



大豆快生根瘤菌 SMH12 效应蛋白 NopP 在共生固氮过程中的功能

孙轶芳, 赵鹏, 刘元, 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】研究 *Sinorhizobium fredii* SMH12 中的 *nopP* 在共生固氮过程中的功能, 为深入解析根瘤菌效应蛋白的菌植互作机理提供线索, 进而为大豆高效根瘤菌的遗传改良提供一定的科学依据。【方法】利用生物信息学分析 *nopP* 的结构特征, 构建 *nopP* 缺失、过表达和互补菌株, 并对其进行共生表型分析; 通过 qRT-PCR 分析 *nopP* 在共生过程中的时空表达特征, 测定在接野生型和突变体的冀豆 17 中 *NIN*、*ENOD40*、*PR1*、*PR2* 和 *PR5* 的表达量; 采用激光共聚焦显微镜观察 NopP 的亚细胞定位。【结果】根瘤菌的 NopP 不包含任何已知功能域, 与病原体的任何 Avr 效应物没有同源性。*nopP* 缺失之后对冀豆 17 和中黄 13 的根瘤固氮酶活均有显著影响, 在瘤数上对冀豆 17 有显著增加, 表明 *nopP* 突变后促进其与冀豆 17 和中黄 13 的共生固氮。qRT-PCR 显示, *nopP* 在自生条件下少量表达, 在共生条件下表达量显著升高, 尤其在接菌 2 d 后表达量达到最高, 显示该基因可能与根瘤菌早期侵染相关。此外, 发现 NopP 在烟草叶片和大豆根中均定位于细胞膜和细胞核。接种突变体的冀豆 17 根中 *NIN* 的表达量升高 1.2 倍, *PR5* 的表达量降低 3.6 倍。【结论】效应蛋白 NopP 在与大豆共生过程中, 参与根瘤菌的早期侵染以及在根瘤菌与豆科宿主植物之间的免疫防御反应中发挥重要功能。

关键词: 共生固氮, 大豆快生根瘤菌 SMH12, 效应蛋白 NopP, 共生表型

病原菌使用不同的策略来破坏植物防御促进感染, 而 T3SS 是实现这一目标的重要武器。同样, 共生过程中 T3SS 对于有效的结瘤和宿主范围也是重要的^[1]。当宿主植物被初次感染时, 根瘤菌表

面保守的微生物相关分子模式(MAMPs)被特定的植物表面受体识别(PRR), 引起了局部较弱并且短暂的 MAMP 触发的免疫反应(MTI), 随后被多种机制抑制, 包括细胞外多糖、结瘤因子等^[2]。同时,

基金项目: 国家重点研发计划(2019YFA09004700, 2018YFD0201006); 国家自然科学基金(31670243); 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: 2019-12-18; 修回日期: 2020-03-26; 网络出版日期: 2020-09-15

根瘤菌通过 T3SS 分泌效应蛋白到宿主细胞中, 抑制植物防御反应, 为其繁殖提供有益的环境^[3-4]。然而, 效应蛋白也可以被特定的植物抗性(R)蛋白识别并诱导强烈的防御反应即效应蛋白触发的免疫(ETI), 进而导致局部超敏反应(HR), 以阻断侵染。但是, 一些效应蛋白也能够抑制 ETI 反应, 从而使其定殖^[5-6]。

T3SS 在许多根瘤菌中已鉴定出来, 并且也鉴定到通过该分泌系统分泌的一些蛋白, 这些蛋白统称为结瘤外蛋白(Nops), 能够影响宿主范围以及共生效率^[7]。在 *B. japonicum* 中, 预测超过 30 个基因可能是 III 型效应蛋白, 在 *S. fredii* 中, 大约有 15 个基因是可能的 III 型效应蛋白^[8]。Okazaki 等已经证明, 根瘤菌 Nops 还可以通过劫持由结瘤因子(nod factor, NF)诱导的结瘤信号并直接激活宿主共生信号^[9]。在效应蛋白中, NopL、NopC 和 NopP 为根瘤菌特异性蛋白, 其在植物和动物病原体中没有同源物^[10]。在 NGR234 中, NopL 抑制豆科植物根瘤提早衰老并且影响 MAPK 信号通路, 作为 MAP 激酶的磷酸化底物抑制本氏烟中的宿主防御反应^[11]。在 *S. fredii* HH103 基因组中, NopC 能够促进结瘤^[12]。NGR234 中 *nopP* 的突变导致宿主豆科植物千斤拔(*Flemingia congesta*)和非洲山毛豆(*Tephrosia vogelii*)的结瘤数量显著减少^[13]。HH103 中, *nopP* 的失活有利于 *G. max* (L.) Merrill cv. Williams 的结瘤, 但是不利于对热带豆科植物 *Erythrina variegata* 的结瘤。并且发现 *nopP* 突变体接种到 Williams 上时, 根部病程相关基因 *PR1* 的转录水平降低, 表明 NopP 对该宿主植物的共生起负调作用^[14]。*B. diazoefficiens* USDA122 的 NopP 是介导 *Rj2*-大豆共生不相容的决定因素, *Rj2* 蛋白属于 R 蛋白的 TIR-NBS-LRR 类^[15-16]。对 USDA122 中的 *nopP* 突变分析表明 NopP 中的 R60、R67 和

H173 三个残基是介导 *Rj2* 的不相容性所必需的。表明 *Rj2*-大豆通过由 *Rj2* 蛋白介导的效应蛋白触发的免疫来监测 NopP 的特定变体并阻碍 USDA122 侵染^[17]。但对 NopP 蛋白在快生根瘤菌中的功能却知之甚少。

Sinorhizobium fredii SMH12 是一种广宿主根瘤菌, 可与大豆及其他几十种豆科植物结瘤固氮, 也是一种具有良好应用前景的根瘤菌接种剂^[18]。因此, 本研究对 SMH12 中的 *nopP* 进行共生表型鉴定和机制分析, 旨在为深入研究大豆快生根瘤菌效应蛋白的菌植互作机制提供科学依据和实验材料。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和培养基: 所用菌株和质粒见表 1。根瘤菌(*Sinorhizobium fredii* HH103)采用 YMA 培养基培养, 筛选突变体时采用 AMS 培养基, 培养条件是 28 °C 培养; 大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)采用 LB 培养基, 培养条件是 37 °C。

1.1.2 植物材料: 冀豆 17、中黄 13、*Glycine max* Williams 82、BD2、圣豆 10 号、绥农 14 和天隆一号(均来自王学路实验室)。

