植物营养与肥料学报 2012,18(1):210-217
Plant Nutrition and Fertilizer Science

田菁茎瘤固氮根瘤菌对小麦种子侵染的促生作用及其在根系内的定殖

刘华伟[1,2], 孙 超[1,2], 杨 呼[1,2], 林晓军[1,2], 郭蔼光[1,2*]
(1 西北农林科技大学生命科学学院,陕西杨凌 712100;
2 旱区作物逆境生物学国家重点实验室,陕西杨凌 712100)

摘要: 选取8个常见小麦品种,通过室内限菌试验筛选出对于田菁茎瘤固氮根瘤菌 *Azorhizobium caulinodans* ORS571 (*A. caulinodans*) 侵染响应敏感的品种,研究了浸种侵染、菌液浓度和添加葡萄糖对接菌小麦幼苗生长的影响,并结合荧光显微镜检测绿色荧光蛋白(GFP)标记 *A. caulinodans* 在小麦幼苗根系内的分布与定殖规律。结果表明:小偃22为响应敏感品种;在室内限菌条件下,浸种侵染小偃22幼苗平均根长和平均株高分别较对照增加了17.04%和8.37%;最适菌液浓度为 1.0×10^8 个/mL;在菌液中添加1 g/L 葡萄糖有助于 *A. caulinodans* 浸种侵染和定殖。荧光显微镜检测结果显示,GFP 标记 *A. caulinodans* 从小麦幼苗根毛和侧根裂隙处进入,定殖于根维管组织等部位。田间试验结果进一步表明 *A. caulinodans* 浸种侵染对不同小麦品种均具较明显的促生作用。

关键词: 田菁茎瘤固氮根瘤菌; 小麦; 侵染; 促生作用
中图分类号: S154.38+1　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1008-505X(2012)01-0210-08

Promotion for wheat growth and root colonization after infecting wheat seeds with *Azorhizobium caulinodans*

LIU Hua-wei[1,2], SUN Chao[1,2], YANG Hu[1,2], LIN Xiao-jun[1,2], GUO Ai-guang[1,2*]
(*1 College of Life Sciences, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;*
2 State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Common eight wheat cultivars were selected and the sensitive cultivars were screened out through gnotobiotic condition test in the laboratory after infecting of the *Azorhizobium caulinodans* ORS571 (*A. caulinodans*) to wheat seeds. Infection method of seed soaking, the density of *A. caulinodans* and adding glucose are also studied, and the colonization of green fluorescence protein (GFP)-labeled *A. caulinodans* in the wheat seedling were detected by fluorescence microscope. The results show that Xiaoyan22 is the most sensitive wheat cultivar to *A. caulinodans*, in the gnotobiotic condition the root length and shoot height are increased by 17.04% and 8.37% respectively compared to the control, the optimum dilution proportion of *A. caulinodans* is 1.0×10^8/mL, and it is helpful for the infection to add 1 g/L glucose in *A. caulinodans* PBS solution. With fluorescence microscope detection the result shows that GFP-labeled *A. caulinodans* infects from wheat seeding root hairs and lateral root fractures, and it can colonize in the vascular bundle of root. The field test shows that there is obvious promotion for wheat growth after infecting wheat cultivars seeds with *A. caulinodans*.

Key words: *Azorhizobium caulinodans*; wheat; infection; growth promotion

收稿日期: 2011-09-13　　**接受日期:** 2011-10-30
基金项目: 国家自然科学基金项目(30700489,31071870);陕西省科学技术研究发展计划项目(2010K02-12-2);西北农林科技大学基本科研业务费专项资金项目(QN2009067)资助。
作者简介: 刘华伟(1975—),男,陕西临潼人,副教授,从事非豆科作物内生固氮的研究。E-mail: bioche@nwsuaf.edu.cn
* 通讯作者 E-mail: guoaiguang@yahoo.com.cn

目前,在我国过度使用化肥以及由此引发的一系列环境等问题已引起了国内外普遍关注[1-3]。如果主要农作物能够实现生物固氮,减少对化肥的依赖,既节省能源,又保护环境,对农业的可持续发展将具有里程碑意义,对人类健康具有长远的重大影响[4]。

固氮菌除自生固氮、共生固氮外,还存在第三种生活形式: 与非豆科草本植物(水稻、小麦、玉米、高粱、油菜等)联合固氮(Associative Symbiotic Nitrogen Fixation)[5]。固氮菌能定殖于根表面或近根处土壤,部分还能定殖于植物组织内部,与宿主有密切联系但又不与其形成特化结构。联合固氮,可减少非豆科草本植物氮肥使用量,有利于降低农业生产成本,减轻化肥污染,保护生态环境。联合固氮菌还作为植物促生菌(Plant Growth Promoting Bacteria,PGPB),会分泌吲哚乙酸(IAA)等激素,可促进植物生长,增加产量,并对植物不造成病害,为非豆科草本植物尤其是禾本科作物的生物固氮拓宽了领域[6]。

