

化感植物根际生物学特性研究现状与展望^{*}

林文雄^{1,2**} 熊君^{1,2} 周军建^{1,2} 邱龙^{1,2} 沈荔花^{1,2} 李振方^{1,2}
陈慧^{1,2} 郝慧荣^{1,2} 陈婷^{1,2} 林瑞余^{1,2} 何海斌^{1,2} 梁义元^{1,2}

(1.福建农林大学生物农药与化学生物学教育部重点实验室 福州 350002;

2.福建农林大学生命科学学院 福州 350002)

摘要 植物的根际是一个复杂的微生态系统,植物的根必须与入侵的邻近植物根及大量以有机物质为营养的细菌、真菌、土存害虫相互竞争空间、水分、矿质营养等。在土壤中,根与根际生物体的相互作用相当复杂且受到许多土壤因素的影响,地下根际生物体以根分泌物为媒介相互作用的机制比发生在地表的生物体的相互作用复杂的多。越来越多的试验表明,根分泌物在根与根、根与根际微生物间起着重要作用,并以其为媒介在植物与环境的相互作用中起着传递信息的作用。本文在简要综述前人研究的基础上,深入探讨了化感植物根际生物学问题及攻克途径,以期为深入研究植物化感作用提供依据。

关键词 根际 化感作用 化感物质 自毒作用 根际微生物 根系分泌物

Research status and its perspective on the properties of rhizosphere biology mediated by allelopathic plants. LIN Wen-Xiong^{1,2}, XIONG Jun^{1,2}, ZHOU Jun-Jian^{1,2}, QIU Long^{1,2}, SHEN Li-Hua^{1,2}, LI Zhen-Fang^{1,2}, CHEN Hui^{1,2}, HAO Hui-Rong^{1,2}, CHEN Ting^{1,2}, LIN Rui-Yu^{1,2}, HE Hai-Bin^{1,2}, LIANG Yi-Yuan^{1,2} (1. Key Laboratory of Biopesticide and Chemical Biology, Fujian Agriculture and Forestry University, Ministry of Education, Fuzhou 350002, China; 2. School of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China), *CJEA*, 2007, 15(4): 1~8

Abstract Rhizosphere is the densely populated area of the soil where plant roots must compete with invading root systems of neighboring plants and soil-borne microorganisms including bacteria, fungi and insects that feed on organic materials for space, water, and mineral nutrients. Interactions within the rhizosphere are based on complex exchanges involving surrounding plant roots and are highly influenced by edaphic factors. However, below-ground biological interactions that are driven by root exudates are more complex than above-ground interactions. Increasing evidence suggests that root exudates act as information transmitter in the interaction process between plants and their environment and thus play an important active role in root-root and root-microbe communication. In this paper, previous studies are vividly reviewed and the direction of future research discussed.

Key words Rhizosphere, Allelopathy, Allelochemicals, Autotoxicity, Soil-borne microorganism, Root exudates

(Received Nov. 23, 2006)

植物化感作用是指一种活体植物(供体, Donor)产生并以挥发(Volatilization)、淋溶(Leaching)、分泌(Excretion)和分解(Decomposition)等方式向环境释放次生代谢物而影响邻近伴生植物(杂草等受体, Receiver)的生长发育的化学生态学现象(Rice, 1980)。根系在其生长过程中向土壤释放的渗出物、分泌物、植物黏液、胶质和裂解物被许多学者统称为根系分泌物。这些物质对土壤的物理、化学和生物学性状具有直接影响,对土壤养分有效性、腐殖质及微生物活动具有直接或间接影响^[1]。根分泌物中的许多物质能够产生自毒作用,或对他种植物产生有益或有害的化感作用。并且在生态系统或农业生态系统中,化感作用在植物的优势种群形成、群落演替及作物生产性能等方面表现得相当突出^[11,12]。近十几年来,对于根际生物学、化学生物学研究已经取得了很大的进展。相比之下,通过植物根系为媒介来研究根际细胞和根系分泌物的关系还处在起始阶段^[13]。在土壤中,根与根际生物体的相互作用相当复杂,受到许多土壤因素的影响,地下根

* 国家自然科学基金(30471028、30070068、30200170、30671220)和福建省重大科技项目(2002F012)资助

** 通讯作者

收稿日期:2006-11-23

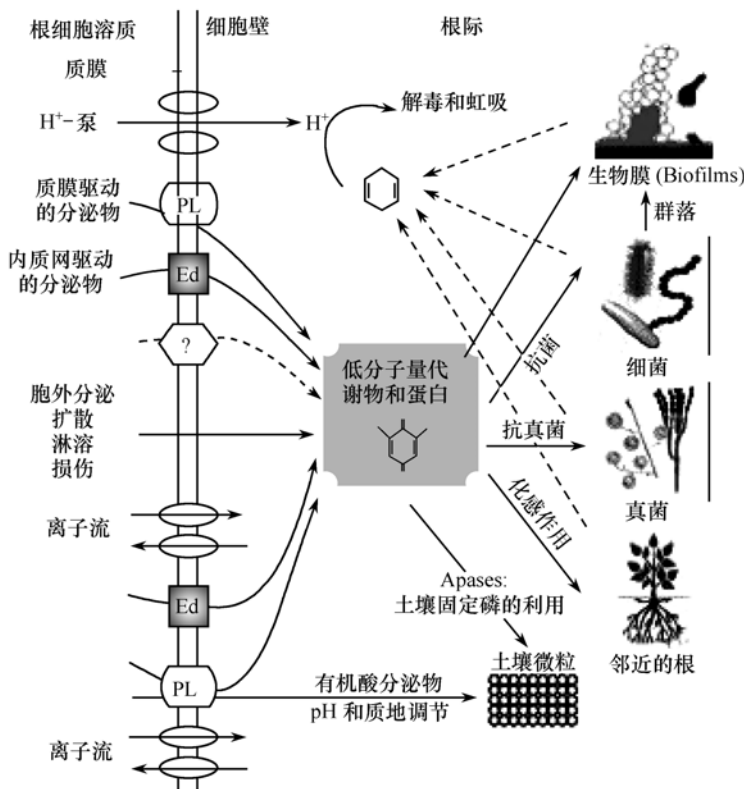


图 1 根分泌物和根际生物体之间相互作用的机制模型

(摘自 Katsuchiro, et al., 2004)

