

根瘤菌质粒研究进展

郭先武

(华中农业大学农业部农业微生物重点实验室 武汉 430070)

关键词 根瘤菌, 共生与非共生质粒, 质粒的特性

分类号 Q939.11 **文献标识码** C **文章编号** 0253-2654(1999)-04-0286-03

根瘤菌能使豆科植物形成根瘤并在根瘤中将氮气转换成植物能利用的形式, 即共生固氮。根瘤菌普遍含有高分子量的大质粒, 而且与其生物学功能有密切关系。因而质粒是根瘤菌的遗传学的重要方面。每个菌株的质粒类型通常是稳定的, 也是菌株的特征之一。已报道的根瘤菌质粒的数目从1~10个不等, 其分子量($M_r/10^6$)多在100~300之间, >1000的称为巨大质粒(Megaplasmid), 已知 *Sinorhizobium meliloti* 和 *Rhizobium galegae* 均含有巨大质粒^[1]。质粒在细胞基因组中占有较大的比重, 如在 *Rhizobium elti* 中其质粒可占细胞基因组的45%。*Azorhizobium* 不含大质粒^[2]。

1 根瘤菌共生质粒及其功能

关于什么是共生质粒(pSym), 含有“与共生有关的基因”概念略显模糊。Mercado-Blanco^[1]定义为“含有形成共生关系不可缺少的即反之则不能形成共生关系的基因”。这类基因不仅有 *nod*, *nif* 基因, 而且包括胞外多糖(EPS)和脂多糖(LPS)基因。如果这些基因位于不同的质粒则共生质粒可分称为 *nod*-pSym 或 *exo*-pSym 等。不过, 一般所指的 pSym 就是 *nod*-pSym, *nod* 或 *nif* 基因通常是紧密连锁在一起。共生质粒的消除或特定基因片段的缺失均导致共生作用的完全丧失。

已知 *Rhizobium loti*, *Bradyrhizobium* 以及 *Rhizobium*, sp. 的少数菌株含有大质粒但不含有共生质粒^[6], 其共生基因分布在染色体上。*S. meliloti* 的 pSym 就是巨大质粒, 其大小接近基因组的50%, 它尚无法消除。因此, 它可以含有细菌生存所必需的基因, 共生基因也不一定在同一质粒上, 如 *S. meliloti* 较小的质粒上含有 *nod* 和 *nif* 基因, 但 EPS 和 LPS 基因则位于较大的质粒上^[5]。*Rhizobium elti* CFN42 菌株的质粒 d 含有 *nod* 和 *nif* 基因, 而

质粒 b 含有 LPS 合成基因。当然, 共生质粒也并非只含有共生基因, 也含有其它与共生无关的非共生基因, 如反硝化作用基因(*nos*)就定位于 *S. meliloti* 的 *nod*-pSym 上, 其 *exo*-pSym 含有硫胺素合成基因(*thi*)和乳糖为唯一碳源的基因(*lac*)以及四碳二羧酸转移基因(*dct*); 吸氢酶(*hup*)与 *nif* 基因位于 *Rhizobium leguminosarum* 菌株的同一质粒上。本文作者在实验中发现(未发表), 缺失了近1/3共生质粒的 *Mesorhizobium huakuii* 7653R 菌株也有结瘤能力, 说明这部分基因与共生无关。

2 非共生质粒的功能

除了共生质粒以外, 大多数菌株也同时含有并非形成共生关系必需的质粒, 称之为非共生质粒 non-pSym, 或隐性质粒, 非共生质粒对共生作用可有正或负的调节作用。质粒功能确认通常是经过质粒的消除试验, 或将特定功能性基因定位在质粒上, 也可直接用异源探针进行分子杂交。前两种方法应较为可靠并能提供直接的证据。

