

四川桉木根瘤主要氮素同化酶活力 及其超微结构研究*

吴祖洪 周国璋

摘要 四川桉木(*Alnus cremastogyne* Burkill)当年幼苗的根瘤平均固氮活力和硝酸还原酶(NR)活力5月底出现高峰,分别达 $11.03 \mu\text{mol G}_2\text{H}_4/(\text{gFw} \cdot \text{h})$ 和 $0.89 \mu\text{mol NO}_2^-/(\text{gFw} \cdot \text{h})$ 。当6月份根瘤开始衰败时,则迅速下降,而根瘤平均谷酰胺合成酶(GS)活力有所上升。2年生幼苗成年瘤和老瘤超过单株瘤重的70%。成年瘤占总瘤重的百分比5月底达最大值,为51.4%。而老瘤在6月份达最大值,为82.1%。随着根瘤由幼瘤发育到成年瘤和老瘤,固氮活力递减,GS活力递增,而NR活力在成年瘤中最高,老瘤次之,幼瘤最小。根瘤超微结构观察表明:随着根瘤的形成和发育,宿主细胞线粒体数递减以致消失,泡囊变小且数目递增,彼此排列成一紧密有序的结构。本文还讨论了根瘤超微结构特征与NR、GS和固氮活力的关系。

关键词 四川桉木、固氮活力、硝酸还原酶(NR)、谷酰胺合成酶(GS)、根瘤细胞、超微结构

四川桉木(*Alnus cremastogyne* Burkill)是非豆科固氮树种,也是我国南方重要的造林树种。作者曾对四川桉木固氮活力,NR和GS活力对生长的影响以及不同氮素形态对酶的调节作用作了初步研究¹⁾。但对根瘤中这3种氮素同化酶的综合分析研究,目前尚未见报道。对根瘤超微结构的研究,过去多集中在根瘤菌、*Frankia*的侵染过程、根瘤结构及 N_2 ase厌氧机理的探讨^[1]。本文以四川桉木为试材,研究在生长过程中其根瘤活力、NR和GS活力变化及不同瘤龄根瘤的分布动态。并对不同瘤龄根瘤的超微结构与固氮活力、NR和GS活力的关系进行了初步探讨,为氮素同化酶的固氮机理的深入研究提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

取2年生桉木扦插苗,移植到相同土质的苗圃地里,经过1个月恢复后,每隔15d取样测定,每次取3株,3个重复。

1.2 方法

1.2.1 硝酸还原酶(NR,NADH:E.C.1.6.6.1)活力测定 按苏梦云等^[2]体内法,测定前不进行诱导处理。

1.2.2 谷酰胺合成酶(GS:E.C.6.3.1.2)活力测定 按黄维南^[3]描述的方法,稍有改进。

1.2.3 酶蛋白测定 按Folin-酚法。

1.2.4 固氮活力测定 按乙炔还原法。

1993-11-11 收稿。

吴祖洪研究实习员,周国璋(中国林业科学研究院亚热带林业研究所 浙江富阳 311400)。

* 本文为第一作者研究生论文的部分内容。

1) 吴祖洪,周国璋. 四川桉木主要氮素同化酶活力的研究. 1993.

1.2.5 根瘤电镜样品的制备 在大田摘取同株桉木根瘤,根据大小、色泽,将根瘤分成幼年、成年、老年3种,保存在0℃以下。2.5%多聚甲醛-戊二醛固定30 min,0.1 M磷酸缓冲液清洗2次,每次15 min,50%、70%、80%、90%乙醇,1:1和1:3的95%乙醇:丙酮,95%及100%丙酮梯度脱水,每级10~20 min,放置20 min后,以1:1,1:2的丙酮:环氧树脂梯度浸透3~6 h,放置24 h后包埋,按常规超薄切片法制片,用透射电镜观察,然后拍片。

