

不同磷浓度下结瘤对大豆生长及苹果酸合成和分泌的影响

李姣姣,徐 舟,梁翠月,廖 红

(华南农业大学 农学院/亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室/根系生物学研究中心,广东 广州 510642)

摘 要:以大豆品种粤春 03-3 为研究对象,采用水培的方式,在高低磷条件下,分别进行接种或不接种根瘤菌的处理。在大豆花期和成熟期分别测定大豆干重、氮磷浓度、根系苹果酸浓度和分泌速率,以研究结瘤对磷调控大豆生长及苹果酸合成和分泌的影响。结果表明:在低磷条件下,结瘤对大豆植株的干重、氮磷浓度均没有显著影响;在高磷条件下,结瘤能够显著提高植株地上部干重和氮浓度。在不结瘤条件下,磷对根系苹果酸浓度没有显著影响。但结瘤后,低磷明显增加了成熟期根系苹果酸的浓度。而且,结瘤显著提高了高磷条件下根系苹果酸的分泌速率。这些结果表明,结瘤影响了磷对大豆生长、根系苹果酸合成和分泌的调控。

关键词:磷;根瘤菌;大豆;苹果酸

中图分类号:S565. 1 **文献标识码:**A **DOI:**10. 11861/j. issn. 1000-9841. 2015. 04. 0643

Effects of Nodulation on Soybean Growth, Malate Synthesis and Exudation in Different Phosphorus Concentrations

LI Jiao-jiao,XU Zhou, LIANG Cui-yue, LIAO Hong

(College of Agriculture, South China Agricultural University/State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources / Root Biology Center, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The objective of study was to evaluate the effects of nodulation on the response of malate synthesis and exudation from soybean roots to phosphorus(P) availability. One soybean genotype YC03-3 was used, and inoculated with or without rhizobia under both high and low P conditions. At both flowering and maturing stages, plant dry weight, nitrogen(N) and P concentration, malate concentration and exudation were measured. The results showed that nodulated plants had higher biomass and N/P concentration than those in non-nodulated plants under high P conditions. However, no significant difference was observed under low P conditions. Malate concentration in non-nodulated roots was not influenced by P availability. However, malate concentration in nodulated roots was significantly higher at low P level than that at high P level at maturing stage. Moreover, malate exudation was significantly higher in the nodulated plants than that in non-nodulated plants under high P conditions. The results indicated that nodulation was involved in regulation of phosphate starvation responsive soybean growth, malate concentration and exudation.

Keywords: Phosphorus availability; Rhizobium; Soybean; Malate

磷是植物生长的必需营养元素之一。但在多数土壤,特别是酸性红壤中,大部分磷主要为难以被植物直接吸收利用的难溶性磷(如:铝磷、铁磷、钙磷),所以有效磷含量低成为限制植物生长的主要因素^[1]。植物在长期的进化过程中,形成了一系列形态和生理变化来适应低磷胁迫,其中包括与微生物形成共生体系,增加根系有机酸的分泌等^[2]。

大豆是一种重要的豆科作物,能与根瘤菌形成共生固氮体系。磷作为植物的必需营养元素,在豆科作物共生固氮过程中起到了重要的作用。对豌豆、大豆、三叶草和小麦等作物的研究发现,磷直接促进了结瘤和共生固氮过程^[3-8]。同时,接种根瘤菌能显著地改善大豆的磷营养状况。Qin 等^[9]研究结果显示,在大田接种根瘤菌可以显著提高大豆产量。进一步的研究结果表明,结瘤提高根系质子的

分泌量,促进了大豆对外界难溶性无机磷,如 Ca-P、Al-P 和 Fe-P 等的活化和利用^[10]。以往的研究表明,除了分泌质子,分泌的有机酸也是植物活化土壤难溶性无机磷的主要机制^[2]。但是,接种根瘤菌是否影响大豆根系有机酸合成和分泌,从而影响大豆对难溶性磷的活化鲜有报道。因此,本研究在不同磷处理条件下,研究接种根瘤菌对大豆根系苹果酸合成和分泌的影响,解析结瘤在大豆响应低磷胁迫过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植物为磷高效大豆品种粤春 03-3。接种的根瘤菌菌株为华南农业大学根系生物学研究中

