

根瘤菌共生固氮的遗传学研究(一)

马庆生

(广西农学院分子遗传学研究室)

根瘤菌是一种重要的固氮微生物,由于它和植物形成独特的共生关系,所以可固定较大量的氮,据估计每年由于根瘤菌共生所固定的氮量可达 139×10^9 吨之多,约占地球上正个固氮总量的四分之一。在农业上根瘤菌共生固氮也是一个重要的氮素来源。

根瘤菌可以在豆科植物上形成根瘤,同时也可以非豆科植物 *Parasponia rugosa* 上形成根瘤^[1],它们可以分成快生类型,如:豌豆根瘤菌,菜豆根瘤菌、三叶草根瘤菌和苜蓿根瘤菌;和慢生类型,如:羽扇豆根瘤菌、大豆根瘤菌、此外还有一个杂合类群,它包括了所有其它的根瘤菌种,快生和慢生的划分不是绝对的,大豆根瘤菌是典型的慢生型根瘤菌,但从大豆根瘤中也分离到了快生型大豆根瘤菌^[2]。

根瘤菌的寄主专一性是一个重要的分类依据,但完全依据寄主专一性来分类并不理想,在某些情况下,同一根瘤菌种可以在好几种寄主植物上形成根瘤,许多豌豆根瘤菌可以在菜豆上成瘤,但这种瘤是无效瘤,它并不固氮,寄主植物的遗传基因可以影响根瘤菌的寄主专一性,从欧洲栽培豌豆中分离到的豌豆根瘤菌通常可以在豌豆(*Pisum sativum*)上结瘤,但却不能在阿富汗豌豆上结瘤,而从土耳其分离到的一个豌豆根瘤菌菌株 TOM 却可以同时阿富汗豌豆和欧洲栽培豌豆上结瘤。

一般认为根瘤菌只有在共生状态时才能固氮,1975年有三个实验室同时发现慢生根瘤菌在离体培养时也可以固氮^[3],这表明根瘤菌携带有合成固氮酶的全部基因。然而在离体条件下诱发快生型根瘤菌固氮的尝试却一直没有

成功。

根瘤菌和寄主植物之间的相互作用是一个复杂的过程,虽然对这过程已有了不少研究,但对整个过程的了解仍然相当肤浅。当豆科种子在含有合适根瘤菌的土壤中萌发时,根瘤菌引起寄主植物的第一个可见的效应是根毛卷曲或分枝,由此而产生一种“曲把拐棍”(Shepherd's crook)的结构,这种结构似乎特别易于受根瘤菌侵入。为了说明根瘤菌侵入根毛这一过程,已经有许多假说来解释这一相互作用的基础。从根瘤菌方面讲大多数研究集中在根瘤菌胞外多糖(Extracellular Polysaccharides)的成分和连接方式上,而有些人认为根瘤菌脂多糖(lipopolysaccharides)结构上比胞外多糖更具多样化,根瘤菌胞外多糖和脂多糖都被认为是根瘤菌识别寄主时起作用的结构物质。从植物方面讲,有人提出植物可分泌一种外源凝集素(lectin)^[4],能起到附着连接根毛表面和根瘤菌表面的作用,但对这种凝集素的实际作用仍有相当争议。

根瘤菌在侵入寄主根部后,开始被局限在侵入线(Infection threads)内,侵入线朝向根毛细胞基部生长。一定时间后,根的部分皮层细胞受到刺激而转变为分生组织细胞,由于这部分分生细胞的分裂而最终导致瘤的形成,根瘤菌从侵入线末端释放出来后逐步分化为类菌体(Bacteroids),在瘤中只有分化为类菌体的根瘤菌才具有固氮作用。

