

中国生物固氮研究现状和展望

沈世华 荆玉祥*

(中国科学院植物研究所中国科学院光合作用和环境分子生理学重点实验室, 北京 100093. * 联系人, E-mail: yxjing@ns.ibcas.ac.cn)

摘要 生物固氮是生命科学中的重大基础研究课题之一, 它在生产实际中发挥着重要作用: 为植物特别是粮食作物提供氮素、提高产量、降低化肥用量和生产成本、减少水土污染和疾病、防治土地荒漠化、建立生态平衡和促进农业可持续发展. 本文在介绍国际生物固氮研究进展的同时, 着重叙述了生物固氮研究取得的重大进展和成果: 收集了根瘤菌资源, 建立了最大的数据库, 修正和发展了国际上对根瘤菌的分类; 发现了固氮基因, 证实了克氏杆菌固氮基因操纵子的连锁性及正调控基因的调节机制和对氧、温度的敏感性; 发现苜蓿根瘤菌结瘤调控基因 *nodD3* 的产物对结瘤基因表达的启动不受宿主类黄酮的作用; 发现苜蓿根瘤菌的碳利用基因和固氮生物氮代谢和碳代谢基因表达及其调节的偶联作用; 化学合成了根瘤菌的结瘤因子; 在固氮基因表达调节基础上, 构建了固氮基因工程菌株, 并在生产中得到应用; 提出了化学模拟固氮酶的结构和功能, 固氮酶活性中心的模型和合成了模型化合物, 受到了国际高度评价. 根据国际上研究的趋势并结合国内的研究进展, 提出了生物固氮研究的发展方向, 建议在联合(内生)固氮菌固氮基因调控及其提供氮素的作用, 根瘤菌与豆科植物共生结瘤固氮的信号传递和分子相互作用, 氮、碳代谢和固氮与光合作用的偶联与共生结瘤固氮中功能基因组学等方面展开积极研究.

关键词 固氮生物 固氮酶 基因表达 化学模拟 微生物与植物相互作用 功能基因组

空气中约 80% 的氮气不能被植物直接利用, 只有固氮微生物具有将氮气转化成氨的能力, 人们称为生物固氮. 据联合国粮农组织(FAO)1995 年粗略估计, 全球每年由生物固定的氮量已近 2×10^6 t(相当于 4×10^8 t 尿素), 约占全球植物需氮量的 3/4. 所以, 生物固氮是地球上最大规模的天然氮肥工厂. 但是, 迄今为止所发现的绝大多数固氮微生物均不能在粮食作物水稻、小麦、玉米以及多种果树、蔬菜上固氮, 即使少数可以的话, 其固氮量也很少, 所以这些植物的高产不得不依赖化学氮肥. 30 年后我国人口将达到 16 亿, 年需粮食 6.4×10^8 t, 总计需尿素 64×10^8 t. 按此需要, 至少还要新建很多氮肥厂, 投资上千亿元. 一方面, 适量使用化学氮肥可使粮食高产; 另一方面, 生产化学氮肥要大量消耗能源, 加重大气污染和温室效应. 大量施用化肥, 不仅提高农业生产成本, 而且导致水土污染, 影响健康和破坏生态平衡. 对于提高农业产量, 降低化肥用量和农业生产成本, 减少水土污染和疾病, 治理占我国国土面积约 27% 的荒漠化地区, 发展可持续农业, 生物固氮将起重要作用.

研究生物固氮的作用机制有 3 个目的: (1) 提高固氮效率, 在理论上阐明影响固氮效率的原因, 在生产实际中提出有效措施; (2) 在研究根瘤菌与豆科植

物相互作用和共生固氮的基础上, 扩大根瘤菌的宿主范围, 使其能在非豆科植物, 特别是主要粮食作物上固氮, 或将固氮基因转移到非豆科植物上, 实现其自主固氮; (3) 在研究固氮酶结构与功能的基础上, 进一步探讨化学模拟固氮酶作用机制, 发展化学催化理论, 改革目前合成氨工艺, 提供廉价氮肥.

