

ADVANCES IN NITROGEN FIXATION
FOR
NON-LEGUMINOUS CROPS

非豆科作物固氮研究进展

IN-CHIEF-CHEN-TING-WEI

陈廷伟主编

1989



ADVANCES IN NITROGEN FIXATION
FOR NON-LEGUMINOUS CROPS



CHINA AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY PRESS

中国农业科技出版社

非豆科作物固氮研究进展

陈廷伟 主编

中国农业科学院土壤肥料研究所

中国农业科技出版社

内 容 提 要

本书介绍生物固氮研究的新领域——向非豆科农作物转移固氮能力研究的发展过程、最新进展和前景展望。书中第一部分为综述，从中可了解国内外对此研究的概况、动态和研究方向。第二部分为研究报告，包括国外学者论文报告的译文和国内学者对人工诱发小麦根瘤的研究报告；从中可了解到近十几年来此项研究的发展过程和近年取得的突破性进展。第三部分是简讯，报道近几年来国内几次有关该项课题研讨情况和学者对此评价和看法以及本项研究的计划和技术路线设计，可供研究参考。

非豆科作物固氮研究进展

陈廷伟 主编
责任编辑 赵学贤
封面设计 马 钢

中国农业科技出版社出版(北京海淀区白石桥路30号)
新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售
北京巨山印刷厂印刷

开本: 787×1092毫米 1/16 印张: 11.25 插页: 2 字数: 258 千字

1989年10月第一版 1989年10月第一次印刷

印数: 1—2000册 定价: 4.20

ISBN 7-80026-147-6/S · 113

写在书前的话(代序)

能不能使根瘤菌或弗兰克氏菌超越自然的宿主范围和更多种植物形成共生固氮体系？能不能使自生固氮细菌和植物形成共生固氮体系？能不能使植物自身固氮？这仅仅是空想或科学幻想，还是现在已经具备或尚未具备着手研究的科学技术基础？不同的人有不同的见解，但任何科学见解都需要以已有的知识做为形成见解的基点。这本书收集了一些已有的有关知识的见解，读过之后想必会产生各种不同的反响，一本能引起反响的书就是有价值的书。反响会引起争议，争议往往是新的思想和科学实践的先驱。

中国科学院 学部委员

华中农业大学 教授

陈华癸

1989年2月

序 言

非豆科作物固氮已是今日生物固氮研究的新方向，要为作物的氮素营养开辟新途径，为农业生产开创新局面。

自然界已提供了一些实例，在豆科植物与根瘤菌的共生固氮体系外，还有一些其他共生固氮体系，改善了共生者的氮素营养。固氮蓝藻与红萍共生固氮，也与一些裸子和被子植物共生，已是人所共知的事实。在过去二十年中已发现有根瘤菌在榆科的*Parasponia*根上结瘤固氮；固氮螺菌在一些禾本科植物根面和根的皮层组织中生长，进行“联合”固氮；田菁根瘤菌（*Azorhizobium sesbania*）在毛茛田菁的茎上形成茎瘤，于有氧环境中固氮；也已有报道在人工诱发的小麦根瘤中引进了根瘤菌和固氮菌；分子遗传学研究已将固氮基因转入大肠杆菌表现了固氮活性。这些研究，已为固氮细菌与高等植物开建新的共生固氮体系，以及将固氮基因转入绿色植物细胞提供了重要的信息。近代生物技术的迅速发展将有可能在非豆科作物上建立固氮体系，不受大气氧压的阻抑而产生固氮效应。

陈廷伟教授主编这本《非豆科作物固氮研究进展》汇集近年来国内外对此项研究的各重要论述，概列了研究动态和研究途径，并在理论上和技术设计方面作了探讨，为开展非豆科作物固氮研究提供有益的参考。

南京农业大学 教授

樊庆笙

1989年4月

前 言

70年代以来,由于氮素化肥能源耗费和环境污染问题日趋严重,人们逐渐认识到农业生产完全依赖化肥终非良策,于是生物固氮研究日益受到世界各国重视。近代遗传工程的兴起,加速了生物固氮研究的发展;尤其是在实现了细菌之间固氮基因转移之后,人们对于应用遗传工程发展一种能固氮的粮食作物的前景给予很大希望,认为这可能是解决当今世界人口剧增、能源缺少和摆脱农业对化肥依赖等问题的一个新出路。因此,非豆科作物固氮问题的研究已成为生物固氮研究中的新领域。这是长期以来人类的愿望,也是现代农业科学中富有挑战性的前沿研究课题,目前已受到国内外广泛关注。许多国家报刊认为,如能实现粮食作物固氮自肥以减少化肥用量,将会使世界农业出现新的绿色革命。

