

胡珍珍,谢华伦,彭杰丽,等.MCHK_7135基因在华葵中慢生根瘤菌共生固氮中的功能[J].华中农业大学学报,2023,42(2):123-130.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2023.02.016

MCHK_7135基因在华葵中慢生根瘤菌共生固氮中的功能

胡珍珍¹,谢华伦²,彭杰丽¹,李友国¹,陈大松¹

1. 华中农业大学生命科学技术学院,武汉 430070; 2. 湖北省植物保护总站,武汉 430070

摘要 为研究MCHK_7135基因在根瘤菌与宿主植物共生固氮中的功能,用同源重组的方法构建了MCHK_7135基因的突变体及回补菌株,对突变菌株和回补菌株在人工培养条件以及与宿主植物紫云英共生下的各项表型进行了考察,结果显示:与野生型菌株相比,突变菌株对氧胁迫的敏感性增强;接种突变株的紫云英长势矮小,侵染线及根瘤原基数目减少,根瘤数量少,固氮酶活性低,而向突变菌株导入完整MCHK_7135基因后,各项共生表型得到不同程度恢复。研究结果表明,华葵中慢生根瘤菌的过氧化物还原酶基因MCHK_7135基因在根瘤菌与宿主植物共生固氮的过程中具有重要功能。

关键词 根瘤菌;共生固氮;过氧化物还原酶;紫云英;同源双交换;突变体

中图分类号 S182 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2023)02-0123-08

在自然界,根瘤菌在土壤中单独存活称为根瘤菌的自生状态,不具有固氮能力。当根瘤菌侵染豆科植物根系,与豆科植物共生形成根瘤后,根瘤菌在根瘤中分化为类菌体(bacteroid)形式,进而行使固氮功能,这是根瘤菌的共生状态^[1-2]。通过转录组分析来研究根瘤菌在自生、共生状态下的差异表达基因,可以找出与共生结瘤、固氮密切相关的根瘤菌功能基因,这将为深入研究根瘤菌在共生固氮过程中的类菌体分化、代谢、固氮等生理过程提供直接的证据^[3-4]。

在前期工作中,笔者所在的生物固氮课题组以与紫云英共生的华葵中慢生根瘤菌(*Mesorhizobium huakuii*)7653R为研究对象,用RNA-Seq和Microarray技术分别对根瘤菌在自生状态以及共生状态下的样品进行了转录组测序,分析了根瘤菌在自生和共生状态下差异表达基因,获得了若干显著差异表达基因^[3]。其中,MCHK_7135基因在共生过程中显著上调表达,它编码1个由177个氨基酸残基组成的蛋白质,其保守结构域属于抗氧化酶家族的过氧化物还原酶(Prxs)。

为探究该基因在共生固氮中的功能,本研究采

用同源重组双交换的方法构建了华葵中慢生根瘤菌7653R的MCHK_7135基因突变体菌株和回补菌株,考察该菌株接种宿主植物紫云英后的共生固氮表型,以期深入研究该基因在根瘤菌类菌体发育和共生固氮中的功能提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料、菌株和主要试剂

紫云英(*Astragalus sinicus*)种子:信紫1号,河南省信阳市农业科学院提供。菌株:笔者所在实验室保存的野生型华葵中慢生根瘤菌7653R菌株,大肠杆菌*E. coli* DH5 α 。质粒:蔗糖敏感型自杀质粒pJQ200SK(Gm^R),组成型表达载体pBBR1MCS-5(Gm^R)。

限制性内切酶、T₄DNA连接酶购自Fermentas公司和TaRaKa公司,PCR反应相关试剂、琼脂糖凝胶电泳Marker购自东盛生物科技有限公司,PCR产物纯化试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒购自上海华舜(Watson)生物公司,抗生素、培养基相关组分等分子生物学常规药品及试剂均购自中国国药集团。FAA固定液购自武汉谷歌生物科技有限公司。研究

收稿日期:2022-08-12

基金项目:国家自然科学基金面上项目(32271772);国家重点研发计划项目(2019YFA0904704)

胡珍珍,E-mail:huzhenzhen217@qq.com

通信作者:陈大松,E-mail:chendasong@mail.hzau.edu.cn

所用PCR引物由北京天一辉远生物科技有限公司合成,DNA的测序工作由北京华大基因公司和南京金斯瑞生物科技有限公司完成。

1.2 根瘤菌目的基因的突变株、回补菌株的构建

1) 根瘤菌 *MCHK_7135* 基因突变菌株的构建。首先利用重叠延伸 PCR (splicing by overlap extension, SOE-PCR) 的方法构建基因突变所需的置换载体(图 1)。获得含有失活的目的基因的置换载体后,导入野生型菌株,通过同源双交换的方法筛选获得目的基因被置换的突变体菌株。主要步骤:以野生型 *M. huakuii* 7653R 全基因组 gDNA 为模板,分别以引物 A+E、F+B 扩增 *MCHK_7135* 的上、下臂片段,引物 E、F 的 3' 端分别带有 *MCHK_7135* 序列(表 1);以 pMD19-T simple-km 质粒为模板,以引物 C+D 扩增 *Km* 基因片段。扩增出含有末端互补重叠的各段序列,即 *MCHK_7135* 的 *Km* 插入点前半段序列(其后端与 *Km* 基因前端互补),*MCHK_7135* 的 *Km* 插入点后段序列(其前端与 *Km* 基因后端互补),插入 *Km* 序列(其前后端分别与 *MCHK_7135* 前后半段有互补序列)。回收这 3 个片段后,等浓度混合,用 A 和 B 引物进行全长扩增(图 1)。最后,将回收到的全长片段(*MCHK_7135::Km*)进行 TA 克隆,挑选正确的转化子进行测序。

