

根瘤菌结瘤基因及结瘤竞争研究的新进展

葛 诚

(中国农科院土肥所微生物室,北京)

根瘤菌作为一个重要的土壤微生物类群,日益受到人类的重视。近廿年来,对根瘤菌本身及根瘤菌-豆科植物共生体系的研究发展很快。本文仅就根瘤菌结瘤基因及结瘤竞争研究的新进展作一简略介绍。

根瘤菌中最重要的两个基因是固氮基因 (*nif*) 和结瘤基因 (*nod*)。过去若干年里对 *nif* 基因做了大量的研究,取得了重要的成果。对它们的研究目前仍在继续深入。比起 *nif* 基因,对结瘤 (*nod*) 基因的研究处于起始阶段,但进展很快。这可以从几个方面反映出来。

nod 基因的定位和结构

Adam Kondorosi 初步总结了与根瘤发生和发育有关的基因鉴定及结构研究的进展指出,从不同的根瘤菌种已经分离和鉴定了在植物寄主上结瘤的基因编码。快生型根瘤菌的 *nod* 基因被确定在大的固有质粒上。如苜蓿根瘤菌的 *nod* 基因,一部分功能和核苷

文内未注明引文出处的均引自 Book of Abstracts 6th International Symposium on Nitrogen Fixation 和 Book of Abstracts 10th North American Rhizobium Conference.

酸序列都是保守的,另一部分则含有确定结瘤寄主专性的基因。用不同的遗传学技术,如 Tns 诱变和互补分析,结合用大肠杆菌小型细胞的表达研究以及体外转录/翻译系统,核苷酸序列分析等,已经鉴定出 4 个公共的(“Common”)结瘤基因,被命名为 *nod A*, *B*, *C*, *D*, 以及至少包括 3 个寄主专性基因 (host-specific nodulation gene) 即 *hcn* 基因,被称为 *nod E*, *F*, *G*。Thomas Egelhoff 等对苜蓿根瘤菌 *nod* 基因产物的研究表明,结瘤基因包括 4 个主要的开读框 (open reading frames),即 *nodA*, *B*, *C*, *D*, 用 *nod C-lacZ* 合成的试验证明 *nodC* 的表达是由植物根渗出液引起的。基因排布说明 *nod ABC* 可能是 1 个操纵子。作者已经纯化了 *nodA* 基因的产物,并以其为抗原制备了抗血清,目前正在做制备其他 *nod* 基因产物抗血清的工作,以便进一步研究 *nod* 基因产物的表达和基因的定位。Robert Fisher 等用苜蓿根瘤菌株 1021 研究了其 *nod* 基因的核苷酸序列和转录分析,并克隆了起始结瘤的基因,确定这个基因在其巨大质粒的 4Kb 部分上。通过测定 *nod* 基因的 DNA 序列以及 *nod::Tn5* 插入位点的 Tn5 饱和诱变,已经画出了 4 个基因图,即 *nodA*, *B*, *C*, *D*, 种间互补性和 DNA 序列分析证明这些基因是保守的。*nod ABC* 被同等转录而 *nodD* 是分散的,*nodD* 转录起点起自 *nodA* 仅仅 266 个核苷酸。进一步的工作还指出,*nod ABC* 的诱导取决于 *nodD* 的表达和增强植物细胞的渗出物。作者并且纯化了在有或无植物渗出液的情况下生长的苜蓿根瘤菌的 RNA 聚合酶,用这些聚合酶转录包含了 *nodD-nodA* 顺反子区的限定的片段,以便去测定这些基因的体外转录起始位点。虽然一般快生型根瘤菌的 *nod* 基因位于大质粒上,但也有例外。最近 Masterson 的研究指出,快生型大豆根瘤菌的 *nod* 基因大部分位于质粒上,且是与 *nif* 基因在同一个质粒上,USDA205 的 *nif* 和 *nod* 基因分别位于 112 和 195Md 两个质粒上,而 USDA194 的 *nod* 基因不在质粒上,与慢生型根瘤菌一样,是在染色体上^[1]。

