

根瘤菌质粒的生物学特性

邹向宏 陈文新

(北京农业大学生物学院 北京 100094)

早期的研究发现,根瘤菌诱导根瘤的行为极不稳定,用已知能消去质粒的化学药剂处理根瘤菌,使根瘤菌丧失了原有的结瘤能力,推测与根瘤菌结瘤性状有关的基因可能定位在质粒上^[1]。随着根瘤菌质粒研究方法的改进^[2,3]。人们从根瘤菌中发现了大于150kb的大质粒,从苜蓿根瘤菌(*Rhizobium meliloti*)中检测到大约1500kb左右的质粒^[3],从山羊豆根瘤菌(*Rhizobium galegae*)检测到大于1700kb的巨大质粒,在同一菌株中检测到的不同质粒数多达10个^[4]。近二十多年来,根瘤菌研究逐步发展,如探究根瘤菌结瘤的分子信号识别机理,鉴定和分离与共生和固氮有关的结构基因、调控基因以及根瘤菌特别是快生型根瘤菌的其它功能鉴别和基因的分离,如吸氢酶基因、抗酸性基因、反硝化酶基因等。根瘤菌的许多生物学特性都与质粒有关。本文综合概述快生型根瘤菌质粒除共生功能外的一些生物学特性。

1 胞外多糖

根瘤菌胞外多糖是一类由根瘤菌分泌的多糖类物质,与根瘤菌的侵染过程密切相关^[5]。胞外多糖(EPS)、脂多糖(LPS)、荚膜多糖(CPS)在根瘤菌与宿主识别以

及结瘤过程中起重要作用。并且有些多糖(如酸性EPS)与宿主范围有关,如将*R. leguminosarum* bv. *trifolii* 宿主范围基因转入*R. leguminosarum* bv. *viciae*,酸性EPS酰化构型被修饰,将赋予后者与三叶草相互作用的能力。*R. meliloti*的共生质粒上的22kb范围内涉及胞外多糖的合成^[6]。

根瘤菌缺失LPS,不能形成正常的侵染线,不能形成固氮根瘤^[7]。LPS缺失菌株有较明显的特征,如生长速度慢,失去运动性,自我凝聚,失去粘液,菌落表面粗糙,对疏水染料敏感等^[8]。目前对LPS的功能不很清楚,一些初步结论是,LPS保护根瘤菌、抵御宿主分泌的毒素作用;破坏宿主屏障,消去宿主抵御能力,有利于根瘤菌形成侵染线^[9]。现有的研究表明,涉及根瘤菌脂多糖合成的基因位于质粒上,对于其它胞外多糖的结构和功能目前研究得较少。值得一提的是许多植物病原菌胞外多糖与病原菌的侵染能力密切相关。

2 碳代谢

三羧酸循环(TCA)是碳代谢途径的重要部分,柠檬

1996-12-27收稿

酸合成酶被认为是碳代谢率的限制性因子,大多数生物具有 TCA 碳代谢途径。对细菌碳代谢研究认为编码碳源代谢中心途径的酶基因位于细菌染色体上,而涉及不是很重要途径的酶基因定位在质粒上。但 Marco 等研究发现,热带根瘤菌(*Rhizobium tropici*)碳代谢中,关键酶柠檬酸合成酶的基因(*pscA*)定位于共生质粒上^[10],这是一个非常有意义的发现。*R. tropici*的*pscA*基因失活(Ti5 插入),不仅明显降低柠檬酸合成酶的活性(认为质粒与染色体共同作用具有完整酶活性),而且可使结瘤率减少到亲本菌株的 30%~50%;克隆*pscA*基因,转入*pscA*突变菌株能使之恢复到野生型;转入到*R. leguminosarum* bv. *phaseoli*突变菌株(缺失载有柠檬酸合成酶基因的质粒)中,使该突变株具有较高柠檬酸合成酶活性,并且赋予此菌株更高的生长速度和结瘤能力。同时也发现*pscA*基因与根瘤菌铁元素的摄取能力有关^[10]。

3 氢的再循环

固氮酶催化分子态氮转化为氨的过程中,将电子传递给 H^+ 产生 H_2 ,流向固氮酶的电子只有 40%~60% 传递给分子态氮,其余以 H_2 形式损失^[11]。Evans 等提出*Rhizobium*在固氮作用中 25% 的能量由于释放氢而损失掉^[12]。根瘤菌 H_2 是固氮酶作用副产物,所有根瘤菌都产生 H_2 ,然而并非所有根瘤菌均具有氧化 H_2 的能力,只是部分根瘤菌有吸氢酶^[12,13]。研究表明吸氢酶基因由单基因编码,许多根瘤菌的*hup*基因定位在质粒上,如*R. leguminosarum*,吸氢酶基因定位在一条共生质粒上。*hup*基因的功能及调控作用在不同根瘤菌具有保守性^[14],因此可将*hup*基因转移到Hup⁻菌株。Brewin 等研究发现*hup*基因定位在一个非接合转移共生质粒 pRL6JL,将该质粒转移到*R. leguminosarum*菌株 Nod⁻和 Hup⁻中,使它放氢量减少,结瘤能力明显增强;该质粒转入其它几种 Hup⁻根瘤菌中,固氮能力也明显增强^[15]。