田菁茎瘤固氮根瘤菌(*Azorhizobium caulinodans*, *A. caulinodans*)ORS571,能通过裂隙侵染方式诱导豆科植物毛萼田菁(*Sesbania rostrata*)根与茎结瘤固氮。由于其对氧浓度的要求较其他根瘤菌宽松,已用于禾本科作物生物固氮的研究[7]。本研究在室内限菌条件下利用绿色荧光蛋白(GFP)标记 *A. caulinodans* 侵染小麦种子,筛选对其敏感小麦品种,探索不同菌液浓度和添加葡萄糖对其浸种侵染效率的影响,利用荧光显微镜检测 GFP 标记 *A. caulinodans* 在小麦幼苗根中的定殖规律。田间试验结果表明 *A. caulinodans* 浸种侵染对不同小麦品种均具较明显的促生作用,为深入研究 *A. caulinodans* 与小麦互作机制,更好地将其应用于农业生产提供依据。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　小麦品种与菌株　小麦品种小偃22、小偃6号、西农979和陕253由西北农林科技大学农学院提供;绵阳19和郑引1号均由西北农林科技大学生命科学学院保存;周麦18和矮抗58为市售小麦种子。绿色荧光蛋白(GFP)标记 *A. caulinodans* 含 pHC60 质粒,TCR 由中国科学院植物研究所馈赠。

1.1.2　培养基与培养条件　TY 液体培养基(胰蛋白胨5 g/L,酵母粉 3 g/L,$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.88 g/L,pH 7.4)用于 *A. caulinodans* 的活化与扩培,28℃,220 r/m 培养至对数生长期备用。

YMA 固体培养基(甘露醇 10 g/L,酵母粉 3 g/L,K_2HPO_4 0.5 g/L,$MgSO4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g/L,NaCl 0.1 g/L,$CaCO_3$ 3g/L,琼脂粉 18 g/L,pH 7.0)用于从接菌小麦体内分离 *A. caulinodans* 和计数。

1.2　方法

1.2.1　种子处理及限菌培养　选取饱满、均匀一致的小麦种子,先用1%次氯酸钠浸泡 10 min,无菌水清洗3次;再用75%酒精浸泡 30s,无菌水冲洗3次,进行表面消毒。参照 Senthilkumar 方法将表面消毒的种子均匀置于大试管(高23cm,直径4cm)中已灭菌的琼脂-水固体培养基(琼脂粉 5g,蒸馏水 1000 mL)(以下简称培养基)表面,种沟朝下,胚朝向同一个方向,进行限菌培养[8,11]。培养条件(ZPW-280B 智能植物培养箱): 光照 16 h,光强 4 级,温度 25℃,相对湿度 46%;黑暗 8 h,光强 0 级,温度 18℃,相对湿度 37%。

1.2.2　敏感性品种筛选　室内条件下,将8个品种的小麦种子表面消毒,置于培养基上限菌培养,每管9粒,设4次重复。将培养至对数生长期的 *A. caulinodans* 于 50 mL 离心管中,8000 r/m 离心 10 min 收集菌体,用 PBS 缓冲液(KH_2PO_4 0.24 g/L,KCl 0.2 g/L,NaCl 8 g/L,Na_2HPO_4 1.44 g/L,pH 7.4)稀释,吸取 1 mL PBS 稀释菌液(约 1.0×10^8 个/mL)加入到培养基表面;平行对照接 1 mL PBS 缓冲液。培养条件同上,接菌后第 9 d 测量不同小麦品种幼苗根长与株高。

1.2.3　浸种侵染　室内条件下,预先进行种子处理和限菌培养。选取对 *A. caulinodans* 敏感品种小偃22种子,表面消毒后置于培养基上,每管9粒,设4次重复,在种子萌发前,吸取 1 mL PBS 稀释菌液(菌数约 1.0×10^8 个/mL)加入到培养基表面;平行对照接 1mL PBS 缓冲液。培养条件同上,接菌后第9d 测量幼苗根长与株高,并统计萌发的根数。

1.2.4　不同菌液浓度浸种侵染　室内条件下,预先进行种子处理和限菌培养。再将培养至对数生长期(菌数约 1.0×10^9 个/mL)的 *A. caulinodans* 离心收集菌体,用 PBS 缓冲液分别稀释为 1.0×10^9 个/mL、1.0×10^8 个/mL、1.0×10^7 个/mL、1.0×10^6 个/mL 四个不同浓度,分别加到培养基表面;平行对照接 1 mL PBS 缓冲液。培养条件同上,接菌后第 9 d 测量不同菌液浓度浸种侵染后小偃22幼苗根长与株高。