生物固氮是生命科学的重大问题之一, 是跨世纪的研究课题. 在当前生命科学的发展中由于基因组学和功能基因组学的建立和高新技术的创新, 又赋予生物固氮研究新的内涵和研究策略, 为实现固氮研究的目标增添了新的动力.

本文叙述生物固氮的研究现状和发展, 着重介绍我国的研究概况和取得的成果, 并结合当前生命科学的进展, 展望生物固氮研究的前景.

1 生物固氮的研究现状

当前, 国内外生物固氮研究已进入一个新阶段, 其特点是多学科交叉, 将基础研究和应用前景相结合, 开拓了思路. 当前生物固氮研究正在分子和原子水平上开展, 如: 固氮基因表达的铵阻遏和氧敏感机制; 共生结瘤固氮中植物与微生物相互关系的基因表达和调控; 根瘤菌结瘤因子的结构和生物合成; 根

瘤菌及其宿主植物的基因组学、转录组学和蛋白质组学;固氮酶的结构和功能及其化学模拟;固氮效率的提高及其在农业和环境保护中的应用等.这些研究要求生物学、农学、化学和物理学等学科的交叉和结合,引入新概念和新技术,综合进行.

1.1 固氮资源的发掘和应用

生物固氮系统分为根瘤菌与豆科植物的共生结瘤固氮系统、联合(包括内生)固氮系统和自生固氮系统.在共生固氮系统方面,世界上有豆科植物 19700 种,其中已知可以结瘤固氮的有 2800 多种,占 15%,而对其共生固氮体系进行过研究的只占 0.5%^[1].不少国家,特别是美洲和非洲国家,积极发展种植大豆或其他豆科植物(美国大豆播种面积约占 30%),以发挥生物固氮作用,减少化学氮肥用量,取得了明显的经济效益.在对联合(内生)固氮系统的研究中,发现禾本科植物甘蔗内有内生固氮菌,以光合产物为能源进行固氮,可为甘蔗提供 60%的氮素^[2].这一发现为进一步开发联合(内生)固氮体系提供了突破空间和潜在的应用前景.在自生固氮体系中,发现一株嗜热放线菌(*Streptomyces thermoautotrophicus*)有耐氧的固氮酶^[3],为最终通过转基因手段实现非豆科植物自主固氮提供了可能的突破点.

我国传统农业耕作过程中采用豆科植物与其他农作物套种、轮作等手段改良土壤环境,提高农作物产量.当前,苜蓿等豆科植物在我国西部地区的开发及开展生态农业、退耕还林还草过程中正起着不可替代的作用.我国共有豆科植物约 1400 多种.多年来,我国科学家以豆科植物根瘤菌为重点,逐步摸清了我国豆科植物的根瘤菌资源,进行了系统分类,发现了一些新属、新种^[4~7],并建立了我国最大的根瘤菌数据库.其中一个重要的发现是,一种植物在不同的生态环境可与多种根瘤菌共生,例如我国的大豆可与 3 个属、7 个种的根瘤菌共生固氮,而一种根瘤菌(如海南根瘤菌 *Rhizobium hanaese*)可从 13 属 14 种豆科植物的根瘤中分离.其他很多植物与根瘤菌的关系也是如此.这一研究说明豆科植物与根瘤菌共生的多样性,修正并发展了传统的根瘤菌“寄主专一性”和植物“互接种族”的概念.将为利用现代基因组学、功能基因组学和蛋白质组学手段,探索最佳的结瘤固氮模式和微生物与植物相互作用的机理提供良好的研究材料.

