硼对大豆结瘤和固氮作用的影响①

Ⅱ. 对根瘤结构和固氮酶活性的影响

江荣风 吴静 王贺 张福锁

（中国农业大学植物营养系，北京 100094）

摘 要

在短期无氮营养液栽培条件下研究了缺硼和正常供硼处理对大豆超结瘤突变体(nts382)及其亲本Bragg根瘤结构和根瘤固氮酶活性的影响。结果表明：1. 在缺硼条件下，无论是超结瘤突变体nts382，还是亲本Bragg，其根瘤固氮酶活性都显著下降；2. 无论是缺硼还是正常供硼处理，超结瘤突变体nts382单位鲜重根瘤活性都明显低于亲本，但由于nts382每株根瘤数和鲜重显著高于其亲本，使每株固氮酶活性明显高于亲本，植株中氮素积累总量也相应的高于亲本；3. 缺硼条件下，根瘤细胞结构发生明显改变，细胞壁凸凹不平，细胞间隙加大，含菌细胞内类菌体含量减少。这可能是硼影响根瘤细胞正常固氮功能的主要原因。

关键词 硼营养 大豆 超结瘤突变体 固氮酶活性

虽然硼是植物生长发育必需的营养元素，但对硼在植物体内的生理作用却了解不多。近年来，对硼在植物体内的直接作用研究越来越多，取得不少新的进展。有关硼对豆科植物结瘤和固氮作用的影响很早就有报道[9]，严重缺硼条件下，大豆和豌豆的结瘤作用完全受到抑制[9,11]；在缺硼土壤上施用硼肥能促进花生生长和根瘤发育，增加固氮量和荚果产量[2,3]，但是硼对豆科植物结瘤作用和固氮作用的影响机理至今尚不清楚。O'hara等(1988)根据早期观察结果认为根瘤分生组织及根瘤生长和发育可能对缺硼极其敏感[10]。对固氮蓝细菌(cyanobacteria)的研究发现，当以固氮作为唯一氮源时，固氮蓝细菌的生长就需要硼，缺硼2小时后细胞固氮酶活性降低60%[5,6]，同时发现其细胞中使固氮酶免受O_2抑制作用的糖脂外膜消失。最近又报道，缺硼豌豆根瘤细胞壁和膜结构发生明显变化，导致固氮酶活性显著下降。尽管如此，硼对豆科植物根瘤固氮作用的直接影响仍缺乏足够的证据。本文总结了用正常结瘤大豆和化学诱变的超结瘤突变体为材料研究硼对大豆超结瘤突变体及其亲本根瘤结构和固氮酶活性影响的结果，讨论了硼与固氮作用的关系。

一、材料与方法

(一)大豆结瘤基因突变体的萌发及根瘤菌接种

将大豆栽培品种Bragg cv.及从栽培种中化学诱变分离出来的超结瘤突变体nts382和不结瘤突变体nod的种子经表面消毒后，在石英砂中萌发。5天后长至3～4cm长时，将幼苗取出洗净后置于含根瘤菌液10^9cell/mL的溶液中接种25min，菌种为USDA110；然后移入水培盆中；最后将根瘤菌液平均加入各盆中。

① 国家自然科学基金资助项目
收稿日期：1996－02－12

(二)试验处理

试验设缺硼和供硼2个处理,缺硼为水培营养液中不加硼(-B);供硼(+B)为营养液中含有正常生长所需的硼浓度(5.0μ mol/L)。营养液为无氮营养液,其浓度(mmol/L)为:0.25$CaCl_2$,0.25KCl,0.5$MgSO_4$,0.13KH_2PO_4,0.13K_2HPO_4,2.35×10^{-2}FeEDTA,$5\times10^{-3}CuSO_4$,$6\times10^{-3}MnSO_4$,$2\times10^{-3}ZnSO_4$,$0.03\times10^{-3}Na_2MoO_4$,$2\times10^{-4}CoSO_4$。每处理重复3~4次,每盆种植2株,每3天换一次营养液。植株生长28天后收获。

(三)根瘤固氮酶活性的测定及根瘤结构观察

植株收获后,将根瘤摘下称重。称取500mg根瘤用乙炔还原法测定根瘤固氮酶活性。用石腊固定做根瘤微切片,用番红--固绿染色,在光学显微镜下观察根瘤的结构。

二、结果与分析

(一)硼对大豆根瘤固氮酶活性的影响

不论缺硼还是供硼处理,大豆超结瘤突变体及其亲本均能结瘤,单株根瘤数差异不大,但超结瘤突变体均显示出大量结瘤的表现型,根瘤数为亲本的7~10倍(图1),说明即使在缺硼条件下,大豆也有结瘤作用。