1.2.5　添加葡萄糖对浸种侵染的影响　室内条件下,预先进行种子处理和限菌培养。由于小麦种子

和 *A. caulinodans* 均接种在培养基上，为了避免浸种侵染早期 *A. caulinodans* 与小麦幼苗竞争利用小麦种子碳源而影响小麦幼苗生长，设置事先将葡萄糖添加于琼脂－水固体培养基中（1 L 培养基添加 1 g 葡萄糖）、将 1 g/L 葡萄糖添加到 PBS 稀释菌液（约 1.0×10^8 个/mL）中和不添加葡萄糖 3 种处理。吸取 1 mL PBS 稀释菌液（约 1.0×10^8 个/mL）加入大试管中培养基上；平行对照接 1 mL PBS 缓冲液。培养条件同上，接菌后第 9 d 测量小偃 22 幼苗根长与株高。

1.2.6 荧光显微镜检测和平板计数 选取接菌第 3 d、第 5 d、第 7 d、第 9 d 等不同时期的幼苗根进行表面消毒，将冲洗液放置于含 10 μg/mL 四环素的 YMA 固体培养基上，28℃ 培养，用于检测表面消毒是否彻底。然后徒手切片，制片，用荧光显微镜检测 GFP 标记 *A. caulinodans* 在小麦幼苗根组织内部的分布状况。离心收集菌体，用 PBS－甘油缓冲液（含 30% 甘油 PBS 缓冲液）稀释为 1.0×10^9 倍、1.0×10^8 倍、1.0×10^7 倍、1.0×10^6 倍，均匀涂布到含有 10μg/mL 四环素的 YMA 固体培养基，28℃ 倒置培养，每个梯度设 4 个重复，计算平板菌落的平均值。

1.2.7 田间试验 田间试验采用 6 个小麦品种（表 1）。将培养至对数生长期的 *A. caulinodans* 菌液用无菌水稀释成 1.0×10^8 个/mL，向其中添加 KH_2PO_4 0.5 g/L，1% $(NH_4)_2Mo_2O_7\cdot4H_2O$ 1 mL/L 和吐温 20 50 mL/L，采用淀粉与无菌水稀释菌液混合后均匀拌种。同等条件下以无菌水替代 *A. caulinodans* 与淀粉混合后均匀拌种，作为平行对照，室温下阴干备用。

试验于 2010～2011 年度在西北农林科技大学试验田中进行。前茬为夏闲地，地势平坦，肥力中等，土壤中有机质含量 14.5 g/kg，速效氮 38.7 mg/kg，速效磷 11.2 mg/kg，速效钾 120.0 mg/kg，灌溉方便。每个小麦参试品种设置 4 个处理和 4 个对照，采用随机区组排列，行距 15 cm，小区面积 10 m^2（2 m×5 m），划分保护行。其他田间管理同高产大田。

试验数据采用 Excel 和 SPSS 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 小麦 8 个品种对 *A. caulinodans* 的敏感性差异

室内限菌条件下，*A. caulinodans* 对 8 个品种小麦幼苗均具有促生作用，但不同品种对 *A. caulinodans* 的敏感程度不同。接菌后第 9d 测量处理与对照小麦幼苗根长和株高（图 1），对根长经过正态性检验，其数据符合正态性分布，通过最小显著差异法（LSD）检验，得出绵阳 19、小偃 6、西农 979 和小偃 22 的 P 值分别为 0.030、0.002、0.007 和 0.008，在 0.05 水平上差异显著。对株高经过正态性检验，其数据符合正态分布，通过最小显著差异法（LSD）检验，得出小偃 22 和绵阳 19 的 P 值分别为 0.032 和 0.007，在 0.05 水平上差异显著。综合以上分析，以小偃 22 差异最显著，接菌后幼苗平均根长较对照增加了 14.94%，平均株高较对照增加了 9.38%，可作为首选试验品种用于深入研究 *A. caulinodans* 与小

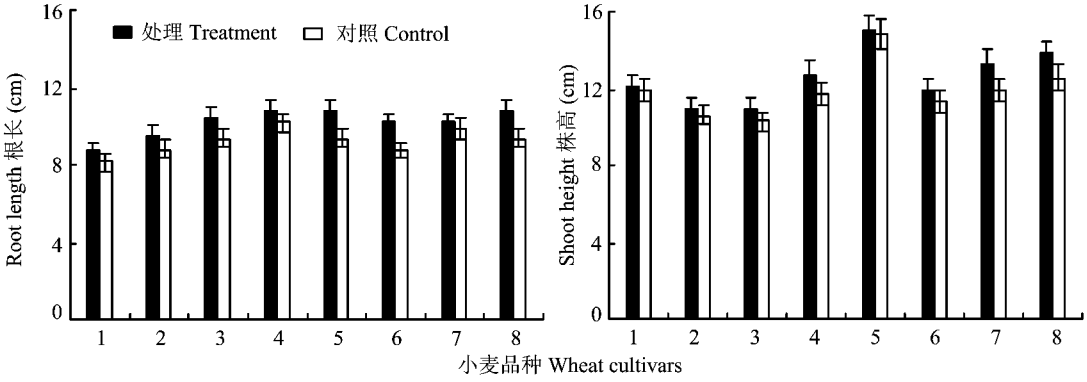

图 1 *A. caulinodans* 浸种侵染 8 个小麦品种后第 9d 小麦幼苗根长与株高

Fig. 1 Seeding root lengths and shoot heights of eight wheat cultivars after 9 days of infection with *A. caulinodans*

