

DOI: 10.11686/cyxb2024427

http://cyxb.magtech.com.cn

柯丹霞, 侯仕博, 周兆源, 等. 大豆 *GmPP2C28* 基因对百脉根结瘤固氮的功能研究. 草业学报, 2025, 34(10): 164-173.

KE Dan-xia, HOU Shi-bo, ZHOU Zhao-yuan, et al. Functional identification of the role of soybean gene *GmPP2C28* in the nitrogen-fixation process of *Lotus japonicus*. Acta Prataculturae Sinica, 2025, 34(10): 164-173.

大豆 *GmPP2C28* 基因对百脉根结瘤固氮的功能研究

柯丹霞*, 侯仕博, 周兆源, 马云浩, 陈志杰, 宋晓莉, 林佳诺

(信阳师范大学生命科学学院, 河南 信阳 464000)

摘要: 植物蛋白磷酸酶 PP2C 是植物至关重要的一类丝/苏氨酸蛋白磷酸酶。该家族基因在植物发育及多种逆境响应中起着关键作用, 关于其在豆科植物与根瘤菌共生结瘤过程中的功能研究相对较少。本研究前期克隆了 1 个大豆 PP2C 家族基因 *GmPP2C28*, 并证实其受根瘤菌诱导表达。构建 *GmPP2C28* 基因的过表达载体 p1302G-*GmPP2C28*, 利用发根农杆菌 LBA1334 介导的百脉根毛根转化法获得带转基因毛状根的百脉根嵌合体植株。通过结瘤试验发现转 *GmPP2C28* 基因百脉根结瘤数目明显高于转空载体的对照植株, 结瘤指示基因的转录水平显著上调。对根瘤切片进行甲苯胺蓝染色发现, 过量表达 *GmPP2C28* 基因显著增加根瘤侵染区类菌体的数量。进一步对根瘤的固氮酶活性进行测定发现, 过量表达 *GmPP2C28* 基因显著增加成熟期及衰老期根瘤的固氮酶活性。以上结果表明在百脉根中异源表达 *GmPP2C28* 基因, 显著增加了嵌合体百脉根植株结瘤数目以及根瘤中类菌体的数量。此外, 过表达 *GmPP2C28* 显著提高了成熟期以及衰老期根瘤的固氮酶活性, 从而大大延缓了根瘤的衰老。研究结果可为创制优良百脉根品种, 充分发挥百脉根的生物固氮作用提供新的候选基因。

关键词: 大豆; 蛋白磷酸酶 2C; 百脉根; 共生固氮; 根瘤衰老

Functional identification of the role of soybean gene *GmPP2C28* in the nitrogen-fixation process of *Lotus japonicus*

KE Dan-xia*, HOU Shi-bo, ZHOU Zhao-yuan, MA Yun-hao, CHEN Zhi-jie, SONG Xiao-li, LIN Jia-nuo

College of Life Sciences, Xinyang Normal University, Xinyang 464000, China

Abstract: Protein phosphatase 2C (PP2C) is a crucial serine/threonine protein phosphatase in plants. These enzymes are encoded by a large gene family, and they play key roles in plant development and various stress responses. However, there is relatively little research on the role of PP2Cs in the formation of nodules in the symbiotic relationship between leguminous plants and rhizobia. Previously, a soybean (*Glycine max*) PP2C family gene *GmPP2C28* was cloned and its expression was confirmed to be induced by rhizobia. In this study, we constructed a plant overexpression vector p1302G-*GmPP2C28* and obtained transgenic *Lotus japonicus* plants using *Agrobacterium tumefaciens* LBA1334-mediated transformation of hairy roots. The transgenic *GmPP2C28*-expressing plants formed significantly more nodules than did those transformed with the empty vector, and the transcript level of the nodule indicator gene also tended to be higher in the transgenic plants than in the empty vector control plants. Methylamine blue staining of nodule slices revealed that overexpression of *GmPP2C28* significantly increased the number of bacteroids in the infected area of the nodules. Analyses of nodule nitrogenase activity revealed that overexpression of *GmPP2C28* significantly increased nitrogenase activity in mature and senescent

收稿日期: 2024-10-28; 改回日期: 2024-12-30

基金项目: 国家自然科学基金项目 (U1904102), 信阳师范大学“南湖学者奖励计划”青年项目和信阳师范大学研究生科研基金项目资助。

作者简介: 柯丹霞 (1983-), 女, 湖北十堰人, 博士。E-mail: kdx_029@163.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: kdx_029@163.com

nodules. Together, these results show that heterologous expression of *GmPP2C28* in *L. japonicus* significantly increased the numbers of nodules and filamentous bacteria in the root nodules. In addition, overexpression of *GmPP2C28* significantly increased nitrogenase activity in mature and decaying nodules, thereby greatly delaying nodule aging. The findings of this study identify a new candidate gene for creating excellent varieties of *L. japonicus* and other legume species with strong biological nitrogen fixation.

