

DOI: 10.11686/cyxb2024102

http://cyxb.magtech.com.cn

杜媛媛, 康文娟, 师尚礼, 等. 外源激素对紫花苜蓿种子内生根瘤菌增殖及幼苗生长的影响. 草业学报, 2025, 34(2): 81-93.

DU Yuan-yuan, KANG Wen-juan, SHI Shang-li, *et al.* Effects of exogenous hormones on the proliferation of endophytic fluorescent labeled rhizobia in seeds and growth of the seedlings. *Acta Prataculturae Sinica*, 2025, 34(2): 81-93.

外源激素对紫花苜蓿种子内生根瘤菌增殖及幼苗生长的影响

杜媛媛, 康文娟*, 师尚礼*, 韩宜霖, 何富强

(甘肃农业大学草业学院, 草业生态系统教育部重点实验室, 中-美草地畜牧业可持续发展研究中心, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 紫花苜蓿根瘤的形成发育及幼苗生长受到多重植物激素的调控。激素对外源根瘤菌的增殖和促生效应已有研究, 但激素对内生根瘤菌的增殖及促生效应研究较少。因此, 筛选出对根瘤菌 SM12531f 生长有促进作用的 3-吲哚乙酸、6-苄氨基嘌呤和 28-高油菜素内酯的浓度, 然后用这 3 种浓度分别浸泡含有青色荧光蛋白标记的内生根瘤菌 SM12531f 的苜蓿种子并种植, 分析外源激素对苜蓿植株组织中内生根瘤菌数量、植株结瘤及植株生长的影响。结果表明, 3-吲哚乙酸、6-苄氨基嘌呤和 28-高油菜素内酯这 3 种激素的最适浓度分别为 $14 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $18 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $2.97 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。幼苗期对植株内生根瘤菌增殖、结瘤及生长有益的是 6-苄氨基嘌呤和 28-高油菜素内酯, 且前者的促进效果更明显, 前者内生根瘤菌在根部的定殖数量最多, 在稀释 100 倍时定殖数量为 $1167 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 、地上鲜重为 $1.99 \text{ g} \cdot \text{株}^{-1}$ 。同样在分枝期对植株有益的是 6-苄氨基嘌呤, 且内生根瘤菌在根部研磨液稀释 100 倍时定殖数量为 $833 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 、地上鲜重为 $5.03 \text{ g} \cdot \text{株}^{-1}$ 。因此, 对苜蓿内生根瘤菌增殖及苜蓿生长最适的激素是 $18 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 6-苄氨基嘌呤, 该发现对精准利用种子内生根瘤菌的结瘤固氮效应提供理论依据, 为紫花苜蓿-根瘤菌共生育种奠定了基础。

关键词: 内生根瘤菌; 增殖; 促生; 生长素; 细胞分裂素; 油菜素内酯

Effects of exogenous hormones on the proliferation of endophytic fluorescent labeled rhizobia in seeds and growth of the seedlings

DU Yuan-yuan, KANG Wen-juan*, SHI Shang-li*, HAN Yi-lin, HE Fu-qiang

Pratacultural College, Gansu Agricultural University, Key Laboratory of Grassland Ecosystem of Ministry of Education, Sino-U. S. Centers for Grazing Land Ecosystem Sustainability, Lanzhou 730070, China

Abstract: The formation, development, and seedling growth of alfalfa nodules are regulated by multiple plant hormones. The proliferation and growth promoting effects of hormones on exogenous rhizobia have been studied, but there is relatively little research on the proliferation and growth promoting effects of hormones on endogenous rhizobia. To address this knowledge gap, three concentrations of 3-indoleacetic acid (IAA), 6-benzylaminopurine (6-BA), and 28-homobrassinolide (HBR), which promote the growth of rhizobium SM12531f, were evaluated. Alfalfa seeds containing cyan fluorescent protein labeled endophytic rhizobia SM12531f were soaked in solutions of one of these three concentrations, and planted. The effects of the exogenous hormones on the number of endophytic rhizobia in alfalfa plant tissue, plant nodulation, and plant growth were analyzed. The results showed that the

收稿日期: 2024-04-02; 改回日期: 2024-05-08

基金项目: 草业生态系统教育部重点实验室(甘肃农业大学)开放课题(编号: KLGE202201)和苜蓿 NCRs 多肽与根瘤菌表面多糖 SPS 的互作机制研究和苜蓿种子内生根瘤菌的根瘤发生机制研究(编号: 0722125)资助。

作者简介: 杜媛媛(2000—), 女, 甘肃定西人, 在读硕士。E-mail: 2922348392@qq.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: kangwj@gsau.edu.cn; shishl@gsau.edu.cn

optimal concentrations for promotional activity of these three hormones were $14 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ for IAA, $18 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ for 6-BA, and $2.97 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ for HBR. During the seedling stage, 6-BA and HBR were beneficial for the proliferation, nodulation, and growth of endophytic rhizobia in plants, and the former had a more significant growth promotion effect. The hormone 6-BA resulted in the highest number of endophytic rhizobia colonizing in the roots, with a colony density of $1167 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$ at a dilution of 100 times and aboveground fresh weight of $1.99 \text{ g}\cdot\text{plant}^{-1}$. 6-BA was also beneficial to plants during the branching stage. The endophytic rhizobia formed $833 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$ in plants with an aboveground fresh weight of $5.03 \text{ g}\cdot\text{plant}^{-1}$, when diluted 100 times in a ground root solution. Therefore, in these test conditions, the most suitable hormone for promoting proliferation and growth of alfalfa endophytic rhizobia was 6-BA at $18 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ concentration. These results provide a theoretical basis for the precise utilization of the nodulation nitrogen fixation effect of endophytic rhizobia in seeds, and lays a foundation for the symbiotic breeding of alfalfa rhizobia.

Key words: endophytic rhizobia; proliferation; promoting growth; auxin; cytokinin; brassinosteroid

紫花苜蓿 (*Medicago sativa*) 是多年生豆科牧草, 被称为“牧草之王”, 拥有众多优良特性。固氮肥田是紫花苜蓿众多优良特性之一, 在生产高蛋白质含量牧草的同时肥沃土地, 在农业可持续发展和土地可持续利用方面具有重要意义^[1]。氮素是植物赖以生存和生长发育必不可少的营养元素^[2]。自然界中的生物固氮是指固氮微生物将大气中的游离态氮固定转化为含氮化合物, 成为植物所能吸收的氮^[3-4]。生物固氮主要有3种类型: 共生固氮、自生固氮和联合固氮。在共生固氮中, 一种广泛分布在土壤中的为根瘤菌, 它可与植物共生形成根瘤, 将大气中的无机氮固定转化为可被植物吸收利用的化合态氮, 减少植物生长对土壤氮素的依赖^[5]。研究发现根瘤菌还可以通过内生菌的形式与谷类植物产生有益的联合, 提高产量^[6]。研究发现, 根瘤菌在苜蓿植株体内的数量分布及其运移动态在时间维度上表现为, 授粉后花内各组织根瘤菌数量迅速增加, 结荚期根和荚果皮内的根瘤菌数量明显高于其他时期, 种子成熟后大部分根瘤菌存在于种皮内^[7]。祁娟^[8]发现苜蓿种子里含有内生根瘤菌, 其具有溶解有机磷、分泌生长素、增强固氮酶活性、增加植株含氮量以及提高植株产量的功能。

外源物质的添加对内生根瘤菌的数量和苜蓿生长也存在不同程度的影响, 如硼、苦参碱、赤霉素、磷酸二氢钾和黄腐酸等。其中适宜浓度硼、苦参碱和赤霉素均可促进幼苗体内根瘤菌的运移及定殖, 且三者可提高幼苗单株结瘤数、根瘤重, 增加幼苗的生物量。张运婷等^[9]和苗阳阳^[10]研究发现添加适宜浓度磷酸二氢钾和黄腐酸接种苜蓿可促进根瘤菌在苜蓿植株体内运移及定殖, 且外源磷酸二氢钾和黄腐酸与相应标记根瘤菌混合接种可促进苜蓿幼苗生长。

