

程杰杰,殷超凡,萨尔山别克·热阿合曼,等. 固氮菌 *Kosakonia radicincitans* GXGL-4A 对玉米和水稻的促生作用及其根际定殖动态[J]. 江苏农业科学,2018,46(2):33-37.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.02.009

固氮菌 *Kosakonia radicincitans* GXGL-4A 对玉米和水稻的促生作用及其根际定殖动态

程杰杰,殷超凡,萨尔山别克·热阿合曼,孙帅欣,陈云鹏

[上海交通大学农业与生物学院/农业部都市农业(南方)重点实验室,上海 200240]

摘要:在前期固氮菌分离、筛选、鉴定的工作基础上,得到固氮菌株 *Kosakonia radicincitans* GXGL-4A(简称 GXGL-4A,下同),测定其在 LB 液体培养基(有氮)、A15 液体培养基(无氮)中的生长曲线发现,GXGL-4A 在 LB 液体培养基中生长迅速,在 A15 液体培养基中也能生长,但生长缓慢。在玉米、水稻生长过程中施用不同浓度的 GXGL-4A,通过测定其鲜质量、株高、根长、根鲜质量等生物量指标证实,GXGL-4A 对玉米和水稻的生长有显著促生作用,且该促生作用在一定范围内随 GXGL-4A 浓度的增加而增强。设置封闭系统(灭菌土)和开放系统(非灭菌土)2 个处理,将 GXGL-4A 释放至玉米根际土壤中,通过抗生素抗性标记法和平板分离计数法测定 GXGL-4A 的种群消长动态,结果显示,在监测的 15 d 内,灭菌土和非灭菌土中的固氮菌 GXGL-4A 数量均呈现先增加后减少的变化趋势,且在接菌后 1 d 达到峰值,灭菌土内的固氮菌 GXGL-4A 数量高于非灭菌土,GXGL-4A 在根际土壤中的生长优势明显。

关键词:固氮菌 GXGL-4A;生长曲线;促生作用;定殖动态

中图分类号:S182 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)02-0033-05

氮元素作为构成蛋白质和核酸的重要元素,对动植物及微生物都有非常重要的意义。土壤氮素在作物氮素供应上占有重要地位,通过向耕地中增施氮肥来提高作物产量是农业生产上的重要措施^[1]。空气中虽然存在大量的氮气,但不能

直接被植物吸收利用,只有转化为硝酸盐、亚硝酸盐等化合物后才能被植物吸收。生物固氮即固氮微生物将大气中的氮气还原成氨的过程,是自然界氮循环的主要环节^[2]。当前氮肥的主要来源是化工生产,化学氮肥的使用曾为我国农作物的增产作出了突出贡献^[3-4],但同时产生很多环境问题,造成农业点源污染和面源污染^[5-7]。

由于氮素化肥的生产伴随着能源的消耗和日趋严重的环境污染等问题,因此生物固氮研究日益受到各国政府的重视。目前发现的具有生物固氮能力的微生物多为细菌,有 100 多个属,占细胞系统发育分支的 1/2 以上^[8]。不同固氮菌的固氮能力差异比较明显,即使是同种固氮菌在不同的环境条件

收稿日期:2016-08-02

基金项目:国家重点基础研究发展计划(编号:2015CB755702)。

作者简介:程杰杰(1990—),男,山东潍坊人,硕士研究生,主要研究方向为环境微生物、基因工程。E-mail:jiejie101@126.com。

通信作者:陈云鹏,副教授,主要研究方向为微生物基因工程、分子植物病理学。Tel:(021)34206620;E-mail:ypchen7274@sjtu.edu.cn。

国农学通报,2007,23(8):136-140.

[2] 张明聪,刘元英,罗盛国,等. 养分综合管理对寒地水稻抗倒伏性能的影响[J]. 中国农业科学,2010,43(21):4536-4542.

[3] 陈海飞,冯洋,蔡红梅,等. 氮肥与移栽密度互作对低产田水稻群体结构及产量的影响[J]. 植物营养与肥料学报,2014,20(6):1319-1328.

