

非豆科植物固氮菌—*Frankia* 的基因组研究进展

王树凤 陈益泰

(中国林业科学研究院亚热带林业研究所 浙江富阳 311400)

摘要 弗兰克氏菌 (*Frankia*) 能够与大约 25 个属的非豆科植物共生进行结瘤固氮, 在生态系统中具有重要意义。本文对 *Frankia* 的基因组学研究进展进行了综述, 包括 *Frankia* 基因组的结构、功能及其表达特点, 同时比较了来源于不同菌株的固氮基因的差异, 并提出今后的发展趋势。

关键词 弗兰克氏菌; 固氮酶基因簇; 谷氨酰胺合成酶基因; rRNA 基因; 质粒

中图分类号 S154

弗兰克氏菌 (*Frankia*) 是与许多木本非豆科植物共生的固氮菌, 属于放线菌类, 与 *Frankia* 共生的植物称放线菌结瘤植物, 是森林生态系统中占优势的固氮树种。迄今为止, 已查明能够进行放线菌结瘤固氮的植物有 8 个科 25 个属 200 多种被子植物^[1]。*Frankia* 与宿主植物所形成的共生固氮体系不仅可以固定自然界中的 N 素, 而且能够改善周围土壤的肥力, 增强植物抗逆性^[2]等, 因此在绿化造林、水土保持、改善生态环境等方面起着巨大作用。

对 *Frankia* 的研究最早开始于 19 世纪, 1978 年 Callaham^[1]首次从香蕨木的根瘤中分离出内生菌 *Frankia* 的纯培养, 使研究工作获得突破性进展, 成为生物固氮研究中的一个活跃领域。随着生物技术手段的发展, 对 *Frankia* 的生物学特性、固氮机理等方面的研究已有许多报道^[3~5]。近年来, 人们逐渐将分子生物学技术应用到该领域, 通过分析 *Frankia* 的基因组序列, 从分子水平探索 *Frankia* 的各种生理功能的基础。本文概述了近年来国内外在 *Frankia* 遗传学方面的研究进展, 特别是 *Frankia* 基因组的结构、功能以及其他在分子水平研究的新进展等。

1 *Frankia* 的基因组概况

DNA 重组动力学研究^[6]表明: *Frankia* 的基因组大约有 8700 ~ 12000 kbp, 它的 DNA 含 G+C 大约 68 % ~ 72 %。到 2001 年 7 月底, 有大约 293 kbp 的 DNA 序列被测出, 根据这些基因的序列长度, 可分成 9 组 (表 1)。

表 1 已知序列的 *Frankia* 基因
Table 1 Groups of sequenced *Frankia* DNA

序列	其基因组	长度 (kbp)	占总 DNA 比例 (%)
1	rRNA genes	162	55.3
2	nif cluster	63.5	21.7
3	GS I gene: glnA	16	5.5
4	GS II gene: gln II	3.7	1.3
5	recA	2	0.7
6	Proteasome gene cluster	4.7	1.6
7	tRNA ^{pro} genes	0.3	0.1
8	<i>Frankia</i> plasmids genes	39.4	13.4
9	Promoter sequences	1.2	0.4

2 rRNA 和 tRNA 基因

2.1 rRNA 基因

Frankia 的 rRNA 基因序列是在木麻黄 *Frankia* 的 CeD 菌株里被鉴定的^[7]。CeD 菌株包含两个 rRNA 操纵子 (分别记为 rrnA 和 rrnB), 其中 rrnA 操纵子有正常的 16S-23S-5S 结构, 这些基因的长度与链霉菌的基因长度相似^[8]。rrnA 的 16S rRNA 基因上游有两个启动子序列 (rrnA P1 和 rrnA P2), 其中 rrnA P2 在大肠杆菌和链霉菌中也起作用。出现两个或多个启动子可能是一个正常的特征, 这在大肠杆菌和链霉菌中也曾报道过^[8,9]。5S rRNA 基因的下游有一个依赖于 ρ -因子的强终止子。位于 16S 和 23S 之间的第 1 个基因间隔区 (intergenic spacer, IGS) 有 411 bp, 比链霉菌 (303 bp) 和枯草杆菌 (169 bp) 的 IGS 都要长, 而第 2 个 IGS 只有 68 bp 长, 在这些基因间隔区中未发现 tRNA 基因。

