第3卷 第3期
1997年9月

植物营养与肥料学报
PLANT NUTRITION AND FERTILIZER SCIENCE

Vol.3 No.3
Sep. 1997

果胶细菌诱导油菜结瘤与固氮研究①

胡小加　张学江　黄沁洁　江木兰

（中国农业科学院油料作物研究所　武汉　430062）

Edward C Cocking　Cordon S webster

（诺丁汉大学生命科学系　诺丁汉　NG7　2RD　英国）

摘　要

果胶细菌处理油菜幼根（2天苗龄、根长3cm），同时接种紫云英根瘤菌突变菌株（Rhizobium huakuii），诱发类根瘤的结瘤率为96.80%。从这些类根瘤中分离的菌株能回接到原寄主。类根瘤的电镜观察可以明显地见到细胞内充满了细菌。乙炔还原法测定的固氮酶活性（C_2H_4）为76.80nmol/(plant·h)。

关键词　果胶细菌　根瘤菌　油菜　类根瘤

豆科植物和根瘤菌的共生固氮为植物提供大量有效氮，它是持续农业主要的生物固氮资源。扩大共生固氮范围，探索将豆科作物的结瘤固氮功能转移到非豆科作物上，是当前生物固氮领域研究者们极感趣的问题。将固氮功能扩大到非豆科植物上，则在理论和应用上均有重大意义。聂延富通过2.4-D的作用，能使小麦根系诱导结瘤[1]；英国科学家研究了根瘤菌在水稻和油菜根系上形成类根瘤的结构，是由于利用酶降解根细胞壁，从而去掉了障碍，使根瘤菌进入植物体中[2]。陈廷伟，Tchan等通过固氮螺菌进一步证实2.4-D对小麦结瘤的作用，并称这种根瘤结构为“类根瘤”[3,4]。由果胶细菌释放的酶破坏了初生根和根毛的细胞壁，可为根瘤菌开辟了一条通路，根瘤菌通过破损的细胞壁裂缝进入，然后在细胞内繁殖，并最终使得固氮能力表达。因此，采用果胶细菌处理油菜根系并接种根瘤菌，研究其根系形成类根瘤和固氮作用，为非豆科植物诱导结瘤和固氮提供依据。

一、材料与方法

（一）试验材料

试验土壤为砂壤，来源于本所农场试验地。土壤的基本农化性状为全磷（P）0.012%，全氮0.127%，碱解氮62.8mg/kg，有机质1.40%，速效钾（K）68.50mg/kg，pH7.2。土壤使用前过筛（<10mm）。油菜品种为甘兰型油菜中油821（本所品种资源室提供）；根瘤菌为紫云英根瘤菌突变菌株CH205-1，能在含新霉素1mg/L的YEM平板上生长（本实验室提供）。果胶细菌为枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）Yt-27（华中农业大学微生物系提供）。

① 总理基金资助的部分工作。本研究的部分工作是在英国诺丁汉大学生命科学系完成的，并得到英国皇家学会资助。
收稿日期：1996－07－29

(二)试验方法

1. 油菜种子表面灭菌及幼根的处理 用1g/L $HgCl_2$常规表面灭菌，灭菌后的种子置细菌培养基中作无菌检查。合格后，催芽备用。催芽2天后，无菌操作取生长健状的幼根(根长3cm)，放入果胶细菌悬浮液中，置28℃培养箱内处理1～8小时，取出后用无菌水洗3次，将幼苗放入根瘤菌悬浮液中，置室温下静放0.5小时，然后将幼苗移至无菌土壤盆钵中，于温室盆栽。

2. 根瘤菌的再分离与回接 被处理油菜苗生长3个月后，选择较大的类根瘤，常规表面灭菌后，在YEM平板上分离，取单菌落纯化，并用纯化菌在含新霉素1mg/L的YEM平板上划线。将能在含有新霉培养基上生长的菌株回接到原寄主植物紫云英上。

3. 透射电镜观察 将培养30天的类根瘤固定在25g/L戊二醛、25mmol/L磷酸氢二钾溶液中，pH为6.8。然后再以10g/L锇酸固定。Epon 812环氧树脂包埋，超薄切片。作醋酸双氧铀—柠檬酸铅双重染色。电镜观察。

4. 固氮酶活性测定 生长100天的油菜放入18cm×18cm试管中，同时每管加2mL无氮营养液，用橡皮塞封口，抽出空气3mL，随后每管加入3mL乙炔气，置于光照培养箱中，光照强度21000lx，培养温度26℃。在培养24小时后，从每管中抽出0.5mL的气体，用气相色谱仪检测乙烯峰，计算乙烯生成量。

二、试验结果

(一)油菜类根瘤的形成

果胶细菌处理油菜幼根1～7小时，然后接种根瘤菌，都能有效地诱导根瘤菌进入油菜根系结瘤。从图1看出，接种后1小时即可结瘤，随着处理时间的延长，结瘤率不断提高，至处理6小时结瘤达到96.80%；处理7小时后结瘤率开始下降，处理8小时则因处理时间过长，幼根组织破坏，不能正常生长。油菜生长50天左右，果胶细菌处理并接有根瘤菌的油菜，其根部出现瘤状物[5]，随着油菜的生长，瘤状物逐渐增大，约在100天后根瘤基本定型，呈乳突状，最大直径0.6cm，类根瘤呈乳白色(图2)。空白对照、果胶细菌对照和根瘤菌对照均无瘤状物出现。

