

固氮根瘤菌(*Azorhizobium*) 在人工诱发小麦类根瘤中的固氮作用*

陈廷伟

(中国农业科学院土壤肥料研究所, 北京 100081)

Siegfried Scherer

(Bacteriological Institute, Faculty of Agriculture, Technical University München, D-8050 Freising, Germany)

Peter Böger

(Lehrstuhl für Physiologie und Biochemie der Pflanzen, Universität Konstanz, D-7750 Konstanz, Germany)

摘 要

用低浓度类似于植物生长激素吲哚乙酸的合成物 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)处理小麦根部能诱发瘤状结构(类根瘤)。结瘤小麦植株生长不受 2,4-D 处理影响。这些类根瘤可被从热带豆科植物毛萼田菁(*Sesbania rostrata*)茎瘤中分离的耐氧茎瘤固氮根瘤菌(*Azorhizobium caulinodans*)侵染,使类根瘤内的细胞间隙和细胞内有大量菌体增殖。有茎瘤固氮根瘤菌拓殖的类根瘤不仅能还原乙炔,而且还能将固定的氮素转移给植株,向结瘤小麦提供 16—23% 的氮素。

关键词 固氮根瘤菌、固氮、根瘤、小麦

对根瘤菌-豆科植物共生关系已有大量研究^[1,2],其目的不仅在于了解有关分子原理,而且也为了在重要的非豆科农作物中建立共生关系。1954 年前已有报道指出^[3],植物激素可以激发非豆科植物形成假瘤状结构。近来,有人重新研究这一现象,以促进根瘤菌和非豆科植物之间的人工共生^[4-6]。而且,还发现用细胞壁降解酶可诱发禾本科植物产生瘤状结构^[7]。用遗传学方法改变的根瘤菌接种水稻时,偶尔也能观察到有瘤状结构^[8]。这些人工诱发的含菌“瘤状”结构可以称之为“类瘤”(Para-nodule)^[9]。聂廷富^[4]首次报道以 2,4-D 诱发小麦根部假瘤结构可为根瘤菌侵染。然而,并无明显证据支持根瘤菌在诱发结构的细胞内生长,也未证明有固氮活性。近来,已有报道表明根瘤菌真能侵入小麦根部的假瘤细胞内^[5,10,11],但也未能测出固氮活性。为了使小麦类根瘤固氮,我们用不同氧压条件和从热带豆科植物毛萼田菁(*Sesbania*

1992-02-21 收稿, 1992-04-22 收修改稿

* 总理基金资助项目

茎瘤中分离到的茎瘤固氮根瘤菌(*Azorhizobium caulinodans*)^[12, 13]作为接种菌株. 这种特殊菌株能够在比较高的氧分压下, 在液体培养中表达高固氮率^[14, 15]. 本文报道有关固氮根瘤菌在诱发小麦根瘤中的固氮作用研究结果.

一、材 料 和 方 法

1. 生物材料 试验用小麦品系为 CA836(北京中国农业科学院), 菌种为茎瘤固氮根瘤菌(*Azorhizobium caulinodans* ORS571)(比利时菌种保藏中心菌系号 LMG 6465). *A. caulinodans* ORS 571-R3 是从诱发小麦根瘤中再分离出菌株, 用于比较接种效果.

2. 液体培养中类根瘤诱导 种子表面用 Incidin(含有甲醛、乙二醛、戊二醛和乙醇的溶液, 德国 Dusseldorf, Henkel 生产)杀菌 15 min 后, 以无菌水洗 3 次. 将种子置于湿滤纸上, 在暗处 24°C 下经 48—60 h 发芽后移入有滤纸条支架及含有 20 ml 灭菌无氮营养液的玻管(30 mm × 200 mm)中. 植物培养在 $580 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ 光照条件下, 当幼苗三片叶时, 加入 $5 \mu\text{mol/L}$ 2,4-D 及固氮根瘤菌(5×10^8 细胞 ml^{-1})处理. 以不处理或只加 2,4-D 或只加根瘤菌为对照.