收稿日期:2014-05-27
基金项目:国家重点基础研究发展计划“973 计划”(2011CB100301);国家自然科学基金(31301835)。
第一作者简介:李姣姣(1988-),女,硕士,主要从事植物营养研究。E-mail: lijiaojiao. love@ 163. com。
通讯作者:梁翠月(1981-),女,博士,副研究员,主要从事植物营养生理和遗传研究。E-mail: liangcy@ scau. edu. cn。

心从南方酸性土壤中分离纯化得到的根瘤菌（*Bradyrhizobium elkanii*）BXYD3。

1.2 试验设计

采用营养液培养方式,设置磷水平和接种根瘤菌双因素处理,其中磷水平包括高磷 250 μmol·L⁻¹ (HP)和低磷 10 μmol·L⁻¹ (LP);接种根瘤菌处理为接种根瘤菌 (+R) 和不接种根瘤菌 (-R)。每个处理 4 次重复,随机排列。

大豆种子用氯气熏蒸法灭菌,纸培法催芽^[11]。待子叶完全展开时,将需接种处理的幼苗在根瘤菌液中浸泡 1 h 进行根瘤接种。所有幼苗移栽到含不同磷水平的营养液中培养,即高磷为 250 μmol·L⁻¹ KH₂PO₄,低磷为 10 μmol·L⁻¹ KH₂PO₄。营养液其它成分为^[12]: 150 μmol·L⁻¹ KNO₃, 120 μmol·L⁻¹ Ca(NO₃)₂·4H₂O, 40 μmol·L⁻¹ NH₄NO₃, 30 μmol·L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 300 μmol·L⁻¹ K₂SO₄, 500 μmol·L⁻¹ MgSO₄·7H₂O, 25 μmol·L⁻¹ MgCl₂, 40 μmol·L⁻¹ Fe-Na-EDTA, 1.5 μmol·L⁻¹ MnSO₄·H₂O, 1.5 μmol·L⁻¹ ZnSO₄·7H₂O, 0.5 μmol·L⁻¹ CuSO₄·5H₂O, 0.15 μmol·L⁻¹ (NH₄)₆Mo₇O₂·4H₂O 和 2.5 μmol·L⁻¹ Na₂B₄O₇·10H₂O。移栽后定时通气,隔天用 0.01 mol·L⁻¹ KOH 或 0.01 μmol·L⁻¹ H₂SO₄将营养液 pH 调至 5.8~6.0,每周更换一次营养液。分别于盛花期和成熟期取样,收集根系分泌物,称量植株及根瘤鲜重,部分样品用于测定苹果酸浓度,其余样品 115℃杀青后 75℃烘干至恒重,测定植株干重和氮磷浓度。

1.3 测定项目与方法

1.3.1 苹果酸含量 根系分泌物收集后取 20 mL 与 2 g 阳离子交换树脂(SIGMA 公司,美国)充分混合,然后 5 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,收集上清液,用冷冻干燥仪(Labconco 公司,美国)冻干成粉末,再用

1 mL 超纯水溶解,测定前保存于 -80℃ 冰箱。大豆根系内源有机酸用 0.25 mol·L⁻¹ HCl 进行提取。所有样品用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,然后用高效液相色谱仪 1260 Infinity LC(安捷伦公司,美国)测定其苹果酸浓度,检测波长为 220 nm,柱温 35℃,固定相为 C18 柱(4.6 mm×250 mm,安捷伦公司,美国),流动相为 0.2% 偏磷酸。

1.3.2 氮、磷含量 称取植物干样 0.2 g 置于 50 mL 消煮管,加 5 mL 浓 H₂SO₄ 过夜处理后,在消煮炉上加热至溶液呈棕黑色,冷却后先加 10 滴 H₂O₂,继续加热至微沸并适当滴入 H₂O₂,直到溶液清亮。所得产物定容至 50 mL,吸取其中 500 μL 样品再定容至 2 mL,用流动分析仪(SKALAR SAN++,荷兰)测定其氮磷含量。

1.4 数据分析

采用 Excel 2003 进行平均值和标准误差的计算,并利用 SPSS 17.0 统计软件进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 不同磷水平条件下结瘤对大豆干重的影响