［注（Note）：1—郑引 1 号 Zhengyin1；2—矮抗 58 Aikang 58；3—小偃 6 号 Xiaoyan 6；4—陕 253 Shan 253；5—绵阳 19 Mianyang19；6—西农 979Xinong 979；7—周麦 18 Zhuomai18；8—小偃 22 Xiaoyan 22.］

麦相互作用的分子机制。

2.2　浸种侵染 *A. caulinodans* 对小麦幼苗生长的影响

室内限菌条件下,用 PBS 稀释 *A. caulinodans* 菌液(约 1.0×10^8 个/mL)浸种侵染小偃22,接菌后第 9 d 统计小偃22 幼苗根长、萌发根数和株高结果显示,浸种侵染后小麦幼苗萌发 5 和 6 个根的比例明显增加,萌发 3 和 4 个根的比例下降(图 2)。平均根长较对照增加了 17.04%,平均株高较对照增加了 8.37%(图 3),表明 *A. caulinodans* 浸种侵染对小麦种子生根萌发和幼苗生长具明显促生作用。

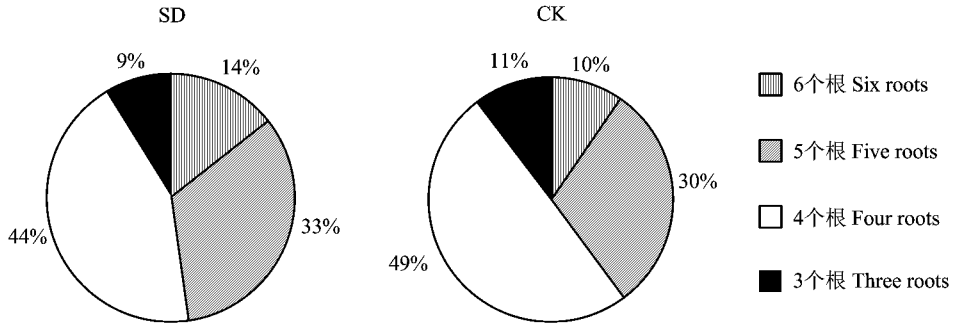

图 2　*A. caulinodans* 浸种侵染小偃 22 后第 9d 小麦幼苗的萌发根数

Fig. 2　The number of wheat seedling roots after 9 days of infection with *A. caulinodans*

[注(Note): SD—浸种侵染 Infection seeds with *A. caulinodans*; CK—对照 Control.]

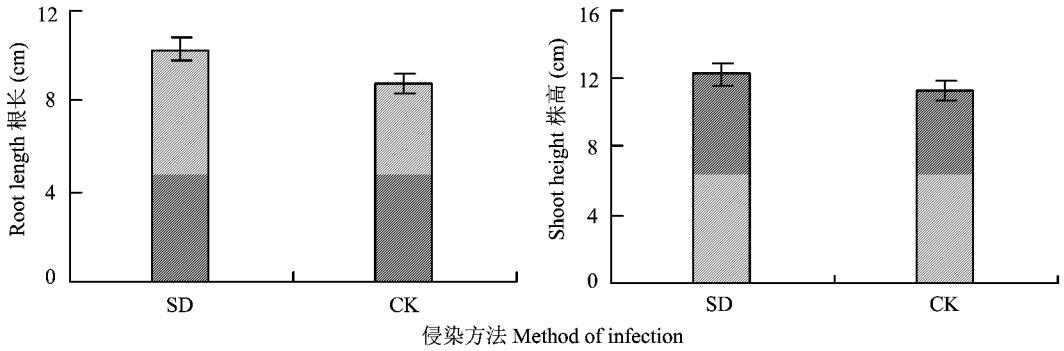

图 3　*A. caulinodans* 浸种侵染小偃 22 后第 9d 小麦幼苗根长与株高

Fig. 3　The root lengths and shoot heights of wheat seedlings after 9 days of infecting with *A. caulinodans*

[注(Note): SD—浸种侵染 Infection seeds with *A. caulinodans*; CK—对照 Control.]

