

自生条件下根瘤菌固氮酶活性的表达*

邹小鲁 黄维南

(福建省亚热带植物研究所)

提 要

在自生条件下,测定从四种热带豆科植物中分离得到的七株根瘤菌乙炔还原能力,获得四株根瘤具有固氮活性。南洋楹菌株8638L、8638M、8638S和四棱豆菌株PS,其中菌株8638L和PS表现较高的固氮活性。结果表明,在培养基中含有低浓度氮源(谷氨酰胺)、两种碳水化合物(阿拉伯糖和琥珀酸钠)及低浓度的氧,是根瘤菌表达较高固氮酶活性所必需的。菌株8638L和PS固氮酶表达最适氧浓度为1%,谷氨酰胺浓度分别为2mMol/L或3mMol/L,最适pH范围在5.6~6.0之间。

根瘤菌在自生条件下固氮酶活性的表达^[6],突破了根瘤菌只有与高等植物共生才能固氮的概念。虽然,已证明豇豆型根瘤菌^[6]、豌豆根瘤菌^[7]、大豆根瘤菌^[8]、苜蓿根瘤菌^[9]三叶草根瘤菌^[10]的一些菌株在特定培养基中均具有自生固氮能力,但是,许多根瘤菌株仍测不出固氮活性。为了在纯培养条件下进一步了解促进根瘤菌自生固氮的关键因子,阐明根瘤菌固氮酶系的合成和活性表达的机理及调节,我们研究数株热带豆科植物共生的根瘤菌在自生条件下固氮酶的表达,初步探讨影响固氮酶表达的生理因素。

材 料 与 方 法

一、菌株与培养条件

根瘤菌菌株8638L, 8638M, 8638S系由南洋楹 *Albizia falcata* 根瘤分离得到^[1], 菌株PS系从四棱豆 *Psophocarpus tetragonolobus* 根瘤中分离得到;根瘤菌菌株858A是从灰金合欢 *Acacia glauca* 根瘤中得到^[2];菌株R1, R4系由银合欢 *Leucaena leucocephala*根瘤中分离得到的。

二、根瘤菌培养基成分及培养条件按黄维南等方法^[3]。

三、固氮酶诱导及测定

参照CS7培养基配方^[6],取培养好的培养物接种于CS7斜面(50ml三角瓶盛10ml固体培养基),于28℃培养5天,换翻口橡皮塞,抽气充氮,注入3ml乙炔,继续诱导4天后,测定固氮酶活性^[1]。

*本室蔡龙祥、蓝谷等同志提供菌种,特此致谢。国家自然科学基金资助。

本文于1989年9月26日收到。

表1 不同根瘤菌菌株在CS7培养基上乙炔还原能力的测定

菌 株	乙炔还原能力	生 长 类 型	宿 主
858A	-	快 生 型	灰 金 合 欢
R1	-	快 生 型	银 合 欢
R4	-	快 生 型	银 合 欢
8638L	++	慢 生 型	南 洋 楹
8638M	+	慢 生 型	南 洋 楹
8638S	+	慢 生 型	南 洋 楹
PS	++	慢 生 型	南 洋 楹

注：“+”表示有乙炔还原能力。“-”表示测不出乙炔还原能力。

四、菌体蛋白含量测定参照黄维南等方法^[5]。

结 果

一、不同来源根瘤菌菌株固氮酶活性表达

表1表明,不同来源的根瘤菌菌株在CS7培养基上,固氮酶诱导情况各不相同。快生型根瘤菌菌株R1, R4和858A均测不出固氮活性,而慢生型根瘤菌菌株8638L、8638M、8638S和PS皆表现自生固氮能力。其中菌株8638L和PS表现较高的固氮活性。因此,我们选择其作进一步研究。