由表 1 可知,不同磷水平和结瘤处理显著影响了大豆在盛花期和成熟期地上部和根系的干重。在低磷条件下,结瘤对大豆地上部和根系的干重没有影响。在高磷条件下,结瘤显著提高了大豆地上部的干重,尤其是在成熟期,结瘤植株地上部的干重是不结瘤植株的 2.8 倍。但是,结瘤显著抑制大豆根系的干重,尤其在盛花期,结瘤根系干重仅为不结瘤根系的 50%。这些结果说明结瘤影响了外源磷对大豆生长的调控作用。另外,低磷胁迫显著抑制了根瘤的生长。在盛花期和成熟期,高磷处理条件下根瘤干重分别是低磷处理的 10 和 20 倍。

表 1 结瘤和磷处理对盛花期和成熟期大豆干重的影响

Table 1 Effects of nodulation and P on soybean dry weight at flowering and maturing stages (g·plant⁻¹)

KH ₂ PO ₄ 浓度 KH ₂ PO ₄ concentration /μmol·L ⁻¹	结瘤处理 Inoculation treatment	盛花期 Flowering stage			成熟期 Maturing stage		
		地上部 Shoot			地上部 Shoot		
		地上部 Shoot	根部 Root	根瘤 Nodule	地上部 Shoot	根部 Root	根瘤 Nodule
10	结瘤 Inoculation	1.87 ± 0.07 c	0.58 ± 0.03 b	0.04 ± 0 b	3.14 ± 0.30 b	0.68 ± 0.06 b	0.03 ± 0.01 b
	不结瘤 Non-inoculation	1.96 ± 0.12 c	0.67 ± 0.04 b	-	3.19 ± 0.23 b	0.90 ± 0.09 b	-
250	结瘤 Inoculation	4.55 ± 0.32 a	0.59 ± 0.05 b	0.40 ± 0.03 a	14.64 ± 1.40 a	1.19 ± 0.06 a	0.65 ± 0.04 a
	不结瘤 Non-inoculation	3.66 ± 0.12 b	1.18 ± 0.08 a	-	5.23 ± 0.19 b	1.32 ± 0.09 a	-

数据为 4 次生物学重复平均值 ± 标准误差; 同列数据具有相同字母表示差异不显著 (P>0.05), 下同。
Each valueis the mean of four replicates with standard error; The same letter in the same column means no significant difference (P>0.05), the same below.

2.2 不同磷水平条件下结瘤对大豆氮磷浓度的影响

由表 2 可知,结瘤和磷处理显著影响大豆地上部和根系的磷浓度。无论接种根瘤菌与否,高磷处理条件下的大豆地上部和根系的磷浓度显著高于低磷处理。虽然,在低磷条件下接种根瘤菌没有显著影响大豆地上部和根系磷浓度。但是,在高磷条件下,接种根瘤菌显著减少了大豆地上部磷浓度,在盛花期和成熟期结瘤大豆地上部磷浓度分别为不结瘤大豆的 69% 和 60%。与地上部磷浓度变化不同,高磷条件下结瘤仅显著降低了盛花期根系磷浓度,而对成熟期根系磷浓度没有影响。这些结果说明外源磷和结瘤显著影响大豆各部位的磷浓度。

表 2 结瘤和磷处理对盛花期和成熟期大豆磷浓度的影响

KH ₂ PO ₄ 浓度		盛花期			成熟期		
KH ₂ PO ₄ concentration /μmol·L ⁻¹	结瘤处理 Inoculation treatment	Flowering stage			Maturing stage		
		地上部 Shoot	根部 Root	根瘤 Nodule	地上部 Shoot	根部 Root	根瘤 Nodule
10	结瘤 Inoculation	1. 01 ± 0. 02 c	1. 25 ± 0. 09 c	2. 84 ± 0. 21 b	1. 47 ± 0. 06 c	0. 70 ± 0. 14 b	1. 31 ± 0. 09 b
	不结瘤 Non-inoculation	1. 05 ± 0. 06 c	1. 28 ± 0. 03 c	—	1. 55 ± 0. 08 c	0. 77 ± 0. 05 b	—
250	结瘤 Inoculation	5. 40 ± 0. 29 b	10. 21 ± 1. 20 b	6. 25 ± 0. 20 a	5. 62 ± 0. 43 b	7. 26 ± 1. 04 a	6. 75 ± 0. 60 a
	不结瘤 Non-inoculation	7. 87 ± 0. 36 a	13. 48 ± 0. 62 a	—	9. 31 ± 0. 48 a	6. 86 ± 0. 76 a	—