然而,由于固氮基因的组成和调控十分复杂,试图通过基因工程将其转移到高等植物细胞的研究面临技术上重重障碍,迄今尚未找到向植物细胞转移固氮基因的有效载体。

正当国际上向植物转移固氮基因突破无门之时,我国学者开拓了一条向非豆科作物移植固氮细菌的新路。山东大学微生物研究所和中国农业科学院土壤肥料研究所协作,用2,4-D和豆科威等植物生长素引导根瘤菌进入小麦等作物根系形成人工诱发根瘤。经光学镜检及电子显微镜扫描和切片研究证明,在诱发根瘤内形成和豆科根瘤相似的含菌区,内有大量根瘤菌增殖;超薄切片研究证明,诱发根瘤内的根瘤菌在形态结构上已随共生的发展而变化;菌体膨大变形,细胞壁逐渐消失,菌体为寄生的包裹膜所包被而内含有聚 β -羟基丁酸颗粒,具有类菌体的典型特征。自小麦根瘤中重新分离的细菌,经培养特征观察、血清学检验和回接到原寄主豆科植物,已证实诱发根瘤中的菌体确系原接种根瘤菌,完全符合柯克(Koch)定律检定标准。目前,诱发根瘤中新共生体系的固氮酶活性尚较低而不稳定,还有待于进一步研究提高。但根瘤菌和烟草愈伤组织联合培养时,根瘤菌进入烟草细胞内共生并表达固氮酶活性已为国内外研究肯定。此外,中国农科院土肥所研究用酶解法处理小麦根系使细胞壁降解,也可引导根瘤菌在小麦根系结瘤共生;用以处理豆科根系可以打破寄主对根瘤菌的识别屏障,从而扩大了豆科接种范围。

上述研究进展已为1988年5月17~20日在济南召开的“全国首届非豆科作物固氮研讨会”论证和肯定。此次会议纪要认为,“非豆科固氮研究工作在我国确实取得了很大进展,而且有自己的特色。”“此项工作确实为根瘤菌向非豆科作物转移开拓了一条新路,是我国科研人员在艰苦条件下取得的创造性成绩。”此次会议还认为,目前我国此项研究虽已处于领先地位,但还存在许多问题,理应采取相应的措施加强此项研究,使其早日用于农业生产。

当前,新技术革命已成为世界浪潮。展望二十一世纪将是以生物技术为主导的世纪,它必然推动农业的新技术革命。为了加强非豆科作物固氮生物技术研究,我们在收集“全国首届非豆科作物固氮研讨会”论文报告的基础上,广泛收集了近十几年来国内外有关非

豆科农作物共生固氮研究方面的主要文献资料，编成本专集，以供关注此项研究进展和发展前景的科研工作者参考。其中论文报告部分，是按发表时间先后顺序排列，以便使读者了解此类研究的发展趋势。

本书编入的论文内容只限于以非豆科农作物为目标的固氮研究工作，不包括和弗蓝克氏放线菌共生固氮的非豆科树木，也不包括联合固氮方面的研究工作。

因限于印刷出版条件和经费，收编入本集的论文报告和译文中的大部分照片和文献目录已删略。对于收入本集的论文作者和译者谨致歉意和谢忱。由于目前国内外尚未见有专门论述非豆科作物固氮的专集，本书首次组织编订缺乏经验；加上我们的水平所限，书中缺点、错误和不足之处在所难免，请读者惠予指正。

