

## 生物固氮和非豆科植物固氮根瘤工程问题

### ON BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION AND ENGINEERING OF ROOT NODULE'S ON NON-LEGUME PLANTS

荆玉祥

#### 一、生物固氮及其研究的意义

所谓生物固氮,是指自然界中一些微生物和蓝藻将大气中的氮转化成氨的过程,其反应式是 $\text{N}_2 + 3\text{H}_2 \rightarrow 2\text{NH}_3$ 。目前能固氮的生物细菌有35属,藻类有21属,除了豆科植物等以外,种种其他微生物大约共达300多种。

研究生物固氮,在理论和实际应用上都很重要。

大家知道,氮素是组成生命的基本元素之一。很多生物分子都有氮元素,特别是由氨基酸组成的蛋白质,氮是基本成分。氮素又是植物生长的主要肥料,然而占空气大约80%成分的氮素却不能被植物直接利用。其实,地球上植物所需大部分的氮肥是通过生物固氮途径获得。据统计,每年固定空气中氮素15 000多万吨,生物固氮约占70%。

自然界的氮素处在一个无限反复循环的过程中,没有这个循环就无从说起生命以及人类对蛋白质的需要。氮素通过生物固氮作用而被植物吸收后,植物再被动物利用。植物、动物死亡后,其尸体则被另一类生物分解,释放出氮气,又归还到大气。在这种氮素循环总过程中,生物固氮起着重要作用。

· 生物固氮原理是通过固氮生物体内一种固氮酶的催化作用,将氮变成了氨。与目前化工生产合成氨比较,生物固氮具有很大优越性。化工生产合成氨只能在高温高压下进行,需要大量的技术设备,一般转化率不过是7%~20%。生物固氮

却是常温常压,效率比高温高压高上千百倍。如果人类能够化学模拟固氮酶的作用原理,人工合成模拟化合物,将对氮肥工业和其他化学工业产生深远的影响。

生物体功能的表型都是与遗传相关,即由基因决定的,当然,固氮生物的固氮酶是由酶的基因表达的。随着当前分子遗传学和生物工程技术的发展,人们试图把固氮基因转移到粮食作物上,使其能产生固氮酶,象豆科植物一样自行固氮。如果非豆科植物自行固氮成功,则将大大推动绿色革命的进程,满足人类对粮食的极大需要。

正因为生物固氮的重要性,近20年来,几乎一直是主要的资本主义国家—美、英、法、联邦德国、加拿大、澳大利亚的重要研究项目。近年来,荷兰、新西兰、印度、日本等国也加快了研究步伐。国际生物固氮会议每隔一年或两年召开一次,至今已开了六次。1985年在美国召开了会议,有40多个国家550多位代表参加。由此可见世界上生物固氮研究概况。在我国,生物固氮研究也受到十分重视。70年代初,在中国科学院组织下,展开了较大规模的研究。全国有很多研究单位,也经常召开生物固氮的学术讨论会。

#### 二、生物固氮的特性

##### 1、固氮酶有两个组分

如前所述,将氮或分子氮变成氨是通过固氮酶的催化进行的。固氮酶十分复杂,由两个组分组成。由于它们含有金属元素,一个叫铁钼蛋白,另一个叫铁蛋白。

荆玉祥 (Jing Yuxiang) 中国科学院植物研究所固氮研究室副研究员。

铁钼蛋白在固氮作用中起络合氮分子( $N_2$ )的作用。近来从这种蛋白中分离到一种因子,叫铁钼共因子,被认为是固氮酶的活性中心。这种活性中心的结构已经清楚。随着固氮酶学的进展,又产生了化学模拟固氮分枝,企图合成模拟活性中心的化合物,在温和条件下,或在常温常压下具有固氮作用。