[4] 佟斌,郑桂萍. 肥密因素对垦鉴稻 10 号质量指数的影响[J]. 黑龙江八一农垦大学学报,2009,21(3):18-21,34.

[5] 陈丽楠,彭显龙,刘元英,等. 养分管理对寒地水稻干物质积累及运转的影响[J]. 东北农业大学学报,2010,41(5):52-56.

[6] Nakano H, Morita S. Effects of time of first harvest total amount of nitrogen, and nitrogen application method on total dry matter yield in twice harvesting of rice[J]. Field Crops Research,2008,105(1/2):40-47.

[7] Chauhan B S, Ahmed S, Awan T H, et al. Integrated weed management approach to improve weed control efficiencies for

sustainable rice production in dry-seeded systems[J]. Crop Protection,2015,71:19-24.

[8] 凌启鸿,张洪程,戴其根,等. 水稻精确定量施氮研究[J]. 中国农业科学,2005,38(12):2457-2467.

[9] 周有炎,龚金龙,李杰,等. 配方施肥对水稻产量及氮素利用的影响[J]. 江苏农业科学,2011(1):75-78.

[10] 吴自明,石庆华,李木英,等. 移栽密度与施肥方法对优质早稻成穗率的影响[J]. 江西农业大学学报(自然科学版),2003,25(2):164-168.

[11] 张镇铭,姚金富,邵达孚,等. 不同群体条件下穗肥施用量对水稻分蘖成穗的影响[J]. 西南农业学报,1998,3(11):148-151.

[12] 张慧,彭显龙,刘元英,等. 前氮后移对寒地水稻群体质量的影响[J]. 土壤通报,2011,42(2):402-406.

[13] 彭显龙,刘元英,罗盛国,等. 实地氮肥管理对寒地水稻干物质积累和产量的影响[J]. 中国农业科学,2006,39(11):2286-2293.

下或在不同的宿主内也会表现出固氮能力的差异^[9]。虽然固氮菌的固氮能力差异较大,但均能在一定程度上促进植物的生长,提高农作物的产量^[10]。

本研究测定固氮菌 GXGL-4A 在 LB 液体培养基(有氮)、A15 液体培养基(无氮)中的生长曲线;以玉米、水稻为试验对象,在其生长过程中施用不同浓度的 GXGL-4A,通过测定玉米、水稻的鲜质量、株高、根长、根鲜质量等指标,并进行数理统计分析发现, GXGL-4A 对水稻和玉米的生长具有促生作用,且该促生作用在一定范围内随 GXGL-4A 浓度的增大而增强;对 GXGL-4A 在玉米根际土壤中的消长动态进行监测,获得其在玉米根际土壤中的消长动态变化情况,可为固氮菌固氮机制的进一步研究及微生物菌肥的开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 固氮菌 *Kosakonia radicincitans* GXGL-4A (简称 GXGL-4A)分离自广西桂林的玉米根部,为革兰氏阴性菌,有荚膜,能分泌胞外多糖类黏性物质,菌体大小约为 $1.5\ \mu\text{m} \times 0.5\ \mu\text{m}$ 。菌体呈杆状,具端生鞭毛。

载体质粒 pET28a(+)携带有卡那霉素抗性基因(*kan^r*)标记,由笔者所在实验室余传金惠赠。

1.1.2 种子 玉米种子先玉 335(非抗旱品种)和宁玉 721(抗旱品种)均购自青上农业科技(吉林)有限公司,水稻种子 CBB23 由上海交通大学农业与生物学院陈功友教授实验室馈赠。

1.1.3 主要试剂及仪器 $2 \times \text{Taq PCR Master Mix}$ 、 $6 \times \text{Loading buffer}$ 、SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒及 SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒,均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;DNA marker,购自天根生化科技(北京)有限公司;Goldview 核酸染料,购自上海少辛生物科技有限公司;卡那霉素(Kan),购自美国 Amresco 公司;其他试剂均为国产分析纯。