3. 乙炔还原测定 麦苗接种根瘤菌后 15—20 天, 以水充分冲洗再以 Incidin 表面杀菌 5 min. 然后以无菌水冲洗, 将整株麦苗移入反应瓶中(先抽去氧气再注入氩气, 然后按比例加入氧气和 10% V/V 的乙炔), 置于 28°C 光照为 $400 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ 条件下, 用气相色谱仪测定乙炔还原活性^[16].

4. 电子显微镜 将培养 15—20 天的类根瘤固定在 2.5% 戊二醛 / 25 mmol/L 磷酸氢钾液中, pH 为 6.8. 然后再以 1% 锇酸固定, 在丙酮 / 丙烯氧化系列脱水后包埋于 Spurr's 树脂中. 切成超薄切片后在饱和乙酸 / 50% 甲醇中染色 30 min, 再经 0.02% 柠檬酸铅染色 5—7 min, 在日立 H-500 电子显微镜下观察.

5. ^{15}N 稀释法试验 在加有标准无氮营养液的 2 kg 灭菌土 / 砂各半的钵中培养麦苗, 以灭菌蒸馏水灌溉. 在麦苗三叶期时, 加入 100 ml 的 $5 \mu\text{mol/L}$ 2,4-D 溶液和固氮根瘤菌(5×10^8 细胞 ml^{-1}). 接种用的菌株分别用 ORS 571 原菌株或从小麦根瘤中再分离出的菌株 ORS 571-R3. 在麦苗 5 叶期时, 再加 100 ml 2,4-D 和孕穗期加 200 ml 2,4-D 溶液. 约在培养 90 天后成熟期时收取植株, 用水充分洗根, 经 70°C 干燥 48 h 后称重、粉碎、过筛后取 150 mg 样品, 用凯氏法分析总氮或以质谱仪分析 ^{15}N . 每盆加入含 3.35% 的标记氮肥 33.3 mg. 应用 ^{15}N 同位素稀释法公式计算植株中来自空气中氮素^[17].

二、结 果 和 讨 论

在我们所有试验中, 以 $5 \mu\text{mol/L}$ 2,4-D 溶液处理麦根后, 10 天内都能诱发出类根瘤. 诱发类根瘤呈圆球形或圆锥形, 直径约为 1—2 mm (图版 I-A). 在液体培养中, 每株麦苗根上能形成 20—30 个瘤; 而在土培中, 每株有一百多个瘤. 在液培中, 与不加 2,4-D 的对照植株相比, 处理植株根系较少. 但在土培中两者并无差别, 经生物量测定, 植株生长正常, 不受处理影响. 用光学显微镜观察证明, 类根瘤起源于根的中柱鞘并有维管束相联; 和对照细胞相比, 类根瘤组织中 DNA 含量增加约 1 倍^[18]. 这和一些有关根瘤菌-豆科共生中瘤状组织为多倍体的报告相似^[19].

电子显微镜观察中看出, 根瘤菌先在类根瘤细胞间隙增殖(图版 I-B), 然后进入瘤细胞内

(图版 I-C). 已有报告指出,根瘤菌侵入豆科植物瘤内有两个途径. 大多数情况是根瘤菌从根毛侵入根内,从卷曲的根毛尖侵入后形成侵入线. 含有细菌的侵入线有一层纤维外壁,不断增生进入根内皮层的细胞间和细胞内^[2]. 经大量切片观察,我们与 Bender 等^[11] 尚未发现在小麦类根瘤内有侵入线. 我们尚不知道固氮根瘤菌如何进入初生瘤组织,但在豆科植物中,偶尔也有不经侵入线侵入根内的. Chendler^[20] 曾报道,根瘤菌对豆科花生的侵入只在形成侧根的部位,在根毛和表皮及皮层细胞连接处进入根内. 菌体先经由胞间层进入在细胞间隙分布,然后通过变态细胞结构进入皮层细胞. 花生(*Arachis hypogaea*)可能作为阐明生长素诱发小麦类根瘤的侵入过程的一种模式. 和豆科根瘤的类菌体相似,在小麦类根瘤细胞内的根瘤菌也形成聚- β -羟基丁酸颗粒,并在菌体细胞质膜和寄主细胞质之间有一明显的间隔(图版 I-D). 偶尔也发现类菌体外有一层周膜(Peribacteroid membrane)^[18].

