



华癸根瘤菌 *urtB* 基因突变株的构建与共生固氮表型分析

周雪娟, 马春草, 李亚楠, 胡倡, 李友国*

华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 湖北 武汉 430070

摘要:【目的】尿素 ABC 转运体透性酶亚基编码基因 *urtB* 可能参与尿素代谢及支链氨基酸转运; 本文旨在获得实验证据阐明 *urtB* 基因对华癸根瘤菌结瘤和固氮的影响, 为深入研究其功能机制提供一定的科学依据。【方法】利用生物信息学分析 *urtB* 基因的结构特征及生物学功能, 通过荧光定量检测 *urtB* 基因在自生和共生条件下的时空表达特征和启动子原位表达技术检测 *urtB* 基因组织表达特征, 采用插入突变构建 *urtB* 突变株, 通过植物盆栽并结合添加氮素处理, 检测与分析突变体的共生固氮表型变化。【结果】分析表明 *urtB* 基因对于氮素转运非常重要, 在共生条件下的表达水平比自生培养条件下显著上调表达; 在成熟根瘤的固氮区中大量表达; 正确构建和筛选获得了根瘤菌 *urtB* 突变株; 接种 *urtB* 突变株与野生型菌株 7653R 相比较, 突变体根瘤发育异常; 植株地上部分生物量和根瘤固氮酶活性显著降低; 添加氮素可恢复其共生缺陷表型。【结论】华癸中慢生根瘤菌 *urtB* 基因可能通过影响根瘤中氮转运或同化, 进而在根瘤发育与共生固氮中发挥重要作用。

关键词: 华癸中慢生根瘤菌, *urtB*, 突变体, 共生固氮

根瘤菌具有多种多样的物质运输系统, 能够利用土壤和根际中的各种复合物^[1-2], 如运输氨基酸的 ABC 转运系统(ABC transporter)等。ABC 型尿素转运体是典型的 ABC 转运系统, 包括 1 个锚定基底物结合蛋白、2 个整合膜转运亚基和 2 个 ATP 结合蛋白。该系统是由 *urtABCDE* 基因簇编码, 其中 *urtA* 编码脂质锚定尿素结合蛋白, *urtB* 和 *urtC* 编码整合膜蛋白, 由尿素透性酶的 2 个亚

基组成, 而 *urtD* 和 *urtE* 编码 ATP 结合蛋白^[3]。在蓝细菌中, *urtA*、*urtB* 和 *urtE* 的突变导致蓝细菌减少尿素的吸收^[4]。在缺乏氮素的条件下, ABC 转运体才会诱导表达和合成, 尿素的吸收能力提高 3 倍以上。但是在有氮培养基中, 尿素转运体会停止或尿素吸收也被阻碍。根瘤菌是一种能够以类菌体形式存在于豆科植物根瘤中的革兰氏阴性菌, 一方面将氮气固定成植物所需氮源, 另一方

基金项目: 国家自然科学基金(31670243, 31772401); 华中农业大学科技创新基金(2662017PY052, 2662017PY121)

*通信作者。Tel: +86-27-87281685; Fax: +86-27-87280670; E-mail: youguoli@mail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2018-04-20; 修回日期: 2018-05-23; 网络出版日期: 2018-07-17

面利用植物所提供的碳源、氮源生存。有研究报道, 在豌豆根瘤菌(*Rhizobium leguminosarum*)中, 编码氨基酸透性酶 Aap 和 Bra 基因双突变后, 由于不能利用谷氨酸、谷氨酰胺、脯氨酸及天冬氨酸等氨基酸, 根瘤菌生长受到明显影响^[5]。另外, 在肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)中发现作为 ABC 转运体的 *psa* 透性酶不仅参与 Mn^{2+} 转运, 同时在系统毒性和抵御超氧化物及过氧化物中发挥重要作用^[6]。特别值得关注的是有研究报道在耻垢分枝杆菌中, 在氮饥饿处理条件下, *urtB* 基因上调表达 19.17^[7]。

华癸中慢生根瘤菌为我国特色的固氮资源, 具有宿主专一性, 其宿主为紫云英^[8-9]。7653R 基因组序列已注释完成, 根据本实验室 RNA-sequence 和 Microarray 以及建立的共生固氮子网络, *urtB*、*urtD* 和 *urtE* 在共生固氮中均上调表达, 其中 *urtB* 基因上调 16.8, 其余分别为 9.4 和 5.1^[10]。本研究利用生物信息学分析 UrtB 蛋白的结构特征及生物学功能, 通过荧光定量和启动子原位表达技术检测 *urtB* 在自生和共生条件下的时空和组织表达特征, 采用插入失活突变技术构建 *urtB* 突变株, 进行植物盆栽实验鉴定其共生表型, 以期获得直接证据阐明 *urtB* 基因在结瘤和固氮中的重要功能, 为深入研究 *urtB* 基因的功能机制奠定工作基础和科学思路。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 本实验所用供试菌株和质粒见表 1。

1.1.2 主要试剂及试剂盒: Ex Taq DNA 聚合酶、dNTPs、2×Taq Master Mix、限制性内切酶、T4-DNA 连接酶、M-MuLV 反转录酶、RNase 抑制剂购自 Ferments 公司和 TaKaRa 公司, 琼脂糖凝胶电泳 Marker 购自东盛公司, PCR 产物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。本研究所用 PCR 引物由武汉天一辉远生物科技有限公司合成, DNA 测序工作由天一辉远公司和南京金斯瑞生物科技有限公司完成。

1.1.3 引物: 本实验所用引物见表 2。

表 1. 菌株和质粒

Strains/Plasmids	Characteristics	Source
<i>M. huakuii</i> 7653R	Wild type, Str ^r	This lab
<i>E. coli</i> DH5α	Host of recombinant plasmids	This lab
<i>E. coli</i> S17-1	Host of transformation plasmids	This lab
pMD19-T(simple)	TA cloning vector, Amp ^r	TaKaRa Co.
pK19mob	Mutant strains construction vector, Kan ^r	This lab
pRG960	Str ^r , Spe ^r	This lab

