

# Research Progress of the Legume Plants Rhizobia Breeding\*

Tao Cheng, Ruzhen Jiao

Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry (CAF), Beijing  
Email: aofuit2012@hotmail.com, jiaorzh@126.com

Received: May 10<sup>th</sup>, 2013; accepted: May 20<sup>th</sup>, 2013; accepted: May 28<sup>th</sup>, 2013

Copyright © 2013 Tao Cheng, Ruzhen Jiao. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Abstract:** To remit the pressure of international energy, the nif fixation of the legume plants rhizobia has played a very significant role. The research of legume plants rhizobia concentrates on the nif fixation, which has received a lot of achievements by nature breeding, cross breeding, mutation breeding and gene standard breeding. The paper not only points out the restrictions of nowadays research, but also makes some prospects for future work.

**Keywords:** Legume Plants; Rhizobia; Breeding

## 豆科植物根瘤菌选育的研究现状\*

程涛, 焦如珍

中国林业科学研究院林业研究所, 北京  
Email: aofuit2012@hotmail.com, jiaorzh@126.com

收稿日期: 2013年5月10日; 修回日期: 2013年5月20日; 录用日期: 2013年5月28日

**摘要:** 豆科植物根瘤菌的固氮能力对于缓解当今世界的能源压力有着勿需言喻的重要性。对于豆科植物根瘤菌的研究主要集中在其固氮能力上, 从传统的自然选育到类似真核生物的杂交遴选、诱变育种再到现在广泛应用的基因水平育种, 都取得了不少成果。本文不仅指出了目前研究仍旧存在的一些局限性, 亦对将来的工作前景做出了一些展望。

**关键词:** 豆科植物; 根瘤菌; 选育

### 1. 引言

空气中约 80% 的氮气不能被植物直接利用, 只有固氮微生物具有将氮气转化成氨的能力, 人们称为生物固氮。目前, 生物固氮的固氮量已达 2 亿 t, 其中根瘤菌与豆科植物共生固氮体系是自然界固氮效率最高、固氮量最大的生物固氮体系<sup>[1,2]</sup>, 其固定的氮占生物固氮量的 65% 以上<sup>[3]</sup>。这极大的缓解了能源压力, 减轻了过多施用化肥对环境造成的污染<sup>[4]</sup>。因此,

\*基金项目: 中国林科院林业所重点项目(ZD200912); 林业科技推广项目([2012]8号)。

研究豆科作物的生物固氮及其固氮能力对农业生产和自然界中的氮素平衡具有重要的现实意义。

与此同时, 豆科植物根瘤菌(Rhizobium)则是一类广泛分布于土壤中的革兰氏阴性细菌, 它可以侵染豆科植物根部, 形成根瘤, 固定空气中的分子态氮形成氨, 为植物提供氮素营养。但根瘤菌与豆科植物独立存在时, 不能利用大气中的 N<sub>2</sub>, 而当根瘤菌侵入豆科植物的根细胞并在其中迅速增殖后, 可产生类菌体, 并在根瘤内出现豆血红蛋白, 同时具备类菌体和豆血红蛋白的根瘤便具有固氮能力。研究表明, 不同的根

瘤菌与大豆品种间的共生固氮能力存在着较大的差异<sup>[5,6]</sup>。

因此,筛选与豆科作物品种匹配、固氮能力好、竞争结瘤能力强的优良菌株,是提高根瘤菌应用效果的重要途径<sup>[7]</sup>。接下来则针对目前对根瘤菌选育的研究进行综述。

## 2. 研究思路

由于根瘤菌同豆科植物的特殊属性,使得科学家们十分希望将这种固氮能力转移到其它高等植物上!目前人工转移固氮能力大体可以归纳为两个策略:一是通过遗传工程将固氮基因(nif)转移到高等植物上,创造能够稳定遗传的固氮新品种。Dixon 等<sup>[8]</sup>首次报道将肺炎克氏杆菌 *Klebsiella pneumoniae* 的固氮基因移接到大肠杆菌 *Escherichia coli* 上,并表达了固氮酶活性。Gerband 等<sup>[9]</sup>将肺炎克氏杆菌的 nif 基因通过质粒转移到啤酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 中, nif 基因随菌体复制 50 多代,但未表达固氮活性。Berman 等<sup>[10]</sup>将肺炎克氏杆菌的 nif 基因通过质粒克隆到啤酒酵母之中,表达了 nifH 的产物。但是,固氮基因向高等植物转移目前仍有许多困难,其中最主要的是载体问题。然而俄罗斯科学院乌法科学中心的韦尔希尼娜等人报告说已成功将一碗豆基因注入烟草的小块叶片和油菜幼苗的茎部,其结果较对照组的根瘤菌的数量分别高出 13 倍和 36 倍,效果显著<sup>[11]</sup>。人工转移固氮能力的第二个策略是诱导固氮微生物进入新的寄主植物,建立新的共生固氮体系。Butgoon 等<sup>[12]</sup>首次报道,将固氮兰细菌融合到玉米和烟草的原生质体中,但未能得到再生植株。随后许多试验相继进行了这方面的研究,但面临的主要障碍是杂合细胞不能恢复细胞壁,形成再生植株。Child 等<sup>[13]</sup>和 Scowcroft 等<sup>[14]</sup>分别用根瘤菌 32H 接种小麦、油菜和烟草等非豆科植物的细胞培养物,测出了固氮酶活性,电镜观察,根瘤菌主要生存在细胞表面和细胞间隙,没有进入细胞内。根瘤菌从整体水平上引入非豆科植物内,以便建立新的共生固氮体系,这是科学家们的另一大策略。