类根瘤内的细菌检定已通过再分离和柯赫定律(Koch's Postulates)证实. 在对照试验中,麦苗株内无内生细菌检出.

根据陈廷伟^[5,10] 和 Bender 等^[11] 以往的研究,用一般根瘤菌(*Rhizobium* 或 *Brady-Brady-rhizobium*)接种麦苗的类根瘤未能测出任何乙炔还原活性. 这是由于根瘤菌内的固氮酶对氧非常敏感,而小麦根瘤内缺乏有除氧功能的豆血红蛋白,因而无固氮作用. 然而,从热带豆科植物毛茛田菁茎瘤中分离出的固氮根瘤菌,可在液体纯培养中相当高的氧浓度下高效能固氮^[14,15]. 本文用此菌接种到小麦类根瘤中,可测出明显乙炔还原活性. 如表 1 所示,即使在 18% 氧浓度下也观察到乙炔还原作用;而在降低氧压时,还原活性显著增强,这是由于固氮酶活性随氧压降低而被诱导增强. 如对照试验表明(表 2,3),乙炔还原主要是由于根瘤菌在类根瘤内拓殖所致. 与豆科植物固氮作用相比,这样的固氮活性仍然相当低,但至少也比本底高

表 1 接种 *Azorhizobium* 的小麦根瘤在不同氧压下固氮酶活性^{a)}

试验处理	乙炔还原量 (n mol C ₂ H ₄ /株)		
	24 h	48 h	72 h
对照 1: 只有麦苗, 无菌, 无 2,4-D	0	0	0
对照 2: 2,4-D 处理麦苗, 无菌	0	0	0
对照 3: 只接种 <i>Azorhizobium</i> ORS 571, 不加 2,4-D	0	0	0
2,4-D, <i>Azorhizobium</i> ORS 571, 18% 氧气, V/V	9.6	16.5	19.1
2,4-D, <i>Azorhizobium</i> ORS 571, 9% 氧气, V/V	9.9	55.9	83.5
2,4-D, <i>Azorhizobium</i> ORS 571, 4.5% 氧气, V/V	20.2	102.7	167.5

a) 表中根面经 Incidin 杀菌 5 min; 数据为 5 株麦苗平均值

表 2 接种 *Azorhizobium* 的诱发小麦根瘤固氮酶活性(1)^{a)}

试验处理	乙炔还原量 (n mol C ₂ H ₄ /株)		
	18 h	42 h	61 h
对照 1: 只有麦苗, 无菌, 无 2,4-D	0	0	0
对照 2: 2,4-D 处理麦苗, 无菌	0	0	0
对照 3: 麦苗只接种 <i>Azorhizobium</i> ORS 571-R3, 不加 2,4-D	0.24	6.97	29.97
麦苗接种 <i>Azorhizobium</i> ORS 571-R3 并以 2,4-D 处理	1.78	78.25	223.43

a) 表中根面未经杀菌; 在含氧 14% 反应瓶中测定; 数据为 6 株麦苗平均值

表3 接种*Azorhizobium*的诱发小麦根瘤固氮酶活性(2)^{a)}

试验处理	乙炔还原量 (n mol C ₂ H ₄ / 株)		
	18 h	42 h	61 h
对照 1: 只有麦苗, 无菌, 无 2,4-D	0	0	0
对照 2: 2,4-D 处理麦苗, 无菌	0	0	0
对照 3: 只接种 <i>Azorhizobium</i> ORS 571-R3, 不加 2,4-D	0	0	7.53
麦苗接种 <i>Azorhizobium</i> ORS 571-R3 并以 2,4-D 处理	0.14	13.27	61.85

