

壳聚糖对 NaCl 胁迫下菜用大豆结瘤固氮的影响

王聪¹, 徐志伟²

(1 内蒙古民族大学农学院, 内蒙古通辽 028042; 2 呼和浩特市赛罕区蔬菜局, 内蒙古呼和浩特 010000)

摘要:【目的】研究壳聚糖对盐胁迫抑制菜用大豆结瘤固氮的缓解效应, 为进一步探讨壳聚糖抗逆机理提供新的线索。【方法】以蛭石为基质, 以菜用大豆‘特早王’-根瘤菌共生体系为研究对象, 采用人工气候箱培养, 研究 NaCl 胁迫下壳聚糖对菜用大豆根瘤形成、生物固氮的影响。菌种为与‘特早王’共生匹配性较好的快生根瘤菌 N18。接种后的植株进行如下 4 个处理: 1) 叶面喷施清水, 根部浇灌无氮营养液 (CK); 2) 叶面喷施壳聚糖水溶液, 根部浇灌无氮营养液 (CTS); 3) 叶面喷施清水, 根部浇灌溶有 NaCl 的无氮营养液 (Cl); 4) 叶面喷施壳聚糖水溶液, 根部浇灌溶有 NaCl 的无氮营养液 (CTS+Cl)。上述各处理施用的水或水溶液均为无菌水配制, NaCl 处理的浓度为 50 mol/L, CTS 处理的适宜浓度为 200 mg/L。接种 30 天后, 将大豆植株取出, 用清水将根部蛭石冲洗干净后, 立即测定根瘤固氮酶活性、根瘤数及根瘤鲜重, 然后测定根瘤豆血红蛋白含量和根系活力, 最后测植株干重和全氮量。【结果】氯化钠胁迫下, 植株干重显著下降, 与 CK 相比降幅达 49%, 喷施壳聚糖后 (CTS+Cl), 降低幅度显著减小, 但依然显著低于 CK ($P < 0.05$)。无盐条件下, 与 CK 相比, 壳聚糖处理 (CTS) 增加植株干重的效果不明显。喷施壳聚糖显著增加了菜用大豆的根瘤数、根瘤鲜重、植株含氮量、根系活力、豆血红蛋白含量及固氮酶活性 ($P < 0.05$)。NaCl 胁迫显著抑制了菜用大豆的结瘤固氮作用, 其中根瘤数、根瘤鲜重分别较 CK 下降了 79%、90%, 而壳聚糖处理 (CTS+Cl) 使菜用大豆在盐逆境下的结瘤数、根瘤鲜重、植株全氮含量、根系活力、豆血红蛋白含量及固氮酶活性等均显著回升, 增幅分别达对照的 29%、20%、17%、48%、19%、21%, 但均显著低于 CK。【结论】非 NaCl 胁迫下, 喷施壳聚糖可以显著促进菜用大豆结瘤, 提高豆血红蛋白含量及固氮酶活性, 最终增加植株含氮量。在 NaCl 胁迫下, 外源壳聚糖可以显著缓解氯化钠胁迫导致的对根系活力和结瘤固氮的影响。因此, 叶面喷施壳聚糖是促进菜用大豆结瘤固氮和生长的有效措施。

关键词: 壳聚糖; 菜用大豆; 结瘤固氮; NaCl 胁迫

Effects of chitosan on nodulation and nitrogen fixation of vegetable soybean under NaCl stress

WANG Cong¹, XU Zhi-wei²

(1 College of Agronomy, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao, Inner Mongolia 028000, China;

2 Egetable Bureau, Saihan District, Hohhot City, Hohhot, 010000, China)

Abstract: 【Objectives】The effect of stimulating growth and tolerance to salt stress of crop through foliar spray of chitosan was confirmed in this paper. 【Methods】Vermiculite culture method was conducted inside plant growth chamber, vegetable soybean [*Glycinemax* (L.) Merr.] ‘Tezaowang’ and the rhizobium N18 were used as the test materials in the symbiotic system of vegetable soybean-rhizobium. Salt stress was prepared by adding 50 mol/L of NaCl in nitrogen-free nutrient solution and chitosan (CTS) spraying concentration was 200 mg/L in the treatments. Four treatments were setup including spraying water and no salt stress control (CK), spraying CTS under no salt stress (CTS); spraying water under salt stress (Cl) and spraying CTS under NaCl stress (CTS + Cl). After 30 days treatment, the plants were harvested, and the activities of nitrogenase, the number and fresh weight of nodules were measured immediately. Then the root activity and leghemoglobin content were

