

根瘤菌菌剂的研究与开发现状^{*}

管凤贞¹ 邱宏端¹ 陈济琛² 林新坚^{2**}

(¹福州大学生物科学与工程学院, 福州 350108; ²福建省农业科学院土壤肥料研究所, 福州 350003)

摘要 根瘤菌与豆科植物共生成成为豆科植物固氮的重要方式, 它可以为豆科植物提供所需氮量的 1/2 ~ 1/3。因此, 土壤中有效根瘤菌的数量是决定豆科植物产量的重要因素, 而根瘤菌菌剂的使用可以有效地提高土壤中根瘤菌数量。本文从根瘤菌菌剂制备中高效菌种的选育及匹配、高密度菌剂的制备、菌剂保存方法等方面进行综述。比较了自然选育、杂交选育和诱变选育等各类选育方法及琼脂试管配对法和水培配对法的优缺点; 总结了菌剂制备的一般过程和方法; 论述了菌剂保藏过程中冷冻干燥法和各种保护剂的使用对菌剂保藏效果的影响。本文阐述了根瘤菌菌剂的制备工艺和发展方向, 为根瘤菌剂的研制提供重要参考。

关键词 根瘤菌; 菌剂; 豆科植物

中图分类号 S144.3 **文献标识码** A **文章编号** 1000-4890(2012)3-0755-05

Rhizobium inoculants: Research progress and development status. GUAN Feng-zhen¹, QIU Hong-duan¹, CHEN Ji-chen², LIN Xin-jian^{2**} (¹Department of Biological Science and Engineering, Fuzhou University, Fuzhou 350108, China; ²Soil and Fertilizer Institute of Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China). *Chinese Journal of Ecology*, 2012, **31** (3): 755–759.

Abstract: Rhizobium-legumes symbiosis is an important way of legumes nitrogen fixation, which can provide 1/2–1/3 of nitrogen the legumes needed in their whole life. Therefore, the quantity of effective rhizobium in soil is an important decisive factor in legume production, while the use of rhizobium inoculants can effectively increase the quantity of rhizobium in soil. This paper reviewed the research progress and development status about the breeding and matching of highly effective rhizobium strains and the preparation and preservation of high-density rhizobium inoculants, analyzed the advantages and disadvantages of the breeding methods such as natural breeding, hybrid breeding, and mutation breeding, the agar matching methods, and the water culture matching methods, and summarized the general process and methods for inoculant preparation. The effects of various freezing-drying methods used in rhizobium inoculant preservation and of the applications of various protective agents on the preservation of rhizobium inoculants were also discussed. This review elaborated the preparation technology and the future development of rhizobium inoculants, which could provide a reference for the research and development of rhizobium inoculants.

Key words: rhizobium; inoculants; legume.

豆科植物在我国植物库中占据着举足轻重的作用。据统计, 我国拥有的豆科植物约为 690 属, 17600 余种, 具有极大的经济及社会价值。根瘤菌作为一种革兰氏阴性的短杆菌, 菌体进入豆科植物

的根系后会与豆科植物共生形成根瘤。豆科植物与根瘤菌共生具有固氮能力强、固氮量大、抗逆性强的优点, 是生物固氮中最高效的体系, 固氮量约占生物固氮总量的 65% (林稚兰和黄秀梨, 2000; 陈文新, 2004)。因此, 在首次种植植物的新地 (Brockwell *et al.*, 1988; Hume & Blair, 1992) 或者在有效根瘤菌数目较少的土壤中 (Singleton *et al.*, 1992) 接种根瘤