Leica DM2500 荧光显微镜(莱卡微系统公司);BSW-200B 台式恒温摇床(上海启步生物科技有限公司);ZDP-2120 电热恒温培养箱(上海智城分析仪器制造有限公司);Minispin® 离心机、Eppendorf BioPhotometer 生物分光光度计(德国 Eppendorf 公司);超净工作台(上海智城分析仪器制造有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 固氮菌 GXGL-4A 生长曲线测定 以体积分数 1% 的接种量将固氮菌 GXGL-4A 接入 LB 液体培养基(有氮)中,每隔 1 h 用分光光度计测量 1 次菌液在 600 nm 处的吸光度并进行记录。以相同接种量将固氮菌 GXGL-4A 接入 A15 液体培养基(无氮)中,8 h 后以相同方法测量菌液在 600 nm 处的吸光度并进行记录,以后每隔 3 h 进行 1 次测量。

1.2.2 固氮菌 GXGL-4A 促生作用研究

1.2.2.1 种子消毒与催芽 将种子在水中浸泡 4 h 后,用蒸馏水彻底冲洗干净,然后移至 75% 乙醇中处理 2 min,用无菌水清洗 2 次后,用 5% NaClO 溶液浸泡 5 min,再用无菌水清洗 2 次。将消毒的玉米和水稻种子用纱布包起来后置于 28 ℃ 恒温培养箱中培养至出芽,出芽标准为胚根与种子等长。

1.2.2.2 固氮菌 GXGL-4A 的培养 将固氮菌 GXGL-4A 以 1% 接种量接种到 LB 液体培养基中,于 37 ℃、160 r/min 的条件下振荡培养约 4 h($D_{600\text{ nm}}$ 约为 1.0),然后在离心机中以 8 000 r/min 的转速离心 10 min,用无菌水洗涤菌体沉淀 2 次后,再用无菌水将其依次稀释为 10^4 、 10^6 、 10^8 CFU/mL 等 3 个浓度梯度,备用。

1.2.2.3 玉米、水稻种植与接种处理 将发芽的玉米种子植入塑料花盆(内径 20 cm、高 20 cm),出苗期每隔 24 h 于同一时间(12:00)浇水 1 次,观察记录出苗情况。将大小长势基本一致的玉米、水稻幼苗分别移栽到相同规格的塑料花盆内,设置对照组(CK)和 3 个浓度梯度(10^4 、 10^6 、 10^8 CFU/mL)试验组,3 次重复。移栽 2 d(展出 1 或 2 张真叶)后,试验组每隔 3 d 对幼苗茎基部施加 1 次固氮菌 GXGL-4A(1 mL/株),对照组加等量无菌水,共计接种 7 次,培养期间每天 12:00 浇 1 次水,以保持土壤湿润。

1.2.2.4 数据采集与分析 接种后 30 d,测量每株玉米、水稻的鲜质量、株高、根长、根鲜质量,试验数据通过 Excel 和 SPSS 进行分析处理。

1.2.3 根际定殖动态研究

1.2.3.1 固氮菌 GXGL-4A 卡那霉素抗性标记 将带有 pET28a(+)质粒的大肠杆菌以体积分数 1% 的接种量接入 LB 液体培养基中,于 37 ℃、160 r/min 条件下振荡培养约 12 h,然后用试剂盒提取质粒。将提取好的质粒用电击转化法转入固氮菌 GXGL-4A 中,将转化菌液涂布于 LB 固体培养基(含 50 $\mu\text{g/mL}$ Kan)平板上,置于 37 ℃ 恒温培养箱内过夜培养,然后挑取阳性转化子。

1.2.3.2 土壤处理 采集大田熟土 600 g,称取其中的 300 g 平铺于托盘内,置于 120 ℃ 恒温箱内干热灭菌 5 h,待土壤自然冷却后装入无菌袋内备用;剩余土壤不进行灭菌处理,而是直接装入无菌袋内备用。