铁蛋白起传递电子的作用,将生物体中电子供体的电子传递到铁钼蛋白,使氮分子获得电子被还原成氨。

在固氮过程中必须要求有这两个组分同时在一起,才有固氮活性。从固氮生物体分离出固氮酶两个组分,再提供ATP能量发生系统、电子供体,就可以在离体条件下测定固氮作用。

## 2、固氮酶有多个可以被还原的底物

氮分子( $N_2$ )是固氮酶作用的底物,将其还原成为氨( $NH_3$ )产物。除此以外,还有乙炔( $C_2H_2$ )、氰( $HCN$ )、迭氮( $N_3$ )、甲基异腈( $CH_3NC$ )等,都可以作为固氮酶作用的底物,各自被还原成相应的产物。特别是乙炔还原成乙烯( $C_2H_4$ ),提供了一个灵敏、方便的测试固氮酶活性的方法,既可用于整体植株测定,也可用于离体测定。但是,如果用于整体测定,乙炔还原法只能说是一个间接方法,因为植株在一定生理条件下也可以释放出 $C_2H_4$ ,就容易混淆究竟是固氮酶活性,还是植株的生理产物。

## 3、不同固氮生物固氮酶组分的互补性

至今已从20~30种固氮生物中分离到固氮酶组分。实验证明,一种固氮生物的固氮酶组分——铁钼蛋白可以和另一种固氮生物固氮酶组分——铁蛋白组合在一起,产生 $C_2H_2$ 还原成为 $C_2H_4$ 的反应。由此说明,虽然是不同的固氮生物,但它们的固氮酶结构有相似性,因而互补时产生了有功能的固氮酶。

## 4、固氮酶反应对氧的敏感性

用化工法合成氨的铁催化剂对氧很敏感,所以催化剂要放在一个密闭无氧的合成塔内才能合成为氨。固氮酶也是如此,遇氧就失去其活性。嫌氧生长的固氮生物,固氮酶不存在遇氧失活的问题,然而对大多数需氧固氮生物,则体内还具有避免固氮酶遇氧失活的保护系统。在豆科植物的共生固氮根瘤中有一种豆血红蛋白,犹如动物和人的血红蛋白一样,能结合根瘤内的氧,从而造成固氮根瘤菌(又称拟菌体)周围的无氧(严格说是低氧分压)条件,以利于固氮作用。

## 5、固氮基因和固氮的铵阻遏效应

任何一种生物性状的表现都是由脱氧核糖核酸(俗称DNA)分子链上的单位片段(又称基因)

决定的,固氮作用也是如此。当今,固氮基因(nif)的研究已非常深入。已知有18~19个固氮基因,其中有合成固氮酶铁钼蛋白和铁蛋白基因(nif B、N、E、Q、M、S、V、U)八个和调节基因(nif AL)两个,以及其他有关基因等。已经证明有19种以上的固氮生物(包括革兰氏阴性、阳性细菌,放线菌和蓝藻在内)的固氮酶结构基因,在DNA的核苷酸排列顺序上有同源性或部分同源性,即核苷酸的排列顺序相同或大致相同。如克氏肺炎杆菌(Kp)的nif KDH可以分别与根瘤菌上的nif KDH杂交。所谓杂交,即Kp的nif KDH的单链DNA上的核苷酸可以与根瘤菌上的DNA同源区互相配对,形成杂交分子。如果用同位素磷( $^{32}P$ )作标记,杂交的分子具有放射性,从而可以检测到固氮酶结构基因。

调节基因相当于一个开关,打开了,其他的有关基因就能工作,关闭了,就不能工作。固氮调节基因nif AL的打开,就合成有功能的固氮酶,关闭了就不合成固氮酶。

固氮的铵阻遏效应,实际上就是固氮调节基因作用的结果。当环境中有氨或其他氮化物存在时,就将nif AL基因关闭,合成固氮酶的基因和其他有关基因就失去了被起动的因子,从而失去固氮作用。大田试验也同样如此,能不能固氮,植物生长好不好,要在贫瘠土壤中试验,不施基肥和氮肥,否则,固氮生物就懒惰,吃现成饭,不工作了。