目前已积累了许多有关非共生质粒所含基因的资料。已报道, 在 *S. meliloti* SAF22 菌株中, 非共生质粒的存在会损害正常根瘤菌的发育和共生效率^[6]。与此相反, 在 *R. tropici* CFN299 菌株与农杆菌的转移接合子中含有 CNF299 全部质粒者比仅含有 pSym 的结瘤能力和固氮效率高得多。对非共生质粒研究得较为透彻的是 *S. meliloti* GR4 的非共生质粒 pRmeGR4b, 不仅查清了其物理图谱, 而且将与结瘤效率有关的三个 *nfe* (nodule formation efficiency) 基因定位于该质粒上, 其中 *nfe* A 和 *nfe* B 启动子含有高度保守的适用于

RpoN作用的序列。因而,它应受 *nifA-rpoN* 调节系统的控制^[7],而 *nfeD* 则与农杆菌的鸟氨酸环化脱氨酶 (ornithine cyclodeaminase OCDs) 同源。非共生质粒对碳源的利用有明显影响,这在三叶草根瘤菌中表现得最为典型。通过对不同菌株的质粒消除研究发现, pRtrW14-2b 可使菌株 W14-2 在苹果酸和乳糖为碳源的培养基上生长, pRtrW14-2b 使该菌株能利用核糖醇, 质粒 pRtrW14-2c 则赋予该菌株利用鼠李糖和山梨糖的能力。pRtrW14-2b 为共生质粒, 使该菌株能以儿茶酚为唯一碳源。

有的菌株中,非共生质粒也与细菌在恶劣环境条件(高温,干燥等)下的生存有关,消除了质粒的菌株与野生型相比,能更好地在干燥条件下生存^[8]。消除质粒 b、c 和 e 会影响菌株 *Rhizobium l. bv. trifolii* W8-7 对高温的敏感性,可能与其不能表达热休克蛋白有关^[9]。许多根瘤菌在含酪氨酸的培养基上生长时产生黑色素。黑色素基因 (*mel*) 常位于质粒上, *Rhizobium l. bv. phaseoli* 中位于共生质粒上,而在 *S. meliloti* GR4 则位于非共生质粒上。在 *R. l. bv. phaseoli* 中受共生基因的调控。但在 *M. meliloti* GR4 中不受其调控,其结构蛋白 MelA 与酪氨酸酶有很高的同源性。至于黑色素基因与共生的关系目前尚不知晓。

3 根瘤菌质粒与基因重排有关的遗传单位

根瘤菌的质粒含有许多与基因重排有关系的遗传单位,如插入序列 (IS), 重复序列以及转座子等。插入序列较小,一般小于 2.5kb,它在整个基因组中均有分布(包括共生质粒和非共生质粒)。研究较多的是 *S. meliloti*。pRmeGR4b 质粒的序列分析表明,几乎每 2.5kb 就含有一个插入序列,在一个 13kb 范围内找到了 ISRm3、ISRm4、ISRm6 和 ISRm7 以及与转座酶同源的二段序列。Ulrick 和 Puhler^[10]报道了 *R. l. bv. viciae* 两个菌株的非共生质粒上各含有一个拷贝的转座子 Tn163,这是在根瘤菌中含有天然转座子的首次报道。*S. meliloti* 1076 中质粒 pSV1 有 *nodB* 和 *nodC* 基因的重复序列,但只有后者有功能。*nifE* 和 *nifB* 的重复序列也被发现,但也只有 *nifE* 有功能。有人估计,重复 DNA 序列在 *Reti* 中约有 700 个。如此丰富的重复序列只有在 *Agrobacterium tumefaciens* 和 *Archea* 和 *Streptomyces* 中有报道。在其它细菌中罕见。IS 转座子和重复 DNA 序列均可能导致基因的重排,如基因扩增、缺失或质粒

