

文章编号: 1000-5692(2004)01-110-05

非豆科木本植物与放线菌共生固氮 相关基因研究进展

何新华^{1,2}, 陈力耕¹, 陈怡¹

(1. 浙江大学 农业与生物技术学院 园艺系, 浙江 杭州 310029; 2. 广西大学 农学院 园艺系, 广西 南宁 530004)

摘要: 氮素固定是地球上维持生产力的一个重要生态反应, 是继 CO₂ 固定之后最重要的生化反应。非豆科木本双子叶植物与固氮放线菌 *Frankia* 共生形成根瘤固氮, 这些植物对绿化荒山、防止水土流失和保护生态环境等具有重要的作用, 它们是陆地生态系统中的重要供氮者。*Frankia* 菌具有对宿主的侵染范围广、固氮活性比较强和对氧气不敏感等特性, 在 *Frankia* 菌与农作物之间建立起新的共生固氮体系的可能性很大。利用生物工程技术和方法构建高效的 *Frankia* 工程菌和新的固氮共生体系将成为今后生物固氮研究领域中的发展方向和追求目标。重点介绍了弗氏放线菌中共生固氮相关的固氮基因和谷氨酰胺合成酶基因、根瘤中结瘤固氮相关的 *nod* 基因、血红蛋白 cDNA 克隆及其他根瘤特异蛋白 cDNA 克隆等方面的研究进展。参 33

关键词: 植物学; 生物固氮; 放线结瘤植物; 放线菌; 共生; 基因

中图分类号: Q945.13 **文献标识码:** A

在自然界, 有 8 科 24 属 200 多种非豆科木本双子叶植物与固氮放线菌 *Frankia* 共生形成根瘤固氮^[1,2]。这类植物统称为放线结瘤植物。它分布广, 适应性强, 是绿化荒山的先锋树种。因其有固氮作用, 能培肥、改良土壤, 故常作为混交林的半生树种, 是森林生态系统中的重要供氮者^[3]。自 1978 年 *Frankia* 的纯培养及分离成功以后, 人们对其细胞学、分类学、形态学、生理生化和遗传学等方面都进行了研究, 取得了许多突破。随着分子生物学的发展, 采用分子生物学手段研究放线菌 *Frankia* 及与非豆科木本双子叶植物共生固氮, 已成为当前非豆科木本植物共生固氮的研究热点。而对放线结瘤植物共生固氮相关基因的研究是非豆科木本植物共生固氮的核心内容之一, 有利于揭示放线结瘤植物共生固氮机理, 为构建高效的 *Frankia* 工程菌和新的固氮共生体系奠定基础。由于放线结瘤植物共生固氮是由 *Frankia* 菌侵染宿主植物形成根瘤, 在根瘤中进行固氮, 因而本文将从 *Frankia* 菌和根瘤 2 个方面介绍非豆科木本植物与放线菌共生固氮相关基因的研究进展。

1 弗氏放线菌中的共生固氮相关基因

目前, 已报道的弗氏放线菌中共生固氮相关基因主要有固氮基因 (*nif*)、谷氨酰胺合成酶(GS) 基因、一些水解酶基因及固氮酶氧保护相关的基因。固氮基因包括 *nifH*, *nifD*, *nifK*, *nifA*, *nifB*, *nifX*, *nifW*,

收稿日期: 2003-09-26; 修回日期: 2003-12-02

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(302362)

作者简介: 何新华(1966-), 男, 湖南衡阳人, 副教授, 从事生物技术与生物固氮研究。E-mail: honest66222@sohu.com

nifZ, *nifV*, *nifE*, *nifN*, *nifU* 和 *nifS* 及一些 *orf* 基因^[1,3], 其中对固氮酶结构基因(*nifHDK*) 研究较多, 部分固氮基因的功能尚不清楚。谷氨酰胺合成酶基因包括 *glnA* 和 *gln II* 2 个基因。

