

低 pH 条件对紫花苜蓿结瘤的影响及机制初探

杨敏^{1,2}, 王永雄³, 黎晓峰^{1*}, 顾明华¹, 陈秀虎², 张维珺¹

(1. 广西大学农学院, 南宁 530005; 2. 清远职业技术学院生物系, 广东

清远 511510; 3. 西南大学动物科学学院, 重庆 400716)

摘要: 探讨了低 pH 条件下紫花苜蓿根毛变形和结瘤受到的影响及其机制。结果表明, 在低 pH 条件下, 初生根伸长和根瘤菌 OD₆₀₀ 值显著下降, 根共生结瘤受到明显抑制。在接种根瘤菌、不加 NF 的条件下, pH5.0、pH4.7、pH4.5、pH4.2 处理的根毛变形率分别比对照(pH6.5)减少了 44.1%、56.4%、60.0% 和 69.0%; 在加入 NF、不接种根瘤菌的情况下, 低 pH(4.5) 处理, 根毛的变形也比对照(pH6.5)减少了 45.9%。结果暗示, 低 pH 条件下苜蓿结瘤初期的结瘤信号传导受阻, 这可能是导致酸性条件下苜蓿结瘤减少的重要原因之一。

关键词: 低 pH; 结瘤; 信号传导; 根毛变形; 苜蓿

中图分类号: S963 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2007)04-0633-05

Preliminary study on the effect of low pH on the nodulation of *Medicago sativa* and corresponded mechanisms

YANG Min^{1,2}, YU Yong-Xiong³, LI Xiao-Feng^{1*},
GU Ming-Hua¹, CHEN Xiu-Hu², ZHANG Wei-Jun¹

(1. College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530005, China; 2. Department of Biology, Qingyuan Polytechnic

College, Qingyuan 511510, China; 3. College of Animal Science, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: Effects of low pH on root hair deformation(RHD)and nodulation in *Medicago sativa* were investigated and corresponded mechanisms was also discussed in present study. It was showed that primary root elongation, the OD₆₀₀ of *Rhizobium meliloti*, and symbiotic nodulation of roots were obviously decreased at low pH. At pH5.0, pH4.7, pH4.5, pH4.2, the rate of RHD was less 44.1%, 56.4%, 60.0% and 69.0% respectively than that at pH6.5 in the presence of *R. meliloti*. Moreover, in the presence of NF RHD was also less 45.9% at pH4.5 than that at pH6.5. These results implied that the nodulation signal transduction of *Medicago sativa* at initial stages of symbiotic nodulation was inhibited at low pH, which might be an important cause resulted in the reduction of nodulation in *Medicago sativa* at acidity conditions.

Key words: low pH; nodulation; signal transduction; root hair deformation (RHD); *Medicago sativa* (alfalfa)

紫花苜蓿 (*Medicago sativa*) 是优质、高产的多年生豆科牧草, 被誉为“牧草之王”, 具有很高的营养价值。通过转基因苜蓿来生产工业酶, 应用前景也

十分广阔 (Austin-Phillips 等, 1994)。但是在实际生产中, 苜蓿的生长、发育受到矿质元素 (张健等, 2002; 刘美艳等, 2004)、微生物 (刘明志, 2005) 和

收稿日期: 2006-08-02 修回日期: 2007-01-20

基金项目: 广西自然科学基金 (0339007); 国家“973”项目 (2001CB108905); 国家自然科学基金 (30360048); 教育部优秀青年教师资助计划 (2003[355]) [Supported by Natural Science Foundation of Guangxi (0339007); State Key Basic Research and Development Plan of China (2001CB108905); the National Natural Science Foundation of China (30360048); Special Fund for Excellent Youth Teachers of State Education Commission (2003[355])]]

作者简介: 杨敏 (1971-), 女, 四川泸县人, 硕士, 讲师, 主要从事植物营养与环境生态的教学与研究工作, (E-mail) yangmin910@126.com.

