

## 根瘤菌竞争结瘤的研究进展

樊妙姬 马庆生

(广西农业大学生物技术教研室, 南宁 530005)

根瘤菌剂接种豆科作物是一项普遍推广的农业技术。但由于土壤中含有固氮效率差别极大的土著根瘤菌群体, 干扰和降低了接种根瘤菌的占瘤率, 致使接种根瘤菌剂的增产效果不显著<sup>[1, 2]</sup>。因此弄清根瘤菌的竞争结瘤机制和提高接种菌剂的占瘤率, 是生物固氮研究领域的理论和实际中急需解决的问题。根瘤菌竞争结瘤是个非常复杂的问题, 产生原因可分为三类: 一为环境因素, 如土壤的类型, 肥力, 土壤微生物的种类, 或土壤中根瘤菌的位置, 菌群体大小及环境变化影响菌的生长以及拌种的方式等, 由此会影响到竞争结瘤; 二是菌本身与竞争有关的因素, 如菌的运动性、生长繁殖速度, 菌的结瘤速度, 细胞表面的特征及根瘤形成效率等, 本质上是菌本身的遗传背景所致, 现在根瘤菌的与竞争结瘤有关的基因已开始被认识并被克隆, 如苜蓿根瘤菌的 *nfeA*, *B*, *D* 和大豆根瘤菌的 *nfeC* 基因等。三是由于寄主方面存在一些基因如 *Rj* 基因等的影响而使菌的竞争性降低。本文将简介一些提高接种菌剂占瘤率的研究情况及竞争结瘤的分子遗传学研究进展。

### 1 利用抗菌性及拮抗作用提高接种菌的竞争能力

使用杀菌剂进行种子处理是农业生产中的重要措施。若与此同时用具有杀菌剂抗性的根瘤菌剂接种, 有可能提高接种菌剂的竞争能力而达到高结瘤、高固氮的目的。如用福美双处理苜蓿种子并接种抗福美双的苜蓿根瘤菌可明显提高苜蓿产量<sup>[3]</sup>。施用福美双并接种抗福美双的大豆根瘤菌剂可大幅度提高接种菌株的占瘤率<sup>[4]</sup>。在分析福美双抗性基因中, 筛选到具抗性的荧光假单胞菌菌株, 通过基因文库互补突变株, 筛选到抗福美双有关的基因克隆, 但该

克隆在大肠杆菌和根瘤菌中表达水平很低<sup>[5]</sup>, 这可能与其基因表达具一定寄主专一性或不能外泌表达产物有关, 也可能福美双的微生物代谢分解由多个步骤组成, 即抗性基因为多基因, 中间产物仍对细菌具有毒性的缘故。福美双的抗性机制还需进一步研究。

春雷霉素具有抑制大豆根瘤菌的作用, 自发突变率极低, 以 NTG(亚硝基胍)诱变获 2 类抗性水平不同的共 5 株突变株: 一类最高抗性为  $500\mu\text{g}/\text{ml}$ , 另一类最高抗性达  $10\text{mg}/\text{ml}$ 。春雷霉素处理种子并接种抗性突变株可提高占瘤率, 春雷霉素抗性菌株的固氮酶活性不受影响<sup>[6]</sup>。春雷霉素抗性机制有两种: 一为多基因的作用, 如大肠杆菌 (*E.coli*) K12<sup>[7]</sup>, 另一类抗性是由于菌体内具有春雷霉素乙酰化酶基因<sup>[8]</sup>, 该基因只有 0.7kb, 因此可应用它构建春雷霉素抗性根瘤菌工程菌株。

土壤中根际微生物之间的相互作用是十分复杂的, 有的相互间会产生拮抗作用。拮抗菌的拮抗机理是菌体分泌一些对其他微生物有害的物质, 抑制其生长或将其杀死。有的菌通过泌酸或碱改变小环境的 pH 值而抑制其他菌生长, 或产生一些抗菌素类物质<sup>[9, 10]</sup>, 或由于次生代谢物的产生<sup>[11]</sup>, 或分泌一些活性蛋白而起抑制的作用。有人用根瘤菌的拮抗菌株与抗该拮抗物的根瘤菌株共同接种, 后者的占瘤率得以提高<sup>[9, 10]</sup>。一些根瘤菌株产生根瘤菌素而抑制其他根瘤菌的生长和结瘤, 提高自身的占瘤率。研究较多的为三叶草素, 为一短肽产物, 能抑制对其敏感的三叶草根瘤菌菌株的生长、结瘤, 而不影响抗性菌株的结瘤<sup>[12~14]</sup>。构建产根

