

植物生长调节剂 BR 和 SHK—6 对大豆生物产量和根瘤固氮活性的激素调控研究^{*}

张明才 何钟佩 田晓莉 王保民 段留生 翟志席 李召虎^{**}

(中国农业大学农学与生物技术学院作物化学控制研究中心,
农业部作物栽培与耕作学重点实验室, 北京 100094)

摘要 应用快生根瘤菌(*S. inorhizobium xinjiangensis*, CCBAU110^T)和慢生根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*^T, USDA6^T)接种大豆, 在无菌沙培条件下叶面喷施植物生长调节剂 BR 和 SHK—6 研究调节剂对大豆植株及根瘤固氮的激素调控效应。结果表明: 1) 不同根瘤菌接种条件下, BR 和 SHK—6 处理大豆根干重和茎干重得到显著增加, 提高了根瘤数、根瘤重和根瘤固氮活性。2) BR 和 SHK—6 处理提高了根瘤固氮能力, 根瘤、根和茎的含氮量得到明显提高。3) BR 和 SHK—6 处理通过改变激素平衡来调控根瘤固氮, 其中 CTK/GA、CTK/IAA 对根瘤固氮有正调控作用, IAA/ABA 和 GA/ABA 有负调控作用。

关键词 根瘤菌; 植物生长调节剂; 激素; 大豆; 根瘤

中图分类号 S 565.1 文献标识码 A 文章编号 1000—9841(2004)02—0096—05

油菜素内酯(Brassinolide)是 1979 年 Grove 等从油菜花粉中分离出来的一种高活性生长调节物质, 能调节植物生长发育的许多过程^[1-3]。BR 诱导植物生长是通过提高代谢途径中的光合、核酸和蛋白质的合成^[4-6]。Vardhini Vbet al. 认为 BR 促进花生生长和产量, 这种促进是与核酸、可溶性蛋白和碳水化合物化合物的增加有关, 进一步研究发现 BR 能提高花生的结瘤数和固氮活性^[7-8]。

目前 BR 对大豆生产上应用研究报道如能促进大豆苗期生长, 叶片硝酸还原酶活性得到明显提高等^[9], 但 BR 对大豆根瘤固氮影响的研究较为缺乏。本实验室研制了新型大豆专用型植物生长调节剂 SHK—6(主要成分为 80% 二乙氨基乙基己酸酯·甲哌噻可湿性粉剂), 在试验中发现其可以提高产量, 改善品质, 而且提高了根系的结瘤数和固氮活性。但植物生长调节剂是如何通过改变内源激素来调控根瘤固氮能力需进一步研究。因此本文通过 BR 和 SHK—6 在不同根瘤菌接种条件下对大豆植株及根瘤固氮的激素调控效应进行比较试验研究, 初步揭

示植物生长调节剂通过改变内源激素调节根瘤固氮活性的机制, 也为新型植物生长调节剂 SHK—6 在大豆生产应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 大豆根瘤菌菌株

快生根瘤菌(*S. xinjiangensis*, CCBAU110^T)和慢生根瘤菌(*B. japonicum*^T, USDA6^T)均为中国农业大学生物学院微生物系陈文新院士提供。根瘤菌培养于 YMA 液体培养基上^[10], 25℃ 培养。接种剂活菌数的测定采用 Beckman DU—70 分光光度计测定吸光值^[11]。

1.2 大豆品种

高油大豆垦农 5 号(黑龙江八一农垦大学)

1.3 试验方法

采用双层钵和 Fahraeus 无氮植物营养液作无菌沙培^[12]。种子经 0.1% HgCl 表面灭菌、催芽后播种, 每处理重复 4 次。将根瘤菌悬浮液稀释每毫升

* 收稿日期: 2004—02—18

基金项目: 国家“863”计划(2003AA246061)和农业结构高速重大技术研究专项资助(2003—03—03A)

作者简介: 张明才(1975—), 男, 博士研究生, 主要从事作物化学控制研究。

** 通讯作者: 李召虎, 教授, 博士生导师。

108 个细胞, 进行接种, 每株接种 1ml。在三叶期叶面喷施植物生长调节剂 BR (0. 1mg. L⁻¹) 和 SHK—6 (100mg. L⁻¹), 喷药后 30 天收获, 测定植株干重和用凯氏定氮测定植株各部位的全氮量^[13]。同时取植株鲜样, 液氮速冻, 测定植物激素。利用间接酶联免疫方法测定植物激素^[14], 利用乙炔还原法测定根瘤固氮酶活性^[15]。