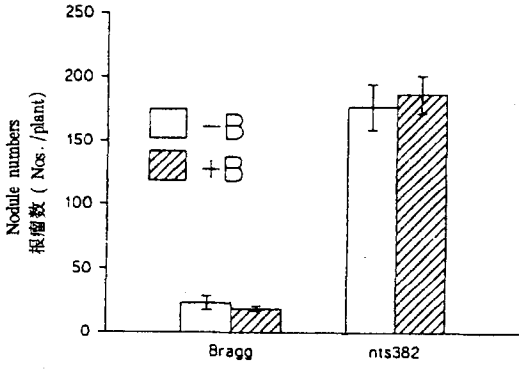

图1 硼对大豆结瘤的影响

Fig.1 Effect of boron on nodulation of soybean

在缺硼条件下,突变体和亲本的根瘤固氮酶活性均显著下降(图2)。其中突变体nts382根瘤固氮酶活性(产生C_2H_4量)由1.28μ mol·h^{-1}·$plant^{-1}$下降至0.279μ mol·h^{-1}·$plant^{-1}$,而亲本Bragg则由0.394μ mol·h^{-1}·$plant^{-1}$下降至0.132μ mol·h^{-1}·$plant^{-1}$,下降幅度为nts382大于亲本Bragg。但就是在-B条件下,突变体nts382仍然保持较高的固氮酶活性。这是由于nts382的根瘤数量远大于Bragg的结果。从植株积累的总氮量来看,缺硼处理的植株呈明显下降趋势,与固氮酶活性的变化一样。从图中还可看出,缺硼引起根瘤固氮量显著下降,其中Bragg亲本和不结瘤突变体nod49植株积累氮量比种子带来的氮量还少,这可能是由于缺硼导致细胞膜透性增加,使一些有机物外渗,而nts382较高的固氮量则是由于根瘤数较多的缘故。由此可见,在缺硼条件下,无论是超结瘤实变体还是其亲本,固氮酶活性都显著下降,从而造成固氮量也随之降低。

(二)硼对大豆根瘤结构的影响

硼易与具有顺式二元醇构型的多羟基化合物形成稳定的硼酸复合物,这种复合物常存在于细胞壁中,因此硼能对细胞壁和质膜结构的稳定起调节作用。把缺硼和正常供硼处理的根瘤分别用石腊固定做成微切片,在光学显微镜下观察其细胞结构(图4)可以看出,正常供硼处理的根瘤细胞排列紧密有序,细胞内类菌体多;而缺硼的根瘤细胞则排列松散,细胞内类菌体少,细胞壁凹凸不平,细胞间隙加大,细胞壁稳定性受到破坏。这可能是缺硼引起根瘤固氮酶活性下降的主要原因。

