

豆科作物调控共生固氮响应干旱胁迫机制研究进展

张立军, 陈艳秋, 宋书宏

(辽宁省农业科学院 作物研究所, 辽宁 沈阳 110866)

摘要: 豆科作物因其丰富的蛋白质含量而成为人类食品和动物饲料的重要原料。豆科作物具有与根瘤菌形成根瘤固定空气中氮素的能力, 这不仅减少了化学肥料的使用, 同时还起到培肥地力、改善农田土壤质量、促进农业可持续发展的作用。然而, 豆科作物的共生固氮过程极易受环境胁迫, 尤其是干旱胁迫的影响。本文简要探讨了根瘤菌在共生固氮应对干旱胁迫过程中所起的作用, 着重论述了寄主植物碳代谢、氮代谢及氧气平衡三方面的调节机制, 并探讨了氧化胁迫、碳氮互作及硫代谢在调控机制研究中的重要意义。

关键词: 豆科作物; 根瘤; 干旱胁迫; 调控

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2013)05-0694-04

Research Progress on Regulation Mechanism of Symbiotic Nitrogen Fixation of Legumes in Response to Drought Stress

ZHANG Li-jun, CHEN Yan-qiu, SONG Shu-hong

(Crop Institute, Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Shenyang 110866, China)

Abstract: Legume crops are the important resource of human food and animal feed with their high protein content. Many legume crops have the ability to form root nodules with rhizobia to fix nitrogen from air, which not only reduce the use of chemical fertilizers, but also enhance the soil fertility, improve soil quality and promote the sustainable development of agriculture. However, the process of symbiotic nitrogen fixation of legumes is vulnerable to environmental stress, especially to drought stress. This paper discussed the role of rhizobia in the process of symbiotic nitrogen fixation response to drought stress, especially the regulation mechanism of carbon metabolism, nitrogen metabolism, and the oxygen balance in the host plant, as well as the significance of oxidative stress, carbon and nitrogen interaction, sulfur metabolism in the regulation mechanism.

Key words: Legume crops; Nodule; Drought stress; Regulation mechanism

氮素是限制作物产量最主要的元素, 虽然豆科作物可以同时利用生物固氮(根瘤固定大气中的氮)和矿质氮(包括土壤矿化氮和氮肥)^[1], 但二者在环境因素和生育时期的作用下表现出既互补又矛盾的复杂关系。在合理施用氮肥的前提下, 环境胁迫是限制共生固氮的最主要因素, 尤其是干旱胁迫严重减少氮素固定数量, 以致作物产量和品质下降^[2]。

迄今为止, 虽然众多学者已经从不同方面论述了干旱对共生固氮的影响, 但由于关注重点局限在寄主植物与固氮菌所形成的共生固氮关系上, 而忽略了干旱对寄主植物本身的影响, 以及寄主植物在共生固氮应对干旱胁迫过程中的调节作用。因此, 本文着重论述了干旱胁迫下寄主植物调控共生固氮的途径。

1 固氮菌在根瘤响应干旱胁迫中的作用

共生固氮是由寄生于寄主细胞、位于根瘤内部

的根瘤菌完成的。通常共生固氮菌较寄主植物具有更强的抗旱能力^[3], 然而能否将这一特性转移给共生体—根瘤还是一个有待论证的问题。虽然很多报道指出, 在理想环境条件下, 经过固氮菌基因改良后的生物固氮效率较未改良前高^[4-6], 但这些研究缺少从寄主植物的光合能力、碳水化合物向根瘤的分配特性以及生物固氮能力等角度进行全面评估。而且即使获得了抗逆性理想的菌系, 是否具有较土著优势菌系更强的接种能力也是一个无法回避的问题^[7]。虽然 Suárez 等^[8]研究发现, 通过过量表达共生固氮菌中的海藻糖-6-磷酸合成酶基因能够改善菜豆抗旱能力和产量, 但这种改善效果与增加干旱后期的存活率有关, 而并未减少干旱初、中期发生的有害生理过程。

目前, 众多研究得到一致结论, 即根瘤中控制根瘤固氮的代谢因素主要包括: (1) 碳水化合物产生能力; (2) 适宜的氧气浓度, 既保证碳水化合物的有氧呼吸, 又避免对固氮酶造成破坏; (3) 适宜的氮

