

生物固氮译文集

第一集

科学出版社

生物固氮译文集

第一集

中国科学院植物研究所七室译

科学出版社

1974

内 容 简 介

本文集选译了有关生物固氮的论文共十六篇，包括近代国际上有关固氮酶系和化学模拟方面研究的基本情况，并部分地包括有关共生固氮及固氮基因遗传转移的研究。可供有关植物、微生物和遗传等科研人员及教学工作者的参考。

生物固氮译文集

第一集

中国科学院植物研究所七室译

*

科学出版社出版

北京朝阳门内大街137号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1974年8月第一版 开本：787×1092 1/16

1974年8月第一次印刷 印张：7

印数：0001—4,620 字数：160,000

统一书号：13031·230

本社书号：380·13—10

定价：0.75元

目 录

扩大共生固氮以增加人类的食物供应·····	
····· D. A. Phillips, J. G. Torrey, R. H. Burris (1)	
根瘤菌和离体植物细胞间共生关系的建立·····	
····· R. D. Holsten, R. C. Burns, R. W. F. Hardy, R. R. Hebert (3)	
根瘤菌共生特性的遗传控制: 质基因控制的证据·····	
····· L. K. Dunican, F. C. Cannon (10)	
在肺炎克氏杆菌中固氮基因的转导·····	
····· S. Streicher, E. Gurney, R. C. Valentine (14)	
肺炎克氏杆菌的固氮作用遗传转移到大肠杆菌·····	
····· R. A. Dixon, J. R. Postgate (21)	
固氮生化的进展 ·····	R. H. Burris (25)
豆科植物根瘤的氮素固定: 用大豆作生化研究 ·····	F. J. Bergersen (34)
固氮的中心反应 ·····	F. J. Bergersen (46)
巴氏梭菌 W5 中钼铁氧还蛋白的分子量和亚单位结构·····	
····· G. Nakos, L. Mortenson (54)	
巴氏梭菌 W5 的固氮铁蛋白亚单位的结构·····	
····· G. Nakos, L. E. Mortenson (59)	
棕色固氮菌固氮酶的钼铁蛋白的分离和结晶·····	
····· R. C. Burns, R. D. Holsten, R. W. F. Hardy (63)	
固氮化学的新进展 ·····	J. Chatt (68)
在温和条件下分子氮的固定 ·····	E. E. Van Tamelen (75)
关于固氮无机模型的进展 ·····	A. D. Allen (84)
模拟酶的某些途径 ·····	A. E. Шилов (95)
固氮基因 ·····	S. L. Streicher, E. G. Gurney, R. C. Valentine (101)

扩大共生固氮以增加人类的食物供应

D. A. Phillips, J. G. Torrey, R. H. Burris

现今世界的粮食供应沉重地依赖于用化肥培育农作物。更多地直接利用空气中大量贮存的分子氮,将比化肥生产的成本来得低廉,并将减少化肥的分配和一部分的应用问题,以及预防地下水过多地负荷可溶性无机营养的潜在危险。虽然在我们知识的现阶段,把因根瘤菌所引起的豆科根瘤类型建立到单子叶植物上的可能性似乎是遥远的,但是在单子叶植物的根际中,它们的广泛根系同一定的自生细菌(好氧的和厌氧的),兰绿藻及一定的真菌之间,在某些情况下存在着亲密的原始合作关系,增加和利用这种关系已经表现出乐观。

在所有研究过的生物体系中,固氮酶(它催化分子氮转化成氨)有着十分类似的特征和性质。这个体系的活性需要以下成分:两种蛋白的复合体(一种为铁钼蛋白,另一种为铁蛋白,它们共同形成酶),一种来源于三磷酸腺苷(ATP)高能磷酸盐, Mg^{++} , 以及一种强的电子供体(例如铁氧还蛋白)。这些基本成分在被研究过的所有固氮酶体系中都被找到,并认为是有效固氮体系中的最起码的成分。有效的有机体或许通过细胞的分隔作用(compartmentalization)和精细的结构屏障(elaborate structural barriers),在多细胞的根瘤结构中,为固氮酶造成一个必需的无氧的细胞内环境。在所有已知的实例中,原核有机体被包括在固氮体系中。在豆科植物中,固氮酶是同根瘤菌的拟菌体联结在一起的,这种拟菌体发生于根瘤中央组织细胞内的包膜中。

1971年4月5—6日,科学家们集会于纽约城,讨论把共生固氮扩大到重要粮食作物,特别是牧草和禾谷类作物上的可能性。会议成为固氮专家们加强工作交流的场所。

讨论集中于把复合根瘤体系扩大到如玉米和小麦等植物上的可能性和希望。深入地探索了三个主要领域内的问题:(1)豆科和非豆科植物的感染过程和根瘤形成的本质;(2)根瘤中的酶和其他蛋白质(特别是豆血红蛋白)的发生;(3)将遗传学技术应用到宿主和细菌二种共生成分,努力扩大有效固氮体系的范围。

相信把现在的固氮界限扩大到某些其他体系的可能性的原因有:(1)增加了非豆科维管植物,例如桤木属(*Alnus*),木麻黄属(*Casuarina*),或杨梅属(*Myrica*)的固氮作用发生的证据,这些植物各属于一些没有联系的植物族系;(2)根瘤菌在豆科植物之间感染的混交性的证据正在增加;(3)把现代分子遗传学方法应用到细菌共生成分的可能性;(4)新近,借助组织培养技术,在离体条件下通过有效根瘤菌和宿主组织的结合,建立了一种有效的固氮酶活性;(5)由于新近发展和利用一种迅速而灵敏的测定固氮酶活性的技术,即用气相色谱测定固氮体系还原乙炔的作用,增加了对这个问题的接近。

注意集中的焦点是在根瘤菌——豆科植物复合体(其中包含着一种微妙均衡的关系)有效共生的分析。在这个体系中,如果有效根瘤的形成开始得较早,结束得较晚,或者以一种很快的速度产生,则可以提高固氮作用。对于初期感染过程的本身至今还很少了解。

