

紫穗槐丛枝菌根(AM)根系分泌物诱导根瘤菌结瘤因子及作用研究

庄 倩¹,赵晓娟²,宋福强^{2*}

(1. 黑龙江省森林植物园,黑龙江 哈尔滨 150081;2. 黑龙江大学 生命学院,黑龙江 哈尔滨 150080)

摘要:为了进一步揭示丛枝菌根(AM)真菌促进紫穗槐结瘤数量及提高固氮能力的机制,试验采用高效液相色谱法(HPLC)并结合结瘤因子生物检测法,研究了菌根化紫穗槐苗木根系分泌物对根瘤菌结瘤因子的诱导效果,以及结瘤因子紫穗槐苗木生长的作用。结果表明,菌根分泌物能够显著诱导根瘤菌产生结瘤因子,HPLC 检测图谱 33 min 出现的色谱峰物质能够诱导紫穗槐的根毛产生变形;结瘤因子回接盆栽紫穗槐实生苗结果表明,在灭菌基质上播种的紫穗槐苗木能够产生根瘤原基并结瘤,且双接种结瘤因子和 AM 真菌处理的紫穗槐苗木产生根瘤原基的数量显著高于单独接种结瘤因子处理的苗木;结瘤因子提高了紫穗槐的菌根侵染率,结瘤因子的量越大,AM 真菌对紫穗槐的侵染效果越显著;结瘤因子与 AM 真菌混合接种能显著提高紫穗槐苗木的生物量。

关键词:AM 真菌;紫穗槐;菌根侵染率;结瘤因子

中图分类号:S793.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2018)03-0164-05

Amorpha fruticosa Arbuscular Mycorrhizal (AM) Root Exudates Induced Nodulation Factors of Rhizobia and Their Interactions

ZHUANG Qian¹, ZHAO Xiao-juan², SONG Fu-qiang^{2*}

(1. Forest Botanical Garden of Heilongjiang Province, Harbin, Heilongjiang 150081, China;

2. Life Science College, Heilongjiang University, Harbin, Heilongjiang 150080, China)

Abstract: In order to reveal the mechanism of *Amorpha fruticosa* nodulation nitrogen fixation ability promoted by arbuscular mycorrhizal (AM) fungi, HPLC and bioassay experiments were used to study the effect of AM fungi on nodulation factor secretion of Rhizobia. Through *A. fruticosa* single inoculated nodulation factor (Nod^+), *A. fruticosa* both inoculated AM fungi and the nodulation factor ($\text{AM}^+ \text{Nod}^+$) and blank control. The effect of nodulation factor on *A. fruticosa* was verified. These results showed that mycorrhizal secretions could significantly induce rhizobia nodulation factor production. The material collected by 33 min detection peak in HPLC could induce deformation of *A. fruticosa* root hairs. Re-inoculation experiments showed that the nodulation factor could promote nodulation of *A. fruticosa* in the absence of rhizobia, and the inoculation of AM fungi could significantly improve nodulation. In addition, nodulation factor could enhance AM fungi inoculation. The larger the amount of nodulation factor, the greater the inoculation of AM fungi. Nodulation factor (Nod^+) of *A. fruticosa* single inoculated could increase plant height, fresh weight and root length significantly. Double inoculation of AM fungi and nodulation factor ($\text{AM}^+ \text{Nod}^+$) treatment increased more than those of single inoculated. These results further determined that the nodulation factor concentration of *A. fruticosa* increased by inoculation of AM fungi and further enhanced rhizobia nodulation ability. Besides, nodulation factor promoted AM fungus inoculation efficiency.

收稿日期:2017-09-07 修回日期:2018-01-03

基金项目:林业公益性行业科研专项经费项目(201504409);国家自然科学基金面上项目(31070576,31570635)。

作者简介:庄倩,女,硕士,副研究员,研究方向:植物学。E-mail:13845067026@163.com

* 通信作者:宋福强,男,博士,教授,研究方向:修复生态学。E-mail:0431sfq@163.com

Key words: arbuscular mycorrhizal (AM) fungus; *Amorpha fruticosa*; mycorrhizal inoculation; nodulation factor

