植物营养与肥料学报 2002,8(4):462～466
Plant Nutrition and Fertilizer Science

铁营养对花生根瘤生长发育和功能的影响

左元梅，刘永秀，张福锁
（中国农业大学植物营养系，北京 100094）

摘要：通过营养液培养试验研究了铁对花生根瘤生长发育和功能的影响。结果表明，铁营养能够明显地提高花生地上部含氮量和总吸氮量。与对照相比，介质中供铁浓度为 80μmol/L 时地上部含氮量和总吸氮量分别提高了 2.0%和 11.7%，表明铁直接参与了固氮过程；当铁浓度在 0～80μmol/L 范围时，铁对根瘤起始点数量没有影响，而对可见根瘤数、根瘤重量和固氮酶活性影响较大。与对照相比，铁浓度为 80μmol/L 时可见根瘤数和根瘤重量分别提高了 194%和 87%，都达到极显著水平。单株花生固氮酶活性和单位根瘤固氮酶活性分别提高了 126%和 10%。这表明铁营养主要是影响花生根瘤的生长发育，进而影响其根瘤的固氮功能。

关键词：铁；根瘤发育；固氮酶；花生
中图分类号：S154.38^{+}1；S143.7　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1008-505X(2002)04-0462-05

Effects of the iron nutrition on nodule development and nitrogen-fixing functions of peanut

ZUO Yuan-mei, LIU Yong-xiu, ZHANG Fu-suo
(*Department of Plant Nutrition, China Agricultural University, Beijing 100094, China*)

Abstract: The effects of the iron nutrition on nodule development and nitrogen-fixing functions of peanut were studied in nutrient solution culture experiment. The major findings were summarized as follows: In nutrient solution culture with a supply of 80μmol/L Fe (EDTA-Fe), the N content and N uptake of peanut shoot have increased by 2.0 % and 11.7% as compared with control, respectively. The results showed that iron was involved in nitrogen-fixing process directly. When the supply of EDTA-Fe was of the range of 0～80μmol/L, iron had great effects on excisable nodule, nodule dry weight and nitrogenase activity, but had no effect on number of nodule initials. The excisable nodule number and nodule dry weight had increased by 194% and 87% as compared with control, respectively, and the nitrogenase activity of per plant and special nitrogenase activity of peanut had increased 126% and 10%. The results showed that iron nutrition had important effects on nodule development first, and then had great effects on nitrogen-fixation functions of peanut nodule.

Key words: iron nutrition; nodule development; nitrogenase activity; peanut

铁是直接参与豆科作物共生固氮的重要营养元素之一，它是固氮酶、豆血红蛋白、铁氧还蛋白等含铁蛋白的重要金属组分。固氮酶约占根瘤菌细胞全蛋白质的 10%～12%，而豆血红蛋白占侵染植物细胞可溶性蛋白的 25%～30%[1]。根瘤菌-豆科植物识别侵染后，根瘤生长发育和维持功能所需的铁完全依靠寄主豆科植物供应[2,3]。实践证明，共生固氮体系对铁的相对需求程度比豆科植物本身要高，缺铁对依靠固氮生长的豆科植物比依靠矿质氮生长的影响更大；在多种豆科作物中，缺铁可抑制豆科作物结瘤，使固氮酶活性显著降低，从而影响产量和品质[4,5]。因此，铁在豆科作物共生固氮中占有重要

收稿日期：2002-01-15
基金项目：国家自然科学基金资助项目(30170185)
作者简介：左元梅(1969—)，女，河北万全人，博士，副教授，硕士生导师，主要从事间作作物体系高效利用养分资源的研究。

的地位。

花生是华北地区重要的油料作物。然而，花生缺铁黄化现象在石灰性土壤地区极其普遍，是花生高产、稳产的主要限制因子之一。黄淮海平原广泛实行的玉米/花生间作制度对改善花生的铁营养具有非常明显的效果[6]。尽管大量研究表明，豆科作物在单作条件下，铁直接参与豆科作物的固氮过程并对其共生固氮产生重要影响，但在我国玉米/花生间作这一农业生产种植体系中，花生铁营养的改善对其固氮的影响如何，这方面的研究在国内外几乎为空白。可以推测，在玉米花生间作体系中，一方面，玉米可通过竞争花生根际氮而对花生固氮产生影响，另一方面，玉米可通过改善花生铁营养而影响花生固氮。为此，为了明确玉米改善花生铁营养对花生共生固氮影响是否占主导地位及其贡献，本研究通过营养液培养试验，探讨了环境介质中铁浓度的变化对花生根瘤发生、发育和固氮性能的影响，旨在了解铁营养和和硝态氮对花生根瘤发生、发育和固氮性能影响的本质差异，为进一步明确间作体系中玉米改善花生铁营养对花生共生固氮的影响及机制提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　试验设计