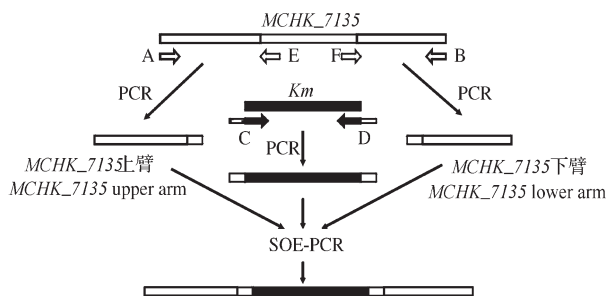


图 1 SOE-PCR 设计方案

Fig. 1 Scheme of SOE-PCR

测序正确的片段构建到含有蔗糖敏感基因 *sacB* 的 pJQ200SK (Gm^R) 载体上,构建成置换载体 pJQ200SK(*MCHK_7135::Km*),再转入大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 。

将含置换载体的大肠杆菌、根瘤菌、辅助菌 *E. coli* pRK2073 进行三亲本杂交,在含 *Km* 的根瘤菌合成培养基 SM 上筛选出获得了置换载体的根瘤菌株 (Km^R),再依次接入含 8%、10%、12% 梯度蔗糖的 TY 液体培养基,经过 8~10 次传代后,菌液涂布于 TY+*Km* 培养基。牙签挑选只在 TY+*Km* 平板上生长而 TY+*Gm* 上不能生长的单菌落。PCR 检测其

表 1 供试 PCR 引物

Table 1 PCR primers used in this study

引物名称 Primer name	序列 Sequence(5'-3')
SOE-B	GCTCTAGACAAAGTCCGAAAATCGCGTC
SOE-C	ACGGAGAAATTTGATGACCCGAAAGC-CACGTTGTGTCT
SOE-D	TTTGAATGACCTCACCGGA-CAGAAAACTCATCGAGCA
SOE-E	AGACACAACGTGGCTTTGCGGTCAT-CAAATTTCTCCGT
SOE-F	TGCTCGATGAGTTTTTCTGTCCGGTGAG-GTCATTCAAA
<i>MCHK_7135</i> -F	GCTCTAGATAACTAGATGAGAGGAG-GAATTTGATGACCCGTC
<i>MCHK_7135</i> -R	GCTCTAGAAGCTTTGCCCTTGTG

染色体上是否只含有插入的 *MCHK_7135::Km* 片段(pJQ200SK(Gm^R)载体已缺失)。符合该要求的单菌落即为双交换突变株 *M. huakuii* 7653R($\Delta 7135$)。

2) 根瘤菌 *MCHK_7135* 回补菌株的构建。先构建含有 *MCHK_7135* 完整 ORF 的回补载体,在引物序列(引物 *MCHK_7135_F* 和 R,表 1)中添加终止密码子和核糖体结合位点,通过 PCR 扩增得到含有核糖体结合位点的完整基因片段,再构建到表达载体 pBBM1MCS-5(Gm^R)中,得到含有回补载体的 *E. coli* DH5 α (pBBM1MCS-5+*7135*)。再进行三亲本结合转移,将重组质粒 pBBM1MCS-5+*MCHK_7135* 导入 *7135* 基因失活的根瘤菌株中(*M. huakuii* 7653R $\Delta 7135$),在 SM+Str+*Km*+*Gm* 抗性平板上生长的单菌落,采用 PCR 验证是否能扩增出回补基因,从而得到回补菌株 *M. huakuii* 7653R $\Delta 7135$ +C (complement)。

1.3 过氧化氢对根瘤菌的胁迫试验

首先将 *M. huakuii* 7653R 的野生型、突变株、回补菌株分别在 TY 液体培养基中培养,检测它们在没有胁迫环境中的生长能力。再分别培养到对数期,离心收集等量菌体,生理盐水清洗后,分别用终浓度为 0、0.1 和 1.0 mmol/L 的 H_2O_2 于 28 $^{\circ}C$ 处理 1 h,用生理盐水洗去 H_2O_2 后,稀释涂布 TY 平板,每种浓度 5 个重复。28 $^{\circ}C$ 培养 3 d,计算菌落数。

1.4 紫云英盆栽试验

紫云英种子用 5% (V/V) NaClO 表面消毒 10 min,无菌水洗 10~15 次后,平铺在 1%~2% 的水

琼脂上, 28 °C 培养 2 d, 使种子发芽。发芽种子栽培于灭菌的沙钵中。在 18~22 °C 光照培养室培养, 浇灭菌的 Fahraeus 无氮营养液, 16 h 光照/8 h 黑暗培养 6 d 后, 接种根瘤菌, 根瘤菌用 TY 液体培养 48 h, 离心后无菌水悬浮, 每钵接种 2 mL。

