

苜蓿中华根瘤菌共生固氮 相关基因突变体的分离和鉴定

张 晴 余海翔 张忠明

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 为了阐明豆科植物共生反应与免疫反应的协调机制, 揭示参与植物细胞侵染、定殖及固氮过程中根瘤菌基因的功能, 以苜蓿中华根瘤菌 Sm2011 为材料, 构建了约 8 000 株 *Tn5-sacB* 转座子插入的突变体库。利用巢式 PCR 检测技术, 从中鉴定和筛选出 *nodC*、*nifH*、*smc01188* 和 *smc04024* 等 4 个特定目标基因的插入突变体及其插入位点。通过结瘤试验考察突变体共生及固氮表型, 结果显示: 植株接种 *smc01188* 突变体 28 d 后, 与对照植株相比, 该基因突变导致根瘤固氮酶活下降, 与慢生型大豆根瘤菌该基因突变体的表型类似; *smc04024* 基因突变不影响植株生长, 根瘤发育基本正常; 接种 *nifH* 突变体后, 植株呈缺氮表型, 生长发育受阻, 根瘤为白色; 接种 *nodC* 突变体后植株不结瘤, 说明 *Tn5-SacB* 的插入导致 *nifH*、*nodC* 基因功能丧失。利用 PCR 检测、鉴定和分离目标基因突变体是一种行之有效的办法。

关键词 苜蓿中华根瘤菌; 共生固氮; *Tn5* 转座子; 插入突变体

中图分类号 Q 939.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2019)01-0043-07

根瘤菌入侵豆科植物并形成根瘤, 根瘤菌在根瘤中分化为类菌体进行固氮作用, 为宿主植物提供氮源(氨), 植物为根瘤菌提供碳源, 这种共生互惠的关系是目前地球上最有效、最经济、最环保的氮素来源, 对现代农业生产具有重要的意义。蒺藜苜蓿作为一种模式豆科植物被广泛用于共生固氮的研究^[1-2], 其共生伙伴苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)的研究也受到广泛重视^[3-4]。蒺藜苜蓿所形成的根瘤属于不定型根瘤, 其分生组织活性持续时间较长, 根瘤菌持续侵入到分生组织, 导致根瘤有明确的分生区、侵染区、固氮区和衰老区, 各区域处于不同的发育阶段^[5]。根瘤菌在侵染区与固氮区开始分化成类菌体并行使固氮功能, 然而类菌体分化的分子机制仍不清楚。目前, 在苜蓿中发现有 700 多种根瘤特异富含半胱氨酸(nodule-specific cysteine-rich, NCR)多肽, 大多在细菌侵染、根瘤发育的不同阶段表达, 这类多肽在体内体外都具有抗菌活性^[6-7]。然而, 根瘤菌遭遇到这些多肽是如何逃逸并存活的还不清楚, 在根瘤菌中发现 BacA 具有保护根瘤菌抵御 NCR 抗菌活性的功能^[8]。为了揭示根

瘤菌在根瘤中侵染、存活、定殖分化及固氮的机制, 需要鉴定出更多参与这些过程的根瘤菌功能基因。*Tn5* 转座突变技术已广泛运用于革兰氏阴性细菌的分子遗传学研究中^[9], 用于构建突变体库与目标基因的筛选。本研究以苜蓿中华根瘤菌 Sm2011 为材料, 构建了约 8 000 株 *Tn5-sacB* 转座子插入的突变体库。利用 PCR 检测技术鉴定和筛选出特定目标基因的插入突变体, 通过结瘤试验进一步观察突变体的共生表型, 旨在为鉴定苜蓿中华根瘤菌突变体提供资源及筛选程序, 为后续深入研究根瘤菌共生固氮调节的分子机制提供基础资料。

1 材料与amp;方法

1.1 植物、菌株和质粒

野生型蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*) R108 种子、苜蓿中华根瘤菌 *Sinorhizobium meliloti* 2011 菌株(简称 Sm2011)、大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α /pRK2073 [pRK2073 为辅助转移质粒, 50 μ g/mL 壮观霉素(Spec)抗性]以及供体菌 *E. coli* S17-1/pMH1701[包含 *Tn5-SacB* 转座子质

收稿日期: 2018-05-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(31670240)

张 晴, 硕士研究生, 研究方向: 根瘤菌分子生物学. E-mail: 549511805@qq.com

通信作者: 张忠明, 教授, 研究方向: 共生固氮. E-mail: zmzhang@mail.hzau.edu.cn

粒, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素 (Kan) 抗性和 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 四环素 (Tc) 抗性] 由笔者所在实验室保藏。