虽然根毛感染的某些细节已经描述,甚至拍成了电影,然而,关于在根瘤菌和宿主植物之间交叉感染的专一性的化学基础,或者随着根瘤菌感染线侵入根皮层细胞的过程中根瘤菌和宿主的相互的生化作用,这些生化变化至今被遗漏或很少知道。关于根瘤菌刺激根皮的皮层细胞进行分裂形成根瘤原基的间接证据,暗示根瘤菌可能产生细胞分裂素,以及来源于宿主根组织的一种补充的激素刺激。

在组织培养中,跳过了根毛感染线的形成,根瘤菌的感染是直接侵入培养的多细胞组织团。电子显微镜的观察指出,根瘤菌侵染培养的大豆细胞后,它们处于细胞内的假囊泡中(pseudovesicles)。这种被侵染的组织显示出固氮酶还原乙炔的活性。

在有效根瘤内,类菌体是固氮酶活性的场所。非细胞提取物对于氧是敏感的,所以必须在无氧条件下制备和测定。这种非细胞提取物的固氮酶类似于从自生固氮生物(如固氮菌属,梭状芽孢杆菌属或蓝绿藻)中提取的固氮酶。特别有意义的是,固氮酶中包含钼的一种亚单位能够代替 *Neurospora crassa* 的硝酸盐还原酶中一种类似的亚单位。在有效根瘤中产生豆血红蛋白色素,但是它对离体的固氮酶活性是不需要的。关于豆血红蛋白的定位问题,是在拟菌体细胞内,还是在包围拟菌体的包膜上,或是在根瘤细胞的细胞质内,一直存在着争论。促进氧的扩散是豆血红蛋白的可能作用,氧对于根瘤内的固氮作用是必需的。用一种公共的根瘤菌品系感染不同宿主植物的实验指出,豆血红蛋白的蛋白质成分是由宿主植物的基因组决定制造的。关于固氮酶成分的遗传信息的定位尚未了解。

具有有效固氮根瘤的非豆科植物,包括 12 个属的木本双子叶植物的一些种,它们分散在若干族系之中,在未鉴定的类似放线菌的微生物和宿主植物根之间存在着共生。它们与豆科共生体系有着明显类似的地方:存在着特化的根结构,硝酸盐抑制根瘤的发育,曾记述有无效根瘤。桉木属是非豆科根瘤共生体系中研究得最多的,然而其感染的微生物迄今还不了解,在人工培养中不能生长,但用压碎的根瘤进行感染尚能转移。内生菌的感染作用明显地是发生在活的根毛上,在根皮的皮层组织中进行繁殖,并形成一层厚的包被。

在单子叶植物,包括一些牧草和菅茅的根上,虽然被报导过有类似根瘤的生长,并有一个特殊报导,指出某些牧草有固氮作用,但是据了解,关于禾谷类作物或单子叶植物的根瘤共生固氮作用没有精细的证明。说得确切一点,是牧草和禾谷类作物同自生微生物在根周围的土壤中,以及在根本身的粘液套上,建立着一种密切的关系,在这里,它们有效地固定空气中相当数量的分子氮,有关这种情况的证据正在增加。在各种不同情况下,这些有机体包括:嫌氧细菌,如梭状芽孢杆菌属;好氧细菌,如固氮菌属;多种蓝绿藻;以及兼性厌氧菌,如克氏杆菌属(*Klebsiella*)。这种亲密的相互依赖是重要的,它在单子叶植物整个氮的供应上似乎得到较好的建立,并且可以通过培育这种关系而予以很好的利用。会议着重强调在植物的引种过程中,维持根际和植物之间这种有益的联合有着重要的意义。

在讨论根瘤菌——豆科植物共生联合的进化起源时,所提的问题中注意到其他未确定的共生体的存在,以及遗传控制宿主和根瘤菌以增加固氮能力的可能性。在关于感染过程、根瘤形成和拟菌体形成这些基础知识得到较多的了解之前,成功的希望是小的。所以强调对这些领域进行更多的基础研究。再者,应该对单子叶植物进行广泛的探索,无论是通过根瘤结构或根际关系的途径,以便为单子叶植物的固氮能力提供证据。在这个领域中的发现,将为把固氮能力扩大到主要粮食作物开辟新的道路。

[译自 *Science*, 1971, 174(4005): 169—170]

根瘤菌和离体植物细胞间共生关系的建立

R. D. Holsten, R. C. Burns,
R. W. F. Hardy, R. R. Hebert

培养条件下大豆细胞和根瘤菌建立共生固氮关系

豆科植物共生固定大气氮,对于把分子氮加入生物界有着巨大的作用,同时是维持农业氮肥的重要过程。在此共生关系中,豆科植物和根瘤菌属特化细菌的相互作用尚未很好了解,这大概是由于缺乏一种适宜的精确的试验体系。一些作者曾用了离体植物根同其相适应的根瘤菌进行结合^[1-4]。最近,还采用了植物细胞和组织的培养物与根瘤菌结合^[5]。对于刺激植物细胞的分化和木质化虽然有明显的结果,但细胞内的细菌共生没有得到证据。

我们采用无菌的植物细胞培养的技术,结合灵敏的乙炔-乙烯测定固氮酶活性的方法,试图建立离体植物细胞与微生物的共生固氮关系。我们认为,这种体系能够进一步用于阐明控制体内结瘤过程及固氮活性的因素。

大豆根细胞的培养

大豆 (*Glycine max* var. Acme) 种子的表面消毒,是将其浸在市售的次氯酸盐溶液中 15 分钟,然后用灭菌水冲洗。将灭菌的种子放在琼脂 (1% 重量/体积) 固体培养基上。培养基的组成是: MS 培养基^[6] 的无机盐,加蔗糖 30 克/立升。全部培养基都在 121°C 下高压灭菌 15 分钟。在 $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 黑暗条件下发芽。