1.1.3 主要试剂和仪器: 限制性内切酶、反转录酶、RNase inhibitor 购自 Fermentas 公司, pMD19-T (simple)、DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司, PCR 反应相关试剂、琼脂糖凝胶电泳 Marker 购自东盛公司; 抗生素、培养基相关等分子生物学试剂均购自中国国药集团。本研究所用 PCR 引物的合成和 DNA 的测序均由武汉天一辉远有限公司和擎科生物科技有限公司完成; 荧光定量 PCR 仪为 ABI Step One, 气相色谱仪为 GC4000A。

表 1. 本研究所用菌株和质粒
Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Characteristics or function	Sources
<i>E. coli</i> DH5 α	Host of recombinant plasmids	This lab
<i>E. coli</i> S17-1	The helper strain used for conjugation	This lab
GV3101	Host of recombinant plasmids	This lab
<i>Sinorhizobium fredii</i> SMH12	Wide type of <i>Sinorhizobium fredii</i> , Str ^f	This lab
SMH12 (Δ nopP)	In frame deletion of <i>nopP</i> from SMH12, kan ^r	This study
CM-nopP	Complement of <i>nopP</i> for SMH12 Δ nopP, Gm ^r	This study
OE-nopP	Overexpression of <i>nopP</i> for SMH12, Gm ^r	This study
PMP2463	Gene fusion expression localization vector, Gm ^r	This lab
pCM351	Mutant strains construction vector, Gm ^r	This lab
pCM158	Mutant strains construction vector, Kan ^r	This lab
pBBR1MCS5	Gene fusion expression vector, Gm ^r	This lab
pCAMBIA1302	Gene fusion expression localization vector, Kan ^r	This lab

1.1.4 引物: 本研究所用引物见表 2, 引物均用 Primer 5.0 软件设计。

1.2 生物信息学分析

通过 NCBI 网站查找目的基因序列, 然后通过 BLASTp 比对查找同源蛋白, 挑选不同种属的同源蛋白序列, 利用 MEGA 软件构建系统发育树。

1.3 qRT-PCR 检测目的基因在自生及共生下的表达量

大豆种子经氯气消毒灭菌后, 放置于超净工作台吹 40 min, 然后用无菌水浸泡种子 1 h, 播种于灭菌后的蛭石中, 用无氮液浇灌。待幼苗长出第一片真叶时, 接快生型根瘤菌 SMH12, 分别收取接菌后 8 h、1 d、2 d、4 d、8 d、10 d、12 d、14 d、16 d、20 d、25 d 的根部组织, 抽提以上不同天数根部组织及自生条件下 SMH12 中的 RNA, 并反转录成 cDNA, 以得到的 cDNA 为模板、16S RNA 为内参基因做荧光定量 PCR。qRT-PCR 反应程序如下: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 60 °C 20 s, 72 °C 20 s, 40 个循环; 72 °C 5 min。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^[19]。

1.4 亚细胞定位分析

1.4.1 在烟草细胞中的亚细胞定位: 以 SMH12

基因组为模板扩增 *nopP* 编码序列并连接到 GFP 的 N 端, 融合表达 NopP-GFP。随后将载体转化到根癌农杆菌 GV3101 菌株中, 过夜培养并收集菌液, 使用烟草注射 buffer 重悬菌体(0.01 mol/L MES-OH, pH 5.8, 0.01 mol/L MgCl₂, 0.15 mol/L 乙酰丁香酮 acetosyringone), 使其终浓度 OD₆₀₀ 为 0.5, 然后室温静置 4 h 后用 1 mL 注射器从烟草叶片下表皮注射进整片烟草叶片, 培养 2 d 后使用激光扫描共聚焦显微镜(Zeiss LSM510)观察细胞荧光并拍照。

1.4.2 在共生状态下的亚细胞定位: 大豆种子经氯气消毒灭菌后, 放置于超净工作台吹 40 min, 用无菌水浸泡种子 1 h, 播种于灭菌后的蛭石中, 用无氮液浇灌。待幼苗长出第一片真叶时, 接快生型根瘤菌 SMH12, 分别收取接菌后 2 d 和 8 d 的植物根部组织, 使用激光扫描共聚焦显微镜(Zeiss LSM510)观察细胞荧光并拍照。

1.5 *nopP* 缺失、超表达及互补菌株的构建

1.5.1 Δ nopP 突变体的筛选与鉴定: 利用 Crelox 系统双交换置换缺失的方法^[20], 构建 *nopP* 缺失突变体。以 SMH12 基因组 DNA 为模板, 采用 *nopP*-up-F/R 和 *nopP*-down-F/R 引物对, 分别扩增 *nopP* 同源交换上臂和下臂, 将产物连接到载体

表 2. 本研究所用引物
Table 2. Primers used in this study

Primers	Sequences of primers (5'→3')	Brief description
nopP-up-F	ggtaccATCATCTGGCAATCGGTT	Amplifying the exchange upstream arm fragment
nopP-up-R	catatgACGAGCTATCAATTCGACC	
nopP-down-F	gggccGACTTACGAAGATGACTTCATG	Amplifying the exchange downstream arm fragment
nopP-down-R	accggtCATCTACTTATGAGCTCCAGC	
nopP-Map-F	AGTCGGGACGCAATGGAT	Validation of <i>nopP</i> mutants
nopP-Map-R	ACTCCACTTCCAATCACTCCG	
nopP-ORF-F	ATGTACGGTTCGAATTGATAGCT	Cloning the ORF of <i>nopP</i> used for complementary plasmid
nopP-ORF-R	TCACATGAAGTCATCTTCGTAAGT	
Gm-F	ATGTTACGCAGCAGCAACG	Cloning the ORF of Gm
Gm-R	TTAGGTGGCGGTACTTGGG	
nopP-q-F	AGGTGGGTTTCAGCATGGAAG	Using for <i>nopP</i> of qRT-PCR
nopP-q-R	GCTCGAGCAGAATATCGCCT	
16S-q-F	GGATCGGAGACAGGTGCTGCA	Reference gene of qRT-PCR
16S-q-R	CGTGTGTAGCCCAGCCCGTA	
nopP-L-F	ggtaccATGTACGGTTCGAATTGATAGCT	Construction of the recombination of <i>NopP</i> localization
nopP-L-R	tctagaCATGAAGTCATCTTCGTAAGT	
PR1-F	GGCCAATACGGGGAGAATCT	Using for PR1 qRT-PCR
PR1-R	TCCAAACAACCTGAGTGTAATGC	
PR2-F	TGAGAGTGGATGGCCTTCTT	Using for PR2 qRT-PCR
PR2-R	TGTTTCACATTCGGAACCAA	
PR5-F	AACGTGCCCATGGACTTTAG	Using for PR5 qRT-PCR
PR5-R	CGGTTTTGAAGACAGTGCAA	
ENOD40-F	GGCTTCTCTGATCAACAAGGG	Using for ENOD40 qRT-PCR
ENOD40-R	ACATAGCCATAGAGACCCCA	
NIN-F	ATATGGTGGGTTGGTGCAGA	Using for NIN qRT-PCR
NIN-R	CCCAGCATCCTTCCACAAAC	
Tef-q-F	TGCAAAGGAGGCTGCTAACT	Reference gene of qRT-PCR
Tef-q-R	CAGCATCACCGTTCTTCAA	
M13-F	GAGCGGATAACAATTTACACAGG	Identify the recombination plasmid PMP2463- <i>NopP</i>
M13-R	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	