Fig.1 Mechanism model of interaction between root secretions and rhizosphere organisms

1 植物根系分泌物的化感作用

1.1 供体根分泌物对受体植物的他感作用

在自然环境中,一种植物的根系与其邻近植物根系持续保持着联系,并通过化学信使迅速识别和阻止其他植物根系的入侵。植物根系分泌物含有许多具有生物活性的化感物质(Allelochemicals),这些物质对受体植物的影响主要表现为对种子萌发和幼苗生长的促进或抑制作用^[17](如图 1 所示)。Tang 等^[18]研究了 *Bigalta limpograss* 根系分泌物的化感作用,指出供体植物根系分泌物中对受体植物生长呈抑制作用的主要是酚类化合物,并采用 GC-MS 分离检测出苯甲酸、苯乙酸、肉桂酸等 16 种酚酸类化合物。最近 Bais 等对矢车菊(*Centaurea maculosa*)的研究表明:入侵杂草 *C. maculosa* 根系分泌的儿茶素(+)-Catechin 和(-)-Catechin 对其成功入侵起到决定性的化学生态学作用,生物测定表明,(+)-Catechin 具有强抗菌功能,而(-)-Catechin 则对其他作物和外来杂草有很强的化感作用。(±)-Catechin 对土壤植物能产生抑制作用的最低浓度约为 100 μg/mL。(±)-Catechin 对拟南芥和 *Centaurea diffusa* 具有毒害作用,当把 100 μg/mL(-)-Catechin 加入到拟南芥和 *Centaurea diffusa* 根部时,出现细胞质浓缩、细胞死亡和 *C. diffusa* 根尖细胞质 Ca^{2+} 离子浓度($[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$)升高。而当用相同条件处理 *C. maculosa* 时,没有发现 $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ 有明显升高^[19]。总之,根分泌的化感物质已经从定性和定量方面得以论证,这使得通常认为入侵植物主要是资源竞争的观点受到挑战。已有研究显示^[2],植物的竞争和化感作用是相互关联而又不可截然分开的两种干扰植物种群的方式,在排除动物、微生物和环境因子的影响后,一个植物群落中何种植物形成优势种群往往是植物种间的化感和资源竞争作用共同作用的结果。显然,在外来杂草的入侵过程中,竞争和化感作用机制也是必不可少的。我们曾提出一种旨在有效区分资源竞争与化感作用的生物测试法^[3],并用此测试法研究了水稻和入侵植物加拿大一枝黄花的化感作用,结果认为植物的化感抑草作用现象的确存在,化感水稻与稗草共生时,化感水稻对稗草所施加的生物干扰(Interference)等于水稻化感抑草作用和资源竞争之和,特别是在资源有限时(如低 N 条件下)化感作用能力增强,是资源竞争的 4.5 倍;在入侵植物加拿大一枝黄花与小麦共生时,在低 N 条件下,该入侵植物对小麦的影响增强,化感作用是资源竞争的 1.7 倍。最近, Ridenow 等在对北美入侵杂草 *Centaurea maculosa* 和新生境植物 *Festuca idahoensis* 的种间关系研究中也发现,入侵杂草 *C. maculosa*

际生物体以植物根系分泌物为媒介相互作用的机制比发生在地表的复杂(图 1)^[14]。植物根系最明显的代谢特征是向根系周围分泌大量的物质,研究表明,大约 5%~21% 光合作用固定的产物被转移到了根际^[15]。供体植物向受体植物释放的化感物质最先进入到土壤,然后转移到受体植物抑制其生长、影响种子的萌芽和微生物的分布等。这些化感物质除受本身物理化学特性影响外,还受供体和受体所处的气候条件和土壤因素的影响,所以化感作用是一个复杂的现象^[16]。化感物质抑制受体植物的生长主要受到供体植物和受体植物生长条件的影响,土壤和植物是主要的影响因子。在根际存在复杂的生物群落,根系必须与入侵的邻近植物根系和以大量有机物质为营养的细菌、真菌和土存动物相互竞争空间、水分、矿质营养等资源^[16]。因此,研究根际生态系统中根与根、根与微生物、根与动物等之间的相互联系以及化感物质在土壤中迁移规律与作用活性,对于深入理解化感物质是如何影响受体植物的生长发育有着重要的理论与实际意义。

和新生境植物 *F. idahoensis* 两者虽都具有较强的竞争能力,但 *C. maculosa* 能从根部分泌化感物质,并利用其较强的资源竞争能力和化感作用特性最终排挤了新生境的 *F. idahoensis*。若在两种混合植物群落的土壤中,用活性炭吸附由 *C. maculosa* 根分泌的化感物质,则其入侵能力明显降低,表明化感作用在 *C. maculosa* 入侵过程中起主导作用^[2]。前人研究也发现野燕麦 (*Avena fatua*) 根系分泌物中的对羟基苯甲酸、香草酸、香豆素等对春小麦胚根与胚芽生长有明显的抑制作用^[1];高山牛鞭草 (*Hemarthria altissima*) 根系分泌出的苯甲酸、苯乙酸、苯丙酸,能抑制莴苣 (*Lactuca sativa*) 种子的萌发;此外,西方豚草 (*Ambrosia psilostachya*) 根际土壤对 *Amaranthus retroflexus* 等 7 种植物的生长都有较强的促进效应,即其根系分泌物对一些植物也可能有促进作用^[18]。