1.1 *nif* 基因

采用异源探针、限制性内切酶图谱和核苷酸序列分析相结合的方法, 至今已构建了 3 个 *Frankia* 菌株 *nif* 基因的遗传图谱, *Frankia* 菌株 EuIK1 的 *nif* 基因顺序为 *nifK-E-N-X-orf3-orf1-W-Z-B-V-orf2-S-or a-or b-fdx I*^[3], *Frankia* 菌株 FaC1 的 *nif* 基因顺序为 *orfA-orfB-nifV-H-D-K-E-N-X-W-B*, *Frankia* 菌株 CpII 的 *nif* 基因顺序是 *nifH-D-K-3kb-X-orf3-orf1-W-Z-B-orf2-U*^[4]。这些 *nif* 基因分别属于不同的操纵子。

nifH, *nifD* 和 *nifK* 基因是分别编码固氮酶的 Fe 蛋白和 MoFe 蛋白的结构基因, 3 个基因连锁成簇排列在染色体上^[3~8], 而且这 3 个基因的核苷酸和氨基酸序列比较保守, 但不同菌株之间 *nifH* 和 *nifD* 及 *nifD* 和 *nifK* 之间的间隔序列在长度和同源性上差异较大^[8]。

nifA 是正调控基因, 在 *Frankia* EuIK1 菌株中发现 2 个 *nifA* 基因, *nifA1* 和 *nifA2* 的完整核苷酸序列长度分别为 1 926 bp 和 1 524 bp^[9]。在 *Frankia* EuIK1 菌株中还分离到含氧铁氧还蛋白氧化还原酶基因(*or*)和铁氧还蛋白基因(*fdx*)。 *Frankia or* 基因与肺炎克氏杆菌 *Klebsellia pneumoniae* 的 *nifJ* 基因序列的同源性为 4%, 而 *Frankia fdx* 基因与棕色固氮菌 *Aetobacter vinelandii* 的 *fdxI* 基因有 56% 核苷酸序列相同。这 2 个基因的产物在共生中可能与固氮和碳代谢有关^[10]。

1.2 *glnA* 和 *gln II*

谷氨酰胺合成酶是把 *Frankia* 菌固定的氮素同化并转移到植物体内的一种酶, 现已从 *Frankia* 菌中分离到 2 个编码谷氨酰胺合成酶(GS)的基因 *glnA* 和 *gln II*。与其他具有双 GS 系统的微生物不一样, 这 2 个谷氨酰胺合成酶基因连在一起, 仅间隔 449 bp。其中 *glnA* 基因只有一个启动子 *glnAp1*, 转录起始于 2 个相邻的核苷酸。比较 *Frankia glnA* 启动子和天蓝色链霉菌 *Streptomyces coelicolor* 启动子, 发现有 2 个序列相同的区域, 即 2 个序列的 -10 和 -35 区域。另外, 一系列正向重复序列在启动子附近成簇排列, 这在链霉菌启动子区域是普遍存在的。研究还发现 *glnA* 启动子和大肠杆菌 *Escherichia coli* 启动子或类似链霉菌-大肠杆菌的启动子之间存在一定的同源性^[5,11], *Frankia* 菌 *glnA* 基因的核苷酸和氨基酸序列比较保守^[3,12]。

对编码菌株 HFP CpII 谷氨酰胺合成酶 II 的 *gln II* 基因分析, 发现一个启动子 *gln II p1* 与革兰氏阴性细菌中的 NtrA (σ^{54}) 结合位点有少量序列相似。比较 *Frankia* 菌株 HFP CpII 和绿色链霉菌 *S. viridochromogenes* 的 *gln II* 基因上游序列, 发现绿色链霉菌 *gln II* 基因上游序列的一个相似区域对应于 HFPCP I 1 的 *gln II p1*, 认为 *gln II p1* 在 *Frankia* 菌株中作为一个氮调节的启动子, 但未发现与 *gln II p1* 重叠的正向重复序列, 因而认为 *gln II* 与 *glnA* 的调节方式不同^[1]。 *Frankia gln II* 基因产物与豌豆 *Pisum sativum* 的 GS 和大豆的 GS II 有高度的同源性, *Frankia gln II* 基因从载体 lac 启动子转录时, 能与大肠杆菌 *Escherichia coli* $\Delta glnA$ 突变体互补, 但当 *Frankia* 启动子转录时, 则不能互补^[13]。

1.3 水解酶基因

Simonet 等在 *Frankia* 菌中发现了与 *Erwinia chysanthemi* 的 *pel*(果胶酶基因)和 *Clostridium thermocellum* 的 *cel*(纤维素分解酶基因)同源的 DNA 序列。 *Frankia* 菌在侵染宿主时与病原菌类似, 必须先水解植物细胞壁, 编码这些水解酶的 *Frankia* 菌基因被认为与结瘤有关^[4]。