豆科植物根瘤的形成和发育受到多种植物激素的调控, 各种激素在根瘤发育的不同阶段相互协调共同调控根瘤的形成和发育, 其作用既有正向的又有负向的^[11]。生长素和细胞分裂素在植物生长发育过程中是必不可少的, 它具有诱导和刺激细胞的分裂分化从而影响植物各器官生长的作用^[12], 并且生长素在根瘤发育的不同阶段积累, 在表皮中, 生长素可促进侵染进程, 细胞分裂素会抑制侵染进程, 两者之间存在着微妙平衡的拮抗作用, 而这两种激素都对根瘤器官形成过程中细胞分裂的启动和维持产生积极影响^[13]。张淑卿^[14]研究发现吲哚乙酸能够提高外源根瘤菌在紫花苜蓿茎内的定殖数量, 但降低了内生根瘤菌在茎和子叶中的定殖数量。

细胞分裂素具有促进细胞分裂、促进种子发芽, 提高坐果率以及增加产量的作用^[15]; 刘尧^[16]研究发现, 细胞分裂素对豆科植物根瘤菌的增殖具有促进作用, 且豆科植物中, 细胞分裂素是根瘤器官发生和根毛侵染的中心调节因子, 对皮层细胞的分裂以及根瘤原基的形成起正向调节作用^[17]。

油菜素内固醇 (brassinosteroid, BR) 在植物生长发育中起到重要的调节功能, 其中包括促进细胞分裂分化、细胞生长和花粉管发育^[18]。BR对根瘤发育的影响是复杂的, 既有积极影响又有消极影响。油菜素类固醇生物合成基因突变导致的BR缺乏会引起番茄 (*Lycopersicon esculentum*)、水稻 (*Oryza sativa*) 和豌豆 (*Pisum sativum*) 突变体中的根瘤菌定殖数量减少; 豌豆的嫁接研究表明, BR可能通过枝条衍生信号影响结瘤。无论根系中BR的产生如何, 在枝条系统中BR生物合成减少的植物比具有野生型芽系统的植物产生的根瘤更少^[19]。

综上所述,目前对根瘤菌的增殖以及促生效应起促进作用的激素类物质有细胞分裂素和生长素。油菜素内固醇对于根瘤菌的增殖以及促生效应既有积极影响又有消极影响。但有关生长素和细胞分裂素的研究大多是围绕外源根瘤菌而展开的,以内生根瘤菌为主题的相对较少,关于油菜素内固醇对内生根瘤菌的影响不太确定。因此,进行生长素、细胞分裂素和油菜素内固醇对内生根瘤菌的增殖以及促生效应影响的研究很有必要,可为精准利用种子内生根瘤菌的结瘤固氮效应提供理论依据,为紫花苜蓿—根瘤菌共生育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 供试青色荧光蛋白(cyan fluorescent protein, CFP)标记的中华根瘤菌株 *Sinorhizobium meliloti*12531f(SM12531f),其原始菌株为 *Ensifer meliloti* 12531(购自中国科学院微生物保藏中心,分离自非甘农5号紫花苜蓿植株体内的外源根瘤菌),现保存于甘肃农业大学草业生态系统教育部重点实验室^[10]。

1.1.2 供试激素 所用激素为3-吲哚乙酸(生长素)、6-苄氨基嘌呤(细胞分裂素)及28-高油菜素内酯(油菜素内固醇),均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

1.1.3 供试种子 参试种子为含有荧光标记内生根瘤菌SM12531f的第3代种子。该种子的初代经实验室前期将标记根瘤菌SM12531f导入苜蓿植株中收获^[10],在25℃+自然湿度、25℃+硅胶干燥、4℃+冰箱冷藏湿度和-4℃+冰箱冷冻湿度这4种贮藏条件下贮藏3年后,将初代种子播种并获得了次代种子。4种贮藏条件处理下的次代种子内生根瘤菌均有传代能力和传代有效性,相比无菌水处理(不含内生根瘤菌)的种子在结瘤、固氮、生长及生物量方面均有所提高^[20]。次代种子再次播种,于2022年8月收获了内含荧光标记内生根瘤菌SM12531f的第3代紫花苜蓿种子,命名为A. GN5+R. 12531f^[9]。通过荧光标记内生根瘤菌的检测,结果表明第3代种子中含有的荧光标记内生根瘤菌SM12531f数量为15~20 cfu·seed⁻¹。

1.1.4 供试培养基以及培养液 TY固体培养基:胰岛蛋白胨5.0 g·L⁻¹,酵母粉3.0 g·L⁻¹,CaCl₂·6H₂O 1.3 g·L⁻¹,琼脂16.0 g·L⁻¹,蒸馏水1000 mL,pH=7.0^[21]。

TY液体培养基:胰岛蛋白胨5.0 g·L⁻¹,酵母粉3.0 g·L⁻¹,CaCl₂·6H₂O 1.3 g·L⁻¹,蒸馏水1000 mL,pH=7.0^[21]。

YMA固体培养基:K₂HPO₄·3H₂O 0.5 g·L⁻¹,MgSO₄·7H₂O 0.2 g·L⁻¹,NaCl 0.1 g·L⁻¹,甘露醇10 g·L⁻¹,酵母粉1 g·L⁻¹,浓度2.5 g·L⁻¹的刚果红溶液10 mL·L⁻¹,琼脂15 g·L⁻¹,蒸馏水1000 mL,pH=7.0^[22]。

1.2 试验方法

1.2.1 同浓度外源激素溶液配制 将2 mg的28-高油菜素内酯、5 mg的3-吲哚乙酸及5 mg的6-苄氨基嘌呤分别置于无菌三角瓶中,用少量酒精进行溶解并用无菌滤膜(直径0.22 μm)过滤3次,之后定容至10 mL配置为母液,然后运用激素母液配置成所需浓度,如下所示:

3-吲哚乙酸浓度设10、12、14、16和18 mg·L⁻¹5个处理,以蒸馏水接种为对照^[23];

6-苄氨基嘌呤浓度为12、14、16、18和20 mg·L⁻¹,以蒸馏水接种为对照^[23];

28-高油菜素内酯浓度为0.98、1.48、1.98、2.47和2.97 mg·L⁻¹,以蒸馏水接种为对照^[24]。

1.2.2 根瘤菌株的活化 把保存在-80℃下甘油中荧光标记的根瘤菌株SM12531f取出,将其接入TY固体平板培养基中进行活化培养,之后挑取单菌落转入TY液体培养基,置于转速120 r·min⁻¹,温度28℃的摇床中培养,直至OD_{600nm}=1×10⁹ cfu·mL⁻¹^[25]。

1.2.3 适宜荧光标记根瘤菌生长的激素浓度测定 将配置好的3种激素按设置的浓度分别加入40 mL的菌液中,置于转速120 r·min⁻¹、温度28℃的摇床中培养。分别在第1、3、5、7天测各处理菌液中的活菌数^[10],选出最适宜内生根瘤菌SM12531f生长的激素浓度,其中以不添加激素的菌液为对照。

1.2.4 激素处理及苜蓿植株培养 试验在2023年5月于甘肃农业大学温室内进行。将内含青色荧光标记内生根瘤菌的紫花苜蓿种子置于已灭菌的50 mL三角瓶内,碘伏(购自兰州博域生物科技有限责任公司,有效碘含量0.45%~0.55%)浸泡3 min,无菌水清洗4次,每次1 min。以上操作均在无菌操作台内进行。

将消毒后的种子分别浸泡在适宜浓度的3-吲哚乙酸(3-indoleacetic acid, 3-IAA)、6-苄氨基嘌呤(6-benzyladenine, 6-BA)和28-高油菜素内酯(28-homobrassinolide, HBR)处理液中2 h,以蒸馏水(CK)为对照^[23]。

将营养土装入75%乙醇消毒且杯底扎有网眼的塑料杯(直径6.0 cm,高7.5 cm,400 g·杯⁻¹),将其放入水培盒中(长31 cm,宽19 cm,高10.5 cm)。每杯播种20粒已处理的种子,待苜蓿幼苗长出真叶后,每杯定苗15株,每个处理重复6次。幼苗生长过程中用无菌蒸馏水补充水分,直至幼苗期及分枝期。

1.2.5 测定指标与方法 荧光标记内生根瘤菌的检测方法。取样组织为幼苗期(生长第30天)和分枝期(生长至45 d)的根、茎、叶。

每个处理各重复随机取3株植株,分离根、茎、叶并分别称取1 g,置于无菌50 mL三角瓶中,在超净工作台内用医用碘伏浸没各部分振荡消毒2 min后,用无菌水冲洗4次直至冲洗液澄清透明无泡沫。将表面消毒的植物组织各面在固体培养基上放置30 min后取出,培养基置于28℃培养48 h,未长出菌落表明植物组织表面已彻底消毒,将消毒后的各个组织放到无菌研钵中,加无菌水2 mL,充分研磨后,将研磨液倒入2 mL已灭菌的离心管中,8000 r·min⁻¹离心20 min,吸取0.2 mL上清液涂布于含刚果红的YMA固体培养基中(根部吸取上清液后,用无菌水配置成10⁻¹、10⁻²、10⁻³稀释液),28℃培养48 h。培养结束后,黑暗条件下用手提式紫外灯(WFH-204B,波长336 nm)观察并记录发青色的荧光标记根瘤菌落数,换算出每g植物组织中荧光标记根瘤菌数量^[19]。

