



花生根瘤菌 *Bradyrhizobium* sp. MM6 III 型分泌系统的结构和功能

赖永秀, 胡美娟, 阮华钦, 陈静瑜, 李雪, 李婷, 靳欢欢, 谷峻*

华南师范大学生命科学学院, 广东 广州 510631

摘要:【目的】探究花生根瘤菌 *Bradyrhizobium* sp. MM6 的 III 型分泌系统(T3SS)的结构及其在根瘤菌与不同宿主建立共生关系中的作用。【方法】同源比对分析菌株 MM6 的 T3SS 基因簇的结构特征, 并采用三亲本接合转移的方法构建 T3SS 调节基因 *ttsI* 突变菌株; 通过蛭石结瘤和石蜡切片实验, 比较突变体与野生型的共生固氮表型差异。【结果】经预测, MM6 的 T3SS 基因簇编码区长约 34.1 kb, 可分为 3 个区域, 包含 10 个保守结构基因和 8 个效应蛋白基因, 与 *B. diazoefficiens* USDA110 相应基因的序列相似性为 83%–93%; 成功构建了 MM6 的 *ttsI* 突变株; *ttsI* 突变株与野生型分别与花生(S523 和 Y45)、野大豆和大豆中黄 57 结瘤, *ttsI* 突变体在花生中的总瘤数显著增加($P<0.05$), 根瘤中含菌细胞更多; *ttsI* 突变体在野大豆中平均每株植物增加 4 个根瘤, 根瘤中含菌细胞更多, 地上部干重相比野生型 MM6 显著增加($P<0.05$); 在大豆中黄 57 中, 野生型 MM6 能形成红色的有效根瘤, *ttsI* 突变体不结瘤, 且植株叶片发黄, 地上部干重相比野生型 MM6 显著降低($P<0.05$)。【结论】MM6 的 T3SS 在花生和野大豆共生体系中起着有害的作用, 而在大豆中黄 57 的共生体系中起着有利的作用。

关键词: 花生根瘤菌, III 型分泌系统, *ttsI*, 共生固氮

III 型分泌系统(T3SS)被称为纳米级的分子注射器, 在革兰氏阴性细菌与宿主相互作用中发挥着重要作用。在病原菌中, 通过 T3SS 分泌的效应因子进入宿主细胞后会影响宿主防御反应系统^[1], 有利于病原菌进入宿主。在根瘤菌中, 不同根瘤菌菌株与不同豆科植物建立共生关系时, T3SS 会

起着有利、中性或有害的作用^[2–4]。已研究的根瘤菌的 T3SS 基因簇长 30–47 kb, 其结构可以分为: 编码 T3SS 核心组成部分的保守基因简称为 *rhc* (rhizobium conserved), 编码 T3SS 分泌的效应蛋白的基因简称为 *Nops* (Nodulation outer proteins), 以及编码调节蛋白的 *ttsI* 基因(原名 *y4xI*), 是一种转

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: 2019-05-07; 修回日期: 2019-07-01; 网络出版日期: 2019-08-27

录激活因子^[5]。

根瘤菌侵染豆科植物的方式主要有侵染线侵染和相对古老的裂隙侵染方式^[6],前者以大豆、苜蓿等为模式植物, T3SS 在菌植互作的研究报道较多^[2-3,7];而后者主要以合萌为模式植物, T3SS 在建立共生关系中的作用略有研究^[8]。已发现在侵染线入侵的根瘤菌-大豆共生体系中,植物分泌的类黄酮先与 NodD 蛋白结合后,诱导 *ttsI* 基因的表达, TtsI 通过结合在 T3SS 相关基因的启动子上起始 T3SS 相关基因的表达^[2]。然而最近研究发现,在根瘤菌-合萌共生体系中,具有 T3SS 的不同慢生根瘤菌菌株侵染不同种合萌时, T3SS 都在其中发挥重要作用^[8]。花生根瘤菌也是以裂隙侵染方式侵染花生建立共生固氮体系,但是 T3SS 在根瘤菌-花生共生固氮体系中的功能研究报道相对滞后。本实验室对分离自广东省主要花生种植区的 71 株花生根瘤菌代表菌株,采用 PCR 技术扩增其 T3SS 序列保守的 *rhcRST* 基因片段,发现包括 *Bradyrhizobium* sp. MM6 在内的 23 株慢生型花生根瘤菌具有 T3SS^[9]。*rhcRST* 基因片的系统发育分析表明, MM6 与大豆共生的 *B. diazoefficiens* USDA110 亲缘关系更近^[9]。为进一步明确 MM6 的 T3SS 的结构和功能,本研究在获得 MM6 基因组草图的基础上,利用生物信息学分析其 T3SS 基因簇的结构特征,并构建 T3SS 调节基因 *ttsI* 突变菌株,通过蛭石结瘤实验,比较突变体与野生型

