

^{32}P 标记玉米联合固氮菌在植株内分布的研究

李凤汀 刘荣昌 杨则瑗 汪文燕

(河北省科学院微生物研究所 保定 071051)

摘 要

利用 ^{32}P 标记根际克雷伯氏菌(*Klebsiella rhizosphere sp. nov*) m-112 菌株,研究其对玉米植株的侵染与固氮作用。结果发现,标记菌株 m-112 接种玉米幼苗后,能迅速侵入到植株根、茎、叶组织中,并在其中定居繁殖。从根、茎(叶鞘+叶基)、叶组织中重新分离得到大量的 m-112 菌体细胞。乙炔还原法测得植株根、茎、叶片的固氮酶活性分别为 133, 81, 29nmol $\text{C}_2\text{H}_4/\text{株}\cdot\text{h}$ 。测得随时间延长玉米植株各器官的放射强度增加,在放射自显影底片上可清楚看到菌体细胞在植株根、茎、叶组织中的分布情况。从而揭开了禾本科植物联合固氮的秘密,打破了根际固氮的传统观念。

关键词 玉米; ^{32}P 标记 m-112 菌株; 联合固氮

自巴西学者 Dobereiner 发现禾本科植物根系存在联合固氮菌后,20 年来联合固氮应用研究有了很大发展^[1-4]。但联合固氮菌与禾本科植物间的密切关系及在植株内的分布,研究报道甚少。本文采用 ^{32}P 标记玉米联合固氮菌株,研究其对玉米植株的侵染、分布、增殖及固氮酶活性。

1 材料和方法

1.1 材料

(1) 菌种:根际克雷伯氏菌(*Klebsiella rhizosphere sp. nov*) m-112 菌株,系作者从玉米根系分离筛选,固氮酶活性 4180nmol $\text{C}_2\text{H}_4/\text{g}$ 鲜菌体 $\cdot\text{h}$ 。

(2) 玉米品种:四单 12,系河北省种子公司提供。

(3) 标记磷素:标记磷酸二氢钾($\text{KH}_2^{32}\text{PO}_4$),中国农科院原子能研究所生产。

1.2 试验方法

(1) 培养基(g/L):苹果酸氢钠 4.3,葡萄糖 5.0, KH_2PO_4 0.2, $\text{K}_2\text{HPO}_4\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.1, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, NaCl 0.1, $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.02, FeCl_3 0.01, $\text{NaMoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.002, 酵母膏 0.2, 蒸馏水 1000ml, 添加 $\text{KH}_2^{32}\text{PO}_4$ 5 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ 。琼脂 15.0, pH6.5-7.0。

(2) ^{32}P 标记菌株的制备:利用含 ^{32}P 培养基的平板接种 m-112 菌株,28℃ 培养 40h 后刮下菌苔,用生理盐水稀释后,25000rpm 离心,弃去上清液取菌泥,如此重复多次,直至上清液放射强度低于本底强度的 10% 或为零时,停止洗涤离心,收集菌体转移到培养液中,活化 1 小时

备用。

(3) ^{32}P 标记 m-112 菌株(以下简称 $^{32}\text{Pm}-112$ 菌株)接种玉米幼苗:玉米种子用 0.2% HgCl_2 消毒 15 分钟,无菌水洗数次,置 4% 蔗糖培养基平板上催芽,当胚根露白时,选择无杂菌污染的种子定植在经过灭菌的沙土管中,置 20°C 光照培养箱中贫瘠培养^[5]。当玉米长出第一片真叶时,分别接种 $^{32}\text{Pm}-112$ 菌悬液、含 ^{32}P 培养基及 m-112 菌悬液各 0.5ml。接入 ^{32}P 培养基和 $^{32}\text{Pm}-112$ 菌悬液的总放射强度之比为 1:0.29。接种后继续培养 5 小时,3 天,5 天,7 天时各取玉米幼苗按根、茎、叶分别制样,测定各器官 ^{32}P 的放射强度。

(4) ^{32}P 放射强度和植株放射自显影:采用 FJ-367 通用闪烁探头,配合 HF-408 自动定标器测定植株各器官内的放射强度,以 cpm/株(根、茎、叶)表示。同时作整株玉米的放射自显影。

