

# 固氮螺菌与植物的相互关系研究进展

阎大来 何路红 李季伦

(北京农业大学农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094)

固氮螺菌 (*Azospirillum*) 首先是从巴西热带禾本科牧草俯仰马唐 (*Digitaria decumbens*) 根际分离得到的<sup>[1,2]</sup>, 由于它分布广泛, 联合寄主种类很多, 尤其是可与许多禾本科作物及牧草联合共生, 成为最受重视的联合共生固氮菌。许多实验室开展了对固氮螺菌的研究, 在其分类、生理生化、遗传和生态等方面均取得了进展。近一时期, 固氮螺菌与植物相互关系的研究尤引人注目, 获得了不少新的信息。

固氮螺菌在根际的存活与增殖取决于许多因素。固氮螺菌能形成孢囊型结构, 产生嗜铁素和植物生长刺激素, 且能游动, 对根分泌物有趋化性, 这些特点对其在根际土壤中的竞争性存活有重要意义。固氮螺菌还具有穿透植物组织的能力, 这对其在根上的定植也很重要。根际土壤环境因素如温度、湿度、pH 值、氧分压、碳氮源及矿质元素等因季节和作物的不同而经常变化, 对固氮螺菌的存活与增殖也会产生很大影响。固氮螺菌分布范围极广, 其对各种环境因素的变化, 尤其是一些逆境条件, 必然存在许多不同的适应机制。虽然固氮螺菌与根瘤菌 (*Rhizobium*) 不同, 寄主专一性不高, 但许多实验结果表明, 它与植物之间也存在着很强的联系, 这方面的研究工作目前正在各个实验室大量开展。

## 1 在土壤中的存活

1.1 孢囊型结构: Eskew 等<sup>[3]</sup>发现巴西固氮螺菌 Sp7 的老培养物形成了一种孢囊状结构, 称其为孢囊型。固氮螺菌的孢囊型呈卵状, 比营养细胞大, 没有鞭毛不能游动, 含有 PHB 颗粒<sup>[4]</sup>; PHB 含量可达细胞干重的 57%<sup>[5]</sup>。伴随孢囊型的出现, 固氮螺菌的固氮酶活性明显下降<sup>[3]</sup>, 但有报道发现巴西固氮螺菌孢囊型与植物愈伤组织联合共生时, 具有固氮能力<sup>[4]</sup>。

固氮螺菌孢囊型结构中常含有数个细胞, 周围的荚膜主要由多糖组成<sup>[4]</sup>。在液体培养基中, 具有荚膜的细胞凝集成肉眼可见的絮状物, 对其分析发现, 包在孢囊型外的纤维状物质主要由纤维素和一些荚膜多糖 (CPS) 组成<sup>[6]</sup>, 这一结构加强了固氮螺菌的抗干旱和抗高温能力<sup>[7]</sup>, 说明 CPS 对其抗逆性有重要意义。Bastarrachea 等<sup>[8]</sup>在含刚果红的培养基上筛选到巴西固氮螺菌和产脂固氮螺菌的无荚膜突变株, 它们不能合成胞外多糖 (EPS), 也不能形成孢囊型, 但这种突变并不影响其对植物根的感染能力, 这说明固氮螺菌孢囊型的形成可能与其在根上的定植无关, 而与在土壤中的存活相关。

**1.2 嗜铁素:**铁元素在土壤中大多以不可溶状态存在,在固氮螺菌中发现了数种嗜铁素<sup>[9,10]</sup>,主要是含酚盐型的多肽类物质,其对三价铁元素有很高的亲合力。在固氮螺菌中伴随着嗜铁素的合成还有数种膜蛋白的合成,其中有的可能参与铁的运输。在固氮菌中,铁和钼是固氮酶结构中的重要成分,Saxena 等<sup>[11]</sup>发现,在钼缺乏的条件下,产脂固氮螺菌 D2 嗜铁素的合成加强,表明钼的吸收也是利用铁的运输系统。已有报道分离到丧失铁吸收利用功能的巴西固氮螺菌突变株<sup>[12]</sup>。虽然推测嗜铁素是固氮螺菌与其它土壤微生物竞争中的一个重要因子,但其作用机制尚不清楚。

**1.3 其它因子:**固氮螺菌可以在培养基中产生细菌素,但其在土壤中是否产生尚不清楚,当将其粗提液加入灭菌土壤后,细菌素活性很快就消失了<sup>[13]</sup>。

土壤细菌吸附于土壤颗粒,可以防止雨水将其冲入深层土壤,巴西固氮螺菌 Cd 可以很强地吸附在土壤或泥炭颗粒上,而不被水冲掉,当加入可吸引菌的物质如根分泌物后,发现这种吸附能力下降<sup>[14]</sup>。