# 三、豆科植物共生固氮根瘤

## 1、共生性固氮系统和固氮量

我国古代劳动人民早就知道利用轮栽耕作提高耕地肥力,即以豆科植物和非豆科作物间替耕种,可不施或少施肥料,既能有高产量,又能提高土壤含氮量,其原理就在于豆科植物的根瘤内有一种叫做根瘤菌的细菌,具有固氮作用。确切地说,这种固氮作用称共生性固氮。豆科植物共生性固氮是根瘤菌和宿主植物两者相互作用和协调的结果。前者将固定的氮供给宿主植物合成氨基酸和蛋白质,后者将光合作用的部分产物输送到根瘤,提供能量,给根瘤菌自行固氮。

根瘤菌的大量应用于农作物,在七、八十年代才开始。1888年首次从根瘤中分离出根瘤菌,此后15年才出现根瘤菌的商品生产,得到广泛使用。现在,各种根瘤菌品系都可以用发酵罐大量生产使用。经过比较,在所有固氮生物中,根瘤菌共生性固氮效率比较高(表1)。

## 2、共生性固氮根瘤的形成

豆科植物共生性固氮研究已有将近100年历史了。自从发现根瘤菌以来,人们就研究根瘤菌

表1 一些固氮系统的固氮量

| 固氮生物体 | 固氮量(硫酸 公斤/亩/年) |
|-------|----------------|
| 紫花苜蓿  | 68—125         |
| 三叶草   | 104            |
| 豇豆    | 100            |
| 大豆    | 60             |
| 花生    | 50             |
| 豌豆    | 20             |
| 蓝藻    | 10             |
| 圆褐固氮菌 | 0.125          |

在豆科植物根上形成根瘤的过程和作用原理。

根瘤菌是杆状菌,是土壤中一种腐生性细菌,通常没有固氮作用,但是一旦侵入到专一的豆科植物的根内,形成根瘤后,就具有固氮作用。根瘤菌侵入豆科植物决不是偶然的,它有独特的侵入方式,侵入后在根的皮肤细胞形成特化结构的根瘤(图1),表现出很大的复杂性。

根瘤菌如何侵入豆科植物根的呢?现知大多数豆科植物是通过其根毛被感染的。首先,在豆科植物的根毛区,相应的根瘤菌被移居一起,然后以极性方式附着在根毛上。根毛受到信息后,以其壁内陷,并逐步向根毛内部延伸,形成管道,直到根的皮肤细胞。这种管道系统叫侵入线(图2)。与此同时,侵入线内的根瘤菌通过不断分裂大量繁殖。当到达根的皮肤细胞时,侵入线发生分枝,伸向很多细胞,并从其中释放出根瘤菌(图3)。侵入后根瘤菌分泌激素,刺激根皮层细胞分裂,这样在根的局部地区,细胞经多次分裂,形成了凸起的根瘤(图1)。用光学显微镜、电子显微镜和扫描电子显微镜观察,可以看到根瘤内大量的根瘤菌(图3、4、5、6)。这时的根瘤菌,由于形态发生了变化,又称根瘤拟菌体,就具有固氮作用。

当然,并不是所有根瘤都是由于根瘤菌侵染根毛和形成侵入线(或称侵染丝)开始的,如花生根瘤内就见不到侵入线结构。花生根瘤菌是在根毛基部的细胞之间以裂缝进入的方式侵染细胞,形成根瘤。

从接种根瘤菌到形成可见的根瘤,在适当条件下至少要4~5天时间。

### 3、根瘤菌对豆科植物结瘤的专一性

根瘤菌对豆科植物的侵染和结瘤有一定的专一性。大豆根瘤菌只对大豆的根侵染和结瘤。苜蓿和三叶草根瘤菌只对苜蓿和三叶草侵染和结瘤,有的根瘤菌也表现了对一些豆科植物结瘤,如红豆根瘤菌不仅使红豆结瘤,也能使菜豆、羽扇豆结瘤。现对这种识别专一性的机理进行过研究,

