

固氮微生物的氢酶与固氮作用

王子芳

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

本世纪三十年代初期, Stevenson 和 Stickland 给细菌中能活化 H_2 的酶命名为“氢酶”。四十年代初, Wilson 等人首次指出棕色固氮菌具有氢酶。五十年代中期 Hock 发现了豆科植物根瘤放 H_2 , 自生固氮菌在固氮过程中放 H_2 。十年以后, Dixon 指出两株豌豆根瘤菌形成不放 H_2 的根瘤, 其类菌体中含有吸 H_2 酶(H_2 -uptake hydrogenase), 吸 H_2 酶参与固氮酶作用所释放 H_2 的再循环。从理论上计算, 固氮酶每还原一克分子 N_2 , 要消耗 35 克分子 ATP, 其中 7 克分子 ATP 用于还原质子(H^+)为 H_2 ^[1]。这个数字说明固氮微生物固氮酶催化能量损失的潜在重要性。但是在自然界, 也存在具有吸氢酶的固氮微生物, 能将固氮过程中放出的 H_2 , 加以再利用, H_2 氧化为 H^+ 是一个产生能量的过程, 理论上计算每氧化一克分子 H_2 可产生 3 克分子 ATP^[2]。为了提高固氮作用的有效性, 充分利用生物能源 H_2 , 加强氢酶与固氮作用关系的研究是完全必要的, 本综述仅提供一点这方面的研究进展。

固氮微生物与放 H_2

1. 固氮作用与放 H_2

Bulen 等的早期工作证明棕色固氮菌的固氮酶有依赖 ATP 和还原物的放 H_2 作用。此后 Koch 又证明豆科根瘤、深红红螺菌、*Anabaena cylindrica* 和 *Alnus glutinosa* 瘤中固氮酶依赖 ATP 和 $Na_2S_2O_4$ 放 H_2 。因此很清楚, 氢的释放是固氮酶反应所固有的特性。不管固氮酶的来源如何, Fe 蛋白和 MoFe 蛋白两个组分是不可缺少的, 当固氮酶两个组分的比例适宜, 并提供 N_2 作为还原底物, 通常固氮酶电子流的 25—30% 流向 H^+ , 其余用于 N_2 的还原。

现已知道, 共生和自生固氮菌体中具有氢氧化系统。Carter 等对三株吸 H_2 正反应(Hup^+)的大豆根瘤菌进行了实验, 其电子消耗分别为 21%, 13% 和 25%。大部分豇豆菌株是 Hup^+ , 而苜蓿根瘤和三叶草根瘤的菌株是 Hup^- 。大部分根瘤菌缺乏 H_2 的再循环系统, 由于放 H_2 , 损失的能量是巨大的。根据

德国表层土壤中 H_2 的丢失和吸收的估计, 以及 Burris 和 Hardy 对全球每年固氮作用的计算, Conrad 和 Seiler^[3] 推算豆科作物每年放 H_2 量为 $2.1-4.4 \times 10^{12}$ 克。宋鸿遇等^[2,7] 研究了光合细菌荚膜红假单胞菌固氮酶的光合放 H_2 作用, 证明营光合异生长的菌体由固氮酶催化放出大量的 H_2 。Benson 等发现放线菌和植物共生体如 *Alnus rubra*, *Elaeagnus commutabi*, *Ceanothus velutinus*, *Myrica californica*, *Purshia tridentata* 和 *Azolla caroliniana* 不放 H_2 或很少放 H_2 。巴西固氮螺菌的培养体在正常生长情况下不放 H_2 ^[4]。

