

紫云英根瘤菌结瘤因子的初步研究

杨国平 朱 军 娄无忌

(南京农业大学土化系 南京 210095)

最近的研究结果表明,豆科植物与根瘤菌的共生识别是一种双向的信号物质交换过程^[1]。首先是豆科植物的根或种子分泌类黄酮物质,诱导根瘤菌的结瘤基因(nod genes)产生结瘤因子(nod factors),分泌到胞外,为植物所接受,从而引发植物某些基因表达,细胞分化,细胞壁形成,最终导致根毛变形等一系列变化。已经测定了几种苜蓿根瘤菌(*Rhizobium meliloti*)和豌豆根瘤菌(*R. leguminosarum* bv. *viciae*)结瘤因子的分子结构式^[2,3],它们均属于寡糖胺类物质,在没有根瘤菌存在的条件下,结瘤因子能独立地促使根毛发生变形,这是检测结瘤因子是否存在的重要手段,即根毛变形试验(Root hair deformation assay,简称 Had 试验)^[4]。高浓度的结瘤因子甚至能诱导植物产生空瘤,其组织结构与典型的根瘤相同^[5]。

紫云英根瘤菌最近由陈文新等^[6]正式定名为 *R. huakuii*,它与我国南方特有的绿肥及蜜源作物黄芪属的紫云英(*Astragalus sinicus* L.)形成共生固氮体系。目前,对它们之间的共生识别过程了解得还不多。本研究通过 Had 试验,首次证明了紫云英根瘤菌在寄主植物分泌物诱导下也能产生结瘤因子。

1 材料和方法

1.1 菌株、植物品种和培养方法

菌株及植物品种见表 1。

根瘤菌的培养采用基本培养基^[7],另补充 2g/L 琥珀酸钠作碳源,1g/L 天冬酰胺(培养 *R. huakuii*)或 1g/L 谷胺酸钠(培养 *R. meliloti*)作氮源,28℃ 培养。

植物生长采用 Fahraeus 培养基^[7],25℃ 光照培养。

表 1 供试菌株与植物品种

菌株	来 源
<i>R. huakuii</i>	
Ra98	日 本
CCBAU2609	中 国
ASB121II	美 国
<i>R. meliloti</i> 1021	美 国
植物	
紫云英(<i>Astragalus sinicus</i> L.) 品种	
余江大叶	江 西
弋江	安 徽
紫花苜蓿(<i>Medicago sativa</i>) 品种	
草原 2 号	内 蒙 古

1.2 种子分泌物的制备

种子分泌物的制备按文献[8]稍加修改进行,经表面消毒后,每克种子加 4ml 无菌水浸泡 24 小时,用纱布滤去种子,滤液 10000×g 离心 10 分钟,上清液用细菌过滤器(Millipore 0.45μm)过滤灭菌,取 0.1ml 滤液涂布在 YMA 平板上,检测是否无菌,无菌的种子分泌物置-20℃ 保存备用。

1.3 根瘤菌结瘤因子粗提物的制备

参考 Anto 等的方法^[4,9],在 100ml 补充碳、氮源的基本培养基中,接种 1% 活化的根瘤菌菌悬液

及适量种子分泌物, 28℃振荡培养到对数期, 10000×g 离心30分钟, 上清液用1/5体积的 n-丁醇抽提两次, 结瘤因子进入丁醇相中。减压蒸馏除去 n-丁醇后, 用5ml 蒸馏水重新溶解, 再用等体积乙酸乙酯抽提3次, 水相部分即为结瘤因子的粗提物。

1.4 Had 试验

取不同量的结瘤因子粗提物, 加入 Fahraeus 培养基中混匀, 倒平板。每皿植入2颗无菌的发芽种子(根长1cm左右), 每个处理重复3皿。置于25℃光照生化培养箱, 先在黑暗中培养1天, 然后在16小时光照/8小时黑暗周期下培养3—5天, 在倒置显微镜下观察根毛形态。以不添加种子分泌物的根瘤菌培养滤液为负对照, 以根瘤菌接种到发芽种子根部作为正对照。

2 结果和讨论

Had 试验结果表明, 未添加种子分泌物的紫云英根瘤菌培养物滤液, 不论在何浓度均不能引起根毛变形, 根毛为直形(图1-a); 而添加1%以上的紫云英根瘤菌结瘤因子粗提物的处理, 供试植物根毛均发生明显变形, 表现为“Z”字形扭曲(图1-b); 接种紫云英根瘤菌于幼苗根部的正对照也出现上述相同的根毛变形(图1-c)。