2.3　不同菌液浓度浸种侵染对小麦幼苗生长的影响

用 PBS 缓冲液将扩培至对数生长期的 *A. caulinodans* (约 1.0×10^9/mL) 分别稀释为 1.0×10^9 个/mL (A)、1.0×10^8 个/mL (B)、1.0×10^7 个/mL (C)、1.0×10^6 个/mL (D)。室内限菌条件下,用 4 个不同浓度菌液浸种侵染小偃 22,接菌后第 9 d 测量结果显示,A、B、C 和 D 幼苗平均根长较对照分别增加了 7.82%、20.11%、17.14% 和 14.87%,B、C 和 D 平均株高较对照分别增加了 22.48%、12.51%、11.93%,但是在 A 浓度下平均株高较对照降低了 3.27%(图 4),表明过高的菌浓度浸种侵染对小麦幼苗生长具抑制作用,菌液浓度菌数为 1.0×10^8 个/mL 最适于浸种侵染。

2.4　添加葡萄糖对 *A. caulinodans* 浸种侵染小麦幼苗生长的影响

在琼脂-水固体培养基中添加浓度为 1 g/L 的葡萄糖,对小麦幼苗根的伸长具明显抑制作用;未添加葡萄糖浸种侵染后的幼苗平均根长较对照仅增加了 5.84%,平均株高较对照增加了 18.65%。但是在 *A. caulinodans* 菌液中添加 1 g/L 葡萄糖,浸种侵染后幼苗平均根长较对照增加了 8.65%,平均株高较对照增加了 23.24%,促生效果更加明显(图 5)。表明添加葡萄糖对 *A. caulinodans* 浸种侵染小麦后的促生效果具有辅助作用。

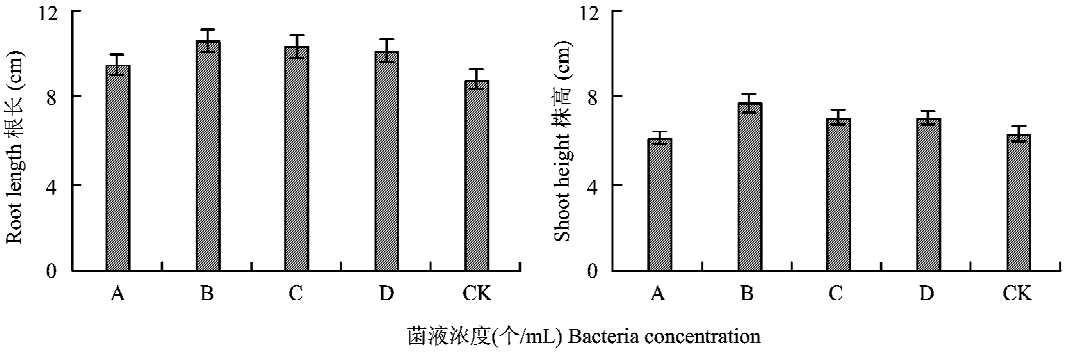

图4 不同浓度 *A. caulinodans* 菌液浸种侵染小偃22后第9d小麦幼苗根长与株高

Fig. 4 The root lengths and shoot heights of wheat seedlings after 9 days of infecting with *A. caulinodans*

[注(Note): A—1.0×10^9 个/mL; B—1.0×10^8 个/mL; C—1.0×10^7 个/mL; D—1.0×10^6 个/mL; CK—对照 Control.]

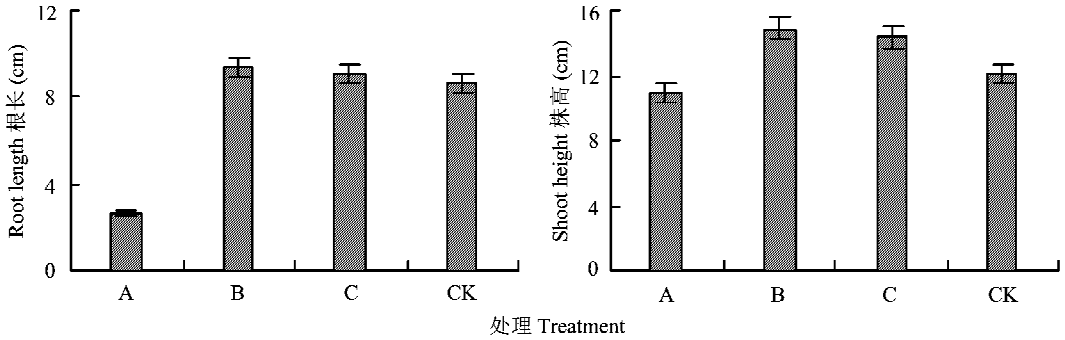

图5 葡萄糖与 *A. caulinodans* 组合浸种侵染小偃22后第9 d小麦幼苗根长和株高

Fig. 5 The root lengths and shoot heights of wheat seedlings after 9 days of infecting with *A. caulinodans*

[注(Note): A—在培养基中添加葡萄糖 Adding glucose in the culture before infection; B—在稀释菌液中添加葡萄糖 Adding glucose in the *A. caulinodans* solution before infection; C—未添加葡萄糖 No glucose adding before infection; CK—对照 Control.]