当初生根大约为 4 厘米长时,在无菌条件下,于生长锥后面 2.5 厘米处切取 5 毫米长的一段根。将这段根放在 50 毫升琼脂固体 MS 培养基[补充 15% 原汁椰子乳 (CM Grand Island Biological Co.) 和 2,4-D 2 毫克/立升]上。培养基装于 250 毫升三角瓶中,塞上棉塞,高压灭菌前,将培养基的 pH 调节到 6。这种被切取的根放于 $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 黑暗条件下培养。

在 10—14 天内,在离体根上产生一团活跃生长的未分化的细胞(愈伤组织)。然后,在无菌条件下,把这种愈伤组织取下来,并将其一部分再培养到补充 15% 椰子乳及 2 毫克/立升 2,4-D 的新鲜 MS 培养基上。在这些培养和以后的再培养中,我们采用了液体培养基,将 225 毫升培养基装在一个改制的 1000 毫升的三角瓶^[7]中,以及 50 毫升琼脂固体培养基装入 250 毫升三角瓶中。液体培养物放于每分钟转一周的旋转器^[8]上,培养在 $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 黑暗条件下。在液体环境中,活跃生长的细胞和愈伤组织群,以 18 小时增加一倍的速度进行繁殖,这种情况直到 14—21 天以上。每隔 20—30 天进行一次液体体系的再培养,以维持一个活跃分裂的细胞群。子叶组织也可按照这种类似的处理建立细胞培养物。

细菌的生长

采用的大豆根瘤菌 (*Rhizobium japonicum*) 品系为 61A76 及 ATCC 10324, 用液体培养基进行培养, 培养基的组成是在 1000 毫升水中加入: K_2HPO_4 1 克; KH_2PO_4 1 克; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.005 克; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.36 克; $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ 0.17 克; KNO_3 0.7 克; 酵母膏 1 克; 甘露醇 3 克, pH 6.4, 121°C 高压灭菌 15 分钟。125 毫升的三角瓶内装 40 毫升培养基, 将根瘤菌接种于其中, 培养在 $30 \pm 1^\circ C$ 下, 不断摇动。每隔 7 天进行一次细菌的再培养, 以维持生活力旺盛的原种。每隔一定时期, 用显微镜观察大豆根瘤菌培养物的纯度, 并将其接种于大豆 Acme 或 Kent 品种的种苗上, 检验形成根瘤的活性, 植株生长在培养室中, 16 小时光周期。

共生关系的建立

从迴转器(摇床)上取出一个大的培养瓶, 其中包含 225 毫升的 MS 培养基(补充 15% 椰子乳, 2 毫克/立升 2,4-D), 以及约 15 克鲜重的活跃生长的根细胞和愈伤组织群, 用 0.1 毫升 (260×10^6 个细菌/毫升) 活跃分裂的大豆根瘤菌悬浮液进行接种感染, 再放回迴转器培养。在培养 3—7 天以后, 瓶中的内含物通过无菌粗棉布流出, 保留在粗棉布上的植物细胞和愈伤组织块(定为阶段 1), 用 250 毫升的无菌 MS 培养基洗涤, 然后转移到不同成分的新鲜的生长培养基内, 培养在前述的条件下。采用乙炔-乙烯的测试技术^[9], 测定用根瘤菌接种过的细胞群的固氮酶活性, 并同时测定未经接过菌的对照组织。将组织在 60°C 下干燥 48 小时后, 测定其干重。

组织的细胞学观察

从经过根瘤菌接种和对照的培养瓶中任意采取大豆根细胞培养物的样品, 用甲醛: 醋酸: 酒精 (5:5:90 体积/体积) 或 Fleming 铬酸固定剂, 在室温下固定 24 小时, 然后, 组织块经一系列各级酒精脱水, 用石蜡(熔点 56—57°C) 包埋, 作成石蜡切片。切片厚度为 8—10 微米, 用番红-固绿或 Van Gieson 棉蓝 (Nile blue) 染色, 用 Zeiss 显微镜相差物镜观察。

同时, 类似的细胞样品用 5% 戊二醛(用 Millonig 磷酸盐缓冲液配制, pH 7.2—7.4) 覆盖, 在室温下固定一小时。固定样品用磷酸盐缓冲液洗涤 20 分钟, 再用 1% OsO_4 在室温下固定一小时, 用磷酸盐缓冲液洗 20 分钟, 经一系列各级酒精脱水直到 100% 氧化丙烯。然后, 样品用环氧树脂 “Epon 812” 包埋, 在 60°C 下聚合 24 小时。用钻石刀切片, 厚度为 500 Å。切片用醋酸双氧铀染色, 再用 Карновский 方法的铅染色。在 RCA EMU-3G 电子显微镜下观察。

侵入培养的根细胞

当已接种根瘤菌的植物细胞的液体培养物被转移到新鲜的生长培养基时(阶段 1, 3—

7 天), 进行石蜡切片观察, 显示出愈伤组织内存在类似在大豆植株根系结瘤中发现的感染线结构。可以看到这些离体体系中的“假感染线”穿过没有分化的细胞群, 在进入细胞质以前有一段明显的距离(图 1)。“类感染线”穿过细胞团的细胞间隙, 在“类感染线”结构中可看到根瘤菌。根瘤菌总是从“假感染线”的末端进入植物细胞, 在植物细胞内进行繁殖, 并以其菌体完全取代了植物细胞内含物(图 2)。在这个发育阶段, 在有根瘤菌繁殖的任何植物细胞团中, 没有发现其他形态学上分化的细胞——例如输导分子。



