

大豆—根瘤菌共生固氮体系 研究的某些新进展

窦新田

(黑龙江省农业科学院土壤肥料研究所)

提 要

本文简述了目前关于大豆—根瘤菌共生固氮体系研究的某些新进展。其中包括侵染的分子识别, 根瘤菌固氮酶, 根瘤菌自生固氮, 根瘤菌与植物细胞离体固氮, 根瘤菌与宿主的关系, 质粒与固氮基因转移等。

自从1888年荷兰 M. W. Beijerinck 首次从豆科作物的根瘤中分离出根瘤菌以来, 世界各国对豆科作物与根瘤菌的共生固氮研究日趋深入。特别是近二十年来, 生物固氮研究异常活跃, 进展迅速。其研究内容涉及固氮生物学、固氮生物化学、固氮化学和固氮遗传学等领域。其研究又分别在生态学水平、细胞水平和分子水平上进行。

在豆科作物共生固氮研究中, 大豆—根瘤菌共生固氮体系历来受到重视。近46年来, 世界大豆生产增长了6倍, 1980年播种面积已达5700万公顷(FAO, 1980)。美国1979年与1930年相比, 大豆播种面积扩大了63倍多^[2,3]。近年, 由于世界各国普遍面临着能源、粮食、人口和环境等问题的困扰, 所以对豆科作物固氮寄予了很大希望。据Burus和Hardy (1975) 估算^[35]: 全世界收获的农产品每年从土壤中带走约11,000万吨氮, 其中工业氮肥最多能提供4,500万吨氮, 而且氮肥利用率不超过50%, 另外约9,000万吨氮是由生物氮提供的, 其中豆科作物固氮为3,500万吨。可见, 豆科作物共生固氮在农业生产上的重要意义。

目前, 各国正积极扩大以大豆为主的豆科作物面积, 以增加土壤中生物氮数量; 另一方面进行大豆—根瘤菌共生固氮体系的生理、生化、生态、和遗传等研究, 以提高大豆与根瘤菌共生固氮的能力。

1. 侵染的分子识别

许多试验证明了根瘤菌具有专一性。这就是: 不同的根瘤菌只能侵染特定的豆科植物。有的根瘤菌可以侵染一种豆科作物, 有的可以侵染多种豆科植物。例如, 从大豆根瘤中分离出来的根瘤菌只能在大豆上形成根瘤, 而不能和豌豆、紫云英等其它豆科作物

结瘤。

1974年, Bohlool 和 Schmide 认为: 大豆与根瘤菌这种专一侵染性是通过分子识别的。这种识别是靠大豆根部分泌的外源凝集素 (Lectins) 和根瘤菌表面的糖类 (如脂多糖、荚膜多糖等) 之间进行专一结合而侵染结瘤的^[32]。他们应用直接镜检技术, 观察了大豆外源凝集素与大豆根瘤菌之间的反应。试验结果说明, 所有同大豆外源凝集素结合的根瘤菌全是大豆根瘤菌, 而其它根瘤菌则是负反应。用荧光素异硫氰酸盐标记大豆外源凝集素, 结果在25株根瘤菌中只与2株大豆根瘤菌结合, 而不同其它不使大豆形成根瘤的23株根瘤菌结合。这些试验说明, 大豆的外源凝集素在大豆与根瘤菌专一性之间具有重要作用。

Dazzo 和 Hubbell (1975) 对大豆外源凝集素的研究也得到了类似的结果^[33,34]。Bhuvaneswari 等 (1977) 试验说明, 22个被试的大豆根瘤菌有15个菌系可与大豆外源凝集素结合^[31]。

植物分泌的外源凝集素是一种特殊的蛋白质。只有与这种蛋白质结合的菌系才可能结瘤固氮, 反之, 不能与之结合的菌系, 就不能结瘤。

处于根瘤菌受体位置的有胞外多糖和脂多糖, 它们对特定的凝集素有亲和力^[7]。加拿大 Arya K. Bal 等用大豆凝集素处理根瘤菌, 发现大豆外源凝集素有第一和第二受体位置, 第一位置在荚膜部分, 第二受体位置位于细胞壁脂多糖处。他们提出假说认为: 荚膜受体对细菌附着在根毛上起作用, 而寄主的特性和分子识别由细胞壁多脂糖受体传递。