根瘤菌遗传的早期研究

根瘤菌研究已有好几十年历史,但根瘤菌遗传学的研究并没有多长时间,在七十年代初

根瘤菌形式遗传的研究取得了进展,用经典的化学诱变方法可以在根瘤菌中得到营养缺陷型突变。 P_1 不相容群的质粒被证实可以转移到根瘤菌中,Haas等^[5]用质粒R 68、45在根瘤菌中建立了转移染色体遗传标记的基因接合转移体系,用类似方法在豌豆根瘤菌和苜蓿根瘤菌中制作了环状染色体连锁图,此外Johnston等^[6]发现用R 68、45转移根瘤菌质粒时,豌豆根瘤菌、三叶草根瘤菌和菜豆根瘤菌染色体之间可有重组发生,用此办法他们获得了带有根瘤菌染色体遗传标记的R'质粒。

在根瘤菌中发展一个理想转化体系的努力一直没有成功,但有人报道了根瘤菌染色体遗传标记的转导,Buchanan-Wollaston^[7]筛选到一株普遍性转导噬菌体RL 38,它可在豌豆根瘤菌和三叶草根瘤菌之间进行转导,在苜蓿根瘤菌中也曾报道了一株专一性转导噬菌体16-3。

早期研究中筛选到的根瘤菌突变体大多为营养缺陷型突变和抗药性突变,这些突变与根瘤菌共生固氮功能之间并没有直接关系,但它们在染色体上的位置却很容易通过连锁图的制作而确定下来,也有一些人进一步对上述突变进行研究以期发现它们与根瘤菌共生固氮能力之间的关系,在这类研究中也确实发现了一些同时是共生固氮功能缺陷的双重突变,然而这种性质的研究并没有从本质上揭示根瘤菌-寄主植物共生的内在联系,这是因为(1)在有些情况下所看到的遗传多效现象(例如一个根瘤菌营养缺陷型突变又是不固氮突变)可能是由于多基因突变所致,(2)对于营养缺陷型突变来讲很难区分所观察到的共生固氮能力上的缺陷是由于该突变菌株不能合成某种物质,还是由于在根瘤中的根瘤菌从植物中得不到适当的营养供应所致。

早期的研究在根瘤菌共生固氮能力方面并没有获得很有价值的结果,但在研究中初步建立了根瘤菌遗传研究体系,另外在进行根瘤菌基因转移中,有人曾把豌豆根瘤菌的染色体

DNA一段一段转移到三叶草根瘤菌中,却始终没有发现含有结瘤基因的片段,这从侧面提示豌豆根瘤菌的结瘤基因可能不在染色体上。

根瘤菌遗传研究的近期工作

近几年根瘤菌遗传研究进展十分迅速,有关结瘤、固氮能力的基因已相继在豌豆根瘤菌、苜蓿根瘤菌和三叶草根瘤菌中找到并已克隆到大肠杆菌载体上,这三种根瘤菌的结瘤、固氮基因群的遗传图也业已完成,这些进展是由于下面几个因素造成的。

1. 在快生型根瘤菌中有关共生固氮能力的基因被证实在质粒上。

许多革兰氏阴性细菌的质粒可以用Helinski等^[8]的方法进行提取,但这种方法用来提取根瘤菌分子量较大的共价闭合环状DNA(ccc DNA)却是不适用的,1977年Nuti等^[9]首先报道了提取根瘤菌大质粒的方法,自此以后又有人报道了好多种改良的方法,用这些方法在一些快生型根瘤菌中发现了许多分子量不等的大质粒。

早在1967年Higashi^[10]把三叶草根瘤菌K₁₀₂和菜豆根瘤菌110在液体培养中混合,30分钟后加入专门感染三叶草根瘤菌的噬菌体,以裂解混合培养中的三叶草根瘤菌,他发现经这样处理后的混合菌液可以在三叶草上形成根瘤,这表明寄主专一性可以从三叶草根瘤菌转移到菜豆根瘤菌中去,于是他推论根瘤菌中至少一些与共生固氮有关的基因可能不在染色体上,随后Johnston等^[11]通过根瘤菌质粒转移,第一次证实了上述推论,他把一条带有产细菌素(Bacteriocin)基因的质粒PRL^{I,II}从豌豆根瘤菌转移到三叶草和菜豆根瘤菌受体菌株中去,结果发现在豌豆上结瘤的能力也随着转移了,这表明质粒PRL^{I,II}还至少带有跟结瘤有关的基因,现在已有许多证据表明在根瘤菌中(至少在快生型根瘤菌中)一些大质粒带有结瘤和固氮基因,这些证据是:

a. 在一些根瘤菌中可以得到不结瘤的突变体,在这些突变体中结瘤能力的缺陷总是跟

某一大质粒的丢失或缺失相关联^[12]。

b. 在一些根瘤菌菌株中某些大质粒是可自身转移的, 当把这种质粒转移到结瘤或固氮能力有缺陷的菌株去时, 后者的缺陷可以由此得到纠正^[11], 在有的条件下根瘤菌大质粒可以转移到寄主专一性不同的菌株, 甚至转移到土壤根瘤杆菌(*Agrobacterium*)中去, 而该大质粒所携带的寄主专一性也随着转移。在这些情况下, 通过琼脂糖凝胶电泳检查, 在那些转移接合子(Transconjugant)中, 都可发现新获得了一条大质粒。

c. 在固氮微生物中, 固氮酶结构基因

nif KDH 的 DNA 碱基顺序是十分相似的^[13], 用肺炎克氏杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)的 *nif* KDH DNA 做探针(Probe), 通过 DNA 分子原位杂交, 发现根瘤菌中具有同源序列的 DNA 在一些大质粒上^[14], 这至少证明在根瘤菌中, 固氮酶结构基因是在大质粒上。

d. Krol 等^[15]分别从豌豆根瘤菌菌株 PRE 和相应的类菌体分离 mRNA, 通过 DNA-RNA 分子杂交发现只有一条大质粒的 DNA 在类菌体状态时强烈表达, 这表明这条大质粒可能带有与共生固氮有关的信息。

(待续)



满江红(*Azolla imbricata*)叶片组织的环状细胞的发现

宋云 左宝玉 匡廷云 段续川
(中国科学院植物研究所光合作用研究室)

满江红(*Azolla*)又名红萍、绿萍, 是漂浮水生蕨类植物, 满江红科, 满江红属。它与满江红鱼腥藻(*Anabaena azollae*)共生, 具有光合、固氮、放氢等功能。近年来, 对它的研究受到了越来越多人的关注, 目前已成为研究的活跃领域。关于满江红的形态特征、显微和亚显微结构的研究前人做了许多工作: Sircar (1935)^[1] Kawamatu (1965)^[2]、Peters 等 (1978)^[3]、Hill (1977)^[4]、Neumüller (1981)^[5] 等人都进行了比较细致的观察。可以说, 满江红的结构基本上清楚的。但是, 他们的研究主要用的是各种切片的方法, 看到的是细胞的某一局部, 未能看到完整细胞的整体。因此迄今为止, 尚未见到一张关于满江红的整体叶肉细胞的照片, 对其叶肉细胞的全貌尚知之不多。我们采用了细胞分离制片的方法^[6, 7]对满江红的整体细胞进行了初步观察, 报道如下:

材料和方法

1. 所用材料为复瓦状满江红(*Azolla imbricata* Roxb Nakai), 是我国自然分布的。在无菌条件下将茎尖接种于液体培养基上, 在光强 6600 Lux, 温度 $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 下, 培养三周。
2. 采用了段续川 (1959)^[6]、(1962)^[7] 的细胞分离制片技术, 在光学显微镜下进行了观察和显微照像。

结果和讨论

细胞分离制片法^[6, 7]是早在六十年代我们试验室用来研究鳞茎植物和小麦叶片细胞的一种方法, 现在已成为我们研究工作中观察整体细胞的一种常规方法。方法简单, 药品易得, 它克服了传统的石蜡切片的繁琐、不能看到细胞整体和禾本科植物中硅细胞干扰的弊病。我们把这一方法首次应用于观察蕨类满江红的整体细胞, 结果表明是成功的。