根瘤性状测定。在幼苗期和分枝期,各处理随机取5株(保持根系完整),小心清洗根系周围营养土,测定其单株结瘤数、单株根瘤重、根瘤直径、根瘤等级。根瘤等级划分参考5分值计分法:1分:中空无内容物的死亡根瘤;2分:横切面呈灰白色的无效根瘤;3分:直径小于0.5 mm的粉色根瘤;4分:直径处于0.5~1.0 mm之间的粉色根瘤;5分:直径≥1 mm的粉色根瘤^[26]。

固氮能力测定。固氮酶活性:采用乙炔还原法测定固氮酶活性^[27],切下根瘤,称取鲜重,放置8 mL青霉素瓶中,盖紧瓶塞并密封,使用微量注射器抽取0.8 mL空气,并注入0.8 mL乙炔气体,反应2 h。然后使用10 μL微量注射器吸取10 μL瓶内气体注入气相色谱仪(Agilent 7890B)。

$$C_2H_4 \text{水平} (\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}) = \frac{C \times hx \times V}{hs \times 1000 \times 22.4 \times t \times m} \times 10^6$$

式中:C代表标准C₂H₄浓度(nmol·mL⁻¹),hx代表样品峰面积,V:反应气体体积(mL),hs:标准C₂H₄峰面积,22.4:乙烯的物质的量,t:反应时间(h),m:瘤重(g)。

血红蛋白含量:参照王树起等^[28]和左元梅等^[29]的方法,取一定量的新鲜根瘤,在4℃的磷酸缓冲溶液(0.1 mol·L⁻¹,pH 6.8)中研磨成匀浆,磷酸缓冲溶液的量约为根瘤体积的4倍左右,4℃离心15 min,取上层清液离心20 min,再取上清液,在波长540 nm条件下用双光束紫外可见分光光度计TU-1901比色测定吸光值。

生物量测定。在幼苗期和分枝期时,每个处理每个重复随机选取5株,称取地上和地下鲜重(滤纸吸干表面水分)和干重(烘箱中105℃杀青20 min,而后80℃烘干至恒重)^[30],并进行根长、株高的测量以及单株叶片数(复叶)的测定。

1.3 数据处理

通过Microsoft Office 2019软件整理、计算数据并用Prism 8软件作图,利用SPSS 25.0(IBM Corporation,美国)软件针对外源激素对内生根瘤菌增殖、根瘤的固氮性能及植株生物量的影响进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 不同浓度外源激素对外源荧光标记根瘤菌SM12531f生长的影响

2.1.1 3-吲哚乙酸 适宜的3-吲哚乙酸浓度对外源标记根瘤菌SM12531f具有促进作用(图1)。处理第1天时,18 mg·L⁻¹的3-吲哚乙酸对根瘤菌SM12531f生长的促进作用最强(OD_{600nm}=1.364),其次为14 mg·L⁻¹的3-吲哚乙酸(OD_{600nm}=1.325),两种处理分别较未经激素处理的对照提高了35.47%和33.69%,差异显著(P<0.05);在第3天(OD_{600nm}=1.520)、第5天(OD_{600nm}=1.530)和第7天(OD_{600nm}=1.522)时14 mg·L⁻¹的3-吲哚乙酸对根瘤菌SM12531f生长的促进作用均显著高于对照(P<0.05),分别较对照提高了71.26%、81.68%和86.90%。因

此,筛选出促进根瘤菌 SM12531f 生长的最适 3-吲哚乙酸浓度为 $14 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.1.2 6-苄氨基嘌呤 图 2 所示,适宜浓度的 6-苄氨基嘌呤对根瘤菌 SM12531f 具有促生作用。 $18 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-苄氨基嘌呤在第 1 ($\text{OD}_{600\text{nm}}=1.403$)、3 ($\text{OD}_{600\text{nm}}=1.628$)、5 ($\text{OD}_{600\text{nm}}=1.700$) 及 7 天 ($\text{OD}_{600\text{nm}}=1.703$) 对 SM12531f 的生长促进作用均最强,显著高于未添加 6-苄氨基嘌呤处理 ($P < 0.05$),且分别比对照组提高了 41.49%、83.47%、101.82% 和 109.13%。因此, $18 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 6-苄氨基嘌呤最适根瘤菌 SM12531f 的生长。

2.1.3 28-高油菜素内酯 图 3 所示,适宜浓度的 28-高油菜素内酯对根瘤菌 SM12531f 具有促生作用。 $2.97 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 28-高油菜素内酯分别第 1 ($\text{OD}_{600\text{nm}}=1.326$)、3 ($\text{OD}_{600\text{nm}}=1.536$)、5 ($\text{OD}_{600\text{nm}}=1.599$) 及 7 天 ($\text{OD}_{600\text{nm}}=1.584$) 对 SM12531f 的生长促进作用均最强,显著高于未添加 28-高油菜素内酯处理组 ($P < 0.05$),且分别比对照组提高了 33.73%、73.06%、89.79% 和 94.56%。因此, $2.97 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 28-高油菜素内酯最适根瘤菌 SM12531f 的生长。

2.2 外源激素对苜蓿植株内生根瘤菌 SM12531f 及其生长的影响

2.2.1 外源激素对苜蓿体内标记内生根瘤菌的影响 将含有标记内生根瘤菌 SM12531f 的种子用最适浓度的 3 种外源激素处理,植株幼苗期和分枝期各组织内的 SM12531f 数量分别如图 4 和图 5 所示。

幼苗期时(图 4A),6-苄氨基嘌呤 ($8.33 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$) 及 28-高油菜素内酯 ($1.67 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$) 处理组的标记内生根瘤菌在植株叶片内的数量显著高于对照 ($P < 0.05$),而 3-吲哚乙酸处理组与对照组的叶部未检测到标记内生根瘤菌 SM12531f。分枝期时(图 5A),6-苄氨基嘌呤、3-吲哚乙酸以及对照组的叶部 SM12531f 的数量差异不显著 ($P > 0.05$),而在 28-高油菜素内酯处理组的叶部未检测到内生根瘤菌。

由图 4B 可知,幼苗期 28-高油菜素内酯处理组的标记内生根瘤菌在植株茎中的数量 ($46.67 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$) 显著高于对照 ($1.67 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$)、3-吲哚乙酸处理组 ($6.67 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$) 及 6-苄氨基嘌呤处理组 ($8.33 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$) ($P < 0.05$),分别提高了 96.43%、85.71% 和 82.14%;6-苄氨基嘌呤处理组及 3-吲哚乙酸处理组的标记内生根瘤菌在茎中的含量与对照差异不显著。分枝期时 6-

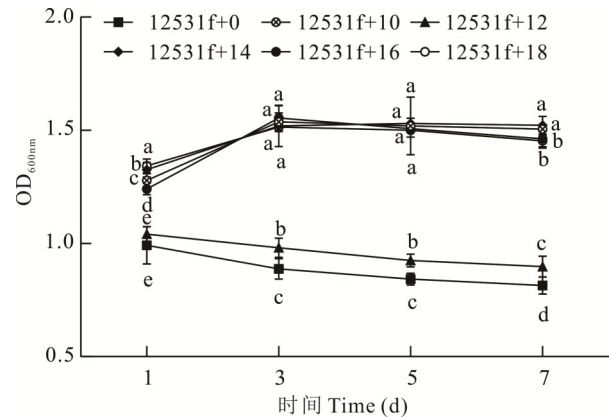


图 1 3-吲哚乙酸处理对 SM12531f 增殖的影响

Fig. 1 Effect of 3-indoleacetic acid treatment on the proliferation of SM12531f

图例为菌株名称+添加浓度,不同小写字母间表示差异显著 ($P < 0.05$),为同一检测时间的测定值(平均值±标准差),下同。The legend shows the name of the strain and the concentration added, the difference between different lowercase letters is significant ($P < 0.05$), and the measured values at the same testing time (mean±standard deviation), the same below.

