

大豆快生根瘤菌 *SfHH103_03182* 基因突变体的构建和共生固氮表型分析

杜 思 曾小波 李友国

华中农业大学生命科学技术学院/农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 以大豆快生根瘤菌 HH103 中 *glnK* 同源基因 *SfHH103_03182* 为研究对象, 采用 pK19mob 单插入失活技术构建该基因的插入失活突变体, 菌落 PCR 和测序分析表明突变体构建正确。植物盆栽试验结果显示, 与接种野生型菌株 HH103 相比, 突变体接种植株的根瘤数量增多, 植株鲜质量和根瘤鲜质量增加, 根瘤固氮酶活无显著差异。在不同浓度氮素处理和盆栽条件下, 对共生表型的检测表明突变体接种植物的根瘤数量没有显著变化。

关键词 大豆快生根瘤菌 HH103; P II 蛋白; 插入突变株; 共生固氮; 高氮处理

中图分类号 Q 939.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2019)01-0035-08

氮素是生命活动所必需的元素。空气中有 78% 的成分为氮气。氮气由于本身化学结构非常稳定不易被植物或微生物直接利用^[1]。根瘤菌和豆科植物能够形成特殊的共生结构——根瘤, 进而将空气中的氮气转化为可被吸收利用的铵态氮。*Sinorhizobium fredii* HH103 是一种具有优良广谱的快生型大豆根瘤菌, 已获得全基因组序列^[2], 可以和多种大豆形成有效共生关系。

Shapiro^[3]在研究谷氨酰胺合成酶活性的调节作用时, 纯化得到具有脱腺苷作用的蛋白 P II 蛋白。P II 蛋白是自然界最广泛分布的信号转导蛋白之一, 广泛存在于细菌、古细菌和植物。在大多数细菌中包含至少 2 类 P II 蛋白, 通常为 GlnB 和 GlnK。P II 蛋白通过蛋白-蛋白之间的相互作用来调节各种靶信号蛋白的活性。P II 蛋白在细胞内通常以三聚体结构存在, 细胞内存在的特殊效应因子 ATP、ADP 和 2-酮戊二酸可以影响 P II 蛋白和靶蛋白的结合^[4]。与 P II 蛋白作用的靶蛋白大多数是参与到细胞氮代谢中的膜蛋白、酶和转录因子^[5]。例如, P II 蛋白的尿苷化和去尿苷化可以激活或者抑制谷氨酰胺合成酶腺苷酰基转移酶(ATase, GlnE 编码的蛋白)的活性, 而 ATase 可以通过共价修饰来调

节谷氨酰胺合成酶(GS)的活性, 影响氨基酸的合成^[6]; GlnK 蛋白在氮充足的条件下会被具有尿苷酰转移酶和裂解酶活性的 GlnD 脱尿苷修饰, 从而结合细胞膜上的铵转运通道蛋白 AmtB 来阻断铵的吸收^[7]。

农业生产中化肥的大量施用使得土壤中的无机氮含量过高。土壤中存在的无机氮源对豆科植物和根瘤菌的共生固氮作用产生较大影响。较高浓度的氮抑制根瘤形成。在环境中 NH_4NO_3 浓度达到 10 mmol/L 时, 豆科植物几乎不与根瘤菌形成根瘤^[8]。无机氮负调控结瘤的所有阶段, 包括根瘤菌侵染、根瘤发育和固氮酶活。特别是无机氮的存在对结瘤早期, 如根瘤菌吸附、根毛卷曲、皮层细胞分裂和侵染线的形成均具有一定的抑制作用^[9]。

目前尚未见关于 *S. fredii* HH103 中 P II 蛋白在共生固氮中的功能研究报道, HH103 中 *Sf-HH103_03182* 基因编码的 GlnK 蛋白和 *M. huakuii* 7653R 中 *MCHK-5476* 基因编码的 P II-like 蛋白 Pz 同源性达到 70%。基于 GlnK 在调节氮素水平和参与氮素代谢等方面的功能, 我们分析认为该基因在共生固氮中可能影响铵的转运吸收, 从而影响 HH103 和大豆植物之间的共生固氮表型。本研

收稿日期: 2018-04-12

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0201006); 国家自然科学基金项目(31670243); 华中农业大学科技创新基金项目(2662017PY052, 2662017PY121)

杜 思, 硕士研究生, 研究方向: 生物固氮与菌植互作, E-mail: 623421768@qq.com

通信作者: 李友国, 博士, 教授, 研究方向: 生物固氮与菌植互作, E-mail: youguoli@mail.hzau.edu.cn

究通过构建插入失活突变体,考察 *SfHH103_03182* 缺失后根瘤菌和大豆的共生表型,并在高氮处理条件下,进一步检测突变体的结瘤能力变化,旨在探究 *SfHH103_03182* 基因在大豆快生根瘤菌 HH103 共生固氮中的功能,为解析根瘤菌在共生条件下对环境氮素水平的感知和应答途径提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