pMD19-T (simple), 测序正确后将其双酶切后分两步与消化的 pCM351 载体连接, 得到质粒 pCM351::*nopP*-up-down 转化至 *E. coli* S17-1 中, 经两亲本结合转移, 稀释涂布于 SM+Str+Gm 平板上, 经引物对 *nopP*-MAP-F/R 及 Gm-F/R 筛选转化子, 进行 PCR 验证突变体。

1.5.2 超表达和 *nopP* 互补菌株的构建: 以快生型根瘤菌 SMH12 基因组 DNA 为模板, 用 *nopP*-ORF-F/R 引物对, 扩增得到 *nopP* 完整的开放阅读框, 经酶切回收后与同样双酶切的载体

pBBR1MCS-5 连接, 构建重组表达载体 pBBR5-*nopP*, 测序正确后进行两亲本接合转移, 分别将重组载体导入野生型 SMH12 及突变体 Δ *nopP* 中, 稀释涂布于含有相应抗生素的平板上, 倒置于 28 °C 培养箱中, 培养 4–7 d 后, 以引物对 M13-F/R 进行阳性转化子 PCR 验证。

1.6 根瘤菌-大豆共生表型分析

大豆种子经氯气消毒灭菌后, 放置于超净工作台吹 40 min, 用无菌水浸泡种子 1 h, 播种于灭菌后的蛭石中, 用无氮液浇灌。待幼苗长出第一片真叶

时,分别接野生型 SMH12(WT)、突变体菌株 $\Delta nopP$ 、超表达菌株 $nopP(OE)$ 、互补菌株(CM),收取接菌后 25 d 植物,分别统计野生型和突变体植物的地上部分鲜重、根瘤数量、根瘤重量及固氮酶活。

1.7 大豆共生及免疫防御相关基因的表达量分析

分别收取接菌野生型 SMH12 和突变体 $\Delta nopP$ 后 2 d 的冀豆 17 根部组织,抽提以上不同根部组织的 RNA,并反转录成 cDNA,以得到的 cDNA 为模板,TEF 为内参基因做荧光定量 PCR,分析野生型和突变体中 *NIN*、*ENOD40*、*PR1*、*PR2* 和 *PR5* 的表达量。qRT-PCR 反应程序如下:95 °C 5 min;94 °C 30 s,60 °C 20 s,72 °C 20 s,40 个循环;72 °C 5 min。信号检测染料使用 SYBR Green,相对表达量分析采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 值的方法。

2 结果和分析

2.1 NopP 的系统发育进化树

前期,我们对 *Sinorhizobium fredii* SMH12 基因组进行了测序和注释,并且通过同源比对发现 *S. fredii* SMH12 基因组中含有一个可能的 *nopP*,进一步通过 BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)分析发现,在快生型、慢生型和中慢生型根瘤菌中均存在 NopP 同源蛋白。系统发育树分析显示,NopP 的同源蛋白分为 3 个簇,分别为相似度较高的慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)、快生型的中华根瘤菌属(*Sinorhizobium*)和中慢生根瘤菌属(*Mesorhizobium*) (图 1)。氨基酸比对分析发现,NopP 在同一菌属中相似度较高,相似度均超过 90% ,

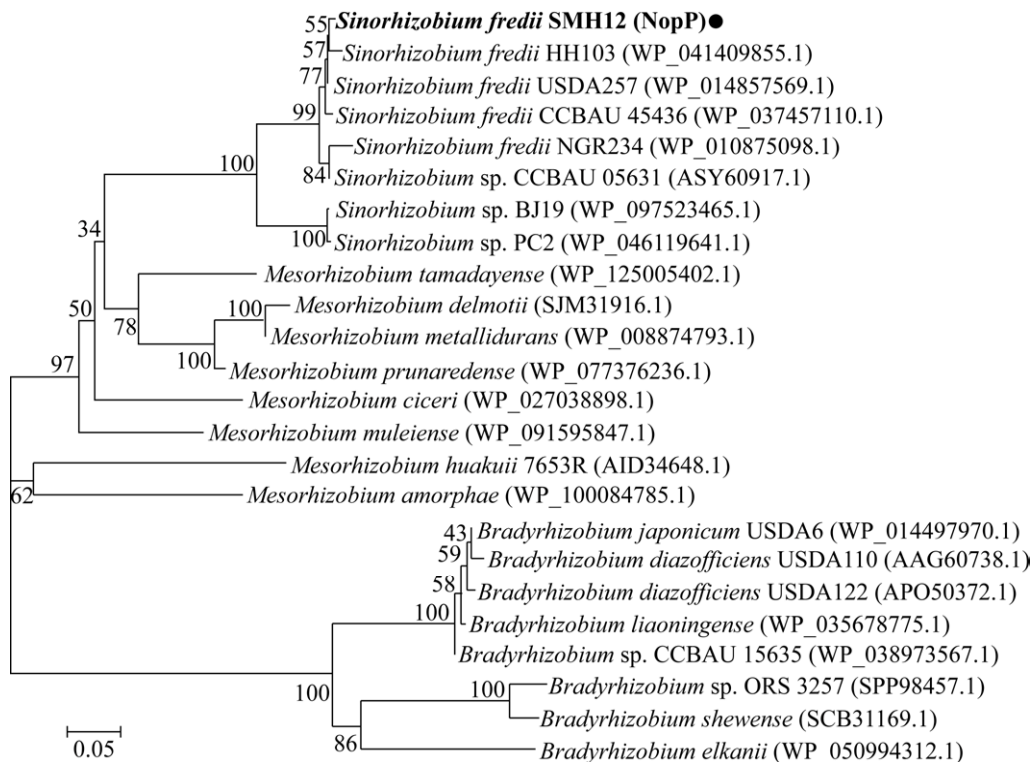


图 1. NopP 同源蛋白的系统发育进化树

Figure 1. Neighbour-joining phylogenetic tree of NopP homologues. Phylogenetic tree of NopP and its homologs from other species was constructed by the neighbor-joining method using the MEGA version X program. Numbers in bracket represent the sequences accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, 0.05 sequence divergence.

