

内蒙古地区苜蓿耐盐促生根瘤菌的筛选及盆栽验证

郑杜翔^{1,4}, 魏杰², 闫伊茹³, 刘长涛³, 闫瑞智³, 张晓霞^{1*}

- 1 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所, 北方干旱半干旱耕地高效利用全国重点实验室, 北京
- 2 内蒙古大学 生命科学学院, 内蒙古自治区高校生物种质资源保护与利用工程研究中心, 内蒙古 呼和浩特
- 3 蒙草生态环境(集团)股份有限公司, 内蒙古 呼和浩特
- 4 山东农业大学 生命科学学院, 山东 泰安

郑杜翔, 魏杰, 闫伊茹, 刘长涛, 闫瑞智, 张晓霞. 内蒙古地区苜蓿耐盐促生根瘤菌的筛选及盆栽验证[J]. 微生物学报, 2026, 66(3): 1211-1224.
ZHENG Duxiang, WEI Jie, YAN Yiru, LIU Changtao, YAN Ruizhi, ZHANG Xiaoxia. Screening of salt-tolerant and plant growth-promoting rhizobia from alfalfa in Inner Mongolia and verification through pot experiments[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2026, 66(3): 1211-1224.

摘要:【目的】针对内蒙古盐渍化土壤制约苜蓿生产的问题, 从该地区苜蓿根瘤中筛选耐盐能力强、促生效果优的根瘤菌, 明确其系统发育地位与功能潜力, 为开发本地化苜蓿高效共生结瘤的根瘤菌菌剂提供菌种资源和理论依据。【方法】在内蒙古自治区采集6个不同盐碱区域的土壤, 通过捕获法获取土著苜蓿根瘤菌, 分离纯化后采用16S rRNA基因序列分析鉴定菌株分类地位; 通过结瘤试验、固氮/解磷/解钾能力测定、产吲哚-3-乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)与胞外多糖含量检测等评价促生功能; 结合种子萌发试验与耐盐盆栽试验测定菌株缓解盐胁迫的效果。【结果】共分离出250株菌株, 其中苜蓿根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)占90.8%(227株); 筛选出8株高效结瘤菌株(1B1Y、1B2Y等), 均具备固氮与解钾能力, 部分菌株(如2B3Y、9B3Y)可解有机磷、产铁载体; 9B3Y的IAA分泌量最高(67.5 mg/L), 16C1Y的胞外多糖含量最高(2.684 g/L); 在盐胁迫(0.4% NaCl)条件下, 2B3Y处理组苜蓿地上部鲜重较盐水对照组增长29%, 且显著缓解种子萌发抑制(根长提升明显)。【结论】筛选获得的菌株(尤其是2B3Y)能通过固氮、分泌IAA与胞外多糖等机制有效缓解盐胁迫对苜蓿的抑制作用, 有望应用于内蒙古盐渍化土壤的苜蓿生产与土壤改良。

关键词: 内蒙古; 苜蓿; 盐渍化土壤; 根瘤菌; 耐盐促生

资助项目: 呼和浩特市科技创新领域人才项目(2023RC-联合体-1); 中国农业科学院重大科技任务(CAAS-ZDRW202407)
This work was supported by the Hohhot Talent Project in the Field of Science and Technology Innovation (2023RC-Consortium-1) and the Major Scientific and Technological Tasks of the Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS-ZDRW202407).

*Corresponding author. E-mail: zhangxiaoxia@caas.cn

Received: 2025-10-12; Accepted: 2025-12-08; Published online: 2025-12-29

Screening of salt-tolerant and plant growth-promoting rhizobia from alfalfa in Inner Mongolia and verification through pot experiments

ZHENG Duxiang^{1,4}, WEI Jie², YAN Yiru³, LIU Changtao³, YAN Ruizhi³, ZHANG Xiaoxia^{1*}

1 State Key Laboratory of Efficient Utilization of Arid and Semi-arid Arable Land in Northern China, Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, China

2 Inner Mongolia Higher Education Engineering Research Center for Protection and Utilization of Biological Germplasm Resources, School of Life Sciences, Inner Mongolia University, Hohhot, Inner Mongolia, China

3 M-Grass Ecology and Environment (Group) Co., Ltd., Hohhot, Inner Mongolia, China

4 College of Life Sciences, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong, China

Abstract: **[Objective]** To screen indigenous rhizobia with high salt tolerance and plant growth-promoting traits from alfalfa nodules and clarify their phylogenetic status and functional potential, thereby providing strain resources and a theoretical basis for developing localized, efficient alfalfa symbiosis and further addressing the constraints of saline soil on alfalfa production in Inner Mongolia. **[Methods]** Indigenous alfalfa rhizobia were collected from six saline-alkali sites in Inner Mongolia *via* a trapping method. Following isolation and purification, the taxonomic status of the strains was determined by 16S rRNA gene sequencing. The plant growth-promoting functions were evaluated through nodulation tests, along with assays for nitrogen fixation, phosphorus solubilization, potassium solubilization, indole-3-acetic acid (IAA) production, and exopolysaccharide (EPS) content. Seed germination and pot experiments were carried out to evaluate the salt stress-alleviating effect of the target strain. **[Results]** A total of 250 strains were isolated, with *Sinorhizobium meliloti* being predominant (227 strains, 90.8%). Eight efficient nodulating strains (e.g., 1B1Y and 1B2Y) were screened out, all of which possessed nitrogen-fixing and potassium-solubilizing capabilities. Some strains (e.g., 2B3Y and 9B3Y) could solubilize organic phosphorus and produce siderophores. Strain 9B3Y secreted the highest amount of IAA (67.5 mg/L), while 16C1Y produced the highest EPS content (2.684 g/L). Under salt stress (0.4% NaCl), the aboveground fresh weight of alfalfa inoculated with strain 2B3Y increased by 29% compared with that of the saline control, and the strain significantly alleviated the inhibition on seed germination (notably increasing the root length). **[Conclusion]** The strains screened out, particularly strain 2B3Y, can effectively mitigate the inhibitory effects of salt stress on alfalfa through nitrogen fixation and the secretion of IAA and EPS. These strains show promise for application in alfalfa production and soil improvement in saline regions of Inner Mongolia.

Keywords: Inner Mongolia; alfalfa; saline soil; rhizobia; salt tolerance and plant growth promoting

紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)作为豆科多年生优质牧草, 因其高蛋白含量、强适口性及良

好的土壤改良作用, 在我国畜牧业发展和生态修复中占据重要地位^[1]。内蒙古是我国重要的畜

牧业基地, 苜蓿种植面积逐年扩大, 但其生产常受到土壤盐渍化的严重制约。该地区地处干旱半干旱区, 蒸发量远大于降水量, 加之不合理的灌溉方式, 导致土壤盐渍化问题日益突出, 据统计, 内蒙古盐渍化土壤面积已超过 450 万 hm^2 , 其中许多地块因盐分过高导致苜蓿种子萌发率降低、幼苗生长受阻、产量大幅下降, 严重影响了牧草产业的可持续发展^[2]。

土壤盐渍化会通过渗透胁迫、离子毒害及氧化损伤等多种途径抑制植物生长, 还会破坏根瘤菌与苜蓿的共生关系, 干扰结瘤过程, 表现为结瘤数量减少、固氮能力下降^[3]。其机制主要与根瘤细胞中 Na^+ 过量积累及关键离子转运蛋白定位异常有关。传统的物理改良(如深耕松土)和化学改良(如施加改良剂)存在成本高、易造成二次污染等局限^[4]。近年来, 利用微生物缓解植物盐胁迫的生物修复技术因其环境友好、可持续性等优点成为研究热点。耐盐促生菌(salt-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria, ST-PGPR)可通过多种机制促进盐胁迫下植物的生长, 如分泌吲哚-3-乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)、赤霉素等植物激素调控植物生理代谢, 产生 1-氨基环丙烷-1-羧酸(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, ACC)脱氨酶降低乙烯积累以缓解胁迫, 溶解土壤中难溶性磷、钾并固定氮素改善营养供应, 还可通过合成胞外多糖、产生抗氧化酶等增强植物的耐盐能力^[5]。