表 3 结瘤和磷处理对盛花期和成熟期大豆氮浓度的影响

KH ₂ PO ₄ 浓度		盛花期			成熟期		
KH ₂ PO ₄ concentration /μmol·L ⁻¹	结瘤处理 Inoculation treatment	Flowering stage			Maturing stage		
		地上部 Shoot	根部 Root	根瘤 Nodule	地上部 Shoot	根部 Root	根瘤 Nodule
10	结瘤 Inoculation	17. 68 ± 0. 16 b	17. 86 ± 0. 74 a	48. 02 ± 1. 90 b	27. 69 ± 1. 17 a	18. 70 ± 1. 06 a	44. 36 ± 1. 85 b
	不结瘤 Non-inoculation	16. 58 ± 0. 90 b	17. 17 ± 0. 46 a	—	25. 94 ± 1. 27 a	18. 25 ± 0. 59 a	—
250	结瘤 Inoculation	25. 90 ± 0. 81 a	16. 90 ± 0. 65 a	62. 04 ± 0. 86 a	31. 75 ± 5. 31 a	15. 00 ± 0. 75 b	67. 08 ± 4. 28 a
	不结瘤 Non-inoculation	11. 04 ± 0. 24 c	14. 78 ± 0. 37 b	—	15. 39 ± 0. 96 b	14. 14 ± 0. 50 b	—

2.3 磷和结瘤对大豆根系和根瘤苹果酸合成的影响

磷水平和结瘤的交互作用能够影响大豆根系苹果酸的浓度。在不接种根瘤菌的条件下,磷对盛

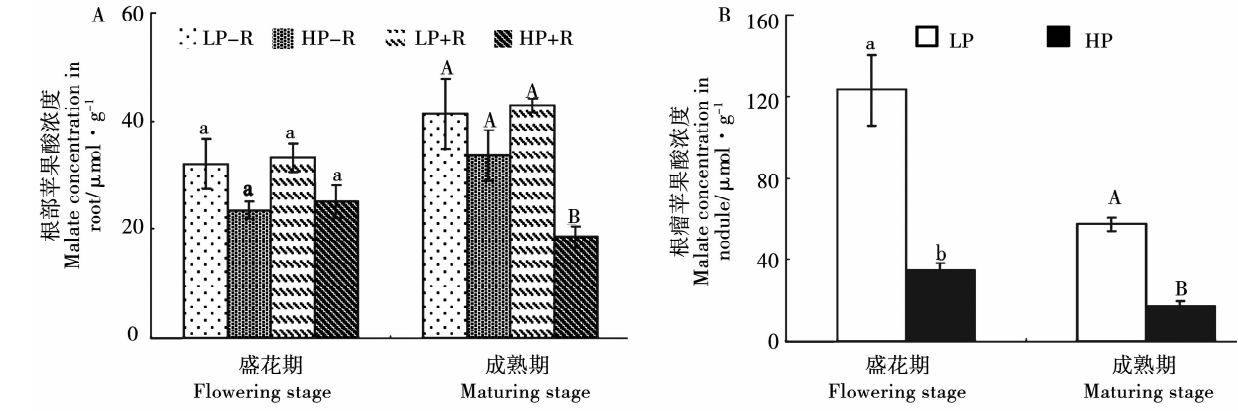
由表 3 可知,与大豆磷浓度变化相反,在高磷条件下,接种根瘤菌显著提高了大豆地上部氮浓度,在盛花期和成熟期结瘤大豆地上部氮浓度为不结瘤大豆的 2 倍。但是,在高磷条件下结瘤只显著提高盛花期大豆根系氮浓度,而对成熟期根系氮浓度无显著影响。在低磷条件下,接种根瘤菌对大豆地上部和根系氮浓度没有显著影响。这些结果说明结瘤促进大豆氮浓度的增加依赖于外源磷浓度。

另外,外源磷显著影响了大豆根瘤氮磷浓度。低磷处理的根瘤氮磷浓度均显著低于高磷处理条件下的根瘤。尤其在成熟期,低磷条件下根瘤的氮和磷浓度分别为高磷处理下的 66% 和 20%,说明磷显著影响了根瘤的氮磷浓度。

