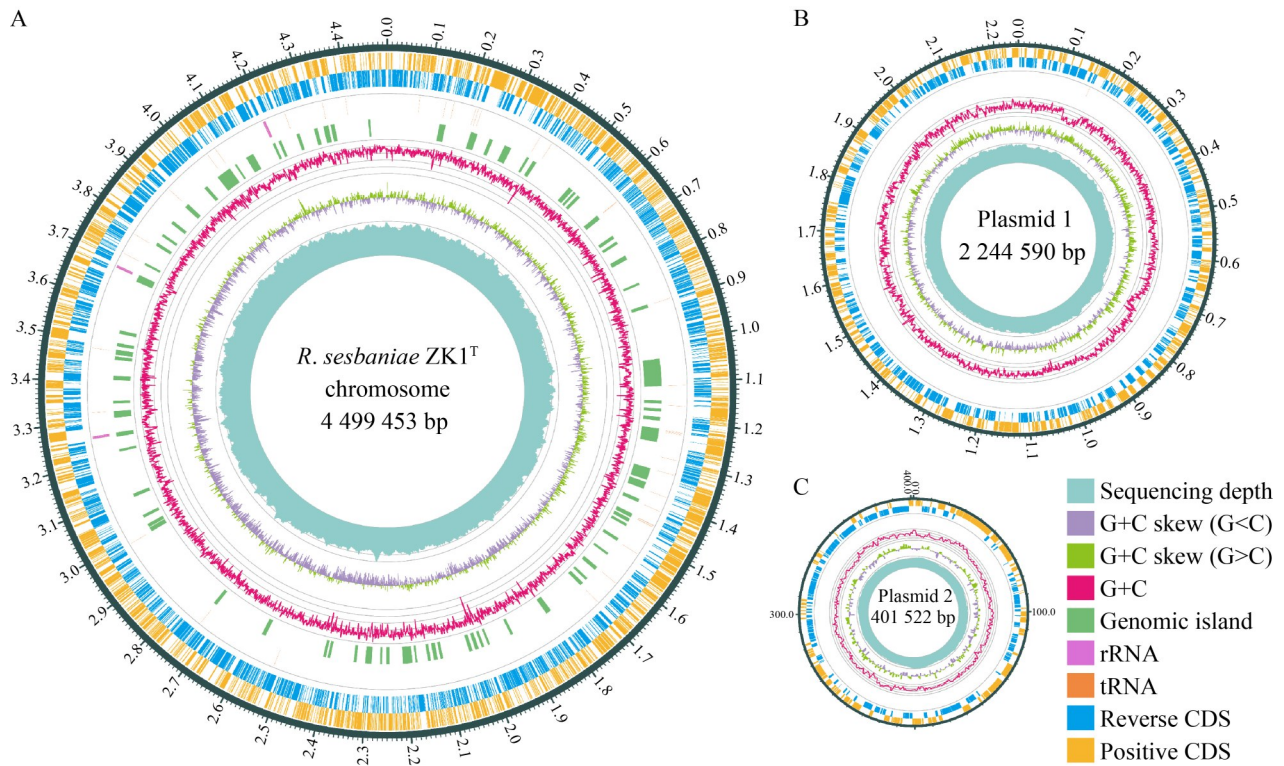


图3 菌株ZK1^T基因组和质粒圈图。A: 基因组圈图; B: 质粒1圈图; C: 质粒2圈图。

Figure 3 Genome and plasmid circular diagram of ZK1^T. A: Genome circular diagram; B: Plasmid 1 circular diagram; C: Plasmid 2 circular diagram.

根据全基因组序列注释结果, 菌株 ZK1^T 存在 *nifH* 基因和常规的结瘤基因 *nodABC*。从 NCBI 数据库获取相似菌株的 *nodABC* 和 *nifH* 基因序列。与此同时, 增加了分离自田菁的中慢生根瘤菌菌株 AC99b^T、中华根瘤菌菌株 ORS609^T 和新根瘤菌菌株 DSM 21817^T 的 *nodABC* 和 *nifH* 共生基因序列进行进一步的比较分析。将供试菌株的共生基因与参比菌株进行多序列比对, 并利用最小进化法构建系统发育树(图 4、图 5)。

基于共生基因序列 *nodB* 和 *nodC* 构建的系统发育树结果表明, 菌株 ZK1^T 仅与分离自田菁的中华根瘤菌菌株 ORS609^T 聚类到同一个进化分支。然而, 在基于 *nodA* 和 *nifH* 基因构建的系统发育树中, 菌株 ZK1^T 与分离自田菁的菌株聚类在一起, 这些菌株分布在不同的属中。相应

地, 分离自菜豆和兵豆的菌株分别聚类到同一个进化分支上, 表明根瘤菌的共生基因与宿主植物具有对应关系, 宿主相同的菌株的共生基因相似度更大(图 4、图 5)。

2.4 ZK1^T 数字 DNA-DNA 杂交值、平均核苷酸一致性和全基因组系统发育分析

在基于全基因组序列构建的系统发育树中, 菌株 ZK1^T 与菌株 GBV016^T、LMG 16473^T、CCBAU 25010^T 形成同一个进化分支(图 6)。这与基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树的拓扑结构一致, 进一步证实了该亲缘关系的稳定性。计算结果表明, 菌株 ZK1^T 与相似菌株的 ANI 和 dDDH 最高值分别为 88.00% 和 38.00% (表 2), 均低于新种鉴定的阈值 95.00%^[31] 和 70.00%^[32]。由此可见, 尽管菌株 ZK1^T 与最相似

