

雷思杰, 黄诗宸, 李友国, 等. 类枯草杆菌蛋白酶基因 *GmSBT1* 在大豆共生固氮中的功能[J]. 华中农业大学学报, 2024, 43(4): 133-139.
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2024.04.015

类枯草杆菌蛋白酶基因 *GmSBT1* 在大豆共生固氮中的功能

雷思杰, 黄诗宸, 李友国, 林会

农业微生物资源发掘与利用全国重点实验室/华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070

摘要 为研究 SBT (subtilases) 家族蛋白在豆科植物共生固氮中的作用机制, 分别利用生物信息学分析、时空表达定位、GUS 染色定位和基因沉默等方法来研究 *GmSBT1* 在大豆-根瘤菌共生中的作用。结果显示: *GmSBT1* 受根瘤菌特异性诱导, 在成熟根瘤中大量表达, 且在根瘤皮层以及含菌细胞中发挥功能。GmSBT1-RNAi 植株地上鲜质量、瘤质量、固氮酶活显著降低。结果表明, GmSBT1 蛋白对根瘤的形成和发育以及根瘤的固氮具有重要的作用。

关键词 蛋白酶; 类枯草杆菌蛋白酶; 根瘤菌; 共生固氮; 大豆

中图分类号 S154.39 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2024)04-0133-07

根瘤菌能与豆科植物建立共生关系, 将氮气转化为氨和氨基酸, 以供植物生长, 既节省成本又能提高大豆产量^[1]。研究根瘤菌与豆科植物的共生机制, 有效利用豆科植物与根瘤菌共生固氮, 对农业可持续发展意义重大。

类枯草杆菌蛋白酶 (subtilases, SBT) 是一类丝氨酸蛋白酶, 具有特殊排列的催化三联体天冬氨酸、组氨酸和丝氨酸残基以及夹在 2 层 α -螺旋之间高度扭曲的七链 β -折叠组成的独特结构, 广泛存在于各种植物中。SBT 蛋白具有广泛的生理学功能, 包括从非特异性的降解蛋白功能到特异性的参与多肽类激素的形成; 同时它也参与降解前体蛋白 (proprotein), 形成有活性的成熟蛋白。在植物中, SBT 基因家族是一类大家族, 在植物生命周期的漫长阶段, 从种子萌发^[2]、生长^[3]、发育^[4]到植物对环境变化的许多逆境反应和适应机制, SBT 家族成员都参与其中。

研究表明, 植物 SBT 蛋白也在植物-病原微生物的互作中发挥着重要功能。例如, 番茄半胱氨酸蛋白酶 Rcr3 参与抗性蛋白 Cf-2 对植物病原真菌 (*Cladosporium fulvum*) 分泌的效应因子 Avr2 的识别, 进而引发植物的超敏反应 (HR)。Rcr3 蛋白前体 proRcr3 可由番茄质外体类枯草杆菌蛋白酶 P69B 加

工激活, 从而导致植物中免疫蛋白酶的激活^[2,5]。百脉根中 SBT 家族 *SbtM1* 基因在含有丛枝的细胞中大量表达, 该基因的沉默能抑制丛枝菌根真菌共生结构的发育^[6]。在大豆与根瘤菌的共生过程中, 豆科植物感知根瘤菌产生的结瘤因子后, 根皮层细胞内陷形成预侵染线引导根瘤菌向新的皮层细胞进发^[7], 随后根瘤菌被释放至皮层细胞中分化为类菌体, 植物细胞周膜将类菌体包裹形成共生体, 产生豆血红蛋白开始共生固氮^[8]。在这一共生过程中, SBT 蛋白是否参与尚无定论。

前期在大豆转录组数据中发现 1 个受根瘤菌特异诱导表达的基因 *Glyma05g03760*, 经过序列比对分析后发现此基因表达蛋白为 SBT 家族成员, 命名为 *GmSBT1*。本研究以 *GmSBT1* 为研究对象, 利用生物信息学、时空表达、组织表达定位和基因沉默等方法来研究 *GmSBT1* 蛋白在大豆与大豆根瘤菌共生中的功能, 以期深入研究 SBT 家族蛋白在豆科植物共生固氮中的作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料、菌株、载体和主要试剂

大豆 (*Glycine max*) 种子 William 82, 由河南大学

收稿日期: 2024-01-23

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32271772)