nod 基因的功能

Hynes 等对苜蓿根瘤菌的研究证明在所研究的苜蓿根瘤菌株中均有两个 800—1000Md 的巨大质粒 MW。其中的一个携带有早期结瘤基因 (*nod ABC*, *Hsp*),固氮基因 *A-F* 以及 *nifHDK* 基因。第二个质粒含有产生胞外多糖 (EPS) 的基因,并且证明一些 EPS 对苜蓿的正常结瘤是必不可少的。Rofe 等用 Tn5 和 MudI734 诱变处理对三叶草根瘤菌编码了 *nod* 和 *hcn* 基因的 14Kb 的 DNA 片段做了鉴定,证明这个片段上有 4 个不同的区域,分别被称为 I, II, III, IV, DNA 序列比较指出 I 区含有 4 个包括了根毛卷曲在内的 4 个基因 (*nodA*, *B*, *C*, *D*), 这些基因在任何地

方突变都将导致根毛不卷曲,这些基因还包括了对三叶草根瘤菌果胶酶活性的调控。II 区突变产生结瘤不完全突变体。III 区的插入则减弱植物的早期识别及入侵过程,并导致结瘤寄主范围的改变,此区突变体引起特征性的根毛畸变,在豌豆上结瘤和产生侵染线。改变结瘤寄主范围甚至还包括了对菌株要求较严格的阿富汗豌豆。IV 区携带了一个决定植物种类的共有的 *nod* 基因的表达激活基因。Downie 等认为豌豆根瘤菌的结瘤和寄主专性基因是在一个连续的共生质粒上。通过对不同的 *nod* 基因的克隆,诱变,体外基因产物的合成及 DNA 序列的开读框,鉴定出 7 个基因,即 *nodA*, *B*, *C*, *D*, *E*, *F*, *G*, 作者认为 *nodABC* 基因在不同的根瘤菌种间是强烈保守的,并能引起根毛卷曲。而 Sandra Auger 等对慢生型大豆根瘤菌结瘤区的分子生物学研究认为,在 1 个重迭的考斯质粒 (cosmid) 克隆系列,用与苜蓿根瘤菌的 8.7Kb 同源的根毛卷曲片段分离了 100Kb 的大豆根瘤菌株 110 的基因组。限定绘图和 Southern 杂交试验确定在 *B. japonicum* 的根毛卷曲同源区是大约 12Kb 的 DNA。用 *B. japonicum* 的 *Hac^r* 突变体互补证明了在结瘤过程中其功能是在这个区的最小部分。功能互补取决于存在于 1.8Kb 的 *EcoRI-HindIII* 片段上。这个区用来自类菌体和植物细胞原位标记的 RNA 的杂交试验做了鉴定。

Parasponia 根瘤菌的 nod 基因

1973 年 Trinick 从巴布亚新几内亚的榆科的 *Parasponia* 属的树木的根瘤上分离出一种豇豆族根瘤菌,这种根瘤菌既可以在 *Parasponia* 属的若干种上结瘤、固氮,而且又可以在豆科植物的豇豆和大翼豆上结瘤和固氮。有趣的是,分布在欧洲和北美的 *Parasponia* 的许多种是由固氮放线菌 *Frankia* 结瘤,而只有生长在巴布亚新几内亚、斐济、马来群岛和印度尼西亚西爪哇岛上的一些种是由这种根瘤菌结瘤和固氮的。对这种特殊根瘤菌的研究有助于了解根瘤菌与非豆科植物结瘤和固氮的实质,许多科学家都积极做了这方面的研究。如 Becking 对 *Parasponia* 根瘤菌的共生,寄主专性,生长及不同条件下的固氮做了研究。他指出,三叶草根瘤菌,羽扇豆根瘤菌能够在 *Parasponia* 根部结瘤,另外的一些热带根瘤菌如花生根瘤菌,合欢根瘤菌也可以在其根部结瘤。而豌豆根瘤菌,菜豆根瘤菌和苜蓿根瘤菌在 *Parasponia* 幼苗根部产生变态根瘤或假根瘤。而 *Parasponia* 根瘤菌只在豇豆和大翼豆上结瘤。作者还比较了由固氮放线菌 *Frankia* 所结根瘤和由 *Parasponia* 根瘤菌所结根瘤的成分做了比较,突出的是后者的根瘤里不含瓜氨酸 (Citrulline),而由 *Parasponia* 根瘤菌所结的豇豆根瘤和大翼豆根瘤里有瓜氨酸,但含量很低^[2]。Scott 分析了 *Parasponia* 根瘤菌 ANU₂₈₈