指出豆科植物根毛上有一种识别蛋白,称植物凝集素,能识别各自的根瘤菌,与其体表的粘多糖有凝集反应。大豆根瘤菌及其粘多糖只对大豆的凝集素起凝集反应,三叶草根瘤菌只对三叶草凝集素起反应。如果将三叶草根瘤菌在高温下培养,获得一种突变体,结果就不能使三叶草结瘤,同时也失去了结合三叶草根的凝集素的能力。进一步研究认为根瘤菌的氧多糖,或脂多糖是凝集素结合的位置,也有指出是多糖中的O<sup>-</sup>抗原部分是凝集素作用的部位。遗传研究指出,将三叶草根瘤菌的DNA转化到自生性固氮的棕色固氮菌,结果使后者获得了三叶草根瘤菌的特性,具有感染三叶草的能力,有助于进一步了解凝集素结合的生化反应。

### 4、参与结瘤固氮的根瘤菌和豆科植物的基因

根据以上所述,根瘤菌侵染豆科植物形成固氮根瘤是多步骤多阶段的。近几年的生物固氮分子遗传学研究指出,结瘤过程的每一个阶段,都有根瘤菌和豆科植物的有关基因参加,达到互通信息,有机协调地形成固氮根瘤。在根瘤菌方面:已知有使其在豆科植物根区定居,粘着根毛和使根毛卷曲的基因。这些基因表达的产物,完成了形成根瘤前的最初感染阶段。根瘤菌进入根皮层细胞后,其结瘤基因和血红素基因开始表达,其产物使细胞分裂,形成根瘤,血红素与豆血原蛋白结合,形成起嫌氧作用的豆血红蛋白。与此同时,根瘤菌的固氮基因表达,产生了固氮能力。在豆科植物方面,有凝集素基因参与和根瘤菌的识别。根瘤菌进入根以后,有豆血红蛋白基因和10~20种结瘤素基因表达,其产物参与根瘤的代谢作用,和保证根瘤固氮的有效性。

对这些基因的研究,有的已经完全清楚,有的正在进一步地深入研究,有的则刚被发现。研究结果将有助于进一步提高豆科植物共生性固氮的效率,并为开辟非豆科植物共生固氮的遗传工程打下基础。

## 四、非豆科植物固氮根瘤工程问题

### 1、所谓“人工诱发固氮根瘤”之说

根瘤菌能否在非豆科植物上,特别是在粮食作物上固氮,是人们关心的大问题,也是当今世界生物固氮研究工作者最为关注和研究的目標之一。

所谓“人工诱发固氮根瘤”,其说法是根瘤菌经磁处理技术,可以使数十种非豆科植物(包括粮食作物)的根结固氮根瘤。从1981年起在国内杂志、地方性报纸和全国性报纸多次报道,文艺刊物上也有传记报导。这些不仅引起国内整个固氮生