2 结果与分析

2.1 BR 和 SHK—6 处理对大豆植株干物质的影响

两种不同根瘤菌接种条件下, BR 和 SHK—6 处理均提高了大豆根干重和茎干重, 且处理与对照比较均达到显著(表 1)。在快生根瘤菌 CCBAU110^T 和慢生根瘤菌 USDA6^T 的比较中, 大豆根干重和茎干重之间的差异未达到显著。

表 1 BR 和 SHK—6 处理对大豆植株干物质的影响			
Table 1 Effect of BR and SHK—6 on the soybean dry weight			
根瘤菌 Rhizobia	处理 Treatment	根 Root weight (mg/g)	茎 Shoot weight (mg/g)
CCBAU110 ^T	BR	0. 315a	0. 740a
	SHK—6	0. 299a	0. 766a
	CK	0. 229b	0. 652b
	Mean	0. 281	0. 719
USDA6 ^T	BR	0. 267a	0. 755a
	SHK—6	0. 265a	0. 801a
	CK	0. 183b	0. 628b
	Mean	0. 238	0. 728

(* The mean difference is significant at the 0. 05 levels by LSD test. The data in table 1 is the average of 12 duplicates, the date of following tables is the same as that.)

2.2 BR 和 SHK—6 处理对大豆根瘤数、根瘤重和根瘤固氮活性的影响

SHK—6 在不同根瘤菌接种条件下, 根瘤数与对照比较差异均达到显著(表 2)。其中在快生根瘤菌 CCBAU110^T 接种, SHK—6 处理根瘤数比对照提高了 55%, 在慢生根瘤菌 USDA6^T 接种, SHK—6 处理根瘤数比对照提高了 63%。同时, BR 处理在快生根瘤菌 CCBAU110^T 和慢生根瘤菌 USDA6^T 的条件下根瘤数比对照分别提高了 18%和 50%。从根瘤固氮活性上分析, 两种不同根瘤菌接种条件下, BR 和 SHK—6 处理均提高了大豆根瘤固氮活性, 且处理与对照比较均达到显著。在根瘤干重上, BR

处理在快生根瘤菌 CCBAU110^T 和慢生根瘤菌 USDA6^T 的条件下根瘤干重比对照分别提高了 15%和 22%, SHK—6 处理与对照比分别提高了 27%和 24%, 各个调节剂处理与对照根瘤干重比较差异均达到显著水平。不同根瘤菌接种对根瘤数和根瘤干重的影响不大, 但对根瘤固氮活性的影响明显, 快生根瘤菌 CCBAU110^T 和慢生根瘤菌 USDA6^T 之间的差异达到显著。

表 2 BR 和 SHK—6 处理对大豆根瘤数、根瘤重和根瘤固氮活性的影响				
Table 2 Effect of BR and SHK—6 on the soybean nodule numbers nodule weight and ARA ^a				
根瘤菌 Rhizobia	处理 Treatment	ARA ($\mu\text{mol C}_2\text{H}_4\text{g}^{-1}\text{fw t nodules h}^{-1}$)	根瘤数 Nodule number (/ plant)	根瘤干重 Nodule dry weight (g/ plant)
CCBAU110 ^T	BR	112. 31a	13ab	0. 176a
	SHK—6	120. 13a	17a	0. 194a
	CK	79. 72b	11b	0. 153b
	Mean	104. 05	14	0. 174
USDA6 ^T	BR	86. 91a	12a	0. 180a
	SHK—6	91. 26a	13a	0. 183a
	CK	65. 12b	8b	0. 147b
	Mean	81. 10	11	0. 170

(^aIndicated acetylene—ethylene reduction activity)

2.3 BR 和 SHK—6 处理对大豆植株蛋白质分布的影响

在无氮培养条件下, 植株的氮素主要来源于种子氮和根瘤固氮, 种子氮含量差异不大, 因此植株蛋白质含量的高低可以反映根瘤固氮能力的强弱。从试验结果分析, 在不同根瘤菌接种条件下, 根瘤固氮产物分配趋势一致, 主要分配到地上部, 其次为瘤中, 再次为根中, 其中茎部的蛋白质含量与其它两

表 3 BR 和 SHK—6 处理对大豆植株蛋白质分布的影响				
Table 3 Effect of BR and SHK—6 on the soybean protein distribution				
根瘤菌 Rhizobia	处理 Treatment	根瘤 Nodule (mg/ plant)	根 Root (mg/ plant)	茎 Shoot (mg/ plant)
CCBAU110 ^T	BR	2. 71b	2. 56b	10. 04a
	SHK—6	4. 10a	3. 35a	11. 64a
	CK	2. 52b	2. 09c	7. 92c
	Mean	3. 11B	2. 674B	9. 87A
USDA6 ^T	BR	2. 98a	1. 91a	8. 321b
	SHK—6	3. 06a	1. 97a	9. 55a
	CK	2. 36b	1. 51b	7. 97b
	Mean	2. 80B	1. 80B	8. 61A