收稿日期: 2013-04-23

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-004-CES11)。

第一作者简介: 张立军(1980-), 男, 学士, 助理研究员, 主要从事大豆遗传育种与栽培研究。E-mail: zhanglj_8005@163.com。

通讯作者: 宋书宏(1964-), 男, 研究员, 主要从事大豆遗传育种与栽培研究。E-mail: sshun@163.com。

素营养状态,避免反馈抑制的发生^[9]。而以上3个代谢途径在很大程度上是由寄主植物决定的,尽管共生固氮菌在根瘤应对干旱胁迫过程中能够起到一定作用,但较寄主植物相比是有限的。因此,研究重点应从寄主植物着手,通过改良根瘤中响应干旱胁迫的主植物基因实现固氮效率的提高。

2 碳代谢在根瘤响应干旱胁迫中的调控作用

在大豆与根瘤菌建立的共生关系中,大豆植株为根瘤输送碳水化合物以满足根瘤菌对能量的需求和支持固氮作用的进行^[10],并且,根瘤对来自寄主植物蔗糖的依赖特性与植株上其他库组织具有相似的性质^[11]。因此,干旱胁迫下,寄主植物改变光合产物的供应是对生物固氮进行调控的一条重要途径。

然而,众多研究结果表明,根瘤固氮能力在干旱初期就表现出明显下降,而光合作用仅略有变化,这似乎表明寄主植物的碳代谢与生物固氮调控无关。实际上,在干旱胁迫下寄主植物通过降低根瘤中蔗糖合成酶活力来避免根瘤对碳水化合物的过量消耗,甚至在光合作用没有发生明显变化前就开始了这种调控,以保证植株主要代谢过程的稳定,这一机制有利于增强极端环境下植物的生存能力^[12]。除此之外,由于根瘤中蔗糖分解受阻,同时寄主植物继续向根瘤供应蔗糖,必然导致根瘤中蔗糖的积累,从而起到渗透调节作用,在一定程度上保护蛋白质和膜免受活性氧(ROS)的伤害^[13-14]。

3 氮代谢在根瘤响应干旱胁迫中的调控作用

众多学者从无机氮对生物固氮的抑制作用推测,寄主植物的氮代谢状态是调控共生固氮的另一个重要方面,并且认为,干旱胁迫下一些含氮化合物起到信号分子的作用,导致反馈抑制的发生^[15]。Sinclair等^[16]研究发现,以酰脲为共生固氮输出产物的大豆和菜豆较以氨基化合物为输出产物的豌豆和羽扇豆对干旱的敏感性更高,进一步研究表明,向大豆喷施酰脲可增加叶片中酰脲含量,并抑制固氮酶活性^[17],据此断定,叶片中的酰脲是导致反馈抑制的信号分子。Vadez等^[18]也指出,大豆抗旱能力与地上部酰脲含量之间存在负相关关系,干旱敏感型大豆品种酰脲含量较高,并将原因归结为叶片中酰脲代谢途径的不同。

而Todd等^[19]研究指出,不同抗旱能力的大豆

品种叶片中酰脲降解途径是相同的,酰胺水解酶的表达与抗旱品种酰脲降解能力的加强无关^[20]。Ladrera等^[21]进一步证实,干旱发生的短时间内不同抗旱基因型大豆叶片中酰脲含量并无明显变化,而生物固氮却显著下降,这表明无论在干旱后期是否起反馈抑制作用,至少在前期大豆叶片中的酰脲与生物固氮变化无关。

随后的研究发现,根瘤内部酰脲的积累与生物固氮的下降同步发生,并且,干旱胁迫下不同基因型品种根瘤中酰脲的积累与生物固氮的抑制程度存在密切关系。由此可以推测,干旱限制了根瘤内部含氮化合物的输出,导致在根瘤中积累,进而直接影响生物固氮的进行。而且,这种根瘤局部的限制作用也可从Marion等^[22]的试验中得到验证,即仅受到干旱胁迫的那半部分根系的生物固氮得到抑制,而供水良好的那半部分依然保持正常的固氮能力。但根瘤中的酰脲是否是真正导致生物固氮下降的物质还有待确认,因为并不是所有根瘤都以酰脲的形式输出固氮产物。