花期和成熟期大豆根系苹果酸浓度没有显著的影响(图 1A)。但是,在接种根瘤菌的条件下,成熟期大豆根系苹果酸浓度显著受磷处理的影响,即低磷条件下根系苹果酸浓度为高磷条件的 2 倍以上(图

1A)。与根系苹果酸浓度的变化不同,在盛花期和成熟期,低磷处理的根瘤苹果酸浓度是高磷处理的

3.5 倍以上,说明根瘤苹果酸浓度显著受外源磷的影响(图 1B)。



LP: 低磷; HP: 高磷; - R: 不接种根瘤菌; + R: 接种根瘤菌。图中不同大写或小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。下同。
LP: Low P; HP: High P; - R: Without rhizobium inoculants; + R: With rhizobium inoculants. Different capital or lowercase letters in the same figure represent significant differences at the 0.05 level. The same below.

图 1 结瘤和磷处理对大豆根系 (A) 和根瘤 (B) 苹果酸浓度的影响
Fig. 1 Effect of nodulation and P on malate concentration of soybean roots (A) and nodules (B)

2.4 结瘤和磷处理对大豆植株根系苹果酸分泌速率的调控

结瘤和磷的交互作用显著地影响了大豆根系苹果酸的分泌。在低磷条件下,接种根瘤菌对大豆根系苹果酸的分泌无显著的影响(图 2)。但是,在

高磷条件下,接种根瘤菌显著提高了大豆根系苹果酸的分泌,在盛花期和成熟期,结瘤根系苹果酸分泌速率分别是不结瘤根系的 1.7 和 2.0 倍(图 2),说明结瘤促进大豆根系苹果酸的分泌依赖于外源磷浓度。

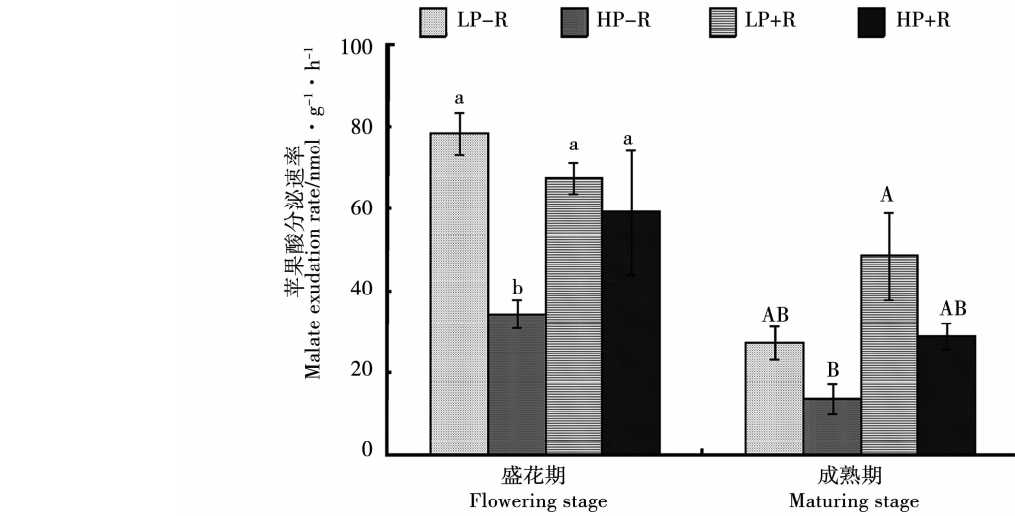


图 2 结瘤和磷处理对大豆苹果酸分泌速率的影响
Fig. 2 Effect of nodulation and P on malate exudation rate from soybean roots

3 结论与讨论

与根瘤菌形成的共生固氮体系可以为豆科作物提供氮营养,因此结瘤作物中根瘤的生长状况与其产量密切相关^[13]。本研究分析了结瘤对大豆在不同磷水平条件下生长的影响,发现根瘤对大豆植株生长的影响依赖于外界磷浓度。高磷条件下,结瘤能显著地提高植株地上部的生物量;而低磷条件下结瘤对植株生长有微弱的抑制作用,这可能与不

