

玉米/花生混作改善花生铁营养对花生根瘤碳氮代谢及固氮的影响

左元梅, 刘永秀, 张福锁

(农业部植物营养学重点实验室, 教育部植物-土壤相互作用重点实验室, 中国农业大学植物营养系, 北京 100094)

摘要:研究了石灰性土壤上玉米(*Zea mays* L.) /花生(*Arachis hypogaea* L.)混作改善花生铁营养对花生光合速率、光合产物的运输、花生各部位糖类含量、固氮酶活性以及根瘤内碳氮代谢及其有关酶活性的影响。结果表明,玉米/花生混作改善花生铁营养能够明显增强固氮酶活性,进而增加了间作花生根瘤氨基酸的含量,这主要是由于玉米/花生混作改善花生铁营养促进了花生光合作用,提高光合产物数量,增加光合产物由地上部向地下部的运输,但是处理间花生根瘤蔗糖和可溶性糖含量变化不大,单作花生根瘤还积累较多淀粉,说明不是光合产物的供应导致了花生固氮活性的差异。玉米/花生混作对花生根瘤碳水化合物代谢水平影响较大,混作花生根瘤异柠檬酸脱氢酶(IDH)、苹果酸脱氢酶(MDH)、琥珀酸脱氢酶活性明显高于单作,而磷酸烯醇丙酮酸羧激(PEPCK)活性低于单作花生,表明混作花生根瘤内三羧酸循环代谢水平较高,形成类菌体直接吸收利用的能量物质苹果酸和琥珀酸多,能够满足类菌体的固氮需求,因此,玉米/花生混作改善花生铁营养增强根瘤碳水化合物代谢水平是提高花生固氮作用的重要原因之一。

关键词:花生;混作;铁营养;根瘤碳氮代谢;酶活性

Effects of improved iron nutrition of peanut intercropped with maize on carbon and nitrogen metabolism and nitrogen-fixing of peanut nodule

ZUO Yuan-Mei, LIU Yong-Xiu, ZHANG Fu-Suo (Key Laboratory of Plant Nutrition, MOA, Key Laboratory of Plant-Soil Interactions, MOE, Department of Plant Nutrition, China Agricultural University, Beijing, 100094, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24 (11): 2584~2590.

Abstract: The effects of improved iron nutrition of peanut (*Arachis hypogaea* L.) intercropped with maize (*Zea mays* L.) on photosynthesis rate, the transport of products of photosynthesis from shoot to root and nodule, the content of sucrose and soluble sugar in different organs of peanut, carbon and nitrogen metabolism and nitrogen-fixing of peanut nodule and its related enzyme activity were studied on calcareous soil in pot experiment. Iron deficiency chlorosis occurred in the young leaves of peanut in monocropping and was particularly obvious at the flowering stage, while the young leaves of peanut grown in intercropping with maize remained green throughout the experiment. The results showed that improvement of iron nutrition of peanut intercropped with maize could improve nitrogen —fixing activity of peanut and increase amino acid content of peanut nodule. The reasons were that improvement of iron nutrition of peanut intercropped with maize could promote photosynthesis of peanut, increase the amount of products of photosynthesis and hasten the transport of products of photosynthesis from shoot to root. However, the content of sucrose and soluble sugar in the nodule had not significant difference between monocropping and intercropping system. This indicated the change of photosynthesis was not a key reason that lead to reduce nitrogen —fixing activity of peanut nodule. The results showed improvement of iron nutrition of peanut in the intercropping system had great effects on carbon metabolism in the nodule. The activity of IDH, MDH and SDH enzyme in the nodule of intercropping

peanut were increased, but PEPCK activity was decreased in the nodule of peanut intercropped with peanut. This indicated TCA cycle activity in the nodule of intercropping peanut was higher than that of monocropping peanut, so malate acid and succinate acid produced was enough to supply bacterioids. These findings confirmed the effects of improvement in iron nutrition of peanut in intercropping system on carbon metabolism of nodule was an important factor which promoted nitrogenase activity of peanut nodule.

