

非豆科作物结瘤固氮的途径

王洪隆* 康玉庆 张存金

(天津教育学院实验中心, 天津 300020)

摘 要 非豆科作物结瘤的方法包括: 酶-PEG 法, 杂交突变法, 改组 nod D 法和 Rhizobia Parasponia 法。利用这些方法均能使非豆科植物结生根瘤, 但这些根瘤均不能固氮。本研究选用毛茛田菁及其根瘤菌为材料, 能使小麦结瘤固氮。同时提出将豆科植物 DNA 以大片段为单位通过花粉管途径转入非豆科作物, 回接该豆科植物根瘤菌, 使其在转化植株上进行定向突变, 从而获得结瘤固氮工程植株和有效的突变菌株。

关键词 非豆科作物 结瘤固氮 分子育种 根瘤菌定向突变

根瘤菌与豆科植物共生固氮为农业生产提供了主要的生物氮源。长期以来, 农业科学家们希望能够将根瘤菌的这种固氮能力转移到水稻、小麦等非豆科作物上。近二十年来, 许多实验室的研究人员对该项工作进行了种种努力, 80 年代末, 非豆科植物结瘤研究取得较快进展。本文对近几年来这方面的工作进行了分析, 针对面临的困难提出了应采取的方案。

1 根瘤菌对非豆科作物结瘤

非豆科作物结瘤工作所遇到的一个严重障碍, 就是根瘤菌对豆科植物寄主的专一性问题。根瘤菌的结瘤基因与寄主植物的基因相互调控着根瘤的发生, 从而使根瘤菌与寄主植物具有专一性识别体系^[1]。这种体系阻碍了根瘤菌侵入非豆科植物根细胞形成根瘤。因此, 要使非豆科作物结瘤, 便需打破这个障碍。

1.1 酶解法^[6,7]: 1989 年, 英国诺丁汉大学研究小组人员利用纤维素酶和果胶酶对水稻幼苗根部进行处理, 降解了部分细胞壁, 然后将根瘤菌与这些处理过的水稻根共同培养, 同时加入 PEG, 使水稻根上形成的根瘤达 1%。研究发现不同水稻品种对这种处理得到的结果不同, 其中 *R. leguminosarum* bv. *trifolii* 能使台北 177 (水稻) 结瘤率达到 7%。经检测这种根瘤没有固氮活性。

该法的明显缺点就是这种操作在大田完成是困难的。另外根瘤获得率很低, 根瘤的结构与豆科植物根瘤也有很大差别, 根瘤细胞形状不规则, 根瘤内具有较大的空腔, 根瘤菌会使部分细胞降解或死亡。

1993-03-10 收稿。

* 法国国家农业科学院蒙比利埃研究中心

1.2 杂交诱变法^[3]: 金国华利用豆科植物田菁为父本, 水稻为母本进行远缘杂交, 获得少量杂交的水稻种子。然后利用田菁根瘤菌回接杂交的水稻种子, 并得到极少的根瘤。从这些根瘤中分离得到根瘤菌 Rr, 再将 Rr 回接普通水稻幼苗, 从而获得根瘤。中国科学院植物研究所研究人员对上述水稻根瘤进行了细胞学与遗传学分析发现, 根瘤结构与豆科植物相似, 并且发现根瘤菌的结瘤基因和固氮基因得到表达, 但同样没有固氮活性^[9]。

该法的优点是大田操作方便。但发现大部分根瘤原基进一步发育发生败育, 仅有少数进一步发育形成较好的根瘤。我们认为可能是适当的植物激素缺乏而导致的结果(王洪隆等, 待发表资料)。

1.3 组建工程株法: 澳大利亚国立大学的研究小组^[3]将 *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ANU 843 的 nod D 基因进行改造组建得到工程株 ANU536。ANU536 能够在 Calrose (水稻品种) 上形成根瘤, 但结瘤率仅有 0.25%。我们也曾提出改造 nod D 组建工程株去侵染非豆科植物结瘤, 并认为是一个极有希望的途径^[1]。通过筛选和进一步重组 nod D 或其它 nod 基因, 可望得到结瘤率较高的工程菌株。

1.4 2,4-D 法^[4]: 聂延富利用 2,4-D 刺激小麦等植物根系, 与根瘤菌共同培养也获得了瘤状物。这种瘤状物一般是从侧根原基发生的, 即 2,4-D 刺激了侧根原基发生了分裂。同时细菌进入植物细胞。因此, 这种方法在大田里操作往往会有土壤里其它细菌侵入, 2,4-D 浓度掌握不好, 往往抑制植物根系生长。

1.5 Rhizobium parasponia 法^[8]: 利用 *Rhizobium parasponia* RP501 和 *Bradyrhizobium* CP283 接种非豆科作物可使之结瘤。

尽管上述方法均使非豆科作物得到不同程度的根瘤, 但没有任何一个试验显示这些根瘤具有固氮活性。

2 结瘤和固氮的多条途径

豆科植物根瘤的厌氧环境是固氮酶活性作用的保证, 而非豆科作物根瘤却没有这种厌氧环境, 原因是其没有植物血红蛋白的表达。因此, 解决这一问题是非豆科作物固氮的方向。