同磷处理条件下根瘤的活性有关^[14]。本研究结果显示,低磷处理下根瘤积累的苹果酸浓度显著高于高磷处理,且接种根瘤菌后,低磷处理的大豆地上部氮含量显著低于高磷处理。前人结果显示高浓度的苹果酸会抑制根瘤的生物固氮活性,从而减少向宿主植物输出氮源^[15-17]。因此,低磷条件下,大豆根瘤积累了过高的苹果酸,抑制了固氮活性。根瘤既竞争了碳源,又减少了向大豆输出氮源,导致大豆植株生长受到抑制。另一方面,高磷条件下,

大豆植株和根瘤的磷含量均显著高于低磷。磷是生物固氮过程提供的能量来源,充足的磷能够为根瘤固氮提供必要的条件^[18-22]。因此,高磷条件下,结瘤对大豆生长具有促进作用;而低磷条件下,结瘤会抑制大豆的生长。

磷是植物生长的必需营养元素之一。但是,磷固有的物理化学特性导致其容易被土壤固定,而难以被植物直接吸收和利用,所以土壤中有效磷的含量难以满足植物生长的需求。前期许多研究表明,植物能够通过增加根系有机酸的合成和分泌,提高对土壤难溶态磷的活化^[10, 23-25]。本研究比较分析了在接种根瘤菌和不接种根瘤菌条件下,大豆根系苹果酸浓度对外界磷的响应。结果显示,在不接种根瘤菌的处理下,磷对根系苹果酸浓度没有显著影响。但是,在接种根瘤菌的条件下,与高磷处理相比,低磷处理显著提高成熟期根系苹果酸浓度。这些结果表明,除了进行碳/氮源的交换外,根瘤和植物之间还存在着复杂的交互作用。根瘤可能通过某种信号途径,改变了大豆根系苹果酸合成过程对外界磷的响应。已有的报道指出,在植物和菌根真菌的共生体系中,菌根信号能够调控宿主植物地上部 miR399 的表达,从而影响植物根系对磷的响应^[26]。但根瘤通过什么信号途径影响大豆根系苹果酸的合成还有待进一步研究。另一方面,在不接种根瘤菌的条件下,低磷处理的大豆根系苹果酸的分泌明显高于高磷处理,说明有机酸分泌的增加是植物对低磷胁迫的普遍适应性反应之一。而接种根瘤菌能够显著地促进高磷条件下,大豆根系苹果酸的分泌;同时,接种根瘤菌也微弱地促进了低磷条件下,大豆根系苹果酸的分泌。这些结果表明,根瘤能够改变外界磷对大豆根系苹果酸分泌的调控。但根瘤通过何种途径影响这一过程还有待进一步探讨。

参考文献

[1] 卢仁骏,严小龙,黄志武,等. 广东省砖红壤旱地土壤养分状况的网室调查[J]. 华南农业大学学报, 1992(2):74-80. (Lu R J, Yan X L, Huang Z W, et al. Greenhouse survey studies on upland latosol soil nutrient status in Guangdong province[J]. Journal of South China Agricultural University, 1992(2):74-80.)

[2] Tian J, Wang X, Tong Y, et al. Bioengineering and management for efficient phosphorus utilization in crops and pastures[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2012, 23(6):866-871.

[3] Israel D W. Investigation of the role of phosphorus in symbiotic dinitrogen fixation[J]. Plant Physiology, 1987, 84(3):835-840.

[4] Israel D W. Symbiotic dinitrogen fixation and host-plant growth during development of and recovery from phosphorus deficiency

[J]. Physiologia Plantarum, 1993, 88(2):294-300.

[5] Drevon J, Hartwig U A. Phosphorus deficiency increases the argon-induced decline of nodule nitrogenase activity in soybean and alfalfa[J]. Planta, 1997, 201(4):463-469.

[6] Almeida J F, Hartwig U A, Frehner M, et al. Evidence that P deficiency induces N feedback regulation of symbiotic N₂ fixation in white clover (*Trifolium repens* L.) [J]. Journal of Experimental Botany, 2000, 51(348):1289-1297.

[7] Hellsten A, Huss-Danell K. Interaction effects of nitrogen and phosphorus on nodulation in red clover (*Trifolium pratense* L.) [J]. Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Plant Soil Science, 2000, 50(3):135-142.

[8] Jakobsen I. The role of phosphorus in nitrogen fixation by young pea plants (*Pisum sativum*) [J]. Physiologia Plantarum, 1985, 64(2):190-196.