Key words: soybean; protein phosphatase 2C; *Lotus japonicus*; symbiotic nitrogen fixation; nodule senescence

豆科植物与根瘤菌的共生固氮是一种最经济、高效和环境友好型固氮方式^[1]。百脉根(*Lotus japonicus*)是一种优良的豆科牧草,由于其营养丰富、适口性好、含皂素低、耐牧性强,目前在世界各地得到了广泛的种植。同时,作为豆科植物,百脉根的生物固氮作用能够增加土壤肥力,促进植株的生长发育。而且,在豆科牧草中,百脉根的遗传转化体系成熟,已经成为重要的模式豆科植物^[2]。然而,如何延缓根瘤衰老,充分发挥其生物固氮作用,是科研与生产的重要课题。因此,利用生物技术对百脉根进行遗传改良,从而培育出延缓根瘤衰老且固氮能力强的新品种,对于牧草行业可持续发展具有重要意义。

蛋白磷酸激酶行使蛋白质的磷酸化功能,而蛋白磷酸酶可以使磷酸化的蛋白质分子去磷酸化,二者作为分子开关协同调控蛋白质的活性^[3]。蛋白磷酸酶(protein phosphatase 2C, PP2C)是一类可以催化丝/苏氨酸残基脱去磷酸基团的磷酸酶,在植物、动物和微生物中广泛存在。已有报道表明植物 PP2C 家族蛋白在细胞信号转导、植物生长发育以及胁迫响应等生物学过程中行使功能^[4-7]。前人从模式豆科植物百脉根中分离出 2 个编码 2C 型蛋白磷酸酶的基因 *LjNPP2C1* 和 *LjPP2C2*。研究发现 *LjNPP2C1* 基因在根瘤中的表达水平较高,而 *LjPP2C2* 基因在根瘤和根中的表达水平相似。*LjNPP2C1* 基因的转录水平在成熟根瘤中显著增加,其最高表达水平出现在血红蛋白基因诱导后。在百脉根不结瘤突变体中检测到 *LjNPP2C1* 基因的表达水平发生了显著变化,这表明 *LjNPP2C1* 基因可能在根瘤发育的早期和晚期都发挥作用^[8]。2015 年的研究表明 *LjPP2C* 能够和促分裂原活化蛋白激酶 6(mitogen-activated protein kinase 6, MPK6)相互作用,体外试验也证实了 *LjPP2C* 能够使 MPK6 去磷酸化,从而负调控 MPK6 介导的共生结瘤信号转导途径^[9]。研究表明,豆科植物 PP2C 家族蛋白可能在共生固氮过程中发挥重要作用。

对野生大豆(*Glycine soja*)以及栽培大豆(*Glycine max*)PP2C 家族成员的功能研究主要集中在大豆生长发育^[10]以及应对盐碱胁迫^[11-14]等方面,有关大豆 PP2Cs 在共生固氮中的作用研究较少。费氏中华根瘤菌(HH103)Ⅲ型效应器结瘤外蛋白 NopL 是 HH103 的 T3SS 效应子,已被证明在 HH103 侵染大豆期间抑制大豆 PP2C 家族蛋白成员 *Glyma. 07g099700* 的表达^[15]。另一个效应子 NopD 可以影响根瘤菌侵染后 *Glyma. 19g069200* 基因的表达,并且不同类型的 *Glyma. 19g069200* 单倍型可以引起显著的根瘤表型差异^[16]。研究表明在根瘤菌与大豆共生关系建立的过程中,根瘤菌效应子 Nops 通过直接或间接作用于大豆 PP2C 家族蛋白来促进根瘤菌的侵染。前期克隆了另一个大豆蛋白磷酸酶基因 *GmPP2C28*,发现其在大豆的根和根瘤中表达水平较高,且受根瘤菌诱导表达,推测其可能参与豆科植物与根瘤菌的共生固氮过程^[17]。

本研究通过在豆科模式植物百脉根中异源表达 *GmPP2C28* 基因,明确其在百脉根共生固氮过程中发挥的作用,为该类基因参与调控结瘤固氮的研究提供分子生物学证据,也为高效固氮百脉根新品种的创制提供新的有效候选基因。

1 材料与方法

1.1 基因编码蛋白的结构分析

分别使用 NCBI(CD-Search)、NetPhos-3.1、TMHMM-2.0 以及 SWISS-MODEL 对蛋白质序列进行保守结构域、磷酸化位点、跨膜结构域分析以及 3D 结构预测构建。

1.2 植物材料和生长条件

氯气灭菌后的栽培大豆种子(W82),均匀包裹于报纸的上端,报纸下端插入蒸馏水中,保持报纸湿润,培养温度为26℃,待种子萌发。4~5 d后打开报纸,将大豆根部组织浸泡于大豆根瘤菌(BXYD3)悬液中。1~2 h后移栽入花盆中,28℃,光照/黑暗(16 h/8 h)继续培养。期间收集接种前的大豆根作为对照,接种后1、3、7、14、21、28 d的根以及14、21、28、35、42、49 d的根瘤,液氮速冻后保存于超低温冰箱。2023年3—6月完成收样工作,试验重复3次。试验地点位于信阳师范大学生命科学学院温室内。

