

类黄酮促进根瘤菌侵染油菜根系的研究^①

胡小加 黄沁洁 张学江

(中国农业科学院油料作物研究所 武汉 430062)

Philip Stone Kenneth O'Callaghan Edward Cocking

(诺丁汉大学生命科学系 诺丁汉 NG7 2RD 英国)

摘 要 本文报道在类黄酮的作用下, 田菁固氮根瘤菌 *Azorhizobium caulinodans* ORS 571 (p^{XLGD4}) 侵染油菜根系的研究结果, 侵染部位为侧根缝隙。类黄酮能有效地提高侵染率。显微镜观察发现, 细菌能在细胞间隙移动并存在于根内外皮细胞间隙, 通过乙炔还原法测定到低的固氮酶活性。从油菜根系分离出的细菌回接到原寄主(田菁)上能形成有效根瘤。

关键词 类黄酮; 根瘤菌; 油菜

早在一百多年前, 科学家们已发现并证实了豆科植物和根瘤菌共生并能有效地固定空气中的氮气。目前最有效的生物固氮系统是根瘤菌—豆科和弗兰克氏放线菌—林木植物共生体系, 细菌在植物体内特别组织中固氮, 此组织被称根瘤。大部分被固定的氮为植物所吸收^[1]。但象在玉米—固氮螺菌的联合固氮体系中, 固氮螺菌侵染的主要部位为玉米根的表面, 但固定的氮仅有少量为玉米所利用^[2]。现有的研究结果证明根瘤菌能侵染玉米、小麦和水稻的根系, 但侵染率较低^[3]。

田菁固氮根瘤菌 ORS 571 能在田菁的茎和根上结瘤。瘤子是由根瘤菌通过细胞裂缝侵染而形成的, 但不形成侵染线, 在根瘤内细菌转变成类菌体并固氮^[4]。同时, ORS 571 具有其它根瘤菌不能相比的是, 其在氧浓度相对高的条件下(12 μ M 可溶解氧)能够固定氮^[5]。本研究以 Lac Z 为报告基因, 采用三亲本杂交标记 ORS 571, 所得菌株 ORS 571 (p^{XLGD4}) 用作试验。在油菜根部接种根瘤菌加或不加类黄酮能明确地发现所接种的根瘤菌。通过根瘤菌在油菜侧根细胞缝隙间移殖内生(LRC_s), 得到根瘤菌的侵染频率, 以及类黄酮所起的作用等。这些结果为今后进一步深入研究根瘤菌—非豆科作物的相互关系和细菌肥料在油菜上的应用打下坚实的基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

(1) 根瘤菌菌株 用 Lac Z 基因标记的田菁固氮根瘤菌 ORS 571 (p^{XLGD4}) 由英国诺丁汉大学生命科学系提供。

(2) 油菜品种 中油 821, 由本所开发处提供。

(3) 类黄酮 黄烷酮(Naringenin); 异黄酮(Daidzein); 黄烷醇(Quercetin); 黄酮(Chrysin)。

① 国家、湖北省自然科学基金(基金号分别为: 39470016, 97J046)和中国农科院院长基金(基金号: 9715~14)项目。

它们都来自美国西克玛化学公司。

1.2 试验方法

1.2.1 油菜种子的处理、培养、加类黄酮及接种根瘤菌

种子用 0.1% HgCl_2 进行常规表面灭菌, 在 26℃ 下催芽, 待种子萌发后将其转入到 25×150mm 大小含有 20ml 半固体无氮培养基试管中, 放置在 26℃ 黑暗条件下培养 1 天后, 将含有幼苗的试管置于 24℃ 光照室培养, 光照强度为 3200lx。加类黄酮的试管, 使其浓度达到 $5 \times 10^{-5} \text{mol/L}$; 根瘤菌 (1×10^8 细胞 ml^{-1}) 的接种量为 200 μl 。处理分为空白对照, 根瘤菌对照, 黄烷酮对照, 异黄酮对照, 黄烷醇对照, 黄酮对照和黄烷酮加根瘤菌, 异黄酮加根瘤菌, 黄烷醇加根瘤菌, 黄酮加根瘤菌共 10 处理, 每处理各 50 个重复 (24 个用于 Lac Z 基因检测, 26 个用于固氮酶活性测定)。

1.2.2 Lac Z 基因的检测及显微镜观察

在油菜生长 2 周后, 将油菜完整的根部剪下, 放入用二甲基甲酰胺溶液所配制的含 2% x-gal (5-溴-4-氯-3-吡啶- β -半乳糖苷) 溶液中, 在 26℃ 黑暗条件下放置 14 小时, 便能观察。通过组织化学染色, 及 Lac Z 基因所产生的 β -半乳糖苷与 x-gal 起兰色反应, ORS 571 (p^{XIGD4}) 在侧根两侧 (入侵处) 形成兰色, 即侧根细胞间隙间移殖内生 (LRCs)^[6]。将根部兰色部分切下, 采用 Epon 812 环氧树脂包埋、切片、甲基胺兰染色及光学显微镜观察^[7]。