* 通讯作者 (Author for correspondence, E-mail: lxf@gxu.edu.cn)

pH 值等多种因素的影响。pH 值高于 6.2, 才能保持住土壤中的钙、镁、钾等矿质元素, 共生细菌才能正常固氮(Stout, 1994); 土壤 pH 值低于 5.7, 苜蓿产量会随着 pH 值的下降而迅速下降(Mahler, 2002)。而酸性土壤占到世界可耕地面积的 40%, 一些是自然呈酸性的, 也有一些是随着季节的变化呈酸性的, 包括过度地使用了一些肥料。由于苜蓿对土壤酸性非常敏感, 土壤酸度大大限制了苜蓿的栽培种植和利用(Don, 2002), 影响南方地区的大面积种植。

紫花苜蓿在酸性土壤中的生长表现已有相关研究报道(郭彦军等, 2006), 但较系统地研究低 pH 条件对苜蓿结瘤的影响机制国内外尚未见报道。为探讨苜蓿对酸性土壤的适应性及低 pH 抑制共生结瘤机理, 本文以紫花苜蓿为材料, 研究了低 pH 对苜蓿根伸长、结瘤、根毛变形、根瘤菌生长的影响, 初步分析了低 pH 抑制苜蓿结瘤的机制。

1 材料与方 法

1.1 试验地点和时间

试验在广西大学农业资源与环境实验室及温室内进行; 2002 年 7 月 2 日开始至 2004 年 2 月 10 日结束, 记录截至 2004 年 3 月 10 日。

1.2 试验材料

(1) 紫花苜蓿品种: 艾菲尼特(*Medicago sativa* cv. Ivynate), 购自山西牧草种子公 司。(2) 根瘤菌菌株(*Rhizobium meliloti*, Strain ASW-1 of *R. meliloti*): 由西南大学牧草与草食家畜重点实验室提供。

1.3 试验方法

1.3.1 幼苗的准备 依次用 75% (v/v) 的乙醇和 0.1% (g/v) 升汞对种子浸泡消毒 5 min 和 15 min, 无菌水漂洗 8~10 次置于 0.1% (g/v) 的水琼脂平板上, 在 25℃ 恒温箱中黑暗倒置培养 36 h。

1.3.2 低 pH 值对初生根生长影响的处理 将苜蓿幼苗植入经过消毒的有孔塑料板上, 幼根浸入于 0.5 mmol · L⁻¹ CaCl₂ 溶液中, 在人工气候箱中培养 1 d 后, 选取根长 3 cm 左右的幼苗, 置于 pH 6.5 和 pH 4.5 的处理液中培养 24 h。处理培养前后, 分别测定幼根长度, 两次测定之差为根伸长量。人工气候箱环境参数为: 25℃, 相对湿度 70%~80%, 光照强度约 54 μmol · m⁻² · s⁻¹, 光周期: 昼 12 h/夜 12 h。

1.3.3 不同 pH 下根瘤菌生长情况的观察 *R. me-*

liloti 菌种活化 1 d 后, 各取 1 mL 接种于 YM 液体培养基中(体积均为 50 mL, pH 值分别为 7.0、6.5、5.0、4.7 和 4.5), 28℃、150 r/min 振荡培养, 每隔 6 h 或 12 h 后, 测其 OD₆₀₀ 值(λ = 600 nm, 用 UV-MINI-1240 220VE 型岛津紫外分光光度计测定)。

