

王婧仪, 曹扬荣, 朱辉. 天冬氨酸转氨酶在中慢生根瘤菌 MAFF303099 共生固氮中的作用 [J]. 华中农业大学学报, 2021, 40(6): 68~74.
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2021.06.009

天冬氨酸转氨酶在中慢生根瘤菌 MAFF303099 共生固氮中的作用

王婧仪, 曹扬荣, 朱辉

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

摘要 为寻找根瘤菌中与共生固氮相关的调控基因, 采用同源重组法, 分别敲除中慢生根瘤菌 MAFF303099 在与豆科植物百脉根共生固氮过程上调表达的 10 个基因, 研究它们对共生固氮的影响。结果显示: $\Delta mlr5883$ 敲除突变体相比于野生型 MAFF303099, 其固氮酶活性下降 40%, 侵染细胞形态未发生显著改变, 对 $\Delta mlr5883$ 回补可恢复固氮酶活性; 预测 mlr5883 编码天冬氨酸氨基转移酶, 体外检测该酶的天冬氨酸转氨酶活性为 16.67 U/mg。该基因的突变会影响固氮效率, 推测其可能参与对植物供给碳源的代谢过程。

关键词 天冬氨酸转氨酶; 中慢生根瘤菌 MAFF303099; 共生固氮; 同源重组

中图分类号 Q 939.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2021)06-0068-07

自发现土壤微生物与豆科植物共生具有固定氮元素的功能^[1-2]以来, 两者形成的共生体系一直是人类研究的热点领域。在共生固氮过程中, 根瘤菌在根瘤中定殖并分化形成具有固氮能力的类菌体^[3], 与宿主植物发生复杂的物质交换和信号转导。建立的共生固氮网络需要整合植物宿主与类菌体两者的碳-氮代谢途径。

类菌体为适应根瘤环境会抑制和激活不同的代谢途径, 与此同时, 植物根瘤中的代谢也会发生一些特化。尽管我们已经了解两者之间会发生碳氮交换, 但至今对于其具体机制并不清楚。在豆科植物与根瘤菌形成的共生体中, 细菌向植物提供氮素营养, 以换取宿主供应的碳源与能源^[4]。相对于植物的根系, 根瘤组织中存在高丰度的蔗糖^[5]。植物通过光合作用产生的蔗糖经韧皮层输送给根瘤, 在侵染细胞的细胞质中蔗糖合成酶和糖酵解酶等的作用下经过一系列分解代谢, 转化为苹果酸和琥珀酸等四碳二羧酸类物质^[6]。现在普遍认为这 2 种有机酸是植物提供给类菌体的主要能源和碳源^[7-8]。类菌体膜上存在四碳二羧酸转运系统 Dct (energy-dependent dicarboxylate transport) 可以转运四碳二羧酸类物质进入类菌体^[9], 其后可能通过三羧酸循

环驱动类菌体的呼吸^[10]。类菌体中天冬氨酸转氨酶催化三羧酸循环中的草酰乙酸与谷氨酸反应生成天冬氨酸与 α -酮戊二酸, 参与对植物碳源的利用与代谢。在苜蓿根瘤菌中可转运天冬氨酸至共生体腔的 Aap/Bra 转运蛋白是保证固氮能够进行所必需^[11]。除此之外天冬氨酸转氨酶的缺失也会导致苜蓿根瘤菌的结瘤不固氮表型^[12]。

2004 年日本学者检测了中慢生根瘤菌 MAFF303099 (*Mesorhizobium japonicum* MAFF303099) 与百脉根共生固氮过程中基因表达变化情况, 其中上调表达的基因多位于染色体共生岛位置^[13]。推测这些上调表达基因很可能与共生固氮网络的维持相关。本研究利用相关转录调控数据库, 通过比较分析, 选取部分上调表达基因, 通过同源重组的方式进行敲除, 考察该基因敲除后对根瘤菌与百脉根共生固氮过程的影响。这些基因涉及蛋白分泌、物质转运、代谢等生理生化活动, 以期通过这种方法筛选出参与共生固氮调控的新基因, 进一步解析根瘤菌-豆科植物的共生固氮机制。

1 材料与方法

1.1 材料及载体

百脉根中慢生根瘤菌 MAFF303099 (*Meso-*

收稿日期: 2021-05-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(32070273); 国家重点研发计划项目(2019YFA0904700)