个部位的含量比较差异达到显著水平,根瘤和根蛋白质含量比较差异未达到显著(表3)。不同根瘤菌接种对根瘤固氮产物分配影响不大。但调节剂处理对各部位含氮量影响较大,如 SHK-6 处理在不同根瘤菌接种条件下,各部位含氮量比对照均有提高,且处理与对照比差异达到显著。BR 处理均比对照提高了各部位的含氮量,其中在 CCBAU110^T 接种条件下,根和茎的含氮量与对照比差异达到显著,在 USDA6^T 接种条件下,根瘤和根的含氮量与对照比差异达到显著。

2.4 BR 和 SHK-6 处理对根瘤激素的影响

研究结果表明,在根瘤中,CTK(细胞分裂素)的含量最高,其次为 GA(赤霉素),IAA 和 ABA 含量较低(表4)。调节剂对根瘤中激素影响较大,其中在 CCBAU110^T 接种条件下,SHK-6 处理各种激素含量与其它各处理比较差异均达到显著,BR 处理与对照比较差异也达到显著。在 USDA6^T 接种条件下,SHK-6 处理各种激素含量(除 GA 和 IAA 外)与对照比较差异也达到显著,而 BR 处理各种激素含量与对照比较,CTK 和 ABA 含量处于同一水平外,GA 和 IAA 含量显著低于对照。两种根瘤菌接种,调节剂对根瘤中激素含量影响不一,这表明各种激素在根瘤固氮中不是单一起作用的,激素平衡起着重要的调控起作用。从激素平衡角度分析(表5),在不同根瘤菌接种条件下,SHK-6 和 BR 处理 CTK/GA 和 CTK/IAA 的比值均高于对照,GA/IAA、GA/ABA 和 IAA/ABA 的比值均低于对照。从根瘤固氮活性与激素比值相关性分析,在

CCBAU110^T 接种条件下,CTK/GA($r=0.95, 0.05$ 显著)和 CTK/IAA($r=0.95, 0.05$ 显著)与根瘤菌固氮活性成显著正相关,而 GA/IAA($r=-0.96, 0.05$ 显著)、GA/ABA($r=-0.99, 0.01$ 显著)和 IAA/ABA($r=-0.95, 0.01$ 显著)与根瘤菌固氮活性成显著负相关;在 USDA6^T 接种条件下,CTK/GA($r=0.97, 0.05$ 显著)、CTK/IAA($r=0.99, 0.01$ 显著)和 CTK/ABA($r=0.97, 0.05$ 显著)与根瘤菌固氮活性成显著正相关,而 GA/ABA($r=-0.98, 0.05$ 显著)和 IAA/ABA($r=-0.99, 0.01$ 显著)与根瘤菌固氮活性成显著负相关。因此可以初步得出,根瘤固氮活性可能是受 CTK/GA、CTK/IAA 正调控,而受 IAA/ABA 和 GA/ABA 负调控作用。

表4 BR 和 SHK-6 处理对根瘤激素的影响
Table 4 Effect of BR and SHK-6 on the content of different plant hormones in nodules

根瘤菌 Rhizobia	处理 Treatment	CTK (ng/g, fw)	GA (ng/g, fw)	IAA (ng/g, fw)	ABA (ng/g, fw)
CCBAU110 ^T	BR	2584b	2177b	724b	615b
	SHK-6	2880a	2286a	768a	676a
	C K	2358c	2142b	703b	536c
	Mean	2607	2202	732	609
USDA6 ^T	BR	2296b	1877b	649c	686b
	SHK-6	2591a	1784c	711b	780a
	C K	2213b	2229a	808a	675b
	Mean	2367	1963	714	

表5 BR 和 SHK-6 处理对根瘤激素的影响
Table 5 Effect of BR and SHK-6 on the content of different plant hormones in nodules

根瘤菌 Rhizobia	处理 Treatment	CTK/GA	CTK/IAA	CTK/ABA	GA/IAA	GA/ABA	IAA/ABA
CCBAU110 ^T	BR	1.19	3.57	4.18	3.01	3.54	1.18
	SHK-6	1.26	3.75	4.26	2.98	3.38	1.14
	CK	1.10	3.35	4.40	3.05	4.00	1.31
	Mean	1.18	3.56	4.29	3.01	3.64	1.21
USDA6 ^T	BR	1.22b	3.54a	3.35	2.89	2.74	0.95
	SHK-6	1.45a	3.64a	3.84	2.51	2.64	0.91
	CK	0.99b	2.74b	2.84	2.76	2.86	1.20
	Mean	1.22	3.31	3.34	2.72	2.75	1.02