4 氧气平衡在根瘤响应干旱胁迫中的作用

干旱抑制共生固氮的另一条重要途径是改变氧气动态平衡。正常情况下,豆血红蛋白(leghemoglobin, LB)可维持侵染细胞内适宜浓度的氧气,在不伤害固氮酶的前提下供有氧呼吸利用。此外,根瘤中还存在一个氧气扩散阀(oxygen diffusion barrier, ODB),调节氧气与碳水化合物的动态平衡^[23]。干旱会造成氧气扩散阀关闭,导致碳水化合物无法分解,共生固氮由于缺乏能量而停止。并且,即使外部人为供氧也不能使根瘤恢复固氮活性,表明寄主植物已丧失维持共生固氮的代谢能力^[24]。

事实上,虽然干旱直接造成根瘤内部氧气缺乏,但实质上是通过影响根瘤内部碳代谢间接抑制共生固氮。

5 其他调控因素在根瘤响应干旱胁迫中的作用

干旱胁迫会导致氧化胁迫伤害^[25],并且这种伤害可能对共生固氮产生决定性的影响,尤其对于苜蓿根瘤的影响巨大^[26],但对于其他豆科植物则体现为干旱作用于根瘤的主要形式或者在干旱后期导致根瘤不可逆转的衰老。虽然通过人为施用抗氧化剂—抗坏血酸盐不能恢复由干旱造成的氧化伤害^[27],但最近报道指出,芸豆和鹰嘴豆根瘤中的抗氧化酶活性升高可大幅度提升抗逆能力^[28]。其他

调节物质如脯氨酸和碳水化合物的积累可以起到对抗氧化胁迫的作用,而海藻糖可能以未知的方式起保护作用。另外,碳氮互作在根瘤响应干旱的调控过程中也起到重要作用,最近研究发现,作为碳氮平衡调控中主要组成部分的异柠檬酸脱氢酶在根瘤应对碳水化合物短缺^[29]和氧化胁迫^[30]过程中起重要作用。同时,有证据表明干旱会抑制蛋氨酸合成酶活性,进而严重影响根瘤内蛋白质合成和硫代谢^[31]。

6 展 望

最近,基因组学、蛋白质组学及代谢组学等相关技术的发展为深入了解干旱胁迫下共生固氮的调控机制创造了条件,研究人员不能仅以上述调控途径作为研究内容,还要创造新的视角、采用系统的研究方法进行探讨。例如根瘤内部蛋白的确切数量,这与干旱或其他环境胁迫引起的蛋白组分变化有关,在蛋白质水平上体现出根瘤内部应对环境胁迫的调节机制。

另一个值得注意的问题是,现有关于代谢路径和相应调控的知识大多是来自最适条件下,通过“体外法”测定酶活力获得的,所得结果可能与活体细胞相差甚远,而相应的代谢流动分析结合代谢组学可以获得代谢产物的流动网络动态,有助于更加客观地理解和描绘根瘤内部的调控网络。

最后,深入了解干旱胁迫对共生固氮的作用机理是改善豆科作物产量和品质的基础,需要将不同学科、不同研究水平的数据结合起来综合分析,这就需要国家乃至国际的资金支持,提供良好的研究环境,进而获得有价值的研究成果,为粮食生产和农业可持续发展提供技术支持。