天隆 1 号大豆种子、费氏中华根瘤菌 HH103 (*Sinorhizobium fredii* HH103, 以下简称 HH103)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) S17-1、自杀质粒 pK19mob

由华中农业大学微生物学国家重点实验室生物固氮研究室保存;抗生素卡那霉素、氨苄青霉素购于 Duchefa 公司;pMD19-T (simple) 购于 TaKaRa 公司;DNA 回收试剂盒购自上海华舜公司;TaqDNA 聚合酶、*Ex Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、DNA 分子质量标准 marker 均购自东盛科技公司 Taq DNA 聚合酶,限制性内切酶等酶制剂购于 Fermentas 公司;PCR 仪为 Bio-Rad 生产;气相色谱仪 GC4000A 购自北京东西仪器有限公司。

1.2 分子生物学操作和引物

细菌基因组 DNA 抽提、质粒抽提、PCR 扩增、DNA 琼脂糖凝胶电泳、限制性内切酶酶切、TA 克隆、大肠杆菌感受态制备等操作步骤参照文献[10]。

本试验所用引物见表 1。

表 1 供试 PCR 引物

Table 1 PCR primer used in this study

引物 ID of primers	引物序列 Sequences of primers(5'→3')	酶切位点 Restriction site	作用 Function
03182-F	<u>AAGCTTCGAGGCAGACAAGGATGGGA</u>	<i>Hind</i> III	扩增上游交换臂片段 To amplify the exchange upstream arm fragments by PCR
03182-R	<u>CCCGGGGACGGAACCGCGATCTCGA</u>	<i>Sma</i> I	扩增下游交换臂片段 To amplify the exchange downstream arm fragments by PCR
03182-MAP	TCCTGTTGATGACCGTTCCCG		检测突变体 To detect the mutant
pK19-MAP	CCTGTGTGAAATTGTTATCCGCT		检测突变体 To detect the mutant

1.3 两亲本接合转移

活化受体菌 HH103(第 1 天)和含有重组质粒 pK19mob-*SfHH103_03182* 的供体菌大肠杆菌 S17-1(第 2 天),保证 2 种菌株同时生长到合适浓度。按 1:1 的体积比 6 000 r/min 离心 3 min 分别收集处于合适浓度的菌体,用无抗 TY 液体培养基洗涤菌体 3 次后重悬菌体于 50 μ L 的 TY 液体培养基中,将重悬后的菌液混合点接在无抗 TY 平板上的滤膜中央,正置于 28 $^{\circ}$ C 培养箱中培养,2 d 后将培养好的滤膜取下,置于灭菌后的 PA 瓶中,加入 5 mL 无菌水,用移液器吹打滤膜使滤膜上的菌体脱落于无菌水中,取打散均匀的菌液稀释至不同浓度涂布在 AMS+Kan 抗性平板上。倒置于 28 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 5~7 d,挑取单菌落进行筛选验证。

1.4 pK19mob 单交换失活突变体构建方法

在中慢生根瘤菌中存在多种可行的基因敲除策略^[11-12]。本研究对快生型大豆根瘤菌 HH103 用单交换质粒 pK19mob 可以使目标基因快速失活^[13]。

在 pK19mob 上连接交换臂 DNA 片段,构建单交换载体。利用两亲本结合转移将单交换载体导入到受体菌 HH103 中,由于交换臂序列和细菌基因组目的片段序列相同,使基因组和单交换载体交换臂发生同源重组。发生同源重组后质粒整合至受体菌基因组上,从而使目的基因发生插入突变,同时由于受体菌基因组整合质粒序列后,随基因组复制翻译质粒上的 *Kan* 基因在自身启动子的作用下表达,会使宿主菌具有 Kan 抗性。经抗性平板 AMS+Kan 筛选的菌落由 PCR 扩增和测序验证。同源重组交换发生后, pK19mob 的 MCS 位点上游的验证引物 pK19-MAP 与目的基因在基因组下游的验证引物 03182-MAP 可扩增得到目的产物,但以野生型 HH103 基因组 DNA 为模板不能扩增到产物,说明 pK19mob 质粒已经通过同源重组单交换整合至染色体目的基因中。

突变体构建和筛选的操作步骤为:以 HH103 上的目的基因 DNA 序列作为模板,选取长度小于

目的基因的片段作为交换臂片段,设计扩增引物 03182-F 和 03182-R。以 03182-F 和 03182-R 为引物扩增片段回收测序。经过测序验证交换臂片段符合要求,酶连片段至 pK19mob,构建单交换载体;将单交换载体钙转化至大肠杆菌 S17-1 中。PCR 扩增验证转化结果。以 HH103 作为受体菌,含有单交换载体的 S17-1 为供体菌,通过两亲本接合转移技术向受体菌 HH103 中导入单交换载体。等待涂布混合菌液的筛选平板 AMS+Kan 上生长出单菌落,挑取菌落,以 pk19-MAP 和 03182-MAP 为突变体验证引物,通过菌落 PCR 扩增和测序检测突变体的可靠性。

