

王焱凡, 杨俊卿, 吕耀, 等. 褐球固氮菌在全红苋菜和小白菜叶际的定殖及其促生长效应[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(2): 336-342.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2020.02.012

褐球固氮菌在全红苋菜和小白菜叶际的定殖及其促生长效应

王焱凡¹, 杨俊卿¹, 吕耀², 徐智敏³, 李取生¹

(1. 暨南大学环境学院, 广东 广州 511443; 2. 广州市环境保护科学研究院, 广东 广州 510620; 3. 仲恺农业工程学院环境科学与工程学院, 广东 广州 510225)

摘要: 通过土培盆栽试验, 研究了叶面接种褐球固氮菌 (Ac63) 在全红苋菜 (*Amaranthus tricolor* L.) 和小白菜 (*Brassica campestris* L.) 叶际的定殖与促生效应, 评估了在贫/富氮土培养且不/喷施接种 Ac63 处理下作物地上部生物量、叶绿素 a 和 b 含量及叶片总氮含量的变化, 设计了 Ac63 的 *nifD* 基因特异性引物并通过 qPCR 分析其在叶际的丰度。结果表明, 接种 Ac63 明显促进了贫氮土培养的全红苋菜地上部生物量、叶绿素 a、b 含量及叶片总氮含量增加 ($P < 0.05$), 但对富氮土培养的全红苋菜仅促进叶绿素 a 含量增加 ($P < 0.05$); 接种 Ac63 对贫/富氮土培养的小白菜均无明显作用 ($P > 0.05$)。qPCR 结果显示 Ac63 能定殖于全红苋菜叶际而不能定殖于小白菜叶际; 此外土壤速效氮可能通过增加叶片氮含量在一定程度上抑制了 Ac63 在全红苋菜的定殖数量及促生作用。说明固氮菌 Ac63 的叶际定殖具有作物选择性, 对于能够定殖的作物具有良好固氮效果。

关键词: 褐球固氮菌; 叶际; 定殖; qPCR

中图分类号: S182, X172

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2020)02-0336-07

Colonization and growth-promoting effects of *Azotobacter chroococcum* in phyllosphere of *Amaranthus tricolor* L. and *Brassica campestris* L.

WANG Yi-fan¹, YANG Jun-qing¹, LYU Yao², XU Zhi-min³, LI Qu-sheng¹

(1. School of Environment, Jinan University, Guangzhou 511443, China; 2. Guangzhou Research Institute of Environmental Protection, Guangzhou 510620, China; 3. College of Environmental Science of Engineering, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China)

Abstract: The colonization of nitrogen-fixing bacteria (Ac63) in the phyllosphere of *Amaranthus tricolor* L. and *Brassica campestris* L. and growth-promoting effects were studied. A pot experiment was carried out to evaluate the changes of aboveground biomass, chlorophyll a and b contents, and total nitrogen content in leaves under different treatments nitrogen-poor and nitrogen-rich soil culture with and without spraying Ac63. The *nifD*-specific primers of Ac63 were designed, and their abundance in leaves was analyzed by qPCR. Results showed that inoculation with Ac63 could significantly promote the aboveground biomass, chlorophyll a and b contents, and total nitrogen content of *A. tricolor* L. cultured in nitrogen-poor soil ($P < 0.05$). However, it only increased the chlorophyll a content of *A. tricolor* L. cultured in nitrogen-rich soil ($P < 0.05$). Inoculation with Ac63 had no significant effect on *B. campestris* L. cultured in nitrogen-poor and nitrogen-rich soil

($P > 0.05$). The qPCR results revealed that Ac63 could colonize in the phyllosphere of *A. tricolor* L. but not in the phyllosphere of *B. campestris* L. In addition, the soil available nitrogen could inhibit the colonization and growth of Ac63 in *A. tricolor* L. by increasing the nitrogen content of leaves to some extent. It is indicated that the phyllosphere

收稿日期: 2019-11-11

基金项目: 国家自然科学基金项目 (41673094)

作者简介: 王焱凡 (1994-), 男, 广东平远人, 硕士, 主要从事农业微生物研究。 (Email) 398639408@qq.com

通讯作者: 李取生, (Email) liqusheng@21cn.com

colonization of nitrogen-fixing bacteria Ac63 has crop selectivity, and it has a good nitrogen fixation effect on the crop that can be colonized.