1.3 植物过表达载体的构建

设计引物 F-OX 和 R-OX(表1),引入 *EcoR* I/*Sma* I 酶切位点,将 *GmPP2C28* 基因(*Glyma.06g050900*)插入植物过表达载体 p1302G 中,构建重组质粒 p1302G-*GmPP2C28*,测序正确后转入发根农杆菌 LBA1334 中备用。2023年7月完成。

1.4 百脉根的发状根转化

百脉根种子(MG20)在无菌锥形瓶中经次氯酸钠处理后,加入少许无菌蒸馏水,待其萌发。参照文献[18]方法制备百脉根外植体并进行毛状根转化。具体如下:通过冻融转化法将重组质粒 p1302G-*GmPP2C28* 以及空载体对照转入发根农杆菌 LBA1334 中。将准备好的外植体下胚轴浸入农杆菌菌悬液中,侵染 30 min;无菌滤纸吸干外植体表面残液后,移入含 2% 蔗糖的 MS 平板上,暗培养 3~5 d;将外植体移入含 300 mg·L⁻¹ 头孢的 MS 培养基,母液配方:1. 大量元素母液(10X, 1 L) KNO₃, 1 g, MgSO₄·7H₂O, 3.7 g, NH₄NO₃, 16.5 g, KH₂PO₄, 1.7 g, CaCl₂·2H₂O, 4.4 g; 2. 微量元素母液(1000 X, 100 mL), MnSO₄·4H₂O, 2.23 g, H₃BO₃, 0.62 g, ZnSO₄·7H₂O, 0.86 g, KI, 83 mg, CuSO₄·5H₂O, 2.5 mg, Na₂MoO₄·2H₂O, 25 mg(单独溶解后混合), CoCl₂·6H₂O, 2.5 mg; 3. 铁盐(200 X, 100 mL), Na₂·EDTA, 746 mg, FeCl₃·6H₂O, 54 mg, 加热溶解; 4. 维生素及其他有机物(100 X, 100 mL), 甘氨酸(glycine), 20 mg, 烟酸(nicotinic acid), 5 mg, 盐酸硫胺素(VB1, thiamine·HCl), 4 mg, 盐酸吡哆辛(VB6, pyridoxin·HCl), 5 mg, 肌醇(M-inositol), 1000 mg。待毛状根长至 3~4 cm 时,配制 GUS 染液鉴定阳性毛状根。随机挑选部分阳性毛状根,检测 *GUS* 及 *GmPP2C28* 基因的表达情况。2023年8—10月完成转化,试验重复3次。

1.5 发状根的结瘤表型观察

选择生长状态一致的阳性嵌合体百脉根植株,将根部组织浸泡于根瘤菌(MAFF303099)菌悬液中,1~2 h后移栽入含无菌蛭石的钵钵中,22℃,光照/黑暗(16 h/8 h),其间浇灌无氮营养液。接种 28 d 后,将植株根部蛭石洗净,统计结瘤数目并拍照, $n=15$ 。2023年11月—2024年5月完成表型统计,试验重复3次。

1.6 荧光定量PCR分析

基因表达水平使用天根公司荧光定量PCR试剂盒进行检测,并计算结果($2^{-\Delta\Delta C_t}$)^[19]。以百脉根多聚泛素 *UBI* (*Polyubiquitin*, *XM_057568040*) 作为内参基因,引物见表1。试验结果分析使用 Excel 2007 软件。2024年6月完成,试验重复3次。

表1 本研究中所使用的引物

Table 1 The primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Sequence of primer (5'-3')
F-OX	GGAATTCATGGGTATCTGC
R-OX	TCCC <u>CCCGG</u> TTAGTTACCAAG
F-GUS	GTCGCGCAAGACTGTAACCA
R-GUS	CGGCGAAATCCATACCTG
F-NIN-rt	AACTCACTGGAAACAGGTGCTTTC
R-NIN-rt	CTATTGCGGAATGTATTAGCTAGA
F-ENOD40-1-rt	GGAGGTATGCTCAAACATTC
R-ENOD40-1-rt	GTAACTTCTCAAGAGAAGACC
F-ENOD40-2-rt	CAAAACTCGTTATGTTGCGG
R-ENOD40-2-rt	CACCTCAAAGGAAGAAGAACA
F- <i>GmPP2C28</i> -rt	TTGCAACGGTCTGTATTTGCG
R- <i>GmPP2C28</i> -rt	TGGGTAACCACACTCTCTGGATG
F-UBI	TTCACCTTGTGCTCCGTCTTC
R-UBI	AACAACAGCACACACAGACAATC

注:下划线区域为酶切位点序列。

Note: The underline region indicates the restriction enzyme cutting sites.

