第3卷 第1期
1997年3月

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

Vol.3 No.1
Mar. 1997

缺氮培养大豆Bragg结瘤突变系对CO_2倍增的反应①

丁 莉② 钟泽璞 李世仪 张崇浩② 白克智 匡廷云

（中国科学院植物研究所，北京 100093）

摘 要

研究了在缺氮条件下，CO_2倍增对大豆（*Glycine max* L.）Bragg及其等基因突变体超结瘤大豆nts382和不结瘤大豆Nod49生长和固氮的影响。结果表明在缺氮条件下CO_2倍增明显提高大生物量和根系结瘤量，但对固氮酶活性的影响则随幼苗的生长而异。播种后25天取样结果显示CO_2倍增条件下，Bragg和nts382的固氮比活性和单株固氮活性都显著提高，而其后3天取样的结果没有表现出增加趋势，固氮比活性在nts382反而明显降低。两种CO_2浓度条件下，nts382单株固氮活性高于Bragg，但固氮比活性低于后者。两次测定结果的差异说明植物对CO_2倍增的反应具有很强的时效性；同时表明，CO_2倍增对植物生长和固氮的促进作用不能长期维持。这可能与生物固氮过程本身的复杂性有关。

根据本研究结果推测，在未来全球环境变化、CO_2倍增条件下，共生固氮植物可能在生态系统氮素平衡中起到更为重要的作用；并有可能通过育种技术改良固氮农作物，提高农作物产量。

关键词 CO_2倍增 大豆Bragg结瘤突变系 固氮比活性 单株固氮活性

我们先前研究的结果[1,3]表明，豆科作物对大气CO_2浓度倍增的反应一般表现为光合速率增加，水分利用效率提高，生物量增加，生物固氮能力增强，C／N比值增加，叶片含氮量降低，生育期缩短等。

大豆Bragg结瘤突变系已为许多实验室选作实验材料[6~7]。江荣凤和张福锁[5]研究了硼对大豆结瘤的固氮作用的影响。在缺硼条件下，Bragg和nts382能够结瘤，但Bragg大豆根瘤的固氮作用完全受到抑制，而在nts382根瘤还能保持较强的固氮能力。该突变系是很有特色的实验材料，尤其是超结瘤突变体对大气CO_2浓度倍增反应如何尚未见报道。本文报告在这方面的初步实验结果。

一、材料与方法

大豆（*Glycine max* (L.) Merr.）Bragg品系和其结瘤突变体超结瘤nts382、不结瘤Nod49及与它们共生的根瘤菌*Bradyrhizobium japonicum* strain USDA110为实验材料，分别由中国科学院植物生理研究所李正正研究员和中国农业大学生物学院高卫民老师馈赠。根瘤菌用TY溶液培养至10^9cells/mL，然后稀释至10^8～10^7cells/mL，用草炭拌匀供接种用。

① 国家自然科学基金重大项目资助
② 工作单位：北京师范大学生物系，北京 100875
收稿日期：1996－07－11

用砂培法将材料培养在北京香山中国科学院植物所植物园试验基地的开顶式培养室里，处理室CO_2浓度为700μ L/L，对照室则为350μ L/L[1]。3个品系处理与对照均为2盆，每盆播种20粒（1995年8月30日播），一周后间苗留下15株。培养期间定期浇灌无氮培养液[5]，其成份为0.25mmol/L $CaCl_2$，0.25mmol/L KCl，0.5mmol/L $MgSO_4$，0.13mmol/L KH_2PO_4，0.13mmol/L K_2HPO_4和各种微量元素混合液。待子叶充分张开后，接种根瘤菌USDA110，分别于1995年9月25日和9月28日取样作生理参数测定。测定参数有生物量、株高、根／冠比、根系结瘤量、单株固氮活性和固氮比活性。固氮活性采用离体根瘤，用乙炔还原法测定[11]。