表 2. 实验所需引物

Table 2. PCR primers used in this study

ID of primers	Sequences of primers(5'→3')	Characteristics
<i>urtB</i> -F	CCCAAGCTTAATTTCGACATTGGCGCTTTG	The forward primer of <i>urtB</i> exchange fragment
<i>urtB</i> -R	GCTCTAGACAGCACCAGCAGCAGCAGATC	The reverse primer of <i>urtB</i> exchange fragment
<i>urtB</i> -D	AAAGTATGCCCAATAGCCC	The verification primer of <i>urtB</i> mutant
M13-F	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	The common forward primer of pK19 vector
M13-R	AGCGGATAACAATTCACACAGG	The common reverse primer of pK19 vector
<i>urtB</i> -RT-F	TCGGGAGCGGTGAAGGA	The quantitative forward primer of <i>urtB</i>
<i>urtB</i> -RT-R	CGACGAAGGTGGTGTAGGC	The quantitative reverse primer of <i>urtB</i>
<i>urtB</i> -p-F	AACTGCAGCGGCGAAATCCAGGCCGA	The forward promoter primer of <i>urtB</i>
<i>urtB</i> -p-R	CGGGATCCCGTCATCGGCTTCTGTTAACCCCTT	The reverse promoter primer of <i>urtB</i>

1.2 培养基和培养条件

大肠杆菌的培养采用 LB 培养基, 在 37 °C 培养。7653R、突变株和定位菌株培养采用 TY 培养基, 筛选突变株采用 AMS 培养基, 在 28 °C 培养。

AMS 培养基(g/L): MOPS 4.190, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.114, NaCl 0.200, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.500, 加入 1 mL Solution A 和 2 mL Solution B 后, 调节 pH 至 7, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。Solution A (g/L): EDTA- Na_2 15.000, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.160, $NaMoO_4$ 0.200, H_3BO_3 0.250, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.200, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.020, $CoCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.001, 4 °C 长期保存。Solution B: $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1.28 g (定容至 50 mL), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.33 g (定容至 50 mL), 随后混匀为 100 mL, 混合溶液现配现用, 混合溶液 4 °C 贮存不超过 1 周。Solution C (g/L): Thiamine hydrochloride 1.000, D-Pantothenic acid calcium salt Biotin 2.000, Biotin 0.001, 过滤除菌, 4 °C 保存。

1.3 *urtB* 突变株、启动子表达定位菌株的构建及筛选

1.3.1 重组质粒的构建: 以 7653R 菌株基因组 DNA 为模板, *urtB*-F 和 *urtB*-R 引物扩增同源交换臂。PCR 反应条件: 95 °C 5 min, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物经 DNA 凝胶回收试剂盒回收后连接载体 pMD19-T (simple) 并转化至 DH5 α , PCR 验证后将阳性克隆送至南京金斯瑞测序。抽提测序正确的阳性克隆质粒和载体 pK19mob 质粒^[11]。以 *Hind* III、*Xba* I 双酶切阳性克隆质粒和 pK19mob, 回收双酶切后的目的片段、载体, 用 T4-DNA 连接酶连接后转化至 S17-1。PCR 检测阳性克隆并将正确的阳性克隆菌株命名为 *urtB*-pK19mob。

1.3.2 启动子表达定位菌株的构建: 通过网站

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/>) 预测 *urtB* 基因启动子序列, PCR 克隆目的片段并连接到 pRG960 载体^[12], 将构建好的重组质粒 *urtB*-pRG960 和空载 pRG960 质粒分别通过电转化到 7653R 感受态中。随后将通过 GUS 染色筛选得到的阳性菌株, 分别命名为 *urtB*-promoter 和 pRG960-CK。随后分别接种在紫云英根部。之后分别收取 10、17、25、30 d 的根, 经过简单清洗后放到 GUS 染液中, 37 °C 染色 3 h 以上, 随后在普通光学显微镜和体式显微镜下观察^[13]。

GUS 染液: 0.01 mol/L $K_4[Fe(CN)_6]$, 0.50 mol/L EDTA, 0.001% Triton X-100, 20% 甲醇, 0.019 mol/L X-Gluc, 0.050 mol/L PBS (pH 7.0)。

1.3.3 7653R Δ *urtB* 单交换突变株的筛选: 以 *urtB*-pK19mob 为供体菌、7653R 为受体菌, 进行两亲本接合转移。将 *urtB*-pK19mob 导入 7653R, 基因通过同源重组交换将质粒整合到染色体上, 从而使靶基因失活。采用含有 Str+Neo 的 AMS 选择性平板上筛选突变体^[14]。将筛选获得的单菌落转移到含有 Str+Neo 抗性的 TY 平板上, 以载体 pK19mob、通用引物 M13-F 与酶切位点对应的目的基因筛选引物 D 进行 PCR 检测, 同时用野生型 7653R 基因组 DNA 为模板作对照^[15]。

1.4 植物盆栽实验及共生表型的测定

1.4.1 植物盆栽实验: 用 75% 乙醇清洗紫云英种子表面 5 min, 2% (V/V) 的 NaClO 溶液表面消毒 10 min, 再用无菌水清洗 8–10 次, 彻底洗去 NaClO 残留, 消毒后的种子吸水膨胀 4–8 h 后铺于无菌素琼脂平板表面, 于 22 °C 培养箱(16 h 光照, 8 h 黑暗)中培养约 2–3 d 催芽。催芽后的种子播种含 Fahareus 无氮植物营养液的无菌沙盆, 每组处理 5 株, 约 3–5 d 植物幼苗长出第一片真叶后, 在根

系接种 1 mL ($OD_{600}=0.5$) 相对应的根瘤菌悬液, 光照培养箱培养 30 d。另外以 Fahareus 无氮植物营养液为基本营养液和 NH_4NO_3 配制所需营养液的无菌双层沙盆。

1.4.2 共生表型的测定: 观察植株长势并测定地上部分鲜重、瘤数、瘤重、固氮酶活(乙炔还原法)^[17]。

1.5 目标基因在自生和共生条件下的荧光定量表达检测

分别抽提自生条件下培养的华葵中慢生根瘤菌 7653R、接种 7653R 的紫云英 9、12、14、18、21、25、30、45、50 d 根瘤的 RNA, 纯化后测定 RNA 浓度, 均调至 2000 ng, 并进行反转录。RT-PCR 程序: 42 °C 1 h; 72 °C 10 min。

1.6 荧光定量 PCR

先用普通 PCR 将内参基因亮度调一致, 然后用目标基因进行扩增, 若条带单一, 大小正确, 再进行荧光定量 PCR 检测, 内参基因为 *rnpB*。Real-time qPCR 程序: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s; 60 °C 20 s, 72 °C 20 s, 40 个循环。信号检测染料使用 SYBR Green, 分析相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 值的方法^[18-19]。