3 讨论

在两种根瘤菌接种条件下,BR 和 SHK-6 处理提高了根瘤数、根瘤重和根瘤固氮活性,根瘤固氮能力得到明显改善,根瘤、根和茎的含氮量得到显著提高,同时大豆根干重和茎干重得到显著增加。在花生上研究报道 BR 在花期喷施 BR 显著提高花生的

根瘤数、根瘤重和根瘤固氮活性^[8]。在根瘤固氮能力调控上, 植物生长调节剂 SHK-6 与 BR 比较发现, SHK-6 处理提高了植株蛋白质的含量, 其中在 CCBAU110^T 的根瘤和根中和 USDA6^T 的茎中蛋白质含量与 BR 比较差异达到显著水平。同时, SHK-6 处理与 BR 处理比较明显提高了根瘤内各种激素含量。这可以表明植物生长调节剂 SHK-6 对根瘤固氮的调控能力要高于 BR, 具有较高的生理活性。在 CCBAU110^T 和 USDA6^T 比较中发现, 不同根瘤菌接种不改变根瘤内的激素水平, 但含量上 CCBAU110^T 要高于 USDA6^T。除根瘤固氮活性外, CCBAU110^T 接种其他各测定指标要高于 USDA6^T, 但差异未达到显著水平。由此可以得出, CCBAU110^T 的活性要高于 USDA6^T, 在生产上的应用价值更高。

豆科植物与根瘤菌形成的共生结构是个复杂的过程。在共生有机体中, 宿主与共生体必然发生交流。在根瘤发生过程中, 植物激素很早就被认为是信号传递的介质。植物生长调节剂应用在豆科作物上来调控根瘤生长发育的研究较多。如大豆用生长素(IAA)、乙烯利和激动素浸种, 结果表明乙烯利、激动素促进了根瘤的提前发生, 而生长素(IAA)延迟了根瘤发生。同时发现以上各处理, 都提高了根瘤数、根瘤重、根瘤活性、叶绿素含量以及整株氮含量^[15]。这些研究结果与本试验的结果基本一致。

本研究初步揭示了植物激素在根瘤固氮表现的调控机理, 即在根瘤中, CTK 的含量最高, 其次为 GA, IAA 和 ABA 含量较低。与此类似的报道有在 *Tephrosea purpurea* Pers(一种豆科牧草)的根瘤中, 含有含量高的 IAA, ABA, GA 和 CTK^[16]。在成熟的 *Lentil* 根瘤中 IAA、CTKs 和 GAs 含量以及根瘤固氮活性都比形成中的根瘤高。在冬季, IAA 和 CTKs 含量最高, 根瘤活性也达到最大值, GA 和 ABA 的含量低^[17]。也有研究认为具有固氮能力的根瘤根瘤活性与 IAA、CTKS 的含量成正相关, 而与 GA、ABA 的含量没有相关性^[18]。但本文研究认为根瘤固氮能力是受 CTK/GA、CTK/IAA 正调控, 而受 IAA/ABA 和 GA/ABA 负调控作用。这一研究报道与前人研究根瘤发生的结果类似, 如 Cooper and Long (1994)发现细胞分裂素能够诱导苜蓿根形成类似根瘤结构^[19]。Hirsch A.M. et al. (1997)发现细胞分裂素诱导 MsENOD40 在未接种的苜蓿根中表达, 同时, 用生长素抑制剂处理未接种的苜蓿(*M. sativa*)和甜豆(*M. eliotus alba*), MsENOD40 也表达。这些结