的共生固氮表型差异,探究 T3SS 在根瘤菌-花生共生固氮体系中的功能。

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,其中供试菌株 *Bradyrhizobium* sp. MM6 (缩写 MM6)分离自广东省茂名土壤的花生根瘤,由本实验保存,具体信息参见文献^[10]。

1.1.2 主要试剂及试剂盒: Ex Taq DNA 聚合酶、dNTPs、Mix、T4-DNA 连接酶、琼脂糖凝胶电泳 Marker 购自 TaKaRa 公司,细菌总 DNA 提取试剂盒、PCR 产物凝胶回收试剂盒购自美基生物公司。研究所用 PCR 引物由上海英潍捷基公司合成, DNA 测序工作由深圳华大基因股份有限公司完成。

1.1.3 培养基: 活化及培养 MM6 及突变株采用 TY^[11]或 YMA 培养基^[12], 28 °C 培养。SM 培养基用于三亲本接合转移实验的突变体筛选^[13]和培养。活化及培养 *E. coli* 菌株采用 LB 培养基^[14], 37 °C 培养。

1.1.4 引物: 本实验所用引物见表 2。

1.2 T3SS 结构比较分析

利用 MM6 的 *rhcRST* 基因片段与基因组序列进行比对,将其定位于相应的支架序列文件,然后将 Scaffold 上预测到的编码序列与 NCBI 的

表 1. 菌株和质粒

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strains/Plasmids	Characteristics	Source
<i>Bradyrhizobium</i> sp. MM6	Wide type, NA [†]	This lab
<i>E. coli</i> DH5α	Host of recombinant plasmids	This lab
pMD19-T (simple)	TA cloning vector, Amp ^r	TaKaRa Co.
pK18mobsacB	Mutant strains construction vector, Kan ^r	Miaolingbio. Inc
pRK2013	Auxiliary plasmid, Kan ^r	China Agricultural University

表 2. 实验所需引物

Table 2. PCR primers used in this study

Primer names	Sequences of primers (5'→3')	Characteristics
<i>ttsI</i> -286F	CGGAATTCGATGATTCCTGCCCAAG	The forward primer of <i>ttsI</i> exchange fragment
<i>ttsI</i> -675R	CCCAAGCTTGTGCCAACGAGTTCAAGAGTG	The reverse primer of <i>ttsI</i> exchange fragment
pK18mobsacB-T	GGCCGATTCATTAATGCAGC	The primer used in PCR amplifying 200 bp upstream of pK18mobsacB
<i>ttsI</i> -818R	GCGGAAACAGCAAAGCAAG	Downstream primer for the downstream sequence of MM6- <i>ttsI</i>
M13-F	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	The common forward primer of pK19 vector
M13-R	AGCGGATAACAATTCACACAGG	The common reverse primer of pK19 vector

GenBank 中已经提交注释的参比序列进行比对, 根据比对的结果绘制成 T3SS 基因簇基本结构图。以 *B. diazoefficiens* USDA110 为参考菌株, 根据基因的序列相似性、大小以及转录的方向绘制 MM6 与 *B. diazoefficiens* USDA110 T3SS 基因簇的基本结构对比图。

1.3 Δ *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 *ttsI*-286F 和 *ttsI*-675R, 分别添加 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切位点。扩增 *ttsI* 基因的部分片段, 与载体 pMD-19^T 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- Δ *ttsI*。DNA 提取参照文献[15]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[16]的方法进行。

1.4 花生根瘤菌 III 型分泌系统调节基因 *ttsI* 突变菌株的获得

三亲本接合转移的方法筛选获得 *ttsI* 突变菌株, 具体操作方法按文献[17]操作。突变体 PCR 验证后, 进行克隆测序。

1.5 蛭石结瘤实验

分别收集培养至对数生长期的 MM6 野生型

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 523 (缩写为 S523)、粤油 45 (缩写为 Y45)、大豆中黄 57 (缩写为 GM57) 和野大豆 (缩写为 GS) 的种子表面消毒并播种^[18]。以不接菌的植物作为空白对照, 1 mL 野生型菌株和 Δ *ttsI* 突变菌株菌液分别接种不同宿主植物, 每个处理 3–5 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和地上部干重, 同时固定根瘤进行石蜡切片分析^[10]。

2 结果和分析

2.1 T3SS 基因簇的基本结构

对 *Bradyrhizobium* sp. MM6 基因组草图测序经数据组装后得到 MM6 基因组大小约为 9.28 Mb, GC 含量 62.86%, 共 127 个 scaffold 文件, 350 个 contig 文件。基因组组分析预测 MM6 基因组中含有 9258 个基因, 总长度约为 7.72 Mb, 平均长度为 834 bp, 占基因组全长的 83.21%。利用已知的 MM6 菌株的 *rhcRST* 基因片段与基因组进行比对, 将 MM6 的 T3SS 定位在 Scaffold10 上, 将 Scaffold10 上的编码序列与 NCBI 的 GenBank 中已经提交注释的参比序列进行比对, 发现 MM6 的