目前, 针对苜蓿根际促生菌的筛选已在新疆、宁夏等盐渍化地区开展了部分研究, 筛选出的菌株在实验室条件下表现出一定的耐盐促生效果, 但由于土壤微生物的分布具有显著的地域特异性, 不同生态环境中的菌株其功能特性差异较大^[6]。内蒙古地区独特的气候条件(昼夜温差大、冬季寒冷干燥)和土壤类型(多为栗钙土、棕钙土)形成了特殊的根际微生态系统^[7], 从中筛选出的耐盐促生菌可能具有更适应本地环境的功能优势, 但其相关研究仍较为匮乏。

本研究以内蒙古盐渍化土壤中生长的苜蓿

根瘤为材料, 分离筛选具有高效耐盐能力和促生特性的根瘤菌资源, 明确其分类地位及促生潜力, 旨在为开发适用于当地的微生物菌剂、改良盐渍化土壤、提高苜蓿产量提供优质资源。

1 材料与方 法

1.1 采样地点概况

土样采集于内蒙古境内主要盐碱地分布地区, 具体位置及理化信息见表 1。

1.2 培养基

YMA 培养基(g/L): 甘露醇 10.0, 酵母提取物 1.0, K_2HPO_4 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, NaCl 0.1, 琼脂 20.0 (固体培养基用, 液体培养基不加琼脂)。

TY 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, NaCl 5.0, 琼脂 20.0。

阿须贝无氮培养基(g/L): 甘露醇 10.0, KH_2PO_4 0.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, NaCl 0.2, CaCl_2 0.1, CaCO_3 5.0, 琼脂 15.0。

蒙金娜有机磷培养基(g/L): 葡萄糖 10.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5, NaCl 0.3, KCl 0.3, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.03, 蛋黄卵磷脂(提前加热溶解于蒸馏水) 0.2, CaCO_3 5.0, 酵母粉 0.4, 琼脂 12.0。

无机磷培养基(g/L): 葡萄糖 10.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5, KCl 0.2, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.03, FeSO_4 0.003, NaCl 0.2, 酵母粉 0.5, 琼脂 12.0。

解钾培养基(g/L): 葡萄糖 5.0, 硫酸铵 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, NaCl 0.1, 碳酸钙 1.0, 钾长石粉(或黑云母) 2.0, 琼脂 20.0, 溴百里酚蓝 4.0。

铁载体培养基(g/L): 葡萄糖 2.0, L-天冬酰胺 0.5, K_2HPO_4 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, 琼脂 15.0。CAS 显色液(g/L): 铬天青 S (CAS) 0.6, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.027, 十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 0.72。

表1 土样采集地位置及理化特性

Table 1 Location and physical and chemical properties of soil sample collection sites

采样点 Sampling point	经纬度信息 Longitude and latitude information	取样植株 Sampling plants	酸碱度 pH	电导率 Electrical conductivity (EC) ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
通辽珠日河中化基地东 East of Zhurihe Sinochem Base, Tongliao	44°12'5.29"N, 121°35'58.35"E	苜蓿 Alfalfa	8.57±0.17	96.10±5.21
通辽珠日河中化基地西 West of Zhurihe Sinochem Base, Tongliao	44°12'22.32"N, 121°31'47.40"E	苜蓿 Alfalfa	8.56±0.13	137.93±13.39
通辽扎鲁特旗 Tongliao Jalut Banner	44°23'12.97"N, 121°15'44.22"E	苜蓿 Alfalfa	6.69±0.22	141.17±23.13
乌拉特中期第二基地 Urad Mid-term Second Base	41°13'59.24"N, 108°46'48.97"E	苜蓿 Alfalfa	8.70±0.04	141.80±4.90
黑麻洼 Heimawa	40°23'3.75"N, 111°33'3.80"E	苜蓿 Alfalfa	8.50±0.04	127.10±13.9
和林格尔 Horinger County	40°29'3.59"N, 111°50'6.71"E	苜蓿 Alfalfa	8.67±0.04	76.41±7.31

组分 A (g/L): KH_2PO_4 8.8, KCl 62.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 100.0; 组分 B (g/L): CaCl_2 86.0; 组分 C (g/L): 柠檬酸铁 12.0; 组分 D (g/L): NaNO_3 12.0, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.4, ZnSO_4 0.1, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.1, H_3BO_3 0.1, Na_2MoO_4 0.02。松本哲良营养培养基使用时将上述 4 种组分等体积混合, 再用蒸馏水稀释 200 倍后使用。

种子: 本研究使用的种子为蒙草生态环境(集团)股份有限公司慷慨提供的紫花苜蓿‘沃苜 2 号’。

1.3 菌株的富集、分离及鉴定

将采集点原位土混入无菌营养土: 无菌蛭石=1:1 基质中进行盆栽试验, 利用豆科植物特异捕获根瘤菌的特性开展原位土盆栽试验。待苜蓿成熟结瘤后进行根瘤的收获^[8]。

将根瘤从根部完整分离并进行表面消毒, 消毒条件为 75% 乙醇浸泡 2 min+2% 次氯酸钠浸泡 3 min, 浸泡过程中不断摇晃, 最后用无菌水快速冲洗 10 次^[9]。用无菌镊子夹破样品, 将创伤面贴在含 1% 刚果红的 YMA 平板上, 30 °C 培养 2-4 d, 根据菌落形态、颜色、黏稠度和表

面光滑程度等特征选择单菌落并划线纯化, 对菌落进行编号, 然后用 20% 甘油保存于 -80 °C 冰箱中待用^[10]。

1.4 根瘤菌分子鉴定

挑取适量 YMA 培养基上单菌落于装有 30 μL 无菌水的离心管中, 沸水浴 10 min, 然后 -20 °C 冰箱冷冻 30 min, 10 000 r/min 离心 5 min 取上清液, 即为 DNA 粗提液。

对细菌 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增, 引物为 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')。PCR 扩增体系 (25 μL): $2 \times \text{Taq PCR StarMix}$ 12.5 μL , 上、下游引物 (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 各 1 μL , 模板 2 μL , ddH_2O 8.5 μL 。PCR 反应程序: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 150 s, 共 30 个循环; 72 °C 终延伸 10 min; 4 °C 保存。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳测试合格后送往北京擎科生物科技股份有限公司测序, 测序结果上传至 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 和 EzBioCloud 数据库 (<https://www.ezbiocloud.net/>), 与模式菌进行 BLAST 在线比

对, 确定菌株分类地位。运用软件 MEGA X 采用邻接法(neighbor-joining method)构建系统发育树。

1.5 根瘤菌促生能力检验

1.5.1 结瘤试验

采用滤纸桥法^[11]进行水培试验。将滤纸裁剪成 400 mm×340 mm 滤纸条, 翻折制成“M”型, 中间凹处提前剪出“V”型小孔, 将滤纸桥放入 20 mm×180 mm 试管中, 加入约 40 mL 松本哲良营养液, 封口, 于 0.1 MPa 灭菌 20 min, 备用。

选取大小均一的苜蓿种子, 种子经 75% 乙醇浸泡 1 min+2% 次氯酸钠浸泡 2 min 消毒处理 3 次, 无菌水冲洗 10 次, 将种子平铺于四层纱布的潮湿育苗盘中置于黑暗处进行育苗。取供试菌株接种于 YMA 培养平板, 加入适量无菌水用一次性接种环刮洗菌苔, 振荡制成菌悬液。2 d 后将萌发幼苗移至滤纸桥, 并按照营养液体积 1% (约 0.4 mL 菌悬液) 添加菌悬液后进行培养, 定期补充营养液。30 d 后调查试验结果, 调查内容包括苜蓿植株株高、地上部分鲜重、地下部分鲜重、根瘤数量。

1.5.2 固氮能力测定

选择在阿须贝氏无氮固体培养基上能够生长的菌株, 接种至新的阿须贝培养基上进行传代培养, 30 °C 培养, 连续传代 3 次, 观察菌株的生长情况, 若能够正常生长则表明该菌具有固氮能力^[12]。