二、氮源对根瘤菌固氮酶活性的影响

根瘤菌纯培养的固氮活性,一般只有在培养基中有少量结合态氮时才表现出来。对菌株8638L,当氮源浓度为 2mMol/L 时,谷氨酰胺(Gln)、天冬酰胺(Asn)、天冬氨酸(Asp)和硫酸铵较有利;尿素、谷氨酸(Glu)、蛋白胨效果次之;硝酸钾、赖氨酸(Lys)效果最少。而对菌株PS,当氮源浓度为 3mMol/L 时,只有谷氨酰胺、天冬氨酸和谷氨酸较有利,其余效果较差(表2)。实验表明,谷氨酰胺是两株根瘤菌固氮酶诱导的最适氮源。适量浓度的谷氨酰胺对固氮酶诱导具有促进作用(图1),过高或过低浓度不利于固氮酶的表达。

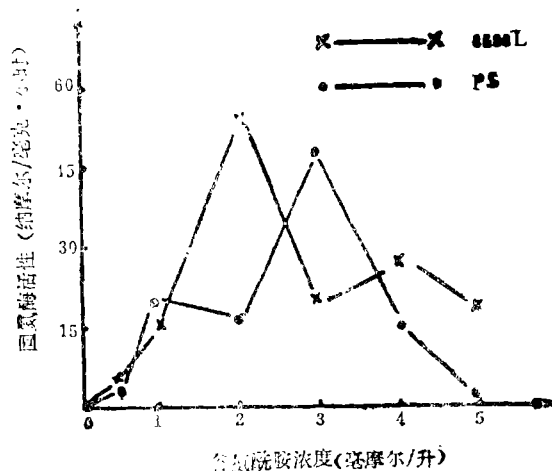


图1 谷氨酰胺浓度对根瘤菌菌株8638L和ps固氮酶达的影响
×—× 8638L •—• PS

表2 不同氮源对根瘤菌菌株8638L和PS生长及固氮酶活性的影响

氮 源	8638L		PS	
	固氮酶活性 (nMol/mg·h)	菌体蛋白量 (mg/瓶)	固氮酶活性 (nMol/mg·h)	菌体蛋白量 (mg/瓶)
谷氨酰胺	53.2	1.7	45.3	1.7
谷 氨 酸	15.5	0.9	25.3	0.7
天冬酰胺	22.6	1.5	1.0	2.0
天冬氨酸	25.0	0.9	21.7	0.8
赖 氨 酸	2.1	0.3	0	0.2
尿 素	12.6	1.4	4.5	1.6
硫 酸 铵	25.0	1.8	8.8	1.7
硝 酸 钾	1.8	1.4	2.5	1.1
蛋 白 胨	12.1	0.6	1.0	2.0

三、碳源对根瘤菌固氮酶活性的影响

除了氮源以外,碳源是根瘤菌自生条件下表现固氮能力最重要的培养基成分。阿拉伯糖加琥珀酸钠对根瘤菌自生条件下固氮酶的表达具有明显的促进作用(表3),其余各类碳源效果较差。在单独以阿拉伯糖或琥珀酸钠作为碳源培养条件下,两株根瘤菌均未测出固氮活力。

表3 不同碳源对根瘤菌菌株8638L和PS生长固氮酶活性的影响

碳 源	8638L		PS	
	固氮酶活性 (nMol/mg·h)	菌体蛋白量 (mg/瓶)	固氮酶活性 (nMol/mg·h)	菌体蛋白量 (mg/瓶)
阿拉伯糖+ 琥珀酸钠	52.6	1.5	44.7	1.8
木 糖	11.3	1.7	1.1	2.0
核 糖	6.0	1.4	6.2	1.9
甘 露 糖	4.1	1.7	0.5	1.7
葡 萄 糖	2.0	1.6	0.2	1.8
蔗 糖	1.2	1.7	0	1.4
半 乳 糖	5.0	1.4	0	1.7
果 糖	11.1	1.4	0.4	2.0
甘 油	8.1	1.5	0	1.7
阿 拉 伯 糖	0	1.4	0	1.4
琥 珀 酸 钠	0	1.4	0	1.5