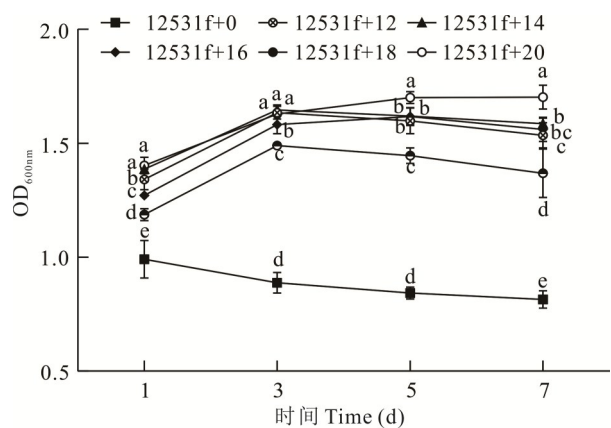


图 2 6-苄氨基嘌呤对 SM12531f 增殖的影响

Fig. 2 Effect of 6-benzylaminopurine on the proliferation of SM12531f

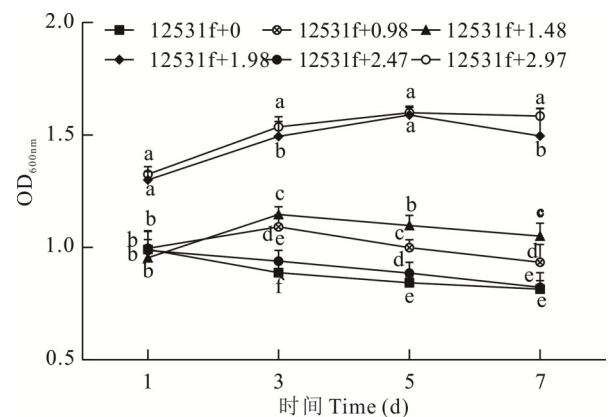


图 3 28-高油菜素内酯对 SM12531f 增殖的影响

Fig. 3 Effect of 28-homobrassinolide on the proliferation of SM12531f

苄氨基嘌呤处理组的标记内生根瘤菌数量($53.33 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$)显著高于对照组($5.00 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$)、3-吲哚乙酸($33.33 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$)及28-高油菜素内酯($6.67 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$)处理组($P<0.05$),分别提高了90.62%,37.50%以及87.49%(图5B)。

在植株幼苗期时,根部研磨液稀释10倍的情况下,激素28-高油菜素内酯处理组($750.00 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$)的标记内生根瘤菌在植株根部的含量显著高于对照($125.00 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$)、激素3-吲哚乙酸处理组($200.00 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$)以及6-苄氨基嘌呤处理组($366.67 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$)($P<0.05$),分别提高了83.33%、73.33%和51.11%;在根部研磨液稀释100倍的情况下,激素6-苄氨基嘌呤处理组($1166.67 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$)显著高于3-吲哚乙酸处理组($333.33 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$)($P<0.05$),并且提高了71.43%,与对照组($833.33 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$)和28-高油菜素内酯组($666.67 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$)差异不显著($P>0.05$);在根部研磨液稀释1000倍的情况下,激素6-苄氨基嘌呤处理组($5000.00 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$)以及28-高油菜素内酯处理组($5000.00 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$)显著高于对照组($3333.33 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$)和3-吲哚乙酸处理组($0 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$)($P<0.05$),并且激素6-苄氨基嘌呤处理组以及28-高油菜素内酯处理组相较于对照组均提高了33.33%(图4C)。

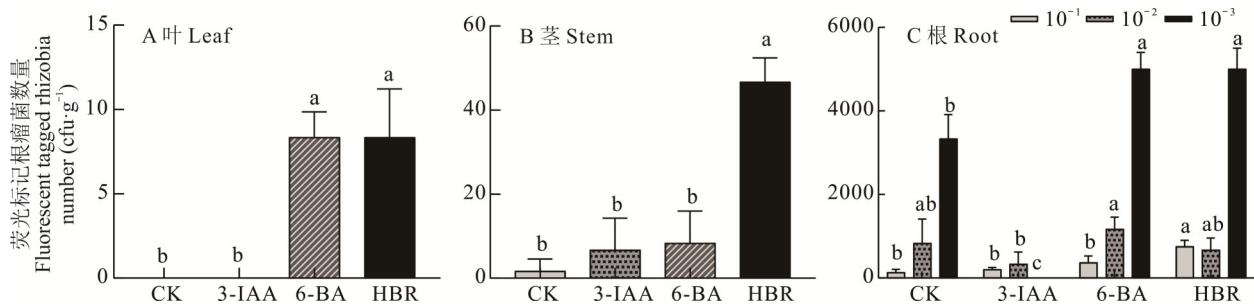


图4 幼苗期苜蓿植株组织内标记内生根瘤菌数量

Fig. 4 Number of endophytic rhizobia labeled in alfalfa plant tissues at seedling stage

不同小写字母表示同一菌株不同激素处理下差异显著($P<0.05$),下同。The different lowercase letters indicate significant differences in the same strain under different hormone treatments ($P<0.05$), the same below.

如图5C所示,在植株分枝期根部研磨液稀释10倍的情况下,3-吲哚乙酸($383.33 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$)以及6-苄氨基嘌呤($383.33 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$)处理组的标记内生根瘤菌数量显著高于对照组($100.00 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$)($P<0.05$),均提高了73.91%,与28-高油菜素内酯处理组差异不显著;根部研磨液稀释100倍的情况下,对照组与处理组均差异不显著($P>0.05$),但6-苄氨基嘌呤处理组的标记内生根瘤菌数量最多,为 $833.34 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$;在根部研磨液稀释1000倍的情况下,对照组与处理组均差异不显著($P>0.05$),但其中6-苄氨基嘌呤以及3-吲哚乙酸处理组的标记内生根瘤菌数量高于对照组以及28-高油菜素内酯处理组,其中6-苄氨基嘌呤以及3-吲哚乙酸处理组的数量均为 $3333.33 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

综上所述,6-苄氨基嘌呤对苜蓿植株体内的标记内生根瘤菌SM12531f具有更持久的促进作用。

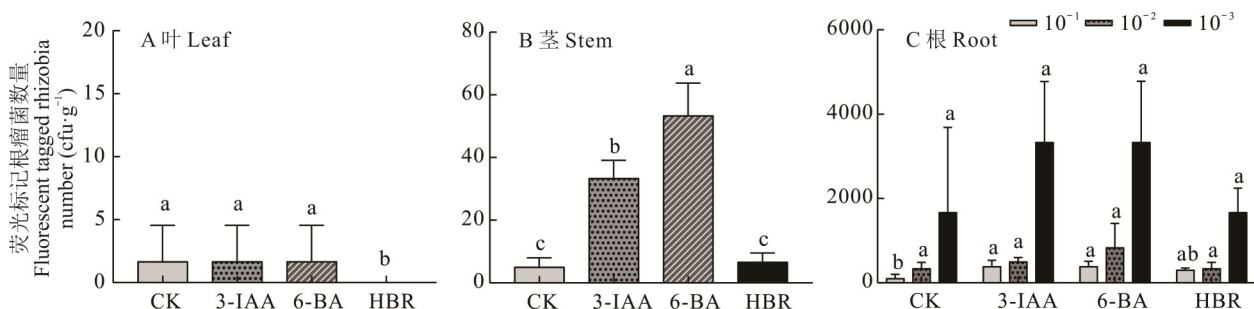


图5 分枝期苜蓿植株组织内标记内生根瘤菌数量

Fig. 5 Number of endophytic rhizobia labeled in alfalfa plant tissues at the branching stage

2.2.2 外源激素对苜蓿植株根瘤特性的影响 图 6 所示,幼苗期 3-吲哚乙酸处理组未结根瘤,因此该处理组的单株结瘤数、单株根瘤重、根瘤直径、根瘤等级、固氮酶活性及豆血红蛋白含量均为 0。

由图 6A 可知,与对照相比,6-苄氨基嘌呤和 28-高油菜素内酯对单株根瘤数无显著影响($P>0.05$);6-苄氨基嘌呤处理组的单株根瘤重($5.00\times 10^{-3}\text{ g}\cdot\text{株}^{-1}$)显著高于对照组($3.90\times 10^{-3}\text{ g}\cdot\text{株}^{-1}$)与 28-高油菜素内酯处理组($2.50\times 10^{-3}\text{ g}\cdot\text{株}^{-1}$)($P<0.05$),分别提高了 22.00% 和 50.00%(图 6B)。