而在不同菌属中相似度则较低, 不超过 40%。另外, 我们在其他非根瘤菌属中未检索到 NopP 同源蛋白的存在, 表明 NopP 是根瘤菌中所特有的效应蛋白, 且保守性较高, 可能是在共生的根瘤菌系统中进化来的。

2.2 根瘤发育过程中 *nopP* 的表达特征

为了明确 *nopP* 在根瘤发育过程中的表达特征, 我们采用 qRT-PCR 方法分别对接菌处理的大豆根瘤样品进行了表达量分析。结果显示, SMH12 中的 *nopP* 在自生和共生过程中均可表达。其中在接菌 2 d 后, *nopP* 表达量最高, 是自生条件的 52 倍, 随后表达量逐渐下降, 并趋于稳定, 但相对于自生条件仍然高量表达(图 2), 表明 *nopP* 在共生过程中发挥重要作用。

2.3 NopP 蛋白的亚细胞定位

为了探明 NopP 在细胞水平下的定位, 我们对生长约 4 周的烟草进行了农杆菌瞬时表达转化, 并在注射 48 h 后观察 NopP 的定位。结果显示, 在烟草叶片细胞表面和细胞核中均能观察到绿色荧光,

并进一步通过 DAPI 染色, 观察到圆点状的蓝色荧光与绿色点状荧光重合, 明确 NopP 定位于细胞核中(图 3-A), 表明 NopP 在烟草中定位于细胞膜和细胞核中。

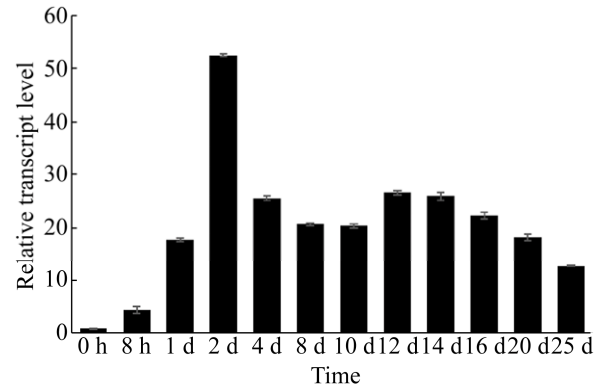


图 2. *nopP* 在自生及共生不同时期的动态表达

Figure 2. The dynamic expression patterns of *nopP* under free-living condition and different staged root nodules. From left to right: SMH12 of free-living cells; RNA was isolated from the roots at 8 h, 1, 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 20 and 25 days after inoculation respectively. The primers listed in Table 2 as described in Methods. The expression level of each gene was normalized by the 16S rRNA gene. Data presented are means±standard deviations of three independent experiments.

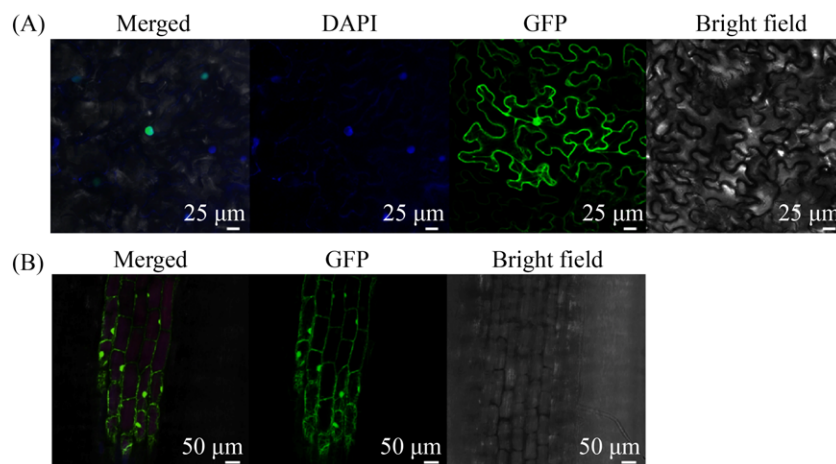


图 3. NopP 在烟草和共生状态下的亚细胞定位

Figure 3. Expression of NopP::GFP in tobacco epidermal (A) and soybean root cells (B). *N. benthamiana* leaves and soybean roots were transfected with combinations of constructs for the expression of NopP::GFP. Confocal images of tobacco cells and soybean root cells expressing NopP fused to green fluorescent protein (GFP). Tobacco leaves were taken 24–48 h after transfection. Soybean root tissues were collected at 2 and 8 days after inoculation. Scale bars, 25 μm (A) and 50 μm (B).

为了进一步明确 NopP 的亚细胞定位, 我们将 SMH12 (pMP2463-nopP) 接种于冀豆 17 中, 并分别取接菌 2 d 和 8 d 后的植物根部, 随后将根部进行琼脂糖包埋做成切片, 再用激光共聚焦观察。结果显示: NopP 在细胞膜和细胞核中均能观察到荧光(图 3-B), 与在烟草叶片中观察的结果相一致。因此, 明确 NopP 定位于细胞膜和细胞核中。

2.4 $\Delta nopP$ 突变菌株的构建和鉴定

以 SMH12 总基因组 DNA 为模板, 分别扩增大小为 692 bp 和 691 bp 的同源上臂和下臂(图 4-A), 同源上臂经 *Kpn* I 和 *Nde* I 连到载体 pCM351, 再经 *Apa* I 和 *Age* I 将同源下臂连到载体 pCM351::up。将构建好的重组质粒导入快生型根瘤菌 SMH12 中, 重组质粒上的交换片段与根瘤菌基因组中的 *nopP* 上、下游片段发生同源重组, 整合到染色体上, 进而将该基因置换。以载体 pCM351 的引物 Gm-F 与酶切位点对应的目的基因的筛选引物 *nopP*-MAP-R 进行 PCR 验证扩增出约为 1625 bp (图 4-B) 片段, 大小与预期相符。同时采用野生型 SMH12 总 DNA 模板为阴性对照, 无