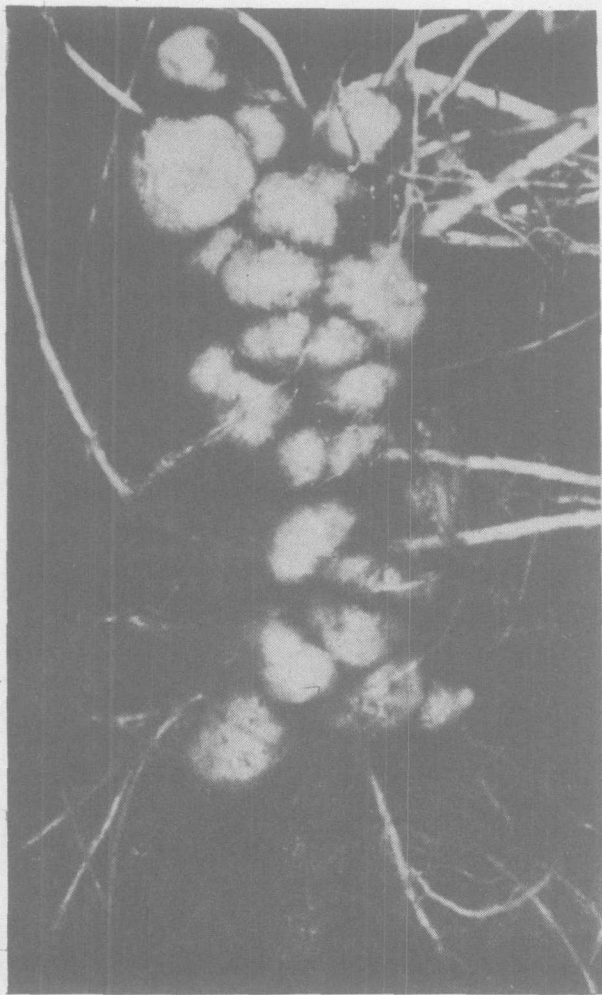


图1 大豆根瘤

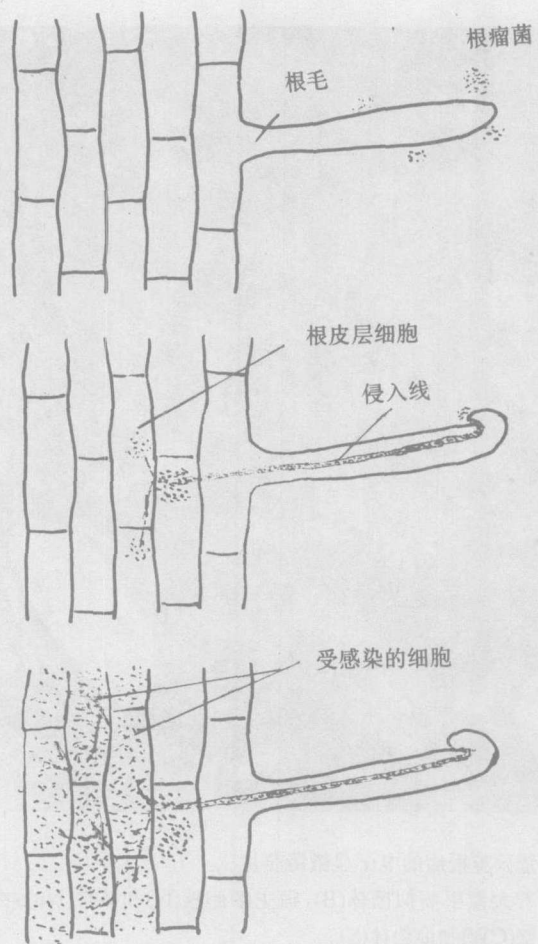


图2 根瘤菌对豆科植物根毛侵入示意图



图3 紫云英根瘤细胞电子显微镜照片

细胞内有根瘤拟菌体(B), 侵入线(IT, 或称侵染丝)向两侧细胞伸展, 内有根瘤菌(R), 液泡(V)。

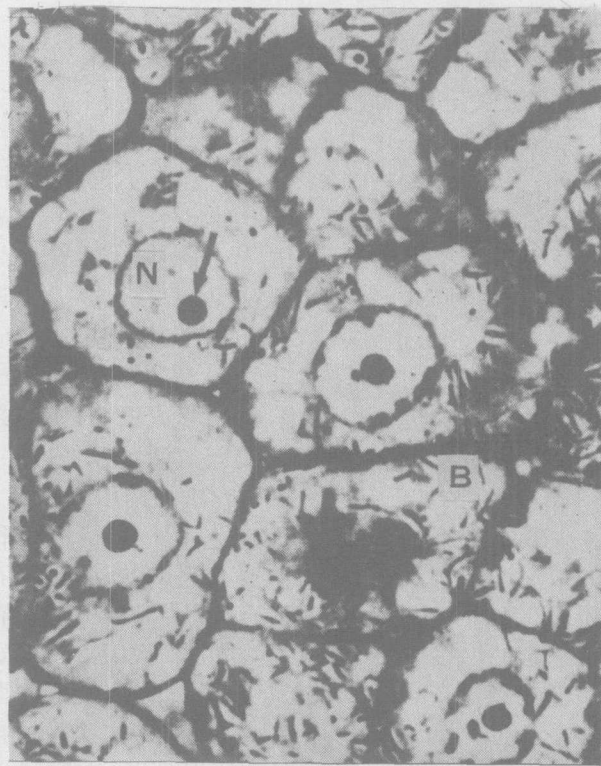


图4 绿豆根瘤的光学显微镜照片

细胞内有大量根瘤菌拟菌体(B), 可见细胞核(N)和其核仁(黑色箭头)。

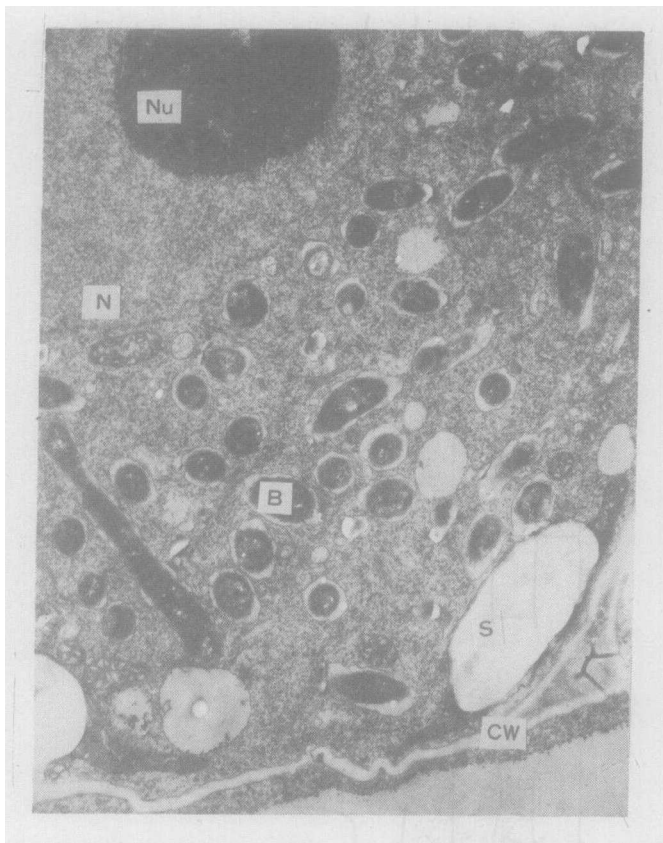


图5 紫云英根瘤的电子显微镜照片  
有大量根瘤拟菌体(B), 宿主细胞核(N)和核仁(Nu), 细胞壁(CW)和淀粉体(S)。

物界的不同看法, 也引起国际同行的怀疑, 并受到我国某些行政领导人的重视。