1.3.4 根瘤数和地上部生物产量的观测 移植前期准备的幼苗于内盛经消毒的珍珠岩的培养杯中, 培养杯的底部浸入到 1/5 剂量的 Fahraeus 无氮营养液(pH6.5)中使营养液的深度达到培养杯高度的 2/3 (Fahraeus 无氮营养液中含 Na₂HPO₄ 150 mg · L⁻¹、MgSO₄ · 7H₂O 120 mg · L⁻¹、KH₂PO₄ 100 mg · L⁻¹、CaCl₂ 100 mg · L⁻¹、柠檬酸铁 5 mg · L⁻¹、H₃BO₃ 2.86 mg · L⁻¹、MnSO₄ · H₂O 2.08 mg · L⁻¹、ZnSO₄ · 7H₂O 0.22 mg · L⁻¹、CuSO₄ · 5H₂O 0.08 mg · L⁻¹、Na₂MnO₄ 0.11 mg · L⁻¹)。苗龄达到 8 d 时, 以 pH6.5 的 Fahraeus 无氮营养液为对照, pH4.5 作为处理, 同时接种苜蓿根瘤菌, 使溶液中根瘤菌数量达到 2 × 10⁷ 个菌 · mL⁻¹。处理 3 d 后更新处理溶液, 并再次接种。连续处理两次后用经消毒、pH 为 6.5 的 Fahraeus 无氮营养液培养, 培养液隔天更换。处理 50 d 后, 观测植株根瘤数, 称取地上部重量。

1.3.5 结瘤因子(Nod factors, 以下简称 NF)的制备

参照杨国平等(1996)的试验方法并略为改动: 将水相 NF 粗提物在旋转蒸发器内减压蒸干后用 pH4.5 的无菌 Milli-Q 超纯水溶解, 1 × 10⁵ Pa 下灭菌 10 min, 置 -20℃ 冰箱中保存备用。

1.3.6 根毛变形率的观测 将处理液的 pH 分别调节至 6.5、5.0、4.7、4.5 和 4.2。处理液以 Fahraeus 无氮营养液作为基本培养液, 并接种根瘤菌(2 × 10⁴ 个菌 · mL⁻¹)。处理 2 d 后, 在显微镜下观测根毛变形率。

将苜蓿幼根浸入到 pH4.5 和 pH6.5 的 0.5 mmol · L⁻¹ CaCl₂ 溶液中, 3 d 后观测根毛变形率。处理溶液在处理前经灭菌处理, 不接种根瘤菌, 但加入按 1.3.5 准备好的 NF, 各处理溶液中 NF 的加入量相同, 以不加入 NF 的处理为对照。

1.3.7 统计检验 以上试验重复两次以上, 各处理均设 3 个以上重复, 邓肯新复级差法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 低 pH 对苜蓿初生根伸长的影响

将根长约为 3 cm 的初生根浸入 pH4.5 的 1/5

剂量的 Fahraeus 无氮营养液中, pH6.5 为对照。处理 24 h 后观测各处理初生根伸长量。经 pH4.5 处理 24 h 后, 初生根的伸长被抑制了 28.6%。多重比较结果显示, pH6.5 与 pH4.5 条件下苜蓿初生根的伸长表现出极显著差异。可见, 苜蓿初生根生长具有比较明显的酸敏感性, 低 pH 抑制苜蓿初生根伸长(表 1)。

表 1 低 pH 对苜蓿初生根伸长的影响

Table 1 Primary root elongation of alfalfa at different pH value

pH 值 pH value	根伸长量 Root elongation (cm)
6.5	16.92±1.18 A
4.5	12.08±0.90 B

注: 表中数据为平均值±标准差, 3 个重复, 每个重复含 15 个观测值。A、B、C、D 表示达到 1% 的极显著水平, 相同字母表示差异不显著, 下同。

Note: Data indicates means±SE, 3 repetitions, 15 data per repetition. A, B, C, D means significant at 1% levels, same letter means no significance. The same below.

2.2 不同 pH 条件下苜蓿根瘤菌的生长

豆科植物共生固氮的前提之一就是在植物的生长环境中根瘤菌能正常生长, 根瘤菌达到一定的数量才能对宿主植物维持较高的侵染力。在其他元素供应充足、氮素水平低的酸性土壤环境中, 豆科植物的结瘤及生长在很大程度上依赖于土壤中根瘤菌的生长情况和数量的多少(Elkins 等, 1976)。根瘤菌的存在不仅导致信号分子量的增加, 而且可提高信号分子的活性。此外, 根瘤菌对植物信号分子也有修饰、分解的作用, 并能产生有生物活性的物质(Rao 等, 1995), 有的对 nod 基因表达有强抑制作用(Cooper 等, 1995)。苜蓿根瘤菌适宜的 pH 在 6.5~7.5 之间, 最适的生长 pH 为 6.8~7.2。图 1 是不同 pH 的 YM 液体培养基培养 *R. meliloti* 24 h 后, *R. meliloti* 菌悬液的 OD₆₀₀ 值。