Key words:peanut; intercropping; iron nutrition; carbon and nitrogen metabolism of nodule; enzyme activity

文章编号:1000-0933(2004)11-2584-07 中图分类号:Q938 文献标识码:A

铁为植物生长发育所必需的微量营养元素。在植物体内铁主要分布于叶绿体中,因此,铁对植物的光合作用影响较大;首先,铁在叶绿素合成过程中起关键作用,缺铁导致植物叶绿体片层重叠结构消失,叶绿体基粒减少,间质部分增大,从而使植物叶绿体内叶绿素含量降低^[1];此外,含铁蛋白如铁氧还蛋白、细胞色素和细胞色素氧化酶等是叶绿体内氧化还原系统的组成成分和电子传递体,缺铁导致磷酸蔗糖合成酶活性显著下降,蔗糖合成减少,光合产物代谢受抑制^[2]。因此,缺铁能明显抑制植物的光合速率,降低光合产物数量。

铁也是直接参与豆科作物共生固氮的重要营养元素之一,它是固氮酶、豆血红蛋白、铁氧还蛋白等含铁蛋白的重要金属组分^[3],在多种豆科作物中,缺铁可抑制豆科作物结瘤,使固氮酶活性显著降低,从而影响产量和品质^[4,5]。

花生(*Arachis hypogaea* L.)是华北地区重要的油料作物。然而,花生缺铁黄化现象在石灰性土壤地区极其普遍,是花生高产、稳产的主要限制因子之一。许多铁高效的双子叶植物在缺铁胁迫下会表现出根系分泌H⁺的数量增多和根系对Fe(Ⅲ)还原力增强的现象^[6],这对植物有效地吸收和利用根际无机铁化合物和Fe(Ⅲ)螯合物非常重要。但本试验利用铁有效性低、pH值和碳酸盐偏高的石灰性土壤,它对酸碱缓冲能力较强,从而使根系质膜还原酶活性某种程度上受到抑制,土壤中的铁不易被花生还原吸收进入植物体内,导致单作花生新叶缺铁黄化;而高pH值对禾本科作物玉米麦根酸类植物铁载体的分泌与Fe³⁺的结合影响不大^[7]。

黄淮海平原广泛实行的玉米(*Zea mays* L.) /花生间作制度对改善花生的铁营养具有非常明显的效果,而且玉米/花生间作改善花生铁营养同时能明显提高花生的光合速率^[8],从而增加光合产物数量,而根瘤还需要大量的碳水化合物参与被固定氮的同化以及根瘤的生长和代谢,据此推测这可能是间作花生固氮功能增强的一个重要原因。为此,本文研究了玉米/花生间(混)作对花生根瘤内碳水化合物含量和与碳氮代谢有关的酶活性的影响,旨在探讨玉米/花生间(混)作改善花生铁营养增强根瘤碳水化合物代谢水平是否是提高花生固氮作用的重要原因之一。

1 材料与方法

1.1 供试土壤和供试植物

试验在中国农业大学植物营养系温室中进行,供试土壤为北京大兴县石灰性砂壤土,其基本理化性状如下:有机质含量3.9g/kg,全氮0.27g/kg,速效磷(Olsen-P)3.9mg/kg,速效钾(NH₄OAc-K)60.4mg/kg,有效铁(DTPA-Fe)4.52mg/kg,pH(CaCl₂)8.3,碳酸钙(CaCO₃)8.32%。供试植物为花生(*Arachis hypogaea* L. cv. Haihua)和玉米(*Zea mays* L. cv. Danyu),品种分别为海花和单玉13。

1.2 试验设计

试验设两个处理:①花生单作;②玉米/花生混作,由于是盆栽试验称为混作。每盆装土10kg,底肥(mg/kg)为N75,P150,K100,Mg50,Mn5,Cu5,Zn5。单作每盆6株花生,混作每盆3株花生和3株玉米。各处理重复8次。花生催芽后,用根瘤菌3201接种后播种。当花生生长至64d时,单作花生新叶普遍出现严重缺铁黄化症状,而间作花生新叶叶色正常,同时采取单作和间作花生的样品,其中每个处理的4次重复花生样品用于摘取根瘤,称重后立即用液氮处理,放于-20℃冰箱中保存备用。另外4次重复花生样品分地上部、地下部和根瘤收获,105℃杀青,80℃烘干,粉碎。

1.3 样品分析测定^[9]

1.3.1 花生叶片叶绿素SPAD值和光合速率测定 用SPAD-502测定花生叶片叶绿素SPAD值及用BAU光合测定系统测定花生叶片的光合速率。

1.3.2 韧皮部汁液收集 双面刀片先用丙酮浸泡几小时,然后用蒸馏水冲洗,干燥,勿擦拭。用处理过的刀片割花生主茎基部,迅速将其插入装有10ml25mmol/L EDTANa₂溶液(pH8.0)的小塑料瓶中,并装入一个密闭的饱和湿度容器里,25℃条件下搜集24h后取出,将上述溶液在5000×g下离心10min,上清液在-20℃冰箱中保存待测定。