陈廷伟 1989年2月

于中国农业科学院

目 录

一、综述

1. 非豆科作物固氮研究现状及前景.....陈廷伟 (3)
2. 关于遗传工程固氮体系.....李阜棣 (11)
3. 固氮生物工程研究概况.....荆玉祥 (18)
4. 固氮遗传工程浅谈.....陈廷伟 (23)
5. 细菌和氮素经济.....A、Ayanaba (27)
6. 根瘤菌对农业的益处.....J、I、Sprent (35)
7. 为什么植物不能固氮.....M、Merrick和R、Dixon (41)
8. 重组DNA技术在固氮研究中的应用.....F、M、Ausubel (46)
9. 欧洲应用基因工程改良农作物和微生物方面的起步.....D、Von、Wettstein (62)
10. 非豆科固氮体系综述.....R、H、Burris (66)
11. 非豆科植物固氮.....译自《Начка И Жузнб (71)
12. 固氮稻的研究.....毛延年编译自日本《自然》 (74)

二、研究报告——国外部分

1. 根瘤菌与植物细胞体外共生的建立.....R、D、Holsten等 (79)
2. 根瘤菌与非豆科植物Trema aspara的共生关系.....M、J、Trinick (83)
3. 根瘤菌与非豆科植物培养细胞的联合固氮作用.....J、J、Child (85)
4. 根瘤菌与烟草和豇豆细胞共生的固氮作用.....W、R、Scowcro等 (87)
5. 烟草和玉米原生质体对固氮蓝藻Gloeocapsa的摄取
.....A、C、Burgoon, P、J、Bottino (90)
6. 植物原生质体对包含在油滴中的蓝细菌的摄取
.....P、M、Bradley, A、Leith (93)
7. 烟草原生质体对形成异形胞蓝细菌的营养缺陷型细胞的摄取及其联合结果
.....J、C、Meeks等 (94)
8. 蓝细胞器及一种蓝细菌导入高等植物细胞的显微操作
.....P、M、Bradley (100)
9. 引导固氮蓝细菌到烟草再生苗中.....M、V、Gusev等 (104)
10. 用聚乙二醇引导蓝细菌细胞及球质体进入离体烟草原生质体的初步研究
.....M、N、Agafodorova等 (109)
11. 根毛尖裸露对根瘤菌——植物相互关系的影响：以草木樨根瘤菌及酶处理玉
米、水稻、小麦及苜蓿根毛后结瘤.....C、C、R、Bayley等 (110)

12. 新根瘤菌转变株——用于处理非豆科种子以引导固氮…… S、E、Nielsen (110)
13. 用酶法处理三叶草根毛排除根瘤菌-寄主间专一性屏障
..... M、K、Ai-Mallah等 (111)
14. 不结瘤植物中的功能血红蛋白基因.....D、Bogusz等 (117)

三、研究报告——国内部分

1. 关于诱导无根瘤植物结根瘤的研究——化学因子 2, 4-D 诱导根瘤菌在小麦
上结根瘤..... 聂延富 (123)
2. 植物生长激素的细胞凝集效应..... 聂延富、董今才、唐盘昌 (129)
3. 2, 4-D 诱导微生物进入植物根细胞的电镜观察
..... 聂延富、唐盘昌、白淑珍 (132)
4. 引导固氮蓝细菌进入植物和真菌原生质体的研究
..... 陈廷伟、谢应先、陈婉华、周宏斌 (134)
5. 根瘤菌和烟草组织培养的联合固氮作用
..... 谢应先、陈廷伟、陈婉华、徐晶 (138)
6. 非豆科作物共生固氮的研究 (I)——根瘤菌导入非豆科作物结瘤共生
..... 陈廷伟、谢应先、陈婉华、于代冠、徐晶 (139)
7. 酶法诱导根瘤菌进入小麦根结瘤共生..... 谢应先、陈廷伟、陈婉华 (146)
8. 2, 4-D 诱发小麦根瘤及引导根瘤菌进入小麦根瘤细胞的研究
..... 于代冠、陈廷伟、谢应先、陈婉华、徐晶 (150)
9. 引导固氮蓝细菌进入植物和真菌原生质体成功..... 《农业科技要闻》 (160)
10. 引导根瘤菌进入小麦根部结瘤成功..... 《农业科技要闻》 (160)

四、简讯

1. 非豆科作物固氮学术交流会首次在京召开..... (165)
2. 全国豆科-根瘤菌共生固氮学术讨论会纪要..... (166)
3. 全国首届非豆科作物固氮研讨会纪要..... (167)
4. “非豆科作物固氮新体系研究”计划及技术路线..... 陈廷伟执笔 (168)