收稿日期: 2019-04-10 接受日期: 2019-08-20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31260472)。

联系方式: 王聪 Tel: 0475-8314809, E-mail: tongliaowangcong@163.com

determined, and the plant dry biomass and total N content were tested at last. **【 Results 】** Without NaCl stress, spraying CTS did not increase the dry plant biomass significantly; Under NaCl stress, the fresh biomass was significantly decreased, and spraying CTS narrowed the decrease significantly but still lower than that in CK ($P < 0.05$). Without NaCl stress, the nodule number, nodule fresh weight, total N content, root activity, leghemoglobin content and nitrogenase activity of vegetable soybean were significantly increased by spraying CTS. Under NaCl stress, the nodulation and nitrogen fixation of vegetable soybean were significantly inhibited, while spraying CTS significantly increased the nodule number, nodule fresh weight, total nitrogen content, root activity, leghemoglobin content and nitrogenase activity of vegetable soybean under salt stress, with the increase of 29%, 20%, 17%, 48%, 19%, 21% of the CK respectively, although they were still significantly lower than CK. **【 Conclusions 】** Under normal condition, spraying chitosan shows significant effect in promoting the nodulation, enhancing the leghemoglobin content and nitrogenase activity, and increase plant growth as a result. Under NaCl stress, spraying chitosan could significantly increase the tolerance of crop to salt stress, although could not offset the diverse effect of salt stress completely. Therefore, foliar application of exogenous chitosan is recommended in the production of legumes.

Key words: chitosan; vegetable soybean; nodulation and nitrogen fixation; NaCl stress

豆科植物发育过程中根与根瘤菌形成根瘤固氮体, 根瘤的共生固氮作用为豆科植物生长提供了重要的氮素来源, 对豆科植物产量和品质的提高具有重要作用。根瘤菌与豆科植物共生关系的建立是根瘤菌、植物及环境三方相互作用的结果。豆科植物结瘤要受到环境因子的限制, 环境因子发生改变, 必将影响根瘤菌与豆科植物共生体系的建立。研究发现, 豆科植物与根瘤菌共生关系的建立对土壤盐分非常敏感。在 50~100 mmol/L NaCl 条件下, 大豆根系根瘤菌侵染率显著下降^[1], 在 210 mmol/L NaCl 条件下, 蚕豆根系结瘤完全被抑制^[2]。

壳聚糖 (CTS) 是甲壳素脱乙酰化后得到的一种聚氨基葡萄糖, 在自然界的合成量仅次于纤维素, 是一种非常廉价、清洁的化学物质, 且其能够增强植株对逆境胁迫的抗性。潘丽芹等^[3]的研究发现, 壳聚糖可显著提高 NaCl 胁迫下白三叶草幼苗的株高、鲜重、干重和根冠比, 有效减轻了盐渍伤害。外源壳聚糖对 NaCl 胁迫下菜用大豆叶绿体内抗坏血酸-谷胱甘肽 (AsA-GSH) 循环产生了显著的诱导作用, 维持了较强的活性氧清除能力, 进而显著提高了其净光合速率^[4-5]。但壳聚糖对盐逆境下豆科植物结瘤固氮的影响的研究尚鲜有报道。盐逆境下, 外源壳聚糖对豆科植物的结瘤固氮是否产生影响? 能否缓解其对豆科植物结瘤固氮的抑制效应? 是当前亟待探讨的问题。