1.3.3 蔗糖和可溶性糖测定 称取花生地上部、根系和根瘤的烘干磨碎样品50mg加入3ml80%的乙醇,在80℃下提取0.5h,离心取上清液,共提取3次,合并上清液,加少许活性碳脱色,并定容至10ml。根据蔗糖含量的多少吸取0.1~1.0ml于试管中,沸

水浴中浓缩至 0.05~0.1 ml, 加入 0.1 ml 30% 的 KOH, 在沸水浴中放 10 min, 冷却至室温。加入 3 ml 蒽酮试剂, 40℃ 条件下保温 10~15 min, 在 620 nm 条件下利用 UV120 紫外分光光度计测定光密度。同时取 20~100 μ g 蔗糖制成标准曲线, 据此计算花生地上部、根系和根瘤中的蔗糖含量。分别取一定量的花生地上部、根系、根瘤以及韧皮部的提取液, 浓缩至 0.05~0.1 ml, 混合 3 ml 蒽酮试剂, 90℃ 加热 15 min, 在 620 nm 条件下测定光密度。取 10~50 μ g 葡萄糖测定光密度, 制成标准曲线, 计算可溶性糖含量。

1.3.4 根瘤细胞淀粉粒光学显微观察 取样后立即摘取花生成熟根瘤(直径 3 mm 左右)放于 2.5% 戊二醛的 0.1 mmol/L 的磷酸缓冲液中(pH 7.0)固定数日, 用同种缓冲液冲洗, 在含有 1% 的钨酸缓冲液中固定 2 h, 再经丙酮系列脱水, 最后包埋在 Spurr's 树脂中。以上操作除聚合外(60℃), 均在室温进行, 做半薄片, 在光学显微镜下进行观察。

1.3.5 酶粗提取液制备 取 0.5 g 左右花生根瘤放入预冷的研钵中, 加入 5 ml 预冷的 100 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(7 mmol/L DTT, 1 mmol/L EDTA, 5% 甘油和 1% PVP, pH 8.2), 迅速研磨, 匀浆液于 15000 \times g 4℃ 离心 20 min, 取上清液供测酶活性用。

磷酸烯醇丙酮酸羧激(PEPCK)酶活性的测定 酶活性反应液的组分为: 1 ml 100 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.2)、1 ml 酶粗提取液、0.1 ml 10 mmol/L $MgCl_2$; 0.1 ml 10 mmol/L $NaHCO_3$; 0.2 ml 40 mmol/L PEP; 0.3 ml 1 mg/ml NADH(pH 8.9); 过量的苹果酸脱氢酶(约 10.5 U) 0.3 ml, 混匀后, 340 nm 条件下测定光密度值, 并记录 3 min。

异柠檬酸脱氢酶活性(IDH)的测定 酶活性反应液的组分为: 1.5 ml 100 mmol/L KP-buffer (pH 7.5); 0.1 ml 酶粗提取液; 0.1 ml 20 mmol/L $MnSO_4$; 0.1 ml 1 mmol/L EDTA- Na_2 ; 0.2 ml 0.3 mmol/L DTT; 0.5 ml 1.5 mmol/L NAD; 0.5 ml 80 mmol/L 异柠檬酸。混匀后, 340 nm 条件下测定光密度值的变化。

苹果酸脱氢酶活性(MDH)的测定 酶活性反应液的组分为: 1.5 ml 25 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0); 0.3 ml 酶粗提取液; 0.2 ml 1 mmol/L EDTA; 0.5 ml 0.5 mmol/L OAA; 0.5 ml 0.2 mmol/L NADH。加入 NADH 后, 计 340 nm 光密度的减少, 测定温度为 30℃。

琥珀酸脱氢酶活性原位显色鉴定 反应混合液组成: 10 ml 0.2 mmol/L 琥珀酸盐缓冲液(pH 7.6), 10 ml 0.1% 硝基蓝四氮盐。将制备的新鲜根瘤徒手切片立即放入上述反应液中, 35℃ 保温, 直至切片变为蓝色, 大约需要 30 min。用 pH 7.6 的磷酸缓冲液洗 2 次, 每次 10 min。再用 10% 中性福尔马林固定 10 min, 水洗 2 min。50% 甘油水溶液封片, 观察。琥珀酸脱氢酶的活动部位显示蓝色或深蓝色, 颜色越深表明活性越高。

天冬氨酸转氨酶(AAT)活性测定 反应液的组分为: 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0); 0.2 mmol/L NADH; 10 mmol/L 天冬氨酸盐; 1 mmol/L α -酮戊二酸盐; 3 μ mol/L 磷酸吡哆醛; 3.6 单位的苹果酸脱氢酶。加入 α -酮戊二酸盐启动反应。