王婧仪, E-mail: 1208289202@qq.com

通信作者: 朱辉, E-mail: zhuhui@mail.hzau.edu.cn

rhizobium japonicum MAFF303099)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 、大肠杆菌 S17-1、大肠杆菌 BL21(DE3)-Codon Plus 及质粒 pBBRMCS-3、pGEX-4T-1 和 pK18-mob-SacB-Genta 均由华中农业大学农业微生物学国家重点实验室生物固氮室研究保藏;百脉根(*Lotus japonicus*) MG-20 生态型种子由华中农业大学农业微生物学国家重点实验室生物固氮研究室扩繁。本研究中的引物合成和基因测序主要由上海生工生物工程有限公司、武汉擎科生物技术有限公司、北京奥科生物技术有限公司完成;文中所用到的限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、ExTaq 酶、Primer star DNA 合成酶等均购自宝生物公司。根瘤菌基因组抽提试剂盒为全式金公司产品,谷草转氨酶(GOT)活性检测试剂盒为北京索宝莱公司产品。其他生化试剂均为国产分析纯产品。

1.2 百脉根盆栽试验

百脉根种子萌发时,先用磨砂纸轻轻刮磨约 1 min,将磨好的种子倒入无菌锥形瓶,用浓硫酸处理 5~8 min,后将浓硫酸吸出,用无菌水冲洗种子 5 次,去除残留的浓硫酸。2% 的次氯酸钠溶液处理 8~10 min,后用无菌水清洗种子 8~10 次,去除残余的次氯酸钠。加入少许无菌水淹没种子表面,4 °C 条件避光进行春化。后将已经膨胀体积变大的种子置于无糖 MS 培养基上,22 °C 暗培养 2 d 使其生根,光照培养(培养条件:16 h 光培养/8 h 暗培养)2~3 d 发芽。之后转移到无菌培养基质(蛭石和珍珠岩的质量比为 3:1)中。移栽完毕后,置于 23 °C 的光照培养箱中培养,光照条件为 16 h 光照/8 h 黑暗。百脉根幼苗长出第 1 片真叶后,接种活化后的新鲜根瘤菌悬液($D_{600} = 0.02 \sim 0.05$) 5 mL/棵至百脉根根部。

1.3 固氮酶活性的测定

取带根瘤的百脉根植株放入小玻璃瓶中,瓶口密封。先用注射器从瓶中抽出 1/10 体积的空气,造成瓶内负压,再注入 1/10 瓶体积的乙炔气作为固氮酶底物。小瓶置 28 °C 反应 2 h 后用微量进样器从每个小瓶中抽取 100 μL 气体注入气相色谱进样室中,记录检测结果。取样完毕后用镊子摘下根瘤并称质量,计算样品的固氮酶活性。

1.4 蛋白的诱导表达与纯化

将经鉴定的重组载体转化到大肠杆菌表达菌株

中,挑取单菌落于 4 mL 相应抗性的 LB 液体培养基中,37 °C 过夜培养。按照 1% 接种量接种震荡培养至 $D_{600} = 0.4 \sim 0.6$ 。加入终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG,16 °C 培养 18 h 后收集菌体。用 10 mL PBS 溶液重悬菌体后液压破碎细胞破碎 3 次,对总蛋白取样。4 °C 8 000 r/min 将破碎后的液体离心 1 h。

用 0.45 μm 的过滤器过滤细胞破碎液离心后的上清,取上清样 10 μL ,加 10 mL 过滤后的上清蛋白液至纯化柱中,4 °C 摆床旋转 1 h 孵育,取下底部盖子,让液体自然流出,取样流液 10 μL 。加 10 mL 的磷酸缓冲液至纯化柱中,用枪吹打混匀,静置 10 min,取下底部盖子,让液体自然流出。重复 2~3 次,并取样 10 μL 。加入 1 mL 的 10 mmol/L 还原性谷胱甘肽溶液,4 °C 摆床旋转孵育 20 min,取下底部盖子使液体自然流出,即得到纯化好的蛋白,取样 10 μL 。分装至无菌的 1.5 mL 离心管,液氮速冻后放至 -80 °C 冰箱备用。对蛋白纯化柱填料进行清洗和保存。对所取样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。

1.5 两亲本杂交法介导的基因敲除

培养根瘤菌 MAFF303099 和 S17-1 菌株至对数生长期。分别收集 1 mL 菌体。TY 液体培养基重悬。重复离心、加无抗 TY 洗涤 1 次。然后 1 000 r/min 离心 1 min 收集洗涤 2 次后的菌体。用 30~50 μL 的无抗 TY 液体培养基重悬 2 种菌体,并将菌体混合液滴在 0.22 μm 的微孔滤膜上,置于 TY 平板。28 °C 培养 2 d 后用无菌水将菌体从滤膜上洗脱并重悬;取 200 μL 菌悬液涂布于含庆大霉素(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、磷霉素(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和 10% 蔗糖的 TY 固体培养基上,28 °C 倒置培养至长出单菌落。菌落 PCR 验证上下臂是否发生同源重组交换。