对实验所得数据进行统计学处理，并作方差分析（ANOVA）。

二、结果与讨论

（一）CO_2倍增对大豆Bragg结瘤突变系生长的影响

9月28日取样结果（表1）表明，CO_2倍增明显促进该突变系的生长。植株地上、地下部分生物量增加，根／冠比有增大趋势；但这种促进效应在9月25日取样中没有观察到。其原因一方面可能与植物对CO_2倍增的反应具有时效性；另一方面在9月25日的取样中CO_2倍增明显提高了结瘤品系的固氮活性（图1），但这种固氮能力的提高尚未对植株生长有明显的改善，相反因太多碳水化合物运往地下部分供给结瘤和固氮所需能量而相对减弱了地上部分的生长。其后三天取样的结果表现出了9月25日取样测到的固氮能力提高对植物生长的正效应。尽管9月28日取样CO_2倍增处理的生物量显著增加，但固氮比活性却降低了。这说明植物体内存在自我调节系统控制其生长发育的平衡，同时说明CO_2倍增对植物生长的促进效应不可能长久持续。

表 1 缺氮培养的大豆Bragg结瘤突变系对CO_2倍增的生长反应

Table 1 Effects of doubled CO_2 on the growth of soybean(Bragg) nodulating mutants in nitrogen-free medium

品系名称 Strain	CO_2 浓度 CO_2 Conc.(μ L/L)	生物量／单株（鲜重，g） Biomass per plant (g,FW)			根／冠比 Root/Shoot Ratio
		单株重量 Per plant	地上部分 Shoot	地下部分 Root	（鲜重比） (FW/FW)
Bragg	350	3.30±0.18	1.98±0.13	1.32±0.06	0.67±0.03
	700	4.16±0.29 *	2.44±0.17	1.72±0.15 *	0.71±0.04
nts382	350	3.06±0.14	1.95±0.08	1.11±0.07	0.57±0.03
	700	3.50±0.14	2.26±0.09 *	1.24±0.07	0.55±0.03
Nod49	350	3.98±0.23	2.24±0.10	1.74±0.13	0.77±0.03
	700	4.44±0.20	2.43±0.10	2.01±0.13	0.83±0.05

表中为播种后生长29天幼苗的结果，* $P<0.05$ 和对照组比。

29 days seedling, * $P<0.05$ vs control.

表1中还可看出，两种CO_2浓度条件下，大豆Bragg结瘤突变系三品系之间存在生长上的差异。尽管是在无氮条件下，但早期Bragg和nts382并未因其根系固氮而比Nod49表现出生长优势。这可能是豆类植物种子中贮存丰富的含氮物质为其早期生长提供了充足的氮素，以及非固氮品系通过扩大根系（Nod49的R／S比值大于两个固氮品系），从而掩盖了这种优势。在早期，Nod49的生物量大于两个结瘤品系，可能因为在结瘤品系更多碳水化合物用于结瘤，而幼嫩瘤的固氮能力较弱，对苗生长的营养供应尚不足以弥补结瘤所耗去的能量，因而造成地上部分营养相对不足。但这种差异在生长后期会完全逆转过来。