在满江红叶片组织的分离制片中, 可以看到表皮细胞(图版: 6、7)被分离下来; 满江红鱼腥藻也被分离出来, 并可以清楚地看到它们具有异型胞和营养胞(图版: 5)。看来叶腔膜已破, 而藻被释放出来(满江红鱼腥藻生活在满江红背叶片的基部的共生腔中, 共生腔由叶腔膜包围)。从分离的整体叶肉细胞看, 发现它们具有两种类型: 一种是与普通绿色植物的一样, 具有叶绿体的叶肉细胞; 另一种是细胞中间有一个直达对面的洞, 就像市场上出售的面包圈(dough-nut), 我们称它为环状叶肉细胞(*Annular mesophyll cell*)(图版: 1、2、3、4)。以下把这种细胞简称为AM细胞(AM cell)。AM细胞中含有丰富的叶绿体, 且这里的叶绿体比非环状叶肉细胞中的饱满; 通过变化显微镜的焦距可以看到洞的四壁含有致密物质(图版: 1)。这种细胞迄今尚未见报道, 是一个值得探讨的问题。

Seto 和 Nasu(1975)^[8]报导过细满江红(*A. filiculoides lamark*)的气孔有两个保卫细胞, 而羽叶满江红(即复瓦状满江红)只有一个。气孔的保卫细胞是由表皮细胞特化而成, 细胞内没有发育完好的叶绿体。一般认为表皮细胞没有发育完好的叶绿体, 只有少数发育不成熟小的质体。我们所观察的表皮细胞和气孔的保

卫细胞(图版: 6, 7)与以上所说是一致的。气孔只有一个保卫细胞。而我们看到的另一种环状细胞(图版: 1、2、3、4)是叶肉细胞, 其中含有丰富的发育完好的叶绿体。这种细胞大约占总叶肉细胞的15%左右, 可见这个比例是很可观的。那么, 这种特殊结构的AM细胞的功能是什么呢? 推测它可为细胞增加表面积, 有利于物质的交换, 提高代谢强度。AM细胞内壁的致密物质可能是由于代谢旺盛和频繁的物质交换而沉积的同化物。但这仅系推测, AM细胞的功能究竟如何还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Sircar, S. M., 1935. *J. Roy. Microbiol. Soc.* III 55: 238—244.
- [2] Kawamatu, S., 1965. *Cytologia*, 30: 80—87.
- [3] Peters, G. A. et al., 1978. *New Phytol.*, 80: 583—593.
- [4] Hill, D. J., 1977. *New Phytol.*, 78: 611—616.
- [5] Neumüller, M. and Bergman, B., 1981. *physiol. Plant*, 51: 69—76.
- [6] 段续川, 1959. 植物学报, 8 (1): 1—14.
- [7] 段续川, 1962. 植物学报, 10 (4): 285—291.
- [8] Seto. K. and Nasu, 1975. *Bull. Osaka Mus. Nat. Hist.*, 29: 51—60.

小鼠 B 细胞的不同分化阶段对淋巴 细胞杂交瘤形成的影响

1. 从脾细胞中去除抗原特异性 B 细胞及前浆细胞后对阳性杂交瘤形成率的影响

沈国良 刘尔翔 吴安然

(中国医学科学院基础医学研究所 世界卫生组织免疫研究和培训合作中心)

自开创小鼠淋巴细胞杂交瘤技术以来^[1]关于 B 细胞的哪一个分化阶段参与融合并形成具有分泌抗体功能的杂交瘤, 至今没有定论。由

于 B 细胞分化各个阶段尚无统一标准, 同时由免疫母细胞转变成浆细胞的过程中尚有多种形态表现^[2], 从而给统一认识带来困难。本文拟