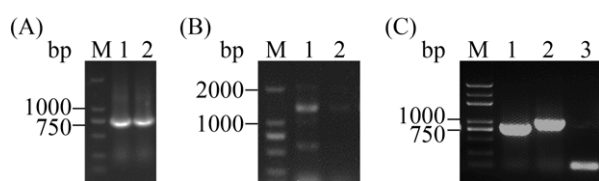


图 4. $\Delta nopP$ 突变株的 PCR 鉴定

Figure 4. Identification of SMH12 ($\Delta nopP$) mutant by PCR. M: DL2000 DNA marker. A: PCR amplification of exchanging arms. Lane 1: the exchange upstream arm; lane 2: the exchange downstream arm. B: PCR verification of SMH12::Gm. Lane 1: the post-gene exchange vector fragment; lane 2: the SMH12 wild-type genome. C: From 1 to 3: cloning the ORF of *nopP* validates the wild type SMH12 genome, SMH12 ($\Delta nopP$), and the elimination the Gm resistant mutant.

条带扩出。进一步将 pCM158 导入 SMH12 ($\Delta nopP$::Gm), 将 Gm 消除得到完全缺失突变体 $\Delta nopP$, 并进行 PCR 验证, 结果表明 SMH12 ($\Delta nopP$) 突变体构建正确(图 4-C)。

2.5 $\Delta nopP$ 突变体与冀豆 17 和中黄 13 的共生固氮表型分析

为了研究 SMH12 ($\Delta nopP$) 对共生固氮的影响, 也构建了 *nopP* 超表达 OE-*nopP* 及互补 CM-*nopP*, 并考察各菌株与冀豆 17 和中黄 13 的共生表型。结果表明, 冀豆 17 和中黄 13 接种不同菌株地上部分长势均有差异, 冀豆 17 接种突变体后的长势高且叶片为绿色, 接种超表达的与野生型相比长势较弱且发黄。接种互补菌株的植物表型介于野生型与突变体之间, 可部分恢复到野生型表型(图 5-A)。同样, 中黄 13 接种突变体和接种超表达的地上植物长势均较野生型的高且叶片为绿色, 接种互补菌株的植物表型介于野生型与突变体之间, 可部分恢复到野生型表型(图 5-B)。

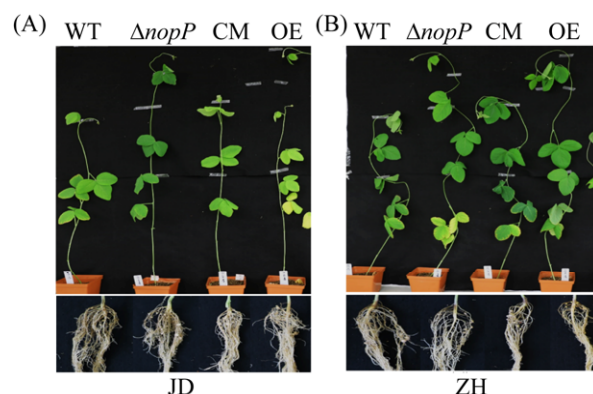


图 5. $\Delta nopP$ 突变株与冀豆 17 和中黄 13 的共生表型
Figure 5. Symbiotic phenotype induced by strains tested on JD17 and ZH13. A: Symbiotic phenotype induced by strains tested on JD17; B: Symbiotic phenotype induced by strains tested on ZH13. WT: the wild type SMH12; $\Delta nopP$: the *nopP* mutant strain; CM: the *nopP* complementation strain; OE: the *nopP* overexpression strain.

进一步对植株根瘤固氮酶活、瘤数、瘤重及地上部分鲜重进行统计分析, 结果表明, 冀豆 17 接种突变体植株的固氮酶活为 24.3 $\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{h})$, 野生型植株的共生固氮酶活为 11.1 $\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{h})$, 突变株的固氮酶活相较于野生型显著升高($P<0.05$), 瘤数也显著高于野生型。接种超表达菌株的植物根瘤酶活、瘤数、瘤重及地上部分鲜重均显著低于野生型。接种突变体的中黄 13 植株的根瘤固氮酶活较野生型显著升高, 接种超表达菌株的植株根瘤固氮酶活为 8.6 $\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{h})$, 野生型植株的为 23.3 $\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{h})$, 超表达的固氮酶活相较于野生型显著降低($P<0.01$)。接种突变体和超表达的瘤数、瘤重以及地上部分鲜重相较于于野生型无明显差异(图 6)。总之, *nopP*

突变后影响了根瘤的生长发育, 导致冀豆 17 和中黄 13 的根瘤固氮酶活性升高, 从而促进了植物的生长发育, 表明 *nopP* 的功能与共生固氮作用相关。

2.6 冀豆 17 根中共生和免疫相关基因的表达量分析

通过接种突变体菌与野生型菌相比, 在接菌 2 d 后的冀豆 17 根中 *NIN* (在 *NFR* 感知 NFs 后表征良好的共生基因)的表达量升高 1.2 倍, *ENOD40* 表达水平没有显著变化。为了检查在冀豆 17 根中 *nopP* 是否激活了防御反应, 我们监测了冀豆 17 根中防御标记基因(*PR1*, *PR2* 和 *PR5*)的表达。结果表明, 与接种野生型的相比, 接种突变体菌的冀豆 17 根中 *PR5* 在接菌 2 d 后的表达量显著降低 3.6 倍。相反, *PR1* 和 *PR2* 的表达没有显著改变(图 7)。