1.7 目标基因的生物信息学分析

利用 NCBI 网站根据目标基因的 ID 名称查找编码蛋白质的序列及名称, 然后通过 NCBI

Conserved Domain Search 网页分析靶蛋白的保守结构域, 根据保守结构域预测靶蛋白的功能; 将蛋白序列通过 BLASTp 比对查找同源蛋白, 挑选不同物种的同源蛋白序列, 使用 DNAMAN 软件进行蛋白同源比对分析, 使用 Clustal X 和 MEGA7 软件的邻位相接法系统(bootstrap N-J Tree)来构建系统发育树。

2 结果和分析

2.1 *urtB* 基因编码蛋白的结构域和功能分析

基于前期工作基础, 我们分析了系列目标基因在共生根瘤中的表达变化, 发现 *urtB*、*urtD* 和 *urtE* 等在共生固氮条件下均显著上调表达, 其中 *urtB* 上调 16.8 倍, *urtD* 上调 9.4 倍, *urtE* 上调 5.1 倍^[10-20]。这表明 ABC 型尿素转运体在共生固氮中应该发挥重要功能。*urtB* 基因全长 1614 bp, 编码 537 个氨基酸, 分子量预期大小为 56.6 kDa。我们进一步在 NCBI 上分析了 *urtB* 基因编码蛋白的保守结构域(图 1)。

通过基本的生物信息分析发现, UrtB 蛋白氨基酸序列包含一个 TM-ABC transporter signature motif 和 urea_trans_UrtB 结构域, 含有该结构域的蛋白超家族参与尿素的代谢和循环。蓝细菌中的研究表明该基因缺失造成高亲和力尿素转运的缺失^[4]。UrtB 在苜蓿根瘤菌 2011 中的同源基因

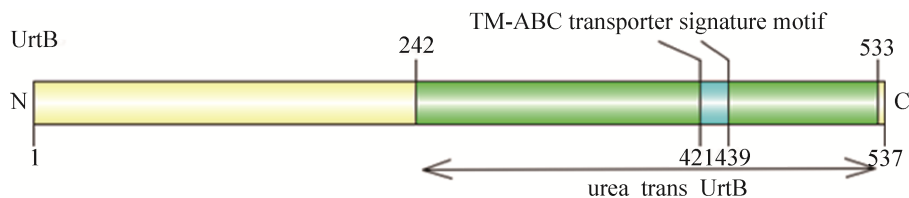


图 1. UrtB 保守结构域示意图

Figure 1. Structure diagram of the conserved domain of UrtB protein.

蛋白是 SMb20604, 在苜蓿根瘤中该基因在感染区、过渡区和固氮区均有表达, 其中在感染区和固氮区的表达量最高。因此, 以上分析提示该类基因在根瘤固氮中具有重要作用。

2.2 *urtB* 基因的同源性比对和系统发育分析

将 *urtB* 基因编码的氨基酸序列在 NCBI 中进行 BLASTp 比对分析, 将搜索得到的不同物种中该基因的同源蛋白构建一个子系统发育树(图 2)。从系

统发育树可看出, *urtB* 基因在中慢生根瘤菌中构成一个相对独立的进化枝, 且与 *Mesorhizobium* sp. SEMIA 3007 (WP_069092226.1)、*Mesorhizobium loti* (WP_064985651.1) 等关系更近。这表明 *urtB* 基因在中慢生根瘤菌属中相当保守。进一步选取 *urtB* 基因编码蛋白与几种较近的中慢生根瘤菌同源蛋白进行氨基酸序列比对, 结果表明 UrtB 与 *Mesorhizobium loti* (WP_064985651.1) 氨基酸序列同源性最高。