供试花生品种为海花 1 号。将花生种子用 10% H_2O_2 在暗处消毒浸泡 30min 后用水冲洗，在滤纸上浸入饱和 $CaSO_4$ 溶液催芽，遮光条件下在石英砂中发苗，待花生幼苗生长 2 片叶时，移植到营养液中。营养液组分为：0.25 mmol/L KH_2PO_4，2 mmol/L Ca $(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$，0.75 mmol/L K_2SO_4，0.01 mmol/L H_3BO_3，0.65 mmol/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$，0.001 mmol/L $MnSO_4 \cdot H_2O$，1.0×10^{-3} mmol/L $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$，5.0×10^{-4} mmol/L CuSO4 · $5H_2O$，5×10^{-5} mmol/L $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$。试验处理设 6 个铁水平（EDTA－Fe），即 Fe 0、10、20、40、80 和 160 μmol/L，每盆种植 5 株花生，每个处理 3 次重复。移栽后的花生首先在完全营养液中培养 1 周，随后进行铁营养处理，6d 后用含有 10^6 个根瘤菌的 3201 的营养液接种 4d，中间换一次含菌营养液，花生继续生长 20d 后收获。每盆取 3 株用于乙炔还原力和各部分含铁量的测定，另外 2 株用于根瘤起始点的观察。

1.2　样品观察及分析

1.2.1　根瘤原基点观察　将收获的花生根系，首先用自来水冲洗干净，然后再用无菌水清洗并置于 1∶3 的乙醇/乙酸溶液中，在 4℃ 冰箱内保持数月固定。用 121℃/10 min 高压灭菌的 10% KOH 溶液浸洗固定好的花生根系，直至根系棕色消失并变白。老的根系还要在 5% NaOCl 溶液中浸泡 10～20 min，使其完全变白，漂白的根系用灭菌的去离子水冲洗，并在 1% 的 HCl 溶液中浸泡 5 min，随后取出根系再用灭菌的去离子水冲洗数次，最后在 0.1% 亮绿（$C_{37}H_{34}N_2Na_2O_9S_3$）溶液中染色 10～30 min，取出置于灭菌去离子水中过夜脱色，在解剖镜下观察根瘤起始点，并计数[7]。

1.2.2　乙炔还原力测定　获取花生根系，立即放于干净自制的 650mL 密闭容器中，然后注入高纯乙炔气 50mL，在 25℃ 无光条件下反应 1h 后，抽取 0.5mL 待测气体，用日本岛津公司生产的气相色谱 GC－14B(FID)测定乙烯释放量。测定条件：柱温 80℃，进样口温度 100℃，检测器温度 150℃，载气流量 50 kPa，氢气流量 50 kPa，空气流量 50 kPa。

1.2.3　植株全铁全氮含量的测定　花生植株分为地上部、地下部和根瘤分别收获后，样品经过 60℃ 烘干后进行测定。全铁含量：称取一定量磨碎混匀的烘干植物样品，在马福炉中于 550℃ 下灰化 7～8h，灰分用 1∶30 HCl 溶解，用原子吸收分光光度计测定。全氮含量：浓 $H_2SO_4 - H_2O_2$ 消煮，凯氏法定氮法[8]测定。

2　结果与分析

2.1　铁营养对花生根瘤生长发育的影响

2.1.1　根瘤起始点　根瘤起始点数目包括可见根瘤数和不可见的根瘤起始原基数量（图 1）；铁对根瘤起始点的影响如图 2 所示。介质中供铁浓度≤80μmol/L 时，铁对根瘤起始点数量影响不大，而介质中供铁浓度在 160μmol/L 时，根瘤起始点数量明显减少，其差异达 5% 显著水平。这些结果表明，介