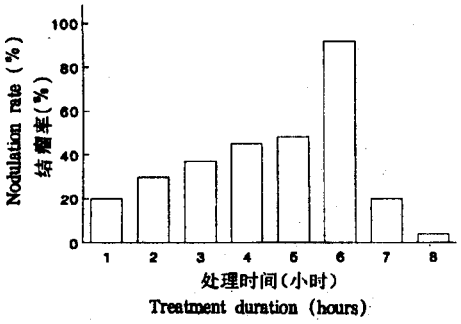

图1 果胶细菌处理并接种根瘤菌的油菜结瘤比率

Fig.1 Nodulation rates of oilseed rape treated with pectobacterium for different duration and inoculated with rhizobium.

(二)类根瘤分离物的形态、抗性、回接试验及透射电镜观察结果

从油菜类根瘤中分离纯化的细菌，革兰氏染色阴性，短杆状，菌落不吸收刚果红，乳白色，半透明，有光泽，边缘整齐。经分离、纯化的细菌在含新霉素1mg/L 的YEM平板上划线，培养一周后，观察到抗性生长；用此抗性菌株回接到原寄主紫云英上，10天观察到紫云英结瘤。由此证明油菜类根瘤分离物为原接种的紫云英根瘤菌菌株CH205-1。电镜观察可明显地看到类根瘤细胞内有感染细菌的分布(图3)。

(三)固氮酶活性

果胶细菌诱导根瘤菌侵入根系结瘤的油菜，在生长100天后，用乙炔还原法测定了150株的固氮酶活性，平均酶活性(C_2H_4)为76.80nmol·$plant^{-1}$·h^{-1}，其余3个对照为零。证明用此方法处理的油菜根系结瘤，确实有固氮作用(表1)。

表 1　油菜根瘤的固氮酶活性

Table 1　Nitrogenase activity of oilseed rape nodules

试验处理 Treatments	试验重复 Replications	固氮酶活性 Nitrogenase activity C_2H_4 nmol·plant^{-1}·h^{-1}
空白对照	150	0
果胶细菌对照	150	0
根瘤菌对照	150	0
果胶细菌加根瘤菌[1)]	150	76.80±9.15

1) 果胶细菌处理时间为6小时　Treated with pectobacterium for 6 hours.

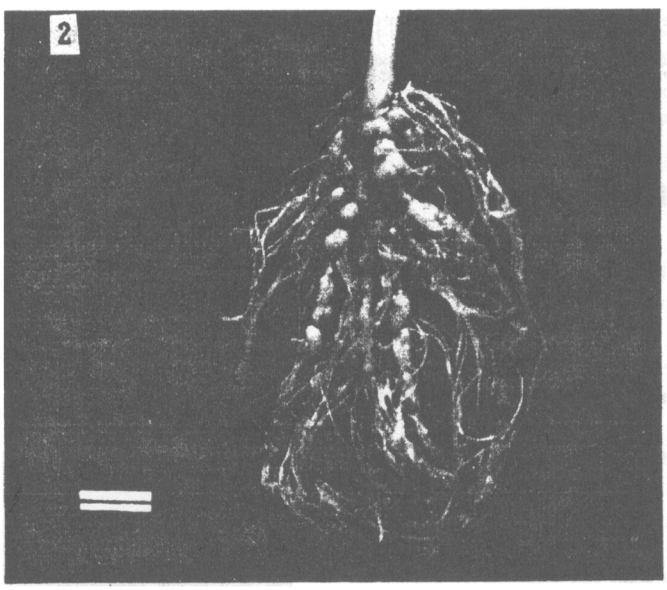

图2　果胶细菌处理(6小时)并接种根瘤菌的油菜根系所形成的类根瘤。标尺:0.9cm

Fig.2 Nodular structure on the roots of oilseed treated with pectobacterium for 6 hours and inoculated with rhizobium. Bar:0.9cm

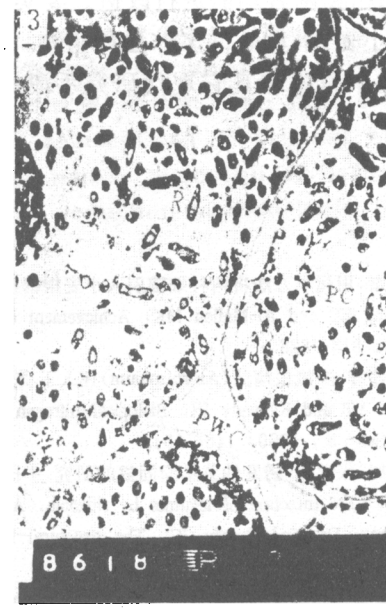

图3 类根瘤透射电镜切片,植物细胞内充满根瘤菌(×3000).植物细胞(PC).植物细胞壁(PCW).根瘤菌(R)

Fig.3 Transveres section of the para-nodule. The plant cell full of rhizobia (×3000). Plant cell(PC), Plant cell wall (PCW), Rhizobia (R).