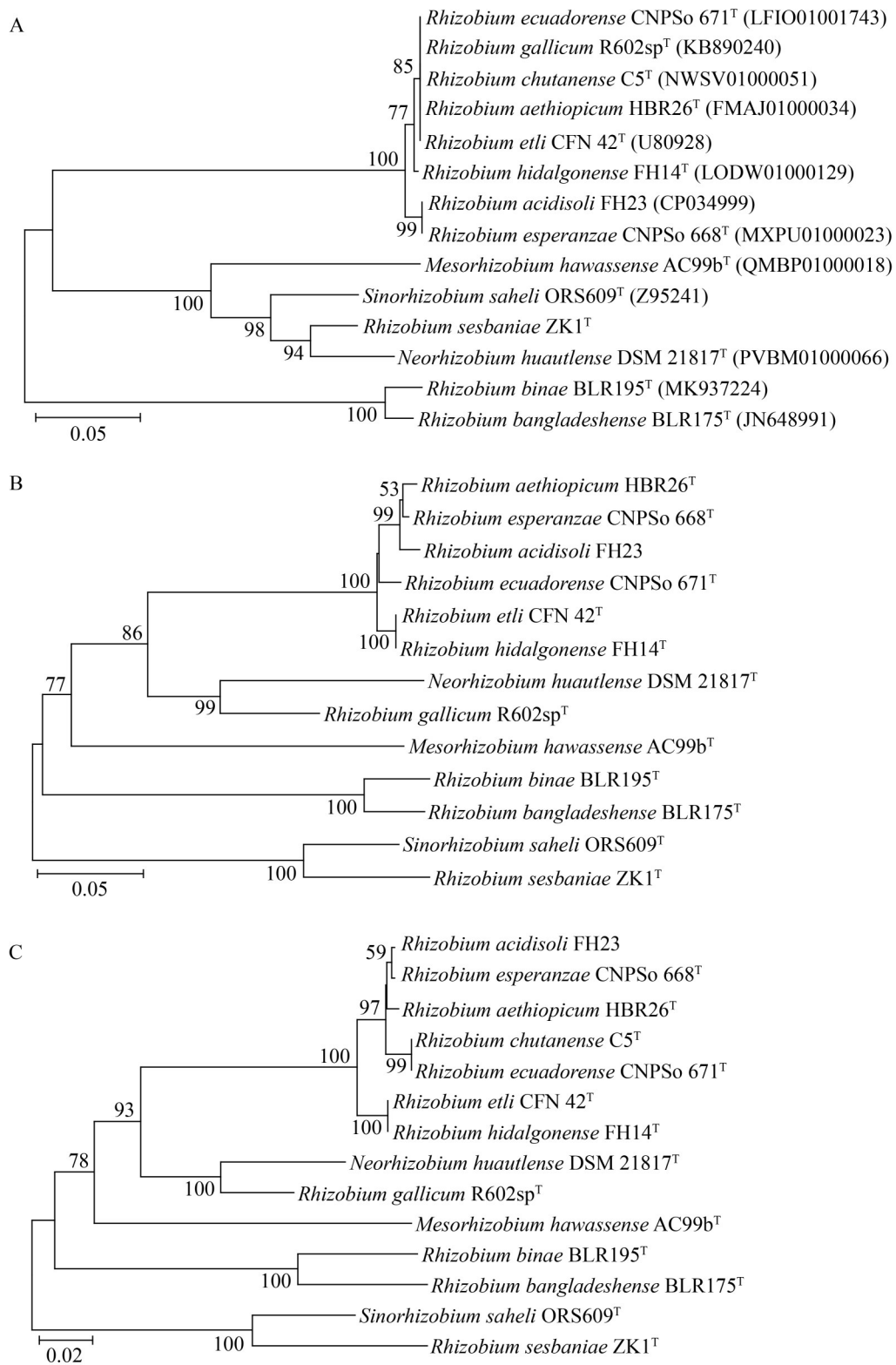


图4 基于*nod*基因序列构建的系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree of ZK1^T based on *nod* gene sequence. A: *nodA* gene; B: *nodB* gene; C: *nodC* gene.

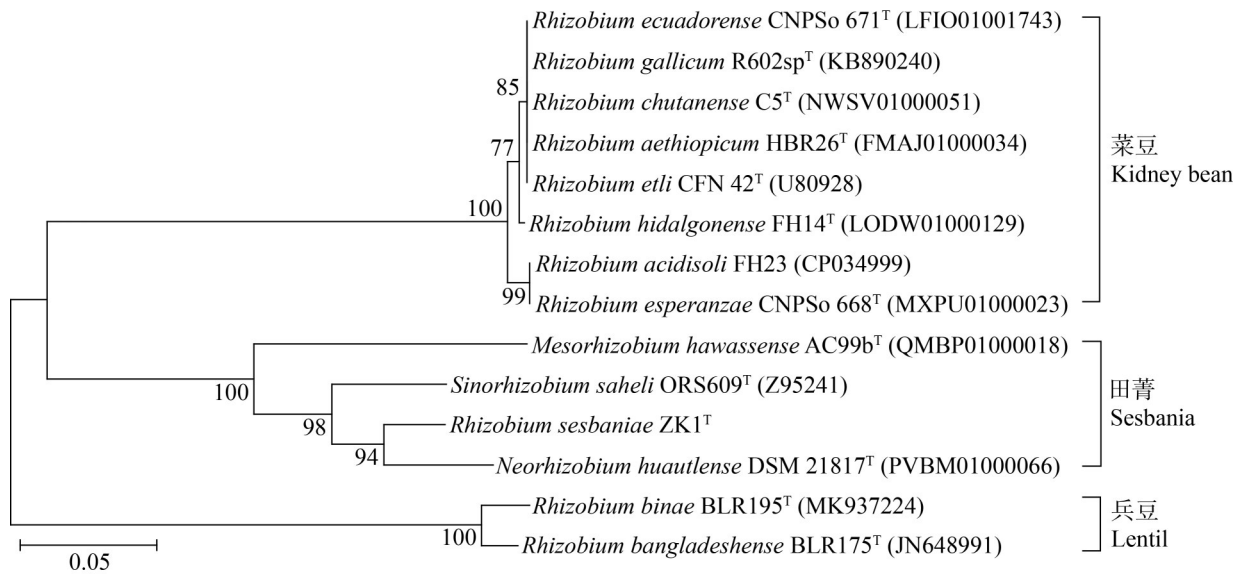


图5 基于*nifH*基因序列构建的系统发育树

Figure 5 Phylogenetic tree of ZK1^T based on *nifH* gene sequence.