图 1 表明, 在不同酸度的 YM 液体培养基上接种 *R. meliloti* 24 h 后, 根瘤菌的生长表现出极显著的差异。以 pH7.0 为对照, 在 pH6.5、pH5.0、pH4.7 和 pH4.5 条件下, 根瘤菌的 OD₆₀₀ 值分别下降了 23.6%、95.2%、96.8% 和 97.0%。这表明低 pH(pH<5.0)对 *R. meliloti* 的生长有很强的抑制作用。

2.3 低 pH 对苜蓿共生结瘤的影响

在苜蓿出苗后 8 d, 幼苗长出第一对真叶后, 以 pH6.5 处理为对照, 将幼苗培养液(1/5 剂量的 Fahraeus 无氮营养液)的 pH 调至 4.5, 同时接种 *R. meliloti*。连续处理 2 次共 6 d 后, 换为 1 个剂量

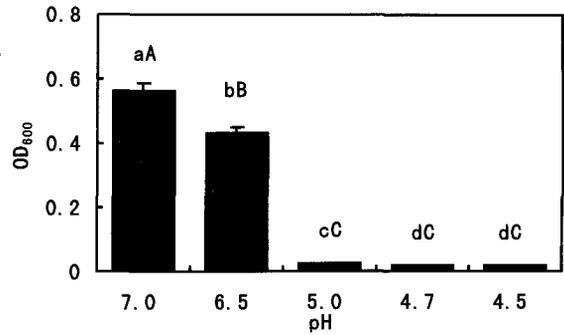


图 1 接种 24 h 不同 pH 条件下苜蓿根瘤菌的生长

Fig. 1 Growth of *R. meliloti* at different pH value inoculated 24 h

的 Fahraeus 无氮营养液继续培养。50 d 后植株结瘤数量及地上部生物产量见表 2。表 2 表明, 低 pH 抑制苜蓿结瘤和植株生长。与对照处理(pH6.5)比较, pH4.5 处理后, 苜蓿结瘤总数减少了 16.9%。在 Fahraeus 无氮营养液培养条件下, 植株地上部分鲜重也相应降低了 15.3%。

表 2 低 pH 对苜蓿结瘤及生长影响 (50 d)

Table 2 Effect of low pH on the nodulation and growth of alfalfa after inoculated 50 d

pH 值 pH value	6.5	4.5
总瘤数(个·株 ⁻¹) Total nodules(nodules·plant ⁻¹)	9.3±0.2 A	7.7±0.2 B
地上部分鲜重(mg·株 ⁻¹) FW of aerial parts (mg·plant ⁻¹)	118.3±2.3 A	98.5±1.1 B

2.4 低 pH 对根毛变形的影响

植株对酸度最敏感的时期几乎与根毛变形的时期相一致, 或稍早一些(Djordjevic 等, 1987)。根瘤菌与豆科植物形成固氮根瘤是一个复杂的过程, 在形态学上宿主植物对根瘤菌入侵最早的反应是根毛的卷曲。其中, 豆科植物与根瘤菌共生互作过程中的信号识别是一种双向的信号分子交换过程(李庆远, 1983)。接种根瘤菌条件下, 如果根瘤菌与其宿主植物间无应答反应, 宿主根毛是直的(图 2:a), 而被根瘤菌侵染的宿主根毛出现弯曲(图 2:b、图 2:c)、分枝(图 2:d)等变形现象(图 2)。

将 Fahraeus 无氮营养液酸度分别调节为 pH6.5、pH5.0、pH4.7、pH4.5 和 pH4.2, 植入苜蓿幼苗, 同时接种 *R. meliloti*, 处理 24 h 后观察苜蓿根毛变形率(表 3)。