雷思杰, E-mail: 1043500763@qq.com

通信作者: 林会, E-mail: linhui@mail.hzau.edu.cn

生命科学学院王学路教授提供;本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)种子由笔者所在实验室保存。菌株为笔者所在实验室保存的大豆慢生根瘤 *Bradyrhizobium japonicum* USDA110、大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 、农杆菌 GV1301 和农杆菌 K599。质粒载体有 TA 克隆载体 pMD19-T、RNAi 干扰载体 pG2RNAi2、亚细胞定位载体 pUB-GFP-mcherry 和启动子组织表达定位载体 1391Z-GUS。

RNA 抽提试剂 Trizol reagent 购自北京艾德莱生物技术有限公司;限制性内切酶、反转录酶均为 Fermentas 公司产品;Taq DNA 聚合酶、Ex TaqDNA 聚合酶、dNTPs 购自东胜科技公司;核酸电泳 Marker、反转录试剂盒和实时荧光定量 PCR 试剂盒购自诺唯赞公司;氨苄青霉素、卡那霉素、链霉素均为 Duchefa 公司产品。引物(表1)合成和 DNA 测序均由武汉擎科生物技术有限公司完成。

表1 供试PCR引物

Table 1 PCR primer used in this study

引物名称 Primer name	用途 Usage	引物序列 Sequence
GmSBT1qrt-F	实时荧光定量PCR	AGGACTGTGACAAATGTGGG
GmSBT1qrt-R	Real time quantitative PCR	ATACAAAGCTGATCGAGATAGGG
GmSBT1Pro-F	启动子扩增	GAGGCAGAGAAAACACATACAAACA
GmSBT1Pro-R	Promoter amplification	AATCACAATATCAATATATATATATAATAAGGAAA
GmSBT1cds-F	扩增编码区 CDS 序列	ATGTTCAAAGCACACCGAACTAAAGAA
GmSBT1cds-R	CDS amplification	TTATACAAAGCTGATCGAGATAGGGCTCCT
GmSBT1RNAi-F	RNAi 干扰片段扩增	AGGCCATTTTCAGCAACCTCAC
GmSBT1RNAi-R	RNAi interference amplification	CAGTTGTAGCTGGCAAGACGTTT

1.2 *GmSBT1* 基因生物信息学分析

通过在 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库中搜索,获得 *GmSBT1* 基因的基因组、CDS (sequence coding for amino acids) 和蛋白质序列及大豆 SBT 在拟南芥和百脉根中同源蛋白序列,使用 MEGA 软件构建系统进化分析树。通过 NCBI 进行蛋白质保守结构域分析。

1.3 *GmSBT1* 在 Williams 82 大豆中的时空表达特征检测

大豆盆栽试验参照文献[9]进行。分别在接种大豆慢生根瘤菌 *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 后 8、14、21 和 28 d,收取大豆根样和根瘤样品,提取 RNA,反转录为 cDNA 后进行实时荧光定量 PCR,参照文献[10]进行。

1.4 *GmSBT1* 的亚细胞定位试验

将去除终止密码子的 *GmSBT1* 编码区插入亚细胞定位载体 pUB-GFP-mcherry 的 GFP 序列的 N 端。经过测序比对正确后,将载体转化到本氏烟草中,烟草盆栽及瞬时转化参照文献[11]进行。培养 2~3 d 后使用激光共聚焦显微镜观察 *GmSBT1* 的亚细胞定位。

1.5 *GmSBT1* 的启动子共生表达定位

将 *GmSBT1* 起始密码子上游 2 340 bp DNA 序列插入启动子定位载体 1391Z-GUS 的 GUS 序列的 N 端。经过测序比对正确后,将载体转化到大豆

根中。接种大豆慢生根瘤菌 *B. japonicum* USDA110,分别在接种后 9、14、21 和 28 d 收取根瘤与根样,用 GUS 染液染色,在显微镜下观察 *GmSBT1* 表达情况。大豆毛根转化和 GUS 染色参照文献[12]和[13]进行。因所转化载体带有绿色荧光蛋白标签,可直接在荧光下检测转化后的阳性根。

1.6 *GmSBT1* 基因干扰表达盆栽试验

克隆 *GmSBT1* 3'UTR 区 226 bp 片段,分别正向、反向插入 pG2RNAi2 载体中构建干扰表达载体。经过测序比对正确后,将载体转化到大豆根中。接种 *B. japonicum* USDA110 28 d 后,收取植物统计共生固氮表型,检测固氮酶活^[9]。大豆毛根转化方法同本文“1.5”。