^{*} 公益性行业 (农业) 科研专项经费 (200803029-14) 和福建省省属公益类科研院所基本科研专项 (2010R1024-3) 资助。

^{**} 通讯作者 E-mail: xinjianlin@163.net

收稿日期: 2011-07-25 接受日期: 2011-11-28

菌剂显得尤为重要。

对此,世界各国相继展开了大量的研究,自1895年首次在德国出现了以“Nitragin”为商品名的根瘤菌接种剂以来,前苏联、英国、美国和法国等相继实现了根瘤菌剂的工业化生产和大面积推广。目前,在美国等发达国家和巴西等发展中国家,接种根瘤菌面积一般都占播种面积的30%~50%,既改善了土壤,保护了环境,又有利于维持氮素平衡(Gan, 2010)。我国根瘤菌剂的研究从20世纪30年代开始,目前共生固氮的基础研究已达到国际先进水平,但根瘤菌剂的产业化和大面积推广应用却很落后,豆科作物接种根瘤菌剂的面积仅占播种面积的1%~3%,与国外相比差距甚大(朱铁霞和胡自治, 2005)。因此,本文对根瘤菌剂制备过程若干环节进行总结归纳和分析,以期找到高效可行的制备方法,为根瘤菌剂在我国的大面积推广应用提供可供参考的理论和依据。

1 高效菌种的选育及匹配

豆科植物与根瘤菌之间的共生结瘤是一个复杂的过程,最终在宿主植物根部形成能够固氮的根瘤(Long, 1989)。形成根瘤的过程是一个由双方有关基因共同参与、相互识别、协同作用并能随环境条件和细胞内的生理状态变化而调节的复杂过程。根瘤菌与寄主之间只有很好搭配才能使豆科植物获得最佳的固氮效果。因此,特定植株高效菌种的选育及匹配至关重要。

目前,对高效菌种的选育主要有以下几种方法: 1) 自然选育。这是一种最基础也是运用得最为广泛的菌种选育方法,其实质是利用自然界中丰富的豆科根瘤菌菌种资源,将自然条件下存在于豆科植物中的各种优良根瘤菌种进行搜集、整理和利用。由于根瘤菌内的宿主专一性基因只存在于某些根瘤菌种内(高俊莲等, 2006),因此,目的豆科植物的根瘤菌菌剂的菌种可以从该植物根瘤中直接分离而来。具体的分离方法有平板划线法和稀释涂布法,其中平板划线法使用较多,通过多次的分离纯化得到纯的单菌落,然后结合所分离菌种的各种理化指标、利用PCR-RFLP分析16S rDNA及nifD-K间隔法(Romdhane *et al.*, 2009)对初步分离的根瘤菌进行鉴定。2) 杂交选育。杂交育种是利用两个或多个遗传性状差异较大的菌株,通过有性杂交、准性杂交和遗传转化等方式,而导致其菌株间的基因的重

组,把亲代的优良性状集中在后代中的一种育种技术(范运梁等, 2010)。此技术可以加大不同来源的根瘤菌株进行基因重组,富集优良基因,但是该过程需要进行多次移接和筛选,较为繁琐,目的性不强,加之后期基因工程技术的快速发展,使得该种育种方法基本上被取代。3) 诱变选育。这是一种利用物理、化学或生物诱变因子对目的微生物基因组进行处理,从而得到所需优良菌种的技术。常用的物理诱变方法有紫外诱变和激光诱变,近年发展起来的微波诱变凭借其较为稳定的诱变效果及较高的有力突变率正逐步成为物理诱变法中不可忽视的新兴力量。比起物理诱变,化学诱变的突变率要高些,但因其较高的致癌率和突变的不稳定性,需要谨慎操作,亚硝基胍(NTG)和呀啉橙是最常用的化学诱变剂。生物诱变主要是利用营养缺陷型菌株的回复突变来选育出具有高效结瘤固氮能力的根瘤菌(Annapurna *et al.*, 2007; Appunu & Dhar, 2008)。4) 原生质体融合选育。原生质体融合技术可以根据需要有目的的选择菌株进行融合,得到较为理想的融合体。韦革宏等(2001)以青霉素和氯霉素分别作为*Rhizobium leguminosorum* USDA2370和*Sinorhizobium xinjiangensis* CCBAU110的抗药性标记。利用原生质体融合技术,成功地获得了USDA2370和CCBAU110的属间融合菌株。该融合菌株可分别在双亲寄主植物上结瘤(宫世勇, 2006)。但该技术中有原生质体的制备和再生对环境依赖很大,因此使该技术的广泛使用受到了一定的限制,在成功选育高效根瘤菌方面的报道较少。5) 基因工程选育。利用基因工程选育高效结瘤固氮的根瘤菌是目前使用得最为广泛的方法,它可以克服菌种间远缘杂交不亲和的现象,有效地提高菌种的结瘤和固氮性能(李友国和周俊初, 2002)。目前国外最成功的例子是利用*dctBA*、*dctB*、*dctC*和*nifA*基因构建的重组苜蓿根瘤菌菌株RMPBC-2,美国环境保护署(EPA)批准其进行商品化生产,这也是目前世界上唯一1株通过了遗传工程菌安全性评价并进入有限商品化生产的重组根瘤菌菌株(Stougaard, 2002; 唐颖, 2006)。