1.2 供体植物根系分泌物的自毒作用

当前研究植物根系分泌物的化感自毒作用即连作障碍及其形成原因主要集中在茄子、黄瓜、茶树、花卉、蔬菜等园艺植物和人工栽培的药用植物等方面,总体而言,研究还不够深入,只停留在现象观察及描述上。已有研究认为,导致连作障碍的原因有 3 种可能:一是土壤理化性质特别是土壤肥力下降。由于连作植物对土壤中营养元素的吸收具有其固有的规律性,同一种植物的长期连作,易造成土壤中某些元素的亏缺,而这些元素无法得到及时补充时,将直接影响下茬作物的正常生长,造成植物抗逆性下降,病虫害发生严重,最终导致产量和品质下降。二是植物活体向环境特别是土壤中分泌出一些自毒物质,并因此而产生自毒作用。因为植物在正常的生命活动中,会向环境释放一些次生代谢物质,这些分泌物在土壤中积聚,对植物自身会产生毒害作用,即植物的化感自毒作用 (Autotoxicity)。化感植物分泌的一些多酚类化合物会破坏膜的功能,化感物质抑制受体植物的 SOD 和 CAT 酶活性,导致体内活性氧增多,启动膜质过氧化,破坏膜的结构;有研究证实,化感物质会降低受体中的赤霉素和生长素水平,从而抑制植物的生长;还有研究发现,化感物质明显抑制受体 ATP 酶的活性,从而影响受体的光合与呼吸作用,产生抑制植物的生长发育现象;有研究报道,自毒物质还影响植物对矿质元素的吸收,如苹果酸、肉桂酸会抑制大麦根磷酸盐和钾离子的吸收,其原因可能是自毒物质抑制呼吸作用和氧化磷酸化过程,抑制质膜 ATP 酶的活性。可见,化感自毒作用对植物的影响是多方面、深层次的。三是病原微生物数量增加,病虫害严重。同种植物的连作生长,造成土壤微生物区系发生变化,有益微生物减少,病原菌数量增加,导致植物病虫害加重,影响其产量与质量。

2 植物根际分泌物对土壤微生物的影响

在土壤中,根系分泌物和根际微生物之间的相互关系是一个重要过程,植物的根系通过分泌各种次生代谢物质对根际微生物的种类、数量和分布产生影响。植物分泌的次生代谢物大约有 10 万种,属于天然低分子物质^[20]。然而由于生境的异质性,致使植物不得时常面对各种逆境,同时还要防御各种微生物、土存昆虫、入侵植物的侵扰。在这些胁迫条件下,植物的一些次生代谢产物量大大提高,对周围其他生物产生不利或有益的影响。尽管根际的生物多样性导致很难用常规的分子或遗传的方法来阐明植物的防御机制,但通过检测模式植物和微生物的相互影响和基因表达,能让我们更好地了解它们之间相互作用的媒介及其信息传递。

根系分泌物定性和定量地影响其周围的微生物,例如在小麦 (*Triticum aestivum*) 的生长发育过程中,随着根系分泌物的增加,根际环境中反硝化细菌数明显增加^[4];白三叶草 (*Trifolium repens*) 根际土壤中的微生物数量和活性与根的长度和密度高度相关^[21]。本实验室为揭示化感水稻根际微生物与水稻化感潜力的关系,利用稀释平板计数法、氯仿熏蒸法,结合 BIOLOG 分析,探讨了不同化感潜力水稻苗期根际土壤的微生物群落特征及其碳代谢功能多样性。结果表明,不同品种水稻根际土壤微生物组成均以细菌占绝对优势,细菌、真菌、放线菌间的组成比例差异较小,细菌占微生物总数的 58.4%~65.6%,放线菌占 32.2%~39.4%,真菌最少,占 2.2%~2.8%。不同水稻品种根际土壤的微生物生物量碳大小顺序依次为:“Iguape Cateto”(441.0mg/kg) > “IAC47”(389.7mg/kg) > “PI312777”(333.2mg/kg) > “Lemont”(283.8mg/kg) > CK(129.3mg/kg),相应土壤的呼吸作用强度高低依次为:“PI312777”[1.404 μ g(C)/g·h] > “Iguape Cateto”[1.019 μ g(C)/g·h] > “IAC47”[0.671 μ g(C)/g·h] > “Lemont”[0.488 μ g(C)/g·h] > CK[0.304 μ g(C)/g·h];在各培养阶段,土壤的平均颜色变化率(AWCD)均以强化感水稻“PI312777”的最高,对照土的最小,不同来源土壤 AWCD 值大小顺序均为:“PI312777” > “IAC47” > “Iguape Cateto” > “Lemont” > CK。“PI312777”、“IAC47”、“Iguape Cateto”的 AWCD 值显著高于非化感水稻“Lemont”。培养 144h 后各种土壤的 AWCD 值均达到最大值,“PI312777”、“IAC47”、“Iguape Cateto”和“Lemont”的 AWCD 值依次为 CK 的 1.89、1.79、