菌株的结瘤基因,用功能互补和 DNA 序列分析,鉴定出 4 个结瘤基因,即 *nod A, B, C, D*, 这些基因的结构及这 4 个基因的产物看来与三叶草根瘤菌完全相同,且与三叶草根瘤菌的氨基酸序列至少有 60% 同源。目前尚未分析这个菌株的 *hsm* 基因。虽然如此,可以说是朝着弄清楚这个问题向前迈进了一大步。

综上所述可以看出,根瘤菌本身的 *nod* 基因调控比较复杂,而根瘤菌在豆科植物根部结瘤除了其本身以外,还有寄主植物和环境条件的影响,是一个复杂的过程。这些因素的总和影响了根瘤菌的结瘤竞争和生产应用。不少学者的研究证明,田间土著根瘤菌中虽然不乏优良菌株,但在许多情况下却是由固氮能力较低的菌株占据根瘤位置的。Peter Ames 等指出,不同的调查者的田间研究表明土著菌株在固氮能力上也常常是低效菌株^[3]。Keyser 等对美国 12 个州的 65 个大豆产区点上分离到 972 个土著大豆根瘤菌株,绝大多数都是无氢酶活性的 *Hup⁻* 菌株,12 个州中有 10 个州仅有 20% 的分离株是 *Hup⁺*, *Hup⁺* 与 *Hup⁻* 菌株在固氮效率上的差异是显而易见的^[4]。因此,了解根瘤菌的结瘤竞争本质及其影响因素对于增加豆科植物的氮素供应是十分必要的。

环境条件与结瘤竞争

许多试验证明,不同的环境对不同的菌株结瘤率有较大影响。Jaffrey 等报道了用两个大豆根瘤菌株 USDA76 和 RCR3410 以 1:1 的比例混合接种,在冬季的温室试验里 USDA76 的结瘤率为 5%,但是当在光照强度不同的控制室里,USDA76 产生了完全不同的结瘤率。大豆在光照强度为 400 μE/m²/sec,每天 16 小时的情况下,USDA76 的结瘤率为 23%,光照强度增加 1 倍,USDA76 的结瘤率为 58%。如果大豆生长在同样的光强度和温度条件下,培养的营养液不同,结瘤率亦有较大差异。高水平的营养 USDA76 结瘤占 59%,反之,则下降为 22%。试验虽然反映出环境条件差异对菌株结瘤竞争的影响,同时也反映出植株生长速率较快对 USDA76 结瘤有利,生长较慢则对 RCR3410 结瘤有利。

土壤类型对菌株的竞争结瘤率也有影响。Rice 等分析了土壤 pH 对接种植株与土著菌株之间的竞争。作者测定了 4500 个根瘤。当苜蓿种在 pH5.9 的土壤上,接种菌株 NRG-61 占据 32.6—45.9% 的根瘤,而种在 pH7.0 的土壤时,该菌株只能形成 3.7% 的根瘤。使用的根瘤菌剂型不同,竞争结瘤率也不同。用颗粒状接种剂明显增加 NRG-61 菌株对土著菌株的竞争能力。在 pH5.9 的土壤上 NRG-61 的结瘤率可增加到 90.4—98.5%,就是在 pH7.0 的土壤上也还有 6.7—28.1% 的根瘤是由 NRG-61 所结。Mouwad 等观察了两种热带土壤上在银合欢上结瘤的