1.4 固氮酶氧保护相关的基因

脂质胞囊是一道阻止氧扩散的屏障, 是固氮酶氧保护系统的主要部位。在 *Frankia* 菌胞囊中类何帕烷(hopanoid)含量是已知生物中最高的, 可能与 *Frankia* 菌固氮酶氧保护机制有关。 Dobritsa 等已从几个 *Frankia* 菌株中分离克隆出与鲨烯-何帕烯(squaleae-hopene)环化酶(shc)编码区部分同源的 328 bp DNA 片段^[13]。

2 放线结瘤植物根瘤中的结瘤固氮相关基因

根瘤是共生固氮的场所, 在根瘤的发育过程中产生一些专门的蛋白质如血红蛋白和结瘤素。这些

蛋白质的基因在结瘤中顺序表达, 与 *Frankia* 菌的固氮基因协同作用, 完成共生固氮过程。一般把宿主植物基因编码的根瘤特异性蛋白统称为结瘤素, 编码这些物质的基因叫结瘤基因。目前对木麻黄 *Casuarina equisetifolia* 和赤杨 *Alnus japonica* 根瘤中相关基因如 *nod* 基因、血红蛋白 cDNA 克隆及其他根瘤特异蛋白 cDNA 克隆进行过研究, 对与 *Frankia* 菌共生固氮的其他植物结瘤相关基因研究较少。

2.1 *nod* 基因

Reddy 等用功能互补法从 *Frankia* 菌株 HFPCcI3 基因文库中筛选到一个克隆 Rm5610NS6, 似乎能互补苜蓿根瘤菌 *nodA*:Tn5 突变体的功能, 但进一步的实验分析结果表明, *nodA*:Tn5 是因为在获得 *Frankia* DNA 片段的同时发生突变而恢复结瘤表型 Nod^+ , 并不是由于 *Frankia* DNA 片段互补了 *nodA*⁻ 的功能才产生结瘤表型, Rm5610NS6 恢复结瘤能力与所导入的 *Frankia* DNA 片段无关^[14]。崔玉海等选用 3 个 *Frankia* 菌株分别建立其质粒基因组文库, 以豌豆根瘤菌 *Rhizobium leguminosarum* 结瘤基因为探针, 通过菌落原位杂交, 从文库中筛选到几个阳性克隆^[17]。柏学亮等利用功能互补从赤杨 *Frankia* 菌株 At4 的基因文库中分离到 2 个可能可互补豌豆根瘤菌 *nod* 基因功能的克隆 pAt2GX 和 pAt3GX, 并验证了这 2 个克隆的互补功能^[18]。但迄今为止, 在 *Frankia* 菌中未发现与根瘤菌 *nod* 同源的 DNA 序列。

2.2 血红蛋白 cDNA 克隆

血红蛋白是晚期结瘤素之一, 在豆科植物和非豆科植物中广泛存在, 分成共生血红蛋白和非共生血红蛋白 2 种类型, 其中共生血红蛋白与结瘤固氮有关。迄今, 在部分 *Frankia* 放线菌结瘤植物的根瘤中也发现了血红蛋白。Jacobsen-Lyon 等^[19] 从木麻黄根瘤 cDNA 表达文库中分离到 3 个共生血红蛋白 cDNA 克隆, 这些 cDNA 克隆属于一个基因家簇 (cashb-sym), 有 90% 的氨基酸序列相同, 它们仅在根瘤组织中表达。它们与一个单拷贝非共生的血红蛋白基因 (cashb-nonsym) 有 53% 的氨基酸序列相同, 这个非共生的血红蛋白基因在根瘤组织及与共生无关的根组织中表达水平低。Jacobsen-Lyon 等还鉴定出 2 个共生和非共生的木麻黄血红蛋白的启动子区, 并在一个转基因 GUS 融合的 Lotus 系统中检测其活性。cashb-sym 启动子区含有豆血红蛋白结瘤素 box 共同序列 AAAGATn6CTCTT 的几乎全部拷贝 (AAAGATn7CTCTT), 木麻黄属植物根瘤血红蛋白及其基因序列与大豆的一个新血红蛋白基因的同源性为 85%~87%^[20]。木麻黄根瘤共生血红蛋白基因与拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 的一个非共生血红蛋白 (Claes 2) 基因 (AHB2) 也有同源性^[21]。Gherbi 等^[22] 从粗枝木麻黄根瘤分离到一个大型共生血红蛋白 cDNA (hb-Cg1F), hb-Cg1F mRNA 与 *Frankia* 菌感染状态的相关。Hb 在 *nif* 基因表达前对降低氧气在宿主细胞的细胞质中集聚是很必需的。