2.2 tRNA 基因

tRNA 基因是在桤木弗兰克氏菌 (*Frankia alni*) 的 Ar13 菌株中鉴定的^[10], 这个基因在 Ar13 菌株、M2 菌株 (来源于木麻黄植物) 和 ACN14a 菌株中是单拷贝, 在其下游存在典型的依赖于 ρ -因子的发夹环状结构终止子。tRNA^{Pro} 基因可作为 pSAM2 载体的结合位点。

3 蛋白质降解体基因

蛋白质降解体是蛋白质水解过程中的一个 20S 的桶状复合物, 其在真核生物中普遍存在。Benoist 等^[6]在木麻黄 *Frankia* 的细胞提取物和培养基浓缩物中发现了类似蛋白质降解体的复合物, 这个复合物可能在侵染寄主过程中通过分解细胞壁蛋白质而起作用。最近在红串红球菌 (*Rhodococcus erythropolis*)、结核杆菌 (*Mycobacteria tuberculosis*) 和天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) 中也发现了类似的复合物。

编码 *Frankia* 蛋白质降解体的基因有 2 个: pcrA 和 pcrB, 分别编码 20S 蛋白质降解体的 α -和 β -亚基, 这 2 个基因是在 *Frankia* ACN14a 菌株中鉴定的, 并在 *E.coli* 体内成功表达^[11]。表达的蛋白质经纯化分析, 得到一个规则的复合体, 该复合体由 4 个环状物构成, 2 个由 β -亚基组成的并列环与 2 个由 α -亚基组成的环从侧面相接, 每个环有 7 个亚基。另外在 pcrB 的基因上游, 有 2 个开放可读框 (orf6 和 orf7), 这些开放可读框在放线菌中是保守的, 其功能目前还不清楚。

4 谷氨酰胺合成酶基因 glnA 和 gln

谷氨酰胺合成酶出现在氨同化的初始阶段, 为蛋白质合成提供谷氨酸盐。Edmands 等人^[12]在 *Frankia* 中发现了两种谷氨酸盐合成酶: GS I 和 GS II, GS I 是 12 亚基酶, 每个亚基分子量 54 kDa, 它的结构表达受亚基的腺苷化控制并受来源于谷氨酰胺代谢物的反馈抑制。GS II 有 8 个与 GS I 相同的亚基, 但它的表达不受亚基的腺苷化控制, 而是由 N 素缺乏诱导。

编码 GS I 和 GS II 的基因分别是 glnA 和 glnII, 它们的序列已在 *Frankia alni* 的 CpII 和 ACN14a 菌株中被测出^[13, 14]。研究发现, ACN14a 和 CpII 菌株的 glnII 有 93 % 的一致性, glnA 序列有 95 % 的一致性。glnA 位于 glnII 的上游, 2 个基

因转录方向相同。Hosted 等^[13]还发现有一个 18 aa 的腺苷化区域起始于 CpII 菌株 glnA 基因的 391 bp 处。另外对 CpII 基因的引物延伸分析表明, glnA 和 glnII 的启动子序列存在差异, glnA 的启动子区位于 -35 和 -10, 可以被 σ^{54} 识别, 而 glnII 的启动子区与 σ^{54} 的结合区序列存在很大差异, 因此推测可能在另外的区域存在 σ^{54} 识别启动子序列。但也有研究发现两者具有相似的基因结构^[15]。