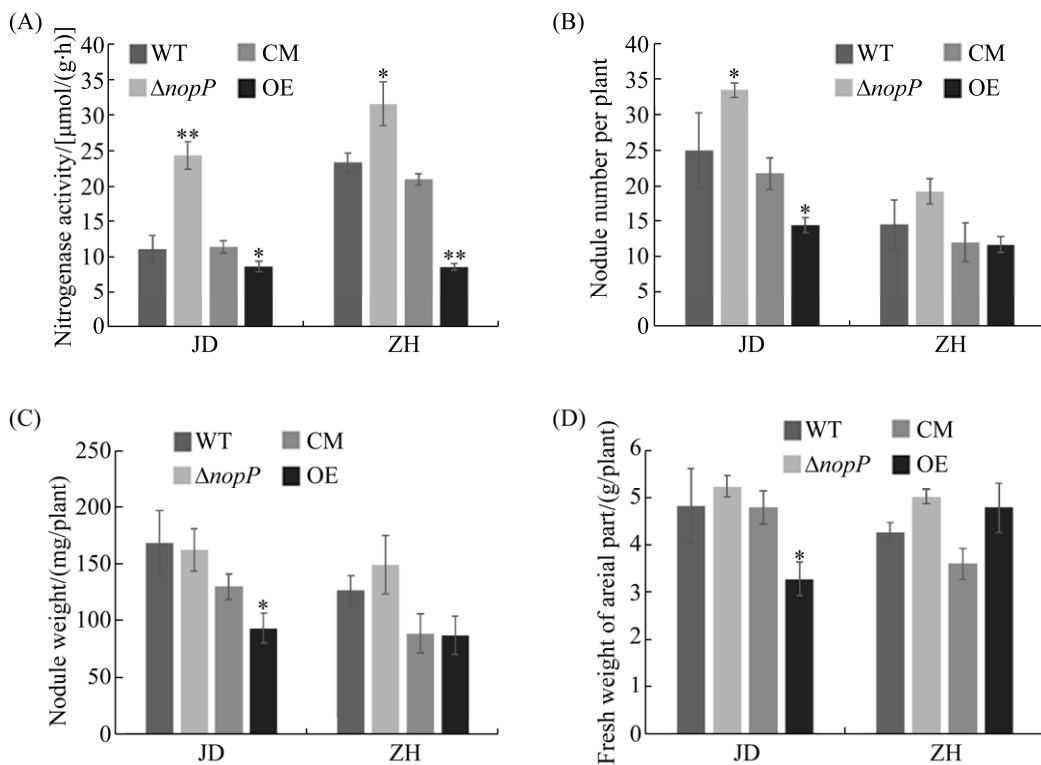


图 6. 植株根瘤固氮酶活、瘤数、瘤重及地上部分鲜重的比较测定

Figure 6. Comparative quantification of the nitrogenase activity (A), number of nodules (B), weight of nodules (C) and fresh weight (D) of aerial part induced by strains tested on JD17 and ZH13. WT: the wild type SMH12; $\Delta nopP$: the *nopP* mutant strain; CM: the *nopP* complementation strain; OE: the *nopP* overexpression strain. *: significant difference at $P<0.05$; **: significant difference at $P<0.01$; the error bars represent the standard deviations of three independent experiments.

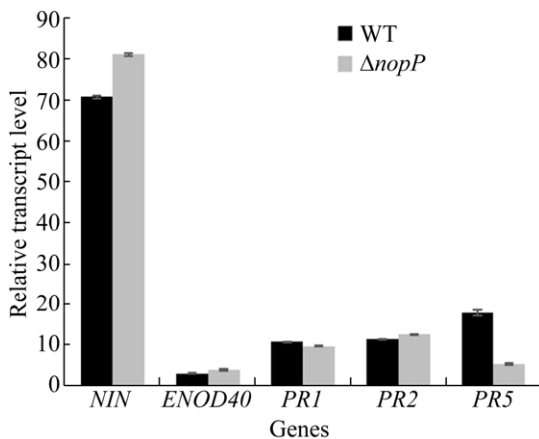


图 7. *NIN*、*ENOD40*、*PR1*、*PR2* 和 *PR5* 在冀豆 17 中的表达量

Figure 7. Expression of *NIN*, *ENOD40*, *PR1*, *PR2* and *PR5* genes in roots of JD17. *G. max* cv. JD17 inoculated with SMH12 and SMH12 $\Delta nopP$ was determined by quantitative reverse transcription PCR using primers listed in Table 2 as described in Methods. RNA was isolated from the roots at 2 day after inoculation (DAI). The expression level of each gene was normalized by the *TEF* gene. Data presented are means \pm standard deviations of three independent experiments.

这表明 *PR5* 的瞬时和早期表达是由野生菌引起的, 可能和 *nopP* 有关。这些结果表明在与冀豆 17 的共生过程中, *nopP* 可能被宿主识别后引起了防御反应, 从而抑制了早期根瘤菌的侵染。

3 讨论

本室对大豆快生型根瘤菌 SMH12 基因组进行了测序和注释, 通过生物信息分析发现其基因组中含有 1 个可能的 *nopP*。前人报道, *B. diazoefficiens* USDA122 中的 NopP 是介导 *Rj2*-大豆共生不相容性的决定因素。对 USDA122 中 *nopP* 与 USDA110 的 *nopP* 分析发现只有 3 个氨基酸残基(R60、R67 和 H173)有差异, 而 USDA110 能与 *Rj2*-大豆正常结瘤^[15]。这暗示了虽然通过系统发育分析该基因在快生型根瘤菌属中相似性较高(图 1), 但是可能

发挥不同的功能。在 NGR234 中, *nopP* 的突变导致宿主豆科植物千斤拔(*Flemingia congesta*)和非洲山毛豆(*Tephrosia vogelii*)的结瘤数量显著减少^[13]; 在 HH103 中, *nopP* 的失活有利于 *G. max* (L.) Merrill cv. Williams 的结瘤, 但是不利于对热带豆科植物 *Erythrina variegata* 的结瘤^[14]; 在 USDA257 中, *nopP* 以依赖于 T3SS 的方式分泌到 *Vigna unguiculata* 的根瘤中^[21]; USDA122 的 NopP 是介导 *Rj2*-大豆共生不相容性的决定因素^[15]。而本研究中, SMH12 中的 *nopP* 缺失后, 对冀豆 17 和中黄 13 的根瘤固氮酶活均有显著影响, 在瘤数上对冀豆 17 有显著增加(图 6), 表明 *nopP* 突变后促进了冀豆 17 和中黄 13 的共生固氮。已有研究发现 T3SS 的基因在早期侵染阶段以及在不同宿主植物的成熟根瘤中表达水平较高^[22-23]。然而, 在大豆中, NopX 只在侵染线中检测到, 而在成熟根瘤中没有检测到^[24]。此外, 蛋白质组学和转录组学方法已经揭示 T3SS 相关基因在大豆成熟根瘤中下调^[25-26]。在接种 HH103 的 T3SS 缺失突变体后 4 d, *PR1* 的表达在根中开始增加, 而在识别可能的诱导子和 *PR1* 蛋白的合成之间必定存在一定的时间间隔, 表明 HH103 的结瘤外蛋白(Nops)在与大豆共生的早期侵染阶段中被识别, 可能抑制大豆防御反应, 从而促进侵染^[14]。本研究通过 qRT-PCR 检测 *nopP* 的表达, 结果显示 *nopP* 在自生条件下仅少量表达, 而在共生条件下表达量显著性升高(图 3), 尤其是在接菌 2 d 后表达量达到最高, 预示着该基因可能参与共生固氮过程并与根瘤菌早期侵染相关。此外, 利用基因-报告基因(NopP-GFP)融合的方法, 发现 *nopP* 基因在烟草和大豆根均定位于细胞膜和细胞核中。由此, 我们分析认为 NopP 蛋白可能通过直接或间接调控共生以及免疫相关的基因, 影响其共生固氮与根瘤菌早期侵染过程。