中国盐碱耕地达 670 万 hm^2 , 居世界第四位^[6], 且由于不合理的水肥管理, 土壤盐渍化和次生盐渍化呈现继续扩大的趋势, 已严重威胁到包括豆科植

物在内的农业生产和生态环境的建设。在生产中, 迫切需要一种简单可行且廉价、清洁的方法使豆科植物和根瘤菌在盐胁迫下仍能维持良好的共生关系, 提高其结瘤固氮能力, 同时, 豆科植物-根瘤菌良好的共生关系也有助于提高植物的耐盐性。菜用大豆是一种高营养的保健食品, 近年来, 随着人们生活水平的提高和膳食结构的改变, 其生产和市场得到迅速发展, 露地及保护地栽培面积逐年增加。为此, 本研究拟以菜用大豆-根瘤菌共生体系为试材, 研究壳聚糖对 NaCl 胁迫下其结瘤固氮的调节作用, 探讨壳聚糖对盐胁迫抑制根瘤菌结瘤固氮的缓解效应, 为进一步揭示壳聚糖抗逆机理提供新的线索。

1 材料与方法

1.1 试材培育及处理

1.1.1 试验材料 菜用大豆选用当地主栽品种‘特早王’, 根瘤菌种为与其共生匹配性较好的快生根瘤菌 N18^[7](菌种购自黑龙江省科学院微生物研究所)。

1.1.2 试材培育 挑选种皮无破损、饱满度相近的种子, 先用 95% 乙醇冲洗 30 s, 再用 1:5(次氯酸钠与无菌水的体积比) 次氯酸钠溶液消毒 3 min, 捞出后播入口径 10 cm、高 10 cm、底部具小孔的硬质塑料钵中, 蛭石作基质, 每钵 2 粒, 每钵定苗 1 株。

幼苗 2 片真叶完全展开后接种。将根瘤菌悬浮液稀释至 OD₆₀₀ 值约为 0.1, 用移液枪取摇匀的菌悬液喷注到幼苗根部周围, 每株接种 1 mL^[8], 然后再覆盖一薄层 (1 cm 左右) 蛭石保湿。放入人工气候箱

中培养, 白天光强为 $150 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 光周期为 14 h 光照/10 h 黑暗, 昼夜温度保持在 $25^\circ\text{C}/18^\circ\text{C}$ 。

所有实验用具、蛭石高温高压灭菌 20 min。

1.1.3 试验处理 试验采用基质培养法, 设 4 个处理: 1) 叶面喷施清水, 根部浇灌无氮营养液 (CK); 2) 叶面喷施 CTS 水溶液, 根部浇灌无氮营养液 (CTS); 3) 叶面喷施清水, 根部浇灌溶有 NaCl 的无氮营养液 (Cl); 4) 叶面喷施 CTS 水溶液, 根部浇灌溶有 NaCl 的无氮营养液 (CTS + Cl)。上述各处理施用的水或水溶液均为无菌水配制。每处理 7 株, 3 次重复, 完全随机排列。CTS 处理的适宜浓度为 $200 \text{ mg}/\text{L}$ ^[7], NaCl 处理的适宜浓度 (在此浓度下, 菜用大豆能够生长, 同时能够形成根瘤) 为 $50 \text{ mol}/\text{L}$ (预备试验筛选)。

接种当天进行 CTS 处理, 用手持小型喷雾器将 CTS 溶液均匀喷洒在幼苗叶片上, 以量足但不下滴为宜, 对照和 Cl 处理喷洒无菌水。CTS 诱导处理 5 天后进行 NaCl 处理, NaCl 溶于 1/4 浓度无氮营养液, 均匀浇入基质中。CK 和 CTS 处理仅浇无氮营养液。

1.2 测定项目及方法

接种 30 天 (NaCl 处理 25 天) 后, 将菜用大豆植株从塑料钵中取出, 用清水将根部蛭石冲洗干净后, 立即测定根瘤固氮酶活性, 之后测定根瘤数及根瘤鲜重, 然后进行根瘤豆血红蛋白含量、根系活力测定, 最后将植株烘干后测其干重、全氮含量。

用乙炔还原法^[9]测定根瘤固氮酶活性, 根瘤豆血红蛋白含量参照文献^[10]中的方法测定, 根系活力采用 TTC 法^[11]测定, 植株全氮含量采用凯氏定氮法^[12]测定。

1.3 数据处理

应用 SPSS 软件对试验数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 壳聚糖对 NaCl 胁迫下菜用大豆植株生长的影响