2. 影响固氮酶放 H_2 的因素

讨论影响纯固氮酶放 H_2 的因素, 要涉及到固氮酶机制的某些方面。铁氧还原蛋白和黄素氧还蛋白是有效的电子给体, 将电子传给 Fe 蛋白。然而, 还没有肯定的证据说明豆科根瘤类菌体中具有功能性的黄素氧还蛋白, 但是含有浓度相当高的中点氧还电位为 -435mV 的铁氧还蛋白。MgATP 与 Fe 蛋白结合导致结构型变化和一个较低还原势能, 它足以去还原 MoFe 蛋白。电子从还原了的 MoFe 蛋白转移到 N_2 和 H^+ , 从而分别形成 NH_3 和 H_2 。CO 抑制固氮作用, 但不能抑制放氢, 这种现象说明 CO 结合 H^+ 和 N_2 的位点不同^[4]。基于这种观察, 固氮酶作用放 H_2 并不因为增加反应系统中的 N_2 分压而消除。如果以 Ar 代替 N_2 充满固氮酶反应, 明显地增加 H_2 的释放, 这说明在电子转移的某一点上, N_2 与 H^+ 竞争电子, 或者是当 N_2 不存在时, 具有更多的质子还原位点。

影响放 H_2 现象是多方面的, 如 ATP 的浓度, 还原底物的供给, Fe 蛋白与 MoFe 蛋白的比例, 所有这些影响到 MoFe 蛋白的周转及电子流向底物的分配。例如 ATP 和还原底物浓度适当, Fe 蛋白和 MoFe 蛋白比例高, 增加 MoFe 蛋白的周转率, 导致电子转移到 N_2 , 最少量电子转向 H^+ 。

豆科根瘤放 H_2 的主要因素是吸 H_2 酶系统存在与否。Dixon 第一个观察到用豌豆根瘤菌 311 接种 *Pisum sativum*, 其根瘤释放少量的 H_2 , 但其他菌种

接种的植物大量地放 H_2 。在菌株 311 的类菌体中证明有氢酶的活性,放 H_2 的类菌体中没有发现氢酶活性。Conrad 和 Seiler^[3] 测定了种植三叶草田里土壤表面的放 H_2 和吸 H_2 量。早春季节,没有放 H_2 ;在六月份,三叶草生长旺盛,放 H_2 量显著增加;当三叶草开始衰老时,放 H_2 量明显地下降;当植物打顶,用 NH_4Cl 作肥料,降低固氮作用,放 H_2 量减少。Bethlenfalvay 和 Phillips 报道豆科植物生长不同阶段,放 H_2 量是不同的。*Pisum sativum* 生长早期,固氮酶损失于放 H_2 的电子流大约是 60%,种植 45 天到 68 天以后,大约是 30%。如果光照从 400 增加到 $800\mu E \cdot cm^{-2} \cdot Sec^{-1}$,其结果导致每株植物放 H_2 比率增加 10 倍,但光照从 400 增加到 $1000\mu E \cdot cm^{-2} \cdot Sec^{-1}$ 观察不到三叶草根瘤放 H_2 的影响^[4]。

温度和 pO_2 对豆科根瘤放 H_2 也有影响。Dart 和 Day 指出,将温度从 20℃ 提高到 40℃, *Vigna unguiculata* 根瘤放 H_2 提高两倍。Drevon 观察到 pO_2 从 20% 提高到 40%,大豆根瘤明显地增加固氮酶活性,同时损失于放 H_2 的电子流减少 16%。这种现象解释为:在较高 pO_2 的情况下,提高了呼吸率,导致 MoFe 蛋白的周转率提高,同时减少流向 H^+ 的电子。

氢酶的生理作用

1. 氢酶的种类

生物细胞中有三类氢酶,第一类是存在于厌氧细菌中的可逆性氢酶,起电子桥的作用,第二类是单向反应的吸氢酶 (H_2 -uptake hydrogenase),只存在于好氧性固氮细菌(包括微好氧固氮细菌)和蓝绿藻体中,第三类是依赖 ATP 的放 H_2 酶。

2. 氢酶的生理作用

一般而言,吸 H_2 作用可以为有机体提供还原剂,同时产生能量。放 H_2 作用可以使某些有机体在无电子受体(不包括 H^+)时,除去过量的还原力。许多光合、好氧、兼性、厌氧细菌及蓝绿藻都能放 H_2 , 同时也能吸 H_2 。下面分别说明其 H_2 酶的生理作用。