1.5 大豆盆栽试验

在密封良好的玻璃干燥器中,用烧杯装 200 mL 次氯酸钠,向次氯酸钠中加入 8.4 mL 浓盐酸,两试剂混合后产生氯气,快速盖紧玻璃干燥器盖子,将大豆种子放置其中灭菌 6 h。之后取出种子,放置于超净工作台吹 40 min,用无菌水浸泡种子 1 h。

盆栽试验采用双层钵沙培方式。多次清洗沙子除去可能含有的有机营养,装瓶后于 121 °C 灭菌 1 h。每钵种 2 粒大豆种子保证发芽。在大豆发芽后长出第 1 片真叶时接菌。用 Fahraeus 无氮营养液浇灌植株。进行高氮胁迫培养时,向营养液中加入 NH_4NO_3 至终浓度分别为 0、5、10、20 mmol/L。光照室温度 30 °C,光照 16 h/黑暗 8 h。

1.6 固氮酶活测定

1) 制备乙烯标准曲线。向测样玻璃瓶中注入 5、10、15、20、25、30 μL 乙烯标准气体。按要求设置气相色谱仪,用微量进样器抽取 100 μL 气体注入气相色谱进样室,记录乙烯峰面积,制作标准曲线。

2) 固氮酶活测定。取生长 28 d 的新鲜根瘤放入测样玻璃瓶中,密封玻璃瓶。用注射器抽出 2 mL 气体后,再注入 2 mL 乙炔气体作为反应底物。置于 28 °C 反应 2 h。反应完成后,用微量进样器取出测样瓶中反应后的气体 100 μL 进样,记录乙烯峰面积,根据标准曲线计算乙烯体积并计算固氮酶活^[14]。

2 结果与分析

2.1 *glnK* 基因序列及编码蛋白结构域分析

大豆快生根瘤菌 HH103 的 *glnK* (*SfHH103_03182*) 基因全长 414 bp,编码 137 个氨基酸。同时,在上游发现与其连锁的基因 *amtB* (*SfHH103_03181*),*amtB* 编码铵转运蛋白。在原核生物中,

glnK 和 *amtB* 的遗传连锁是非常保守的,这也说明了 GlnK-AmtB 复合物作用的重要性。Sant 等^[15]通过对 P II 蛋白进行详细的系统发育分析,认为 *glnK* 和 *amtB* 之间的连锁可能代表了 P II 蛋白的起源。

对 *SfHH103_03182* 基因的氨基酸序列分析发现:该基因编码的第 26~137 个氨基酸包含一个功能结构域 COG0347 (图 1),属于 P II 超家族。COG0347 结构域与信号转导、氨基酸转运代谢等相关,具有该结构域的蛋白可以调节谷氨酰胺合成酶活性。因此,在 *S. fredii* HH103 中 *SfHH103_03182* 可能通过调控根瘤菌的氨基酸同化吸收而影响 HH103 与豆科植物的共生作用。

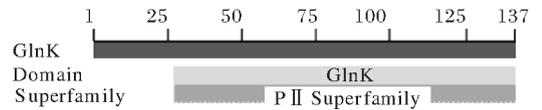


图 1 *SfHH103_03182* 编码蛋白保守结构域分析

Fig.1 Analysis of conserved domains of *SfHH103_03182*

将 *SfHH103_03182* 编码蛋白的氨基酸序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 同源性比对,将搜索获得的同源蛋白构建系统发育树(图 2)。结果显示,GlnK 蛋白广泛分布于细菌的各个种属。与 *Sinorhizobium fredii* NGR234 编码的 ACP26885.1 蛋白(注释为 nitrogen regulatory protein P II)序列相似性最高,达到 82%;与 *Sinorhizobium meliloti* 1021 编码的 NP_387295.1 蛋白(注释为 nitrogen regulatory protein P II)相似性达到 78%;与 *Mesorhizobium loti* MAFF303099 编码的 BAB50949.1 蛋白(注释为 nitrogen regulatory protein P II; GlnK)和 *Mesorhizobium huakuii* 7653R 编码的 AID33269.1 蛋白(注释为 P II-like protein Pz)相似性达到 70%。除共生固氮菌外,与大肠杆菌(*Escherichia coli*)编码的 WP_087905121.1(注释为 nitrogen regulatory protein P II)蛋白相似性为 69%;与联合固氮菌 *Pseudomonas stutzeri* A150 编码的 WP_003096476.1 蛋白(注释为 P II family nitrogen regulator)相似性为 64%;与自生固氮菌 *Azotobacter vinelandii* 编码的 WP_012703245.1 蛋白(注释为 P II family nitrogen regulator)相似性达到 64%。从系统发育树可以看出:*Sinorhizobium fredii* 中 GlnK 蛋白非常保守,形成一个相对独立的发育分支。自生固氮菌和联合固氮菌各自形成一个单独的系统发育分支,且与共生固氮菌的亲缘关系较远,可能与其存在功能