由图 1 可知, NaCl 胁迫下, 菜用大豆植株干重显著下降, 较对照 (CK) 的降幅达 49%, 而壳聚糖处理 (CTS+Cl) 显著提高了菜用大豆的生物量, 增幅可达 CK 的 19%, 但显著低于 CK。无盐条件下, 壳聚糖处理 (CTS) 与 CK 的差异不显著, 但显著高于盐胁迫下壳聚糖处理 (CTS+Cl)。说明 NaCl 胁迫严重抑制了菜用大豆植株的生长, 而壳聚糖处理可显著缓解其抑制作用, 但无盐条件下壳聚糖对菜用大豆植株生长的诱导作用不显著。

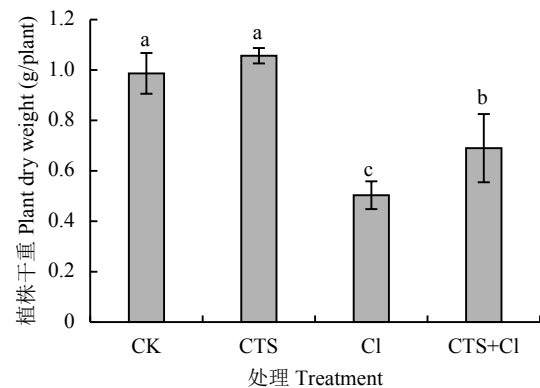


图 1 CaCl 胁迫下壳聚糖处理菜用大豆植株干重

Fig. 1 Dry weight of vegetable soybean plants with chitosan treatments under NaCl stress

[注 (Note): 柱上不同字母表示不同处理间差异显著 Different letters above the bars indicate significant difference among treatments ($P < 0.05$).]

2.2 壳聚糖对 NaCl 胁迫下菜用大豆结瘤固氮的影响

表 1、图 2 显示, NaCl 胁迫大幅减少了菜用大豆的根瘤数和根瘤鲜重, 降幅分别达 CK 的 79%、

表 1 NaCl 胁迫下壳聚糖处理菜用大豆的结瘤固氮

Table 1 Nodulation and nitrogen fixation of vegetable soybean with chitosan treatments under NaCl stress

处理 Treatment	根瘤数 Nodule number (No./plant)	根瘤鲜重 Nodule weight (mg/plant, FW)	植株含氮量 Plant N content (g/kg)
CK	$32.63 \pm 1.65 \text{ b}$	$232.67 \pm 11.17 \text{ b}$	$20.63 \pm 1.18 \text{ b}$
CTS	$42.11 \pm 1.74 \text{ a}$	$305.67 \pm 15.18 \text{ a}$	$23.58 \pm 1.00 \text{ a}$
Cl	$6.90 \pm 0.57 \text{ d}$	$24.33 \pm 1.09 \text{ d}$	$14.18 \pm 0.49 \text{ d}$
CTS + Cl	$16.36 \pm 0.79 \text{ c}$	$71.33 \pm 2.21 \text{ c}$	$17.61 \pm 2.03 \text{ c}$

注 (Note): 同列数值后不同字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$) Values followed by different letters in the same column indicate significant difference among treatments ($P < 0.05$).