丛枝菌根真菌(*Glomus mosseae*)是一类土著真菌,在自然界中分布广泛且历史悠久。该类真菌能够与大部分高等植物根系建立共生关系并形成丛枝菌根(arbuscular mycorrhizal, AM)^[1]。植物形成AM后能够促进根系对养分的吸收^[2],提高植物对逆境胁迫的抵抗能力^[3-6],对重金属及有机农药污染的土壤也具有较好的修复能力^[7],从而改善植物的生长境况。结瘤因子(脂壳寡糖,LCOs)被定义为根瘤菌在豆科植物根系分泌物(类黄酮)作用下分泌合成的一类多糖类物质^[8],这类物质能够引起宿主植物根系在形态上发生巨大变化,在根系结瘤过程中发挥着极为重要的作用^[9]。LCO不但可以促进豆科植物根系结瘤固氮,而且对某些非豆科类植物根系细胞分裂等也同样具有一定的刺激作用^[10]。

紫穗槐(*Amorpha fruticosa*)在世界范围内广泛分布,属于木本豆科、紫穗槐属,是一种耐盐碱、耐寒、耐旱、耐湿、抗风沙、抗逆性极强的多年生落叶丛生灌木,在荒山坡地、道路旁、河岸、盐碱地均可生长;同时,紫穗槐具有很高的经济效益,其茎条萌发力极强,是优良的饲料植物^[11]。紫穗槐不但能形成根瘤,同时还能够丛枝菌根。前期研究结果表明AM真菌能够显著提高紫穗槐结瘤数量并提高其固氮能力^[12]。本研究继续开展AM真菌与紫穗槐共生体根系分泌物对根瘤菌结瘤因子的诱导情况,以及结瘤因子对紫穗槐的菌根形成、生长情况的影响,研究结果为进一步揭示AM真菌促进紫穗槐结瘤数量固氮能力的机制提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植株为紫穗槐种子,根瘤菌菌株为紫穗槐中慢生根瘤菌(*Mesorhizium amorphae*),AM真菌为摩西球囊霉(*Glomus mosseae*)。

1.2 方法

1.2.1 盆栽苗木设计 选择饱满的紫穗槐种子,用温水搓洗2~3次,再用KMnO₄(浓度0.3%)浸泡3~4 h,用清水冲洗干净。在恒温水浴锅(25℃)中清水浸种1 d。然后淘洗2~3次,催芽。苗木盆栽培养基质按花土(5):蛭石(3):细沙(2)比例混匀,高压灭菌1 h后,在阴凉处干燥、备用。

盆栽苗木设2个处理:1)单独接种AM真菌处理(AM):当紫穗槐种子播种15 d时施入AM真菌接种物,接种量为盆栽介质体积的5%;2)非接种处

理(CK):紫穗槐种子播种15 d时加入与单接种AM处理等量的灭活AM真菌接种物及其滤出液。每种处理设10个重复。

1.2.2 侵染率的测定 采用J. M. Phillip^[13]等的KOH脱色-酸性品红染色法,玻片镜检测定侵染根段数。

1.2.3 根系分泌物的提取 根据紫穗槐侵染率的实时测定结果,选取紫穗槐出苗15 d(菌根侵染率0%)和菌根侵染率为15%、25%、50%及100%时期根系表面土壤各100 g,样品分装在三角瓶中并加入浓度为80%的乙醇500 mL,在90℃水浴下持续加热3 h后,采用滤纸抽滤,再用0.22 μm微孔滤膜过滤,利用旋转蒸发仪控制温度在40℃的条件下对获得滤液进行蒸发,直至10 mL为止,然后放到冰箱中保存。同时提取相应时期CK处理苗木的根系分泌物为对照。

1.2.4 结瘤因子的提取与制备 首先配制一定量的YMA液体培养基,121℃下高压灭菌30 min,冷却后接种适量根瘤菌。28℃、160 r·min⁻¹摇床上培养至OD值0.6~0.8,制成种子液。在三角瓶中装入300 mL YMA液体培养基,同时接入种子液2.5 mL,在28℃160 r·min⁻¹摇床上培养2 d,再向摇瓶中分别加入5 mL前期提取的菌根分泌物和对照处理根系分泌物,以此作为根瘤菌结瘤因子的诱导剂,继续摇培至OD值1~1.2。以不加诱导剂作为对照。用正丁醇对所获得的液体培养基以3:2比例进行抽提2次,得到的上清液再利用孔径为0.45 μm的滤膜抽滤后,再蒸发至1 mL,然后转入1.5 mL离心管中,利用4℃离心机12 000 r·min⁻¹下离心5 min,得到的上清液低温保存过夜,次日再离心3 min,获得的上清液保存在乙腈中备用。