1.60 和 1.43 倍。对不同类型 C 源的 AWCD 分析表明,提取的与 C 源利用功能多样性相关的主成分 1、主成分 2、主成分 3 依次能够解释变量方差的 70.08%、11.33% 和 7.02%,与主成分 1、主成分 2 和主成分 3 显著相关的 C 源共有 19 种,其中与主成分 1 显著正相关的主要是酚酸、糖类、氨基酸和胺类,与主成分 2 显著相关的主要是酚酸、糖类和脂肪酸类,而与主成分 3 显著正相关的主要是糖类和羟基酸,对各主成分起分异作用的主要 C 源分别是胺类和氨基酸。相关分析表明,土壤微生物总量与细菌数量、茛苳根长抑制率(IR)、AWCD、微生物生物量碳(MBC)、MBR 及多样性指数(Shannon 指数)间存在显著或极显著正相关;土壤细菌数量与微生物总量、茛苳根长抑制率(IR)、AWCD、MBR 及 Shannon 指数间呈显著正相关;土壤放线菌数量与 IR、MBC 呈显著正相关;而土壤真菌数量与所分析的各种指标间均无显著相关性。此外我们还研究了化感水稻“PI312777”不同叶龄期(3~7 叶期)的根际微生物区系变化及根际土壤酶活性。结果表明以空白土壤为对照,与非化感水稻“Lemont”相比,随生育进程,化感水稻“PI312777”对细菌、放线菌、固氮菌的生长有促进作用,但对真菌生长却呈抑制作用;进一步分析表明,化感水稻“PI312777”对氨化细菌、好气性固氮菌、好气性纤维素分解菌、硫化细菌、亚硝酸细菌、硝酸细菌生长具有促进作用,而对反硫化细菌、反硝化细菌生长有抑制作用。此外,化感水稻“PI312777”的根际分泌物还对土壤脲酶、磷酸酶、蔗糖酶的活性具有促进作用,而对过氧化氢酶有抑制作用,这与土壤真菌生长受阻有关。同时前人研究认为植物为了防御病原微生物的侵扰,必须迅速且有选择地采取相应的机制,并有选择地向根际加大释放分泌物来抑制病原菌的产生^[22,23],例如小麦根系分泌物能直接抑制小麦全蚀病原菌(*Gaeumannomyces graminis*)的菌丝发育^[24],荞麦(*Fagopyrum esculentum*)的根系分泌物对小麦全蚀病菌也有明显的抑制作用,但豆类、棉花(*Gossypium arborcum*)和茄子(*Solanum melongena*)等的根系分泌物对黄萎病(*Verticillium*)的抑制则是通过吸引 *Talaromyces flowus* 而起间接作用^[5],但这都必然影响到其根和芽的生长^[25]。多数药用植物连作障碍严重,张辰露对丹参研究表明,丹参根系分泌的酸性物质影响了土壤微生物群落,特别是真菌数量。本实验室研究地黄连作障碍的土壤微生物区系的结果表明,连作土壤中有益根际细菌如氨化细菌、好气性固氮菌、好气性纤维素分解菌、硫化细菌、硝化细菌的数量减少,真菌的生长也受到连作植物的抑制,而根际土壤中放线菌、反硝化细菌、反硫化细菌数量增多。显然,这样的土壤微生物环境不利于药用植物的健康生长。然而,也有一些药用植物却耐连作。我们以连作两年和多年的怀牛膝根际土壤为研究对象,对其微生物区系和酶活性的变化作了对比研究。结果表明,连作牛膝的根际土壤中细菌总数占绝对优势,放线菌次之,真菌最少;随着种植年限的增加,细菌的数量和比例明显增加,真菌数量变化较小,土壤由放线菌型向高肥的细菌型过渡;其中随着种植年限的增加,亚硝化细菌、反硝化细菌、好气性纤维素分解菌、硫化细菌的数量均明显增加,同时脲酶、蛋白酶、蔗糖酶和多酚氧化酶活性显著增强,过氧化氢酶活性却显著降低。从而认为在耐连作药用植物种植地的土壤微生物区系中,有益微生物可能与植物形成共生关系,或对病原微生物起拮抗作用,从而保证药用植物的健康生长;而在忌连作植物的种植地中,根围土壤中的养分劣化,特别是根系分泌物抑制微生物的生长导致其种群数量减少,尤其是与根部形成共生关系的有益微生物数量减少,破坏了土壤中原有的微生物区系,使得药用植物病虫害增多,影响产量与质量。

然而,由于根际的复杂性和多样性,很难了解其对植物生长和形态上的影响^[26]。不同植物种类或同种植物在不同发育阶段,其根系分泌物在组分和量上均有一定差异,且不同组分对根际微生物的生态效应不同,玉米(*Zea mays*)根系分泌物在不同生育期蛋白质与总糖含量有明显差异,这些物质的种类和数量差异对土壤微生物种群的分布有直接影响。凤眼莲(*Eichhornia crassipes*)根系分泌物组分中的氨基酸 Met、Gly、Ala、Asp、Ser、Val 和 Leu 均对根际杆菌属 F2(*Enterobacter* sp. F2)有强烈的正趋化作用,而 Lys、Cus、Arg、Thr、Pro、Asn、Gln、Ile、Phe 和 Trp 则对该细菌产生负趋化作用,分泌物中的氨基酸作为根际生态系统中的信息流,影响着该系统的降酚功能^[5]。