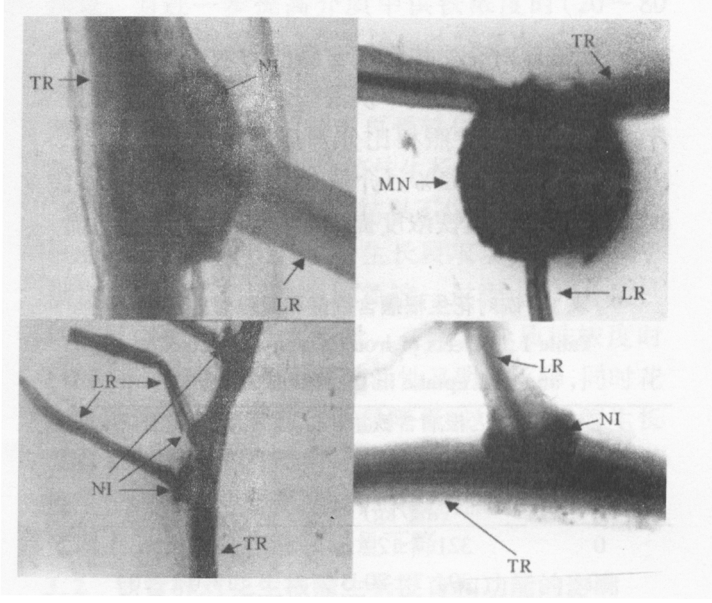

图 1　根瘤原基观察结果

Fig. 1　Dissecting microscope of nodule initiation of peanut

(TR-主根 Taproot，LR-侧根 Lateral root，NI-根瘤原基 nodule initiation)

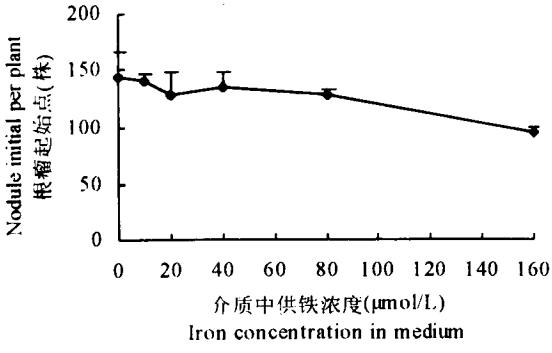

图2 铁对花生根瘤发育点的影响

Fig. 2 Effect of iron on nodule initiation of peanut

质中供铁浓度≤80 μmol/L 时,铁对花生-根瘤菌间的识别、侵染和形成根瘤起始原基无影响,而高铁浓度(160 μmol/L)对花生-根瘤菌间的识别、侵染和形成根瘤起始原基具有一定的抑制作用。

2.1.2 可见根瘤数和根瘤重量 铁对可见根瘤数和根瘤重量的影响(图3)表明,根瘤数随介质中供铁浓度的提高而增加,当铁浓度超过 80 μmol/L 时,可见根瘤数又开始下降。Duncan's 多重比较表明,介质中供铁浓度为 80 μmol/L 时,可见根瘤数最多,与对照相比提高了 194%,差异达 1%显著水平。根瘤重量也随铁浓度的提高而增加,铁浓度超过 40μmol/L 时又开始下降。Duncan's 多重比较发现,介质中供铁浓度为 40 μmol/L 时,根瘤重量最高,与对照相比提高了 118%,差异达 1%显著水平。可见根瘤数和根瘤重量与介质中供铁浓度之间有明显的相关性。