1.5.3 解磷和溶磷能力测定

供试菌株接种到蒙金娜无机磷培养基(测定溶解无机磷能力)和蒙金娜卵磷脂培养基(测定溶解有机磷能力)上, 每株菌重复 3 次, 28 °C 培养 4 d 后观察是否有透明圈产生, 有则表明该菌具有解磷能力^[13]。

1.5.4 解钾能力测定

供试菌株接种到解钾培养基上, 每株菌重复 3 次, 28 °C 培养 72 h, 观察硅酸盐细菌培养

基平板中是否有透明油滴状菌落且有黄色晕圈出现, 菌落有透明油滴状且有黄色晕圈则证明有解钾能力^[14]。

1.5.5 产铁载体能力测定

供试菌株接种到 CAS 检测培养基上, 每株菌重复 3 次, 28 °C 培养 48 h, 菌落周围产生黄色晕圈, 晕圈越大、颜色越深表明产铁量越多, 为产铁载体阳性菌^[15]。

1.5.6 产吲哚-3-乙酸(IAA)能力测定

供试菌株接种于盛有 10 mL 含 0.2 g/L 色氨酸的 YMA 液体培养基的 20 mL 摇菌管中, 每个处理 3 个重复, 200 r/min 培养 96 h。用 50 mL 35% HClO₄、1 mL 0.5 mol/L FeCl₃ 配制成 Salkowskis 比色液。培养产物于 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min, 吸取 50 μL 上清液滴于白色瓷板上, 同时滴加 50 μL Salkowskis 比色液, 以等量不接菌的培养基为空白对照, 避光显色 30 min 后观察颜色变化, 若颜色变成粉色表明该菌株能够产生 IAA, 迅速用酶标仪测定发生颜色变化溶液在波长为 530 nm 处的吸光度, 采用分析纯的 IAA 标准品(0、5、20、40、60、80、100 mg/L)绘制标准曲线, 根据标准曲线计算 IAA 的含量^[16]。

1.5.7 产胞外多糖能力测定

供试菌株接种于盛有 100 mL YMA 液体培养基的 250 mL 锥形瓶, 28 °C、200 r/min 培养 72 h。取适量菌液于 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min, 上清液即为根瘤菌胞外多糖粗提^[17]。

采用硫酸-蒽酮法测定胞外多糖含量^[18]。取 0.1 mL EPS 粗提液于试管中, 加入 0.9 mL 蒸馏水, 再加入 5.0 mL 蒽酮硫酸试剂快速混匀, 沸水浴 10 min, 冷水浴快速冷却, 测定 620 nm 处吸光值, 依照葡萄糖标准曲线计算总糖含量。

1.6 种子萌发试验

将 TY 培养基培养 48 h 菌液稀释至 $OD_{600}=0.2$ (CFU $\approx 10^8$) 备用, 种子经 75% 乙醇浸泡 1 min+2% 次氯酸钠浸泡 2 min, 无菌水冲洗 10 次备

用。将消毒后的苜蓿种子在菌悬液中短暂浸泡，对照(CK)为未接菌处理，种子浸泡在无菌液体培养基中。将种子置于 0.7% 水琼脂培养基中，每皿 10 粒，重复 3 次，光照培养箱培养，24 h 观察种子萌发情况，于第 3 天测定根长。计算发芽指标：发芽势、发芽率、发芽指数(germination index, GI)、活力指数(vigor index, VI)^[19]。其中，发芽指数(GI)与活力指数(VI)分别按公式(1)和公式(2)计算。

$$GI = \sum (G_t/D_t) \quad (1)$$

式中：GI 为发芽指数； G_t 为第 t 日的发芽数； D_t 为相应的发芽日数。

$$VI = GI \times S \quad (2)$$

式中：VI 为活力指数；GI 为发芽指数； S 为培养第 3 日测得的幼苗平均根长(cm)。

1.7 耐盐促生盆栽试验

1.7.1 耐盐浓度确认

配制 NaCl 浓度分别为 0、0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0% 的水琼脂(0.7%)，高温灭菌后倒入无菌塑料盒内。选取大小一致的苜蓿种子，用 75% 乙醇消毒 1 min，再用 2% 次氯酸钠消毒 2 min，最后用无菌水冲洗 10 次。消毒后的种子点植于盛有水琼脂(0.7%)的一次性塑料盒内，避光室温培养 3 d 后统计每组萌发率。

1.7.2 耐盐促生盆栽验证

将营养土与蛭石按体积比 1:1 混合，每小钵装入 100 g 混合基质后浇灌 100 mL 无菌盐水，播入数量一致的供试种子，置于(25±2) °C、16 h 光/8 h 暗、相对湿度 60%–70% 的温室中培养并适时补水；待幼苗生长 1 周即将进入三叶期时，将培养至对数生长期的供试菌剂调节至 $OD_{600} = 0.5$ ，每株根部浇灌 0.5 mL 菌剂，对照处理浇灌相应的培养基，每组设 7 次重复，菌剂处理 1 个月后收获植株用于后续指标测定。

1.8 数据处理

试验数据使用 Excel 2021 和 GraphPad Prism 8.0 软件处理。

2 结果与分析

2.1 菌株分离鉴定结果

从 6 处采样点各取 3 份土样(共 18 份)，这些土样基本属于盐碱地范畴。对每份土样进行 3 组菌种捕获盆栽试验(共 54 组)，采集新鲜苜蓿根瘤样品，利用划线法进行菌落纯化，共计分离纯化菌株 250 株。其中，包括苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*) 227 株，占比 90.8%；芽孢杆菌(*Bacillus* sp.) 15 株，占比 6.0%；其他菌株 8 株，占比 3.2%。所分离菌株中根瘤菌 16S rRNA 序列之间差异不大，以代表性菌株 2B3Y 为例构建系统发育树以明确其分类地位，结果显示其属于 *S. meliloti* (图 1)。

2.2 结瘤能力测定结果

在缺氮的松本哲良营养液环境中添加不同菌剂，实验分 3 个批次完成，共计完成 200 株根瘤菌的结瘤能力测定。在不同批次中分别挑取结瘤能力强且在低氮环境下农艺性状表现稳定的适量菌株进行后续检验，确认 8 株菌株在结瘤能力、株高、产量等方面表现较好，分别编号为 1B1Y、1B2Y、2B3Y、9B3Y、11C1Y、15B1Y、16C1Y、17C2Y (图 2)，用于后续功能检验。

2.3 耐盐浓度检验

根据不同氯化钠浓度下种子萌发情况对苜蓿种子的最大耐受能力进行评测。结果表明，随着盐浓度梯度升高，植株的萌发抑制逐渐增强。当种子处于 0.4% 浓度的氯化钠环境中时，将近半数(50%)种子的萌发受到明显影响(图 3)，萌发根长低于种子长度，未达到萌发标准^[20]。

2.4 萌发实验结果

经不同菌株发酵液浸种处理的种子，其萌发指数表现出不同影响(表 2)。当种子处于 0.4% NaCl 的实验组中时，相较于在清水中各项萌发指标均显著下降，发芽势降至 70%，发芽率为 73.33%，发芽指数为 2.45，种子活力指数为