2 结果与分析

2.1 *GmSBT1* 基因生物信息学分析

通过在 NCBI 和 phytozom 数据库中搜索 *GmSBT1* 基因的序列,发现 *GmSBT1* 基因无内含子,全长 2 680 bp,编码 771 个氨基酸,预测蛋白分子质量为 8.28 ku,PI 值为 6.48。通过 NCBI 网站对 *GmSBT1* 蛋白结构进行域分析,显示该蛋白含有 S8 肽酶结构域,其特征是催化三联体的天冬氨酸、组氨酸和丝氨酸残基特殊的排列;PA (protease-associated) 结构域可能参与底物结合和(或)促进构象变化,从而影响到位点对底物的稳定性和可及性;AprE 结构域则起到

翻译后修饰、蛋白质周转以及类似分子伴侣的作用。蛋白结构分析结果显示 *GmSBT1* 可能作为某个前体蛋白的加工剂,通过 PA 结构域与底物进行结合,并对其进行修饰。

将 *GmSBT1* 基因与大豆、拟南芥、百脉根中部分

SBT 蛋白基因构建系统进化树(图 1),结果显示,大豆 *SBT* 家族 76 个成员可分为 6 个亚家族。*GmSBT1* 属于亚家族 V 成员,与大豆 Glyma17g133500.1 同源性最高,与百脉根中菌根诱导基因 *LjSbtM1* 处于同一个亚家族中(图 1)。

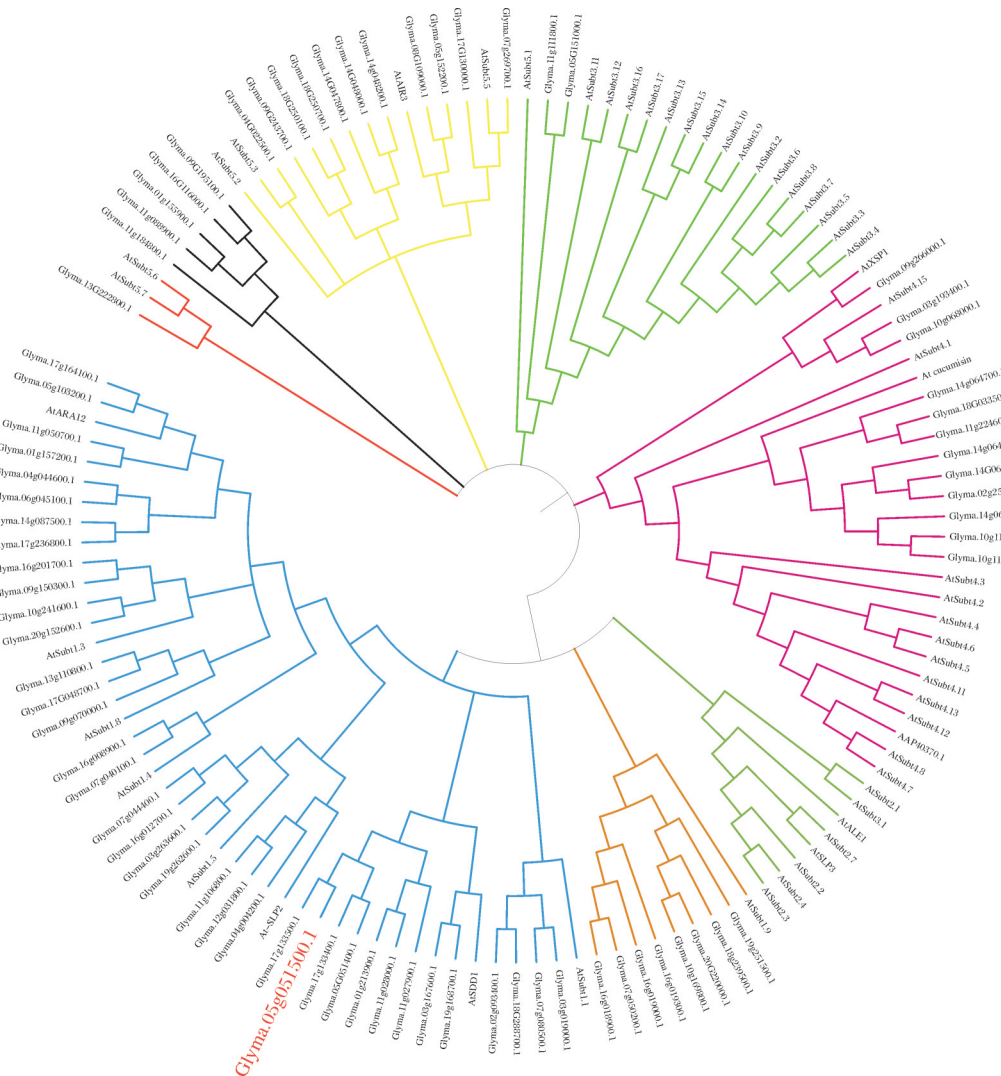


图 1 SBT 家族系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of the SBT family