1.2 培养基

TY 培养基: 5.0 g 胰蛋白胨, 1.3 g $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 3.0 g 母粉, ddH_2O 定容至 1 000 mL, pH 值调至 7.0~7.2。

SM 培养基: 10.0 g 露醇, 0.5 g K_2HPO_4 , 0.1 g NaCl , 0.2 g MgSO_4 , 0.1 g $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 4.0 mL Rh 元素液 (5 g H_3BO_3 , 5 g Na_2MnO_4 , ddH_2O 定容至 1 000 mL), 1.0 mL 混合维生素液 (10.0 mg 硫胺素, 10.0 mg 泛酸钙, 10.0 mg 烟酰胺, 1.0 mg 生物素, ddH_2O 定容至 1 000 mL), ddH_2O 定容至 1 000 mL, pH 值调至 6.8~7.0。

植物培养基 FM: 0.10 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.12 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.10 g KH_2PO_4 , 0.15 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 5.0 mg 柠檬酸铁 (Fe-EDTA), 1 mL 微量元素母液 (2.86 g H_3BO_3 , 2.03 g $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.22 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.13 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.08 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, ddH_2O 定容至 1 000 mL), 定容至 1 000 mL, 调节 pH 至 6.5。12 $^\circ\text{C}$ 灭菌 20 min, 固体 FM 培养基加入 12 g/L 琼脂。

1.3 突变体库的构建及检测

利用三亲本杂交技术, 将供体菌 *E. coli* S17-1/pMH1701、受体菌 Sm2011、辅助菌 *E. coli*/pRK2073 分别在相应抗性培养液中培养至对数期 (OD_{600} 约 0.8); 将三者以 2:2:1 (2 mL:2 mL:1 mL) 的比例混合收集后用 TY 液体洗涤数次, 用 50~70 μL 的 TY 液体重悬并转移到 TY 平板的微孔滤膜上, 于 28 $^\circ\text{C}$ 倒置培养 2 d。然后 5 mL 无菌水将菌体从滤膜上洗脱下来并稀释至 10^{-1} , 取 100 μL 涂布于 SM+Kan (70 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 平板, 28 $^\circ\text{C}$ 倒置培养 3~4 d; 在 SM+Kan 平板上进行复筛; 复筛后的菌落分别点板于 SM+Kan、SM+Kan+Tc (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、SM+Kan+ Sac (7% 蔗糖) 的平板上, 进行下一步的筛选; 选取只能在 SM+Kan 平板上生长, 不能在 SM+Kan+Tc 和 SM+Kan+7% 蔗糖的平板上生长的菌落构建突变体库。随机挑选单菌落用引物 Tn5-F (5-TAGTGAAGCCATGCAGGAAG-GCGCTTA-3)/Tn5-R (5-CGATGGGTATAAAT-GTCGATGACGCGCAAG-3) 进行 Tn5-IS50 基因 PCR 扩增验证。

1.4 目标基因突变体的鉴定

在目标基因的上下游 100 bp 左右处各设计

1 条引物 (F/R), 引物退火温度约 60 $^\circ\text{C}$, 并以野生型根瘤菌为模板进行 PCR 扩增验证。在转座子 Tn5-sacB 两侧 100 bp 左右和 50 bp 左右处, 分别设计引物 P (5-GCACGATGAAGAGCAGAAGT-TATCATGAAC-3) 与 P2 (5-GTTAGGAGGTCA-CATGGAAGTCAG-3), 因 Tn5-sacB 首尾呈 180 $^\circ$ 倒置, 两端引物均为 P 与 P2, 记作 P_L 、 P_R (Tn5 左和右) 与 P_{2L} 、 P_{2R} (Tn5 左和右)。巢式 PCR 方法: 第一轮 PCR, 以 P_L/F 、 P_R/R 为引物分别扩增突变体混合库; 第二轮以稀释 200 倍的第一轮 PCR 产物为模板, 用 P_{2L}/F 、 P_{2R}/R 为引物分别进行扩增。若能扩增出与目的基因大小相近的特异条带, 则进行测序验证。用 F/P_L 和 P_R/R 引物扩增对应的 96 孔平板中的菌株逐个筛选, 并在 TY+Kan 平板上培养分离到单菌落, 然后菌落 PCR 以 F/P_L 、 P_R/R 和 F/R 为引物进行扩增进一步验证及测序。

