

固氮蓝藻的异形胞研究进展

周芳^{1,2}, 方仙桃¹, 高宏^{1*}

(1. 中国科学院大学水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 湖北武汉 430072; 2. 中国科学院大学研究生院, 北京 100049)

摘要 文中对近年来丝状固氮蓝藻的异形胞研究进展进行了总结, 并介绍了具有异形胞的蓝藻在农业上的意义。

关键词 蓝藻; 固氮; 异形胞

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2013)02-00524-04

Advances on the Heterocysts of the Nitrogen-fixing Cyanobacteria

ZHOU Fang et al (National Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan, Hubei 430072)

Abstract The latest studies on the heterocysts of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacteria were reviewed and the significance of heterocyst-forming cyanobacteria in agriculture was also discussed.

Key words Cyanobacterial; Nitrogen-fixing; Heterocyst

蓝藻是地球上最早能进行光合放氧的生物, 大约在距今 30 亿年前, 最早的蓝藻祖先就已出现在地球上。蓝藻种类众多, 且广泛分布于地球上各种水体及陆地环境中, 包括南北两极。丝状蓝藻是多细胞蓝藻中重要的一类, 其藻丝形式在进化的早期就开始发展了^[1]。在最复杂的丝状蓝藻中, 发现了多达 4 种细胞类型: 能进行放氧光合作用并伴随固定 CO₂ 的营养细胞、藻丝由小细胞形成的小型活动的藻殖段细胞、休眠期的厚壁孢子和可固定大气氮的终极分化细胞——异形胞^[2]。在多细胞原核生物中, 形成异形胞的蓝藻为细胞分化和多细胞模式形成的研究提供了一个很好的模型。其中鱼腥藻属菌株 PCC 7120(鱼腥藻 PCC 7120) 是研究的较为深入的一种能形成异形胞的丝状蓝藻。其藻丝只含 2 种类型的细胞: 营养细胞和异形胞。

通常异形胞与营养细胞的区别有以下几点: 体积稍大、色素减少、包被加厚, 并形成由储存氮源的蓝藻颗粒体(cyanophycin)构成的极球(polar granule)。成熟的异形胞为固氮作用提供了微氧环境, 也为营养细胞的放氧光合作用提供了空间上的隔离。同时分化的细胞也发生了许多代谢和形态上的变化^[3], 在生理上, 放氧光合系统 PSII 在分化过程中被降解, 因此不释放氧气, 而异形胞的呼吸速率也大幅增加, 进一步消除了进入细胞中的氧气^[4]。细胞形态上的变化包括异形胞细胞壁外 2 个附加包被层的积累: 在内的糖脂层(HGL)和在外的多糖层(HEP)^[5], 提供防止氧气透过的物理屏障。

异形胞和营养细胞是相互依存的。因为异形胞缺乏光合系统 PSII, 所以必须依赖于营养细胞提供还原剂和碳源, 例如蔗糖^[6]。在鱼腥藻 PCC 7120 中, 营养细胞给异形胞提供谷氨酸, 而后者将其转换为谷氨酰胺和其他氨基酸^[7], 同时,

异形胞将固定的氮以氨基酸的形式提供给营养细胞^[2]。用纳米尺度的高分辨率二次离子质谱(NanoSIMS)对类颤鱼腥藻固定碳和固定氮的时空分布进行研究^[8], 结果显示新固定的氮是从异形胞产出并迅速分发到营养细胞附近的。

1 异形胞的发育调控

异形胞发育的时间轴开始于感知到缺氮胁迫。在 30 °C 条件下, 异形胞的发育是在约 20 h 内完成的, 涉及到对选定的营养细胞向异形胞的启动分化和成熟。一些使用 DNA 微阵列方法的研究显示在氮减少后基因表达会发生全局改变^[9]。如果在氮被去除后的 12 h 内添加化合态氮源或 PatS-5, 分化过程是可被逆转的, 在此时间点之后则不能逆转^[10]。