1.6 碘-碘化钾染色法观察根瘤内淀粉粒

将包埋好的石蜡块于 -20 °C 预冷 10 min 后固定在样品夹上,设置切片厚度为 5 μm ,使用徕卡切片机进行切片,将组织置于干净的载玻片上,滴加 40% 的乙醇预展片,后置于 42 °C 的水浴锅中充分展片。组织切片置于载玻片上,做好标记,55 °C 烘片 3 min。于染色缸中用二甲苯浸泡石蜡切片 15 min,并重复该操作 3 次;之后用 95%、85%、75% 乙醇依次于染色缸中浸泡切片各 15 min,用碘液将组织染色 10 min,倾去染液后快速水洗;甩干水,于 60 °C 烘 4~6 h 后用二甲苯透明 3 min,盖上盖玻片用体式

显微镜和光学显微镜对染色后的根瘤切片进行观察并拍照记录。

2 结果与分析

2.1 共生表型统计

前期研究筛选出 MAFF303099 在共生固氮过程中的上调表达基因 ($\Delta mlr2566$ 、 $\Delta mll4860$ 、 $\Delta mll5060$ 、 $\Delta mlr5883$ 、 $\Delta mlr6114$ 、 $\Delta mll6127$ 、 $\Delta mlr6132$ 、 $\Delta mlr6210$ 、 $\Delta mlr7570$ 和 $mlr7572$)，通过两亲本杂交和同源重组

方法构建了相应的 10 株基因敲除突变体菌株。将这些突变体菌株接种至野生型百脉根，观察植物固氮酶活性和结瘤数表型，探讨突变体根瘤菌对其共生固氮的影响。

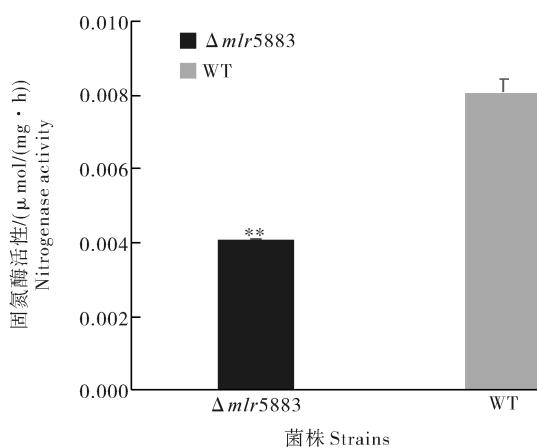
对百脉根植株分别接种 10 种不同根瘤菌突变体，发现根瘤菌突变体所形成的根瘤菌数量与野生型根瘤菌相比没有显著差异（表 1）。但 $\Delta mlr5883$ 菌株固氮酶活性显著下降（图 1），且 3 次重复实验表型稳定。故后续以该基因为主，探究 $mlr5883$ 在

表 1 突变体结瘤数和固氮酶活性表型统计

Table 1 Nodules number and nitrogenase activity of mutants phenotype

$\Delta mlr2566$		$\Delta mll4860$		$\Delta mll5060$		$\Delta mlr5883$		$\Delta mlr6114$		$\Delta mll6127$		$\Delta mlr6132$		$\Delta mlr6210$		$\Delta mlr7570$		$\Delta mlr7572$	
I	II																		
ns	ns	—	+	ns	+	—	—	ns	ns	+	+	—	—	ns	ns	—	—	ns	+
		ns	ns	ns	ns	ns	—	ns	ns	+	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	+
		ns	ns	ns	—			ns	ns	ns	ns	ns	ns				ns	ns	

注：I：结瘤数；II：固氮酶活性；ns：与野生型相比没有显著差异；+：与野生型相比共生表型（结瘤数/固氮酶活性）显著增加；—：共生表型与野生型相比显著降低。Note: I : Nodule number; II : Nitrogenase activity ; ns: There is no significant difference compared with the wild type; +: The symbiotic phenotype (nodule number/nitrogenase activity) is significantly increased compared with the wild type; -: The symbiotic phenotype is significantly reduced compared to the wild type.



误差线表示标准差；** 表示在 1% 的水平上的显著差异，($n>50$)。下同。Error bars denote SE; ** means significant differences at $P<0.01$ ($n>50$)。The same as follows.