1.5 GFP 标记根瘤菌株及早期侵染事件观察

为便于观察共生早期的侵染线, 通过两亲本结合转移方法对根瘤菌标记绿色荧光蛋白基因(*gfp*), 分别向 *M. huakuii* 7653R 的野生型、突变体、回补菌株导入含有 *gfp* 基因的质粒 pMP2463(Gm^R), 从而获得 *gfp* 标记的根瘤菌株。

将 *gfp* 标记的野生型、突变株、回补菌株分别接种盆栽紫云英。依次在接菌后 4、8、14 d 收获根系, 在荧光显微镜下(405 nm)观察根瘤菌侵染线、根瘤原基的激发荧光。

1.6 共生固氮效应检测

在洗净灭菌的河沙中播种发芽的紫云英, 浇已灭菌的 Fahraeus 无氮营养液, 7 d 后接种根瘤菌。接种菌后培养 30 d 收获紫云英, 检测共生固氮效应指标, 包括: 植株长势、地上部分鲜质量、每株植株的根瘤数、根瘤质量、固氮酶活性。用乙炔还原法测固氮酶活性。根瘤用石蜡法制作切片、苯胺蓝染色, 在普通光学显微镜下观察根瘤组织结构。

2 结果与分析

2.1 华葵根瘤菌 7653R 的 *MCHK_7135* 基因序列同源性及结构域分析

我们的前期研究显示, *MCHK_7135* 位于华葵根瘤菌 7653R 菌株的 pMHa 共生质粒上(GenBank: WP_038654552)。该基因开放阅读框架(ORF)有 534 bp, 编码 1 个由 177 个氨基酸残基组成的蛋白质(图 2), 预测其分子质量为 19.9 ku。通过 NCBI 网站对 *MCHK_7135* 进行结构域分析(图 3), 结果显示, 其保守结构域与 Prx5 高度同源。Prx(peroxidase)属于抗氧化蛋白家族, 广泛存在于原核和真核生物中。其活性基团是含有 1 个保守半胱氨酸的硫氧还蛋白(thioredoxin)。从氨基酸序列的系统发育树(图 3)可以看出: 华葵根瘤菌 7653R 的 Prx 与同属于中慢生型根瘤菌属的鹰嘴豆根瘤菌(*M. ciceri*)、百脉根根瘤菌(*M. loti*)的 Prx 有较高同源性(95%、86%), 与苜蓿根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)、大豆根瘤菌(*S. fredii*)有一定程度的同源性(80%、76%)。与奈瑟氏菌(*Neisseria meningitidis*)、大肠杆菌(*E. coli*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)等同源性较低(51%、21%、25%)(图 4)。

```

1   ATGACCGGTCAAAGAAGGTTCCCTTCGTACGTTTCTTACGCGTGTTCGGGATGATTCAGTCCAGGGCCCAATCCATACCGCTGGGAA
1   M T G Q K K V P F V T F L T R V R D D S V Q G P N P Y R W E
91  GAAAGAACATCCCACGACTACTTTGCCGCGAAACGGGCCATCCTGTTCTCGCTGCCTGGCGCTTTCACCCCGACCTGTTTCGACCTACCAA
31  E R T S H D Y F A G K R A I L F S L P G A F T P T C S T Y Q
181 CTCCCCAGTTTCGAAGACCTCTACGAGGAATCAAGAAGGAGGAGTTGACGCGATCTACTGCCTCTCCGTCACGATGCCTTTGTGCATG
61  L P S F E D L Y E E F K K E G V D A I Y C L S V N D A F V M
271 AATGCATGGGGGAAGTCTTGGGGCTGCAGAAAGTCGAGCTGATCCCGGACGGTTTCAGCGGAGTTCAGTCCGAAATGGGCATGCTTGT
91  N A W G K S L G L Q K V E L I P D G S G E F T R K M G M L V
361 GCCAAGGACAATCTCGGCTTCGGTATGCGCTCTGGCGCTACGCGGCTCTGGTCAATAATGGCGTGGTGGAGCAGTGGTTTGAGGAGGAA
121 A K D N L G F G M R S W R Y A A L V N N G V V E Q W F E E E
451 GGTTCCTCCGACAACCTGCGAGACCGACCCCTATGGCGTCTCTATCCCGCAGAACGTCCTTCAAACATTGAAGGACGCAGCATGA
151 G F S D N C E T D P Y G V S S P Q N V L Q T L K D A A *
    
```

图 2 根瘤菌 *MCHK_7135* 基因的 DNA 及氨基酸序列

Fig.2 DNA and amino acid sequence of *MCHK_7135* in rhizobium

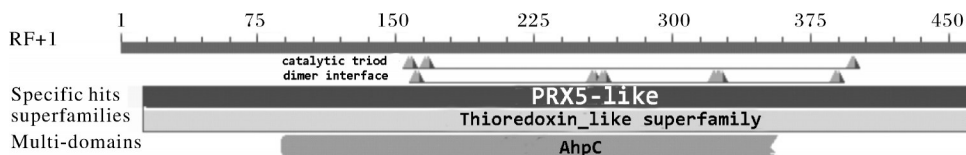


图 3 NCBI 网站对 *MCHK_7135* 蛋白保守结构域的分析

Fig. 3 Conserved domains analysis of *MCHK_7135* peptide

2.2 *MCHK_7135* 基因突变菌株和回补菌株的构建

1) *MCHK_7135* 基因突变菌株构建。首先用重叠延伸 PCR(SOE-PCR)构建同源双交换所需的目

的基因失活片段, 即被卡那霉素基因插入的 *MCHK_7135* 片段(*MCHK_7135::Km*)。再将之构建到含有蔗糖敏感基因 SacB 的 pJQ200SK(Gm^R)载体上。