(1) 厌氧细菌: 厌氧细菌中氢酶的作用有两方面:一是通过氢酶的放 H_2 作用将发酵过程中的还原型载体(如 NADH)氧化使之重新进入循环,并不断地从底物磷酸化提供 ΔTP 。二是许多厌氧细菌以硫酸盐、 CO_2 、硝酸盐或延胡索酸盐为最终电子受体时,通过氢酶的吸 H_2 作用,利用 H_2 作为能源,这种产能方式是电子传递磷酸化相关联的。

(2) 兼性细菌:以 *E. coli* 为例,说明兼性细菌中氢酶的作用,其作用也包括除去过剩的还原剂和产能两个方面。不过,在除去过剩的还原剂时,还与甲酸脱氢酶有关,并释放 CO_2 。*E. coli* 能利用 H_2 作为还原剂,以还原 NO_3^- 为 NO_2^- 。

(3) 好氧固氮菌:这类细菌包括根瘤菌和自生固氮菌。自从 Dixon 证实根瘤中有氢酶系统以来,人们对吸氢酶予以极大的重视,这主要是由于氢酶与固氮酶有着密切的关系。Partridge 等指出圆褐固氮菌中氢酶的作用:a. 为固氮酶免于 O_2 的损害提供保护作用,b. 由于 H_2 的再循环产生 ATP, c. 为 N_2 的还原作用提供电子。Yates 和 Walker 计算在好氧情况下,自生固氮菌可能从 H_2 的再循环中夺回用于固氮作用总能量的 12% 的能量。

(4) 光合细菌:所有检测过的光合细菌都有利用 H_2 作为还原剂以固定 CO_2 的能力。有些光合细菌有时还能以 H_2 作为唯一能源, CO_2 为唯一碳源,营化能自养。 H_2 的利用是由氢酶所介导的,这种 H_2 酶的活性受有机物和 CO 的抑制。光合细菌具有光依赖的放 H_2 作用(通过固氮酶)和吸 H_2 作用(通过 H_2 酶),也有暗中的放 H_2 作用(通过氢酶),这些作用都与生理条件有关。

(5) 蓝细菌:蓝细菌具有氢酶,根据各个种和生长条件,它们既放 H_2 ,同时也吸 H_2 ,蓝细菌区别于光合细菌的特点是前者具有两个光合系统并放 O_2 ,而后者只具有一个简单光合系统,缺乏光合系统 II,不放 O_2 。

3. 影响氢酶活性的因素

(1) pH: 氢酶所需的最适 pH 范围相当窄小。如大豆根瘤菌纯化的颗粒状氢酶以甲烯蓝为电子受体时的最适 pH 为 5.3;以铁氰酸盐为受体时的最适 pH 为 5.7;棕色固氮菌颗粒状氢酶的最适 pH 为 8.0;真培养碱菌的可溶性氢酶的最适 pH 也为 8.0 左右。氢酶对 pH 的要求是极严格的,稍微偏离最适 pH,其活性迅速下降。由于 H^+ 是放 H_2 作用的底物,又是吸 H_2 作用的产物,可以推想,低 pH 将有利于放 H_2 作用,而高 pH 则有利于吸 H_2 作用。这个推想为许多实验所证实。理论上认为, pH 的高低不仅决定 H^+ 浓度的大小,而更重要的是不同的 pH 能使氢酶的活性基团和有关部位发生不同的解离,因而使其处于不同的催化活性状态,从而直接影响着氢酶催化反应的速率,甚至还可能导致氢酶催化方向的改变。

(2) 温度: 氢酶具有热稳定性的特点。其最适反应温度在 50℃ 以上,计算氢酶反应的活化能在 26—70 千焦耳/摩尔的范围内。

(3) 金属离子: Ni 在植物和动物细胞 H_2 酶的合成和功能中具有重要作用。Bartha 和 Ordal 指出,当真培养碱杆菌营无机化能自养生长时,特别需要 Ni。Tabillion 等指出,5 株真培养碱杆菌,2 株自养黄杆菌 (*Xanthobacter autotrophicus*),1 株黄假单胞菌和 2 株节杆菌的化能自养生长时, Ni 是必需的。代表 6 个种的 12 株菌的实验中,培养在自养条件下,其中 10 株菌需要 Ni,培养在异养条件下,没有一株需要 Ni。