图 1 $\Delta mlr5883$ 与野生型的固氮酶活性

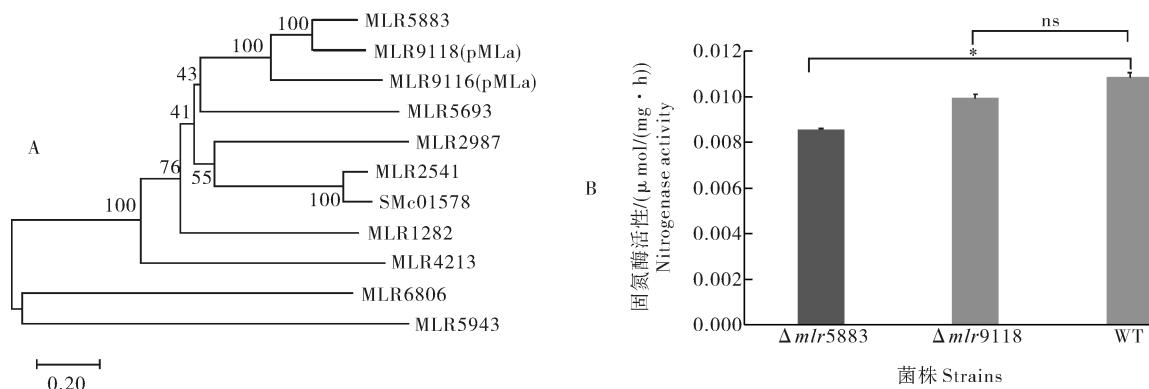
Fig.1 Nitrogenase activity of $\Delta mlr5883$ and wide type 共生固氮中发挥的作用。

2.2 生物信息学分析

$mlr5883$ 有 1 191 个碱基，可编码形成具有 396 个氨基酸的蛋白产物。Uniprot 网站 (<https://www.uniprot.org/>) 预测该蛋白具有天冬氨酸氨基转移酶，催化 L- 天冬氨酸转氨基至 α - 酮戊二酸形成草酰乙

酸和 L- 谷氨酸。SMART 网站预测在 $mlr5883$ 的 63~205 碱基处有一个氨基转移酶结构域。

$mlr5883$ 的敲除导致固氮酶活性的下降，但并不完全丧失酶活性。推测可能在 MAFF303099 中存在仍能发挥相同功能的酶或者存在其他并行生化途径。为探究是否由于同功蛋白致使 $\Delta mlr5883$ 菌株仍具有部分固氮功能，在 MAFF303099 基因组和 2 个共生大质粒上检索具有潜在天冬氨酸转氨酶功能的基因，采用最大似然法经自举法检验 (bootstrap 检验) 构建蛋白分子进化树 (图 2A)，结果显示，质粒 pLMA 上的 2 个基因产物 MLR9118 和 MLR9116 与 $MLR5883$ 有最大的相似性，同一性分别为 67.7% 和 50.0%。采用相同的方法对与同源性最近的 $mlr9118$ 进行单敲除，并未发现固氮酶活性与野生型有显著变化 (图 2B)。据此可以推测，MAFF303099 在与百脉根的共生固氮过程中， $mlr5883$ 作为主要功能基因发挥天冬氨酸转氨酶作用，为验证这一假设，笔者曾尝试同时对 $mlr5883$ 、 $mlr9118$ 和 $mlr9116$ 实行多基因敲除，但未能成功。



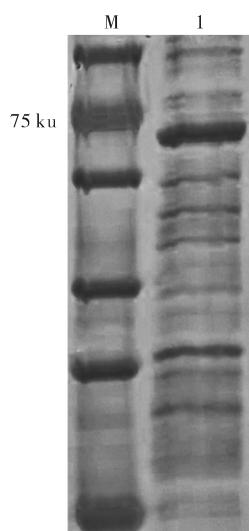
A:MLR5883 的分子进化树; B: $\Delta mlr5883$, $\Delta mlr9118$ 和野生型菌株固氮酶活性。误差线表示标准误; * 表示在 5% 的水平上的显著差异 ($n>50$)。A:Molecular evolutionary tree of MLR5883; B:Nitrogenase activity of $\Delta mlr5883$, $\Delta mlr9118$ and wide type. Error bars denote SE; * * means significant differences at $\alpha=0.05$ ($n>50$)。

图 2 分子进化树与同源基因固氮酶活性

Fig.2 Molecular evolutionary tree analysis and nitrogenase activity of $\Delta mlr5883$, $\Delta mlr9118$ and wide type