注:碳源浓度为25毫摩尔/升。

以丙酮酸或三羧酸循环中间产物代替CS7培养基中的琥珀酸培养结果表明(表4),丙酮酸或苹果酸对菌株8638L固氮酶表达有一定的效果。对菌株PS而言, α -酮戊二酸有一定的作用,但也仅为琥珀酸培养条件下的固氮酶活性的1/3左右。

表4 与三羧酸循环相关的化合物对根瘤菌菌株8638L和PS生长及固氮酶活性的影响

碳 源	8638L		PS	
	固 氮 酶 活 性 (nMol/mg·h)	菌体蛋白量 (mg/瓶)	固 氮 酶 活 性 (nMol/mg·h)	菌体蛋白量 (mg/瓶)
琥 珀 酸	53.6	1.4	47.5	1.5
丙 酮 酸	44.3	1.8	9.5	1.6
苹 果 酸	33.2	1.4	0.7	1.6
延胡索酸	0.3	0.8	0.4	1.1
α -酮戊二酸	15.4	1.3	17.1	1.3

注：碳源浓度为25毫mMol/L

四、氧浓度对根瘤菌固氮酶活性的影响

和其它自生固氮菌一样，根瘤菌固氮酶对氧是敏感的。但是，为了保证根瘤菌本身生长与呼吸代谢水平，也需要适量的氧。图2表明，菌株8638L和PS在固体斜面上，固氮酶活性表达的最适初始氧浓度约为1%左右。在诱导过程中，加入5%氧，就抑制固氮酶活性的表达（图3）。

五、培养基的pH对根瘤菌固氮酶活性的影响

培养基的pH影响着根瘤菌的生长和固氮酶表达。表5表明，在pH5.6~6.0之间比较有利于根瘤菌固氮酶活性的表达。

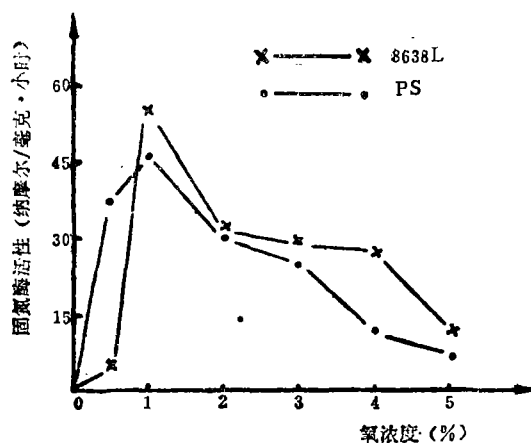
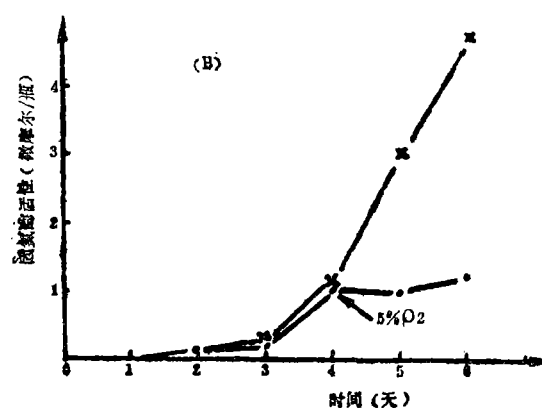
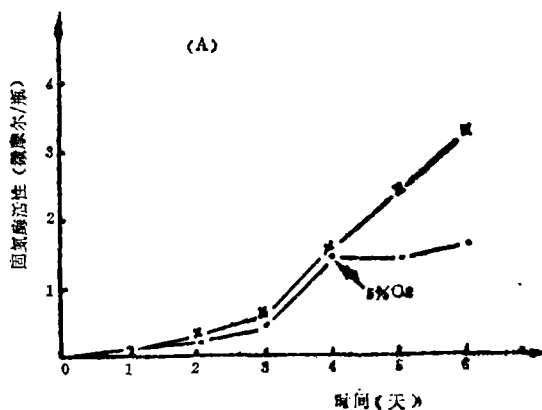