4 细菌素

根瘤菌的细菌素是由根瘤菌分泌,能杀死或阻止相似的但对细菌素敏感的菌株生长的高特异性抗生素,一般只对根瘤菌起作用,而菌株本身具有免疫作用。无疑能分泌抗性较强的细菌素的菌株因抑制同种根瘤菌的生长,具有较强的竞争结瘤能力^[16]。细菌素的产生在许多根瘤中是由质粒(包括共生质粒)决定

的^[16]。人们通过对编码细菌素产生基因的克隆,将这些克隆到的基因转移到其它菌株中,筛选竞争性强的菌株非常有意义,三叶草素的研究与应用便是较成功的例子。Triplett 等构建了含有与三叶草素产生及抗性的有关基因(*tx*)的重组质粒 pTFX1,将它转移到对三叶草素敏感的*R. leguminosarum* bv. *viceae*, *R. leguminosarum trifolii*, *R. meliloti*以及*Agrobacterium tumefaciens*,三叶草素产生及抗性基因都能得到表达^[16]。Triplett 将 pTFX1 转入到固氮率较高的三叶草菌株 TA1 中,用标记交换(marker exchange)法,将 pTFX1 的 4.1kb 和 *tx* 区整合到 TA1 菌株的染色体中,以免质粒不稳定性影响田间试验效果。构建的重组菌株在无选择压力情况下,能稳定产生三叶草素,重组菌株与三叶草素敏感菌株混合实验,结果表明重组菌株显示出明显的竞争结瘤能力^[17]。

5 抗酸性

大多根瘤菌对酸特别敏感,土壤过酸严重抑制根瘤菌的生长、结瘤等功能^[18,19],少数根瘤菌在酸性土壤环境条件下,其生存能力和结瘤能力明显比酸性敏感菌株强。在酸性土壤中接种抗酸性菌株,是增加根瘤菌存活性和结瘤能力的有效手段。如在澳洲,有大片土壤因 pH 低,豆科植株因无抗酸性根瘤菌,不能生长,使土壤一片荒漠^[19]。在 350000ha 试验区接种抗酸性苜蓿根瘤菌成功地建立了一个苜蓿草原,这吸引人们去研究根瘤菌抗酸性。根瘤菌抗酸性与质粒密切相关,多个质粒含有与抗酸性相关基因^[20]。酸敏感性根瘤菌在酸性环境条件下,生长量少,共生效应差。最近人们根据实验结果,推断菌株抗酸性能力与控制胞质的 pH 值能力相关^[19,20]。抗酸性菌株在酸性环境条件下能稳定有效的泵出 H^+ ,在菌体内维持较稳定的 pH 内环境;而酸性敏感的菌株不能维持 pH 梯度,也就不能在菌体内维持稳定的 pH 内环境。

6 反硝化作用

根瘤菌与豆科植物形成共生体,能将 N_2 转化为化合态氮供植物利用;另一方面,某些根瘤菌通过反硝化作用,能将化合态氮(离子状态氮素)还原为气体状态氮^[24]。根瘤菌在无氧或其它特殊条件下,以氮的氧化物(NO_3^- 、 NO_2^- 、 NO 、 N_2O)作为最终电子受体,伴随气态氮(N_2O 或 N_2)的产生。在还原反应过程中根瘤菌获得 ATP 能量,供自身生长。它们在自由生长或类菌体

状态时,都具有反硝化作用^[25]。反硝化作用每一步骤促反应都由相应的反硝化酶作用,它们各自对应的基因分别为硝酸盐还原酶基因(*nar*)、亚硝酸盐还原酶基因(*nir*)、一氧化氮还原酶基因(*nor*)、一氧化二氮还原酶基因(*nos*)^[22]。并不是所有的根瘤菌都具有完整的反硝化途径。迄今人们发现一部分根瘤菌的反硝化作用终产物为 N_2 ,少数根瘤菌缺失 NO_2^- 还原酶,根瘤菌内有 NO_2^- 累积。大部分根瘤菌缺失 N_2O 还原酶(缺失 *nos* 基因),终产物为 N_2O ,而且多数情况下以 N_2O 形式释放^[22]。而 N_2O 不仅是固氮酶的竞争阻遏物,而且严重影响生态环境,破坏大气层中臭氧层、影响气候变化、使紫外线等有害射线加强,形成酸雨,对生态环境造成严重威胁^[23],因此研究 N_2O 还原活性显得非常意义。