1.5 根瘤菌突变体表型的鉴定

将野生型 R108 蒺藜苜蓿种子用浓 H_2SO_4 10 min、2% NaClO 5 min 灭菌消毒处理后, 4 $^\circ\text{C}$ 无菌水浸没春化 2 d 后转移至 FM 固体培养基中 23 $^\circ\text{C}$ 倒置暗培养 12~16 h, 移栽到灭菌处理的珍珠岩/蛭石 (1:2) 混合基质中, 光照培养 3 d 后接种根瘤菌, 将其用 TY 液体培养至对数期 (OD_{600} 约为 1.0), 用 FM+0.5 mmol/L KNO_3 重悬稀释至 OD_{600} 在 0.02~0.04, 接种 28 d 后, 观察、统计植株的结瘤相关表型。

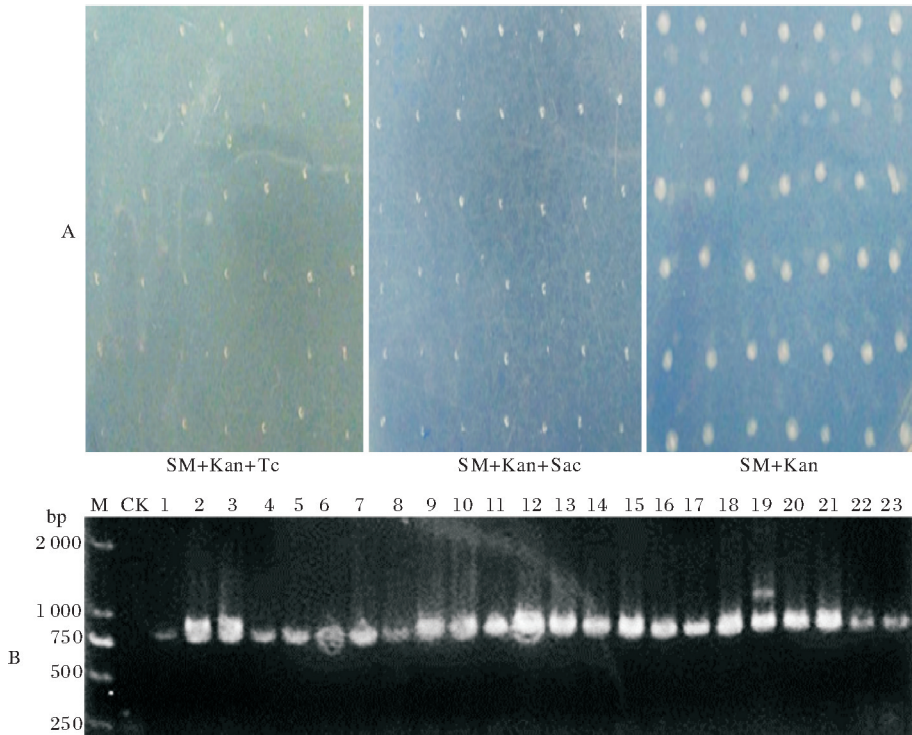
2 结果与分析

2.1 苜蓿中华根瘤菌突变体库的制备及贮存

利用细菌三亲本杂交, 以携带有 Tn5-SacB 转座子质粒 (pMH1701) 的大肠杆菌为供体、在含有协助转移质粒 (pRK2073) 的大肠杆菌辅助下, 将 Tn5-SacB 转座子质粒导入受体菌株苜蓿中华根瘤菌 Sm2011 中。通过在滤膜上杂交 2 d 后制备杂交混合菌悬液, 稀释后分别涂布 SM (基本培养基) 和 SM+Kan 平板, 待长出菌落后统计各个平板菌落数。统计结果表明, Tn5-SacB 转座效率约为 1.84×10^{-6} 。由于质粒 pMH1701 在苜蓿中华根瘤菌中不能复制, 导致 Tn5-SacB 转座子插入到根瘤菌染色体或内源质粒上, 使根瘤菌携带有 Kan 抗性和 SacB 基因。因此, 将杂交后在平板上长出的菌落分别点种到 SM+Kan、SM+Kan+Tc 和 SM+Kan+ Sac (7% 蔗糖) 的平板上观察菌落生长。结果

显示,绝大多数菌落都能在 SM+Kan 平板上生长,而在另外 2 种平板上不能生长(图 1A),说明 *Tn5-SacB* 转座子插入到根瘤菌复制子中。在 *Tn5-IS50* 片段上设计引物,随机挑取 23 个菌落进行 PCR 检测,都能扩增出 810 bp 的条带,表明转座子存在于苜蓿中华根瘤菌中(图 1B)。经过复证,筛选