2.3 其他根瘤特异蛋白 cDNA 克隆及相关基因

据报道, 迄今已从赤杨根瘤 cDNA 文库中分离到富含谷氨酸和脯氨酸的 cDNA 克隆 pAg13^[23], 2 个类似枯草杆菌 *Bacillus subtilis* 蛋白酶的丝氨酸蛋白酶 Ag12-1 和 Ag12-2^[24], 编码根瘤特异的半胱氨酸蛋白酶 (AgNOD-CP1) 的 cDNA 克隆 pAgNg118-203^[25] 富含甘氨酸/组氨酸蛋白质 (AgNOD-GHRP) 的一个基因家簇的不同成员 pAgNt84^[4, 26] 和 pAg164^[27] 的 2 个 cDNA 克隆, PEP 羧化酶的 cDNA 克隆^[4], 果糖激酶和谷氨酸合成酶 cDNA 克隆^[4], 脂肪酸还原酶 cDNA 克隆^[4], 蔗糖合成酶和烯醇化酶的 cDNA 克隆^[4] 等。Bogusz 等从木麻黄根瘤中分离出一个金属结合蛋白——金属硫蛋白 cDNA 克隆^[4]。这些基因都与结瘤固氮有关。

3 放线结瘤植物共生固氮基因的利用与展望

利用 *Frankia* 菌和链霉菌 *Streptomyces* 进行原生质体融合, 已成功地得到了具有嵌合性状的融合子, 传代 10 次仍保持其结瘤、固氮和抗生特性^[28, 29]。利用发根农杆菌 *Agrobacterium rhizogines* 和根癌农杆菌 *A. tumefaciens* 转染, 已经在木麻黄科植物上建立了两个转基因系统, 能在木麻黄上形成转基因的放线菌固氮根瘤, 具有固氮酶活性^[30~32]。

此外, 潘建菁等^[33] 应用 *Frankia* 菌接种水稻 *Oryza sativa* 和玉米 *Zea mays*, 在 2, 4-D 诱导下苗木出现瘤状突起, 经测定具有与根瘤菌相似的乙炔还原活性。

应用现代科学技术建立和完善生物固氮体系已经成为解决人类目前所面临的人口、粮食、能源和

环境等问题的重要技术措施, 生物固氮研究已经引起越来越多人的关注。同根瘤菌与豆科植物共生固氮相比, *Frankia* 菌与非豆科木本双子叶植物共生固氮的分子生物学研究尚处于起步阶段, 对 *Frankia* 菌固氮基因的调控机理、*Frankia* 菌与非豆科木本双子叶植物之间的信号传递、相互识别、基因的顺序性表达和调节及对根瘤形成、发育和固氮作用大小的影响等相互作用的机理、功能基因组学和蛋白质组学等方面的研究几乎是空白。但由于 *Frankia* 菌具有跨越科、属植物进行侵染结瘤固氮的特性, 被认为是研究扩大寄主范围、结瘤机制、固氮基因转移和构建新的固氮物种的理想材料, 研究和应用潜力巨大, 也越来越受到重视。从研究现状来看, 试图通过基因工程将 *nif* 基因从豆科植物转移到非豆科农作物中难度比较大, 在短期内很难实现, 而采用细胞工程方法将根瘤菌导入非宿主农作物细胞内则切实可行。除此之外, 由于 *Frankia* 菌具有对宿主的侵染范围宽、固氮活性比较强和对氧气不敏感等特性, 在生物固氮研究中对 *Frankia* 菌的研究将更为重要, 有可能由此会找到新的突破口, 在 *Frankia* 菌与农作物之间建立起新的共生固氮体系将具有更大的可能性。随着研究的不断深入, 人类将进一步揭示 *Frankia* 菌共生固氮的奥秘, 阐明其遗传机制。利用生物工程技术和方法构建高效的 *Frankia* 工程菌和构建新的固氮共生体系将成为今后生物固氮研究领域中的发展方向和追求目标。

参考文献:

- [1] Benson D R, Silver W B. Biology of *Frankia* strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants [J]. *Microbiol Rev*, 1993, **57**: 293—319.
- [2] 洪国藩, 宋鸿遇. 固氮之光——共生固氮体系中最佳结瘤固氮控制模型的研究[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1997.
- [3] National Center for Biotechnology Information (NCBI). Nucleotide sequence database (GenBank) [OL]. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/index.html>, 2003-11-28.
- [4] Mullin B C, Dobritsa S V. Molecular analysis of actinorhizal symbiotic systems: progress to date [J]. *Plant and Soil*, 1996, **186**: 9—20.
- [5] Schwintzer C R, Tjepkeman J D. *The Biology of Frankia and Actinorhizal Plants* [M]. New York: Academic Press, 1990.
- [6] Nomand P, Simonet P, Bardin R. Conservation of *nif* sequences in *Frankia* [J]. *Mol Gen Genet*, 1988, **213**: 238—246.
- [7] 崔玉梅, 王焰玲, 秦敏, 等. 弗兰克氏菌固氮基因片段的分离及其比较 [J]. 科学通报, 1990, **35** (18): 1419—1221.
- [8] 何新华, 陈力耕, 胡西琴, 等. 杨梅根瘤内生菌超微结构及其固氮酶结构基因的研究 [J]. 果树学报, 2003, **20** (3): 206—210.
- [9] Lee H, Sung S B, Kim H B, et al. Sequence analysis and expression patterns of two *nif A* genes from EulK1 [J]. *Aust J Plant Physiol*, 2001, **28** (9): 939—949.
- [10] Yoo W Y, Sung S B, An C S. Nucleotide sequences of the 2-oxoacid ferredoxin oxidoreductase and ferredoxin genes from *Frankia* strain EulK1, a symbiont of *Elaeagnus umbellata* root nodules [J]. *Can J Bot*, 1999, **77** (9): 1 279—1 286.
- [11] Hosted T J. Studies on *Frankia* symbiotic genes [D]. Storrs: University of Connecticut, 1992.
- [12] 何新华, 陈力耕, 胡西琴. 杨梅属植物共生结瘤固氮研究进展 [J]. 果树学报, 2002, **19** (5): 351—355.
- [13] Rochefort D A, Benson D R. Molecular cloning, sequencing, and expression of the glutamine synthetase II (*gln II*) gene from the actinomycete root nodule symbiont *Frankia* sp. Strain CpI 1 [J]. *J Bacteriol*, 1990, **172**: 5 335—5 342.
- [14] Simonet P, Nomand P, Hirsch A M, et al. The genetics of the *Frankia*-actinorhizal symbiosis [A]. Gresshoff P M. *The Molecular Biology of Symbiotic Nitrogen Fixation* [C]. Boca Ration: CRC Press 1990. 70—110.
- [15] Dobritsa S, Potter D, Gookin T E, et al. Hopanoid lipids in *Frankia*: identification of squalene-hopene cyclase gene sequences [J]. *Can J Microbiol*, 2001, **47** (6): 535—540.
- [16] Reddy A, Bochenek B, Hirsch. A new *Rhizobium meliloti* symbiotic mutant isolated after introducing *Frankia* DNA sequence into a *nodA*: Tn5 Strain [J]. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1992, **5**: 62—71.
- [17] 崔玉海, 秦敏, 王焰玲, 等. *Frankia* 基因文库的构建及与根瘤菌结瘤基因区同源克隆的筛选 [J]. 遗传学报, 1990, **17** (5): 405—410.
- [18] 柏学亮, 陈丽梅, 邹铎. *Frankia* 菌株 At4 的类 *nodD* 基因的克隆与研究 [J]. 广西农业大学学报, 1993, **12** (2): 45—50.
- [19] Jacobson-Lyon K, Jensen E O, Jørgensen J E, et al. Symbiotic and non-symbiotic haemoglobin genes in *Casuarina glauca* [J]. *Plant Cell*, 1995, **7**: 213—223.
- [20] Andersson C R, Jensen E O, Llewellyn D J, et al. A new hemoglobin gene from soybean: a role for hemoglobin in all plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (12): 5 682—5 687.
- [21] Treviskis B, Watts R A, Andersson C R, et al. Two hemoglobin genes in *Arabidopsis thaliana*: the evolutionary origins of leghemoglobins [J]. *Proc Natl Acad. Sci USA*, 1997, **94** (2): 12 230—12 234.
- [22] Gherbi H, Duhoux E, Franche C, et al. Cloning of a full-length symbiotic hemoglobin cDNA and situ localization of corresponding mRNA in *Casuarina glauca* root nodule [J]. *Physiol Plant*, 1997, **99** (4): 608—616.