的消除与共价结合等。Palacios^[11]根据重复 DNA 序列提出了根瘤菌基因扩增的动态模型。

4 根瘤菌质粒形式的多样性

根瘤菌每个菌株在数量和大小上通常是稳定的,在自然群体中存在丰富的多样性。Hashem^[12]从不同植株(苜蓿,红三叶草等)上分离出的根瘤菌,其质粒数 *R. meliloti* 为 1~8 个 (< 50 ~ > 1600MD); *R. l. bv. trifolii* 为 3~7 个 (< 75 ~ 500MD), *Rhizobium sp.* 1~5 个 (75~800MD)。陈雯莉^[13]等采集同一块灰潮土的大豆根瘤分离大豆根瘤菌,质粒检测发现可分为 11 个质粒类型,质粒数为 2~6 个,Mr 为 12~530 × 10⁶ 之间,即使来自同一植株的根瘤菌也有多样性存在。邹向宏等^[14]在同一块稻田中分离到 154 个紫云英根瘤菌株,其中 100 个来自 10 株植物的根瘤,40 个来自同一植株的不同根瘤,14 个来自同一植株的两个不同的根瘤。质粒检测也表明,不仅来自同一块土壤,同一植株根瘤菌的质粒类型不同,而且同一根瘤也可分离出不同的质粒类型。如此丰富多样性该如何解释,需要深入研究根瘤菌质粒的一些基本特征如可转移性、稳定性、不相容性等,才有可能从理论上认识这种现象。

5 根瘤菌质粒的稳定性

根瘤菌质粒在培养条件下是稳定的。Weaver^[15]将菜豆根瘤菌传代 120 次后其质粒依然维持不变。说明根瘤菌的质粒有精细的复制和稳定机制。现在已找到了几个与此相关的片段。如在 *S. meliloti* 的 pSym b 上克隆并测序的 0.8kb / DNA 片段^[16],它含有复制起点的几个功能区,几段 A-T 丰富的序列,一个与大肠杆菌复制起点 c 类似的 13 个碱基片段,遗憾的是这个复制起点似乎不是必要的,因此,该质粒应存在另一个复制起点,另一个序列是来自 *S. meliloti* GR4 菌株的 pRmeGR4a,这个 4.8kb 的 *PstI* 片段负责质粒的自主复制^[17],序列分析表明它有几个阅读框,但缺失研究表明只有一个阅读框是必需的。该阅读框的氨基酸序列与 *A. rhizogenes* 的 pRiA4b 及 *A. tumefaciens* 的 pTiB653 质粒的 RepC 蛋白有一定程度的同源性但功能不能互补。也许从进化的角度来看它们是同源的,有共同的祖先,并已有一定程度的分化。从 DNA 序列的比较来看,原核生物的复制机制与真核生物在某些方面是相似的,与农杆菌 *repA*、*repB* 基因同源的序列在 *R. l. bv. viciae* 中也已经找到。另外,用 pRmeGR4a 的 *repC* 基因为探针

检测到 pRmeGR4b 和 *Sinorhizobium fredii* 均含有同源序列。可见其非常保守,也许有共同起源。现在已根据 repC 保守序列设计出了通用引物,并成功地经 PCR 扩增出多属根瘤菌相应片段,并作了序列测定^[18],从而在深入认识质粒的起源、稳定性、不相容性和构建有关载体等方面均有非常重要的意义。

根瘤菌的质粒在共生条件下会发生一定比例的缺失、消除或重排。陈雯莉^[13]用快生型大豆根瘤菌 HA12-1-12 和 HA7-2-2 感染四种不同的宿主,对从瘤中分离出菌株的质粒检测发现,菌株 HA12-1-12 在四种不同宿主中高度稳定,没有发现质粒的缺失和丢失。而 HA7-2-2 不仅有共生质粒的缺失,而且有非共生质粒的消除及额外质粒的出现。杂交实验证明,这些变异菌株的共生基因 (*nodABC* 及 *nifHDK*) 没有丢失。表明不同菌株在特定条件下的稳定性也不同。在培养条件下的生长环境适宜,没有强的选择压力,而在共生条件下则完全不同,根瘤菌本身由环境的诱导会出现分化,这种特化的根瘤菌其主要功能不是繁殖而是行使特定的功能。当然,我们不知道上述变异菌株来自根瘤中哪一部分的菌体,但可以肯定存在某种环境因子可能不利于质粒正确行使其复制和分配功能,从而导致质粒的缺失、丢失和重排。

