



# 豆科植物根瘤衰老机制与影响因素研究进展

任明霞<sup>1</sup>, 艾加敏<sup>2</sup>, 张瑞丽<sup>1</sup>, 李洋<sup>1</sup>, 邓振山<sup>1\*</sup>

1 延安大学 生命科学学院, 陕西 延安 716000

2 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100

任明霞, 艾加敏, 张瑞丽, 李洋, 邓振山. 豆科植物根瘤衰老机制与影响因素研究进展[J]. 微生物学报, 2024, 64(12): 4701-4726.

REN Mingxia, AI Jiamin, ZHANG Ruili, LI Yang, DENG Zhenshan. Research progress in mechanism and influencing factors of root nodule senescence in leguminous plants[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(12): 4701-4726.

**摘要:** 豆科植物根瘤中的生物固氮作用对农业可持续发展和自然生态环境保护具有重要意义。依据根瘤的不同发育时期可将根瘤分为初生期、活跃期和衰老期3个时期, 其中的衰老期是一个复杂的生理过程, 涉及多种基因和环境因素的相互作用, 可以通过调节固氮酶活性、豆血红蛋白基因表达水平等来调节根瘤的功能和寿命。同时, 各种生物与非生物胁迫也会加速根瘤的衰老, 降低豆科植物的生物积累量与生产力。本文系统阐述了根瘤衰老的形态、生理生化与分子变化机制, 梳理了影响根瘤衰老的生物与非生物因素, 探讨了能有效延迟共生根瘤的衰老, 从而延长共生结瘤固氮功能, 提高土壤氮利用效率, 增加豆科植物种子灌浆期间种子发育的总体氮供应的策略, 可在增强粮食安全的同时又减少化学肥料对环境的不利影响。

**关键词:** 共生固氮; 根瘤; 衰老机制; 生物与非生物胁迫; 延缓衰老

## Research progress in mechanism and influencing factors of root nodule senescence in leguminous plants

REN Mingxia<sup>1</sup>, AI Jiamin<sup>2</sup>, ZHANG Ruili<sup>1</sup>, LI Yang<sup>1</sup>, DENG Zhenshan<sup>1\*</sup>

1 School of Life Sciences, Yan'an University, Yan'an 716000, Shaanxi, China

2 School of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

**Abstract:** The nitrogen fixation in legume root nodules is of great significance for sustainable

资助项目: 国家自然科学基金(32160003)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32160003).

\*Corresponding author. E-mail: zhenshandeng214@163.com

Received: 2024-06-30; Accepted: 2024-09-12; Published online: 2024-09-13

agricultural development and natural eco-environment protection. The growth period of root nodules can be divided into young, active, and senescence stages. Root nodule senescence is a complex physiological process involving the interactions of multiple genes and environmental factors. The functions and lifespan of root nodules can be altered by regulating nitrogenase activity and leghemoglobin gene expression levels. Biotic and abiotic stresses can accelerate the senescence of root nodules and reduce the biomass and productivity of leguminous plants. This article expounds the mechanism of morphological, physiological, biochemical, and molecular changes of root nodules during senescence and summarizes the biotic and abiotic factors that affect root nodule senescence. Furthermore, the measures for delaying the senescence of root nodules are discussed. These measures will prolong the symbiotic nitrogen fixation, improve the nitrogen utilization efficiency, and increase the overall nitrogen supply for seed filling of leguminous plants, thereby enhancing food security and reducing the adverse effects of chemical fertilizers on the environment.

**Keywords:** symbiotic nitrogen fixation; root nodule; senescence mechanism; biotic and abiotic stresses; delaying senescence

豆科植物种类繁多，分布广泛，在维持生物多样性、供给食物、促进全球氮素循环等方面发挥着重要作用<sup>[1-3]</sup>。豆科植物因其能够与土壤中的根瘤菌共生并形成根瘤或茎瘤，且其中的根瘤菌利用植物通过光合作用产生的碳源将空气中的游离氮转化为植物可直接吸收利用的含氮化合物氨，为宿主植物提供氮源的同时也提高了土壤的肥力；这种生物固氮作用对植物的生长、作物的产量增加、土壤的健康以及农业的绿色发展都具有重要意义<sup>[4-6]</sup>，已成为内生菌与宿主植物良性共生研究的热点领域。根瘤有效固氮周期的长短直接影响着植物生物量 and 生产力<sup>[7-9]</sup>，因此，了解根瘤衰老的机制和影响因素，通过多种措施延缓根瘤的衰老是提高豆科作物产量和质量的创新策略之一，对于保障农业的可持续发展和环境的保护至关重要。

本文系统阐述了根瘤衰老的形态、生理生化与分子变化机制，并总结了影响根瘤衰老的生物和非生物因素，以及有效延迟根瘤衰老的措施。这些研究有助于延缓根瘤的衰老过程，提升生物固氮效率和土壤氮利用效率，同时为

豆科植物在种子灌浆期间提供总体氮供应，从而增强粮食安全，减轻化学肥料对环境的不利影响。

## 1 根瘤的发育及其微生物种群的组装与演替

根瘤是植物与根瘤菌有序相互作用的结果。以侵染线方式入侵的根瘤菌为例，其根瘤形成过程主要包括以下几个步骤：(1) 豆科植物根部分泌氨基酸和类黄酮等信号物质，引诱根瘤菌集聚于根毛处；(2) 根瘤菌识别信号物质，调控结瘤基因表达，合成结瘤因子(nod factors, NF)和脂壳寡糖(lipo-chito-oligosaccharides)；(3) 植物识别结瘤因子，导致根毛细胞膜去极化和离子通量变化，引发根毛的异常卷曲并形成侵染线，侵染线不断延伸，将根瘤菌包裹于根部皮层细胞中，形成根瘤原基；(4) 根瘤菌持续增殖，侵染线继续延长，皮层细胞不断分化，最终形成完整的根瘤<sup>[10-12]</sup> (图 1)。

以大豆为代表，豆科植物生长经历 6 个时期：发芽期、幼苗期、花芽分化期、开花结荚

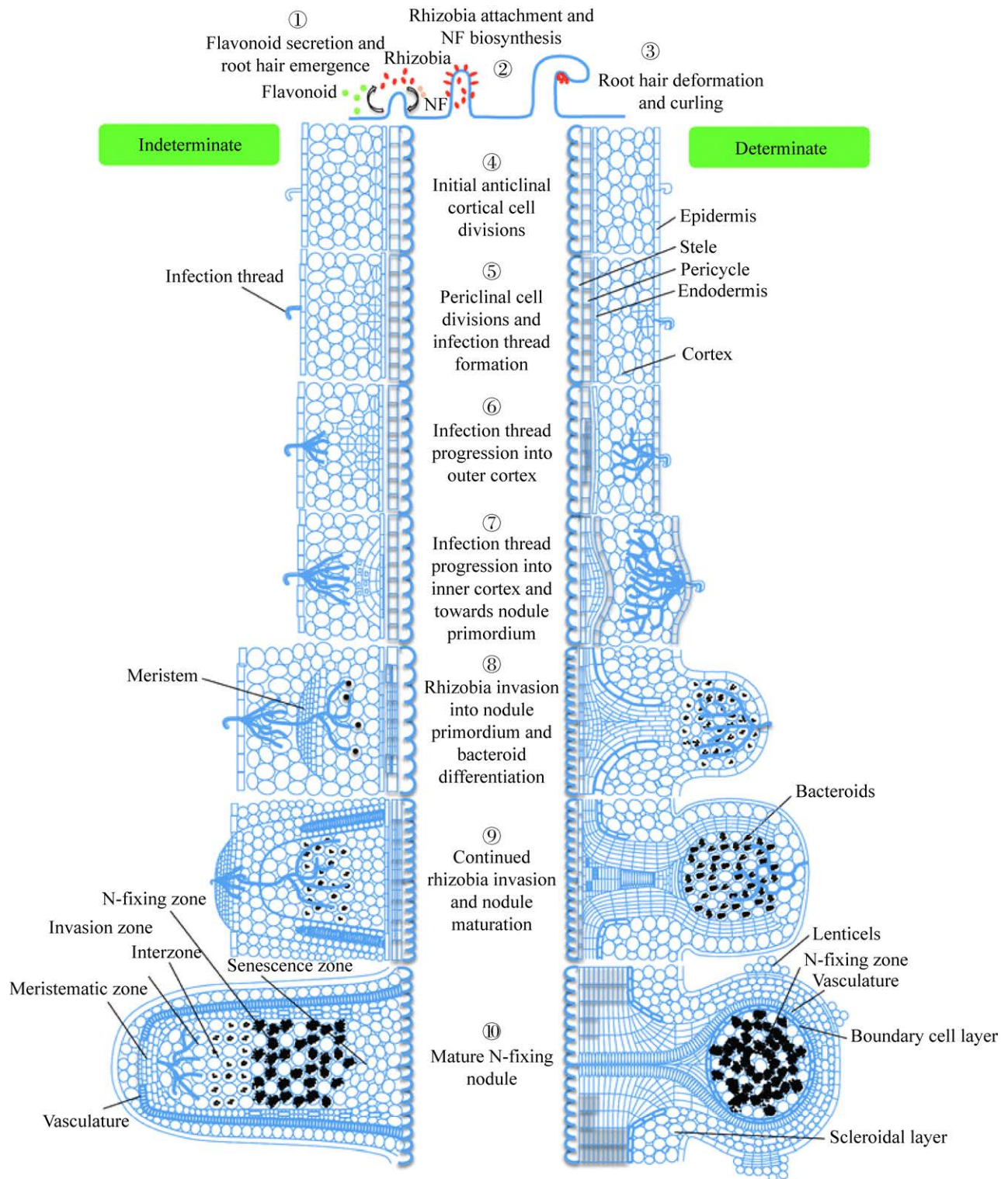


图 1 根瘤菌以侵染线方式与豆科植物建立共生关系形成根瘤<sup>[10]</sup>

Figure 1 Rhizobia establish symbiotic relationships with leguminous plants through infection lines to form nodules<sup>[10]</sup>.

期、鼓粒期和成熟期<sup>[13]</sup>。随着宿主植物的生长发育，根瘤也经历着不同步的变化；根据根瘤在形态和生理生化上的差异，可将根瘤的生长周期划分为3个阶段：初生期、活跃期和衰老期<sup>[8-9]</sup>

(图2)。通常在植物幼苗期，根瘤菌开始侵染根系形成初生期根瘤；在开花结荚期，形成活跃期根瘤，具有成熟且高固氮活性；而在鼓粒期(有些种类甚至更早的阶段)，观察到明显的根瘤

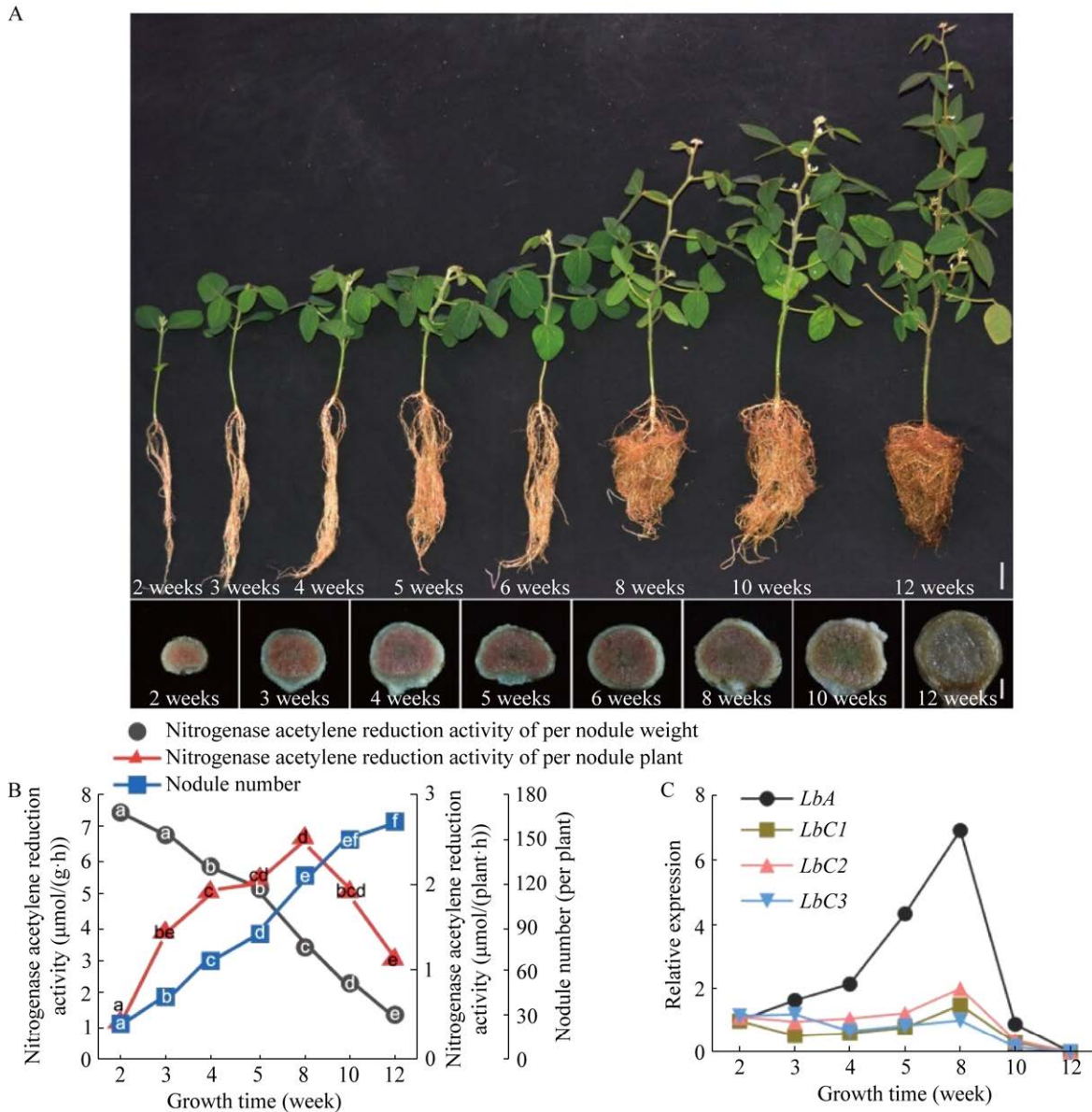


图2 大豆植株与根瘤生长周期<sup>[8]</sup>

Figure 2 The growth cycle of soybean plants and nodules<sup>[8]</sup>. A: Plant and nodule development at different time points after inoculation with rhizobia. The upper panel illustrates plant growth at the different stages, and the lower panel shows longitudinal sections of the largest root nodule at the base of the main root at different stages. B: Nitrogenase activity and nodule number at different developmental stages. C: Relative expression of leghemoglobin genes *LbA*, *LbC1*, *LbC2*, and *LbC3* in nodules at different developmental stages. 2–5 weeks is the soybean seedling stage, 6–8 weeks is the flower bud differentiation period, and 10–12 weeks is the flowering-podding phase.