a) 表中根面经 75% 乙醇杀菌 1 min; 在含氧 14% 反应瓶中测定, 数据为 6 株麦苗平均值

一个数量级。结瘤麦苗每株含有细菌数约为 $0.4 - 4 \times 10^8$ 个, 相当于每株大豆根瘤中含菌数的 0.05%。4.5% 含氧条件下, 结瘤麦苗乙炔还原率最高约为每株每小时 4 nmol 乙烯, 而大豆的乙炔还原率可高达 10—200 nmol 乙烯/h/株。显然, 这一数据和植株结瘤量及含有根瘤菌数有关。在我们人工培养体系中(表 1—3), 结瘤麦苗乙炔还原率虽较低, 但和豆科植物相比仍在同一数量级。

在表 1—3 所示条件下, 固氮酶活性导入类根瘤内可能并不必需在寄主和固氮根瘤菌之间建立起“共生关系”。这或可证明, 最高乙炔还原率是在诱导之后发生, 因为这只在低氧浓度下才观察到。而且, 在植株的乙炔还原测定培养过程中, 固氮根瘤菌还可能增殖。因此, 在这样的试验中还不能推断所固定的氮素已原位转移给小麦植株。为此, 我们在土培的更自然条件下, 测试了根瘤菌在麦苗根瘤的氮素平衡中是否真有贡献。在 ¹⁵N 标记肥料的盆栽试验中(表 4), 我

表4 细菌固氮对结瘤和不结瘤麦苗氮素平衡的贡献^{a)}

试验处理	植株氮素百分率来源于:		
	空气	肥料	土壤
对照: 无细菌, 无 2,4-D	0	1.41 ± 0.13	98.59 ± 0.13
<i>Azorhizobium</i> ORS 571 无 2,4-D	11.56 ± 14.52	1.25 ± 0.21	87.19 ± 14.31
<i>Azorhizobium</i> ORS 571, 加 2,4-D	28.00 ± 10.50	1.02 ± 0.15	70.98 ± 10.34
<i>Azorhizobium</i> ORS 571-R3, 无 2,4-D	16.89 ± 9.76	1.17 ± 0.13	81.94 ± 9.62
<i>Azorhizobium</i> ORS 571-R3, 加 2,4-D	39.56 ± 9.61	0.85 ± 0.13	59.59 ± 27.66

a) 表中数字表示植株含氮量的分配, 数据为 5 盆, 每盆 10 株的平均值($\bar{X} \pm SD$)

们用 ¹⁵N 同位素稀释法^[17] 检测了植株氮素来源。试验中以不接种根瘤菌而其它处理相同的非固氮植株为对照。在不加 2,4-D 而只接种固氮根瘤菌 ORS 571 的处理盆中, 植株平均有 11.6% 的氮素来自空气。显然, 这是由于富含水分的土壤生态体系中发展起的微通气小生境(niches), 有利于根瘤菌的固氮活性表达(可与 Boddey and Dobereiner (1988) 的及 New 和 Kennedy (1989) 报告的固氮螺菌/根际联合比较)。而在以 2,4-D 诱发并接种根瘤菌的类根瘤处理中, 固氮量增加到 28%。固氮根瘤菌 ORS 571-R3 菌株是由小麦类根瘤中分离出又用于重新接种麦苗。这一菌株对小麦氮素平衡贡献更大。表 4 说明, 高达 39.6% 的小麦植株氮素是来自空气。减去对照值(表 4 中只接种固氮根瘤处理的联合固氮量), 仍约有 16—23% 的氮素可供给人工诱发的固氮根瘤菌/小麦联合共生体系。对于寄主植株向固氮根瘤菌转移碳素养分的机制还不清楚, 设想固氮根瘤菌只是利用从类根瘤细胞膜渗出的碳