由图 6C,D 所示,6-苄氨基嘌呤及 28-高油菜素内酯处理组对根瘤直径及根瘤等级的影响不显著($P>0.05$)。

分析图 6E 可以得出激素 6-苄氨基嘌呤处理组的固氮酶活性($5.00\times 10^{-4}\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)显著高于对照组($1.51\times 10^{-4}\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)及 28-高油菜素内酯处理组($1.07\times 10^{-4}\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)($P<0.05$),分别提高了 69.78% 和 78.53%;同样地(图 6F),6-苄氨基嘌呤处理组的豆血红蛋白含量($0.43\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$)显著高于对照组($0.18\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$)与 28-高油菜素内酯处理组($0.29\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$)($P<0.05$),分别提高了 57.51% 和 31.95%。

因此,在苜蓿植株幼苗期,激素 6-苄氨基嘌呤对植株的结瘤能力有积极影响。

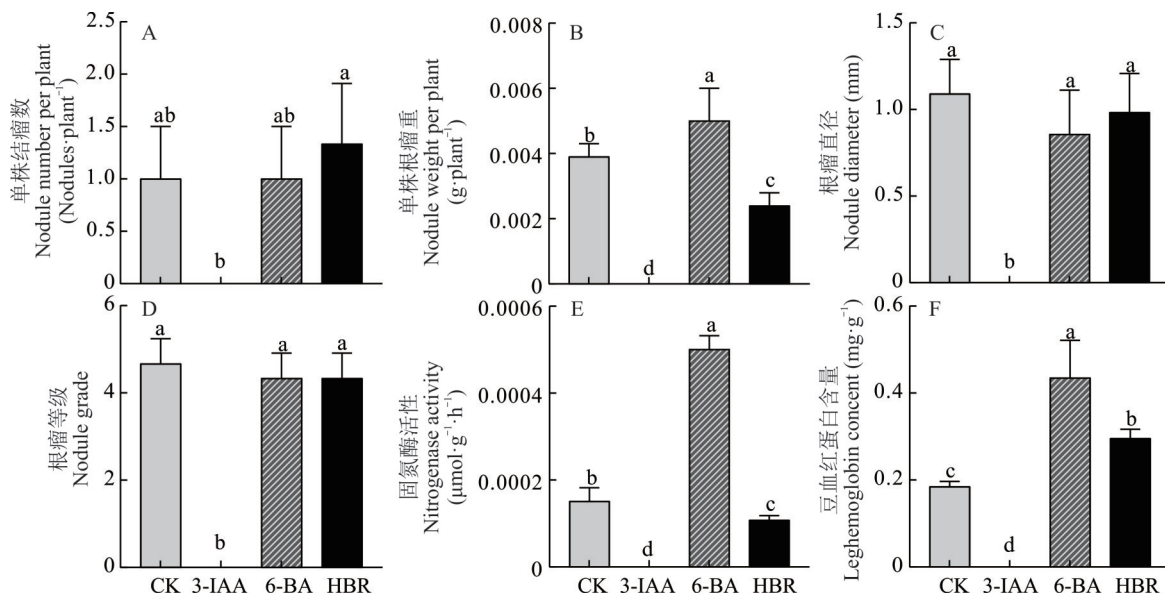


图 6 幼苗期苜蓿植株的结瘤能力

Fig. 6 Nodulation capacity of alfalfa plants at seedling stage

由图 7A 可知,分枝期对照组、6-苄氨基嘌呤处理组以及 28-高油菜素内酯处理组的单株结瘤数均显著高于 3-吲哚乙酸处理组($2.00\text{ 结瘤数}\cdot\text{株}^{-1}$)($P<0.05$),分别提高了 60.00% 和 53.81%;如图 7B 所示,对照组的单株根瘤重($10.5\times 10^{-3}\text{ g}\cdot\text{株}^{-1}$)显著高于各处理组($P<0.05$),较 3-吲哚乙酸处理组、6-苄氨基嘌呤处理组及 28-高油菜素内酯处理组分别提高了 37.50%、55.77% 和 68.27%。

由图 7C 可知,对照组的根瘤直径(1.37 mm)显著高于各处理组($P<0.05$),较 3-吲哚乙酸处理组、6-苄氨基嘌呤处理组及 28-高油菜素内酯处理组分别提高了 24.21%、35.77% 和 37.22%;而在根瘤等级方面(图 7D),处理组与对照组差异均不显著($P>0.05$)。

激素 3-吲哚乙酸处理组的固氮酶活性($13.44\times 10^{-4}\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)显著高于对照组($8.11\times 10^{-4}\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)、6-苄氨基嘌呤处理组($7.67\times 10^{-4}\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)及激素 28-高油菜素内酯处理组($9.59\times 10^{-4}\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)($P<0.05$),分别提高了 39.55%、42.85% 和 28.52%(图 7E);在豆血红蛋白含量中(图 7F),6-苄氨基嘌呤处理组($6.20\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$)显著高于对照组($4.03\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$)、3-吲哚乙酸处理组($5.70\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$)与 28-高油菜素内酯处理组($5.29\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$)($P<0.05$),分别提高了 35.00%、8.06% 和 14.68%。

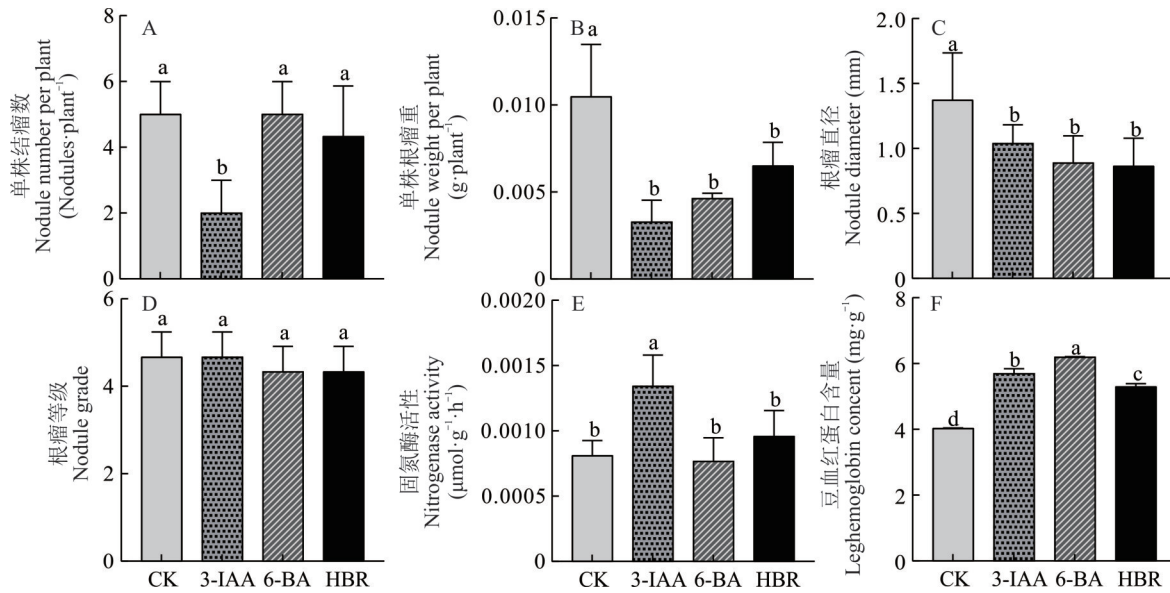


图7 分枝期苜蓿植株的结瘤能力

Fig. 7 Nodulation capacity of alfalfa plants at branching stage

因此,分枝期时,外源激素的添加在固氮酶活性方面3-吲哚乙酸具有促进作用;在豆血红蛋白含量中处理组均有促进作用,其中6-苄氨基嘌呤促进效果最为明显。

综上所述,激素6-苄氨基嘌呤对苜蓿植株的结瘤能力能够产生积极影响。

2.2.3 外源激素对苜蓿植株生物量的影响 由表1可知,幼苗期时,6-苄氨基嘌呤处理组的地上鲜重($1.99 \text{ g} \cdot \text{株}^{-1}$)显著高于激素3-吲哚乙酸处理组($1.62 \text{ g} \cdot \text{株}^{-1}$) ($P < 0.05$),显著提高了22.84%,与对照组及激素28-高油菜素内酯处理组差异不显著;在地上干重中,6-苄氨基嘌呤处理组($0.31 \text{ g} \cdot \text{株}^{-1}$)显著高于对照组($0.23 \text{ g} \cdot \text{株}^{-1}$) ($P < 0.05$),显著提高了34.78%,与激素3-吲哚乙酸处理组及28-高油菜素内酯处理组差异不显著;激素28-高油菜素内酯处理组的地下鲜重($1.40 \text{ g} \cdot \text{株}^{-1}$)显著高于其他处理组 ($P < 0.05$),较对照组、3-吲哚乙酸处理组及6-苄氨基嘌呤处理组分别提高了68.67%、105.88%和91.78%;在地下干重中,激素28-高油菜素内酯处理组($0.16 \text{ g} \cdot \text{株}^{-1}$)显著高于其他组 ($P < 0.05$),较对照组、3-吲哚乙酸处理组及6-苄氨基嘌呤处理组分别提高了166.67%、166.67%及128.57%。