化合态氮源如铵或硝酸盐的存在会抑制异形胞的分化。在蓝藻中, 三羧酸循环的一个中间产物 α -酮戊二酸构成了氮胁迫的信号^[11]。在鱼腥藻 PCC 7120 中由于缺乏 α -酮戊二酸表达脱氢酶而不具有完整的三羧酸循环, α -酮戊二酸的主要功能是作为碳骨架服务于一系列的生物合成反应。氮胁迫条件导致了 α -酮戊二酸表达水平的增加。将 α -酮戊二酸的一种人工合成类似物 2,2-双氟代戊酸(DFPA)添加到培养基中, 即导致即使在铵盐存在的情况下异形胞仍旧发育, 表明在调控异形胞发育的过程中 α -酮戊二酸起关键作用^[11]。

NtcA 是一个转录调控因子, 属 CAP(Catabolite activator protein)蛋白质家族, 可在异形胞分化起始阶段感应 α -酮戊二酸的浓度变化。该蛋白在蓝藻中高度保守, 调节许多基因并参与碳和氮的代谢^[12]。在鱼腥藻 PCC 7120 中, NtcA 蛋白是氮代谢和异形胞发育途径中基因表达的必需蛋白^[13-14]。在氮胁迫后 *ntcA* 基因会被迅速诱导并自我调控^[15]。而不能利用硝酸盐作为唯一氮源的 *ntcA* 突变体, 会阻止异形胞发育的启动^[16]。被 NtcA 激活的基因通常有保守的 TGTA-(N8)-TACA 结合位点, 且集中在转录起始位点上游 -41.5 核苷酸处(TSP)^[12]。NtcA 的 DNA 结合活性会在 α -酮戊二酸的存在下得到增强, 且其转录激活需要 α -酮戊二酸^[17]。此外, α -酮戊二酸的合成类似物 DFPA 可在体外刺激 NtcA 的 DNA 结合活性^[11]。

基金项目 科技部“十二五”农村领域国家科技计划课题(2011-BAD14B02-1)。

作者简介 周芳(1987-), 女, 湖北武汉人, 博士研究生, 研究方向: 蓝藻分子遗传学。* 通讯作者, 助理研究员, 博士, 从事蓝藻遗传学与生物技术研究, E-mail: gaoh@ihb.ac.cn。

收稿日期 2012-11-26

HetR 是异形胞发育的主调控因子,在异形胞分化和图式形成中起关键作用。尽管 NtcA 可能是第一个感知到 2-OG 信号的蛋白,但 *ntcA* 的表达需要 *hetR* 进行进一步强化。反之,*hetR* 的表达也依赖于 *ntcA*。同时 *hetR* 和 *ntcA* 也是积极的自主调控基因^[18],由 NtcA 和 HetR 组成的调控循环是异形胞发育的中心环节。NtcA 涉及到异形胞发育以外的活性调节,而细胞发育更需要的似乎是 HetR。*hetR* 缺失突变体的藻丝不能产生异形胞,而过量表达 *hetR* 和特定的点突变会导致异形胞频率的增加。*hetR* 基因编码一个丝氨酸蛋白酶, HetR 蛋白则会形成一个具有 DNA 结合活性的同源二聚体^[19]。异形胞的抑制因子 PatS 可在体外干扰 HetR 的 DNA 结合活性^[20]。然而一个 *hetR*_{R223W} 的点突变后藻株对图式形成的主要抑制信号 PatS 和 HetN 变得不敏感,导致鱼腥藻在缺氮诱导后形成成串异形胞^[21]。由此看来, HetR 也许可直接或间接平衡异形胞分化中大部分活性和抑制信号的影响。

NrrA 是一个应答调控蛋白,在 HetR 和 NtcA 之间进行连接调控。*nrrA* 在缺氮 3 h 后的分化细胞中转录,直接依赖于 NtcA。之前研究显示的转座子报告菌株 TLN14 在缺氮 1 h 后异形胞被快速诱导的表型,现在发现是因为与 *nrrA* 基因融合的缘故。*nrrA* 突变株在缺氮诱导后,会导致 HetR 的积累延迟从而延迟异形胞的发育,过表达 *nrrA* 则导致 *hetR* 的上调表达,因此异形胞的频率也会增加^[22]。

