

碳水化合物和 H_2 对 *Gunnera* / *Nostoc* 共生体固氮活力的影响

茆辉民

(莱阳农学院基础部, 莱阳 265200)

Warwick B. Silvester

(Department of Biological Sciences, University of Waikato, Hamilton, New Zealand)

王澜芳 蒋家慧 梁永平

(莱阳农学院, 莱阳 265200)

摘 要 以 *Gunnera* / *Nostoc* 共生体为材料, 研究、比较了碳水化合物和 H_2 对其固氮活力及呼吸速率的影响, 结果表明, 在正常条件下, 外源 H_2 可提高 *Gunnera* / *Nostoc* 共生体固氮活力近 100%, 却使其呼吸速率下降近 50%; 而碳水化合物 (葡萄糖) 也可使其固氮活力提高约 100%, 并使其呼吸速率提高近 160%。表明碳水化合物及 H_2 均可作为 *Gunnera* / *Nostoc* 共生体提供固氮过程的还原力。由于 H_2 的循环利用降低了呼吸速率, 所以就间接地节约了 *Gunnera* / *Nostoc* 共生体固氮过程中对碳水化合物的消耗。结果还表明, 碳水化合物 (葡萄糖) 对恢复饥饿后的 *Gunnera* / *Nostoc* 共生体固氮活力的作用优于外源 H_2 。

关键词 生物固氮 *Gunnera* / *Nostoc* 固氮共生体 固氮活力 碳水化合物 H_2

近几十年来, 固氮生物 H_2 代谢的研究进展迅速。六十年代 Dixon^[4]发现豌豆根瘤菌形成的根瘤很少释放 H_2 , 其类菌体含有吸氢酶, 参与固氮酶反应所产生的 H_2 的再利用, 指出了固氮酶和氢酶的相关性。1976~1977 年, Smith^[5]等报道, 固氮菌、柱胞鱼腥藻和蓝细菌也存在固氮酶所产 H_2 的再利用现象。1976 年, Schubert 和 Evans^[6]指出, 豆科植物根瘤中固氮酶反应的放 H_2 具有普遍性, 是一种能量损失, 而具有吸氢酶的根瘤能循环利用由固氮酶所释放的 H_2 。本文以 *Gunnera* / *Nostoc* 共生体为材料, 围绕碳水化合物及 H_2 对其固氮活力和呼吸速率的影响, 以及二者作为 *Gunnera* / *Nostoc* 共生体固氮底物的优劣性等问题进行研究, 以期加深了解碳水化合物及 H_2 二者与 *Gunnera* / *Nostoc* 共生体固氮活力的相互关系。

1 材料和方法

1.1 材料

从野生于新西兰的 *Gunnera* / *Nostoc* 共生体（根乃拉草—念珠藻共生体，被子植物与蓝细菌的共生体）植株取自然感染有 *Nostoc* 细胞的匍匐茎切段进行繁殖，繁殖的植株种于玻璃温室的砂基中。

1.2 外源葡萄糖对 *Gunnera* / *Nostoc* 共生体固氮活力及其呼吸速率影响的测定

按 1989 年 Silvester^[7] 的方法测定，即使用连续气流测定系统。把含有 *Nostoc* 细胞的位于茎节处（叶片生于茎节处）的腺体组织挖出横切（0.5mm 厚），然后用直径为 2mm 的打孔器打成圆片，把圆片置于一附着有吸水纸（双层，浸有一定量的蒸馏水，使切片底部充分湿润，以后向其上喷施一定量的不同浓度的葡萄糖溶液，测定碳水化合物对其固氮活力的影响）容积为 7ml 的扁平玻璃瓶中，然后此反应瓶分别与充有“10kPa C_2H_2 +21kPa O_2 + N_2 ”混合气体的气球及气相色谱仪（Schimadzu, GT8A）和红外线 CO_2 分析仪（1RGA40, Grubb-Parsons）相连（中间加有蠕动式微气流泵），二种仪器均与电脑相连，每分钟自动取样一次，然后电脑自动绘出 C_2H_4 产生和 CO_2 释放的动态曲线。反应在 28℃ 的水浴中进行。