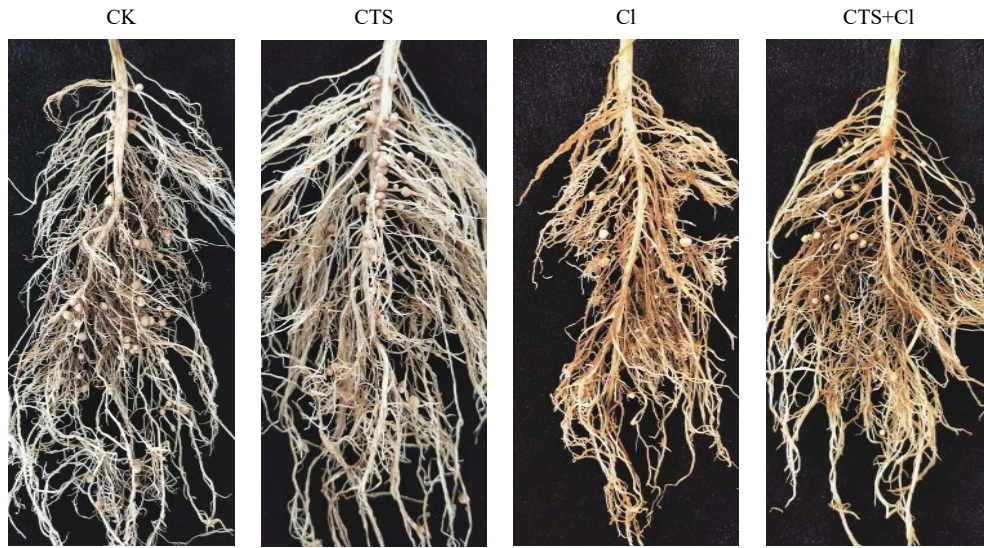


图 2 NaCl 胁迫下壳聚糖处理菜用大豆根系生长及结瘤

Fig. 2 Root growth and nodulation of vegetable soybean with chitosan treatments under NaCl stress

90%，而壳聚糖处理使菜用大豆的结瘤数及根瘤鲜重均显著回升，增幅分别为 CK 的 29%、20%。无盐条件下，壳聚糖处理显著提高了菜用大豆的根瘤数和根瘤鲜重，增幅分别为 CK 的 29%、31%。表明在盐胁迫和无盐条件下壳聚糖对菜用大豆根瘤的形成均有显著的促进作用。

菜用大豆植株的含氮量受 NaCl 胁迫伤害而显著下降，降幅达 CK 的 31%，壳聚糖处理后植株含氮量显著回升，增幅达 CK 的 17%。无盐条件下，壳聚糖处理显著提高了菜用大豆植株的含氮量。可见在盐胁迫和无盐条件下壳聚糖对菜用大豆与根瘤菌共生固氮均有显著的促进作用 (表 1)。

上述结果表明，壳聚糖通过促进菜用大豆根瘤的形成及发育，进而促进固氮作用，提高植株含氮量。

2.3 壳聚糖对 NaCl 胁迫下菜用大豆根系活力的影响

NaCl 胁迫下，菜用大豆根系的发育受到了严重抑制，致使其根系活力较 CK 显著下降了 62%，而壳聚糖处理有效促进了盐逆境下根系的生长，使根系活力回升了 CK 的 48%。无盐条件下，壳聚糖显著提高了菜用大豆的根系活力，增幅达 CK 的 17% ($P < 0.05$)。表明无论在盐胁迫还是无盐条件下，外源壳聚糖均可诱导提高菜用大豆根系的活力水平 (图 3)，增强其吸收能力，促进植株生长，为结瘤固氮奠定良好的物质基础。

2.4 壳聚糖对 NaCl 胁迫下菜用大豆根瘤豆血红蛋白含量和固氮酶活性的影响

由图 4 可见，菜用大豆根瘤豆血红蛋白的合成

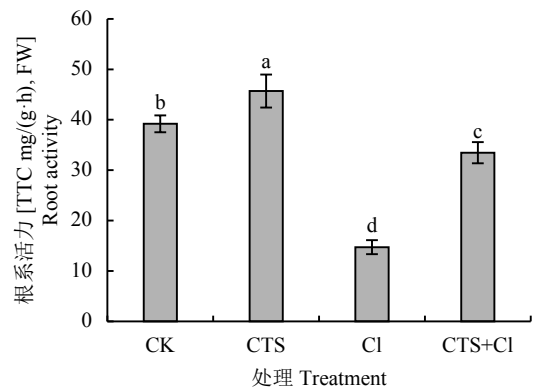


图 3 不同处理菜用大豆根系活力

Fig. 3 Root activity of vegetable soybean under different treatments

[注 (Note): 柱上不同字母表示不同处理间差异显著 ($P < 0.05$)
Different letters above the bars indicate significant difference among treatments ($P < 0.05$)]