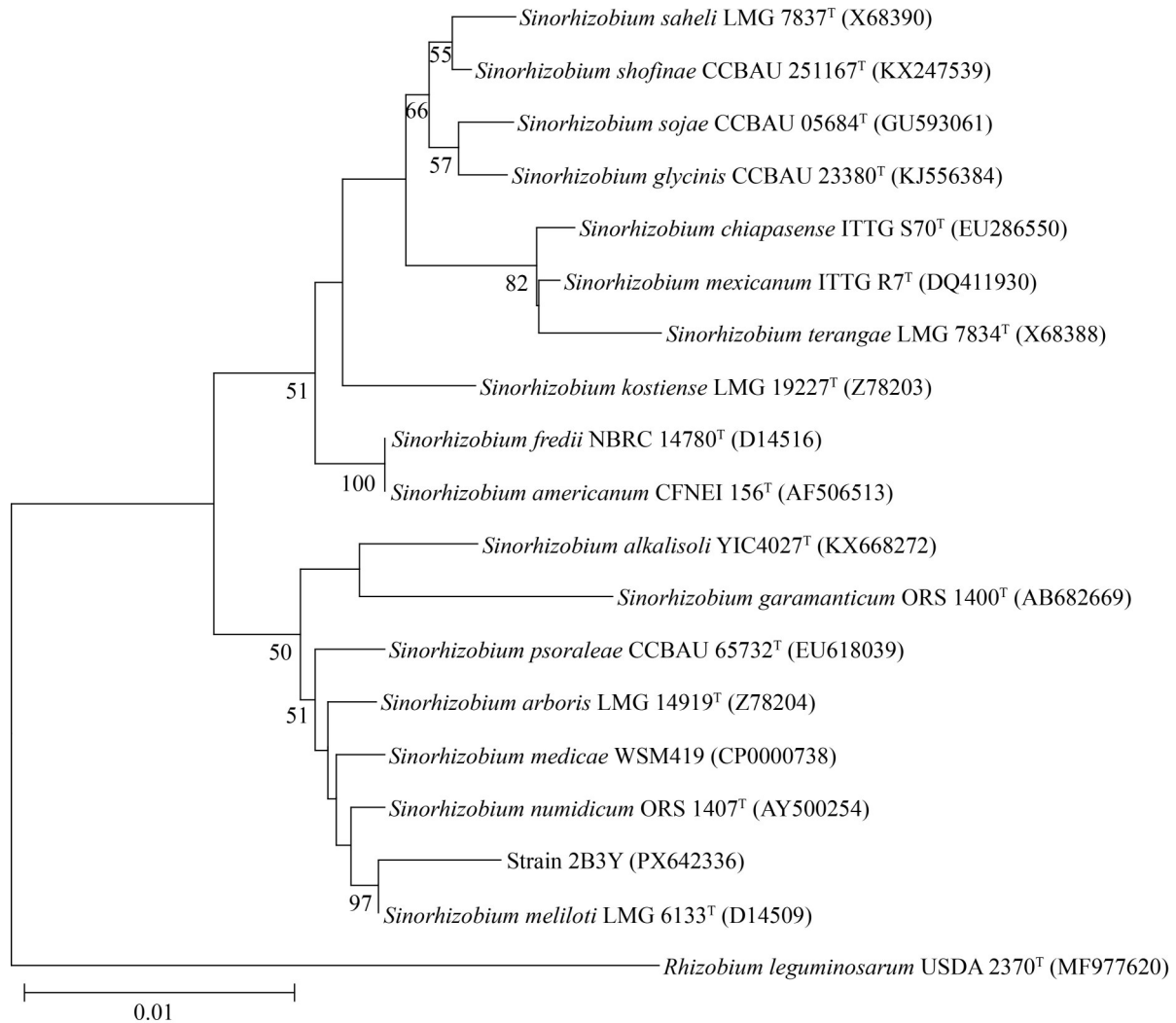


图1 基于16S rRNA基因序列采用邻接法(neighbor-joining method)构建的菌株2B3Y及其相关菌株系统发育树。菌株名后括号内为GenBank登录号; 节点数字为1 000次自展重复计算的支持率(仅显示≥50%的值); 标尺长度0.01代表每核苷酸位点1%的替换率; ^T表示模式菌株; 2B3Y为本研究菌株(NCBI登录号为PX642336); 外群为*Rhizobium leguminosarum* USDA 2370^T (MF977620)。

Figure 1 Phylogenetic tree of strain 2B3Y and its related strains constructed by neighbor-joining method based on 16S rRNA gene sequence. GenBank accession number in parentheses after strain name; Node numbers are support rates for 1 000 self-expanding double-counting (only values≥50% are shown); Ruler length 0.01 represents a 1% substitution rate per nucleotide site; ^T denotes the model strain; 2B3Y is the study strain (NCBI accession number PX642336); The outgroup is *Rhizobium leguminosarum* USDA 2370^T (MF977620).

5.11, 平均根长缩短近半至 2.11 cm, 表明盐胁迫对苜蓿种子的萌发存在显著抑制作用。接种菌液处理后, 2B3Y 相较于盐水对照在根长方面表现出显著的促进作用, 11C1Y、15B1Y、

16C1Y、17C2Y 在萌发指标各方面均高于盐水对照组, 具有一定的缓解作用。

2.5 耐盐盆栽验证

由图 4 农艺性状数据可知, 苜蓿经菌液灌

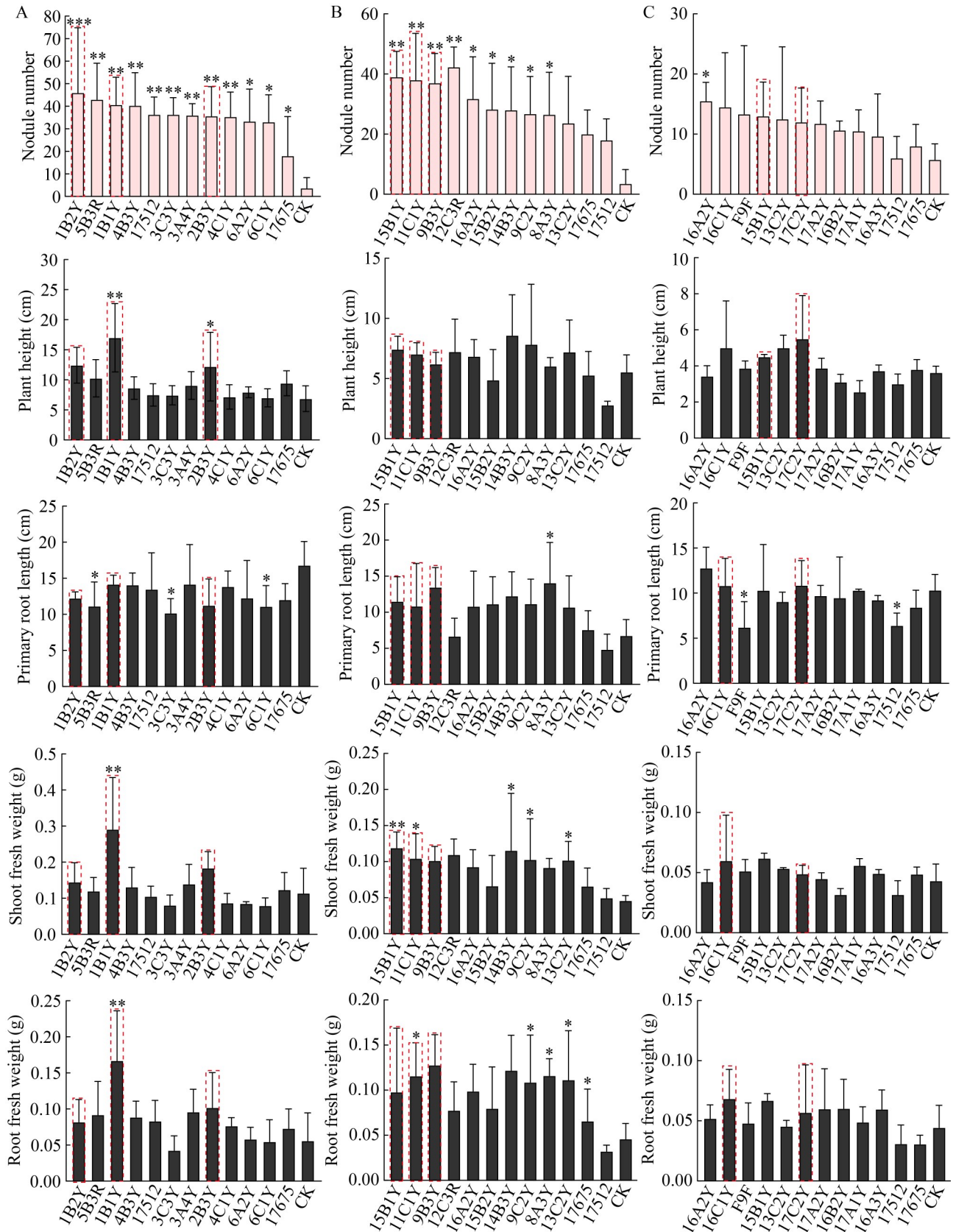


图2 根据结瘤实验统计植株农艺性状(包括结瘤数、株高、根长、鲜重等)。A: 批次一; B: 批次二; C: 批次三。每组3-4次重复, *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$ 。根据每批次结瘤数排名前10菌株处理组进行农艺性状排序; 17512、17675为蒙草生态环境(集团)股份有限公司目前在使用高效促生中华苜蓿根瘤菌。

Figure 2 Statistics of plant agronomic traits (including nodulation number, plant height, root length, fresh weight, etc.) according to nodulation experiments. A: Lot 1; B: Lot 2; C: Lot three. 3-4 replicates per group, *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$. According to the agronomic traits of the top ten strain treatment groups in terms of the number of nodules in each batch; 17512 and 17675 are the high-efficiency rhizobium bacteria currently used by M-Grass Ecology and Environment (Group) Co., Ltd. to promote the growth of Chinese alfalfa.