1.2 生物固氮调控机理及植物与微生物的相互作用

用自生固氮菌——克氏肺炎杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)研究固氮基因及其表达和调控机理,有很多开创性工作,如发现了固氮基因 *nifC*, 7 个固氮基因 *nif* 操纵子连锁以及正调控基因 *nifA* 的调节机理及其对温度和氧的敏感性^[8~10].豆科植物与根瘤菌之间的分子对话机理研究有了重大进展.在能量供应方面,弄清了根瘤菌在豆科植物根瘤中依靠植物提供四碳二羧酸糖作碳源用于固氮,并发现了 *dctABD* 基因^[11];重组根瘤菌已经构建成功,并用于提高固氮效率^[12,13];与粮食作物联合固氮的固氮螺菌(*Azospirillum brasiliense* Yu62)的固氮调节机理也已逐步明朗,为构建铵阻遏条件下也能固氮的基因工程菌株打下了理论基础^[14].我国科学家在深入研究正调节基因(*nifA*)的表达及其产物(NifA)活性调节机制的基础上,构建了不受铵阻遏的组成型表达的 *nifA* 质粒,将其引入大豆根瘤菌(*Bradyrhizobium japonica*)和阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)后,固氮作用不受铵阻遏^[15~19].用此基因工程菌株接种水稻可以增产^[20,21].此外,还开展了固氮基因负调节基因(*nifL*)的研究^[22,23].我国分离的巴西固氮螺菌 Yu62 的固氮酶基因表达和活性双重调节机制研究已经比较清楚,为构建耐铵泌铵的基因工程菌株和降低玉米化肥用量提供了理论基础^[24~26].田间实验结果有实效,施用工程菌株比不施用的对照增产 21.1%,比野生型菌剂增产 8.5%.在相同产量水平下可降低 20% 的氮肥使用量.在共生固氮体系结瘤固氮基因表达调节研究的基础上,发现苜蓿根瘤菌结瘤基因 *nodD3* 的表达不受苜蓿类黄酮物质的启动^[27,28],为扩大根瘤菌的宿主范围提供了理论根据.同时, *nodD3* 基因表达受到两个启动子的控制^[29],第 2 个启动子可以被 NtrC 激活^[30];化学合成了苜蓿根瘤菌的结瘤因子^[31];根据宿主植物对根瘤菌识别因子和固氮嫌氧机制的研究,将豆科植物的凝集素基因和血红蛋白基因转入烟草和水稻,获得基因表达,为进一步研究非豆科植物和根瘤菌侵染的关系奠定了技术基础^[32,33].近年来,我国开展了特有的华癸根瘤菌(*Sinorhizobium huakuii*)结瘤固氮基因表达调节的研究^[34,35],发现了微生物体内碳代谢与固氮及氮代谢的基因表达调节之间存在着偶联关系^[36,37].这一发现不仅对生物固氮调控有重要意义,也对基因表达调控基础研究有重要贡献,为进一步研究光合和固氮之间的偶联提

供了理论基础。

1.3 固氮酶的生物化学特性及其化学模拟

国际上已经对固氮酶高分辨率的空间结构进行了研究,阐明了其活性中心的原子簇 FeMoco 及其周围蛋白分子的三维结构^[38,39]。Schmid 等人^[40]对棕色固氮菌缺失 FeMoco 的突变种 *nifB*-Av1 的钼铁蛋白组分做了晶体衍射结构分析,发现 4 个亚单位中的 1 个构象发生了较大变化,存在一个带正电的漏斗状 (funnel) 结构,它足够容纳带负电的 FeMoco 的插入,成为具有固氮功能的钼铁蛋白组分。与此同时,化学模拟固氮酶在温和条件下合成氨有了很大进展^[41]。在这个领域里我国也做了大量非常出色的工作:固氮酶催化 HD 的形成绝对依赖于氮^[42];在固氮酶催化还原 N_2 的放氢机制中,率先提出了双位点放 H_2 模式,对了解固氮酶催化机制有所发展^[43]。美国 1992 年用 X 光衍射确定固氮酶活性中心原子簇是由 MoS_3Fe 和 FeS_3Fe_3 两个缺口的立方烷型簇合物组成^[38],通过 3 个非蛋白配体 S 桥联而成为一个笼(其顶端分别是 Fe 和 Mo)。其实在此之前,我国就已经合成了这两个簇合物^[44];根据配位催化原理和化学探针思路,提出活性中心原子簇笼应是活口的, N_2 还原成氨和质子还原成 H_2 都是在笼内进行,提出用于还原底物有两条质子通道的设想^[45~47]。这些进展对指导合成高效催化剂,实现在温和条件下固氮有重要意义。