果表明根皮层中较高的细胞分裂素/生长素比例导致细胞分裂, 可以推测细胞分裂素/生长素比例的控制是结瘤因子信号传递的组成部分之一^[20]。

参考文献

- 1 赵毓橘. 油菜素内酯研究进展[J]. 植物学通报, 1995, 12(专辑): 30-34.
- 2 Sasse JM. Recent progress in brassinosteroids research[J]. *Physiol Plant*, 1997, 100: 696-701.
- 3 Fujioka S, Sakurai A. Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids [J]. *Physiol Plant*, 1997, 100: 710-715.
- 4 Braun P, Wild A. The influence of brassinosteroids on growth and parameters of photosynthesis of wheat and mustard plants[J]. *J Plant Physiol*, 1984, 116: 189-196.
- 5 Kalinch FN, Manadava NB, Todhunter JA. Relationship of nucleic acid metabolism to brassinolide induced responses in bean[J]. *J Plant Physiol*, 1985, 120: 207-214.
- 6 Sairam PK. Effect of homobrassinolide application on plant metabolism and grain yield under irrigated and moisture stress conditions of two wheat varieties[J]. *Plant Growth Regulation*, 1994, 14: 173-181.
- 7 Vardhini VB, Rao SSR. Effect of brassinosteroids on growth, metabolite content and yield of *Arachis hypogaea*[J]. *Phytochemistry*, 1998, 48: 927-930.
- 8 Vardhini VB, Rao SSR. Effect of brassinosteroids on nodulation and nitrogenase activity in Groundnut(*Arachis hypogaea* L.)[J]. *Plant Growth Regulation*, 1999, 28: 165-167.
- 9 齐志广, 赵俊霞. 油菜素内酯对大豆苗期生长及硝酸还原酶活性的影响[J]. 河北师范大学学报(自然科学版), 1999, 23(2): 271-273.
- 10 Vincent M J. 上海植物生理研究所固氮室译, 根瘤菌实用手册[M]. 上海: 人民出版社, 1970. 3
- 11 杨江科, 周琴, 周俊初. pH 对土壤中土著快、慢生根瘤菌结瘤的影响[J]. 应用生态学报, 2001, 12(4): 639-640.
- 12 缪礼鸿. 费氏中华根瘤菌内源质粒的不相容性及其在质粒消除中的应用[J]. 微生物学报, 2001, 41(4): 432-439.
- 13 张家藻, 莫尚武, 邱淑华. 大豆球蛋白微量快速分析[J]. 大豆科学, 1987, 6(2): 151-156.
- 14 何钟佩主编. 农作物化学控制实验指导[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1993: 60-68.
- 15 常从云. 大豆—根瘤菌共生固氮乙炔还原法测定方法的研究[J]. 大豆科学, 1986, 5(4): 357-366.
- 16 Sharma R, Kwon EO. Effect of growth regulators on nodulation and some biochemical parameters in soybean[J]. *Plant Physiology and Biochemistry India*, 1987, 14(2): 146-152.
- 17 De P. S., Basu P. S. Content of hormone and indole acetic acid metabolism in root nodules of *Tephrosea Purpurea* Pers[J]. *Indian J. Plant Physiol*, 1995, Vol. XXXVIII No. 3: 228-232.
- 18 Dangar T. K., Basu P. S. Seasonal changes and metabolism of plant hormones in root nodules of *lens sp*[J]. *Biologica plantarum*, 1984,

- 26(4): 253—259.
- 19 Dangar T. K., Basu P. S. Studies on seasonal variation of plant hormones nitrogen fixation and indole acetic acid metabolism in root nodulus of *Betea monosperma* (Lam.) Taub[J]. *Plant and Soil*. 1985, 84(1): 147—152.
- 20 Coopes J. B., Long, S. R. Morphogenetic complementation of *Rhizobium meliloti* nodulation mutants by trans—zeatin secretion[J]. *Plant Cell*. 1994, 6: 215-225.
- 21 Hirsch, A. M. Early nodulin genes are induced in alfalfa root outgrowths elicited by auxin transport inhibitors[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1989, 86: 1244-1248.

HORMONAL REGULATION OF PLANT GROWTH REGULATOR BR AND SHK—6 ON SOYBEAN BIOMASS AND NITROGENASE ACTIVITY

Zhang Mingcai He Zhongpei Tian Xiaoli Wang Baomin Duan liusheng Zhai zhixi Li Zhaohu
(*The Center of Crop Chemical Control, College of Agronomy and Biotechnology,
China Agricultural University, Beijing 100094*)

Abstract A comparative study was conducted on regulation of brassinolide(BR) and SHK—6 on the symbiosis between soybean and rhizobium strains of CCBAU110^T and USDA6^T under sterility sandy culture and pot experiment. The results showed that BR and SHK—6 significantly increased the dry weight of root and shoot, nodule numbers nodule weight and nitrogenase activity in different inoculated rhizobium strains. The nitrogen content was evidently increased by BR and SHK—6 in the nodule, root and shoots. Plant growth regulator regulated the nodule number and fixing nitrogen activity by the hormone balance. It was found that the CTK/GA and CTK/IAA was up—regulation of nodule fixing nitrogen activity, and the IAA/ABA and GA/ABA was down—regulation of nodule fixing nitrogen activity.

Key word Rhizobium; Plant growth regulator; Hormone; Soybean; Nodule