植物根系也会向根际释放一系列蛋白以抵御病原微生物的侵染,虽然已经报道这些蛋白是来自根的表面细胞^[23,27],但具体是哪一种蛋白现在还不清楚。通过将绿色荧光蛋白(GFP)、人类胎盘分泌的碱性磷酸酶(SEAP)、内质网信号肽木聚糖酶转入转基因烟草(*Nicotiana tabacum*),发现重组体 GFP、SEAP 和木聚糖酶都是通过根系分泌出来的,带有内质网靶信号肽的重组蛋白优先被转移到细胞壁和胞外,结果表明,根分泌的途径和内质网分泌途径极其相似^[28]。已有报道表明美洲商陆(*Phytolacca americana*)发根会向根际分泌核糖失活蛋白(RIP)、PAP-H^[27]。RIP 广泛存在于高等植物中,并通过具 N-糖苷酶活性来抑制蛋白合成,选择性地删除 28S rRNA 保守区的腺嘌呤残基,根系分泌的 RIP 还具有抗真菌特性,如抑制能使根腐烂的真

菌(*Rhizoctonia solani* 和 *Trichoderma reesei*)^[27,29]。前人也从美洲商陆的根得到一些发病相关蛋白,如 1,3- β 葡聚糖酶、几丁质酶、蛋白酶。这些发病相关蛋白被认为通过分裂真菌的细胞壁,使 PAP-H 更加容易进入其细胞壁,随后 PAP-H 很快进入真菌的细胞质,使蛋白质的合成停止,最终导致其细胞死亡^[29]。显微技术分析也表明,大量 PAP-H 聚集在根表皮细胞的细胞壁,作为细胞的一种成分^[27]。这些结果表明,植物根分泌系统及其分泌的生物活性蛋白、次生代谢物质都与根和微生物的相互作用有关,并影响土壤微生物类群。

必须指出的是,上述分析的化感作用对土壤微生物群落的影响只是建立在传统的平板法等研究基础上的,有其局限性,因为土壤中的微生物只有约 10% 能被培养,因此,采用这一传统的方法不能全面反映问题的实质所在。针对这一现象,近年来国内外许多学者采用分子生物学的技术与方法研究土壤微生物的生物多样性问题并取得重要进展。据此,我们运用末端限制性酶切片长度多态性(T-AFLP)技术,首次研究了化感水稻根系分泌物对土壤微生物的影响,结果发现非化感水稻根际土壤的 T-RFs 比化感水稻和空白土壤多,如片段 64(含有 *Clostridium* sp.str. AZ3 B.1、*Acidosphaera rubrifaciens* str. HS-AP3、clone SJA-118 等 3 种细菌)、136[含 clone env. OPS 2、*Eubacterium bifforme* ATCC 27806(T)、*Bacillus stearothermophilus* NCDO 1768(T)、*Bacillus caldovelox* 等 4 种细菌]、138[含 *Eubacterium cylindroides* ATCC 27803(T)、*Ectothiorhodospira marina* str. BN9914、Matheron BA 1010 DSM 241(T)、*Bacillus* GL1 str. GL1、*Desulfotobacterium dehalogenans* str. JW/IU-DC1 DSM 9161(T)、str. AshY1、*Paenibacillus kobensis* str. Yk205 IFO 15729(T)、*Aenibacillus macerans* JCM 2500(T)、*Allochromatium vinosum* ATCC 17899(T)、*Rubrobacter radiotolerans* JCM 2153(T)、*Bacillus tipchiralis*、clone Phenol-4、*Thermochromatium tepidum* str. MC ATCC 43061(T)、*Paenibacillus larvaesubsp. pulvifaciens* NCDO 1141 等 13 种细菌]、431[含 *Methyloarcula terricola* str. h37 VKM b-2160、str. JTB359、*Rhodovulum sulfidophilum* str. W-4(T) 等 3 种细菌]、467(含 Symbiont of *Alvinella pompejana*、*Campylobacter* sp. CCUG 20705 等 2 种细菌)、482[含 str. AT、*Haliscobenobacter hydroxsis* ATCC 27775(T)、*Methylophilus methylotrophus* str. AS1 ATCC 53528(T) 等 3 种细菌]、483(含 *Phytoplasma* sp.、*Phytoplasma* sp.str. ESFY 等 2 种细菌)只在化感水稻“IAC47”、“PI312777”、“Iguape Cateto”和非化感水稻“Lemont”的根圈土壤中出现,而空白土壤则未出现,说明水稻的根分泌物促进了这些微生物的生长,片段 79(含 *Thermus aquaticus* str. X-1 ATCC 27978、*Telluria micta* ACM 1762(T)、*Methanobrevibacter* sp.str. MB-9、*Desulfotomaculum alkaliphilum* str. S1 等 4 种细菌)只出现在非化感水稻“Lemont”中,而没有在化感水稻“IAC47”、“PI312777”、“Iguape Cateto”中出现,说明非化感水稻“Lemont”的根际微生物的种类比化感水稻丰富。因此,认为化感水稻的根分泌物在抑制其邻近的受体植物的同时,也抑制了其根际一些微生物的生长。