图 1 愈伤组织的石蜡切片, 显示大豆根瘤菌 (*Rhizobium japonicum*) 的进入是通过一种“类感染线”结构($\times 600$)。

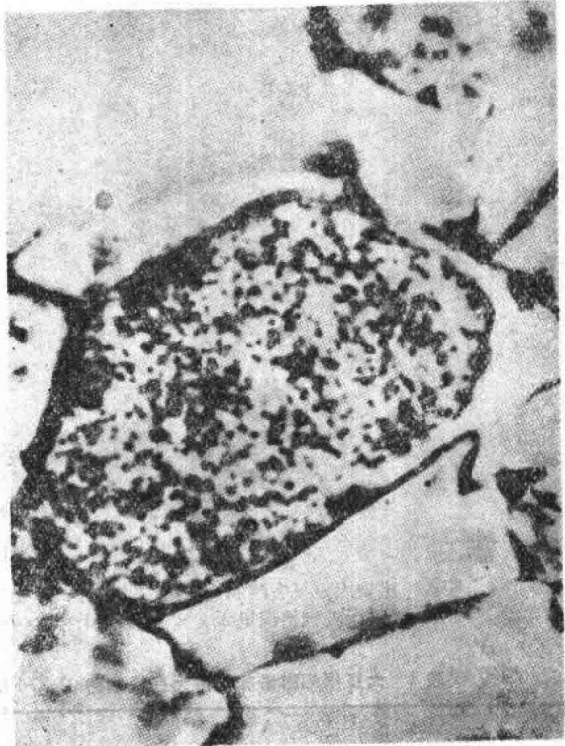


图 2 在开始侵入以后, 充满大豆根瘤菌的愈伤组织细胞。

共生体系的继续发育

随着根瘤菌开始侵入植物细胞(在细胞培养物接种根瘤菌以后 3—7 天), 细胞培养物即转移到新鲜的培养基(分液体的和琼脂固体的两种), 从而进到第二发育阶段。应用了以下几种培养基: (1)MS; (2)MS 加 10—15% 椰子乳; (3)MS 加 10—15% 椰子乳和 2 毫克/立升 2, 4-D。大豆根细胞的对照培养物(未接种根瘤菌)也转移到同样的培养基, 培养在同样条件下。在转移之后, 到观察细菌的侵入和测定固氮酶的活性之前, 所有的培养物都培养 7—20 天。光培养物从 Duro-Test Optima 灯得到约为 500 米烛光的光照。

图 3 指出, 在培养的大豆根细胞转移之后, 根瘤菌侵入的程度和 MS 培养基的补充因素的关系。在有根瘤菌感染的植物细胞转移到不含补充生长因素的 MS 培养基以后, 根瘤菌的侵入最广泛(图 3a)。补充了椰子乳, 以及补充了椰子乳和 2, 4-D 的, 被根瘤菌居住的细胞数就显著的减少(图 3b, c)。测定在这些培养条件下的固氮酶活性的结果(表 1, 2)指出, 固氮酶活性同根瘤菌的侵入程度成正相关(表 1)。没有根瘤菌存在的组织只有很

小的乙炔-乙烯的还原活性(表1)^[11,12]。表2指出,虽然 Acme 大豆根细胞的培养物对根瘤菌 61A76 品系的反应变化很大,但用乙炔-乙烯技术可以测出其液体体系所建立的确有固氮能力的共生关系。用 Kent 大豆品种的根细胞在液体培养中建立共生关系的试验很

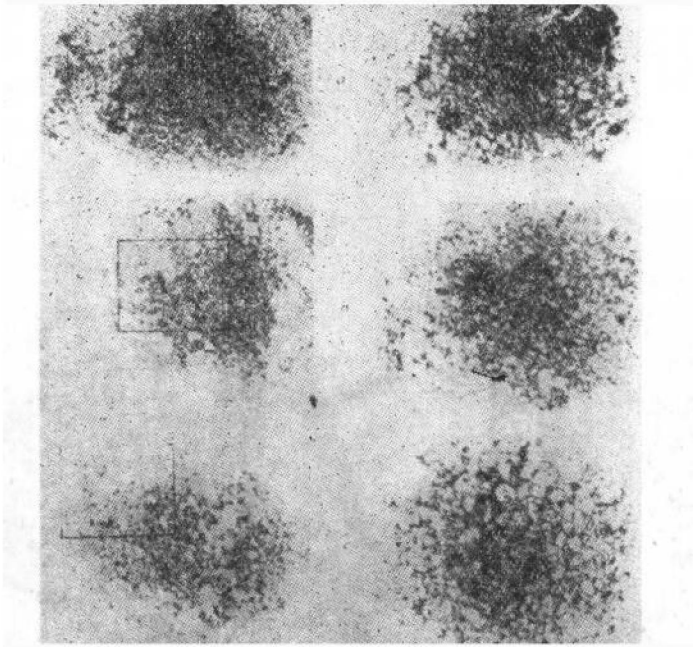


图3 感染大豆根瘤菌的愈伤组织的切片,示生长补充物对共生联合体系发育的影响(关于处理情况见本文)。左×350;右×700。

表1 大豆根细胞培养物用大豆根瘤菌 61A76 品系接种后乙炔-乙烯的还原作用*

	乙烯,毫微克分子数/1克鲜重×24小时	
	光照	黑暗
MS	72.8	318.6
MS + 10% 椰子乳	36.6	129.0
MS + 10% 椰子乳 + 2ppm 2,4-D	7.7	37.9
未接种过菌的对照		
MS + 10% 椰子乳 + 2ppm 2,4-D	0.4	2.1

* 乙炔还原活性的测定,是在培养物开始接种根瘤菌 21 天后,和转移到半固体琼脂培养基 14 天后进行。开始建立共生关系后,培养是在连续光照或连续黑暗下进行。

表2 两块分离的大豆根细胞培养物同大豆根瘤菌 61A76 品系建立共生关系后乙炔-乙烯的还原作用*

	乙烯,毫微克分子数/1克干重×24小时	
	培养物——1	培养物——2
愈伤组织 + 61A76 品系	638	88.0
未接种菌的对照	307	25.7

* 把根瘤菌加入液体培养物中 3—5 天后进行测定。

少成功。甚至在用 Acme 大豆品种时, 由于采用了另一个大豆根瘤菌品系 (ATCC10324), 结果, 所有的固氮酶活性都较低, 虽然在电子显微镜下观察到根瘤菌侵入了培养的细胞。子叶组织在此研究条件下没有建立共生关系的趋势。