(5)固氮酶活性测定:采用乙炔还原法测定各植株各器官的固氮活性,以 $\text{nmolC}_2\text{H}_4/\text{株}$ (根、茎、叶)表示。

2 结果与讨论

2.1 接种 $^{32}\text{Pm}-112$ 菌株后玉米植株的放射强度

用 $^{32}\text{Pm}-112$ 菌悬液,含 ^{32}P 培养基和 m-112 菌液各 0.5ml 分别接种玉米幼苗后,继续培养 5 小时,3 天,5 天,7 天,取出植株,冲洗干净根部砂土,置 105°C 烘箱中烘至恒重,按根、茎、叶分别剪碎,测定各器官的放射强度,见图 1。由图 1 可见用 $^{32}\text{Pm}-112$ 菌悬液接种的玉米幼苗,同单质 ^{32}P 接种的一样,仅 5 小时在植株的根、茎、叶片各器官均表现出明显的 ^{32}P 放射强度,而接 m-112 菌液和不接菌的对照观测不到放射强度。随培养时间的延长,根部的放射强度逐渐减少,茎、叶的放射强度逐渐增加。土壤中 $^{32}\text{Pm}-112$ 和 ^{32}P 的放射强度之比约为一个固定值

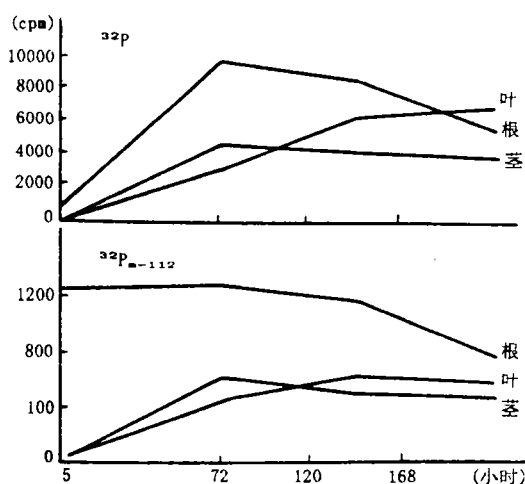


图 1 $^{32}\text{Pm}-112$ 和单质磷进入玉米植株的速度

(0.63-0.69:1.0);5 小时后, $^{32}\text{Pm}-112$ 菌株和单质 ^{32}P 在根部放射强度之比为 0.11-0.13:1.0,接近一个常数。说明 $^{32}\text{Pm}-112$ 和 ^{32}P 进入根的速度相当。由根进入茎的速度 $^{32}\text{Pm}-112$ 菌株几乎呈直线上升,而单质 ^{32}P 从 5 小时后则是逐渐增加,三天后进入速度减慢。从茎进入叶的速度 $^{32}\text{Pm}-112$ 比单质 ^{32}P 慢,这可能与自显影图上在叶舌处形成的环状节有关。 $^{32}\text{Pm}-112$ 菌体是主动进入还是被动进入或两者兼有之,有待进一步研究。

$^{32}\text{Pm}-112$ 菌株接入玉米植株 3 天内,植株干物重低于接 ^{32}P 培养基的植株,这显然是菌体生命活动消耗了植株养分,5 天以后植株干物重超出接 ^{32}P 培养基的 11-30%,表明菌株进入植株后没有不良影响,且有促进植株干物质积累作用。