1.7 根瘤切片的观察及固氮酶活性的测定

按照文献[20]中的具体方法进行根瘤石蜡切片的制备和甲苯胺蓝染色。分别选取对照组及试验组毛状根基部相同位置的 5 个根瘤,每个样品随机选取 4 张染色后的切片,用于统计单位面积侵染细胞的数目($n=20$)。采用乙炔还原法测定根瘤的固氮酶活性^[21],并根据以下公式计算乙烯生成速率($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)。 $Rate$ 为乙烯生成速率, X 为样品测定的乙烯峰面积, FW 为根瘤样品的鲜重。2024 年 5—8 月完成,试验重复 3 次。

$$Rate = \frac{(0.0002X + 111.66) \times 8}{2 \times 28.06 \times 1000 \times FW}$$

1.8 数据处理

数据的平均值和 SE 是通过 Microsoft Excel 2007 软件计算的。使用 Microsoft Excel 2007 中的 Student t 检验确定试验组和对照组之间的显著差异。

2 结果与分析

2.1 GmPP2C28 蛋白的生物信息学分析

GmPP2C28(Glyma.06g050900)是大豆 PP2C 最大亚家族 E 中的一个成员,对 GmPP2C28 蛋白质序列进行保守结构域分析,发现其具有典型的 PP2C 家族保守结构域(图 1A)。采用同源建模的方法,对 GmPP2C28 蛋白质序列进行 3D 结构预测及构建,如图 1B 所示,在 GmPP2C28 蛋白的三维结构中, α 螺旋肽段处于结构外围,而 β 片层组成的三明治结构(β -sandwich)作为催化部位处于结构中心,据此形成一个“Y”字母图形,以保证酶与底物结合的稳定性。对 GmPP2C28 蛋白质序列进行磷酸化位点分析,发现在 GmPP2C28 蛋白质中存在多个可能的磷酸化修饰位点,其中,丝氨酸(serine, Ser)可能发生磷酸化修饰的位点最多,有 20 个,苏氨酸(threonine, Thr)和酪氨酸(tyrosine, Tyr)分别有 10 和 2 个,说明该蛋白可能受到磷酸化修饰,并在信号转导过程中发挥调控作用(图 1C)。

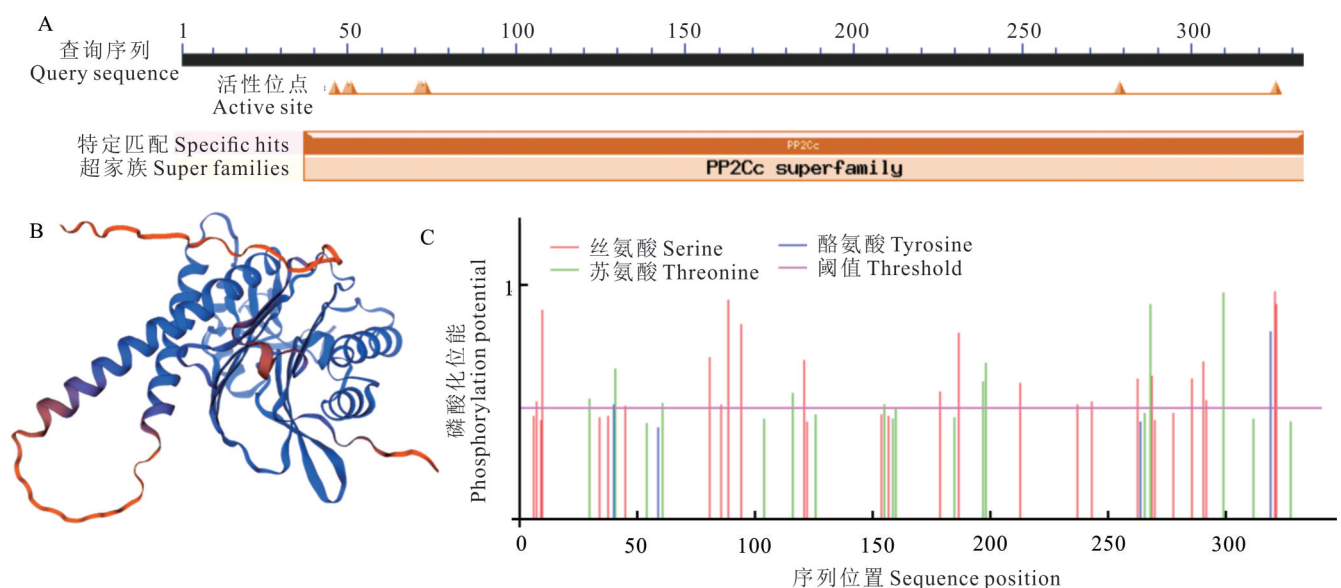


图 1 GmPP2C28 蛋白的生物信息学分析

Fig. 1 Bioinformatics analysis of GmPP2C28 protein

A: GmPP2C28 蛋白的保守结构域分析。B: GmPP2C28 蛋白的 3D 结构预测。C: GmPP2C28 蛋白的磷酸化位点分析。A: Conservative domain analysis of GmPP2C28 protein; B: 3D structure prediction of GmPP2C28 protein; C: Phosphorylation site analysis of GmPP2C28 protein.