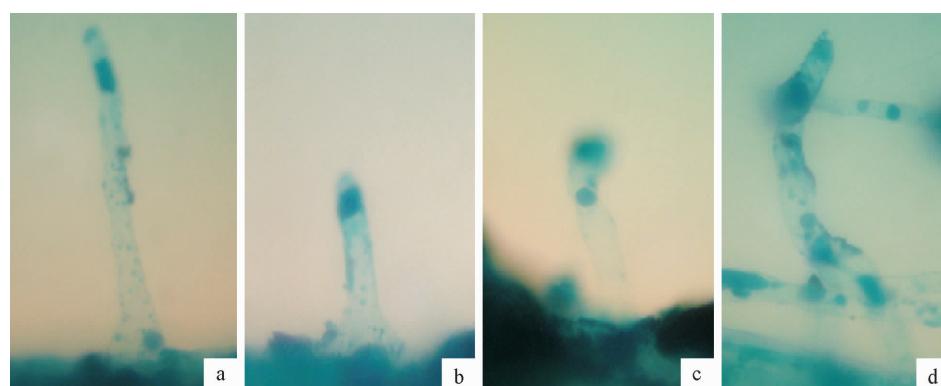
1.2.5 HPLC检测结瘤因子 对检测样品过C18柱(φ4.6 mm×250 mm),然后进行线性梯度洗脱,对洗脱物进行结瘤因子分析。HPLC检测波长为214 nm,流速1.0 mL·min⁻¹,柱温25℃,洗脱时间1 h。

1.2.6 结瘤因子的生物检测 采用根毛变形试验方法对结瘤因子的生物活性进行检测^[14]。首先配制琼脂含量为1.5%的溶液,121℃高压灭菌15 min后倒平板、备用。紫穗槐种子用浓度1%的NaOH溶液反复淘洗,直至去除种子表皮上的蜡质,随后再用温水反复冲洗后,放到2%的NaOCl溶液浸泡2 min,再用灭菌蒸馏水再冲洗干净。处理后的种子

放到先前准备好的水琼脂平板内,每个平板放 10 粒种子,25℃恒温避光培养,种子发芽以后仍要继续培养 15 d 以上。用灭菌的解剖刀将嫩根部切下放到载玻片上,并滴加 1 滴结瘤因子检测液,黑暗条件下 25℃培养 24 h。随后将载玻片置于显微镜下,滴加甲基蓝染液进行染色,观察根系的变化。

1.2.7 结瘤因子回接紫穗槐 取结瘤因子 10 mL,在 40℃旋转蒸发仪蒸发至干,然后加 1 mL 蒸馏水溶解并梯度稀释。结瘤因子回接试验设 6 个处理:1)单接种 AM 真菌处理(AM^+):按照盆栽培养基质 5%(v/v)的量向基质中接种摩西球囊霉接种物,同时播种预先处理好的紫穗槐的种子;2)单接种结瘤因子(Nod_1^+):盆栽苗木只加入结瘤因子稀释液 10 mL;3)单接种结瘤因子(Nod_2^+):盆栽苗木只加入结瘤因子稀释液 20 mL;4)双接 AM 真菌和结瘤因子($AM^+ Nod_1^+$):对盆栽紫穗槐加入 AM 真菌接种物并加入结瘤因子稀释液 10 mL;5)双接 AM 真菌和结瘤因子($AM^+ Nod_2^+$):对盆栽紫穗槐加入 AM 真菌接种物并加入结瘤因子稀释液 20 mL;6)非接种处理(CK):播种紫穗槐种子的同时加入与单接种 AM 真菌处理等量灭活的 AM 真菌接种物及其滤出液。每个处理设 3 个重复。

不同处理的盆栽紫穗槐随机摆放在温室内,常规培养。当苗子生长到第 10 周时,每个处理随机选取紫穗槐苗木 10 株,分别测定苗木菌根侵染率、植株各项生长指标,以及每株紫穗槐苗木根系上根瘤原基的数量。



注:a、b 为对照;c、d 为产生变形的根毛(400×)

图 1 结瘤因子诱导的根毛变形及对照

Fig. 1 The diagram of deformation hair induced by nodulation factor and its control

由于 HPLC 检测的物质量与峰面积呈正比,因此对 33 min 出现的色谱峰进行面积测定。由表 2 可知,紫穗槐苗木形成菌根的不同时期,菌根根系分泌物对根瘤菌结瘤因子的诱导量都显著高于对照处理。苗木在生长不同时期根系分泌物诱导根瘤菌产生结瘤因子的峰面积也有所不同,在菌根侵染率