菌株之间的竞争作用。在氧化土壤上,用单菌株接种,B213 和 B215 均超过土著菌株,结瘤率分别为 92% 和 62%。B214 菌株在这类土壤上具有最小的竞争力,结瘤率仅为 30%。但这个菌株在软土上却可形成 70% 的根瘤。如果改用多菌株接种剂,则最成功的竞争者为 TAL1145 菌株,它在两类土壤上的结瘤都超过了土著的和其它的银合欢接种菌株^[5]。另外,温度对菌株的结瘤竞争也有较强的影响。Olson 等证实了根温对两个苜蓿根瘤菌株结瘤和侵染模式的影响。在根温控制条件下,使其温度保持在 7、12、17、21、25℃,气温 24—30℃,结果表明,根温在 21℃ 时根瘤量增加最多,25℃ 则减少,7℃ 的根温产生的根瘤与 21℃ 相比,数量相差不大,但重量减少 25%。根温愈低,双侵染愈高,如 7℃ 时,双侵染为 66%,12℃ 为 38%,21℃ 时仅有 10%。目前对双侵染对固氮的作用还不太了解。Trinić 从通常是由慢生型的豇豆根瘤菌结瘤的扁豆 (*Lablab*) 根瘤中分离到 1 株产酸的快生型根瘤菌株 NGR234^[6],用此菌株与慢生型豇豆根瘤菌株的结瘤竞争研究亦表明了不同快、慢型豇豆根瘤菌现瘤时间,结瘤率均有较大差异。这种温度影响是 Trinić 解释在热带的一些豆科植物根瘤里为什么主要是慢生型的,尽管土壤中存在不少快型菌株,而从根瘤里分离出来的机会要少得多的原因^[7]。

菌株间的结瘤竞争

这里一方面是接种菌株中的多菌株间的结瘤竞争,另一方面是接种菌株与土著菌株间的结瘤竞争。R. K. A.-Rashidi 等评价了伊拉克的一个引入的和土著的苜蓿根瘤菌株之间的竞争试验,结果表明引入菌株在持久性上有明显差异,第一季 3D oa1 和土著分离株 2-1 有高的回收率,占被测根瘤 80% 以上。第二季 3D oa1 和 2-1 的结瘤率下降到 45% 和 20%,另外两个引进菌株 3D oa29a 和 3D oa6 及土著分离株 14-2 均增加了结瘤率。同一互接种族的根瘤菌之间,甚至同一根瘤菌种但来源不同,可以互相抑制结瘤。Lie 报道了阿富汗豌豆可与亚洲中部和东部土壤中的豌豆根瘤菌结瘤,但欧洲土壤中的豌豆根瘤菌则抑制这种结瘤作用。Dowling 等指出,欧洲豌豆根瘤菌 PF₁ 菌株上有 3 个大质粒,其中的 1 个 (p_{sym}PF₁) 可以杂交到苜蓿根瘤菌的 *nif* 和 *nod* 基因上,阻断原来土著菌株结瘤的基因可能就携带在这个共生质粒上。中国快生型大豆根瘤菌与慢生型大豆根瘤之间的结瘤竞争也表现出既与大豆品种有关,也与菌株的数量有关^[8,9,10]。此外,根瘤菌株之间的结瘤竞争与菌株的运动性有关。Peter Ames 等用苜蓿根瘤菌的有鞭毛的或无鞭毛不运动的菌株所做的结瘤竞争试验证明,运动菌株 RM2011 可以占据根瘤的 77%、86% 或 65%,另外两个试验里 RM2011 结瘤率分别为 98% 和 73%^[3]。