目前根瘤菌反硝化途径研究得较多的是苜蓿根瘤菌,苜蓿根瘤菌除自由生长状态在厌氧条件下具反硝化作用外,类菌体状态也有完整的反硝化途径,但受到 NO_3^- 在根瘤内迁移率的控制。许多实验证明 N_2O 还原酶结构基因(*nodZ*)具有高度的保守性^[23,24]。非常奇特的是苜蓿根瘤菌 N_2O 还原酶结构基因 *nosZ* 定位在巨大的共生质粒上,*nif* 与 *nos* 位于同一共生质粒^[24]。但并非所有的 *nosZ* 基因均位于共生质粒显示了共生质粒的多样性。现在人们正在利用定位于 *A. eutrophus* 小质粒上的 *nosZ* 基因向其它根瘤菌进行转移^[28],以进一步研究根瘤菌反硝化作用以及 *nosZ* 的功能。

7 其它生物学特性

黑色素的产生几乎是所有 *R. phaseoli* 菌株的特征。在加酪氨酸的培养基上 *R. phaseoli* 产生明显的黑色素,编码黑色素的基因定位在质粒上,黑色素可作为遗传操作的标记。一些根瘤菌能够利用典型的农杆菌的 Opine 和根表化合物。在根瘤菌中这种功能是由质粒编码的^[25]。此外,质粒决定菌株对多种抗生素的抗性,与菌株抗逆性(如耐盐、耐碱等),生长速度及存活性密切相关。

8 结 语

根瘤菌大多含有大质粒,这些质粒除涉及共生效应外,还与菌株的生长能力,抗逆性,细菌素分泌,多种代谢相关。共生质粒与根瘤菌的共生行为直接相关,也与其它非共生质粒有关^[26,27]。有些根瘤菌质粒上基因位点对菌株共生效应起抑制作用,质粒消除反而增强

其共生效应^[28,29],可见质粒相互关系比较复杂。目前研究根瘤菌质粒只有几个种,迄今已描述 17 个根瘤菌种^[30],自然界还有许多种与豆科植物、非豆科植物相互作用的根瘤菌。随着根瘤菌研究范围的扩大与深入,人们将揭示获得更多有关根瘤菌质粒的功能,对根瘤菌理论与实际应用研究具有意义。

参 考 文 献

- [1] Higashil S. J Appl Microbiol, 1967,391~403.
- [2] Eckhardt T. Plasmid, 1978, 1: 584~588.
- [3] Burkardt B, Burkardt H J. J Mol Biol, 1984, 175: 213~318.
- [4] Selenska-Trajkowa S, Radewa G, Markov K. Lett Appl Microbiol, 1990, 10: 123~126.
- [5] Haiverson L J Stacey G. Microbiol Rev, 1986, 50: 193~225.
- [6] Long S R Reed J W, Himawan J, et al. J Bacteriol, 1988, 170: 4239~4248.
- [7] Canter C. J Bio Chem, 1990, 265: 21122~21127.
- [8] Stanley J, Vcervates E, J Appl Bacteriol, 1991, 79: 9~19.
- [9] Carlson R W, Kalembo S, Turowslici D, J Bacteriol, 1987, 169: 4923~4928.
- [10] Macro A, Pardo J L. Mol Microbiol, 1994, 11: 315~321.
- [11] Monika Labes, Rostogi V. J Bacteriol, 1993, 175: 2662~2673.
- [12] Evans I J, Downie J A. Gene, 1986, 43: 95~102.
- [13] 张学江. 中国生物固氮五十年, 南京: 南京农业大学出版, 1988, 63~68.
- [14] Cunningham S D. Proc. Nor. Am. symbiotic Nitrogen Fixationcon. 12th, 1989, 227.
- [15] Brewin N J, DeTong T M, Philips D A, et al. Nature, 1980, 288: 77~79.
- [16] Triplett E W. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 86: 3810~3814.
- [17] Pietermel J S, Van R J. J Bacteriol, 1993, 175: 438~447.
- [18] Richardson A E, Simpson R J. Soil Biol Blochem, 1989, 21: 87~95.
- [19] Howieson J G, Ewang M A. Plant Soil, 1988, 105: 179~188.
- [20] Chen H, Richardson A E, Gartner E, et al. Appi Environ Microbiol, 1991, 57: 2005~2011.
- [21] O'hara G W, Daniel R M, Sdtteele K W. et al. Soil Bio Biochem. 1984, 16: 429~431.

- [22] O'hara, G W, Groos T J, Dilworth M J, *et al.* J Gen Microbio Appl Environ Microbiol, 1989, 55: 1870~1876.
- [23] Wang W C, Sze N D. *Nature*, 1980, 286: 589~560.
- [24] Chan Y K, Wheatcroft R. J Bacteriol, 1993, 175: 19~26.
- [25] Tepfer D. J Bacteriol, 1988, 170: 1153~1161.
- [26] Hynes M F, McGregor N F. Molecular Microbiol, 1990, 4: 407~41431.
- [27] Zou X H, Li F D. 8th Int. Sym. on Molecular Plant-Microbe Interaction, U. S. A, 1996, H80.
- [28] Borthakur D, Barber C E, Lamb J W, *et al.* M Gen Genet, 1986, 203:320~323.
- [29] 叶 政. 武汉大学学报, 生物工程专刊, 1990, 34~36.
- [30] Martinez-Romero E. Cri Rev Plant Sci, 1996, 15: 113~140.