和固氮酶活性在 NaCl 胁迫下均受到了严重抑制，致使二者较 CK 大幅下降，降幅分别达 34% 和 35%，而壳聚糖处理有效缓解了盐胁迫对其的抑制作用，使豆血红蛋白含量和固氮酶活性分别回升了 CK 的 19% 和 21%。无盐条件下，壳聚糖处理显著提高了菜用大豆根瘤豆血红蛋白含量和固氮酶活性。可见，壳聚糖对菜用大豆根瘤豆血红蛋白的合成和固氮酶活性的提高有显著的促进作用，而二者协调变化是提高根瘤固氮效率的重要保障。

3 讨论

盐渍环境对豆科植物的结瘤固氮会产生严重的

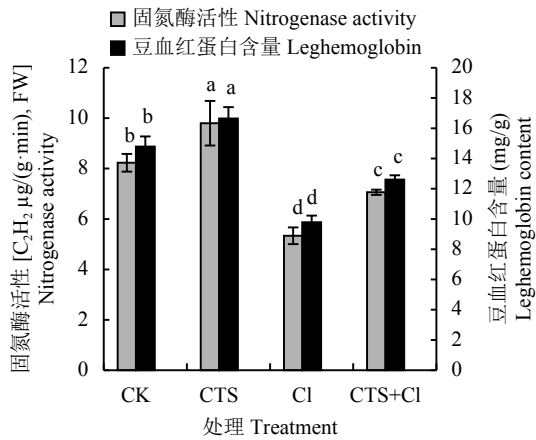


图 4 不同处理菜用大豆根瘤豆血红蛋白含量和固氮酶活性

Fig. 4 Leghemoglobin content and nitrogenase activity of vegetable soybean nodules under different treatments

[注 (Note): 柱上不同字母表示不同处理间差异显著 ($P < 0.05$) Different letters above the bars indicate significant differences among treatments ($P < 0.05$)]

阻碍作用。李梅等^[12]的研究发现, NaCl 浓度大于 100 mmol/L 时, 随着浓度的升高, 蒺藜苜蓿根瘤数量不断减少, 根瘤不断变小, 同时固氮区细胞数量也相应减少。而王登科等^[13]研究发现, NaCl 抑制种子萌发, 减缓根瘤菌的生长, 降低根瘤菌的抗氧化能力, 最终限制豆科绿肥作物的早期生长。本研究中, NaCl 胁迫使菜用大豆根瘤数、根瘤鲜重大幅下降, 最终导致植株含氮量下降, 生长受阻(表 1、图 1)。这可能与 NaCl 抑制根瘤菌生长, 降低根瘤菌的抗氧化能力有关。然而, NaCl 胁迫使菜用大豆根系生长受阻^[14-15], 侧根短, 侧根少(图 2), 根毛发育不良而不宜结瘤^[16], 可能是导致菜用大豆根瘤少而小的另一主要原因。壳聚糖处理使盐胁迫下菜用大豆的结瘤数、根瘤鲜重显著升高, 这表明壳聚糖可缓解 NaCl 对根瘤菌生长的抑制作用, 提高其抗逆性。同时, 壳聚糖可促进 NaCl 胁迫下菜用大豆根系的生长, 使侧根长及侧根数显著增加(图 2), 这可能是盐胁迫下壳聚糖诱导菜用大豆根瘤数、根瘤鲜重增加的重要原因之一。本研究中壳聚糖诱导 NaCl 胁迫下根系活力的提高也有力证明了壳聚糖在盐逆境下可改善菜用大豆根系生长状况, 促进营养物质的吸收, 进而改善地上部的生长和营养状况。此外, 笔者前期的研究发现, 外源壳聚糖使 NaCl 胁迫下菜用大豆的净光合速率显著升高^[5]。这些结果均显示壳聚糖处理可为菜用大豆结瘤奠定良好的物质基础。这可能是外源壳聚糖提高盐胁迫下菜用大豆结瘤能力的另一重要因素。