共生培养物的电子显微镜观察

根瘤菌——植物细胞培养物用电子显微镜观察证实, 根瘤菌进入到培养的植物细胞, 并取代了正常的细胞质成分 (图 4)。在一些情况下, 根瘤菌被包围在一种小囊泡中, 这种小囊泡在形态学与完整大豆根系的根瘤细胞内所看到的是类似的 (图 5)。进一步观察到, 在培养

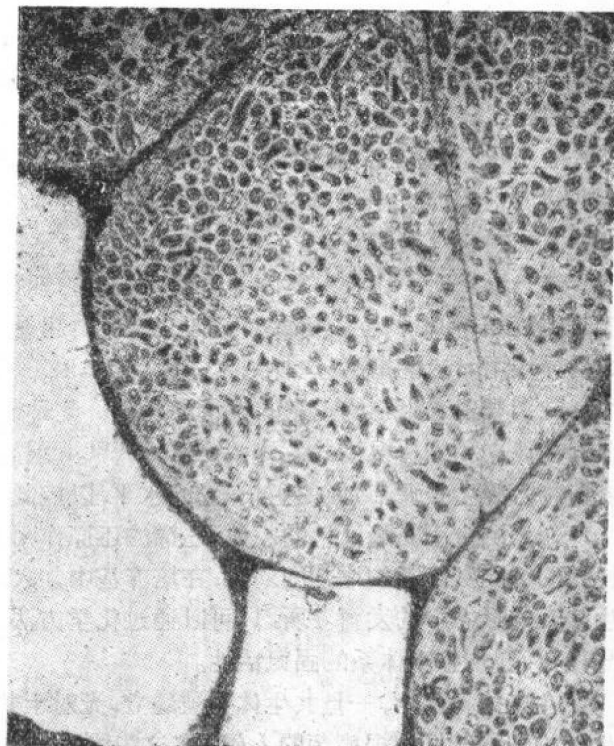


图 4 培养的大豆愈伤组织感染大豆根瘤菌后的电子显微镜照相 ($\times 4160$)。

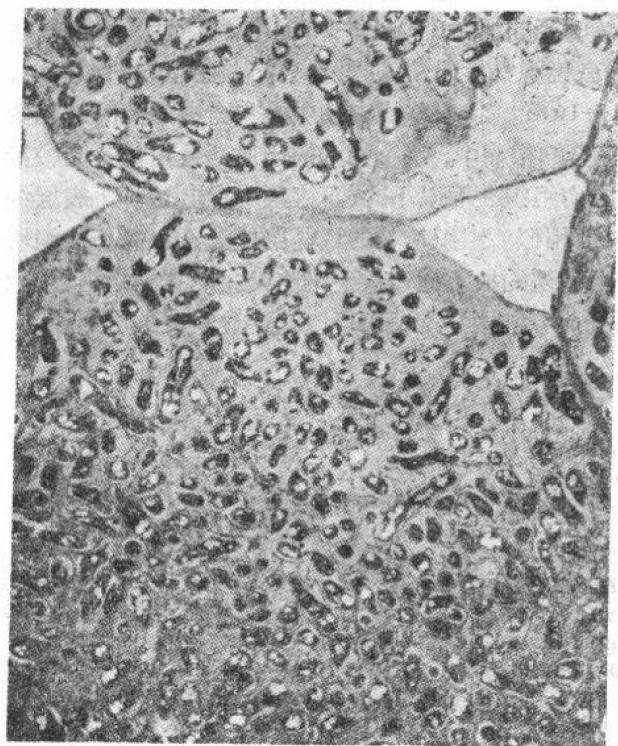


图 5 大豆根瘤 (感染大豆根瘤菌) 的电子显微镜照相, 示 β -羟基丁酸盐的积累。

于大豆根瘤类菌体中所表现的内含物。这种内含物已指出为 β -羟基丁酸盐聚合物。随着这种人造共生体系培养时间的增加 (直到转移后 15—20 天), 它变得更加显著。显微镜观察指出, 未经接种菌的组织没有微生物的污染。作为培养植物细胞的培养基, 经检验也没有微生物和固氮活性; 细菌的感染仅仅是根瘤菌, 它们在植物细胞外显示无固氮活性, 因此, 很清楚, 我们观察到的不是自生的固氮细菌。

共生关系的机能

我们所叙述的这种机能体系, 为阐明控制根瘤形成的机制以及共生体系的固氮机制, 提供了一种新的工具。

离体共生体的形态学与完整的

大豆根瘤是类似的^[13,14]。在人工培养细胞的细胞质中的根瘤菌,如同在根瘤内一样,它常常被包围在一种小囊泡之中。这些细胞内的菌体(类菌体?)具有一种内含物,此种内含物已经通过试验鉴定为聚合 β -羟基丁酸盐^[15]。一种类似于植株根瘤中的“感染线”结构,在液体培养环境中,在根瘤菌侵入培养植物细胞的早期阶段,也被观察到。根瘤菌进入培养细胞的方式,以及后来在细胞内的繁殖,并完全取代了细胞质,所有这些,也是同在根瘤体内所发生的过程类似的。

进一步发现,随着根瘤菌开始进入培养的细胞,在培养环境中外加的植物生长因素(细胞分裂素和植物生长激素)耗尽的时候,引起根瘤菌侵入的细胞数增加,并增大固氮酶的诱导作用。这就指出,这种共生体系,其本身一开始就有足够的生长刺激素,再予以外加,就会导致遏止它的正常的发育和机能。此种情况符合过去所提出的植物体内生长调节剂在建立和维持根瘤共生体系的作用^[16,17]。因此可以通过在根瘤菌侵入的临界期,改变植物内源生长调节剂(如生长素)的水平,以控制有效根瘤的形成过程。

作为测定固氮酶活性的乙炔-乙烯的还原作用指出,共生体系的固氮效能随着根瘤菌侵入的细胞数比率的增加而增加,在培养基中加入植物生长素,则减弱固氮酶的活性和共生体系的形态学的发育。所以,可以通过化学方法,调节被侵入的细胞比率和固氮酶的诱导作用,增加整个体系的固氮活性。

