



## 花生根瘤菌 *Bradyrhizobium* sp. MZ5 III 型分泌系统调节基因 *ttsI* 突变体的功能分析

李婷, 李雪, 阮华钦, 赖永秀, 陈静瑜, 胡美娟, 谷峻\*

华南师范大学生命科学学院, 广东 广州 510631

**摘要:**【目的】探究慢生型花生根瘤菌 III 型分泌系统在花生-根瘤菌互作的功能。【方法】本研究采用同源重组和三亲本接合转移的方法, 构建 *Bradyrhizobium* sp. MZ5 的 III 型分泌系统调节基因 *ttsI* 突变体; 荧光定量 PCR 检测添加大豆苷元(Daidzein)和染料木黄酮(Genistein)诱导物后野生型和突变株转录水平上 *ttsI* 的表达量变化及其差异; 蛭石结瘤实验分析 *ttsI* 基因突变对花生结瘤能力的影响。【结果】在转录水平上, 大豆苷元和染料木黄酮对 MZ5 的 III 型分泌系统调节基因 *ttsI* 的表达具有显著的抑制作用 ( $P<0.05$ )。在 MZ5 $\Delta$ *ttsI* 突变体中 *ttsI* 基因的表达量都明显下调, 与野生型菌株的相比都达到极显著水平 ( $P<0.001$ )。蛭石结瘤实验表明, 与野生型菌株相比, MZ5 $\Delta$ *ttsI* 突变体在不同花生品种的结瘤数和地上部干重都显著性降低。根瘤石蜡切片表明, MZ5 $\Delta$ *ttsI* 突变体在根瘤内的含菌量少于野生型菌株。【结论】*Bradyrhizobium* sp. MZ5 菌株中的 III 型分泌系统在花生-根瘤菌互作中对结瘤有积极的促进作用。

**关键词:** 花生根瘤菌, 黄酮类物质, III 型分泌系统, 结瘤

与花生建立共生关系的根瘤菌以慢生型根瘤菌为主, 它们以相对古老的“裂隙侵染(crack entry)”方式进入宿主。研究发现, 以“侵染线”方式入侵的根瘤菌中, III 型分泌系统(T3SS)参与根瘤菌-豆科植物相互作用, 在一定程度上影响根瘤菌的共生专一性, 并且 III 型分泌系统调节基因 *ttsI* 受植物类黄酮物质的诱导, 进而转录调节因子 TtsI 会调节 III 型分泌系统相关基因的表达, 在菌植互动中起着有益、有害或中性作用<sup>[1-3]</sup>。菌株 USDA122

的 T3SS 调控基因 *ttsI* 突变后接种到大豆品种 Hardee, 与野生型菌株相比, 突变菌株获得了结瘤能力<sup>[4]</sup>。*B. elkanii* SEMIA587 中转录调节基因 *ttsI* 突变后, 分别接种 3 个不同的大豆品种 Embrapa 48、Peking 和 McCall, 与野生型相比, 在前两种大豆品种上,  $\Delta$ *ttsI* 突变体的结瘤数明显下降; 但在后者中,  $\Delta$ *ttsI* 突变体对结瘤几乎没有影响<sup>[5]</sup>。当 *M. loti* 的 T3SS 转录调节基因 *ttsI* 缺失后, 表现为在 *Lotus corniculatus* subsp. frondosus

基金项目: 国家自然科学基金(31570006); 广东省自然科学基金(2015A030313380)

\*通信作者。Tel/Fax: +86-20-85211327; E-mail: gujun@senu.edu.cn

收稿日期: 2018-04-17; 修回日期: 2018-06-04; 网络出版日期: 2018-09-08

中结瘤数减少, 然而在 *Lotus halophilus* 中结瘤数却明显增加<sup>[6]</sup>。相比之下, 目前对 III 型分泌系统以“裂隙侵染”的花生-根瘤菌互作中的功能研究相对滞后。