2.2 $^{32}\text{Pm}-112$ 接种玉米植株的放射自显影

将接种 $^{32}\text{Pm}-112$ 菌株、 $m-112$ 菌株、 ^{32}P 培养基的玉米和不接种的玉米植株作放射自显影, 进一步研究 $m-112$ 菌株在植株内运行、积聚和分布。结果接种 ^{32}P 标记菌株和接入 ^{32}P 的植株样在底片上都形成清晰的植株图像, 接 $m-112$ 菌株和不接菌的对照都未出现植株图像。可见玉米幼苗接种 $^{32}\text{Pm}-112$ 菌株和接入 ^{32}P 5 天的植株各器官的放射自显影图像在底片中黑度较强, 植株根系、叶鞘、叶片, 甚至主叶脉和分叶脉都清晰可辨。尤其接 $^{32}\text{Pm}-112$ 菌的植株的叶舌部位出现黑度很强的环状叶节, 即叶环。接 ^{32}P 的植株则没有。这种现象可能是由于植株输导组织变窄, 进入植株的标记菌体积聚造成的。这也说明了 $^{32}\text{Pm}-112$ 进入叶的速度比 ^{32}P 慢的原因。试验充分说明玉米联合固氮菌 $m-112$ 菌株首先趋向根组织, 在某些根毛区积聚、增殖, 而后由未角质化的根毛进入根组织中, 通过皮层细胞间隙进入木质部的导管, 继而运行到根、茎、叶组织中。所以玉米植株根、茎、叶组织中均有 $m-112$ 菌株存在。

2.3 接种 $^{32}\text{Pm}-112$ 菌株的玉米固氮酶活性

$^{32}\text{Pm}-112$ 接种玉米后, 采用乙炔还原法测定植株根、茎、叶各器官的固氮酶活性, 结果从接种 $^{32}\text{Pm}-112$ 菌株 7 天、17 天的玉米根、茎、叶各器官上均能测得明显的固氮酶活性, 其中以根部的固氮活性最高, 分别为 36.8 ± 3.1 和 $133.0 \pm 9.5 \text{ nmol C}_2\text{H}_4/\text{株} \cdot \text{小时}$, 茎为 30.1 ± 1.7 , 81.0 ± 2.1 , 叶为 33.0 ± 1.9 , $29.0 \pm 0.9 \text{ nmol C}_2\text{H}_4/\text{株} \cdot \text{小时}$ 。但是接种 ^{32}P 的玉米幼苗和不接菌的对照都没有测到固氮酶活性。说明 $^{32}\text{Pm}-112$ 菌株不仅侵入根组织, 也侵入到茎和叶片组织中, 并在其中定居繁殖, 表达出显著的固氮酶活性。

2.4 $^{32}\text{Pm}-112$ 接种玉米的显微镜观察与菌体回接

取接种 $^{32}\text{Pm}-112$ 菌株 7 天的玉米幼苗样在无菌条件下作根、叶鞘、茎基和叶片徒手切片, 在光学显微镜下观察, 发现在根、鞘和叶片组织、维管束及细胞间隙里都存在很多运动着的菌体细胞。这些细胞可随液流作同向运动, 也可逆流相相反方向运动。同时取不同培养时间的玉米幼苗, 洗净消毒后各器官在无菌条件下分别磨碎, 作稀释平板计数, 结果见表 1。

从表 1 可见玉米幼苗接菌后 7 天, 根、茎、叶组织中均分离到 $m-112$ 菌体细胞, 且根组织含菌量最多。

14 天以后随培养时间的延长, 根组织中含菌量逐渐降低, 茎、叶组织中含菌量逐渐增加, 可超出根组织含菌量几倍到几十倍。很显然这时 $^{32}\text{Pm}-112$ 菌株的主要栖居场所已从根部转移到茎、叶组织, 这种现象可能是由于植株光合产物诱导的结果, 菌株能更容易地获得各种营养。从玉米幼苗各器官分离获得的菌体细胞经纯化培养可测定到更高的固氮酶活性, 叶 265, 茎 225, 根 $141 \text{ nmol C}_2\text{H}_4/\text{管小时}$, 一般规律为叶 > 茎 > 根。

表 1 玉米植株含菌量

处 理	时间(天)	根/单株	茎/单株	叶/单株	全 株
^{32}P		0.0	0.0	0.0	0.0
$^{32}\text{Pm}-112$	7	4.0×10^4	0.8×10^4	4.3×10^4	9.1×10^4
^{32}P		0.0	0.0	0.0	0.0
$^{32}\text{Pm}-112$	14	0.2×10^4	1.3×10^4	35.0×10^4	36.4×10^4
^{32}P		0.0	0.0	0.0	0.0
$^{32}\text{Pm}-112$	27	1.4×10^4	210×10^4	260.0×10^4	531.4×10^4