5 超氧歧化酶基因 sodF

在放线菌共生过程中, 超氧化物能够影响铁氧还蛋白、固氮酶复合体等酶的结构并吸收氢化酶, 超氧歧化酶 (SOD) 是保护细胞免受活性氧损伤的保护酶之一。Puppo 等^[16]很早就发现 *Frankia* 纯培养物中含有 SOD, 而且其活性要比其他细菌的酶活性高。1997 年, Alskog 等^[3]发现 *Frankia* 的泡囊中含 Fe-SOD; 最近, 在 ACN14a- tsr 菌株中得到了编码 Fe-SOD 的基因 (sodF)^[17]。这种 Fe-SOD 是一组由 5 种蛋白质组成的复合蛋白, 由桤木根分泌物诱导产生。从 sodF 编码的蛋白微序列分析和 DNA 序列分析得知, sodF 共有 621 bp。Marechal 等^[18]发现有大约 9 kb 的基因区 (genetic island) 环绕在 sodF 周围, 研究表明这个基因区与基因激活因子—乙酰-CoA 转移酶的基因序列相似, 在这个基因区还发现了细菌铁蛋白的基因。该基因区的 DNA 链与大肠杆菌 sodABrecA 突变体 (厌氧生长) 的序列完全互补。

6 *Frankia* 固氮酶基因簇 nif

到目前为止, 人们在 *Frankia* 的 nif 基因簇中确定了 16 个基因和 5 个开放可读框 (orfA、B、1、2、3), 包括固氮酶复合体的 3 个结构基因, 还有与铁钼辅助因子 (FeMo-co) 合成和组装相关的 10 个基因以及某些与固氮密切相关的基因。它们均以相同的方向转录,

6.1 固氮酶复合体的结构基因

Frankia 能够固定大气中的 N 素并将固定的 N 转移到寄主植物和土壤, 它的固氮作用依赖于固氮酶复合体和 FeMo-co 的表达, 该酶由 nifHDK 结构基因编码。nifH 基因编码 N_2O_4 还原酶, 而 nifD 和 nifK 分别编码 N_2O_4 还原酶的 α -和 β -亚基。第一个报道的 *Frankia* 固氮基因是 Ar13 菌株的 nifH 基因^[19], 而完整的 nifHDK 序列则是在 Ar13 和 EuIK1

菌株中得到的^[20]。

6.2 与 FeMo-co 相关的基因

FeMo-co 包括一个金属硫中心 ($\text{Fe}_7\text{S}_9\text{Mo}$) 和一个柠檬酸盐分子^[21], 与 FeMo-co 相关的基因共有 10 个: *nifV*, *nifH*, *nifE*, *nifN*, *nifX*, *nifW*, *nifZ*, *nifB*, *nifU* 和 *nifS*, 所有这些基因都在 *nif* 基因簇中, 而且这些基因在 *Frankia* 中很可能是保守的。

nifE 和 *nifN* 分别编码 NifEN 复合体的 α -和 β -亚基, NifEN 复合体是一个四聚物, 是固氮酶 FeMo-co 生物合成所必需的^[22]。*nifB* 表达的产物是铁硫实体 (NifB-co), 它是 FeMo-co 的前体, 这个前体与 NifEN 复合体结合, 在 FeMo-co 合成过程中发挥作用。*nifU* 和 *nifS* 的基因产物对于 Fe 和 S 元素在 Fe-S 实体中的出现是必不可少的, 对修复损伤的 Fe-S 簇也可能起作用, NifU 可能为 Fe-S 簇的组装提供媒介^[23]。

柠檬酸盐是 FeMo-co 中的有机成分, 它的合成是由 *nifV* 基因控制的。*nifV* 基因的产物可以通过浓缩乙酰-CoA 和 α -酮戊二酸盐催化柠檬酸盐形成^[24], 另外 *nifW* 也可能在此过程中发挥作用。*nifZ* 的作用在 *Frankia* 中虽不明确, 但 Jacobson 等^[25]发现棕色固氮菌 (*Azotobacter vinelandii*) 的 *nifZ* 对于 FeMo 蛋白的分解或活化是必需的。而 Shah 等^[26]发现 *nifW* 和 *nifZ* 在柠檬酸盐和 FeMo 前体 (NifEN、NifX) 的结合过程中起重要作用。