2.1 寻找特殊的根瘤菌: 陈廷伟^[5]选用了在有氧环境能表达固氮活性的毛萼田菁 (*Sesbania rostrata*) 根瘤菌 ORS571 作为菌种, 通过 2,4-D 诱导在小麦上形成根瘤。通过检测, 发现小麦根瘤具有固氮活性。这在非豆科植物固氮方面提供了一个良好开端, 因此, 选择具有很强的屏氧能力的根瘤菌处理非豆科作物结瘤, 对于非豆科作物固氮具有重要意义。

2.2 分子育种—根瘤菌定向突变法^[11]: 我们通过对当今非豆科植物的研究, 提出一个分子育种的方法, 使水稻结瘤和固氮。该方法是通过水稻花粉管将大片段豆科植物 DNA 转移到水稻中, 然后再利用这种植物的根瘤菌回接这种转化的种子幼苗, 以进行筛选。

2.2.1 筛选高效结瘤的根瘤菌突变种: 豆科植物 DNA 转移到水稻中, 使这种转化的水稻种子中含有田菁的遗传信息, 增加了这种转化种子幼苗与根瘤菌的亲和能力, 同时提供了一个根瘤菌与水稻遗传物质相互作用的机会, 菌体内的缺陷型基因(如缺陷与水稻物质相互识别的结瘤基因)在上述环境中会优先突变成功能性基因(能与水稻物质识别的结瘤基因), 这

种突变过程可能是菌体内时常发生单链 DNA 缓慢突变, 并且发生在 mRNA 转录期。在这种情况下, DNA 修复缓慢, 最终完成修复工作。mRNA 转录突变产生某种或几种蛋白(如能与水稻物质相互作用的蛋白), 这种蛋白通过反转录修复 DNA, 而后细胞才能生长, DNA 再复制下去, 从而产生了突变体。这与细菌指导方向性突变假说相符合。这种突变体在转化幼苗上结瘤, 这个过程是突变体的稳定过程, 从根瘤分离出根瘤菌, 再回接普通水稻, 从而得到根瘤。

2.2.2 筛选固氮工程植株与根瘤菌。检测转化幼苗根瘤的固氮活性, 因为大片段 DNA 转移有可能使豆血红蛋白基因转入水稻并表达, 如转化幼苗根瘤具有固氮活性, 那么, 将这株植物进行无性繁殖^[12], 并分离根瘤菌, 将无性繁殖的植株接种这种根瘤菌, 从而获得能够结瘤固氮的工程水稻株系。选用毛萼田菁为材料可能会更好。

参 考 文 献

- 1 王洪隆等. 豆科植物根瘤发生的分子生物学. 植物学通报, 1991, 8(1): 1~8
- 2 王洪隆等. 大蒜花梗组织培养再生植株. 华北农学报, 1992, 7(3): 66~70
- 3 金国华等. 水稻等植物结生固氮根瘤的方法. 中国专利, CN1056215
- 4 聂延富. 关于诱导无根瘤植物结根瘤的研究. 自然杂志, 1983, 6(5): 326~336
- 5 陈廷伟等. 非豆科作物共生固氮的研究(II). 自然杂志, 1991, 14(4): 268~272
- 6 Al-Mallah MK et al. Formation of nodular structures on rice seedlings by rhizobia. J Exp Bot, 1989(40): 473~478
- 7 Al-Mallah MK et al. Nodulation of oilseed rape by rhizobia. J Exp Bot, 1990(41): 1567~1572
- 8 Cocking EC et al. Nodulation of non-legumes by rhizobia. In: Cresshoff PM et al, eds. Nitrogen Fixation: Achievements and Objects. New York, London: Chapman and Hall, 1990
- 9 Li GS et al. Identification of rice nodules that contain Rhizobia bacteria. Chin J Bot, 1991, 3(1): 8~17
- 10 Rolf BG et al. Evolving a Rhizobium for non-legumes nodulation. In: Gresshoff PM et al, eds. Nitrogen Fixation: Achievements and Objects. New York, London: Chapman and Hall, 1990
- 11 Wang HL (王洪隆) et al. Rice nodulation and nitrogen fixation via molecular breeding. In: Spirit of Enterprise The 1993 Rolex Awards. Buri International, Switzerland, 1993
- 12 Lewin R. Can bacteria direct their own evolution? New Scientist, 1990(9): 15

Methods for Non-legume Nodulation and Nitrogen Fixation

Wang Honglong Kang Yuqing Zhang Cunjin

(Center of Laboratories, Tianjin College of Education, Tianjin 300020)

Abstract Non-legume nodulation methods including Enzyme-PEG, Breeding mutation, Recommendation *nodD* and inoculating *Rhizobia parasponia*, have been proved to be the good methods for nodulation in non-legumes. But the nodules have not the abilities of nitrogen fixation. Wheat nodules from 2,4-D, ORS571 treatment have the capability of nitrogen fixation. The paper suggests that Molecular Breeding-Directed Mutation of *Rhizobia* will become a good method for nodulation and nitrogen fixation in non-legumes.

The method is that the large legume DNA fragments are transfected to rice zygotes through rice pollen tubes. The transformed rice seeds are planted and inoculated *rhizobia* from the legume. These transformed rice plants provide an environment for the *rhizobia* directed mutation.

This is similar to the Cairns and Hall's idea of bacteria mutation depending on environment. The bacterial mutants will be isolated from the transformed rice nodules. Genetic rice plants with the ability of nitrogen fixation will also be selected and propagated by tissue culture.

Key words: Nodulation; Non-legumes; Molecular breeding; Directed-mutation of *rhizobia*