2.3 MLR5883 天冬氨酸转氨酶(AAT)活性验证

为了测定 MLR5883 编码蛋白是否具有预测的天冬氨酸氨基转移酶功能, 构建 pGEX-4T-1/MLR5883 蛋白表达载体, 原核诱导表达可溶性的目的蛋白。网站预测的目的重组蛋白大小约为 69 ku, 考马斯亮蓝染色结果显示, 靠近 75 ku 条带位置下方存在一明显条带, 与预测蛋白大小相近(图 3)。经 GST 标签纯化后的蛋白质量浓度为 0.21 mg/mL。根据标准曲线计算得到纯化的重组蛋白天冬氨酸氨基转移酶活性为 16.67 U/mg。证明 MLR5883 编码蛋白具有 AAT 酶活性。



M 为 ABclonal 蛋白 marker (RM19001); 洗道 1 为纯化蛋白样品。M: Protein marker; Lane 1: Elution protein sample 20 μL.

图 3 融合蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig.3 Induced protein expression and purification of fusion protein

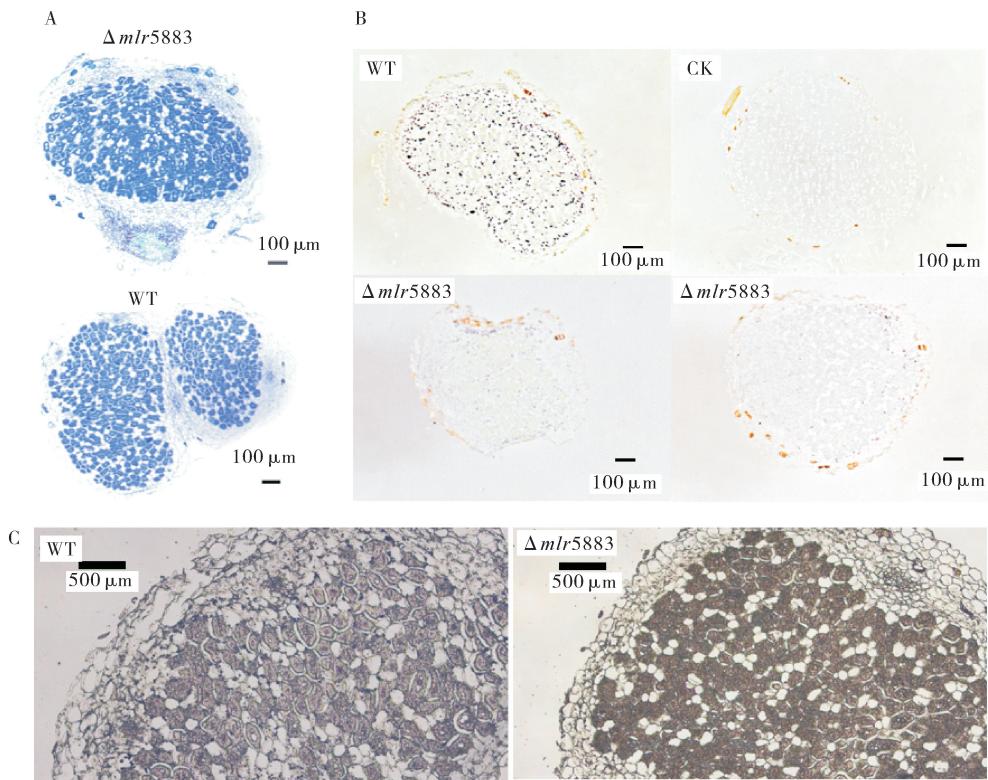
2.4 根瘤组织中侵染细胞形态与淀粉粒的观察

为了探究导致固氮酶活性下降的原因,首先对根瘤组织中的侵染细胞形态进行观察。根据以往的研究^[14]推测该基因参与根瘤菌与植物共生时碳源的代谢,故对根瘤中淀粉粒情况进行观察。

观察结果(图 4)显示:野生型和 $\Delta mlr5883$ 菌株所形成的根瘤中侵染细胞在形态上没有显著差异,淀粉颗粒的大小和数量发生显著改变。野生型根瘤中的淀粉粒数量较多, 直径较大。而突变体形成的根瘤中淀粉颗粒的数量大大减少,且直径更小。