利用三亲本结合转移技术, 将置换载体

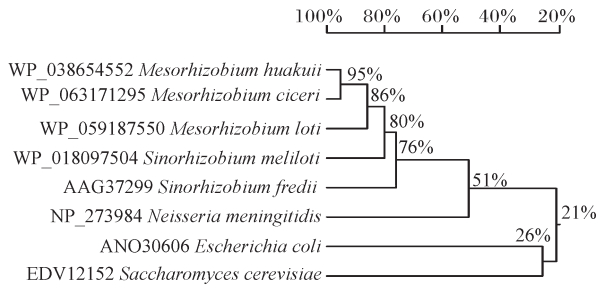


图4 *MCHK_7135*基因系统发育树

Fig.4 The phylogenetic tree of *MCHK_7135* gene

pJQ200SK (*MCHK_7135*: : *Km*) 导入野生型 *M. huakuii* 7653R 中。挑取在 SM+*Km* 培养基上生长的转化子接种在含蔗糖的 TY 培养基上, 由于 pJQ200SK 含有 *SacB* 基因, 是蔗糖敏感型自杀质粒, 在含蔗糖的培养基中因不能复制而丢失, 而质粒上 *MCHK_7135*: : *Km* 片段则会以一定频率和野生型根瘤菌上的 *MCHK_7135* DNA 序列发生同源交换。用不同浓度的蔗糖进行筛选, 最终获得同源双交换的突变株。得到的突变株只能在含有抗生素 *Km* 的 SM 平板上生长, 在 SM+*Gm* 上不生长。说明其 pJQ200SK 载体已经丢失, 而含 *Km* 的目的基因片段已经通过同源双交换, 替换了染色体上原有的野生型 *MCHK_7135* 基因序列。

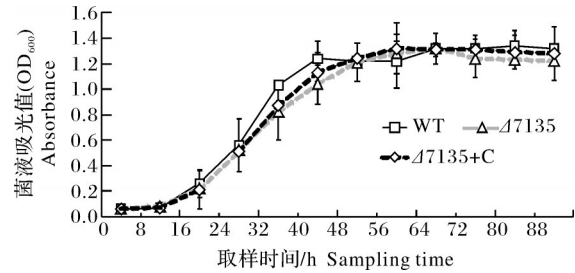
2) *MCHK_7135* 基因回补菌株的构建及筛选。为了验证突变菌株与紫云英的共生表型变化是否由于目的基因失活所引起, 需要构建回补菌株: 以野生型根瘤菌 gDNA 为模板, 扩增出的 *MCHK_7135* 全长克隆到表达载体 pBBR1MCS5 上, 构建成回补载体 pBBM1MCS5+*7135*。三亲本结合转移导入 $\Delta 7135$ 突变株, 获得回补菌株 *M. huakuii* 7653R $\Delta 7135$ +C。

2.3 过氧化氢对根瘤菌的胁迫试验结果

1) 无胁迫条件下, *M. huakuii* 7653R 的野生型、突变株、回补菌株的生长情况。3 种菌株活化培养到对数期后, 分别等量接种到 TY 液体培养基中 28 °C 振荡培养, 定期取样测 OD₆₀₀ 值。结果显示: 3 种菌株的生长速度相似, 表明在正常培养条件下, *MCHK_7135* 基因缺失不影响根瘤菌的生长(图5)。

2) 在 H₂O₂ 胁迫条件下, *M. huakuii* 7653R 的野生型、突变株、回补菌株的生长情况。3 种菌株经终浓度为 0、0.1、0.5 和 1.0 mmol/L 的 H₂O₂ 处理后, 稀释涂布 TY 平板, 结果显示, 在没有 H₂O₂ 胁迫时 (0 mmol/L), 各菌株的生长没有明显差异; 在 H₂O₂ 胁迫处理后, *MCHK_7135* 突变株对氧胁迫更为敏

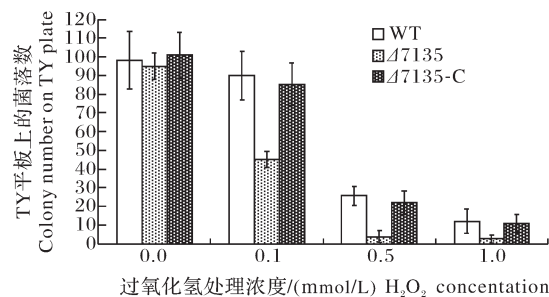
感, 其存活率下降的程度显著大于野生型和回补株, 说明 *MCHK_7135* 基因有助于根瘤菌抵御氧胁迫(图6)。



WT: 野生型根瘤菌 Wild-type rhizobium strain; $\Delta 7135$: 突变株 $\Delta 7135$ mutant strain; $\Delta 7135$ +C: 回补菌株 $\Delta 7135$ mutant strain complemented with complete *MCHK_7135* gene. 误差线表示 3 个重复的标准差。Error bar represent the mean \pm SD for 3 replications. 下同。The same as follows.

图5 各根瘤菌株在液体培养基中的生长曲线

Fig.5 Growth curve of each rhizobium strains in liquid medium



*: 有显著性差异 ($P < 0.05$), **: 有极显著性差异 ($P < 0.01$)。下同。*: Significant difference, $P < 0.05$; **: very significant difference, $P < 0.01$. The same as follows.