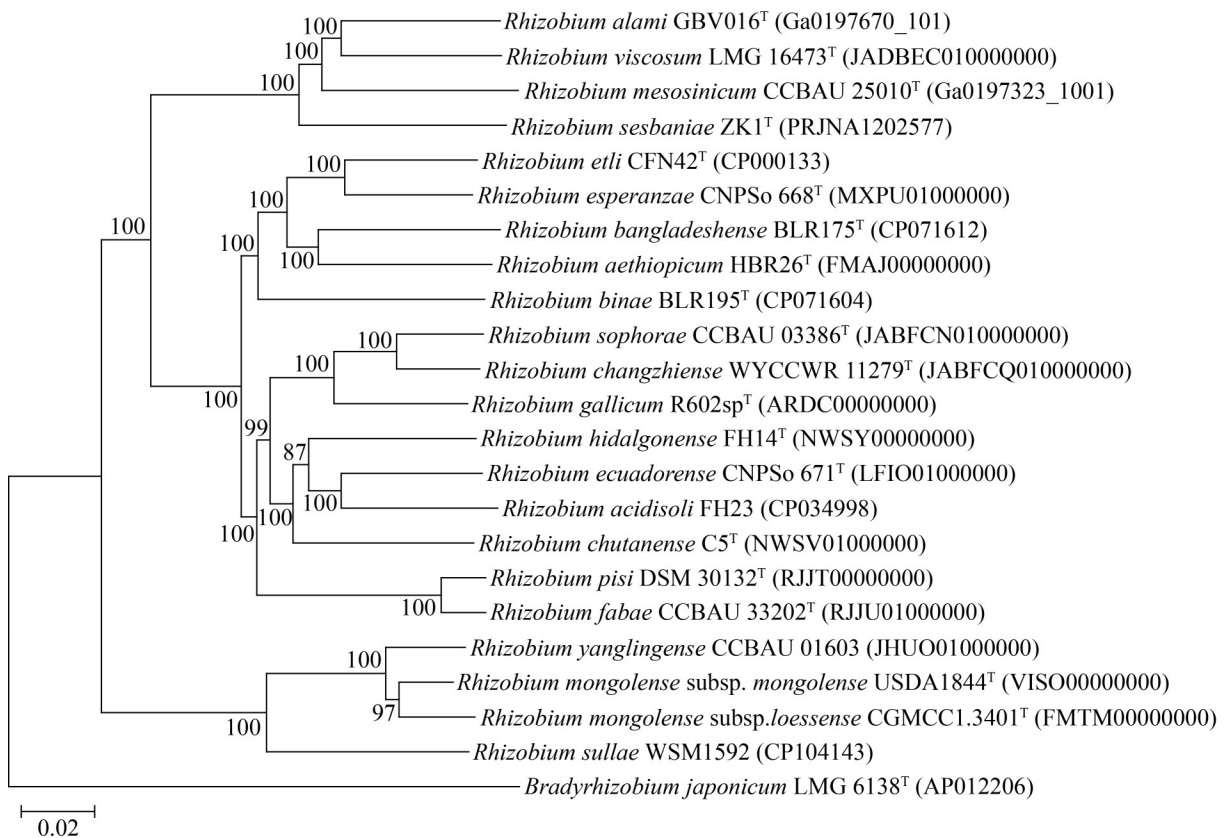


图6 ZK1^T基于全基因组序列构建的系统发育树

Figure 6 Phylogenetic tree of ZK1^T based on whole genome sequence.

表2 菌株ZK1^T与参考菌株的ANI和dDDH值Table 2 The ANI and dDDH values between strain ZK1^T and reference strains

Reference strains	Accession No.	ANI (%)	dDDH (%)
<i>Rhizobium sesbaniae</i> ZK1 ^T	PRJNA1202577	100.00	100.00
<i>Rhizobium alarii</i> GBV016 ^T	Ga0197670_101	87.73	38.00
<i>Rhizobium viscosum</i> LMG 16473 ^T	JADBEC010000000	88.00	37.80
<i>Rhizobium mesosinicum</i> CCBAU 25010 ^T	Ga0197323_1001	87.89	36.40
<i>Rhizobium chutanense</i> C5 ^T	NWSV010000000	80.04	25.30
<i>Rhizobium fabae</i> CCBAU 33202 ^T	RJJU010000000	80.04	25.20
<i>Rhizobium pisi</i> DSM 30132 ^T	RJJT000000000	80.10	25.10
<i>Rhizobium changzhense</i> WYCCWR 11279 ^T	JABFCQ010000000	80.03	25.00
<i>Rhizobium acidisoli</i> FH23	CP034998	79.71	24.90
<i>Rhizobium ecuadorensis</i> CNPSO 671 ^T	LFIO010000000	79.43	24.90
<i>Rhizobium sophorae</i> CCBAU 03386 ^T	JABFCN010000000	79.44	24.80
<i>Rhizobium hidalgonense</i> FH14 ^T	NWSY000000000	79.59	24.80
<i>Rhizobium gallicum</i> R602sp ^T	ARDC000000000	79.68	24.80
<i>Rhizobium binae</i> BLR195 ^T	CP071604	79.63	24.80
<i>Rhizobium etli</i> CFN 42 ^T	CP000133	79.84	24.70
<i>Rhizobium esperanzae</i> CNPSO 668 ^T	MXPU010000000	79.78	24.60
<i>Rhizobium aethiopicum</i> HBR26 ^T	FMAJ000000000	79.68	24.60
<i>Rhizobium bangladeshense</i> BLR175 ^T	CP071612	79.68	24.50
<i>Rhizobium mongolense</i> subsp. <i>mongolense</i> USDA 1844 ^T	VISO000000000	77.61	22.70
<i>Rhizobium yanglingense</i> CCBAU 01603	JHUO010000000	77.63	22.40
<i>Rhizobium sullae</i> WSM1592	CP104143	77.34	22.40
<i>Rhizobium mongolense</i> subsp. <i>loessense</i> CGMCC 1.3401 ^T	FMTM000000000	77.46	22.30

菌株的 16S rRNA 基因序列相似度高于新种鉴定的阈值 98.65%^[33], 但基于全基因组序列的 ANI 和 dDDH 值低于新种鉴定的阈值, 因此可认定其为根瘤菌属的一个新种^[34], 并将其命名为 *Rhizobium sesbaniae* ZK1^T (图 6)。该菌株已于 2024 年 12 月 30 日保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心, 保藏编号为 CGMCC No.33228。

2.5 ZK1^T 抗逆性与促生能力评价

在 YEM 培养基中, 当 NaCl 浓度低于 1.5% 时, 根瘤菌 ZK1^T 的 OD_{600} 值未显示出显著变化, 表明其生长状况基本稳定。然而, 随着 NaCl 浓度增加至 2.0%, ZK1^T 的生长开始明显下降, 而在 4.0% NaCl 浓度下, 菌株几乎无法生长(图 7A)。在不同 pH 条件下, 极端酸碱环境

(pH 2.0、3.0、10.0、11.0)对 ZK1^T 造成显著影响, 使其几乎无法生长。相比之下, 在 pH 5.0 和 pH 6.0 的条件下, ZK1^T 的生长与对照相比未受到明显影响, 但在 pH 4.0 时表现出一定程度的生长抑制(图 7B)。