并分离到约 8 000 个转座子插入克隆,分别接种于 96 孔板中(含 TY+Kan 培养液)并点种于平板培养基上(每皿 96 个克隆并对应于一个 96 孔板),培养后将平板上 96 个菌落制备成混合菌悬液,置于一个保藏管中;分别在 96 孔板和混菌保藏管中加入 50% 甘油,在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 贮藏备用。



A. *Sm2011* 插入突变体抗性筛选,选择培养基依次为 SM+Kan+Tc(排除根瘤菌含 Tc 抗性质粒 pMH1701)、SM+Kan+Sac(含有 *SacB* 基因的根瘤菌对蔗糖敏感)、SM+Kan; B. 菌落 PCR 检测, M:DNA marker; CK:受体菌株 *Sm2011*;泳道 1~23:阳性克隆的 *Tn5-IS50* 扩增片段,大小为 810 bp。A. Selection of drug-resistance mutants, mutants were grown on medium SM+Kan+Tc, SM+Kan+Sac and SM+Kan respectively. B. *Tn5-IS50* (810 bp) by PCR; M:DNA marker; CK: Wild type strain *Sm2011*; Lane 1-23: Random selective drug-resistance colonies.

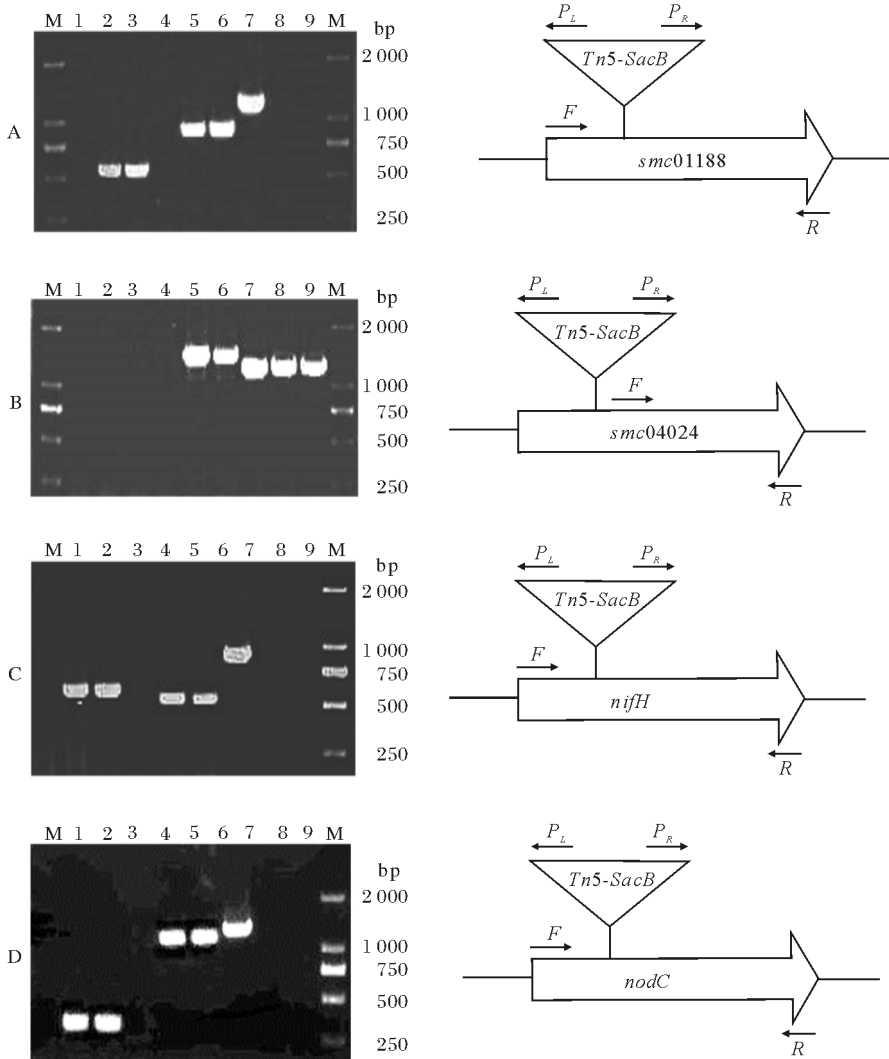
图 1 苜蓿中华根瘤菌抗性筛选及 *Tn5* 转座子的鉴定

Fig.1 Selection of drug-resistance and identification of *Tn5* transposon in mutants of *S. meliloti*