由表 3 可知, 接种 *R. meliloti* 条件下, pH5.0、pH4.7、pH4.5、pH4.2 处理 24 h 后, 苜蓿根毛变形

受到极显著的抑制,根毛变形率分别比对照(pH6.5)减少了44.1%、56.4%、60.0%和69.0%。这表明 *R. meliloti* 侵染苜蓿根时,根瘤菌在与宿主植物进行相互识别的过程极显著地受到低 pH 抑制。

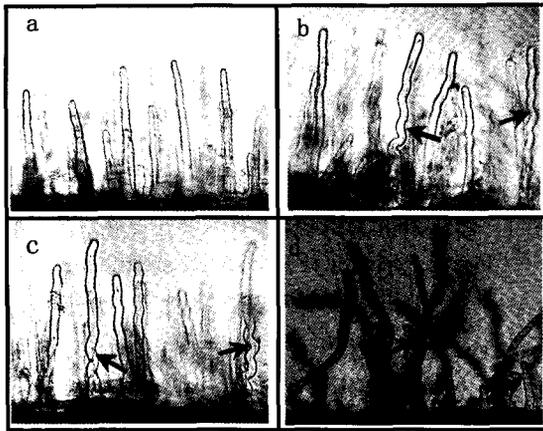


图2 不同处理下苜蓿根毛的变形情况(×160)

Fig. 2 Root hair deformation in different treatment on alfalfa (×160)

a. 对照; b, c. 根毛弯曲; d. 根毛分枝。

a. CK; b, c. Root hair contorted; d. Root hair branched.

表3 接种根瘤菌不同 pH 对苜蓿根毛变形的影响

Table 3 The effect of different pH at root hair deformation inoculated *R. meliloti*

pH 值	pH value	根毛变形率	Root hair deformation (%)
6.5		36.24±2.71	A
5.0		20.26±1.59	B
4.7		15.80±1.19	C
4.5		14.48±1.23	CD
4.2		11.22±1.22	D

表4 低 pH 对苜蓿根毛变形的影响

Table 4 Root hair deformation at low pH

pH 值	根毛变形率 Rate of RHD (%)	
	NF(+)	NF(-)
6.5	41.88±3.13A	3.78±0.56a
4.5	22.65±1.88B	3.43±0.24a

从植物根部分泌出的类黄酮化合物,诱导根瘤菌结瘤基因的表达,结果产生一种叫做 NF 的脂寡糖的合成和分泌(Truchet 等,1991)。在没有根瘤菌存在的情况下,NF 可使对应的宿主植物出现根毛分枝、弯曲及膨胀等变形现象,即根毛变形试验(root hair deformation assay,简称 Had 试验)(Peters 等,1986)。纯化的苜蓿根瘤菌 NF 在极低浓度就可使苜蓿出现 Had 表型(Dénarié 等,1993;Schultze 等,1994;Long,1996;Downie 等,1999)。

杨国平等研究发现,NF 只需与根毛接触 4 h 左右,即能诱导根毛变形(杨国平等,1996)。NF 是根瘤菌引起寄主根毛变形的结瘤信号,高浓度的 NF 甚至可以诱导寄主根系形成空的根瘤(Stokkermans 等,1994)。本研究发现,在苜蓿种子分泌物诱导下根瘤菌合成和分泌的 NF 可以诱导苜蓿根毛发生变形(图 2)。表 4 结果显示,在加入 NF 的情况下,低 pH(4.5)对苜蓿根毛的变形具有极显著的抑制作用,根毛变形率减少了 45.9%;而在不添加 NF 也不接种 *R. meliloti* 的情况下,根毛变形率很低(表 4)。低 pH(4.5)对苜蓿根毛变形无显著影响,说明缺乏结瘤信号诱导条件下低 pH 本身并不抑制苜蓿根毛的变形。