6.3 其他与固氮有关的基因

除了上述编码固氮酶复合体和 FeMo-co 的基因以外, 在 *Frankia* EUK1 菌株的 *nifS* 序列下游还发现了 3 个与固氮相关的基因。其中前两个与编码 2-氧酸基铁氧还蛋白还原酶亚单位 (*ora* 和 *orb*) 的基因具有序列相似性, 最后一个与编码七铁型铁氧还

蛋白 (*fdxI*) 的序列相似^[27]。铁氧还蛋白是 2-氧酸基铁氧还蛋白还原酶的电子受体, 在离体状态下可以给固氮酶提供电子, 另外铁氧还蛋白和 2-氧酸基铁氧还蛋白还原酶在丙酮酸盐生成乙酰-CoA 的过程中也发挥作用。*fdx* 基因通常存在于 *nif* 基因簇中, 与 *nifHDK* 共转录^[28], 而 *ora* 和 *orb* 与固氮基因簇的相关性却只是在 *Frankia* 中发现。

尽管 *ora*、*orb* 和 *fdxI* 基因与 *nif* 基因簇存在联系, 但在 *Frankia* 这些基因的上游并没有发现明显的 *nif*-启动子, 研究表明这些基因也并非共转录^[27]。

6.4 *nif* 基因簇的结构

在 *Frankia* 基因组中, 与 FeMo-co 组装和合成有关的大部分基因都与 *nifHDK* 基因聚集或临近 (图 1)^[29]。

在 *Frankia* CpI1 菌株的 *nif* 基因簇中, Harriot 等^[30]为 *nifB* 下游的开放可读框命名为 *orf2*, MacEwan 和 Gatherer^[31]发现 CpI1 菌株的 *Orf2* 与来源于 *Anabaena* 和 *Cyanothecce* 的 *HesB* 具有序列相似性, 因此将 CpI1 菌株的这个 *orf* 命名为 *hesB*, 以此区别于 EUK1 菌株的 *orf2*, 因为 EUK1 菌株的 *orf2* 与 *hesB* 序列是没有相似性的。*hesB* 的功能目前还不清楚, 但 Huang 等^[28]发现蓝藻的 *hesB* 基因只在固氮状态下才能表达。

最后一个 *orf* 的序列是在 CpI1 菌株中被鉴定的^[30], 命名为 *nifU*, 因为这个序列与编码某些二氮营养物的 *nifU* 的 C-末端结构域相似。为了与来源于其他细菌的 *nifU* 完整序列相区分, 有人建议以 *nifU_F* 表示^[32]。EUK1 的 *nifU_F* 与 CpI1 不同, 它有 629 nt 长, 而 CpI1 的 *nifU_F* 只有 215 nt; EUK1 的 *nifU_F* 与 *hesB* 是融合在一起的, 因此检测不到独立的 *hesB* 基因。

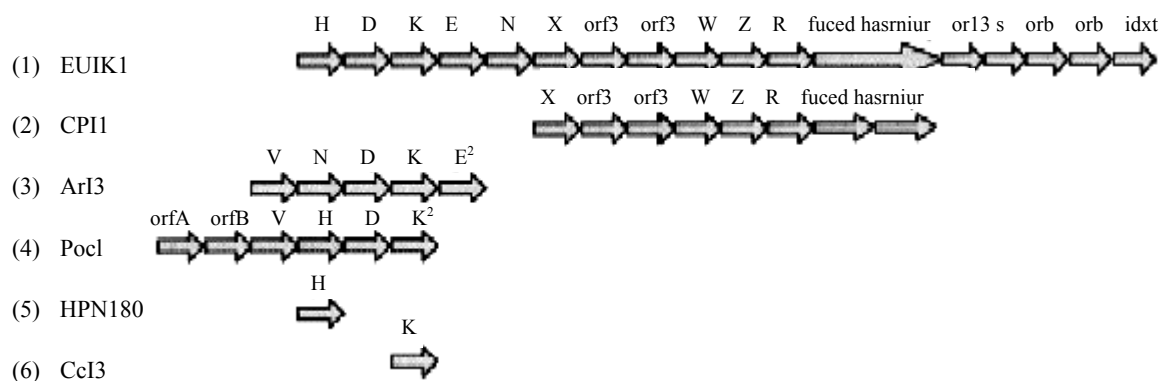


图1 来源于*Frankia*不同菌株(种)的*nif* 基因簇的结构^[29]