## 3. 研究方法

基于目前的科学水平,研究从常规的自然选育到

类似真核生物的杂交选育再到现在广泛应用的基因水平的育种。虽然各种研究方法不同,但其研究的结果却是不分伯仲的重要。对于豆科植物根瘤菌的研究都是有着不言而喻的重要性。

### 3.1. 自然选育

自然选育是目前获得新菌种的一种最常用的方法,其实质是广泛搜集品种资源,积累和利用在自然条件下发生的有益变异,通过考察各株根瘤菌的具体固氮能力,通过比较各菌株所表现出来的结果,从而进行筛选。该方法相对简单直接,结果也较为一目了然。许多科学家都通过该思路达到了选育的目的。如张欣等<sup>[15]</sup>通过共生匹配试验检测株高、叶片颜色、主根和侧根上的结瘤数量、所结根瘤的干重、植株地上部分干重等一系列生物学指标,筛选出两株具有广谱亲和性的大豆根瘤菌,并且说明大豆根瘤菌与大豆的共生结瘤固氮具有一定的选择局限性。同样,王文丽等<sup>[16]</sup>也通过共生匹配试验,利用双层钵培养法进行根瘤菌回接试验,也筛选出共生匹配效果好,共生固氮力强的菌株。

### 3.2. 杂交选育

杂交选育是利用两个或多个遗传性状差异较大的菌株,通过有性杂交、准性杂交和遗传转化等方式,而导致其菌株间的基因的重组,把亲代的优良性状集中在后代中的一种育种技术。通过杂交育种可以实现不同的遗传性状的菌株间杂交,使遗传物质进行交换和重新组合,改变亲株的遗传物质基础,扩大变异范围,获得新的品种。

杂交育种在真核生物育种上发挥了重要的作用,但该方法在根瘤菌选育方面与其他育种手段相比没有优势,目前有关运用传统的杂交手段选育根瘤菌的工作报道很少。

### 3.3. 诱变育种

诱变育种在医药和工业生产菌选育中得到广泛应用。诱变及筛选的第一步关键是用物理、化学或生物的诱变因子修改目的微生物的基因组(genome),产生突变型。

在物理诱变中,激光诱变技术应用广泛,在生物

育种中使用的激光器种类繁多, 波长从红外到紫外, 几乎每一个波段的激光都有效果<sup>[17]</sup>。近年来, 微波诱变技术悄然兴起, 它是一种新型的育种技术, 在其他菌种选育过程中应用广泛, 利用微波结合其他诱变方法进行复合处理, 对根瘤菌进行选育也具有巨大的潜力。

化学诱变剂的突变率通常要比电离辐射的高, 并且十分经济, 但由于它们多是引起碱基置换突变, 易发生回变, 导致变异不稳定, 突变株分离和检测困难, 另外这些物质大多是强致癌剂, 使用时必须十分谨慎, 对实验条件也有较高的要求。在化学诱变中, 目前仍然没有新型诱变剂的出现, 其通常和多种诱变技术相结合的复合诱变广泛用于根瘤菌选育研究中<sup>[18]</sup>。

原生质体融合就是用水解酶除去细胞壁, 释放出球状原生质体, 然后诱导两亲本的原生质体融合, 而达到杂交的目的, 经筛选获得稳定融合子。利用原生质体融合技术选育优良菌株是一项良好的方法。原生质体融合技术由于遗传信息传递量大, 不需了解双亲详细的遗传背景, 可有目的地选择亲株以选育理想的融合株, 便于操作等优点, 为遗传育种提供了一种有效手段, 然环境因素对原生质体的制备有较大影响, 国内外通过融合技术获得高效固氮能力根瘤菌的相关报道不是很多。