[9] Qin L, Zhao J, Tian J, et al. The high-affinity phosphate transporter GmPT5 regulates phosphate transport to nodules and nodulation in soybean [J]. Plant Physiology, 2012, 159(4):1634-1643.

[10] Qin L, Jiang H, Tian J, et al. Rhizobia enhance acquisition of phosphorus from different sources by soybean plants[J]. Plant and Soil, 2011, 349(1-2):25-36.

[11] Yan X, Liao H, Trull M C, et al. Induction of a major leaf acid phosphatase does not confer adaptation to low phosphorus availability in common bean [J]. Plant Physiology, 2001, 125(4):1901-1911.

[12] Lynch J, Epstein E, Läuchli A, et al. An automated greenhouse sand culture system suitable for studies of P nutrition[J]. Plant, Cell & Environment, 1990, 13(6):547-554.

[13] 马剑,黄高宝,高亚琴,等. 接种根瘤菌对豌豆根际细菌数量动态变化及产量的影响[J]. 干旱地区农业研究, 2009, 27(6):7-10. (Ma J, Huang G B, Gao Y Q, et al. Effect of inoculated peas with rhizobium on the number of pea rhizobacteria dynamic changes and yields[J]. Agricultural Research in the Arid Areas, 2009, 27(6):7-10.)

[14] 苗淑杰,乔云发,韩晓增,等. 缺磷对已结瘤大豆生长和固氮功能的影响[J]. 作物学报, 2009, 35(7):1344-1349. (Miao S J, Qiao Y F, Han X Z, et al. Effects of phosphorus deficiency on growth and nitrogen fixation of soybean after nodule formation[J]. Acta Agronomica Sinica, 2009, 35(7):1344-1349.)

[15] Chen Z, Cui Q, Liang C, et al. Identification of differentially expressed proteins in soybean nodules under phosphorus deficiency through proteomic analysis[J]. Proteomics, 2011, 11(24):4648-4659.

[16] Sa T, Israel D W. Energy status and functioning of phosphorus-deficient soybean nodules[J]. Plant Physiology, 1991, 97(3):928-935.

[17] Le Roux M R, Khan S, Valentine A J. Organic acid accumulation may inhibit N₂ fixation in phosphorus-stressed lupin nodules[J]. New Phytologist, 2008, 177(4):956-964.

[18] Schulze J, Temple G, Temple S J, et al. Nitrogen fixation by white lupin under phosphorus deficiency[J]. Annals of Botany, 2006, 98(4):731-740. (下转第 652 页)

Beijing: Agricultural Press, 1986;274-340)

[13] Liu W, Lua H H, Wua W X, et al. Transgenic Bt rice does not affect enzyme activities and microbial composition in the rhizosphere during crop development[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2008, 40: 475-486.

[14] 黄代中,肖文娟,刘云兵,等. 浅水湖泊沉积物脱氢酶活性的测定及其生态学意义[J]. 湖泊科学,2009,21(3):345-350. (Huang D Z, Xiao W J, Liu Y B, at al. Determination of dehydrogenase activity in sediment of shallow lakes and its ecological significance[J]. Journal of Lake Science, 2009, 21(3): 345-350.)

[15] 吴凡,林桂潮,吴坚文,等. 转 *AtPAP15* 基因大豆种植对土壤养分及酶活性的影响[J]. 土壤学报,2013,50(3):600-608. (Wu F, Lin G C, Wu J W, at al. Effects of planting *AtPAP15* transgenic on soil nutrients and enzyme activities in rhizosphere [J]. Acta Pedologica Sinica, 2013,50(3):600-608.)

[16] 乔琦,丁伟,李新海,等. 转基因抗旱大豆对土壤酶活性的影响[J]. 东北农业大学学报,2010,41(12):11-14. (Qiao Q, Ding W, Li X H, at al. Effect of transgenic drought resistant soybean on soil enzyme activity[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2010,41(12):11-14.)

[17] 刘佳,刘志华,徐广惠,等. 抗草甘膦转基因大豆 (RRS) 对微生物和土壤氮素转化的影响[J]. 农业环境科学学报,2010,29(7):1341-1345. (Liu J, Liu Z H, Xu G H, et al. Effects of roundup ready soybean (RRS) on microorganisms and nitrogen transformation in the rhizospheric soil[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2010,29(7):1341-1345.)