Fig. 1 Structure of *nif* cluster of *Frankia* from different strains/species

7 *Frankia* 质粒及其复制

7.1 *Frankia* 质粒的结构

在 *Frankia* 中, 存在大约 7 ~ 190 kbp 长度不等的质粒, 对这些质粒进行 RFLP (Restriction fragment length polymorphisms) 分析发现, 共有 4 组: 8 kb、18 kb、35 kb 和 55 kb。另外还发现有一个 190 kb 的质粒, DNA 印迹分析表明后者有完整的 *nifHDK* 簇^[32]。

目前已明确序列的质粒有 3 个: 其中 8 kb 质粒组的 2 个, 分别是 ArI3 菌株的 pFQ31 和 CpI1 菌株的 pFQ11; 18 kb 质粒组的 1 个, 即 CpI1 菌株的 pFQ12^[15, 33, 34]。pFQ31 和 pFQ11 都是 8.5 kb, pFQ12 是 22.4 kb; pFQ12 的 GC 含量为 76 %, pFQ31 是 72 %; pFQ11 和 pFQ31 有 99.7 % 的相似性, 而 8 kb 质粒和 18 kb 质粒之间不存在序列相似性。最近的研究^[35]也表明 pFQ11 和 pFQ12 只在 4 个很短的区域 (不到 100 bp) 具有相同的序列, 但这些质粒上都有一个 *korSA* 相似序列, 所表达的氨基酸序列有很强的相似性。

7.2 质粒基因的功能

pFQ12 大约有 50 多个开放可读框, 其中 20 个是编码序列; pFQ31 有 17 个, pFQ11 只有 4 个。研究表明, 由这些可读框推测的蛋白质序列与在质粒复制、遗传及转化中出现的蛋白质序列相似^[15], 但至今还没有在蛋白质表达水平上的研究来证实这些推断。

repFA 是 pFQ31 的一个 *orf*, 编码类似于 Rep 蛋白的复制起始蛋白。pFQ12 有 2 个 *orf* 编码类似于质粒转化相关的蛋白质: 其中 *Orf3* 与 *pRK2* 的 *TrbL* 转移因子类似, *Orf6* 与 *pR751* 的 *KfrA* 相似, 该蛋白是一种内源抑制因子。

Frankia 的这 3 个质粒都包含一个编码类似于分割蛋白的序列: pFQ31 的 *parFA* 基因和 pFQ11 的 *orf3* 编码的蛋白质类似于假单胞菌 *Pseudomonas alcaligenes* 的 *ParA* 蛋白质, pFQ12 的 *orf11* 编码类似枯草杆菌的 *SpoJ* 蛋白质。分割蛋白质的作用是在细胞分裂过程中将 DNA 分子等分, 产生相等的遗传物质, 从而保证质粒遗传的稳定性。

另外, 这 3 个质粒还包含一个类似链霉菌 pSAM2 的 *KorSA* 蛋白质基因, *KorSA* 是 *kil-kor* 系统 *GntR* 家族的一个转录抑制因子, 控制 pSAM2 的复制、融合和剪切。在 *kil-kor* 系统中, 当细胞不受

kor (*kill override*) 基因调控时, *kil* 基因便发挥作用使细胞致死。*Frankia* 的 *KorSA* 相似序列可能会干涉 pSAM2 的融合特性, 因此, 在以 pSAM2 转化 *Frankia* 时应该考虑到这一点。