1.2.8 数据处理 应用 SPSS 17.0 软件对获得的数据进行单因素方差分析和 LSD 多重比较($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 根系分泌物对根瘤菌结瘤因子诱导

通过 HPLC 检测结果表明,不同处理样品图谱的各时间段诱导的结瘤因子出峰时间不尽相同,且同一时间段 AM 处理与 CK 处理的出峰时间也有所差异,出峰数量也各不相同。

表 1 不同处理紫穗槐在不同时期根系分泌物对根瘤菌结瘤因子诱导 HPLC 分析出峰数量

Table 1 The peak number of HPLC related to rhizobia nod factor induced by different periods of *Amorpha fruticosa* root exudates in different treatments

出峰数量	0%	10%	25%	100%
AM	44	39	56	44
CK	43	40	32	39

从表 1 可以看出,AM 处理组诱导的根瘤菌结瘤因子相较空白对照组来说在侵染率 0% 与 10% 时期产生的峰值数量基本相同,但在菌根侵染率在 25% 时期特异峰最多,产生的差异峰达到 24 种之多。

对菌根侵染率在 25% 时期 AM 处理与对照处理可能为结瘤因子且明显的差异峰进行结瘤因子生物检测(根毛变形试验),结果表明,在 33 min 出现的色谱峰能够诱导紫穗槐的根毛产生变形,根毛顶端膨大(图 1c),且呈“Z”字形弯曲(图 1d),可以认为 33 min 左右出现的峰为结瘤因子。

25% 与 100% 时期,无论是 AM 处理还是 CK 处理之间不存在显著差异($P > 0.05$),但都显著高于菌根侵染率 0% 和 10% 时期($P < 0.05$)。

2.2 结瘤因子回接紫穗槐苗木的效果

当苗子生长到第 10 周时,分别测定了不同处理紫穗槐苗木的菌根侵染率、株高、鲜重以及根瘤原基

的数量。从表3可以看出,AM真菌与结瘤因子混合处理的紫穗槐苗木根侵染率显著高于单接种AM真菌处理,且随着结瘤因子浓度的增加,效果越显著。在没有接种AM真菌处理的苗木根系内没有检测到菌根侵染率,表明苗木培养基质灭菌比较彻底,没有土著AM真菌存在。AM⁺Nod₂⁺处理的

表2 不同处理根系分泌物诱导根瘤菌产生结瘤因子的峰面积

Table 2 The peak area of rhizobia nodulation factors induced by root exudates in different treatments

峰面积	0%	10%	25%	100%
AM	0.311±0.008 ^{Ca}	2.042±0.04 ^{Ba}	2.985±0.012 ^{Aa}	2.895±0.002 ^{Aa}
CK	0.298±0.006 ^{Ca}	0.548±0.011 ^{Bb}	0.873±0.007 ^{Ab}	0.938±0.005 ^{Ab}

注:表中数据为平均值($n=3$);不同大写字母表示同行数据存在显著差异,不同小写字母表示同列数据存在显著差异($P<0.05$)。

表3 结瘤因子回接对紫穗槐苗木的影响结果

Table 3 The effect of nodulation factor inoculation on *A. fruticosa* seedlings

处理	菌根侵染率/%	株高/cm	鲜重/g	根瘤原基的数量/个
CK	0	14.43±0.07 ^e	0.43±0.08 ^e	0
AM ⁺	68.4±1.7 ^c	17.70±0.05 ^c	0.61±0.02 ^c	0
Nod ₁ ⁺	0	16.85±0.03 ^d	0.55±0.07 ^d	10.5±0.7 ^b
Nod ₂ ⁺	0	17.54±0.06 ^c	0.59±0.06 ^c	11.4±0.3 ^b
AM ⁺ Nod ₁ ⁺	75.6±1.2 ^b	20.50±0.09 ^b	0.78±0.04 ^b	14.8±0.5 ^a
AM ⁺ Nod ₂ ⁺	80.2±1.3 ^a	22.81±0.11 ^a	0.98±0.03 ^a	15.4±0.3 ^a