2.2 GmPP2C28 基因的表达水平分析

分别收集接种根瘤菌后不同时期大豆根以及根瘤组织样品,用于检测 GmPP2C28 基因的表达水平。在接种根瘤菌的根组织中, GmPP2C28 基因呈现缓慢上升的趋势,至接种 28 d 时,表达水平为对照的 16 倍。与此同时,

在根瘤形成过程中, *GmPP2C28* 基因的表达水平呈现先升高再降低的趋势, 在接种后 28 d 时达到峰值, 随后回落到接种早期水平(图 2)。结果表明 *GmPP2C28* 基因在根瘤成熟期表达水平较高, 推测其可能参与调控根瘤发育。

2.3 转 *GmPP2C28* 基因百脉根毛状根的鉴定

将植物过表达载体 *GmPP2C28*-p1302G 转入发根农杆菌 LBA1334, 用于百脉根的遗传转化。对毛状根进行 GUS 染色, 结果如图 3A 所示, 箭头所指为变蓝的阳性毛状根。随机挑选部分阳性毛状根进行 PCR 检测, 在转 *GmPP2C28* 基因以及空载体毛状根中均检测到 *GUS* 基因的表达, 而野生型对照中没有出现目的条带(图 3B)。进一步对阳性毛状根进行 RT-PCR 检测, 发现在转 *GmPP2C28* 基因毛状根中均能检测到

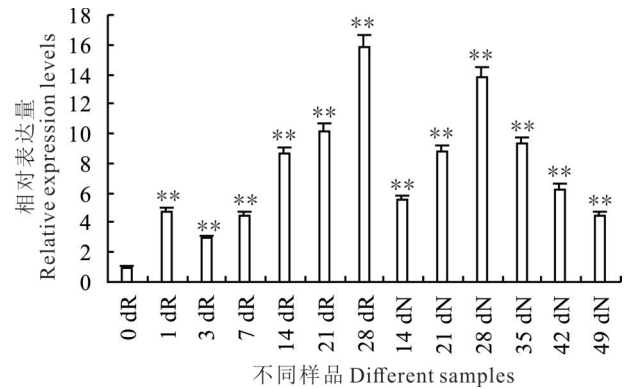


图 2 *GmPP2C28* 基因在不同时期大豆根和根瘤中的表达水平
Fig. 2 Expression levels of *GmPP2C28* gene in soybean roots and nodules at different stages

dR 代表接种不同天数的根组织。dN 代表接种不同天数的根瘤组织。
** 代表 $P < 0.01$ 。下同。dR represents root tissues inoculated for different days. dN represents nodule tissues inoculated for different days.
** represents $P < 0.01$. The same below.

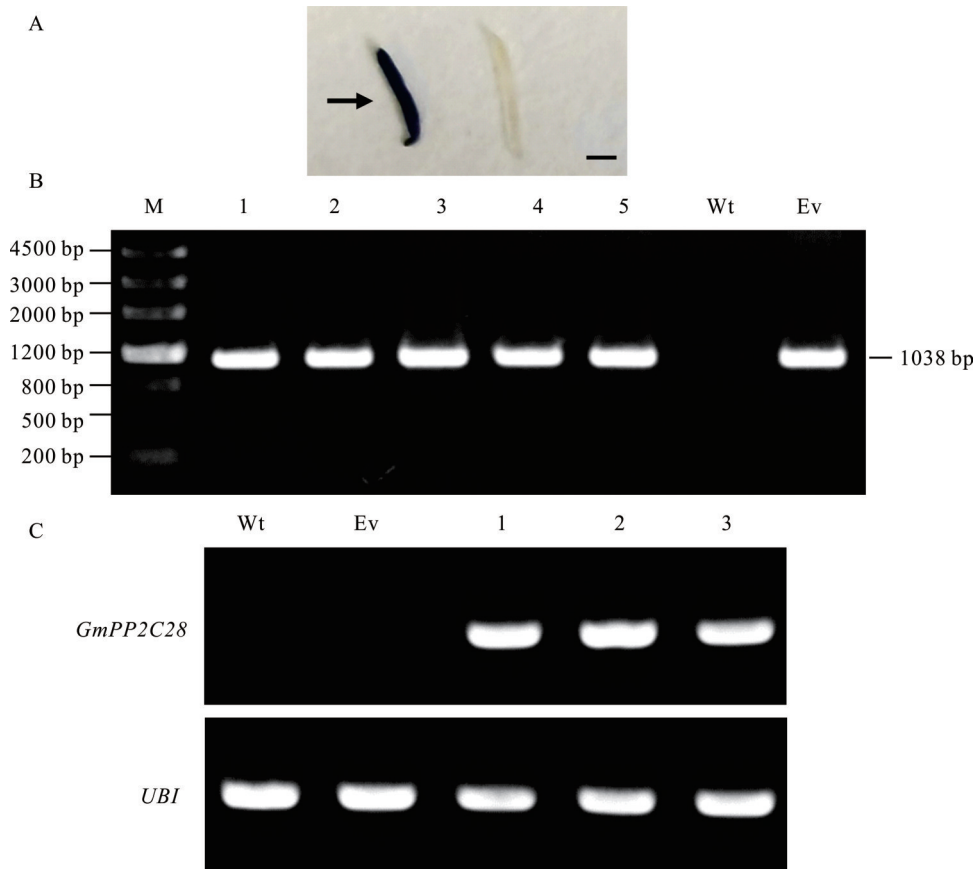


图 3 嵌合体百脉根阳性毛状根的分子生物学检测

Fig. 3 Molecular biology detection of positive hairy roots in composite *L. japonicus*