1.3 外源 H_2 对 *Gunnera* / *Nostoc* 共生体固氮活力及呼吸速率影响的测定

含有 *Nostoc* 细胞的组织处理及与仪器的连接同上，只是另充一只气球，内含“10kPa C_2H_2 +10kPa H_2 +21kPa O_2 + N_2 ”混合气体，然后进行测定。反应在 28℃ 水浴中进行。

1.4 外源同时加糖及加 H_2 对 *Gunnera* / *Nostoc* 共生体固氮活力影响的测定

含 *Nostoc* 细胞的组织处理同上，只是当反应平稳后，向反应瓶中加入不同浓度的葡萄糖溶液（从低到高浓度顺次加入，每加另一浓度的葡萄糖液前，先用吸水纸吸去组织圆片上前一浓度的糖液），此时当反应平稳后接通含有 H_2 的气球而关闭只含 C_2H_2 而不含 H_2 的气球。然后按此顺序从低浓度到高浓度的葡萄糖溶液依次加入及接通含 H_2 气球。反应在 28℃ 水浴中进行。

1.5 H_2 及碳水化合物对饥饿后的 *Gunnera* / *Nostoc* 共生体固氮活力影响的测定

含 *Nostoc* 细胞的组织处理同上，只是把含有 *Nostoc* 细胞的圆片进行约 3h 的饥饿处理，即给反应瓶通以“10kPa C_2H_2 +21kPa O_2 + N_2 ”的混合气体，连续运转，3h 后当 C_2H_4 的产生量趋于零时，接通含有 H_2 的气球（含“10kPa C_2H_2 +10kPa H_2 +21kPa O_2 + N_2 ”混合气体）并进行加糖处理。反应在 28℃ 水浴中进行。

2 结果与分析

2.1 外源葡萄糖对 *Gunnera* / *Nostoc* 共生体固氮活力及组织呼吸速率的影响

Stal 等^[13] 研究表明，蓝细菌固氮酶活性与呼吸速率是相关的。本研究结果表明（图 1），随着葡萄糖液浓度的提高，*Gunnera* / *Nostoc* 共生体固氮活力及其呼吸速率均快速提高，至葡萄糖浓度 1.5% 处，固氮活力提高近 100%，从此浓度开始，葡萄糖液浓度增加则无明显的促进作用。组织呼吸速率的变化趋势与固氮活力的变化基本一致，至葡萄糖液浓度 1.5% 处，呼吸速率比对照（0，开始未加葡萄糖液）提高约 160%。值得注意的是组织呼吸

速率的提高幅度明显地高于固氮活力提高的幅度。表明碳水化合物通过呼吸作用可为 *Gunnera*/ *Nostoc* 共生体固氮作用提供大量还原力。

2.2 外源 H₂ 对 *Gunnera*/ *Nostoc* 共生体固氮活力及呼吸速率的影响

1975 年, Rivera-ortiz 和 Burris 发现^[9], C₂H₂ 非竞争性地抑制 N₂ 还原反应, 即在 C₂H₂ 的存在下, 所有流经固氮酶的电子将用于 C₂H₄ 的产生。所以固氮酶在此情况下将不催化 H₂ 的产生, 而组织中吸氢酶仍可保持较长时间的活跃状态, 不受 C₂H₂ 的限制。孙金华等^[1]报道, 在共生体碳底物不足或光合作用受限情况下, C₂H₂ 的还原受 H₂ 的支持。Fu 和 Knowles^[10]的研究表明, 外源 H₂ 可支持固氮酶活性。本文结果表明 (图 2), 在反应开始阶段, 外源 H₂ 可极显著地提高 *Gunnera*/ *Nostoc* 共生体固氮活力, 约 100%, 这也证明了在 *Gunnera*/ *Nostoc* 共生体中吸氢酶的存在。而组织呼吸速率在不加外源 H₂ 时, 可高达 0.92μmolCO₂ · 100glands⁻¹ · min⁻¹, 在外源 H₂ 存在下, 却下降至小于 0.48μmolCO₂ · 100glands⁻¹ · min⁻¹, 下降约 50%, 而此时 *Gunnera*/ *Nostoc* 共生体固氮活力却提高近 100%。表明外源 H₂ 在吸氢酶作用下确实能使 *Gunnera*/ *Nostoc* 共生体固氮活力极显著地提高, 并且使组织呼吸速率极显著地降低, 表明了 H₂ 可以作为 *Gunnera*/ *Nostoc* 共生体固氮作用的还原力提供者。