衰老,即衰老期根瘤<sup>[9,14]</sup>。根瘤发育阶段的转变反映了宿主植物养分分配和生长繁殖策略的变化;例如,在植物鼓粒期由繁殖策略主导,根瘤内的养分被重新吸收以支持种子充盈,植物以相同的碳成本换取不到较高的氮养分,为了保证产量和种子品质,根瘤开始衰老<sup>[8,15]</sup>。

随着根瘤的发育,根瘤内的微生物也发生着动态变化<sup>[16]</sup>。首先,植物根际微生物群落的演替是一个动态过程<sup>[17-18]</sup>。随着植物生长不同时期会向土壤分泌不同种类和含量的代谢物,引起根际土壤化学和生物特性的变化,根际微生物群落也会根据植物的宿主效应逐渐形成特异性群落<sup>[19]</sup>。因此,植物的生长状态会影响根际微生物群落演替的方向<sup>[20]</sup>。其次,环境过滤作用驱动着植物根际和根瘤内细菌群落的组装,在根瘤中,只有特定类型的微生物才能通过根系的选择和过滤作用在根际定殖并繁衍生息;当根际微生物群落发生变化时,进入根瘤内并定殖的微生物也会发生变化<sup>[21]</sup>。根瘤的发育过程同时也伴随着微生物的侵入与定殖,根瘤活跃期伴随着功能固氮微生物的大量增殖,而根瘤衰老期则伴随着内容物的泄漏与类菌体释放,表明随着根瘤发育阶段的推进,根瘤和根际土壤中的微生物群落也在发生演替<sup>[10,16]</sup>。根据植物不同的生长阶段和环境需求,微生物群落的变化将贯穿整个植物生命周期,因此根瘤与根际土壤中的微生物群落处于持续动态变化之中<sup>[16,22]</sup> (图 3)。总的来看,根瘤的发育是一个复杂的生理过程,涉及多种基因、环境因素以及宿主植物与微生物之间的相互作用。因此,阐明豆科植物根瘤的衰老机制,探究延缓根瘤衰老的策略,将为提高豆科植物生物量和产量,尤其是突破同时增加大豆生长量和大豆蛋白质含量的科学难题提供科学依据。

## 2 根瘤及其衰老类型

根据形态和结构特征,豆科植物根瘤分为定型根瘤和不定型根瘤两类,其主要由宿主植物种类所决定;在成熟的根瘤中,这 2 种类型具有不同的组织分区;不定型根瘤即苜蓿、含羞草和刺槐等的根瘤,在成熟后可分为 6 个发育区域:根尖分生区、侵染区、过渡区、成熟固氮区、衰老区和分化根瘤菌暂存区,根瘤的衰老从固氮区靠近根部的位置开始,逐渐向根部和根尖蔓延;相比之下,定型根瘤如百脉根、大豆和降香黄檀等,则无永久的分生组织,其成熟根瘤是由未侵染区域、侵染细胞、成熟固氮细胞以及衰老细胞构成均匀组织,其发育与衰老都呈现出由中心向边缘辐射的特征<sup>[11-12]</sup> (图 4)。

定型根瘤与不定型根瘤的类菌体结构和分化方式存在差异<sup>[11]</sup>。不定型根瘤的功能单元是单个类菌体包裹在包膜内,只有在衰老的根瘤中才有类菌体中细菌碳源类贮藏物聚- $\beta$ -羟丁酸 (poly- $\beta$ -hydroxybutyrate, PHB) 的积累,而定型根瘤的功能单元通常由多个包裹在同一被膜内的类菌体组成,且整个发育过程中均可观察到多个类菌体中 PHB 的积累<sup>[23]</sup>。由于基因组扩增和细胞膜内的渗透压变化等因素导致类菌体的生长差异,不定型根瘤形成终端分化类菌体,而定型根瘤形成非终端分化类菌体;这一过程主要受到根瘤特异性共生多肽 (nodule cysteine rich peptide, NCR) 的调控<sup>[11,24]</sup>。NCR 是一类富含半胱氨酸的植物多肽,是介导不定型根瘤类菌体分化的关键驱动力,几乎所有的 NCR 均来源于反向重复区缺失类群 (inverted repeat-lacking clade, IRLC) 豆科植物。NCR 多肽定位于类菌体上,在结构上与植物防御素和蝎神经毒素等抗菌肽相似,一些阳离子 NCR 在体外显示出较强的抗菌活性,能够引发膜损伤和细胞死亡<sup>[25-26]</sup>。

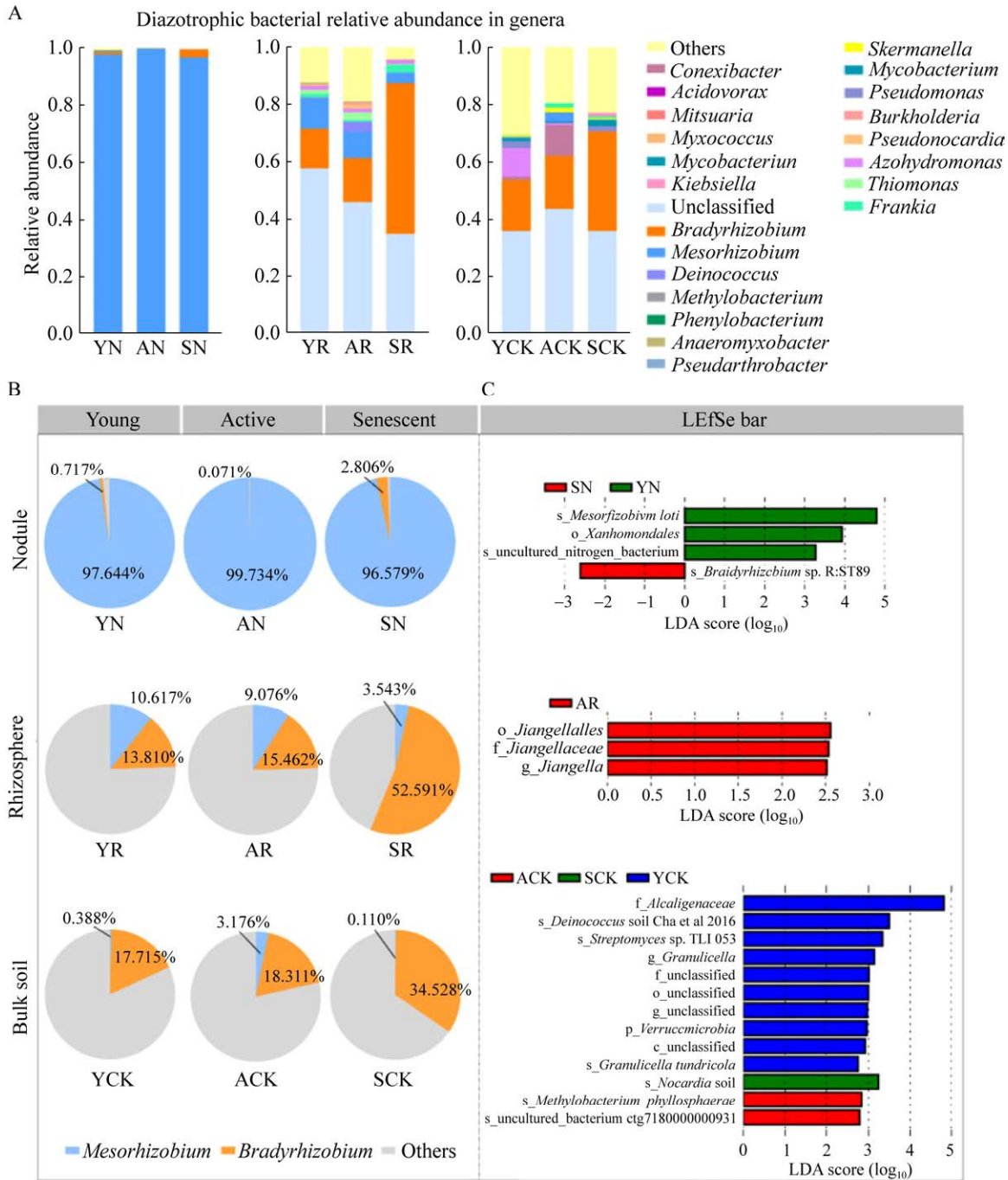


图 3 白刺花根瘤不同发育时期根内、根际土、对照土主要细菌组成的比较<sup>[16]</sup>

Figure 3 Comparison of main bacterial composition in nodules, rhizosphere soil, and bulk soil at different development stages of *Sophora davidii* (Franch.) Skeels nodules<sup>[16]</sup>. A: The distribution of communities at genus level. B: Proportion of relative abundances of *Mesorhizobium* and *Bradyrhizobium* in nine samples. C: Differentially abundant diazotroph taxa in nodules, rhizosphere soil, and bulk soil. Detected using linear discriminant analysis effect size analysis. AN, YN, and SN represent the primary, active, and decay stage, respectively; YR, AR, and SR represent the primary, active, and decay stage of rhizosphere soil, respectively; YCK, ACK, and SCK represent the primary, active, and decay stage of contrast soil.

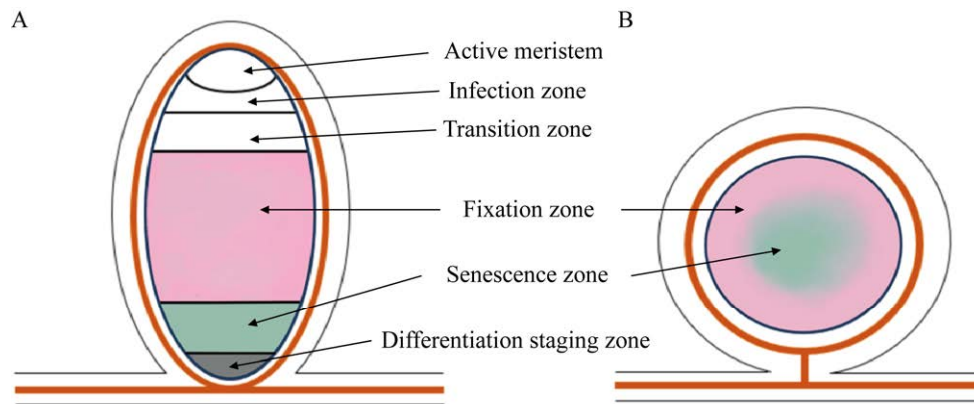


图 4 不定型根瘤(A)与定型根瘤(B)

Figure 4 Indeterminate nodule (A) and determinate nodule (B).

此外, NCR 基因失调也与根瘤异常发育相关<sup>[27]</sup>, 例如, *AsNCR083* 在根瘤菌中的组成型表达导致共生的紫云英植株根瘤发育异常, 类菌体分化受阻, 共生体早衰。

### 3 根瘤衰老的概述

根瘤衰老是指豆科植物与根瘤菌共生固氮系统中根瘤的退行性变化, 该过程涉及到一系列基因表达、信号传导通路和生理生化变化。与叶片等器官的衰老类似, 根瘤衰老的直接原因在于氧化还原平衡的紊乱, 引发氧化应激反应, 主要表现为细胞膜过氧化和活性氧(reactive oxygen species, ROS)的积累<sup>[28]</sup>, 这种氧化状态破坏了固氮酶体系的正常工作条件, 导致固氮酶活性下降甚至失活。根瘤菌和豆科植物的氧化还原及其调节系统与固氮根瘤衰老密切相关; 在根瘤菌与豆科植物中, 还原组分包括超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、谷胱甘肽合成酶(glutathione synthetase, GSS)、硫基氧还原蛋白(thioredoxin, Trx)、谷氧还蛋白(glutaredoxin, GRX)、抗坏血酸(ascorbic acid, AsA)等和与氧化组分 NADPH 氧化酶(respiratory burst oxidase

homologue, RBOH)、一氧化氮合成酶(nitric oxide synthase, NOS)、活性氮(reactive nitrogen species, RNS)和 ROS 等, 这些成分之间维持着微妙的平衡<sup>[11,29-35]</sup>。各种环境胁迫会加剧氧化组分的积累, 加速氧化还原平衡状态的破坏, 从而加速根瘤衰老的发生; 面对各种胁迫, 植物或者根瘤菌也会激活一系列基因以对抗被动的衰老过程, 但这场“博弈”最终会以加速氧化的一方获胜而导致衰老结束<sup>[4-5,11,32,35]</sup>。

根瘤衰老分为程序性衰老和环境诱导的衰老两大类; 程序性衰老是一种自然发育进程, 由于根瘤的寿命较豆科植物短, 通常在种子成熟前便发生根瘤衰老, 与种子发育后期需要大量蛋白质积累的需求相矛盾<sup>[8]</sup>。因此, 在农业生产中, 通常在豆荚灌浆期间施用氮肥, 以提高大豆产量和种子蛋白质含量<sup>[36]</sup>。环境诱导的衰老则是指由于环境压力或相关因素(如弱光<sup>[37-38]</sup>、盐碱<sup>[39]</sup>、高温<sup>[40]</sup>、干旱<sup>[41]</sup>、高氮<sup>[42]</sup>和病原体攻击<sup>[43]</sup>)导致根瘤衰老过早激活, 进而降低共生固氮效率。这可能是由于根瘤中的固氮酶体系的最适工作条件(适宜温度、微氧、低氮和充分的能量供应)被破坏, 固氮酶活力的抑制或丧失会快速激活根瘤衰老程序<sup>[35,44]</sup>。尽管“植物免疫与

生长理论”和“碳氮平衡学说”等理论可以部分解释这一现象，但其中深层机制尚不明确，特别是关于融合植物和环境胁迫这 2 个因素对机制的影响还鲜有报道。

## 4 根瘤衰老的形态变化、生理生化及分子机制

### 4.1 形态变化

无论哪种类型根瘤，其衰老时具有相似的颜色变化，根瘤由粉红色变为绿色、棕色和黑色，这是根瘤衰老的典型指标之一；根瘤衰老还伴随着细胞液泡破裂，酸度改变，共生体膜的完整性丧失，固氮细菌被水解消失，内含物(核酸和蛋白质)被降解和吸收<sup>[45]</sup>。光镜下观察成熟根瘤纵向切片，发现衰老根瘤切片呈白色、棕色或绿色(图 2A)；用甲苯胺蓝对根瘤切片进行染色，明显观察到衰老根瘤中类菌体的数量减少而增加了溶解空泡的大小<sup>[8,29]</sup>。在电镜下可以明显观察到类菌体形态发生不规则变化，内部组织溶解形成空腔，PHB 在类菌体中过度积累<sup>[5,29]</sup>。在荧光显微镜下，通过 SYTO9 绿色荧光核酸染料(green fluorescent nucleic acid stain)染色<sup>[5]</sup>和绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)染色标记活细胞，或通过 DNA 断裂的原位末端标记法(*terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL*)<sup>[8]</sup>和碘化丙啶(propidium iodide, PI)染色法标记死细胞，以荧光强度反映衰老根瘤中根瘤菌的死亡。虽然以上方法揭示了根瘤衰老的形态变化信息，但它在探索根瘤衰老过程中时空变化方面存在不足。近年来，应用激光捕获显微切割技术和单细胞核转录组测序技术是破解植物单细胞表达异质性的有效手段，通过从组织中分离特定细胞与构建单细胞核和空间转录组图谱可以直接揭示根瘤不同发育时期特异基因表达