A: 毛状根根尖的 GUS 染色图, 箭头所示为深蓝色的阳性毛状根。B: PCR 检测毛状根中 *GUS* 基因的表达。C: RT-PCR 检测毛状根中 *GmPP2C28* 的表达。多聚泛素 (*UBI*) 作为内参基因。Wt: 野生型。Ev: 空载体对照。M: DNA Marker III。Bars=5 mm。A: The GUS staining image of the root tip of the hairy root, the dark blue positive hairy root indicated by the arrow. B: PCR detection of *GUS* gene expression in transgenic and control hairy roots. C: RT-PCR was used to detect the expression level of *GmPP2C28* in transgenic and control hairy roots. Polyubiquitin as an internal reference gene. Wt: Wild-type. Ev: Empty vector control. M: DNA Marker III molecular weight standard.

GmPP2C28 基因的表达,而野生型和空载体对照中都未出现目的基因条带(图3C)。以上结果表明 *GmPP2C28* 基因已经成功表达于嵌合体百脉根阳性毛状根中。

2.4 过表达 *GmPP2C28* 增加百脉根的结瘤数目

对接种根瘤菌 28 d 后的转基因植株进行结瘤表型统计发现,转 *GmPP2C28* 基因试验组的单株平均结瘤数为 18.9 个,显著高于空载体对照组的 10.1 个(图 4A, B)。荧光定量 PCR 检测转基因毛状根中结瘤指示基因 *LjNIN*、*LjENOD40-1* 和 *LjENOD40-2* 的转录水平,发现其在转 *GmPP2C28* 基因毛状根中均上调表达(图 4C)。结果表明 *GmPP2C28* 基因在百脉根中的异源表达能够显著上调结瘤指示基因的表达,从而增加嵌合体百脉根的结瘤数目。

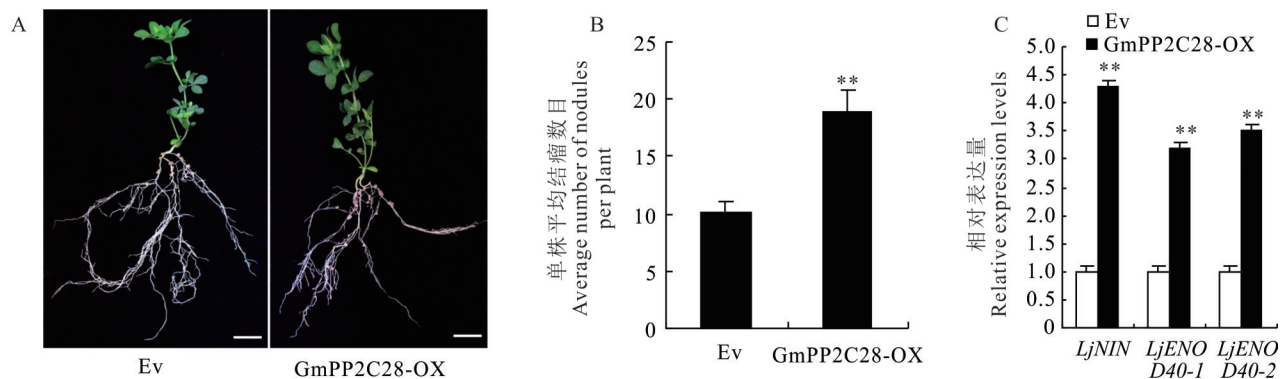


图4 过表达 *GmPP2C28* 基因对百脉根结瘤的影响

Fig. 4 Effect of overexpression *GmPP2C28* gene on nodulation in composite *L. japonicus*

A: 接种根瘤菌 28 d 后嵌合体植株的结瘤表型。B: 单株嵌合体植株的平均结瘤数目。C: 荧光定量 PCR 检测嵌合体百脉根毛状根中结瘤指示基因的表达水平。GmPP2C28-OX: 超表达 *GmPP2C28* 嵌合体植株。Ev: 空载体对照。下同。Bars=10 mm。n=15。A: The nodulation phenotype of complex plants after 28 days of inoculation with rhizobia. B: The average number of nodules in a single composite plant. C: Fluorescence quantitative PCR was used to detect the expression levels of nodule indicator genes in the hairy roots of complex *L. japonicus*. GmPP2C28-OX: Over-expressing *GmPP2C28* complex plants. Ev: Empty vector control. The same below.

2.5 过表达 *GmPP2C28* 增加根瘤中侵染细胞的数量

对接种根瘤菌 28 d 后的转基因植株根瘤切片进行染色观察发现,在侵染区的中心部位, *GmPP2C28*-OX 试验组的侵染细胞排列更密集,而空载体对照组的侵染细胞排列较松散(图 5A~D)。统计学分析发现,与对照相比,过表达 *GmPP2C28* 显著增加了单位面积内侵染细胞的数量($P < 0.05$,图 5E)。