1.4 我国生物固氮研究成果的国际认可和曾经面临的困境

“生物固氮”成为科学定义并开始大力研究已有 114 年的历史。我国自 1937 年开始生物固氮研究,已有 65 年历史。20 世纪 70 年代生物固氮研究在生物化学和分子遗传学等方面取得突破后,我国也取得了一系列重要成果,在国际上占有一定的地位,在某些方面还具有重要影响。因此,国际生物固氮研究委员会主席 W. Newton 曾多次建议在中国召开国际生物固氮研究大会,经研究决定 2003 年在北京召开第 14 届国际生物固氮大会。

我国生物固氮研究的道路曲曲折折,曾经有两种错误认识:一是受到假冒伪劣生物固氮肥料的宣传的干扰,认为生物固氮问题已经解决;二是对国际和国内生物固氮研究的突破性进展了解不够,认为难度大,进展甚微,国内经多年研究也未出成果。两

者的结果使我国的生物固氮研究面临严重困境。

为防止困境再现,经我国有关决策者和研究人员的共同努力,恢复了固氮研究应有的地位。这就为巩固研究成果,继续发展,不失时机地迎接生物固氮的重大突破的新时代的到来,并把生物固氮研究与生命科学其他学科相关的重大科学问题提高到一个新水平,使其进一步为我国农业可持续发展做出重要贡献。

2 生物固氮研究的展望

根据国际上生物固氮研究的发展和我国的具体情况,我国生物固氮研究应着重下列几个方面。

2.1 联合(内生)固氮菌固氮基因调控及其在提供氮素中的作用

联合或内生固氮菌大多数是自生固氮菌,其固氮作用大小极易受外界环境因素(氧、铵、温度等)的制约。在自然状态下有些固氮菌与植物有着松散的联合,或进入植物成为内生菌,这就为进一步利用这些固氮生物给植物提供氮素创造了更多的机会。在研究固氮基因表达和调控的基础上,有针对地进行固氮菌的遗传改造,构建高效的固氮菌株,以提高固氮效率,减少化肥施用,为作物提供更多的固氮量^[13,14,20,21]。

2.2 根瘤菌与豆科植物共生结瘤固氮的信号传递和分子相互作用

豆科植物共生固氮由于其固氮作用的高效率,始终是生物固氮研究的焦点之一。根瘤菌与豆科植物之间的信号传递、相互识别、基因的顺序性表达和调节对根瘤的形成、发育和固氮作用的大小等有着错综复杂的联系。苜蓿根瘤菌和苜蓿的共生结瘤固氮是共生固氮的模式系统,研究最为集中,但仍然有很长的路要走。如果考虑到地区不同和自然环境的差异,即使是同一模式系统也会有不同的差异表现,更何况还有特异的共生固氮系统?在分子水平上阐明两者相互作用的机理,一方面旨在提高共生固氮的效率,另一方面还可以为扩大根瘤菌宿主范围,为实现粮食作物共生固氮提供理论依据和技术措施。

2.3 氮、碳代谢和固氮与光合作用的偶联

氮、碳代谢是一切生物最基本的代谢作用,而且是相互联系的。固氮作用需要消耗作为能源的碳源。植物共生固氮中固氮作用的能源直接来自光合作用。

固氮生物有选择性地利用碳源，其中以四碳二羧酸糖的利用较好。固氮生物在氮、碳代谢的基因表达中，分别利用 RNA 聚合酶的 σ^{54} 和 σ^{70} 。碳代谢调控蛋白 CRP(carbon receptor protein)与结合在启动子上的 σ^{54} 相互作用，使依赖 σ^{54} 的 *dctA* 和 *glnAp2* 等基因启动子的表达受到抑制^[36,37]，其结果就在分子水平上将氮、碳代谢联系起来。最近研究证明，CRP-cAMP 同样抑制肺炎克氏杆菌 *nif* 基因的表达，而且其抑制作用的大小与启动子上有无潜在的 CRP 结合位点直接相关^[48,49]。