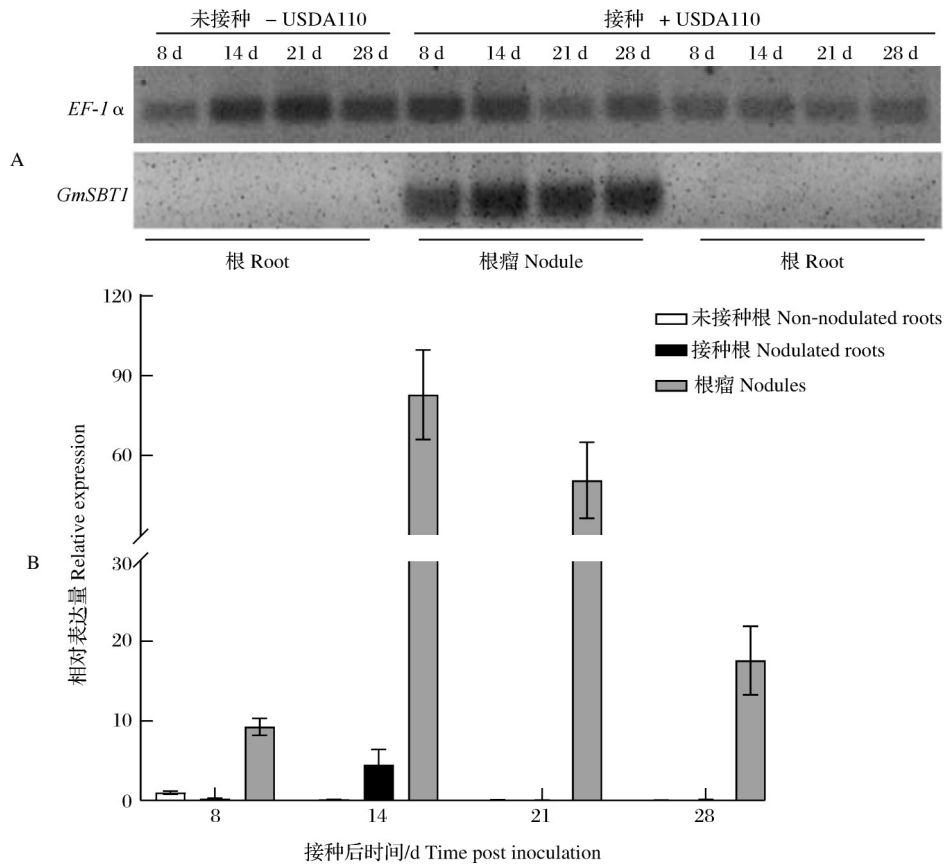
2.2 *GmSBT1* 在大豆 Williams 82 中的时空表达特征

慢生根瘤菌 *B. japonicum* USDA110 接种大豆 Williams 82 后,对不同时间根及根瘤样品进行 *GmSBT1* 基因表达水平检测。结果显示,*GmSBT1* 在不接根瘤菌的根中不表达,仅在接种根瘤菌后 14 d 的根中有表达。*GmSBT1* 在根瘤发育的各个时期表达量均较高,其中在 14~21 d 相对表达量最高(图 2)。上述结果表明,*GmSBT1* 受根瘤菌诱导高量表达,可能参与根瘤的形成和发育。

2.3 *GmSBT1* 的亚细胞定位

将含有 pUB-*GmSBT1*-GFP-mcherry 质粒的发根农杆菌 K599 注射进幼嫩烟草叶片中,共培养 2~3 d 后在激光共聚焦显微镜中观察结果。结果显示,对照组(35S: GFP)在烟草叶片细胞中的细胞核、细胞膜、细胞质中均有表达(图 3A、B、C),而实验组(35S: *GmSBT1*-GFP) *GmSBT1* 定位在细胞膜上(图 3D-F)。