2 结果与分析

2.1 桉木年生长初期根瘤主要氮素同化酶活力的变化

桉木在当地的生长期是3~11月份。3月份根瘤开始形成,5月份根瘤发育成熟,固氮活力不断上升,5月底出现活力高峰。6月份后可能受梅雨、干旱气候影响^[4],根瘤开始衰败,活力下降(图1)。根瘤NR活力的变化趋势与固氮活力大体一致,只是4月底比3月初略有下降。6月份后NR活力的下降不及固氮活力下降那么明显。从3月份到5月份,根瘤GS活力一直很低,基本没多大变化,6月份后才开始有所上升。这时正值根瘤开始衰败时期,估计根瘤GS活力与根瘤衰败有关。

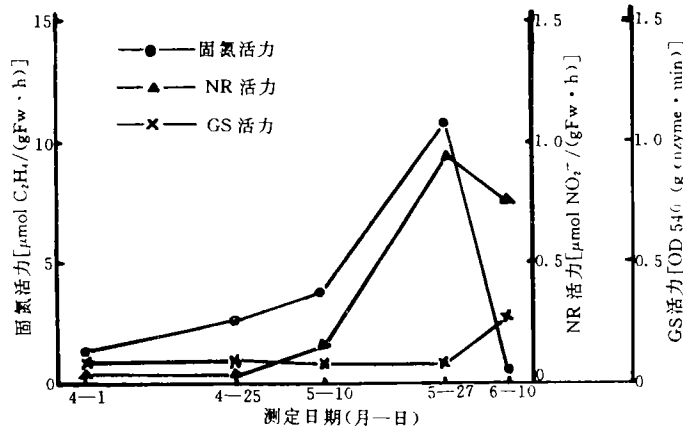


图1 桉木根瘤固氮活力、NR和GS活力的变化

2.2 桉木年生长初期不同瘤龄根瘤的分布及瘤重的变化

桉木(2年生)在生长期存在着瘤龄的不同,按其色泽,大小分为老瘤($\varnothing 0.6\sim 0.8$ cm,黑褐色)、成年瘤($\varnothing 0.3\sim 0.6$ cm,黄褐色)和幼瘤($\varnothing < 0.3$ cm,淡黄色)3类。单株平均瘤重4月底比4月初稍有下降,5月后逐月上升。老瘤占总瘤重百分比在6月份达到了最大值,其值为82.1%。成年瘤占总瘤重的百分比从4月初起呈上升趋势,5月底达到高峰,为51.4%,6月后有所下降。幼瘤占总瘤重的百分比最高不超过30%,4月底比4月初稍有增加,以后逐渐下降(表1)。从表1中还可看出,在单株瘤重中,老瘤和成年瘤始终占绝大多数(超过70%)。估计根瘤的平均氮素同化能力主要由这两类根瘤决定。

2.3 不同瘤龄根瘤固氮活力、NR、GS活力比较

桉木根瘤的固氮活力随瘤龄的增长而下降。幼瘤固氮活力最高,成年瘤次之,老瘤明显下降,根瘤NR活力以成年瘤为最高,老瘤次之,幼瘤最小。根瘤GS活力很小,随瘤龄增长稍有增加(表2)。由此可见,固氮活力、NR、GS活力随着根瘤瘤龄的变化差异很大,但由于老瘤及

成年瘤重占单株总瘤重的 70% 以上,至少可以初步断定根瘤的硝态氮及铵态氮同化能力(反映为 NR 及 GS 活力)主要由老瘤及成年瘤决定。根瘤 GS 活力变化趋势(表 2),也与 GS 与根瘤衰老有关的假说相一致。

表 1 2 年生四川桉木幼苗年生长初期瘤龄、瘤重的变化 (1990 年)

测定日期 (月—日)	平均瘤重 (g/株)	瘤 龄	各龄瘤重 (g/株)	各龄瘤重占总瘤重 (%)
04—01	0.743	O	0.390	49.5
		A	0.273	34.6
		J	0.125	15.9
04—25	0.533	O	0.278	38.8
		A	0.271	37.8
		J	0.168	23.4
05—27	0.796	O	0.386	36.7
		A	0.541	51.4
		J	0.125	11.9
06—10	1.015	O	0.915	82.1
		A	0.160	14.3
		J	0.040	3.6