Friedrich 等断定,对可溶性和膜结合性的两种 H_2 酶的合成来说, Ni 都是需要的。用示踪的方法证明,在光照条件下生长的荚膜红假单胞菌中加入 Ni ,其 H_2 酶的特异活性增加,而 Ni 的最佳效果浓度大约是 $10^{-3} M$ 。Partridge 和 Yates 报道圆褐固氮菌培养在含有 EDTA 或其他螯合剂中,其 H_2 酶的表达受到抑制。Albracht 使用同位素 Ni ,用电子顺磁共振仪(EPR)测量 H_2 酶作用过程中 Ni 的参与,获得令人确信的证据。

(4) O_2 : 所有 Fe-S 蛋白的生物活性都受 O_2 的影响,氢酶也不例外。 O_2 对氢酶活性的影响分为可逆性反应与不可逆反应两种类型。a. O_2 对氢酶活性可逆性反应: 例如真养产碱菌的 H_2 酶就是属于这类酶^[13]。这类酶在有氧条件下提取,然后充 H_2 、或加入葡萄糖和葡萄糖氧化酶、或加入连二亚硫酸盐、或巯基乙醇等还原剂、或抽真空等方法,活化其氢酶。b. O_2 对 H_2 酶的不可逆性反应: 有证据表明,还原态的 H_2 酶较氧化态的 H_2 酶对 O_2 更为敏感,即使是较稳定的氧化态 H_2 酶暴露于空气中一周后,其活性显著下降,甚至失活,而这种失活是不可逆的。这种不可逆的反应与氧基尤其是 O_2^- 有关^[13]。

(5) 碳量: 限碳和 H_2 源对离体培养的根瘤菌的 H_2 酶表达是必需的。Lim 报道,在圆褐固氮菌的限碳培养基中, H_2 酶活性增加。Maier 指出,浓度为 15 mM 的碳源物质抑制大豆根瘤菌 H_2 酶活性的表达。但是,Maier 和 Merberg 描述了大豆根瘤菌的一系列突变菌株,不论是 H_2 酶活性,还是细胞生长均对 O_2 不敏感。

(6) NH_4^+ 和 NO_3^- : Lim 指出生长在 N_2 中细胞的 H_2 酶活性比生长在 NH_4^+ 或 NO_3^- 中高。Maier 指出,大豆根瘤菌在浓度达到 10mM 的 NH_4^+ 或 NO_3^- 的培养基中生长,其 H_2 酶活性就不能表达。

(7) 其他因素: 所有氢酶活性都受 CO 的抑制。有人报道氢酶活性受 10% C_2H_2 的抑制。缓冲溶液系统,如 Tris-HCl 抑制 H_2 酶活性。

4. H_2 酶基因的遗传

关于 H_2 酶基因遗传的知识,知道得很少。Carter 用 Hup^+ 和 Hup^- 的大豆根瘤菌菌株作两种接种剂,接种一系列遗传背景不同的大豆品系,所有用 Hup^- 菌株接种的根瘤放 H_2 , 而用 Hup^+ 菌株接种的根瘤很少或不放 H_2 。这些实验说明寄主植物对氢酶的表达没有影响。但 Dixon 报道豌豆根瘤菌的 Hup^+ 菌株在 *Pisum sativum* 和 *Vicia bengalensis* 的根瘤中表达 H_2 酶活性,但在 *Vicia faba* 的根瘤中不表达 H_2 酶活性,这说明寄主植物产生一定的影响。Gibson^[11] 报道根瘤菌 CB756 和 32H1 在 *Vigna radiata* 根上形成 Hup^- 根瘤,而在 *Vigna unguiculata* 和 *Vigna mungo* 根上形成 Hup^+ 根瘤。从几种 *Vigna* 植物相互嫁接实验中,

他们认为是根而不是苗的遗传型是 Hup 基因表达的重要因素,寄主植物影响 H_2 酶表达可能是与碳水化合物转移到根瘤中的种类和数量有密切关系。在大豆根瘤菌离体培养中,碳水化合物的浓度对 H_2 酶去阻遏起重大作用,这说明 H_2 酶合成的遗传信息存在于根瘤菌体内,而不在植物体内。