Key words: *Azotobacter chroococcum*; phyllosphere; colonization; qPCR

氮素在作物产量和品质形成中起着重要作用,但过度施氮会造成农田土壤板结、水体富营养化等环境问题^[1-2]。生物固氮能为陆地生态系统提供每年 195 Tg 的氮输入,其中约 32 Tg 进入农业系统^[3]。微生物肥料是代替化学氮肥的有效手段,非共生固氮菌是微生物肥料的重要组成部分,这类固氮菌能定殖在小麦和玉米等非豆科作物根际,从而促进作物的生长^[4]。其主要接种方式为根际灌施,但复杂的土壤环境及菌株间竞争可能影响非共生固氮菌的根际定殖效果,在一定程度上制约了非共生固氮菌菌剂的推广应用^[5]。

相比于土壤环境,叶际生理环境及菌群结构相对简单。有研究者发现叶际微生物能为宿主植物提供 10%~25% 的氮^[6]。在叶面接种固氮菌 *Azospirillum brasilense* 能显著增加油菜、玉米和小麦的产量^[7-8]。在叶面接种固氮菌 *Klebsiella variicola* W12 能增加玉米茎叶的氮含量^[9]。在叶面喷施接种非共生固氮菌并实现叶际定殖可能是微生物肥料推广应用的思路。非共生固氮菌 *Azotobacter chroococcum* 具有较强的固氮和分泌植物生长激素的能力,其广泛分布于水稻、小麦和棉花等作物的叶际^[10]。另外南方常见的高营养价值蔬菜苋菜 (*Amaranthus tricolor* L.) 和小白菜 (*Brassica campestris* L.) 需要通过大量施用氮肥实现高产,但过量的氮肥会使这 2 种作物的成品率下降及硝酸盐累积^[11-13],目前还没有在这 2 种作物的叶际接种固氮菌的定殖研究。

目前测定叶际定殖菌株数量的方法主要为平板涂布法^[9,14],操作过程繁琐且费时,若叶际原生菌株与目标菌株形态相近则可能会造成计数准确度较低。而实时荧光定量 (qPCR) 法具有反应快速、特异性强和灵敏度高的优点,被广泛应用于细菌定殖数量的检测^[15]。建立叶际细菌 qPCR 测定方法有望能快速、稳定地评估其在叶际的定殖情况。

本研究选择菌株 *Azotobacter chroococcum* CICC 22663 (Ac63) 作为研究对象,建立使用 qPCR 测定 Ac63 在作物叶际中定殖数量的方法,通过盆栽试验评估叶面接种 Ac63 对贫氮土或富氮土栽培下苋菜和小白菜的促生效果,以期能够为农作物的氮肥施

用减量化提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 供试材料

褐球固氮菌 *A. chroococcum* 22663 (Ac63) 购于中国工业微生物菌种保藏管理中心 (CICC),可用作固氮菌肥,菌株保存于 4 ℃ 冰箱中备用。用于 Ac63 培养的固氮培养基 (液体) 成分包括:酵母提取物 0.50 g、甘露醇 20.00 g、KH₂PO₄ 0.20 g、K₂HPO₄ 0.80 g、MgSO₄ · 7H₂O 0.20 g、CaSO₄ · 2H₂O 0.10 g、FeCl₃ 0.02 g、Na₂MoO₄ · 2H₂O 0.02 g、去离子水 1 L。选取全红苋菜 (*Amaranthus tricolor* L.) 及小白菜 (*Brassica campestris* L.) 为供试作物,种子购于江苏欢乐谷种业。

1.2 Ac63 在作物叶际定殖数量测定方法的建立

1.2.1 引物设计 采用 qPCR 方法测定 Ac63 在叶际的定殖。Ac63 通过固氮酶将 N₂ 转化为铵, *nifD* 基因编码 Ac63 的固氮酶钼铁蛋白的 α 链^[16],因此基因的特异性序列可作为 PCR 扩增的靶标,通过 qPCR 特异性地评估 Ac63 在叶际的定殖数量。在 NCBI 中下载 *A. chroococcum* 的 *nifD* 基因的序列及与该序列相似度高但属于不同菌株的 20 组 *nifD* 基因的序列,利用 MEGA7 进行序列同源性比对,使用 Oligo7 软件根据比对得到的特异性序列设计特异性引物。

1.2.2 引物特异性的验证 为确保所设计的引物仅能评估作物叶际 Ac63 定殖数量,在 GenBank 进行引物 primer-BLAST 验证以确保引物特异性。对 Ac63 进行 PCR 验证:按照基因组提取试剂盒说明书提取 Ac63 基因组 DNA,然后使用 Ac63 *nifD* 基因的特异引物对基因组进行 PCR 扩增。PCR 体系 (25 μl): 12.5 μl PrimeSTAR Max Premix 2× (TAKARA, JAPAN), 1.0 μl 正向引物 (10 μmol/L), 1.0 μl 反向引物 (10 μmol/L), 1.0 μl DNA 模板, 9.5 μl DEPC 水。PCR 扩增条件: 98 ℃ 变性 10 s, 55 ℃ 退火 5 s, 72 ℃ 延伸 10 s, 共 35 个循环。通过琼脂糖凝胶电泳确认扩增条带与预计产物大小相符,送上海生工公司进行测序及 BLAST 比对,确认特异性引物