### 3.4. 基因水平育种

该水平的各种操作旨在解决根瘤菌同豆科植物是如何形成共生体以及其内部的具体机理。有助于帮助我们认识到在这个过程中关键步骤, 重要酶等, 为我们更好的控制和提高固氮能力提供基础。根瘤菌与植物的共生固氮过程是十分复杂的, 有关共生固氮基因的定位、表达和调控等机理还没有完全被认识, 许多工作仍被视为探索性的实验, 因此, 加强对根瘤菌与植物之间共生固氮的机理的研究将会大大促进根瘤菌选育工作。

近年来, 随着荧光技术的发展, 目前广泛应用的外源基因有 luxAB、GFP 和 RFP 等能够稳定遗传的外源基因, 且不影响共生结瘤固氮行为, 该标记方法具有快速、方便、准确的优点, 广泛用于评价菌株竞争结瘤能力; 肖文丽等<sup>[19]</sup>在应用该标记技术发现其为根瘤菌竞争结瘤能力评价提供了直观、简便、准确的检

测手段。除了上述的几种会发光的基因, 会出现颜色反应的几种基因如: gusA 基因、CelB 基因和 xylE 基因也是较为常用的。以上每一种标记方法都有其优缺点, 所以对根瘤菌—豆科植物共生体在不同的生长阶段, 不同的实验室条件, 不同的实验目的, 场所等应选择适合的标记方法。在研究根瘤菌的侵染过程和早期定植时, 可以应用绿色荧光蛋白基因(gfp)标记, 在激光共聚焦显微镜下能够很容易的观察到侵染线, 但是激光共聚焦显微镜等设备的费用较高, 普通实验室未购买的情况下可以应用一些便宜简便的方法如 luxAB; 对于难导入外源 DNA 的微生物或由于导入外源 DNA 宿主代谢受到干扰微生物, 用抗体和 DNA 标记技术更合适; 大田实验中更适合用 gusA 基因标记, 这种方法得到的结果准确, 可以原位定位, 可以观察所施的根瘤菌的运动性和结瘤部位, 但是价钱较贵, 操作要求严格<sup>[20]</sup>。

然而在根瘤菌与宿主植物共生的过程中, 需识别植物的一系列如有机酸、类黄酮、氨基酸、胞外多糖<sup>[21,22]</sup>等信号分子, 并能够逃避宿主植物的免疫反应, 才能成功侵入宿主植物, 这其中就包括根瘤菌体内很多与该过程相关的基因的表达变化。张江等<sup>[23]</sup>重点对 ssiA 基因进行了研究, 其基因表达产物为一类 LysE 家族氨基酸外运蛋白, 经氨基酸诱导性试验发现 ssiA lacZ 只能被刀豆氨酸诱导, 因此推测其可能与 L 刀豆氨酸的外运有关。于海鹏等<sup>[24]</sup>采用分子生物学及基因工程手段将大豆血红蛋白基因 lbc3、lbc2、lbc1、lba 导入土著大豆根瘤菌中, 构建高效固氮根瘤菌工程菌株, 该工程菌株能够自身合成大豆血红蛋白, 在保证固氮作用正常进行的前提下, 对提高根瘤的固氮酶活性也起到一定作用, 同时为研究根瘤菌与非豆科植物的共生固氮作用奠定基础。

## 4. 问题

目前对于豆科植物根瘤菌的研究中, 虽然已经取得了诸多的成果, 但尚未得出具有根本性突破的结果。仍旧存在以下问题需要解决:

1) 选育过程周期长、工作量大。在国内外的研究中, 还是以自然选育方法为主导, 然该方法主要是基于自然进化, 对有益突变进行筛选。故而其相对耗时漫长、过程繁杂、工作量大。

2) 固氮过程尚未清晰认识。固氮基因的定位, 表达和调控等的机理尚未被完全认识。其具体的过程十分复杂, 随着技术的不断更新进步, 已经取得了一些成果, 但完全的认识清楚却还有待加油。

3) 合适的固氮体系尚未建立。能够大范围应用的根瘤菌尚未建立, 突破性的工作还有待进一步深入研究。

## 5. 展望

基于目前根瘤菌选育的研究现状, 未来的发展趋势有以下几个方面:

1) 深入了解根瘤菌与植物的共生固氮过程, 目前的诸多工作都还只是探索性的实验, 因此, 加强对根瘤菌与植物之间的共生固氮过程的机理的研究将会大大促进根瘤菌的选育工作。

2) 基因工程育种将成为主要的研究方向之一。通过 DNA 分子克隆技术和表达技术为主要技术的基因工程技术, 将会为构建越来越高效的结瘤能力和固氮能力的根瘤菌菌株提供直接的工具。

3) 开发和建立高效的根瘤菌筛选技术, 完善选育步骤、缩短育种周期、降低生产成本、提高遴选效率。

4) 组建几个通用的根瘤菌基因模板, 突破仅仅同豆科植物内共生, 而达到其他高等植物中。从而真正的达到根瘤菌的大面积应用, 造福地球!