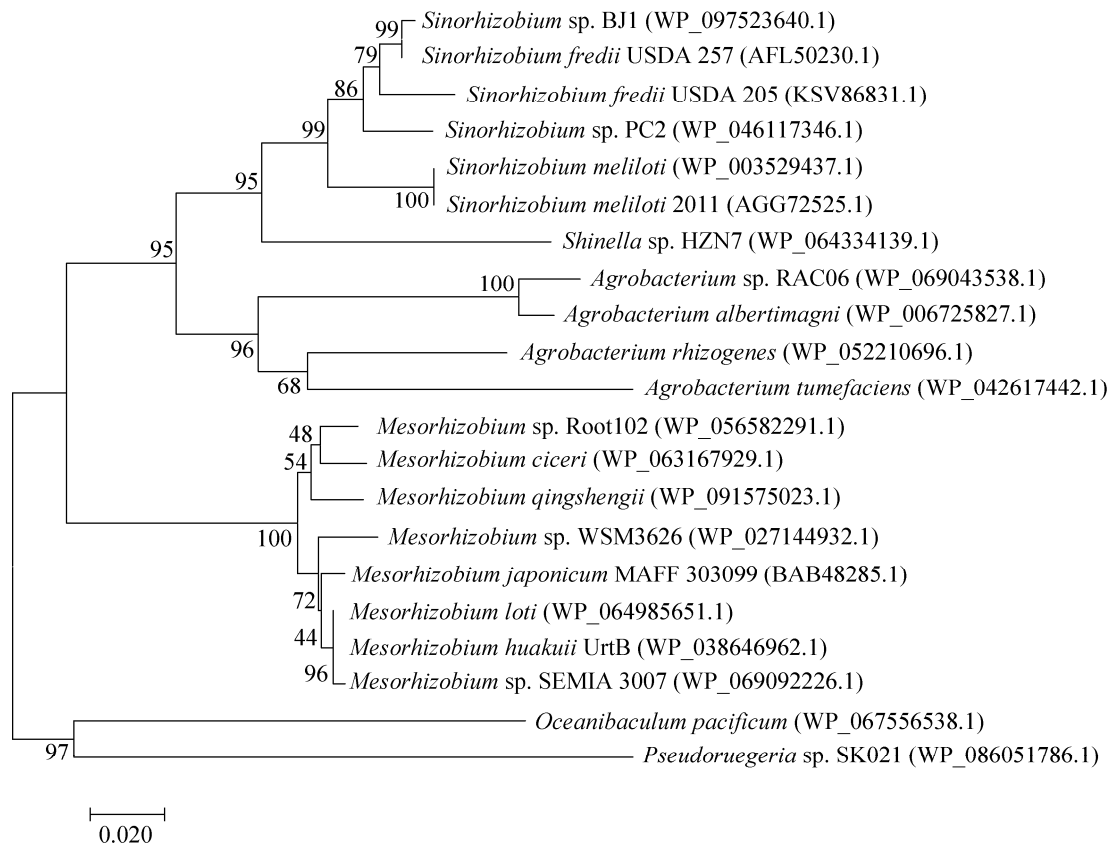


图 2. UrtB 及同源蛋白的系统发育分析

Figure 2. Phylogenetic analysis of the UrtB and homologous proteins. The phylogenetic tree of UrtB was constructed basing on amino acid sequences. The phylogenetic tree showing relationships between UrtB protein and some highly homologous members from *Mesorhizobium* sp. SEMIA 3007 (WP_069092226.1) and *Mesorhizobium loti* (WP_064985651.1). The neighbor-joining phylogenetic tree was constructed using MEGA 7.0 software. Bootstrap values (%) were calculated by 1000 resampling repetitions. The number in parentheses represents the accession of protein. Node number represents the confidence level of relatives, the length of branches represents the evolutionary distance and the coefficient is 0.020.

2.3 *urtB* 基因在自生和共生条件下的表达水平和动态变化

为了探究 *urtB* 基因在 7653R 中的表达特性, 分别收获接种 *M. huakuii* 7653R 生长到第 9、12、14、18、21、25、30、45、50 天的根瘤以及自生条件下培养到对数期的 7653R, 抽提 RNA 并反转录获得 cDNA, 进行 Real-time PCR 定量分析。PCR 定量分析以编码 RNaseP 的 *rnpB* 为内参基因。结果显示在共生根瘤的各个时期 *urtB* 基因均增强表达, 且在 12、14 d 表达量提高 10 倍以上(图 3)。

2.4 *urtB* 基因启动子在共生条件下的原位表达分析

本文进行了 *urtB* 基因启动子表达定位的 GUS 染色和检测, 结果显示 *urtB* 基因在早期侵染的根毛、侵染线以及早期根瘤中不表达。但是, *urtB* 基因在接种 10 d 根瘤中的侵染区有少量表达(图 4-A), 在 17–30 d 的根瘤固氮区中大量表达(图 4-B–D)。这表明 *urtB* 基因与根瘤发育和共生固氮功能密切相关。

2.5 7653R *urtB* 突变体菌株的构建和鉴定

以 7653R 总基因组 DNA 为模板, 扩增大小为 849 bp 的同源片段, 电泳结果表明大小与预期相

符(图 5-A); 测序正确克隆经 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切与同样双酶切的载体 pK19mob 酶连, 转化 *E. coli* DH5 α , 抽提质粒酶切验证。重组质粒导入华癸根瘤菌 7653R 中, 重组质粒上交换片段与根瘤菌基因组中的 *urtB* 基因发生同源重组, 整合到染色体上, 进而将该基因失活。

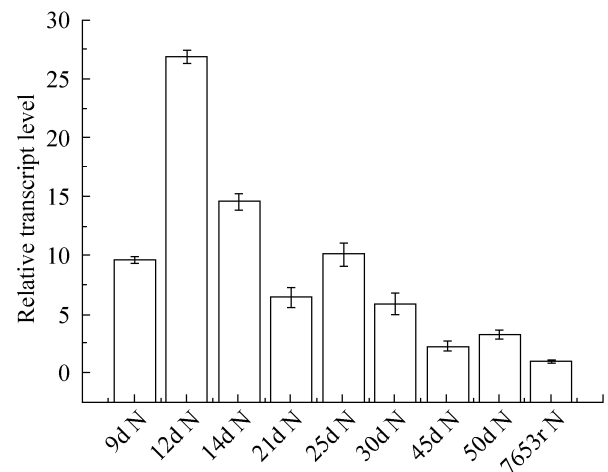


图 3. *urtB* 在培养条件和不同时期根瘤中的动态表达 Figure 3. The dynamic expression patterns of *urtB* under free-living condition and different-staged root nodules. From left to right: nodules collected at 9, 12, 14, 21, 25, 30, 45 and 50 d respectively; 7653R of free-living cells. The error bars represent the standard deviations of three independent experiments.

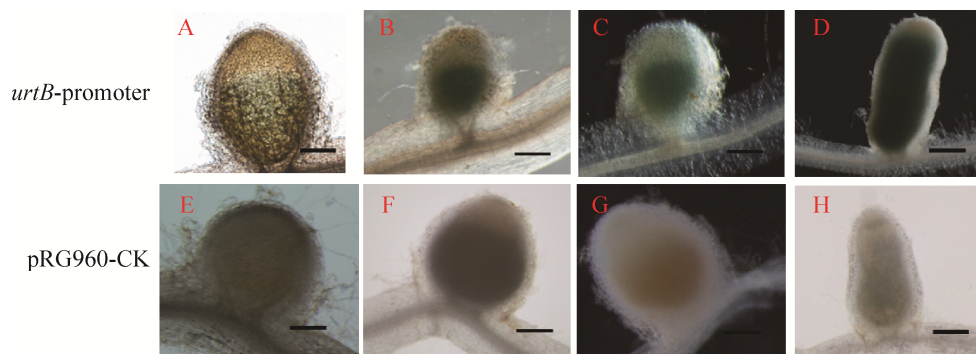


图 4. *urtB* 启动子在根瘤发育过程中的原位时空表达检测

Figure 4. Spatial and temporal expression analysis of *urtB* promoter in nodules. A–D: *urtB* fusion with GUS staining observation of nodules collected at 10, 17, 25 and 30 d respectively; E–H: pRG960-CK GUS staining observation of nodules at 10, 17, 25 and 30 d respectively; Bar=500 μ m (A); Bar=100 μ m (B–H).

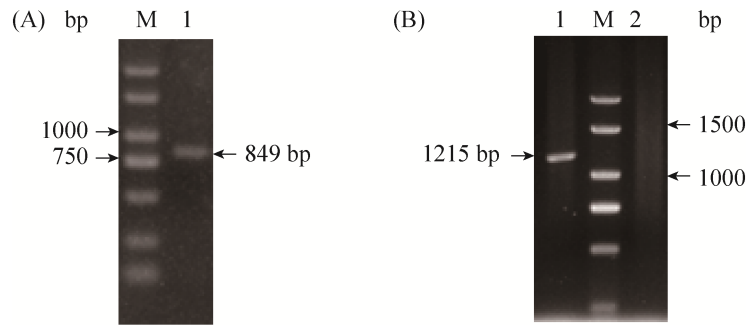


图 5. 7653R Δ urtB 突变株的 PCR 检测鉴定

Figure 5. Identification of 7653R Δ urtB mutant by PCR. M: DL2000 DNA marker; lane 1: PCR product of *urtB* mutant genomic DNA; lane 2: PCR products of wild-type 7653R genomic DNA.