扩增的片段序列与设计序列相符。

1.2.3 引物扩增效率的验证 采用 Ac63 的 *nifD* 基因特异引物对含有 Ac63 *nifD* 基因片段的标准质粒(通过对 Ac63 的基因组进行 PCR 并克隆得到)进行 qPCR 以检测引物的扩增效率。qPCR 体系(20 μ l): 10 μ l SYBR Green PCR Mix (208054, QIAGEN), 1 μ l 正向引物(10 μ mol/L), 1 μ l 反向引物(10 μ mol/L), DNA (50 ng) 1 μ l, DEPC 水 8 μ l。qPCR 程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 10 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 s, 40 个循环, 随后以 0.1 $^{\circ}$ C/s 的速度从 65 $^{\circ}$ C 升至 95 $^{\circ}$ C。通过绘制熔解曲线和扩增曲线评估引物的扩增效率及特异性, 将满足条件的引物作为测定 Ac63 叶际定殖数量的 qPCR 引物。

1.3 土培盆栽试验

1.3.1 供试土壤的采集与前处理 用于盆栽试验的土壤采自广州市番禺区暨南大学南校区校内 0~25 cm 表层土。土壤的理化性质如下: pH 5.52, 氮 1.98 mg/kg、硝态氮 1.26 mg/kg, 速效磷 2.54 mg/kg, 速效钾 66.10 mg/kg。新鲜土壤在阴凉处自然风干 7 d, 随后挑除大块石和植物残体, 将土壤过 2.0 mm(10 目)筛备用。

1.3.2 试验条件及处理 试验设置的处理包括: 每 1 kg 供试土壤以水溶液的形式施入 KCl 95.4 mg(相当于钾 50 mg)同时掺加过磷酸钙(含磷 12%)833.3 mg(相当于磷 100 mg)并混匀, 该处理条件下的土壤称为贫氮土; 每 1 kg 贫氮土再以水溶液的形式施入 NH_4NO_3 57.1 mg(相当于氮 20 mg), 该处理条件下的土壤称为富氮土。选取全红苋菜(简称 A)和小白菜(简称 X)作为供试作物。每种作物分别设置 4 种处理: 贫氮土培养, 不接种 Ac63(简称 C)和喷施接种 Ac63(简称 P); 富氮土培养, 不接种 Ac63(简称 N)或喷施接种 Ac63(简称 NP)。各处理表示方式以作物简称+肥料处理简称命名, 如 AP 代表全红苋菜在贫氮土培养并喷施接种 Ac63。每种处理均设置 3 个花盆作为重复(共 $2 \times 4 \times 3 = 24$ 盆)。

种子消毒及育苗: 作物的种子在 70% 乙醇中表面消毒 30 s, 再在 2% 次氯酸钠中消毒 3 min, 然后用无菌水洗涤 4 次。消毒后的种子播种在含有未灭菌贫氮土的育苗板中, 放置在白光 16 h/d 和 (28 ± 2) $^{\circ}$ C 的培养箱中育苗 14 d, 每天适当补水保湿。将长势相近的幼苗移栽至装有 1.5 kg 未灭菌的贫/富氮

土的塑料花盆(直径 20 cm)内, 每盆移栽 8 株。

盆栽试验于 2018 年 5 月至 7 月在广州市番禺区暨南大学南校区的温室内进行(日均气温为 27~33 $^{\circ}$ C)。在移栽后每天进行浇水保湿, 第 5 d、10 d、15 d 和 30 d 使用 5 ml 雾化喷壶对每组需要接种 Ac63 的处理组(P 和 NP 处理组)的作物叶面喷施 Ac63 叶面接种剂 5 ml(每盆接种约 1.6 ml), 不接种的处理组(C 和 N 处理组)用 5 ml 无菌水代替。接种时土壤表面用铝箔覆盖, 以避免接种剂进入土壤。Ac63 叶面接种剂($>10^9$ CFU/ml)通过如下方式制备: Ac63 接种固氮培养基(液体)后以 28 $^{\circ}$ C, 180 r/min 培养 16 h, 经 6 000 r/min 离心 5 min 后重悬于等体积无菌水中制成。