图2 氧浓度对根瘤菌菌株8638L和PS固氮酶表达的影响



(A), 8638L

(B), PS

图3 根瘤菌菌株8638L和PS乙炔还原时间进程

(A): 8638L, (B): PS

讨 论

根瘤菌固氮酶基因的表达, 需要一些专一条件, 包括限量氮源, 适当的碳源, 合适的氧浓度^[11]。此外, 培养菌龄、环境的pH值、温度等因素也会影响固氮酶基因的表达。虽然这些因素对于不同种系的根瘤菌, 可能会产生不同结果。但是, 固氮酶活性形成的基本要求还是一致的。

表5 固体培养时, pH对根瘤菌菌株8638L和PS固氮酶活性的影响

pH	8638L		PS	
	固氮酶活性 (nMol/mg·h)	菌体蛋白量 (mg/瓶)	固氮酶活性 (nMol/mg·h)	菌体蛋白量 (mg/瓶)
5.4~5.0	23.3	1.0	23.6	1.6
5.6~6.0	55	1.4	48.1	1.7
6.1~6.5	18.5	1.6	16.3	1.9
6.6~7.0	12.8	1.2	12.8	1.2
7.1~7.8	6.1	1.4	7.3	1.1
8.0~8.4	2.3	1.2	2.6	1.1

根瘤菌生长所需的氮源及其水平, 影响着固氮酶的表达^[12]。实验表明, 谷氨酰胺是根瘤菌菌株8638L和PS固氮酶表达的最适氮源, 其最适浓度在2~3mMol/L, 与大多数根瘤菌诱导结果相类似。

许多工作证明阿拉伯糖加琥珀酸钠是较好的碳源。Gibson^[13]等认为培养基中的阿拉伯糖可以由木糖或核糖所取代, 但葡萄糖、蔗糖、甘露糖或半乳糖等只能维持较低的固氮活性, 如果只有阿拉伯糖而没有琥珀酸盐则几乎没有固氮活性。通常认为在含有琥珀酸盐的培养基中, 固氮酶活性较高部分是由于琥珀酸盐促进根瘤菌合成大量的聚多糖^[14], Kurz^[15]认为, 产生大量粘液的菌株其乙炔还原活性较高, 可能是粘液对固氮酶起了氧保护作用。但是, Agarwal的工作表明^[16], 聚多糖的合成与固氮酶表达呈负相关。慢生型根瘤菌的己糖代谢是经过Entre Doudoroft途径^[17], 而戊糖代谢也是类似情况^[18], 这样由阿拉伯糖形成葡萄糖醛和丙酮酸。我们的结果表明, 丙酮酸和三羧酸循环部分中间产物可能替代琥珀酸盐, 对固氮酶的表达有一定作用。

根瘤菌在低氧分压下固氮酶活性较高^[15], 菌株8638L和PS培养在气相氧浓度为1%左右条件下, 固氮酶活性最高, 氧浓度过高或过低均不利于固氮酶表达。当固氮酶活性已表达后, 再注入5%氧可以抑制固氮酶活性, 但24小时后, 固氮酶活性又有所恢复, 可能由于呼吸代谢中消耗了一部分氧, 随着氧浓度的降低, 固氮酶基因又正常表达。慢生型根瘤菌在培养过程中会产生微碱性反应^[13], 菌株8638L和PS在pH5.6~6.0范围内固氮酶活性较高, 可能微偏酸环境较适合共固氮酶表达。

到目前为止, 有关根瘤菌自生固氮已有许多报道, 对影响其固氮酶基因表达的因素, 也有广泛的了解。但是, 这些因素在根瘤菌自生固氮中起着何种生理功能, 其调控机制如何? 依然有待于进一步阐明。