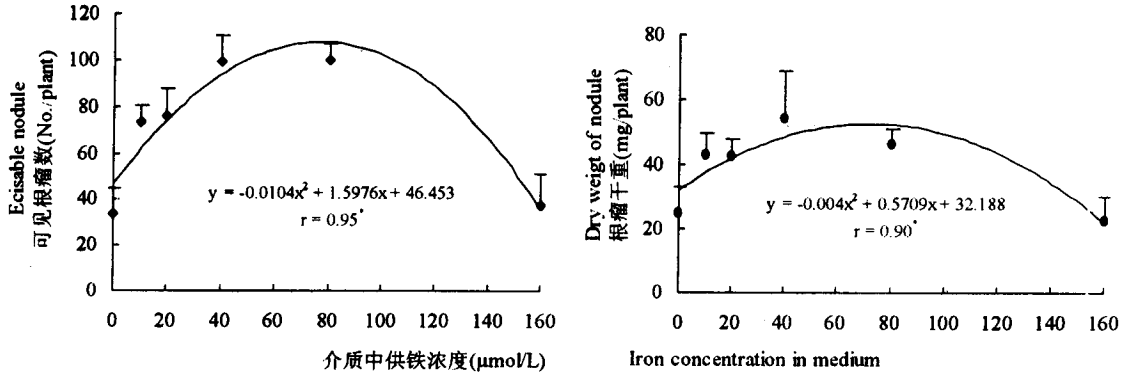

图3 铁对花生可见根瘤数和根瘤干重的影响

Fig.3 Effects of iron on excisable nodule number and nodule dry weight of peanut

2.2 铁营养对花生根瘤铁含量的影响

表1看出,随介质中供铁浓度的提高,花生根瘤含铁量增加,与对照相比分别提高了 23%、50%、103%、157%和 232%。介质供铁浓度≤80μmol/L 时,根瘤吸铁量随铁浓度提高而增加,与对照相比分别增加 112%、159%、340%和 379%;当介质中供铁浓度为 160μmol/L 时,根瘤吸铁量又明显下降,与 80μmol/L 时吸铁量相比,下降 34.2%。这与 160μmol/L 时可见根瘤数和根瘤重量下降相一致。

表1 铁对花生根瘤含铁量和吸铁量的影响

Table 1 Effects of iron on iron concentration and iron uptake in the nodule of peanut

铁浓度 Iron Concen. (μmol/L)	根瘤含铁量 Iron content in nodule (mg/kg)	根瘤吸铁量 Iron uptake of nodule (μg/plant)
0	321.7±29.6	8.0±2.6
10	394.7±20.3	17.0±2.0
20	483.8±28.1	20.7±3.3
40	652.0±108.5	35.2±9.1
80	828.3±111.2	38.3±1.8
160	1069.5±122.2	25.2±10.1

2.3 铁营养对花生根瘤固氮功能的影响

单株花生固氮酶活性和单位根瘤固氮酶活性随铁浓度提高而增加,当铁浓度超过 40μmol/L 时又开始下降。在铁浓度为 0~80μmol/L 范围内,与对照比各处理单株固氮酶活性分别提高 15%、126%、174%和 126%,单位根瘤固氮酶活性分别提高 9%、22%、21%和 10%(图4)。

2.4 铁营养对花生植株中含氮量的影响

花生地上部含氮量与介质中供铁浓度的关系可分为三个变化阶段(表2),即:1) 当介质中供铁浓度较低时(0~10 μmol/L),花生地上部含氮量随介质中供铁浓度提高而下降(4.4%); 2)在铁浓度为 20

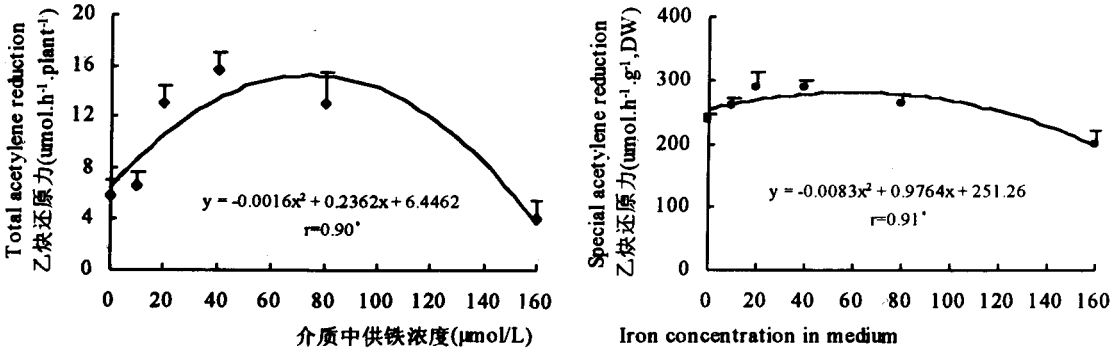

图 4　铁对花生单株固氮酶活性和单位根瘤固氮活性的影响

Fig.4　Effects of iron on total acetylene reduction and special acetylene reduction of peanut