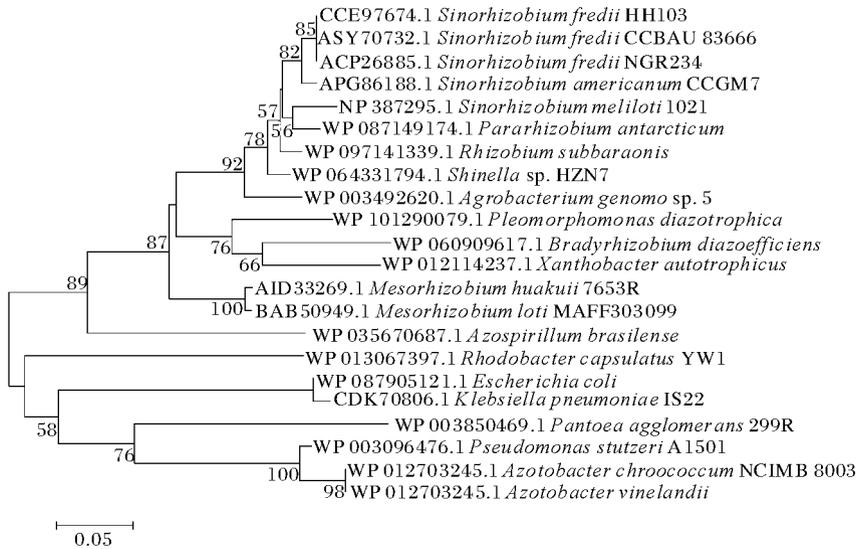


图 2 GlnK 蛋白系统发育分析

Fig.2 Phylogenetic analysis of the GlnK protein

上的差异。

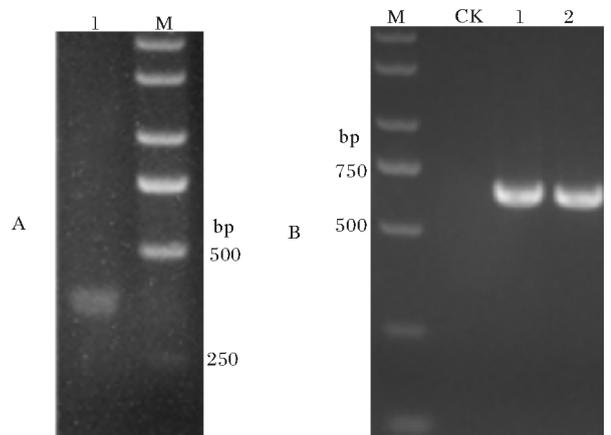
2.2 *SfHH103_03182* 插入失活突变体的构建与鉴定

以 HH103 基因组 DNA 为模板,以 03182-F 和 03182-R 为引物,扩增目的基因 *SfHH103_03182* 同源交换臂,片段大小为 225 bp。克隆交换臂片段至 TA 克隆载体 pMD-19T,测序获得正确 TA 克隆后,抽提质粒。回收经 *Hind* III 和 *Sma* I 双酶切的目的片段,酶连片段至经相同双酶切的 pK19mob,转化 *E. coli* S17-1。以 M13 通用引物 PCR 验证转化结果,得到符合预期大小 375 bp 的片段(图 3A)。

以含有同源重组质粒 pK19mob-*SfHH103_03182* 的 *E. coli* S17-1 为供体菌,野生型 *Sinorhizobium fredii* HH103 为受体菌做两亲本接合转移,将同源重组质粒 pK19mob-*SfHH103_03182* 导入至 HH103。同源重组质粒上的交换臂片段与 HH103 基因组中 *SfHH103_03182* 基因发生同源重组,质粒整合至 HH103 染色体上,随着细菌基因组的复制,质粒上 Kan 基因在自身启动子的作用下表达,使突变体菌株产生 Kan 抗性,使用含 Kan 抗性的选择性平板 AMS 筛选根瘤菌突变体。

将筛选平板 AMS+Kan 上生长的菌落转接划线至 TY+Kan 平板。通过菌落 PCR 方法,以 pK19mob 质粒序列上的验证引物 pK19-MAP 和相应根瘤菌基因组序列上的验证引物 03182-MAP 进行 PCR 扩增验证,同时以野生型 HH103 菌液作为

对照模板。验证引物 pK19-MAP 和 03182-MAP 扩增突变体预期目的条带大小为 644 bp,扩增出的片段大小符合预期且野生型 HH103 对照组无条带(图 3B)。扩增该条带进行测序分析,比对分析结果发现该片段在同时具有原基因组序列和质粒序列,质粒片段插入目的基因 ORF 的 276 bp 处,表明 *SfHH103_03182* 基因突变体构建正确。



M: DNA marker; 1: pK19mob-*SfHH103_03182*; 1-2: *SfHH103_03182* mutant; CK: HH103.