一、综 述

非豆科作物固氮研究现状及前景

陈廷伟

(中国农业科学院土壤肥料研究所 研究员)

前 言

氮素是组成蛋白质的主要元素，因而是植物生长所必需的大量营养元素。空气中虽含有近80%的氮气，但并不能直接为高等植物吸收利用。自然界中只有极少数原核类低等微生物能自生或与少数植物共生固定大气氮素，通称为生物固氮作用；广大农田作物由于缺乏共生固氮作用，必须依赖氮肥供应才能生长。加之，大多数土壤缺乏氮素，因而氮肥往往成为农业增产的限制因素。为此，当前世界迫切需要开辟氮素肥源，以增产粮食满足人口日益增长的需要。

70年代以来，人工合成氮素化肥的能源耗费巨大，不合理地过量施用后带来的环境污染问题也日趋明显，人们开始逐渐认识到单纯依赖化肥并非良策，于是生物固氮的研究日益受到各国重视。目前，生物固氮研究已列为“国际生物学计划”(IBP)的重点内容，美、苏、日本等国都列为重点研究课题，国际上每两年召开一次生物固氮学术讨论会，近十几年内已开过七次，由此可见世界上对此课题的关注。

目前，一般都认为研究生物固氮的近期目标主要是发展自然界现有的豆科植物和根瘤菌的共生固氮体系，以提高固氮效能。然而，研究共生固氮的最终目的是将这种奇妙的固氮能力转移到其他非豆科农作物上，因为长期以来，人们总是期望广大农田中的粮食作物也能和豆科作物一样有固氮自肥的能力，以减少对化肥的依赖。70年代中期，由于遗传工程的兴起，开始实现了细菌之间的固氮基因的转移，为人们达到这种梦寐以求的目标展示了美好的前景。因而，遗传工程用于生物固氮特别是用于向非豆科作物转移固氮能力，已成为生物固氮研究中的一个新兴领域，前景引人注目。美国《2000年农业展望》一书中指出：向非豆科植物引入固氮能力可显著地减少化肥用量。据生物固氮专家Ausubel估计，到2000年，美国对化肥的需求量将增加3倍，单是新建化肥厂就要耗资3000亿美元；若能采用遗传工程培育自行固氮的作物，将会大大降低农业成本。

最近，美国《纽约时报》报道：“能为美国农业带来蓬勃生机的三大类农业生物工程产品中，第二类是将固氮细菌基因移植到非固氮物体内，培育出能自造氮肥的作物，在少施肥或不施肥情况下也能获得高产。此类正在研究中的产品一旦取得突破，将会使美国农业面貌为之改观”（《科技日报》，1988年1月3日）。美国农业研究中心的学者认为：“发展中的所谓固氮禾本科作物仍然是一个试验室的设想，但此种设想若能实现，将有助

于世界饥民和营养不良者得到更多食物。”因此，现代农业科学中的这一富有挑战性的研究课题，不仅引起农业科学界的兴趣，而且也受到社会各阶层的关注，人们对它抱有很大的期望。

国内外研究现状

进入80年代，生物固氮研究领域中获得三项有划时代意义的进展：（1）证实生物固氮作用只限于原核类微生物（包括细菌、放线菌和蓝细菌）。过去认为有些真核微生物（酵母菌和真菌）有固氮作用，都未能确证。（2）查明不同种类固氮微生物都由共同的固氮基因（nif）控制固氮遗传，nif基因和固氮酶只存在于固氮菌体中；具有共生固氮作用的高等植物只提供固氮效能得以充分表达的宿主条件。（3）实现了细菌之间nif基因的转移后，对nif基因的位置、数目、结构和功能等方面有了更深入的了解，开始形成固氮遗传工程学科，并为探索nif基因向高等植物转移开辟了道路。

几种可能的转移途径

目前，固氮遗传工程的研究进展已为nif基因的转移的研究奠定了理论基础。但是，通过什么途径可以向高等植物转移，还有待于探索。现在，许多学者对于实现非豆科作物固氮设想了多种多样的方案，归纳起来主要有以下几方面：

1. 扩大共生固氮范围，建立新的非豆科作物和根瘤菌共生固氮的体系。主要是用生物技术引导根瘤菌侵染非宿主植物细胞。

2. nif基因通过载体向植物转移。具体步骤是将nif基因先转移到一种能侵染非豆科植物的细菌（如农杆菌）或病毒（如CaMV）中，利用这些载体将nif基因带进植物细胞。