在 YMA 固体培养基上观察到的结果与液体培养基一致, 即 ZK1^T 能够承受高达 1.5%–2.0% 的 NaCl 浓度, 并且能够在 pH 4.0–10.0 之间生长良好(图 8)。

如图 8 所示, ZK1^T 能够在蒙金娜有机磷培养基(P)中生长, 但不能在固氮培养基(NFM)和解钾培养基(K)中生长。进一步观察发现, 在有机磷培养基上培养 5 d 后, ZK1^T 菌落周围形成了直径约为 0.5 cm 的透明晕圈, 表明其具有溶磷能力。

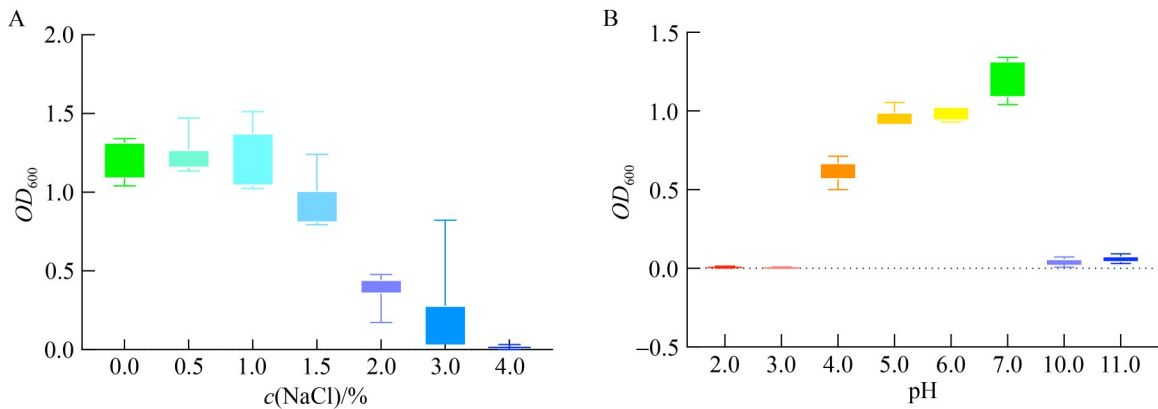


图7 ZK1^T耐逆性评价。A: 不同NaCl浓度; B: 不同pH条件。

Figure 7 Stress tolerance evaluation of ZK1^T. A: Different NaCl concentrations; B: Different pH conditions.

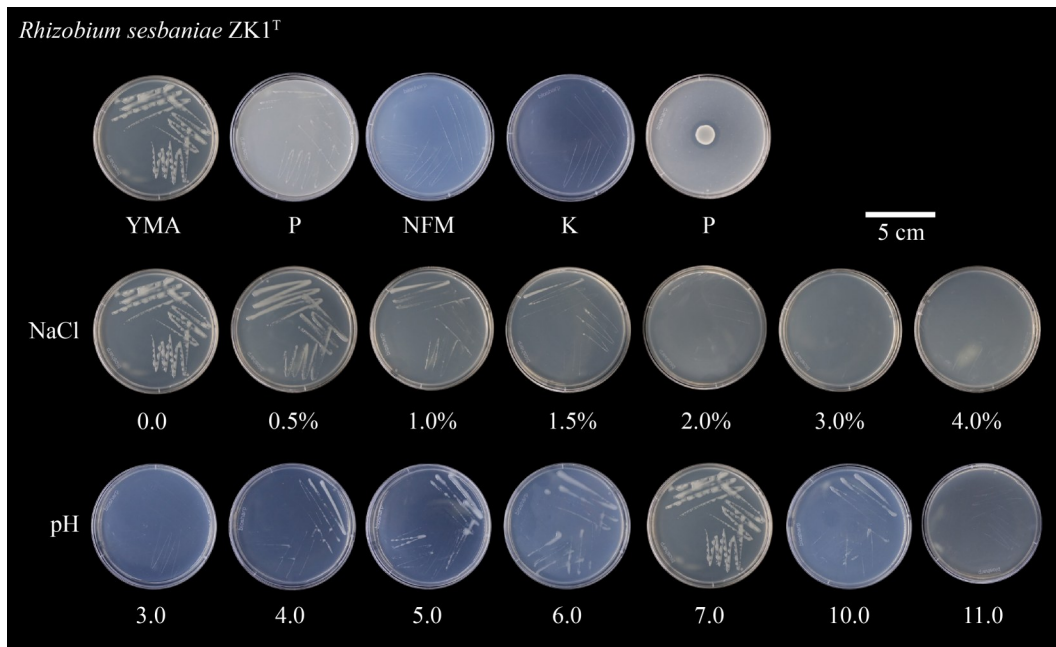


图8 ZK1^T抗逆性评价

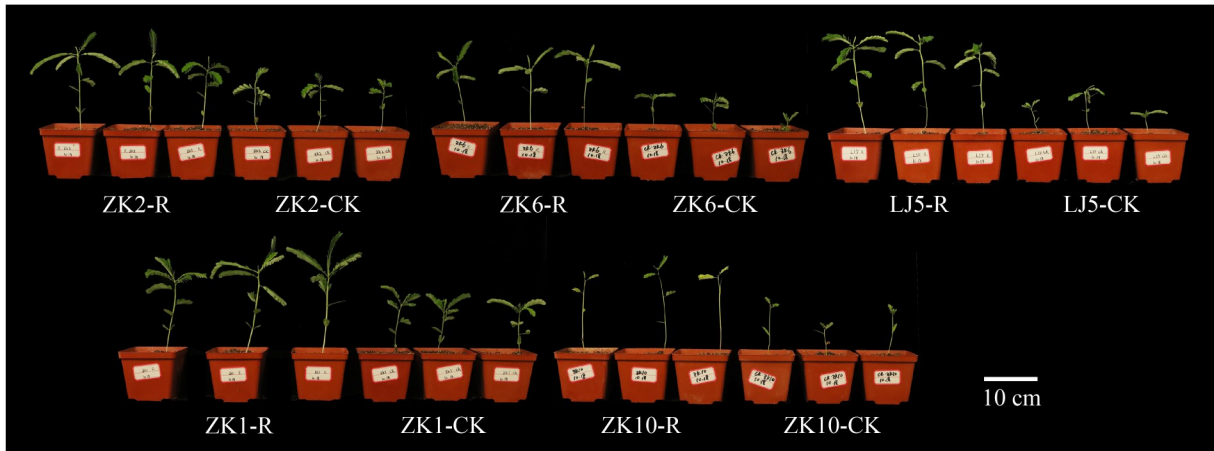
Figure 8 Stress resistance evaluation of ZK1^T.