关于大豆根瘤菌分子识别的研究, 不仅对大豆—根瘤菌共生固氮体系研究中具有重要意义, 而且有可能将根瘤菌结瘤固氮特性扩大到非豆科作物上。Maier 等 (1978) 把结合于外源凝集素的大豆根瘤菌细胞表面受体的合成控制基因转移给棕色固氮菌, 结果可使不固氮的棕色固氮菌固氮。

外源凝集素在豆科植物结瘤中引起了广泛注意, 但是对于在根上作为辨认识别的问题及它们在根瘤和寄主间作为侵染特性的分子基础方面尚有不同的观点, 对受体点的位置也有不同看法。

2. 根瘤菌氢酶

在生物固氮体系中, 固氮酶在催化固氮作用时, 还进行氢的释放, 称为需 ATP 的放氢作用。产生氢气是固氮酶有固氮作用的标志。这种现象, 是固氮过程中不可避免的一种附带反应。根据 Winter 和 Burris (1968) 报导^[5], 固氮酶产生10分子的氢气必需消耗4个ATP (三磷酸腺苷) 和2个电子。苜蓿和白三叶草等豆科植物在固氮过程中产生氢气约消耗其总固氮作用中25—35%的能量, 大豆则消耗26%。据估计, 美国一年种植的大豆因放氢作用所耗去的能量, 相当于3,000亿立方呎的天然气能量。

1976年, Evans 及其同事首先发现, 具有氢酶根瘤菌能再循环利用固氮过程中所放出的氢, 作为还原氮素或胺的 H^+ 及 e^- , 可用下式表示:

白水解产物。下列碳源组合等的一种: 阿拉伯糖或半乳糖+琥珀酸盐; 延胡索盐或丙酮酸盐; 木糖、阿拉伯糖或半乳糖+蔗糖; 蔗糖+琥珀酸盐; 葡萄糖酸盐+甘露醇; 阿拉伯糖或甘油+琥珀酸盐; 葡萄糖+琥珀酸盐。

据报道, 自生根瘤菌形成的固氮酶其活性水平与离体的类菌体相似。用 $^{15}\text{N}_2$ 实验发现, 固定的氮有94%以上被自生大豆根瘤菌所输出^[27]。

根瘤菌自生固氮的发现说明根瘤菌具有固氮作用的全部基因组。因此, 它也能象其它固氮微生物那样可以进行固氮基因转移。此外, 对研究共生固氮的遗传学也具有重要的理论和现实意义。

4. 根瘤菌与植物细胞离体固氮

1971年, Holsten 等^[25]用大豆根瘤菌感染离体的大豆根进行组织培养, 发现在愈伤组织内产生类似在大豆根瘤中出现的侵入线。“侵入线”穿过细胞团的细胞间隙, 在“侵入线”中可以看到根瘤菌, 根瘤菌总是从“侵入线”的末端进入植物细胞, 在植物细胞进行繁殖, 并以其菌体完全取代了植物细胞内含物。对细胞固氮酶活性测定表明: 固氮酶活性同根瘤菌的侵入程度成正相关。这项工作经过三年其它学者的试验, 都成功地得到重复^[36]。

Phillips (1974) 测到了其它根瘤菌与大豆细胞的固氮, 特别是一种豇豆根瘤菌 32H1 得到的效果更明显。它与大豆细胞离体固氮时得到比正常大豆根瘤菌共生体更高速率的乙炔还原作用。而豇豆族的 32H1, 有很广的宿主范围, 它在许多热带豆科植物上都能形成根瘤。

大豆根瘤菌与大豆细胞离体固氮说明, 根瘤菌具有合成固氮酶的遗传信息的证据, 这否定了根瘤菌固氮基因部分是编码在宿主基因组中的理论, 而宿主植物细胞只产生一种利于根瘤菌生长的扩散因子。此外, 根瘤菌与植物离体共生固氮对研究和控制根瘤菌的侵染的共生的发展过程, 提供了新的途径。

用根瘤菌感染非豆科植物进行组织培养时, 发现这些根瘤菌能与植物细胞建立共生固氮联系。用根瘤菌感染不同侵染族的豆科作物也获得了类似效果。例如, 1972年 Davey 等将大豆根瘤菌引入豌豆叶片原生质体中, 在新的细胞中产生了共生, 并有乙炔还原能力。为什么根瘤菌能与非豆科植物细胞离体固氮呢? 这可能因为寄主细胞产生的扩散物质, 对根瘤菌的固氮过程没有抑制作用。如果利用植物原生质体培养技术就有可能扩大根瘤菌的接种谱, 使非豆科作物接瘤固氮。

