

水稻和稗草及白兰瓜根毛 对根瘤菌的反应

康玉庆

王洪隆

(天津教育学院中心实验室, 天津 300020)

(法国国家农业科学院共生实验室, 蒙比利埃)

摘要 用田菁根瘤菌突变体处理水稻和稗草, 用田菁根瘤菌和磁场处理白兰瓜, 显微观察发现这三种非豆科植物根毛发生规律性变化, 包括根毛的弯曲、膨大、分枝及侵入线的形成。同时, 水稻与白兰瓜均结根瘤。这些结果与豆科植物的情况具有相似性, 是反映非豆科植物与根瘤菌之间建立互作关系的重要标志。

关键词 田菁 根瘤菌 突变体 水稻 稗草 白兰瓜 根毛 根瘤

固氮根瘤菌可使豆科植物结根瘤, 其侵入的第一步是在植物根毛的顶端进行吸附, 随后使根毛发生弯曲等变化, 最终发展为有效的固氮体系。尽管这一系列作用的分子遗传学分析、生物化学基础等尚不完全清楚, 但许多研究者通过对豆科植物与固氮根瘤菌之间的互作进行探讨, 揭示出豆科植物根毛的细胞学变化规律, 为豆科植物结瘤研究提供了指导^[3,4]。70年代以来, 固氮基因工程、植物组织培养及细胞融合技术的进步, 促进了根瘤菌与非豆科植物建立共生关系的工作的发展^[2,5,7]。但根瘤菌与非寄主植物根毛细胞之间的相互作用尚未被更广泛地系统研究。本文论述了利用田菁根瘤菌及其突变体在不同外界条件下分别对水稻、稗草及白兰瓜进行侵染的研究, 通过比较发现了这些植物根毛对根瘤菌反应的共同点及这些变化与结瘤的重要相关性。目前已经确定nod A, B, C基因对豆科植物根毛弯曲有作用, 今后这方面的研究方向应该是探索非豆科植物结瘤作用的遗传基础, 这一工作的重要性是不言而喻的。

1 材料和方法

1.1 固氮根瘤菌

田菁固氮根瘤菌 (*Rhizobium sesbania*) G⁻, Nod⁺, Fix⁺。取田菁根瘤, 95%的乙醇浸泡20s, 0.1%的升汞杀菌5 min, 灭菌水洗5次, 压碎取瘤内含物接种在YMA固体培养基25℃培养3d, 转接YMA液体培养基, 25℃振荡培养24h, 得到菌液A。

田菁固氮根瘤菌突变体 (*Rhizobium sesbania* SM₁)G⁻, Nod⁺, Fix⁺。此菌株采用基因诱变得到的。YMA固体培养基25℃活化, 转接YMA液体培养基25℃振荡培养24h, 得到菌液B。

用田菁种子常规灭菌法进行表面灭菌, 放入平皿28℃萌发, 芽长至2~3 cm时, 加适量

75%的乙醇研磨成匀浆, 4℃静置48h, 然后加等量Na-K缓冲液5000rpm离心20min, 将上清液于4℃下用无菌蒸馏水透析48h, 其间换水4次, 得到提取液C。

1.2 植物处理

将水稻及稗草 (*Echinochloa crusgalli*) 种子如上法进行表面灭菌、萌发, 出芽后移入Fahraeus小室培养^[1], 每株加菌液B 10ml, 提取液C 1ml, 28℃下光照培养, 光照时间为16h/d, 培养期间每7d加一次B液和C液。

将白兰瓜 (*Cucumis melo* var *inodorous*) 种子如上法进行表面灭菌萌发, 出芽后移入Fahraeus小室, 放在磁场强度1000Gs的环境中28℃光照培养, 光照时间16h/d, 每7d每株加A液10ml, C液1ml, 0.5×10^{-6} 的2,4-D 0.5ml。

三种植物设5组重复, 每组20株, 自培养24h起开始进行扫描电镜及光学显微镜观察记录。扫描电镜样品: 戊二醛(2%)固定2h, 1% OsO₄固定8h, 放入30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%和100%的乙醇水溶液中逐次脱水, 再放入临界点干燥器之中干冰干燥, 镀金, 观察。光学显微镜观察: 用明视野及暗视野观察培养于Fahraeus小室中的样品^[6]。

1.3 培养基及缓冲液

YMA培养基: 甘露醇10g; KH₂PO₄ 0.2g; MgSO₄·7H₂O 0.2g; NaCl 0.1g; 酵母膏1g; 琼脂15g; 加水至1000ml, pH7.0~7.2。