- [23] Guan C H, Akkemans A D L, vanKammen A, *et al.* Ag13 is expressed in *Alnus glutinosa* nodules in infected cells during endosymbiont degradation and in the nodule pericycle [J]. *Physiol Plant*, 1997, **99** (4): 601—607.
- [24] Ribeiro A, Akkemans A, van Kammen A, *et al.* A nodule-specific gene encoding a subtilisin-like protease is expressed in early stages of actinorhizal nodule development [J]. *Plant Cell*, 1995, **7**: 785—794.
- [25] Goetting-Minesk M P, Mullin B C. Differential gene expression in an actinorhizal symbiosis: evidence for a nodule-specific cysteine proteinase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**: 9 891—9 895.
- [26] Twig P G. Isolation of a nodule-specific cDNA encoding a putative glycine-rich protein from *Alnus glutinosa* [D]. Knoxville: PhD Dissertation University of Tennessee, 1993.
- [27] Pawlowski K, Twigg P, Dobritsa S, *et al.* A nodule-specific gene family from *Alnus glutinosa* encodes glycine and histidine-rich proteins expressed in the early stages of actinorhizal nodule development [J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 1997, **10**: 656—664.
- [28] Parkash P K, Cummings B. Creation of novel nitrogen-fixing actinomycetes by protoplast fusion of *Frankia* with streptomycetes [J]. *Plant Mol Biol*, 1988, **10**: 281—289.
- [29] 邹铨, 弥铁锈, 张忠伟, 等. *Frankia* 与链霉菌融合子特性的研究 [J]. 微生物学报, 1994, **14** (4): 310—315.
- [30] Diouf D, Gherbi H, Prin Y, *et al.* Hairy root nodulation of *Casuarina glauca-a system* for the study of symbiotic gene-expression in an actinorhizal tree [J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 1995, **8**: 532—537.
- [31] Bogusz D, Franche C, Gherbi H, *et al.* *Casuarinaceae-Frankia* symbiosis: molecular study of the host-plant [J]. *Acta Bot Gallia*, 1996, **143** (7): 621—633.
- [32] Franche C, Diouf D, Le Q V, *et al.* Genetic transformation of the actinorhizal tree *Allocauarina verticillata* by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Plant J*, 1997, **11** (4): 897—904.
- [33] 潘建菁, 陈启锋, 黄世贞. 诱导固氮菌与稻苗结瘤共生的研究 [J]. 福建农林大学学报, 1998, **27** (4): 405—410.

Review of related genes of nitrogen-fixation about nonleguminous woody dicotyledonous plants in symbiosis with actinomycete

HE Xin-hua^{1,2}, CHEN Li-geng¹, CHEN Yi¹

(1. Department of Horticulture, College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, Zhejiang China; 2. Department of Horticulture, College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530004, Guangxi, China)

Abstract: Nitrogen fixation is one of important ecological reactions sustaining productive force on the earth, only second to CO₂ fixation. The non-leguminous woody dicotyledonous plants can fix nitrogen gas in symbiosis with actinomycete *Frankia*, which has very significant effects on soil restoration, fuel wood, production of wood and derivatives, agro-forestry, coastal restoration, and the prevention of desertification. These plants are important nitrogen suppliers among land ecological system. *Frankia* has the characteristics of extensive host ranges, higher nitrogenase activity and insensitive to oxygen, so it is very likely to establish a new symbiotic nitrogen-fixing system between *Frankia* and crops. Highly efficient engineering *Frankia* strains and new symbiotic nitrogen-fixing system obtained by the approaches and technologies of biological engineering will be the most important objectives in the field of biological nitrogen fixation in the future. We will focus on the research progress about *Frankia* genes involved nitrogen metabolism (including *nif* gene organization, *ghn* and *gln* II), genes related to nodulation such as *nod* genes, hemoglobin genes and other nodule-specific cDNA clones in root nodules formed by infection of *Frankia* in the paper. [Ch, 33 ref.]

Key words: botany; biological nitrogen fixation; actinorhizal plants; actinomycete; symbiosis; gene