报道指出豌豆根瘤菌、三叶草根瘤菌、菜豆根瘤菌和苜蓿根瘤菌^[11,17]快生型根瘤菌共生基因定位于大质粒上。Brewing 发现豌豆根瘤菌带有结瘤基因质粒的杂交转移同时导致 Hup 基因的转移。杂交技术也用于真养产碱菌化能自养菌携带 Hup 基因质粒的转移^[12,16]。DeJong^[6] 用一个带有 Nod 、 Nif 和 Hup 质粒的豌豆根瘤菌菌株接种 *Pisum sativum*,得到提高固氮作用的效果。

Cantrrell^[13] 描述了,用接合转移的装配型质粒(cosmid)构建大豆根瘤菌 Hup 菌株的 DNA 克隆库。通过接合作用,将含有 Hup^+ 基因库的装配型质粒转入可逆的大豆根瘤菌 Hup^- 突变株,并筛选四环素抗性和 Hup^+ 菌落。从一系列大豆根瘤菌接合子分离质粒 DNA,并转入大肠杆菌,然后使大肠杆菌转化株与大豆根瘤菌 Hup^- 突变株进行接合转移,结果使得所有的接合子都是 Hup^+ 表型,同时都保留使大豆产生根瘤和固氮的能力。这就有可能将大豆根瘤菌克隆基因库用于转化 Hup 基因到缺乏 H_2 循环系统的根瘤菌菌种中去。

固氮微生物中 H_2 代谢过程

1. H_2 在呼吸链中的地位

H_2 代谢的过程在好气固氮细菌中研究得较多,固氮作用与吸 H_2 过程的相互关系如图 1 所示。自从根瘤菌类菌体中发现 H_2 酶活性以来,已证明 O_2 是豌豆根瘤菌和大豆根瘤菌吸 H_2 酶系统中电子最终受体,氧氢反应(Oxyhydrogen reaction)的化学计量法表明 $2MH_2$ 为 $1MO_2$ 所氧化产生 $2MH_2O$ ^[18]。 O_2 不能直接与 H_2 酶发生作用,但是从 H_2 而来的电子通过一系列携带者传给 O_2 。许多作者^[11]证明, H_2 氧化时,产生 ATP。Emerich^[13] 指出,在大豆根瘤菌类菌体中, KCN 、 NaN_3 、 NH_2OH 或 Na_2S 都抑制电子从细胞色素 C 转移到 O_2 ,显著地抑制 H_2 的吸收。

2. 氢氧化系统中的电子传递

还原型的吸 H_2 酶的第一个电子受体尚未确定。Eisbrenner^[12] 在化能自养的大豆根瘤菌吸 H_2 过程中观察到一个类似细胞色素 b 的不同光谱成分,这个成分被称为 559- H_2 ^[10] (图 1)。559- H_2 成分也存在于 Hup^+ 的大豆根瘤菌类菌体中,它的浓度比在化能自养生长的细胞中低得多。559- H_2 浓度与根瘤菌 H_2 酶的比例之间呈正相关 ($r = 0.98$)。无论是 Hup^- 突