1.2.3.3 种子消毒与催芽 种子消毒与催芽方法同“1.2.2.1”节。种子出芽后,播种于含 50 g 灭菌土的塑料采样罐(高 10 cm,内径 6 cm)内,即为封闭系统处理;播种于含 50 g 非灭菌土的塑料采样罐内,即为开放系统处理。每罐播 3 粒种子,设 3 次重复。

1.2.3.4 标记菌 GXGL-4A 的培养及在玉米根际土壤的释放 待种子破土后,采用灌根法接种固氮菌 GXGL-4A。标记菌于含有 50 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素的 LB 液体培养基中,在 37 ℃、180 r/min 条件下培养 24 h 后,取 5 mL 用无菌水稀释至 50 mL(接种浓度 1×10^7 CFU/mL),用移液器缓慢地释放至玉米幼苗的根际土壤中。

1.2.3.5 消长动态监测 分别于释放后 1、3、6、9、12、15 d 取 3 罐幼苗根际土壤各 1 g,加入到 9 mL 无菌水中涡旋振荡 15 min,即为 10^{-1} 稀释度,根据含菌量用无菌水进行梯度稀释,取稀释后菌液 200 μL 涂布于含有 50 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素的 LB 平板上,并置于 37 ℃ 恒温培养箱内进行过夜培养。统计每个培养皿的菌落数,计算平均 1 g 根际土壤的含菌量。试验时以释放后 1 h 回收的细菌数量为初始接种量。

1.2.3.6 数据采集与分析 试验数据通过 Excel 和 SPSS 进行分析与处理。

2 结果与分析

2.1 固氮菌 GXGL-4A 生长曲线分析

由图 1、图 2 可知,固氮菌 GXGL-4A 在 LB 液体培养基(富氮)、A15 液体培养基(无氮)中均能生长,但生长速度不同。在 LB 液体培养基(富氮)中生长迅速,接种后约 1 h 即进入对数生长期,并在测定时间内其 $D_{600\text{ nm}}$ 一直增大;而在 A15 液体培养基(无氮)中细菌生长缓慢,接种后约 10 h 才进入对数生长期,约 20 h 达到生长最大值,之后其 $D_{600\text{ nm}}$ 逐渐减小。据此可知,在营养较丰富的条件下,固氮菌 GXGL-4A 生长迅猛,而在无氮条件下,固氮菌 GXGL-4A 虽也能生长,但增殖缓慢,这一结果表明,氮营养水平对固氮菌的生长至关重要。

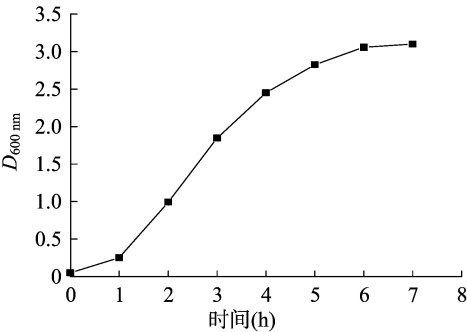


图1 固氮菌 GXGL-4A 在 LB 液体培养基中的生长曲线

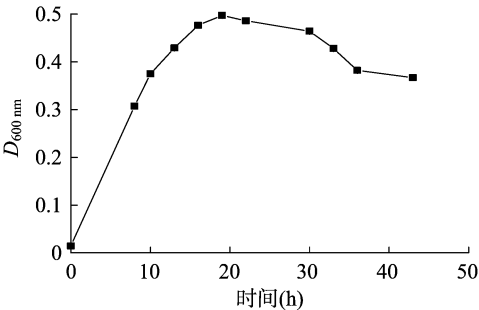


图2 固氮菌 GXGL-4A 在 A15 液体培养基中的生长曲线

2.2 固氮菌 GXGL-4A 促生作用分析

由表 1 至表 3、图 3 至图 9 可知,试验组玉米先玉 335、宁玉 721 及水稻 CBB23 植株的株高、根长、根鲜质量、植株鲜质量等指标与对照组植株整体上差异明显,固氮菌 GXGL-4A 对水稻 CBB23 的促生效果较 2 个供试玉米品种更好。