## 2、研究“人工诱发固氮根瘤”方法问题

### (1) 关键要研究磁的作用

整个地球是个大磁场, 所以地球有南极北极之分。磁场对生物的影响是存在的, 不论在国外, 还是在国内都有研究。1986年日本出版一本《磁生物学》专著就是说明; 国内有磁生物学有关组织, 还有各种磁疗器应用也是见证。根据“人工诱发固氮根瘤”报道, 关键在于磁的作用。首先要研究磁能否打破根瘤菌对非豆科植物的识别专一性, 使之侵染, 进入根细胞, 分裂形成根瘤; 第二是根瘤有无固氮活性和如何测定固氮活性。

### (2) 在一切已知条件下研究磁的作用

磁的作用是一个要问的未知因素, 所以接种的根瘤菌要用纯化的菌种, 要在灭菌的沙土、蛭石粉或琼脂培养基上接种种子消毒后萌发的幼苗; 在一定的温度、光照下进行, 防止风吹雨淋。在这些已知条件下, 就可知是否磁场真的打破根瘤菌的专一性。如果起正作用, 就应该在非豆科植物根上结瘤。然后回收根瘤内的根瘤菌, 在同样条件对豆科和非豆科植物进行回接试验, 得到反复验证。所接种的纯根瘤菌, 应该有可核对的标记, 如对噬菌体敏感, 能抗抗生素或制备根瘤菌的抗