注:O——老瘤;A——成年瘤;J——幼瘤。

表 2 四川桉木不同瘤龄根瘤的 NR、GS 与固氮活力

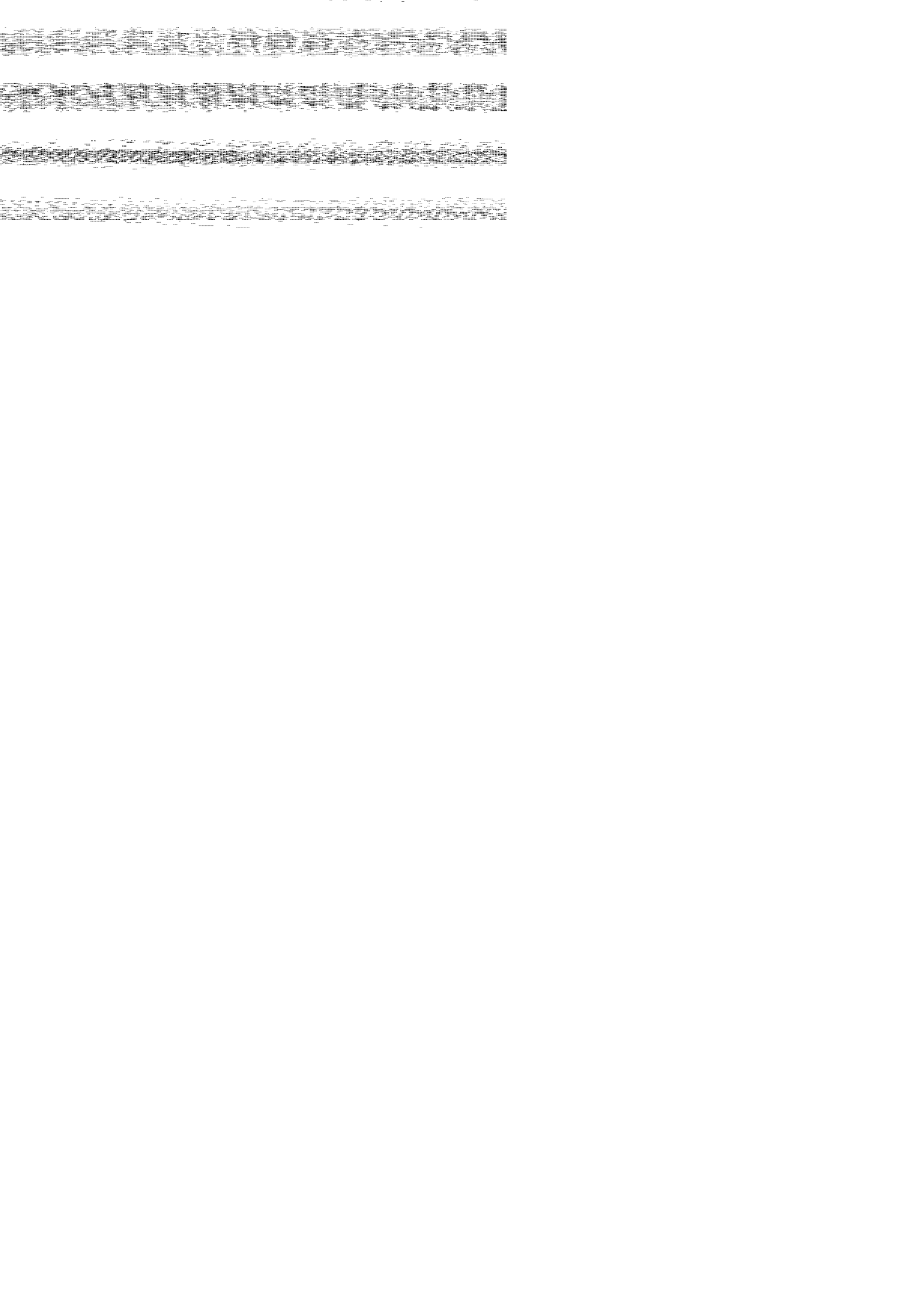
瘤龄	直径 (cm)	色泽	NR 活力 [$\mu\text{mol NO}_3^- / (\text{gFw} \cdot \text{h})$]	GS 活力 [$\text{OD}_{540} / (\text{g enzyme} \cdot \text{min})$]	固氮活力 [$\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 / (\text{gFw} \cdot \text{h})$]
O	0.6~0.8	黑褐色	0.70	0.28	0.64
A	0.3~0.6	黄褐色	0.97	0.12	2.46
J	<0.3	淡黄色	0.01	0.08	3.91