在离体条件下,一旦共生体系被建立,光对于共生体似乎没有刺激作用;但是,在光下生长的细胞能抵抗根瘤菌的入侵。在这些培养物中,可能建立没有固氮机能的共生体。有这种可能性,即在离体条件下,生长在光下的细胞,或许通过光敏色素系统^[18],发育一种能抵抗微生物入侵的自然防御机构。

在这种离体共生体系中的乙炔-乙烯的还原活性(照此推算的固氮酶活性),至今只达到大豆根瘤中活性的1%的数量级。显微镜观察指出,在这种培养的共生体的细胞团中,感染根瘤菌的细胞数仅为总细胞数的1—10%。在完整的根瘤中,包含根瘤菌的细胞数占90%以上,所以,在离体共生体系和完整的根瘤中,每个细胞的还原活性可能是比较接近的。如图3所指示的,感染仅发生在愈伤组织表面以下的(下表层)细胞,这种下表层细胞在生理条件上可以认为与完整根的皮层相似。组织培养的最初感染是通过愈伤组织块的周围细胞的变化而发生的,而不是象在完整的根上通过根毛细胞发生。这就指出,植物体内共生关系的发生,除了在适宜条件下通过根毛以外,也可以是通过表皮细胞的侵入。

参 考 文 献

- [1] Lewis, K. N., and McCoy, E., 1933, *Bot. Gaz.*, **95**, 316.
- [2] McGonagle, M. P., 1944, *Nature*, **153**, 528.
- [3] Raggio, N., Raggio, M., and Burris, R. H., 1959, *Biochim. Biophys. Acta*, **32**, 274.
- [4] Raggio, M., Raggio, N., and Torrey, J. G., 1957, *Amer. J. Bot.*, **44**, 325.
- [5] Vohky, I., and LaRue, T. A., 1967, *Naturwissenschaften*, **54**, 96.
- [6] Murashige, T., and Skoog, F., 1962, *Physiol. Plant*, **15**, 473.
- [7] Steward, F. C., and Shantz, E. M., 1956, *Chemistry and Mode of Action of Growth Substances* (edit. by Wain, R. L., and Wightman, F.), 312 (Academic Press, New York).
- [8] Caplin, S. M., and Steward, F. C., 1949, *Nature*, **163**, 920.
- [9] Hardy, R. W. F., Holsten, R. D., Jackson, E. K., and Burns, R. C., 1968, *Plant Physiol.*, **43**, 1185.
- [10] Millonig, G., 1961, *J. Appl. Phys.*, **32**, 1637.
- [11] Gamborg, O. L., and LaRue, T. A. G., 1968, *Nature*, **200**, 604.

- [12] Stewart, E. P., and Freebairn, H. T., 1967, *Plant Physiol.* **42**, Suppl., S-30.
- [13] Goodchild, D. J., and Bergersen, F. J., 1966, *J. Bact.*, **92**, 204.
- [14] Holsten, R. D., Hebert, R. R., Jackson, E. K., Burns, R. C., and Hardy, R. W. F., 1969, *Bact. Proc.*, 149.
- [15] Klucas, K. V., and Evans, H. J., 1968, *Plant Physiol.*, **43**, 1458.
- [16] Kefford, N. P., Brockwell, J., and Zwar J. A., 1960, *Austral. J. Biol. Sci.*, **13**, 456.
- [17] Thimann, K., 1936, *Proc. US Nat. Acad. Sci.*, **22**, 511.
- [18] Lie, T. A., 1969, *Plant and Soil*, **30**, 391.

[译自 *Nature*, 1971, **232** (5307): 173—176]

根瘤菌共生特性的遗传控制:质基因控制的证据

L. K. Dunican, F. C. Cannon

摘 要

在根瘤菌属的培养物中,有效性和感染性的遗传控制表现出与其他细菌在质基因(plasmid)控制的特点上有某些相同之处。曾报导用吖啶橙和 EB 染料(ethidium bromide)¹⁾处理后,有效性随之消失,同时利用紫霉素抗性作为失效的一种检定方法已被肯定。本文对于有效性的质基因的控制与在一定土壤中由于某些土壤成分的作用,影响根瘤菌属种的存在而使丧失其有效性之间的联系进行了讨论,还讨论了根瘤菌和土壤杆菌的致毒性的质基因控制在分类学上的联系。

感染性(Inf^+)和有效性(Eff^+)是根瘤菌属的两个遗传特性,这种遗传特性容许有机体与一种豆科植物宿主进入一个共生的联合体系而形成根瘤,固定空气中的氮。具有感染性(Inf^+)和无效性(Eff^-)的品系可形成根瘤,但不能固氮;带 Inf^- 和 Eff^- (或 Inf^- 和 Eff^+)的品系不能结瘤。宿主的特异性与感染性在遗传上难以区分^[2]。

感染性和有效性的不稳定性在很多研究方面已有记载,并且由于某种培养和土壤环境,导致缺乏这种特异性的变异体的增加。这种不稳定性遗传基础还不清楚。然而 Balassa^[2] 和其他人的工作证明,根瘤菌可以进行遗传交换,因而引起很多研究者证明了在本属内可以转化、转导和结合。这些遗传上的研究对我们了解 Inf^+ 或 Eff^+ 的遗传基础,或者对说明根瘤菌有时会丧失这些特性,并没有什么重要的贡献。Higashi^[3] 曾指出这些特性可能是被质基因 DNA 所控制,本文评价了在根瘤菌中控制和传递 Inf^+ 和 Eff^+ 的质基因理论,并讨论了根瘤菌在土壤中遗传稳定性的重要性。

质基因是遗传的要素,它们可能存在于细菌内染色体外的位置。当细胞生长在低于致死剂量浓度的吖啶橙、EB 染料和重金属或是细胞处于升高的温度下,质基因所载有的遗传特性可自发丧失(低频率)或被消除^[6]。质基因可以经细菌的结合或转导传递到一个合适的受体中去^[6]。

在根瘤菌中固氮控制因素的消除

已知在根瘤菌的种中吖啶染料消除 Eff^+ 和 Inf^+ 的比率有时可与其他有机体的质基因消除相比较。Higashi 用结合试验来表明三叶草根瘤菌的一个品系用吖啶橙处理后丧失了 Inf^+ 性。被吖啶橙处理过的品系不能形成根瘤,或不能由结合而传递结瘤能力

1) 系 2-7-diamino, q-phenylphenanthridinium 10-ethyl bromide.