3. 直接将nif基因或固氮细菌导入植物细胞或原生质体内，进而培育成能表达固氮作用的植物。

以上三种研究途径的目标实际上只有两个：一是将自然界现有共生固氮体系扩大到非豆科作物上，创建新的共生固氮体系^{*}；二是通过基因工程或细胞工程转移固氮基因，构建自身能固氮的植物。

对于第一个目标，由于在70年代中期已发现自然界有非豆科植物*Parasponia*和根瘤菌共生固氮体系，加之近年对转移固氮能力的细胞工程技术发展迅速，扩大共生固氮范围的可能性日益增大。对于第二个目标即实现植物自身固氮，是否可能，美国哈佛大学固氮遗传工程学家Ausubel认为有两条理由支持这种可能性。第一，没有理论上的理由认定原核生物固氮基因不能在真核生物细胞中起作用；第二，由于分子遗传工程技术的不断发展，有可能一步步将细菌的nif基因转移到植物中，最终表达固氮作用。他认为这种可行性取决于：在体外建立带有固氮基因的遗传载体，它能通过原核-真核生物之间DNA的摄取、复制和表达屏障，创造一个在植物细胞内使固氮作用得以发生的合适厌氧环境^[1]。这也就是说，构建自身固氮植物的目标在理论上是有可能的，但具体实现起来，比扩大共生固氮体系的目标复杂得多。因为，这要涉及固氮基因工程中的一系列问题。

* 自然界有些非豆科的木本植物能和弗兰克氏菌属放线菌共生固氮，但迄今尚未发现禾本科植物有共生固氮作用。

固氮基因工程

1. nif基因

遗传工程中的基因重组技术首先是从大肠杆菌 (*E. coli*) 开始的, 由于有固氮作用的肺炎克氏杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 简称 (Kp) 在亲缘关系上和大肠杆菌很接近, 因而自70年代起固氮生物的分子遗传学研究主要以Kp为模式进行。目前, Kp中的nif基因的位置已经查明, 它定位于组氨酸 (his) 操纵子末端和莽草酸渗透酶基因 (ShiA) 之间的基因组片段上。这一群簇至少含有17个基因组, 排列在含有23kb的8个操纵子基因群簇。但迄今对于nif的确切数量、组织结构及其产物的功能都还不很清楚^[2]。因此, 目前还不可能准确地对nif基因进行切割和重组。

2. nif基因向真核细胞转移

1972年Dixon等^[3]首先将Kp的nif基因转移到大肠杆菌中, 并得到表达, 从而实现了原核生物之间固氮能力的转移。此项突破促使许多学者提出将nif基因克隆到植物细胞的设想。然而, 向高等植物移植nif基因就不象原核生物之间转移那样简单。因为, 肺炎克氏杆菌nif基因可转到质粒上, 而质粒可以转导入近缘的大肠杆菌体中, 并不涉及nif基因的切割和重组。但是, 对于高等植物就必须涉及如何将nif切割并组装到一个合适的运载工具 (载体) 上, 其次是将nif基因导入何处 (受体) 才可能表达功能。

(1) 载体

Ausubel^[1]认为, 目前可能用于引导细菌DNA进入植物细胞的载体有三种:

①以叶绿体为载体 可利用叶绿体作为nif基因载体的有利条件是: ①叶绿体内的有关基因较小 (80~100百万道尔顿) 易于在体外进行基因重组操作; ②叶绿体的蛋白质合成机制近似于原核生物, 有利于原核DNA在其中分子克隆; ③叶绿体含有大量ATP, 可以为高度耗能的固氮反应提供能量。不利的条件是, 叶绿体在光合作用中产生的氧对固氮酶有毒害。因此, Ausubel建议构建一个不发生氧伤害的变异叶绿体, 将它作为nif基因的载体导入植物细胞。目前, 移植叶绿体已能实现, 但改造一个叶绿体还难以进行。