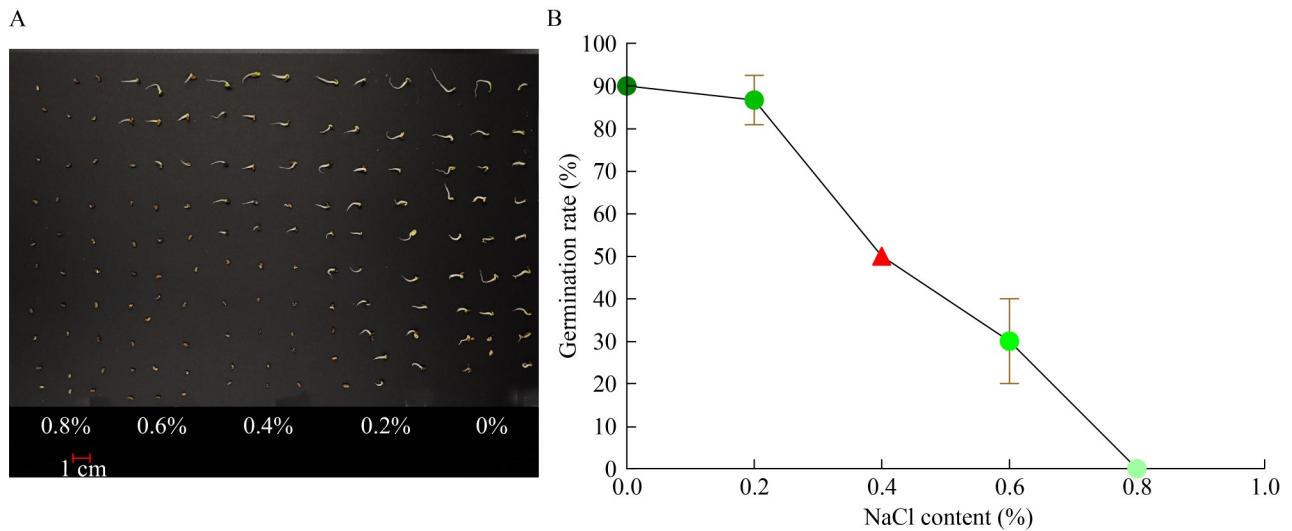


图3 紫花苜蓿种子在不同氯化钠浓度下的萌发表现。A: 不同氯化钠浓度下紫花苜蓿种子萌发表型; B: 氯化钠浓度对紫花苜蓿种子萌发率的影响。

Figure 3 Germination performance of alfalfa seeds under different NaCl concentrations. A: Germination pattern of alfalfa seeds under different NaCl concentrations; B: Effect of NaCl concentration on germination rate of alfalfa seeds.

根处理后, 其植株的茎粗、地上/地下部鲜重与干重、株高、主根长及结瘤数等农艺性状指标均显著提升。其中, 菌株 2B3Y 等在缓解盐碱胁迫方面表现突出(图 4A), 可有效在植株根部定殖并形成根瘤(图 4B), 对苜蓿茎粗、地上部干重、地下部干重及结瘤数等指标具有较为稳定的显著促进效果(图 4C)。以地上部鲜重为例, 盐水对照组(0.125 g)仅为清水对照组(0.182 g)产量的 68.7%, 这表明该试验所用盐浓度显著抑制了苜蓿产量; 而施加菌液 2B3Y 组(0.162 g)相较于盐水对照组(0.125 g)增长 29.6%, 相较于阳性对

照 ACCC 17512 (0.152 g)、ACCC 17675 (0.158 g) 约提升 2.5%–6.6%。由此可见, 施加菌液有效增强了植株的耐盐性与生长活力, 提升了牧草产量。

2.6 促生功能鉴定

将获得 8 株高效结瘤菌株进行各项促生功能检测(表 3), 结果显示 8 株菌株均具有固氮能力, 在解磷、铁载体产生及次生代谢物分泌等方面存在一定差异。解磷特性方面: 2B3Y、9B3Y、11C1Y、15B1Y、16C1Y、17C2Y 具备

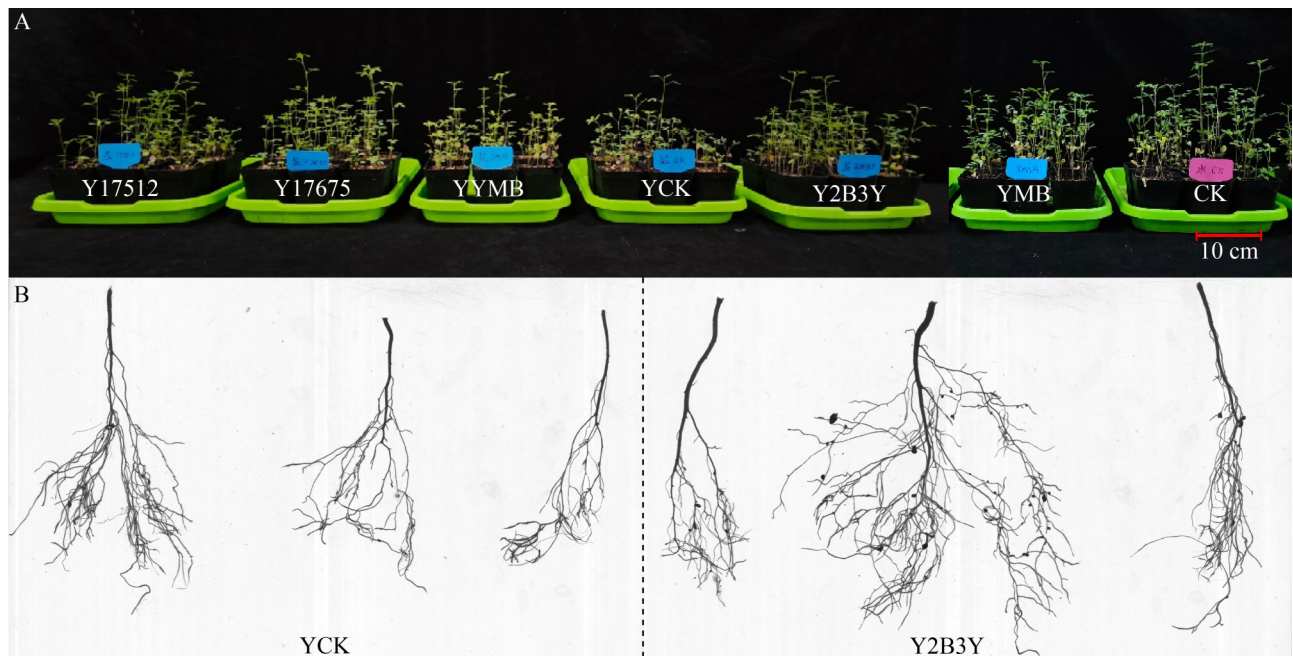
表2 不同菌株浸种对苜蓿萌发指数的影响

Table 2 Effect of soaking seed with different strains on germination index of alfalfa