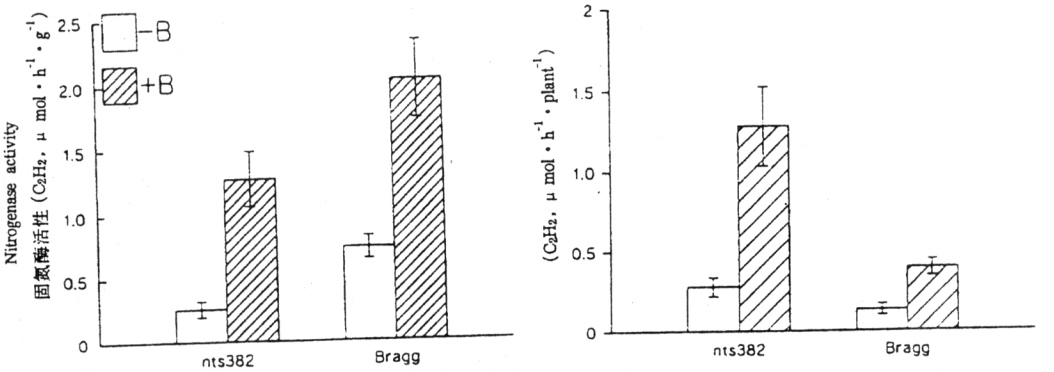

图2 硼对大豆固氮酶活性的影响

Fig.2　Effect of boron on nitrogenase activity

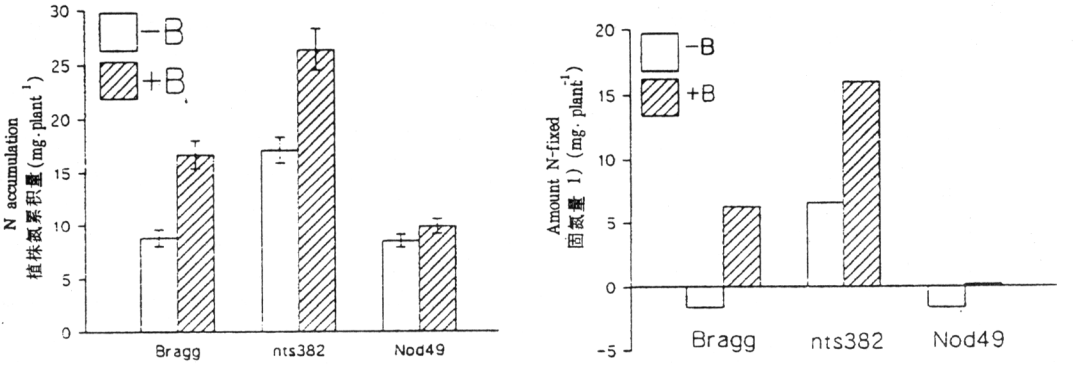

图3 硼对大豆植株氮素积累和根瘤固氮量的影响

Fig.3　Effect of boron on N accumulation of plants and N fixed by soybean nodules

1）扣除从种子中带来的氮素　Minus the N derived from seeds

-B　　+B

图4 硼对大豆根瘤结构的影响

Fig.4　Effect of boron on nodule structure of soybean

三、讨 论

缺硼条件下，两种不同结瘤基型大豆nts382和Bragg固氮酶活性都显著下降，植株中积累的总氮量也明显降低。由此可见，硼对豆科植物固氮作用有显著影响，这与其它研究结果是一致的[1,5~8]，但是，硼对根瘤固氮作用的哪一个具体过程产生了直接影响是这一机理研究的焦点。从上述结果可以看出，硼对结瘤作用虽然有影响，但缺硼植物同样可以结瘤。这可能是由于根瘤初始化过程及其后期的发育需要的硼较少，种子中的硼可能已经能够满足这一时期植株生长和根瘤发育的需求。根瘤固氮作用过程中含菌细胞需要有完整而且稳定的细胞膜系统和类菌体膜系统，一旦这些膜系统受到破坏，固氮酶的活性将受到抑制。从光学显微镜下可以看出缺硼处理的根瘤细胞壁和细胞膜稳定性下降，同时细胞间隙加大，类菌体含量少。因此，可以推论缺硼引起根瘤细胞壁和细胞膜结构发生变化才可能是硼影响固氮作用的主要原因。

参 考 文 献

1 江荣风、张福锁，1994：硼对大豆结瘤和固氮作用的影响 Ⅰ．对生长、营养元素吸收与分布和固氮量影响。植物营养与肥料学报，1：67～72。

2 江荣风，张起刚，张福锁等，1994：施硼对花生利用氮素的影响。北京农业大学学报，20(2)：218～222。

3 蔡常被，王智昭，1987：广西花生施硼技术与效果的研究。花生科技，2：15～17。

4 Bolanos J, Esteban E, Bonilla I et al, 1994: Essentiality of boron for symbiotic dinitrogen fixation in pea rhizobium nodules. Plant Physiol., 104:85～90.

5 Bonilla I, Fernandez-Valiente E, Sanchez-Maeso E, 1986: Essentiality of boron for dinitrogen fixation in Anabaena sp. PCC 7119. Plant Physiol., 81:430～433.

6 Garcia-Gonzalez M, Mateo P, Bonilla I, 1988: Boron protection for O_2 diffusion in heterocysts of Anabaena sp. PCC 71109. Plant Physiol., 87:785～789.

7 Garcia-Gonzalez M, Mateo P, Bonilla I, 1990: Effect of boron deficiency on photosynthesis and redutant sources and their relationship with nitrogenase activity in Anabaena PCC 7119. Plant Physiol. 93:560～565.

8 Garcia-Gonzalez M, Mateo P, Bonilla I, 1991: Boron requirement for envelope structure and function in Anbaena PCC 7119 heterocysts. J. Exp. Bot. 42:925.

9 Mulder E G, 1948: Investigations on the nitrogen nutrition of pea plants. Plant Soil 1:179～212.

10 O' Hara G W, Boonkerd N, Dilworth M J, 1988: Mineral constraints to nitrogen fixation. Plant Soil, 108:93～110.

11 Yamagishi M and Yamamoto Y, 1994: Effect of boron on nodule development and symbiotic nitrogen fixation in soybean plants. Soil Sci. Plant Nutr., 40(2):265～274.

EFFECT OF BORON ON GROWTH, NODULATION AND NITROGEN FIXATION OF SOYBEAN NODULATING MUTANTS AND ITS PARENT

Ⅱ. Nitrogenase activity and nodule structure

Jiang Rongfeng Wu Jin Wang He Zhang Fusuo

(Department of Plant Nutrition, China Agricultural University)

Summary

This study was undertaken to determine how boron might affect the nodulation and nitrogen fixation in a short term hydroponically cultured soybean supernodulating mutant nts382 and its parent Bragg cv. in N free solution. The results indicated that nitrogenase activity decreased significantly in both soybean genotypes under boron deficiency. In boron free culture medium, nodule cell walls changed obviously and cell arrangement was irregular, suggesting the importance of boron in the stability and normal functionality of nodule cells.

Key words Boron nutrient Soybean Supernodulating mutant Nitrogenase activity