T3SS 基因簇位于 Scaffold10 上编号为 1299–1341 基因区域, 总长度约为 34.1 kb, GC 含量 57.9%, 单个基因如 *ttsI* 基因的 GC 含量为 57.8%, *rhcV* 基因的 GC 含量为 56.6%。根据比对的结果绘制成 T3SS 基因簇基本结构图(图 1), 图中 MM6 T3SS 中的基因组成根据编码蛋白的功能的不同主要分为 3 类, 分别是编码装置结构蛋白的保守基因、编码分泌蛋白的效应基因和编码调节蛋白的基因; 此外, 还包括迄今为止功能未明确的基因, 暂时命名为假定蛋白基因。具体的比对结果及基因注释结果见附表 1。

MM6 的 T3SS 基因簇由 3 个区域组成: Region I、Region II 和 Region III。Region I 位于中央区域, 包含有编码 T3SS 核心组分的基因 *rhcC1*、*rhcJ*、*nopV*、*rhcN*、*nopZ*、*rhcQ*、*rhcR*、*rhcS*、*rhcT* 和 *rhcU*, 这些基因在组成和组织上都是高度保守的^[1]。T3SS 中的调控蛋白基因 *ttsI* 位于 Region II 中。Region II 和 Region III 主要包含效应基因, 如 *nopAJ*、*nopAR*、*nopE1*、*nopH*、*nopY* 和 *nopM*, 以及一些假定蛋白基因, 如图 1 中黑色箭头所示。

2.2 MM6 与 *B. diazoefficiens* USDA110 T3SS 基因簇基本结构的比较分析

根据 MM6 与 *B. diazoefficiens* USDA110 基因

的序列相似性、大小以及转录的方向绘制 T3SS 基因簇的对比图中(图 2), MM6 的保守结构基因 *rhcC2*、*rhcU*、*rhcT*、*rhcS*、*rhcR*、*rhcQ*、*rhcN*、*rhcJ*、*rhcC1*、*rhcV* 与 *B. diazoefficiens* USDA110 相应基因的序列相似性为 87%–93%; 效应蛋白基因 *nopAR* (1326)、*nopZ* (1318)、*nolV*、*nopE1* (1312)、*nopH* (1311)、*nopY* (1309) 与 *B. diazoefficiens* USDA110 相应基因的序列相似性为 83%–93%; 调节基因 *ttsI* 与 *B. diazoefficiens* USDA110 *ttsI* 基因的序列相似性为 94%。此外, 两者 T3SS 基因簇的基因转录方向完全一致, 基因的长度相近。

2.3 MM6 Δ *ttsI* 突变体的构建和验证

根据同源单交换的原理, 采用三亲本接合转移的方法构建了 *ttsI* 基因的突变体。将通过三亲本接合转移获得的能够在含有 NA^+ 和 Kan^+ 抗性的 SM 筛选平板上生长的接合子, 用引物 pK18T/*ttsI*-818R 进行 PCR 验证, 同时以野生型 MM6 总 DNA 模板为阴性对照, 接合子可以扩增出约 749 bp 的片段, 阴性对照没有扩增出条带, 证明接合子确实发生 *ttsI* 基因的插入突变(图 3)。为进一步明确 Δ *ttsI* 突变株的 *ttsI* 基因成功发生了插入突变, 将 Δ *ttsI* 突变株与花生形成的根瘤进行分菌, 将类菌体分离至 YMA 平板上, 挑取镜检形态大小正确且 PCR 验证条带大

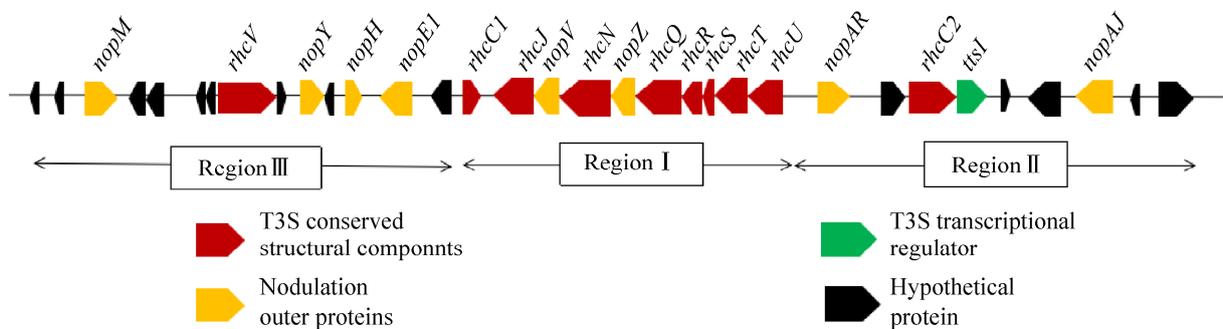


图 1. MM6 T3SS 基因簇基本结构图

Figure 1. Basic structure of MM6 T3SS gene cluster.