## 参考文献 (References)

- [1] 朱剑光, 尉亚辉, 吴异舟. 花生慢生根瘤菌的分离与鉴定[J]. 生物技术, 2006, 16(2): 45-48.
- [2] 姚志恒. 基因在费氏中华根瘤菌中的验证及对结瘤的影响[J]. 江西农业学报, 2009, 21(2): 8-10, 54.
- [3] P. H. Graham, C. P. Vance. Legumes: Importance and constraints to greater use. *Plant Physiology*, 2003, 131(3): 872-877.
- [4] 朱兆良. 合理使用化肥充分利用有机肥发展环境友好的施肥体系[J]. 中国科学院院刊, 2003, 2: 89-93.
- [5] 郭春景, 杨旭升, 陈锡时. 大豆根瘤菌与黑龙江省主栽大豆品种共生匹配的研究[J]. 大豆通报, 2004, 2: 6, 8.
- [6] E. T. Kiers, M. G. Hutton and R. F. Denison. Human selection and the relaxation of legume defences against ineffective rhizobia. *Proceedings of the Royal Society/Biological Sciences*, 2007, 274(1629): 3119-3126.
- [7] 马中雨, 李俊, 张永芳等. 大豆根瘤菌与大豆品种共生匹配性研究[J]. 大豆科学, 2008, 27(2): 221-227.
- [8] R. A. Dixon, J. R. Postgate. Genetic transfer of nitrogen fixation from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli*. *Nature*, 1972, 237(5350): 102-103.
- [9] C. Gerband, C. Elmerich and N. Tandeau. Construction of new yeast vectors and cloning of the nif (nitrogen fixation) gene cluster of *Klebsiella pneumoniae* in yeast. *Current Genetics*, 1981, 3(3): 173-180.
- [10] J. Berman, J. Gershoni. Expression of nitrogen fixation genes in foreign hosts. Assembly of nitrogenase Fe protein in *Escherichia coli* and in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 1985, 260(9): 5240-5243.
- [11] 新华网. 研究表明烟草和油菜可与根瘤菌共生反胶束固定木瓜蛋白酶的动力学研究[N]. 新华网, 2011-08-24(67).
- [12] A. Burgoon, P. Bottino. Uptake of the nitrogen fixing blue-green algae *Gloeocapsa* into protoplasts of tobacco and maize. *Journal of Heredity*, 1976, 67(4): 223-226.
- [13] J. Pagan, J. Child. Nitrogen fixation by *Rhizobium* cultured on a defined medium. *Nature*, 1975, 253: 406-407.
- [14] W. Scowcroft, A. Gibson. Nitrogen fixation by *Rhizobium* associated with tobacco and cowpea cell cultures. *Nature*, 1975, 253(5490): 351-352.
- [15] 张欣, 李玉文. 高效大豆根瘤菌的筛选[J]. 内蒙古科技与经济, 2011, 10(236): 125-127.
- [16] 王文丽, 李娟, 卢秉林. 蚕豆根瘤菌的分离、筛选及其肥效研究[J]. 干旱地区农业研究, 2010, 28(6): 112-115.
- [17] G. W. Feng, H. Cheng, H. Xu, et al. Application of Laser Mutation Technology in Biology Breeding. *Acta Laser Biology Sinica*, 2007, 44(5): 56-60.
- [18] 范运梁, 刘雪, 戴美学. 根瘤菌选育研究进展[J]. 生物技术, 2010, 20(1): 96-98.
- [19] 肖文丽, 关大伟, 李俊, 曹凤明, 陈慧君. 采用 gfp 和 rfp 基因标记评价大豆根瘤菌竞争结瘤能力[J]. 大豆科学, 2010, 29(3): 366-369.
- [20] 于芳, 韩梅, 韩晓日, 肖亦农, 林荣峰. 标记基因技术在根瘤菌研究中的应用[J]. 土壤通报, 2010, 41(3): 744-748.
- [21] M. J. Kathryn, K. Hajime, W. D. Bryan, et al. How rhizobial symbionts invade plants: The Sinorhizobium-Medicago model. *Nature Reviews: Microbiology*, 2007, 5(8): 619-633.
- [22] 周晶, 王鹏, 钟增涛等. 中慢生型天山根瘤菌胞外多糖相关基因 exo5 及其在根毛吸附和生物膜形成中作用的研究[J]. 土壤, 2008, 40(3): 465-468.
- [23] 张江, 王彦涛, 郑会明, 钟增涛, 朱军. 中华苜蓿根瘤菌受种子分泌物诱导的基因筛选和分析[J]. 土壤学报, 2011, 48(1): 217-220.
- [24] 于海鹏, 潘钰, 李海英. 大豆血红蛋白串联基因簇转化根瘤菌工程菌株的构建[J]. 黑龙江大学自然科学学报, 2011, 28(2): 233-236.