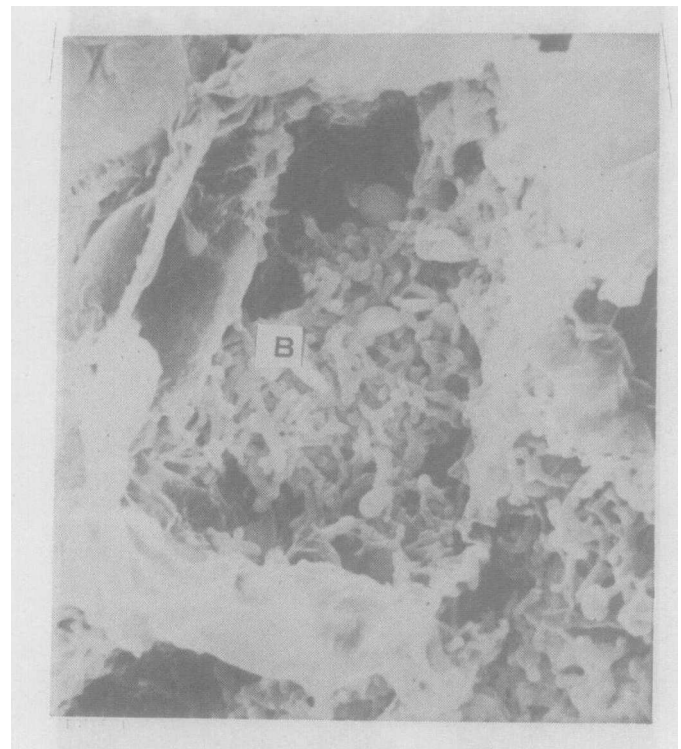


图6 紫云英根瘤的扫描电子显微镜照片  
在细胞内有大量存在的根瘤拟菌体。

血清等, 以区别培养过程中杂菌的污染。

### (3) 用多种方法检测固氮酶

随着生物固氮研究的深入发展和生物固氮的特性, 检测生物固氮的方法也就日趋完善, 而且可靠性也有所提高。为验证人工诱发固氮根瘤, 则必须用多种方法, 才有可靠性。这些方法就是: (a) 整体根瘤的乙炔还原法; (b) 从根瘤分离固氮酶, 在试管内的乙炔还原法; (c) 制备固氮酶组分的抗血清, 检测固氮酶组分; (d) DNA分子杂交法, 检测固氮酶的结构基因; (e)  $^{15}\text{N}_2$  质谱测定法。必须指出, 每一种方法都有其优点和缺点, 必须综合使用, 才能达到取长补短, 相互验证。

### 3、“人工诱发固氮根瘤”得不到验证

科学是实事求是, 是真理, 是不以人的主观意志为转移的。如果反映客观存在, 一定会经得起人们从各个角度, 严格条件下的反复验证。从目前来看, 尚未得到固氮研究工作者在上述严格条件下的证实, 而对南京、河南和北京在黄瓜上结的根瘤检查, 确证存在着大量线虫(图7), 所以有人说它是线虫瘤并非没有道理。关于增产试验, 要有严格规划和精心操作的小区试验和大田试验相结合, 并用概率原理消除误差。一般来说, 在小区试验, 接种和不接种的效果在其差达到200 ~ 1000%之间, 则能说明问题; 如果在25%左右的

差异,就难说明大田试验的增产效果。人工诱发根瘤的小麦增产试验,一则在小麦根上极少有根瘤,即使有,若以豆科根瘤的数量衡量,可以忽略不计;即使有,也不能说明其固氮性质;二则尚未达到小区条件的严格控制,所得增产数据,应采取谨慎态度。