Na-K缓冲液: K₂HPO₄ 0.43g; NaH₂PO₄ 1.46g; NaCl 7.2g; 蒸馏水至1000ml, pH7.2, 10磅灭菌20min。

2 结果与讨论

水稻、稗草及白兰瓜自接种28h即有根瘤菌对根毛的吸附作用, 培养到72h吸附作用已相当典型, 如附图A, 可见根毛的顶端及侧壁均有根瘤菌的吸附。

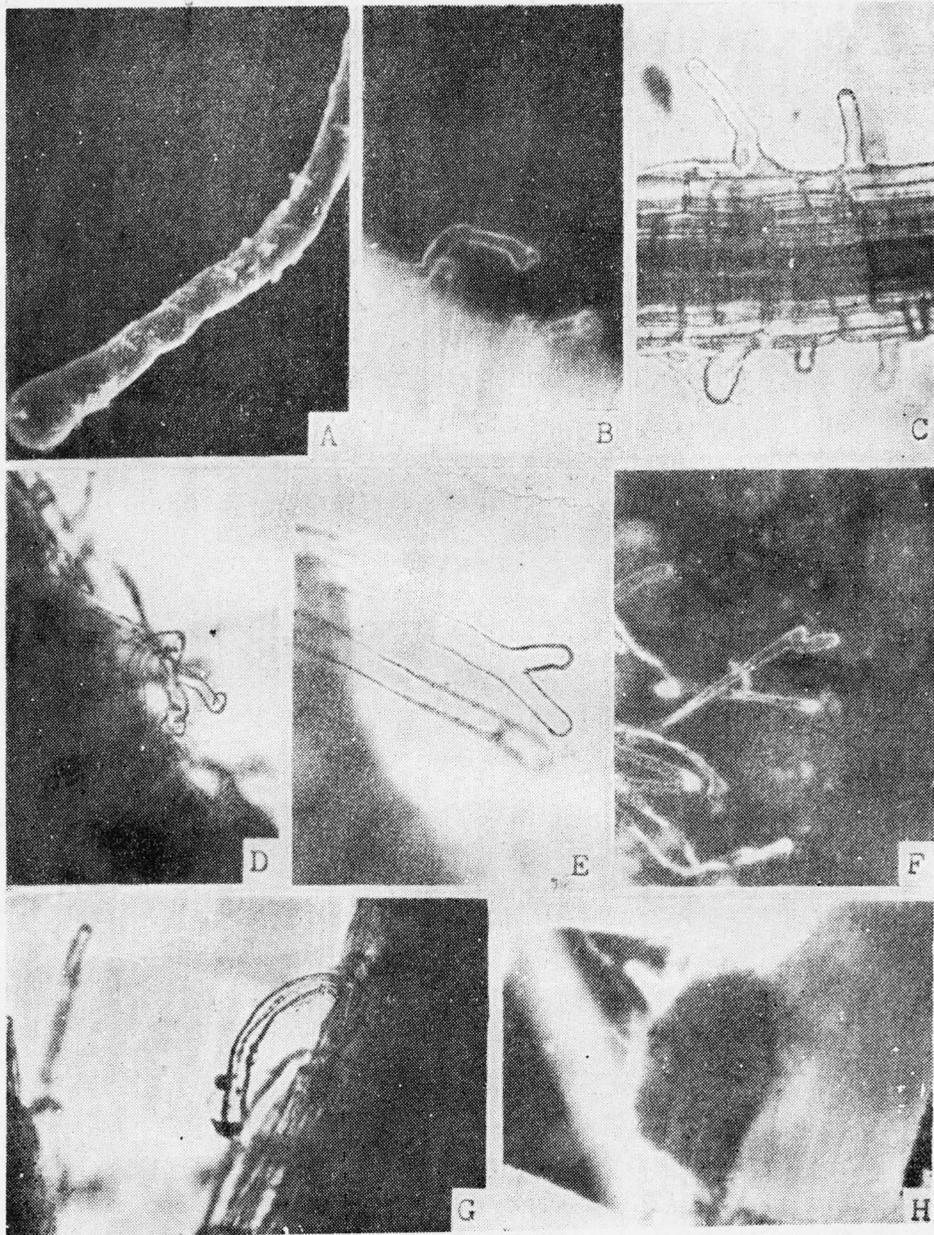
培养10d左右3种植物根毛均见弯曲, 弯曲分为两种: (1)为中度弯曲, 如附图B的水稻根毛。(2)为螺旋状弯曲, 如附图D的稗草根毛。与弯曲同期的一种变化为根毛的膨大, 此种变化在水稻和稗草根上都有发现, 如附图C。

培养30d左右可见这3种植物根毛发生分枝变化, 附图E, F分别为白兰瓜和稗草根毛分枝情况, 从附图B中即能看到水稻根毛在培养10d时就已开始进行分枝。这种结构变化发生率很低, 到目前为止, 只见豆科植物有此变化的报道。

一种重要的变化在稗草培养到35d发生, 即侵入线的形成, 如附图G, 这种变化的发生率也很低, 多为即将伸长的根毛, 这种变化与豆科植物的侵入线极其相似, 虽然少见, 但我们认为这种结构在非豆科植物结瘤过程中是非常重要的。