谷氨酰胺合成酶(GS)活性测定 酶粗提取液组成: 0.05 mol/L 咪唑-HCl 缓冲液, pH 7.2; 0.5 mmol/L EDTA 和 1 mmol/L DTT。酶活性反应液的组分为: 1 ml 50 mmol/L 咪唑缓冲液, pH 7.2; 0.2 ml 酶粗提取液; 0.1 ml 20 mmol/L $MgCl_2$; 0.1 ml 25 mmol/L 羟胺; 0.3 ml 100 mmol/L 谷氨酸; 0.3 ml 10 mmol/L ATP。30℃ 条件下反应 0.5 h, 三氯乙酸-三氯化铁-盐酸混合液(25 g $FeCl_3 \cdot 5H_2O$, 14 ml 浓 HCl, 81.5 ml 10% 三氯乙酸, 最后定容 250 ml)中止反应, 离心(5000 \times g, 10 min), 取上清液于 540 nm 条件下测定光密度。定义: 光密度每变化 0.001 为 1 个酶活单位。

1.3.6 根瘤中氨基酸含量的测定 采用茚三酮显色法。

2 结果与分析

2.1 玉米/花生混作对花生光合速率的影响

生长 64 d 时单作花生新叶表现出严重的缺铁黄化症状, 而混作花生新叶叶色正常, 不同处理间花生新叶叶绿素含量差异极显著($F=60.22$, $P<0.01$), 混作花生新叶叶绿素含量是单作花生的 1.80 倍, 而老叶的叶绿素含量在处理间没有差异。同时, 混作花生新叶光合速率也明显高于单作花生($F=50.09$, $P<0.01$)(图 1)。说明玉米/花生混作能明显地改善花生铁营养(表 1), 矫正花生缺铁黄化症, 提高花生光合速率。

2.2 玉米/花生混作对花生根瘤固氮酶活性的影响

如表 2 所示, 混作花生的单株和单位根瘤固氮酶活性高于单作花生, 其中混作花生单株固氮酶活性是单作花生的 3.8 倍, 单位根瘤固氮酶活性是单作的 2.5 倍, 混作和单作花生之间单株根瘤固氮酶活性($F=15.63$, $p<0.01$)和单位根瘤固氮酶活性($F=37.87$, $p<0.01$)差异显著。

2.3 玉米/花生混作对花生根瘤内氨基酸含量的影响

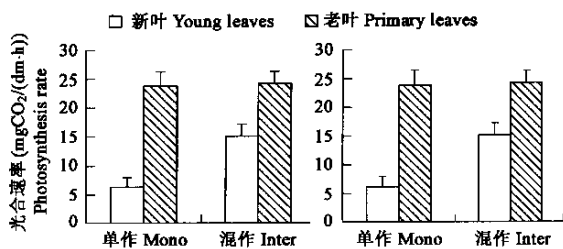


图 1 玉米/花生混作对花生叶绿素含量和光合速率的影响

Fig. 1 Effect of intercropping of maize and peanut on chlorophyll content and photosynthesis rate in leaves of peanut

混作对花生根瘤氨基酸含量的影响如图2所示,混作花生根瘤氨基酸含量略比单作增加了12%。说明混作花生固氮活性提高,形成的固氮产物也比较多。

2.4 玉米/花生混作对花生地上部蔗糖和可溶性糖含量影响

与单作相比,混作花生地上部蔗糖和可溶性糖含量分别提高14.6%和23.2%(表3),方差分析结果表明处理间差异显著($F=6.14, P<0.05; F=14.61, P<0.05$),说明因受缺铁黄化的影响,单作花生光合速率下降,光合产物数量减少,因而地上部蔗糖和可溶性糖含量也随之减少。

2.5 玉米/花生混作对花生韧皮部汁液蔗糖和可溶性糖含量的影响

韧皮部蔗糖和可溶性糖运输量如表3所示,方差分析结果表明,无论蔗糖($F=7.49, P<0.05$)还是可溶性糖($F=33.77, P<0.01$)混作花生都明显高于单作,分别提高109%和115%,这表明混作改善花生铁营养使花生生长正常,地上部供应根系和根瘤的光合产物也较单作花生多。