图6 各根瘤菌株经 H₂O₂ 胁迫处理后在 TY 平板上的菌落数

Fig.6 The colony number of each strains on TY plate after H₂O₂ stress treatment

2.4 根瘤菌突变菌株的早期侵染事件观察

将标记了 *gfp* 荧光基因的野生型根瘤菌、突变株、回补菌株分别接种盆栽紫云英。分别在接菌后 4、8、14 d 收获根系, 在荧光显微镜下观察 GFP 标记的侵染线和根瘤原基(图7、图8)。

由图8可知: 在接种根瘤菌的早期(4 dpi), *M. huakuii* 7653R $\Delta 7135$ 突变株侵染紫云英根毛形成的侵染线数量略少于野生型根瘤菌, 但未达到显著水平, 在接菌 8、14 d 后, 突变株形成的侵染线数量显著少于野生型。回补菌株形成的侵染线数量略少于野生型, 但无显著差异。在形态上, 野生型、突变株、回补株侵染的侵染线长度、形状无显著差异(图7)。

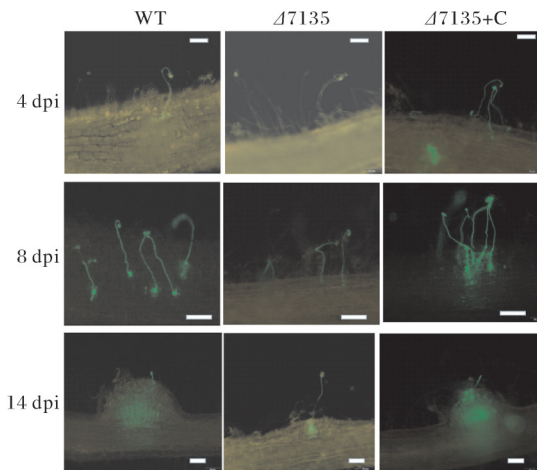
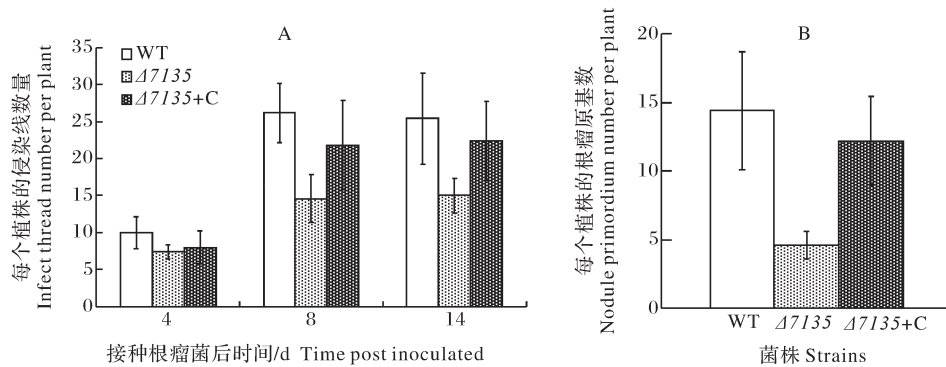


图7 GFP标记的侵染线和根瘤原基

Fig.7 Infect thread and nodules primordium labeled by GFP(bar=100 μm)



A: 接菌后不同时期,各菌株形成的侵染线统计; B: 接菌14 d后的根瘤原基统计。A: The infect thread by each rhizobium strains in vary days after inoculation; B: The nodule primordium number by each rhizobium strains in 14 dpi.

图8 各根瘤菌株的早期侵染事件数据

Fig.8 Data of early infect event by each rhizobium strains

数据分析结果显示,与野生型相比,接种 $\Delta 7135$ 突变株的紫云英植株鲜质量显著偏低(表2),与不接菌的植株鲜质量接近,而接种回补菌株 $\Delta 7135+C$ 的紫云英鲜质量与野生型无显著差异; $\Delta 7135$ 突变株在紫云英根系上所结根瘤多为白色无效瘤(图9B),根瘤鲜质量、数量和固氮酶活性都显著低于野生型(表2)。

共生表型统计结果表明,*MCHK_7135*基因突变失活后,显著降低了根瘤菌的结瘤和固氮能力。与野生型相比,回补菌株 $\Delta 7135+C$ 在每株紫云英上所结根瘤的数和固氮酶活性都没有显著差异。回补菌株接种的紫云英鲜质量、根瘤质量虽比野生型降低,但均高于突变株(表2)。说明向突变株导入完整的*MCHK_7135*基因后,根瘤菌的结瘤、固氮能力得到部分恢复。

接菌14 d(14 dpi)后形成的根瘤原基形态和数量统计结果显示,接种突变菌株14 d后形成的根瘤原基数量显著少于野生型(图8)。在形态上也比野生型、回补菌株的根瘤原基略小(图7)。回补菌株形成的根瘤原基在数量、形态上与野生型无显著差异。