抽提菌落总 DNA 进行 PCR, 以载体 pK19mob 的通用引物 M13-F 与酶切位点对应的目的基因的筛选引物 *urtB*-D 进行 PCR 验证, 同时采用野生型 7653R 总 DNA 模板为阴性对照, 使用 M13-F 和 *urtB*-D 扩增的 Δ urtB 突变株的 PCR 产物约为 1215 bp (图 5-B), 片段大小与预期相符, 7653R 阴性对照组无条带扩出。结果表明 Δ urtB 突变体构建正确。

2.6 7653R Δ urtB 突变株的共生固氮表型检测和分析

以 7653R 和 7653R Δ urtB 为接种菌株, 不接菌为对照, 进行紫云英盆栽实验。光照培养箱中培养 30 d 后收集植株。由地上部分长势可看出, 接种 7653R 的紫云英植株, 长势正常、叶片绿色, 而接种 7653R Δ urtB 的紫云英植株长势矮小、叶片发黄, 表现出明显的氮饥饿状态(图 6-A)。同时, 观察植株地下部分表型可见, 接种 7653R 的植株根系发达, 根瘤数量多且为粉色根瘤, 而突变株根瘤为白色根瘤, 对照植株不结瘤(图 6-B)。石蜡切片结果显示接种 30 d 的野生型植株所结根瘤正处于旺盛的固氮时期, 各个分区明显, 且固氮区占大部分, 含菌组织体积较大(图 6-C 左), 这表明根瘤固氮活力旺盛。而突变植株根瘤固氮区含菌细胞明显较少, 部分细胞呈现衰老裂解状态(图 6-C 右), 这与

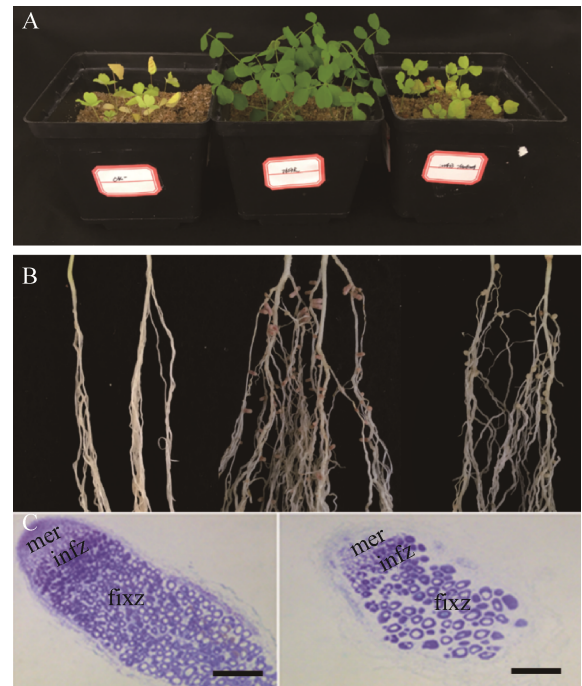


图 6. 7653R Δ urtB 突变株与紫云英的共生表型测定分析
Figure 6. Symbiosis phenotypes of 7653R Δ urtB mutant tested on *Astragalus sinicus*. A: Appearances of plant growth, negative control (without inoculation of any rhizobia strain) (left), 7653R-wild type (middle) and 7653R Δ urtB mutant (right); B: Appearances of root nodulations, control (left), 7653R-wild type (middle) and 7653R Δ urtB mutant (right); C: Microscopic observations for the development of root nodules. Paraffin-embedded slides of longitudinal section of 30 d nodules stained with toluidine blue. 7653R nodule (left) and 7653R Δ urtB mutant nodule (right). mer, meristem; infz, infection zone; fixz, nitrogen fixation zone. Bars=500 μ m.

植物长势矮小, 固氮酶活降低的盆栽表型相吻合。表明 *urtB* 基因在固氮时期发挥重要作用。进一步, 对植株地上部分鲜重、瘤数、瘤重及固氮酶活性进行数据统计分析(图 7), 结果发现接种突变体菌株与野生型菌株相比, 在地上部分鲜重、瘤数、瘤重及根瘤固氮酶活性均存在显著性差异 ($P < 0.05$, $n=12$)。

2.7 补加氮素处理可恢复 7653R Δ *urtB* 的共生固氮缺陷表型

为了确认上述共生固氮缺陷表型(植株所表现出的缺氮特征)确实是由于目标基因 *urtB* 的功能失活所导致的, 我们进一步在盆栽中额外补充

氮素, 并检测在接种 7653R Δ *urtB* 后紫云英的共生表型。结果表明, 野生型组根瘤为正常粉色根瘤, 加氮处理组突变株所结根瘤仍为白色小根瘤, 但植物叶片呈绿色(图 8)。经统计学分析, 瘤数、瘤重及固氮酶活与野生型相比仍表现出显著性差异, 但地上部分鲜重较野生型无显著性差异(表 3)。所以不难看出, 补充氮素能够弥补由于 *urtB* 基因固氮转运功能缺失所导致的共生植株缺氮表型, 使得植物此时能够正常生长, 从而地上部分生物量与野生型无差异。这个结果进一步说明该基因可能参与共生固氮过程中类菌体所固定有机氮素的转运或同化吸收。