与细胞形态，例如 Liu 等<sup>[46]</sup>通过单细胞核转录组测序建立了大豆根瘤细胞图谱，发现同一根瘤不同细胞的基因表达具有异质性，未感染的细胞在根瘤发育过程中分化为功能不同的亚型；Serova 等<sup>[47]</sup>通过激光显微切割直接获得了 4 个根瘤感染细胞<sup>[46-47]</sup>(图 5)。这些方法在探索根瘤衰老过程中形态变化显示出了有效性。

### 4.2 生理生化机制

根瘤内一系列氧化还原组分的含量与活性直接影响根瘤的老化进程。不论是哪种类型的根瘤衰老，其生物化学机制都呈现相似的特征，主要表现为抗氧化组分含量或活性降低，氧化与分解组分含量或活性增加<sup>[11,29-35,48]</sup>。

在衰老根瘤中，非酶促抗氧化组分含量降低。例如，可溶性蛋白是植物体内重要的渗透调节物质，具有维持细胞渗透势、增强细胞的保水能力、保护细胞的生命物质和生物膜的作用，有助于植物体抵御氧化胁迫和减轻逆境伤害等<sup>[48]</sup>；谷胱甘肽(glutathione, GSH)是一种含有巯基的小分子肽类物质，具有重要的抗氧化作用和解毒作用<sup>[34-35]</sup>；AsA 作为一种有效的抗氧化剂，能够直接清除活性氧自由基，还可作为酶的辅助因子，参与如脱落酸、乙烯等多种植物激素合成的酶促反应，并且 AsA 代谢相关酶参与生物胁迫与非生物胁迫应答<sup>[30-32]</sup>；豆血红蛋白(leghemoglobin, Lb)不仅向根瘤中的根瘤菌输送氧气，满足固氮过程中能量的供应<sup>[49]</sup>，还通过其氧合能力维持根瘤内部的低氧环境，确保高固氮酶活性，避免过度积累的 RNS 和 ROS<sup>[33]</sup>。在衰老的根瘤中，酶促抗氧化类物质的活性降低，如 SOD、CAT、GRX、Trx 等<sup>[29,34]</sup>。同时，表征细胞氧化损伤与水解的组分含量增加，例如丙二醛(malondialdehyde, MDA)、半胱氨酸蛋白酶、紫色磷酸酶(purple acid phosphatase, PAP)、CLE (CLAVATA3/embryo surrounding region-related)肽等<sup>[48,50-52]</sup>。



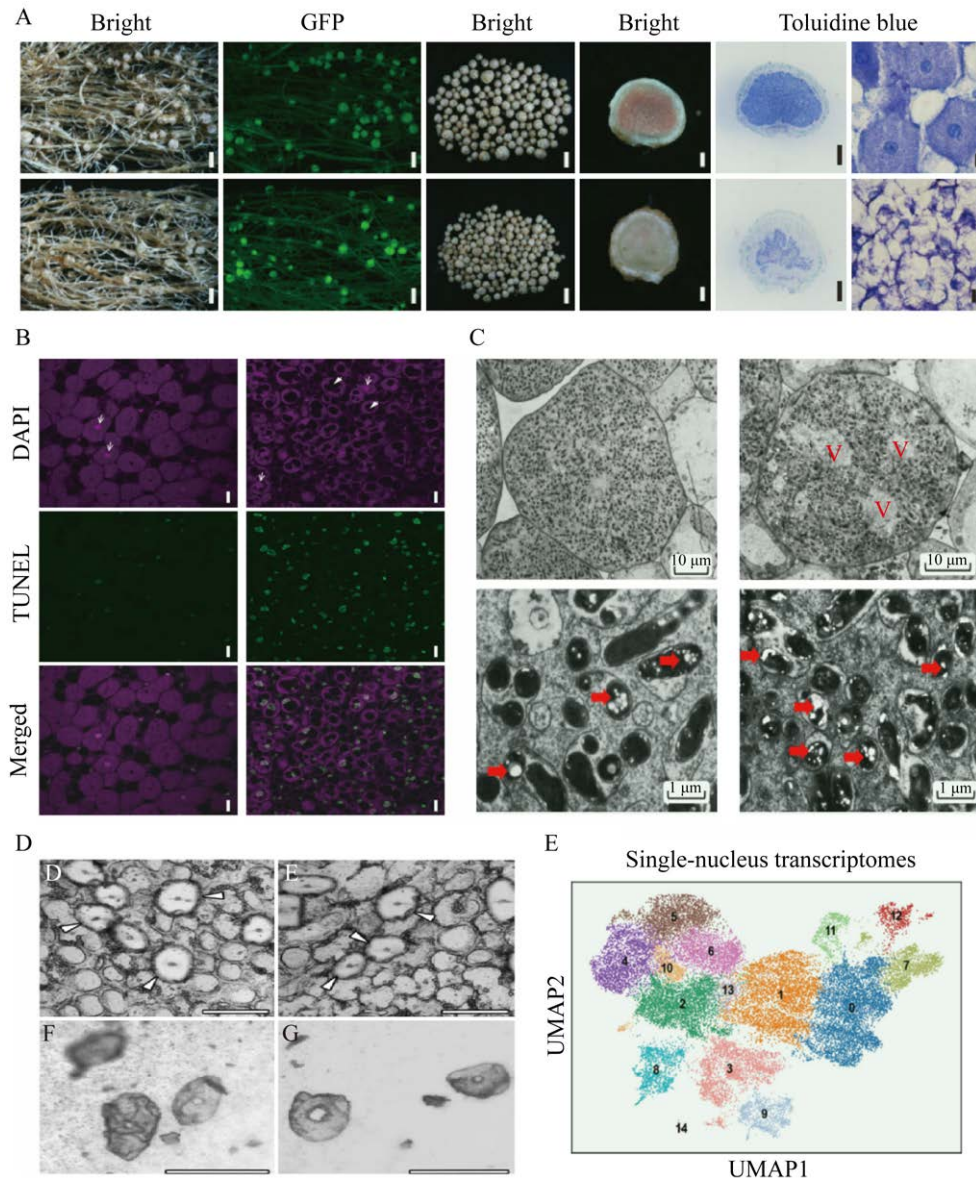


图 5 不同方式表征根瘤衰老<sup>[5,8,32-33]</sup>

Figure 5 Different ways to characterize root nodule senescence<sup>[5,8,32-33]</sup>. A: *In situ* observation and slice observation of nitrogen fixing nodules (upper) and senescent nodules (lower). B: Apoptosis analysis in fixing nodules (left) and senescent nodules (right) using a TUNEL assay. The upper panel (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) illustrates DAPI-stained nuclei and rhizobia. The middle panel (TUNEL) represents double-strand DNA breaks labeled using the TUNEL assay. The lower panel (Merged) represents merged images of the DAPI and TUNEL signals. Nuclei and vacuoles are indicated by white arrows and arrowheads, respectively. C: Transmission electron micrographs of nitrogen fixing nodules (left) and senescent nodules (right). V is lytic vacuolar compartments. PHB is indicated by red arrow. D: Laser capture (upper) microdissection (lower) of the infected cells of 4 weeks after inoculation (WAI) nodules of pea plants cv. Sparkle. E: Uniform manifold approximation and projection (UMAP) map of single cell nucleus expression distribution. The different colors represent different cell types with different transcription levels, indicating that the gene expression between different cells in the same nodule is heterogeneous, and different cell types may have different effects on the aging and function of the nodule.

此外，地下部和地上部中能源物质和固氮产物的过度积累也标志着根瘤的老化，例如可溶性糖、PHB，以及定型根瘤与不定型根瘤分别将类菌体产生的  $\text{NH}_4^+$  转化为酰胺与胺类物质<sup>[53-54]</sup>。这可能是由于衰老根瘤中碳氮代谢失衡，导致碳源物质无法及时消耗，从而在根瘤中积累；相比之下，主要固氮产物通过根瘤的维管系统运输到茎、叶中被吸收利用，豆科植物的地上部在固氮后期表现出酰胺和胺类总含量及总积累量最高<sup>[55-56]</sup>。

### 4.3 分子机制

豆科根瘤衰老受到一系列基因调控，已有一系列转录因子和基因表达量的变化被用作根瘤老化的分子指标(表 1)。

在大豆中，GmNAC039 和 GmNAC018 是介导大豆根瘤衰老的关键转录因子，它们直接结合并激活 4 种半胱氨酸蛋白酶 *GmCYP* 基因的表达，这些基因的过表达均会导致根瘤早衰<sup>[8]</sup>。半胱氨酸蛋白酶在豆科植物根瘤衰老中普遍发挥着关键作用，例如，在紫云英中，沉默编码根瘤特异性半胱氨酸蛋白酶 *Asnodf32* 基因的表达可以延缓根瘤的衰老，延长根瘤的寿命<sup>[57]</sup>。

bHLH (basic helix-loop-helix)类转录因子作为植物中第二大类转录因子，在调控植物对光的响应、抗非生物胁迫和次生代谢合成中发挥了关键作用。近年来，研究表明 bHLH 转录因子也参与了豆科植物结瘤与固氮过程的调控。苜蓿和大豆中均存在 bHLH 类转录因子调控根瘤菌与宿主植物间的养分交换的情况，影响根瘤菌的共生，进而影响根瘤发育与活性<sup>[58-59]</sup>。Breakspear 等<sup>[60]</sup>发现，在苜蓿中处理根瘤菌及结瘤因子 3 d 后，一些 bHLH 类转录因子基因表达发生明显变化，证实了 bHLH 响应根瘤菌和结瘤因子并参与根瘤菌侵染和根瘤形成过程。此外，一些 bHLH 转录因子在豆科植物铁稳态调控网络上游发挥重要作用，如在缺铁条件下大豆中 GmbHLH47<sup>[61]</sup>、GmbHLH57 和 GmbHLH300<sup>[62]</sup>会在根或根瘤中表达。与 NAC 转录因子类似，在紫花苜蓿中，MtbHLH2 可通过抑制木瓜蛋白酶样半胱氨酸蛋白酶基因 *MtCP77* 的表达，减缓植物细胞程序性死亡和 ROS 的积累来负向调控根瘤的衰老<sup>[63]</sup>。

$\text{C}_2\text{H}_2$  转录因子是一种锌指蛋白类转录因子，含有乙烯响应元件结合因子 EAR 基序的

表 1 根瘤衰老生理生化及分子变化

Table 1 Physiological and biochemical changes in root nodule senescence

Leguminous plant	Classification	Components and related coding genes	References
<i>Glycine max</i>	Energy substances	Starch, soluble sugars, soluble proteins,	[5,11,29]
<i>Pisum sativum</i>		PHB	
<i>Glycine max</i>	Nitrogen fixing products	Acyl urea, Amide	[11,53-54]
<i>Pisum sativum</i>		SOD, CAT, GPx, Grxs, Trx	
<i>Glycine max</i>	Enzymatic oxidation-reduction components	GSH, AsA, MDA, RNS, ROS	[11,44]
<i>Glycine max</i>			
<i>Glycine max</i>	Nitrogen fixation function	Nitrogenase, Lb	[5,8,11-12,24]
<i>Robinia pseudoacacia</i>			
<i>Medicago truncatula</i>			
<i>Medicago sativa</i>	Cellular phagocytosis and decomposition	Cysteine protease, PAP, chitinase, peptidase	[11,50-52,57]
<i>Glycine max</i>			
<i>Medicago truncatula</i>			
<i>Astragalus sinicus</i>			

C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 型锌指蛋白在耐盐、抗寒和抗旱等非生物胁迫相关基因的表达中都发挥了重要作用<sup>[64]</sup>。在豆科植物中, C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 转录因子对宿主与根瘤菌共生关系的建立、根瘤正常发育和共生固氮具有重要功能。在紫花苜蓿中, 根瘤特异性 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 转录因子 MtRSD 可通过结合到囊泡相关膜蛋白 VAMP721a 的启动子区域调控其表达, 进而抑制 VAMP721a 的转录和结瘤细胞中囊泡的运输, 最终抑制共生体的发育与类菌体分化, RSD 突变体的根瘤表现出早期的根瘤衰老与结瘤数明显增加<sup>[65-66]</sup>。

结瘤起始因子 NIN (nodule inception) 是豆科植物中非常重要的结瘤起始转录因子, NLP (NIN-like protein) 是 NIN 的同源蛋白, 这 2 类蛋白不仅影响结瘤调控共生基因的表达, 控制结瘤信号通路中根瘤产生及根瘤数量<sup>[67-68]</sup>, 还能够诱导 *Lbs* 基因表达, 控制根瘤内豆血红蛋白的含量<sup>[69-70]</sup>。NLP 主要调控氮营养条件下根瘤的生长发育过程, 例如, 在大豆中, 不同硝酸盐浓度处理会导致 *GmNLP* 过表达毛状根和野生型毛状根产生根瘤数量、根瘤干重和结瘤表型差异<sup>[71]</sup>。

此外, 参与细胞降解的基因、防御反应基因和胁迫制裁等相关的基因也与根瘤衰老有关。例如, 在截形苜蓿中编码肽酶(peptidase)、几丁质酶(chitinase)、PAP、E3 泛素连接酶和结瘤受体激酶的基因<sup>[50-52]</sup>与紫云英中编码宿主特异性共生多肽 NCR 的基因等<sup>[27]</sup>。

## 5 影响根瘤衰老因素

全球气候变暖导致极端逆境如高温、强光、渍水、干旱和病虫害频繁发生, 这些极端逆境对全球作物产量造成了负面影响, 是作物生产中的主要环境胁迫因素<sup>[72-74]</sup>。各种胁迫包括干旱、盐碱和低温等都会引发细胞内渗透压和氧

化应激, 而脯氨酸作为一种相容渗透剂、分子伴侣和 ROS (活性氧类) 清除剂, 在非生物胁迫适应中发挥作用<sup>[75]</sup>。

### 5.1 生物因素

#### 5.1.1 病虫害

多种病虫害的侵染会诱导根瘤快速衰老。例如, 斑驳病毒<sup>[76]</sup>、黄曲霉、假盘孢菌<sup>[43]</sup>、镰孢菌<sup>[77]</sup>和线虫<sup>[78]</sup>均会显著降低根瘤的数量、质量、大小、固氮酶活性和豆血红蛋白含量, 甚至导致根瘤细胞变形坏死, 这可能是因为病虫害分泌的某些代谢产物能够干扰植物与根瘤菌的共生关系, 增加植株体内 ROS 含量, 抑制植物正常生理代谢, 从而影响植株根系生长和根瘤的固氮功能。目前实验室条件下使用芽孢杆菌、假单胞菌<sup>[79]</sup>、伯克霍尔德氏菌、丛枝菌根真菌、木霉菌、链霉菌等生物防治剂对豆科作物的根腐病、菌核病、炭腐病、胞囊线虫等病害有良好的防治效果, 在增加根瘤数量和固氮酶活性的同时, 具有显著的促进生长、增加产量、控制病害的效果, 但在田间的防治效果尚不理想<sup>[80]</sup>。