②以根瘤农杆菌Ti质粒为载体 有利条件是农杆菌和根瘤菌是亲缘相近的土壤细菌, 根瘤菌的带有固氮基因的大质粒有可能通过转座子导入农杆菌的Ti质粒, 而Ti质粒的DNA能整合进入植物细胞。然而, 实际应用还有许多难以克服的缺点: 一是此菌的Ti质粒分子量过大, 体外重组和克隆DNA的技术十分复杂; 二是农杆菌不侵染禾本科植物, 而对双子叶植物是病原菌, 如何只保留其侵染能力而又去除其致病基因, 在技术上还难以实现。更主要的是, 在自然条件下农杆菌以Ti质粒侵染植物致病后并不经核遗传。近年有实验证明, 用遗传操作技术将Ti质粒DNA插入寄主植物细胞核内, 最后仍在减数分裂中丢失。因此, 即使能以农杆菌Ti质粒为载体, 将nif基因导入植物细胞, 充其量也不过相当于导入一种根瘤菌, 不一定能随植物继代遗传。

③以CaMV为载体 应用花椰菜病毒 (CaMV) 的优点是: DNA较小便于克隆技术操作, 而其大小正适合于携带nif基因, 如克隆成功, 作为载体将nif基因导入寄主植物, 就可扩散侵染到植株各部位细胞, 但实际应用也有很大问题: 一是此病毒只侵染十字花科芸薹属植物, 如加以改造, 经酶切重组后即无侵染力而失去载体作用; 二是此病毒的DNA只在细胞质中复制, 并不能进入细胞核, 因而和农杆菌一样, 也不能随种子遗传

(2) 受体

Dixon认为,在理论上将外源因素导入植物细胞有三处潜在部位:核、线粒体和叶绿体,由于nif基因群簇十分复杂,使它在植物核内表达至少必须单个操作15个基因,因此以核作为nif基因的受体,问题复杂而难以实现。其次是线粒体,由于它的DNA编码方式不同,也不是导入nif基因的合理部位。最后,他认为只有叶绿体由于其rRNA和tRNA基因的转译信息和大肠杆菌很相似,可能为nif基因在植物细胞内表达提供最合适环境^[2]。由此可见,Ausubel和Dixon经过分析比较后,认为叶绿体是nif基因的理想载体和受体。但是,由于对nif基因的基本情况尚未查明,在体外切割和重组目前还难以实现;加之,真核生物的基因克隆现今还处于摇篮时期,对于nif基因的载体和受体都还处于设想阶段,短时间内还难以实现。

由于nif基因难以导入植物细胞,有些学者只好退而求其次,先转移到一种较简单的真核细胞——酵母菌中,啤酒酵母正是适合于这一研究目的的理想受体。因为,它是最低等的单细胞真核生物,其基因DNA长度只相当于高等生物的十分之一。更重要的是它的质粒易于转移,并具有在细菌和酵母细胞中复制的能力;而且还能在厌氧条件中生长,可避免固氮酶的氧失活作用。因而是nif基因的良好受体。

近年,美国康乃尔大学和法国巴斯德研究所已将肺炎克氏杆菌的nif基因转移到酵母菌中^[4],虽然尚未表达固氮作用,但至少已能突破真核细胞禁区。看来,nif基因在低等真核细胞中的表达只是时间问题,可能不需很久即会有突破。如能成功,就是向高等植物这个目标迈进了一大步。

固氮细胞工程

鉴于通过基因工程向高等植物转移nif基因在技术上面临重重障碍,促使许多学者转而研究将固氮细菌整体导入植物细胞,即转入固氮细胞工程的研究。早期,此类研究是从固氮细菌和植物组织联合培养以建立体外共生固氮体系开始的。

早在30年代初至60年代中期(1933~1967年),许多学者试验用离体的豆科植物根、愈伤组织和细胞培养物与相应的根瘤菌联合培养,以探索二者在体外共生的可能。但限于当时的技术条件,在30多年内一直未能证明根瘤菌能在离体植物细胞内共生和固氮。