大豆根部主要分泌大豆苷元和染料木黄酮来吸引根瘤菌, 并且近期研究发现大豆在营养生长的不同阶段, 根部分泌的大豆苷元和染料木黄酮等黄酮类化合物的种类和含量会发生变化, 尤其是在氮饥饿条件下, 大豆根际分泌物中的大豆苷元和染料木黄酮分别增加了 8 倍和 15 倍<sup>[7]</sup>。此外, 有研究者发现不同花生品种在幼苗期黄酮类化合物的含量存在差异, 以大豆苷元为主而几乎检测不到染料木黄酮化合物的存在<sup>[8]</sup>。因此, 本研究选取了这两种黄酮类化合物考察其对慢生型花生根瘤菌 III 型分泌系统的影响。本实验室前期研究发现一群新的结瘤遗传型<sup>[9]</sup>, 其代表菌株为 MZ5。为进一步明确 MZ5 的 III 型分泌系统在菌植互作中的功能, 本研究首先构建了该菌株的 III 型分泌系统的调节基因 *ttsI* 的突变体, 在转录水平上探究了不同黄酮类物质对该菌株野生型及其 *ttsI* 突变体的 III 型分泌系统调节基因 *ttsI* 表达的影响, 并通过蛭石结瘤实验比较分析野生型和突变体在花生结瘤能力的差异, 进一步探究 III 型分泌系统在花生-根瘤菌互作中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株:** 供试的慢生型花生根瘤菌菌株 *Bradyrhizobium* sp. MZ5(缩写 MZ5)是分离自广东省梅州土壤的花生根瘤, 由本实验保存, 具体信息参见文献<sup>[9]</sup>。

**1.1.2 试剂:** 实验用大豆苷元和染料木黄酮均购

买于 Sigma-Aldrich 公司上海分公司; 荧光定量 PCR 及反转录试剂购于 TaKaRa 公司; 细菌总 RNA 提取试剂盒购于北京博陵科公司。定量用引物由上海英潍捷基公司合成。实验用质粒 pRK2013 为中国农业大学陈文新课题组馈赠; pK18mobsacB 购于武汉森灵生物。

**1.1.3 培养基:** 活化及培养 MZ5 及突变株采用 TY<sup>[10]</sup>或 YMA 培养基<sup>[11]</sup>, 28 °C 培养。黄酮类物质诱导的培养基为 AG 培养基<sup>[12]</sup>。SM 培养基用于三亲本杂交筛选<sup>[13]</sup>。活化及培养 *E. coli* 菌株采用 LB 培养基<sup>[14]</sup>, 37 °C 培养。

### 1.2 $\Delta ttsI$ 突变体质粒载体的构建

提取慢生型花生根瘤菌总 DNA, 根据 *ttsI* 基因的核酸序列设计上下游引物 *ttsI36F* 和 *ttsI341R*, 分别添加 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点(表 1)。扩增 *ttsI* 基因的部分片段, 与载体 pMD-19<sup>T</sup> 连接, 双酶切重组质粒和 pK18mobsacB 自杀载体, 连接、转化, 获得 *ttsI* 基因体外突变的重组质粒 pK18mobsacB- $\Delta ttsI$ 。DNA 提取参照文献<sup>[15]</sup>的方法; 质粒的提取、DNA 的限制性酶切和连接等操作参照文献<sup>[16]</sup>的方法进行。

### 1.3 花生根瘤菌 III 型分泌系统调节基因 *ttsI* 突变体的构建

三亲本接合转移的方法构建 *ttsI* 突变体。具体操作方法按文献<sup>[17]</sup>操作。

### 1.4 黄酮类物质对花生根瘤菌菌株的体外诱导

将 MZ5 及其突变体培养在含有相应抗生素的 AG 培养液中至稳定期, 5%接种量接种于新鲜的 AG 培养液中, 分别添加大豆苷元和染料木黄酮至终浓度为 1  $\mu$ mol/L, 180 r/min 恒温(28 °C)振荡培养 72 h。以只添加等体积 DMSO 的 AG 培养基的培养物为阴性对照, 每个处理分别接种 3 个