参与异形胞早期发育的其他基因,如 *ccbP* 基因是通过调节钙离子浓度来控制起始分化的,在异形胞起始分化过程中,*ccbP* 的下调和被降解导致胞内 Ca^{2+} 浓度的升高,并将缺氮信号传递并放大,然后起始异形胞的分化^[23]。*hetF* 基因是一个低水平组成性表达的基因,在异形胞发育中对 *hetR* 的表达起负调控作用^[24],可能通过编码蛋白酶活性来控制 HetR 的表达量在适当水平。而 *patA* 基因对异形胞发育的调控作用类似于 *hetF* 基因,也是通过对 *hetR* 的表达进行负调控,而且 *patA* 还和异形胞图式形成有关^[25]。*hetP* 基因也是启动异形胞分化所必需的。该基因插入失活的藻株不能形成异形胞,而过量表达 *hetP* 则会产生成簇异形胞^[26]。

2 异形胞的图式形成和维持

在缺乏氮源条件下,鱼腥藻 PCC 7120 藻丝体上大约 10% 的细胞以半规律的模式分化形成固氮的异形胞,氮源持续缺乏,新的异形胞在 2 个已形成的异形胞之间产生以继续维持这种生长模式的存在。现在发现了一些对于异形胞图式形成和维持起关键作用的基因并提出了一些调控模型,在缺氮条件下,鱼腥藻 PCC 7120 的固氮异形胞在藻丝上按照一种周期性图式排列。异形胞分化的图式需 2 个抑制因子, *patS* 和 *hetN*。它们是通过横向抑制 HetR 这个分化激活因子的表达水平而在分化的不同阶段发挥作用。

在鱼腥藻 PCC 7120 中,*patS* 编码一个有 13 或 17 个氨基酸的多肽,具体长度取决于其在细胞内所使用的翻译起始密码子的不同^[27]。在 *hetR* 和 *patS* 基因组已测序的所有丝状蓝藻中,*patS* 基因编码的多肽可能有 13~90 个氨基酸,但其 C-端均包含一个保守的 5 个氨基酸序列, RGSGR^[28]。*patS* 基

因在异形胞发育的早期转录并在分化的细胞和成熟的异形胞中强表达,即使是在有氮源条件下,*patS* 缺失突变株也能形成异形胞,而缺氮诱导后,藻丝形成成串的异形胞表型,大约全部细胞的 30% 会分化形成异形胞,而过量表达 *patS* 则会抑制异形胞的形成。PatS C-端最后 5 个氨基酸残基突变后其抑制功能消失。通过在培养基中添加人工合成的对应于 PatS 最后 5 个氨基酸的多肽 PatS-5 (RGSGR),就可抑制异形胞的分化,而最后 4 个氨基酸的多肽则不能抑制分化^[27]。PatS 信号应该是通过分化细胞向邻近的细胞传递来抑制 HetR 的。然而,如果将细胞内的 PatS 替换成 PatS-5 并使其在分化的细胞内表达,则其即丧失了抑制异形胞分化的功能,这暗示全长的 PatS 对于抑制信号的扩散及成熟可能起到重要作用^[29]。Golden 等发现当让一个定位于胞质的蛋白带上 PatS-5 后仍可起到抑制作用,说明 PatS 的作用受体位于胞质中^[29]。体外试验显示 PatS-5 可抑制 HetR 的 DNA 结合活性,且表现为一种浓度依赖的形式,暗示在营养细胞中可能具有高 PatS/HetR 比率,从而抑制了异形胞的形成,而且 HetR 是 PatS 的一个受体^[20]。过表达 *patS* 和 *hetR* 可抑制异形胞形成,暗示了 *patS* 基因作用于 *hetR* 的下游,而 PatS 可抑制 HetR 的活性^[30]。由于 PatS 在藻丝中调控异形胞图式形成的机理尚不清楚,而研究发现 PatS-5 是全长 PatS 多肽片段调控正常异形胞分化图式最低限度的一个替换物。然而, Feldmann 通过 EMSA 和 ITC 试验分别定性和定量的证明了 PatS-6 对 HetR DNA 结合活性的抑制能力要超过 PatS-5 30 倍,超过 PatS-7 1 200 倍,而 PatS-8 与 HetR 则没有结合^[31]。这是不是意味着 PatS-6 与 HetR 的相互作用比 PatS-5 更有效,同时也更可能是体外 PatS 活性的替代物。虽然已知调控异形胞图式的活性物质的存在,但其沿藻丝移动的途径还不清楚。这些活性物质是否能通过相邻细胞之间的细胞壁进行移动,还是运输到周质间隙后,通过藻丝共同的周质间隙运输到相邻的细胞^[32],都有待于进一步研究。