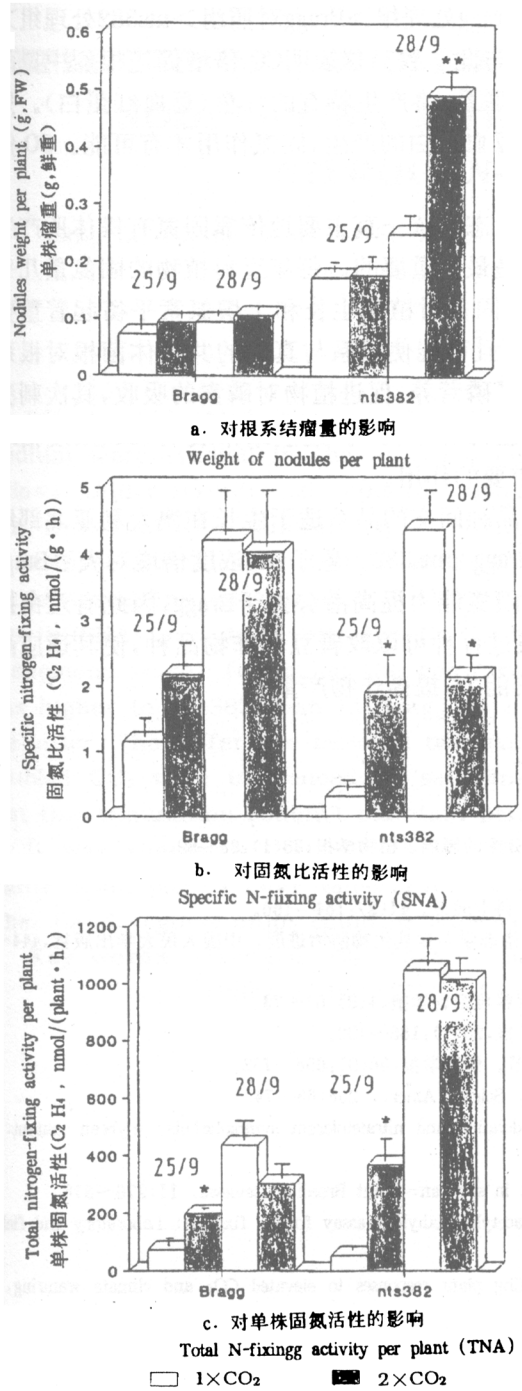

图1　缺氮条件下CO_2浓度倍增对大豆Bragg结瘤突变系固氮酶活性的影响

Fig.1　Effects of doubled CO_2 on the nitrogen-fixing enzyme activities of soybean(Bragg) nodulating mutants

(二)CO_2倍增对大豆Bragg结瘤突变系固氮活性的影响

图1可见，9月25日测定结果表明在缺氮环境下，CO_2倍增明显提高Bragg和nts382的固氮比活性和单株固氮活性，尤其是nts382表现更显著。其后三天采同批培养的材料测定发现CO_2倍增下，Bragg和nts382的根系结瘤量明显增加，也是nts382的更明显，这与nts382地上部分生物量显著增加(表1)相一致。这是因为结瘤的调节因子来自地上部分[9]。然而它们的固氮比活性和单株固氮活性都没有表现出增加趋势，nts382的固氮比活性反而明显降低。这可能与在此前的三天中它的结瘤量急剧增加而固氮活性相应增加的各项因子尚未具备的缘故。

两次测定结果的差异说明，CO_2倍增对固氮活性的影响随幼苗生长而异。植物对CO_2倍增的反应具有很强时效性，可能存在一最敏感时期；同是说明CO_2倍增对这一突变系生物固氮的促进效应不可能长久持续，这一缺欠可进一步通过育种得到改善。其原因可能与生物固氮过程本身的复杂性有关。单株固氮活性的提高与来源于根系生物量以及相应根瘤量的增大，或来源于根瘤量增加及固氮比活性的增加有关。固氮比活性反映固氮酶催化活性的强弱，它取决于能量(ATP)、还原能力(NADP)的供应水平以及为移走铵离子所需碳架的多少。这三者都直接或间接来源于光合作用，CO_2倍增条件下，只有当这三个因素的供应都充足时，才能表现出固氮比活性的提高，这在我们先前的报告已有论述[12]。

在正常大气CO_2浓度和CO_2浓度倍增两种条件下，nts382的单株固氮活性均高于Bragg，但固氮比活性低于后者。其可能原因是nts382与Bragg相比，每个根瘤中的根瘤菌数前者少于后者，这为超结瘤品系固氮酶的比活性下降提供了解释。我们从解剖二者根瘤中观察到类似现象。以切开根瘤后，切面是否出现红色为标准(豆血红蛋白)。结果发现CO_2倍增条件下，nts382的根瘤有50%出现红色，在Bragg为100%；而

对照则分别为32%和56%。从其红色深浅程度看，Bragg处理组>Bragg对照组>nts382处理组>nts382对照组。拟菌体占根瘤中比例大小的排序也与此一致。这表明CO_2倍增促进根瘤中拟菌体的形成，且在Bragg表现更明显。同产生类菌体相联系，将产生特有的红色(豆血红蛋白)。只有随着根瘤的建立和细菌适应分化成类菌体，以及豆血蛋白的产生，固氮作用才有可能。CO_2倍增刺激类菌体的形成从而提高了固氮活性。

氮素通常是作物生长中的主要限制因子，自然生态系统一直主要地依靠固氮有机体所产生的氮供给作物生长，根瘤菌与豆科植物的共生通常是最为重要的。每年豆科植物的固氮量几乎与工业氮肥生产量相等，年约3千万吨[2]。可见生物固氮对植物生长和土壤氮素平衡起着重要作用。大气CO_2浓度倍增不仅提高生物固氮能力，而且可能使根系与真菌的共生体菌根对根系的侵染增强[8,13]。菌根侵染增强一方面极大地改善了磷营养，促进植物对磷素的吸收，其次刺激根瘤形成提高固氮能力，利于吸收氮素，从而促进植物的生长[4]。这些结果表明，CO_2浓度倍增有可能使固氮植物在生态系统氮素平衡中起更为重要的作用。