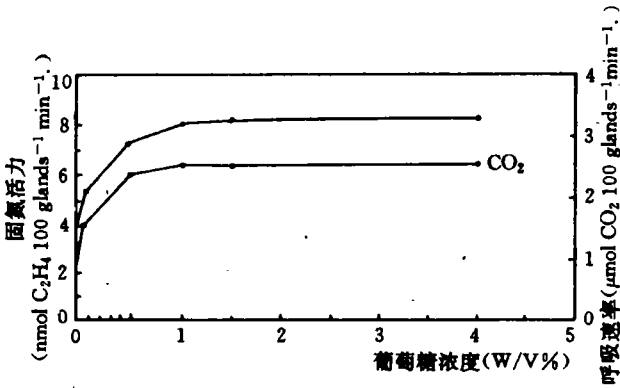


图 1 外加葡萄糖对 *Gunnera*/ *Nostoc* 共生体固氮活力及组织呼吸速率的影响

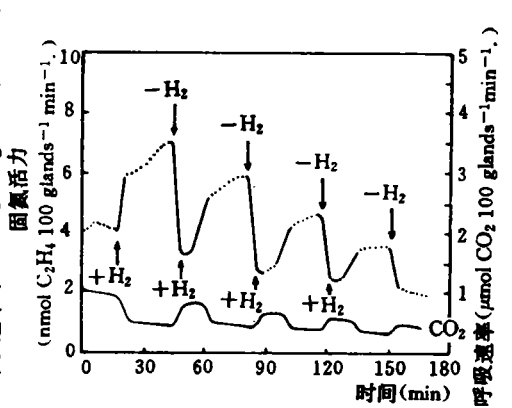


图 2 外源 H₂ 对 *Gunnera*/ *Nostoc* 共生体固氮活力及组织呼吸速率的影响

2. 外源同时加糖和 H₂ 对 *Gunnera*/ *Nostoc* 共生体固氮活力的影响

Emerich 等^[11]和孙金华等^[2]报道, 碳水化合物的氧化竞争电子传递链而抑制吸氢酶活性。Fu 等^[10]报道, 固氮酶活性受碳水化合物供应状况影响很大。从图 1 和图 2 可知, 外源葡萄糖和 H₂ 均能提高 *Gunnera*/ *Nostoc* 共生体固氮活力, 但二者的关系如何呢? 为此, 设计了“连续的外加不同浓度葡萄糖同时伴随外源加 H₂”及“加 H₂ 后葡萄糖液对 *Gunnera*/ *Nostoc* 共生体固氮活力影响”的二个试验。结果如图 3 和图 4 所示。从图 3 可知, 当碳水化合物供应不足时 (未加葡萄糖液), 外源 H₂ 可极显著地提高 *Gunnera*/ *Nostoc* 共生体固氮活力, 提高约 100%; 而当碳水化合物供应相对充足时 (1.5%葡萄糖处), 外源 H₂ 对其固氮活力则无显著影响。而图 4 则从另一角度表明, 当先加外源 H₂ 时 (此时不加

葡萄糖液), 结果如图 3 所示, 即 H_2 使 *Gunnera*/*Nostoc* 共生体固氮活力提高了近 100%。而此时若再加 1.5% 葡萄糖液, 则对 *Gunnera*/*Nostoc* 共生体固氮活力无显著影响。这表明, 碳水化合物及 H_2 对 *Gunnera*/*Nostoc* 共生体的固氮作用是互补的, 二者均可作为 *Gunnera*/*Nostoc* 共生体固氮的共同还原力提供者。但碳水化合物及 H_2 对 *Gunnera*/*Nostoc* 共生体固氮的作用是否相同呢? 长时间单独供给 *Gunnera*/*Nostoc* 共生体 H_2 而不供给碳水化合物是否可行呢? 这些问题尚待研究。