2.5 $\Delta mlr5883$ 回补表型的观察

构建回补载体 pBBR1-MCS3/ox-*mlr5883*, 将其接合转入 $\Delta mlr5883$ 中。接种野生百脉根 MG-20, 共培育 21 d 后观察共生表型。结果显示, 21 d 后接种不同种根瘤菌和不接种根瘤菌的植物的生长状态有区别。不接种的百脉根植株长势最弱小(图 5A), 根系上没有根瘤形成, 表现为明显的缺氮表型。其次为接种只含质粒的 $\Delta mlr5883$ 对照组(图 5B), 与接种回补根瘤菌和野生型根瘤菌的植株相比较为弱小。接种了 *mlr5883* 回补菌株的百脉根苗(图 5C)长势与接种野生型的百脉根苗(图 5D)长势相近甚至更好,但差异不显著。植株表型与固氮酶活性的测定结果相吻合, 固氮酶活性最高的为回补菌株形成的根瘤,其次为野生型,突变体长势最差并与前两者相比有显著差异(图 5E)。同时还发现三者的结瘤数量与固氮酶活性的趋势恰好相反,但对三者结瘤数量进行统计分析并没有发现显著差异(图 5F)。



A:甲苯胺蓝染色观察侵染细胞形态; B:体式显微镜下碘-碘化钾染色法观察根瘤内淀粉粒; C:普通光学显微镜观察根瘤内淀粉粒。A:Toluidine blue staining to observe the morphology of infected cells; B:Amyloplasts are stained with potassium iodide,images are taken by a stereoscopic microscopes; C:Amyloplasts are stained with potassium iodide,images are taken by a optical microscope. WT:野生型 Wild type; CK:对照,未加碘化钾染色 Control check,without potassium iodide stained.

图 4 $\Delta mlr5883$ 与野生型根瘤石蜡切片

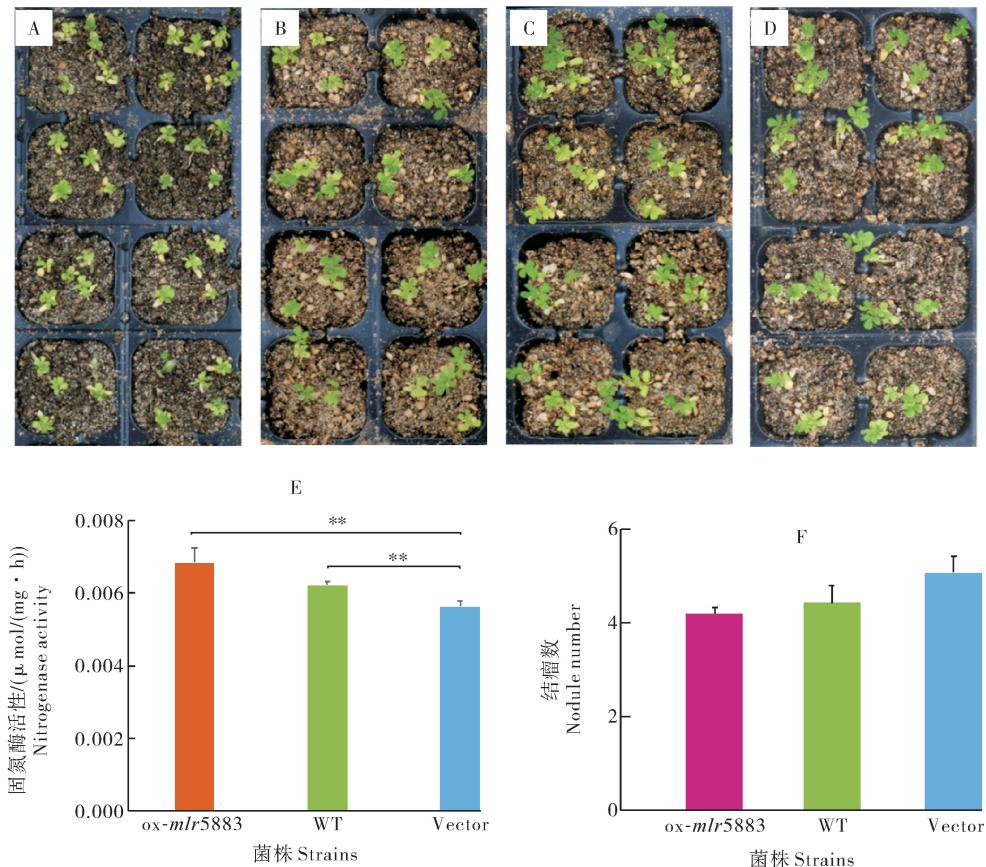
Fig.4 Paraffin-embedded slides of nodules