图 3 同源交换质粒 pK19mob-*SfHH103_03182* 构建(A)与 *SfHH103_03182* 基因突变体 PCR 验证(B)

Fig.3 Construction of plasmid of pK19mob-*SfHH103_03182* (A) and PCR identification of *SfHH103_03182* mutant(B)

2.3 突变体共生表型的检测与分析

以野生型 HH103 为对照菌株,以突变株 *SfHH103_03182* mutant 为实验菌株,以不接菌为空

白对照,以天隆 1 号大豆品种为接种对象进行植物盆栽试验。接种后的植物在 22 °C 光照培养室培养 28 d,然后收集植物样品,测定植物共生表型。由图 4 和表 2 可见,空白对照组的大豆植物长势矮小,叶

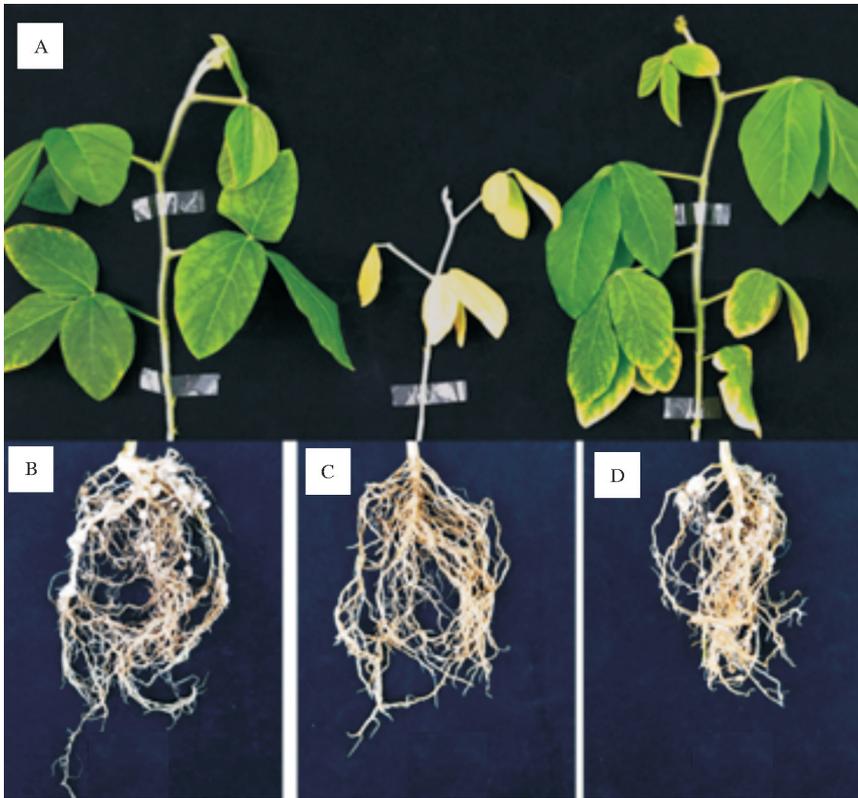
片发黄,无结瘤。接种突变株 *SfHH103_03182* 的植物长势和接种 HH103 相比,根瘤数量和根瘤鲜质量增加,植物地上部分质量和根瘤固氮酶活无明显差异。

表 2 *SfHH103_03182* 突变株共生表型测定结果

Table 2 Symbiosis phenotypes of *SfHH103_03182* mutant tested on Tianlong 1 soybean

菌株 Strain	单株植物鲜质量/g Fresh weight per plant	固氮酶活/($\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{h})$) Nitrogen fixation activity	单株瘤质量/g Fresh weight of nodule per plant	单株瘤数 Number of nodule per plant
HH103	3.66±0.27a	17.31±6.16a	0.472±0.131a	53.60±19.98a
<i>SfHH103_03182</i> mutant	3.90±0.15a	17.08±4.48a	0.610±0.168a	68.40±17.52a
CK	1.60±0.39b	0	0	0

注:表中数据为 3 个重复的平均值,每列数据包含相同字母表示无显著差异($P<0.05$)。Note: The data is average of three replicates. Data in each column followed by the same letter indicates no significant differences ($P<0.05$).



A. 接种 HH103、不接种和接种 *SfHH103_03182* mutant 植株地上部分表型; B. 接种 HH103 植物的结瘤表型; C. 不接种的植株不结瘤; D. 接种 *SfHH103_03182* mutant 植株的结瘤表型。A. Symbiosis phenotypes of aerial part inoculated with HH103 and *SfHH103_03182* mutant; B. Nodulation phenotype of underground part inoculated with HH103; C. No nodulation phenotypes of underground part without inoculation; D. Nodulation phenotypes of underground part inoculated with *SfHH103_03182* mutant.