2.6 玉米/花生混作对根瘤内碳水化合物含量的影响

不同处理间根瘤内蔗糖和可溶性糖含量差异不明显(表3),相比较而言单作花生根瘤蔗糖含量略比混作高1.8%,可溶性糖含量略低2.4%。根瘤光学显微观察发现,单作花生根瘤皮层细胞内积累大量淀粉粒(图3),而混作花生则较少,这与单作根瘤蔗糖含量较高相一致,说明单作花生固氮活性低,消耗能量较少,因此尽管单作花生光合产物供应较少,但是还是完全能够满足固氮需要,并有累积。因此,可以推测单作花生缺铁黄化对光合速率以及光合产物的数量和运输的影响不是限制固氮活性的关键因子,碳水化合物代谢可能是限制花生固氮活性的因素。

2.7 玉米/花生混作对根瘤内与碳水化合物代谢有关酶活性的影响

混作花生根瘤内异柠檬酸脱氢酶(IDH)活性和苹果酸脱氢酶(MDH)活性高于单作花生(表4),分别提高28%和29%;琥珀酸脱氢酶活性原位显色反应也说明混作高于单作(图4)。而混作花生根瘤磷酸烯醇丙酮酸羧激酶(PEPCK)活性则比单作花生低47%。

2.8 混作对花生根瘤内与氮代谢有关酶活性的影响

表4结果表明,混作花生根瘤内谷氨酰胺合成酶活性明显高于单作($F=8.97, P<0.05$),增加了42%,这与混作花生固氮活性较高相一致。而混作花生天冬氨酸转氨酶活性则低于单作,下降16%,这可能与单作花生根瘤PEPCK羧激酶活性高,形成草酰乙酸较多有关。

3 讨论

3.1 混作对花生碳水化合物的分配与固氮活性的影响

一般情况下,豆科植物净光合速率和固氮活性之间关系较为密切,随着根瘤固氮活性的提高,其光合速率也增加^[10]。本试验结果表明,缺铁严重影响了花生光合速率(图1),光合产物数量减少,因此,由地上部向根系转移的光合产物数量也明显下降,这与单作花生固氮酶活性较低相一致,但这并不是单作花生固氮酶活性降低的根本原因,因为不同处理间花生根瘤内碳水化合物的含量并没有差异(表3)。相对而言,单作花生根瘤内蔗糖和淀粉的含量还高于混作花生呈累积的趋势,这说明不是光合产物的供应导致了花生固氮活性的差异,而是固氮活性的差异导致了处理间根瘤内碳水化合物的水平与供应数量间不平衡。

3.2 混作对花生根瘤能量代谢和固氮活性的影响

表1 玉米/花生混作对花生各部位铁含量的影响

Table 1 Effects of intercropping of maize and peanut on iron content in organs of peanut

处理 Treatments	地上部 Shoot	根系 Root	根瘤 Nodule
单作 Monocropping	224.1±5.3	972.5±26.6	916.6±14.5
混作 Intercropping	276.7±12.2	1128.3±23.6	1021.1±10.1

表中数据是重复的平均值。下同Data are given as average of each value of 4 replicates (s.e, s.e are standard error of the mean (n=4); the same below

表2 玉米/花生混作对花生根瘤固氮酶活性的影响

Table 2 Effect of intercropping of maize and peanut on nitrogenase of peanut nodule

固氮酶活性 Nitrogenase	花生 Peanut	
	单作 Monocropping	混作 Intercropping
单株根瘤 Nitrogenase of nodules of per plant ($\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/(\text{h} \cdot \text{plant})$)	1.2±0.42	4.6±0.22
单位根瘤 Nitrogenase of nodules of per gram ($\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/(\text{h} \cdot \text{gDW})$)	86.71±20.49	220.25±30.51

表3 玉米/花生混作对花生地上部、根瘤蔗糖和可溶性糖含量和韧皮部蔗糖和可溶性糖运输量的影响

Table 3 Effect of intercropping of maize and peanut on sucrose and soluble sugar content in shoot, nodule and the phloem of peanut

花生部位 Organs of peanut	处理 Treatments	蔗糖含量 Sucrose content (mg/gDW)	可溶性糖含量 Soluble sugar content (mg/g DW)
地上部 Shoot	单作 ^①	13.1±1.2	63.2±3.7
	混作 ^②	15.0±0.7	77.9±2.6
根瘤 Nodule	单作	36.3±5.3	69.0±4.0
	混作	35.6±3.3	70.8±6.5
		Sucrose transport ($\mu\text{g}/(\text{h} \cdot \text{plant})$)	Soluble sugar transport ($\mu\text{g}/(\text{h} \cdot \text{plant})$)
韧皮部 Phloem	单作	78.8±4.0	124.49±48.4
	混作	164.6±13.8	267.65±9.5