3 讨 论

本研究选取百脉根中慢生型根瘤菌 MAFF303099 在成熟根瘤中表达上调的基因,构建了相关基因敲除突变体菌株,鉴定了这些突变体菌株与百脉根共生过程中的结瘤固氮表型。其中 *mlr5883* 编码一个天冬氨酸氨基转移酶(AAT)。已有的研究表明在形成不定型根瘤的苜蓿根瘤菌中,其 AAT 突变后会导致 Fix^- (结瘤不固氮)表型^[12],而敲除了 *mlr5883* 的 MAFF303099 菌株导致固氮酶活性降低,根瘤中淀粉颗粒的大小与数量发生变化。对该基因回补表达后固氮酶活性提升至野生型水平,这些结果表明 MAFF303099 中 *mlr5883* 在百脉根共生固氮中发挥重要作用。在苜蓿根瘤菌与百脉根根瘤菌中敲除 AAT 基因,两者接种植物后其共生固氮表型有差异,可能原因一是由于不定型根瘤与定型根瘤代谢差异所导致,二是 *mlr5883* 在百脉根根瘤菌中有 2 个同源基因,它们

可能存在功能冗余现象。

接种 $\Delta mlr5883$ 突变根瘤菌所形成根瘤的固氮酶活性的降低与植物提供碳源变化存在关联,具体机制需要进一步的试验证明。在类菌体吸收植物供给碳源的过程中,普遍认为植物来源的苹果酸在苹果酸脱氢酶(MDH)作用下生成草酰乙酸,草酰乙酸在柠檬酸循环中代谢,为类菌体维持自身生理生化反应和固氮反应供能^[15-16]。Mcdermott 等^[17]认为存在跨类菌体膜的苹果酸/天冬氨酸循环,该循环可为固氮反应提供还原当量但不涉及碳源的转运。AAT 为该循环所必需的关键酶。但苹果酸/天冬氨酸循环中涉及的底物转运在一些共生关系中速率较低。故苹果酸/天冬氨酸循环跨类菌体膜是否真实存在仍有较多疑点。与不定型根瘤 AAT 突变体的 Fix^- 表型^[12]相比,本研究再次验证了根瘤器官的代谢多样性^[18]。对于类菌体中 AAT 如何影响根瘤中氨基酸代谢和碳源代谢仍需要进一步探究。



A-D为接种21 d后百脉根植株生长状态, A:未接种; B:接种 Δ mlr5883/pBBR1-MCS3; C: Δ mlr5883/pBBR1-MCS3-ox-mlr5883; D:接种野生型MAFF303099; E:3种菌株的固氮酶活性; F:3种菌株的结瘤数。A: The growth state of the MG20 without incubation with rhizobium at 21 dpi; B: The growth state of the MG20 incubation with Δ mlr5883/pBBR1-MCS3 at 21 dpi; C: The growth state of the MG20 incubation with Δ mlr5883/pBBR1-MCS3-ox-mlr5883 at 21 dpi; D: The growth state of the MG20 incubation with wild type *M. loti* MAFF303099 at 21 dpi; E: Nitrogenase activity of ox-mlr5883, vector and wide type. The nitrogenase activity was measured 21 days after inoculated; F: Nodules number of ox-mlr5883, vector and wide type.

图5 回补共生表型的观察与统计

Fig.5 Symbiosis phenotype observation and statistics

本研究证实百脉根根瘤菌MAFF303099中 $mlr5883$ 基因所编码的天冬氨酸转氨酶参与调控固氮过程,该基因的缺失对根瘤中淀粉颗粒积累产生影响。该基因可能通过参与类菌体中植物供给碳源的代谢和利用,从而影响固氮过程。这些研究为解析共生固氮中的根瘤菌与豆科植物的碳氮代谢及物质交换过程提供证据,为深入研究共生固氮的作用机制奠定基础。

参考文献 References

- [1] GALLOWAY J N. The global nitrogen cycle: past, present and future[J]. Science in China series C: life sciences, 2005, 48 (Suppl 2):669-677.
- [2] 师尚礼.苜蓿根瘤菌固氮研究进展及浅评[J].中国草地,2005 (5):63-68.SHI S L. Advance in the study of symbiotic nitrogen fixation of alfalfa rhizobium and comment on it[J]. Chinese journal of grassland, 2005 (5):63-68(in Chinese with English abstract).
- [3] 邱平,郑凯杰,赵晓宇,等.根瘤菌侵染早期大豆根系的转录组分析[J].大豆科学,2021,40(3):289-298. QI P, ZHENG K J, ZHAO X Y, et al. Transcriptome analysis of soybean root system in the early stage of rhizobium infection[J]. Soybean science, 2021, 40(3):289-298(in Chinese with English abstract).
- [4] UDVARDI M K A N, DAY D A. Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules[J]. Annual review of plant physiology and plant molecular biology, 1997, 48 (1): 493-523.
- [5] YE H, GEMPERLINE E, VENKATESHWARAN M, et al. MALDI mass spectrometry-assisted molecular imaging of metabolites during nitrogen fixation in the *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* symbiosis [J]. The plant journal,