分组 Group	发芽势 Germination energy (%)	发芽率 Germination rate (%)	发芽指数 Germination index (GI)	种子活力指数 Vigor index (VI)	平均根长 Mean root length (cm)
YCK	90.00±10.00a	90.00±10.00ab	2.45±0.69abc	5.11±1.31bc	2.11±0.12c
CK	86.67±15.28a	86.67±15.28abc	3.00±0.33ab	17.48±2.47a	5.86±0.92a
TY	70.00±20.00abc	73.33±20.82abc	2.89±0.51abc	14.59±2.95a	5.03±0.15a
YTY	66.67±15.28abc	70.00±17.32abc	2.34±0.58abc	4.51±2.00bc	1.88±0.49c
Y17512	73.33±57.74abc	76.67±5.77abc	2.56±0.20abc	6.13±1.42bc	2.43±0.72bc
Y17675	53.33±15.28bc	56.67±11.55c	1.89±0.38c	5.25±0.46bc	2.84±0.52bc
Y1B1Y	46.67±23.09c	60.00±26.46bc	2.00±0.88bc	5.28±2.23bc	2.66±0.19bc
Y1B2Y	60.00±26.46abc	66.67±32.15abc	2.22±1.07abc	3.71±0.62c	1.96±0.90c
Y2B3Y	66.67±11.55abc	70.00±17.32abc	2.33±0.58abc	7.32±1.38b	3.26±1.00b
Y9B3Y	80.00±20.00ab	93.33±5.77a	2.89±0.38abc	7.73±3.06b	2.62±0.68bc
Y11C1Y	76.67±15.28abc	93.33±5.77a	3.11±0.19a	6.68±1.36bc	2.16±0.53bc
Y15B1Y	86.67±15.28a	90.00±10.00ab	3.00±0.33ab	7.69±1.10b	2.57±0.36bc
Y16C1Y	90.00±10.00a	93.33±5.77a	3.11±0.19a	6.99±1.07bc	2.24±0.21bc
Y17C2Y	76.67±5.77abc	76.67±5.77abc	2.56±0.20abc	5.52±0.64bc	2.16±0.12bc

YCK: 盐水胁迫+未接菌对照; CK: 清水对照; TY: 培养基对照; YTY: 盐水胁迫+TY培养基对照; Y17675、Y2B3Y等: 盐水胁迫+对应菌株处理。不同小写字母代表处理组间显著差异($P<0.05$); 数值=平均数±标准差。

YCK: Saline stress+uninoculated bacteria control; CK: Water control; TY: Medium control; YTY: Saline stress+TY medium control; Y17675, Y2B3Y, etc.: Saline stress+corresponding strain treatment. Different lowercase letters represent significant differences between treatment groups ($P<0.05$); Value=mean±SD.



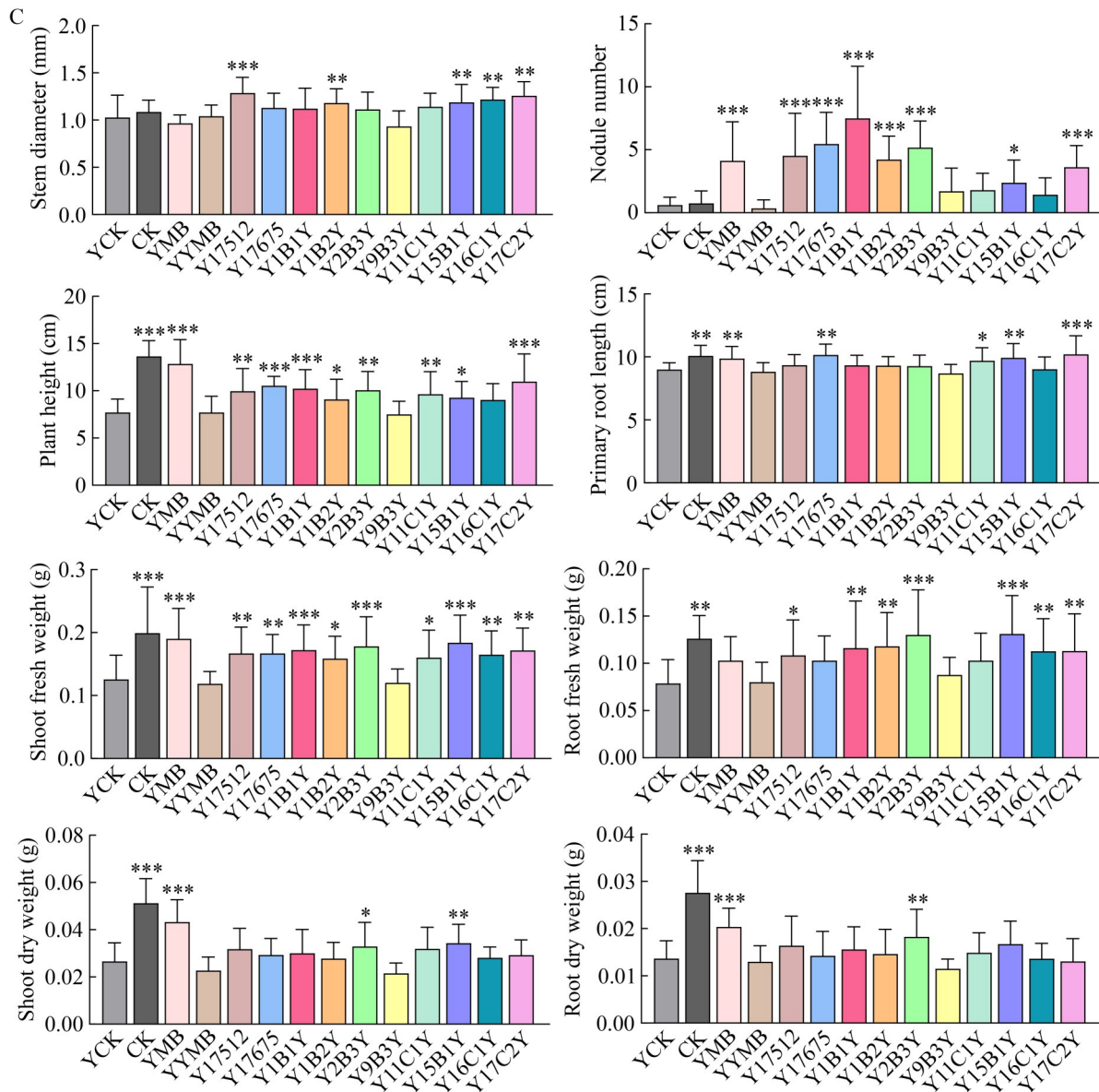


图4 施加不同根瘤菌剂的苜蓿盆栽试验表型与生长指标。A: 不同根瘤菌剂处理下苜蓿植株生长表型; B: 根瘤菌剂处理下苜蓿根系形态, 椭圆状阴影为根瘤; C: 不同根瘤菌剂处理下苜蓿农艺性状统计(包括鲜重、干重、根长、结瘤数等)。显著性分析相较于盐水对照(YCK), *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$ 。CK: 清水对照; YCK: 盐水胁迫+未接菌对照; YMB: 培养基对照; YYMB: 盐水胁迫+YMB培养基对照; Y17675、Y2B3Y等: 盐水胁迫+对应菌株处理。

Figure 4 Phenotype and growth index of alfalfa in pot experiment with different rhizobium agents. A: Alfalfa plant growth phenotype under different rhizobia treatment; B: Root morphology of alfalfa treated with rhizobia, elliptical shadow is nodule; C: The statistics of alfalfa agronomic traits (including fresh weight, dry weight, root length, nodulation number, etc.) under different rhizobia treatments. The significance analysis compared with the saline control (YCK), *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$. CK: Water control; YCK: Saline stress+uninoculated bacteria control; YMB: Medium control; YYMB: Saline stress+YMB medium control; Y17675, Y2B3Y, etc.: Saline stress+corresponding strain treatment.