2.6 ZK1^T接种促生效果

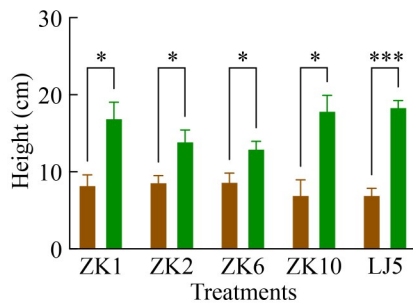
为了探究根瘤菌 ZK1^T 对不同田菁品种的生长及结瘤能力的影响, 本研究在全程无菌条件下进行了盆栽回接实验。结果显示, 接种 24 d 后, ZK1^T 不仅显著促进了‘中科菁 1 号’的生长和结瘤效果, 还显著提高了‘中科菁 2 号’、‘中科菁 6 号’、‘中科菁 10 号’以及‘鲁菁 5 号’的株高和生物量(鲜

重)。然而, 仅‘中科菁 10 号’和‘鲁菁 5 号’的结瘤数量有显著增加(图 9), 对于‘中科菁 2 号’和‘中科菁 6 号’则未观察到显著影响。其中, 对‘中科菁 1 号’的生物量提升和结瘤数量促进效果在所有测试的田菁材料中最为显著(图 9C、9D), 表明尽管 ZK1^T 能够普遍促进不同田菁材料的生长和结瘤, 但其与分离宿主品种之间的共生关系效率更高。

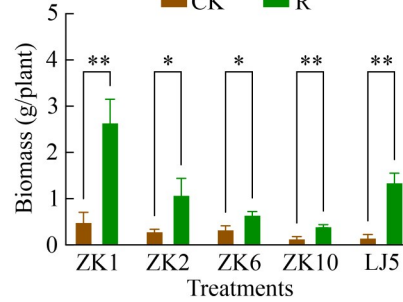
A



B



C



D

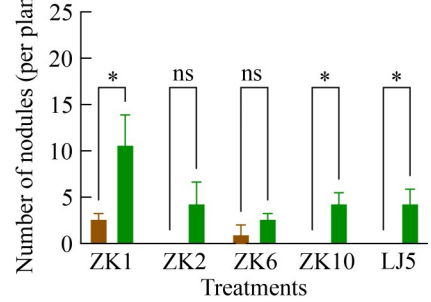


图9 ZK1^T接种对不同田菁材料的促生作用

Figure 9 Growth-promoting effects of ZK1^T inoculation on different sesbania materials. ns: No significant; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

3 讨论

生物固氮(biological nitrogen fixation, BNF)占地球生物圈中大气氮固定总量的60%以上,在全球氮素循环中具有重要潜力^[35]。豆科植物根系与根瘤菌之间的共生关系是最典型且研究最深入的生物固氮模式,这种共生关系在农业生态系统中对提高植物氮素利用效率起着关键作用^[36]。筛选具备高效结瘤和固氮能力的根瘤菌菌株是未来在农业生产中广泛应用的基础。

根瘤菌能够分泌多种化学物质,如植物激素、脂质几丁寡糖、核黄素以及固氮酶产生的氢,这些物质在土壤中具有促进种子萌发、增强植物生长、提升光合效率和粮食产量的潜力^[37]。研究表明,根瘤菌还具有抑制土壤病原

菌的能力,而豆科植物根系释放的酚类化合物不仅有助于控制病原体,还能促进共生微生物的增殖^[38]。相较于植物本身,根瘤表现出更优越的抗氧化性能,这主要归因于其较高的抗氧化酶活性及丰富的抗氧化物质含量^[39]。研究还发现,接种根瘤菌后,植物相关抗性基因表达量有所增加,表明微生物与植物之间的共生关系有助于改善植物的总体健康状况,并增强其对非生物胁迫(包括耐盐能力)的耐受能力^[40]。

尽管田菁具有很大潜力开发为适生边际土地、肥饲兼用的理想优质蛋白饲草,但目前尚缺乏高效的栽培技术,尤其是在培育耐逆优质田菁品种(系)及其配套的高效根瘤菌方面。为此,本研究选择耐逆、优质的‘中科菁1号’材料,利用纯培养的方式从其自结瘤的粉色根瘤

中分离纯化出一株根瘤菌。通过 16S rRNA 基因序列的比较和构建系统发育树, 初步确定了菌株 ZK1^T 的最相似菌种和分类地位。然而, 随着测序技术的发展, 原核生物的分类鉴定逐渐过渡到以全基因组序列为基础, 以 ANI 和 dDDH 值作为判断是否是一个新种的“黄金标准”^[31-32,41-42]。这些先进手段克服了传统上仅依靠表型特征观察以及受到 16S rRNA 测序完整性限制所带来的不足之处。因此, 相较于现有已发布的模式菌株, 虽然本研究中的 ZK1^T 菌株与传统意义上定义的新种存在一定差距(基于 16S rRNA 基因序列相似度), 但综合全基因组水平计算得出的 ANI 值与 dDDH 值结果均强烈支持将 ZK1^T 认定为根瘤菌属内的一个新成员。

田菁作为典型的高耐胁迫豆科植物, 与根瘤菌共生可改善土壤理化性质, 特别是在贫瘠土壤和退化生态系统中^[43]。研究表明, 能够与田菁形成共生关系的根瘤菌类群较为丰富, 主要分布在中华根瘤菌属(*Sinorhizobium*)、根瘤菌属(*Rhizobium*)、新根瘤菌属(*Neorhizobium*)、农杆菌属(*Agrobacterium*)、固氮根瘤菌属(*Azorhizobium*)、中慢生根瘤菌属(*Mesorhizobium*) 和剑菌属(*Ensifer*)^[44-49]。本研究分离到的田菁根瘤菌新种属于根瘤菌属。