进入70年代,由于组织培养技术的发展和乙炔还原法测定固氮酶活性的技术应用,促进了体外共生固氮研究的发展。1971年Holster等^[5]首先报道根瘤菌可与豆科植物在体外建立共生关系。他通过电镜观察证明:根瘤菌是从细胞间隙进入大豆细胞内的;细胞质内的根瘤菌增殖后由泡囊包被,其形态和内含物(聚 β -羟基丁酸)与正常生长的大豆根瘤菌的相似。但此种体外共生体系中的固氮酶活性较低,固氮能力只相当于正常大豆根瘤菌的1%。继后,其他学者也证实了此类试验结果^[6]。不久,Child^[7]试验证明,根瘤菌32H1和小麦、烟草等6种非豆科植物细胞在体外联合培养时有联合共生固氮作用。经电镜观察证明,根瘤菌生长在愈伤组织的细胞间隙内,并对细胞有破坏性入侵。同年,Scowcroft等^[8]报道了根瘤菌32H1和烟草及豆类细胞培养有联合固氮作用。这些试验表明,根瘤菌不仅可以和豆科,而且也能和非豆科植物建立体外共生固氮体系。但可能由于不久后研究发现离体根瘤菌在一定培养条件下也具有固氮作用,所以对建立体外联合共生固氮体系的研究后来就少了。

70年代中期遗传工程的发展,特别是PEG(聚乙二醇)细胞融合技术的应用,促使学者们进行试图将固氮细菌移植到真核细胞的研究。先是有人将自生固氮菌融合到真菌原生质内,复壁再生后能表达固氮酶活性^{[9][10]}。同时,美国和苏联许多学者进行了植物原生质体摄取固氮蓝细菌或将二者进行联合培养的研究。其中,将蓝细菌中的*Anacystis nidulans*^[11]、粘球藻(*Gloeocapsa* sp)^[12]、可变鱼腥藻(*Anabaena variabilis*)^[13]和蓝色小体(cyanella)^[14]导入植物原生质体都已成功,但未能得到再生细胞,或最终为再生细胞所排斥。前几年,我们曾进行过粘球藻和真菌细胞及小麦、玉米、烟草等作物原生质体融合试验,但亦未能得到再生的融合体。苏联以Butenko院士为首的协作组,对固氮蓝细菌和非豆科植物组织联合培养进行了大量研究;1979~1986年期间有7篇研究报告^[15~21]报道了固氮蓝细菌(可变鱼腥藻)和烟草及人参细胞联合培养的试验结果。1986年已获得有固氮蓝细菌共生的烟草再生苗,蓝细菌定居在烟草组织内部及再生苗表面,可形成异形胞并有乙炔还原活性。但以上所有的试验都还停留在细菌和高等植物联合共生阶段,未能将固氮细菌移植到非豆科植物细胞内,更谈不到建立共生体系。

最近几年,我国在向非豆科作物转移固氮能力的研究方面已开拓了一条新路。聂延富^[26]应用植物生长素2,4-D处理根系,引导根瘤菌进入小麦等作物根部形成根瘤;经镜检和分离荧光抗体及抗血清试验证明,根瘤内含有大量根瘤菌,经测定有较低的固氮能力。我们对此进行了长时间验证和系统研究^[27],现已证明除2,4-D外,豆科威等生长素也能引导根瘤菌在小麦根系的根瘤原基内拓殖成含菌根瘤。经扫描分光光度仪测定,生长素处理的根瘤细胞核DNA含量比瘤外细胞DNA量增加一倍左右,诱发的多倍体细胞为根瘤菌增殖创造了条件。扫描电镜证明,小麦根瘤细胞内含有大量细菌。超薄切片电镜中看到菌体外有周膜包被,菌体内含有聚 β -羟丁酸颗粒。分离后的细菌学和血清学检验及回接试验证明,其中细菌确系原接种的根瘤菌。盆栽试验证明,生长素处理的根瘤菌接种对小麦生长有明显刺激作用,但根瘤菌的固氮酶活性很不稳定。我国的上述研究结果已经被澳大利亚悉尼大学验证,结果一致(詹耀曾教授个人通信)。我们在进一步试验中还看出,用脱壁酶结合生长素处理根系,对非豆科作物引导结瘤效果更好;甚至用营养诱导法也能使水稻形成根瘤,电镜切片中观察到其中含有大量根瘤菌。此外,在生长素的引导下,根瘤菌和烟草愈伤组织共培养后经扫描和透射电镜证明,根瘤菌不只是在以往文献报道的细胞间隙内,而且也在细胞内增殖;经乙炔还原法测定,有明显固氮酶活性^[28]。