由表2可知,分枝期时,6-苄氨基嘌呤处理组($5.03 \text{ g} \cdot \text{株}^{-1}$)的地上鲜重显著高于3-吲哚乙酸处理组($2.06 \text{ g} \cdot \text{株}^{-1}$)以及28-高油菜素内酯处理组($2.97 \text{ g} \cdot \text{株}^{-1}$) ($P < 0.05$),分别显著提高了144.17%和69.36%;在地上干重中,同样6-苄氨基嘌呤处理组($0.95 \text{ g} \cdot \text{株}^{-1}$)显著高于3-吲哚乙酸处理组($0.39 \text{ g} \cdot \text{株}^{-1}$)以及28-高油菜素内酯处理

表1 幼苗期不同激素对苜蓿植株地上、地下干鲜重的影响

Table 1 The effect of different hormones on the aboveground and belowground dry and fresh weight of alfalfa plants during the seedling stage ($\text{g} \cdot \text{plant}^{-1}$)

处理	地上鲜重	地上干重	地下鲜重	地下干重
Treatment	Aboveground fresh weight	Aboveground dry weight	Underground fresh weight	Underground dry weight
CK	$1.73 \pm 0.08\text{ab}$	$0.23 \pm 0.00\text{b}$	$0.83 \pm 0.01\text{b}$	$0.06 \pm 0.00\text{c}$
3-IAA	$1.62 \pm 0.21\text{b}$	$0.29 \pm 0.05\text{ab}$	$0.68 \pm 0.01\text{d}$	$0.06 \pm 0.00\text{c}$
6-BA	$1.99 \pm 0.23\text{a}$	$0.31 \pm 0.02\text{a}$	$0.73 \pm 0.01\text{c}$	$0.07 \pm 0.01\text{b}$
HBR	$1.66 \pm 0.15\text{ab}$	$0.29 \pm 0.03\text{ab}$	$1.40 \pm 0.00\text{a}$	$0.16 \pm 0.01\text{a}$

注:数据为平均值±标准误,同列不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。CK:对照;3-IAA:3-吲哚乙酸;6-BA:6-苄氨基嘌呤;HBR:28-高油菜素内酯。下同。

Note: The values in the Table are mean±standard error, different letters in the same column indicate significant differences ($P < 0.05$). CK: Control group; 3-IAA: 3-indoleacetic acid; 6-BA: 6-benzyladenine; HBR: 28-homobrassinolide. The same below.

表2 分枝期不同激素对苜蓿植株地上、地下干鲜重的影响

Table 2 Effects of different hormones during branching stage on dry and fresh weight of alfalfa plants above and below ground (g·plant⁻¹)

处理 Treatment	地上干重 Aboveground dry weight	地上鲜重 Aboveground fresh weight	地下鲜重 Underground fresh weight	地下干重 Underground dry weight
CK	0.80±0.09ab	4.28±0.47ab	2.33±1.00b	0.36±0.13a
3-IAA	0.39±0.10c	2.06±0.48c	1.19±0.19c	0.21±0.12a
6-BA	0.95±0.19a	5.03±1.20a	3.91±0.20a	0.46±0.23a
HBR	0.51±0.20bc	2.97±1.04bc	2.19±0.14b	0.29±0.12a

组(0.51 g·株⁻¹) ($P<0.05$), 分别显著提高了143.59%及86.27%;激素6-苄氨基嘌呤处理组的地下鲜重(3.91 g·株⁻¹)显著高于其他处理组($P<0.05$), 较对照组、3-吲哚乙酸处理组及28-高油菜素内酯处理组分别提高了67.81%、228.57%和78.53%;在地下干重中, 对照组与其他处理组差异不显著($P>0.05$)。

在苜蓿植株幼苗期, 激素6-苄氨基嘌呤处理组的单株叶片数(20.00)显著高于对照组(16.00) ($P<0.05$), 显著提高了25.00%, 与激素3-吲哚乙酸处理组以及28-高油菜素内酯处理组差异不显著($P>0.05$); 激素6-苄氨基嘌呤处理组的株高(32.62 cm)显著高于激素3-吲哚乙酸处理组(29.02 cm) ($P<0.05$), 显著提高了12.41%, 与对照组和28-高油菜素内酯处理组差异不显著($P>0.05$); 在根长中, 激素6-苄氨基嘌呤处理组(18.80 cm)、28-高油菜素内酯处理组(18.50 cm)以及对照组(19.10 cm)均显著高于激素3-吲哚乙酸处理组(14.80 cm) ($P<0.05$), 分别提高27.02%、25.00%和29.05%(表3)。

在苜蓿植株分枝期, 6-苄氨基嘌呤(53.33)以及28-高油菜素内酯处理组(62.67)的单株叶片数与对照组(64.00)差异不显著($P>0.05$), 而3-吲哚乙酸处理组(33.67)显著低于对照组($P<0.05$), 降低了47.39%; 在株高以及根长方面, 对照组与处理组差异不显著($P>0.05$, 表4)。

综上所述, 激素6-苄氨基嘌呤对苜蓿植株的生长具有促进作用。

3 讨论

植物激素控制植物的生长发育。最常见的植物激素有生长素、细胞分裂素、赤霉素等, 它们在植物整个生活史中既可独立发挥作用又能互相协同作用^[31]。植物激素不但控制植物的生长发育过程, 同样还调节根瘤的形成^[11]。

生长素的准确定位、运输以及积累在植物器官形成过程中起重要作用^[32], 含有生长素生物合成酶基因的根瘤菌感染过的豆科植物能产生较多数目的根瘤^[33], 且生长素对根瘤的发育阶段以及植株需要生长素的位置有要求^[34]。张淑卿^[14]研究发现吲哚乙酸能够提高外源根瘤菌在紫花苜蓿茎内的定殖数量, 但降低内生根瘤菌在植株

表3 幼苗期不同激素对苜蓿植株单株叶片数、株高以及根长的影响

Table 3 Effects of different hormones at seedling stage on leaf number, plant height and root length of alfalfa plant

处理 Treatment	单株叶片数 Leaf number per plant	株高 Plant height (cm)	根长 Root length (cm)
CK	16.00±2.00b	31.66±2.15ab	19.10±0.30a
3-IAA	19.00±1.73ab	29.02±3.21b	14.80±1.10b
6-BA	20.00±1.73a	32.62±2.31a	18.80±0.80a
HBR	19.33±1.53ab	29.64±1.09ab	18.50±0.70a

表4 分枝期不同激素对苜蓿植株单株叶片数、株高以及根长的影响

Table 4 Effects of different hormones at branching stage on leaf number, plant height and root length of alfalfa plant

处理 Treatment	单株叶片数 Leaf number per plant	株高 Plant height (cm)	根长 Root length (cm)
CK	64.00±21.28a	32.46±2.51a	19.13±0.95a
3-IAA	33.67±5.13b	35.04±2.05a	19.23±3.02a
6-BA	53.33±9.24ab	35.52±5.81a	20.13±0.67a
HBR	62.67±2.08a	34.10±3.90a	20.20±3.45a

中的定殖数量。本研究发现3-吲哚乙酸并未对内生根瘤菌在苜蓿植株组织中的增殖起到积极作用,从而导致3-吲哚乙酸未对内生根瘤菌种子育成幼苗的结瘤性能起到积极作用,与张淑卿^[14]的研究结果一致。并且生长素影响细胞分裂素的产生,也影响植株的生长和伸长^[35],在本研究中生长素并未对苜蓿植株的地上地下鲜重、地上地下干重、单株叶片数、株高以及根长方面起促进作用,其原因可能为3-吲哚乙酸未对内生根瘤菌的增殖起到积极作用,进一步使苜蓿植株的固氮性能减弱,从而导致3-吲哚乙酸未对苜蓿植株的生长起到促进作用。