根瘤菌对植株的增产效果除了与根瘤菌的固氮效率有关外,还取决于该菌与特定植株的匹配关系。考察菌种与植株间的匹配情况则主要采用盆栽法和试管培养法,其中又以简便、直观的试管培养法居多。当前的试管培养法根据培养基的不同又分为水培法和琼脂试管培养法。通过这两种培养方法可以

简便易行的观察测量植株的结瘤情况、固氮性能和产量变化等情况,从而确定对菌种与植株间的匹配关系,为后期制备相应植株的根瘤菌剂提供可供参考的依据。

2 高密度菌剂的制备

菌剂的商业生产通常决定于以下因素:1)生产菌株的增产效果;2)生产成本;3)保存后的有效活菌数;4)剂型和使用方法(刘保平和周俊初,2006)。目前市场上常见的根瘤菌菌剂,根据载体的状态和制备的工艺主要分为5种类型:琼脂平板菌剂、固体菌剂、颗粒菌剂、液体菌剂、冻干菌剂(吴红慧和周俊初,2004)。琼脂和液体剂型是最早应用的菌剂,其生产工艺简单,但不便于运输和保存。相反,固体菌剂由于具有轻质、保质期长、便于运输等优点得到了较为广泛的应用。制备高品质的固体根瘤菌剂,最重要的是选择合适的吸附剂。陈华葵和樊庆笙(1979)指出吸附剂的要求是通气良好,持水量高,据此,提出4项初步的要求:通气良好、持水量高、有机质含量在30%以上、酸碱度中性(王保林等,2006)。据此,作为根瘤菌的吸附材料很多,如草炭、蛭石、珍珠岩、煤炭、草炭、膨润土和高岭土等。草炭、蛭石、珍珠岩由于其营养与pH适中,表面积比较大和吸附性好,有利于根瘤菌的存活及菌剂保存,是理想的吸附剂(熊春林等,1989;牛彦波等,2003;吴皓琼等,2004)。另外,草炭和蛭石等资源丰富,价格低廉,适合于在根瘤菌剂生产中应用推广,已成为当代根瘤菌类肥料的主要类型,但是由于草炭是不可再生资源(Han *et al.*, 2010),在某种程度上影响了其使用。近年来,随着学科的交叉日益紧密,越来越多的新型高效吸附剂不断出现。如地方工业废料:海藻酸钠(Dommergues *et al.*, 1979)、草酸生产废料(Karshal *et al.*, 1996)和飞灰(Ghosh *et al.*, 1996)等;食品行业吸附剂:多孔淀粉(姚卫蓉和姚惠源,2004);医用吸附剂:离子交换树脂、吸附树脂、氧化淀粉或氧化纤维素等(张树江等,2002);用于饲料行业的:白炭黑、草炭等(李晓暄等,2010);环境治理领域:介孔材料二氧化硅、 TiO_2 - SiO_2 等(吴胜举等,2010);最新研究又发现以蚯蚓粪及其水提物、牛尿等为基础的天然混合物(Kalra *et al.*, 2010),含有粉煤灰的土壤(Chaudhary *et al.*, 2011)等都可以大幅度的提高根瘤菌的数量及保藏时间。这些吸附剂各具优点,它们的出现为根瘤菌