注:表中数据为平均值($n=10$);不同小写字母表示同列数据存在显著差异($P<0.05$)。

3 结论与讨论

AM真菌能够与紫穗槐根系形成菌根共生体,侵染率可达100%;紫穗槐菌根侵染率在25%时的根系分泌物能够有效地诱导根瘤菌产生更多的结瘤因子;紫穗槐菌根分泌物对根瘤菌诱导出的结瘤因子能够使紫穗槐根毛顶端膨大形成根瘤原基;结瘤因子与AM真菌混合接种能显著提高紫穗槐苗木的菌根侵染率、株高、鲜重和根瘤原基的数量,且随着结瘤因子含量的增加效果越显著。

结瘤因子是在宿主植物根系分泌的类黄酮作用下,根瘤菌合成并分泌一类多糖信号分子(脂壳寡糖)。不同根瘤菌能形成2~60种的结瘤因子^[15]。结瘤因子的质与量随着根瘤菌种类的不同而发生改变并具有种属专一性。结瘤因子的合成决定于结瘤基因nod的表达,nod基因种类多样,其产物可以合成结瘤因子^[16]。nod基因的表达起始于根瘤菌感知类黄酮类物质^[17]。类黄酮类物质能够诱导根瘤菌nodD调节基因的表达,随后启动nodABC的表达。类黄酮与NodD调节蛋白的早期接触会激活nod基因的转录从而合成结瘤因子以产生根瘤原基。AM真菌在与植物形成共生体-菌根时,高等植物分泌的类黄酮物质被公认为共生体形成和发展的初始信号^[18]。本研究发现紫穗槐菌根侵染率在25%时期的根系分泌物能够有效诱导根瘤菌产生更多的结瘤因子,但是否与此时紫穗槐分泌更多的类

苗木菌根侵染率、株高、鲜重及根瘤原基数量都显著高于其他处理($P<0.05$),而CK处理最差。单接种结瘤因子与对照相比提高了根瘤原基的数量并促进了苗木的生长,且Nod₂⁺优于Nod₁⁺。单接种AM真菌也同样促进了苗木的生长,但效果显著低于双接种(AM⁺Nod⁺)处理($P<0.05$)。

Table 3 The effect of nodulation factor inoculation on *A. fruticosa* seedlings

黄酮物质有关,还有待于进一步研究。

结瘤因子能够使根瘤菌进入根部以及皮层细胞,并诱导结瘤基因的表达以及细胞分化,引起根瘤原基的形成^[19]。结瘤因子还被发现能够促进种子萌发、植物地上部分的生长^[20]以及侧根的伸长^[21]。C.Chen^[22]等发现 *Bradyrhizobium japonicum* 的结瘤因子能够加速西红柿的开花结果,并且能够提高西红柿的产量,同时结瘤因子还能够提升干旱条件下大豆植株的产量等^[23]。本研究进一步证明了AM真菌与结瘤因子混合接种能够显著提高紫穗槐的生物量和根瘤原基的数量。研究结果对揭示AM真菌在生态系统中的作用奠定了一定的理论基础。

参考文献:

- [1] SMITH S E, READ D J. Mycorrhizal symbiosis [M]. Cambridge: Academic Press, 2010.
- [2] SMITH S E, SMITH F A, JAKOBSEN I. Mycorrhizal fungi candominate phosphate supply to plants irresoective of growth responses [J]. Plant Physiology, 2003, 133: 16-20.
- [3] POZO M J, CORDIER C, DUMAS-GAUDOT E, et al. Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defence responses to *Phytophthora* infection in tomato plants [J]. Journal of Experimental Botany, 2002, 53: 525-534.
- [4] 杨亚忠.逆境胁迫下丛枝菌根对茶树生长及茶叶品质的影响[J].绿色科技,2016(7):127-128.
- [5] 邓勋,宋小双,尹大川,等.盐胁迫下深色有隔内生真菌D575对樟子松生长及耐盐性的影响[J].森林工程,2015,31(6):5-10.