hetN 编码一个类似于酮脂酰还原酶的蛋白。与 *patS* 一样,过表达 *hetN* 会完全抑制异形胞发育。*hetN* 缺失突变株在缺氮诱导的 24 h 内,异形胞图式是正常的,可随着缺氮时间的延长,到 48 h 时会由于异形胞的过量产生导致 Mch 表型^[33]。*hetN* 基因不表达时所产生的延迟出现的 Mch 表型,以及 *hetN* 基因总是在缺氮诱导 12 h 后才在异形胞中表达的事实^[34],说明 HetN 并不能控制异形胞的图式形成,但显然是图式维持的另一个活性因子。在有氮条件下,营养细胞中存在有少量 HetN 蛋白;而在缺氮条件下,*hetN* 基因主要在异形胞中表达且 HetN 蛋白也仅存在于成熟异形胞中^[35]。HetN 蛋白在其 132~136 位的氨基酸序列与 PatS 的 5 肽 RGSGR 序列相同。试验表明,保守的替换 RGSGR 中的任意一个氨基酸都会降低 HetN 对细胞分化的抑制作用, HetN 的抑制作用和图式形成活性主要是由于其包含 RGSGR 序列。

其他基因如 *patA* 基因是通过促进 *hetR* 的表达来影响异形胞的图式形成。*patA* 编码一个类似于 CheY 蛋白的应答调控蛋白,其作用是激活磷酸激化的开关。*patA* 突变株形成的

异形胞几乎只存在于藻丝的端部,即使过表达 *hetR* 这种表型也会维持,表明 *patA* 是在 *hetR* 的下游起作用的。通过研究 *patA*、*hetN* 和 *patS* 上位表达关系得出,*patA* 只有在 *patS* 和 *hetN* 存在时才是必需的,说明 PatA 可能可削弱 PatS 等抑制信号的抑制作用,或通过保护 HetR 使其对抑制信号不再敏感^[30]。

3 异形胞的相关固氮基因及基因组重排

固氮作用是依赖于 ATP,通过固氮酶复合物催化将大气中的氮转变成铵盐的过程。在包括鱼腥藻 PCC 7120 在内的许多形成异形胞的蓝藻中,固氮酶复合物只在异形胞中合成,而固氮酶复合物在所有固氮生物中都是高度保守的,由固氮酶(钼-铁蛋白)和还原酶(铁蛋白)组成。鱼腥藻 PCC 7120 中,固氮基因(*nif* 基因)是在异形胞发育后期即缺氮 18~24 h 后才特异性表达的^[36]。其中 *nifHDK* 基因丛的 *nifH* 编码固氮酶还原酶,*nifD* 和 *nifK* 分别编码固氮酶的 α 和 β 亚基^[37]。在 *nifHDK* 操纵子的上游是另一个操纵子 *nifB-fdxN-nifS-nifU*^[38]。