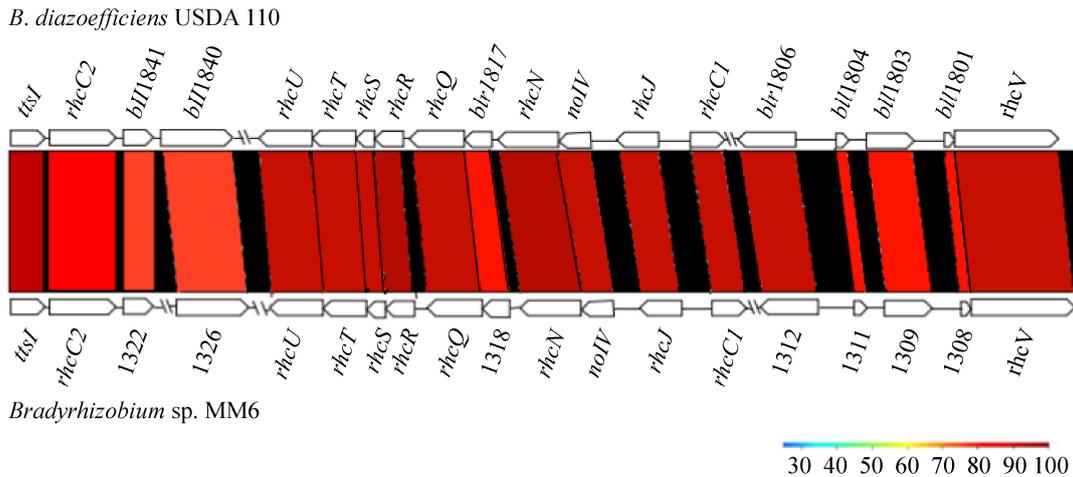


图 2. *Bradyrhizobium* sp. MM6 和 *B. diazoefficiens* USDA110 T3SS 基因簇的对比图

Figure 2. Comparison of the type III secretion gene clusters in *Bradyrhizobium* sp. MM6 and *B. diazoefficiens* USDA110. Colored strips represent the conserved gene regions between the compared strains, and the color indicates the percentage similarity.

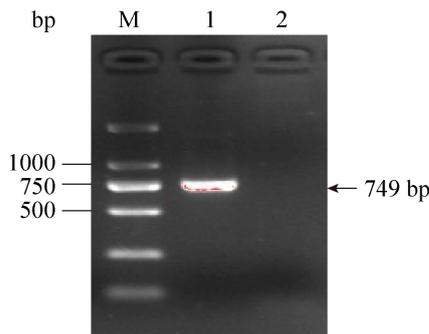


图 3. MM6 Δ ttsI 突体验证的电泳图

Figure 3. The electrophoretic diagram of the MM6 Δ ttsI mutant. M: DL2000 DNA marker; lane 1: PCR product of *ttsI* mutant genomic DNA; lane 2: PCR products of wide-type MM6 genomic DNA.

小为 749 bp 的菌体进行扩繁，提取基因组 DNA，用引物 pK18T/*ttsI*-818R 进行 PCR 扩增，将纯化后的 PCR 产物进行克隆，送至深圳华大基因股份有限公司进行测序。测序结果见图 S1、S2、S3。

2.4 MM6 Δ ttsI 突变体以及野生型菌株与不同花生品种的结瘤

将野生型 MM6 和 MM6 Δ ttsI 突变体分别接种

花生油油 523 和粤油 45。在油油 523 和粤油 45 中，接种突变体与 MM6 野生型菌株相比，总瘤数增加，且存在显著性差异(图 4-A, $P < 0.05$)，但是地上部干重没有明显的差异(图 4-B)。两个花生品种相比，MM6 菌株的野生型和突变体在粤油 45 中能形成更多的根瘤(图 4-A)。比较不同品种花生的叶片发现：在油油 523 中，接种突变体的植株叶片比接种 MM6 野生型菌株的绿，接种野生型菌株的植株叶片出现较为明显的缺氮现象(图 4-C)；而在粤油 45 中，接种突变体的植株叶片和接种 MM6 野生型菌株的没有明显的差异(图 4-D)。

对花生油油 523 和粤油 45 的根瘤进行石蜡切片并显微观察，发现在花生油油 523 中，接种 MM6 Δ ttsI 菌株的根瘤切片比接种 MM6 野生型菌株的含菌区域更大，含菌细胞更多(图 5-A)；在花生粤油 45 中，接种 MM6 野生型菌株的根瘤切片染色较浅，中央区域含有大量的未被根瘤菌侵染的细胞，含菌细胞明显少于接种 MM6 Δ ttsI 菌株的根瘤切片(图 5-B)。