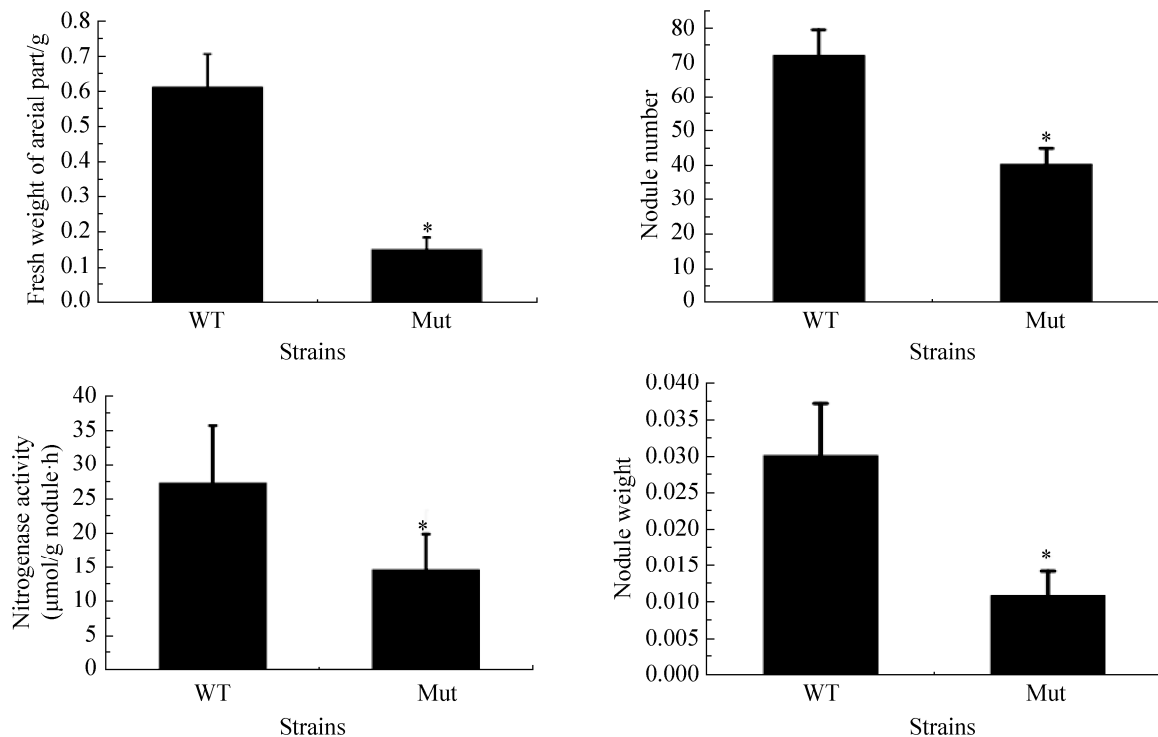


图 7. 植株地上部分鲜重、瘤数、瘤重及固氮酶活的比较测定

Figure 7. Comparative quantification of the fresh weight of plant, number of nodule, nitrogenase activity and fresh weight of nodule induced by 7653R Δ *urtB* mutant. *: significant difference at $P < 0.05$; the error bars represent the standard deviations of three independent experiments.

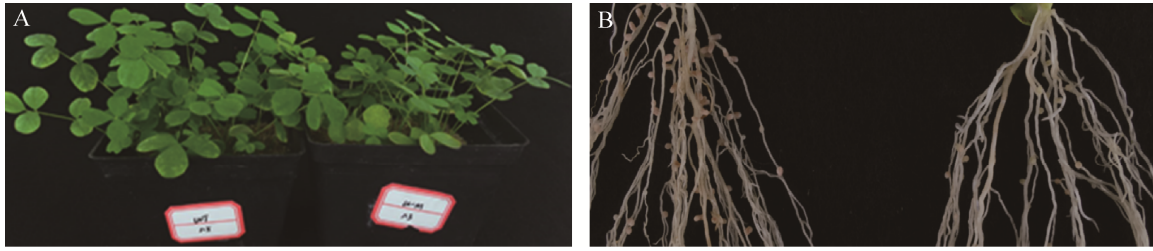


图 8. 补加氮素处理条件下 *urtB* 突变株共生固氮缺陷表型的恢复

Figure 8. Symbiosis phenotype restoration of *urtB* mutant after N addition treatment in pot plant experiment. A: Appearances of plant growth, 7653R-wild type (left, no nitrogen addition) and 7653R Δ *urtB* mutant (right, with nitrogen addition); B: Appearances of root nodulations, 7653R-wild type (left, no nitrogen addition) and 7653R Δ *urtB* mutant (right, with nitrogen addition).

表 3. 7653R Δ *urtB* 共生固氮缺陷表型的恢复测定

Table 3. Symbiosis phenotypes restoration of 7653R Δ *urtB* by the addition nitrogen in pot experiment

Group	Fresh weight of plant/(g/plant)	Number of nodule/(plant)	Fresh weight of nodule/(g/plant)	Nodule nitrogenase activity/(μ mol/g nodule h)
WT-7653R	0.57 ^a \pm 0.06	36.5 ^a \pm 0.16	0.09 ^a \pm 0.01	13.88 ^a \pm 2.52
7653R Δ <i>urtB</i> +N	0.48 ^a \pm 0.04	20.67 ^b \pm 0.33	0.02 ^b \pm 0.02	6.27 ^b \pm 1.11

The data is average of three replicates; values in each column followed by the different letter indicate significance difference ($P < 0.05$).

3 讨论

生物固氮是指固氮微生物将空气中的 N_2 还原成 NH_4^+ 的过程。根瘤菌与宿主豆科植物相互作用形成根瘤, 主要以类菌体(bacteroids)形式进行生物固氮作用。根瘤菌与宿主豆科植物两者互利共生, 宿主豆科植物为根瘤菌提供作为碳源、能源以及还原力的四碳二羧酸, 作为回报^[21], 根瘤菌将类菌体中固定的有机氮分泌供给植物利用, 同时自身生长也需要氮素。

在蓝细菌的研究报道中发现, *urtB* 基因可能参与运输、结合蛋白、氨基酸、肽和胺, 该超家族蛋白对于氮素转运非常重要。在耻垢分枝杆菌中有研究报道, 调控氮代谢的转运体也包括尿素 ABC 转运体^[21]。通过生物信息学分析, 我们发现 7653R *urtB* 基因的保守结构域与蓝细菌非常相似。

系统发育分析该基因在中慢生根瘤菌中较为保守, 暗示了 *urtB* 基因可能参与中慢生根瘤菌中共生体的形成及共生固氮中 N 素的运输。为了探究华癸根瘤菌 *urtB* 基因对根瘤发育及共生固氮的影响, 本文进行了一系列实验及检测分析。转录组分析显示 *urtB* 基因在共生固氮时期上调表达 16.8。荧光定量测定显示, 该基因在根瘤形成及共生固氮过程中的表达量都明显升高, 说明了 *urtB* 基因参与根瘤形成与共生固氮过程。我们构建筛选了 *urtB* 基因单交换突变体^[22-23], 并检测在缺氮条件下接种紫云英的共生表型。盆栽实验结果显示, *urtB* 基因突变株地上部分矮小, 叶片发黄, 根瘤颜色为白色, 根瘤较小。突变体植株地上部分鲜重、瘤数、瘤重及固氮酶活均显著性降低。石蜡切片观察发现 *urtB* 基因突变导致根瘤含菌细胞少、类菌体数量少。这些结果均表明 *urtB* 基因