#### 5.1.2 根瘤内生菌

根瘤内生菌也会影响根瘤衰老。豆科植物根瘤中存在 2 类根瘤菌: 低效根瘤菌和高效根瘤菌; 低效根瘤菌消耗植物有机物, 固氮效率低甚至不固氮; 高效根瘤菌消耗有机物, 固氮效率高<sup>[81]</sup>。无论接种哪种根瘤菌, 都会导致宿主植物诱导防御相关基因表达, 使根瘤菌必须抵抗宿主的免疫防御; 在成功的共生相互作用中, 高效根瘤菌能够抑制宿主的防御反应<sup>[50]</sup>。根瘤菌的种类和固氮效率会影响植物生长、营养状况、宿主转录变化以及微生物群落组成, 其中低效根瘤菌会导致植物相关基因的转录水平增加, 而高效根瘤菌接种则减少相关基因的转录水平<sup>[50,82-83]</sup>。根瘤内存在低效根瘤菌具有独特意义, 如增加生物多样性以增强环境抵抗

力。此外，根瘤内还存在着大量非根瘤菌，它们对根瘤衰老的影响尚未得到充分研究，它们通过多种方式对根瘤的发育产生间接影响，包括激素分泌、抗菌物质释放以及影响共生性能。无论哪种根瘤菌接种，均会导致宿主植物与防御相关的基因被瞬时诱导，因此根瘤菌在侵染植物时需抵抗宿主的免疫防御，主要表现为宿主吞噬细胞利用氧化剂对其产生细胞毒性作用<sup>[84]</sup>。然而，在成功、相容的共生相互作用中，高效率的根瘤菌能够克服宿主的防御反应，表现为关闭防御反应；Lagunas 等<sup>[50]</sup>发现具有不同结瘤和固氮效率的根瘤菌菌株会对植物生长、营养、宿主转录变化和微生物组补充产生不同影响；其中，低效率根瘤菌会引起植物半胱氨酸蛋白酶、几丁质酶、紫色磷酸酶等与根瘤衰老、胁迫和防御相关基因的转录水平提高，而高效率根瘤菌的接种则会降低这些基因的转录水平。当然，根瘤内低效率根瘤菌的存在有着独特的意义，例如增加微生物群落多样性，以提高对环境的抵抗力<sup>[85]</sup>。此外，根瘤内还存在着大量非根瘤菌，它们对根瘤衰老的影响目前尚未深入研究，它们可能通过产生长激素、抗菌物质、影响宿主与根瘤菌共生性能等多种方式<sup>[86]</sup>间接影响根瘤的发育过程。

### 5.1.3 植物激素

根瘤菌合成的激素与植物内源激素共同调节根瘤的形成与发育过程；正向调控根瘤发育与固氮的激素有生长素(indole-3-acetic acid, IAA)、赤霉素(gibberellin, GA)、油菜素甾醇(brassinosteroids, BRs)等，它们在器官发育和侧根形成中发挥重要作用<sup>[87-93]</sup>。对于豆科植物来说，IAA 的极性运输至根瘤原基和维管束交界区域是根瘤形成与后期膨大的先决条件，这依赖于 *PIN1* 基因编码蛋白的极性运输与侧向化分布<sup>[87]</sup>。GA 通过对信号通路的中枢负调节因

子赤霉素不敏感蛋白 DELLA 水平的调控，不仅影响共生信号通路中核心钙振荡信号和钙调蛋白激酶 CCaMK-CYCLOPS (CCaMK-IPD3)复合物的形成，还可以与结瘤信号通路蛋白 NSP2-NSP1 相互作用，进而调控下游共生基因的表达，最终影响根瘤的形成从而影响固氮效率<sup>[88-89]</sup>。值得注意的是，DELLA 蛋白被认为是激素串扰的关键中枢调节剂<sup>[90-91]</sup>，可以整合多种激素信号以调节根瘤共生过程(图 6)。BRs 通过与受体激酶 BRI1 结合触发磷酸化反应，从而调节植物的生长发育，且其外源施用方式会导致不同的根瘤表现型，例如，花生叶面施用 BRs 能够增加植株的根瘤数、根瘤质量和固氮酶活性<sup>[92]</sup>，但在大豆根部施用 BRs 却抑制了结瘤和固氮能力<sup>[93]</sup>。

负向调控根瘤发育与固氮、促进根瘤衰老的激素包括乙烯(ethylene, ETH)、茉莉酸(jasmonic acid, JA)、水杨酸(salicylic acid, SA)和脱落酸(abscisic acid, ABA)等。ETH 对侵染线的形成、根瘤的形态、位置和数量均具有调控作用，高浓度 ETH 与内质网膜上的乙烯受体蛋白 ETR1 结合，导致受体失活和相应蛋白激酶 CTR1 失活，从而促使传递蛋白 EIN2 去磷酸化而激活，进而启动核内转录因子 EIN3 和 ERFs 的表达，最终抑制结瘤和固氮的过程，并引发植物免疫响应<sup>[1,91,94]</sup>。JA 可通过调控对结瘤 Nod 因子的响应影响根瘤的形成<sup>[95]</sup>，在大豆中，JA 的合成与响应还受到结瘤自动调控途径(auto-regulation of nodulation, AON)关键调控因子 NARK 的负调控<sup>[96]</sup>。近期研究发现，在截形苜蓿中，JA 通过调控转录因子 MtMYC2，不仅可以激活 *MtIPD3*、*MtNIN*、*MtDNF1* 基因表达促进共生建立，同时在共生体形成阶段激活 *MtDNF2*、*MtNAD1*、*MtsymCRK* 基因表达来抑制宿主防御以确保高效的共生固氮<sup>[97-98]</sup>。SA 参与植物对病

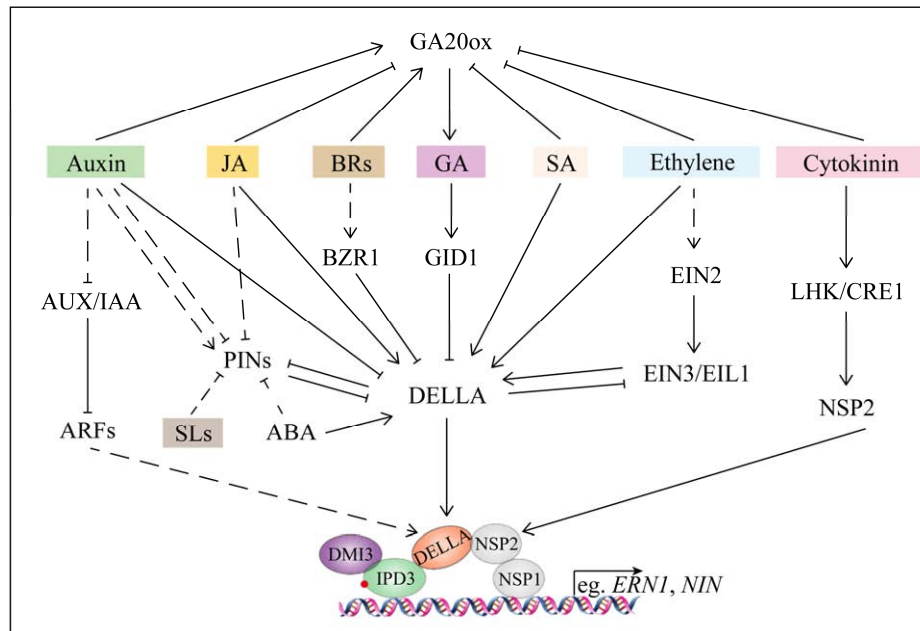


图 6 DELLA 蛋白在植物激素调节根瘤共生过程中作为整合节点<sup>[91]</sup>

Figure 6 DELLA protein is a node of integration in the process of phytohormone regulation of rhizome symbiosis<sup>[91]</sup>.

原菌的防御, 因此高内源水平的 SA 会抑制根瘤菌的侵染与生长, 进而抑制结瘤形成, 尤其在不定型根瘤中这种抑制效果更为显著<sup>[99-101]</sup>; ABA 对根瘤发生与功能的调控取决于环境条件。正常情况下, ABA 通过抑制早期结瘤基因 *ENOD11*、*NIN* 和 *RIP1* 的表达来抑制根瘤形成<sup>[91,102]</sup>, 但在盐胁迫条件下, 脱落酸预处理却提高了紫花苜蓿的固氮能力<sup>[103]</sup>。

## 5.2 非生物因素

多种非生物逆境, 如寒冷、干旱、高温和土壤酸碱度异常等, 都会损害豆科植物和根瘤菌的相互作用, 进而影响菌植互作、根瘤发育和共生固氮的一系列过程<sup>[104]</sup>, 并对植物基因表达、蛋白质和代谢物的生物合成, 以及激素信号传导等方面带来改变。

### 5.2.1 氮含量

高氮和低氮对植物根瘤产生不同影响。适量氮的施用不仅能促进植物生长, 还可增加结

瘤数量和根瘤质量, 因此豆科植物在适宜生长阶段需要适量氮肥来提高根瘤固氮能力。然而, 氮肥过量会导致“氮阻遏”现象发生, 抑制根瘤形成, 同时通过豆血红蛋白抑制固氮酶活性, 其抑制程度和时间与施肥量呈正相关, 氮肥用量越大, 抑制越重, 抑制时间越长<sup>[105]</sup>。与铵盐相比, 硝酸盐在高氮条件下抑制根瘤形成和促进根瘤衰老中起着关键作用<sup>[67,106]</sup>。高硝酸盐会抑制结瘤起始因子 *NIN* 的表达, 促使 *NIN* 同源蛋白 *NLP* 通过核-质穿梭进入细胞核与 *NIN* 形成复合体, 与 *NIN* 竞争结合位点, 从而抑制 *NIN* 对下游 *CRE1*、*NF-YA1* 等基因的激活, 最终抑制根瘤形成<sup>[68]</sup>。在大豆中, *GmNLP* 基因参与了硝酸盐响应下的结瘤的形成和调控, *GmNLP* 基因过表达和敲除对不同硝酸盐浓度呈现不同反应, 导致不同的根瘤表型<sup>[71]</sup>。此外, *AON* 相关基因整合结瘤信号与土壤硝酸盐信号, 以平衡根瘤发育与植物资源分配, 如高氮

环境会激活 AON 系统，负向调控结瘤固氮<sup>[67]</sup>。

关于高氮抑制根瘤固氮的原因，有多种假说，其中亚硝酸盐毒性和碳饥饿 2 种假说较广为人知，但仍存在争议。亚硝酸盐毒性假说指出，硝酸还原酶将硝酸盐还原为亚硝酸盐，亚硝酸盐进一步代谢产生一氧化氮(nitric oxide, NO)，这些化合物对细胞产生毒性；NO 可以通过上调衰老信号通路上游相关基因的表达，同时通过抑制谷氨酰胺合成酶和豆血红蛋白等关键结瘤蛋白的活性来促进根瘤衰老<sup>[107-108]</sup>。碳饥饿假说认为，高氮导致根瘤中碳分配减少，导致碳供应不足，从而降低根瘤固氮活性<sup>[109-110]</sup>。然而，对于这些假说的理论证据尚不足够充分，其具体机理还需要进一步研究。

### 5.2.2 盐度

高盐胁迫是影响植物生长和作物产量的重要的环境制约因素之一，其对植物生长发育和豆科植物结瘤固氮过程具有显著影响。在根瘤形成初期，植物对盐胁迫尤其敏感，高盐环境会抑制细菌定殖、根毛变形、根毛卷曲和侵染线形成等过程<sup>[111-112]</sup>。Abdel-Wahab 等与李梅等的研究表明，盐胁迫会显著减少根瘤数量、大小和固氮区细胞数量，抑制根瘤固氮酶活性，降低豆血红蛋白含量<sup>[113-114]</sup>。这些作用可能是由于盐分引起的离子毒害、渗透胁迫和氧化胁迫<sup>[114]</sup>，降低了土壤养分有效性，破坏了氮循环相关的土壤细菌群落的稳定性<sup>[115]</sup>，进而影响根瘤内的共生固氮过程。

### 5.2.3 金属元素

金属元素在根瘤细胞中发挥重要作用，参与豆血红蛋白合成、维持固氮酶活性和信号传导。例如，铁是豆血红蛋白的重要组成部分，根瘤细胞内高浓度的豆血红蛋白创造了一个相对低氧的环境，维持根瘤内部 ROS 的动态平衡，对固氮酶起到保护作用，同时又能够传递低浓

度、高通量的氧气到线粒体及类菌体，以维持活跃的细胞呼吸<sup>[116]</sup>。其次，生物固氮的执行人固氮酶由铁蛋白和钼铁蛋白组成，铁蛋白与 Mg-ATP 结合以后，被黄素氧还蛋白或铁氧还蛋白还原，并与钼铁蛋白暂时结合以传递电子；铁蛋白反复氧化和还原， $e^-$  和  $H^+$  依次通过铁蛋白和钼铁蛋白，最终传递给  $N_2$  和乙炔，将它们分别还原成  $NH_3$  和乙烯<sup>[117]</sup>。因此铁、钼与镁元素的缺乏会导致豆血红蛋白失活，固氮酶活性的降低，根瘤早衰。近期研究还发现，植物微量营养素锌还可作为细胞内的第二信使，细胞内低浓度锌控制一个亮氨酸拉链转录因子 FUN 由不活跃的丝状结构向活性凝聚状态转换，从而诱导根瘤衰老相关基因 *NAC094*、*HO1* 和 *NRT2.1* 的表达，以响应环境中的高硝酸盐，从而将环境变化与转录因子控制根瘤代谢活动联系起来<sup>[118]</sup>。

### 5.2.4 干旱

干旱是多维胁迫之一，能够引起植物从表型、生理、生化和分子水平的一系列变化，干旱胁迫下，植物呈现复杂的代谢动态响应，包括激素代谢、碳氮代谢、可溶性糖积累等多种途径的调控<sup>[119-121]</sup>。对于蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)来说，脯氨酸代谢相关基因 *MtP5CS*、自噬相关基因 *MtATG* 和胁迫相关蛋白基因 *MtSAP* 的改变可能导致氧化胁迫的 NO 等物质的积累与核酸组织的降解，并抑制铁蛋白的合成，进而加速根瘤的衰老<sup>[41,122-124]</sup>。