除此以外,在异形胞分化进入晚期时,基因组在 3 个位置上发生了影响固氮的 DNA 重排^[39-40]。其中有 2 个是发生在固氮酶相关基因丛中,一个是在 *nifD* 基因内部包含 *xisA* 基因的 11 kb DNA 片段发生的位点特异性剪切,另一个是在 *fdxN*(编码细菌型铁氧还蛋白)内部一个 55 kb 的 DNA 被剪切掉,第 3 个发生在 *hupL* 内部,剪切掉一个 10.5 kb 的 DNA 片段。这 3 个 DNA 元件看起来对基因的正常功能都没有危害,只是存在于 DNA 序列中,传递给下一代营养细胞,在终极分化的异形胞中从染色体上剪切掉,是为了其所在的基因可正常表达。

4 固氮蓝藻在农业上的意义

粮食危机严重地影响着人类的生存和发展,是当今世界面临的重大问题之一。而氮是植物所必需的生命元素之一。大气中约有 4/5 是 N_2 ,但它并不能直接为植物所利用。而固氮蓝藻具有固氮作用,可固定大气中的分子态氮成为氮化合物,同时其具有光合作用,可将 CO_2 变为碳化合物并放出氧气,从而为自身的固氮提供能源和还原剂。固氮蓝藻一方面利用这些氮化合物提供给自身生长发育,同时还将体内谷氨酸转变成谷氨酰胺和其他氨基酸等含氮化合物^[7],而藻体死亡后经分解又可释放出大量的氨态氮,这些都能提高土壤肥力,改善土壤结构,提高产量。继 1939 年印度学者 De 对固氮蓝藻为水稻提供肥料的报道后^[41],美、英等国科学家也进行了试验,证明固氮蓝藻具有肥效;随后,利用在稻田放养固氮蓝藻增肥增产的工作在许多国家如日本、印度、埃及、意大利、美国、菲律宾和以色列都开展起来。瑞典曾测定过在含念珠藻较丰富的旱地里,固氮量可达 15~51 kg/hm²。还有人测定森林土壤里固氮蓝藻的固氮量约为 10.9 kg/hm²^[42]。由此可表明固氮蓝藻的固氮量是很可观的,它们就像是大自然中的天然生物氮肥厂,可制造出大量的氮化合物。而且蓝藻固氮在提高了土壤肥力同时还可避免因施用化肥给土地带来的不良影响,因此其在农业及自然界的氮素循环中都

有重要意义。而具有异形胞的蓝藻就是其中的一种固氮蓝藻,研究如何将其应用于农业生产具有深远意义。

目前面临的另外一个问题是土地盐碱化,这严重制约着耕地利用的永续性,直接影响了农业的可持续发展。盐分对植物的危害主要包含引起离子毒害(特别是 Na^+)和渗透胁迫 2 方面^[43-44]。而光合自养型的固氮蓝藻有很好的耐盐性和调节渗透压的能力,具有异形胞的固氮蓝藻,细胞能分泌胞外多糖(EPS),这种 EPS 为多聚阴离子大分子,可与阳离子相互作用,它对 Na^+ 的吸附能影响外环境 pH 的改变。固氮蓝藻的耐盐机理可归纳为 4 个方面: Na^+/H^+ 和 $Na^+/H^+ - K^+$ 反向载体系统可不断地将胞内 Na^+ 排出胞外;在盐胁迫情况下可合成酸性化合物,从而降低土壤的 pH 值;积累或产生一些相溶性物质,维持细胞内外渗透压平衡;结合氮的存在可阻止过量 Na^+ 的积累,从而提高蓝细菌的耐盐性^[45]。具有异形胞的固氮蓝藻能从本质上改善土壤的理化性质,并且投入低,因此其在盐碱地改良上的优势及应用潜力也是不容忽视的。