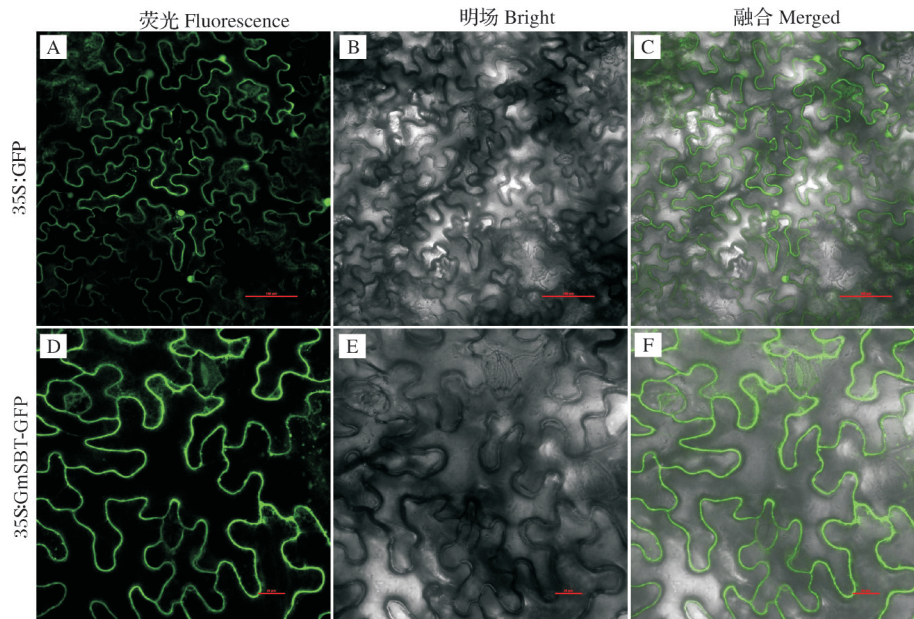
无菌蛭石中接种根瘤菌 *B. japonicum* USDA110 后进行培养,收取接种后 9、14、21、28 d 的根瘤与根



A: *GmSBT1* 半定量 PCR 结果; B: *GmSBT1* 荧光定量 PCR 结果, 数据是 3 个生物学重复的结果。A: *GmSBT1* semi quantitative PCR results; B: *GmSBT1* real-time quantitative PCR results, data are results of three biological replicates.

图 2 *GmSBT1* 在植株根和根瘤中的转录水平

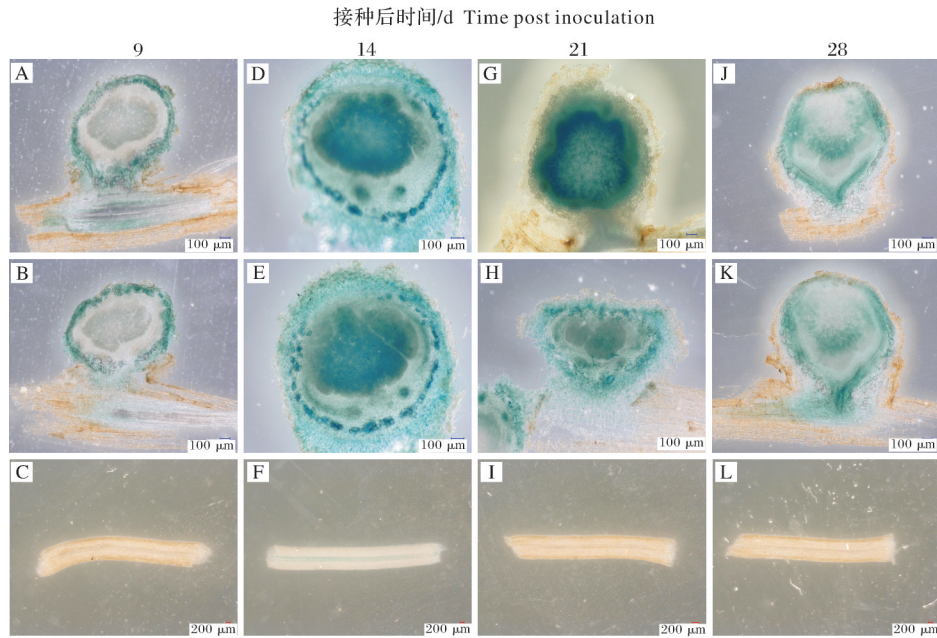
Fig. 2 Transcriptional level of *GmSBT1* in roots and nodules



A-C: 空载体对照; D-F: *GmSBT1* 在本氏烟草叶片中的定位。标尺为 10 μm。A-C: Non-fused 35S-GFP (control); D-F: The localization of *GmSBT1* fused 35S-GFP in *N. benthamiana* leaf cells. Bar=10 μm.