刘尧^[16]研究发现,细胞分裂素对豆科植物根瘤菌的增殖具有促进作用,并且细胞分裂素是根瘤器官发生所必需的,根瘤形成的一个主要下游目标是诱导细胞分裂素的合成、运输和信号传导^[36]。Nandwal等^[37]研究发现细胞分裂素对豌豆的固氮能力具有促进作用,高浓度的细胞分裂素处理下根瘤数量减少,低浓度时根瘤数量增加。因此可以说明根瘤对细胞分裂素的需求具有一定的浓度范围^[38]。本研究发现适宜浓度的6-苜氨基嘌呤对苜蓿植株的结瘤能力具有积极作用,这与Mens等^[38]的研究结果相似。且适宜浓度的细胞分裂素可明显提高紫花苜蓿的粗蛋白、粗纤维、叶绿素含量及其产量^[39],本研究中,适宜浓度的6-苜氨基嘌呤对苜蓿植株的地上地下鲜重、地上地下干重、单株叶片数、株高以及根长方面具有促进作用,其原因可能为适宜浓度的细胞分裂素可促进种子的萌发、芽的分化、茎的伸长以及根的生长等^[40]。

油菜素内酯对根瘤发育的影响是复杂的,既有积极影响又有消极影响^[19]。有研究表明用不同浓度的28-高油菜素内酯浸种后,小扁豆(*Polygala tatarinowii*)的根瘤数减少,与此相反,用24-表油菜素内酯处理豌豆种子,可导致根瘤数量、根瘤鲜重和干重以及固氮酶活性的增加,说明不同种类不同浓度的油菜素内酯对不同植物产生不同的影响^[39]。本研究发现28-高油菜素内酯在幼苗期和分枝期对苜蓿植株的结瘤性能并未起到促进作用,与Ferguson等^[34]的研究结果相似。适宜浓度的油菜素内酯可以快速有效地影响苜蓿的生长,在提高产量、改善生长性状等方面有重要意义^[41],但在本研究中28-高油菜素内酯在地上地下鲜重、地上地下干重、单株叶片数、株高以及根长方面的促进作用低于6-苜氨基嘌呤,其原因可能为28-高油菜素内酯对内生根瘤菌的增殖作用低于6-苜氨基嘌呤,进一步使苜蓿植株的固氮性能减弱,从而导致28-高油菜素内酯对苜蓿植株生长的促进作用不及6-苜氨基嘌呤。

研究发现,外源添加适宜浓度的硼、赤霉素以及苦参碱对内生荧光标记根瘤菌由根系向下部茎以及下部叶转移及定殖具有积极作用,并且有利于外源添加的荧光标记根瘤菌由根系向下部茎、下部叶、上部茎和上部叶内的定殖^[10]。本研究中激素6-苜氨基嘌呤对苜蓿植株体内的标记内生根瘤菌SM12531f具有促生作用,而28-高油菜素内酯只在苜蓿植株的幼苗期、3-吲哚乙酸只在分枝期对苜蓿植株的内生根瘤菌SM12531f起作用;在幼苗期,激素6-苜氨基嘌呤对苜蓿植株的结瘤能力有积极影响,在分枝期,6-苜氨基嘌呤对根瘤的豆血红蛋白起到积极作用,而28-高油菜素内酯和3-吲哚乙酸并未对苜蓿植株的结瘤能力起到促进作用。苗阳阳^[10]研究发现,添加适宜浓度的硼、赤霉素和苦参碱对苜蓿幼苗的地上鲜重、地上干重、地下鲜重以及地下干重具有促进作用。本研究中,3种外源激素在苜蓿植株生物量方面,6-苜氨基嘌呤的促进效果最为明显。因此,对于苜蓿植株内生根瘤菌有益的外源物质中包含适宜浓度的细胞分裂素。

4 结论

在幼苗期 $2.97 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的28-高油菜素内酯对紫花苜蓿植株标记内生根瘤菌SM12531f增殖以及苜蓿结瘤、固氮和生长有益,但促进效果低于 $18 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的6-苜氨基嘌呤;且幼苗期和分枝期对紫花苜蓿植株标记内生根瘤菌SM12531f增殖以及苜蓿结瘤、固氮和生长均有益的激素为浓度 $18 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的6-苜氨基嘌呤。因此,在幼苗期和分枝期对苜蓿内生根瘤菌增殖以及苜蓿生长最适的是 $18 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的6-苜氨基嘌呤。

参考文献 References:

- [1] Li Y. Development and utilization and biological characteristics of *Medicago sativa* L. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2007, 35(1): 84–85, 1287.
李妍. 紫花苜蓿的生物学特性及开发利用. 安徽农业科学, 2007, 35(1): 84–85, 1287.

- [2] Wang X Y. Symbiotic nitrogen fixation system in plants. *Friend of Chemical Industry*, 2006(6): 41–42.
王秀云. 植物的共生固氮体系. *化工之友*, 2006(6): 41–42.
- [3] Burgess B K, Lowe D J. Mechanism of molybdenum nitrogenase. *Chemical Reviews*, 1996, 96(7): 2983–3011.
- [4] Seefeldt L C, Hoffman B M, Dean D R. Mechanism of Mo-dependent nitrogenase. *Annual Review of Biochemistry*, 2009, 78(1): 701–722.
- [5] Zhang Q L, Lin M, Ping S Z. Biological nitrogen fixation and its application in sustainable agriculture. *Biotechnology Bulletin*, 2008(2): 1–4.
张秋磊, 林敏, 平淑珍. 生物固氮及在可持续农业中的应用. *生物技术通报*, 2008(2): 1–4.
- [6] Li Q, Liu H W, Wang W L. Colonization of *Azorhizobium caulinodans* in wheat and nutrient-related miRNA expression. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizer*, 2014, 20(4): 930–937.
李强, 刘华伟, 王渭玲. 田菁茎瘤固氮根瘤菌在小麦体内的定殖及营养元素相关 miRNA 的表达. *植物营养与肥料学报*, 2014, 20(4): 930–937.
- [7] Li J F, Zhang S Q, Shi S L, *et al.* Position and quantity of endogenesis rhizobia in alfalfa plant. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2009, 17(6): 1200–1205.
李剑峰, 张淑卿, 师尚礼, 等. 苜蓿内生根瘤菌分布部位与数量变化动态. *中国生态农业学报*, 2009, 17(6): 1200–1205.
- [8] Qi J. Screening of alfalfa seeds and its growth-promoting ability. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2006.
祁娟. 苜蓿种子内生根瘤菌筛选及其促生能力研究. 兰州: 甘肃农业大学, 2006.
- [9] Zhang Y T, Shi S L, Miao Y Y, *et al.* Effects of KH_2PO_4 on rhizobia migration and colonization in alfalfa seedlings. *Grassland and Turf*, 2018, 38(3): 40–49.
张运婷, 师尚礼, 苗阳阳, 等. 磷酸二氢钾对苜蓿幼苗体内根瘤菌运移及定殖的影响. *草原与草坪*, 2018, 38(3): 40–49.
- [10] Miao Y Y. Effects of exogenous materials on the migration and colonization of rhizobia in alfalfa plants. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2017.
苗阳阳. 外源物质对苜蓿内生根瘤菌运移定殖的影响研究. 兰州: 甘肃农业大学, 2017.
- [11] Liu X J. Development and self-regulation of root nodules in legume plants. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2013, 41(34): 13110–13114.
刘旭娇. 豆科植物根瘤的发育及其自我调整. *安徽农业科学*, 2013, 41(34): 13110–13114.
- [12] Zeng B Q, Qian B. Evaluation and application of auxin and cytokinin in promoting rooting of pines. *Fujian Forestry Science and Technology*, 1990(3): 58–62.
曾斌琦, 钱波. 生长素和细胞分裂素促进松类生根效果的评价及应用. *福建林业科技*, 1990(3): 58–62.
- [13] Ke M Y. Mechanism of auxin transport in salicylic acid-induced immune response and soybean nodule development. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2022.
柯美玉. 生长素运输在水杨酸诱导的免疫反应和大豆根瘤发育中的作用机制研究. 福州: 福建农林大学, 2022.
- [14] Zhang S Q. Migration of rhizobia inside alfalfa plants and influencing factors. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2012.
张淑卿. 根瘤菌在苜蓿植株体内的运移及影响因素. 兰州: 甘肃农业大学, 2012.
- [15] Yang Q L. Application technology of plant growth regulator in vegetable production. *Agricultural Science and Technology and Information*, 2012(23): 21–22.
杨庆礼. 植物生长调节剂在蔬菜生产上的应用技术. *农业科技与信息*, 2012(23): 21–22.
- [16] Liu Y. Transcriptional analysis of differentially expressed genes involved in selective nodulation in *Bradyrhizobium diazoefficiens* at the presence of soybean root exudate. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2018.
刘尧. 大豆根系分泌物诱导后 *Bradyrhizobium diazoefficiens* 选择性结瘤相关基因表达差异分析. 北京: 中国农业科学院, 2018.
- [17] Liu W, Zhao Z F, Feng Y J, *et al.* Regulation of plant hormones on the formation and development of legumes root nodules. *Soybean Science*, 2013, 32(2): 262–266.
刘薇, 赵振芳, 冯永君, 等. 植物激素在豆科植物根瘤形成和发育过程中的调控作用. *大豆科学*, 2013, 32(2): 262–266.
- [18] Yi C X, Hu J Q, Zhou B Y. Effects of brassinosteroid and gibberellin on chilling resistance and floral formation of *Litchi chinensis*. *South China Fruit Tree*, 2024, 53(2): 68–74, 82.
易晨歆, 胡嘉琪, 周碧燕. 油菜素内酯和赤霉素处理对荔枝抗寒性及成花的影响. *中国南方果树*, 2024, 53(2): 68–74, 82.
- [19] McGuinness P N, Reid J B, Foo E. The role of gibberellins and brassinosteroids in nodulation and arbuscular mycorrhizal