参考文献

- [1] SCHIRRMMEISTER B E, ANTONELLI A, BAGHERI H C. The origin of multicellularity in cyanobacteria[J]. BMC Evol Biol, 2011, 11: 45.
- [2] MEEKS J C, E L HAI J. Regulation of cellular differentiation in filamentous cyanobacteria in free-living and plant-associated symbiotic growth states[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2002, 66: 94-121.
- [3] GOLDEN J W, YOON H S. Heterocyst formation in *Anabaena* [J]. Curr Opin Microbiol, 1998, 1: 623-629.
- [4] WOLK C P, ERNST A, ELHAI J. Heterocyst metabolism and development [M]//BRYANT D A. The Molecular Biology of Cyanobacteria. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1994: 769-823.
- [5] CARDEMIL L, WOLK C P. The polysaccharides from heterocyst and spore envelopes of a blue-green alga. Structure of the basic repeating unit[J]. J Biol Chem, 1979, 254: 736-741.
- [6] CUMINO A C, MARCOZZI C, BARREIRO R, et al. Carbon cycling in *Anabaena* sp. PCC 7120. Sucrose synthesis in the heterocysts and possible role in nitrogen fixation[J]. Plant Physiol, 2007, 143: 1385-1397.
- [7] MARTIN-FIGUEROA E, NAVARRO F, FLORENCIO F J. The GS-GOGAT pathway is not operative in the heterocysts. Cloning and expression of *glsF* gene from the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120[J]. FEBS Lett, 2000, 476: 282-286.
- [8] POPA R, WEBER P K, PETT-RIDGE J, et al. Carbon and nitrogen fixation and metabolite exchange in and between individual cells of *Anabaena oscillarioides* [J]. ISME J, 2007, 1: 354-360.
- [9] EHIRA S, OHMORI M, SATO N. Genome-wide expression analysis of the responses to nitrogen deprivation in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC 7120[J]. DNA Res, 2003, 10: 97-113.
- [10] THIEL T, PRATTE B. Effect on heterocyst differentiation of nitrogen fixation in vegetative cells of the cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413[J]. J Bacteriol, 2001, 183: 280-286.
- [11] LAURENT S, CHEN H, BEDU S, et al. Nonmetabolizable analogue of 2-oxoglutarate elicits heterocyst differentiation under repressive conditions in *Anabaena* sp. PCC 7120[J]. Proc Natl Acad Sci, 2005, 102: 9907-9912.
- [12] HERRERO A, MURO-PASTOR A M, VALLADARES A, et al. Cellular differentiation and the NtcA transcription factor in filamentous cyanobacteria[J]. FEMS Microbiol Rev, 2004, 28: 469-487.
- [13] WEI T F, RAMASUBRAMANIAN T S, PU F, et al. *Anabaena* sp. strain PCC 7120 *bifA* gene encoding a sequence-specific DNA-binding protein cloned by in vivo transcriptional interference selection[J]. J Bacteriol, 1993, 175: 4025-4035.
- [14] RAMASUBRAMANIAN T S, WEI T F, GOLDEN J W. Two *Anabaena* sp. strain PCC 7120 DNA-binding factors interact with vegetative cell- and heterocyst-specific genes[J]. J Bacteriol, 1994, 176: 1214-1223.
- [15] RAMASUBRAMANIAN T S, WEI T F, OLDFHAM A K, et al. Transcription