2.3 固氮菌 GXGL-4A 根际消长动态分析

从图 10 可以看出,接种后 1~15 d 均可以从玉米植株根际土壤中检测到标记菌,在封闭系统与开放系统内,玉米根际土壤的标记菌数量变化趋势基本一致,均先增加后减少,并且均在释放 1 d 后达到最大值;在相同的接种浓度(1×10^7 CFU/mL)下,封闭系统内标记菌 GXGL-4A 的数量明显高于开放系统,其原因可能是灭菌土内的微生物数量较少,接种后,固氮菌 GXGL-4A 迅速占据玉米根际土壤生态位而成

表 1 不同处理下玉米品种先玉 335 的生物量

处理浓度 (CFU/mL)	先玉 335 生物量			
	株高 (cm)	根长 (cm)	根鲜质量 (g)	植株鲜质量 (g)
0 (CK)	58.1 ± 1.501Bb	27.8 ± 1.035ABb	6.5 ± 0.070Aa	28.9 ± 1.862ABab
10 ⁴	58.6 ± 1.724Bb	34.6 ± 2.046Aa	9.1 ± 0.134Aa	33.6 ± 1.341Aa
10 ⁶	61.1 ± 0.450ABb	25.2 ± 1.378Bb	8.7 ± 0.893Aa	23.6 ± 0.745Bb
10 ⁸	68.3 ± 2.958Aa	25.1 ± 1.301Bb	7.9 ± 0.519Aa	28.7 ± 1.790ABab

注:同列数据后不同大、小写字母分别表示在 0.01、0.05 水平上差异显著。下表同。

表 2 不同处理下玉米品种宁玉 721 的生物量

处理浓度 (CFU/mL)	宁玉 721 生物量			
	株高 (cm)	根长 (cm)	根鲜质量 (g)	植株鲜质量 (g)
0 (CK)	60.6 ± 2.576Aa	25.4 ± 2.325Bb	4.7 ± 0.325Aab	21.9 ± 2.494Aab
10 ⁴	67.2 ± 2.978Aa	27.5 ± 0.231ABb	5.6 ± 0.053Aa	27.8 ± 1.516Aa
10 ⁶	67.8 ± 2.938Aa	25.8 ± 1.538ABb	4.8 ± 0.066Aab	21.3 ± 1.015Aab
10 ⁸	59.6 ± 2.486Aa	34.0 ± 0.300Aa	4.2 ± 0.422Ab	19.5 ± 1.136Ab