2.5 荧光显微镜检测 GFP 标记 *A. caulinodans* 在小麦幼苗根中的定殖

利用荧光显微镜检测浸种侵染小麦幼苗根中的 GFP 标记 *A. caulinodans*。结果显示,与对照(图6A)相比,*A. caulinodans* 可通过根毛和侧根裂隙(图6C)进入根部组织,在根维管组织和细胞间隙定殖(图6B)。对检测到 GFP 标记 *A. caulinodans* 组织进行表面消毒,研磨后进行平板计数,根部 *A. caulinodans* 为 2.4×10^7,再次表明 *A. caulinodans* 可在小麦根组织内部定殖。

2.6 田间试验与统计

在同等栽培条件下, *A. caulinodans* 浸种侵染除

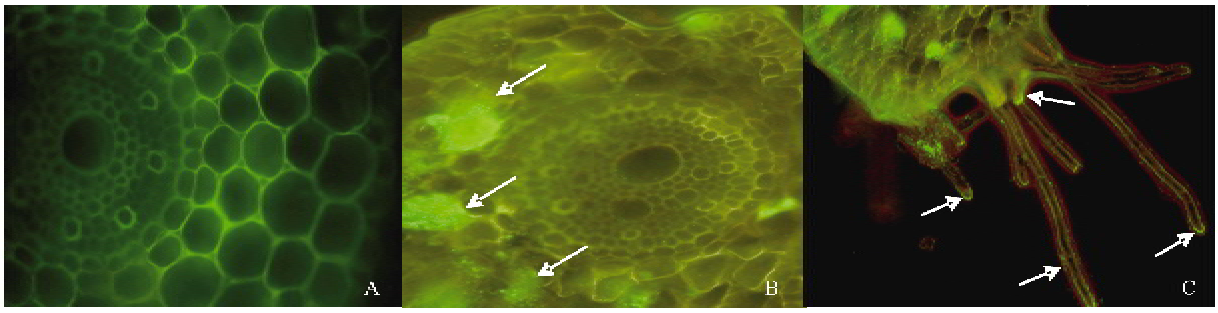

图6 GFP 标记 *A. caulinodans* 在小偃22幼苗根内定殖荧光显微镜图

Fig. 6 Colonization of GFP-labeled *A. caulinodans* in roots of wheat seedling by fluorescence microscope

[注(Note): A—对照根部横切 The root cross-section of CK; B—处理根部横切 The root cross-section of treat; C—处理根毛 The root hairs of treat.]

周麦 18 与对照间产量差异不大外,其他 5 个参试品种 *A. caulinodans* 浸种侵染较对照实际产量均有增加,小偃 22 增产 1273 kg/hm^2,小偃 6 号增产 979 kg/hm^2,西农 979 增产 772 kg/hm^2,矮抗 58 增产 535 kg/hm^2,绵阳 19 增产 265 kg/hm^2。小偃 22 和小偃 6 号 *A. caulinodans* 浸种侵染与对照相比成穗数、穗粒数和千粒重差异显著,进行 SPSS 单因素方差分析结果,经 *F* 检验在 0.05 水平上差异显著。其中小偃 22 各项指标增长最为明显,千粒重较对照增加了 3.5 g,产量较对照增加了 23.82%(表 1)。

表 1　小麦产量及构成要素

Table 1　Wheat yield and yield components

小麦品种 Wheat cultivar	处理 Treatment	穗数 Number of spike ($\times 10^4$/hm^2)	穗粒 Grains per spike (No./spike)	千粒重 1000-grain weight (g)	实际产量 Actural yield (kg/hm^2)
小偃 22 Xiaoyan 22	CK	599.5 b	40.8 b	43.7b	5345b
	SD	626.7 a	44.8 a	47.2a	6618 a
小偃 6 号 Xiaoyan 6	CK	789.5 b	26.5 b	39.6b	4135 b
	SD	802.8 a	30.7 a	41.5a	5114 a
矮抗 58 Aikang 58	CK	839.3 a	32.8 a	45.1 a	6218 a
	SD	910.3 b	32.8 b	45.2 b	6753 b
西农 979 Xinong 979	CK	663.3 a	39.1 a	41.7 a	5404 a
	SD	726.5 b	38.3 b	44.4 b	6176 b
周麦 18 Zhoumai 18	CK	920.8 a	31.5 a	47.7 a	6908 a
	SD	928.5 b	30.8 b	48.2 b	6889 b
绵阳 19 Mianyang 19	CK	720.8 a	27.1 a	47.7 a	4660 a
	SD	669.5 b	30.4 b	48.4 b	4925 b

注(Note):SD—浸种侵染 Infection seeds with *A. caulinodans*. 同列数据后不同小写字母表示同一品种处理间差异达 5% 显著水平 Values followed by different letters in a column are significant between treatments in the same cultivar at the 5% level.