我国研究的以上几种诱发非豆科作物结瘤方法也是国际上最新动向。1987年,国外报道应用豆科宿主植物的提取物驯化出新的根瘤菌转变菌株(transformants),用以处理小麦、水稻、高粱等7种非豆科植物能结瘤固氮。这些新菌株已分别命名为小麦根瘤菌(*Rhizobium tritici*)、水稻根瘤菌(*R.oryzae*)等,并已由美国菌种中心(ATCC)编号^[22]。

此外,我们还发现通过植物生长素的引导,能使大豆根瘤菌在绿豆上结瘤,这表明应用生长素引导,有可能扩大根瘤菌宿主范围。1987年底,英国细胞工程权威学者E.C.Cocking等报道^[24],应用酶降解三叶草根毛尖端细胞壁,可使百脉根根瘤菌在白三叶草上结瘤固氮,从而打破寄主专一性屏障。此文和1986年他们发表的论文都指出,用酶降解根毛细胞壁,可能为引导根瘤菌进入豆科和非豆科细胞形成新的共生固氮联合开辟新的通道

以上研究进展说明,当前固氮细胞工程的研究已经跨过组织培养和原生质体融合的体外共生体系的探索阶段,进入了采用生长素和酶处理方法直接将根瘤菌导入非宿主植物细胞,以建立共生固氮新体系的阶段。还说明,植物细胞壁已可以突破,它不再是固氮能力转移的屏障,非豆科作物也并不是根瘤菌的禁区。

讨论及前景展望

回顾近20年来,国内外对于固氮能力转移的研究目标已逐渐集中于两个突破点上:一是在理论上主张为植物组装固氮细胞器,二是在转移方法上已有可能直接将根瘤菌引导入非寄主根系,建立新的共生固氮体系。在这两个前沿点上,何者切实可行?

1. 为植物组装固氮细胞器的可行性

1984年,最先将nif基因转移到大肠杆菌中的英国学者R. A. Dixon在其论文《为什么植物不能固氮?》中,论述了构建固氮植物的可能性^[2]。他认为发展固氮植物的唯一策略是将nif基因导入植物细胞器——叶绿体中。Dixon的论点和美国哈佛大学的同行Ausubel的论点不谋而合,即为植物组装一个固氮细胞器是最佳方案。

从进化的观点上看,高等植物是可能有固氮细胞器的。豆科植物和根瘤菌有天然共生关系,根瘤菌进入宿主植物细胞内转化为脱去细胞壁的类菌体后,实质上已是一种具有固氮作用的细胞器。但由于类菌体的进化程度还不高,只能在细胞内暂时共生而不能随宿主细胞遗传;因而还不能成为真正的细胞器,只能称之为有固氮作用的内共生体或亚细胞器。

为什么植物在进化过程中没有形成固氮细胞器?1983年在西德图宾根大学召开的国际内共生学学术讨论会上,有些学者认为,在远古的生物进化过程中,当时没有条件在前真核细胞和原核固氮生物之间发展共生作用。因为,在真核细胞形成的水生或底生环境中,生物生长的限制因素是能量和有机碳源,而不是氮素。因而,首先出现的内共生体系是蓝藻类原核生物和前真核细胞之间的光合共生体系,进而演化成具有光合作用的细胞器(叶绿体)的植物。但是,当时进化过程中没有条件演化出具有固氮作用的细胞器。因此,遗传工程学者们主张借助于现代科学技术的发展,人为地加速内共生的进化过程,为植物组装固氮细胞器。

固氮遗传工程学者的上述设想从理论上说是有可能的,因为在细菌之间由细胞器(质粒)转移nif基因已经实现,高等植物的细胞器(叶绿体)转移在技术上也已可行。但问题在于,为高等植物组装和移植一个固氮细胞器却不那么简单,因为目前对固氮基因的结构和功能的研究还不很充分,现今还难以将nif基因切割组装到叶绿体上。加之叶绿体放氧对固氮酶的毒害问题尚无妥善解决办法,因而应用基因工程向高等植物转移固氮基因目前还是难以在短期内实现的长远设想。

2. 根瘤菌导入植物细胞的技术突破的前景

在人们对nif基因导入高等植物还不得其门而入之时,通过细胞工程却已能将根瘤菌整体导入非宿主植物细胞。导入技术突破的,为建立新的共生固氮体系开拓了广阔的前