在本研究中, 除了用分离的宿主品种‘中科菁 1 号’外, 还选择了其他田菁品种为实验材料对菌株 ZK1^T 进行回接实验, 验证了菌株的促生长和结瘤能力。在接菌处理中, 根瘤数、根瘤鲜重、株高和地上部分鲜重均显著高于未接种处理, 这也为进一步探究菌株的应用前景奠定了一定基础和数据支撑。与其他四倍体田菁不同, ZK10 材料作为二倍体毛萼田菁能够同时形成根瘤和茎瘤, 本研究分离出的 ZK1^T 根瘤菌能够与其正常形成根瘤。‘中科菁 2 号’‘中科菁 6 号’以及‘鲁菁 5 号’采用相同方法分离得到的均为同一株根瘤菌, 与本研究报告的 ZK1^T 不同。‘中科菁 1 号’的耐逆性优异是否与内生根瘤菌 ZK1^T 作用相关, 需要后续进一步探索其调控

机制。

在当前农业和生态研究中, 根瘤菌-豆科植物改良系统已成功建立并广泛应用。该系统通过种植豆科植物并接种根瘤菌, 有效减少了盐碱地土壤中的含盐量, 促进了污染物的分解, 显著改善了土壤结构与肥力。Rejili 等^[50]的研究指出, 6 种野生豆科植物与其根瘤菌形成的共生体系在突尼斯半干旱地区对盐碱地的改良具有显著效果。Yanni 等^[51]的研究则表明, 土著耐盐根瘤菌能显著提高菜豆(*Phaseolus vulgaris* L.) 的耐盐碱和抗干旱胁迫能力。国内有关豆科植物-根瘤菌共生体系耐盐性的研究已有报道, 如紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)-根瘤菌^[52]、箭筈豌豆(*Vicia sativa* L.)-根瘤菌^[53]等。鉴于根瘤菌-豆科植物共生体系在农艺、经济和生态上的深远影响, 该体系特别适合用于有机质低、氮素缺乏的边际土地改良。因此, 建立田菁-根瘤菌共生体系对改良边际土地的意义重大。此外, 有研究报告, 根瘤菌对豆科植物耐盐性的影响在物种间存在较大差异^[54-55], 还需要进一步深入研究这种共生关系, 以更好地理解其对豆科植物耐逆性的具体影响机制。

4 结论

本研究从‘中科菁 1 号’田菁新品系根瘤内分离到一株田菁根瘤菌, 编号为 ZK1^T, 经鉴定后确认其为一个新种, 命名为田菁根瘤菌(*Rhizobium sesbaniae*)。ZK1^T 能够耐受 2.0% 的 NaCl 浓度和 pH 4.0-10.0 的条件, 并且具有溶解有机磷的能力。ZK1^T 在提高不同田菁材料生长和结瘤方面具有一定的作用, 具备开发为田菁根瘤菌菌剂产品的潜力, 未来可用于助力边际土地生态改良。

致谢

感谢海南省种业实验室贾亚军、刘少坤提供田菁种子。

作者贡献声明

陈妍：实验操作、数据收集和处理、论文撰写；王富强：研究构思和设计、论文讨论、论文撰写和修改；龙永：协助实验操作、测序数据收集和处理、论文修改；范鲁燕：协助实验操作、数据收集和图片处理；任舒萌：协助实验操作与种子处理；宋显伟：论文讨论、论文撰写和修改；曹晓风：研究构思和设计、论文讨论、技术支持、论文撰写和修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] LIU SL, HOU XY, YANG M, CHENG FY, COXIXO A, WU X, ZHANG YQ. Factors driving the relationships between vegetation and soil properties in the Yellow River Delta, China[J]. *Catena*, 2018, 165: 279-285.
- [2] XIA JB, REN JY, ZHANG SY, WANG YH, FANG Y. Forest and grass composite patterns improve the soil quality in the coastal saline-alkali land of the Yellow River Delta, China[J]. *Geoderma*, 2019, 349: 25-35.
- [3] LIU YT, CHEN X, XUE SY, QUAN TY, CUI D, HAN LZ, CONG WX, LI MT, YUN DJ, LIU B, XU ZY. SET DOMAIN GROUP 721 protein functions in saline-alkaline stress tolerance in the model rice variety Kitaake[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2021, 19(12): 2576-2588.
- [4] 曹晓风, 孙波, 陈化榜, 周俭民, 宋显伟, 刘小京, 邓向东, 李秀军, 赵玉国, 张佳宝, 李家洋. 我国边际土地产能扩增和生态效益提升的途径与研究进展[J]. *中国科学院院刊*, 2021, 36(3): 336-348.
- [5] CAO XF, SUN B, CHEN HB, ZHOU JM, SONG XW, LIU XJ, DENG XD, LI XJ, ZHAO YG, ZHANG JB, LI JY. Approaches and research progresses of marginal land productivity expansion and ecological benefit improvement in China[J]. *Bulletin of Chinese Academy of Sciences*, 2021, 36(3): 336-348 (in Chinese).
- [6] LUO HF, WANG XF, YOU CQ, WU XD, PAN DF, LV ZY, LI T, ZHANG DM, SHEN ZB, ZHANG XD, LIU GD, HE KX, YE QT, JIA YJ, ZHAO QH, DENG X, CAO XF, SONG XW, HUANG G. Telomere-to-telomere genome of the allotetraploid legume *Sesbania cannabina* reveals transposon-driven subgenome divergence and mechanisms of alkaline stress tolerance[J]. *Science China Life Sciences*, 2024, 67(1): 149-160.
- [7] CUI Q, XIA JB, YANG HJ, LIU JT, SHAO PS. Biochar and effective microorganisms promote *Sesbania cannabina* growth and soil quality in the coastal saline-alkali soil of the Yellow River Delta, China[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 756: 143801.
- [8] WANG TW, ZHANG JQ, SHI WX, SUN JH, XIA TQ, HUANG FQ, LIU YY, LI HK, TENG KL, ZHONG J. Dynamic changes in fermentation quality and structure and function of the microbiome during mixed silage of *Sesbania cannabina* and sweet sorghum grown on saline-alkaline land[J]. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(5): e02483-22.
- [9] XIA TQ, WANG TW, SUN JH, SHI WX, LIU YY, HUANG FQ, ZHANG JQ, ZHONG J. Modulation of fermentation quality and metabolome in co-ensiling of *Sesbania cannabina* and sweet sorghum by lactic acid bacterial inoculants[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 851271.
- [10] 刘雅辉, 王秀萍, 刘广明, 孙建平, 姚玉涛, 杨雅华. 滨海盐土区 4 种典型耐盐植物盐分离子的积累特征[J]. *土壤*, 2017, 49(4): 782-788.
- [11] LIU YH, WANG XP, LIU GM, SUN JP, YAO YT, YANG YH. Ions absorption and accumulation in four typical salt-tolerant plants in coastal saline soil region[J]. *Soils*, 2017, 49(4): 782-788 (in Chinese).
- [12] GUO XQ, ZHU GL, JIAO XR, ZHOU GS. Effects of nitrogen application and planting density on growth and yield of *Sesbania* pea grown in saline soil[J]. *Current Science*, 2019, 116(5): 758.
- [13] 景宇鹏, 林春野, 赵沛义, 李秀萍, 赵强, 刘宇杰, 刘梅, 妥德宝, 王丽君, 杨晓. 5 种植物改良河套灌区盐渍化土壤的效果研究[J]. *土壤与作物*, 2020, 9(2): 114-125.
- [14] JING YP, LIN CY, ZHAO PY, LI XP, ZHAO Q, LIU YJ, LIU M, TUO DB, WANG LJ, YANG X. Salinized soil improvement by planting 5 plant species in Hetao irrigation area[J]. *Soils and Crops*, 2020, 9(2): 114-125 (in Chinese).
- [15] 谢文军, 王济世, 靳祥旭, 张衍鹏, 武兰芳, 欧阳竹. 田菁改良重度盐渍化土壤的效果分析[J]. *中国农学通报*, 2016, 32(6): 119-123.
- [16] XIE WJ, WANG JS, JIN XX, ZHANG YP, WU LF, OUYANG Z. Effect of *Sesbania cannabina* cultivation on severe salinity soil fertility improvement[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2016, 32(6): 119-123 (in Chinese).
- [17] REN CG, KONG CC, XIE ZH. Role of abscisic acid in strigolactone-induced salt stress tolerance in arbuscular mycorrhizal *Sesbania cannabina* seedlings[J]. *BMC Plant Biology*, 2018, 18: 1-10.
- [18] ZHENG H, WANG X, CHEN L, WANG ZY, XIA Y, ZHANG YP, WANG HF, LUO XX, XING BS. Enhanced growth of halophyte plants in biochar-amended coastal soil: roles of nutrient availability and rhizosphere microbial modulation[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2018, 41(3): 517-532.
- [19] FAROOQ M, ULLAH N, NADEEM F, NAWAZ A, SIDDIQUE KHM. *Sesbania* brown manuring improves soil health, productivity, and profitability of post-rice bread wheat and chickpea[J]. *Experimental Agriculture*, 2021, 57(3): 145-162.
- [20] 朱兆良. 合理使用化肥 充分利用有机肥 发展环境友好的施肥体系[J]. *中国科学院院刊*, 2012(2): 89-93.