5. 大豆根瘤菌与宿主的关系

近年许多研究都证明, 大豆宿主对根瘤菌的生长和发育、固氮等都有一定影响。因此, 在选育根瘤菌和进行根瘤菌接种时都要考虑大豆—根瘤菌之间的最佳联合效应^[18]。

首先, 大豆的光合作用对根瘤菌的固氮具有重要作用, 因为大豆光合作用提供根瘤菌固氮时所必须的碳源。因此, 任何影响光合作用的因子都有可能影响根瘤菌的固氮作用。例如, 生长在加富三倍二氧化碳条件下的大豆, 由于二氧化碳加富的结果使光合作

用加强,而大豆的固氮能力从75公斤/公顷提高到425公斤/公顷。美国培育的“绿叶黄荚”的大豆品种,使大豆光合作用延长,从而使根瘤菌的固氮能力维持到鼓粒期甚至更长。

美国农业部试验表明^[30],大豆遗传型对大豆根瘤菌菌株有选择性。某些菌株在某些品种的根瘤内较多,而在其它品种的根瘤中则较少。亲缘关系密切的品种其根瘤内的大豆根瘤菌相类似。某些大豆遗传型的专化性决定着某些根瘤菌菌株占优势,这表明可利用选定的大豆品种来改变土壤根瘤菌类型的成分。在一些组合中,大豆—根瘤菌组合的相互作用的范围从完全不结瘤到不同类型和程度的固氮作用的结瘤。因此,在大豆育种中同时应考虑选育与之对应的根瘤菌菌种,即所谓的大豆—根瘤菌最佳组合。

D. F. Weber 指出,控制大豆植株根瘤形成有三种遗传基因,Rj1——隐性基因,它决定某些大豆品种不形成根瘤的能力;Rj2——独立的显性基因,它决定无效根瘤的形成;Rj3——独立基因,它决定根瘤接种的无效性。为提高大豆根瘤菌的接种效果,Devine^[28]首先选出了与当地土著根瘤菌不能共生固氮的新的的大豆基因型,并进一步在这个基因型的几万个单株中,找到了能与高效根瘤菌共生的单株。从而选育出不为当地土著根瘤菌侵染的大豆—根瘤菌共生固氮体系。

6. 质粒和固氮基因转移

质粒(Plasmid)是细菌染色体外很小的一圈双螺旋环状DNA,它是一个能独立进行自我复制的单位。质粒很小,只有染色体大小的0.1—10%,质粒可以容易地从细菌中提取出来,转移到另一种细菌中去。因此,质粒是当前基因转移重要的运载工具。

质粒在细菌中广泛存在。近年有不少报道证明根瘤菌也具有质粒,质粒上带有控制共生固氮方面的基因。基因包括:寄主范围、根瘤形成、固氮作用、氢酶、根毛吸附、荚膜形成等。J. Penarie 等研究工作报导,根瘤菌细胞内的质粒带有300个以上的基因,控制共生固氮过程中的各个阶段^[6,7,14,15,20,29]。

M. A. Cole 和 G. H. Elkan 1973年在大豆根瘤菌中发现R质粒。根瘤菌的氢酶是由细菌细胞中的氢酶基因所控制。美国 Michael A. Cantrell 等认为大豆根瘤菌中控制氢酶的基因是在较大的质粒上。

根瘤菌的质粒与结瘤有关。S. Higashi (1967)曾用吡啶橙消除三叶草根瘤菌的质粒,可使根瘤菌失去结瘤能力。L. K. Dunican 等(1976)认为控制固氮作用的固氮基因操纵子是定位于质粒中,但也有人认为根瘤菌的固氮基因是定位于染色体上。

质粒携带的基因比较容易转移。如果将带有固氮基因(nif)的质粒进行人工重组,有可能把固氮基因转移给不能固氮的微生物或者植物,或者获得固氮力强的特异菌种。

1974年爱尔兰的 L. K. Dunican 等第一次将三叶草根瘤菌的固氮基因转移给不固氮的产气克氏杆菌,重组体获得有固氮能力。这是第一次利用质粒重组方法将根瘤菌的固氮基因转移给不同属的细菌中。西德 Hauke Hennecke 将大豆根瘤菌带有固氮基因的质粒进行重组,在大肠杆菌上鉴定出质粒的重新组合。