参考文献

- [1] 陈慧,邸伟,姚玉波,等. 不同大豆品种根瘤固氮酶活性与固氮量差异研究[J]. 核农学报,2013,27(3):379-383. (Chen H, Di W, Yao Y B, et al. Study on the difference of nodule nitrogenase activity and amount of nitrogen fixation of different soybean varieties[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2013, 27(3): 379-383.)
- [2] 王平,周道玮,姜世成. 半干旱地区禾-豆混播草地生物固氮作用研究[J]. 草业学报,2010,19(6):276-280. (Wang P, Zhou D W, Jiang S C. Research on biological nitrogen fixation of grass-legume mixtures in a semi-arid area of China[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2010, 19(6): 276-280.)
- [3] Zahran H H. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under sever conditions and in an arid climate[J]. Microbiology Molecular Biology Reviews, 1999, 63: 968-989.
- [4] Yurgel S N, Soberón M, Sharypova L A, et al. Isolation of *Sinorhizobium meliloti* Tn5 mutants with altered cytochrome terminal oxidase expression and improved symbiotic performance[J]. FEMS Microbiology Letters, 1998, 165: 167-173.
- [5] Soberón M, López O, Morera C, et al. Enhanced nitrogen fixation in a rhizobium etli ntrC mutant that overproduces the *Bradyrhizobium japonicum* symbiotic terminal oxidase cbb₃[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65: 2015-2019.
- [6] Marroqui S, Zorreguieta A, Santanarria C, et al. Enhanced symbiotic performance by rhizobium tropici glycogen synthase mutants[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183: 854-864.
- [7] 李志芳,朱春茂,吴文良,等. 白三叶草/根瘤菌共生固氮潜力及干旱限制因素[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(3): 639-644. (Li Z F, Zhu C M, Wu W L, et al. Potential capacity of symbiosis nitrogen fixation of white clover-rhizobium interaction and drought limiting factor[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2009, 28(3): 639-644.)
- [8] Suárez R, Wong A, Ramírez M, et al. Improvement of drought tolerance and grain yield in common bean by overexpressing trehalose-6-phosphate synthase in rhizobia[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2008, 21: 958-966.
- [9] Merrick M J. Regulation of nitrogen fixation in free-living diazotrophs[M]//Klipp W, Masepohl B, Gallon J R, et al. Genetics and regulation of nitrogen fixation in free-living bacteria. Springer Dordrecht, 2005: 197-223.
- [10] Silva J A, Uchida R. Biological nitrogen fixation, plant nutrient management in Hawaii's soils[M]. Approaches for Tropical and Subtropical Agriculture, 2000: 121-126.
- [11] Hawker J S. Source[M]//Dey P M, Dixon R A. Biochemistry of storage carbohydrates in green plants. London: Academic Press, 1985: 1-51.
- [12] Marion D, Hohnjec N, Küster H, et al. Evidence for transcriptional and post-translational regulation of sucrose synthase in pea nodules by the cellular redox state[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2008, 21: 622-630.
- [13] Cuin T A, Shabala S. Exogenously supplied compatible solutes rapidly ameliorate NaCl-induced potassium efflux from barley roots[J]. Plant Cell Physiology, 2005, 46: 1924-1933.
- [14] Cuin T A, Shabala S. Compatible solutes reduce ROS-induced potassium efflux in *Arabidopsis* roots[J]. Plant Cell and Environment, 2007, 30: 875-885.
- [15] King C A, Purcell L C. Inhibition of N₂ fixation in soybean is associated with elevated ureides and amino acids[J]. Plant Physiology, 2005, 137: 1389-1396.
- [16] Sinclair T R, Serraj R. Legume nitrogen fixation and drought[J]. Nature, 1995, 378: 344.
- [17] Vadez V, Sinclair T R, Serraj R. Asparagine and ureide accumulation in nodules and shoots as feedback inhibitors of N₂ fixation in soybean[J]. Physiologia Plantarum, 2000, 110: 215-223.
- [18] Vadez V, Sinclair T R. Leaf ureide degradation and N₂ fixation tolerance to water deficit in soybean[J]. Journal of Experimental Botany, 2001, 52: 153-159.
- [19] Todd C D, Polacco J C. Soybean cultivars "Williams 82" and "Maple Arrow" produce both urea and ammonia during ureide degradation[J]. Journal of Experimental Botany, 2004, 55: 867-877.