表 3 不同处理下水稻品种 CBB23 的生物量

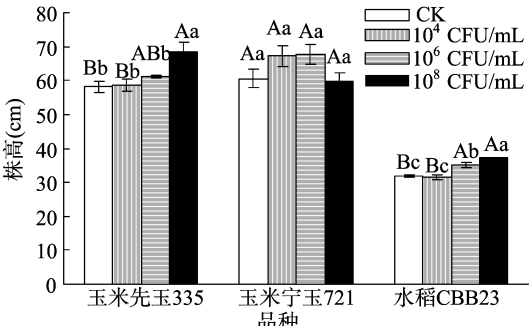
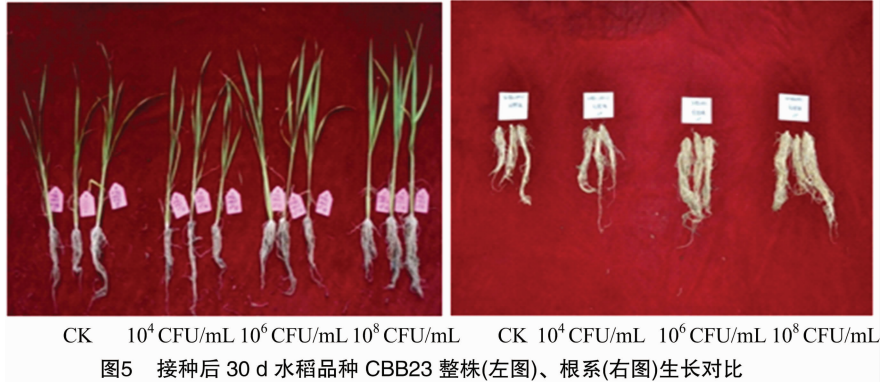
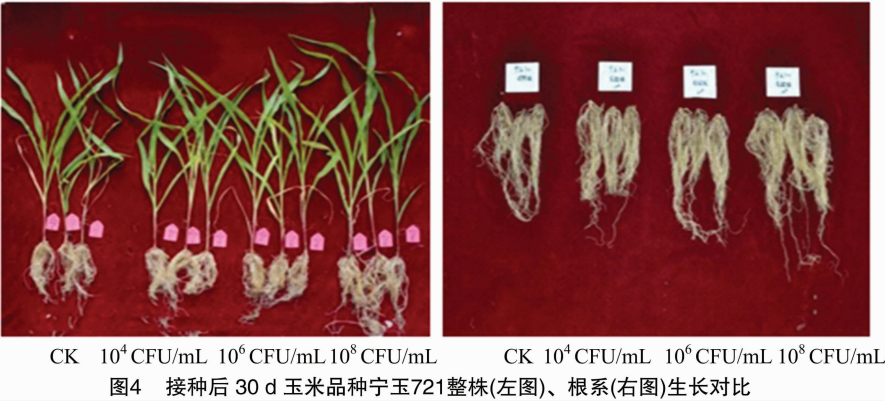
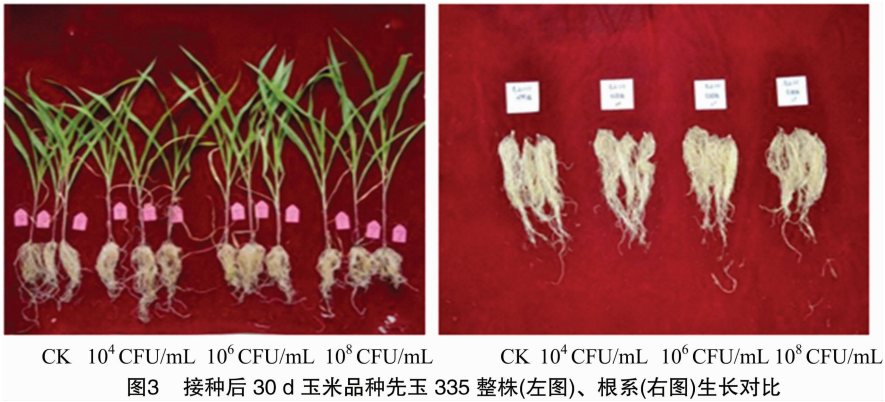
处理浓度 (CFU/mL)	CBB23 生物量			
	株高 (cm)	根长 (cm)	根鲜质量 (g)	植株鲜质量 (g)
0 (CK)	31.8 ± 0.351Bc	14.2 ± 1.033Bb	2.2 ± 0.354Aa	4.1 ± 0.682ABbc
10 ⁴	31.4 ± 0.764Bc	20.9 ± 0.437Aa	1.4 ± 0.162Ab	2.9 ± 0.198Bc
10 ⁶	35.2 ± 0.775Ab	21.5 ± 0.717Aa	3.4 ± 0.633Aa	6.4 ± 0.913Aab
10 ⁸	37.3 ± 0.133Aa	19.9 ± 1.187Aa	3.7 ± 0.546Aa	6.6 ± 0.618Aa

为优势种群,而在自然土内微生物群落非常复杂,接种后,固氮菌 GXGL-4A 与土壤中的原始微生物进行生态位竞争,导致接种后标记菌数量低于灭菌土。

3 讨论与结论

微生物的固氮作用在农业增产中具有十分重要的意义。

本研究表明,固氮菌 GXGL-4A 在营养较丰富的条件下生长迅速,在无氮条件下也可通过自身固氮作用利用空气中的氮气维持自身生长,它对玉米和水稻生长具有显著促生作用,整体上来看,施加固氮菌后的供试植株在株高、根长、根鲜质量及植株鲜质量等方面较对照植株生物量明显提高。在一定浓度范围内,其促生作用随菌液浓度的增加而增强,尤其是根系