图 4 *SfHH103_03182* 突变株与大豆天隆 1 号的共生表型

Fig.4 Symbiosis phenotypes of *SfHH103_03182* mutant tested on Tianlong 1 soybean

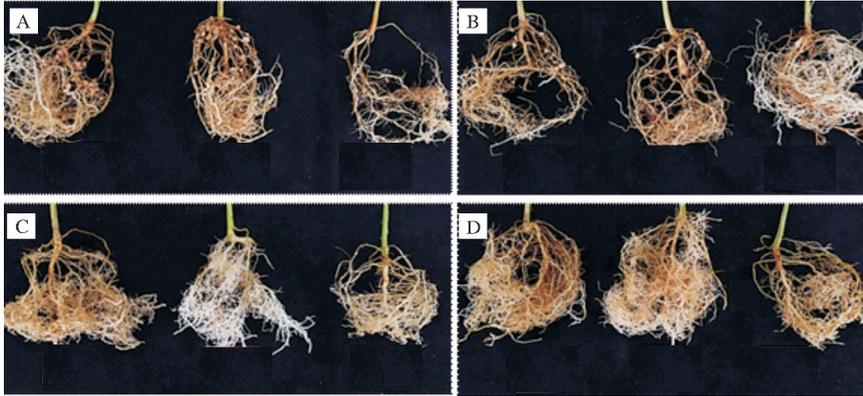
2.4 不同浓度氮素处理下的共生表型检测分析

设计不同的 NH_4NO_3 浓度(0、5、10、20 mmol/L)处理进行盆栽试验,接种 HH103 和突变体 *SfHH103_03182* mut。接种后的大豆植株在 22 °C 光照

培养室培养 28 d 后收集植物样品,统计结瘤数量,从而检测接种突变体的大豆是否在高氮情况下解除氮对结瘤的抑制作用。由图 5 和图 6 所示,对比结瘤数量发现,在 20 mmol/L 处理的大豆完全不结

瘤,在 10 mmol/L 处理下接种野生型和突变体 *SfHH103_03182 mutant* 的大豆均表现出少量的结瘤

能力,但是突变体和野生型的结瘤数量并没有显著差异。



A. 0 mmol/L NH_4NO_3 ; B. 5 mmol/L NH_4NO_3 ; C. 10 mmol/L NH_4NO_3 ; D. 20 mmol/L NH_4NO_3 . 每个处理从左至右依次是接种 HH103、接种 *SfHH103_03182 mutant* 和不接种(对照)植株; Treatments from left to right are inoculated with HH103, *SfHH103_03182 mutant* and without inoculation.

图 5 不同浓度 NH_4NO_3 处理下 *SfHH103_03182* 突变株与野生型天隆 1 号的结瘤表型

Fig.5 Nodulation phenotype of *SfHH103_03182 mutant* tested on Tianlong 1 at the different concentration of NH_4NO_3

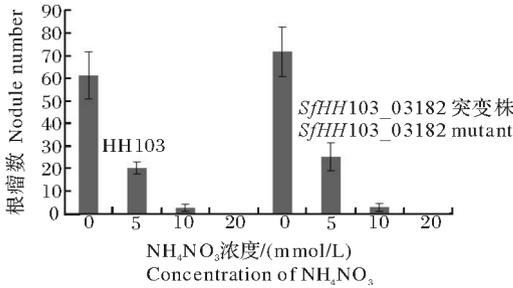


图 6 在不同 NH_4NO_3 浓度处理下 *SfHH103_03182* 突变株与大豆天隆 1 号共生时的结瘤数量测定

Fig.6 Nodule number of *SfHH103_03182 mutant* tested on Tianlong 1 at the different concentration of NH_4NO_3

3 讨论

土壤中氮的缺失是根瘤菌和大豆互利共生形成根瘤的前提,土壤中氮和硝酸盐的浓度过高可能会造成根瘤无法正常形成^[16]。P II 蛋白在研究谷氨酰胺合成酶的活性中被发现,是受氮传感蛋白 GlnD 共价修饰的三聚体蛋白,ATP 和 2-酮戊二酸也可以修饰 P II 蛋白从而控制 P II 蛋白和靶蛋白的作用,脱尿苷的 P II 蛋白会激活组氨酸激酶 NtrB 活性磷酸化 NtrC 蛋白使其控制氮素调控基因的表达^[17]。自 GlnK 蛋白被发现以来,有大量研究围绕大肠杆菌、古细菌、自生固氮菌以及联合固氮菌等细菌中的 glnK/glnB 的功能进行研究。在大肠杆菌中,GlnK 蛋白在缺氮情况下会调控 *Ntr* 基因的表达,对于细菌在缺氮条件下的生长至关重要;在缺氮情况下对