以上结果表明:*MCHK_7135*突变失活后,对根瘤菌早期侵染有一定影响,特别是对根瘤原基形成的影响较大。

2.5 突变株、回补菌株在紫云英上的共生表型

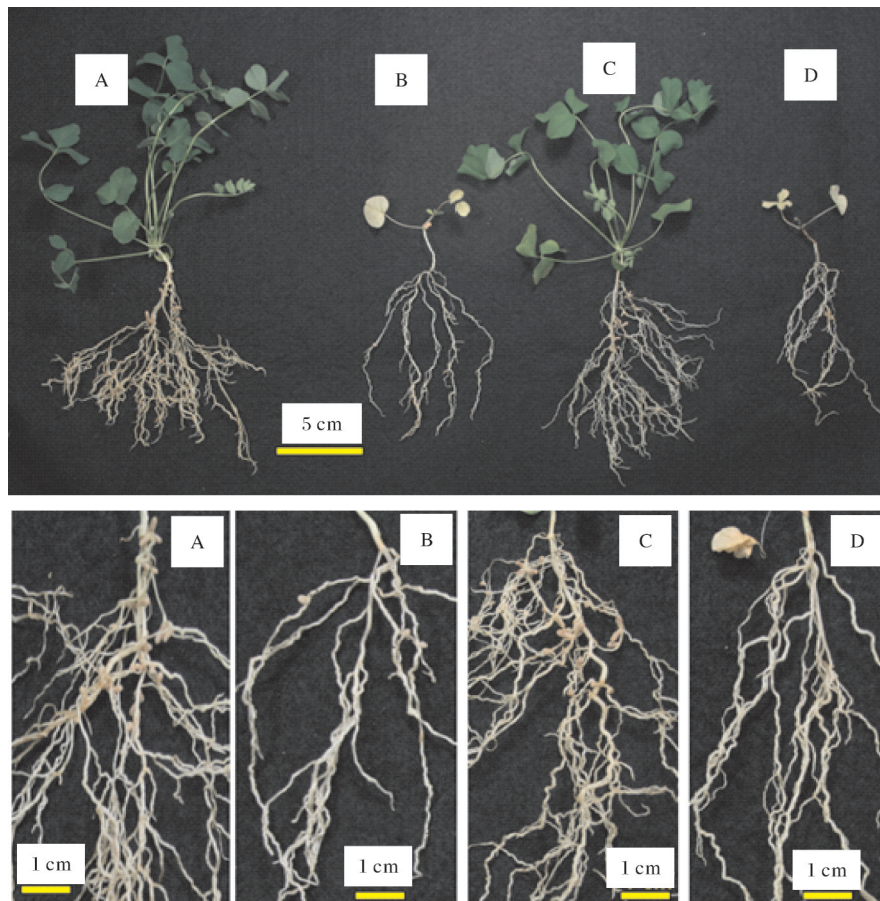
相较于接种野生型*M. huakuii* 7653R的紫云英,接种 $\Delta 7135$ 突变株的紫云英长势矮小、瘤数偏少、体积较小、颜色偏白;回补突变株所结根瘤体积比突变株大,颜色为桃红色,紫云英植株长势正常,接近野生型(图9)。

2.6 根瘤石蜡切片观察

接菌30 d后收获根瘤,制备石蜡切片,用苯甲胺蓝染色,结果显示:和野生型*M. huakuii* 7653R相比, $\Delta 7135$ 突变株的根瘤尺寸偏小,根瘤内含有类菌体的植物细胞(染成蓝色的细胞)比例较少,且多数含菌的根瘤细胞内有大的空泡。回补株的根瘤表型接近野生型根瘤(图10)。

3 讨论

生物在生理代谢中会产生一些活性氧类物质(reactive oxygen species, ROS),包括超氧阴离子(O_2^-)、过氧化物(如 H_2O_2)和某些含氧自由基等。高浓度的过氧化物或超氧化物会对生物的细胞组分或功能蛋白造成毒害,从而损伤细胞。生物组织通常会通过超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、过氧化物还原



A:野生型根瘤菌; B: $\Delta 7135$ 突变株; C: $\Delta 7135$ +C 回补菌株; D:不接根瘤菌对照。A:Inoculated with wild-type rhizobium strain; B: Inoculated with $\Delta 7135$ mutant strain; C: Inoculated with $\Delta 7135$ +C complement strain; D: None-inoculated as control.

图9 接种根瘤菌各菌株30 d后,盆栽紫云英的全植株、根系表型

Fig.9 Whole plant and root phenotypes of *A. sinicus* inoculated by vary rhizobium strains for 30 days

表2 接种根瘤菌不同菌株后紫云英的各项共生表型

Table 2 Symbiotic phenotypes of *A. sinicus* inoculated by vary rhizobium strains

菌株 Strain	单株地上部鲜质量/g Fresh weight aboveground part per plant	根瘤数 Nodules number	单株根瘤质量/mg Weight of root nodule per plant	固氮酶活(C_2H_4)/ ($\mu\text{mol/h}$) Activity of nitrogenase
WT	$0.179 \pm 0.003a$	$18.44 \pm 0.59a$	$13.02 \pm 0.70a$	$11.21 \pm 0.027a$
$\Delta 7135$	$0.110 \pm 0.150b$	$11.34 \pm 1.77a$	$7.60 \pm 1.05b$	$5.20 \pm 0.109b$
$\Delta 7135$ +C	$0.168 \pm 0.016a$	$14.88 \pm 4.03a$	$10.41 \pm 0.64a$	$8.01 \pm 0.425a$
CK	$0.120 \pm 0.026b$	0	0	0

注:CK:不接根瘤菌的紫云英对照。表中数据为5个重复的平均值,每列数据中有相同字母表示没有显著差异($P < 0.05$)。Note: CK: *A. astragalus* without rhizobium. The data is average of 5 replicates. Data in each column followed by the same letter are not significant difference ($P < 0.05$).