固氮酶能够将 N_2 还原成 NH_3 , 因此其活性高低

可直接反映根瘤类菌体的固氮效率。但根瘤固氮酶活性的发挥还需要高流量的低氧环境, 豆血红蛋白则在这一过程中发挥着重要作用^[17]。豆血红蛋白能够维持豆科植物根瘤内较低 O_2 , 并能有效地把 O_2 传递给类菌体的含铁血红蛋白, 其浓度越高, 根瘤的固氮酶活性也越高^[18-19]。本研究中, 壳聚糖显著提高了盐胁迫下菜用大豆根瘤的豆血红蛋白含量及固氮酶活性(图 4), 说明壳聚糖可通过提高根瘤豆血红蛋白含量来保证固氮酶活性发挥对高流量低氧环境的需求, 进而提高固氮酶活性, 促进固氮作用有效进行。这可能是壳聚糖在盐逆境下提高菜用大豆植株含氮量的一个重要原因。此外, 豆科植物的固氮过程同时也是一个耗能过程, 因此, NaCl 胁迫下菜用大豆植株含氮量的升高也与壳聚糖能够提高根系活力、增进吸收、提高光合效率^[4]密切相关。

豆科植物结瘤是非常复杂的过程, 既需要大量能量, 同时还需要特殊的根瘤菌信号分子诱导根瘤形成。在此过程中, 蔗糖^[20]、大豆异黄酮^[21]、生长素^[22]等对大豆结瘤发挥着重要作用。盐逆境下, 壳聚糖如何调节上述结瘤相关物质代谢及其在根部的积累进而促进根瘤形成, 如何调节氮代谢进而促进氮的固定, 还有待进一步研究。

4 结论

NaCl 胁迫下, 外源壳聚糖促进了菜用大豆根瘤的形成及发育, 提高了根瘤的固氮效率, 进而促进了植株的生长, 表明壳聚糖对盐逆境抑制菜用大豆结瘤固氮具有显著的缓解效应, 但壳聚糖促进结瘤固氮的机理还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Tu J C. Effect of salinity on Rhizobium-root hair interaction, nodulation and growth of soybean[J]. *Canadian Journal of Plant Science*, 1981, 61: 231-239.
- [2] Zahran H H, Sprent J I. Effects of sodium chloride and polyethylene glycol on root-hair infection and nodulation of *Vicia faba* L. plants by *Rhizobium leguminosarum*[J]. *Planta*, 1986, 167(3): 303-309.
- [3] 潘丽芹, 韦海忠, 张浩, 等. 壳聚糖对盐胁迫下白三叶种子萌发及幼苗生长的缓解作用[J]. *分子植物育种*, 2018, (11): 3740-3744.
Pan L Q, Wei H Z, Zhang H, et al. Effects of chitosan on seed germination and seedling growth of trifolium repens under salt stress[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2018, (11): 3740-3744.
- [4] 王聪, 杨恒山, 董永义, 等. 外源壳聚糖对 NaCl 胁迫下菜用大豆光合作用及荧光特性的影响[J]. *西北植物学报*, 2015, 35(6): 1198-1205.
Wang C, Yang H S, Dong Y Y, et al. Effect of exogenous chitosan on photosynthesis and fluorescence characteristics of vegetable soybean