表 1. 本研究 PCR 所用引物  
Table 1. The PCR primer pairs used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Comment
<i>ttsI</i> -36F	CG <b>CGGATC</b> CTGGTTGTGCCCGCTATGACATTCTCC	Bold letters of the primer are <i>Bam</i> H I restriction site
<i>ttsI</i> -341R	CCC <b>AAGCTT</b> GATGCTTGCCGACCGATGGGAT	Bold letters of the primer are <i>Hind</i> III restriction site
pK18mobsacB-T	GGCCGATTCATTAATGCAGC	The primer used in PCR amplifying 200 bp upstream of pK18mobsacB
<i>recA</i> -289F	CGCTCGGGTGCGGTGGGA	The internal reference primers used in RT-PCR
<i>recA</i> -370R	CGCCCATCTCGCCCTCG	
<i>ttsI</i> -325F	ATCGGTGCGCAAGCATC	The primer pairs used in RT-PCR
<i>ttsI</i> -469R	CCTCGTTGTCAAATGCG	
<i>ttsI</i> -745R	GATCTGAGCTACGGCAGTAAAGTG	Downstream primers verifying the downstream sequence of the MZ5- <i>ttsI</i>

重复。5000 r/min 离心收集菌体，洗涤后保存于 -80 °C 冰箱用于总 RNA 提取。

### 1.5 花生根瘤菌总 RNA 的提取及反转录

细菌总 RNA 提取方法按照北京博陵科为公司 HiFi-Ex 细菌 RNA 快速提取试剂盒的操作手册进行。提取后的总 RNA 经 DNase I 消化并抽提，以去除基因组 DNA 污染。纯化后细菌总 RNA 用随机引物按照 TaKaRa 公司的 Reverse Transcriptase M-MLV(RNase H-)试剂盒进行反转录。

### 1.6 花生根瘤菌的荧光定量 PCR

根据供试菌株 III 型分泌系统中的 *ttsI* 基因设计定量引物，以 *recA* 基因作为内参基因，本研究所用引物见表 1。Real time qPCR 程序：95 °C 5 min；94 °C 30 s；60 °C 20 s；72 °C 20 s，循环 40 次；72 °C 5 min。信号检测染料使用 SYBR GREEN，相对表达量采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  的方法分析。

### 1.7 蛭石结瘤实验

分别收集培养至对数生长期的 MZ5 菌体及其突变体的菌体用灭菌的生理盐水制成 40 mg/mL 的菌悬液。将花生油油 523 (缩写为 S523)和粤油 45 (缩写为 Y45)的种子表面消毒并播种<sup>[18]</sup>。以不接菌的植物作为空白对照，实验组的植物接种

1 mL 菌液，每个处理 4–6 个重复。置于 26–28 °C 培养，光照和黑暗时间分别为 16 h 和 8 h。培养 40 d 后收获并统计总瘤数、有效瘤数、地上部干重，同时固定根瘤进行石蜡切片分析<sup>[9]</sup>。

## 2 结果和分析

### 2.1 $\Delta$ *ttsI* 突变体的验证

将通过三亲本接合转移获得的能够在双抗平板上生长的结合子，用引物 M13R/*ttsI*341R 和 pK18T/*ttsI*341R 进行 PCR 验证，分别可以扩增出 326 bp 和 506 bp 的片段，证明结合子确实发生 *ttsI* 基因的插入突变(图 1)。为进一步明确  $\Delta$ *ttsI* 突变株的 *ttsI* 基因成功发生了插入突变，利用 pK18-T/ $\Delta$ *ttsI*745R 引物对进行 PCR 扩增并将相应的 PCR 纯化产物送至北京六合华大基因公司进行测序。

### 2.2 不同黄酮类物质对 *ttsI* 基因的表达影响

在图 2 中，添加大豆苷元对 MZ5 的 *ttsI* 基因表达量的影响，与未添加大豆苷元对照相比，表达量降低并且差异显著( $P < 0.05$ )；染料木黄酮处理后与对照相比，MZ5 的 *ttsI* 基因表达的抑制作用达到极显著差异水平( $P < 0.001$ )。在添加或不添加