此外,近年来,利用基因标记进行微生态研究也取得较大进展,Gage 等以 *GFP* 为标记基因对 *Rhizobium meliloti* 和苜蓿的共生体形成的前期进行了研究。他们分别将 *GFP* 和 *GFP-S65G* 克隆到 *Salmonella tryphimurium trp* 启动子的下游,构建生成质粒 PtbigpTBIG(trp-GFP-S65T),再将 pTBIG 和 pTBIG 上的 trp-GFP 和 trp-GFP-S65T 融合子克隆到质粒(trp-GFP)和 Pmb393 中,得到重组成部分质粒 Ptb936(trp-GFP)和质粒 Ptb93F(trp-GFP-S65T),分别转化菌株 *Rhizobium meliloti* MB501 后进行观察。发现在赤霉素选择压力下质粒得以稳定表达,而在无选择压力下,将菌株 MB501/PTB93F 与寄主混合培养,3d 后在根部发现一些发光菌株,两周以内数量一直在增加,可以看到菌株镶嵌在根系的表面和根毛上,经常出现在环状根毛顶端的微型菌落,整个菌落柱在入侵表皮细胞以前进行 2~3 次分支,侵染线在培养 1 周即可看到,宽度约 4 个细胞,菌体侵染方向与侵染线一致^[30]。Lee 等^[31]在研究植物病原真菌对生防菌 *Pseudomonas putida* 相关基因表达的影响过程中,利用基因 *pyrB*(天冬氨酸酯转甲酰酶基因)构建了质粒 Priv11,导入 *Pseudomonas putida*,将卡那霉素抗性基因同源重组整合到细菌染色体上,这为研究菌株在土壤中的生态学提供了有效手段。Oparka^[32]将 *GFP* 编码基因置于根瘤菌组成启动子之后,利用 *GFP* 产生的绿色荧光可清楚地观察到根瘤菌对植物的侵染过程和与之共生的情况。Leff 等利用 *GFP* 标记研究水生环境中的基因工程菌等。这些成果都为应用基因标记研究根际微生态系统提供了理论依据。

3 土壤环境对根分泌物的影响

化感物质在土壤中抑制植物生长的活性是其与植物和土壤成分相互作用的结果^[33~35]。我们的研究结果表明,化感物质抑制活性受土壤成分的影响很大。同一水稻品种在沙培和土培不同培养方式下,其根系

分泌物在介质中的存留形式与含量有一定的差异,这种差异可能源于土壤环境的不同。根系分泌物在土壤环境的滞留、转化、迁移等过程中,可能发生氧化、还原、水合、质子化以及微生物分解,所以未经土壤环境的根系分泌物中的物质并不一定就是最终起到化感作用的物质。化感作用是各类物质和环境各因子如土壤、温度、水分、营养物质等综合作用的结果,其中可能同时存在着拮抗和协同作用。国内外许多学者的研究结果也表明植物化感作用潜力的高低是多种物质共同作用的结果。非化感水稻“Lemont”虽然也存在许多人认为是化感物质的萜类、酚酸、酯类等,但总体并未显示化感作用,这也证明了化感作用是多种物质间综合作用的结果。因此,期望从中找出一种特征物质是不现实甚至是不可能的。当前许多研究是用水稻根系的水浸提液对受体生长影响来判定物质的化感作用强弱,该方法在化感物质种类的前期筛选中简化了环境影响因子,从而取得较好的研究结果,但忽略了化感物质经土壤后,最终影响受体植物的物质可能是已发生变化的存留形式,这在一定程度上会影响到对真正起到化感作用之物质判断的准确性。Inderjit 等^[34]的研究表明酚类化感物质在土壤中会失去化感作用。孔垂华等^[6]发现胜红蓟的类萜化感物质在土壤中会发生聚合反应。鉴于土壤是根系分泌物影响其他植物的必经途径,因此研究经土壤环境后的对受体植物产生作用的化感物质更具有实际意义,而土壤环境的复杂性和多变性给化感作用研究提出了新的挑战。

植物能依据不同的生物和非生物因子合成、释放不同种类和数量的次生代谢物质,以抵御环境胁迫和生物侵害^[1,35]。化感水稻“PI312777”和非化感水稻“Lemont”的根系分泌物中都有相同或相似的含氧萜类化合物,但二者的化感作用差异却很大,说明化感水稻品种能根据环境变化来调节自身分泌化感物质的种类和数量,以达到抵御外来之敌的目的^[7]。Shibuya 等^[36]研究也发现,当把 L-3, DOPA 分别加入到“Masa”和火山灰土壤中,前者抑制活性大于后者。这表明化感物质的化学特性易受受体植物的诱导,但受到土壤环境因素影响更大。然而,化感物质在土壤中是如何运转并影响受体植物的生长发育,至今仍是一个难题。前人研究认为化感物质进入土壤能对受体植物起的作用,只有它落于泥水中后被受体植物根系所吸收才会发生,并运用加石碳酸于土壤泥水中来模拟测试得到了验证^[37]。然而由于条件限制化感物质在泥水中的数量是很难被测出的,通过离心分离法从泥水的泥土中得到一些决定性物质,这些物质在泥水中的抑制活性取决于其浓度而不取决于数量^[38,39]。Tongma 等^[40]在对墨西哥向日葵研究中也发现到类似的现象。因此,在泥水中化感物质抑制植物生长活性主要取决于其浓度。

前人研究还表明,根分泌物受到土壤中温度、空气、光照、养分等的影响。在适合植物生长的温度范围内,大多数植物的分泌速度一般随温度的升高而加强,但也有些植物在低温条件下释放更多的分泌物。我们的研究结果反复证明了营养胁迫下,水稻化感抑草能力增强,并认为与其逆境下酚酸类物质代谢增强有关^[1~3]。已有研究也证实,相对高温(31℃)使在无菌培养中的番茄和三叶草氨基酸分泌增加;在较高温度下,三叶草分泌生物素和尼克酸数量增加;5~10℃是草莓根系分泌氨基酸最适宜的温度;37℃时,棉花、菜豆根分泌物增加,豌豆却减少;玉米和黄瓜经“冷处理”后,根分泌物大量增加^[8]。Elroy^[41]在无菌培养条件下进行试验,结果表明:豌豆、大豆、小麦或番茄在砂土或砂壤土中生长,先使其干旱到萎蔫点,然后再浇水,根系氨基酸的分泌量较一直保持在湿润条件下的高。禾本科单子叶植物(小麦、水稻)在缺 Fe 胁迫下,根分泌一种非蛋白质氨基酸——麦根酸,这种物质可活化土壤中的难溶性 Fe 和其他金属元素,对这些离子进入植物体内起载体作用^[42]。另有报道苜蓿(*Medicago sativa*)在缺 P 胁迫条件下根系分泌的有机酸有柠檬酸、苹果酸和丁二酸,其中柠檬酸的分泌量是正常供 P 时的 2 倍^[43]。可见,土壤环境对植物的根际生物学过程起重要作用,需要深入研究。