豆科植物是 C₃ 植物，固氮作用需消耗光合作用能量的 10%，因此减产达 5%，固氮不增产^[50]。虽然在大豆根瘤菌中增加 *nifA* 正调控基因的拷贝数，可以提高固氮作用，增加产量^[51,52]，但仍然需要植物提高光合作用效率，才能满足既不施或少施氮肥，又能达到增产的目的。如何提高豆科植物的光合作用效率，是光合作用和固氮作用的共同研究问题。现有报道表明，通过诱变获得高光效的大豆品种，产量可提高 30%左右^[53]。这一品种将为固氮和光合偶联研究提供了材料。另一途径是通过转基因技术将 C₄ 植物的基因转入豆科植物，使其变成 C₄ 植物。这种可能性是存在的，最近已经将玉米光合作用 C₄ 途径的基因转入水稻，获得高光效增产幅度较大的转基因水稻^[54~56]，这为获得 C₄ 豆科植物提供了借鉴。

2.4 共生固氮中包括蛋白质组学在内的功能基因组学研究

共生固氮功能基因组学和蛋白质组学研究包括根瘤菌和宿主植物两个方面。功能基因组学研究的前提是对目的生物的基因组进行全序列分析。目前国际上已经对苜蓿根瘤菌基因组进行了全序列分析^[57]，接着是大豆根瘤菌和百脉根根瘤菌(*Rhizobium loti*)基因组。在宿主植物方面已经启动了对苜蓿 *Medicago sativa* Lin)、大豆(*Glycine max* Lin)和百脉根(*Lotus corniculatu*)基因组序列的分析^[58~60]。这些研究成果将为固氮功能基因组和蛋白质组学研究奠定基础 and 建立技术平台。目前，固氮功能基因组和蛋白质组学已经陆续有所报道^[61~63]。固氮资源生物多样性研究表明，不同根瘤菌可与同一豆科植物相互作用结瘤固氮，但它们之间的结瘤固氮效率却大不相同。同样，同一根瘤菌可与不同属的豆科植物结瘤固氮^[64]。这一结果为开展共生固氮功能基因组学和蛋白质组学研究奠定了基础。可以充分利用公布的苜蓿根瘤菌基因组序列，通过 RNA 和蛋白质差异显示法和微

阵列法，对不同苜蓿根瘤菌基因组及其突变株在共生条件下进行功能比较，对不同根瘤菌在同一豆科植物结瘤的不同根瘤素基因表达进行比较，将可大大推进共生结瘤固氮中微生物与植物相互作用机理的研究。在此基础上，还可寻找非豆科植物，特别是禾本科植物中是否有以及有多少类似于豆科植物的根瘤素存在，从而最终为非豆科植物的共生固氮和自主固氮提供策略和技术路线。无疑，共生固氮功能基因组和蛋白质组学研究将具有更为重大的科学意义和潜在的实际意义。

致谢 感谢沈善炯、李季伦和朱家壁教授对文稿的建议和修改及林敏、陈文新、周朝晖等教授所提供资料。本工作为国家重点基础研究发展规划资助项目(批准号：2001CB108904)。

参 考 文 献

1 Denarie J, Roche P. *Rhizobium* nodulation signals. In: Verma D P S. Molecular Signals in Plant-Microbe Communications. Boca Raton/Ann Arber/London: CRC Press, 1991. 296~324

2 Pliverira A L M, Urquiaga S, Dobereiner J, et al. Biological nitrogen fixation (BNF) in micropropagated sugarcane plants inoculated with different endophytic diazotrophic bacteria. In: Pedrosa F O, Hungria M, Yates M G, eds. Nitrogen Fixation: From Molecules to Crop Productivity. Dordrecht/Boston/London: Kluwer Academic Publishers, 1999. 425

3 Ribbe M, Gadkari D, Meyer O. N₂ fixation by *Streptomyces thermoautotrophicus* involves a molybdenum-dinitrogenase and a manganese-superoxide oxidoreductase that couple N₂ reduction to the oxidation of superoxide produced from O₂ by a molybdenum-CO dehydrogenase. J Biological Chemistry, 1997, 272: 26627~26633

4 Tan Z Y, Xu X T, Wang E T, et al. Phylogenic and genetic relationships of *Mesorhizobium tianshanense* and related rhizobia. Int J Syst Bacteriol, 1997, 47: 874~879

