

旋扭山绿豆根瘤菌 CB627 结瘤因子的测定 (简报)

靖元孝 陈兆平 程惠青 莫熙穆

(华南师范大学生物系, 广州 510631)

ROOT HAIR DEFORMATION TESTING OF NODULATION FACTOR IN *RHIZOBIUM* STRAIN CB627 ISOLATED FROM *DESMODIUM INTORTUM*

Jing Yuanxiao Chen Zhaoping Cheng Huiqing Mo Ximu

(Department of Biology, South China Normal University, Guangzhou 510631)

中图分类号 Q939.1107

Rhizobium、*Bradyrhizobium* 和 *Azorhizobium* 能侵染豆科植物并形成根瘤。在根瘤形成过程中, 共生伙伴之间首先进行信号物质交换, 植物分泌类黄酮 (flavonoids) 到根际, 类黄酮与 NodD 蛋白结合, 进而在转录水平调节其它 nod 基因的表达, 这些 nod 基因的产物 (Nod 蛋白) 控制根瘤菌产生胞外信号物质 (lipochitin oligosaccharide, 简称 LCO)^[1]。LCO 能引起宿主植物根毛变形、皮层细胞分裂、根瘤原基及根瘤的形成, 因此 LCO 定名为结瘤因子 (nod factor)。在没有根瘤菌存在的条件下, LCO 能独立引起对应豆科植物根毛变形, 这是检测 LCO 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)。LCO 的发现和分子结构的阐明是近年来生物固氮领域的重要进展之一。国外有关苜蓿根瘤菌、豌豆根瘤菌、大豆根瘤菌及其它根瘤菌 LCO 结构和功能的报道很多^[2-5]。在国内, 杨国平^[6]等对紫云英根瘤菌 LCO 进行了初步的研究。旋扭山绿豆是一种优良的豆科牧草, 在广东广为种植。本研究以旋扭山绿豆 (*Desmodium intortum*) 为宿主植物, 利用 Had 实验来检测根瘤菌 CB627 结瘤因子的存在。

1 材料和方法

菌株、植物品种和培养方法 旋扭山绿豆根瘤菌 CB627 由澳大利亚赠送。根瘤菌的培养采用特定培养基^[7], 其中用 2 g L⁻¹ 琥珀酸钠作碳源, 1 g L⁻¹ 谷氨酸钠作氮源。植物生长采用 Jensen 培养基^[8]。

种子分泌物的制备 旋扭山绿豆种子经表面消毒后, 每克种子用 5 ml 无菌水浸泡 24 h, 过滤得滤液, 滤液在 4 000 × g 下离心 15 min, 上清液用细菌过滤器过滤除菌, 用 YMA 平板检测滤液是否有菌, 无菌的种子分泌物置 -20 °C 保存备用。

根瘤菌结瘤因子粗提物的制备 在根瘤菌培养基(250 ml)中, 接种0.2 ml活化的根瘤菌悬液及2 ml种子分泌物, 28℃、110 r min⁻¹振荡培养至对数期, 10 000×g离心20 min, 上清液用1/5体积的正丁醇抽提三次, 合并收集LCO正丁醇抽提液。冷冻干燥除去正丁醇后, 用适量蒸馏水重新溶解, 再用等体积乙酸乙酯洗涤三次, 水相部分即为LCO粗提物。冷冻干燥后, LCO粗提物置-5℃保存备用。

Had 试验 取不同量的LCO粗提物, 加入20 ml Jensen培养基中混匀倒平板, LCO最终浓度分别为10⁻⁶、10⁻⁵、10⁻⁴、2×10⁻⁴、5×10⁻⁴ mg ml⁻¹, 每个平板种上经灭菌的发芽种子20粒, 每个处理重复三皿, 先在黑暗条件下培养24 h, 然后转至16 h光照/8 h黑暗周期条件下培养。培养过程中, 用显微镜观察根毛形态。对照实验为: 1) 接种根瘤菌至Jensen培养基中; 2) 加入不添加LCO粗提物的根瘤菌培养滤液至Jensen培养基中; 3) 不添加任何成分至Jensen培养基中。