剂的制备提供了广阔的原料,也为新型根瘤菌剂的开发提供了参考。固体菌剂就是将培养好的菌液在无菌状态下直接加于这些吸附剂上制备而成的。颗粒菌剂则是将根瘤菌液吸附在草炭、蛭石、细黏土等固体材料上,再经造粒、烘干而成,经过造粒制备的菌剂适合大规模机械播种。冻干菌剂是用冷冻干燥技术除去细胞水分制成,国外已有商品出售(吴红慧和周俊初,2004)。除琼脂菌剂外,其他4种菌剂的制备过程都涉及到菌种的高密度培养。

目前,国内外大都利用自动化发酵技术来获得制备根瘤菌剂所需的高密度细胞培养液。大致流程为:菌种的斜面活化→一级种子液培养→二级种子液培养→发酵罐内扩大培养→高密度菌剂的获得。在此期间,发酵培养基种类繁多,有较为常用的以甘露醇-酵母粉为主的YMA培养基,以豆芽汁为主要成分的BSE培养基,成分较为简单的YA、TY培养基,较为复杂的AMM、SM培养基,近期,诸如以糖废料为底物(Singh *et al.*, 2011)的一些新型培养基也时有报道,具体采用何种培养基,还需根据不同菌体的生化特性而定。发酵条件通常为:通气 $0.4 \sim 0.8 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$,搅拌速度 $120 \sim 200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,温度 $28 \sim 30 \text{ }^\circ\text{C}$,接种量 $1\% \sim 10\%$,种子液的装液量 $20\% \sim 60\%$ 。放罐时间则根据各种类型根瘤菌的生长状况而定,如贾小红等(2007)研究的北京紫花苜蓿需 $30 \sim 36 \text{ h}$,陈逸湘和李忠(2007)研究的紫云英需 $3 \sim 4 \text{ d}$,王继华等(2000)研究的快生型大豆根瘤菌需 48 h 。经过相应时间的培养,菌数大都超过 $10^{10} \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

3 菌剂保存方法

菌剂的保藏对于菌剂生产具有极其重要的意义。保质期的长短直接关系到菌剂的运输和使用效果,进而关系到生产厂家的盈亏。因此,良好的保藏方法是菌剂制备结束后一项重要的工作。针对菌剂的保藏,固体菌剂主要是采取常温保藏法,Khanazi等(2007)利用珍珠岩为主要吸附剂制备的固体菌剂,置于室温保藏6个月后,菌剂中活菌数仍大于 $1 \times 10^9 \text{ ind} \cdot \text{g}^{-1}$ 。液态、浓缩菌剂主要用低温及冷冻干燥法。其中低温可以有效的降低菌体的代谢,增加菌剂的保质期。为了增加液态菌剂中菌体的存活率,常需添加诸如硅藻土、琼脂等的悬浮剂。冷冻干燥保藏法较液态保藏法效果更佳,朱虹和何绍江(2005)利用冷冻干燥保藏了 $4 \sim 25$ 年的根瘤菌进

行试验,发现其仍然具有很好的结瘤固氮能力,但由于在低温的情况下细胞容易冻伤,因此需加入适当的保护剂,保护剂不仅可以与细胞内或细胞外的水牢固结合,减少冷冻过程中的水分丢失,还可减少盐类物质对细胞的损害,防止细胞内形成太大的冰晶而损害细胞,进而使菌体的存活率大大提高(Zdenek, 2003)。Harrison (1956) 使用甘油做保护剂,并认为甘油含量为 2% ~ 55% 时对细菌都有保藏效果,具体浓度随细菌种类不同而不同,一般选用 10%。常玮等(2003)将石蜡封存的根瘤菌进行活化,发现其存活率仍为 50.6%。除此之外,用作食品保鲜的山梨酸、苯甲酸钠、脱脂牛奶等也常作为保护剂。