已发现根瘤菌 T3SS(*rhc*)基因和宿主植物 R 基因负责诱导共生不相容性^[27-29]。这些发现暗示宿主植物通过感知特定的根瘤菌 T3SS 效应蛋白, 并通过防御反应抑制根瘤菌侵染^[30-32]。一般而言, ETI 引起快速合成水杨酸(SA), SA 响应 Avr 效应物必需信号分子的快速合成, 随后诱导 SA 依赖性防御信号(例如 *PR1*、*PR2* 和 *PR5*)^[33-34]。在 *Rj4*-大豆植物与 *Bradyrhizobium elkanii* USDA61 的不相容性中, SA 积累并且 *PR1* 在根中的表达增加^[35]。最近报道在接种 USDA122 后, 在侵染的早期阶段瞬时诱导 *Rj2*-大豆中的 *PR2* 基因(2 DAI)。*PR2* 诱导的时间与 *G. max* (L.) Merr. cv. Hardee (*Rj2*)根毛中侵染线(IT)发育的抑制相关。表明 *Rj2*-大豆在结瘤的早期阶段通过接种 USDA122 激活宿主防御反应, 并且下游防御信号传导途径可能与 *Rj4*-共生不相容性不同^[15]。将 *S. fredii* HH103 的 *nopP* 突变体接种到大豆 Williams 上时, 根部防御基因 *PR1* 的转录水平降低, 表明 NopP 对该宿主植物的共生起负调控作用^[14]。因此, 我们进一步通过定量分析共生以及免疫防御相关基因的表达量的变化情况, 发现与接种野生型菌相比, 接种突变体菌的冀豆 17 根中 *NIN* 的表达量升高 1.2 倍, *PR5* 的表达量降低 3.6 倍。说明 NopP 在进入宿主细胞过程中, *NIN* 和 *PR5* 可能参与了这一过程, 影响宿主免疫防御及根瘤菌的侵染。

本文首次研究了大豆快生型根瘤菌 SMH12 中的效应蛋白 NopP 对共生固氮的影响。我们通过生物信息学及实验结果分析, 认为快生型根瘤菌 SMH12 中 *nopP* 基因可能在根瘤菌早期侵染及宿主的免疫防御过程中发挥重要功能, 但具体的功能机制还有待进一步实验研究。因此, 本文的研究结果为深入了解在共生结瘤早期根瘤菌-豆科植物相互识别的机制提供了新线索。

参考文献

- [1] Deakin WJ, Broughton WJ. Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion systems. *Nature Reviews Microbiology*, 2009, 7(4): 312–320.
- [2] Zamioudis C, Pieterse CMJ. Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2012, 25(2): 139–150.
- [3] Alfano JR, Collmer A. Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annual Review of Phytopathology*, 2004, 42: 385–414.
- [4] Jones JDG, Dangl JL. The plant immune system. *Nature*, 2006, 444(7117): 323–329.
- [5] Boller T, Felix G. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology*, 2009, 60: 379–406.
- [6] Tsuda K, Katagiri F. Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, 2010, 13(4): 459–465.
- [7] Staehelin C, Krishnan HB. Nodulation outer proteins: double-edged swords of symbiotic rhizobia. *Biochemical Journal*, 2015, 470(3): 263–274.
- [8] Kimbrel JA, Thomas WJ, Jiang Y, Creason AL, Thireault CA, Sachs JL, Chang JH. Mutualistic co-evolution of type III effector genes in *Sinorhizobium fredii* and *Bradyrhizobium japonicum*. *PLoS Pathogens*, 2013, 9(2): e1003204.
- [9] 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.
- [10] Bartsev AV, Boukli NM, Deakin WJ, Staehelin C, Broughton WJ. Purification and phosphorylation of the effector protein NopL from *Rhizobium* sp. NGR234. *FEBS Letters*, 2003, 554(3): 271–274.
- [11] Zhang L, Chen XJ, Lu HB, Xie ZP, Staehelin C. Functional analysis of the type 3 effector nodulation outer protein L (NopL) from *Rhizobium* sp. NGR234: symbiotic effects, phosphorylation, and interference with mitogen-activated protein kinase signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(37): 32178–32187.
- [12] Jiménez-Guerrero I, Pérez-Montaña F, Medina C, Ollero FJ, López-Baena FJ. NopC is a *Rhizobium*-specific type 3 secretion system effector secreted by *Sinorhizobium* (*Ensifer*) *fredii* HH103. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0142866.
- [13] Skorpil P, Saad MM, Boukli NM, Kobayashi H, Ares-Orpel F, Broughton WJ, Deakin WJ. NopP, a phosphorylated effector of *Rhizobium* sp. strain NGR234, is a major determinant of