参 考 文 献

1. 张宪武: 1980, 固氮微生物研究动向, 应用微生物, 3, 1—9.
2. 张道勇: 1981, 工业氮和生物氮的意义, 国外科技动态, 8.
3. 付道雄: 1981, 生物固氮研究的进展, 国外科技, 7.
4. 陈华葵, 王子芳: 1979, 在三个水平上的生物固氮研究, 中国微生物学会1979年学术讨论会论文.
5. 黄启颖: 1979, 氢与氢酶对固氮作用及固氮酶活性的影响, 台湾农业科学.
6. 李仲贤: 1933, 根瘤菌质粒的研究概况, 华中农学院学报, (2) 1, 96—100.
7. 张 宏、宋明芝: 1982, 第四届国际固氮会议大豆根瘤菌研究论文摘要, 国外农学——大豆, 1, 46—52.
8. 中国农科院油料所根瘤菌组: 1980, 关于花生、大豆根瘤菌选育及应用的某些研究资料, 应用微生物, 6.
9. 莫汉庆、孙 珊: 1981, 大豆凝集素和花生凝集素的性质和作用, 植物生理学通讯, 5.
10. 出国参考察报告: 1979, 澳大利亚生物固氮, 科学技术文献出版社, 2—8.
11. 罗明典: 1977, 根瘤菌共生固氮及其专异性问题研究的进展, 应用微生物, 2, 1—7.
12. 罗明典: 1980, 离体条件下细菌—植物共生研究的进展, 微生物和分子遗传学专集, 科学技术文献出版社, 235—229.
13. 罗明典: 1982, 原生质体对异源供体的吸收性和共生固氮研究的现状及展望, 基因无性繁殖, 科学出版社, 55—64.
14. 丁勇等: 1982, 苜蓿根瘤菌和羽扇豆根瘤菌的大质粒, 遗传, 5, 22—24.
15. 宁林夫: 1978, 根瘤菌质粒的转移与杂交育种, 1978年全国生物固氮学术讨论会论文.
16. 山东农科院土肥所: 1982, 大豆根瘤固氮的研究, 山东农业科学, 2.
17. 尤崇杓: 1982, 美国固氮研究, 世界农业, 2, 9—12.
18. Riley, R.: 1979, 共生固氮的育种, Plant Breeding Perspectives, 341—343.
19. Becking, J. H.: 生物固氮及其经济意义, 广东省植物所译自“国际原子能委员会—341/14”.
20. Rolfe, B. G. 等: 1982, 共生固氮基因的遗传和生化分析, 生物科学动态, 1.
21. Brill, W. J.: 1979, 生物固氮, 生物科学参考资料(第十二集), 科学出版社.
22. Brill, W. J.: 1982, 农业微生物学, 科学, 1, 89—90.
23. Burris, R. H.: 1981, 固氮酶的作用机制, 应用微生物, 6, 11—18.
24. Bergersen, F. J.: 1974, 豆科植物根瘤的氮素固定: 用大豆作生化研究, 生物固氮译文集(第一集), 科学出版社.
25. Holsten, R. D. 等: 1974, 根瘤菌和离体植物细胞间共生关系的建立, 生物固氮译文集(第一集), 科学出版社: 3—9.
26. Scowcroft, W. R.: 1978, 植物组织培养和固氮, 中澳植物组织培养学术讨论会论文.
27. Shanmugam, K. T. 等: 1932, 生物固氮, 生物固氮译丛(二), 农业出版社1—9.
28. Devine, T. E. 等: 1977, 大豆根瘤形成的遗传特性, Euphytica, 26 (3), 527—536.
29. Dunican 等: 1974, 根瘤菌共生特性的遗传控制, 质基因控制的证据, 生物固氮译文集(第一集), 科学出版社, 10—13.
30. Weber, D. F. 等: 1975, 美国农业部对大豆—根瘤菌共生的一些研究, 生物固氮, 科学技术文献出版社重庆分社, 91—95.
31. Bhuvaneswari, T. V. 等: 1977, Plant Physiology, 60 (4), 486—491.
32. Bohlool, B. B. and Schmidt, E. L.: 1974, Science, 185 (269).
33. Dazzo, F. B. and Hubbell, D. H.: 1975, Plant and Soil, 45 (713).
34. Dazzo, F. B. and Hubbell, D. H.: 1975, Appl. Microbiol., 30 (172).
35. 中村道徳: 1979, 生物窒素固定, 学会出版センター.
36. Мишггин, Е. Н., Шильникова, В. К.: 1938, Биологическая Фиксация атмосферного азота, 235—239.
37. Мурамцев: 1976, Агрономическая Микробиология, 83—125.
38. Демина, Н.С.: 1979, 根瘤菌自生固氮的能力, 应用微生物, 4, 53.