4 根瘤菌菌剂的开发现状及前景

根瘤菌菌剂作为一种有效提高豆科植物产量的微生物菌剂,已经得到了较为全面的开发,目前市售的根瘤菌菌剂主要有液态、固态和颗粒 3 种。并从 2002 年实验到现在已收到很好的效果,每公顷平均增产大豆 4342 kg,每公顷平均效益 484.5 元,减少尿素投入达 800 t。使用根瘤菌剂不仅可以增加豆科植物的产量,而且由于根瘤菌剂耐污染能力强(Li *et al.*, 2011),可以减少因长期使用化肥对土壤造成的破坏、水源污染、节省能源和改善土壤生态环境等。尽管如此,由于我国根瘤菌剂产业起始阶段发酵水平低、保质期短和技术不成熟、质量不过关等问题,使根瘤菌剂的产业化和大规模推广应用受限制,虽然我国大豆种植约 800 万 hm^2 ,但与大豆生产大国 30% ~ 60% 以上的根瘤菌剂接种面积相比,我国不足 3% (农博网, <http://info.china.alibaba.com/news/detail/v0-d1006148589.html>),差距甚大,因此有必要加大研究与开发力度,缩小与发达国家多年来形成的巨大差距。

现阶段,我国制备根瘤菌剂的技术已非常成熟。秦皇岛领先科技有限公司研制的根瘤菌剂的有效菌数已经超过了 $2 \times 10^9 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$,与美国、加拿大相当,保质期已达到半年甚至 1 年。根瘤菌剂已广泛在黑龙江、河北、山西等省市推广 100 万 hm^2 ,使大豆增产 7% ~ 15% (农博网, <http://info.china.alibaba.com/news/detail/v0-d1006148589.html>)。我国的根瘤菌产业正面临一个好时机,但是,由于存在竞争性能不如土著根瘤菌(Fauzia *et al.*, 2005)、菌剂施用广谱性能不佳、菌剂施用存在地域和环境差异

等,加之受到传统种植模式、农户知识缺乏、商家经营理念及政府重视程度和投入力度等影响,根瘤菌剂的进一步开发和大规模推广使用还需从以下几方面进行努力:1) 加大基础研究,提高菌剂根瘤菌的竞争及结瘤能力;2) 重视相关生物技术的利用,加强根瘤菌对宿主的侵染及宿主对根瘤菌的接纳能力(Hamdi, 2001),增加菌剂的广谱性能,增强菌种对地域和各种环境的适应能力,为根瘤菌剂的大规模生产和使用提供技术支持;3) 以试验示范为基础,以宣传培训为重要手段,改变农户传统种植观念,推行新的农技推广模式;4) 国家给予政策支持,加大研发和推广经费投入,为高效根瘤菌剂的制备和推广提供政策支撑;5) 根瘤菌剂市场的发展对氮肥产业有所冲击,建议化肥产业改变现有产品结构,向环保、节能型方向转化。

随着社会的发展,越来越多的学科相互交叉,将为新型有效的根瘤菌剂的开发利用提供有力的条件和技术支持,从而促进根瘤菌剂的大面积推广应用。

5 结 语

根瘤菌菌剂不仅可以有效地提高豆科植物的产量,而且还可以改良土壤的肥力,对农业生产具有积极的意义,引起了人们的极大兴趣和广泛关注,也已成为豆科植物增产的主要研究方向。近年来随着新技术特别是分子生物学技术的发展,各种高效菌种不断的被选育或者改造出来,制备菌剂的工艺、保藏菌剂的方法也不断的完善和发展,配制成的菌剂的效果越来越好,在农业生产中得到了越来越广泛地利用。同时还存在一些问题急需解决,如菌剂制备工艺的完善、保藏时间的进一步延长、大面积的推广利用等。相信随着科学研究的进一步深入相关的问题必将得到有效地解决。

参考文献

- 常 玮, 龙 涛, 张慧涛, 等. 2003. 保藏条件对根瘤菌存活及特性的影响. 新疆农业科学, 40(3): 179-181.
- 陈华葵, 樊庆笙. 1979. 微生物学. 北京: 农业出版社.
- 陈文新. 2004. 豆科植物根瘤菌-固氮体系在西部大开发中的作用. 草地学报, 12(1): 1-2.
- 陈逸湘, 李 忠. 2007. 紫云英根瘤菌剂的应用与生产方法. 现代农业科技, (24): 138.
- 范运梁, 刘 雪, 戴美学. 2010. 根瘤菌选育研究进展. 生物技术, 20(1): 96-98.
- 高俊莲, 孙建光, 陈文新. 2006. 斜茎黄芪根瘤菌结瘤基因 *nodA* PCR 扩增及 PCR-RFLP 分析. 微生物学杂志, 26(4): 1-5.
- 宫世勇. 2006. 高效重组苜蓿中华根瘤菌的构建及其耐盐性