大肠杆菌补氮后细菌能够快速恢复生长也能起到一定作用^[18]。通过对大肠杆菌中氮同化的动态调节研究发现在氮富集的情况下 GlnK 受到严格的调控,在氮缺乏的情况下被表达,表明在大肠杆菌中 GlnK 可能在氮浓度发生急剧变化时作为缓冲,还可能在碳氮代谢联系中起作用^[19]。*Haloferax mediterranei* 中 GlnK 蛋白会在高氮情况下阻断氨转运蛋白的作用^[20]。He 等^[21]在 *Pseudomonas stutzeri* A1501 中使 *glnK* 基因失活,发现在 *glnK* 突变体中 *nifA* 基因的转录被关闭,从而影响了突变体的固氮酶活。在共生固氮菌中关于 GlnK 蛋白的作用报道比较少,在 *Sinorhizobium meliloti* 1021 中发现 *glnK* 突变后,根瘤菌依旧可以和植物形成有效共生固氮关系^[22]。

本研究通过对 GlnK 蛋白进行系统发育分析,发现 GlnK 广泛存在于各个菌属,其中自生固氮菌和联合固氮菌各自分别形成一个单独的系统发育分支。在 *Sinorhizobium* 中 GlnK 蛋白序列保守,推测其功能也较相似。在 *Mesorhizobium huakuii* 7653R 中 *MCHK_5476* 基因编码 P II-like 蛋白 Pz,根据转录组数据分析发现该基因在类菌体中显著上调表达^[23],但 *Sinorhizobium meliloti*^[24]和 *Rhizobium leguminosarum*^[25]在共生条件下,P II 基因均下调表达。推测在不同根瘤菌中 GlnK 的共生固氮功能可能不同。

本研究通过单交换同源重组的方法构建了大豆

根瘤菌 *SfHH103_03182* 突变株, 通过 PCR 扩增和测序验证了突变体的可靠性。通过盆栽试验发现 *SfHH103_03182* 缺失后根瘤数量和根瘤鲜质量上升, 地上部分植物和固氮酶活无明显差异。说明 *SfHH103_03182* 没有参与大豆根瘤菌 HH103 和大豆天隆 1 号共生作用中固氮酶相关代谢过程, 但影响根瘤的形成和数量, 与 *Sinorhizobium meliloti* 1021 中突变 *glnK* 后的共生表型结果类似。通过高氮处理接种大豆根瘤菌 HH103 和突变体的大豆植株, 对突变体在大豆上的结瘤能力观察发现, 随着 NH_4NO_3 浓度升高, 大豆结瘤数目减少, 但 *glnK* 基因突变后不会解除高浓度氮素对大豆的结瘤抑制作用。推测, 由于 GlnK 和 GlnB 在氮素调节中共同被 GlnD 修饰调控, 缺失单独 *glnK* 后可能存在功能弥补作用。