给菜豆根瘤菌的一个品系。发现 Higashi 的品系自发消除 Inf^+ 的比率为 1.2×10^{-1} , 经吡啶橙处理后增至 7.2×10^{-1} 。这些消除比率是很高的, 可能由于在试验中所用植株的数目少, 因而过高地估计了实际的消除比率。

在一个有效的三叶草根瘤菌品系 T_1 上使用已知的消除剂来检验三叶草根瘤菌内 Eff^+ 的质基因控制的可能性, 当这个品系生长到对数时期就接种到 (含 10 微克/毫升的) 吡啶橙 (Merck 厂产) 或 (含 25 微克/毫升) EB 染料 (Calbiochem 厂产) 的甘露醇-酵母抽提液的培养液中。一管不加任何补充物的同样的培养液用作测量其自发的消除比率。所有试管都用吹气泡法来通气, 并在 25°C 下保温 24 小时。在有或无 15 微克/毫升紫霉素的甘露醇-酵母抽提液的琼脂上, 在 25°C 下保温四天后, 计算每管内含物的细胞数。紫霉素对亲本培养的最低抑制浓度为 5 微克/毫升, 抗紫霉素 (Vio^r) 的细胞为 20—25 微克/毫升。所得结果见表 1, 表中亦提供了经丝裂霉素 C 0.01 微克/毫升 (丝裂霉素 C 是一种原噬菌体的诱导药剂), 或用突变剂 N-甲基-N-硝基-N-亚硝基胍 (NTG) 4 微克/毫升处理后所出现的抗紫霉素变异体的比率。已知丝裂霉素或 N-甲基-N-硝基-N-亚硝基胍都不能活化已消除的质基因。

Schwinghamer^[20] 和 Hendry 及 Jordan^[9] 曾指出在根瘤菌的一个有效品系中获得抗紫霉素 (Vio^r) 与丧失有效性 (Eff^+) 是相关连的。我们用 Fahraeus 技术检验, 发现所有的 40 个 Vio^r 变异体在宿主白花三叶草上产生无效根瘤, 而亲本菌系在所有的试验植株上都结有效根瘤。作者因此认为在这种根瘤品系中, Vio^r 是一个估计 Eff^+ 的丧失的有效方法, 因为无论抗性变异体是由自发而来, 或是使用质基因消除药剂分离得来的, Vio^r 是经常地和丧失 Eff^+ 相关连的。

表 1 “质基因消除”药剂对三叶草根瘤菌品系 T_1 的效应*

质基因消除药剂	抗紫霉素变异体的出现频率	使用药剂后的增值率
无	2.7×10^{-7}	—
吡啶橙	3.5×10^{-6}	13 倍
EB 染料	4.1×10^{-6}	19 倍
丝裂霉素 C	2.6×10^{-7}	0
N-甲基-N-硝基-N-亚硝基胍	3.0×10^{-8}	减少

* 质基因消除未知。

从表 1 的结果表明, 吡啶橙和 EB 染料这两种“质基因消除”药剂都能增加 Vio^r 变异体的出现, 这也就是 Eff^+ 消除的假设比率。与已知的其他细菌的“质基因体系”消除比率相比较, 其消除比率是很低的, 但在三个试验中都能重复出来。表 1 也表明不包含突变形式, 因为 NTG 并没有增加这些变异体的出现比率。丝裂霉素 C 降低了自发变异体的出现比率。这些结果支持了在三叶草根瘤菌中质基因控制 Eff^+ 的论说。

在自然条件下有效性的丧失

根瘤菌的培养物, 在自然条件下, 特别是在不同的环境下, 可以丧失其有效性。据报道, 某些高地土壤和泥炭土促进了 Eff^- 菌株的增加^[1,21,22]。这些情况可以用带有 Eff^+ 质基因的丧失原理解释, 即由于在酸性条件下某些金属 (例如锰) 的浓度增高而发生的质

基因消除效应。

自 Blum 和 Rice^[4] 指出了鞣酸和没食子酸减低了某些根瘤菌株的有效性以来,其他土壤成分可能也有这种作用。他们认为在水浸地和泥炭土中有这些化合物存在导致有效性的消失。本试验室正在用试验来决定一些化合物和某些腐殖酸的其他成分作为对带有效性定子的质基因的消除剂的作用范围。在初步试验中发现,虽然只有联苯三酚和间苯三酚的消除能力可与 EB 染料和吡啶橙相比,但有几个化合物包括没食子酸和鞣酸能使 Vio^r 变异株的出现增加^[5]。

根瘤菌中的遗传交换

自 Balassa 的早期工作以来,曾有报导证实并扩大了关于在根瘤菌中遗传转移的事实。这些报导列在表 2。遗传交换的三个主要类型: 结合、转导和转化的证据是令人信服的。然而关于 *Eff*⁺ 或 *Inf*⁺ 特性的传递的报导却很少,因为它们的选择是困难的。

这些遗传转移方式的存在提供了遗传的基础,由此质基因可以从一个菌株传递到另一菌株。结合是特别重要的,因为在其他的细菌系统中用这种方式的质基因转移是非常有效的,同时也是在自然条件下最方便的方法。