- ZHU ZL. Fertilizer management strategies for the harmonization of agriculture development with environment protection[J]. Bulletin of Chinese Academy of Sciences, 2003(2): 89-93 (in Chinese).
- [17] 慈恩, 高明. 生物固氮的研究进展[J]. 中国农学通报, 2004(1): 25-28.
CI E, GAO M. Research progress on biological nitrogen fixation[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2004(1): 25-28 (in Chinese).
- [18] 李项岳, 李岩, 姜南, 吴海龙, 宋万平, 徐化凌, 解志红. 如东田菁根瘤菌遗传多样性及高效促生菌株筛选[J]. 微生物学报, 2015, 55(9): 1105-1116.
LI XY, LI Y, JIANG N, WU HL, SONG WP, XU HL, XIE ZH. Genetic diversity of the rhizobia and screening of highefficient growth-promoting strains isolated from *Sesbania cannabina* in Rudong County[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2015, 55(9): 1105-1116 (in Chinese).
- [19] SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4(4): 406-425.
- [20] TAMURA K, STECHER G, KUMAR S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11[J]. Molecular Biology and Evolution, 2021, 38(7): 3022-3027.
- [21] CHEN S. Ultrafast one-pass FASTQ data preprocessing, quality control, and deduplication using fastp[J]. iMeta, 2023, 2(2): e107.
- [22] KOREN S, WALENZ BP, BERLIN K, MILLER JR, BERGMAN NH, PHILLIPPY AM. Canu: scalable and accurate long-read assembly *via* adaptive *k*-mer weighting and repeat separation[J]. Genome Research, 2017, 27(5): 722-736.
- [23] DANECHEK P, BONFIELD JK, LIDDLE J, MARSHALL J, OHAN V, POLLARD MO, WHITWHAM A, KEANE T, MCCARTHY SA, DAVIES RM, LI H. Twelve years of SAMtools and BCFtools[J]. GigaScience, 2021, 10(2): giab008.
- [24] LI H. Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences[J]. Bioinformatics, 2018, 34(18): 3094-3100.
- [25] SEEMANN T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation[J]. Bioinformatics, 2014, 30(14): 2068-2069.
- [26] CHAN PP, LIN BY, MAK AJ, LOWE TM. tRNAscan-SE 2.0: improved detection and functional classification of transfer RNA genes[J]. Nucleic Acids Research, 2021, 49(16): 9077-9096.
- [27] LAGESEN K, HALLIN P, RØDLAND EA, STÆRFELDT H, ROGNES T, USSERY DW. RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes[J]. Nucleic Acids Research, 2007, 35(9): 3100-3108.
- [28] LEFORT V, DESPER R, GASCUEL O. FastME 2.0: a comprehensive, accurate, and fast distance-based phylogeny inference program[J]. Molecular Biology and Evolution, 2015, 32(10): 2798-2800.
- [29] RICHTER M, ROSSELLÓ-MÓRA R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009, 106(45): 19126-19131.
- [30] MEIER-KOLTHOFF JP, CARBASSE JS, PEINADO-OLARTE RL, GÖKER M. TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes[J]. Nucleic Acids Research, 2022, 50(D1): D801-D807.
- [31] JAIN C, RODRIGUEZ-R LM, PHILLIPPY AM, KONSTANTINIDIS KT, ALURU S. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries[J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 5114.
- [32] AUCH AF, von JAN M, KLENK HP, GÖKER M. Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison[J]. Standards in Genomic Sciences, 2010, 2(1): 117-134.
- [33] KIM M, OH HS, PARK SC, CHUN J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014, 64(Pt2): 346-351.
- [34] LI S, DONG L, LIAN WH, LIN ZL, WEI QC, XIAO M, LI WJ. *Rufibacter roseolus* sp. nov. and *Rufibacter aurantiacus* sp. nov., isolated from desert soil[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2023, 73(10): 006093.
- [35] KANAKIDOU M, MYRIOKEFALITAKIS S, DASKALAKIS N, FANOURGAKIS G, NENES A, BAKER AR, TSIGARIDIS K, MIHALOPOULOS N. Past, present and future atmospheric nitrogen deposition[J]. Journal of the Atmospheric Sciences, 2016, 73(5): 2039-2047.
- [36] DAVIES-BARNARD T, FRIEDLINGSTEIN P. The global distribution of biological nitrogen fixation in terrestrial natural ecosystems[J]. Global Biogeochemical Cycles, 2020, 34(3): e2019GB006387.
- [37] DAKORA FD. Defining new roles for plant and rhizobial molecules in sole and mixed plant cultures involving symbiotic legumes[J]. New Phytologist, 2003, 158(1): 39-49.
- [38] BERENDSEN RL, PIETERSE CMJ, BAKKER PAHM. The rhizosphere microbiome and plant health[J]. Trends in Plant Science, 2012, 17(8): 478-486.
- [39] SHRIVASTAVA P, RAJESH K. Soil salinity: a serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2014, 22(2): 123-131.
- [40] WANG YF, ZHANG ZQ, ZHANG P, CAO YM, HU TM, YANG PZ. *Rhizobium* symbiosis contribution to short-term salt stress tolerance in alfalfa (*Medicago sativa* L.)[J]. Plant and Soil, 2016, 402(1): 247-261.
- [41] EID J, FEHR A, GRAY J, LUONG K, LYLE J, OTTO G, PELUSO P, RANK D, BAYBAYAN P, BETTMAN B, BIBILLO A, BJORNSON K, CHAUDHURI B, CHRISTIANS F, CICERO R, CLARK S, DALAL R, DEWINTER A, DIXON J, FOUQUET M, et al. Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules[J]. Science, 2009, 323(5910): 133-138.
- [42] MADOUY MA, ENGELEN S, CRUAUD C, BELSER C,