- under NaCl stress[J]. *Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinica*, 2015, 35(6): 1198–1205.
- [5] 王聪, 董永义, 贾俊英, 等. NaCl 胁迫下外源壳聚糖对菜用大豆叶绿体抗氧化系统的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2016, 22(5): 1356–1365.
- Wang C, Dong Y Y, Jia J Y, *et al.* Effects of exogenous chitosan on antioxidant system in chloroplast of vegetable soybean under NaCl stress[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2016, 22(5): 1356–1365.
- [6] Pitman M G, Läuchli A. Global impact of salinity and agricultural ecosystems[A]. Lauchli A, Lutge U. Salinity: Environment-Plants-Molecules[C]. Berlin: Springer, 2002. 3–20.
- [7] 王佳木. 壳聚糖对菜用大豆结瘤固氮及相关代谢的影响[D]. 通辽: 内蒙古民族大学硕士学位论文, 2018.
- Wang J M. Effects of Chitosan on nodulation, nitrogen fixation and related metabolism of vegetable soybean[D]. Tongliao: MS Thesis Inner Mongolia University for Nationalities, 2018.
- [8] 孟娜. 根瘤菌共生对大豆耐盐性的促进作用及机制研究[D]. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 2016.
- Meng N. The mechanism study on Rhizobia symbiosis promoting effect of the salt resistance of soybean seedlings[D]. Nanjing: PhD Dissertation of Nanjing Agricultural University, 2016.
- [9] Zablutowicz R M, Reddy K N. Impact of glyphosate on the *Bradyrhizobium japonicum* symbiosis with glyphosate-resistant transgenic soybean: A minireview[J]. *Journal of Environment Quaility*, 2004, 33: 825–831.
- [10] 宋鸿遇. 植物生理学实验技术手册[M]. 上海: 科学技术出版社, 1985. 311–312.
- Song H Y. Experiment technology of plant physiology[M]. Shanghai: Science and Technology Publish Corporation, 1985. 311–312.
- [11] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000. 186–191.
- Li H S. The principle and technology of plant physiology and biochemistry experiment[M]. Beijing: Higher Education Press, 2000. 186–191.
- [12] 李梅, 潘喆云, 李宁宁, 等. NaCl胁迫对藜藜苜蓿生长发育及共生结瘤的影响[J]. *植物生理学报*, 2018, 54(9): 1409–1416.
- Li M, Pan Z Y, Li N N, *et al.* Effects of NaCl stress on growth and symbiotic nodulation in *Medicago truncatula*[J]. *Plant Physiology Journal*, 2018, 54(9): 1409–1416.
- [13] 王登科, 于翔宇, 张学风, 等. 酸、铝和盐胁迫对夏季豆科绿肥作物种子萌发及根瘤菌抗氧化酶活性的影响[J]. *草业学报*, 2018, 27(10): 35–44.
- Wang D K, Yu X Y, Zhang X F, *et al.* Responses of seed germination and rhizobia antioxidative enzyme activities in legumes to acidity and aluminum and NaCl stresses[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2018, 27(10): 35–44.
- [14] 邵桂花, 万超文. 大豆萌发期耐盐生理初步研究[J]. *作物杂志*, 1994, (6): 25–27.
- Shao G H, Wan C W. Preliminary study on salt tolerance physiology of soybean at germination stage[J]. *Crops*, 1994, (6): 25–27.
- [15] Abdel-samad H M, Shaddad M A K. Salt tolerance of soybean cultivars[J]. *Biologia Plantarum*, 1997, 39(2): 263–269.
- [16] Duzan H M, Zhou X, Souleimanov A, *et al.* Perception of *Bradyrhizobium japonicum* nod factor by soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] root hairs under abiotic stress conditions[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2004, 55: 2641–2646.
- [17] Bergersen F J, Turner G L. Leghaemoglobin and the supply of O₂ to nitrogen-fixing root nodule bacteroids: presence of two oxidase systems and ATP production at low free O₂ concentration[J]. *Journal of General Microbiology*, 1975, 91(2): 345–354.
- [18] Appleby C A. Leghaemoglobin and *Rhizobium* respiration[J]. *Annual Review of Plant Physiology*, 1984, 35: 443–478.
- [19] Dakora D F, Appleby C A, Atkins C A. Effects of pO₂ on the formation and status of leghaemoglobin[J]. *Plant Physiology*, 1991, 95: 723–730.
- [20] 刘薇, 韩祥东, 冯永君, 等. 大豆转录因子GmNMHC5对植株蔗糖水平的响应与调控[A]. 中国作物学会. 第23届全国大豆科研生产研讨会论文集[C]. 北京: 科学技术出版社, 2013. 69.
- Liu W, Han X D, Feng Y J, *et al.* The response and regulation of soybean transcription factor GmNMHC5 to sucrose level in plants[A]. Chinese Crop Society. The 23rd national symposium on soybean scientific research and production[C]. Beijing: Science and Technology Press, 2013. 69.
- [21] Subramanian S, Stacey G, Yu O. Endogenous isoflavones are essential for the establishment of symbiosis between soybean and *Bradyrhizobium japonicum*[J]. *Plant Journal*, 2006, 48(2): 261–273.
- [22] Gresshoff P M. Molecular genetic analysis of nodulation genes in soybean[J]. *Plant Breeding Reviews*, 1993, 11: 275–318.