2.2 苜蓿中华根瘤菌特定目标基因突变体筛选及插入位点的鉴定

根据苜蓿中华根瘤菌 *Sm2011* 基因组信息选取特定目标并设计相应的引物,利用巢式 PCR 方法鉴定目标基因突变体。本研究选取的目标基因,其功能分别编码固氮还原酶(*nifH*)、结瘤(*nodC*),调控肽聚糖合成羧肽酶。首先利用 *Tn5* 上的引物 *P*(P_L 、 P_R)和 *P2*(P_{2L} 、 P_{2R})(*Tn5* 左和右边)和基因上引物 *F*和 *R*(正向和反向)进行交叉配对,对 79 个混合菌液进行 PCR 扩增。当 DNA 扩增带出现在某一管中时,再对相应的 96 孔板中的每个

克隆分别进行扩增,鉴定出目标基因插入突变体。大量和多次的 PCR 检测结果显示,在突变体中, *Tn5* 引物基因 P_L 与 *F* 引物则扩增出 549 bp DNA 片段, *Tn5* 引物 P_R 与基因引物 *R* 则扩增出 877 bp DNA 片段,而基因 *F*和 *R* 引物未能扩增出条带;在野生型菌株 *Sm2011* 中,基因引物 *F*和 *R* 能扩增出 1 190 bp 片段,说明 *Tn5-SacB* 插入在 *smc01188* 基因编码区(图 2 A)。同样的方法,鉴定到 *Tn5-SacB* 分别插入在 *smc04024* 基因非翻译区(图 2 B)、*nifH* 基因编码区(图 2 C)和 *nodC* 基因编码区(图 2 D)。



A. 羧肽酶基因突变体(*smc01188*)不同引物对 PCR 扩增片段(左图), 根据不同引物对扩增片段的大小及有无, 鉴定到 *Tn5-SacB* 插入位点(右图); B. 糖基转移酶基因突变体(*smc04024*)不同引物对 PCR 扩增片段; C. 固氮还原酶基因(*nifH*)突变体不同引物对 PCR 扩增片段; D. 共同结瘤基因(*nodC*)突变体不同引物对 PCR 扩增片段。电泳图中泳道 1; Sm2011 菌株基因组为模板, 分别以目标基因 *F* 与 *Tn5-P_L* 引物扩增(见右图引物方位); 2, 3; 分别以突变体 2 个菌落基因组为模板, 以目标基因 *F* 与 *Tn5-P_L* 引物扩增; 4; 以 Sm2011 基因组为模板, 以目标基因 *R* 与 *Tn5-P_R* 引物扩增; 5, 6; 分别以突变体 2 个菌落基因组为模板, 以目标基因 *R* 与 *Tn5-P_R* 引物扩增; 7; 以 Sm2011 基因组为模板, 以目标基因 *F* 与 *R* 引物扩增; 8, 9; 分别以突变体 2 个菌落基因组为模板, 以目标基因 *F* 与 *R* 引物扩增; M; DNA 分子质量标准。A. *smc01188* gene mutant; B. *smc04024* gene mutant; C. *nifH* mutant; D. *nodC* mutant. The target mutant DNA fragments were amplified by different pairs of primers (Left picture) and schematic structure of *Tn5-SacB* insertion site on target gene (Right picture). Two colonies were selected for PCR detection in each mutant. In electrophoresis; Lane 1; Wild type Sm2011 strain was amplified by *F/Tn5-P_L* primers; Lane 2 & 3; Two colonies of each target mutant were amplified by *F/Tn5-P_L* primers; Lane 4; Wild type Sm2011 strain was amplified by *R/Tn5-P_R* primers; Lane 5 & 6; Two colonies of each target mutant were amplified by *R/Tn5-P_R* primers; Lane 7; Wild type Sm2011 strain was amplified by *F/R* primers; Lane 8 & 9; Two colonies of each target mutant were amplified by *F/R* primers; M; DNA marker.