- BERTRAND L, ALBERTI A, LEMAINQUE A, WINCKER P, AURY J. Genome assembly using Nanopore-guided long and error-free DNA reads[J]. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 327.
- [43] DONG X, LI Z, WANG Q, XIE Z, LI Y, LUO Y. Enhancing the growth performance of *Sesbania cannabina* using *Ensifer alkanisoli* and biochar under salt stress[J]. *Rhizosphere*, 2024, 30: 100888.
- [44] BOIVIN C, NDOYE I, LORTET G, NDIAYE A, de LAJUDIE P, DREYFUS B. The *Sesbania* root symbionts *Sinorhizobium saheli* and *S. teranga* bv. *sesbaniae* can form stem nodules on *Sesbania rostrata*, although they are less adapted to stem nodulation than *Azorhizobium caulinodans*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(3): 1040-1047.
- [45] CUMMINGS SP, GYANESHWAR P, VINUESA P, FARRUGGIA FT, ANDREWS M, HUMPHRY D, ELLIOTT GN, NELSON A, ORR C, PETTITT D, SHAH GR, SANTOS SR, KRISHNAN HB, ODEE D, MOREIRA FMS, SPRENT JI, YOUNG JPW, JAMES EK. Nodulation of *Sesbania* species by *Rhizobium (Agrobacterium)* strain IRBG74 and other rhizobia[J]. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(10): 2510-2525.
- [46] DEGEFU T, WOLDE-MESKEL E, LIU BB, CLEENWERCK I, WILLEMS A, FROSTEG Å. *Mesorhizobium shonense* sp. nov., *Mesorhizobium hawassense* sp. nov. and *Mesorhizobium abyssinicae* sp. nov., isolated from root nodules of different agroforestry legume trees[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2013, 63(Pt 5): 1746-1753.
- [47] DREYFUS B, GARCIA JL, GILLIS M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1988, 38(1): 89-98.
- [48] WANG ET, van BERKUM P, BEYENE D, SUI XH, DORADO O, CHEN WX, MARTÍNEZ-ROMERO E. *Rhizobium huautlense* sp. nov., a symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1998, 48(Pt 3): 687-699.
- [49] WANG YC, WANG F, HOU BC, WANG ET, CHEN WF, SUI XH, CHEN WX, LI Y, ZHANG YB. Proposal of *Ensifer psoraleae* sp. nov., *Ensifer sesbaniae* sp. nov., *Ensifer morelense* comb. nov. and *Ensifer americanum* comb. nov.[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2013, 36(7): 467-473.
- [50] REJILI M, MAHDHI M, FTERICH A, DHAOUI S, GUEFRACHI I, ABDEDDAYEM R, MARS M. Symbiotic nitrogen fixation of wild legumes in Tunisia: soil fertility dynamics, field nodulation and nodules effectiveness[J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2012, 157: 60-69.
- [51] YANNI Y, ZIDAN M, DAZZO F, RIZK R, MEHESEN A, ABDELFAHATTAH F, ELSADANY A. Enhanced symbiotic performance and productivity of drought stressed common bean after inoculation with tolerant native rhizobia in extensive fields[J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2016, 232: 119-128.
- [52] de SOUZA JEB, de BRITO FERREIRA EP. Improving sustainability of common bean production systems by co-inoculating rhizobia and azospirilla[J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2017, 237: 250-257.
- [53] 王雪翠, 马晓彤, 韩梅, 曹卫东, 张宏亮, 白金顺, 曾闹华, 高嵩涓, 周国朋, 王艳秋. 青海箭筈豌豆根瘤菌的筛选及其共生体耐盐性研究[J]. *草业学报*, 2016, 25(8): 145-153.
- WANG XC, MA XT, HAN M, CAO WD, ZHANG HL, BAI JS, ZENG NH, GAO SJ, ZHOU GP, WANG YQ. Screening of rhizobia of common vetch (*Vicia sativa*) in Qinghai, and assessment of symbiont salt tolerance[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2016, 25(8): 145-153 (in Chinese).
- [54] Del PILAR CORDOVILLA M, LIGERO F, LLUCH C. Influence of host genotypes on growth, symbiotic performance and nitrogen assimilation in faba bean (*Vicia faba* L.) under salt stress[J]. *Plant and Soil*, 1995, 172(2): 289-297.
- [55] EL-AKHAL MR, RINCÓN A, COBA de La PEÑA T, LUCAS MM, EL MOURABIT N, BARRIJAL S, PUEYO JJ. Effects of salt stress and rhizobial inoculation on growth and nitrogen fixation of three peanut cultivars[J]. *Plant Biology*, 2013, 15(2): 415-421.