## 2 在根上的定植

**2.1 游动与趋化性:**固氮螺菌具有鞭毛可以游动,这是其趋化性和趋氧性的基础,用转座子随机诱变已分离到丧失鞭毛(Fla<sup>-</sup>)和趋化性(Che<sup>-</sup>)的突变株<sup>[15]</sup>。低氧分压和许多化合物对固氮螺菌具有吸引作用,已建立了区分其趋氧性和趋化性的实验方法<sup>[16]</sup>。在具有溶氧梯度的培养基中,固氮螺菌游向低氧分压区域<sup>[17]</sup>,如在无氮半固体培养基中,菌在培养基表面下形成一层菌膜<sup>[18]</sup>。巴西固氮螺菌 Cd 对天冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸、阿拉伯糖、半乳糖、琥珀酸和苹果酸有趋化性<sup>[16]</sup>;产脂固氮螺菌主要对蔗糖有趋化性,但它并不能利用蔗糖,在小麦根分泌物中含有蔗糖酶,可将蔗糖水解成可利用的果糖和葡萄糖,它们对菌的吸引力更强<sup>[19]</sup>。固氮螺菌对某些可利用的有机酸或糖并无趋化性,说明某一底物是否被利用与其对菌的吸引能力并不绝对相关。Reinhold 等<sup>[20]</sup>对从不同植

物根际分离到的固氮螺菌进行分析,发现其趋化性可能具有菌株特异性。

**2.2 与根皮层的识别:**Umali-Garcia 等<sup>[21]</sup>发现固氮螺菌在根毛上的吸附比其它土壤微生物更为有效,说明其与寄主植物之间可能存在一种特殊的识别机制。后来发现不同的巴西固氮螺菌和产脂固氮螺菌菌株可以与麦胚凝集素相结合,麦胚凝集素是禾本科中研究最多的外源凝集素,而固氮螺菌不能识别大豆的外源凝集素<sup>[22]</sup>。根据分析不同外源凝集素对固氮螺菌的亲合力强弱,Yagoda-Shagam 等<sup>[23]</sup>提出固氮螺菌与外源凝集素的识别可能与表面的多糖类物质有关,这与根瘤菌和豆科植物共生识别特点相似。在巴西固氮螺菌中现已克隆出一些可以互补恢复丧失胞外多糖合成能力突变株(Exo<sup>-</sup>)的校正片段<sup>[24]</sup>,其也可以恢复苜蓿根瘤菌 Exo<sup>-</sup>的固氮能力,这有力地支持了上面的假设。对有固氮螺菌定植的根进行电镜观察,发现菌是通过一种纤维状物质固着于根部的<sup>[25]</sup>。

**2.3 在根部组织中的定植:**1977 年 Okon 等<sup>[26]</sup>发现固氮螺菌可以在玉米根部组织中定植,用荧光抗体免疫技术,发现固氮螺菌是在表皮与皮层组织之间的周质空间内定植的<sup>[27]</sup>。有证据表明固氮螺菌是在侧根的突出部分侵入根内的<sup>[28]</sup>,电镜观察发现固氮螺菌可以在皮层细胞间隙通透,推测这是其定植过程中的一步,固氮螺菌可产生的果胶酶可能参与这一过程<sup>[29]</sup>。

## 3 植物激素类物质的产生

1979 年 Tien 等<sup>[30]</sup>发现用巴西固氮螺菌接种后,植物根毛和侧根数量增加,这一作用可用 IAA、激动素和赤霉素 A<sub>3</sub> 的混和物所代替,推测固氮螺菌可以产生植物生长素、细胞分裂素和赤霉素类物质。Reynders 和 Vlassak<sup>[31]</sup>用层析法检测到固氮螺菌产生的 IAA。由于 IAA 可从固氮螺菌中很快分泌出来,并且产量较高易于检测,故而固氮螺菌产生植物激素的研究主要集中在 IAA 上。

为了确定固氮螺菌 IAA 的产生对植物的作用,曾用 5-氟色氨酸筛选到一些 IAA 超量与

低量产生突变株<sup>[32,33]</sup>。接种实验表明, IAA 低量产生突变株丧失了增加侧根数量和长度的能力<sup>[34]</sup>, 而超量产生突变株则与野生菌株的效果基本相同<sup>[35]</sup>。

在细菌和植物中, IAA 的生物合成基本上均以色氨酸为前体, 在巴西固氮螺菌和产脂固氮螺菌中色氨酸合成途径中的一些基因已被克隆<sup>[36,37]</sup>。从色氨酸到 IAA 的合成途径不只一种, 较清楚的有如下两个:

IAM 途径: Trp → IAM (吲哚乙酰胺) → IAA

转氨途径: Trp → IPyr (吲哚丙酮酸) → IAld (吲哚乙醛) → IAA

用 Tn5 随机诱变方法没有得到巴西固氮螺菌和产脂固氮螺菌完全丧失 IAA 合成能力的突变株<sup>[38,39]</sup>, 说明在固氮螺菌中可能存在着不只一个的 IAA 合成途径。Ruckdaschel 等<sup>[37]</sup>对产脂固氮螺菌进行分析, 发现其 IAA 的合成不通过 IAM 途径。转氨途径中的 Trp → IPyr 过程在细菌中是由非特异性的芳香族转氨酶催化的, 在产脂固氮螺菌中已发现有四种这样的转氨酶<sup>[40]</sup>, 其中之一的基因已被克隆<sup>[37]</sup>。Katzy 等<sup>[41]</sup>分离到一个巴西固氮螺菌 Sp245 的 Tn5-Mob 插入突变株, 是 IAA 低量产生突变株, 分析发现突变位于该菌株的一个 85MDa 质粒上。对一株巴西固氮螺菌 Sp6 的 Tn5 插入突变株进行分析, 发现其可积累大量的 IAM, 推测在巴西固氮螺菌中存在 IAM 途径, 该突变株可能是 IAM 水解酶 (催化 IAM → IAA) 的基因发生了突变, 用杂交法已从巴西固氮螺菌 Sp245 的基因文库中筛选到一个可以恢复其 IAA 合成能力的 DNA 片段<sup>[42]</sup>。进一步的代谢分析表明, 在巴西固氮螺菌中可能存在三种不同的 IAA 合成途径, 其中之一不依赖于色氨酸<sup>[43]</sup>。

因为检测限的原因, 现在尚不清楚固氮螺菌细胞分裂素的产生量。用生物学方法测定 1 或 3d 的巴西固氮螺菌或产脂固氮螺菌培养物, 发现分泌到培养基中的细胞分裂素低于 0.5ng/ml<sup>[44]</sup>, 用放射免疫法测定也仅发现痕量的反应<sup>[45]</sup>。用色质联机方法, 在产脂固氮螺菌

培养物中检测到赤霉素 A<sub>1</sub>、A<sub>3</sub> 和异 A<sub>3</sub>, 浓度范围在 20—40pg/ml<sup>[46]</sup>。用放射免疫法在固氮螺菌的老培养物中检测到脱落酸, 但浓度仅为 0.4ng/ml<sup>[45]</sup>。

#### 4 根生理和形态上的变化

Bashan 等<sup>[47]</sup>发现, 用固氮螺菌接种小麦后, 其全根的质子流加强, 这推测是与固氮螺菌在根部定植后引发的对矿质元素的吸收加强作用有关。Hadas 和 Okon<sup>[48]</sup>用巴西固氮螺菌接种苗期番茄, 发现植物体内参与三羧酸循环的酶活性增强。

固氮螺菌接种后, 植物形态上主要的变化是根毛和侧根数量增多, 同时根尖与根毛区的间距缩短, 侧根根毛数量也有增加<sup>[30,49,50]</sup>。这些变化的主要原因推测是固氮螺菌分泌的植物激素造成的。Kucey<sup>[51]</sup>发现接种固氮螺菌的小麦根际范围较不接种的小, 但由于根表面积扩大, 以及根生理上的变化, 可以促使植物更有效地吸收矿质元素, 这会对作物产量起促进作用。

固氮螺菌与植物相互关系的研究远非完善, 还需要进行大量详尽的研究, 其结果一方面可以指导固氮螺菌在田间的实际应用, 配合其固氮作用的充分发挥, 另一方面也可以作为联合共生固氮菌与植物相互关系的模式。

#### 参 考 文 献

- [1] Dobereiner J. Day J M. Proceeding of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation. Newton. W. E & Nyman. C. J. (eds.), Washington State University Press. Pullman. 1976. 518—538.
- [2] von Bulow J F W. Dobereiner J. Proc Natl Acad Sci USA. 1975. 72: 2389—2393.
- [3] Esekew D L. Foelt D D. Ting I P. Appl Environ Microbiol. 1977. 34: 582—585.
- [4] Berg R H. Tyler M N. Novick N J. et al. Appl Environ Microbiol. 1980. 39: 642—649.
- [5] Bleakley B H. Appl Environ Microbiol. 1988. 54: 2986—2995.
- [6] Sadasivan L. Neyra C A. J Bacteriol. 1985. 163: 716—723.
- [7] Sadasivan L. Neyra C A. J Bacteriol. 1987. 169: 1670—