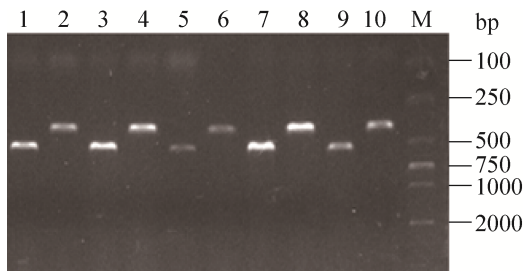


图 1. MZ5  $\Delta ttsI$  突变体验证的电泳图

Figure 1. The electrophoretic diagram of the MZ5  $\Delta ttsI$  mutant. 1, 3, 5, 7, 9: PCR products used primers M13R and  $\Delta ttsI$ -341 R; 2, 4, 6, 8, 10: PCR products used primers pK18-T and  $\Delta ttsI$ -341 R; M: DL 2000 marker.

两种黄酮类物质的条件下, 突变体 MZ5  $\Delta ttsI$  的 *ttsI* 基因的表达量都明显下调, 表达量仅为野生型的 10%–30%, 且差异都达到了极显著水平 ( $P < 0.001$ )。这表明 MZ5  $\Delta ttsI$  突变体中的 *ttsI* 基因由于插入突变, 使得其 *ttsI* 基因的表达量都明显下调, 与野生型菌株相比都达到了极显著水平 ( $P < 0.001$ )。且大豆苷元和染料木黄酮对 *ttsI* 基因的诱导作用丧失。

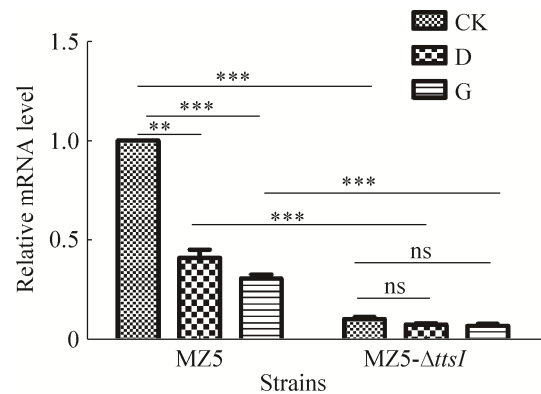


图 2. 大豆苷元和染料木黄酮对菌株 MZ5 及其突变体的 III 型分泌系统中 *ttsI* 基因表达的影响

Figure 2. The effect of Daidzein and Genistein on the *ttsI* gene expression of T3SS in *Bradyrhizobium* sp. MZ5 and its mutant. \*\*: Significant difference at 0.05 level; \*\*\*: Significant difference at 0.001 level; ns: no significant difference.