- nodulation of the tropical legumes *Flemingia congesta* and *Tephrosia vogelii*. *Molecular Microbiology*, 2005, 57(5): 1304–1317.
- [14] López-Baena FJ, Monreal JA, Pérez-Montaña F, Guasch-Vidal B, Bellogín RA, Vinardell JM, Ollero FJ. The absence of Nops secretion in *Sinorhizobium fredii* HH103 increases *GmPR1* expression in Williams soybean. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2009, 22(11): 1445–1454.
- [15] Gassmann W, Bhattacharjee S. Effector-triggered immunity signaling: from gene-for-gene pathways to protein-protein interaction networks. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2012, 25(7): 862–868.
- [16] Kourelis J, Van Der Hoorn RAL. Defended to the nines: 25 years of resistance gene cloning identifies nine mechanisms for R protein function. *The Plant Cell*, 2018, 30(2): 285–299.
- [17] Sugawara M, Takahashi S, Umehara Y, Iwano H, Tsurumaru H, Odake H, Suzuki Y, Kondo H, Konno Y, Yamakawa T, Sato S, Mitsui H, Minamisawa K. Variation in bradyrhizobial NopP effector determines symbiotic incompatibility with *Rj2*-soybeans via effector-triggered immunity. *Nature Communications*, 2018, 9: 3139.
- [18] Rodríguez-Navarro DN, Bellogín R, Camacho M, Daza A, Medina C, Ollero FJ, Santamaría C, Ruiz-Saínz JE, Vinardell JM, Temprano FJ. Field assessment and genetic stability of *Sinorhizobium fredii* strain SMH12 for commercial soybean inoculants. *European Journal of Agronomy*, 2003, 19(2): 299–309.
- [19] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [20] Marx CJ, Lidstrom ME. Broad-host-range *cre-lox* system for antibiotic marker recycling in gram-negative bacteria. *BioTechniques*, 2002, 33(5): 1062–1067.
- [21] Schechter LM, Guenther J, Olcay EA, Jang S, Krishnan HB. Translocation of NopP by *Sinorhizobium fredii* USDA257 into *Vigna unguiculata* root nodules. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(11): 3758–3761.
- [22] Perret X, Freiberg C, Rosenthal A, Broughton WJ, Fellay R. High-resolution transcriptional analysis of the symbiotic plasmid of *Rhizobium* sp. NGR234. *Molecular Microbiology*, 1999, 32(2): 415–425.
- [23] Zehner S, Schober G, Wenzel M, Lang K, Göttfert M. Expression of the *Bradyrhizobium japonicum* type III secretion system in legume nodules and analysis of the associated *its* box promoter. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2008, 21(8): 1087–1093.
- [24] Krishnan HB. NolX of *Sinorhizobium fredii* USDA257, a type III-secreted protein involved in host range determination, is localized in the infection threads of cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp) and soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) nodules. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(3): 831–839.
- [25] Sarma AD, Emerich DW. Global protein expression pattern of *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids: a prelude to functional proteomics. *Proteomics*, 2005, 5(16): 4170–4184.
- [26] Chang WS, Franck WL, Cytryn E, Jeong S, Joshi T, Emerich DW, Sadowsky MJ, Xu D, Stacey G. An oligonucleotide microarray resource for transcriptional profiling of *Bradyrhizobium japonicum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2007, 20(10): 1298–1307.
- [27] 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.
- [28] Tsukui T, Eda S, Kaneko S, 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.
- [29] Okazaki S, Zehner S, Hempel J, Lang K, Gottfert M. Genetic organization and functional analysis of the type III secretion system of *Bradyrhizobium elkanii*. *FEMS Microbiology Letters*, 2009, 295(1): 88–95.
- [30] Gourion B, Berrabah F, Ratet P, Stacey G. Rhizobium-legume symbioses: the crucial role of plant immunity. *Trends in Plant Science*, 2015, 20(3): 186–194.
- [31] Macho AP, and Zipfel C. Science direct targeting of plant pattern recognition receptor triggered immunity by bacterial type-III secretion system effectors. *Current Opinion in Microbiology*, 2015, 23(6): 14–22.
- [32] Marie C, Broughton WJ, Deakin WJ. Rhizobium type III secretion systems: legume charmers or alarmers? *Current Opinion in Plant Biology*, 2001, 4(8): 336–342.
- [33] Vlot AC, Dempsey DA, Klessig DF. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology*, 2009, 47: 177–206.
- [34] Yoshioka K, Kachroo P, Tsui F, Sharma SB, Shah J, Klessig DF. Environmentally sensitive, SA-dependent defense responses in the *cpr22* mutant of *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 2001, 26(4): 447–459.
- [35] Yasuda M, Miwa H, Masuda S, Takebayashi Y, Sakakibara H, Okazaki S. Effector-triggered immunity determines host genotype-specific incompatibility in legume-*Rhizobium* symbiosis. *Plant and Cell Physiology*, 2016, 57(8): 1791–1800.

Functional characterization of a T3SS effector protein NopP of *Sinorhizobium fredii* SMH12 in the symbiotic nitrogen fixation and interaction with soybean

Yifang Sun, Peng Zhao, Yuan Liu, Youguo Li*

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

Abstract: [Objective] To understand the molecular mechanism of the effector *nopP* in the nodulation and nitrogen fixation of *Sinorhizobium fredii* SMH12, and to provide foundation for effective genetic improvement of rhizobium-soybean symbiosis, we studied the function of *nopP* in symbiotic nitrogen fixation between *S. fredii* SMH12 and soybean. [Methods] The phylogenetics of the NopP was analyzed by bioinformatics, and the deletion mutant ($\Delta nopP$), overexpression (OE-*nopP*) and complementation strains (CM-*nopP*) were constructed by genetic operation. We further analyzed the symbiotic phenotypes. Meanwhile, the expression pattern of *nopP* under free-living and symbiotic conditions and the expression of *NIN*, *ENOD40*, *PR1*, *PR2* and *PR5* in $\Delta nopP$ mutant in roots of *Glycine max* cv. JD17 inoculated with SMH12 and SMH12 $\Delta nopP$ were detected by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). The subcellular localization of NopP was observed by laser confocal microscopy. [Results] The NopP protein of *S. fredii* SMH12 does not contain any functional domains and has no homologues with Avr effectors in the genome of several pathogens. Deletion of *nopP* in SMH12 significantly increased the nitrogen fixation activity of JD 17 and Zhong Huang 13 compared with the wild type strain SMH12, and the nodule number significantly increased in JD17 inoculated with the mutant $\Delta nopP$. It is indicated that the deletion of *nopP* promoted the symbiotic nitrogen fixation with JD17 or Zhong Huang 13. qRT-PCR showed that the expression level of *nopP* under symbiosis was significantly up-regulated compared to that under free-living condition, and the *nopP* was highly expressed at a 2-day post inoculation (dpi), indicating that the *nopP* gene plays important role in the rhizobia early infection and the symbiotic nitrogen fixation. In addition, the NopP protein localizes at the cytoplasm membrane and nucleus in both tobacco leaves and soybean roots. Moreover, the expression of *NIN* in the roots of JD17 inoculated with the mutant $\Delta nopP$ was up-regulated by 1.2 times, whereas the expression level of *PR5* was down-regulated by 3.6 times compared to the wild-type SMH12 inoculation. [Conclusion] The effector protein NopP of SMH12 plays important roles in the early infection of rhizobia and the defense response regulation in soybean under symbiosis.

Keywords: symbiotic nitrogen fixation, *Sinorhizobium fredii* SMH12, effector protein NopP, symbiotic phenotypes

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Key Research and Development Project (2019YFA09004700, 2018YFD0201006), by the National Natural Science Foundation of China (31670243) 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: 18 December 2019; Revised: 26 March 2020; Published online: 15 September 2020