图 2 目标基因突变体插入位点的 PCR 检测

Fig.2 Detection of *Tn5-SacB* insertion site on target genes by PCR

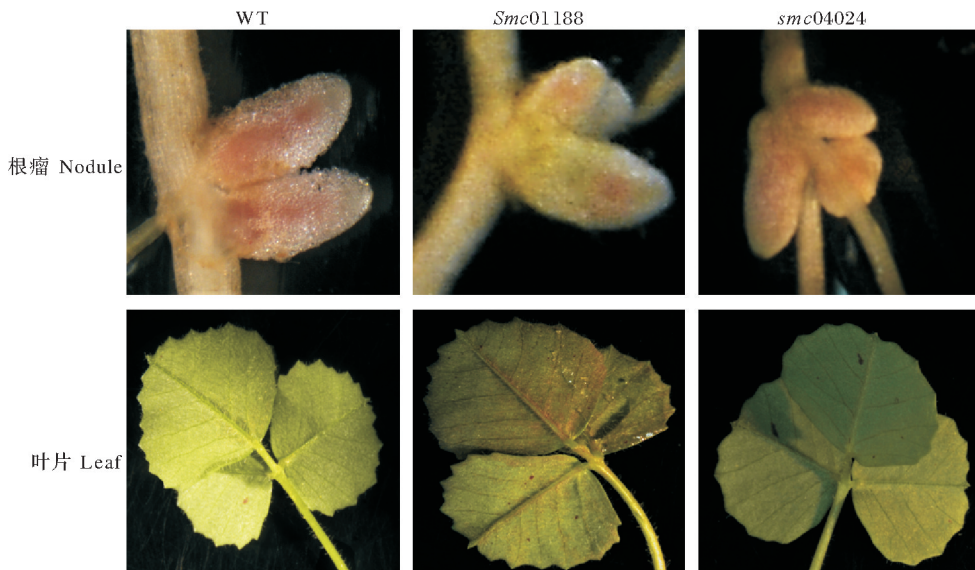
2.3 苜蓿中华根瘤菌肽聚糖合成相关基因突变体的表型

在苜蓿中华根瘤菌基因组存在6个基因编码调控肽聚糖合成的酶,它们分别是羧肽酶基因(*smc00122*、*smc01188*)、糖基转移酶基因(*smc04024*)、细胞分裂因子基因(*smc00716*)、酰胺酶基因(*smc01854*)、水解酶基因(*smc04025*)。通过转座子诱变及插入位点高通量测序发现,*Tn5*插入上述基因中,在NCR247多肽^[10]胁迫下导致其突变体的竞争性降低^[1],暗示这些基因在根瘤固氮过程中可能参与根瘤菌抵御宿主的防御多肽的攻击。为了进一步观察其突变体的共生固氮表型,我们选取*Tn5-SacB*插入突变体*smc01188*、*smc04024*进行结瘤试验。结果显示,接种*smc01188*突变体28d后,与对照植株根瘤相比,突变体根瘤粉红色区域大大缩小、叶片也呈现出部分褐红色。说明该基因突变导致固氮酶活下降,该结果与慢生型大豆根瘤菌该基因突变体表型类似^[11]。*smc04024*突变体结瘤试验结果表明,该基因突变不影响植株生长、根瘤发育基本正常(图4)。原因可能是由于*Tn5-SacB*插入位点在*smc04024*基因上游非编码区(图2B),但

不影响该基因正常表达。

2.4 苜蓿中华根瘤菌 *nifH* 和 *nodC* 基因突变体的表型

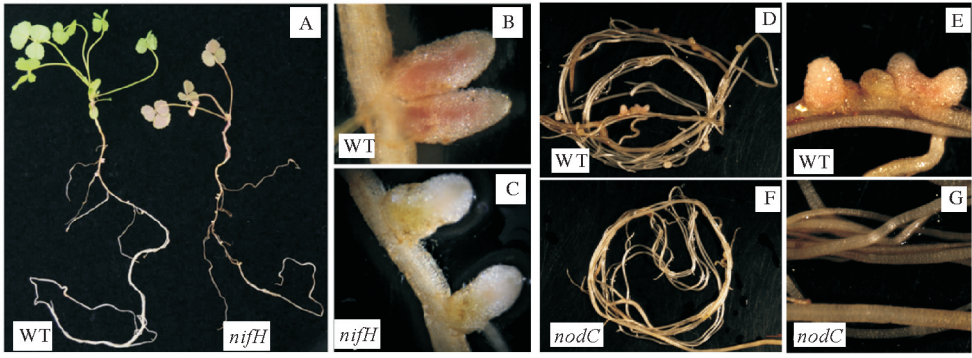
固氮酶结构基因*nifHDK*存在于所有固氮微生物中,且结构和功能都十分保守,其中任何一个基因突变都导致固氮功能丧失。根瘤菌*nifHDK*基因突变则导致宿主植物产生白色根瘤、无固氮活性。根瘤菌中*nodABCD*等结瘤关键基因负责结瘤因子的合成,其突变后将无法在宿主植物上正常结瘤。将筛选到的固氮还原酶基因(*nifH*)和结瘤基因(*nodC*)插入突变体在选择培养基上活化后在无氮培养条件下进行盆栽结瘤试验。接种根瘤菌数天后,观察植株生长状况及根瘤颜色,结果显示:当植株接种野生型根瘤菌Sm2011后,植株生长发育正常、根瘤呈粉红色;而接种鉴定出的*nifH*突变体后,植株呈缺氮表型,生长发育受阻,叶片出现褐红色,根瘤为白色(图3A-C)。与野生型根瘤菌在宿主植物上能够正常结瘤的表型相比较,接种*nodC*突变体后植物上完全没有结瘤(图3D-G)。说明*Tn5-SacB*的插入导致*nifH*、*nodC*基因功能丧失。