瘤菌素的高效固氮根瘤菌工程菌株,也是提高高效固氮菌株的竞争能力的有效途径之一。

## 2 根瘤菌竞争结瘤的分子遗传学方面研究进展

结瘤过程是根瘤菌与豆科植物间相互作用的结果。近年来对根瘤菌竞争结瘤的有关基因研究取得了一些进展,特别是苜蓿根瘤菌。1986年 Sanjuan<sup>[15]</sup>分析苜蓿根瘤菌的一个隐晦大质粒 pRmeGR4b,其上不含 *nif*、*nod* 或 *fix* 基因,但含有该质粒的菌株比野生型菌株或消除了该质粒的菌株具有更高的侵染力,即结瘤效率更高。制作该质粒的基因文库,发现了有意义的克隆 pRmNT40,认为该克隆上含有控制 *nifKDH* 表达的启动子。以苜蓿根瘤菌的 *fixA* 启动子片段(即  $P_2$ )为探针,发现 pRmeGR4b 质粒上的 905bp PstIDNA 片段与  $P_2$  杂交,序列分析该片段发现其中 206bp 显示与  $P_1$ (即 *nifH* 启动子)和  $P_2$  两个共生启动子的 RNA 起始点上游的 DNA 具有高度的同源性。认为 *nif* 启动子在该段 DNA 具有保守的序列。研究这段类 *nif* 启动子序列的下游片段的表达,表明下游片段在微氧状态无论是培养液或根瘤中的表达都是依赖于 *nifA* 基因的功能的。转座子插入则会降低其竞争结瘤能力。由此认为 pRmeGR4b 上的约有 5kb 的片段是一段新的共生片段,定名为根瘤形成效率基因簇(nodule formation efficiency genes),即 *nfe* 基因<sup>[16]</sup>。序列分析 *nfe* 片段中的 3345bp 的 DNA,证实该片段中有 4 个开放阅读框架(Open reading frames ORFs),其中两个向右转录,为 *nfeA* 和 *nfeB*,其前方则有与 *nif* 基因部分一致的序列和 *nifA* 结合位点,同时发现了 *nfeA* 的独立于 *nifA* 转录的起始位点。另两个开放阅读框架(ORFs)向左转录,定名为 ORFA 和 ORFB,位于 *nfeA* 和 *nfeB* 的上游。没有发现 ORFA 和 ORFB 与 *nif* 有同源的序列。ORFA 的表达也许间接地与 *nifA*-NtrA 调控网偶联。分别鉴定了在体外转录/转译 *nfeA* 和 *nfeB* 的基因产物,*nfeA* 的基因产物在氨基末端与 *nifH* 基因产物的氨基末端有高度

的同源性,同时 *nfeA* 与 *fixABCX* 操纵子的不编码区上游的序列具有同源性。并发现 ORFB 编码蛋白与许多原核生物调节蛋白中的 DNA 结合位点有相同的序列,但还不清楚 ORFB 编码转录调节子或是转座酶<sup>[17]</sup>。进一步的研究<sup>[18]</sup>发现 *nfeB* 基因的 128bp 下游有一个开放阅读框架 ORFC,为 970bp 长,编码 320 个氨基酸,ORFC 编码产物与根瘤土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)的鸟氨酸环化脱氢酶(OCD)十分相似,OCD 酶是一种不常见的酶,作用于鸟氨酸转变为脯氨酸的过程中。在体外及体内转录/转译系统,ORFC 的产物为 37000 蛋白。DNA 杂交结果表明 GR4 菌株具有单拷贝的这种类 OCD 酶基因。在其他一些苜蓿根瘤菌及其他种的根瘤菌中尚未发现与 GR4 菌株的 ORFC 同源的片段,ORFC 突变的菌株的结瘤效率比野生型菌株低,因此认为 ORFC 为一个新的 *nfe* 基因,为 *nfeD* 基因。*nfeD* 下游还有一个开放阅读框架 ORFD,其序列等还有待于研究。苜蓿根瘤菌的 *nfe* 基因即根瘤形成效率基因与竞争结瘤有直接关系。