参 考 文 献

- [1] YURGEL S N, RICE J, KAHN M L. Transcriptome analysis of the role of GlnD/GlnBK in nitrogen stress adaptation by *Sinorhizobium meliloti* Rm1021 [J]. PLoS One, 2013, 8 (3): e58028.
- [2] WEIDNER S, BECKER A, BONILLA I, et al. Genome sequence of the soybean symbiont *Sinorhizobium fredii* HH103 [J]. J Bacteriol, 2012, 194(6): 1617-1618.
- [3] SHAPIRO B M. The glutamine synthetase deadenylylating enzyme system from *Escherichia coli* resolution into two components, specific nucleotide stimulation, and cofactor requirements [J]. Biochemistry, 1969, 8(2): 659-670.
- [4] TRUAN D, BJELIC S, LI X D, et al. Structure and thermodynamics of effector molecule binding to the nitrogen signal transduction P II protein GlnZ from *Azospirillum brasilense* [J]. J Mol Biol, 2014, 426(15): 2783-2799.
- [5] HUERGO L F, CHANDRA G, MERRICK M. P (II) signal transduction proteins: nitrogen regulation and beyond [J]. FEMS Microbiol Rev, 2013, 37(2): 251-283.
- [6] JIANG P, MAYO A E, NINFA A J. *Escherichia coli* glutamine synthetase adenylyltransferase (ATase, EC 2.7.7.49): kinetic characterization of regulation by P II, P II-UMP, glutamine, and alpha-ketoglutarate [J]. Biochemistry, 2007, 46(13): 4133-4146.
- [7] JAVELLE A, SEVERI E, THORNTON J, et al. Ammonium sensing in *Escherichia coli* role of the ammonium transporter AmtB and AmtB-GlnK complex formation [J]. J Biol Chem, 2004, 279(10): 8530-8538.
- [8] 刘莉, 周俊初, 陈华癸. 不同化合态氮浓度对大豆根瘤菌结瘤和固氮作用的影响 [J]. 中国农业科学, 1998, 31(1): 87-89.
- [9] LIM C W, LEE Y W, LEE S C, et al. Nitrate inhibits soybean nodulation by regulating expression of CLE genes [J]. Plant Sci, 2014, 229: 1-9.
- [10] 萨姆布鲁克 J, 塞尔 D W. 分子克隆实验指南 [M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [11] 谭茜, 王龙祥, 张先鹏, 等. CRISPR/Cas9 在豆科植物毛根转化中的应用及共生基因的编辑 [J]. 华中农业大学学报, 2017, 36(5): 45-51.
- [12] 周向珍, 朱辉. 百脉根根瘤菌 MAFF303099 Tn5 转座子插入突变体库的构建及筛选 [J]. 华中农业大学学报, 2018, 37(2): 16-22.
- [13] SCHÄFER A, TAUCH A, GER W J, et al. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum* [J]. Gene, 1994, 145(1): 69-73.
- [14] 杨倩倩, 刘元, 陈大松, 等. 藜苜蓿中 1 个聚半乳糖醛酸酶基因突变体的筛选及共生固氮表型的初步鉴定 [J]. 华中农业大学学报, 2017, 36(4): 62-70.
- [15] SANT'ANNA F H, TRENTINI D B B, SHANA-DE-SOUTO W, et al. The PII superfamily revised: a novel group and evolutionary insights [J]. Journal of molecular evolution, 2009, 68(4): 322-336.
- [16] D'APUZZO E, VALKOV V T, PARLATI A, et al. PII overexpression in *Lotus japonicus* affects nodule activity in permissive low-nitrogen conditions and increases nodule numbers in high nitrogen treated plants [J]. Mol Plant Microbe Interact, 2015, 28(4): 432-442.
- [17] DIXON R, KAHN D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation [J]. Nat Rev Microbiol, 2004, 2(8): 621-631.
- [18] BLAUWKAMP T A, NINFA A J. Physiological role of the GlnK signal transduction protein of *Escherichia coli*: survival of nitrogen starvation [J]. Mol Microbiol, 2002, 46(1): 203-214.
- [19] GOSZTOLAI A, SCHUMACHER J, BEHREND S V, et al. GlnK facilitates the dynamic regulation of bacterial nitrogen assimilation [J]. Biophys J, 2017, 112(10): 2219-2230.
- [20] PEDRO-ROIG L, CAMACHO M, BONETE M J. Regulation of ammonium assimilation in *Haloferax mediterranei*: interaction between glutamine synthetase and two GlnK proteins [J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1834: 16-23.
- [21] HE S, CHEN M, XIE Z, et al. Involvement of GlnK, a P II protein, in control of nitrogen fixation and ammonia assimilation in *Pseudomonas stutzeri* A1501 [J]. Arch Microbiol, 2008, 190(1): 1-10.
- [22] YURGEL S N, RICE J, MULDER M, et al. GlnB/GlnK P II proteins and regulation of the *Sinorhizobium meliloti* Rm1021 nitrogen stress response and symbiotic function [J]. J Bacteriol, 2010, 192(10): 2473-2481.
- [23] PENG J, HAO B, LIU L, et al. RNA-Seq and microarrays analyses reveal global differential transcriptomes of *Mesorhizobi-*

- um huakuui* 7653R between bacteroids and free-living cells[J]. PLoS One, 2014, 9(4): e93626.
- [24] AMPE F, KISS E, SABOURDY F, et al. Transcriptome analysis of *Sinorhizobium meliloti* during symbiosis[J]. Genome biology, 2003, 4(2): R15.
- [25] ERCOLANO E, MIRABELLA R, MERRICK M, et al. The *Rhizobium leguminosarum* *glnB* gene is down-regulated during symbiosis[J]. Mol Gen Genet, 2001, 264(5): 555-564.

Mutant construction and symbiotic nitrogen fixation phenotype analysis of soybean rhizobia *SfHH* 103_03182

DU Si ZENG Xiaobo LI Youguo

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology/College of Life Science and Technology,
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract The GlnK protein is a P II family protein existing widely in bacteria, archaea and plants and involved in regulating nitrogen metabolism. The insertion mutant of *glnK* homologue gene *Sf-HH103_03182* in *Sinorhizobium fredii* HH103 was constructed. The results of PCR and sequence analyses confirmed that the mutant was correctly constructed. The results of pot plant experiments showed that the nodule number of the plant inoculated with the mutant, the fresh weight of plants and the fresh weight of root nodules increased compared with inoculated with wild-type strain HH103. There was no significant difference in root nodule nitrogenase activity. The results of symbiotic phenotype tested on host plant soybean at different concentrations of nitrogen levels showed that there was no significant changes in the number of root nodules in the mutant inoculated plants.

Keywords *Sinorhizobium fredii* HH103; P II protein; inserted mutant; symbiotic nitrogen fixation; high nitrogen stress

(责任编辑:张志钰)