与根瘤发育及共生固氮密切相关。在有氮条件下接种 *urtB* 突变株后发现, 突变株所结根瘤仍为白色小根瘤, 瘤数、瘤重及固氮酶活仍然很低, 但地上部分长势和叶色与接种野生型 7653R 菌株无明显差异, 这进一步说明该基因可能参与根瘤发育和共生固氮过程中氮素的运输。另外共生体膜上还存在大量其他的转运系统, 如 MgtE 在豌豆根瘤中被推测为 Mg^{2+} 转运子, 它的缺失突变影响到镁的代谢及 Mg^{2+} -ATP 参与的固氮作用, 产生结瘤不固氮的共生表型(Fix-)^[24]; 百脉根硫转运子 SST1 缺失突变后, 影响到电子传递而产生结瘤不固氮的共生表型(Fix-)^[25]; *urtB* 基因缺失之后导致了紫云英结瘤不固氮, 可能影响到类菌体所固定有机氮素的转运或同化吸收。

本文首次研究了根瘤菌中尿素 ABC 转运体在氮素转运中对共生固氮的影响。我们通过生物信息学及实验结果分析, 认为中慢生根瘤菌中 *urtB* 基因可能在根瘤发育及共生固氮过程中参与氮素的转运, 但具体的转运机制还有待进一步实验研究。可通过免疫电镜来观察根瘤中该基因蛋白的表达定位; 还可通过抽提突变株根瘤 RNA, 采用荧光定量方法检测其上下游基因 *urtD*、*urtE* 表达情况, 以及固氮酶铁蛋白 *nifH* 及谷氨酰胺合成酶 GS 基因等的表达^[10]。

参 考 文 献

- [1] Galibert F, Finan TM, Long SR, Pühler A, Abola P, Ampe F, Barloy-Hubler F, Barnett MJ, Becker A, Boistard P, Bothe G, Boutry M, Bowser L, Buhrmester J, Cadieu E, Capela D, Chain P, Cowie A, Davis RW, Dréano S, Federspiel NA, Fisher RF, Gloux S, Godrie T, Goffeau A, Golding B, Gouzy J, Gurjal M, Hernandez-Lucas I, Hong A, Huizar L, Hyman RW, Jones T, Kahn D, Kahn ML, Kalman S, Keating DH, Kiss E, Komp C, Lelaure V, Masuy D, Palm C, Peck MC, Pohl TM, Portetelle D, Purnelle B, Ramsperger U, Surzycki R, Thébault P, Vandenbol M, Vorhölter FJ, Weidner S, Wells DH, Wong K, Yeh KC, Batut J. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science*, 2001, 293(5530): 668–672.
- [2] Young JP, Crossman LC, Johnston AW, Thomson NR, Ghazoui ZF, Hull KH, Wexler M, Curson AR, Todd JD, Poole PS, Mauchline TH, East AK, Quail MA, Churcher C, Arrowsmith C, Cherevach I, Chillingworth T, Clarke K, Cronin A, Davis P, Fraser A, Hance Z, Hauser H, Jagels K, Moule S, Mungall K, Norbertczak H, Rabinowitsch E, Sanders M, Simmonds M, Whitehead S, Parkhill J. The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. *Genome Biology*, 2006, 7(4): R34–R89.
- [3] Sachs G, Kraut JA, Wen Y, Feng J, Scott DR. Urea transport in bacteria: acid acclimation by gastric *Helicobacter* spp. *The Journal of Membrane Biology*, 2006, 212(2): 71–82.
- [4] Valladares A, Montesinos ML, Herrero A, Flores E. An ABC-type, high-affinity urea permease identified in *Cyanobacteria*. *Molecular Microbiology*, 2002, 43(3): 703–715.
- [5] Hosie AHF, Allaway D, Galloway CS, Dunsby HA, Poole PS. *Rhizobium leguminosarum* has a second general amino acid permease with unusually broad substrate specificity and high similarity to branched-chain amino acid transporters (Bra/LIV) of the ABC family. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(15): 4071–4080.
- [6] McAllister LJ, Tseng HJ, Ogunniyi AD, Jennings MP, McEwan AG, Paton JC. Molecular analysis of the PSA permease complex of *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology*, 2004, 53(3): 889–901.
- [7] Jessberger N, Lu Y, Amon J, Titgemeyer F, Sonnewald S, Reid S, Burkovski A. Nitrogen starvation-induced transcriptome alterations and influence of transcription regulator mutants in *Mycobacterium smegmatis*. *BMC Research Notes*, 2013, 6(10): 482–524.
- [8] Li YX, Li F, Zhou XL, Xie FL, Li YG. Screening proteins interacting with the outer membrane protein opa22 in *Mesorhizobium huakuii* 7653R with bacterial two-hybrid library. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2014, 33(2): 28–33. (in Chinese)
李一星, 李芳, 周鑫兰, 谢福莉, 李友国. 利用细菌双杂交文库筛选华葵中慢生根瘤菌 7653R 中与外膜蛋白 Opa22 互作的蛋白. *华中农业大学学报*, 2014, 33(2): 28–33.

