

影响根瘤菌共生固氮效率的主要因素及遗传改造*

李友国 周俊初**

(华中农业大学农业部农业微生物重点实验室 武汉 430070)

摘要:介绍了影响根瘤菌共生固氮效率的主要因素及遗传改造:包括土壤因素、宿主植物、四碳二羧酸转移酶基因 *dc*、固氮调节基因 *nifA*、吸氢酶基因 *hup*、共生质粒(基因)、缺陷型回复突变等。

关键词:根瘤菌, 共生固氮效率, 影响因素, 遗传改造

中图分类号: Q939.96 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 06-0086-04

根瘤菌的共生固氮效率既与参与固氮的根瘤菌和植物基因有关, 又受到生态环境(如土壤环境与肥力、pH、温度等)不同程度的影响。限于篇幅本文仅简介影响根瘤菌共生固氮效率的主要因素及遗传改造。

1 土壤因素

土壤环境中的生物和非生物因素均能不同程度地影响接种根瘤菌的结瘤和共生固氮效率。

豆科植物仅依靠共生固氮常难于达到高产目的, 一般仍需要配合施用少量化学氮肥。在苗期施用少量氮肥可加强植株光合作用, 促进根系生长, 为根瘤菌感染和结瘤创造较好条件。在籽粒形成后期追施少量氮肥有助于维持大豆营养生长和延长根瘤菌固氮作用, 促进籽粒形成。另一方面, 土壤环境中较高浓度的化合态氮(主要为硝态氮和铵态氮)能影响根瘤菌对根毛的侵染; 降低结瘤数量; 抑制类菌体固氮酶活, 从而对其固氮效率表现出明显抑制作用, 并随着菌株和宿主植物不同而异。研究表明随着施氮水平的增加, 宿主植物干物重和叶面积也增加, 但根瘤的数量和生长显著受到抑制。浅召兴一郎研究发现在 200mg/L 化合态氮浓度下, 籽实百粒重和产量虽然仍有少量增加, 但产量及其组成受氮肥的影响已不显著。另有研究发现苜蓿根瘤菌结瘤调节基因 *nod D3* 受铵态氮($\text{NH}_4^+ \text{-N}$)的控制, 并分离到能在 2mmol/L $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 条件下比野生型菌株更能有效结瘤的苜蓿根瘤菌突变株。刘莉等^[1]采用微根盒培养装置证实高浓度的化合态氮能抑制大豆根瘤菌的根毛感染, 其抑制作用浓度随化合态氮种类而异。

土壤 pH 对接种根瘤菌的共生固氮效率也有明显影响。Moawad 用荧光抗体法研究土著大豆根瘤菌 123 和 138 血清型的占瘤率时发现, 中性土壤中 123 血清型占优势, 占瘤率高达 60%~90%, 但在附近偏碱土壤中, 123 血清型的竞争能力则不及 138 血清型。Thies 和 Bohlool 的研究结果也表明, 供试菌株的占瘤率与土壤类型、有机质含量、总氮量及土壤温度等有显著相关性。研究结果表明 pH 对根瘤菌生长的影响是一个相对渐进的过程, 并依据其受影响程度不同可分为酸敏感型和酸耐受型两大类, 随着土壤的酸化, 根瘤菌结瘤和植物生长均会受到不同程度的抑制。

* 国家高技术研究发展计划项目 (“863” 项目) (No. 2001AA214021)

Project of Chinese National Programs for High Technology Research and Development (No. 2001AA214021)

** 联系人

收稿日期: 2001-07-30, 修回日期: 2001-10-17

除土壤理化因子外,生物因素如土壤微生物(特别是土著根瘤菌)、噬菌体、菌根等也会影响根瘤菌的占瘤率,从而影响其共生固氮效应。Srinivasan 和 Petersen^[12]用菜豆根瘤菌 TAL182 和巨大芽胞杆菌 S49 混合接种菜豆时,发现 TAL182 的结瘤数较单独接种时增加 14%~20%。他们认为巨大芽胞杆菌 S49 能部分解除根系对 TAL182 结瘤的抑制作用,从而提高了根瘤菌在菜豆根系的共生效率。