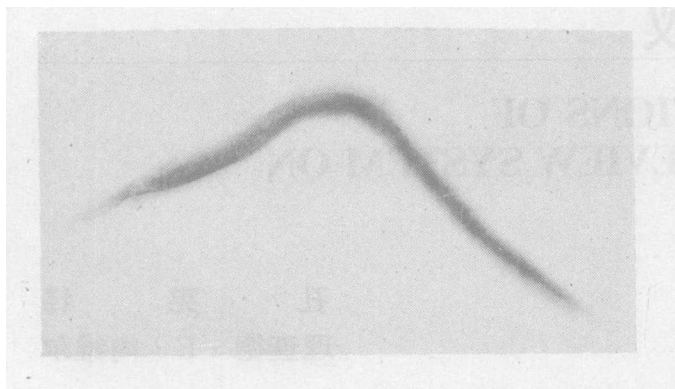


图7 从人工诱发的黄瓜根瘤中分离出大量线虫,在此仅仅示一条

### 五、非豆科植物固氮的可能性问题

由于固氮基因之多和根瘤菌对宿主植物的专一性,给研究工作带来了复杂性和困难性。那么是否有这种可能性呢?我认为是有可能的。

其实,在自然界有很多非豆科植物,如桉木、木麻黄、杨梅、胡颓子、沙棘等具有结瘤固氮能力,不过它们不是由根瘤菌引起,而是由一种固氮放线菌——弗兰克氏菌引起。这一研究工作正在分子遗传水平上研究其结瘤固氮过程和原理。根瘤菌在非豆科植物上结瘤固氮也有一例。1973年在澳大利亚发现榆科的一种*Parasponia* sp. 植物上有固氮根瘤,从中分离出红豆根瘤菌。在人工可控条件下回接试验也获成功,固氮活性为豆科植物固氮根瘤的1/3到1/2。观察根瘤,有侵入线结构;DNA分子杂交证明有固氮基因,和其他慢速根瘤菌的固氮结构基因相似;根瘤内有豆血红蛋白存在。

与此同时,随着对于克氏肺炎杆菌固氮基因的精细结构分析和产物功能的了解,人们进行了真核生物的固氮工程的尝试。1981年美、法两家实验室分别把24Kb碱基对的克氏杆菌固氮基因整合到真核生物酵母细胞,随酵母细胞的分裂,固氮基因可以复制,但可惜没有基因产物。1984年美国 and 以色列两家实验室,将固氮酶结构基因nif DH整合到酵母细胞,结果得到了基因产物——蛋白质多肽,说明整合的基因可以转录和转译了,但

由于没有嫌氧系统和缺乏后加工基因,所以还不能固氮。

以上说明两个问题:一个是自然界有非豆科植物的结瘤固氮;二是固氮遗传工程可以将低等的原核生物的固氮基因整合到真核生物,但由于对固氮基因的表达和调节作用等基础研究还不够,战略设计还不够完善。

尽管根瘤菌可在非豆科植物上结瘤固氮,至今被发现和确认的并不多,但确实是一个令人鼓舞的现象。如果了解根瘤菌侵入*Parasponia* sp.的分子基础,则对侵入其他非豆科植物,特别是粮食和经济作物的结瘤和固氮会有启示和促进作用。整个克氏肺炎杆菌固氮基因整合到酵母细胞核以及固氮酶结构基因在酵母细胞中的表达,是固氮工作者的一个模型试验,虽然还不具固氮活性,但对人们进一步的试验提供了经验和借鉴,使人们思考改进研究战略方案。经过艰苦实践,实现它不是没有可能的。

最后再说到固氮的能量供给,在共生性固氮过程中,固氮根瘤菌将氮转变为氨,所消耗的能量是巨大得惊人,这些能量都由寄生植物的光合作用产物所供给。大豆根瘤系统中其固氮酶来自光合产物的电子流中约有40%不能用于还原氮气,这是能量的无谓浪费。因此豆科作物之所以低产,也可在这里看到是其限制因子消耗大量能量的缘故,如果粮食作物一旦真的获得了固氮(nif)基因,而结成根瘤固氮,如果不提高其光合效率,便是说光合产物跟不上,那末这些作物的生长,就没有足够的光合产物来供应,那又将是一种灾难了。纵使粮食作物产生根瘤也必须改革它的种植和栽培制度,以便求得更多的光合产物,才能提高其产量。因此必须按照科学规律办事,坚持以严肃的科学实验操作程序,否则就难以突破。

---

## 《科技导报》受理广告业务

本刊系中美合办的综合性刊物,在国内外公开发行,主要读者对象是中、上层领导人,各级决策和管理人员,各学科领域的科技和经济工作者,以及高等院校师生。

本刊欢迎国内外各单位刊登广告,有关广告の説明、价格等材料函索即寄。