1.3.3 作物收获与理化性质测定 作物土培 45 d 后收获, 分别剪取作物的根、茎和叶, 称量同一盆内 8 株作物的茎叶总质量作为地上部鲜质量。采用 Arnon 光度法测定作物叶片中叶绿素 a 和叶绿素 b 含量^[17]。采用国标 LYT1269—1999 的方法测定叶片总氮含量。需要进行 Ac63 定殖数量测定的叶片用液氮速冻并迅速转移至 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

1.3.4 作物叶际菌株 Ac63 定殖数量的评估 将叶片从 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中取出并在液氮中研磨成粉末状, 采用植物总 DNA 提取试剂盒(69104, QIAGEN)提取叶片总 DNA。通过琼脂糖凝胶电泳法测定 DNA 完整性, 采用超微量分光光度计(Nanodrop One C, Thermo Fisher Scientific)测定 DNA 浓度, 并使用 DEPC 水将 DNA 稀释至 50 ng/ μ l。将方法 1.2.3 中确定的引物用于叶际 DNA 的 qPCR 扩增, 扩增体系及程序同方法 1.2.3。

1.4 数据处理

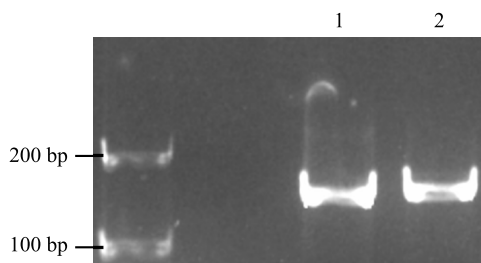
采用 Microsoft Excel 2016 和 SPSS 22.0 进行数据平均值、标准差及方差分析计算; 采用 SPSS Statistics 22.0 进行单因素方差分析(Turkey 分析), $P < 0.05$ 被认为组间有显著差异; 采用 Thonar 等^[18]的公式计算标准质粒的拷贝数, 使用 CFX manager 3.1 软件进行 qPCR 计算并换算成每 1 g 叶片中 *nifD* 基因的拷贝数, 确保引物或扩增条件达到绝对定量的标准($0.9 < E < 1.1$, $R^2 > 0.97$)。

2 结果与分析

2.1 Ac63 在叶际定殖数量测定方法的建立

为实现对作物叶际 Ac63 定殖数量的测定, 根

据 *A. chroococcum* *nifD* 基因的特异序列设计了 2 对特异性引物,引物对的序列分别为 *nifD* 1F:5'-TTA-CCCTGAGAAAGCCCGT-3'、*nifD* 1R: 5'-CCCTTGGAACCGGCGTAAG-3'及 *nifD* 2F:5'-CCCTGAGAAA-GCCCGTAAA-3'、*nifD* 2R: 5'-CCCTTGGAACCGGCGTAA-3'。BLAST 比对结果显示,2 对引物均只能扩增出 *A. chroococcum* 的 *nifD* 基因的片段。使用 2 对特异性引物对 Ac63 的基因组进行 PCR 扩增,电泳条带的大小均与设计大小一致,约为 150 bp(图 1)。测序结果验证了 2 对引物均能扩增出 Ac63 的 *nifD* 基因片段,但仅有 *nifD* 1F/*nifD* 1R 引物对的扩增效率($R^2=0.99$, $E=98\%$)达到了绝对定量的标准。这表明引物对 *nifD* 1F/*nifD* 1R 及方法 1.2.3 的扩增条件可用于测定 Ac63 在叶际的定殖数量。



1:引物为 *nifD* 1F/*nifD* 1R;2:引物为 *nifD* 2F/*nifD* 2R。

图 1 2 对特异性引物对 Ac63 的 *nifD* 基因的 PCR 扩增

Fig.1 PCR amplification of the *nifD* gene from Ac63 by two pairs of specific primers

2.2 叶面喷施接种 Ac63 对全红苋菜和小白菜生物量、叶绿素含量和叶片总氮含量的影响

如图 2、图 3、图 4 所示,在贫氮土中,喷施接种 Ac63(AP 处理)相比于不接种(AC 处理)能显著增加全红苋菜的地上部鲜质量、叶绿素 a、b 含量和叶片总氮含量($P<0.05$);在富氮土中,喷施接种 Ac63(ANP 处理)相比于不接种(AN 处理)能显著增加全红苋菜叶绿素 a 含量($P<0.05$),而对地上部鲜质量、叶绿素 b 含量及叶片总氮含量无显著影响($P>0.05$)。这说明 Ac63 对全红苋菜有促生作用,但土壤速效氮的增加会降低 Ac63 对全红苋菜的促生效果。