5 Wang E T, van Berkum P, Sui X H, et al. Diversity of rhizobia associated with *Amorpha fruticosa* isolated from Chinese soils and description of *Mesorhizobium zморрphae* sp nov. Int J Syts Bacteriol, 1999, 49: 51~65

6 Tan Z Y, Wang E T, Peng G X, et al. Characterization of bacteria isolated from wild legumes in the North-Western regions of China. Int J Syst Bacteriol, 1999, 49: 1457~1469

7 Yan A M, Wang E T, Kan F L, et al. *Sinorhizobium melilotii* associated with *Medicago sativa* and *Melilotus* spp. Int J Syst Bacteriol, 2000, 50: 1887~1891

8 Shen S C. Organization and regulation of nitrogen fixation genes: 1974~1995. In: Kung S D, Yang S F, eds. Discoveries in Plant Biology. Vol III. Dordrecht/Boston/London: World Scientific Press, 2000. 383~392

9 朱家壁, 俞冠翹, 江群益, 等. 基因 *nifA* 产物对肺炎克氏杆菌

(*Klebsiella pneumoniae*)*gln* 突变型的 Nif⁻表型的校正和固氮酶的组成型合成的作用. 中国科学, B 辑, 1983, (8): 688~696

10 Hu B, Zhu J B, Shen S C, et al. A promoter region binding protein and DNA gyrase regulae anaerobic transcription of *nifAL* in *Enterbacter cloacae*. J Bacteriol, 2000, 182: 3920~3923

11 Wang Y P, Birkenhead K, Boesten B, et al. Genetic analysis and regulation of the *Rhizobium melilotii* genes controlling C₄-dicarboxylic acid transport. Gene, 1989, 85: 135~143

12 Bosworth A H, Williams M K, Albrecht K A, et al. Alfalfa yield response to inoculation with recombinant strains of *Rhizobium melilotii* with an extra copy of *dctABD* and/or modified *nifA* expression. Appl Environ Microbiol, 1994, 60: 3815~3832

13 林敏, 尤崇杓, 刘永正, 等. 重组耐铵固氮菌株的田间长期定点释放试验. 生物技术学报, 1995, 1: 28~33

14 李永兴, 李久蒂, 卢林刚, 等. 玉米联合固氮工程菌 *Enterobacter gergivuae* E7 在田间的接种效应. 中国农业科学, 2000, 33: 72~77

15 Shen S C, wang S P, Yu G Q, et al. Expression of the nodulation and nitrogen fixation genes in *Rhizobium melilotii* during development. Genome, 1989, 31: 354~360

16 王水平, 朱家璧, 俞冠翘, 等. 苜蓿根瘤菌(*Rhizobium meliloti*) *nifA* 基因的异源表达及其产物的氧敏感性. 中国科学, B 辑, 1990, (3): 261~266

17 Deng X P, Shen S C. Structure and oxygen sensitivity of *nifLA* promoter of *Enterobacter cloacae*. Science in China, Ser B, 1995, 38(1): 60~66

18 赵洁平, 戴小密, 许玲, 等. 固氮正调节基因 *nifA* 促进大豆根瘤菌的结瘤效率. 科学通报, 2001, 46(23): 1984~1987

19 高云峰, 吴桐, 朱家璧, 等. 苜蓿根瘤菌固氮酶基因启动子 P1 转录起始点下游顺序(DS)的特性. 中国科学, C 辑, 1996, 26(2): 100~106

20 沈炳福. 水稻对耐铵工程固氮菌株的响应. 植物生理学报, 1995, 21: 302~306

21 张福星, 尤崇杓, 卢婉芳. 环境因子变化的水稻氮素吸收及接种效应的影响. 农业生物技术学报, 1995, 1: 93~98

22 Hu B, Zhu J B, Shen S C, et al. A promoter region binding protein and DNA gyrase regulae anaerobic transcription of *nifAL* in *Enterbacter cloacae*. J Bacteriol, 2000, 182: 3920~3923

23 Xiao H, Shen S C, Zhu J B. NifL, an antagonistic regulator of NifA interacting with NifA. Science in China, Ser C, 1998, 41(3): 303~308