图 3 *GmSBT1* 在烟草叶片中的亚细胞定位

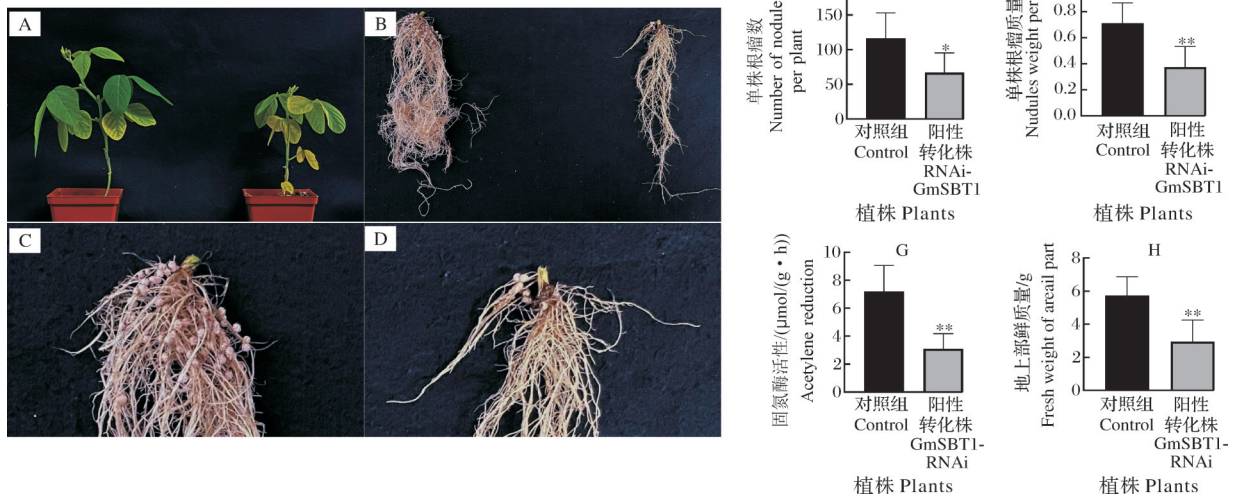
Fig. 3 Subcellular localization of *GmSBT1* in *N. benthamiana* leaf cells



A-C 为接种后 9 d 阳性转化植株观察;D-F 为接种后阳性转化植株观察;G-I 为接种后 21 d 阳性转化植株观察;J-L 为接种后 28 d 阳性转化植株观察。标尺为 100 μm。A-C: Transgenic plants of 9 days post inoculation for GUS staining observation; D-F: Transgenic plants of 14 days post inoculation for GUS staining observation; G-I: Transgenic plants of 21 days post inoculation for GUS staining observation; J-L: Transgenic plants of 28 days post inoculation for GUS staining observation. Bar=100 μm.

图 4 *GmSBT1* 在大豆根瘤中的时空表达定位

Fig. 4 Temporal and spatial expression of *GmSBT1* in nodules



A: 左为对照组地上部分, 右为 *GmSBT1*-RNAi 阳性转化植株地上部分; B: 左为对照组地下部分, 右为 *GmSBT1*-RNAi 阳性转化植株地下部分; C: 对照组地下部分局部图; D: *GmSBT1*-RNAi 阳性转化植株地下部分局部图; E: 根瘤数; F: 根瘤质量; G: 固氮酶活性; H: 地上部鲜质量。数据是 3 个生物学重复的平均值; 采用 *t* 检验检测显著性差异 (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$), 误差线表示平均值 ± 标准差。A: The left side was the aerial part of CK control group, and the right side was the aerial part of *GmSBT1*-RNAi transformed plants; B: The left side is the underground part of CK control group, and the right side is the underground part of *GmSBT1*-RNAi positive transformed plants; C: Partial underground control map of CK group; D: Partial underground control map of *GmSBT1*-RNAi group; E: The number of transgenic nodule; F: Transgenic nodule fresh weight; G: Nitrogenase activity as determined by an acetylene; H: Fresh weight of areail part of transgenic plants. Data are the averages of three biological replicates. The statistical significance was determined using an unpaired two-tailed Student' *t*-test (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$). Error bars represent means ± SD.

图 5 *GmSBT1*-RNAi 和对照组植株表型测定结果

Fig. 5 Symbiotic phenotype of *GmSBT1*-RNAi transgenic plants

样, GUS染色后显微观察 *GmSBT1* 的表达。结果显示 *GmSBT1* 在整个结瘤时期均有表达, 但表达部位、强度有所不同。在结瘤早期(接种后 9 d), *GmSBT1* 在根瘤皮层中表达(图 4A-C); 在接种后 14、21 d 发育成熟根瘤中, *GmSBT1* 在根瘤皮层以及固氮区的含菌细胞中表达, 表达强度最高; 在衰老根瘤中(接种后 28 d), 根瘤皮层以及固氮区的含菌细胞中 *GmSBT1* 的表达减弱。