水化合物。

在豆科植物中,根瘤菌/豆科植物共生的一个主要特征是其共生体和寄主的专一性^[1]。然而,在诱发的类根瘤中似乎并无专一性。因为,不只是固氮根瘤菌,而且不同种根瘤菌和固氮螺菌都可以进入类根瘤(材料未附)。在我们试验中是应用灭菌培养基,而在天然条件下不仅有固氮菌,也可能有其它土壤微生物进入根内。在可能作出任何深远推测以前,在人工条件下建立的固氮根瘤菌/小麦“共生”特性必须要求有土壤细菌存在的自然环境中研究。为了在这样条件下获得明确结果,一种经遗传工程改造的能产生多量吡啶乙酸的固氮根瘤菌可能有用。因为,目前正在研究固氮根瘤菌的分子生物学,其中许多技术对于早日实现这一目标是必需的。

致谢 感谢中国农业科学院谢应先、陈婉华、于代冠和韩凯参加部分工作。陈廷伟的部分试验工作是在康斯坦茨大学受德国汉诺威大众汽车公司基金会资助完成的。

参 考 文 献

- [1] Long, S. R., *Cell*, **56**(1989), 203 — 214.
- [2] Rolfe, B. G. & Gresshoff, P. M., *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **39**(1988), 297 — 319.
- [3] Arora, N., Skoog, F. & Allen, O. N., *Am. J. Bot.*, **46**(1954), 610 — 613.
- [4] 聂延富, 自然杂志, **6**(1983), 5:326.
- [5] 陈廷伟等, 自然杂志, **11**(1988), 3:163.
- [6] Tchan, Y. T. & Kennedy, I. R., *Agricultural Sciences* (Melbourne), **2**(1989), 57 — 59.
- [7] Al-Mallah, M. K. et al., *J. Exp. Bot.*, **40**(1989), 473 — 478.
- [8] Rolfe, B. C. & Bender, G. L., in *Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives* (Eds. Gresshoff, P. M. et al.), Chapman and Hall, New York, London, 1990, 779 — 780.
- [9] Kennedy, I. R. et al., *Trans. 14th Int. Congr. Soil Sci.* (Kyoto), **III**(1990), 146.
- [10] 陈廷伟, 非豆科作物固氮研究进展, 中国农业科技出版社, 北京, 1989, 3 — 10.
- [11] Bender, G. L. et al., in *Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives* (Eds. Gresshoff, P. M. et al.), Chapman and Hall, New York, London, 1990, 825.
- [12] Dreyfus, B. et al., *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **38**(1989), 89 — 98.
- [13] Tsien, H. C. et al., *J. Bacteriol.*, **156**(1983), 888 — 897.
- [14] Dreyfus, B. L. et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**(1983), 711 — 713.
- [15] De Bruijn, F. J., in *Plant-Microbe Interactions*, Vol. III (Eds. Kosuge, T. and Nester E. W.), McGraw Hill, New York, 1989, 457 — 493.
- [16] Weisshaar, H. & Böger, P., *Arch. Microbiol.*, **136**(1983), 270 — 274.
- [17] Rennie, R. J. & Rennie, D. A., *Can J. Microbiol.*, **29**(1983), 1022 — 1035.
- [18] 于代冠等, 非豆科作物固氮研究进展(陈廷伟主编), 中国农业科技出版社, 北京, 1989, 150 — 157.
- [19] Allen, O. N. & Allen, E. K., *The Leguminosae*, the University of Wisconsin Press, Wisconsin, 1981, 63.
- [20] Chandler, M. R., *J. Exp. Bot.*, **29**(1978), 749 — 755.