24 何路红, 阎大来, 马旅雁. 肺炎克氏杆菌 *nifA* 基因在巴西固氮基因表达的铵调节中的作用. 生物工程学报, 1995, 11: 385~388

25 马旅雁, 吴奥, 赵银锁. 巴西固氮螺菌 Yu62 *dragTG* 基因及其下游区域的定位诱变. 生物工程技术学报, 1999, 15: 281~287

26 马旅雁, 李季伦. 巴西固氮螺菌 Yu62 *dragTG* 基因启动子区域的核苷酸序列及其功能分析. 生物工程学报, 1997, 13: 343~349

27 朱冰, 戴小密, 朱家璧, 等. 苜蓿根瘤菌 *nodD3P1* 启动子下游序列的调节功能. 科学通报, 1999, 44(21): 2308~2312

28 Yu G Q, Zhu J B, Gu J, et al. Evidence that the nodulation regulatory gene *nodD3* of *Rhizobium meliloti* is transcribed from two separate promoters. Science in China, Ser B, 1993, 36: 225~236

29 吴桐, 朱家璧, 俞冠翘, 等. 苜蓿根瘤菌多拷贝固氮基因启动子对根瘤发育的抑制. 中国科学, B 辑, 1994, 24(10): 1053~1059

30 陈迪, 刘彦杰, 朱家璧, 等. 苜蓿根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*) *nodD3P1* 启动子下游序列的缺失和互补分析. 中国科学, C 辑, 2002, 32(6): 512~518

31 Wang L, Li C, Wang Q, et al. Chemical synthesis of NodRm-1: the nodulation factor involved in *Rhizobium melilotii*-legume symbiosis. J Chem Soc Perkin Trans, 1994, 1: 621~628

32 ZhangJ X, Jing Y, Shen S H, et al. Transformation of two nitrogen-fixation-related plant genes into tobacco and their expressions. Acta Botanica Sinica, 2000, 42: 834~840

33 Zhang J X, Wang Y P, Sheng S H, et al. Transformation of pea lectin gene and *Parasponia* haemoglobin gene into rice and their expressions. Acta Botanica Sinica, 2001, 43: 267~274

34 金润之, 江群益, 沈思师, 等. 紫云英根瘤菌 *nifDNA* 的分子克隆. 科学通报, 1992, 37(17): 1603~1606

35 金润之, 朱劲松, 江群益, 等. 紫云英根瘤菌 Ra159 的巨大质粒上存在有 *nod* 和 *nif* 基因的证明. 微生物学报, 1993, 33: 170~173

36 Wang Y P, Kolb A, Buck M, et al. CRP interacts with promoter-bound σ 54 RNA polymerase and blocks transcriptional activation of the *dctA* promoter. EMBO J, 1998, 17: 786~796

37 Tian Z X, Li Q S, Buck M, et al. The CRP-cAMP complex and downregulation of the *glnAp2* promoter provides a novel regulatory linkage between carbon metabolism and nitrogen assimilation in *E. coli*. Mol Microbiol, 2001, 4: 911~924

38 Kim J, Rees D C. Structural models for the metal centers in the nitrogenase molybdenum-ion protein. Science, 1992, 257: 1677~1682

39 Chan M K, Ress D C. The nitrogenase FeMo-cofactor and P-cluster pair: 0.22 nm resolution structure. Science, 1993, 260: 797~794

40 Schmid B, Ribbe M W, Einsle O, et al. Structure of a cofactor-deficient nitrogenase MoFe protein. Science, 2002, 296: 352~356

41 Nishibayashi Y, Iwai S, Hidai M. Bimetallic system for nitrogen fixation: ruthenium-assisted protonation of coordinated N₂ on tungsten with N₂. Science, 1998, 279: 540~542

42 Li J, Burris R. Influence of pN₂ and pH₂ on HD formation by various nitrogenase. Biochemistry, 1983, 22: 4472~4480

43 张振挥, 吴柏和, 李季伦. 固氮酶催化的放 H₂ 反应. 微生物学报, 1993, 33: 320~330

44 吴新涛, 卢嘉锡. 固氮酶活性中心网兜模型的回顾和前瞻. 科学通报, 1995, 40(7): 577~581

45 Tsai K R, Wan H L. On the structure-function relationship of nitrogenase M-cluster and P-cluster pairs. J Cluster Sci, 1995, 6: 485~501