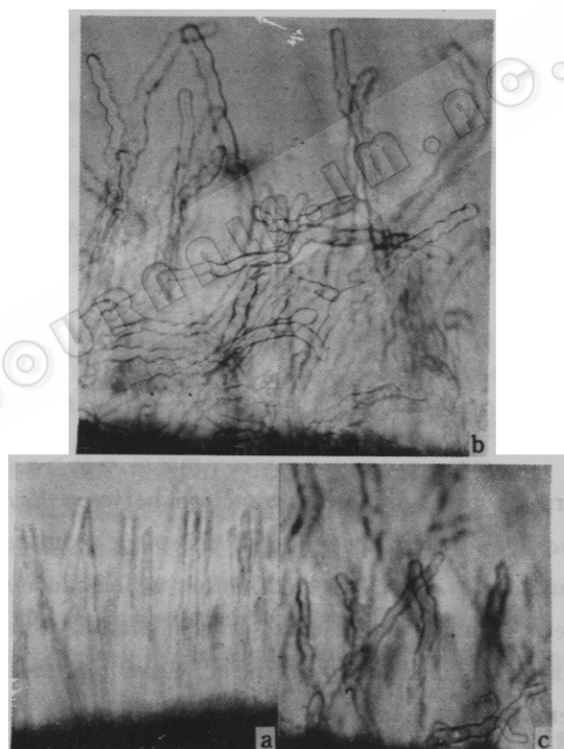


图1 不同处理下的紫云英根毛生长情况(×100)

- a. 在植物培养基中加入未添加种子分泌物的紫云英根瘤菌培养滤液;
- b. 添加1%的紫云英根瘤菌结瘤因子粗提物;
- c. 接种紫云英根瘤菌于幼苗根部。

Had 试验最初是用于检测苜蓿根瘤菌结瘤因子的生物测定方法, 该方法灵敏可靠, 为苜蓿根瘤菌结瘤因子的提纯和大量制备提供了有效的生物检测方法, 为最终确定其化学结构起了重要作用。苜蓿根瘤菌结瘤因子的 Had 试验, 也表现为根毛出现“Z”字形变形^[10], 其它豆科植物根毛, 在相应的根瘤菌结瘤因子的作用下, 并非均表现为“Z”形变形。例如, 豌豆根瘤菌在其寄主野豌豆(common vetch)上诱

导形成粗短根^[4], 三叶草根瘤菌 (*R. leguminosarum* bv. *trifolii*) 使其寄主根毛产生伸长, 膨大等变形^[11]。

本研究首次证明: ①紫云英根瘤菌在种子分泌物的诱导下能够产生结瘤因子; ②该结瘤因子的生理效应是引起紫云英根毛呈现“Z”字形变形。有关该结瘤因子化学结构的研究正在进行中。

参 考 文 献

- [1] Fisher R F, Long S R. *Nature*, 1992, **357**: 655—660.
- [2] Lerouge P, Roche P, Faucher C *et al.* *Nature*, 1990, **344**: 781—784.
- [3] Spink H P, Sheely D, van Brussel *et al.* *Nature*, 1991, **354**: 125—130.
- [4] Anton A N, van Brussel, Zaat S A J *et al.* *J Bacteriol*, 1986, **165**: 517—522.
- [5] Truchet G, Roche P, Lerouge P *et al.* *Nature*, 1991, **351**: 670—673.
- [6] Chen W X, Li G S, Qi Y L *et al.* *Intern J Systematic Bacteriol*, 1991, **41**: 275—281.
- [7] Vincent J M. A manual for the practical study of root nodule bacteria. IBP Hand Book 15. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1970.
- [8] Peters N K, Frost J W, Long S R *et al.* *Science*, 1986, **233**: 977—980.
- [9] Schultze M, Quiclet-Sire B, Kondorosi E *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**: 192—196.
- [10] Faucher C, Mailler F, Vasse J *et al.* *J Bacteriol*, 1988, **170**: 5489—5499.
- [11] Ervin S E, Hubbell D H. *Appl Environ Microbiol*, 1985, **49**: 61—68.

THE PRIMARY STUDY ON THE NOD FACTOR OF *RHIZOBIUM HUAKUII*

Yang Guoping Zhu Jun Lou Wuji

(Department of Soil Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract In the course of the symbiotic interaction between *Rhizobium meliloti*, *R. leguminosarum* bv. *viciae* and their host plants, the plant exudate can induce rhizobia produce extracellular molecules, i. e. the nod factors which cause some morphological, physiological and genetic changes in the roots of host plants. The Nod factors can be detected by the Had assay which is based on the root hair morphological changes. The result of Had assay demonstrates that at the presence of plant seed exudates, *R. huakuii* could produce Nod factor and its bio-activity is to elicit the root hair helix-curling.

Key words *Rhizobium huakuii*, Nod factor, Had assay