无论在贫氮土或富氮土中,喷施接种 Ac63(XP、XNP 处理)相比于不接种(XC、XN 处理)对小白菜的地上部鲜质量、叶绿素 a、b 含量和叶片的总氮含量的影响均无显著差异($P>0.05$)。这说明

Ac63 对小白菜无明显促生作用。

贫氮和富氮土中,相比于不接种处理,喷施接种 Ac63 后全红苋菜地上部鲜质量、叶绿素 a、b 含量和叶片总氮含量的增长率均比小白菜高。这进一步说明接种 Ac63 对全红苋菜的促生作用较小白菜强。

2.3 Ac63 在全红苋菜和小白菜叶际的定殖情况

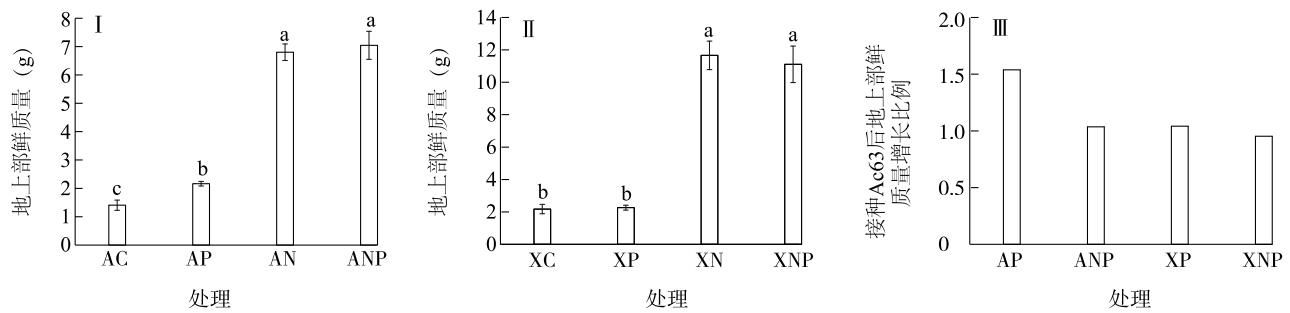
由于引物对 *nifD*1F/*nifD*1R 对 Ac63 的 *nifD* 基因具有较好的特异性,故叶际中 *nifD* 基因的丰度代表了 Ac63 的定殖数量。如图 5 所示,使用引物对 *nifD*1F/*nifD*1R 进行 qPCR 扩增的结果说明:贫氮土及富氮土中,全红苋菜叶面喷施接种 Ac63 后叶际 *nifD* 基因丰度分别达到 $1 \text{ g } 7.27 \times 10^5$ 拷贝和 6.34×10^5 拷贝,而小白菜叶面喷施接种 Ac63 后叶际 *nifD* 基因在贫/富氮土中均低于检出限。说明固氮菌 Ac63 能在全红苋菜的叶际定殖,而不能在小白菜的叶际定殖,Ac63 在不同作物叶际定殖存在差异;另外在富氮土栽培条件下 Ac63 在全红苋菜叶际的定殖数量比贫氮土栽培条件下低,这可能是由于全红苋菜通过吸收土壤速效氮使得叶片中氮含量增加,进而抑制了 Ac63 的定殖。

3 讨论

叶面接种 Ac63 显著提高了贫氮土培养的全红苋菜叶片总氮含量。有报道称固氮菌 *A. chroococcum* 利用固氮酶将空气中的 N_2 固定为铵^[19],在满足菌体自身氮需求后将多余的铵通过 *glnK-amtB* 操纵子分泌到胞外^[20]。Ac63 可能是通过固氮并分泌铵的方式使得全红苋菜叶片总氮含量增加。

喷施接种 Ac63 相比于不接种对全红苋菜有较显著的促生作用,而对小白菜无显著的促生作用。全红苋菜叶绿素含量及生物量上升的原因可能是叶片氮的增加促进了叶绿素的合成,同时叶绿素又是参与植物光合作用的一种主要色素^[21],从而提高了作物的生物量。qPCR 测定结果也显示 Ac63 能够在全红苋菜的叶际定殖,而不能在小白菜的叶际定殖。有报道称菌株与宿主植物的匹配度可能影响叶面接种固氮菌的定殖和促生效果^[22]。最近的研究结果也表明 *Azospirillum brasilense* 叶面接种剂对不同作物的促生效果及定殖效果存在较大差异^[7-8, 23]。这说明相比于在小白菜叶际,Ac63 在全红苋菜叶际具有更强的环境适应力及微生物竞争力。