- 1677.
- [8] Bastarrachea F, Zaaamudio M, Ruvas R. *Can J Microbiol.* 1988. **34**: 24--29.
- [9] Bachhawat A K, Ghosh S. *J Gen Microbiol.* 1987. **133**: 1759--1765.
- [10] Saxena B. *J Gen Microbiol.* 1986. **132**: 2219--2224.
- [11] Saxena B. *Curr Microbiol.* 1989. **19**: 291--295.
- [12] Bazzicalupo M, Fani R, Fantappie O, Nitrogen Fixation. Polsinelli M, Materassi R, Vincenzini M (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, 1991. 291--292.
- [13] Oliveira R G B, Drozdowicz A. *Azospirillum N*: Genetics, Physiology, Ecology. Klingmuller W (ed.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, 1988. 101--108.
- [14] Bashan Y, Levanony H. *J Gen Microbiol.* 1988. **134**: 1811--1820.
- [15] van Rijn P. *Appl Environ Microbiol.* 1990. **56**: 990--996.
- [16] Barak R. *J Appl Microbiol.* 1983. **53**: 399--403.
- [17] Okon Y *et al.* *Microb Ecol.* 1980. **6**: 277--280.
- [18] Nur I. *Can J Microbiol.* 1980. **26**: 714--718.
- [19] Heinrich D, Hess D. *Can J Microbiol.* 1985. **31**: 26--31.
- [20] Reinhold B, Hurek T, Fendrik I. *J Bacteriol.* 1985. **162**: 190--195.
- [21] Umali-Garcia M. *Appl Environ Microbiol.* 1980. **39**: 219--226.
- [22] Del Gallo M M, Negi M, Neyra C A. *J Bacteriol.* 1989. **171**: 3504--3510.
- [23] Yagoda-Shagam J. *Appl Environ Microbiol.* 1988. **54**: 1831--1837.
- [24] Michiels K W, Vanderleyden J, Vangool A. *et al.* *J Bacteriol.* 1988. **170**: 5401--5404.
- [25] Gafny R. *Soil Biol Biochem.* 1986. **18**: 69--75.
- [26] Okon Y. *Appl Environ Microbiol.* 1977. **33**: 85--88.
- [27] Schank S C. *Soil Biol Biochem.* 1979. **11**: 287--295.
- [28] Reinhold B, Hurek T. Nitrogen Fixation with Non-legumes. Skinner F A (eds.), Kluwer Academic Press, Dordrecht, 1989. 209--218.
- [29] Umali-Garcia M. Environmental Role of Nitrogen-Fixing Blue-Green Algae and Asymbiotic Bacteria. *Ecol. Bull.*, Stockholm 26. 1978. 373--379.
- [30] Tien T M. *Appl Environ Microbiol.* 1979. **37**: 1016--1024.
- [31] Reynders L, Vlassak K. *Sol Biol Biochem.* 1979. **11**: 547--548.
- [32] Hartmann A *et al.* *Can J Microbiol.* 1983. **29**: 916--923.
- [33] Marocco A. *Azospirillum I*: Genetics, Physiology, Ecology. Klingmuller, W. (ed.), Birkhauser Verlag, Basel, Boston, Stuttgart, 1983. 149--158.
- [34] Barbieri P. *FEMS Microbiol Lett.* 1986. **36**: 87--90.
- [35] Kapulnik Y. *Can J Microbiol.* 1985. **31**: 881--887.
- [36] Zimmer W. *Mol Gen Genet.* 1991. **1229**: 41--51.
- [37] Ruckdaschel E *et al.* *Mol Gen Genet.* 1991. **1229**: 301--302.
- [38] Abdel-Salam M S, Klingmuller W. *Mol Gen Genet.* 1987. **210**: 165--170.
- [39] Barbieri P. *Mol Gen Genet.* 1991. **1229**: 161--168.
- [40] Rackdaschel, E.: *Mol Gen Genet.* 1988. **211**: 49--53.
- [41] Katzy E. *FEMS Microbiol Lett.* 1990. **72**: 1--4.
- [42] Costacurta A. *Symbiosis.* 1992. **13**: 151--158.
- [43] Costacurta A. 9th International Congress on Nitrogen Fixation: Program and Abstracts, 1992. EXS 151.
- [44] Zimmer W, Bothe H. *Plant Soil.* 1988. **110**: 239--247.
- [45] Kolb W, Martin P. *Azospirillum II*: Genetics, Physiology, Ecology. Klingmuller W (ed.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 1985. 215--221.
- [46] Bottini R. *Plant Physiol.* 1989. **90**: 45--47.
- [47] Bashan Y. *Can J Microbiol.* 1989. **35**: 691--697.
- [48] Hadas R, Okon Y. *Biol Fertil Soils.* 1987. **5**: 241--247.
- [49] Jain D K, Patriquin D G. *Can J Microbiol.* 1985. **31**: 206--210.
- [50] Morgenstern E, Okon Y. *Arid Soil Res Rehabil.* 1987. **1**: 211--217.
- [51] Kucey R M N. *Can J Microbiol.* 1988. **34**: 735--739.