WT:表示植株接种野生型菌株 Sm2011;*smc01188*:接种 *smc01188* 突变体菌株;*smc04024*:接种 *smc04024* 突变体菌株。豆血红蛋白使根瘤呈粉红色,表示正常固氮根瘤,粉红色块体小说明固氮活性低下。叶片背面产生褐色说明植株呈现缺氮表型。WT:Inoculation with wild type Sm2011;*smc01188*:Inoculation with *smc01188* mutant;*smc04024*:Inoculation with *smc04024* mutant. The pink nodule with a fill of leghemoglobin has normal nitrogen fixating activity and nodule with less pink has low nitrogen fixating activity. Leaf with brown shows plant grew under nitrogen-starvation.

图3 根瘤菌肽聚糖合成相关基因突变体的表型

Fig.3 Phenotype of peptidoglycan synthesis related gene mutants in *S. meliloti*



A.接种根瘤菌 28 d 后植株生长状况; B.接种野生型菌株 Sm2011 后的根瘤; C.接种 *nifH* 突变体菌株后的根瘤,呈白色无固氮活性; D,F.接种野生型根瘤菌 (D,E) 和 *nodC* 突变体 (F,G) 10 d 后植株的共生表型。A. The growth of plants by 28 dpi with rhizobia. B-C. Nodules of plant inoculation with wild type Sm2011 (B) and *nifH* mutant (C). D-G. Symbiotic phenotype of palnts by 10 dpi with wild type Sm2011 (D,E) and *nodC* mutant (F,G); E; Magnification of root nodules in (D); G; Magnification of root in (F).

图 4 *nifH* 和 *nodC* 基因突变体的表型

Fig.4 Phenotype of *nifH* and *nodC* gene mutants in *S. meliloti*

3 讨 论

Tn5 转座诱变是一种构建突变体的传统方法,广泛用于根瘤菌诱变^[12],但突变体的分离和鉴定都靠植物结瘤试验来完成,耗时费力且需要大量的重复试验。笔者所在实验室已分离到部分共生固氮相关基因突变体^[13-14],但仍然不能满足目前共生固氮研究的需求。在豆科植物中发现了与根瘤菌共生相关的信号途径^[15-16],植物具有识别根瘤菌、调控其入侵和感染、定殖及固氮的功能,在这些过程中根瘤菌的入侵和定殖是如何逃逸植物防御体系的? 已有的研究表明,植物依赖其天然免疫机制防止微生物入侵,防御系统的第一道屏障是通过植物细胞跨膜受体 (PRR) 辨别微生物或病原相关分子模式 (MAMPs/PAMPs) 而激活免疫反应 (PTI), 从而抑制微生物侵染^[17]。然而,根瘤菌也具有微生物相关分子模式,在侵染豆科植物时为何没有激活植物的免疫反应,其中必然涉及根瘤菌相关基因的功能。因此,本研究构建了苜蓿中华根瘤菌 Sm2011 的 *Tn5-sacB* 转座子插入突变体库,建立了快速鉴定和筛选目标基因插入突变体的程序。本研究成功地分离到 *nodC*、*nifH*、*smc01188*、*smc04024* 等基因突变体,可为后续研究根瘤菌共生固氮相关基因的功能提供材料;同时,也可以利用豆科植物突变体大规模筛选根瘤菌抑制宿主共生固氮缺陷突变的功能基因,以便深入研究根瘤菌与豆科植物相互作用的分子机制。