三、讨　论

利用果胶细菌所产生的果胶酶降解初生根和根毛的细胞壁,使其去除带有识别因子的顶端细胞壁,而达到容易侵染的目的,为根瘤菌开辟了一条通路,根瘤菌通过破损的细胞壁裂缝进入,然后在细胞内繁殖,形成类根瘤,并最终使得固氮能力表达。豆科根毛顶端的细胞表面糖类—卵磷脂现被认为是影响选择根瘤菌寄主专一性的识别因子[6]。很明显,在根瘤菌侵入豆科根时有细胞壁水解酶[7]的参加,这是一种植物寄主特定的根瘤菌种间在溶解根毛顶端细胞壁时的

有效行为。而且随着对有机体侵染的发展形成了根瘤，进而导致建立了两种生物体间的共生体系[8]。

功能瘤的形成是一个复杂的过程，包含有不同表型的阶段[9]，而每个阶段既决定于细菌基因，又依赖于寄主植物的基因。最近Truchet等报道了在紫花苜蓿根系自发形成的无根瘤菌的瘤子是有组织的结构而不是变态的肿瘤[10]。在豆科中，有结瘤的遗传信息，而根瘤菌的基因仅仅作为起动植物结瘤过程的一个方面。也许在某些非豆科植物中，可能也有类似豆科植物的全部结瘤遗传信息，或者有部分有关的遗传信息。所以有些植物，像油菜可能有部分基因与豆科植物中结瘤基因DNA是同源的。我们的研究表明，根瘤菌和非豆科作物不但可以形成类根瘤，而且这种类根瘤具有乙炔还原作用。为了构建一个新的共生体，不但要选择根瘤菌和植物的适当组合，也需要对二者进行遗传改造，使它们相互适配。但是为了构建一个新的共生体，对固氮微生物和植物两者均需进行改造。要实现像根瘤菌一豆科植物共生体系的高固氮功能，并扩大到油菜、小麦、水稻等许多非豆科植物，需要很长的研究过程，不可能在短期内奏效。但是有了分子生物学技术和其它现代研究手段的今天，通过不断探索和实践，这个目的的实现将是有望的。

参 考 文 献

1 聂延富.用化学方法将两种细菌引入小麦根部皮层细胞的报告.微生物学杂志.1986,6(4):35～38.

2 Cocking EC and Al-Mallen MK. Achicvement and objective. In Gresshoff PM eds, Nitrogen Fixation. Chapman and Hall, 1990, 813～823.

3 陈廷伟等.固氮根瘤菌(Azorhizobium)在人工诱发小麦类根瘤中的固氮作用.中国科学,1992,712～716.

4 Tchan YT and Kennedy IR. Biological nitrogen fixation and prospects for yield increases in wheat. Trans 14th Int. Congr. Soil Sci. Ⅲ, 1990, 146～151.

5 胡小加,张学江.诱发油菜结瘤固氮的研究.中国油料,1993,4:42～44.

6 Bauer WD. Infection of legumes by rhizobia. Ann. Rev. Plant Physiol., 1981, 32:407～449.

7 Callaham DA and Torrey JG. The structural basis for infection of root hairs of *Trifolium repens* by Rhizobium. Can. J. Bot., 1981, 59:1647～1664.

8 Verma DP and Zogbi VS. A co-operative action of plant and rhizobium to dissolve the host cell wall during development of root nodule symbiosis. Plant Sci. Lett., 1978, 13:137～142.

9 Vincent JM. Factors controlling the legume-rhizobium symbiosis. In Newton WE et al eds, Nitrogen Fixation. University park press, 1980, 103～129.

10 Truchet G and Barker DG. Alfalfa nodulation in the absense of rhizobium. Mol. Gen. Grnet., 1989,219:65～68.

INDUCING NODULATION AND NITROGEN FIXATION ON RAPE ROOTS WITH PECTOBACTERIUM

Hu Xiaojia Zhang Xuejiang Huang Qinjie Jiang Mulan
(Institute of Oil Crops, CAAS, Wuhan 430062)

Edward C Cocking Gordon S Webster
(Department of Life Science, University of Nottingham, NG7, 2RD, UK)

Summary

Nodular structures have been induced on oilseed rape root by treating the 3cm length roots of 2-d seedlings with a pectobacterium, followed by inoculation with a mutant strain of *Rhizobium astraglus*, the nodulation rate is 96.80%. The strains were isolated from nodules of oilseed rape and successfully reinoculated to original host. Transverse section of para-nodules showed that cells of nodule were full of bacteria. The activity of the nodules was determined by acetylene reduction method (C_2H_4,76.80 nmol • plant^{-1} • h^{-1}).

Key words Pectobacterium Rhizobium Oilseed rape.