2 宿主植物

Cregan 等发现大豆品种的不同基因型能限制结瘤菌株的类型或血清型,通过对大豆品种的选育可使菌株 USDA110 在选育品种上的占瘤率提高,并抑制了竞争能力相当的 123 血清簇菌株的占瘤率。已知,大豆的隐性基因 *rj1* 能抑制多数大豆慢生根瘤菌的结瘤。Rasooly 将含有 *rj1* 基因的北京黑豆与另一含 *rj1* 的品种 Harosoy 166-2470 杂交,获得的杂交子二代的 *rj1* 纯合子能与费氏中华根瘤菌 USDA205 结瘤,但 F2 代自交后,又失去了与 USDA205 的结瘤能力。因此通过对宿主植物基因型(品种)的选育,可望有选择地提高固氮优良菌株与宿主之间的亲和力和匹配性来提高接种菌的占瘤率和共生固氮效率。

有人曾提高 CO₂ 浓度以促进结瘤三叶草植株的固氮作用,并将它归因于对植物光合作用的提高。Mulder 等也报道在水培盆栽条件下向红三叶草根系通入含有 4% CO₂ 的空气后能提高植株的结瘤数量和固氮效率。Hardy 等在田间试验中通过采用加富 CO₂ 的空气使大豆植株的瘤数、瘤重和固氮酶活性成倍增加并延长了其作用时间,从而使处理植株的固氮量比对照提高 4 倍。上述结果表明,提高植物光合效率或采用高光合效率的品种将加强固氮过程的碳源和能源供应,从而提高根瘤菌的共生固氮效率。

3 四碳二羧酸转移酶基因 *dct*

苹果酸和琥珀酸等四碳二羧酸是植物供给类菌体以支持共生固氮所需要的直接碳源及能源,加强四碳二羧酸转移酶基因(*dctABD*)的表达可以加强光合产物向类菌体的传递,以充分满足其固氮作用和氨同化吸收过程对能量及碳源的需求,从而提高其共生固氮效率^[3]。

Ronson 等首先克隆到豌豆根瘤菌的 *dct* 基因,并证实其由 *dctA*、*dctB* 和 *dctD* 组成。其中 *dctA* 基因编码一个诱导型转运蛋白质,其表达受 *dctB* 和 *dctD* 编码的双组份调控蛋白的调控。Canon 等的研究结果表明导入 *dct* 基因能明显地影响大豆慢生根瘤菌的固氮效率和植物生长。Ronson 等在部分小区试验地上也证实了在苜蓿根瘤菌中导入 *dct* 基因的增效作用。Bosworth 等^[4]构建了 7 株在染色体上克隆有额外拷贝 *dctABD* 或/和 *nifA* 的重组苜蓿根瘤菌,在美国威斯康星州进行的严格小区田间比较试验结果表明,同时克隆有 *dctABD* 和 *nifA* 的菌株 RMPBC-2 在土壤有机质和化合态氮含量较低的 Hancock 试验点上的苜蓿植株生物量较出发菌 PC 高 12.9%、较不接种对照高 17.9%,其差异已达到显著性水平。1997 年,Research Seed 公司已向美国环境保护署(EPA)申请并获得了生产 RMPBC-2 重组苜蓿根瘤菌剂的商品化许可证。李友国^[5,6]等以 pTR102 和 pLAFR3 为载体构建重组质粒将苜蓿根瘤菌的 *dctABD* 基因导入大豆根瘤菌,盆栽和小区试验结果表明,*dctABD* 的导入可显著提高受体菌的共生固氮效率,*nifA* 的导入主要影响其结瘤