### 2.3 *ttsI* 基因对花生结瘤特征的影响

由图 3-A 可知, MZ5  $\Delta ttsI$  突变体仍具有在花生粤油 45 和汕油 523 的结瘤能力。但是与野生型

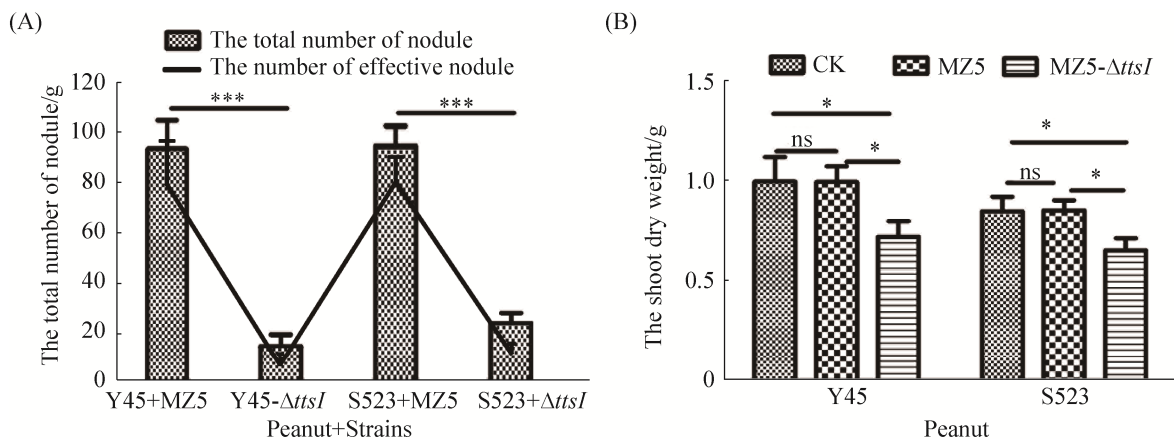


图 3. 菌株接种花生结瘤结果

Figure 3. The nodulating results of Y45 and S523. A: the nodulating results of MZ5 and its mutant on Yueyou No. 45 and Shanyou No. 523. B: the shoot dry weight of peanut plants. Y45+MZ5: Yueyou No. 45 inoculated *Bradyrhizobium* sp. MZ5; Y45+ $\Delta ttsI$ : Yueyou No. 45 inoculated the *ttsI* mutant; S523+MZ5: Shanyou No. 523 inoculated *Bradyrhizobium* sp. MZ5; S523+ $\Delta ttsI$ : Shanyou No. 523 inoculated the *ttsI* mutant. \*\*\*: significant difference at 0.001 level. Y45: Yueyou No. 45; S523: Shanyou No. 523; \*: significant difference at 0.01 level; ns: no significant difference.

MZ5 相比, 突变体的总瘤数和有效瘤都明显减少, 且均达到极显著水平( $P < 0.001$ )。其中, 野生型 MZ5 的有效瘤数均占 89%, 而接种 MZ5  $\Delta ttsI$  突变体的有效瘤数仅为 65% 和 62%。MZ5  $\Delta ttsI$  突变体接种 2 个花生品种的地上部干重(图 3-B), 与野生型 MZ5 相比也显著降低( $P < 0.05$ ), 表明该突变体对花生的生长产生负面的影响。

野生型 MZ5 及 MZ5  $\Delta ttsI$  突变体根瘤石蜡切片结果见图 4。在野生型 MZ5 侵染花生的根瘤中, 从外侧到内侧分别分化出根瘤皮层区、根瘤维管束区域和在根瘤最内侧染色加深的部位即明显的含菌细胞区域, 根瘤菌基本占领了内部的中央细胞区域(图 4-A、B 和图 4-E、F)。在 MZ5  $\Delta ttsI$  突变体的根瘤切片中, 其内部基本结构上发现根瘤皮层区、根瘤维管束区域所占区域比较大, 而根瘤菌所占领内部的中央细胞区域比较小, 含菌数量减少, 即在中央区域存在较多未着色的空白区域(图 4-C、D 和图 4-G、H)。

### 3 讨论

李俊等发现有些花生根瘤菌与大豆存在共生结瘤作用, 并且有些大豆根瘤菌也能和花生存在共生结瘤作用<sup>[19]</sup>。本研究前期实验发现 MZ5 能够与多个不同花生品种和野大豆结瘤, 但与多个大豆品种以及豇豆不结瘤。基于前期对 MZ5 与其他 22 株具有 T3SS 的慢生型花生根瘤菌的 T3SS 结构基因 *rhcJ-C1*、固氮基因 *nifH* 和共生相关基因 *nodD-A* 的系统发育分析的基础上, 发现其共生基因的遗传背景与近年来研究较多的 *Bradyrhizobium japonicum* 和 *Bradyrhizobium diazoefficiens* 相差较远, 可能代表一个新的结瘤遗传型<sup>[9]</sup>。已发现快生型根瘤菌中的 III 型分泌系统赋予根瘤菌宿主特异性, 能够影响根瘤菌的宿主范围<sup>[20-22]</sup>。在 *Sinorhizobium* sp. NGR234 的基因组中存在大量的分泌系统相关基因, 这可能是导致其具有广宿主的原因<sup>[23]</sup>。最近, 在以“裂隙”方式侵染的“合萌-