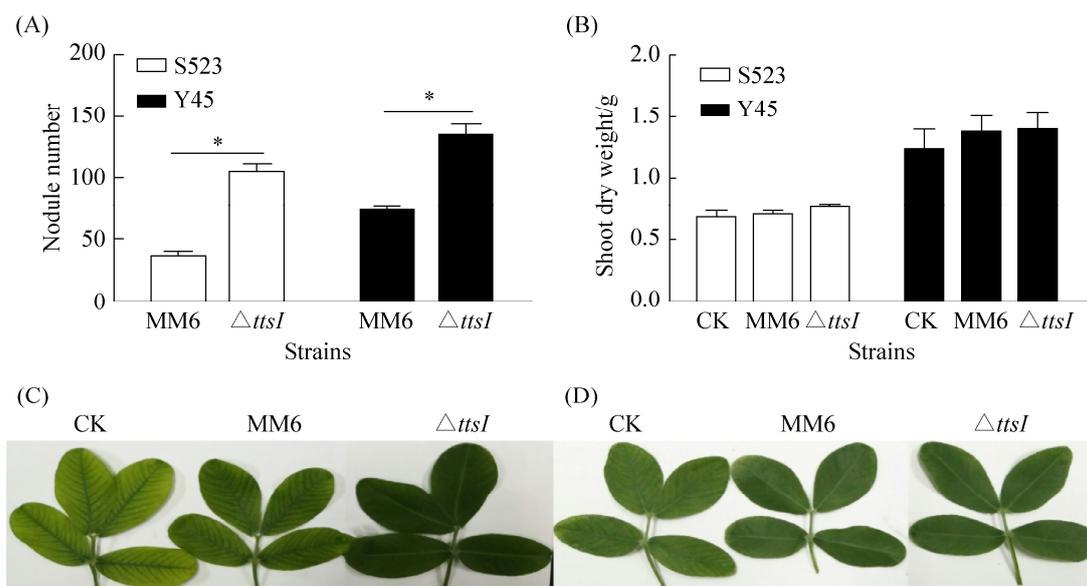


图 4. *MM6ΔttsI* 突变体以及野生型菌株与花生的共生表型

Figure 4. Symbiotic phenotypes of the *ttsI* mutant and wild-type strain with peanut. *: significant difference at $P < 0.05$; ns: no significant difference. The error bars represent the standard deviations of three independent experiments. C: S523; D: Y45.

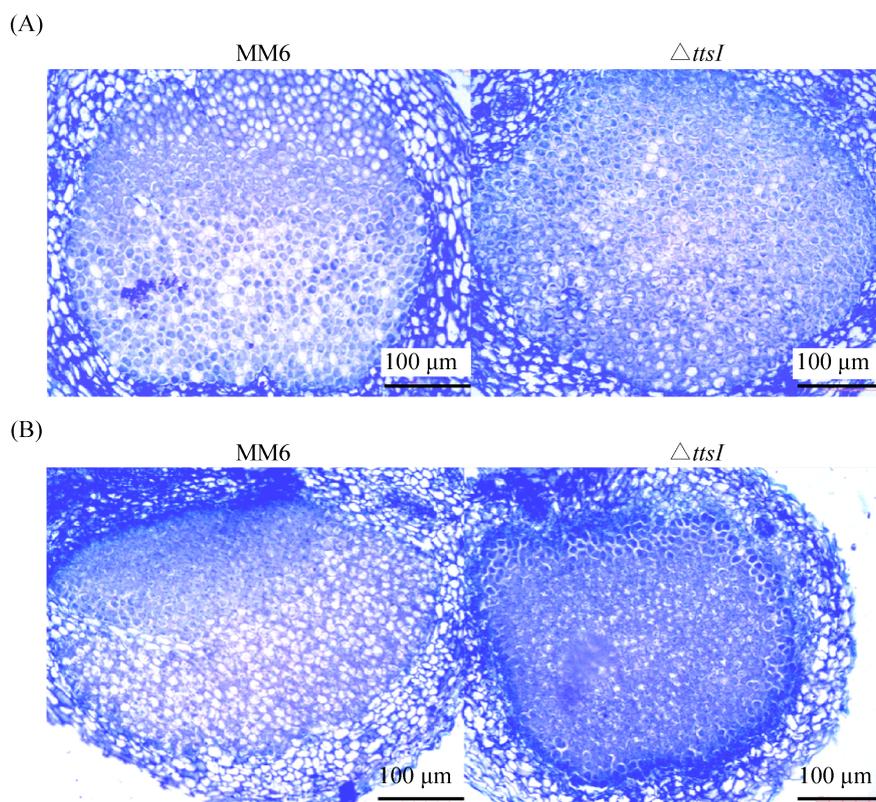


图 5. *MM6* 及 *MM6ΔttsI* 突变体侵染花生后的根瘤石蜡切片

Figure 5. The paraffin section of root nodules after peanut infection by *MM6* and its mutants. The semi-thin nodule section magnified 100 times (10×10). A: S523; B: Y45.