根瘤的形成大约在培养50d左右, 水稻和白兰瓜均有根瘤产生。附图H为水稻根瘤, 这种根瘤为白色或棕色, 呈圆形或椭圆形, 多在侧根基部附近发生。形成初期可见周围的根毛。

根瘤菌对根毛的吸附, 根毛的弯曲和分枝, 形成侵入线, 是一般结瘤前期的共同特征。由附表可见, 结瘤的二种植物基本发生以上结构变化。虽然我们在水稻、白兰瓜根毛上没



附图 水稻、稗草和白兰瓜根毛对根瘤菌的反应

A. 根瘤菌对水稻根毛的吸附； B. 水稻根毛的弯曲及顶端的早期分枝 ($\times 200$)； C. 稗草根毛的膨大 ($\times 160$)，
D. 稗草根毛的弯曲 ($\times 200$)； E. F. 分别为稗草和白兰瓜的根毛分枝 ($\times 500$, $\times 160$)； G. 稗草根毛的侵入线 ($\times 200$)； H. 水稻根瘤 ($\times 100$)。

有观察到侵入线，但并不能就此断定没有形成，因为侵入线的发生率很低，并且存在的时间很短，观察不到这种结构是极有可能的，侵入线的特性及形成规律有待进一步研究。根毛的膨大在水稻及稗草上均见发生，发生率较分枝要高。这一特征也应视为非豆科植物结瘤

前期的重要标志。

附表 根毛变化特征比较

项 目	水 稻	稗 草	白 兰 瓜
条 件	突变体	突变体	磁场, 2,4-D
吸 附	100%	100%	100%
膨 大	1%	0.5%	—
弯 曲	5%~25%	2%~20%	2%~20%
分 枝	0.3%	0.3%	0.1%
侵 入 线	—	0.1%	—
平均每株结瘤数	12	—	5

通过以上实验结果, 我们可以这样认为: 无论诱导非豆科植物与固氮根瘤菌之间建立共生关系的因素是基因水平的还是外界条件, 其作用过程均具有根毛的弯曲、分枝及菌对根毛顶端和侧壁的吸附等特征, 也就是说, 检验根瘤菌对植物作用的强弱及是否有效, 可通过根毛的反应来判断。选择更广泛的植物种类作系统研究将会具有更为积极的意义, 通过染色体分析深入研究非豆科植物结瘤的遗传学基础, 也将对这方面的工作起重要的指导作用。

鸣谢 本文主要结论得到王燕宽教授指教, 谨表谢意。

参 考 文 献

- 1 Vincent J M 著, 上海植物生理研究所固氮室译. 根瘤菌实用研究手册. 上海人民出版社. 1974, 134~135
- 2 聶延富. 关于诱导无根瘤植物结根瘤的研究. 自然杂志, 1983, 6 (5): 326~336
- 3 Susan M W, William N. Nodule morphogenesis: the early infection of Alfalfa (*Medicago sativa*) root hairs by *Rhizobium meliloti*. *Can J Bot*, 1989 (67): 3108~3122
- 4 Nobuyuki T, Kunihiko S. *Rhizobium* attachment and curling in asparagus, rice and oat plants. *Plant Cell Physiol*, 1990, 31 (1): 119~127
- 5 Plaziuski J et al. Expression of *Rhizobium trifolii* early nodulation genes on maize and rice plants. *Journal of Bacteriology*, 1985, 163 (2): 812~815
- 6 Georges T et al. Sulphated lipo-oligosaccharide signals of *Rhizobium meliloti* elicit root nodule organogenesis in alfalfa. *Nature*, 1991, 351 (20): 670~673
- 7 Jing Y et al. Pseudonodules formation on barley roots induced by *Rhizobium astragali*. *FEMS Microbiology Letters*, 1990 (69): 123~128

The Reactions of Root Hairs of Rice, Branyardgrass and Cucumis melo var inodorous on Rhizobia

Kang Yuqing

(Lab. Center, Tianjin College of Education, Tianjin 300020)

Wang Honglong

(Lab. Sym. Res. INRA, Montpellier, France)

Abstract Rice and branyardgrass were treated by rhizobium mutant of *sesbania*, *Cucumis melo var inodorous* was treated by rhizobium and magnetic field. Microscope observations showed that regular deformation occurred on the root hairs of these three non-leguminous plants; the root hairs curled, expanded and branched, and infection threads were formed. At the same time the nodules were discovered on roots of rice and *Cucumis melo var inodorous*. All of the plants were similar to the leguminous plant roots. It is an important sign for establishment of symbiotic association between rhizobia and non-leguminous plants.

Key words. *Rhizobium sesbania*; Mutant; Rice; Branyardgrass; *Cucumis melo var inodorous*; Root hairs; Root nodules