参 考 文 献

- [1] 黄维南等, 1987, 南洋楹的结瘤固氮研究。亚热带植物通讯1987(2): 5—10
- [2] 蔡龙祥等, 1985, 银合欢和苏门答腊金合欢根瘤菌的分离和回接。亚热带植物通讯1985(2): 4—10
- [3] 黄维南等, 1980, 根瘤菌与植物离体细胞培养物结合时的固氮活性。实验生物学13(3): 287—295
- [4] 上海植物生理研究所固氮研究室, 1974, 固氮研究中乙炔还原定量测定方法的简化。植物学报 16(4): 382—384
- [5] 黄维南等, 1981, 马铃薯培养基中的根瘤菌自生固氮活性。植物生理学报 7(2): 151—160
- [6] Pagan D. J., et al. 1975, Nitrogen fixation by *Rhizobium* cultured on a defined medium. Nature. 256: 406—407
- [7] Stam H. et al., 1983, Depression of nitrogenase in chemostate cultures of the fast growing *Rhizobium leguminosarum*. Arch Microbiol. 135: 199—204
- [8] Wilcockson J., werner D., 1978, Nitrogenase activity of *Rhizobium japonicum* growing on agar surfaces in relation to slime production, growth and survival. J Gen Microbiol. 108: 151—160
- [9] Bedmar E.J., Olivares J., 1979, Nitrogen fixation (acetylene reduction) by free-living *Rhizobium meliloti*. Curr Microbiol. 2: 11—13
- [10] Urban J.E. et al., 1986, *Rhizobium trifolii* 0403 is capable of growth in the absence of combined nitrogen. Appl Environ Microbiol. 52: 1060—1067
- [11] Child J.J., 1978, Nitrogen fixation by free-living *Rhizobium* and its implication. In: Subba Rao N.S. (eds) Recent Advances in biological Nitrogen Fixation. pp.325—342
- [12] pankhurst C.E., 1981, Nutritional requirement for the expression of nitrogenase activity by *Rhizobium* sp. in agar culture. J Appl Bacteriol
- [13] Gibson A.H. et al., 1976, Nitrogenase activity in culture *Rhizobium* sp. strain 32H1: nutritional and physical consideration. Arch Microbiol. 108: 45—54
- [14] Dudman W.F., 1964, Growth and extracellular polysaccharide production by *Rhizobium meliloti* in defined medium. J Bacteriol. 88: 640—645
- [15] Kurz W.G.W., Lasue T.A., 1975, Nitrogenase activity in *Rhizobium* in absence of plant host. Nature. 256: 407—408
- [16] Agarwal A.K., Keister D.L., 1983, physiology of ex planta nitrogenase activity in *Rhizobium japonicum*. Appl Environ Microbiol. 45: 1592—1601
- [17] Keel B.B. et al., 1969, Glucose catabolism in *Rhizobium japonicum*. J Bacteriol. 97: 1184—1191
- [18] Pedrose F.O., Zancan G.T., 1974, L-Arabinose metabolism in *Rhizobium japonicum*. J Bacteriol. 119: 336—338

EXPRESSION OF NITROGENASE ACTIVITY IN FREE-LIVING RHIZOBIUM

Zou Xiao-Iu and Huang Wei-nan

(Fujian Institute of Subtropical Botany)

ABSTRACT

Seven free-living strains of *Rhizobium*, isolated from the nodules of four species of tropical leguminous plants, have been studied for their ability of acetylene reduction. Four strains of *Rhizobium*, viz. 8638L, 8638M and 8638S, *Albizia falcataria*, and strain PS *Psophocarpus tetragonolobus* produced more than trace amounts of acetylene reduction activity. Among them, *Rhizobium* sp. strains 8638L and PS yield higher nitrogenase activity. A medium containing a low-level source of nitrogen (Glutamine), a combination of two carbohydrate (Arabinose and Succinate) and low oxygen tension appears necessary for the expression of high level of nitrogenase activity. The results showed that the optimal concentrations of oxygen for both strains 8638L and PS, were 1%, while the concentrations of Glutamine for the strains 8638L and PS were 2 mMol/L or mMol/L, respectively. The nitrogenase activity of both strains cultured on the medium being higher under pH 5.6—6.0.