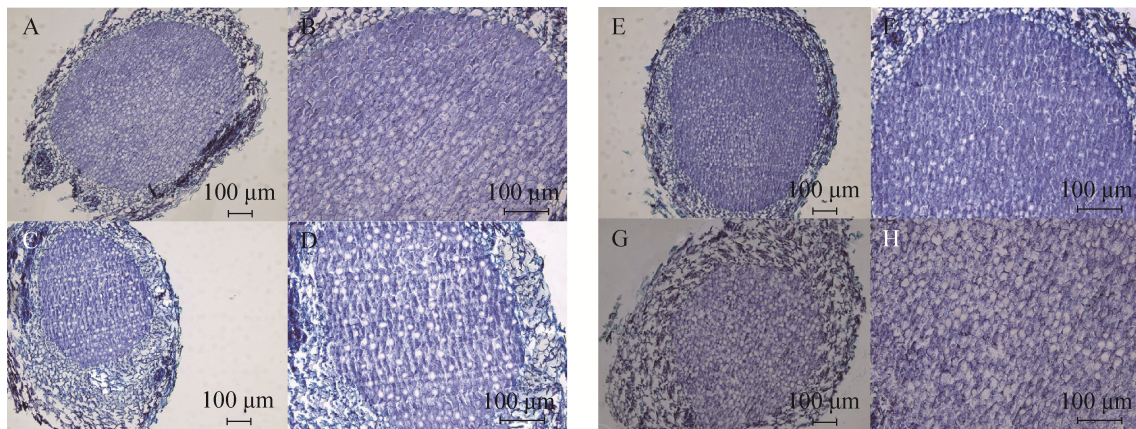


图 4. MZ5 及其  $\Delta ttsI$  突变体侵染花生后根瘤石蜡切片

Figure 4. The semi-thin nodule section for infecting peanuts of *Bradyrhizobium* sp. MZ5 and its mutant. A, E: The semi-thin nodule section of *Bradyrhizobium* sp. MZ5 infecting Shanyou No. 523 and Yueyou No. 45 (10 $\times$ 10). C, G: The semi-thin nodule section of the  $\Delta ttsI$  mutant infecting Shanyou No. 523 and Yueyou No. 45 (10 $\times$ 10). B, D, F, H: The corresponding enlarged microscopic views (10 $\times$ 20).

慢生型根瘤菌”互作系统中, *B. elkanii* USDA61 菌株中 III 型分泌系统的 *ttsI* 及 *rhcJ* 基因分别突变后, 均丧失了与“不依赖于结瘤因子”的豆科植物宿主印度合萌 *Aeschynomene indica* 的结瘤作用<sup>[24]</sup>。同时发现光合慢生根瘤菌 ORS285 虽然缺少 T3SS, 但是仍可以与宿主印度合萌 *Aeschynomene indica* 结瘤。由此可见, 在不同的豆科宿主和根瘤菌互作中, III 型分泌系统的功能是不同的。在 MZ5 中添加大豆昔元和染料木黄酮对 III 型分泌系统的调节基因 *ttsI* 的表达均有下调作用。