- DENG X, SONG X S, YIN D C, et al. Growth and physiological responses of *Pinus sylvestris* var. Mongolica to salt tolerance under inoculation of dark septate endophyte D575[J]. Forest Engineering, 2015, 31(6): 5-10. (in Chinese)
- [6] 田帅, 刘振坤, 唐明. 不同水分条件下丛枝菌根真菌对刺槐生长和光合特性的影响[J]. 西北林学院学报, 2013, 28(4): 111-115.
- TIAN S, LIU Z K, TANG M. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on growth and photosynthetic characteristics of robinia pseudoacacia under different water conditions[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2013, 28(4): 111-115. (in Chinese)
- [7] SONG F Q, LI J Z, FAN X X, et al. Transcriptome analysis of *Glomus mosseae/Medicago sativa* mycorrhiza on atrazine stress [J]. Scientific Reports, 2016, 6(2025): 1-11.
- [8] 张琴, 张磊. 豆科植物根瘤菌结瘤因子的感知与信号转导[J]. 中国农学通报, 2005(7): 233-238.
- ZHANG Q, ZHANG L. Perception and signal transduction of rhizobium nod factor in leguminous plants[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2005(7): 233-238. (in Chinese)
- [9] 高丽峰, 胡志昂, 王红新, 等. 根瘤菌结瘤因子的结构和功能[J]. 生命科学, 2002, 14(1): 17-19.
- GAO L F, HU Z A, WANG H X, et al. Structure and function of *Rhizobium* nod factor[J]. Bulletin of Life Sciences, 2002, 14(1): 17-19. (in Chinese)
- [10] 胡廷会, 李立军, 李杨. 结瘤因子和苏芸金菌素对干旱胁迫下燕麦产量及其保护酶活性的影响[J]. 西北植物学报, 2013, 33(12): 2451-2458.
- HUI T H, LI L J, LI Y. Effects of LCO and TH17 on the yield and protective enzyme activities of oat under drought stress[J]. Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin., 2013, 33(12): 2451-2458. (in Chinese)
- [11] WANG E T, BERKUM P V, SUI X H, et al. Diversity of rhizobia associated with *Amorpha fruticosa* isolated from Chinese soils and description of *Mesorhizobium amorphae* sp. nov [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1999, 49(1): 51-65.
- [12] SONG F Q, TIAN X J, HE X B. The influence of desert false indigo, *Amorpha fruticosa*, and three arbuscular mycorrhizae fungi on the growth of *Populus ussuriensis* seedlings[J]. New Forests, 2009, 37: 265-273.
- [13] PHILLIPS J M, HAYMEN D S. Improved procedures for clearing and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection[J]. Trans. Br. Mycol Soc., 1970, 55: 158-161.
- [14] PRITHIVIRAJ B, ZHOU X, SOULEIMANOV A, et al. A host specific bacteria-to-plant signal molecule (nod factor) enhances germination and early growth of diverse crop plants [J]. Planta, 2003, 216: 437-451.
- [15] DHAEZE W, HOLSTERS M. Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development [J]. Glycobiology, 2002, 12(6): 79-105.
- [16] GOUGH C. Rhizobium symbiosis: insight into nod factor receptors[J]. Current Biology, 2003, 13: 973-975.
- [17] 温晋芳, 姜在民, 苑文柯, 等. 唐棣果黄酮类化合物的提取及抗氧化性研究. 西北林学院学报, 2017, 32(2): 218-224.
- WEN J F, JIANG Z M, YUAN W K, et al. Extraction and antioxidant activity of flavonoids from the fruit of *Amalanchier alnifolia*[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2017, 32(2): 218-224. (in Chinese)
- [18] 盛江梅, 吴小芹. 菌根真菌与植物根际微生物互作关系研究 [J]. 西北林学院学报, 2007, 22(5): 104-108.
- SHENG J M, WU X Q. Interaction between mycorrhizal fungi and rhizosphere microorganisms[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2017, 22(5): 104-108. (in Chinese)
- [19] MYLONA P, PAWLOWSKI K, BISSELING T. Symbiotic nitrogen fixation[J]. Plant Cell, 1995, 7: 869-885.
- [20] PRITHIVIRAJ B, ZHOU X, SOULEIMANOV A, et al. A host specific bacteria-to-plant signal molecule (nod factor) enhances germination and early growth of diverse crop plants [J]. Planta, 2003, 216: 437-451.
- [21] OLÁH B, BRIE RE C, BECARD G, et al. Nod factors and a diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi stimulate lateral root formation in *Medicago truncatula* via the *DMI1/DMI2* signaling pathway[J]. Plant J., 2005, 44: 195-207.
- [22] CHEN C, MCLVER J, YANG Y, et al. Foliar application of lipo-chitoooligosaccharides (nod factors) to tomato (*Lycopersicon esculentum*) enhances flowering and fruit production [J]. Can. J. Plant Sci., 2007, 87: 365-372.
- [23] ATTI S, BONNELL R, PRASHER S, et al. Response of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) under chronic water deficit to LCO application during flowering and pod filling[J]. Irrig. Drain., 2005, 54: 15-30.