2.4 *GmSBT1* 基因对根瘤发育的影响

为了验证 *GmSBT1* 在大豆结瘤和固氮中的功能, 构建 *GmSBT1*-RNAi 载体, 对转化植株的结瘤固氮表型进行检测。结果显示, 接种 *B. japonicum* USDA110 后 28 d 的 RNAi 植株地上部分较对照组长势差、叶片发黄、植株矮小(图 5A), 地下部分主根细小、侧根稀疏, 且地下部分整体上更细小(图 5B-D)。统计结果显示, *GmSBT1*-RNAi 植株的地上鲜质量、单株酶活、单株瘤数和平均瘤质量均显著低于试验组(图 5E-H), 表明 *GmSBT1* 在大豆根瘤的形成发育以及根瘤固氮中具有重要功能。

3 讨论

SBT 蛋白是一类在植物发育和信号级联中具有高度特异性功能的丝氨酸蛋白酶, 能以细胞壁为靶点, 通过调节细胞壁的性质和细胞外信号分子的活性来调控植物生长发育^[14], 也能够微生物识别和信号转导级联反应中发挥重要功能。研究表明, SBT 蛋白酶能将无活性的前体蛋白转化为具有生物活性的蛋白肽激素或切割特定的靶点使其失活^[15-16], 这种选择性蛋白酶成为细胞发育以及对环境做出反应的关键调节因子^[17-19]。

Takeda 等^[6] 研究发现, 受丛枝菌根真菌特异性诱导的百脉根基因 *SbtM1* 启动子区定位在感染细胞的细胞膜上, 而 *LjSbtM1* 编码区、信号肽区定位在细胞间隙以及环丛枝膜上, 可能是信号肽引导 *LjSbtM1* 蛋白从细胞膜转移至细胞间隙和环丛枝膜内, 并且 *LjSbtM1* 的沉默会抑制植物细胞内的丛枝菌根真菌的发育, 因此, 推测 *LjSbtM1* 可能裂解植物细胞壁内和细胞壁之间的结构蛋白, 以延长菌丝在细胞间隙中的长度, 并穿透到寄主细胞中。

本研究结果显示, 大豆 *GmSBT1* 基因受根瘤菌特异诱导表达, 在成熟根瘤固氮区的皮层及含菌细胞内大量表达, 亚细胞定位结果显示 *GmSBT1* 蛋白定位在细胞膜上, 结合对 *GmSBT1* 蛋白保守结构域

分析, 推测 *GmSBT1* 蛋白跟随着底物蛋白一起从根瘤皮层细胞膜转移至含菌细胞膜上发挥作用。*GmSBT1*-RNAi 结果显示根瘤的发育及固氮活性被显著抑制, 表明 *GmSBT1* 在大豆与根瘤菌的共生固氮过程中发挥了重要作用, 推测与含菌共生体的形成有关, *GmSBT1* 通过裂解植物细胞壁蛋白, 利于共生互作界面(symbiotic interface)的形成。对于 *GmSBT1* 基因在大豆与根瘤菌共生中发挥功能的分子机制和基因调控机制仍需进一步探究。

参考文献 References

- [1] 曾长立, 刘丽, 田雪婷, 等. 耕作方式与接种根瘤菌对土壤肥力及豌豆产量与品质的影响[J]. 江汉大学学报(自然科学版), 2021, 49(2): 66-75. ZENG C L, LIU L, TIAN X T, et al. Effects of tillage management and rhizobia inoculation on soil fertility, pea yield and quality[J]. Journal of Jiangnan University (natural science edition), 2021, 49(2): 66-75 (in Chinese with English abstract).
- [2] TANAKA H, ONOUCHI H, KONDO M, et al. A subtilisin-like serine protease is required for epidermal surface formation in *Arabidopsis* embryos and juvenile plants[J]. Development, 2001, 128(23): 4681-4689.
- [3] SCHARDON K, HOHL M, GRAFF L, et al. Precursor processing for plant peptide hormone maturation by subtilisin-like serine proteinases[J]. Science, 2016, 354(6319): 1594-1597.
- [4] ENGINEER C B, GHASSEMIAN M, ANDERSON J C, et al. Carbonic anhydrases, EPF2 and a novel protease mediate CO₂ control of stomatal development [J]. Nature, 2014, 513(7517): 246-250.
- [5] VON GROLL U, BERGER D, ALTMANN T. The subtilisin-like serine protease SDD1 mediates cell-to-cell signaling during *Arabidopsis* stomatal development [J]. The plant cell, 2002, 14(7): 1527-1539.
- [6] TAKEDA N, SATO S, ASAMIZU E, et al. Apoplastic plant subtilases support arbuscular mycorrhiza development in *Lotus japonicus* [J]. The plant journal, 2009, 58(5): 766-777.
- [7] OLDROYD G E D, MURRAY J D, POOLE P S, et al. The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis [J]. Annual review of genetics, 2011, 45: 119-144.
- [8] OLDROYD G E D. Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants [J]. Nature reviews microbiology, 2013, 11(4): 252-263.
- [9] 杜思, 曾小波, 李友国. 大豆快生根瘤菌 *SjHH103_03182* 基因突变体的构建和共生固氮表型分析[J]. 华中农业大学学报, 2019, 38(1): 35-42. DU S, ZENG X B, LI Y G. Mutant construction and symbiotic nitrogen fixation phenotype analysis of soybean rhizobia *SjHH 103_03182* [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2019, 38(1): 35-42 (in Chinese with English abstract).