2.6 过表达 *GmPP2C28* 提高根瘤的固氮酶活性

分别收集嵌合体百脉根接种 28 和 49 d 的根瘤,通过乙炔还原法测定不同时期根瘤的固氮酶活性。图 6 结果显示,接种 28 d 时, *GmPP2C28*-OX 组根瘤的固氮酶活性显著高于对照组($P < 0.05$);接种 49 d 时, *GmPP2C28*-OX 组和对照组根瘤的固氮酶活性都随接种时间的延长而降低,但 *GmPP2C28*-OX 组根瘤的固氮酶活性仍显著高于对照组($P < 0.01$),表明过表达 *GmPP2C28* 显著提高了成熟期以及衰亡期根瘤的固氮酶活性,从而大大延缓了嵌合体百脉根根瘤的衰老。

3 讨论

已在多个植物物种中鉴定出 PP2C 家族成员,该家族蛋白具有高度保守的结构特征^[22-25]。植物 PP2C 蛋白的 C 末端具有保守的催化结构域, N 末端延伸区长度的不同赋予了 PP2C 不同的功能^[26]。PP2C 家族蛋白多定位于细胞浆和细胞核,可以特异性的结合多种底物进行去磷酸化修饰作用^[27]。本研究使用 TMHMM-2.0 软件对 *GmPP2C28* 蛋白质序列进行跨膜结构域分析,未发现蛋白质序列中存在跨膜结构域,提示该蛋白可能存在于细胞质或细胞核中,这与文献^[27]报道一致。

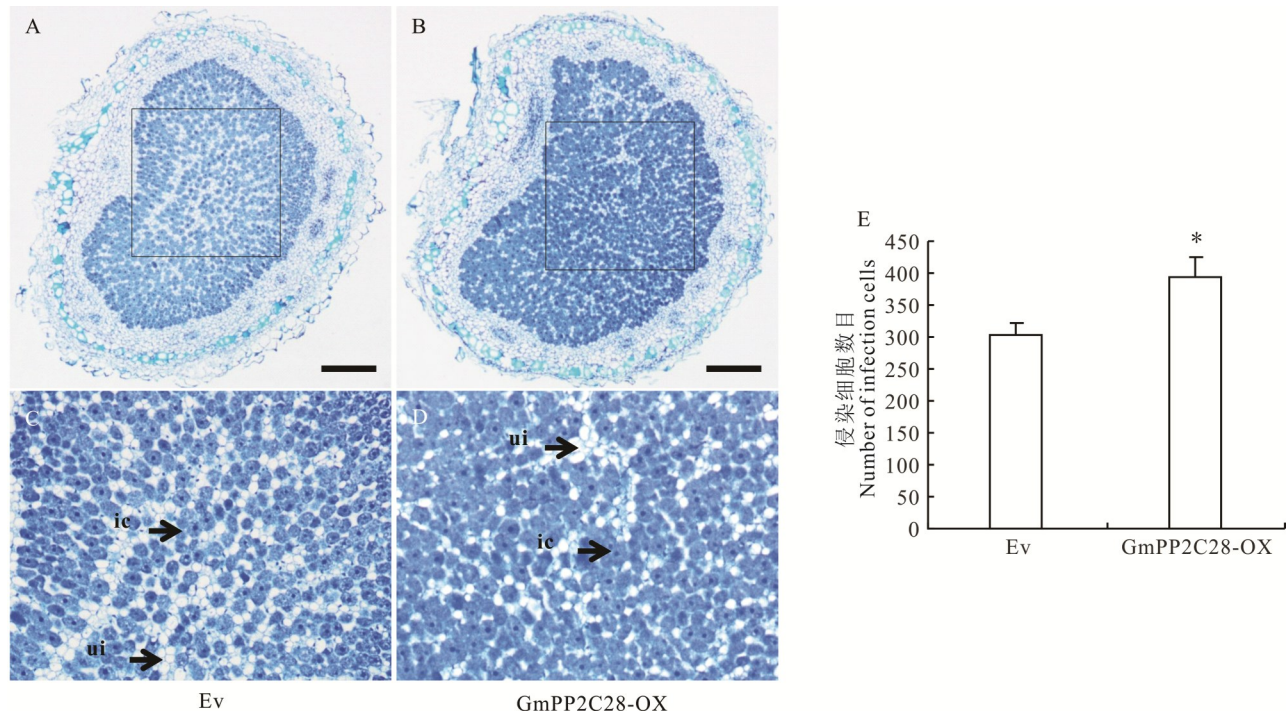


图5 转基因根瘤的切片染色分析

Fig. 5 Section staining analysis of the transgenic nodules

A, B: 分别为接种根瘤菌 28 d 时对照 (Ev) 和 GmPP2C28-OX 根瘤的横切面甲苯胺蓝染色图片。C, D: 分别为 A 和 B 的高倍放大图片。黑框部分为放大位置。ic: 侵染细胞。ui: 非侵染细胞。E: 接种根瘤菌 28 d 时 Ev 和 GmPP2C28-OX 根瘤切片单位面积侵染细胞的数目。*代表 $P < 0.05$ 。Bars = 200 μm (A, B), 50 μm (C, D)。n = 20。A, B: Cross sectional images of Ev and GmPP2C28-OX nodules stained with toluidine blue after 28 days of inoculation with rhizobia, respectively. C, D: High magnification images of A and B respectively. The black box indicates the enlarged position. ic: Infecting cells. ui: Non invasive cells. E: The number of infected cells per unit area in Ev and GmPP2C28-OX nodule sections after 28 days of inoculation with rhizobia. * represents $P < 0.05$.