同一品种的不同处理间标有不同大、小写字母分别表示在 0.01、0.05 水平上差异显著。图7~图9同

图6 不同玉米、水稻株高对比

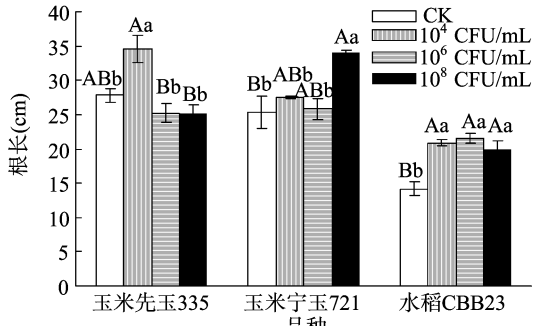


图7 不同处理玉米、水稻根长对比

表现最为明显,固氮菌 GXGL-4A 能在根际土壤中迅速定殖并成为优势种群,推断其促生作用主要是通过根部定殖来实现的。

先前已有一些关于植物根际促生菌 (plant growth

promoting rhizobacteria,简称 PGPR) 的研究,主要集中在 PGPR 菌株的筛选、入侵机制以及促生机制等方面^[11-13],研究结果表明,PGPR 可通过固氮、解磷及产生植物生长调节剂等方式来促进植物生长^[14-17]。对固氮菌的定殖观测表明,固氮醋酸杆菌能从根尖和侧根发生的周围侵染植物^[18],而固氮螺菌能

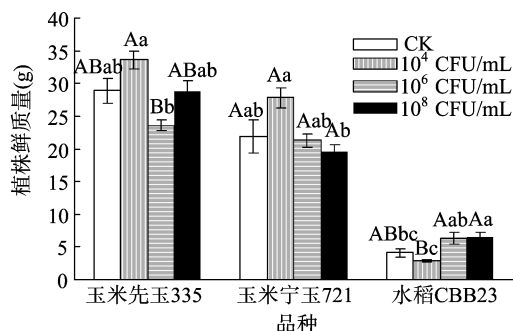


图8 不同处理玉米、水稻植株鲜质量对比

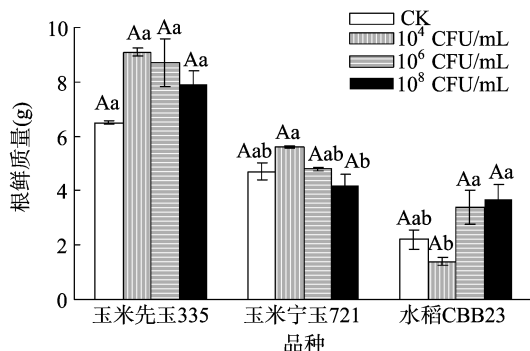


图9 不同处理玉米、水稻根鲜质量对比

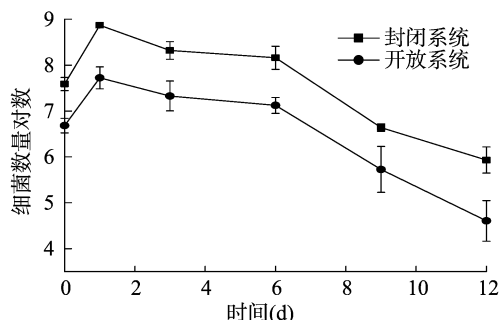


图10 固氮菌 GXGL-4A 在玉米植株根际土壤中的消长动态

在根表与皮层之间的周质空间内定殖^[19]。虽然固氮菌所固定的氮素供给植物的很少,但细菌死亡后释放的有机氮能逐步被植物吸收利用,此外,固氮菌可以分泌许多有机酸使植物根际 pH 值下降,使难溶性矿物质变得易溶,从而促进植物根系对各种营养物质的吸收,进而间接促进植物生长^[20-21]。