### 5.2.5 pH

豆科植物偏好生长在弱酸性土壤中，合适的弱酸处理有助于根瘤菌发挥自身优势，而过酸或过碱的环境对根瘤菌的生存不利并进而导致侵染率的下降<sup>[4,125-126]</sup>。研究显示，在强酸性环境下，紫花苜蓿根系质膜  $H^+$ -ATPase 活性降低，根系质膜透性增强，导致根际细胞损伤，加速了根瘤早衰<sup>[127]</sup>。高 pH 主要通过抑制钼、铁、

锌、锰等微量元素的有效性<sup>[126]</sup>、抑制叶片光合效率<sup>[128]</sup>和渗透损伤间接促进根瘤的衰老。

### 5.2.6 温度

有研究发现短期低温处理对大豆生长具有双重作用,可以抑制根瘤形成但提高固氮能力<sup>[2]</sup>。大豆苗期经历短期低温后生物量积累抑制作用可恢复,低温抑制了大豆根瘤的形成和生长,却显著增加了处理 49 d 后大豆共生固氮量,这可能是由于短暂低温锻炼增强了细胞膜稳定性和抗氧化能力,提高了作物耐冷性<sup>[72]</sup>。

高温不仅能影响根瘤菌的侵染,还会抑制固氮酶活性,加速根瘤衰老<sup>[40]</sup>。通过基因工程手段过表达编码脯氨酸合成途径的限速酶基因 *P5CS*, 可以提高脯氨酸的积累量,从而增强植株对高温胁迫的抵抗能力;高温条件下, *P5CS* 基因过表达植株根瘤数目、干鲜重、脯氨酸含量、全氮、豆血红蛋白含量及谷氨酰胺合成酶活性均显著高于野生型植株<sup>[129]</sup>。

### 5.2.7 光照

豆科植物光合产物的高低极大影响了植物的生产力,是固氮作用的限制因素。弱光环境较正常光照降低了光质和红光/远红光比率,导致光合效率降低,减少豆科植物-根瘤菌共生固氮体系的光合产物运向根瘤的能量供应,根瘤的碳供应不足,最终导致豆科植物的结瘤率和根瘤的固氮活性的降低<sup>[38]</sup>。除此以外,光信号可能与多种植物激素信号协同调控根瘤形成与供能<sup>[101,130-131]</sup>。

## 6 延迟根瘤衰老措施

目前延缓根瘤衰老的主要方法是利用基因编辑技术构建衰老相关基因敲除突变植株。例如,通过基因编辑技术敲除大豆根瘤衰老关键转录因子 GmNAC、半胱氨酸蛋白酶 *GmCYP* 基因,可以有效增加豆血红蛋白基因表达量,提高

固氮酶活性,从而延缓根瘤衰老过程<sup>[8]</sup>(图 7A)。

另外,通过适量施用铁肥<sup>[132]</sup>、钼肥<sup>[133]</sup>、镁肥<sup>[134]</sup>等营养元素也能提高固氮酶活性,延缓根瘤衰老的进程。例如,有特殊理化性质的新型纳米化肥——二硫化钼纳米粒子(MoS<sub>2</sub> NPs),过其优异的抗氧化酶活性与硫醇化合物结合,能保护根瘤免受 ROS 伤害,长期维持生物固氮(biological nitrogen fixation, BNF)功能,最终提高作物的营养和产量<sup>[133]</sup>(图 7B)。

针对中国土壤中无机氮含量过高抑制根瘤菌共生的问题,改进耕作方式对于提高作物产量至关重要。例如,适量施用氮肥配合套作可提高根瘤的抗氧化能力,通过豆类作物与其他作物套作,可以增强种间氮素竞争吸收和转移作用,缓解氮素对根瘤形成及固氮的抑制,同时增强根瘤抗氧化代谢能力,延缓根瘤衰老过程<sup>[11]</sup>(图 7C)。此外,选择对氮素不敏感的根瘤菌菌株进行接种,也是应对土壤中氮素过高的一种创新策略。

培育优质抗逆性作物品种是延缓环境胁迫下根瘤衰老的有效措施。然而,品种选育面临种质资源多样性不足、品种鉴定难度大、优异基因挖掘滞后以及品种特性易退化等一系列挑战<sup>[135]</sup>。

传统的基因编辑方法造价昂贵且容易导致其他基因丢失。普通化学肥料存在利用率低、肥效单一且可能破坏土壤结构等缺点,不符合绿色化学和可持续农业发展的要求。目前,研究关于利用微生物交换与补充来延缓根瘤衰老的工作尚不多见。植物微生物组内蕴藏着大量优良微生物资源,在植物生长与抵抗外界压力时,宿主植物通过大量遗传调控因子整合生物/非生物胁迫,利用物理屏障、控制营养分流以及产生抗菌分子来调控微生物的招募与定殖,维持微生物群落稳定并增强宿主植物的防御能力<sup>[136-138]</sup>(图 8)。

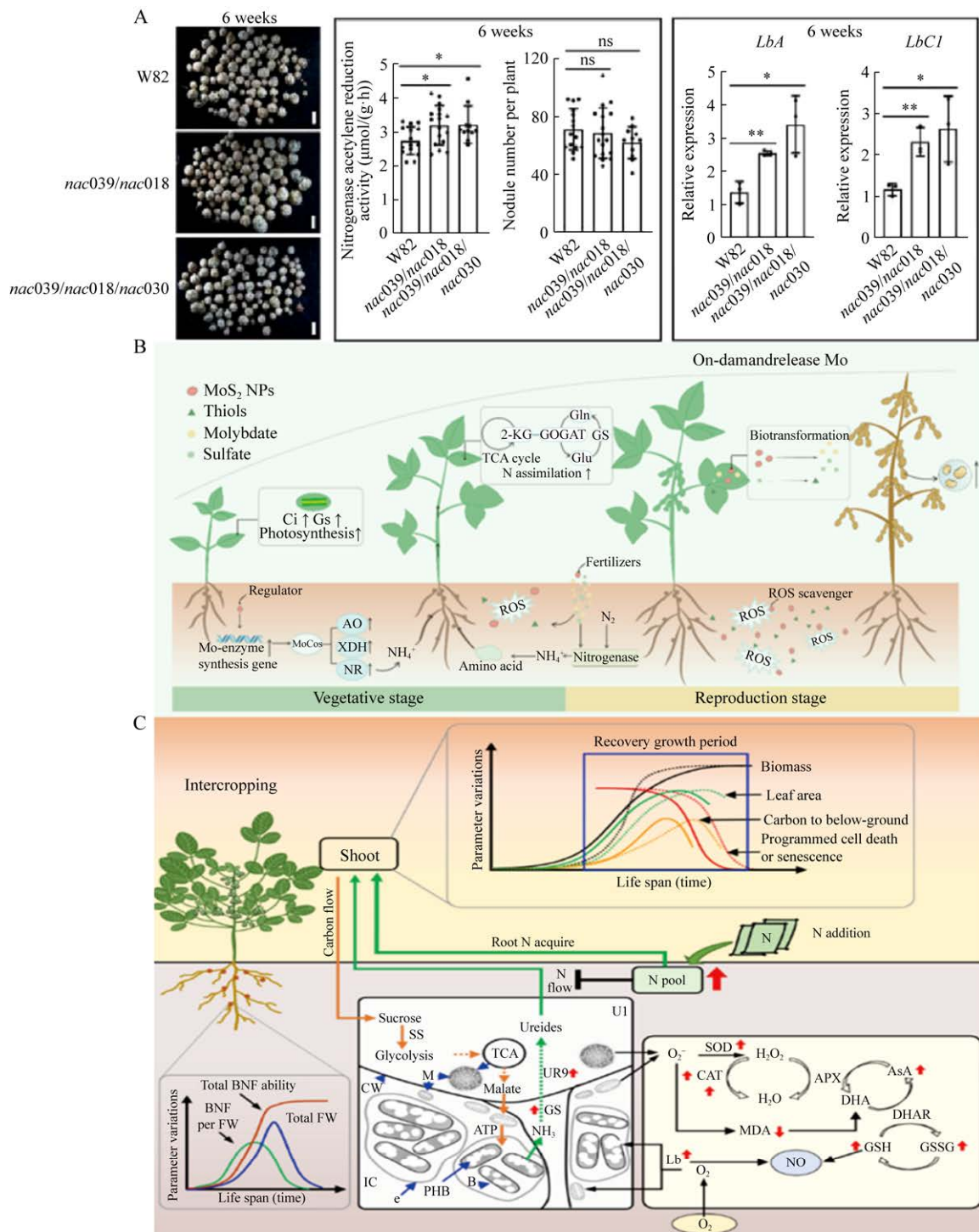


图 7 多种措施延缓大豆根瘤衰老和提高大豆产量<sup>[8,11,133]</sup>

Figure 7 Multiple measures were taken to delay the senescence of soybean nodule and increase the yield of soybean<sup>[8,11,133]</sup>. A: Knock out GmNAC018 and GmNAC039 increases nitrogenase activity and soybean hemoglobin gene expression in root nodules. B: MoS<sub>2</sub> NPs can release Mo in a responsive fashion to support BNF and capture the ROS to promote soybean C and N assimilation. C: Effects of cropping patterns and N rates on the nodule N fixation and antioxidant.



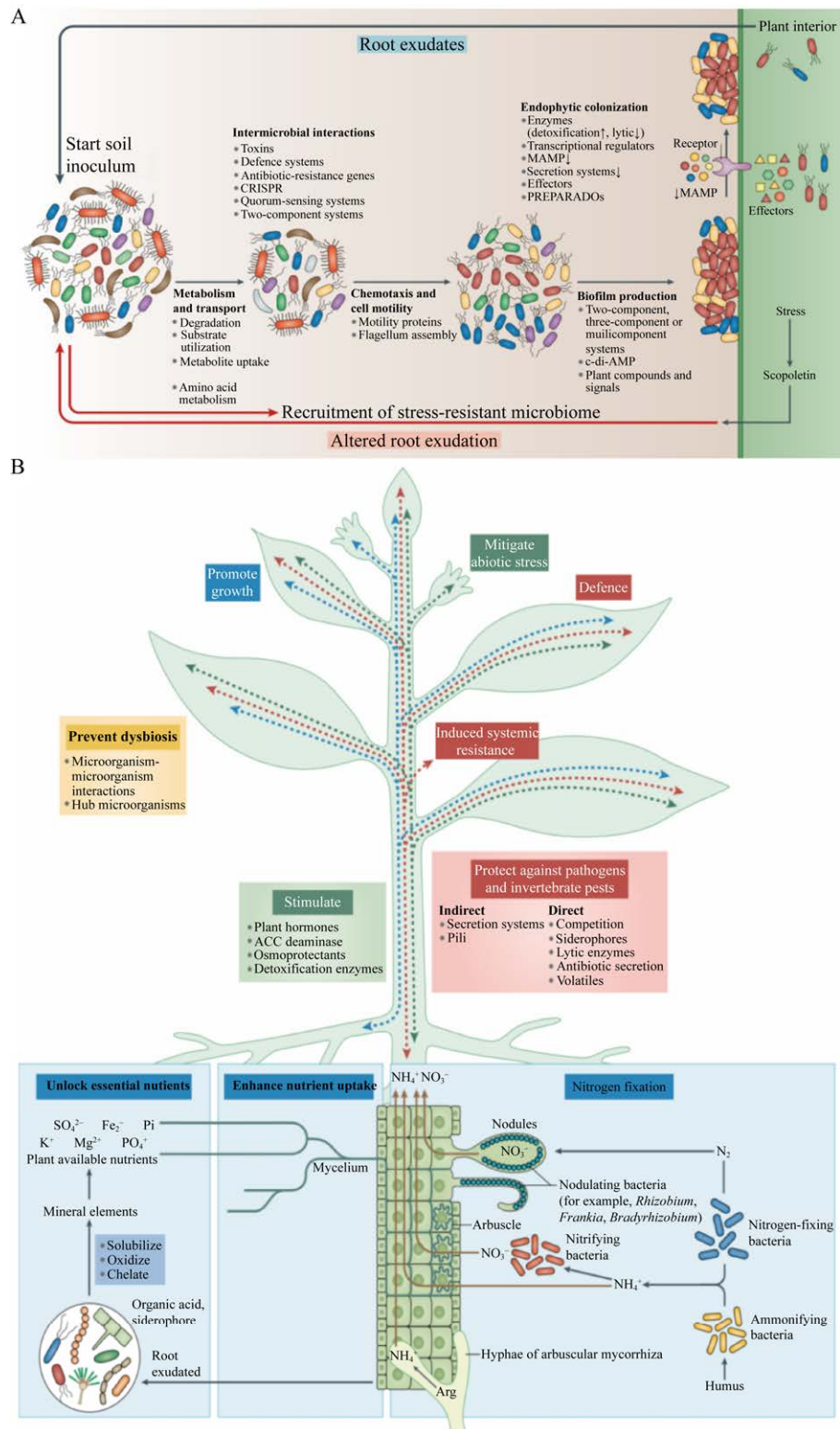


图 8 植物微生物组<sup>[138]</sup>

Figure 8 The plant microbiome<sup>[138]</sup>. A: Plant colonization and microbiome assembly. B: Beneficial effects of the plant-associated microbiome.