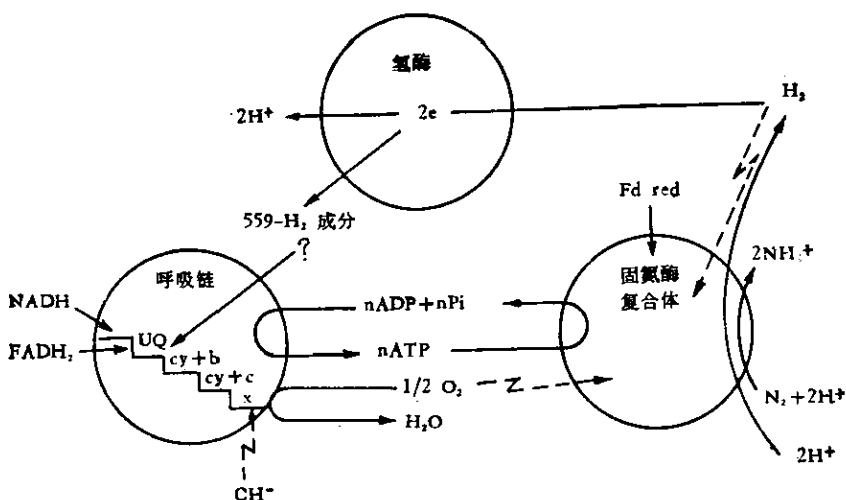


图1 固氮作用与吸 H_2 过程的相互关系

变体或是 Hup^- 野生型大豆根瘤菌菌株均不含有 559- H_2 成分。Eisbrenner 和 Evans^[10] 指出, 在吸 H_2 系统中, 这个成分可能与 H_2 酶直接相连, 它的氧化还原势能比辅酶 Q(UQ) 更低, 可能是 b 型细胞色素。关于 559- H_2 , 需要进一步研究, 并测定它在 H_2 氧化途径中的作用。

有证据表明, 辅酶 Q 是电子传递的载体, 将电子从 H_2 传给 O_2 。O'Brian 和 Maier^[20] 指出 P-苯醌参与大豆根瘤菌中的氢氧反应。用紫外线照射后, H_2 的氧化受到抑制, 但加维生素 K₁ 以后, 活性得到回复, 然而, 到目前为止, 没有证据说明维生素 K₁ 是根瘤菌的自然成分。

实验还证明, 细胞色素 b, c 在辅酶 Q 和 O_2 之间传递电子^[19, 21]。当内呼吸为吡嗪乙酸和丙二酸盐所抑制时, 增加 H_2 , 导致细胞色素反应率显著地增加。这种现象可能假设为, H_2 氧化过程中, 细胞色素 b, c 具有比辅酶 Q 更高的氧化还原势能。

氢酶与固氮作用的关系

Dixon 指出, 固氮微生物中 H_2 氧化系统的几点可能的好处: a. H_2 氧化反应中, 大量消耗 O_2 , 从而保护了固氮酶对 O_2 的敏感; b. 氧化作用可以除去固氮作用过程中所产生 H_2 对固氮酶的抑制作用; c. H_2 的氧化作用可以提供固氮作用和其它过程中所需要的 ATP。

H_2 再循环的好处已经在几种不同的固氮微生物中得到验证, 如在 *Anabaena cylindrica*, *Anabaena* 7120^[22], 圆褐固氮菌以及大豆根瘤菌类菌株中都证实具有固氮酶抗 O_2 损伤的保护作用。Dixon^[23] 指出, 豌豆和羽扇豆根瘤中 H_2 的浓度可能达到抑制固氮酶的

作用。因此根瘤中的吸 H_2 酶系统具有很大意义。在大豆根瘤菌类菌株中, 当 H_2 氧化时, ATP 浓度增加, Nelson 和 Salminen^[19] 观察到豌豆根瘤菌的某些菌株含有吸 H_2 系统, 这个系统是与 ATP 的合成相结合。Pedrosa^[22] 报道加 H_2 到碳饥饿的 *A. brasilense* 培养体中, 大大增加了 C_2H_4 还原的比率。

豆科根瘤中 H_2 再循环的有利效果已为 Evans^[14, 15] 和 Pate^[21] 一系列实验所证实。他们用单株野生型 Hup^+ 和 Hup^- 或二者混合进行的实验指出, 用 Hup^+ 菌株接种, 植物干物质产量和总氮量均增加。

Dejong 将由两株土著豌豆根瘤菌菌株质粒组成的重组体 PU1008 质粒转移到豌豆根瘤菌菌株 300 和 3622 中去, 构成的新菌株 3960 和 3963 都是 Hup^+ , 它们具有固氮酶活性和结瘤功能, 比受体菌株固定更多的 N_2 , 植物干重也有增加。Rainbird^[23] 测定豇豆根瘤菌的 Hup^+ 菌株对 *Vigna unguiculata* 的“C”素经济效果。在整个生长期, 由 Hup^+ 菌株所形成的根瘤释放 CO_2 的比率明显地降低, 消耗的碳水化合物比 Hup^- 菌株形成的根瘤少 10%。