4 问题与展望

近年来,生物入侵已成为全球关注和研究的热点问题,生物入侵在许多地域引发了严重的生态和经济等问题,其中外来植物种或杂草的入侵是重要的方面^[44]。目前中国外来杂草已达 23 科共 108 种^[9],其中近 10 种已成为入侵种。这些外来杂草的入侵已对农林和自然生态系统造成极大的危害^[10]。利用植物化感作用(Allelopathy)控制农田杂草是 21 世纪发展可持续农业的生物工程技术之一。植物根系通过次生代谢向根际分泌大量物质,并以其为媒介与其他生物发生各种化学作用。在土壤环境中,化感物质的活性受到供体、受体以及根际微生态环境等各方面因素的影响,并可能被土壤微生物所降解,但它们之间必然存在一定的互相适应、协同进化机制。通过现代生物技术与传统的生态学方法相结合,了解根分泌物与根际微生态系统中相互作用中起着传递信息的因子,将有利于阐明其作用机制。因此,研究根与根、根与微生物、根与土壤动物等之间的相互联系及化感物质在土壤中的活性,对更好地了解化感物质是如何影响受体植物的生

长发育有着重要的意义。

目前有关根际的研究趋向于整体性即根际生物学过程与机制的系统研究,这不仅涉及生物生态学方面,还涉及物理学和化学等相关领域,已成为当前国际科学前沿问题之一。从最基本的根际显微结构、根际微环境中物质迁移和调控、根际的物理、化学和生物环境动态、植物的营养遗传特性、根分泌物的作用以及根际的信息传递,到植物与植物、植物与微生物、植物与土壤、微生物与土壤、微生物与微生物个体甚至群体之间的相互作用,积累了大量的研究成果。我们实验室在特异种质资源的引进、筛选和评价、化感作用水稻的生物学特性与发育遗传、基因定位及分子克隆以及应用功能蛋白组学研究 N 素营养调控化感水稻抑草作用的分子机理等方面开展了大量研究,并取得较好的研究成果,受到国内外同行的关注。目前在化感水稻根际的生物学动态过程、根际多样性、根际化感物质的提取以及利用基因工程菌鉴定化感物质的种类等化感水稻生物学的研究方面已经取得了一些进展。这将有利于根际生态系统理论体系的建立,阐明其调控机制,为建立科学合理的预测和控制方法奠定基础,在全球变化和生态系统水平上拓宽认识植物和其他生物与环境之间相互关系的视野,防止生物入侵。从农业生态的角度来说,还可以减少对化学除草剂的使用,降低生产成本、保护生态环境和生物多样性,降低农业投入,使作物栽培向高产、优质、生态、安全生产发展。

参 考 文 献

- 1 林文雄.水稻化感作用.厦门:厦门大学出版社,2006
- 2 林文雄,何海斌,熊君,等.水稻化感作用及其分子生态学研究进展.生态学报,2006,26(8):2687~2695
- 3 熊君,林文雄,周军建,等.不同供氮条件下水稻的化感抑草作用与资源竞争分析.应用生态学报,2006,16(5):885~889
- 4 李振高,潘映华,李良谟.不同基因型小麦根际细菌及酶活性的动态研究.土壤学报,1993,30(1):1~8
- 5 史刚荣.植物根系分泌物的生态效应.生态学杂志,2004,23(1):97~101
- 6 孔垂华,徐涛,胡飞.胜红蓟化感作用研究.Ⅱ.主要化感物质的释放途径和活性.应用生态学报,1998,9(3):257~260
- 7 何海斌,陈祥旭,林瑞余,等.化感水稻 PI312777 苗期根系分泌物中化学成分分析.应用生态学报,2005,16(12):2383~2388
- 8 熊明彪,何建平,宋光煜.根分泌物对根际微生物生态分布的影响.土壤通报,2002,33(2):145~148
- 9 强胜,曹学章.中国异域杂草的考察与分析.植物资源与环境学报,2000,9(4):34~38
- 10 万方浩,郭建英,王德辉,等.中国外来入侵生物的危害与管理对策.生物多样性,2002,10(1):119~125
- 11 Kohli R.K., Singh H.P., Batish D.R. Allelopathy in Agroecosystems. New York: Food Products Press, 2001
- 12 Takeuchi Y., Kawaguchi S., Yoneyama K. Inhibitory and promotive allelopathy in rice (*Oryza sativa* L.). Weed Biol. Manag., 2001, 1(3): 147~156
- 13 Walker T.S., Bais H.P., Grotewold E., et al. Root exudation and rhizosphere biology. Plant Physiology, 2003, 132(5): 44~51
- 14 Bais H.P., Park S.W., Weir T.I., et al. How plants communicate using the underground information superhighway. Trends in Plant Science, 2004, 9(1): 26~32
- 15 Marschner H. Mineral Nutrition of Higher Plants (2nd). London: Academic Press, 1995
- 16 Katsuchi K. Factors affecting phytotoxic activity of allelochemicals in soil. Weed Biology and Management, 2004, 4(1): 1~7
- 17 Callaway R.M., Aschehoug E.T. Invasive plants versus their new and old neighbors: a mechanism for exotic invasion. Science, 2000, 290(5491): 521~523
- 18 Tang C.S., Young C.C. Collection and identification of allelopathic compounds from the undisturbed root system of *Bigalita limpograss* (*Hemarthria altissima*). Plant Physiology, 1982, 69(1): 155~160
- 19 Bais H.P., Vepachedu R., Gilroy S., et al. Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interactions. Science, 2003, 301(5638): 1377~1380
- 20 Dixon R.A. Natural products and plant disease resistance. Nature, 2001, 411(6839): 843~847
- 21 Schortemeyer M., Santrckova H., Sandowsky M.J. Relationship between root length density and soil microorganisms in the rhizospheres of white clover and perennial ryegrass. Commun. Soil Sci. Plant Anal., 1997, 28(19/20): 1675~1682
- 22 Flores H.E., Vivanco J.M., Loyola-Vargas V.M., et al. 'Radicle' biochemistry: the biology of root-specific metabolism. Trends in Plant Science, 1999, 4(6): 220~226
- 23 Bais H.P., Loyola-Vargas V.M., Flores H.E., et al. Root-specific metabolism: the biology and biochemistry of underground organs. In Vitro Cell Dev. Biol. Plant, 2001, 37(6): 730~741
- 24 Smiley R.W., Cook R.J. Relationship between take-all of wheat and rhizosphere pH in soils fertilized with ammonium vs. nitrate nitrogen. Phytopathol., 1973, 63: 882~890
- 25 Schenck N.G. Microorganisms and Root Development and Function. Madison, FL: Soil and Crop Science Society, 1976
- 26 Kothari S.K., Marschner H., George E. Effect of VA mycorrhizal fungi and rhizosphere microorganisms on root and shoot morphology, growth and water relations in maize. New Phytol., 1990, 116(2): 303~311
- 27 Park S.W., Lawrence C.B., Linden J.C., et al. Isolation and characterization of a novel ribosome-inactivating protein from root cultures of