7.3 质粒的复制

目前已有研究者通过 *Oriloc* 分析推测出了上述 3 个质粒复制的起点, 并发现这 3 个质粒均以类似于 θ -模型的方式复制^[33~35]。pFQ31 的复制起点是以 *ptrFA* 和 *repFA* 序列之间的 DNA 回文结构为基础的, 这个区域包含 θ -型复制特有的起始结构骨架 (类似 *iteron* 的重复序列, 富含 AT 区和其他一些重复序列)。pFQ11 和 pFQ12 虽然也是以类似 θ -模型的方式复制, 但未发现 θ -模型复制的保守序列^[35]。

8 存在的问题及展望

在共生固氮过程中, 宿主植物的结瘤是固氮菌进行固氮的第一步, 目前人们已经在豆科植物的根瘤菌中分离克隆到了结瘤基因 (*nod*), 放线菌结瘤植物的结瘤过程虽与根瘤菌存在许多共同之处, 但到目前为止, 还未找到 *Frankia* 的结瘤基因, 只是发现了某些类似于根瘤菌结瘤基因类的 *nod* 基因^[36], 因此对 *Frankia* 结瘤的分子生物学基础还有待于进一步探索。已经确定的 *Frankia* 基因序列在 *Frankia* 总的 DNA 中还不到 3 %, 很多未知功能的基因还有待于分析, 因此序列分析工作仍需进行。

Frankia 遗传转化和抗性突变体的研究对于深入了解 *Frankia* 对寄主的侵染机制和固氮作用具有重要意义, 目前已初步获得 *Frankia* 蛋白质在大肠杆菌的表达, mRNA 转录分析工作也取得一定进展。但由于受 *Frankia* 启动子的限制, *Frankia* 遗传转化工作遇到了很多困难, 因此, 下一步的工作是尽可能找到更有效的转化工具。最近在 *Frankia* 基因组中发现 6 个拷贝的插入序列^[34]以及共轭转座子 *Tn916* 可能具有转化 *Frankia* 细胞的潜力^[37], 为进一步研究基因在 *Frankia* 细胞中的表达提供了依据。

林木生物固氮研究是生物技术在林业中应用的一个方面, 对于我国的林业发展具有重要意义。我国对 *Frankia* 共生固氮的遗传学研究起步相对较晚, 又加上目前我国在林业生物技术方面投入不足、研究手段相对滞后等原因, 使得对共生固氮的分子基础研究远远低于国际水平, 很多研究都是国外工作的重复。但随着我国对林业生物技术重视程度的增加, 这些问题必将得到一定程度的解决, 相应的研