3 讨论与结论

豆科植物的共生结瘤受到多种因素的影响(慈恩等,2005)。研究表明,低 pH 抑制苜蓿根系的结瘤(表 2),这与 Vargas 和 Graham 在沙培条件下 pH 对菜豆根瘤菌竞争结瘤能力影响的研究结果一致(Vargas 等,1989)。低 pH 抑制共生固氮结瘤是多因素共同作用的一系列因果关系,表现为一系列根系的生理和形态学上的应答反应(杨国平等,1996;Spaink 等,1991)。在苜蓿根系周围有根瘤菌存在的情况下,根部分泌出的类黄酮化合物,诱导根瘤菌结瘤基因的表达,产生 NF。NF 是根瘤菌引起寄主根毛变形的结瘤信号,在 NF 的作用下,根瘤菌侵染苜蓿根系,导致苜蓿根毛变形——结瘤初期的应答反应。可见,根系结瘤的过程实质上就是根瘤菌与苜蓿根系间相互作用的结瘤信号诱导、传导和应答反应过程。在根瘤菌与苜蓿根系间相互作用过程中,无论哪一环节受到抑制,都可能会阻碍苜蓿根系结瘤。

在低 pH 条件下影响紫花苜蓿结瘤的因素:首先,根系生长受阻(表 1)抑制了苜蓿的结瘤(表 2)。苜蓿根系生长受阻使其吸收水分、养分的能力下降,光合作用降低,影响了结瘤过程中植物向根瘤菌提供糖类和 ATP 能量,从而减弱了根系的结瘤能力。第二,根瘤菌生长受阻,导致结瘤信号分子数量的减少和活性的降低;影响信号分子的修饰、分解,降低产生有生物活性的物质(Rao 等,1995)的能力,根瘤菌侵染根系能力降低,nod 基因的表达受到的抑制等(Cooper 等,1995),从而影响苜蓿的结瘤。Hohenberg 等(1984)和 Munns(1970)也报道土壤的酸性条件抑

制根瘤菌在土壤中的存活率,从而减少植物的结瘤。第三,根瘤菌与根系之间的相互作用过程受阻。结瘤过程中任何妨碍二者间交流的因素均可能导致结瘤过程受阻。根毛变形是根毛对根瘤菌入侵和 NF 诱导植物共生结瘤初期的应答反应,根毛变形受阻,势必影响苜蓿的结瘤。低 pH 条件下,接种根瘤菌或添加 NF 粗提物情况下,苜蓿根毛变形都受到低 pH 的抑制(表 3、4),致使苜蓿结瘤受阻。而在不接种根瘤菌也无 NF 存在的情况下,低 pH 对苜蓿根毛变形无显著影响(表 4),这说明缺乏结瘤信号诱导条件下低 pH 本身并不抑制苜蓿根毛的变形。可见,低 pH 抑制了根毛对结瘤信号的感应,在低 pH 胁迫下,结瘤信号传递受阻,根毛变形受到阻碍并最终抑制了苜蓿的结瘤。

当然,本研究仅侧重于低 pH 对结瘤信号的传导方面做了初步的探讨,苜蓿结瘤的影响机制还有很多,在今后的研究中进一步深入。

参考文献:

- 李庆逵. 1983. 中国红壤[M]. 北京:科学出版社,74—193
- 杨国平,朱军,徐苏芸,等. 1996. 根瘤菌 NF 的微量生物检测法[J]. 微生物学通报,23(1):56—57
- Austin-phillips S, Bingham E T, Koegel R G. 1994. Production of industrial and animal feed enzymes in transgenic alfalfa[J]. *Springer link*, 721:234—242
- Ci E(慈恩), Gao M(高明). 2005. Research advances in the effects of environmental factors on the symbiotic nitrogen fixation of legumes(环境因子对豆科共生固氮影响的研究进展)[J]. *Acta Bot Boreali-occident Sin*(西北植物学报), 25(6):1 269—1 274
- Cooper J E, Rao J R, Everaert E, et al. 1995. Metabolism of flavonoids by *Rhizobia* IA. Tikhonovch(eds). Nitrogen Fixation, Fundamentals and Applications[M]. Netherland: Kluwer Academic Publishers;287—292
- Dénarié J, Cullimore J. 1993. lipo-oligosaccharide nodulation factors; a new class of signaling molecules mediating recognition and morphogenesis[J]. *Cell*, 74:951—954
- Djordjevic M A, Remond J W, Batley M, et al. 1987. Clovers secrete specific phenolic compounds which either stimulate or repress nod gene expression in *Rhizobium trifolii*[J]. *EMBO*. 6, 1 173—1 179
- Don Comis. 2002. New alfalfa may be ideal for poor soils [EB/OL]. <http://www.ars.usda.gov/is/pr/2002/020125.htm>, 2002—01—04
- Downie J A, Walker S A. 1999. Plant responses to nodulation factors[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2 :483—489
- Guo YJ(郭彦军), Huang JG(黄建国). 2006. Study on *Medicago sativa* L. growth in acid soils(紫花苜蓿在酸性土壤中的生长表现)[J]. *Acta Prat Sci*(草业学报), 15(1):84—89
- Hohenberg J S, Munns D N. 1984. Effect of the soil acidity factors on the nodulation and growth of *Vigna unguiculata* in solution culture[J]. *Agron J*, 76:477—481
- Liu MY(刘美艳), Zhang J(张健), Zhang W(张伟). 2004. Study on enhancement of cold resistance of *Trifolium* by Ca^{2+} (Ca^{2+} 提高白花苜蓿抗冷性的研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), 24(2):174—177
- Liu MZ(刘明志). 2005. The *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and characteristics of *Medicago sativa* (根瘤农杆菌对苜蓿的转化及其特性)[J]. *Guihaia*(广西植物), 25(2):121—12
- Long S R. 1996. *Rhizobium symbiosis*; Nod factors in perspective [J]. *Plant Cell*, 8:1 885—1 898.
- Mahler R L. 2002. Impacts and management of soil acidity under direct seed systems—status and effects on crop productions[R]. Direct seed conference, CA, January, 16—18
- Munns D N. 1970. Nodulation of *Medicago sativa* L. in solution culture V. Calcium and pH requirement during infection[J]. *Plant Soil*, 32:90—102
- Peters N K, Frost J W, Long S R. 1986. A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes [J]. *Science*, 233:977—980
- Rao J R, Cooper J E. 1995. Soybean nodulating *Rhizobia* modify nod gene induces Daidzein and geniste into yield aromatic products that can influence gene-inducing activity[J]. *MPMI*, 8(6): 855—862
- Roche P, Faucher C, denarie J, et al. 1991. Molecular basis of symbiotic host specificity in *Rhizobium meliloti*; nodH and nodPQ genes encode the sulfation of lipo-oligosaccharide signals[J]. *Cell*, 67:1 131—1 143
- Schultze M, Kondorosi E, Ratet P, et al. 1994. Cell and molecular biology of *Rhizobium*-plant interactions[J]. *Int Rev Cytol*, 156: 1—75
- Spaink H P, sheeley D M, van Brussel A A N. 1991. A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipo-oligosaccharide Signals determines host specificity of *Rhizobium*[J]. *Nature*, 354: 125—130
- Stokkermans T J W, Peters N K. 1994. *Bradyrhizobium elkaii* lipo-oligosaccharide signals induce complete nodule structures on Glycine Soja Seibold et al. [J]. *Zucc Planta*, 193:413—420
- Stout D G. 1994. Growth of alfalfa on acid soils when established with pre-inoculated coated seed[M]. *Africulture and AgriFood Canada*;87—110
- Truchet G, Roche P, Lerouge P, et al. 1991. Sulphated lipo-oligosaccharide signals of *Rhizobium meliloti* elicit root nodule organogenesis in alfalfa[J]. *Nature*, 351:670—673
- Vargas A A T, Graham P H. 1989. Cultivar and pH effects on competition for nodule sites between isolates of *Rhizobium* in beans[J]. *Plant soil*, 117:195—200
- Zhang J(张健), Liu MY(刘美艳), Xiao W(肖炜). 2002. The toxic effect of Hg^{2+} on alfalfa leaves(Hg^{2+} 对苜蓿叶片的毒害效应)[J]. *Guihaia*(广西植物), 22(6):553—556