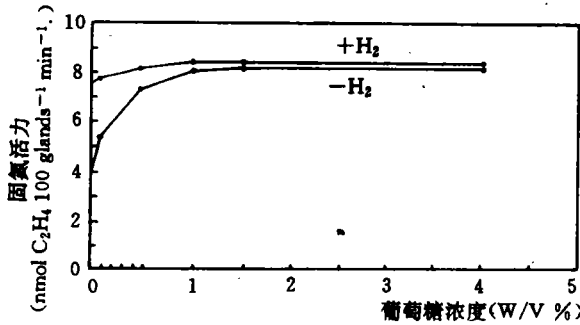


图 3 外加不同浓度葡萄糖伴随加 H_2 对 *Gunnera*/*Nostoc* 共生体固氮活力的影响

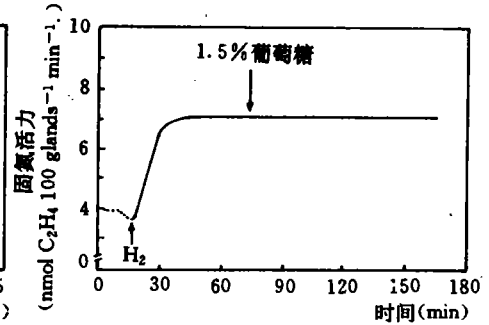


图 4 外源 H_2 (先加) 及葡萄糖 (后加) 对 *Gunnera*/*Nostoc* 共生体固氮活力的影响

2.4 碳水化合物及 H_2 对恢复饥饿后的 *Gunnera*/*Nostoc* 共生体固氮活力的作用

Silvester 等^[12]报道, 细胞内的光合产物对固氮酶活性有重要影响。陈因等^[3]报道, 必须有足够的碳水化合物供应, 才能使固氮产物氨进一步同化, 从而使固氮过程正常进行。结果表明 (图 5), 当给反应瓶通入 “10kPa C_2H_2 +21kPa O_2 + N_2 ” 混合气体后,

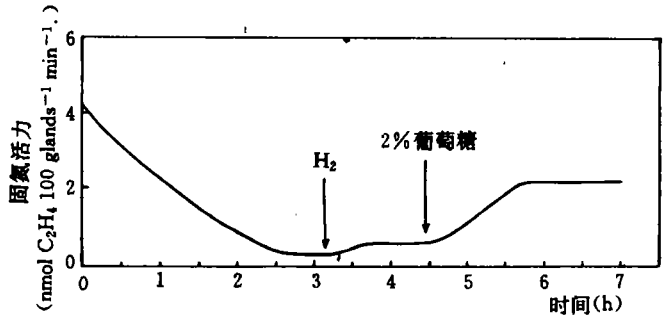


图 5 H_2 及葡萄糖对恢复饥饿状态下 *Gunnera*/*Nostoc* 共生体固氮活力的作用

让其进行约 3h 的连续运转, C_2H_4 的产生量几乎趋于零时, 接通含有 “10kPa C_2H_2 +10kPa H_2 +21kPa O_2 + N_2 ” 混合气体的气球, 这时外源 H_2 几乎不能使 C_2H_4 的产生量发生显著变化。而此时若给组织喷施 2% 的葡萄糖液 (关闭含有 H_2 的气球, 接通只含有 C_2H_2 的气球), 则 C_2H_4 的产生值可恢复至正常情况下的 50% 左右。这表明, 对 *Gunnera*/*Nostoc* 共生体而言, 碳水化合物对维持和恢复固氮活力优于 H_2 。

3 讨论

本研究结果表明, 在正常情况下, 外源 H_2 可使 *Gunnera*/*Nostoc* 共生体固氮活力提高约 100%, 所以 H_2 确实可为 *Gunnera*/*Nostoc* 共生体固氮作用提供还原力, 也间接证明了在 *Gunnera*/*Nostoc* 共生体中吸氢酶的存在; 而碳水化合物也可使 *Gunnera*/*Nostoc* 共生体