总体而言,微生物菌剂作为一种绿色肥料,在农业可持续发展中具有广阔前景。研究表明,在根瘤不同发育阶段,根瘤、根际土壤和非根际土壤中的固氮微生物群落的多样性存在明显变化,主要物种组成也不同<sup>[22]</sup>。可见根瘤不同发育阶段会引起关键菌群的差异,这是宿主植物调控的结果,它们对根瘤发育和功能也发挥着不同作用。基于肠道菌群移植<sup>[139]</sup>与微生物-土壤反馈<sup>[136]</sup>理论,利用根瘤不同发育阶段关键菌群进行移植,例如将有效期关键菌群组成的合成菌群移植到衰老期的根瘤中,从而延缓根瘤衰老的进程,延长生物固氮的时间,是可持续农业发展的新思路。

## 7 总结与展望

根瘤衰老是氧化还原、结瘤信号与抑制结瘤信号、生长类激素与衰老类激素、碳代谢与氮代谢等多场“博弈”的综合结果,无论是生物胁迫还是非生物胁迫均可能加速多个“天平”的倾斜,从而加速根瘤衰老进程。

豆科植物种类繁多,在食品安全、农业可持续发展方面具有重要意义。根瘤的生物固氮作用不仅可以增加作物产量,还有助于维持生态平衡和生物多样性。通过微生物交换与补充延缓共生根瘤的衰老,延长高效固氮周期,这是一项创新策略,有助于提高豆科植物种子的氮供应,同时提高种子品质和丰富遗传资源。此举不仅有助于增强粮食安全,减轻化学肥料对环境的负面影响,提高土壤氮利用效率和种植效益,还可缓解耕地紧张并降低进口成本。此外,这一策略也有助于提高植物适应性和抗逆能力,促进生态修复和土壤改良,同时维持土壤生物多样性与群落稳定。为了实现延缓根瘤衰老的目标,可以通过高通量测序分析不同发育阶段根瘤内微生物群落的差异,筛选出活

跃期根瘤中的高效固氮菌和植物促生菌,并通过培养法分离和筛选关键菌株。然而,在这一过程中存在诸多问题与挑战:(1) 根瘤核心微生物的筛选标准的设定,核心菌群大小范围的确定;(2) 难培养菌或生长期周期长的慢生菌的获取;(3) 在核心菌群组装时,菌株间的拮抗或抑制作用的解决;(4) 调节核心菌群中各菌株的比例以确保各菌株间养分摄取均衡,保证菌群的养分利用率与固氮效率的双提升;(5) 大田试验中,不同地区土壤理化性质不同,土著菌群影响广泛,如何保障应用菌剂的良好活性、侵染率以及性能稳定。

总之,本文总结了根瘤衰老的形态、生理生化及分子变化机制,探讨了多种因素对根瘤衰老的影响,并提出了一种新颖的策略,即移植活跃期根瘤核心微生物来延缓根瘤衰老,从而为促进豆科作物的碳氮协同增长和丰富大豆种质资源提供了新思路。

## 参考文献

- [1] 杨军,刘承武,李霞,田长富,谢芳,曹扬荣,王二涛. 豆科植物-微生物共生固氮研究进展[J]. 植物生理学报, 2023, 59(8): 1407-1435.  
YANG J, LIU CW, LI X, TIAN CF, XIE F, CAO YR, WANG ET. Advances in the legume-rhizobia symbiosis[J]. *Plant Physiology Journal*, 2023, 59(8): 1407-1435 (in Chinese).
- [2] 李天,余洁,乔云发,苗淑杰. 短期低温对大豆苗期生长和结瘤固氮的影响[J]. 中国农业气象, 2024, 45(2): 159-169.  
LI T, YU J, QIAO YF, MIAO SJ. Effect of short-term low temperature on seedling growth and nodule nitrogen fixation in soybean[J]. *Chinese Journal of Agrometeorology*, 2024, 45(2): 159-169 (in Chinese).
- [3] 陈桂玉,项东宇,魏国栋,刘慧,房玲燕,李林. 胶东半岛野生豆科植物资源调查与分析[J]. 中国野生植物资源, 2023, 42(6): 85-92.  
CHEN GY, XIANG DY, WEI GD, LIU H, FANG LY, LI L. Investigation and analysis on wild plant resource of *Leguminosae* in Jiaodong peninsula[J]. *Chinese Wild Plant Resources*, 2023, 42(6): 85-92 (in Chinese).

- [4] 吴月, 隋新华, 戴良香, 郑永美, 张智猛, 田云云, 于天一, 孙学武, 孙棋棋, 马登超, 吴正锋. 慢生根瘤菌及其与花生共生机制研究进展[J]. 中国农业科学, 2022, 55(8): 1518-1528.  
WU Y, SUI XH, DAI LX, ZHENG YM, ZHANG ZM, TIAN YY, YU TY, SUN XW, SUN QQ, MA DC, WU ZF. Research advances of bradyrhizobia and its symbiotic mechanisms with peanut[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2022, 55(8): 1518-1528 (in Chinese).
- [5] WANG X, QIU ZM, ZHU WJ, WANG N, BAI MY, KUANG HQ, CAI CL, ZHONG XB, KONG FJ, LÜ PT, GUAN YF. The NAC transcription factors SNAP1/2/3/4 are central regulators mediating high nitrogen responses in mature nodules of soybean[J]. Nature Communications, 2023, 14(1): 4711.
- [6] 张振鹏. 滨海耐盐豆科植物合萌根瘤菌多样性及演化历史研究[D]. 烟台: 中国科学院大学(中国科学院烟台海岸带研究所)博士学位论文, 2020.  
ZHANG ZP. Diversity and evolution history of rhizobia nodulated with coastal salt-tolerant plant *Aeschynomene indica*[D]. Yantai: Doctoral Dissertation of Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, 2020 (in Chinese).
- [7] 赵秀芬, 房增国. 大豆、花生固氮与施氮关系的研究进展[J]. 安徽农学通报, 2005(3):48-49.  
ZHAO XF, FANG GZ. Research progress on the relationship between nitrogen fixation and nitrogen application of soybean and peanut[J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2005(3):48-49 (in Chinese).
- [8] YU HX, XIAO AF, WU JS, LI HX, DUAN Y, CHEN QS, ZHU H, CAO YR. GmNAC039 and GmNAC018 activate the expression of cysteine protease genes to promote soybean nodule senescence[J]. The Plant Cell, 2023, 35(8): 2929-2951.
- [9] van de VELDE W, GUERRA JCP, de KEYSER A, de RYCKE R, ROMBAUTS S, MAUNOURY N, MERGAERT P, KONDOROSI E, HOLSTERS M, GOORMACHTIG S. Aging in legume symbiosis. A molecular view on nodule senescence in *Medicago truncatula*[J]. Plant Physiology, 2006, 141(2): 711-720.
- [10] FERGUSON BJ, INDRASUMUNAR A, HAYASHI S, LIN MH, LIN YH, REID DE, GRESSHOFF PM. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2010, 52(1): 61-76.
- [11] 陈平. 带状套作下大豆恢复性生长对根瘤碳供应与抗氧化代谢特性研究[D]. 雅安: 四川农业大学博士学位论文, 2023.  
CHEN P. Study on the effects of soybean root nodules carbon supply and antioxidant metabolism in relay strip intercropping[D]. Ya'an: Doctoral Dissertation of Sichuan Agricultural University, 2023 (in Chinese).
- [12] 霍海波. 刺槐对根瘤菌结瘤因子的响应及血红素降解因子 HmuS 在共生中的作用机制研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学博士学位论文, 2021.  
HUO HB. Responses of *Robinia pseudoacacia* to rhizobial *nod* factor and the mechanism of heme degrading enzyme HmuS in symbiosis[D]. Yangling: Doctoral Dissertation of Northwest A&F University, 2021 (in Chinese).
- [13] 杨光宇, 郑惠玉. 小粒大豆各发育阶段与主要农艺性状相关的初步研究[J]. 吉林农业科学, 1988(1): 35-40.  
YANG GY, ZHENG HY. A preliminary study on the correlation between various developmental stages and main agronomic traits of small grain soybean[J]. Journal of Northeast Agricultural Sciences, 1988(1): 35-40 (in Chinese).
- [14] BETHLENFALVAY GJ, PHILLIPS DA. Ontogenetic interactions between photosynthesis and symbiotic nitrogen fixation in legumes[J]. Plant Physiology, 1977, 60(3): 419-421.
- [15] Imsande J, Schmidt JM. Effect of N source during soybean pod filling on nitrogen and sulfur assimilation and remobilization[J]. Plant and Soil, 1998, 202(1): 41-47.
- [16] AI JM, YU TF, LIU XD, JIANG YY, HAO ZW, ZHAO XY, WANG ET, DENG ZS. Nodule-associated diazotrophic community succession is driven by developmental phases combined with microhabitat of *Sophora davidii*[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 1078208.
- [17] WANG M, GE AH, MA X, WANG X, XIE Q, WANG L, SONG X, JIANG M, YANG W, MURRAY JD, WANG Y, LIU H, CAO X, WANG E. Dynamic root microbiome sustains soybean productivity under unbalanced fertilization[J]. Nature Communications, 2024, 15(1): 1668.
- [18] 苏律. 连作番茄根际微生物群落演替及番茄青枯病的化学和生物联合防控机制[D]. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 2020.  
SU L. Succession of microbial community in tomato rhizosphere during continuous cropping and control mechanism of tomato bacterial wilt by combined application of chemical and biocontrol agent[D]. Nanjing: Doctoral Dissertation of Nanjing Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [19] CHAPARRO JM, BADRI DV, VIVANCO JM. Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development[J]. The ISME Journal, 2014, 8(4): 790-803.

- [20] CANARINI A, KAISER C, MERCHANT A, RICHTER A, WANER W. Root exudation of primary metabolites: mechanisms and their roles in plant responses to environmental stimuli[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 157.
- [21] LI J, AI JM, LIU XD, JIANG YY, ZHENG CC, ZHAO RH, DENG ZS. Environmental filtering drives the establishment of the distinctive rhizosphere, bulk, and root nodule bacterial communities of *Sophora davidii* in hilly and Gully Regions of the Loess Plateau of China[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 945127.
- [22] 艾加敏. 白刺花根瘤中非根瘤菌与根瘤菌组装、演替及其互作关系研究[D]. 延安: 延安大学硕士学位论文, 2023.
- AI JM. Assembly, succession and interaction between non-rhizobium and rhizobium in nodules of *Sophora davidii* (Franch.) Skeels[D]. Yan'an: Master's Thesis of Yan'an University, 2023 (in Chinese).
- [23] 朱瑞芬. 腐熟牛粪对紫花苜蓿结瘤促生机制研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学博士学位论文, 2023.
- ZHU RF. Nodulation-promoting mechanism of decomposed cow manure on alfalfa (*Medicago sativa* L.)[D]. Lanzhou: Doctoral Dissertation of Gansu Agricultural University, 2023 (in Chinese).
- [24] 逯秀明. 苜蓿对中华苜蓿根瘤菌固氮缺失株生理响应机制的研究[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2020.
- LU XM. Study on physiological response mechanism of *medicago* to *Sinorhizobium meiloti* nitrogen-deficient plants of strains[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [25] MERGAERT P. Role of antimicrobial peptides in controlling symbiotic bacterial populations[J]. *Natural Product Reports*, 2018, 35(4): 336-356.
- [26] van de VELDE W, ZEHROV G, SZATMARI A, DEBRECZENY M, ISHIHARA H, KEVEI Z, FARKAS A, MIKULASS K, NAGY A, TIRICZ H, SADIAT-JEUNEMAÎTRE B, ALUNNI B, BOURGE M, KUCHO KI, ABE M, KERESZT A, MAROTI G, UCHIUMI T, KONDOROSI E, MERGAERT P. Plant peptides govern terminal differentiation of bacteria in symbiosis[J]. *Science*, 2010, 327(5969): 1122-1126.
- [27] 魏丰. 紫云英 *NCR* 基因家族发掘分析及其在类菌体分化固氮中的功能研究[D]. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 2021.
- WEI F. Analysis and functional characterization of *NCR* gene family during bacteroid differentiation and nitrogen fixation in *Astragalus sinicu*[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2021 (in Chinese).
- [28] JING HC, HEBELER R, OELJEKLAUS S, SITEK B, STÜHLER K, MEYER HE, STURRE MJG, HILLE J, WARSCHIED B, DIJKWEL PP. Early leaf senescence is associated with an altered cellular redox balance in *Arabidopsis cpr5/old1* mutants[J]. *Plant Biology*, 2008, 10(Suppl 1): 85-98.
- [29] 谢婧. 豌豆根瘤菌硫氧还蛋白基因 *trxs* 的功能研究[D]. 武汉: 中南民族大学硕士学位论文, 2019.
- XIE J. Study of the function of thioredoxin genes *trxs* in *Rhizobium leguminosarum*[D]. Wuhan: Master's Thesis of South-Central University for Nationalities, 2019 (in Chinese).
- [30] KUCK JL, BASTARACHE JA, SHAVER CM, FESSEL JP, DIKALOV SI, MAY JM, WARE LB. Ascorbic acid attenuates endothelial permeability triggered by cell-free hemoglobin[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, 495(1): 433-437.
- [31] WANG ZF, LI QE, WU WG, GUO J, YANG YL. Cadmium stress tolerance in wheat seedlings induced by ascorbic acid was mediated by NO signaling pathways[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2017, 135: 75-81.
- [32] 赵阳涛. 抗坏血酸过氧化物酶在响应玉米小斑病抗性中的研究[D]. 郑州: 河南农业大学硕士学位论文, 2023.
- ZHAO YT. Studies of ascorbate peroxidase in response to resistance to southern corn leaf blight[D]. Zhengzhou: Master's Thesis of Henan Agricultural University, 2023 (in Chinese).
- [33] DOWNIE JA. Legume haemoglobins: symbiotic nitrogen fixation needs bloody nodules[J]. *Current Biology*, 2005, 15(6): R196-R198.
- [34] SHAYKHOESLAM ESFAHANI E, SHAHPURI A. Thioredoxin h isoforms from rice are differentially reduced by NADPH/thioredoxin or GSH/glutaredoxin systems[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, 74: 243-248.
- [35] 周宇, 端木德强. 豆科植物固氮根瘤衰老过程中的代谢调控研究进展[J]. *华中农业大学学报*, 2024, 43(4): 12-24.
- ZHOU Y, DUANMU ZQ. Advances in studying metabolic regulation during senescence of nitrogen-fixing nodule in legumes[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2024, 43(4): 12-24 (in Chinese).
- [36] IMSANDE J. Ineffective utilization of nitrate by soybean during pod fill[J]. *Physiologia Plantarum*, 1986, 68(4): 689-694.
- [37] TSIKOU D, KALLONIATI C, FOTELLI MN, NIKOLOPOULOS D, KATINAKIS P, UDVARDI MK,