46 周朝晖, 颜文斌, 张凤章, 等. 固氮酶催化作用机理及其化学模拟, 厦门大学学报, 2001, 40: 320~329

47 Zhou Z H, Yan W B, Wan H L, et al. Synthesis and characterization of homochiral polymeric S-malato molybdate (VI): toward the potentially stereospecific formation and absolute configuration of iron-molybdenum cofactor in nitrogenase. J Inorganic Biochem, 2002, 90: 137~143

48 李稚婷, 孙义成, 毛贤军, 等. 碳代谢总体调控蛋白 CRP 对肺炎克氏杆菌启动子的抑制作用. 科学通报, 2002, 47(15): 1133~1139

49 李稚婷, 张维佳, 王忆平. 碳代谢总体调控蛋白 CRP 对 *nifA* 启动子的抑制作用不依赖于该启动子上游 CRP 与 *nifA* 竞争的靶位点. 科学通报, 2002, 47(16): 1242~1246

50 Bergersen F J. The Central reaction of nitrogen fixation. Plant and Soil, 1971, Special Vol: 511~524

51 陈昌斌, 戴小迷, 俞冠翹, 等. 组成型 *nifA* 对根瘤菌(*Rhizobium fredii*) HN01 lux 结瘤效率的促进作用. 科学通报, 1999, 44(5): 529~533

52 Li Y, Zhou J C. Influence of introduced extra *nifA* gene on rhizosphere colonization and competition for nodule occupancy by *Sinorhizobium fredii* strain HN02 NL. J Huazhong Agrecultural University, 2000, 19: 198~203

53 Hao N B, Du W G, Ge Q Y, et al, Progress in the breeding of soybean for high photosynthetic efficiency. Acta Botanica Sinica, 2002, 44: 253~258

54 Ku M S B, Agarie S, Nomura M, et al. High-level expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plants. Nat Biotech, 1999, 17: 76~80

55 焦德茂, 李霞, 黄雪清, 等. 转 PEPC 基因水稻的光合 CO₂ 同化和叶绿素荧光特性. 科学通报, 2001, 46(5): 411~418

56 Huang X Q, Jiao D M, Chi W, et al. Characteristics of CO₂ exchange and chlorophyll fluorescence of transgenic rice with C₄ genes. Acta Botanica Sinica, 2002, 44: 405~412

57 Galibert F, Finan T M, Long S L, et al. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. Science, 2001, 293: 668~672

58 Bell C J, Dixon R A, Farmer A D, et al. The *Medicago* genome initiative: A model legume database. Nucleic Acids Res, 2001, 29(1): 114~117

59 Shoemaker R, Keim P, Vodkin L, et al. A compilation of soybean ESTs: generation and analysis. Genome, 2002, 45: 329~338

60 Marek LF, Mudge J, Damielle L, et al. Soybean genomic survey: BAC-end sequences near RFLP and SSR markers. Genome, 2001, 44: 572~581

61 Panter S, Thomson R, de Bruxelles G, et al. Identification with proteomics of novel proteins associated with the peribacteroid membrane of soybean root nodules. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2000, 13: 325~333

62 Mathesius U, Keijzers G, Natera S H, et al. Establishment of a root proteome reference map for the model legume *Medicago truncatula* using the expressed sequence tag database for peptide mass fingerprinting. Proteomics, 2001, 1: 1424~1440

63 Natera S H, Guerreiro N, Djoeftievic M A. Proteome analysis of differentially displayed proteins as a tool for the investigation of symbiosis. Mol Plant-Microbe Interact, 2000, 13: 995~1009

64 张海瑜, 张海予, 李小红, 等. 一株能在苜蓿上结瘤的费氏中华根瘤菌. 微生物学报, 2001, 41: 129~132

(2002-08-28 收稿, 2002-11-28 收修改稿)