2.5 MM6 Δ *ttsI* 突变体以及野生型菌株与野大豆和大豆的结瘤

在野大豆中,接种 MM6 野生型菌株形成的根瘤数平均为 1 个,而接种 MM6 Δ *ttsI* 菌株形成的根瘤数平均能达到 5 个,且接种突变体的植株地上部干重比接种 MM6 野生型菌株的重,并存在显著性差异(图 6-A)。在大豆中黄 57 中,接种 MM6 菌株的植株平均根瘤数为 4 个,切开时为红色的有效根瘤;接种 MM6 Δ *ttsI* 菌株的植株除 1 株植物上出现 1 个瘤状物外,其他重复均没有形成根瘤,接种突变体的植株地上部干重比接种 MM6 野生型菌株的轻,并存在显著性差异(图 6-A)。比较植物的叶片发现:在野大豆中,接种突变体的植株叶片比接种 MM6 野生型菌株的绿(图 6-B);在大豆中黄 57 中,接种突变体的植株叶片出现更为明显的缺氮现象(图 6-C)。

对野大豆根瘤进行石蜡切片并显微观察,发现在野大豆中,接种 MM6 Δ *ttsI* 菌株的根瘤切片

的含菌细胞区域较大,含菌细胞更多(图 7-A)。

3 讨论

豆科植物与根瘤菌之间存在共生特异性,根瘤菌的 T3SS 与其宿主特异性有关。不同植物在氮饥饿条件下会产生不同种类的黄酮物质,进而吸引其根际的根瘤菌,并激活相应根瘤菌的 NodD 蛋白,类黄酮与 NodD 蛋白的响应具有特异性。在以“侵染线”入侵的大豆根瘤菌中,被激活的 NodD 能诱导 *ttsI* 基因的表达,*ttsI* 基因编码转录激活因子,结合于高度保守的 *tts*-boxes 区域,从而诱导 T3SS 的激活和效应分子的表达^[19]。已发现具有抗性的大豆检测到 T3SS 的活性后,就会表达抗性基因 *R*,产生由效应蛋白引起的保护性的免疫应答(effector triggered immunity, ETI),也称超敏反应。其特征是出现快速的、局部的细胞重组性死亡,从而阻止病原微生物的扩散^[20]。研究表明,在以“侵染线”入侵的大豆-根瘤菌共生体系中,植

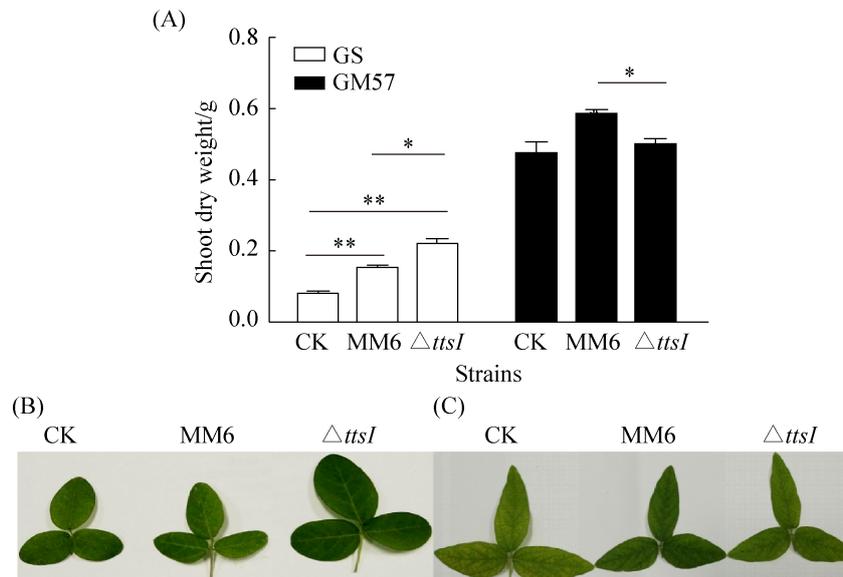


图 6. MM6 Δ *ttsI* 突变体以及野生型菌株与野大豆以及大豆中黄 57 的共生表型

Figure 6. Symbiotic phenotypes of the *ttsI* mutant and wild-type strain with wild *Glycine soja* and *Glycine max* 57. *: significant difference at $P < 0.05$; **: significant difference at $P < 0.01$; ns: no significant difference. The error bars represent the standard deviations of three independent experiments. B: GS; C: GM57.

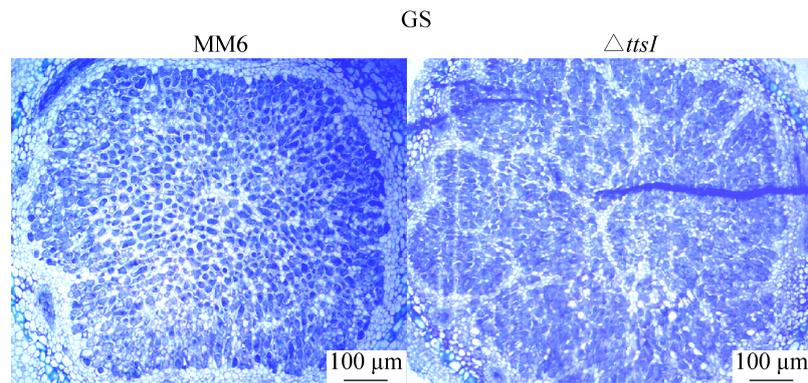


图 7. MM6 及 MM6 Δ ttsI 突变体侵染野大豆后的根瘤石蜡切片

Figure 7. The paraffin section of root nodules after *Glycine soja* infected by MM6 and its mutants. The semi-thin nodule section magnified 40 times (4×10).