本研究聚焦于固氮菌 GXGL-4A 的固氮促生作用,在后续研究中,将借助现代分子生物学技术进一步探究其固氮促生机制并对其进行遗传改造,使其具有更强的适应能力和固氮能力,甚至开发成可施性生物肥料,应用前景广阔。

参考文献:

- [1] 鲁如坤. 我国土壤氮、磷、钾的基本状况[J]. 土壤学报, 1989, 26 (3): 280-286.
- [2] 杨 持, 王祥荣, 郭建国, 等. 生态学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2008: 250-253.
- [3] Fan S, Pardey P G. Research, productivity, and output growth in

- Chinese agriculture[J]. Journal of Development Economics, 1997, 53 (1): 115-137.
- [4] Wang J Y, Wang S J, Chen Y. Leaching loss of nitrogen in double - rice - cropped paddy fields in China [J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 1995, 7 (3): 155-166.
- [5] Fischer G, Winiwarter W, Ermolieva T, et al. Integrated modeling framework for assessment and mitigation of nitrogen pollution from agriculture: concept and case study for China [J]. Agriculture Ecosystems & Environment, 2010, 136 (1/2): 116-124.
- [6] Velthof G L, Oudendag D, Witzke H R, et al. Integrated assessment of nitrogen losses from agriculture in EU - 27 using MITERRA - EUROPE[J]. Journal of Environmental Quality, 2009, 38 (2): 402-417.
- [7] Guo J H, Liu X J, Zhang Y, et al. Significant acidification in major Chinese croplands[J]. Science, 2010, 327 (5968): 1008-1010.
- [8] 陈文新. 生物固氮. 氮素循环与农业和环境学术研讨会论文集[C]. 厦门: 厦门大学出版社, 2001: 4-5.
- [9] 孙建光, 罗 琼, 高 森, 等. 小麦、水稻、玉米、白菜、芹菜内生固氮菌及其系统发育[J]. 中国农业科学, 2012, 45 (7): 1303-1317.
- [10] 赵志强. 鄂尔多斯几种沙生植物根际自身固氮菌的筛选及对杨柴接种效应研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2008.
- [11] 肖相政, 刘可星, 廖宗文. 短小芽孢杆菌 BX-4 抗生素标记及定殖效果研究[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28 (6): 1172-1176.
- [12] 翁启勇, 陈庆河, 赵 健, 等. 利福平标记菌株 BS1 在番茄、茄子根部及土壤中的定殖动态[J]. 福建农业学报, 2003, 18 (2): 87-88.
- [13] 孙 华. 应用根际促生细菌防治大豆胞囊线虫病的研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2009.
- [14] Roberto P, Zeno V, Paolo N, et al. The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil - plant interface[M]. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2007: 73-109.
- [15] 朱培森. 高效解磷细菌的筛选及其应用[D]. 南京: 南京农业大学, 2007.
- [16] 荣良燕, 姚 拓, 赵桂琴, 等. 产铁载体 PGPR 菌筛选及其对病原菌的拮抗作用[J]. 植物保护, 2011, 37 (1): 59-64.
- [17] Asghar H N, Zahir Z A, Arshad M. Screening rhizobacteria for improving the growth, yield, and oil content of canola (*Brassica napus* L.) [J]. Australian Journal of Agricultural Research, 2004, 55 (2): 187-194.
- [18] Reis V M, Olivares F L, de Oliveira A L M, et al. Technical approaches to inoculate micropropagated sugar cane plants were *Acetobacter diazotrophicus* [J]. Plant and Soil, 1999, 206: 205-211.
- [19] Okon Y, Kapulnik Y. Development and function of *Azospirillum* - inoculated roots[J]. Plant and Soil, 1986, 90: 3-16.
- [20] Bashan Y, Singh M, Levanony H. Contribution of *Azospirillum brasilense* Cd to growth of tomato seedlings is not through nitrogen fixation[J]. Canadian Journal of Botany, 1989, 67: 2429-2434.
- [21] Bremer E, Janzen H H, Gilbertson C. Evidence against associative N₂ fixation as a significant N source in long - term wheat plots[J]. Plant and Soil, 1995, 175: 13-19.