LCO的紫外吸收 利用日本岛津UV-1206分光光度计测定在不同波长下LCO的光密度值。

2 结果和讨论

在16 h光照/8 h黑暗周期条件下培养24 h后, 每个处理观察10株幼苗, 每株幼苗统计100条根毛, 结果表明: 在Jensen培养基中, 当LCO浓度小于2×10⁻⁴ mg ml⁻¹(即10⁻⁶、10⁻⁵、10⁻⁴ mg ml⁻¹)时, 没有观察到根毛变形; 而当LCO浓度为2×10⁻⁴、5×10⁻⁴ mg ml⁻¹时, 有70%的根毛发生变形, 表现为根根毛弯曲、膨胀和分支(图1-a)。培养30 d后, 有Had反应的植株有瘤状物形成, 但瘤状物呈白色, 没有根瘤菌存在; 接种根瘤菌的对照组也出现以上相同的根毛变形(图1-b), 但根瘤呈粉红色, 有根瘤菌存在; 而加入未添加LCO粗提物的CB627培养物滤液对照组, 不论何浓度、处理时间多长均不能引起根毛变形(根毛为直形)(图1-c); 不添加任何成分的对照组也没有观察到根毛变形。可见, 在没有根瘤菌存在的条件下, LCO粗提物能独立引起旋扭山绿豆根毛变形并形成瘤状物。

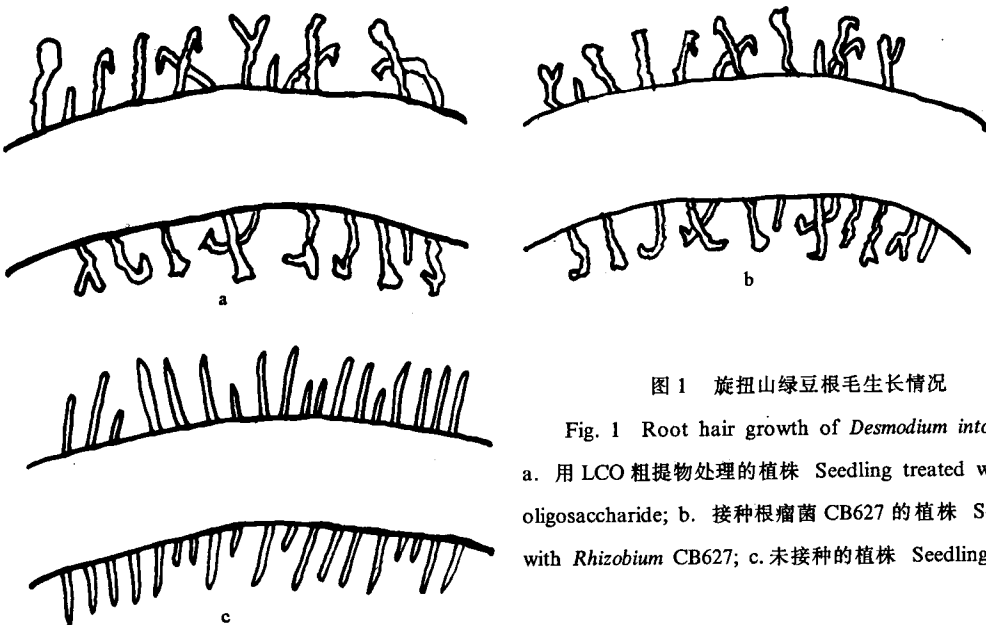


图1 旋扭山绿豆根毛生长情况

Fig. 1 Root hair growth of *Desmodium intortum*

a. 用LCO粗提物处理的植株 Seedling treated with Lipochitin oligosaccharide; b. 接种根瘤菌CB627的植株 Seedling inoculated with *Rhizobium* CB627; c. 未接种的植株 Seedling uninoculated