1.2.3 固氮酶活性测定

当油菜生长至 28 天时, 取生长在试管中的完整油菜根系, 用“日立 163”型气相色谱仪测定其固氮酶活性 (乙炔还原法)^[8]。

1.2.4 根部内含菌的分离、回接、抗血清制备和抗血清凝集反应

油菜生长 2 周后, 取幼苗的根, 常规表面灭菌后, 平板分离, 取单菌落纯化, 用纯分离物作回接试验。抗血清制备和抗血清凝集反应按文献^[9]描述的方法进行。

2 结果与分析

2.1 ORS 571 (p^{XIGD4}) 侵染油菜根系的 LRCs 和固氮酶活性测定

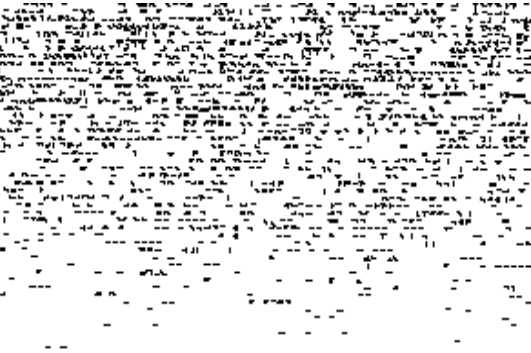
油菜生长 14 天后, 根部接有 ORS 571 (p^{XIGD4}) 以及加或不加类黄酮, 根瘤菌都能从侧根缝隙侵入, 并沿着细胞间隙向内延伸, 从外皮层至内皮层细胞间均有根瘤菌的分布 (图 1)。从图 1 可看出根瘤菌是从侧根缝隙入侵的, 并通过细胞间隙移动, 并在细胞间隙形成含菌区 (箭头所指)。

油菜接种根瘤菌加不同的类黄酮, 所得 LRCs 百分率和固氮酶活性不同 (表 1)。从表 1 可以看出黄烷酮促进根瘤菌入侵的效果最佳, LRCs (%) 为 40.6, 异黄酮次之, 而黄烷醇和黄酮的效果不理想。当油菜生长至 28 天时, 黄烷酮加根瘤菌和异黄酮加根瘤菌的处理每株根系分别有 1~3 和 1~2 个类根瘤形成, 而黄烷醇加根瘤菌、黄酮加根瘤菌和仅接种根瘤菌的处理, 类根瘤形成不明显 [BFQ], 而其它处理无类根瘤形成。表 1 还可看出, [BF] 黄烷酮的固氮酶活性最高为 82.2nmol C_2H_4 /株/小时。

2.2 油菜根内菌的分离、回接及抗血清反应

从油菜根中分离出的细菌, 经纯化后回接到原寄主植物田菁上。在接种 14 天后能在其上

结瘤,并能与ORS 571(p^{XLGD4})产生抗血清反应。证明所分离的菌为原接种的根瘤菌ORS 571(p^{XLGD4})。



放大倍数为 400, 主根(1), 侧根(2)

图 1 植物细胞间隙充满根瘤菌

3 结语

豆科植物根的分泌物,特别是黄烷酮和异黄酮,对根瘤菌的繁殖和定居起重要作用。根瘤菌的结瘤基因由这类物质的诱导而表达,它们结构成分的细微差异可能改变作用的性质。甚至产生相反的性质,抑制侵染和结瘤。受植物类黄酮物质诱导的是结瘤基因中称为共同结瘤基因(nod A B C),所有根瘤菌都具有这些基因^[10]。在油菜上应用黄烷酮和异黄酮能有效地提高根瘤菌的侵染率和固氮酶活性。油菜根的分泌物中可能不含类黄酮物质,或是所含的类黄酮物质在浓度上和种类上不能有效地诱导根瘤菌的结瘤基因,这些为今后提出了新的研究课题。

致谢 本研究的 部分工作是在英国诺 汉大学生命科学系受英国皇家学会资助完成的。

参 考 文 献

1 Xylona P. Symbiotic nitrogen fixation. *Plant Cell*, 1995, 7: 869 ~ 885

2 Okon Y. Azospirillum as a potential inoculant for agriculture. *Trends Biotechnol*, 1985, 3: 223 ~ 228

3 Cocking E C. Altering the specifidity control of the interaction between rhizobia and plants. *Symbiosis*, 1992, 14: 123 ~ 130

4 Dreyrus B. Nitrogen fixation bacterium isolated from sesbania rostrata. *Bacteriol*, 1988, 38: 89 ~ 98

5 Buijijn F. The unusual symbiosis between the diazotrophic stem ~ nodulating bacterium *Azorhizobium caulin-*
odans ORS 571 and the tropical legume sesbania rostrata. *Plant and Soil*, 1989, 114: 457 ~ 462

6 Hartwig U A. Flavonoids released naturally from alfalfa seeds enhance growth rate of *Rhizobium meliloti*. *Plant*
Physiol, 1991, 95: 797 ~ 803

7 Huang J. Ultrastructure of bacterial penetration in plants. *Plant Cell*, 1986, 176: 1913 ~ 1923

8 胡小加等. 诱发油菜结瘤固氮的研究. *中国油料*, 1993, 4: 42 ~ 44

9 Vincent J M. Factors controlling the legume—rhizobium symbiosis. In: Newton W E et aleds *Nitrogen Fixa-*
tion. University park press, 1980, 108 ~ 129

10 李阜棣编著. 土壤微生物学. 中国农业出版社, 1996. 201 ~ 203

表 1 油菜接种根瘤菌加不同类黄酮 LRCs 百分率
及固氮酶活性 (nmol C₂H₄/ 株/ 小时)

处理	LRC _s (%) ±SE(%)	固氮酶活性±SE
CK	0	0
N	0	0
D	0	0
Q	0	0
C	0	0
R	8. 6±2. 3	6. 8±3. 1
R+ N	40. 6±12. 5	82. 2±18. 5
R+ D	34. 4±10. 2	67. 9±15. 2
R+ Q	19. 3±5. 8	17. 1±7. 2
R+ C	15. 1±3. 6	11. 3±6. 8

* CK—空白对照; R—根瘤菌; N—黄烷酮; D—异黄酮; Q—黄
烷醇; C—黄酮; n₁= 24; n₂= 26