- associations. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 269.
- [20] Liu C, Shi S L, Kang W J, *et al.* Effects of storage methods on the transmissibility of endophytic rhizobia from alfalfa seeds. *Grassland and Turf*, 2022, 42(2): 18–27.
刘畅, 师尚礼, 康文娟, 等. 贮藏方法对紫花苜蓿种子内生根瘤菌传代能力的影响. *草原与草坪*, 2022, 42(2): 18–27.
- [21] Huo P H. Antimicrobial-resistant rhizobia screening and effect verification of undesired microbe control in the prepared rhizobia inoculant. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2014.
霍平慧. 耐抑菌剂根瘤菌筛选及耐药菌株制备抑菌剂抑杂菌效果研究. 兰州: 甘肃农业大学, 2014.
- [22] Ji Y L. Study on growth-promoting effect of *Robinia pseudoacacia* rhizobia on *Platycodon grandiflorus*. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2014, 26(5): 72–75.
冀玉良. 刺槐根瘤菌对桔梗的促生作用研究. *江西农业学报*, 2014, 26(5): 72–75.
- [23] Song J Q, Wang Y X, Zhang B. Effects of endogenous hormone change and exogenous auxin on the germination process of alfalfa seed. *Acta Agrestia Sinica*, 2018, 26(3): 691–696.
宋佳琦, 王玉祥, 张博. 内源激素变化及外源生长素对紫花苜蓿种子萌发过程的影响. *草地学报*, 2018, 26(3): 691–696.
- [24] Anuradha S, Seeta Ram Rao S. Effect of brassinosteroids on salinity stress induced inhibition of seed germination and seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Growth Regulation*, 2001, 33(2): 151–153.
- [25] Kang W J. Biotype classification of *Medicago sativa* rhizobia and its transcriptome analysis. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2019.
康文娟. 紫花苜蓿根瘤菌生物型划分及其转录组学分析. 兰州: 甘肃农业大学, 2019.
- [26] Li J F, Shi S L, Zhang S Q. Effects of the pH value of an acid environment on early growth and physiology of *Medicago sativa* W525. *Acta Prataculturae Sinica*, 2010, 19(2): 47–54.
李剑峰, 师尚礼, 张淑卿. 环境酸度对紫花苜蓿早期生长和生理的影响. *草业学报*, 2010, 19(2): 47–54.
- [27] Elsayed A. Induction of rhizobium inoculants harboring salicylic acid gene. *Australian Journal of Basic & Applied Sciences*, 2015. DOI:10.13140/RG.2.1.1869.0724. 2015.
- [28] Wang S Q, Han X Z, Qiao Y F, *et al.* Effects of low molecular organic acids on nitrogen accumulation, nodulation, and nitrogen fixation of soybean (*Glycine max* L.) under phosphorus deficiency stress. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2009, 20(5): 1079–1084.
王树起, 韩晓增, 乔云发, 等. 缺磷条件下低分子量有机酸对大豆氮积累和结瘤固氮的影响. *应用生态学报*, 2009, 20(5): 1079–1084.
- [29] Zuo Y M, Liu Y X, Zhang F S. Effects of improvement of iron nutrition by mixed cropping with maize on nodule microstructure and leghaemoglobin content of peanut. *Chinese Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2003(1): 33–38.
左元梅, 刘永秀, 张福锁. 与玉米混作改善花生铁营养对其根瘤形态结构及豆血红蛋白含量的影响. *植物生理与分子生物学学报*, 2003(1): 33–38.
- [30] Che B, Jin C, Zhang S, *et al.* Expression and identification of replication and transcription-competent ebola virus-like particles. *Chinese Journal of Virology*, 2017, 33(3): 325–330.
车彬, 金聪, 张硕, 等. 复制型埃博拉病毒样颗粒的表达和鉴定. *病毒学报*, 2017, 33(3): 325–330.
- [31] Zhu H R, Liu S, Yu Y P, *et al.* Research progress on detection methods of plant growth regulators. *Fertilizer and Health*, 2021, 48(6): 15–18, 53.
朱海荣, 刘爽, 于燕萍, 等. 植物生长调节剂检测方法研究进展. *肥料与健康*, 2021, 48(6): 15–18, 53.
- [32] Eva Benková, Michniewicz M, Sauer M, *et al.* Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell*, 2003, 115(5): 591–602.
- [33] Pii Y, Crimi M, Cremonese G, *et al.* Auxin and nitric oxide control indeterminate nodule formation. *BMC Plant Biology*, 2007, 7(1): 21.
- [34] Ferguson B J, Mathesius U. Phytohormone regulation of legume-rhizobia interactions. *Journal of Chemical Ecology*, 2014, 40(7): 770–790.
- [35] Teale W D, Paponov I A, Palme K. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2006, 7(11): 847–859.
- [36] Lin J, Roswanjaya Y, Kohlen W, *et al.* Nitrate restricts nodule organogenesis through inhibition of cytokinin biosynthesis in *Lotus japonicus*. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 6544.
- [37] Nandwal A S, Bharti S. Effect of kinetin and indole acetic acid on growth, yield and nitrogen fixing efficiency of nodules in pea

- (*Pisum sativum* L.). Indian Journal of Plant Physiology, 1982, 25(4): 358–363.
- [38] Mens C, Li D, Haaima L E, *et al.* Local and systemic effect of cytokinins on soybean nodulation and regulation of their isopentenyl transferase (IPT) biosynthesis genes following rhizobia inoculation. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 1105.
- [39] Liu D L, Gu W Y, Qin Y L, *et al.* Effects of exogenous CTK on the growth and character of alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Pratacultural Science*, 2005, 22(10): 36–40.
刘大林, 谷文英, 秦玉玲, 等. 外源细胞分裂素对紫花苜蓿生长及品质的影响. *草业科学*, 2005, 22(10): 36–40.
- [40] Shang X Y, Zhou L F, Shi X Y, *et al.* Self-activation detection and expression analysis of cytokinin response regulator ARR9 of *Medicago truncatula*. *Chinese Journal of Grassland*, 2021, 43(12): 1–10.
尚骁尧, 周玲芳, 石欣玥, 等. 蒺藜苜蓿细胞分裂素响应调节因子 ARR9 自激活检测及表达分析. *中国草地学报*, 2021, 43(12): 1–10.
- [41] Wang W J, Ma D M, Zhao L J, *et al.* Effects of 2, 4-table brassinolide on enzyme activity and root ion distribution and absorption in alfalfa seedlings. *Acta Agrestia Sinica*, 2021, 29(6): 1363–1368.
王文静, 麻冬梅, 赵丽娟, 等. 2, 4-表油菜素内酯对盐胁迫下紫花苜蓿生理指标及根系离子积累的影响. *草地学报*, 2021, 29(6): 1363–1368.