①Monocropping;②Intercropping

生物固氮是一个非常消耗能量的过程,固氮酶每催化一分子的 N_2 还原为 NH_3 需要16分子的ATP和8个 e^- ,大约每固定1g N需要5~10g C。同时,根瘤还需要大量的碳水化合物参与被固定氮的同化以及根瘤的生长和代谢,因此,根瘤必须在微氧环境下保持高效率的碳代谢以满足其能量需求。大量研究结果表明,豆科植物光合产物主要以蔗糖的形式运到根瘤,为固氮提供能量^[11],在根瘤内蔗糖能很快降解形成二羧酸-苹果酸和琥珀酸^[12~14],这些二羧酸能够被类菌体直接吸收利用为其固氮提供能量^[15]。

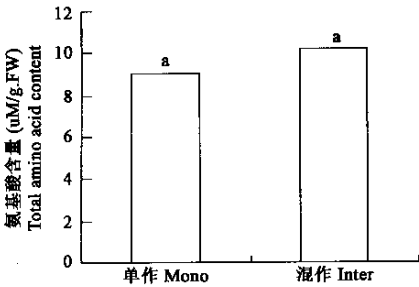


图2 玉米/花生混作对花生根瘤氨基酸含量的影响

Fig. 2 Effect of intercropping of maize and peanut on amino acid content in the nodule of peanut

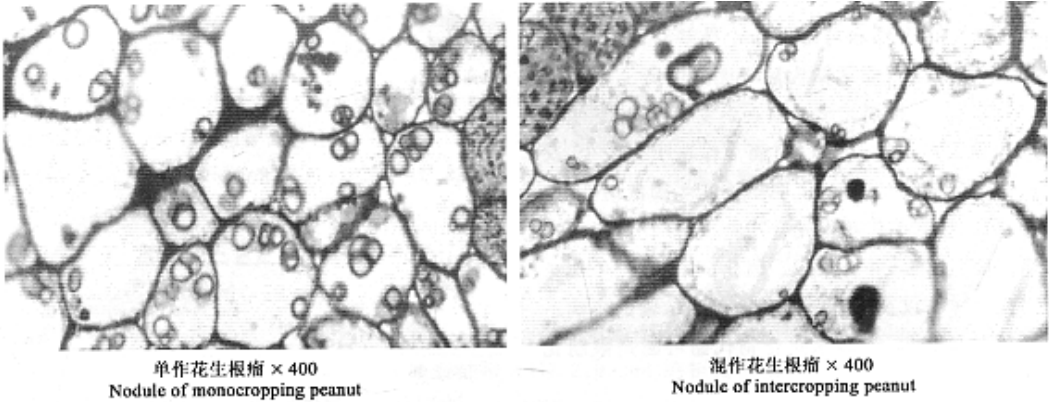


图3 根瘤光学显微镜观察结果——示皮层细胞内淀粉粒积累状况

Fig. 3 Light micrographs of nodule starch grain accumulation of peanut in monocropping and intercropping system.

SG 淀粉粒 Starch grain, C 皮层细胞 Cortical cell, IC 侵染细胞 Infected cell

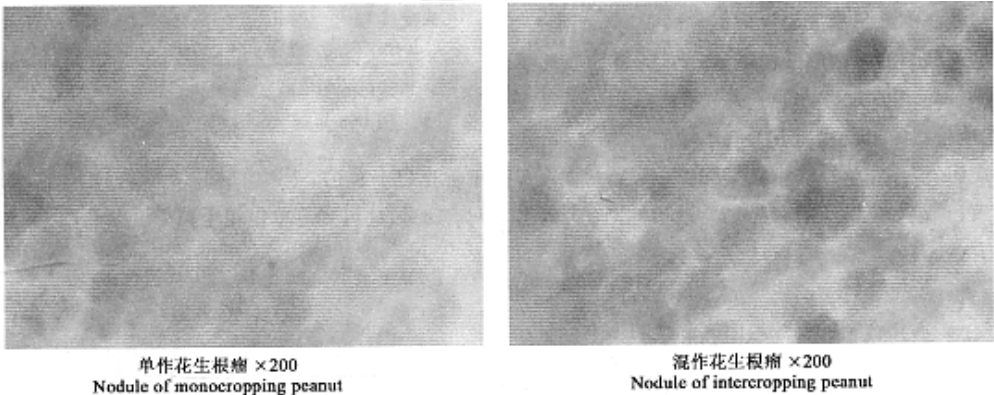


图4 花生根瘤琥珀酸脱氢酶活性原位显色结果

Fig. 4 Light micrographs of succinic dehydrogenase activity in the nodule of peanut