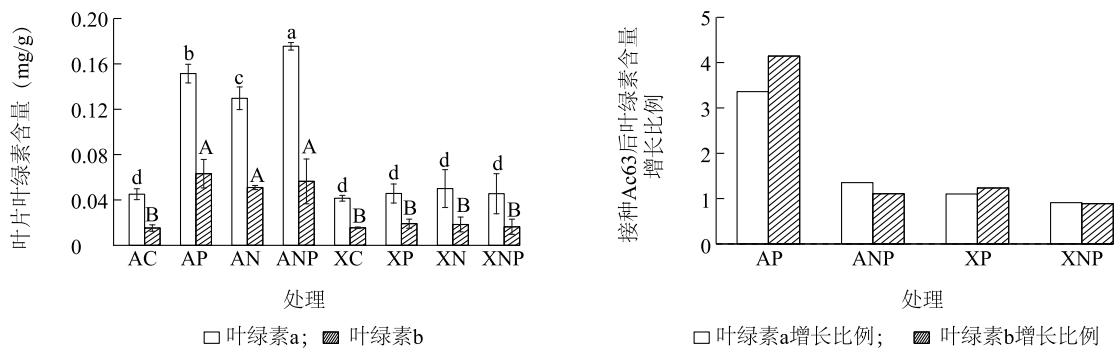
值得注意的是 Ac63 为何只在全红苋菜而不在



A:全红苋菜;X:小白菜。C:贫氮土培养,不接种 Ac63;P:贫氮土培养,接种 Ac63;N:富氮土培养,不接种 Ac63;NP:富氮土培养,接种 Ac63。不同小写字母代表不同组间差异显著 ($P<0.05$)。

图2 喷施接种 Ac63 对全红苋菜 (I) 和小白菜 (II) 地上部鲜质量及其增长率 (III) 的影响

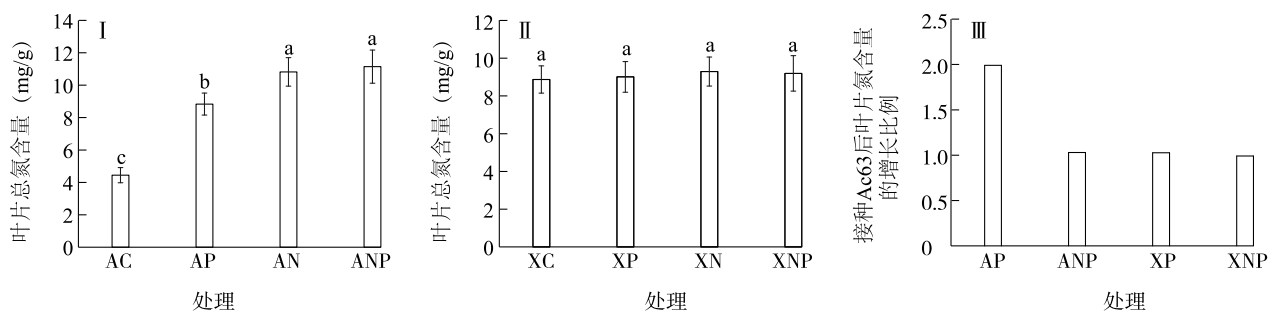
Fig.2 Effects of inoculation with Ac63 on shoot fresh weight of *Amaranthus tricolor* L. (I) and *Brassica campestris* L. (II) and its growth rate (III)



各处理见图2注。不同小写和大写字母分别代表不同组间叶绿素 a 和 b 含量差异显著 ($P<0.05$)。

图3 喷施接种 Ac63 对全红苋菜和小白菜叶片叶绿素含量 (I) 和叶绿素含量增长率 (II) 的影响

Fig.3 Effects of inoculation with Ac63 on chlorophyll content (I) and its growth rate (II) of *Amaranthus tricolor* L. and *Brassica campestris* L.



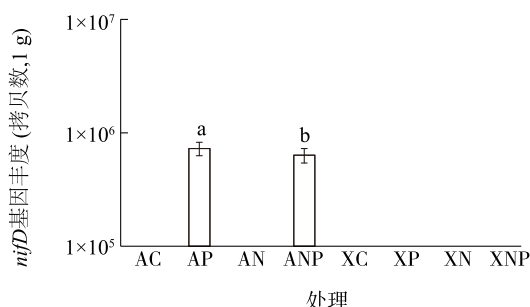
各处理见图2注。不同小写字母代表不同组间差异显著 ($P<0.05$)。

图4 喷施接种 Ac63 对全红苋菜 (I) 和小白菜 (II) 叶片总氮含量及其增长率 (III) 的影响

Fig.4 Effects of inoculation with Ac63 on leaf total nitrogen content of *Amaranthus tricolor* L. (I) and *Brassica campestris* L. (II) and its growth rate (III)