- [9] Li YX, Wang JY, Shi XF, Chen DS, Li YG. Activity *in vitro* and function of a non-specific lipid transfer protein *AsIB259* from *Astragalus sinicus* in symbiotic nitrogen fixation. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2014, 33(2): 19–25. (in Chinese)
李一星, 王建云, 石晓峰, 陈大松, 李友国. 紫云英非特异性转脂蛋白 *AsIB259* 的体外酶活性及在共生固氮中的功能. *华中农业大学学报*, 2014, 33(2): 19–25.
- [10] Peng JL, Hao BH, Liu L, Wang SM, Ma BG, Yang Y, Xie FL, Li YG. RNA-Seq and microarrays analyses reveal global differential transcriptomes of *Mesorhizobium huakuii* 7653R between bacteroids and free-living cells. *PLoS One*, 2014, 9(4): e93626.
- [11] Heil JR, Cheng J, Charles TC. Site-specific bacterial chromosome engineering: $\Phi 31$ integrase mediated cassette exchange (IMCE). *Journal of Visualized Experiments*, 2012, (61): e3698.
- [12] van den Eede G, Deblaere R, Goethals K, van Montagu M, Holsters M. Broad host range and promoter selection vectors for bacteria that interact with plants. *Molecular Plant Microbe Interact*, 1992, 5(3): 228–234.
- [13] Wang C, Zhu H, Jin LP, Chen T, Wang LX, Kang H, Hong ZJ, Zhang ZM. Splice variants of the *SIP1* transcripts play a role in nodule organogenesis in *Lotus japonicus*. *Plant Molecular Biology*, 2013, 82(1/2): 97–111.
- [14] Tang GR, Li NN, Liu YM, Yu LM, Yu LL, Yan JH, Luo L. *Sinorhizobium meliloti* glutathione reductase is required for both redox homeostasis and symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(3). DOI: 10.1128/AEM.01937-17.
- [15] Li YN, Zeng XB, Zhou XJ, Li YG. Cloning, mutagenesis and symbiotic phenotype of three lipid transfer protein encoding genes from *Mesorhizobium huakuii* 7653R. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(12): 1901–1911. (in Chinese)
李亚楠, 曾小波, 周雪娟, 李友国. 华癸中慢生根瘤菌 7653R 3 个脂质转运蛋白基因的克隆、突变及共生表型. *微生物学报*, 2016, 56(12): 1901–1911.
- [16] Kuai JL, Liu XJ, Li WQ. Effects of different nitrogen levels on the growth characteristics of alfalfa inoculated with rhizobium. *Grassland and Turf*, 2011, 31(3): 56–59,63. (in Chinese)
蒯佳林, 刘晓静, 李文卿. 不同氮素水平对接种根瘤菌紫花苜蓿生长特性的影响. *草原与草坪*, 2011, 31(3): 56–59,63.
- [17] Li YX, Zhou L, Li YG, Chen DS, Tan XJ, Lei L, Zhou JC. A nodule-specific plant cysteine proteinase *AsNODF32* is involved in nodule senescence and nitrogen fixation activity of the green manure legume *Astragalus sinicus*. *New Phytologist*, 2008, 180(1): 185–192.
- [18] Estrada-Navarrete G, Cruz-Mireles N, Lascano R, Alvarado-Affantranger X, Hernández-Barrera A, Barraza A, Olivares JE, Arthikala M, Cárdenas L, Quinto C, Sanchez F. An autophagy-related kinase is essential for the symbiotic relationship between *Phaseolus vulgaris* and both *Rhizobia* and *Arbuscular Mycorrhizal Fungi*. *The Plant Cell*, 2016, 28(9): 2326–2341.
- [19] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [20] Wang SM, Hao BH, Li JR, Gu HL, Peng JL, Xie FL, Zhao XY, Frech C, Chen NS, Ma BG, Li YG. Whole-genome sequencing of *Mesorhizobium huakuii* 7653R provides molecular insights into host specificity and symbiosis island dynamics. *BMC Genomics*, 2014, 15: 440.
- [21] Prell J, Poole P. Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. *Trends in Microbiology*, 2006, 14(4): 161–168.
- [22] Schafer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler A. 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*. *Gene*, 1994, 145(1): 69–73.
- [23] Abd-ElKarem Y, Elbers T, Reichelt R, Steinbüchel A. Heterologous expression of *Anabaena* sp. PCC7120 cyanophycin metabolism genes *cphA1* and *cphB1* in *Sinorhizobium (Ensifer) meliloti* 1021. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 89(4): 1177–1192.
- [24] Karunakaran R, Ramachandran VK, Seaman JC, East AK, Mouhsine B, Mauchline TH, Prell J, Skeffington A, Poole PS. Transcriptomic analysis of *Rhizobium leguminosarum biovar viciae* in symbiosis with host plants *Pisum sativum* and *Vicia cracca*. *Journal Bacteriology*, 2009, 191(12): 4002–4014.
- [25] Krusell L, Krause K, Ott T, Desbrosses G, Krämer U, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, James EK, Sandal N, Stougaard J, Kawaguchi M, Miyamoto A, Sukanuma N, Udvardi MK. The sulfate transporter SST1 is crucial for symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus* root nodules. *The Plant Cell*, 2005, 17(5): 1625–1636.

Construction and analysis of symbiotic phenotypes of *urtB* mutant in *Mesorhizobium huakuii* 7653R

Xuejuan Zhou, Chuncao Ma, Yanan Li, Chang Hu, Youguo Li*

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei Province, China

Abstract: [Objective] Urea ABC-transporter permease subunit UrtB may be involved in urea metabolism and branched-chain amino acid transport. This study aimed to obtain experimental evidence to clarify the effect of *urtB* gene on the nodulation and nitrogen fixation of *Mesorhizobium huakuii* and provide scientific basis for further study of its functional mechanism. [Methods] The structure characteristics and biological functions of UrtB protein were analyzed by bioinformatics, the expression pattern of *urtB* gene under free-living growth and symbiosis conditions were detected by fluorescent quantitative real-time PCR, and in situ expression of *urtB* gene in nodule tissue during nodulation process were detected by promoter fusion with β -glucuronidase activity. The *urtB* gene mutant was constructed by site-directed insertion, pot plant experiments and in combination with nitrogen addition treatment were carried out to identify symbiotic phenotypes and restoration. [Results] It showed that the *urtB* gene was anticipated to be involved in nitrogen transport of rhizobia. The expression level of *urtB* gene under symbiotic conditions was significantly up-regulated compared to that under free-living conditions, and *urtB* gene was highly expressed in the nitrogen-fixing zone of the mature nodules; an *urtB* mutant of 7653R was screened and obtained. Compared with the wild-type strain 7653R, the 7653R Δ *urtB* mutant inoculated with host plant resulted in an abnormal development of the nodule, and the above ground biomass of plants and nodule nitrogenase activity were significantly decreased. Adding nitrogen in the pot experiment could restore its symbiotic defective phenotype. [Conclusion] The *urtB* gene of *Mesorhizobium huakuii* may affect nitrogen transport or assimilation in root nodules, and therefore it plays an important role in root nodule development and symbiotic nitrogen fixation.

Keywords: *Mesorhizobium huakuii*, *urtB*, mutant, symbiotic nitrogen fixation

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31670243, 31772401) and by the Fundamental Research Funds for Huazhong Agricultural University (2662017PY052, 2662017PY121)

*Corresponding author. Tel: +86-27-87281685; Fax: +86-27-87280670; E-mail: youguoli@mail.hzau.edu.cn

Received: 20 April 2018; Revised: 23 May 2018; Published online: 17 July 2018