本研究成功构建了 MZ5 *AttS* 突变体, 通过蛭石结瘤实验比较了野生型和突变体在原宿主的结瘤能力差异。当 MZ5 的调节基因 *ttsI* 发生插入突变后, 降低了其在汕油 523 和粤油 45 的结瘤能力, 说明 MZ5 的 T3SS 在与花生建立共生关系时发挥着重要作用。目前本研究只证实了 *ttsI* 基因突变会影响菌株在花生上的结瘤能力, 此基因突变后是否会改变宿主范围, 还需要接种更多不同豆科宿主植物进行更深入的研究。MZ5 的 T3SS 中 *ttsI* 基因突变后会影响到哪些效应因子, 这些效应因子在根瘤菌与花生建立共生关系过程中的作用也需要进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] Krause A, Doerfel A, Göttfert M. Mutational and transcriptional analysis of the type III secretion system of *Bradyrhizobium japonicum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2002, 15(12): 1228–1235.
- [2] Viprey V, Del Greco A, Golinowski W, Broughton WJ, Perret X. Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in *Rhizobium*. *Molecular Microbiology*, 1998, 28(6): 1381–1389.
- [3] Becker A, Bamett MJ, Capelac D, Dondrup M, Kamp PB, Krol E, Linke B, Rüberg S, Runte K, Schroeder BK, Weidner S, Yurgel SN, Batut J, Long SR, Pühler A, Goesmann A. A portal for rhizobial genomes: *RhizoGATE* integrates a *Sinorhizobium meliloti* genome annotation update with postgenome data. *Journal of Biotechnology*, 2009, 140(1/2): 45–50.
- [4] Tsukui T, Eda S, Kaneko T, Sato S, Okazaki S, Kakizaki-Chiba K, Itakura M, Mitsui H, Yamashita A, Terasawa K, Minamisawa K. The type III secretion system of *Bradyrhizobium japonicum* USDA122 mediates symbiotic incompatibility with *Rj2* soybean plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(3): 1048–1051.
- [5] de Campos SB, Deakin WJ, Broughton WJ, Passaglia LMP. Roles of flavonoids and the transcriptional regulator TtsI in the activation of the type III secretion system of *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA587. *Microbiology*, 2011, 157(3): 627–635.
- [6] Okazaki S, Kaneko T, Sato S, Saeki K. Hijacking of leguminous nodulation signaling by the rhizobial type III secretion system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 2013, 110(42): 17131–17136.
- [7] Sugiyama A, Yamazaki Y, Yamashita K, Takahashi S, Nakayama T, Yazaki K. Developmental and nutritional regulation of isoflavone secretion from soybean roots. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2016, 80(1): 89–94.
- [8] Kirakosyan A, Kaufman PB, Duke JA, Seymour EM, Warber S, Bolling SF. Production of isoavones in seeds and seedlings of different peanut genotypes. *Crop Science*, 2007, 47(2): 717–719.
- [9] Chen JY, Hu MJ, Ma HM, Wang YS, Wang ET, Zhou ZF, Gu J. Genetic diversity and distribution of bradyrhizobia nodulating peanut in acid-neutral soils in Guangdong Province. *Systematic and Applied Microbiology*, 2016, 39(6): 418–427.
- [10] Honeycutt RJ, McClland M, Sobral BW. Physical map of the genome of *Rhizobium meliloti* 1021. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175(21): 6945–6952.
- [11] Vincent JM. The modified Fåhræus slide technique//Vincent JM. A Manual for the Practical Study of the Root-Nodule Bacteria. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970.
- [12] Sadowsky MJ, Tully RE, Cregan PB, Keyser HH. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* serogroup 123 and its relation to genotype-specific nodulation of soybean. *Applied and Environment Microbiology*, 1987, 53(11): 2624–2630.
- [13] 刘冬颖. *Mesorhizobium amorphae* CCNWGS0123 III 型分泌