小白菜的叶际定殖。叶际包括叶片表面及内部,叶际细菌首先通过形成生物膜定殖在叶面,随后部分细菌能从伤口或气孔侵入叶内实现更稳定的定

殖^[24]。细菌形成生物膜是叶际定殖的关键,如固氮菌 *P. stutzeri* 通过形成生物膜定殖在叶面^[25]。部分关键的化学物质诱导了生物膜的形成,如沙拉叶片



各处理见图2注。不同小写字母代表不同组间差异显著($P < 0.05$)。

图5 喷施接种 Ac63 对盆栽全红苋菜和小白菜叶片 Ac63 *nifD* 基因丰度的影响

Fig.5 Effects of inoculation with Ac63 on the abundance of *nifD* gene in the leaves of *Amaranthus tricolor* L. and *Brassica campestris* L.

的渗出物中转铁蛋白能增强病原菌 *Salmonella enterica* 的铁载体合成,并促进菌株生物膜形成从而实现在沙拉叶面的定殖^[26]。推测全红苋菜的叶面可能存在促进 Ac63 生物膜形成的物质,而小白菜叶面不存在。

目前仍不清楚 Ac63 是否侵入了叶内。有研究者发现使用绿色荧光表达质粒 pHc60 标记非共生固氮菌 *A. chroococcum* (Azb19) 后,菌株只能定殖在高粱的根表面而不能侵入根内^[27]。申红妙等发现促生菌 JL4-gfp 在葡萄叶面及叶内均能定殖^[14]。Peredo 等通过原位荧光杂交技术发现植物促生菌 *Methylobacterium* 侵入了拟南芥的叶内并定殖在气孔的内壁^[28]。*A. chroococcum* 能否侵入叶内未见报道。

另外 Ac63 在贫氮土栽培的全红苋菜叶际定殖数量及 Ac63 对植物的促生效果显著高于富氮土栽培的,这可能由于土壤速效氮被作物吸收使得叶片氮含量增加,进而抑制了 Ac63 的促生效果及其在叶际的定殖能力。有研究者称施氮会降低甘蔗叶际内生固氮菌 *nifH* 基因的表达量^[29]。Fuentes-Ramirez 等也发现外源施加土壤速效氮会降低内生固氮菌 *G. diazotrophicus* 在甘蔗的定殖数量,并推测这是由于植物的生理状态改变造成的^[30]。但目前还没有氮肥对固氮菌叶际定殖调控机制的报道。我们推测苋菜从土壤中吸收了更多的速效氮导致减少了对 Ac63 的定殖依赖。外源施加速效氮可能会影响固氮菌在叶际的定殖和促生能力,应考虑氮肥与

固氮菌接种剂的配比。

综上所述,Ac63 在全红苋菜和小白菜叶际的定殖能力存在较大差异,Ac63 能够定殖于全红苋菜叶际并显著促进其生长,同时土壤速效氮含量在一定程度上会影响 Ac63 对作物的促生效果。研究结果为减少农业生产中化学氮肥施用量提供了可能性,也为发掘固氮菌 Ac63 在叶际定殖的机制奠定了基础。

参考文献:

- [1] 孙丽,马友华,何传龙,等.巢湖流域减量施肥对番茄产量品质和土壤硝态氮的影响[J].中国农学通报,2011,27(25):250-255.
- [2] CARPENTER S R, CARACO N F, CORRELL D L, et al. Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen[J]. Ecological Applications, 1998, 8(3):559-568.
- [3] GALLOWAY J N, DENTENER F J, CAPONE D G, et al. Nitrogen cycles: Past, present, and future[J]. Biogeochemistry, 2004, 70(2):153-226.
- [4] SAIKIA S, JAIN V. Biological nitrogen fixation with non-legumes: An achievable target or a dogma? [J]. Current Science, 2007, 92(3):317-322.
- [5] BASHAN Y, DE-BASHAN L E, PRABHU S, et al. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998-2013) [J]. Plant and Soil, 2014, 378(1/2):1-33.
- [6] BENTLEY B L, CARPENTER E J. Direct transfer of newly-fixed nitrogen from free-living epiphyllous microorganisms to their host plant[J]. Oecologia, 1984, 63(1):52-56.
- [7] AHMADI-RAD S, GHOLAMHOSEINI M, GHALAVAND A, et al. Foliar application of nitrogen fixing bacteria increases growth and yield of canola grown under different nitrogen regimes[J]. Rhizosphere, 2016, 2:34-37.
- [8] FUKAMI J, NOGUEIRA M A, ARAUJO R S, et al. Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense* [J]. AMB Express, 2016, 6(1):3.
- [9] 葛安辉,方萍,熊超,等.联合固氮菌叶面接种剂的优化及其在玉米叶际的定殖[J].微生物学通报,2018,45(6):1303-1313.
- [10] RASHID A, MIR M R, HAKEEM K R. Biofertilizer use for sustainable agricultural production[M]. Cham, Springer: Plant, Soil and Microbes, 2016:163-180.
- [11] 杨佩,赵中华.氮肥对小白菜生长及硝酸盐累积的影响[J].中国果菜,2017,37(10):20-23.
- [12] 黄小云,徐伟,苏唯,等.氮肥施用对小白菜产量和品质的影响分析[J].农村经济与科技,2016,27(14):38-39.
- [13] 李卫泳,王志强,巩万合,等.苋菜氮磷钾肥最佳用量试验[J].蔬菜,2015(2):29-31.