～80 μmol/L 时，花生地上部含氮量随铁浓度增加而提高，分别比对照提高了 0.8%、5.9% 和 2.0%；3)当铁浓度为 160 μmol/L 时，花生地上部含氮量与对照相比下降 5.7%。这些结果表明，当介质铁浓度极低时，由于花生植株主要受缺铁胁迫，随着提高介质中供铁浓度，植株生长迅速而产生的稀释效应造成植株含氮量下降。当介质中供铁浓度超过 10 μmol/L 时，花生植株生长开始主要受氮的限制，因而进一步提高介质中供铁浓度，促进了根瘤发育，增强了固氮活性，提高了地上部含氮量。当介质中供铁浓度提高到 160 μmol/L 时，高铁浓度可能抑制了根瘤生长发育和功能，但并没有影响花生植株的正常生长，因而花生植株地上部含氮量又下降。

花生总吸氮量如表 2 所示。花生吸氮量首先随介质中供铁浓度提高而增加，而在 160 μmol/L 时又明显下降。供铁浓度为 40 和 80 μmol/L 时的花生吸氮量比对照分别提高 11.3% 和 11.7%。

表 2　铁对花生地上部氮含量和总吸氮量的影响

Table 2　Effect of iron on shoot N concentration and N uptake per plant of peanut

铁浓度 Iron concen. (μmol/L)	地上部氮含量 N content of shoot (g/kg)	总吸氮量 Total N uptake (mg/plant)
0	19.7±0.2	36.9±0.7
10	18.8±0.1	37.0±0.2
20	19.9±0.2	38.8±0.9
40	20.8±0.3	41.0±1.1
80	20.1±0.1	41.2±1.4
160	18.6±0.2	38.1±1.2

3　讨论

3.1　铁营养与作物共生固氮的关系

根瘤菌能有效地固氮，不仅可满足自身对氮素营养的需求，又能供寄主植物利用，根瘤菌通过固氮可为豆科作物提供其所需的 1/3～2/3 的氮素；同时豆科作物也为根瘤菌提供了适宜的生活环境和生长发育所需要的能源[9,10]。增加介质中的铁能够提高豆科植物的根瘤数、根瘤重和固氮酶活性，进而增加植物体内的氮含量；施用铁肥植物固氮速率的增加先于植物生长的增加[11~13]。本研究结果表明，在不供铁时，花生植株地上部含氮量较高(19.68g/kg)，而含铁量较低(140mg/kg)，表明花生植株生长主要受铁供应不足的限制，当介质中的铁浓度提高到 10 μmol/L 时，花生地上部含氮量降低 4.4%，而含铁量略增，表明花生植株开始受氮供应不足的限制，这可能主要是由于根瘤固氮还受铁不足胁迫所致。当进一步提高介质中供铁浓度时(20～80 μmol/L)，花生地上部含氮量和总吸氮量明显提高，这与根瘤固氮酶活性提高同步(图 4，表 2)，表明此时根瘤生长发育和功能不再受铁供应的抑制，固氮酶活性较高，满足了花生植株生长所需要的氮，因而地上部含氮量提高。以上结果不仅说明花生固氮对铁的相对需求量比其本身生长要求多，而且证明了铁直接参与了花生共生固氮这一过程，提高介质铁浓度可以提高植株含氮量。在较高介质铁浓度时(160 μmol/L)，根瘤固氮酶活性又明显下降，同时花生植株地上部含氮量也明显降低，这表明根瘤生长发育和功能对高铁毒害比花生植株更敏感，此时根瘤生长发育和功能受抑制，而植株生长正常，因而花生地上部含氮量和总吸氮量下降。

3.2　铁营养对花生根瘤生长发育和功能的影响

据报道，缺铁主要影响花生根瘤的发育，并指出类菌体繁殖对缺铁最敏感[7,13]；而另外的研究认为，白羽扇豆缺铁主要影响根瘤的发生，缺铁抑制了根瘤菌诱导的初始分生组织的进一步分化，导致根

瘤无法形成[14]。本研究结果表明,当介质中供铁浓度处于0～80μmol/L时,根瘤起始点几乎没有变化(图2)。说明在此范围内,根瘤菌与豆科植物之间的识别、侵染和形成根瘤原基等过程不受铁的影响。但当介质中供铁浓度较高时(160μmol/L),根瘤起始点数目明显减少,说明过高的铁浓度可能影响了根瘤菌和花生间的识别和侵染,导致根瘤原基无法形成。也有研究表明,根瘤菌成功侵染豆科植物可能需要低铁环境[15],铁能够调控参与根瘤菌侵染的基因表达[16],因此,低铁不影响根瘤菌侵染,但是过高的铁浓度却能够抑制根瘤菌侵染寄主植物。