- pokeweed and its mechanism of secretion from roots. *Plant Physiol.*, 2002, 130(1): 164~178
- 28 Gleba D., Borisjuk N. V., Borisjuk L. G., *et al.* Use of plant roots for phytoremediation and molecular farming. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1999, 96(11): 5973~5977
- 29 Park S. W., Stevens N. M., Vivanco J. M., *et al.* Enzymatic specificity of three ribosome inactivating proteins against fungal ribosomes, and correlation with antifungal activity. *Planta*, 2002, 216(2): 227~234
- 30 Gage D. J., Bobo T., Long S. R. Use of green fluorescent protein to visualize the early events of symbiosis between *Rhizobium meliloti* and alfalfa (*Medicago sativa*). *J. Bacteriol.*, 1996, 178(24): 7159~7166
- 31 Lee S. W., Cooksey D. A. Genes expressed in *Pseudomonas putida* during colonization of a plant-pathogenic fungus. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, 66(7): 2764~2772
- 32 Oparka K. J., Cruz S. S., Padgett H. S., *et al.* Gating of epidermal plasmodesmata is restricted to the leading edge of expanding infection sites of tobacco mosaic virus (TMV). *Plant Journal*, 1997, 12(4): 781~789
- 33 Fisher R. F. Juglone inhibits pine growth under certain moisture regimes. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 1978, 42: 801~803
- 34 Inderjit, Dakshini K. M. M. Allelopathic effect of *Pluchea lanceolata* on characteristics of four soils and tomato and mustard growth. *Am. J. Bot.*, 1994, 81(7): 799~804
- 35 Littera P., Bazzalo M. E. Seed-to-seed allelopathic effects between two invaders of burned Pampa grassland. *Weed Res.*, 1999, 39: 297~308
- 36 Shibuya T., Fujii Y., Asakawa Y. Effects of soil factors on manifestation of allelopathy in *Cytisus scoparius*. *Weed Res. Japan*, 1994, 39: 222~228
- 37 Blum U., Worsham A. D., Gerig T. M., *et al.* Use of water and EDTA extractions to estimate available (free and reversibly bound) phenolic acids in Cecil soil. *J. Chem. Ecol.*, 1994, 20(2): 341~359
- 38 Dalton B. R., Blum U., Weed S. B. Differential sorption of exogenously applied ferulic, *p*-coumaric, *p*-hydroxybenzoic, and vanillic acids in soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 1989, 53(3): 757~762
- 39 Kitou M., Yoshida S. Allelopathic effect of extracts of soil amended with some plant materials on germination and radicle elongation of lettuce. *Weed Sci. Technol.*, 1998, 43: 1~9
- 40 Tongma S., Kobayashi K., Usui K. Allelopathic activity of Mexican sunflower (*Tithonia diversifolia*) in soil. *Weed Sci.*, 1998, 46(4): 432~437
- 41 Curl E. A., Truelove B. *The Rhizosphere*. Berlin: Springer-Verlag, 1986
- 42 Treeby M., Marschner H., Römheld V. Mobilization of iron and other micronutrient cations from a calcareous soil by plant borne, microbial, and synthetic metal chelators. *Plant and Soil*, 1989, 114(2): 217~226
- 43 Lipton D. S., Blanchar R. W., Blevins D. G. Citrate, malate, and succinate concentration in exudates from P-sufficient and P-stressed, *Medicago sativa* L. seedlings. *Plant Physiol.*, 1987, 85(2): 315~317
- 44 Brundu G., Brock J., Camarda I., *et al.* *Plant Invasions: Species Ecology and Ecosystem Management*. Netherlands Leiden: Backhuys Publishers, 2001