酶(peroxidase, Prx)的作用来减少活性氧ROS对细胞的损伤^[5-6]。

在病原微生物或根瘤菌侵染宿主植物时,宿主植物会产生活性氧物质作为防御机制,而根瘤菌体内的相关酶类表达会被激活,从而保护根瘤菌的侵

染过程^[7]。根瘤菌在根瘤内演化成类菌体之后,由固氮酶完成固氮功能,固氮酶对氧气极为敏感,必须在较低氧压下才有正常活性。而植物细胞代谢过程中会产生大量活性氧类物质,对根瘤菌类菌体造成毒害^[8]。根瘤内的豆血红蛋白(leghemoglo-

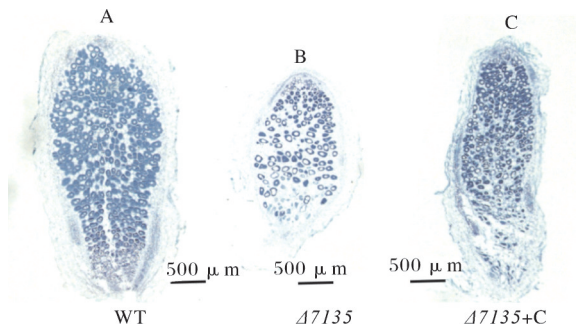


图 10 接种根瘤菌 30 d 后的根瘤石蜡切片

Fig. 10 Paraffin section of nodule after inoculated with rhizobium for 30 days

bin) 作为氧的载体,能缓冲细胞中的氧浓度变化,使得根瘤内处于低氧压环境^[9]。同时,在共生状态下,类菌体中的超氧化物歧化酶、过氧化氢酶的表达显著增强,这无疑也是为了保护类菌体处于低氧压环境^[3],而固氮酶只有在低氧压下才能正常行使固氮功能。

对豌豆根瘤菌的研究^[10-12]表明,豌豆根瘤菌中的过氧化氢酶基因 *katG* 能将 H_2O_2 催化生成 H_2O 和 O_2 ,从而解除宿主植物的防御机制;将 *katG* 突变失活后,突变株对 H_2O_2 的敏感性增强; *katG* 失活没有影响根瘤菌在豌豆上的共生固氮能力,但 *katG* 突变菌株不能在宿主植物根圈正常定殖;研究还表明,根瘤菌类菌体的发育也需要抗氧化基因的参与,在根瘤中形成低氧压的环境中,根瘤菌才能顺利演化成能固氮的类菌体。*katG* 还能调节豌豆根瘤菌中 *ohrB* 和 *grxC* 等抗氧化基因的表达^[12]。在类菌体发育阶段,*katG* 和 *ohrB* 的表达都显著提高。而豌豆根瘤菌的抗氧化基因 *ohrB* 失活后,对类菌体发育和结瘤能力有显著影响。

对根瘤菌的研究表明,过氧化物还原酶在保护根瘤菌侵染、类菌体发育、固氮酶正常固氮方面起着重要作用^[8,10-12]。过氧化物还原酶家族广泛存在于真核及原核生物中。该家族所有蛋白均在 N-端具有保守的 Cys 残基,有的成员在 C-端还具有保守的 Cys^[8,13]。Peroxidoxin 蛋白家族拥有过氧化氢酶活性,含半胱氨酸的硫氧还蛋白是反应的活性中心,将过氧化物的过氧基(R-OOH)还原成 R-OH。Peroxidoxin 在消除生物代谢产生的过氧化物中具有重要作用^[14-15]。

本研究首先构建了华葵中慢生根瘤菌的过氧化物还原酶 *MCHK_7135* 基因突变菌株,在自生条件下, $\Delta 7135$ 菌株对 H_2O_2 胁迫的敏感性显著增强,说明

MCHK_7135 失活后,根瘤菌更容易受到过氧化物毒害。接种紫云英之后,突变株的结瘤数量和固氮能力都显著低于野生型菌株,说明过氧化物还原酶基因 *MCHK_7135* 对于根瘤菌类菌体发育以及根瘤的固氮功能都起重要作用。过氧化物还原酶基因的失活,将导致根瘤菌侵染宿主时,宿主产生的防御机制不能被解除,根瘤菌不能在宿主植物根系正常定殖,进而影响结瘤和固氮。本研究探讨了华葵根瘤菌的 *MCHK_7135* 作为过氧化物酶基因在根瘤菌侵染、结瘤、固氮中的作用,下一步将研究该基因在根瘤中抗氧化胁迫的分子机制和基因调控机制。