- of the *Anabaena* sp. strain PCC 7120 *ntcA* gene: Multiple transcripts and NtcA binding[J]. J Bacteriol, 1996, 178: 922 - 926.
- [16] FRIAS J E, FLORES E, HERRERO A. Requirement of the regulatory protein NtcA for the expression of nitrogen assimilation and heterocyst development genes in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120[J]. Mol Microbiol, 1994, 14: 823 - 832.
- [17] TANIGAWA R, SHIROKANE M, MAEDA SI S, et al. Transcriptional activation of NtcA-dependent promoters of *Synechococcus* sp. PCC 7942 by 2-oxoglutarate in vitro[J]. Proc Natl Acad Sci, 2002, 99: 4251 - 4255.
- [18] BLACK T A, CAI Y, WOLK C P. Spatial expression and autoregulation of *hetR*, a gene involved in the control of heterocyst development in *Anabaena* sp. PCC 7120[J]. Mol Microbiol, 1993, 9: 77 - 84.
- [19] ZHOU R, WEI X, JIANG N, et al. Evidence that HetR protein is an unusual serine-type protease[J]. Proc Natl Acad Sci, 1998, 95: 4959 - 4963.
- [20] HUANG X, DONG Y, ZHAO J. HetR homodimer is a DNA-binding protein required for heterocyst differentiation, and the DNA-binding activity is inhibited by PatS[J]. Proc Natl Acad Sci, 2004, 101: 4848 - 4853.
- [21] KHUDYAKOV I Y, GOLDEN J W. Different functions of HetR, a master regulator of heterocyst differentiation in *Anabaena* sp. PCC 7120 can be separated by mutation[J]. Proc Natl Acad Sci, 2004, 101: 16040 - 16045.
- [22] EHIRA S, OHMORI M. NrrA, a nitrogen-responsive response regulator facilitates heterocyst development in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120[J]. Mol Microbiol, 2006b, 59: 1692 - 1703.
- [23] ZHAO Y, SHI Y, ZHAO W, et al. CcbP, a calcium-binding protein from *Anabaena* sp. PCC 7120, provides evidence that calcium ions regulate heterocyst differentiation[J]. Proc Natl Acad Sci, 2005, 102: 5744 - 5748.
- [24] WONG F C, MEEKS J C. The *hetF* gene product is essential to heterocyst differentiation and affects HetR function in the cyanobacterium *Nostoc punctiforme*[J]. J Bacteriol, 2001, 183: 2654 - 2661.
- [25] LIANG J, SCAPPINO L, HASELKORN R. The *patA* gene product, which contains a region similar to CheY of *Escherichia coli*, controls heterocyst pattern formation in the cyanobacterium *Anabaena* 7120[J]. Proc Natl Acad Sci, 1992, 89: 5655 - 5659.
- [26] FERNANDEZ-PINAS F, LEGANES F, WOLK C P. A third genetic locus required for the formation of heterocysts in *Anabaena* sp. strain PCC 7120[J]. J Bacteriol, 1994, 176: 5277 - 5283.
- [27] YOON H S, GOLDEN J W. Heterocyst pattern formation controlled by a diffusible peptide[J]. Science, 1998, 282: 935 - 938.
- [28] ZHANG J Y, CHEN W L, ZHANG C C. *hetR* and *patS*, two genes necessary for heterocyst pattern formation, are widespread in filamentous non-heterocyst-forming cyanobacteria[J]. Microbiology, 2009, 55: 1418 - 1426.
- [29] WU X, LIU D, LEE M H, et al. *patS* minigenes inhibit heterocyst development of *Anabaena* sp. strain PCC 7120[J]. J Bacteriol, 2004, 186: 6422 - 6429.
- [30] OROZCO C C, RISSER D D, CALLAHAN S M. Epistasis analysis of four genes from *Anabaena* sp. strain PCC 7120 suggests a connection between PatA and PatS in heterocyst pattern formation[J]. J Bacteriol, 2006, 188: 1808 - 1816.
- [31] FELDMANN E A, NI S S, SAHU I D, et al. Differential Binding between PatS C-Terminal Peptide Fragments[J]. Biochemistry, 2012, 51 (12): 2436 - 2442.
- [32] WOLK C P. Heterocyst formation[J]. Annu Rev Genet, 1996, 30: 59 - 78.
- [33] CALLAHAN S M, BUIKEMA W J. The role of HetN in maintenance of the heterocyst pattern in *Anabaena* sp. PCC 7120[J]. Mol Microbiol, 2001, 40: 941 - 950.
- [34] BAUER C C, RAMASWAMY K S, ENDLEY S, et al. Suppression of heterocyst differentiation in *Anabaena* PCC7120 by a cosmid carrying wild-type genes encoding enzymes for fatty acid synthesis[J]. FEMS Microbiol Lett, 1997, 151: 23 - 30.
- [35] LI B, HUANG X, AND ZHAO J. Expression of *hetN* during heterocyst differentiation and its inhibition of *hetR* up-regulation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120[J]. FEBS Lett, 2002, 517: 87 - 91.
- [36] ELHAI J, WOLK C P. Developmental regulation and spatial pattern of expression of the structural genes for nitrogenase in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120[J]. EMBO J, 1990, 9: 3379 - 3388.
- [37] GOLDEN J W, WHORFF L L, WIEST D R. Independent regulation of *nifHDK* operon transcription and DNA rearrangement during heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. J Bacteriol, 1991, 173: 7098 - 7105.
- [38] MULLIGAN M E, HASELKORN R. Nitrogen fixation (*nif*) genes of the cyanobacterium *Anabaena* species strain PCC 7120. The *nifB-fdxN-nifS-nifU* operon[J]. J Biol Chem, 1989, 264: 19200 - 19207.
- [39] GOLDEN J W, ROBINSON S J, HASELKORN R. Rearrangement of nitrogen fixation genes during heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120[J]. Nature, 1985, 314: 419 - 423.
- [40] GOLDEN J W, WIEST D R. Genome rearrangement and nitrogen fixation in *Anabaena* blocked by inactivation of *xisA* gene[J]. Science, 1988, 242: 1421 - 1423.
- [41] DE P K. The role of blue-green algae in nitrogen fixation in rice-field[J]. Proc Roy Soc London, 1939, 127: 121 - 139.
- [42] YAN G A, YU J Y. Comparison of the effects of nitrogen on removal, growth and some physiological characteristics of immobilized and free *Chlorella Vulgaris*: I Growth and nutrient removal[J]. Toxicological and Environmental Chemistry, 1997, 58: 63 - 74.
- [43] 牛东玲, 王启基. 盐碱地治理研究进展[J]. 土壤通报, 2002, 33(6): 399 - 455.
- [44] 白文波, 李品芳. 盐胁迫对马蔺生长及 K⁺、Na⁺ 吸收与运输的影响[J]. 土壤, 2005, 37(4): 415 - 420.
- [45] 张巍, 冯玉杰. 固氮蓝藻在盐碱化土地生态修复中应用的研究进展[J]. 土壤, 2008, 40(4): 510 - 516.
- [46] YANG B, CHU S S, PAN G. Measurement of gas vesicle in cyanobacteria and its pretreatment methods[J]. Agricultural Science & Technology, 2011, 12(8): 1096 - 1099.
- [47] 王业勤, 何家菀, 黎尚豪. 固氮蓝藻细胞中保护固氮酶的除氧系统[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 1982(3): 231 - 240.