- RENNENBERG H, FLEMETAKIS E. Cessation of photosynthesis in *Lotus japonicus* leaves leads to reprogramming of nodule metabolism[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(5): 1317-1332.
- [38] 林佩真, 周惠民, 樊庆笙. 光照强度对大豆根瘤固氮作用的影响[J]. *南京农业大学学报*, 1985(4): 58-63.
- LIN PZ, ZHOU HM, FAN QS. The effect of light intensity on nitrogen fixation in soybean nodules[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 1985(4): 58-63 (in Chinese).
- [39] PHANG TH, SHAO G, LAM HM. Salt tolerance in soybean[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2008, 50(10): 1196-1212.
- [40] SEROVA TA, KUSAKIN PG, TSYGANOV VE. Effect of elevated temperature on premature senescence in nodules of pea (*Pisum sativum* L.) *sym26* and *sym27* mutants. I. Histological organization and expression of marker genes[J]. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2023, 70(8): 198.
- [41] DHANUSHKODI R, MATTHEW C, McMANUS MT, DIJKWEL PP. Drought-induced senescence of *Medicago truncatula* nodules involves serpin and ferritin to control proteolytic activity and iron levels[J]. *The New Phytologist*, 2018, 220(1): 196-208.
- [42] DU MK, GAO Z, LI XX, LIAO H. Excess nitrate induces nodule greening and reduces transcript and protein expression levels of soybean leghaemoglobins[J]. *Annals of Botany*, 2020, 126(1): 61-72.
- [43] 丁婷婷, 王晓瑜, 段廷玉. 病害对豆科牧草光合作用、营养成分及根瘤的影响[J]. *草业科学*, 2019, 36(1): 152-160.
- DING TT, WANG XY, DUAN TY. Effect of disease on photosynthesis, nutrition, and nodulation of leguminous forage[J]. *Pratacultural Science*, 2019, 36(1): 152-160 (in Chinese).
- [44] 马骏. 功能性铁基纳米酶增强大豆共生固氮体系研究[D]. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 2022.
- MA J. Functional iron-based nanoenzyme mediated enhancing soybean symbiotic nitrogen fixation system[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2022 (in Chinese).
- [45] 潘晴. 硫化氢对大豆共生根瘤衰老的作用研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2019.
- PAN Q. The function of hydrogen sulfide in soybean nodule senescence[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2019 (in Chinese).
- [46] LIU ZJ, KONG XY, LONG YP, LIU SR, ZHANG H, JIA JB, CUI WH, ZHANG ZM, SONG XW, QIU LJ, ZHAI JX, YAN Z. Integrated single-nucleus and spatial transcriptomics captures transitional states in soybean nodule maturation[J]. *Nature Plants*, 2023, 9(4): 515-524.
- [47] SEROVA TA, TIKHONOVICH IA, TSYGANOV VE. Analysis of nodule senescence in pea (*Pisum sativum* L.) using laser microdissection, real-time PCR, and ACC immunolocalization[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2017, 212: 29-44.
- [48] 陈喜凤. 米豆条带间作体系产量效应分析及其抗倒机制研究[D]. 长春: 吉林农业大学博士学位论文, 2020.
- CHEN XF. Study on yield effect and lodging-resistance mechanism of maize-soybean strip intercropping system[D]. Changchun: Doctoral Dissertation of Jilin Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [49] HARDISON R. Hemoglobins from bacteria to man: evolution of different patterns of gene expression[J]. *The Journal of Experimental Biology*, 1998, 201(Pt 8): 1099-1117.
- [50] LAGUNAS B, RICHARDS L, SERGAKI C, BURGESS J, PARDAL AJ, HUSSAIN RMF, RICHMOND BL, BAXTER L, ROY P, PAKIDI A, STOVOLD G, VÁZQUEZ S, OTT S, SCHÄFER P, GIFFORD ML. Rhizobial nitrogen fixation efficiency shapes endosphere bacterial communities and *Medicago truncatula* host growth[J]. *Microbiome*, 2023, 11(1): 146.
- [51] 刘佳星. MtDMI2 和 MtPUB2 协同调控截形苜蓿结瘤平衡的分子机制[D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2017.
- LIU JX. A molecular mechanism for the synergistic effect of MtDMI2 and MtPUB2 regulating nodulation homeostasis in *Medicago truncatula*[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of China Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [52] PÉREZ GUERRA JC, COUSSENS G, de KEYSER A, de RYCKE R, de BODT S, van de VELDE W, GOORMACHTIG S, HOLSTERS M. Comparison of developmental and stress-induced nodule senescence in *Medicago truncatula*[J]. *Plant Physiology*, 2010, 152(3): 1574-1584.
- [53] SEEFELDT LC, HOFFMAN BM, PETERS JW, RAUGEI S, BERATAN DN, ANTONY E, DEAN DR. Energy transduction in nitrogenase[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2018, 51(9): 2179-2186.
- [54] SCHWEMBER AR, SCHULZE J, del POZO A, CABEZA RA. Regulation of symbiotic nitrogen fixation in legume root nodules[J]. *Plants*, 2019, 8(9): 333.
- [55] 丁怡梦, 陈慕琪, 丁文锐, 任清铭, 沈文远, 刘大同, 陆成彬, 熊飞. 谷类作物碳氮代谢互作机制的研究进展[J]. *植物生理学报*, 2024, 60(5): 753-761.

- DING YM, CHEN MQ, DINGWR, Research advances on the carbon-nitrogen metabolic interaction mechanisms in cereal crops[J]. *Plant Physiology Journal*, 2024, 60(5): 753-761 (in Chinese).
- [56] Collier R, Tegeder M. Soybean ureide transporters play a critical role in nodule development, function and nitrogen export. *The Plant journal*. 2012, 72(3): 355-367.
- [57] LI YX, ZHOU L, LI YG, CHEN DS, TAN XJ, LEI L, ZHOU JC. A nodule-specific plant cysteine proteinase, AsNODF32, is involved in nodule senescence and nitrogen fixation activity of the green manure legume *Astragalus sinicus*[J]. *The New Phytologist*, 2008, 180(1): 185-192.
- [58] GODIARD L, LEPAGE A, MOREAU S, LAPORTE D, VERDNAUD M, TIMMERS T, GAMAS P. MtbHLH1, a bHLH transcription factor involved in *Medicago truncatula* nodule vascular patterning and nodule to plant metabolic exchanges[J]. *The New Phytologist*, 2011, 191(2): 391-404.
- [59] CHIASSON DM, LOUGHLIN PC, MAZURKIEWICZ D, MOHAMMADIDEHCESHMEH M, FEDOROVA EE, OKAMOTO M, McLEAN E, GLASS ADM, SMITH SE, BISSELING T, TYERMAN SD, DAY DA, KAISER BN. Soybean SAT1 (symbiotic ammonium transporter 1) encodes a bHLH transcription factor involved in nodule growth and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> transport[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(13): 4814-4819.
- [60] BREAKSPEAR A, LIU CW, ROY S, STACEY N, ROGERS C, TRICK M, MORIERI G, MYSORE KS, WEN JQ, OLDROYD GED, DOWNIE JA, MURRAY JD. The root hair “infectome” of *Medicago truncatula* uncovers changes in cell cycle genes and reveals a requirement for auxin signaling in rhizobial infection[J]. *The Plant Cell*, 2015, 26(12): 4680-4701.
- [61] [邓国伟. 大豆 *GmbHLH47* 转录因子的克隆及功能初步鉴定[D]. 哈尔滨: 哈尔滨师范大学硕士学位论文, 2022.
- DENG GW. Cloning and functional identification of soybean *GmbHLH47* transcription factor[D]. Harbin: Master's Thesis of Harbin Normal University, 2022 (in Chinese).
- [62] LI L, GAO WW, PENG Q, ZHOU B, KONG QH, YING YH, SHOU HX. Two soybean bHLH factors regulate response to iron deficiency[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2018, 60(7): 608-622.
- [63] DENG J, ZHU FG, LIU JX, ZHAO YF, WEN JQ, WANG T, DONG JL. Transcription factor bHLH2 represses *CYSTEINE PROTEASE77* to negatively regulate nodule senescence[J]. *Plant Physiology*, 2019, 181(4): 1683-1703.
- [64] HAN GL, YUAN F, GUO JR, ZHANG Y, SUI N, WANG BS. AtSIZ1 improves salt tolerance by maintaining ionic homeostasis and osmotic balance in *Arabidopsis*[J]. *Plant Science*, 2019, 285: 55-67.
- [65] SINHARROY S, TORRES-JEREZ I, BANDYOPADHYAY K, KERESZT A, PISLARIU CI, NAKASHIMA J, BENEDITO VA, KONDOROSI E, UDVARDI MK. The C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> transcription factor regulator of symbiosome differentiation represses transcription of the secretory pathway gene *VAMP721a* and promotes symbiosome development in *Medicago truncatula*[J]. *The Plant Cell*, 2013, 25(9): 3584-3601.
- [66] 周顺馨. 大豆 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 类转录因子 *GmRSD1/2* 调控结瘤的功能初探[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2022.
- ZHOU SX. Preliminary functional analysis of C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-like transcription factors *GmRSD1/2* in regulating nodulation in soybean[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2022 (in Chinese).
- [67] LIN JS, ROSWANJAYA YP, KOHLEN W, STOUGAARD J, REID D. Nitrate restricts nodule organogenesis through inhibition of cytokinin biosynthesis in *Lotus japonicus*[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 6544.
- [68] LIN JS, LI XL, LUO ZP, MYSORE KS, WEN JQ, XIE F. NIN interacts with NLPs to mediate nitrate inhibition of nodulation in *Medicago truncatula*[J]. *Nature Plants*, 2018, 4(11): 942-952.
- [69] YANG J, LAN LY, JIN Y, YU N, WANG D, WANG ET. Mechanisms underlying legume-rhizobium symbioses[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2022, 64(2): 244-267.
- [70] 陆保福, 康文娟, 师尚礼, 关键, 南攀, 马瑞宏. 豆科植物-根瘤菌固氮系统及其碳氮互作[J]. *中国草地学报*, 2023, 45(11): 119-135, 144.
- LU BF, KANG WJ, SHI SL, GUAN J, NAN P, MA RH. Nitrogen fixation system of legume-rhizobia and its carbon-nitrogen interaction[J]. *Chinese Journal of Grassland*, 2023, 45(11): 119-135, 144 (in Chinese).
- [71] 金润哲. *GmTCP* 和 *GmNLP* 响应硝态氮浓度对大豆结瘤影响的分子机制[D]. 哈尔滨: 东北农业大学博士学位论文, 2024.
- Kim Yunc. Molecular mechanism of *GmTCP* and *GmNLP* in response to nitrate concentration on soybean nodulation[D]. Harbin: Doctoral Dissertation of Northeast Agricultural University, 2024 (in Chinese).
- [72] 王笑, 蔡剑, 周琴, 戴廷波, 姜东. 非生物逆境锻炼提高作物耐逆性的生理机制研究进展[J]. *中国农业*

- 科学, 2021, 54(11): 2287-2301.
- WANG X, CAI J, ZHOU Q, DAI TB, JIANG D. Physiological mechanisms of abiotic stress priming induced the crops stress tolerance: a review[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2021, 54(11): 2287-2301 (in Chinese).
- [73] FAHAD S, BAJWA AA, NAZIR U, ANJUM SA, FAROOQ A, ZOHAIB A, SADIA S, NASIM W, ADKINS S, SAUD S, IHSAN MZ, ALHARBY H, WU C, WANG DP, HUANG JL. Crop production under drought and heat stress: plant responses and management options[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1147.
- [74] 王秋京, 李秀芬, 闫平, 吕佳佳, 王瞭瞭, 马国忠. 黑龙江省主要农业气象灾害时序特征及其对大豆产量影响的灰色关联分析[J]. *中国农学通报*, 2020, 36(3): 81-87.
- WANG QJ, LI XF, YAN P, LV JJ, WANG LL, MA GZ. Main agro-meteorological disasters Heilongjiang: sequential characteristics and grey correlation analysis of their effects on soybean yield[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2020, 36(3): 81-87 (in Chinese).
- [75] ZHANG XX, SUN Y, QIU X, LU H, HWANG I, WANG TZ. Tolerant mechanism of model legume plant *Medicago truncatula* to drought, salt, and cold stresses[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 847166.
- [76] WONGKAEW SPJF. Effects of infection by peanut mottle virus on nodule function[J]. *Phytopathology*, 1986, 76(3): 294.
- [77] MUTHOMI JW, OTIENO PE, CHEMINING GN, NDERITU JH, WAGACHA JM. Effect of legume root rot pathogens and fungicide seed treatment on nodulation and biomass accumulation [J]. *Journal of Biological Sciences*, 2007, 7(7): 1163.
- [78] KHAN MR, MOHIDDIN FA, AHAMAD F. Inoculant rhizobia suppressed root-knot disease, and enhanced plant productivity and nutrient uptake of some field-grown food legumes[J]. *Acta Agriculturae Scandinavica*, 2018, 68(2): 166-174.
- [79] 周扬, 岳晓凤, 唐晓倩, 闫洪林, 张奇, 李培武. 黄曲霉毒素阻控与花生超级结瘤耦合效应研究初报[J]. *中国油料作物学报*, 2021, 43(6): 947-960.
- ZHOU Y, YUE XF, TANG XQ, YAN HL, ZHANG Q, LI PW. A preliminary study on the coupling effect of aflatoxin green control and super-nodulation[J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2021, 43(6): 947-960 (in Chinese).
- [80] 陈雪, 莫芹, 陈一帆, 李丹, 沈渊, 章寅, 吕贝贝. 大豆土传病害生防菌及其应用研究进展[J]. *中国油料作物学报*, 2023, 45(5): 1082-1094.
- CHEN X, MO Q, CHEN YF, LI D, SHEN Y, ZHANG Y, LYU BB. Research progress on biocontrol bacteria for soybean soil-borne diseases and its application[J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2023, 45(5): 1082-1094 (in Chinese).
- [81] IRISARRI P, CARDOZO G, TARTAGLIA C, REYNO R, GUTIÉRREZ P, LATTANZI FA, REBUFFO M, MONZA J. Selection of Competitive and Efficient Rhizobia Strains for White Clover.[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 768.
- [82] KUNKUN F, HANNAH H, CORINNE W, GUO XS, WANG DZ, BAI Y, ZHU YG, FIERER N, CHU HY. Identification of the rhizosphere microbes that actively consume plant-derived carbon[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2022: 166.
- [83] Ferguson BJ, Mens C, Hastwell AH, Zhang M, Su H, Jones CH, Chu X, Gresshoff PM. Legume nodulation: The host controls the party[J]. *Plant Cell and Environment*, 2019, 42(1): 41-51.
- [84] GOURION B, BERRABAH F, RATET P, STACEY G. Rhizobium-legume symbioses: the crucial role of plant immunity[J]. *Trends in Plant Science*, 2015, 20(3): 186-194.
- [85] BLANCO RA, SICARDI M, Frioni L. Competition for nodule occupancy between introduced and native strains of rhizobium leguminosarum biovar trifolii[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2010, 46(4): 419-425.
- [86] EGAMBERDIEVA D, WIRTH SJ, SHURIGIN VV, HASHEM A, ABD ALLAH EF. Endophytic bacteria improve plant growth, symbiotic performance of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and induce suppression of root rot caused by *Fusarium solani* under salt stress[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1887.
- [87] 高震, 柯美玉, 徐慧芳, 陈栩. 生长素调控大豆根瘤发育的机制及应用[C]//中国植物学会. 首届植物科学前沿学术大会摘要集(二). 福州: 福建农林大学海峡联合研究院, 2022: 1.
- GAO Z, KE MY, XU HF, CHEN X. The mechanism and application of auxin regulation on soybean root nodule development[C]//Botanical Society of China. Abstract of the First Frontier Conference of Plant Science (2). Fuzhou: Straits Joint Research Institute of Fujian Agriculture and Forestry University, 2022: 1 (in Chinese).
- [88] 彭凯. 赤霉素调控豆科植物结瘤固氮相关重要蛋白 DELLA 与 GID1 的纯化工艺优化及改造初探[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2023.
- PENG K. Optimization of purification process and