万方数据

有研究表明,苹果酸和琥珀酸是寄主豆科植物侵染细胞内类菌体可直接吸收利用的能量物质^[15]。因此,三羧酸循环中的异

表4 玉米/花生混作对花生根瘤异柠檬酸脱氢酶(IDH)、苹果酸脱氢酶(MDH)、磷酸烯醇丙酮酸羧激酶(PEPCK)、谷氨酰胺合成酶(GS)和天冬氨酸转氨酶(AAT)活性的影响

Table 4 Effects of intercropping of maize and peanut on IDH, MDH, PEPCK, GS and AAT activity in the nodule of peanut

酶活性 ($\mu\text{molNADH}/(\text{gFW} \cdot \text{min})$)	单作 Monocropping	间作 Intercropping
IDH	20.4 ± 2.3	26.2 ± 2.6
MDH	3.4 ± 0.1	4.4 ± 0.3
PEPCK	2.3 ± 0.3	1.2 ± 0.2
GS	31.0 ± 3.2	44.0 ± 4.6
AAT	0.38 ± 0.12	0.32 ± 0.16

柠檬酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶和琥珀酸脱氢酶活性高与混作花生固氮酶活性高所需苹果酸和琥珀酸强度大相一致,因而混作花生根瘤固氮所需能量多,形成的苹果酸和琥珀酸也相应较多。

磷酸烯醇丙酮酸羧激酶的功能主要是催化固定由呼吸释放的CO₂的反应并形成草酰乙酸,再参与根瘤内的碳氮代谢,从而提高碳的利用效率。植物在逆境条件下,磷酸烯醇丙酮酸羧激酶活性往往升高,以满足其对新陈代谢能量和碳架的需要。由于单作花生在缺铁黄化的条件下,根瘤内三羧酸循环中的异柠檬酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶和琥珀酸脱氢酶活性较低(表4),不能满足类菌体和寄主细胞能量和碳架需求,因而由磷酸烯醇丙酮酸羧激酶催化固定CO₂的途径增强,三羧酸循环关键酶异柠檬酸脱氢酶活性测定结果也表明,混作花生根瘤内碳水化合物代谢强度高于单作。

PEPCK 羧激酶是豆科植物根瘤中将碳氮代谢联系在一起的关键酶,其活性受根瘤内苹果酸含量水平的反馈调节,苹果酸含量越高,PEPCK 活性越低,此外,PEPCK 羧激酶活性的高低与植物组织呼吸强度有密切关系,呼吸强度越高,PEPCK 羧化酶活性越低^[16~18]。研究结果表明,单作花生根瘤PEPCK 羧激酶活性明显高于混作花生(表4),说明混作花生根瘤苹果酸水平和呼吸强度高于单作,单作花生固氮受能量供应的限制,导致固氮活性下降。

总之,在混作花生根瘤内碳代谢趋向于形成苹果酸和琥珀酸,以满足高活性的固氮代谢能量需要;而单作花生因受缺铁的胁迫,根瘤碳代谢趋向于形成苹果酸和琥珀酸的程度较弱,这与单作花生固氮活性低相一致。

NH₄⁺ 被同化的第一步是在谷氨酰胺合成酶的催化下形成谷氨酸,此酶活性随固氮酶活性的提高而增加^[19]。单作花生因受缺铁胁迫固氮酶活性较低,因而谷氨酰胺合成酶活性也较低(表4),根瘤提取物中可溶性氨基酸总量也相应降低(图2)。天冬氨酸转氨酶催化谷氨酸和草酰乙酸反应形成天冬氨酸,该反应所需碳架——草酰乙酸的20%~35%是由PEPCK 羧激酶催化固定CO₂形成的^[20]。单作花生根瘤天冬氨酸转氨酶活性高于混作,这可能与单作花生根瘤PEPCK 羧激酶活性高,形成草酰乙酸多密切相关。

综上所述,单作花生缺铁黄化严重影响了叶片的光合速率,光合产物减少,并且由地上部向地下部运输的量也减少。但是,根瘤内碳水化合物含量处理间并没有差异,甚至单作花生根瘤内还积累少量糖类,由此可见,光合产物运输量的减少并不是单作花生根瘤固氮活性降低的关键因素。根瘤内碳水化合物代谢强度是混作花生高于单作花生,这是导致单作花生根瘤固氮活性低的原因之一,其可能机制如下:①缺铁限制根瘤碳代谢的某一反应,如乌头酸酶催化的反应,导致类菌体所需能量物质供应不足;②侵染细胞内类菌体受缺铁影响较大,对能量需求减少,导致碳代谢强度减弱。③缺铁还可能通过抑制根瘤内含铁金属蛋白如豆血红蛋白的合成,进而影响类菌体的O₂供应,导致碳代谢强度减弱。是碳代谢导致的固氮活性的差异,还是侵染细胞类菌体对能量的需求反馈导致的碳代谢差异,还有待于进一步深入研究和探讨。

References:

[1] Guerinot M L and Yi Y. Iron: Nutritious, noxious and not really available. *Plant Physiology*, 1994, **104**: 815~820.