- 初探(硕士学位论文). 湖北: 华中农业大学.
- 贾小红, 周顺桂, 李旭军, 等. 2007. 北京地区紫花苜蓿根瘤菌接种剂的研制. 应用基础与工程科学学报, **15**(1): 17-22.
- 李晓暄, 陈正行, 周蕴宇. 2010. 高纯度多孔稻壳基白炭黑的制备及性质. 粮食加工, **35**(1): 51-53.
- 李友国, 周俊初. 2002. 影响根瘤菌共生固氮效率的主要因素及遗传改造. 微生物学通报, **29**(6): 86-89.
- 林稚兰, 黄秀梨. 2000. 现代微生物学与实验技术. 北京: 科学出版社.
- 刘保平, 周俊初. 2006. 根瘤菌菌剂研究. 湖北农业科学, **45**(1): 57-61.
- 牛彦波, 吴皓琼, 李智. 2003. 载体、灭菌方式及 pH 对生物肥料产品活菌数及保存期的影响. 黑龙江八一农垦大学学报, **15**(3): 36-39.
- 唐颖. 2006. 根瘤菌耐盐工程菌株的构建及其生理特性研究(硕士学位论文). 北京: 中国农业科学院.
- 王保林, 詹火元, 陶佳喜, 等. 2006. 几种花生根瘤菌菌剂保藏效果的比较. 安徽农业科学, **34**(19): 4985-4986.
- 王继华, 程玉鹏, 孙洪涛, 等. 2000. 快生型大豆根瘤菌剂的制备及接种效果分析. 哈尔滨师范大学自然科学学报, **16**(6): 92-96.
- 韦革宏, 贺学礼, 郭杰, 等. 2001. 豌豆根瘤菌与新疆中华根瘤菌原生质体的属间融合研究. 生物工程学报, **17**(5): 534-538.
- 吴皓琼, 沙长青, 牛彦波, 等. 2004. 保护剂与抑菌剂对生物肥料保存期的影响. 生物技术, **14**(6): 55.
- 吴红慧, 周俊初. 2004. 根瘤菌培养基的优化和剂型的比较研究. 微生物学通报, **31**(2): 14-19.
- 吴胜举, 李凤亭, 张冰如. 2010. 介孔吸附剂在水处理中的应用研究进展. 工业水处理, **30**(4): 1-8.
- 熊春林, 黄隆广, 丁磊. 1989. 根瘤菌新载体及其接种效果的研究. 微生物通报, (2): 66-69.
- 姚卫蓉, 姚惠源. 2004. 多孔淀粉包埋益生菌的工艺研究. 广州食品工业科技, **20**(B11): 31-34.
- 张树江, 李彦锋, 周林成, 等. 2002. 医用吸附剂研究进展. 甘肃科学学报, **14**(1): 76-80.
- 朱虹, 何绍江. 2005. 不同保藏年代的大豆根瘤菌冻干菌种的生物学活性研究. 土壤肥料, (3): 54-56.
- 朱铁霞, 胡自治. 2005. 公农 1 号紫花苜蓿接种“富思德”苜蓿根瘤菌剂及施肥试验研究(硕士学位论文). 兰州: 甘肃农业大学.
- Annapurna K, Balakrishnan N, Vital L. 2007. Verification and rapid identification of soybean rhizobia in Indian soils. *Current Microbiology*, **54**: 287-291.
- Appunu C, Dhar B. 2008. Isolation and symbiotic characteristics of two Tn5-derived phage-resistant *Bradyrhizobium japonicum* strains that nodulate soybean. *Current Microbiology*, **57**: 212-217.
- Brockwell J, Herridge DF, Morthorpe LJ, et al. 1988. Numerical effects of *Rhizobium* population on legume symbiosis// Beck DP, Materon L, eds. Nitrogen Fixation by Legumes in Mediterranean Agriculture. Aleppo, Syria: ICARDA: 179-193.
- Chaudhary SK, Inouhe M, Rai UN, et al. 2011. Inoculation of *Rhizobium* (VR-1 and VA-1) induces an increasing growth and metal accumulation potential in *Vigna radiata* and *Vigna angularis* L. growing under fly-ash. *Ecological Engineering*, **37**: 1254-1257.
- Dommergues YR, Diem HG, Divies C. 1979. Polyacrylamide entrapped *Rhizobium* as an inoculant for legumes. *Applied and Environmental Microbiology*, **37**: 779-781.
- Fauzia YH, Farrukh IN, Rehan N, et al. 2005. Symbiotic effectiveness and bacteriocin production by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* isolated. *Environmental and Experimental Botany*, **54**: 142-147.
- Gan Y, Johnston AM, Knight JD, et al. 2010. Nitrogen dynamics of chickpea: Effects of cultivar choice, N fertilization, *Rhizobium* inoculation, and cropping systems. *Canadian Journal of Plant Science*, **90**: 655-666.