Had 试验最初是用于检测苜蓿根瘤菌 LCO 活性的生物测定方法, 该方法灵敏可靠, 为苜蓿根瘤菌 LCO 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^[2]。引起 Had 反应所需时间各不相同, 有的需几天甚至几周, 有的只需数分钟或几小时^[2,3,9], 所需纯品 LCO 的浓度为 10^{-11} — 10^{-7} mol/L。本实验在 16 h 光照、8 h 黑暗周期条件下培养 24 h 后, 只要 LCO 粗品的浓度大于 $0.2 \mu\text{g ml}^{-1}$, 就能观察到根毛变形, 如以每皿 20 ml Jensen 培养基计算, 则利用 $4 \mu\text{g}$ 的 LCO 粗品就足够进行 Had 试验。

此外, 我们还研究了 LCO 的紫外吸收特性, 发现 LCO 最大吸收峰为 210 nm (图 2), 这与豌豆根瘤菌 LCO 的最大吸收峰 (206 nm) 和苜蓿根瘤菌 LCO 的最大吸收峰 (220 nm) 非常接近^[2,10,11], 为今后进行 LCO 纯化及结构分析工作打下了基础。

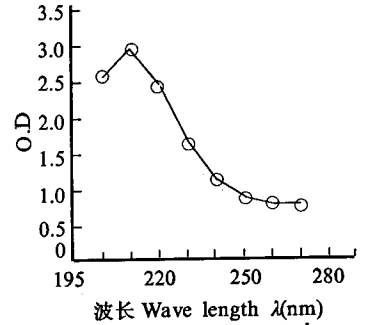


图 2 LCO 的紫外吸收

Fig. 2 UV absorption of lipochitin oligosaccharide

参考文献

- 1 Tikhonovich I A et al. Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications. Proceedings of the 10th International Congress on Nitrogen Fixation. Dordrecht/Boston/London:Kluwer Academic publishers, 1995, 37
- 2 Lerouge P, Roche P, Faucher C et al. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. Nature, 1990, 344:781—784
- 3 Heidstra R, Geurts R, Franssen H et al. Root hair deformation activity of nodulation factors and their fate on *Vicia sativa*. Plant Physiol, 1994, 105:787—797
- 4 Stokkermans T J W, Peters N K. *Bradyrhizobium elkanii* lipo-oligosaccharide signals induce complete nodule structures on *Glycine soja* Siebold et Zucc. Planta, 1994, 193:413—420
- 5 Poupot R, Martinez-Romero E, Gautier N et al. Wild type *Rhizobium etli*, a bean symbiont, produces acetylfucosylated, N-methylated, and carbamoylated nodulation factors. J Biol Chem, 1995, 270(11):6050—6055
- 6 杨国平, 朱军, 娄无忌. 紫云英根瘤菌结瘤因子的初步研究. 微生物学报, 1994, 34(5):406—408
- 7 [英]J. M. 芬森特著, 上海植物生理研究所固氮研究室译. 根瘤菌实用研究手册. 上海:上海人民出版社, 1974, 5—6
- 8 [英]J. M. 芬森特著, 上海植物生理研究所固氮研究室译. 根瘤菌实用研究手册. 上海:上海人民出版社, 1974, 72
- 9 Kurkdjian A C. Role of the differentiation of root epidermal cells in nod factor (from *Rhizobium meliloti*)-induced root-hair depolarization of *Medicago sativa*. Plant Physiol, 1995, 107:783—790
- 10 Spaink H P, Sheeley D M, van Brussel A A N et al. A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipo-oligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium*. Nature, 1991, 354:125—129
- 11 Schultze M, Quietlet-sire B, Kondorosi É et al. *Rhizobium meliloti* produces a family of sulfated lipo-oligosaccharides exhibiting different degrees of plant host specificity. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89:192—196