3　讨论

3.1　*A. caulinodans* 浸种侵染小麦体系的优化

植物与细菌的相互作用具有种属专一性,某些细菌的基因型与一定基因型的植物品种间存在最佳配合[9-10]。结合农业生产实际,高效浸种侵染体系的建立与联合固氮菌在非寄主植物中定殖与迁移能力密切相关,较高的细菌群体密度可弥补联合固氮菌在非寄主植物中有限的定殖能力。

本研究室内限菌试验与田间试验结果一致表明小偃 22 为对 *A. caulinodans* 敏感的小麦品种;通过优化菌液浓度、添加外源葡萄糖等措施,优化了室内限菌条件下 *A. caulinodans* 浸种侵染小麦的体系;结合大田实际,在 *A. caulinodans* 菌液中添加钼元素以增强 *A. caulinodans* 固氮酶的活性,添加吐温 20、淀粉等措施使菌液与小麦种子充分混合均匀,室温阴干,建立了大田条件下 *A. caulinodans* 侵染小麦体系,对于进一步深入研究 *A. caulinodans* 与小麦相互作用的分子机制,更好地将其应用于农业生产实际具有重要意义。

3.2　*A. caulinodans* 在小麦幼苗根系内的定殖

联合固氮菌可从伤口和自然开口(侧根裂隙、气孔、茎皮孔)侵染非豆科植物,定殖于根的表皮、皮层和维管系统的细胞间隙和细胞内,形成生态小境[11]。迟峰等研究表明定殖于植物根内的固氮菌可向上迁移,在水稻中可到达叶鞘和叶[12-13],在烟草中可到达茎、叶、甚至在生殖器官子房中也有固氮菌定殖[11]。刘元等研究了巴西固氮螺菌(*Azospirillum brasilense* Yu62)在玉米根中的定殖规律[14]。刘华伟等研究了巴西固氮螺菌(*Azospirillum brasilense* Yu62)在小麦体内的定殖规律及其促生作用[15]。

本研究利用荧光显微镜检测发现,小麦幼苗根与根围环境在 *A. caulinodans* 浸种侵染过程中扮演着重要角色。*A. caulinodans* 可通过根毛和侧根裂隙

侵入小麦根部,进入根维管束组织,并在维管束组织和细胞间隙中定殖,本研究结果与迟峰等、刘元等研究固氮菌在水稻、烟草、玉米等非豆科作物中的分布定殖规律一致[11,13-14]。

3.3 *A. caulinodans* 对小麦的促生作用

非豆科植物与联合固氮菌相互作用揭示了一个另一形式的固氮系统,联合固氮菌还可作为植物促生菌促进植物生长,增加产量,并不会对植物造成病害或伤害,从而为非豆科植物尤其是禾本科作物生物固氮提供了一个更广阔的研究领域。

迟峰等用 *A. caulinodans* 等根瘤菌侵染水稻、烟草种子,利用激光共聚焦显微镜检测到 GFP 标记根瘤菌作为联合固氮菌分布植物全身,并提高植物光合作用效率,促进植物生长。应用蛋白质组学方法研究表明接种固氮菌促进了水稻防御、光合、代谢等相关蛋白的表达,与光合作用和能量等相关一些蛋白表达显著上调[11,16]。Senthilkumar 等在迟峰工作基础上,利用 *A. caulinodans* 接种水稻,荧光显微镜检测结果表明 GFP 标记 *A. caulinodans* 遍布水稻各组织。接种 *A. caulinodans* 可显著提高水稻蛋白质含量、总氮量和固氮酶活力,生物质总量相比对照提高 5.4%～16%[8]。

聂延富、陈廷伟等利用低浓度的 2,4-D 诱发小麦根部产生瘤状结构(类根瘤),*A. caulinodans* 可侵染并在类根瘤内的细胞间隙和细胞内大量增殖,并向结瘤小麦提供 16%～23% 的氮素[17,7]。对 *A. caulinodans* 离体发酵培养验证其能产生吲哚乙酸(IAA)及赤霉素(GA)类物质[18]。潘佩平等初步研究了接种 *A. caulinodans* 泌铵型突变株对盆栽小麦生长的影响[19]。

田间试验研究结果显示 *A. caulinodans* 浸种侵染使小偃 22 穗数和穗粒数较对照增多 4.54% 和 9.80%、千粒重较对照增加 8.01%、产量较对照提高 1273 kg/hm^2,平均增产 23.82%,表明 *A. caulinodans* 浸种侵染对小偃 22 具有较明显的促生作用。但 *A. caulinodans* 在小麦体内定殖是否具有固氮作用? 如何提高 *A. caulinodans* 联合固氮的效率有待于进一步深入研究。

参考文献:

[1] Guo J H, Liu X J, hang Y *et al*. Significant acidification in major Chinese croplands[J]. Science, 2010, 327: 1008-1010.

[2] Mara Hvistendahl. China's push to add by subtracting fertilizer [J]. Science, 2010, 327: 801.

[3] Qiu J. Nitrogen fertilizer warning for China [J/OL]. Nature News, 2009, 090216. http://www.nature.com/news/2009/090216/full/news.2009.105.html.