一般认为根瘤菌与豆科植物共生固氮过程中,类菌体利用的碳源主要是植物细胞提供的羧酸类及氨基酸类物质。有实验证实鸟氨酸、脯氨酸等氨基酸代谢过程与竞争结瘤过程有密切关系。已克隆了鸟氨酸环化脱氢酶基因即 *nfeD* 与竞争结瘤有关。近年的研究还发现当 Tn5 插入脯氨酸脱氢酶基因失活时,突变株的竞争结瘤能力降低。将克隆到的带有脯氨酸脱氢酶基因的 DNA 片段互补突变株,又可恢复其竞争结瘤能力。以此 DNA 片段为探针, DNA 杂交证实该片段与苜蓿根瘤菌、三叶草根瘤菌、大豆根瘤菌和根瘤土壤杆菌的许多菌株有同源性,说明这些菌株的脯氨酸分解途径依赖于脯氨酸脱氢酶活性。该酶的活性对苜蓿根瘤菌的竞争结瘤是必需的<sup>[19]</sup>。竞争结瘤是一个复杂的过程,与许多代谢过程密切相关。鸟氨酸、脯氨酸等氨基酸的代谢与竞争结瘤间的关系还有待进一步研究。

1994年 Chun 和 Stacey<sup>[20]</sup>报道了大豆根瘤菌的 *nfeC* 基因。USDA110 的 Tn5 突变株 NAD14, 对比野生型 USDA110, 在接种后 20d, 虽然平均瘤数、瘤重都十分相似, 两者的固氮水平也相似, 但是 NAD14 突变株根瘤形成时间延迟, 与野生型共同接种表现出结瘤能力降低为原来的 1/10 左右。Bhagwat 等<sup>[21]</sup>分析了大豆根瘤菌结瘤延迟的突变株, 发现它们仍保留着其竞争能力。因此认为 NAD14 菌株中的突变部分包含与竞争结瘤有关的基因。序列分析了 2.2kb 野生型菌株 USDA110 的相应片段, 发现了一个开放阅读框架 (ORF), 该基因的性质与苜蓿根瘤菌的 *nfe* 基因十分相似, 因此定名为 *nfeC* 基因, 此基因长 825bp, 编码 275 个氨基酸。该基因从右向左转录。用 *nfeC* 的 DNA 序列与 GeneBank 和 EMBL 的资料比较, 未发现任何有意义的相似性。在 *nfeC* 基因的上游具有两个启动子,  $P_1$  和  $P_2$ , 它们负责在不同条件下进行不同的调节。 $P_1$  在类菌体中表达, 但在菌培养时有氧和无氧条件下均不表达;  $P_2$  则仅仅在有氧条件下表达。*nfeC* 基因位于 *nodYABCSU* 操纵子左侧约 43kb 处。

### 3 豆科植物(寄主)对竞争结瘤的影响

豆科植物的基因对结瘤过程和竞争结瘤过程等均起一定的决定作用。目前为止, 探讨了寄主的部分结瘤素基因在结瘤过程中的作用, 认识了不同植物会产生不同结构的黄酮类物质参与激活与其共生的根瘤菌的结瘤基因。研究结果表明, 若干种豆科植物具有控制寄主植物与根瘤菌的结瘤反应的基因。如豌豆的显性 *Sym1* 基因控制伊朗豌豆的温敏性结瘤 (Temperament sensitive nodulation); 显性的 *Sym2* 基因控制阿富汗豌豆对许多根瘤菌株的普遍抗性 (General resistance), 显性基因 *Sym4* 表现对单一菌株 310a 的专一性抗性 (Specific resistance)<sup>[22]</sup>。

大豆根瘤菌共生固氮体系的研究中, 也发现了大豆控制结瘤反应的几个基因。如隐性基因 *rl1* 的存在使寄主不能与所有的大豆根瘤菌

形成根瘤; 显性基因 *Rj2* 的存在则 USDA7、USDA14 和 USDA122 等被测试的所有 122 和 CI 血清组的慢生大豆根瘤菌系不能在其上形成根瘤; 显性基因 *Rj3*、*Rj4* 同样分别抑制着一些特定菌株的结瘤反应。这些基因的分离符合孟德尔遗传规律, 其分布, 分离和定位等仍在研究之中<sup>[14]</sup>。另外 PI 遗传型的大豆品种可抑制大豆根瘤菌 USDA123 的结瘤和降低其竞争结瘤。PI 基因型大豆植株由属血清型 123 的菌株形成的根瘤很少, 而对于属血清 127 或 129 的菌株仅部分限制或根本不限制其结瘤反应。接种根瘤菌剂后, PI 基因型大豆比普通的大豆品种威廉姆斯 (Williams) 的固氮效率要高, 这是由于竞争性强的 USDA123 菌株及血清型为 123 的菌株竞争结瘤明显地减少的结果。在此基础上发现根瘤菌一个单一的 GSN 基因 (基因型特异结瘤基因) *NolA* 的存在会使血清型为 123 的菌株能够在限制该血清型菌株结瘤的植物基因型的寄主上结瘤, 从而证实了根瘤菌与寄主间具有 gene-for-gene 的相互作用的分子遗传学关系。另外, 发现三个基因型: PI377578, 371607 和 417566 能够限制血清型 123 中的不同的分离菌株的结瘤。由上述研究结果可见, 寄主遗传系统中存在着对某些特殊群体有排斥作用的基因。这就有可能利用一种完全排斥土著根瘤菌的基因型的寄主, 如 *Rj* 或 PI 等基因型, 筛选和接种能够使之结瘤的高效固氮根瘤菌株, 减少或完全排斥土著根瘤菌的竞争结瘤, 从而能够高效固氮, 提高作物产量。