寄主植物对结瘤竞争的影响

寄主植物是根瘤菌结瘤的对象,对菌株有一定的选择性,故对结瘤竞争有十分重要的影响。许多研究认为寄主产生的外源凝集素(lectin)对识别根瘤菌及根瘤菌的侵染关系较大。Colynskaya 等分析了不同来源的 20 个大豆栽培品种的种子中的蛋白质和 lectin 的含量。多数蛋白质的含量为 29—32%,蛋白质中含有的 lectin 为 3.4—12.7%,与蛋白质含量无相关性。lectin 的含量在欧洲大豆最高,苏联远东地区次之,美国和中国的栽培大豆含量最低^[1]。快、慢型大豆根瘤菌均可侵染大豆结瘤,但二者又有极大的差异^[2,3]。Heron 等的试验表明从中国分离的 11 株快生型大豆根瘤菌并不凝集大豆寄主的外源凝集素^[4]。同一寄主对不同菌株有明显的选择性是肯定的,而且有许多试验证明。Cregan 等研究了寄主基因型抑制一些土著大豆根瘤菌结瘤的可能。作者及他人调查了美国中西部大豆产区的土壤中土著大豆根瘤菌的主要群体是血清组 123,在田间,这个类群常形成 65% 以上的根瘤。但是,这个类群是低效的,大多数菌株无吸氢酶活性。作者从美国收集的种质资源中鉴定了 12 个组合,这些组合抑制血清组 123 的结瘤。进一步用这些基因型中的 2 个试验。它们能与慢生型的高效菌系 USDA6, USDA110 和 122 有效固氮,但抑制 USDA123 结瘤。对照大豆品种为常用的 Williams,当接种 123/110 混合物时,USDA123 在对照大豆上结瘤为 79%,在筛选的基因型组合品种根部结瘤仅为 7%。类似的结果在接种 123/122, 123/138 的试验中均得到了。此项研究为进一步改善大豆氮素营养,增强高效菌株的竞争结瘤能力开辟了一条新的途径。Keyser 等进一步鉴定了血清组 123 菌株在美国栽培大豆和外国大豆品种上结瘤的差异,指出需要进一步筛选能够抑制多数血清组 123 菌株的大豆基因型。除了这些以外,还应该注意田间的根瘤菌区系的作用与寄主本身的影响哪个为主的问题。因为有些情况下,田间的根瘤菌区系是稳定的,对结瘤起主要作用,而引入菌株常常起不了主要作用。最近, Kossak (1985) 研究了一些生物和非生物因素对大豆根瘤菌株间竞争模式的影响后发现,在不同的土壤中,大豆根瘤菌血清组 USDA123 和 USDA110 在根瘤中占据的比例是不同的。当增加土壤中的硝酸盐含量或者在大豆根际中存在产生抗菌素的放线菌都不影响两个菌株间的竞争模式。过去一些

人认为抗性微生物区系的存在能够影响根瘤菌株间的竞争结果。虽然在实验室条件下,一些土壤微生物可以抑制根瘤菌,但在豆科根际土壤里,这种影响却很小。作者在试验中发现了另一个很有意义的现象。当大豆被种在根系被分成两部分的系统里,先用大豆根瘤菌接种其中的一半,结瘤后,再接种另一半根系,后接种的一半根系结瘤明显受到抑制。对此,作者进一步做了试验,大豆幼苗在被移栽入土壤之前,预先暴露于不同的菌株中,时间为 2—72 小时,然后移栽入土壤中,菌株间的竞争模式被大大改变。如原来土著菌系 USDA123 占据 70% 的根瘤,接种菌 USDA110 仅占 15%,根系预先暴露于 USDA110 后,其在根瘤中占据的比例达 26—55%。在另一种土壤里所做的试验也得到了一致的结果。试验表明,根系早期接触菌系对侵染结瘤具有关键影响^[5]。此结果对在生产中解决接种菌株的结瘤竞争无疑是个极好的启发。

参 考 文 献

- [1] Masterson, R. V. et al.: *J. of Bacteriol.*, 163(1): 21—26, 1985.
- [2] Becking, J. H.: *Plants and Soil*, 75(3): 309—402, 1983.
- [3] Peter, A. et al.: *J. of Bacteriol.*, 148(1): 728—729, 1981.
- [4] Keyser, H. H. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 47(4): 613—615, 1984.
- [5] Moawad, H. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 48(1): 5—9, 1984.
- [6] Trinick, M. J.: *J. of Appl. Bacteriol.*, 49: 39—53, 1980.
- [7] Trinick, M. J. et al.: *Plants and Soil*, 73(1): 105—115, 1983.
- [8] McLoughlin, T. J. et al.: *Can. J. Microbiol.*, 31: 220—223, 1985.
- [9] Israel, D. W. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 51(5): 898—903, 1986.
- [10] 葛诚等: 大豆科学, 5(4): 327—333, 1986.
- [11] Colynskaya, E. L. et al.: *Fizologiya and Biohimiya Kulturnykh Rastaniy*, 15(5): 477—481, 1983.
- [12] Scholla, M. H. et al.: *Int. J. of Syst. Bacteriol.*, 34(3): 283—286, 1984.
- [13] Scholla, M. H. et al.: *Int. J. of Syst. Bacteriol.*, 34(4): 484—486, 1984.
- [14] Heron, D. C. et al.: *Plants Physiol.*, 72(1): 158, 1983.
- [15] Kossak, R. M. et al.: *Appl. and Environ. Microbiol.*, 49(5): 1128—1133, 1985.