2.4 桉木不同瘤龄根瘤超微结构特征

在幼瘤中,已看到明显的泡囊隔膜和内部共生丝状体,但泡囊间彼此比较疏松。这时可以看到宿主细胞内集聚着许多线粒体,表明根瘤进行着旺盛的细胞呼吸(图 2-1)。成年根瘤泡囊变小而且数量递增,泡囊隔膜彼此紧挨形成致密有序的结构。同时宿主细胞线粒体也相应减少(图 2-2),老瘤解剖结构中泡囊隔膜消失,丝状体融为一体,同时根瘤细胞缩小,宿主细胞器也相应消失(图 2-3)。将这些根瘤超微结构的变化与相应瘤龄根瘤的固氮活力、NR、GS 活力相比较,可以看出,不同瘤龄根瘤超微结构中,宿主细胞线粒体的变化趋势与根瘤固氮活力相一致,这暗示着根瘤的发育及其固氮能力,需要宿主细胞的呼吸作用提供能量和厌氧环境,这与在大豆上的研究结果相一致^[5]。另外从照片上还可看出,根瘤从幼年到成年再向老年发育的过程中泡囊结构有一个从疏松向致密有序到最终泡囊隔膜消失的变化过程。成年根瘤泡囊形成一个致密有序的结构,也使根瘤具有较高的 NR 活力,这种结构有利于 NR 活力表达。

3 结论

(1)四川桉木幼苗生长期,根瘤的氮素同化主要取决于固氮酶,但硝酸还原酶也很活跃,



Studies on the Main Nitrogen Assimilation Enzymes Activities and Nodule Cell Ultrastructure in the Nodule of *Alnus cremastogyne*

Wu Zuhong

Zhou Guozhang

Abstract The activities of nodule average nitrogen-fixing and NR of 1-year-old *Alnus cremastogyne* seedlings reached its maximum in late May, which were $11.03 \mu\text{mol C}_2\text{H}_4/(\text{gFw} \cdot \text{h})$ and $0.89 \mu\text{mol NO}_2^-/(\text{gFw} \cdot \text{h})$ respectively. When the nodule began senescence in June, both of them decreased rapidly, but the nodule average GS activity increased. The weight of the adult nodule and the old nodule of the 2-year-old seedling was 70% more than its total nodule weight. The ratio of the adult nodule weight to the total nodule weight per seedling was the highest in late May and that of old nodule was the highest in June, they were 51.4% and 82.1% respectively. When the nodule developed from the juvenile to the adult and then to the old, the nitrogenfixing activity decreased with the increase of the GS activity. The NR activity was the highest in the adult, middle in the old and lowest in the juvenile. With the development of nodule, the mitochondria of the host cell decreased, and finally disappeared in the old, the vesicle size decreased but its number increased, and the vesicles connected tightly to each other, forming a regular structure. The characteristics of nodule cell ultrastructure was discussed, which might have something to do with the three nitrogen assimilation enzymes in the nodule.

Key words *Alnus cremastogyne*, nitrogenfixing activity, nitrate reductase (NR), glutamine synthetase (GS), nodule cell, ultrastructure

Wu Zuhong, Assistant Engineer, Zhou Guozhang (The Research Institute of Subtropical Forestry, CAF Fuyang, Zhejiang 311400).