[2] Anthon G E and Emerich D W. Developmental regulation of enzymes of sucrose and hexose metabolism in effective and ineffective soybean nodules. *Plant Physiology*, 1990, **92**: 346~351.

[3] Dakora D F. A functional relationship between leghaemoglobin and nitrogenase based on novel measurements of the proteins in legume root nodules. *Annals of Botany*, 1995, **15**: 49~54.

[4] Tang C, Robson A D and Dilworth M J. The role of iron in the (*brady*) rhizobium legume symbiosis. *Journal of Plant Nutrition*, 1992, **15**: 2235~2252.

[5] Levier K. Iron uptake by symbiosynthesis from soybean root nodules. *Plant Physiol.*, 1996, **111**: 613~618.

[6] Romheld V, Muller C and Marschner H. Location and capacity of proton pumps in roots of intact sunflower plants. *Plant Physiology*, 1984, **76**: 603~606.

[7] Zhang F, Treeby M, Romheld V, *et al.* Mobilization of iron by phytosiderophores as affected by other micronutrients. *Plant and Soil*, 1990, **130**: 173~178.

[8] Zuo Y M, Li X L, Cao Y P, *et al.* Effects of peanut intercropping with maize on iron nutrition of peanut plants on calcareous soil. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 1997, **3**(2): 153~159.

[9] Wang G Q, Xu C H, Wei J M, *et al.* Respiration and carbon and nitrogen metabolism. In: Tang Z C ed. *Experimental guidebook of modern plant physiology*. Beijing: Scientific Press, 1999. 117~183.

[10] Sellstedt A. Nitrogen and carbon utilization in *Alnus incana* fixation N₂ or supplied with NO₃⁻ at the same rate. *Journal of Experimental Botany*, 1986, **37**: 786~797.

[11] Kouchi M and Hsiao K. Utilization and metabolism of photoassimilated ¹³C soybean roots and nodules. *Soil Science Plant Nutrition*, 1985, **31**: 323~334.

[12] Copeland L and Tanner G J. Malic enzyme activity in bacteroids from soybean nodules. *Journal of Genetic Microbiology*,1989a, **135**: 2005~2011.

[13] Copeland L and Tanner GJ. Enzymes of carbohydrate metabolism in soybean nodules. *Phytochemistry*, 1989b, **28**: 57~61.

[14] Kouchi H and Yoneyama T. Metabolism of ¹³C-labelled photosynthate in plant cytosol and bacteroids of root nodules of *Glycine max*. *Plant Physiology*, 1986, **68**: 233~244.

[15] Dilworth M and Glenn A. How dose a legume nodule work? *Trends Biochemistry Science*, 1984, **9**: 519~523.

[16] Jiao J A and Chollet R. Translational regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in C₄and crassulacean acid metabolism plants. *Plant Physiology*, 1991, **95**: 981~985.

[17] Schuller K A and Werner D. Phosphorylation of soybean (*Glycine max* L.) nodule phosphoenolpyruvate carboxylase in vitro decreases sensitivity to inhibition by L-malate. *Plant Physiology*, 1993, **101**: 1267~1273.

[18] Ocana. Phosphoenolpyruvate carboxylase in root nodules of *Vicia faba*: partial purification and properties. *Physiologia Plantarum*, 1996, **97**: 724~730.

[19] Temple S J. Total glutamine synthetase activity during soybean nodule development is controlled at the level of transcription and holoprotein turnover. *Plant Physiology*, 1996, **112**: 1723~1733.

[20] Maxwell C A. CO₂fixation in alfalfa and birdsfoot trefoil nodules and partitioning of ¹⁴C to the plant. *Crop Science*, 1984, **24**: 257~264.

参考文献：

[8] 左元梅, 李晓林, 曹一平, 等. 石灰性土壤上玉米/花生间作对花生铁营养的影响. *植物营养与肥科学报*, 1997, **3**(2):153~159.

[9] 王国强, 徐春和, 魏家绵, 等. 呼吸及碳水化合物代谢, 碳代谢. 见:汤章城主编. *现代植物生理学实验指南*. 北京:科学出版社, 1999. 117~183.