6 根瘤菌质粒的可转移性

根瘤菌的质粒一般不能转移,在辅助质粒的作用下可以实现根瘤菌质粒的诱动转移。目前仅证明 *R. l. bv. trifolii* 不仅在培养条件下以 10~4 频率自我转移,而且在土壤中也向土著菌转移。*R. leguminosarum* 菌株 300 的 6 个内源质粒中的两个小质粒也具有自我转移能力。*S. meliloti* GR4 的 pRmeGR4a 也具有自我转移能力,它甚至能够诱导另一个不能自我转移的质粒 pRmeGR4b 共转移,但这种共转移只能转移 *S. meliloti* 中而不能转移到农杆菌中^[19]。根瘤菌的绝大部分菌株的质粒不能自我转移。到目前为止,发现能自我转移的质粒极少,且仅限于少数几个菌株。但尚不能低估在自然环境中共生质粒和非共生质粒以低频率向其它菌株甚至不同种菌株进行自我转移和共转移的生物学意义。根瘤菌的质粒较大,给研究带来了许多困难,人们对其兴趣甚浓,根瘤菌质粒、尤其是在共生质粒的研究对提高根瘤菌的结瘤及固氮能力,阐明根瘤菌质粒的稳定机制及起源均有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Hongeycutt R J, McClelland M, Sobral B W S. *J Bacteriol*, 1993, **175**(21): 6954-4952.
- [2] Buldani J I, Weaver R W. *Soil Biol Biochemi*, 1992, **24**: 737~742.
- [3] Mercado - Blanco J, Toro N. *MPMI*, 1996, **9**(7): 535~545.
- [4] Charles T C, Finan T M. *Genetics* 1991, **127**:5~20.
- [5] Holloway P, McCormick W, Watson R J, Chan Y-K. *J Bacteriol*, 1996, **178**:1505~1514.
- [6] Velazquez E, Mateos P F, Pedrero P *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**:2828~2834.
- [7] Soto M J, Zorzano A, Mercado - Blanco J *et al.* *J Mol Biol*, 1993, **229**: 570~576.
- [8] Pankhurst C, Macdonald P, and Reeves J. *J Gen Microbiol*, 1986 **132**:2321~2328.
- [9] Sen D, Baldani J I, Weaver R W. In: P M Gresshoff, L E Roth, G Stacey, and W E Newton, ed *Nitrogen Fixation: Achievements and objectives*. Chapman & Hall, London, 1990, 583.
- [10] Ulrich A, Puhler A. *Mol Gen Genet*, 1994, **242**: 505~516.
- [11] Palacios R, Castillo M, Flores M *et al.* In: I - A. Tikhonovich *et al.* eds. *Nitrogen Fixation Fundamentals and Applications*. Kluwer Academic Publishers. Netherland. 1995, 353~357.
- [12] Hashem F M, Kuykendall L D. In: Graham P H *et al.* (eds): *Symbiotic nitrogen fixation*. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 1994, 181~184.
- [13] Chen W L, Zhou J C, Huang Q Y, Li F D. In: Li F D *et al.* (eds): *Diversity and Taxonomy of Rhizobia*. China Agricultural Sciencetech Press. Beijing. 1996, 116~124.
- [14] Zou X H, Cao Y Z, Li F D. In: Li F D *et al.* (eds): *Diversity and Taxonomy of Rhiobia*. China Agricultural Sciencetech Press, Beijing. 1996, 25~221.
- [15] Weaver R W. *Soil Biol Biolchem*, 1990 **22**(1): 465~469
- [16] Margolin W, Long S R. *J Bioterial*, 1993, **175**: 6553~6561.
- [17] Mercado-Blanco J, Olivares J. *Arch Microbiol*, 1993 **160**:477~485.
- [18] Turner S L, Rigottier - Gois L, Power R S *et al.* *Microbiology*, 1996 **142**:1705 - 1713.
- [19] Herrera-cervera J A, Olivares J, Sanjuan J. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**:1145~1150.