究水平也将有所提高。

参考文献

- 胡传炯, 周启, 周平贞. 马桑弗兰克氏菌的生物学特性的多样性. 土壤, 1998, 30 (3): 158 ~ 161
- 吴建峰, 林先贵. 土壤微生物在促进植物生长方面的作用. 土壤, 2003, 35 (1): 18 ~ 21
- Alskog G, Huss-Danell K. Superoxide dismutase, catalase and nitrogenase of symbiotic *Frankia* (*Alnus incana*) in response to different oxygen tensions. *Physiol. Plant*, 1997, 99: 286 ~ 292
- Cournoyer B, Gouy M, Normand P. Molecular phylogeny of the symbiotic actinomycetes of the genus *Frankia* matches host-plant infection processes. *Mol. Biol. Evol.*, 1993, 10: 1303 ~ 1316
- Fernandez MP, Meugnier H, Grimont PAD, Bardin R. Deoxyribonucleic acid relatedness among members of the genus *Frankia*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1989, 39: 424 ~ 429
- Benoist P, Muller A, Diem HG, Schwenke J. Highmolecular-mass multicatalytic proteinase complexes produced by the nitrogen-fixing actinomycete *Frankia* strain. *J. Bacteriol.*, 1992, 174: 1495 ~ 1504
- Normand P, Cournoyer B, Simonet P, Nazaret S. Analysis of a ribosomal RNA operon in the actinomycete *Frankia*. *Gene*, 1992, 111: 119 ~ 124
- Pernodet JL, Boccard F, Alegre MT, Gagnat J, Guerineau M. Organisation and nucleotide sequence analysis of aribosomal RNA gene cluster from *Streptomyces ambofaciens*. *Gene*, 1989, 79: 33 ~ 46
- Baylis HA, Bibb MJ. Organisation of the ribosomal RNA genes in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Gen. Genet.*, 1988, 211: 191 ~ 196
- Alegre MT, Cournoyer B, Mesas JM, Guerineau M, Normand P, Pernodet JL. Cloning of *Frankia* species putative tRNA(Pro) genes and their efficacy for pSAM2 site-specific integration in *Streptomyces lividans*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, 60: 4279 ~ 4283
- Pouch MN, Cournoyer B, Baumeister W. Characterization of the 20S proteasome from the actinomycete *Frankia*. *Mol. Microbiol.*, 2000, 35: 368 ~ 377
- Edmands J, Noridge NA, Benson DR. The actinorhizal root-nodule symbiont *Frankia* sp. strain CpI1 has two glutamine synthetases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1987, 84: 6126 ~ 6130
- Hosted TJ, Rochefort DA, Benson DR. Close linkage of gene encoding glutamine synthetase I and II in *Frankia alni* CpI1. *J. Bacteriol.*, 1993, 175: 3679 ~ 3684
- Cournoyer B, Lavire C. Analysis of *Frankia* evolutionary radiation using *glnII* sequences. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1999, 177: 29 ~ 34
- Xu X, Kong R, de Bruijn FJ, He SY, Murry MA, Newman T, Wolk CP. Sequence and characterization of plasmid pFQ11 and glutamine synthetase gene *glnA* from *Frankia* spp.. Abstract in 11th International Meeting on *Frankia* and Actinorhizal plants. Carry-le-Rouet, France, 2001
- Puppo A, Dimitrijevic L, Rigaud J. Superoxide dismutase and catalase activities in purified *Frankia* vesicles. *Physiol. Plant*, 1989, 77: 308 ~ 311
- Hammad Y, Marechal J, Cournoyer B, Normand P, Domenach AM. Modification of the protein expression pattern induced in the nitrogen-fixing actinomycete *Frankia* sp. strain ACN14atsr by root exudates of its symbiotic host *Alnus glutinosa* and cloning of the *sodF* gene. *Can. J. Microbiol.*, 2001, 47: 541 ~ 547
- Marechal J, Santos R, Hammad Y, Ceremonie H, Domenach AM, Normand P. Characterization of the *sodF* gene region of *Frankia* sp. strain ACN14a and complementation of *Escherichia coli* *sod* mutants. Abstract in 11th International Meeting on *Frankia* and Actinorhizal plants. Carry-le-Rouet, France, 2001
- Normand P, Simonet P, Bardin R. Conservation of *nif* sequences in *Frankia*. *Mol. Gen. Genet.*, 1988, 213: 238 ~ 246
- Kim HB, An CS. Nucleotide sequence and expression of *nifHD* from *Frankia* strain EuIK1, a symbiont of *Elaeagnus umbellata*. *Physiol. Plant*, 1997, 99: 690 ~ 695
- Kim J, Rees DC. Structural models for the metal centers in the nitrogenase molybdenum-iron protein. *Science*, 1992, 257: 1677 ~ 1682
- Ludden PW, Shah VK, Roberts GP, Ruttimann-Johnson C, Rangaraj P, Foulger T, Allen RM, Roll JT, Zhang X, Chatterjee R. Biosynthesis of the iron-molybdenum and iron-vanadium cofactors. In: Elmerich C, Konorosi A, Newton WE. eds. *Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1998, 33 ~ 38
- Yuvaniyama P, Agar JN, Cash VL, Johnson MK, Dean DR. NifS-directed assembly of a transient [2Fe-2S] cluster