参 考 文 献

- [1] 杨倩倩,刘元,陈大松,等. 蒺藜苜蓿中 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.
- [2] 赵圣博,李友国,赵斌,等. 蒺藜苜蓿中 CDF 家族锌转运体 Mt-MTP3 的鉴定和表达调控分析[J]. 华中农业大学学报, 2018, 37(3): 52-60.
- [3] ARNOLD M F F, SHABAB M, PENTERMAN J, et al. Genome-wide sensitivity analysis of the microsymbiont *Sinorhizobium meliloti* to symbiotically important, defensin-like host peptides[J]. mBio, 2017, 8 (4): e01060. doi: <https://doi.org/10.5061/dryad.32152>.
- [4] 陈琳,余海翔,张忠明. 运用 Gibson 克隆技术构建蒺藜苜蓿成熟根瘤的酵母 AD-cDNA 文库[J]. 华中农业大学学报, 2018, 37(2): 23-27.
- [5] GUINEL F C. Getting around the legume nodule: I. The structure of the peripheral zone in four nodule types[J]. Botany, 2009, 87: 1117-1138.
- [6] MERGAERT P, NIKOVICS K, KELEMEN Z, et al. A novel family in *Medicago truncatula* consisting of more than 300 nodule-specific genes coding for small, secreted polypeptides with conserved cysteine motifs[J]. Plant Physiol, 2003, 132: 161-173.
- [7] VAN-DE-VELDE W, ZEHIROV G, SZATMARI A, et al. Plant peptides govern terminal differentiation of bacteria in symbiosis[J]. Science, 2010, 327: 1122-1126.
- [8] HAAG A F, BALOBAN M, SANI M, et al. Protection of *Sinorhizobium* against host cysteine-rich antimicrobial peptides is critical for symbiosis[J]. PLoS Biol, 2011, 9: e1001169.
- [9] 年洪娟,陈丽梅,李昆志. *Tn5* 转座突变技术在革兰氏阴性细菌分子遗传研究中的应用[J]. 中国生物工程杂志, 2009, 29(12):

- 114-118.
- [10] SHABAB M, ARNOLD M F, PENTERMAN J, et al. Disulfide cross-linking influences symbiotic activities of nodule peptide NCR247[J]. PNAS, 2016, 113: 10157-10162.
- [11] GULLY D, GARGANI D, BONALDI K, et al. A peptidoglycan-remodeling enzyme is critical for bacteroid differentiation in *Bradyrhizobium* spp. during legume symbiosis[J]. Mol Plant Microbe Interact, 2016, 29: 447-457.
- [12] BERINGER J E, BEYNON J L, BUCHANAN-WOLLASTON A V, et al. Transfer of the drug-resistance transposon Tn5 to *Rhizobium*[J]. Nature, 1978, 276: 633-634.
- [13] 李碧璇, 张晴, 朱辉, 等. 百脉根小 GTPase ROPs 基因反转座子插入突变体的分离和鉴定[J]. 华中农业大学学报, 2017, 36(2): 45-52.
- [14] 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.
- [15] 李文清, 曹文刚, 李豪, 等. 百脉根 4 个共生基因在水稻中的共表达及其对水稻转录组的影响[J]. 华中农业大学学报, 2017, 36(4): 55-61.
- [16] 汪涛, 冯勇, 张忠明. 百脉根 SERKs 基因家族在根瘤共生中的功能鉴定[J]. 华中农业大学学报, 2018, 37(2): 9-15.
- [17] ZIPFEL C. Early molecular events in PAMP-triggered immunity[J]. Curr Opin Plant Biol, 2009, 12: 414-420.

Isolation and identification of mutant of symbiotic nitrogen fixation related genes from *Sinorhizobium meliloti*

ZHANG Qing YU Haixiang ZHANG Zhongming

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

Abstract *Sinorhizobium meliloti* strain 2011(Sm2011) was used to construct a random mutant library consisting of approximately 8 000 clones with transposon *Tn5-sacB* insertion mutagenesis technique to clarify the coordination mechanism of symbiosis and immunity in the legume-rhizobium interaction and to reveal the function of rhizobium genes involved in plant cell infection, colonization and nitrogen fixation process in the nodule. We screened insertional mutants of four specific target genes including *nodC*, *nifH*, *smc01188* and *smc04024* from the mutant library and identified its insertion sites with nested PCR. The symbiotic and nitrogen-fixing phenotypes of mutants were examined by nodulation experiments. The result showed that the gene mutation caused a decrease in nitrogenase activity after *smc01188* mutant was inoculated for 28 days compared with the control plant root nodules, which was similar to the phenotype of the slow-growing soybean rhizobium. The *smc04024* gene mutation did not affect the growth of the plant, and the root nodule development was basically normal. The plant had a nitrogen-deficient phenotype with white nodule, blocked growth and development after inoculation of the *nifH* mutant. There was no nodulation on the plants after the inoculation of the *nodC* mutant, indicating that the insertion of *Tn5-SacB* resulted in loss of function of the *nifH* and *nodC* genes. Detection, identification and isolation of target gene mutants with PCR is an effective method.

Keywords *Sinorhizobium meliloti*; symbiotic nitrogen fixation; *Tn5* transposon; inserted mutant

(责任编辑: 张志钰)