- Ghosh TK, Hajra KK, Bhattachatyees PK, et al. 1996. Fly-ash, a new carrier material for *Rhizobium* inoculants of tree legumes. *Indian Forester*, **122**: 528-530.
- Hamdi HZ. 2001. Rhizobia from wild legume: Diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. *Journal of Biotechnology*, **91**: 143-153.
- Han JT, Jiang ZY, Jiao SH. 2010. Four materials as carriers for phosphate dissolving *Rhizobium* sp. inoculants. *Advanced Materials Research*, 156-157: 919-928.
- Harrison AP. 1956. Causes of death of bacteria in frozen suspensions. *Antonie van Leeuwenhoek*, **22**: 407-418.
- Hume DJ, Blair DH. 1992. Effect of numbers of *Bradyrhizobium japonicum* applied in commercial inoculants on soybean seed yield in Ontario. *Canadian Journal of Microbiology*, **38**: 588-593.
- Kalra A, Chandra M, Awasthi A, et al. 2010. Natural compounds enhancing growth and survival of rhizobial inoculants in vermicompost-based formulations. *Biology and Fertility of Soils*, **46**: 521-524.
- Kaushal A, Rawlat AK, Verman LN, et al. 1996. Oxalic acid industrial waste as a carrier for *Rhizobium* inoculant and its effect on soybean. *Journal of the Indian Society of Soil Science*, **44**: 249-252.
- Khavazi K, Rejali F, Seguin P, et al. 2007. Effect of carrier, sterilization method, and incubation on survival of *Bradyrhizobium japonicum* in soybean (*Glycine max* L.) inoculations. *Enzyme and Microbial Technology*, **41**: 780-784.
- Li JF, Huo PH, Shi SL, et al. 2011. Effect of bacteriostats on cells growth and contamination-resistant capability of *Rhizobium* inoculants. *Advanced Materials Research*, 291-294: 2460-2465.
- Long SR. 1989. Rhizobium-legume nodulation: Life together in the underground. *Cell*, **56**: 203-214.
- Romdhane SB, Trabel M, Aouani WE, et al. 2009. The diversity of rhizobia nodulating chickpea (*Cicer arietinum*) under water deficiency as a source of more efficient inoculants. *Soil Biology & Biochemistry*, **41**: 2568-2572.
- Singh AK, Gauri, Bhatt RP, et al. 2011. Optimization and comparative study of the sugar waste for the growth of *Rhizobium* cells along with traditional laboratory media. *Research Journal of Microbiology*, **6**: 715-723.
- Singleton P, Thies J, Bohlool BB. 1992. Useful models to predict response to legume inoculation// Mulongo YK, Gueye M, Spencer S, eds. Biological Nitrogen Fixation and Sustainability of Tropical Agriculture. Chichester UK: John Wiley and Sons: 245-256.
- Stougaard J. 2002. Regulators and regulation of legume root nodule development. *Plant Physiology*, **124**: 531-540.
- Zdenek H. 2003. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*, **46**: 205-229.

作者简介 管凤贞,女,1986年生,硕士研究生,主要从事根瘤菌与植物互作机理及根瘤菌肥料方面的工作。E-mail: guan.fengzhen@163.com
责任编辑 魏中青