[18] 吕晓波,王宏燕,刘琦,等. 抗草甘膦转基因大豆 (RRS) 在黑土生态系统种植的安全性研究[J]. 大豆科学,2009,28(2):

260-265. (Lyu X B, Wang H Y, Liu Q, et al. Biosafety of roundup ready soybean(RRS) planted in black soil ecosystem[J]. Soybean Science, 2009,28(2):260-265.)

[19] 袁红旭,张建中,郭建夫,等. 种植转双价抗真菌基因水稻对微生物群落及酶活性的影响[J]. 土壤学报,2005,42(1):122-126. (Yuan H X, Zhang J Z, Guo J F, at al. Activities of microbes and enzymes in soil after growing transgenic rice with two extra anti-fungus genes[J]. Acta Pedologica Sinica, 2005,42(1): 122-126.)

[20] 万小羽,梁永超,李忠佩,等. 种植转 *Bt* 基因棉对土壤生物活性的影响[J]. 生态学报,2007,27(12):5414-5420. (Wan X Y, Liang Y C, Li Z P, et al. Effect of planting transgenic *Bt* cotton on soil enzymatic and m icrobial activities[J]. Acta Ecologica sinica, 2007,27(12):5414-5420.)

[21] Jepson P C, Croft B A, Pratt G E. Test systems to determine the ecological risks posed by toxin release from bacillus thuringiensis genes in crop plants[J]. Molecular Ecology,2008,3(1):81-89.

[22] Oger P, Petit A, Dessaux Y. Genetically engineered plants producing opines alter their biological environment[J]. Nature Biotechnology, 1997, 15(4):369-372.

[23] Northcott G L, Jones K C. Experimental approaches and analytical techniques for determining organic compound bound residues in soil and sediment[J]. Environmental Pollution, 2000, 108(1): 19-43.

[24] Kremer J R, Means E N, Kim S. Glyphosate affects soybeanroot exudation and rhizosphere micro-organisms[J]. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 2005, 85(15): 1165-1174.

(上接第 647 页)

[19] 吴明才,肖昌珍,郑普英. 大豆磷素营养研究[J]. 中国农业科学, 1999, 32(3):59-65. (Wu M C, Xiao C Z, Zheng P Y. Study on the physiological function of phosphorus to soybean[J]. Scientia Agricultura Sinica, 1999, 32(3):59-65.)

[20] 丁娇. 长期施肥对大豆固氮能力的影响[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2013: 8-10. (Ding J. Effect of long-term fertilization on nitrogen fixation ability of soybean[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2013: 8-10.)

[21] 姚玉波. 大豆根瘤固氮特性与影响因素的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2012: 48-56. (Yao Y B. Study on characteristics of nodule nitrogen fixation and influencing factors of soybean [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2012: 48-56.)

[22] Israel D W. Investigation of the role of phosphorus in symbiotic dinitrogen fixation[J]. Plant Physiology, 1987, 84(3):835-840.

[23] Gahoonia T S, Nielsen N E, Lyshede O B. Phosphorus (P) acquisition of cereal cultivars in the field at three levels of P fertilization[J]. Plant and Soil, 1999, 211(2):269-281.

[24] 兰忠明,林新坚,张伟光,等. 缺磷对紫云英根系分泌物产生及难溶性磷活化的影响[J]. 中国农业科学, 2012, 45(8): 1521-1531. (Lan Z M, Lin X J, Zhang W G, et al. Effect of P deficiency on the emergence of *Astragalus* L. root exudates and mobilization of sparingly soluble phosphorus [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2012, 45(8):1521-1531.)

[25] 张振海,陈琰,韩胜芳,等. 低磷胁迫对大豆根系生长特性及分泌 H^+ 和有机酸的影响[J]. 中国油料作物学报, 2011, 33(2):135-140. (Zhang Z H, Chen Y, Han S F, et al. Effect of P deficiency stress on soybean root system and its secretion of H^+ and organic acid [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2011, 33(2):135-140.)

[26] Branscheid A, Sieh D, Pant B D, et al. Expression pattern suggests a role of MiR399 in the regulation of the cellular response to local Pi increase during *arbuscular mycorrhizal* symbiosis [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2010, 23: 915-926.