能力,并且与土壤肥力水平、受体菌和大豆品种等因素有关。

4 固氮酶正调节基因 *nifA*

nifA 除了作为固氮酶的正调节基因外,还与根瘤发育、类菌体分化及竞争结瘤有关。加强 *nifA* 的表达水平也是提高根瘤菌共生固氮效率和结瘤能力的途径之一。

朱光富等^[7]将含有肺炎克氏杆菌 *nifA* 基因的高拷贝质粒 pCK3 导入花生慢生根瘤菌 147-3,盆栽结果表明转移接合了 147-3 (pCK3) 的根瘤鲜重、地上部分植株干重和总氮量均比出发菌株有显著提高。Bosworth 等的田间小区试验结果也证明,只有同时导入额外拷贝的 *nifA* 和 *dctABD* 基因才能获得显著的增产效果。周强和魏辉^[8]将带有组成型 *nifA* 基因的质粒导入大豆慢生根瘤菌 22-10 中得到重组菌 A62,以 A62 接种的小区单位产量高出对照组 12.6%。陈昌斌^[9]等构建了一个带有组成型表达 *Kp nifA* 的重组质粒 pXD1,当 pXD1 转移至大豆根瘤菌 RfHN01lux 后,重组菌接种的植株株高、鲜重、干重以及大豆产量均优于原始出发菌。

5 吸氢酶基因 *hup*

研究表明若能利用部分根瘤菌所具有的吸氢酶基因 *hup* 来循环利用固氮酶还原 H^+ 放出的 H_2 ,则有可能因减少能量损失而提高固氮效率。

Brewin 和 DeJong 发现定位于共生质粒上的 *hup* 基因共转移后提高了受体豌豆根瘤菌的固氮效率。Lambert 等将带有大豆慢生根瘤菌 *hup* 基因的 cosmid 分别导入苜蓿、三叶草和其它 *Hup*⁻ 的大豆根瘤菌中,发现导入质粒 pHU1 使受体菌 USDA123sps 在根瘤中 90% 的固氮酶放氢得到再利用。Behki 等报道将含有吸氢酶基因的豌豆根瘤菌质粒导入苜蓿根瘤菌后可以提高转移接合子菌株在苜蓿上的相对固氮效率,但同年 Cunningham 等将含有 *hup* 基因的质粒 pRL6JI 导入豌豆根瘤菌后却未能提高受体菌的固氮能力。Triplett 等^[10]将含有三叶草素基因 *txc* 和吸氢酶基因 *hup* 的重组质粒 pHUTFXPAR 导入几种大豆快生根瘤菌后,显著提高了受体菌的占瘤率和固氮效率。王振宇等^[11]将含有花生根瘤菌 *hup* 基因的质粒 pZ55 导入 *Hup*⁻ 的花生根瘤菌,显著提高了接合子的共生固氮效率和作物产量。

6 共生质粒(基因)

已有的研究结果表明大多数快生型根瘤菌的共生固氮基因定位在称为共生质粒 (pSym) 的大质粒上,少数根瘤菌的共生质粒能自主转移,但大多数根瘤菌的共生质粒可在带有 *tra* 基因的协助质粒帮助下向受体菌转移^[12]。

DeJong 等将豌豆根瘤菌 128C53 的共生质粒 pIJ1008 转入豌豆根瘤菌 300 显著提高了转移接合子 300 (pIJ1008) 的结瘤和共生固氮效率。Zhang 等^[13]将豌豆根瘤菌的共生质粒 pJB5JI 导入华癸根瘤菌 7653R 和大豆快生根瘤菌 B52 后,发现转移接合子的竞争结瘤能力、固氮酶活性和植株干重均高于受体菌,但导入大豆慢生根瘤菌 22-10 之后,其植株干重却显著低于 22-10。朱光富等^[7]探讨了共生质粒 pMN53 和其余 4 个分别带有共生基因的外源质粒在花生根瘤菌中的行为,结果表明导入 pCK3 和 pHN32 的转移接合子表现不同程度的增效作用,但导入 pMN53 明显地推迟了结瘤时间并降低了固氮能力。周俊初^[14]等将大豆快生根瘤菌 B52 的基因文库随机导入大豆慢生根瘤菌 22-10 中,通过