参考文献 References

- [1] ROY S, LIU W, NANDETY R S, et al. Celebrating 20 years of genetic discoveries in legume nodulation and symbiotic nitrogen fixation[J]. *The plant cell*, 2020, 32(1): 15-41.
- [2] FREIBERG C, FELLAY R, BAIROCH A, et al. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes[J]. *Nature*, 1997, 387(6631): 394-401.
- [3] PENG J L, HAO B H, LIU L, et al. RNA-Seq and microarrays analyses reveal global differential transcriptomes of *Mesorhizobium huakuii* 7653R between bacteroids and free-living cells[J/OL]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e93626 [2022-08-12]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093626>.
- [4] LI J, DAI X B, LIU T S, et al. LegumeIP: an integrative database for comparative genomics and transcriptomics of model legumes[J/OL]. *Nucleic acids research*, 2012, 40(D1): D1221-D1229 [2022-08-12]. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr939>.
- [5] DIETZ K J, MITTLER R, NOCTOR G. Recent progress in understanding the role of reactive oxygen species in plant cell signaling[J]. *Plant physiology*, 2016, 171(3): 1535-1539.
- [6] DUBUISSON M, VANDER STRICHT D, CLIPPE A, et al. Human peroxiredoxin 5 is a peroxynitrite reductase[J]. *FEBS letters*, 2004, 571(1/2/3): 161-165.
- [7] MA J, ZHOU Y, LI J Y, et al. Novel approach to enhance *Bradyrhizobium diazoefficiens* nodulation through continuous induction of ROS by manganese ferrite nanomaterials in soybean[J/OL]. *Journal of nanobiotechnology*, 2022, 20(1): 168 [2022-08-12]. <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01372-2>.
- [8] DOMBRECHT B, HEUSDENS C, BEULLENS S, et al. Defence of *Rhizobium etli* bacteroids against oxidative stress involves a complexly regulated atypical 2-Cys peroxiredoxin[J]. *Molecular microbiology*, 2005, 55(4): 1207-1221.
- [9] GÜNTHER C, SCHLERETH A, UDVARDI M, et al. Metabolism of reactive oxygen species is attenuated in leghemoglobin-deficient nodules of *Lotus japonicus*[J]. *Molecular plant-microbe*

- interactions, 2007, 20(12):1596-1603.
- [10] ZOU Q, LUO S, WU H T, et al. A GMC oxidoreductase GmcA is required for symbiotic nitrogen fixation in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* [J/OL]. *Frontiers in microbiology*, 2020, 11: 394[2022-08-12]. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00394>.
- [11] DEL CARMEN VARGAS M, ENCARNACIÓN S, DÁVALOS A, et al. Only one catalase, katG, is detectable in *Rhizobium etli*, and is encoded along with the regulator OxyR on a plasmid replicon [J]. *Microbiology (reading, England)*, 2003, 149(5):1165-1176.
- [12] 周艳琳, 何冬兰, 李晓华, 等. *katG* 基因在豌豆根瘤菌抗氧化中的功能 [J]. *微生物学报*, 2015, 55(7):843-850. ZHOU Y L, HE D L, LI X H, et al. Antioxidative function of *katG* gene in *Rhizobium leguminosarum* [J]. *Acta microbiologica sinica*, 2015, 55(7):843-850 (in Chinese with English abstract).
- [13] HAAG A F, KERSCHER B, DALL'ANGELO S, et al. Role of cysteine residues and disulfide bonds in the activity of a legume root nodule-specific, cysteine-rich peptide [J]. *The Journal of biological chemistry*, 2012, 287(14):10791-10798.
- [14] ABBAS K, RIQUIER S, DRAPIER J C. Peroxiredoxins and sulfiredoxin at the crossroads of the NO and H₂O₂ signaling pathways [J]. *Methods in enzymology*, 2013, 527:113-128.
- [15] PARSONAGE D, NELSON K J, FERRER-SUETA G, et al. Dissecting peroxiredoxin catalysis: separating binding, peroxidation, and resolution for a bacterial AhpC [J]. *Biochemistry*, 2015, 54(7):1567-1575.

Function of *MCHK_7135* gene in symbiotic nitrogen fixation of *Mesorhizobium huakuii*

HU Zhenzhen¹, XIE Hualun², PENG Jieli¹, LI Youguo¹, CHEN Dasong¹

1. College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Hubei Provincial Plant Protection General Station, Wuhan 430070, China

Abstract In the previous studies, the global transcriptome databases of *Mesorhizobium huakuii* 7653R in free living and in symbiotic condition were constructed respectively. Some differential expression genes in free living and symbiotic condition were identified with RNA-Seq and Microarray. Among these genes, *MCHK_7135* belongs to the peroxiredoxin (Prxs) family. Its expression was significantly up-regulated at the stage of symbiotic nitrogen fixation. In this article, the replacement mutants and complementary strains of *MCHK_7135* were constructed by homologous recombination to study the function of *MCHK_7135* gene in symbiotic nitrogen fixation between rhizobia and host plants. The phenotypes of mutant and complementary strains were investigated under free living and symbiotic condition with *Astragalus sinicus*. Results showed that the mutant strain of *MCHK_7135* gene was more sensitive to H₂O₂ stress compare with the wild-type strain. The growth of *A. sinicus* plant inoculated with the mutant was inhibited, the number of infect thread and nodule primordia decreased, the number of nodule was small, and the activity of nitrogenase was low. However, when the mutant strain was complemented by complete *MCHK_7135* gene, some symbiotic phenotypes were restored to different degree. It is indicated that the peroxiredoxin gene *MCHK_7135* of *M. huakuii* plays an important role in the symbiotic nitrogen fixation between rhizobia and host plants.

Keywords rhizobium; symbiotic nitrogen fixation; peroxiredoxin; *Astragalus sinicus*; homologous recombination; mutant

(责任编辑:张志钰)