固氮活力提高约 100%, 并且碳水化合物及 H_2 均可作为 *Gunnera* / *Nostoc* 共生体固氮作用提供还原力, 且互为补充。另外, 在 H_2 和碳水化合物共同存在的条件下, 由于 H_2 可使其呼吸速率降低约 50%, 这样就相对地减少了碳水化合物的消耗。对于维持和恢复 *Gunnera* / *Nostoc* 共生体固氮活力来说, 碳水化合物优于 H_2 。

Gunnera / *Nostoc* 共生体作为自然界唯一的一类被子植物与蓝细菌的共生体, 对其固氮活力是如何受 H_2 及碳水化合物代谢的调控及与植株生长和 NH_3 代谢的关系等问题的进一步深入探索和研究, 无疑将是十分诱人的。

参 考 文 献

- 1 孙金华, 陈秉俭, 汪化等. 紫云英根瘤菌的分子氢再利用与固氮活性. 科学通报, 1987 (18): 1417~1420
- 2 孙金华, 陈秉俭, 杨玉锁等. 紫云英根瘤菌 109 菌株氢氧化电子传递链. 植物生理学报, 1990 (16): 158~166
- 3 陈因, 方大惟. 分子氮影响下的蓝藻 *Anabaena* 7120 乙炔还原. 植物生理学报, 1989, 15 (3): 245~250
- 4 Dixon ROD. Hydrogen uptake and exchange by pea root nodules. *Ann Bot*, 1967 (31): 179~188
- 5 Smith LA, Hill S et al. Inhibition by acetylene of conventional hydrogenase in nitrogen fixing bacteria. *Nature* (London), 1976(262): 209~210
- 6 Schubert KR, Evans HJ. Hydrogen evolution: A major factor affecting the efficiency of nitrogen fixation in nodulated symbionts. *Proc Natl Acad Sci*, 1976(73): 1207~1211
- 7 Silvester WB, Parson R et al. Simple apparatus for growth of nodulated plants and for continuous nitrogenase assay under defined gas phase. In: Torey JG and Winship LJ eds. *Application of continuous and steady-state methods to root biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1989, 67~96
- 8 Stal LJ and Krumbein WE. Temporal separation of nitrogen fixation and photosynthesis in the filamentous, non-hyterocystous *cyanobacterium oscillatoria* sp., *Arch Microbiol*, 1987 (149): 76~80
- 9 Rivera-Ortiz JM, Burris RH. Interactions among substrates and inhibitors of nitrogenase. *J Bacteriol*, 1975(123): 537~545
- 10 Fu Changlin and Knowles R. H_2 supports nitrogenase activity in carbon-starved *Azospirillum lipoferum* and *A. amazonense*. *Can J Microbiol*, 1988(34): 825~829
- 11 Emerich DW, Ruiz-Argueso T et al. Investigation of the H_2 oxidation system in *Rhizobium japonicum* 122 DES nodule bacteroids. *Plant Physiol*, 1980(66): 1061~1066
- 12 Silvester WB. Endophyte Adaptation in *Gunnera* / *Nostoc* Symbiosis, in *Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants*. In: Nutman PS ed. *International Biological Programme* (Vol. 7). Cambridge University Press, 1975, 521~528

Effect of Carbohydrate and Hydrogen on Nitrogen-fixing Activity of *Gunnera* / *Nostoc* Symbiont

Man Huimin

(Department of Basic Courses, Laiyang Agricultural College, Laiyang, Shandong Province)

Warwick B. Silvester

(Department of Biological Sciences, University of Waikato, Hamilton, New Zealand)

Wang Lanfang Jiang Jiahui Liang Yongping

(Laiyang Agricultural College)

Abstract The work was carried out in New Zealand from 1989—1991. The results showed that exogenous H_2 increased nitrogen fixing activity of *Gunnera* / *Nostoc* symbiont by nearly 100%, but decreased respiratory rate by nearly 50% simultaneously. Exogenous carbohydrate (glucose) increased nitrogen fixing activity by nearly 100%, and increased respiratory rate by nearly 160% simultaneously. It also showed that carbohydrate (glucose) was much better than H_2 in maintaining and restoring nitrogen fixing activity of *Gunnera* / *Nostoc* symbiont.

Key words: Biological nitrogen fixation; *Gunnera* / *Nostoc* symbiont; Nitrogen fixing activity; Carbohydrate; Hydrogen