- 2013,75(1):130-145.
- [6] UDVARDI M, POOLE P S. Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses[J]. Annual review of plant biology, 2013, 64(1):781-805.
- [7] ROSENDAHL L, DILWORTH M J, GLENN A R. Exchange of metabolites across the peribacteroid membrane in pea root nodules[J]. Journal of plant physiology, 1992, 139(5): 635-638.
- [8] WATSON R J, CHAN Y K, WHEATCROFT R, et al. *Rhizobium meliloti* genes required for C₄-dicarboxylate transport and symbiotic nitrogen fixation are located on a megaplasmid [J]. Journal of bacteriology, 1988, 170(2):927-934.
- [9] YURGEL S N, KAHN M L. Dicarboxylate transport by rhizobia[J]. FEMS microbiology reviews, 2004, 28(4):489-501.
- [10] LODWIG E, POOLE P. Metabolism of rhizobium bacteroids [J]. Critical reviews in plant sciences, 2003, 22:37-78.
- [11] LODWIG E M, HOSIE A H F, BOURDÈS A, et al. Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume *Rhizobium* symbiosis[J]. Nature, 2003, 422(6933):722-726.
- [12] RASTOGI V K, WATSON R J. Aspartate aminotransferase activity is required for aspartate catabolism and symbiotic nitrogen fixation in *Rhizobium meliloti*[J]. Journal of bacteriology, 1991, 173(9):2879-2887.
- [13] UCHIUMI T, OHWADA T, ITAKURA M, et al. Expression islands clustered on the symbiosis island of the *Mesorhizobium loti* genome[J]. Journal of bacteriology, 2004, 186(8): 2439-2448.
- [14] SCHWEMBER A R, SCHULZE J, DEL POZO A, et al. Regulation of symbiotic nitrogen fixation in legume root nodules[J/OL]. Plants, 2019, 8(9):333[2021-05-14]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31489914/>. doi:10.3390/plants8090333.
- [15] SULIEMAN S, TRAN L P. Asparagine, an amide of particular distinction in the regulation of symbiotic nitrogen fixation of legumes[J]. Critical reviews in biotechnology, 2013, 33(3): 309-327.
- [16] APPELS M A, HAAKER H. Glutamate oxaloacetate transaminase in pea root nodules : participation in a malate/aspartate shuttle between plant and bacteroid [J]. Plant physiology, 1991, 95(3):740-747.
- [17] MCDERMOTT T R, KAHN M L. Cloning and mutagenesis of the *Rhizobium meliloti* isocitrate dehydrogenase gene [J]. Journal of bacteriology, 1992, 174(14):4790-4797.
- [18] GREEN R T, EAST A K, KARUNAKARAN R, et al. Transcriptomic analysis of *Rhizobium leguminosarum* bacteroids in determinate and indeterminate nodules[J]. Microbial genomics, 2019, 5(2):1-16.

Role of aspartate aminotransferase in symbiotic nitrogen fixation of *Mesobrhorhizobium* MAFF303099

WANG Jingyi, CAO Yangrong, ZHU Hui

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

Abstract In order to find the regulatory genes related to symbiotic nitrogen fixation in rhizobia, homologous recombination was used to knock out 10 up-regulated genes during the symbiotic nitrogen fixation of *Lotus japonicus* and *Rhizobium* MAFF303099. The results showed that the nitrogenase activity of the $\Delta mlr5883$ was 40% lower than that of the wild-type MAFF303099. The morphology of infected cells did not change significantly, and replenishing *mlr5883* restored nitrogenase activity. It is predicted that *mlr5883* encodes an aspartate aminotransferase. The aspartate aminotransferase activity of this MLR5883 was 16.67 U/mg *in vitro*. The mutation of *mlr5883* affected the efficiency of nitrogen fixation, indicating that it may be involved in the metabolic process of supplying carbon sources to plants.

Keywords aspartate aminotransferase; *Mesobrhorhizobium* MAFF303099; symbiotic nitrogen fixation; homologous recombination

(责任编辑:张志钰)