表 2 根瘤菌中的遗传转移

供 体	受 体	转 移 特 性	参 考 文 献
转化:			
大豆根瘤菌	大豆根瘤菌	抗链霉素	Balassa ^[2]
三叶草根瘤菌	三叶草根瘤菌		
苜蓿根瘤菌	苜蓿根瘤菌		
苜蓿根瘤菌	三叶草根瘤菌	<i>Eff</i> ⁺	Langeeta ^[15]
三叶草根瘤菌	三叶草根瘤菌	<i>Eff</i> ⁻	Kleczkowska ^[12]
大豆根瘤菌	大豆根瘤菌	抗链霉素	Mareckova ^[17]
藜豆类根瘤菌	藜豆类根瘤菌	腺嘌呤 ⁺	Raina et al. ^[18]
豌豆根瘤菌	根瘤病土壤杆菌	抗磺胺	Kern ^[11]
根瘤病土壤杆菌	豌豆根瘤菌	抗链霉素	Kern ^[11]
转导:			
苜蓿根瘤菌	苜蓿根瘤菌	抗链霉素	Kowalski ^[14]
结合:			
三叶草根瘤菌	菜豆根瘤菌	宿主特征	Higashi ^[9]
	豌豆根瘤菌(抗链霉素)	抗链霉素,	
	×	抗青霉素	Bose et al. ^[3]
	豌豆根瘤菌(抗青霉素)	(重组合体)	

在自然界中质基因的交换

事实支持了在根瘤菌中有效种的 *Eff*⁺ 和 *Inf*⁺ 是被载在不同的质基因上的理论。如果土壤条件导致质基因的消失,则根瘤菌的种群的有效性减少,被引证的例子是: 在酸性土和泥炭土中可能由于有消除质基因的足够浓度的某种金属和酚化化合物的存在,因而促使无效菌种群的发展。也可以想象在某种情况下,将有效的根瘤菌接种到土壤里去,可能

会由于质基因的转变而将其有效性传递给土生的无效菌株,从而改进了土壤中根瘤菌的固氮能力。研究用不同比例组成的 Eff^+ 及 Eff^- 菌株混合接种剂所得的结瘤效应表明,形成有效根瘤的数量有时大大地超过由两种菌株混合比例所预期的数目^[19]。然而 Singer 等人^[21]发现在泥炭土壤中结瘤成功的比率是与混合体中带 Eff^+ 有机体的比率是相同的,并且得出结论认为:豆科植物是优先接纳有效有机体的,甚至当全部根瘤菌接种剂中只有一小部分有效有机体时也是如此。另一种解释认为:可能是由于在接种剂中或在土壤里 Eff^+ 和 Eff^- 菌株之间的遗传交换,导致在环境中有效有机体的相对数量和产生有效根瘤数量的增加。在酸性泥炭土壤中 Eff^+ 质基因的转移被认为是受到阻碍, Eff^+ 菌株的比率因此不可能增加。

在土壤里根瘤菌中 Inf^+ 质基因的丧失是难以作实验性测定的,因为这样的一个不结瘤菌株假如被分离出来,也可能被当作其他属的菌株,例如土壤杆菌。没有证据认为,土壤杆菌和根瘤菌的区别只在于有或没有在植物上形成瘤或在豆科植物上形成根瘤的特殊的质基因,虽然这个概念将是有吸引力的。这两属是十分相关的,以至能容许在它们之间进行抗抗生素特性的相互转变^[10],并且它们分享了一个相当大的 DNA 同系体^[7]。土壤杆菌一个种(产生虫瘿)的毒性可以传递给非病原性的放射土壤杆菌(*A. radiobacter*),而使之变成与根瘤土壤杆菌不可区分^[11]。放射土壤杆菌可能是在根瘤菌固氮菌株与土壤杆菌形成肿瘤菌株之间占一中心位置。

参 考 文 献

- [1] Allen, E. K. and Allen, O. N., 1950, *Bacteriol. Rev.*, **14**:273—330.
- [2] Balassa, G., 1963, *Bacteriol. Rev.*, **27**:228—241.
- [3] Bose, P. and Venkataraman, G. S., 1969, *Sep. Experimenta*, **25**:772—.....
- [4] Blum, U. and Rice, E. L., 1969, *Bull. Torrey Bot. Club.*, **96**:531—544.
- [5] Cannon, F. C. and Dunican, L. K. (Unpublished).
- [6] Hayes, W., 1968, *The Genetics of Bacteria and their Viruses*. Blackwell.
- [7] Heberlein, G. T. et al., 1967, *J. Bacteriol.*, **94**:116—124.
- [8] Hendry, G. S. and Jordan, D. C., 1969, *Can. J. Microbiol.*, **15**:671—675.
- [9] Higashi, S. J., 1967, *Gen. Applied Microbiol.*, **13**:391—403.
- [10] Kern, H., 1969, *Arch. Mikrobiol.*, **66**:63—68.
- [11] Kerr, A., 1969, *Nature (London)*, **223**:1175—1176.
- [12] Kleczkowska, J. J., 1965, *J. General Microbiol.*, **40**:377—383.
- [13] Klein, D. T. and Klein, R. M., 1953, *J. Bacteriol.*, **66**:220—228.
- [14] Kowalski, M., 1967, *Acta Microbiol. (Polon)*, **16**:7—12.
- [15] Lange, R. T. and Alexander, M., 1961, *Can. J. Microbiol.*, **7**:959—961.
- [16] Lowe, J. F. and Holding, A. J., 1969, *J. Appl. Bacteriol.*, **32**:iii.
- [17] Mareckova, H., 1969, *Arch. Mikrobiol.*, **68**:113—115.
- [18] Raina, J. L. and Modi, V. V., 1969, *J. General Microbiol.*, **57**:125—130.
- [19] Robinson, A. C., 1969, *J. Agric. Res.*, **20**:827—841.
- [20] Schwinghamer, E. A., 1964, *Can. J. Microbiol.*, **10**:221—233.
- [21] Singer, M. et al., 1964, 8th Intern. Congr. Soil. Sci., 1021—1025.
- [22] Thornton, H. G., 1947, Report Rothamsted Expt. Stat., 1939—1945.
- [23] Watanabe, T., 1963, *Bacteriol. Rev.*, **27**:87—115.

[译自 Plant and Soil, Special Volume 1971, 73—79]