- [14] 申红妙,李正楠,贾招闪,等. 内生枯草芽孢杆菌 JL4 在葡萄叶上的定殖及其对葡萄霜霉病的防治[J]. 应用生态学报, 2016, 27(12):4022-4028.
- [15] ZHANG Y, GAO X, WANG S, et al. Application of *Bacillus velezensis* NJAU-Z9 enhanced plant growth associated with efficient rhizospheric colonization monitored by qPCR with primers designed from the whole genome sequence[J]. Current Microbiology, 2018, 75(12):1574-1583.
- [16] JACOBSON M, PREMAKUMAR R, BISHOP P. Transcriptional regulation of nitrogen fixation by molybdenum in *Azotobacter vinelandii*[J]. Journal of Bacteriology, 1986, 167(2):480-486.
- [17] 苏正淑,张宪政. 几种测定植物叶绿素含量的方法比较[J]. 植物生理学通讯, 1989(5):77-78.
- [18] THONAR C, ERB A, JANSÁ J. Real-time PCR to quantify composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities-marker design, verification, calibration and field validation[J]. Molecular Ecology Resources, 2012, 12(2):219-232.
- [19] ROBSON R L, JONES R, ROBSON R M, et al. *Azotobacter* genomes; the genome of *Azotobacter chroococcum* NCIMB 8003 (ATCC 4412)[J]. PLoS One, 2015, 10(6):e0127997.
- [20] RADCHENKO M V, THORNTON J, MERRICK M. Control of *AmtB-GlnK* complex formation by intracellular levels of ATP, ADP, and 2-oxoglutarate[J]. Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(40):31037-31045.
- [21] BOJOVIC B, MARKOVIC A. Correlation between nitrogen and chlorophyll content in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Kragujevac Journal of Science, 2009, 31:69-74.
- [22] HUANG H, BREMER E, HYNES R, et al. Foliar application of fungal biocontrol agents for the control of white mold of dry bean caused by *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. Biological Control, 2000, 18(3):270-276.
- [23] 方萍,张丽梅,贾小明,等. 固氮螺菌(*Azospirillum brasilense*) NO40 在红壤性水稻土上的接种效应[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2001, 27(10):35-38.
- [24] POTNIS N, TIMILSINA S, STRAYER A, et al. Bacterial spot of tomato and pepper: Diverse *X. anthomonas* species with a wide variety of virulence factors posing a worldwide challenge[J]. Molecular Plant Pathology, 2015, 16(9):907-920.
- [25] KASTELEIN P, KRIJGER M, CZAJKOWSKI R, et al. Development of *Xanthomonas fragariae* populations and disease progression in strawberry plants after spray-inoculation of leaves[J]. Plant Pathology, 2014, 63(2):255-263.
- [26] KOUKKIDIS G, HAIGH R, ALLCOCK N, et al. Salad leaf juices enhance *Salmonella* growth, colonization of fresh produce, and virulence[J]. Appl Environ Microbiol, 2017, 83(1):2416.
- [27] SULTANA U, DESAI S, REDDY G. Successful colonization of roots and plant growth promotion of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) by seed treatment with *Pseudomonas putida* and *Azotobacter chroococcum*[J]. WJ Microbiol, 2016, 3:43-49.
- [28] PEREDO E L, SIMMONS S L. Leaf-FISH: Microscale imaging of bacterial taxa on phyllosphere [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 8:2669.
- [29] 李佳慧,袁丹,陆建明,等. 氮肥对甘蔗叶片内生固氮菌 *nifH* 基因表达的影响[J]. 生物技术通报, 2017, 33(7):100-106.
- [30] FUENTES-RAMIREZ L E, CABALLERO-MELLADO J, SEPULVEDA J, et al. Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization[J]. FEMS Microbiology Ecology, 1999, 29(2):117-128.

(责任编辑:张震林)