- 系统基因 *nolU* 缺失菌株构建及功能研究. 西北农林科技大学硕士学位论文, 2015.
- [14] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [15] de Bruijn FJ, Rossbach S, Schneider M, Ratet P, Messmer S, Szeto WW, Ausubel FM, Schell J. *Rhizobium meliloti* 1021 has three differentially regulated loci involved in glutamine biosynthesis, none of which is essential for symbiotic nitrogen fixation. *Journal of Bacteriology*, 1989, 171(3): 1673–1682.
- [16] Du BH, Li XH, Lin RS, Wang L, Yang SS. Study on isolation of *noeB* of *Sinorhizobium meliloti* 042BM by Tn5-1063 mutagenesis. *Acta Microbiologica Sinica*, 2004, 44(2): 206–209. (in Chinese)  
杜秉海, 李小红, 林榕珊, 王磊, 杨苏声. 利用 Tn5-1063 转座诱变法分离苜蓿中华根瘤菌 042BM *noeB* 基因的研究. *微生物学报*, 2004, 44(2): 206–209.
- [17] Vincent JM. *A manual for the practical study of the root-nodule bacteria*. IBP handbook No. 15. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970.
- [18] Bonaldi K, Gargani D, Prin Y, Fardoux J, Gully D, Nouwen N, Goormachtig S, Giraud E. Nodulation of *Aeschynomene afraspera* and *A. indica* by photosynthetic *Bradyrhizobium* sp. strain ORS285: the Nod-dependent versus the Nod-independent symbiotic interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2011, 24(11): 1359–1371.
- [19] Li T, Guan DW, Li J, Cao FM, Wei GH, Feng RH. Screening of superior soybean rhizobial strains and approach to Inoculation methods for region of Huanghuaihai. *Soybean Science*, 2010, 29(4): 645–650. (in Chinese)  
李涛, 关大伟, 李俊, 曹凤明, 韦革宏, 冯瑞华. 黄淮海地区优良大豆根瘤菌菌株的筛选与接种方式研究. *大豆科学*, 2010, 29(4): 645–650.
- [20] Freiberg C, Fellay R, Bairoch A, Broughton WJ, Rosenthal A, Perret X. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature*, 1997, 387(6631): 394–401.
- [21] Krishnan HB, Lorio J, Kim WS, Jiang GQ, Kim KY, de Boer M, Pueppke SG. Extracellular proteins involved in soybean cultivar-specific nodulation are associated with pilus-like surface appendages and exported by a type III protein secretion system in *Sinorhizobium fredii* USDA257. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2003, 16(7): 617–625.
- [22] González V, Santamaría RI, Bustos P, Hernández-González I, Medrano-Soto A, Moreno-Hagelsieb G, Janga SC, Ramírez MA, Jiménez-Jacinto V, Collado-Vides J, Dávila G. The partitioned *Rhizobium etli* genome: genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 2006, 103(10): 3834–3839.
- [23] Schmeisser C, Liesegang H, Krysciak D, Bakkou N, Le Quéré A, Wollherr A, Heinemeyer I, Morgenstern B, Pommerening-Röser A, Flores M, Palacios R, Brenner S, Gottschalk G, Schmitz RA, Broughton WJ, Perret X, Strittmatter AW, Streit WR. *Rhizobium* sp. strain NGR234 possesses a remarkable number of secretion systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(12): 4035–4045.
- [24] Okazaki S, Tittabutr P, Teulet A, Thouin J, Fardoux J, Chaintreuil C, Gully D, Arrighi JF, Furuta N, Miwa H, Yasuda M, Nouwen N, Teumroong N, Giraud E. *Rhizobium*-legume symbiosis in the absence of Nod factors: two possible scenarios with or without the T3SS. *The ISME Journal*, 2016, 10(1): 64–74.

## Construction of regulatory gene *ttsI* mutant in type III secretion system of *Bradyrhizobium* sp. MZ5 and its function analysis

Ting Li, Xue Li, Huaqin Ruan, Yongxiu Lai, Jingyu Chen, Meijuan Hu, Jun Gu\*

School of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631, Guangdong Province, China

**Abstract:** [Objective] To explore the function of type III secretion system of bradyrhizobial strains in peanut-rhizobia interaction. [Methods] We constructed the *ttsI* mutant of type III secretion system in *Bradyrhizobium* sp. MZ5 by the way of homologous recombination and three parental conjugative transfer. The different expression of *ttsI* in MZ5 and MZ5 $\Delta$ *ttsI* were analyzed by real-time PCR by using the cDNA as templates after addition of Daidzein and Genistein. The vermiculite nodulation experiment was performed to comparative analysis of the nodulation ability of *Bradyrhizobium* sp. MZ5 and its *ttsI* mutant on *Arachis hypogea* (S523 and Y45). [Results] We found that daidzein and genistein had a significant inhibiting effect on the *ttsI* gene of the strain MZ5 ( $P < 0.05$ ). In the vermiculite nodulation experiment, we found that there was a significant reduction in the number of nodules and the shoot dry weight on peanut S523 and Y45 for MZ5 $\Delta$ *ttsI* mutant ( $P < 0.05$ ) comparing with the wild-type strain MZ5. The semi-thin nodule section showed that the MZ5 $\Delta$ *ttsI* mutant contained fewer cells in the nodules than the wild-type strain. [Conclusion] The type III secretion system of *Bradyrhizobium* sp. MZ5 has a positive effect on peanut-rhizobia interaction.

**Keywords:** peanut bradyrhizobia, flavones, type III secretion system, nodulation

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31570006) and by the Natural Science Foundation of Guangdong Province (2015A030313380)

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-20-85211327; E-mail: gujun@scnu.edu.cn

Received: 17 April 2018; Revised: 4 June 2018; Published online: 8 September 2018