- modification for GA-regulated nitrogen fixation-related important protein GID1-DELLA in legumes[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2023 (in Chinese).
- [89] DAVIÈRE JM, de LUCAS M, PRAT S. Transcriptional factor interaction: a central step in DELLA function[J]. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2008, 18(4): 295-303.
- [90] DAVIÈRE JM, ACHARD P. A pivotal role of DELLAs in regulating multiple hormone signals[J]. *Molecular Plant*, 2016, 9(1): 10-20.
- [91] LIU H, ZHANG C, YANG J, YU N, WANG ET. Hormone modulation of legume-rhizobial symbiosis[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2018, 60(8): 632-648.
- [92] BV V, SSR R. Effect of brassinosteroids on nodulation and nitrogenase activity in groundnut (*Arachis hypogaea* L.)[J]. *Plant Growth Regulation*, 1999, 28(3): 165-167.
- [93] HUNTER WJ. Influence of root-applied epibrassinolide and carbenoxolone on the nodulation and growth of soybean (*Glycine max* L.) seedlings[J]. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 2001, 186(4): 217-221.
- [94] BERRABAH F, BALLIAU T, AÏT-SALEM EH, GEORGE J, ZIVY M, RATET P, GOURION B. Control of the ethylene signaling pathway prevents plant defenses during intracellular accommodation of the rhizobia[J]. *The New Phytologist*, 2018, 219(1): 310-323.
- [95] SUN J, CARDOZA V, MITCHELL DM, BRIGHT L, OLDROYD G, HARRIS JM. Crosstalk between jasmonic acid, ethylene and Nod factor signaling allows integration of diverse inputs for regulation of nodulation[J]. *The Plant Journal*, 2006, 46(6): 961-970.
- [96] KINKEMA M, GRESSHOFF PM. Investigation of downstream signals of the soybean autoregulation of nodulation receptor kinase GmNARK[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2008, 21(10): 1337-1348.
- [97] NAKAGAWA T, KAWAGUCHI M. Shoot-applied MeJA suppresses root nodulation in *Lotus japonicus*[J]. *Plant & Cell Physiology*, 2006, 47(1): 176-180.
- [98] GUO D, LI JR, LIU P, WANG YZ, CAO N, FANG XL, WANG T, DONG JL. The jasmonate pathway promotes nodule symbiosis and suppresses host plant defense in *Medicago truncatula*[J]. *Molecular Plant*, 2024, 17(8): 1183-1203.
- [99] FERGUSON BJ, MATHESIUS U. Phytohormone regulation of legume-rhizobia interactions[J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2014, 40(7): 770-790.
- [100] STACEY G, McALVIN CB, KIM SY, OLIVARES J, SOTO MJ. Effects of endogenous salicylic acid on nodulation in the model legumes *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula*[J]. *Plant Physiology*, 2006, 141(4): 1473-1481.
- [101] 柯美玉. 生长素运输在水杨酸诱导的免疫反应和大豆根瘤发育中的作用机制研究[D]. 福州: 福建农林大学博士学位论文, 2022.
- KE MY. Mechanism of auxin transport in salicylic acid-induced immune response and soybean nodulation[D]. Fuzhou: Doctoral Dissertation of Fujian Agriculture and Forestry University, 2022 (in Chinese).
- [102] 唐洁. 脱落酸调控大豆结瘤的机制[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2018.
- TANG J. The mechanism of ABA regulated soybean nodulation[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [103] PALMA F, LÓPEZ-GÓMEZ M, TEJERA NA, LLUCH C. Involvement of abscisic acid in the response of *Medicago sativa* plants in symbiosis with *Sinorhizobium meliloti* to salinity[J]. *Plant Science*, 2014, 223: 16-24.
- [104] ARAÚJO SS, BEEBE S, CRESPI M, DELBREIL B, GONZÁLEZ EM, GRUBER V, LEJEUNE-HENAUT I, LINK W, MONTEROS MJ, PRATS E, RAO I, VADEZ V, PATTO MCV. Abiotic stress responses in legumes: strategies used to cope with environmental challenges[J]. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2015, 34(1/2/3): 237-280.
- [105] 王树起, 韩晓增, 乔云发, 严君, 李晓慧. 施氮对大豆根瘤生长和结瘤固氮的影响[J]. *华北农学报*, 2009, 24(2): 176-179.
- WANG SQ, HAN XZ, QIAO YF, YAN J, LI XH. Nodule growth, nodulation and nitrogen fixation in soybean (*Glycine max* L.) as affected by nitrogen application[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2009, 24(2): 176-179 (in Chinese).
- [106] NISHIDA H, SUZAKI T. Nitrate-mediated control of root nodule symbiosis[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2018, 44: 129-136.
- [107] 柯丹霞, 刘怡, 刘晓雪, 霍娅娅, 李锦颖. 一氧化氮在根瘤共生固氮中的作用研究进展[J]. *信阳师范学院学报(自然科学版)*, 2023, 36(1): 156-161.
- KE DX, LIU Y, LIU XX, HUO YY, LI JY. Research progress on the role of nitric oxide in symbiotic nitrogen fixation of nodulation[J]. *Journal of Xinyang Normal University (Natural Science Edition)*, 2023, 36(1): 156-161 (in Chinese).
- [108] GUPTA KJ, IGAMBERDIEV AU. The anoxic plant mitochondrion as a nitrite: NO reductase[J]. *Mitochondrion*, 2011, 11(4): 537-543.



- [109] ZHONG X, WANG J, SHI X, BAI M, YUAN C, CAI C, WANG N, ZHU X, KUANG H, WANG X, SU J, HE X, LIU X, YANG W, YANG C, KONG F, WANG E, GUAN Y. Genetically optimizing soybean nodulation improves yield and protein content[J]. *Nature Plants*, 2024, 10(5): 736-742.
- [110] 柯丹霞, 徐勤朕, 杨娜, 柏梦焱, 关跃峰. 高氮抑制豆科植物结瘤固氮机制研究进展[J]. *生物技术通报*, 2019, 35(10): 40-45.  
KE DX, XU QZ, YANG N, BAI MY, GUAN YF. Research progresses on the mechanism of high nitrogen inhibiting nodulation and nitrogen fixation in legumes[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2019, 35(10): 40-45 (in Chinese).
- [111] ZAHARAN HH, SPRENT JI. 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.
- [112] DUZAN HM, ZHOU X, SOULEIMANOV A, SMITH DL. 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(408): 2641-2646.
- [113] ABDEL-WAHAB AM, SHABEB MSA, YOUNIS MAM. Studies on the effect of salinity, drought stress and soil type on nodule activities of *Lablab purpureus* (L.) sweet (Kashrangeeg)[J]. *Journal of Arid Environments*, 2002, 51(4): 587-602.
- [114] 李梅, 潘喆云, 李宁宁, 罗利, 于亮亮. NaCl 胁迫对蒺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 ZY, LI NN, LUO L, YU LL. Effects of NaCl stress on growth and symbiotic nodulation in *Medicago truncatula*[J]. *China Industrial Economics*, 2018, 54(9): 1409-1416 (in Chinese).
- [115] LI X, WANG AC, WAN WJ, LUO XS, ZHENG LX, HE GW, HUANG DQ, CHEN WL, HUANG QY. High salinity inhibits soil bacterial community mediating nitrogen cycling[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87(21): e0136621.
- [116] WANG LL, RUBIO MC, XIN X, ZHANG BL, FAN QL, WANG Q, NING GG, BECANA M, DUANMU DQ. CRISPR/Cas9 knockout of leghemoglobin genes in *Lotus japonicus* uncovers their synergistic roles in symbiotic nitrogen fixation[J]. *The New Phytologist*, 2019, 224(2): 818-832.
- [117] 郭青娟. 固氮酶催化 N<sub>2</sub> 和 H<sup>+</sup> 还原的电子传递通路[D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2015.  
GUO QJ. Electron transfer pathways in the process of N<sub>2</sub> and H<sup>+</sup> reduction catalyzed by nitrogenases[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of China Agricultural University, 2015 (in Chinese).
- [118] LIN JS, BJØRK PK, KOLTE MV, POULSEN E, DEDIC E, DRACE T, ANDERSEN SU, NADZIEJA M, LIU HJ, CASTILLO-MICHEL H, ESCUDERO V, GONZÁLEZ-GUERRERO M, BOESEN T, PEDERSEN JS, STOUGAARD J, ANDERSEN KR, REID D. Zinc mediates control of nitrogen fixation via transcription factor filamentation[J]. *Nature*, 2024, 631(8019): 164-169.
- [119] VERSLUES PE, BAILEY-SERRES J, BRODERSEN C, BUCKLEY TN, CONTI L, CHRISTMANN A, DINNENY JR, GRILL E, HAYES S, HECKMAN RW, HSU PK, JUENGER TE, MAS P, MUNNIK T, NELISSEN H, SACK L, SCHROEDER JI, TESTERINK C, TYERMAN SD, UMEZAWA T, WIGGE PA. Burning questions for a warming and changing world: 15 unknowns in plant abiotic stress[J]. *The Plant Cell*, 2023, 35(1): 67-108.
- [120] SINGH RK, PRASAD M. Delineating the epigenetic regulation of heat and drought response in plants[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2022, 42(4): 548-561.
- [121] BASHIR K, MATSUI A, RASHEED S, SEKI M. Recent advances in the characterization of plant transcriptomes in response to drought, salinity, heat, and cold stress[J]. *F1000Research*, 2019, 8: F1000 Faculty Rev-658.
- [122] CHARRIER A, PLANCHET E, CERVEAU D, GIMENO-GILLES C, VERDU I, LIMAMI AM, LELIÈVRE E. Overexpression of a *Medicago truncatula* stress-associated protein gene (*MtSAP1*) leads to nitric oxide accumulation and confers osmotic and salt stress tolerance in transgenic tobacco[J]. *Planta*, 2012, 236(2): 567-577.
- [123] VERDOY D, COBA deLa PEÑA T, REDONDO FJ, LUCAS MM, PUEYO JJ. Transgenic *Medicago truncatula* plants that accumulate proline display nitrogen-fixing activity with enhanced tolerance to osmotic stress[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2006, 29(10): 1913-1923.
- [124] YANG MK, WANG LP, CHEN CM, GUO X, LIN CL, HUANG W, CHEN L. Genome-wide analysis of autophagy-related genes in *Medicago truncatula* highlights their roles in seed development and response to drought stress[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 22933.
- [125] 吴昊, 邓家珍, 何雅琴, 林铭业, 叶绍明. 施氮与 pH 处理对尾巨桉-降香黄檀间作体系幼苗生长的影响[J]. *林草资源研究*, 2024(1): 111-124.  
WU H, DENG JZ, HE YQ, LIN MY, YE SM. Effecty

- of nitrogen and pH treatment on seeding growth of *Eucalyptus urophylla* × *E. grandis*-*Dallergia odorifera* intercropping systems [J]. *Forest and Grassland Resources Research*, 2024(1): 111-124 (in Chinese).
- [126] 杨琼博. pH 值和化合态氮对紫花苜蓿结瘤和固氮效果的影响[D]. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文, 2007.
- YANG QB. Effects of pH and combined nitrogen factors on alfalfa bunching and nitrogen fixation[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2007 (in Chinese).
- [127] 郭奇梅, 孙吉雄, 安渊, 刘剑锋. 酸和铁胁迫对紫花苜蓿根系质膜 H<sup>+</sup>-ATPase 活性的影响[J]. *草原与草坪*, 2009, 29(3): 12-15.
- GUO QM, SUN JX, AN Y, LIU JF. Effect of acidity and Fe stress on the activity of H<sup>+</sup>-ATPase in plasma membrane of alfalfa roots[J]. *Grassland and Turf*, 2009, 29(3): 12-15 (in Chinese).
- [128] PANG QY, ZHANG AQ, ZANG W, WEI L, YAN XF. Integrated proteomics and metabolomics for dissecting the mechanism of global responses to salt and alkali stress in *Suaeda corniculata*[J]. *Plant and Soil*, 2016, 402(1/2): 379-394.
- [129] 高凡. 高温胁迫下 *StP5CS* 基因过表达对菜用大豆生长及结瘤固氮的影响[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2019.
- GAO F. Effects of overexpression of *StP5CS* gene on growth and nitrogen fixation in vegetable soybean under high high temperature stress[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [130] 刘薇, 赵振芳, 冯永君, 吴存祥. 植物激素在豆科植物根瘤形成和发育过程中的调控作用[J]. *大豆科学*, 2013, 32(2): 262-266.
- LIU W, ZHAO ZF, FENG YJ, WU CX. Regulation of plant hormones on the formation and development of legumes root nodules[J]. *Soybean Science*, 2013, 32(2): 262-266 (in Chinese).
- [131] 李秀菊, 孟繁静. 大豆成花的光周期诱导研究: I. 真叶内植物激素及同化物的变化[J]. *中国农业大学学报*, 1996, 1(5): 35-39.
- LI XJ, MENG FJ. Study on the photoperiod-induced flowering in soybean: I. change of contents of plant hormones and assimilates in the first leaves[J]. *Journal of China Agricultural University*, 1996, 1(5): 35-39 (in Chinese).
- [132] DAKORA FD. A functional relationship between leghaemoglobin and nitrogenase based on novel measurements of the two proteins in legume root nodules[J]. *Ann Bot*, 1995, 75(1): 49-54.
- [133] LI MS, ZHANG P, GUO ZL, CAO WD, GAO L, LI YB, TIAN CF, CHEN Q, SHEN YZ, REN FZ, RUI YK, WHITE JC, LYNCH I. Molybdenum nanofertilizer boosts biological nitrogen fixation and yield of soybean through delaying nodule senescence and nutrition enhancement[J]. *ACS Nano*, 2023, 17(15): 14761-14774.
- [134] 彭文婷. 镁影响大豆结瘤固氮的生理及分子机制[D]. 福州: 福建农林大学博士学位论文, 2020.
- PENG WT. Physiological and molecular mechanisms of soybean nodulation affected by magnesium[D]. Fuzhou: Doctoral Dissertation of Fujian Agriculture and Forestry University, 2020 (in Chinese).
- [135] 范贝贝, 李瑾, 冯献. 农业强国目标下作物育种科技与装备创新: 态势、挑战与路径[J]. *科技导报*, 2023, 41(16): 23-31.
- FAN BB, LI J, FENG X. Seed industry technology and equipment under the goal of agricultural power: situation, challenge and path[J]. *Science & Technology Review*, 2023, 41(16): 23-31 (in Chinese).
- [136] WANG ZH, SONG Y. Toward understanding the genetic bases underlying plant-mediated "cry for help" to the microbiota[J]. *iMeta*, 2022, 1(1): e8.
- [137] NAKAGAMI S, WANG Z, HAN XW, TSUDA K. Regulation of bacterial growth and behavior by host plant[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2024, 62: 69-96.
- [138] TRIVEDI P, LEACH JE, TRINGE SG, SA TM, SINGH BK. Plant-microbiome interactions: from community assembly to plant health[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2020, 18(11): 607-621.
- [139] HAZAN S, HAROON J, JORDAN S, WALKER SJ. Improvements in gut microbiome composition and clinical symptoms following familial fecal microbiota transplantation in a nineteen-year-old adolescent with severe autism[J]. *Journal of Medical Cases*, 2024, 15(4/5): 82-91.