铁对花生可见根瘤数和根瘤重量的影响与对根瘤起始点的影响不同。在0～80μmol/L铁浓度范围内,随着介质中铁浓度的提高,花生的可见根瘤数和根瘤重量明显增加(图3)。表明铁主要是影响根瘤原基进一步发育成可见根瘤,进而影响根瘤重量。根瘤发育过程主要包括根瘤菌繁殖增生和与固氮有关的蛋白如固氮酶和豆血红蛋白等的表达合成,而与固氮酶和豆血红蛋白合成有关基因的表达却需要较高铁浓度的诱导[17~19]。因此,缺铁抑制了花生固氮酶和豆血红蛋白的表达合成,影响了根瘤发育,从而导致花生的固氮功能降低。可见,铁在豆科作物共生固氮中占有极其重要的地位。

参考文献:

[1] Dakora D F. A functional relationship between leghaemogbin and nitrogenase based on novel measurements of the proteins in legume root nodules[J]. Annals of Botany Company, 1995, 15: 49-54.

[2] Guerinot M L and Yi Y. Iron: nutrition, noxious and not really available[J]. Plant Physiol., 1994, 104: 815-820.

[3] Wittenberg J B. Siderophore-bound iron in the peribacteriod space of soybean root nodules[J]. Plant and Soil, 1996, 178: 161-169.

[4] Tang C, Robson A D and Dilworth M J. The role of iron in the (*brady*) rhizobium legume symbiosis[J]. Journal of Plant Nutrition, 1992, 15 (10): 2235-2252.

[5] Levier K. Iron uptake by symbiosythesis from soybean root nodules [J]. Plant Physiol., 1996, 111: 613-618.

[6] 左元梅,李晓林,曹一平,张福锁. 石灰性土壤上玉米/花生间作对花生铁营养的影响[J]. 植物营养与肥料学报,1997, 3(2): 153-159.

[7] O'Hara G W, Dilworth M J and Boonkerd N. Iron-deficiency specifically limits nodule development in peanut inoculated with *Bradyrhizobium* sp[J]. New phytol., 1988, 108: 51-57.

[8] 李酉开. 土壤农业化学常规分析方法[M]. 北京:科学出版社, 1983.

[9] Hirsch A M. Developmental biology of legume nodulation[J]. New Phytol., 1992, 122: 211-237.

[10] Wani S P, Rupela O P and Lee K K. Sustainable agriculture in the semi-arid tropics through biological nitrogen fixation in grain legumes[J]. Plant and Soil, 1995, 174: 29-49.

[11] Chahal P P K and Chahal V P S. Interaction of *rhizobium* and *meloidogyne incognita* on symbiotic nitrogen fixation in mungbean under different concentrations of iron[J]. Journal of Plant Nutrition, 1988, 11:821-828.

[12] Hemantaranjan A. Iron fertilization in relation to nodulation and nitrogen fixation in French bean[J]. Journal of Plant Nutrition, 1988, 11(6-11):829-842.

[13] O'Hara G W, Dilworth M J and Boonkerd N. Mineral constraints to nitrogen fixation[J]. Plant and Soil, 1988, 108:93-110.

[14] Tang C, Robson A. D and Dilworth M. J. Which stage of nodule initiation in *Lupinus angustfolius* L. is sensitive to iron deficiency [J]? New Phytol., 1991, 117:243-250.

[15] Miller J F. Coordinate regulation and sensory transduction in the control of bacterial virulence[J]. Science, 1989, 243: 916-922.

[16] Payne S M. Iron and virulence in the family enterobacteriaceae [J]. CRC Microbiol. Rev., 1988,16: 81-111.

[17] Roessler P G and Nadler K D. Effects of iron deficiency on heme biosynthesis in *rhizobium japonicum* [J]. J. Bacteriol., 1982, 149:1021-1026.

[18] Guerinot M L and Chelm B K. Bacterial γ-aminolevulinic acid synthase activity is not essential for leghemoglobin formation in the soybean/ *Bradyrhizobium japonicum* symbiosis[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1986, 83: 1837-1841.

[19] Fisher H M. The pleiotropic nature of symbiotic regulatory mutants: *Bradyrhizobium japonium nif*. A gene is involved in control of *nif* gene expression and formation of determinate symbiosis [J]. Gen. Genet., 1986, 209: 621-626.