[4] 荆玉祥, 王忆平. 非豆科作物的自主和共生结瘤固氮[A]. 第十八届全国生物固氮学术研讨会论文摘要汇编[C]. 湖北武汉: 中国微生物学会, 2009. 1-5.
Jing Y X, Wang Y P. Nitrogen fixation and symbiotic nodule formation in Non-legume crops[A]. Abstracts of the 18th Nitrogen fixation Conference of China[C]. Wuhan: Chinese Society for Microbiology, 2009. 1-5.

[5] 沈世华, 荆玉祥. 中国生物固氮研究现状和展望[J]. 科学通报, 2003, 48(6): 535-540.
Shen S H, Jing Y X. Present and prospect of nitrogen-fixing in China[J]. Chin. Sci. Bull., 2003, 48(6): 535-540.

[6] 李俊, 姜昕, 葛诚. 禾本科作物实现生物固氮的途径[J]. 世界农业, 1999, 248(12): 28-30.
Li J, Jiang X, Ge C. The ways to nitrogen fixation of gramineous crops[J]. World Agric., 1999, 248(12): 28-30.

[7] 陈廷伟, Siegfried S, Peter B. 固氮根瘤菌 *Azorhizobium* 在人工诱发小麦类根瘤中的固氮作用[J]. 中国科学 B 辑, 1992, 22(7): 712-716.
Chen T W, Siegfried S, Peter B. Nitrogen fixation of *Azorhizobium* in artificially induced root para-nodules in wheat [J]. Sci. China, Ser. B, 1992, 22(7): 712-716.

[8] Senthilkumar M, Madhaiyan M, Sundaram S P *et al*. Induction of endophytic colonization in rice (*Oryza sativa* L.) tissue culture plants by *Azorhizobium caulinodans* [J]. Biotechnol. Lett., 2008, 30: 1477-1487.

[9] Biswas J C, Ladha J K, Dazzo F B. Rhizobia inoculation improves nutrient uptake and growth of lowland rice[J]. Soil Sci. Soc. Am. J., 2000, 64: 1644-1650.

[10] Hφgslund N, radutoiu S, Krusell L *et al*. Dissection of symbiosis and organ development by integrated transcriptome analysis of Lotus japonicas mutant and wild-type plants[J]. PLoS ONE, 2009, 4(8): e6556.

[11] 迟峰. 根瘤菌在植物内的迁移运动及其与植物相互作用的蛋白质组学研究[D]. 北京: 中国科学院植物研究所博士学位论文, 2006.
Chi F. Migration of rhizobia in plants and proteome analysis of their interaction[D]. Beijing: PhD Dissertation, Institute of Botany, Chinese Academy of Science, 2006.

[12] Chi F, Shen S H, Cheng H P *et al*. Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology[J]. Appl. Environ. Microbiol., 2005, 71(11): 7271-7278.

[13] Ji K X, Chi F, Yang M F *et al*. Movement of rhizobia inside tobacco and lifestyle alternation from endophytes to free-living rhizobia on leaves[J]. J. Microbiol. Biotechnol., 2010, 20(2): 238-244.

[14] Liu Y, Chen S F, Li J L. Colonization pattern of *Azospirillum* brasilense Yu62 on maize roots[J]. Acta Bot. Sin., 2003, 45(6): 748-752.

[15] 刘华伟, 王庆贺, 张宏, 等. 巴西固氮螺菌 Yu62 的 EGFP 标

记及其在小麦体内的定殖研究[J].西北植物学报，2009，29(12)：2367-2372.
Liu H W, Wang Q H, Zhang H *et al*. Colonization of *Azospirillum brasilense* Yu62 in wheat via EGFP [J]. Acta Bot. Boreali-Occid. Sin., 2009, 29(12): 2367-2372.

[16] Chi F, Yang P F, Han F *et al*. Proteomic analysis of rice seedlings infected by Sinorhizobium meliloti 1021 [J]. Proteomics, 2010, (10): 1861-1874.

[17] 聂延富. 关于诱导无根瘤植物结根瘤的研究 - 化学因子 2,4-D 诱导根瘤菌在小麦上结根瘤[J].自然杂志，1983，6(5)：326-336.
Nie Y F. Artificially induced root para-nodules in non-nodulating plants-2,4-D inducing root para-nodules for rhizobia in wheat [J]. Nat. Mag., 1983, 6(5): 326-336.

[18] 杜寒春. 根瘤菌对禾本科作物生长的促进作用研究[D]. 南京：南京农业大学博士学位论文. 2005.
Du H C. The study on effects of rhizobium on cereal plants growth [D]. Nanjing: PhD Dissertation, Nanjing Agricultural University, 2005.

[19] 潘佩平，王桂兰，周鸿宾. 固氮根瘤菌 ORS571 泌铵型突变株的筛选和接种盆栽小麦试验[J].山西农业科学，2006，34(2)：54-56.
Pan P P, Wang G L, Zhou H B. Isolation of NH_4^+-excreting mutants of *Azorhizobium caulinodans* ORS571 and its inoculation experiment on potted wheat [J]. J. Shanxi Agric. Sci., 2006, 34(2): 54-56.