对 Hup^+ 菌株的增产作用, 有的研究者持相反的意见。Gibson^[17] 用豇豆根瘤菌进行实验, 发现增加 H_2 对 $^{15}N_2$ 的固定作用或 C_2H_4 还原比率没有明显地增加, 植物的总氮或干重也没有明显地增加。迄今, 三叶草、豌豆和羽扇豆所提供的资料说明, 还未发现含有足够的吸 H_2 酶活性去再循环固氮酶作用过程中释放的 H_2 的菌株。

从上面两种意见来看, 虽然对 H_2 再循环能力的估价和利用, 以及 Hup^+ 菌株接种豆科植物, 提高其干重和含氮量的效益有不同看法, 但是从理论上分析, H_2 再循环能力的利用仍然是一种可考虑的潜在力量。

参 考 文 献

- [1] Beringer, J. E.: *J. Gen. Microbiol.*, 116: 1—7, 1980.
- [2] Brewin, N. J.: In *Genetic Engineering of Symbiotic Nitrogen Fixation and Conservation of Fixed Nitrogen*, ed. J. M. Lyons et al., pp. 65—78, 131—136, New York: Plenum, 698 pp., 1981.
- [3] Cantrell, M. A. et al.: *Abstr. 1st. Int. Symp. on "Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interaction"* Bielefeld, West Germany, 1982.
- [4] Chan, Y. K. et al.: *Can. J. Microbiol.*, 26: 1126—1131, 1980.
- [5] Conrad, R. and W. Seiler: *J. Geophys. Res.*, 85: 5493—5498, 1980.
- [6] Delong, T. M. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 128: 1829—1838, 1982.
- [7] Denarie, J. et al.: In *Current Perspectives in Nitrogen Fixation*, ed. A. H. Gibson, W. E. Newton, pp. 137—141, 407, New York: Elsevier/North Holland, 434pp, 1981.
- [8] Dixon, R. O. D. et al.: *Plant Sci. Lett.*, 23: 109—116, 1981.
- [9] Eisbrenner, G. and H. J. Evans: *J. Bacteriol.*, 149: 1005—1012, 1982.
- [10] Eisbrenner, G. and H. J. Evans: *Plant Physiol.*, 70: 1667—1672, 1982.
- [11] Eisbrenner, G. and H. J. Evans: *Ann. Rew. Plant Physiol.*, 34: 105—136, 1983.
- [12] Eisbrenner, G. et al.: *Arch. Microbiol.*, 132: 230—235, 1982.
- [13] Emerich, D. W. et al.: *Plant Physiol.*, 66: 1061—1066, 1980.
- [14] Evans, H. J. et al.: *Isr. J. Bot.*, 31: 72—88, 1982.
- [15] Evans, H. J. et al.: *See Ref.*, 7: 84—96, 1981.
- [16] Friedrich, B. et al.: *J. Bacteriol.*, 147: 198—205, 1981.
- [17] Gibson, A. H. et al.: *See Ref.*, 7: 373, 1981.
- [18] McCrae, R. E. et al.: *B. B. R. C.*, 80: 384—390, 1978.
- [19] Nelson, L. M. and S. O. Salminen: *J. Bacteriol.*, 151: 985—995, 1982.
- [20] O'Brian, M. R. and R. J. Maier: *Abstr. Ann. Meet. Am. Soc. Microbiol.*, p. 153, 1982.
- [21] Pate, J. S. et al.: *See Ref.*, 7: 105—116, 1981.
- [22] Pedrosa, F. O. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 128: 161—166, 1982.
- [23] Rainbird R. M. et al.: *Plant Physiol.*, 71: 122—127, 1983.
- [24] Rivera-Ortiz, J. M. and R. M. Burris: *J. Bacteriol.*, 123: 537—545, 1975.
- [25] Schneider, K. and H. G. Schlegel: *Biochem. J.*, 193: 99—107, 1981.
- [26] Silsbury, J. H.: *Plant Physiol.*, 67: 599—602, 1981.
- [27] 宋鸿遇等: *植物生理学报*, 5(3): 237—243, 1979.
- [28] 陆因奎: *植物生理学报*, 9(2): 183—191, 1983.