(上接第 491 页)

- [26] 潘向艳, 季孔庶, 方彦. 淹水胁迫下杂交鹅掌楸无性系叶片内源激素含量的变化[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2008, 32(1): 29 - 32.
- [27] 刘桂丰, 杨传平, 温绍龙, 等. 盐逆境条件下 3 个树种的內源激素变化[J]. 东北林业大学学报, 1998, 26(1): 1 - 3.
- [28] 揭雨成, 冷鹏, 许英. 干旱胁迫下苧麻叶片萎蔫程度、相对含水量与 ABA 变化的品种间差异[J]. 中国麻业, 2002, 24(1): 16 - 18.
- [29] 徐文玲, 王翠花, 牟晋华, 等. 不同浓度脱落酸对大白菜抗冷特性的影

- 响[J]. 山东农业科学, 2012(1): 47 - 50.
- [30] 刘高峰. 脱落酸诱导黄瓜对霜霉病的抗性研究[J]. 北方园艺, 2012(2): 146 - 148.
- [31] 汤日圣, 童红玉, 唐现洪, 等. 脱落酸提高水稻秧苗耐盐性的效果[J]. 江苏农业学报, 2012(4): 910 - 911.
- [32] 初敏, 王秀峰, 王淑芬, 等. 脱落酸预处理对低温胁迫下萝卜幼苗的缓解效应[J]. 河南农业大学学报, 2012(1): 40 - 44.
- [33] 郝格格, 孙忠富, 张灵强, 等. 脱落酸在植物逆境胁迫研究中的进展[J]. 中国农学通报, 2009(18): 212 - 215.