物防御过程和根瘤菌 T3SS 编码的效应分子是决定根瘤菌的宿主范围的因素之一^[7]。在根瘤菌以“裂隙”方式侵染豆科植物的共生体系中，目前许多研究集中于慢生型根瘤菌-合萌这一共生体。在非光合慢生根瘤菌 *Bradyrhizobium elkanii* USDA61 中，研究者发现它可以通过 T3SS 与不依赖结瘤因子的合萌物种 *Aeschynomene indica* 共生结瘤，细胞学分析发现根瘤中出现了褐色坏死的区域，说明 *B. elkanii* USDA61 通过 T3SS 入侵 *A. indica* 细胞时引起了植物的免疫防御反应，抑制了根瘤菌在宿主细胞内的繁殖^[21]。此外，发现所有能与 *A. indica* 共生结瘤的慢生型根瘤菌都具有 T3SS，但是并不是所有具有 T3SS 的菌株都能与 *A. indica* 结瘤，如 *B. diazoefficiens* USDA110，这说明除了 T3SS 装置外，菌株通过 T3SS 分泌的特定的效应蛋白在同宿主的分子对话过程中也发挥着重要作用^[21]。具有光合能力的慢生根瘤菌 ORS285 的 T3SS 结构基因 *rhcN* 突变后，在不依赖于结瘤因子的合萌物种中的结瘤能力与野生型 ORS285 的没有差别，但是在依赖于结瘤因子的 *A. uniflora* 中能形成更多的根瘤，且根瘤发育更好，而在 *A. afraspera* 中，与野生型 ORS285 相比，形成的根

瘤更少，这暗示了 ORS285 可能具有特殊的 T3SS 的效应混合物，可以影响与依赖结瘤因子的合萌宿主的结瘤，但是对于不依赖结瘤因子的合萌宿主没有影响^[21]。与合萌相似，根瘤菌也是以裂隙侵染的方式进入花生^[22]。T3SS 在慢生根瘤菌-花生共生体建立过程的作用未有报道。本研究通过构建 MM6 Δ ttsI 突变体并接种不同侵染方式的豆科宿主，发现 T3SS 中的调节基因 *ttsI* 突变后，突变菌株与花生汕油 523 和粤油 45 以及野大豆共生结瘤的能力增强，说明 T3SS 在野生型的 MM6 菌株与花生和野大豆建立共生体过程中起着有害的作用；但是突变菌株丧失了与大豆中黄 57 的结瘤能力，说明 T3SS 在野生型的 MM6 菌株与大豆中黄 57 建立共生体的过程中起着有利的作用。由此可见，花生根瘤菌 MM6 中的 T3SS 在其与不同宿主建立共生体的过程中发挥着不同的作用。这一结果表明，不同宿主豆科植物对根瘤菌菌株具有选择性，这种专一性涉及了 T3SS 分泌的效应蛋白在两者对话过程中的功能。然而，在此分泌系统中哪些效应因子起着关键的作用还是未知，需要进一步构建不同效应因子突变体进行深入探究。

基因水平转移是形成根瘤菌多样性及适应新环境的主要动力^[23]。在本研究中,根据 MM6 的基因组草图测定结果,菌株的全基因组的 GC 含量为 62.86%, T3SS 基因簇的 GC 含量为 57.9%,与基因组的 GC 含量相差 4.96%,其中 *tsI* 和 *rhcV* 基因的 GC 含量分别与基因组的 GC 含量相差 5.06%和 6.26%。这表明 MM6 的 T3SS 中的一些基因很可能是通过水平转移获得的。根据 MM6 菌株的基因组草图数据,我们绘制了 MM6 的 T3SS 基因簇的基本结构图,发现和其他慢生型根瘤菌的 T3SS 基本结构很相似。将 MM6 的 T3SS 基因簇与目前研究比较深入的标准菌株 *B. diazoefficiens* USDA110 的 T3SS 基因簇进行比较,发现 MM6 的 T3SS 基因簇的组成及结构与 *B. diazoefficiens* USDA110 的很一致,且基因序列相似性高。