表3 菌株促生功能特征

Table 3 Characteristic of growth-promoting functions of strains

菌株 Strain	固氮 Nitrogen fixation	解有机磷 Organic-phosphate solubilization	解无机磷 Inorganic-phosphate solubilization	解钾 Potassium solubilization	铁载体 Siderophore production	吲哚-3-乙酸 IAA (mg/L)	胞外多糖 Exopolysaccharide (g/L)
1B1Y	+	-	-	+	-	63.4±1.2	2.379±0.117
1B2Y	+	-	-	+	-	61.3±10.0	2.130±0.052
2B3Y	+	+	-	+	+	58.9±3.4	0.500±0.018
9B3Y	+	+	-	+	+	67.5±10.7	1.166±0.118
11C1Y	+	+	-	+	+	49.0±9.7	0.551±0.018
15B1Y	+	+	-	+	-	56.0±4.4	2.320±0.074
16C1Y	+	+	-	+	-	61.1±2.6	2.684±0.051
17C2Y	+	+	-	+	+	57.0±2.2	0.730±0.029

+: 阳性; -: 阴性; 数值=平均数±标准差, $n=3$ 。

+: Positive; -: Negative; Value=mean±SD, $n=3$ 。

解有机磷能力; 所有菌株均无解无机磷能力。解钾特性方面: 8株菌株均具有解钾能力。铁载体与酶活性方面: 2B3Y、9B3Y、11C1Y、17C2Y可产生铁载体。IAA与胞外多糖方面: 各菌株IAA分泌量介于49.0–67.5 mg/L, 其中9B3Y最高(67.5 mg/L); 胞外多糖含量为0.500–2.684 g/L, 16C1Y最高(2.684 g/L)。

3 讨论

3.1 菌株分离结果与地域适应性分析

目前研究表明与苜蓿共生结瘤的根瘤菌主要分布于 *Sinorhizobium*、*Rhizobium*、*Pararhizobium*、*Shinella*、*Neorhizobium* 5个属的20余个有效种中, 其中 *Sinorhizobium* 属内的2种(*Sinorhizobium meliloti* 和 *Sinorhizobium medicae*)为优势核心种, 占我国已分离苜蓿根瘤菌的80%–90%, 且在不同生态区存在遗传群分化^[21]。本研究从内蒙古6个采样点的苜蓿根瘤中分离得到250株细菌分离物, 其中根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)占比高达90.8%, 这可能与内蒙古独特的气候(昼夜温差大、冬季寒冷)和土壤类型(栗钙土、棕钙土)密切相关。已有研究指出, 土壤微生物分布具有显著的地域特异性, 不同生态环境会筛选出功能适配的菌株^[6-7]。本

研究中根瘤菌的高占比印证了 *Sinorhizobium meliloti* 对内蒙古盐渍化根际微环境的良好适应性, 也说明该地区苜蓿根瘤存在稳定的优势根瘤菌种群, 为后续筛选高效菌株奠定了资源基础。

与新疆、宁夏等盐渍化地区的研究相比, 本研究分离的菌株在促生功能上呈差异化分布。已有研究表明, 新疆地区的解磷菌株资源较为丰富^[22], 而本研究中的8株高效菌株未表现出解无机磷的能力, 但都能有效解钾, 其中6株(2B3Y、9B3Y等)具有解有机磷的功能。该功能谱为区域专用菌剂的精准开发提供了靶点。

3.2 菌株促生机制与盐胁迫缓解效果

对8株高效结瘤菌株的促生功能测定结果显示, 其核心促生机制可归纳为3类。

3.2.1 养分供应优化

所有菌株均具备固氮潜力, 可与苜蓿形成共生关系, 在缺氮盐渍化土壤中与苜蓿共生为宿主提供氮源; 同时, 全部具备解钾能力, 能将土壤中难溶性钾转化为有效钾, 缓解盐胁迫下苜蓿的钾离子吸收障碍^[5]。此外, 部分菌株(如2B3Y)的解有机磷能力可提升土壤有机磷利用率, 进一步补充养分。

3.2.2 植物激素调节

八株菌株的 IAA 分泌量在 49.0–67.5 mg/L 之间, 其中 9B3Y 等分泌量最高。IAA 作为关键植物激素, 可促进苜蓿根系生长(如主根伸长、侧根增多), 增强根系对水分与养分的吸收能力, 这也是 9B3Y 在种子萌发试验中显著提升根长的重要原因^[16]。

3.2.3 盐胁迫抵御

16C1Y 的胞外多糖含量最高(2.684 g/L), 胞外多糖可在根系表面形成保护膜, 减少盐离子渗透与积累, 降低离子毒害^[5]; 而 2B3Y、9B3Y 等菌株产铁载体的特性能增强苜蓿对铁元素的吸收, 缓解盐胁迫下的铁缺乏症状, 同时提升植株抗氧化能力, 减少氧化损伤^[15]。

耐盐盆栽试验进一步验证了菌株的实际应用价值: 在 0.4% NaCl 胁迫下, 2B3Y 处理组苜蓿地上部鲜重较盐水对照组增长 29.6%, 且茎粗、结瘤数等指标均显著提升, 说明该菌株能有效缓解盐胁迫造成的产量损失。与当前使用广泛的生产菌株(ACCC 17512、ACCC 17675)相比, 2B3Y 在根长、地下部鲜重等指标上表现更优, 凸显其在促进苜蓿根系发育、增强抗逆性方面的优势, 具备开发为本地化菌剂的潜力。

3.3 研究局限与未来方向

本研究仍存在 2 点局限: (1) 菌株筛选仅基于实验室与盆栽条件, 未开展田间试验验证, 实际应用中可能受自然气候(如干旱、低温)影响, 需进一步通过田间小区试验评估其稳定性; (2) 对菌株促生机制的研究较浅, 仅测定了宏观功能指标, 未深入分析关键功能基因的表达特征, 难以揭示其分子层面的耐盐促生机制。

未来研究可围绕 2 方面展开: (1) 以 2B3Y 为核心菌株开展不同盐渍化程度土壤的田间试验, 优化菌剂的施用剂量与方式(如拌种、灌根); (2) 通过基因组测序与转录组分析挖掘菌株的耐盐与促生关键基因, 明确其分子机制, 为菌株的基因工程改造(如增强耐盐基因表达)提供靶点。

4 结论

本研究从内蒙古盐渍化土壤的苜蓿根瘤中筛选获得 8 株高效耐盐促生根瘤菌, 其中菌株 2B3Y 表现最优。该菌株具备固氮、解有机磷、解钾、产铁载体与高 IAA 分泌能力, 能显著缓解 0.4% NaCl 胁迫对苜蓿种子萌发(提升活力指数、根长)与植株生长(增加地上部鲜重、结瘤数)的抑制作用。该菌株适配内蒙古盐渍化土壤的生态与养分特点, 可作为核心菌株开发本地化微生物菌剂, 为该地区苜蓿产业可持续发展与盐渍化土壤改良提供重要支撑。

作者贡献声明

郑杜翔: 实验设计、数据收集、数据分析、初稿撰写、论文修改; 魏杰: 样品采集、实验指导; 闫伊茹: 样品采集、数据收集与监管; 刘长涛: 样品采集、执行调研; 闫睿智: 样品采集、材料收集; 张晓霞: 试验设计、实验指导、审阅、论文修改。

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] HUANG JH, HUANG TY, CHEN J, LI GQ, WANG ZJ, HUO N. Nematode community characteristics indicate soil restoration under different revegetation approaches in the semiarid area of the Chinese Loess Plateau[J]. *Forests*, 2023, 14(9): 1886.
- [2] 田德龙, 侯晨丽, 徐冰, 任杰, 张琛. 分枝期水盐胁迫对紫花苜蓿生长及生理特征的影响[J]. *灌溉排水学报*, 2023, 42(4): 8-14.
TIAN DL, HOU CL, XU B, REN J, ZHANG C. Combined effect of water and salt stress on growth and physiological traits of alfalfa at branching stage[J]. *Journal of Irrigation and Drainage*, 2023, 42(4): 8-14 (in Chinese).
- [3] TRIFONOVA NA, KAMYSHINSKY R, COBA deLa PEÑA T, KOROLEVA MI, KULIKOVA O, LARA-DAMPIER V, PASHKOVSKIY P, PRESNIAKOV M, PUEYO JJ, LUCAS MM, FEDOROVA EE. Sodium accumulation in infected cells and ion transporters mistargeting in nodules of *Medicago truncatula*: two ugly items that hinder coping with salt stress effects[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(18): 10618.