- [10] 萨姆布鲁克J,拉塞尔D W.分子克隆实验指南[M].3版.黄培堂,译.北京:科学出版社,2002. SAMBROOK J, RUSSELL D W. Molecular cloning [M]. 3rd ed. Translated by HUANG P T. Beijing: Science Press, 2002 (in Chinese).
- [11] 孙春莲,王洪洋,田振东.农杆菌介导的pCB302-3载体在本氏烟中瞬时表达条件优化[J].华中农业大学学报,2015,34(3):8-12. SUN C L, WANG H Y, TIAN Z D. Optimizing agroinfiltration-mediated transient expression in *Nicotiana benthamiana* using pCB302-3 vector[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2015, 34(3):8-12 (in Chinese with English abstract).
- [12] 宗晓秋,张东升,黄文坤,等.发根农杆菌诱导大豆毛状根体系的建立[J].华中农业大学学报,2012,31(6):699-703. ZONG X Q, ZHANG D S, HUANG W K, et al. Establishment of soybean hairy root system induced by *Agrobacterium rhizogenes* [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2012, 31(6):699-703 (in Chinese with English abstract).
- [13] CHATTOPADHYAY T, ROY S, MITRA A, et al. Development of a transgenic hairy root system in jute (*Corchorus capsularis* L.) with *gusA* reporter gene through *Agrobacterium rhizogenes* mediated co-transformation [J]. Plant cell reports, 2011, 30(4):485-493.
- [14] CEDZICH A, HUTTENLOCHER F, KUHN B M, et al. The protease-associated domain and C-terminal extension are required for zymogen processing, sorting within the secretory pathway, and activity of tomato subtilase 3 (SISBT3)[J]. Journal of biological chemistry, 2009, 284(21):14068-14078.
- [15] LEIBOWITZ M J, WICKNER R B. A chromosomal gene required for killer plasmid expression, mating, and spore maturation in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. PNAS, 1976, 73(6):2061-2065.
- [16] CHASAN R, ANDERSON K V. The role of easter, an apparent serine protease, in organizing the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo [J]. Cell, 1989, 56(3):391-400.
- [17] NAKAYAMA K. Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins [J]. The biochemical journal, 1997, 327 (Pt 3):625-635.
- [18] IZAGUIRRE G. The proteolytic regulation of virus cell entry by furin and other proprotein convertases [J/OL]. Viruses, 2019, 11(9):837 [2024-01-23]. <https://doi.org/10.3390/v11090837>.
- [19] PATON A W, BEDDOE T, THORPE C M, et al. AB5 subtilase cytotoxin inactivates the endoplasmic reticulum chaperone BiP [J]. Nature, 2006, 443(7111):548-552.

Function of subtilases *GmSBT1* in symbiotic nitrogen fixation of soybean

LEI Sijie, HUANG Shichen, LI Youguo, LIN Hui

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

Abstract Bioinformatics analysis, spatiotemporal expression localization, GUS staining localization and gene silencing were used to study the mechanism of SBT family proteins in the soybean-rhizobia symbiosis to investigate the function of the *GmSBT1* gene in symbiotic nitrogen fixation between rhizobia and host plants. The results showed that the *GmSBT1* gene was specifically induced by rhizobia and only expressed at high levels in the nodules, possibly functioned in the rhizobia cortex and bacterial cells. RNA interference significantly reduced the fresh weight, nodule weight, and nitrogenase activity aboveground. It is indicated that the *GmSBT1* protein plays an important role in the formation and development of nodules, and the nitrogen fixation in nodules as well.

Keywords protease; subtilizes; rhizobium; symbiotic nitrogen fixation; soybean

(责任编辑:张志钰)