- within the NifU protein . Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2000, 97: 599 ~ 604
- 24 Zheng L, White RH, Dean DR. Purification of the *Azotobacter vinelandii* nifV-encoded homocitrate synthase. J. Bacteriol., 1997, 179: 5963 ~ 5966
 - 25 Jacobson MR, Cash VL, Weiss MC, Laird NF, Newton WE, Dean DR. Biochemical and genetic analysis of the nifUSVWZM cluster from *Azotobacter vinelandii*. Mol. Gen. Genet., 1989, 219: 49 ~ 57
 - 26 Shah VK, Rangaraj P, Chatterjee R, Allen RM, Roll JT, Roberts GP, Ludden PW. Requirement of NifX and other nif proteins for *in vitro* biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. In: Elmerich C, Konorosi A, Newton WE. eds. Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1998, 51 ~ 52
 - 27 Yoo WY, Sung SB, An CS. Nucleotide sequence of the 2-oxoacid ferredoxin oxidoreductase and ferredoxin genes from *Frankia* EuIK1, a symbiont of *Elaeagnus umbellata* root nodules. Can. J. Bot., 1999, 77: 1279 ~ 1286
 - 28 Huang TC, Lin RF, Chu MK, Chen HM. Organization and expression of nitrogen-fixation genes in the aerobic nitrogen-fixing unicellular *Cyanobacterium Synechococcus* sp. strain RF-1. Microbiology, 1999, 145: 743 ~ 753
 - 29 Lavire C, Cournoyer B. Progress on the genetics of the N₂-fixing actinorhizal symbiont *Frankia*. Plant and Soil, 2003, 254: 125 ~ 137
 - 30 Harriott OT, Hosted TJ, Benson DR. Sequences of nifX, nifW, nifZ, nifB and two ORF in the *Frankia* nitrogen fixation gene cluster. Gene, 1995, 161: 63 ~ 67
 - 31 MacEwan NR, Gatherer D. Codon indices as a predictor of gene functionality in a *Frankia* nitrogen fixation gene cluster. Gene, 1995, 161: 63 ~ 67
 - 32 Simonet P, Haurat J, Normand P, Bardin R, Moiroud A. Localization of nif genes on a large plasmid in *Frankia* sp. strain ULQ0132105009. Mol. Gen. Genet., 1986, 204: 492 ~ 495
 - 33 Lavire C, Louis D, Perriere G, Briolay J, Normand P, Cournoyer B. Analysis of pFQ31, a 8551-bp cryptic plasmid from the symbiotic nitrogen-fixing actinomycete *Frankia*. FEMS Microbiol. Lett., 2001, 197: 111 ~ 116
 - 34 John TR, Rice JM, Johnson JD. Analysis of pFQ12; a 22.4 kb *Frankia* plasmid. Can. J. Microbiol., 2001, 47: 1 ~ 10
 - 35 Frank AC, Lobry JR. Oriloc: Prediction of replication boundaries in unannotated bacterial chromosomes. Bioinformatics, 2000, 16: 560 ~ 561
 - 36 何新华, 陈力耕, 陈怡. 非豆科木本植物与放线菌共生固氮相关基因研究进展. 浙江林学院学报, 2004, 21 (1): 110 ~ 114
 - 37 Myers A, Rawnsley T, Tisa L. Developing genetic tools for *Frankia*, the bacterial partner of the actinorhizal symbiosis. 11th International Meeting on *Frankia* and Actinorhizal plants. Carry-le-Rouet, France, 2001

ADVANCES IN RESEARCH ON GENOMES OF *FRANKIA*

WANG Shu-feng CHEN Yi-tai

(Research Institute of Subtropical Forestry, China Academy of Forestry, Fuyang, Zhejiang 311400)

Abstract Nitrogen-fixation symbiosis between non-legume plants and *Frankia* strains is the predominant N₂-fixing system in forests. Actinomycete *Frankia* is of fundamental and ecological importance for its ability to fix nitrogen and to nodulate about 25 genera of plants. Here is a review on genomes of *Frankia*, including the organization, function, localization and some particular properties of its genes. Also a comparative analysis of *Frankia* nif genes from various strains and species was carried out. Novel trends in research on *Frankia* genetics were given in the end.

Key words *Frankia*, Nif gene cluster, Gln, Rrn, Plasmid