植物盆栽筛选出 HN32 等 4 个增效转移接合子, 在复筛试验中发现 HN32 菌株接种大豆植株的干重比 22-10 提高 7.8%。

7 缺陷型回复突变

已知植物生长激素吲哚乙酸生物合成的前体是色氨酸, 因此根瘤菌的色氨酸代谢及其缺陷株的研究也受到不少研究者的重视。

Kaneshiro 和 Nicholson 分离并比较研究了大豆慢生根瘤菌 L-259 菌株的色氨酸分解代谢增强突变株与出发菌株的共生效应, 发现该突变株具有较高的共生固氮效率。Hunter 和 Kuykendall 研究了大豆慢生根瘤菌色氨酸回复突变型的共生效应, 从中筛到了一株具有高效共生固氮效率的菌株 TA11 Nod⁺。用该菌接种的植株干重、全氮量和结瘤率均较野生菌株显著提高。何方等^[15]利用转座子 Tn5 对大豆快生根瘤菌 8-1-4A 进行诱变, 也得到色氨酸营养缺陷型和回复突变株。盆栽试验结果也证明大多数原养回复突变株的固氮酶活、植株干重及含氮量均有提高, 唯根瘤数比出发菌有所降低。目前尚不清楚上述结果的作用机理。

8 结语

根瘤菌与豆科植物的共生固氮作用是一个由双方有关基因共同参与、协同作用并自主调节的复杂过程, 影响和决定根瘤菌共生固氮效率的因素来自土壤生态环境、宿主植物和根瘤菌等 3 个方面。尽管生物固氮研究者已构建了一些竞争结瘤能力和共生固氮效率显著提高的基因工程菌株, 但必须指出: 要充分发挥高效重组根瘤菌的共生固氮在农业生产实践中的经济价值和生态效益, 必须综合考虑土壤肥力、作物特性和气候等环境条件, 制定出接种根瘤菌剂与化学氮肥配合施用的理想措施, 才能实现高产优质的目标。

参考文献

- [1] 刘 莉, 周俊初, 陈华癸. 中国农业科学, 1998, 31 (4): 87~89.
- [2] Srinivasan M, Petersen D J. Can J Microbiol, 1997, 43: 1~8.
- [3] Vance C P, Miller S S, Driscoll B T, *et al.* In: Elmerich C, Kondorosi A, Newton W E, eds., Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1997, 443~448.
- [4] Bosworth A H, Williams M K, Albrecht K A, *et al.* Appl Environ Microbiol, 1994, 60 (10): 3815~3832.
- [5] 李友国, 李 杰, 刘墨青, 等. 高技术通讯, 2000, 10 (5): 1~7.
- [6] 李友国, 李 杰, 刘墨青, 等. 遗传学报, 2000, 27 (8): 742~750.
- [7] 朱光富, 周俊初, 陈华癸. 遗传学报, 1996, 23 (2): 131~141.
- [8] 周 强, 魏 辉. 湖北农业科学, 1997, 3: 43~44.
- [9] 陈昌斌, 戴小密, 俞冠翘, 等. 科学通报, 1999, 44 (5): 529~533.
- [10] Triplett E W, Kent A D, Wojtasik M L, *et al.* In: Elmerich C, Kondorosi A, Newton W E, eds., Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1997, 619~620.
- [11] 王振宇, 龙敏南, 刘月英, 等. 微生物学报, 2001, 41 (4): 421~426.
- [12] 郭先武. 微生物学通报, 1999, 26 (4): 286~288.
- [13] Zhang X X, Zhou J C, Zhang Z M. Curr Microbiol, 1995, 31: 97~101.
- [14] 张学贤, 马立新, 周俊初. 高技术通讯, 1996, 6 (4): 4~7.
- [15] 何 方, 周俊初, 李阜棣. 高技术通讯, 1994, 2 (4): 25~28.