参 考 文 献

- [1] Tampakaki AP. Commonalities and differences of T3SSs in rhizobia and plant pathogenic bacteria. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5: 114.
- [2] 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.
- [3] Okazaki S, Zehner S, Hempel J, Lang K, Göttfert M. Genetic organization and functional analysis of the type III secretion system of *Bradyrhizobium elkanii*. *FEMS Microbiology Letters*, 2009, 295(1): 88–95.
- [4] Ausmees N, Kobayashi H, Deakin WJ, Marie C, Krishnan HB, Broughton WJ, Perret X. Characterization of NopP, a Type III secreted effector of *Rhizobium* sp. strain NGR234. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(14): 4774–4780.
- [5] Marie C, Deakin WJ, Viprey V, Kopcińska J, Golinowski W, Krishnan HB, Perret X, Broughton WJ. Characterization of nops, nodulation outer proteins, secreted via the type III secretion system of NGR234. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2003, 16(9): 743–751.
- [6] Fabra A, Castro S, Taurian T, Angelini J, Inañez F, Dardanelli M, Tonelli M, Bianucci E, Valetti L. Interaction among *Arachis hypogaea* L. (peanut) and beneficial soil microorganisms: how much is it known? *Critical Reviews in Microbiology*, 2010, 36(3): 179–194.
- [7] Tsukui T, Eda S, Kaneko T, Sato S, Okazaki S, Kakizaki-Chiba K, Itakura M, Mitsui H, Yamashita A, Terasawa K, Minamisawaa 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.
- [8] 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 the United States of America*, 2013, 110(42): 17131–17136.
- [9] Ruan HQ, Hu MJ, Chen JY, Li X, Li T, Lai YX, Wang ET, Gu J. Detection of the type III secretion system and its phylogenetic and symbiotic characterization in peanut bradyrhizobia isolated from Guangdong Province, China. *Systematic and Applied Microbiology*, 2018, 41(5): 437–443.
- [10] 陈静瑜. 广东省慢生型花生根瘤菌的系统发育及共生匹配性研究. 华南师范大学硕士学位论文, 2016.
- [11] Honeycutt RJ, McClelland M, Sobral BW. Physical map of the genome of *Rhizobium meliloti* 1021. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175(21): 6945–6952.
- [12] Nutman PS. The modified Fahraeus slide technique/Vincent JM. A Manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacteria. Oxford-Edinburgh: Blackwell Scientific Publications, 1970.
- [13] 刘冬颖. *Mesorhizobium amorphae* CCNWGS0123 III 型分泌系统基因 *noIU* 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. Cold Spring Harbor, 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 root-nodule bacteria. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970.

- [18] Delamuta JRM, Ribeiro RA, Menna P, Bangel EV, Hungria M. Multilocus sequence analysis (MLSA) of *Bradyrhizobium* strains: revealing high diversity of tropical diazotrophic symbiotic bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2012, 43(2): 698–710.
- [19] Yang SM, Tang F, Gao MQ, Krishnan HB, Zhu HY. R gene-controlled host specificity in the legume–rhizobia symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(43): 18735–18740.
- [20] Lohar DP, Sharopova N, Endre G, Peñuela S, Samac D, Town C, Silverstein KAT, VandenBosch KA. Transcript analysis of early nodulation events in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, 2006, 140(1): 221–234.
- [21] Okazaki S, Tittabutr P, Teulet A, Thouin J, Fardoux J, Chaintreuil C, Gully D, Arrighi JF, Furuta N, Miwa H, Yasuda M, Nouwen N, Teamroong 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.
- [22] Sachs JL, Quides KW, Wendlandt CE. Legumes versus rhizobia: a model for ongoing conflict in symbiosis. *New Phytologist*, 2018, 219(4): 1199–1206.
- [23] Bailly X, Olivieri I, Brunel B, Cleyet-Marel JC, Béna G. Horizontal gene transfer and homologous recombination drive the evolution of the nitrogen-fixing symbionts of *Medicago* species. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(14): 5223–5236.

Structure and function of type III secretion system in peanut *Bradyrhizobium* sp. MM6

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

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

Abstract: **[Objective]** To reveal the functions of type III secretion system (T3SS) of peanut *Bradyrhizobium* sp. MM6 interacting with different host plants. **[Methods]** We analyzed its structural characteristics of T3SS gene clusters by BLASTn in NCBI related database, and constructed the T3SS regulatory gene *ttsI* mutant by homologous single exchange. We also compared the differences of symbiotic phenotype between the MM6 and its *ttsI* mutant by nodulating experiment. **[Results]** The T3SS gene clusters of MM6 included 3 regions containing 10 conserved structural genes and 8 effectors. The similarity was 83% to 93% with *B. diazoefficiens* USDA110 corresponding genes sequence. The total nodule number and fresh root nodule weight significantly increased in the *ttsI* mutant nodulating peanut and wild soybean. In soybean Zhonghuang 57, the MM6 formed red effective root nodules, whereas the *ttsI* mutant only formed 1 empty nodule, and the plant leaves turned yellow, and the dry weight of aboveground part was significantly lower than that of the wild type strain. **[Conclusion]** The T3SS of MM6 played a negative role in the symbiosis system of MM6 with peanut and wild soybean, whereas it played a positive role when nodulated with the soybean Zhonghuang 57.

Keywords: peanut *Bradyrhizobium*, type III secretion system, *ttsI*, symbiotic nitrogen fixation

(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: 7 May 2019; Revised: 1 July 2019; Published online: 27 August 2019