### 4 展望

近年来在竞争结瘤机制和根瘤菌寄主专一性方面的研究取得了许多进展, 对根瘤菌竞争结瘤有关的基因和豆科植物的寄主限制性结瘤的基因均有了一定的认识。由于导致竞争结瘤的因素十分复杂, 因此解决的方案就不可能是一种, 如改变大豆根瘤菌的 EPS 可以提高其竞争力<sup>[23]</sup>, 但对于苜蓿根瘤菌, EPS 则为其侵染所必需, 改变之则导致竞争能力降低<sup>[24]</sup>。同样抗菌性的应用也有限, 特别是慢生大豆根瘤菌

具有抗许多种类抗菌素的能力。应用具有抑制土著根瘤菌结瘤的特殊豆科植物基因型的品种可解决竞争结瘤问题,但现在尚未培育出抑制所有土著根瘤菌的豆科植物品种。无论如何,应用具有高竞争结瘤能力的根瘤菌和抑制土著根瘤菌结瘤的植物品种是最佳途径,这方面的研究势必会受到关注。

### 参 考 文 献

- [1] Hicks P M, Loynachan T E. *Soil Biol Biochem*, 1989, 21(4): 561~5.
- [2] Keyser H H, Gregan P B. *Appl Environ Microbiol*, 1987, 53: 2631~2635.
- [3] Odeymi O, Alexander M. *Soil Biol Biochem*, 1977, 9: 247~251.
- [4] Jones R, Giddens J, Agromony J, 1984, 76(4): 599~602.
- [5] 陈荣基, 唐东阶, 武波, 等. 农业生物技术进展与展望. 贾士荣主编, 合肥: 中国科学技术大学出版社, 1993, 118~127.
- [6] Isoi T, Yoshida S. *Soil Sci Plant Nutr*, 1990, 36(2): 283~288.
- [7] Fouts K E, Barbour S D. *J Bacteriol*, 1981, 143: 914~919.
- [8] Hokko-Chem. Patent, 1993, JP. 5023187.
- [9] Li D M, Alexander M. *Plant and Soil*, 1988, 108: 211~219.
- [10] Li D M, Alexander M. *Plant and Soil*, 1990, 129: 195~201.
- [11] Keel C, Solnider U, Haas D, De'fage C. *MPMI*, 1992, 5(1): 4~13.
- [12] Schwinghamer E A, Belkenree R P. *Arch Microbiol*, 1968, 64: 130~145.
- [13] Triplett E W, Barta T M. *Plant Physiol*, 1987, 85: 335~342.
- [14] Triplett E W, Sadewsky M J. *Annu Rev Microbiol*, 1992, 46: 299~328.
- [15] Toro N, Oliares J. *Mol Gen Genet*, 1986, 202: 331~335.
- [16] Sanjuan J, Olivares J J of *Bacteriol*, 1989, 4154~4161.
- [17] Soto M J, Zorzano A, Mercado-Blanco J, *et al. Mol Biol*, 1993, 229: 570~576.
- [18] Soto M J, Zorzano A, Garcia-Rodriguez F M, *et al. MPMI*, 1994, 6(6): 703~737.
- [19] Jimenez Zurd J, Toro N. *MPMI*, 1995, 8(4): 492~498.
- [20] Chun J Y, Stacey G. *MPMI*, 1994, 7(2): 248~255.
- [21] Bhagwat A A, Tully R E, Keister D L. *Appl Environ Microbiol*, 1991, 57: 3496~3501.
- [22] Lie T A. *Annu Appl Biol*, 1978, 88: 245~246.
- [23] Ames P, Bergman K. *J of Bacteriol*, 1988, 148: 728~729.
- [24] Finan T M, Hirsch A M, Leigh J A. *Cell*, 1985, 969~977.