- [4] 杨劲松, 姚荣江, 王相平, 谢文萍, 张新, 朱伟, 张璐, 孙瑞娟. 防止土壤盐渍化, 提高土壤生产力[J]. 科学, 2021, 73(6): 30-34, 2, 4.
YANG JS, YAO RJ, WANG XP, XIE WP, ZHANG X, ZHU W, ZHANG L, SUN RJ. Halt soil salinization, boost soil productivity[J]. *Science*, 2021, 73(6): 30-34, 2, 4 (in Chinese).
- [5] MISHRA P, MISHRA J, ARORA NK. Plant growth promoting bacteria for combating salinity stress in plants-recent developments and prospects: a review[J]. *Microbiological Research*, 2021, 252: 126861.
- [6] 陈燕鸿, 蔺红苹, 徐苏琪, 邱雨春, 李双羽, 李嘉怡, 卢冬梅. 植物根际促生菌的筛选及其耐盐促生效果[J]. 微生物学报, 2025, 65(1): 150-168.
CHEN YH, LIN HP, XU SQ, QIU YC, LI SY, LI JY, LU DM. Screening of plant growth-promoting rhizobacterium with salt tolerance from rhizosphere[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(1): 150-168 (in Chinese).
- [7] CAO CY, TAO S, CUI ZB, ZHANG Y. Response of soil properties and microbial communities to increasing salinization in the meadow grassland of Northeast China[J]. *Microbial Ecology*, 2021, 82(3): 722-735.
- [8] 杜普旋, 陈荣华, 邓权清, 鲁清, 刘浩, 范呈根, 李少雄, 洪彦彬. 花生根瘤菌的分离筛选及应用[J]. 南方农业学报, 2023, 54(1): 102-109.
DU PX, CHEN RH, DENG QQ, LU Q, LIU H, FAN CG, LI SX, HONG YB. Isolation, screening and application of peanut rhizobia[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2023, 54(1): 102-109 (in Chinese).
- [9] SHARMA M, MALLUBHOTLA S. Diversity, antimicrobial activity, and antibiotic susceptibility pattern of endophytic bacteria sourced from *Cordia dichotoma* L.[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 879386.
- [10] 宋丹萍, 吴航玉, 王亚婷, 杜焰玲, 胡骥, 陈镜霖, 余秀梅, 张玉婷, 崔永亮. 花生根瘤菌的分离鉴定及对重金属的抗性研究[J]. 湖南农业科学, 2024(10): 17-22, 30.
SONG DP, WU HY, WANG YT, DU YL, HU J, CHEN JL, YU XM, ZHANG YT, CUI YL. Peanut rhizobia: isolation, identification, and characterization of resistance to heavy metals[J]. *Hunan Agricultural Sciences*, 2024(10): 17-22, 30 (in Chinese).
- [11] 梁静. 黄河三角洲野大豆根瘤菌多样性及耐盐促生菌株筛选[D]. 北京: 中国农业科学院, 2021.
LIANG J. Diversity of rhizobia from *Glycine soja* in the yellow river delta and screening of salt-tolerant and growth-promoting strains[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2021 (in Chinese).
- [12] 孟超楠, 赵玉洁, 陈佳欣, 张旖璐, 王彦佳, 冯丽荣, 孙玉刚, 郭长虹. 2株青贮玉米根际固氮菌的筛选鉴定及促生作用研究[J]. 草业学报, 2024, 33(3): 174-185.
MENG CN, ZHAO YJ, CHEN JX, ZHANG YL, WANG YJ, FENG LR, SUN YG, GUO CH. Screening and identification of two strains of nitrogen-fixing bacteria from the silage maize rhizosphere and their roles in plant growth promotion[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2024, 33(3): 174-185 (in Chinese).
- [13] 陈苏, 简敏菲, 张晓, 黄文新, 付学琴. 东乡野生稻根际促生菌分离筛选及其促生作用的研究[J]. 中国土壤与肥料, 2022(10): 222-230.
CHEN S, JIAN MF, ZHANG X, HUANG WX, FU XQ. Isolation, screening, and growth-promoting characteristics of plant growth promoting rhizobacteria in the rhizosphere of Dongxiang wild rice[J]. *Soil and Fertilizer Sciences in China*, 2022(10): 222-230 (in Chinese).
- [14] 杨金新, 王璐, 覃天涵, 段莹泽, 韦靖, 李佳慧, 朱英芝, 李战彪. 水稻内生菌 *Acinetobacter soli* JKDY-3 分离鉴定及其促生作用[J]. 南方农业学报, 2025, 56(5): 1486-1497.
YANG JX, WANG L, QIN TH, DUAN YZ, WEI J, LI JH, ZHU YZ, LI ZB. Isolation and identification of an endophytic *Acinetobacter soli* JKDY-3 from rice and its plant growth-promoting effects[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2025, 56(5): 1486-1497 (in Chinese).
- [15] 热孜亚·吐尔逊. 鄯善地区黑果枸杞根际微生物特征及耐盐促生菌的筛选和促生特性研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆师范大学, 2022.
Reziwa·Tuerxun. Characteristics of rhizosphere microorganisms and screening and growth promoting+ characteristics of salt tolerant growth promoting bacteria of *Lycium ruthenicum* in Shanshan area[D]. Urumqi: Xinjiang Normal University, 2022 (in Chinese).
- [16] 郭英, 杨萍, 张丹雨, 刘莹莹, 马莲菊, 卜宁. 野大豆多功能根际促生菌的筛选鉴定和促生效果研究[J]. 生物技术通报, 2018, 34(10): 108-115.
GUO Y, YANG P, ZHANG DY, LIU YY, MA LJ, BU N. Screening, identification and growth-promoting effect of multifunction rhizosphere growth-promoting strain of wild soybean[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2018, 34(10): 108-115 (in Chinese).
- [17] 殷爱华, 韩素芬. 豆科树种凝集素和根瘤菌胞外多糖结合反应与结瘤的关系[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2005, 29(5): 88-90.
YIN AH, HAN SF. Relationship of nodulation with reactions of letins of leguminous trees with EPS of *Rhizobium*[J]. *Journal of Nanjing Forestry University*, 2005, 29(5): 88-90 (in Chinese).
- [18] 谢心文, 门磊, 孙怡, 顾喆, 寇佳怡, 魏溪垚. 蒽酮-硫酸法测定复方木鸡颗粒中粗多糖[J]. 中成药, 2019, 41(7): 1685-1687.
- [19] LI D, CHEN WM, LUO W, ZHANG HF, LIU Y, SHU DT, WEI GH. Seed microbiomes promote *Astragalus mongholicus* seed germination through pathogen suppression and cellulose degradation[J]. *Microbiome*, 2025, 13(1): 23.
- [20] 黄燕芬. 琉璃草种子发芽检验标准化研究[J]. 种子, 2009, 28(8): 121-123.
HUANG YF. Studies on standardized method of *Cynoglossum zeylanicum* seed germination testing[J]. *Seed*, 2009, 28(8): 121-123 (in Chinese).
- [21] HARRISON TL. Population genomics of the *Medicago lupulina* and *Ensifer* mutualism in North America[J]. *Molecular Ecology*, 2022, 31(19): 4872-4888.
- [22] 王继莲, 王冬玲, 周茜, 张甜, 李明源. 盐碱地旱生芦苇根际解磷菌株筛选及促生特性[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(1): 64-74.
WANG JL, WANG DL, ZHOU Q, ZHANG T, LI MY. Screening and growth-promoting characteristics of phosphorus-solubilizing strains from the rhizosphere of *Phragmites australis* in saline-alkali soil[J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2024, 40(1): 64-74 (in Chinese).