- [20] Charlson D V, Korth K L, Purcell L C. Allantoate amidohydrolase transcript expression is independent of drought tolerance in soybean[J]. Journal of Experimental Botany, 2009, 60: 847-851.
- [21] Ladrera R, Marino D, Larrainzar E, et al. Reduced carbon availability to bacteroids and elevated ureides in nodules, but not in shoots, are involved in the nitrogen fixation response to early drought in soybean[J]. Plant Physiology, 2007, 145: 539-546.
- [22] Marion D, Frendo P, Ladrera R, et al. Nitrogen fixation control under drought stress: localized or systemic? [J]. Plant Physiology, 2007, 146: 1968-1974.
- [23] Minchin F R, James E K, Becana M. Oxygen diffusion, production of reactive oxygen and nitrogen species, and antioxidants in legume nodules[M]//Dilworth M J, James E K, Sprent J I, et al. Nitrogen-fixing leguminous symbioses. Springer Dordrecht, 2008: 321-362.
- [24] 袁剑刚, 杨中艺. 氮肥和水分条件对长喙田菁生长、结瘤和固氮的影响[J]. 植物生态学报, 2003, 27(1): 172-176. (Yuan J G, Yang Z Y. Effect of fertilizer and water condition on growth, nodulation and N-fixation of *Sesbania rostrata*-*Azorhizobium caulinodans* symbiosis[J]. Acta Phytocological Sinica, 2003, 27(1): 172-176.)
- [25] 赵志光, 李海燕, 陈拓, 等. 干旱与氧化胁迫对小麦根氧化还原状态和叶片 ABA 积累的影响[J]. 西北植物学报, 2006, 26(4): 736-742. (Zhao Z G, Li H Y, Chen T, et al. Effects of drought and oxidative stresses on redox status in wheat roots and ABA accumulation in wheat leaves[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2006, 26(4): 736-742.)
- [26] Naya L, Ladrera R, Ramos J, et al. The response of carbon metabolism and antioxidation defenses of alfalfa nodules to drought stress and to the subsequent recovery of plants [J]. Plant Physiology, 2007, 114: 1104-1114.
- [27] Zabalza A, Gálvez L, Marino D, et al. Effects of ascorbate and its immediate precursor, galactono-1,4-lactone on the response of nitrogen-fixing pea nodules to water stress [J]. Journal of Plant Physiology, 2008, 165: 805-812.
- [28] Sassi S, González E M, Aydi S, et al. Tolerance of common bean to long-term osmotic stress is related to nodule carbon flux and antioxidant defenses: evidence from two cultivars with contrasting tolerance [J]. Plant and Soil, 2008, 312: 39-48.
- [29] Gálvez S, Hirsch A M, Wycoff K L, et al. Oxygen regulation of a nodule-located carbonic anhydrase in alfalfa [J]. Plant Physiology, 2000, 124: 1059-1068.
- [30] Marino D, González E M, Frendo P, et al. NADH recycling systems in oxidase stressed pea nodules: a key role for the NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase [J]. Planta, 2007, 225: 413-421.
- [31] Larrainzar E, Wienkoop S, Ladrera R, et al. *Medicago truncatula* root nodule proteome analysis reveals differential plant and bacteroid response to drought stress [J]. Plant Physiology, 2007, 144: 1459-1507.

沉痛悼念王金陵先生

我国著名作物遗传育种学家、农业教育家、中国大豆杂交育种的开拓者、中国大豆泰斗、《大豆科学》创刊人之一王金陵先生,因病医治无效,于2013年9月4日在哈尔滨逝世,享年96岁。

王金陵先生一生献身于大豆的研究和教育事业,在大豆遗传育种、大豆进化、大豆生态、大豆种质资源评价与利用等方面做出了突出的贡献。他育种育人,注重培养人才和学术交流,1981年参与筹备创办《大豆科学》,并于1982~2000年亲任主编,对刊物的发展倾注了大量精力。先生一丝不苟、精益求精的工作作风和科学严谨的精神,为《大豆科学》的办刊立下了无形的准则。编辑部将继续秉承先生遗志,不断提高刊物学术水平,积极传播大豆科研成果,繁荣大豆学术研究,推动大豆产业发展。

王金陵先生终身不移的执着信念、勇开先河的创新意识、求真务实的科学态度、甘当人梯的无私品格将永远铭刻在我们心中,他为《大豆科学》的发展和我国农业科教事业做出的卓越贡献将亘古不朽、光耀史册!

王金陵先生千古!

《大豆科学》编辑部

2013年9月