有研究[10]表明，同时应用超结瘤突变体与栽培品种回交的品系适于生长在澳大利亚北部地区，并能很好地表达超结瘤现象，产量高于其亲本Bragg和nts382。鉴于CO_2浓度倍增对大豆Bragg结瘤突变系生长和固氮的明显促进作用，且nts382固氮能力提高潜势强于Bragg，因此有理由推测在未来全球环境变化、CO_2浓度倍增的条件下，通过育种可以改善豆科作物品种，使其适应高CO_2条件，增强植物共生固氮能力和吸收土壤磷素的能力，提高作物产量

参 考 文 献

1 丁莉，钟择璞，李世仪等，1996：CO_2倍增对紫花苜蓿碳、氮同化与分配的影响。植物学报，38(1)：83～89。

2 于振文等译，1993：作物生理学。农业出版，172～173。

3 白克智，钟泽璞，丁莉等，1996：大豆对CO_2倍增的一些生理反应。科学通报。41(2)：164～166。

4 北京农业大学植保系植物生态病理教研室编译，1990：植物根际生态学与根病生物防治进展。中国人民大学出版社，444～448。

5 江荣风，张福锁，1994：硼对大豆结瘤和固氮作用的影响。植物营养与肥料学报，1(9)：67～73。

6 李止正，高锦华等，1994：寄主大豆对根结瘤的控制。植物生理学报，20(2)：185～192。

7 李止正，龚颂福等，1994：大豆Bragg结瘤突变系叶片的NR活性调节。植物学报，36(9)：696～702。

8 Bazzaz F A & Fajer E D, 1992: Plant life in a CO_2-rich world. Scient. Amer., 266:68～74.

9 Carroll B J, McNeil D L, Gresshoff P M, 1985 b: Suppernodulation and nitratetolerant symbiotic(nts) soybean mutant. Plant Physiol., 78:34～40.

10 Gresshoff P M, 1994: Molecular genetic analysis nodulation genes in soybean. Plant Breeding Reviews, 11:276～318.

11 Hardy R W F, Holsten R D, Jackson R K et al., 1967: The acetylene-ethylene assay for Z_2 fixation: Laboratory and field evolution. Plant Physiol., 43:1185～1207.

12 Korner ch, 1995: Towads a better experimental basis for upscaling plant responses to elevated CO_2 and climate wamring. Plant, Cell and Environment, 18:1101～1110.

13 Monz C A, Hunt H W et al., 1994: The response of mycorrhizal colonization to elevated CO_2 and climate change in *Pascopyrum smithii* and *Bouteloua gracilis*. Plant and Soil, 165:75～85.

EFFECTS OF DOUBLED CO_2 ON SOYBEAN(BRAGG) NODULATING MUTANTS CULTIVATED IN NITROGEN-FREE MEDIUM

Ding Li Zhong Zepu Li Shiyi Zhang Chonghao Bai Kezhi Kuang Tingyun

(Institute of Botany, Academia Sinica, Beijing 100093)

Summary

Effects of doubled CO_2 on soybean(Bragg) nodulating mutants grown in nitrogen-free medium were studied in the open-top chambers. The main results were described as follows: Under no-nitrogen condition, doubled CO_2 remarkably raised soybean biomass, and increased the number and weight of nodules per plant, but the effects on nitrogenase activities were different as the seedlings growing up. The results of sample 25 days seedling showed that doubled CO_2 sharply stimulated specific nitrogen-fixing activity(SNA) and total nitrogen-fixing activity(TNA). In the following 3 days, such phenomena wasn't found, on the contrary SNA was decreased. In two CO_2 levels, TNA was higher in nts382 than in Bragg, but SNA was lower slightly in the fomer than in the latter. The difference between two samplings indicated that the response of plant to doubled CO_2 were influenced by sampling time and plant growth stages, and showed that this stimulation couldn't maintain permanently in the mutant..

It was suggested that in the CO_2 doubled environment, symbiotic nitrogrn-fixing plants could play a more important role in nitrogen balance in one ecosystem. On the other hand, legume crops could be improved through breedings in the future.

Key words Doubled CO_2 Soybean Bragg nodulating mutants Specific nitrogen-fixing activity(SNA) Total nitrogen-fixing ctivity(TNA).