PP2C 通过催化蛋白质去磷酸化, 负调控蛋白激酶级联信号系统, 参与一系列细胞生命活动^[28-29]。在动物细胞中, PP2C 家族成员 PPM1A 可通过去磷酸化 MKK4/7 以及 MKK3/6b 激酶, 抑制由环境压力引起的 p38 和 JNK /MAPK 激酶级联通路的激活^[30]。PPM1A 也能够与应激状态下的 p38 互作, 从而抑制炎症和凋亡反应^[31]。因此, PPM1A 可以选择性地抑制不同的细胞应激信号通路^[32]。同样地, 在植物中, PP2C 蛋白也能够与许多信号通路相互作用, 共同调节植物对内外部环境的响应。研究发现水稻 (*Oryza sativa*) PP2C 基因 *OsBIPP2C1* 在转基因烟草 (*Nicotiana tabacum*) 中的过表达可以抑制病原体感染并增强非生物耐受性^[33]。GmPP2C3a 是大豆 PP2C 蛋白家族的成员, 被鉴定为一种能够抑制病毒感染和传播的抗病毒蛋白^[34]。早期的研究表明, PP2Cs 负调控酵母和拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中的丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 通路^[35], 以及由细菌鞭毛蛋白触发的 MAPK 通路^[36]。MAPK 途径可能参与建立根瘤菌共生关系, 因为 MAPK 途径基因之一 *MiTDY1* 已被证明与根瘤形成有关, 并调节根尖的发育^[37]。在白羽扇豆 (*Lupinus albus*) 中, 根瘤菌可以激活 MAPK 基因 *SIMK* 和 *SAMK*, *SIMK* 和 *SAMK* 的突变体抑制了根瘤菌的感染^[38]。在大豆中, *GMK1* 已被鉴定为 MAPK 同源物, 其表达与日本慢生根瘤菌 USDA110 的感染有关^[39]。百脉根 LjPP2C 可以与 MPK6 激酶互作参与调控共生固氮^[9]。这些结果表明, PP2C 可

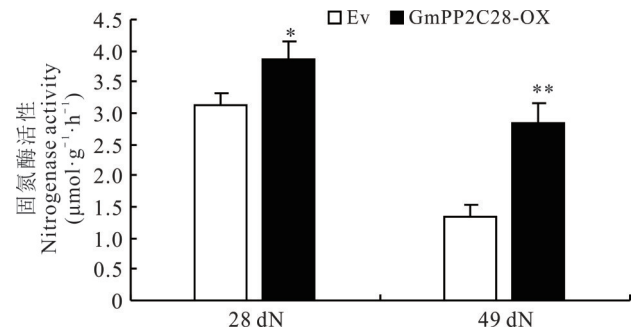


图6 不同时期转基因根瘤的固氮酶活性测定

Fig. 6 Determination of nitrogenase activity in transgenic root nodules at different stages

以参与调节根瘤共生固氮。然而,进一步的研究对于充分阐明其功能及相互作用机制至关重要。

本研究通过在百脉根中异源表达 *GmPP2C28* 基因,显著增加了嵌合体百脉根植株结瘤数目以及根瘤中类菌体的数量。此外,过表达 *GmPP2C28* 显著提高了成熟期以及衰亡期根瘤的固氮酶活性,从而大大延缓了根瘤的衰老。推测 *GmPP2C28* 可能通过去磷酸化抑制根瘤衰老相关蛋白的活性,从而抑制根瘤细胞的衰亡。因此,下一步可以通过酵母双杂交技术筛选 *GmPP2C28* 的互作蛋白,探索二者在结瘤信号传递过程中的蛋白互作机制。此外,可以通过百脉根稳定转化体系获得 *GmPP2C28* 基因的过表达材料,这将进一步明确该基因的生物学功能,也将为培育出延缓根瘤衰老且固氮能力强的百脉根新品种提供有效的候选材料。

4 结论

本研究以大豆蛋白磷酸酶基因 *GmPP2C28* 为对象,在百脉根中过表达该基因能够增加百脉根结瘤数目并延缓根瘤的衰老,表明 *GmPP2C28* 基因正调控百脉根的结瘤固氮过程。本研究为高效固氮百脉根新品种的创制提供了基因资源,对共生固氮分子机理的研究和育种都具有重要意义。

参考文献 References:

- [1] Xu Q Z, Wang X, Wang N, *et al.* Nitrogen inhibition of nitrogenase activity involves the modulation of cytosolic invertase in soybean nodule. *Journal of Genetics and Genomics*, 2024, 51(12): 1404–1412.
- [2] Ke D X, Peng K P, Xia Y J, *et al.* Cloning of salt-stressed responsive gene *GmWRKY6* and salt resistance analysis of transgenic *Lotus japonicus*. *Acta Prataculturae Sinica*, 2018, 27(8): 95–106.
柯丹霞, 彭昆鹏, 夏远君, 等. 盐胁迫应答基因 *GmWRKY6* 的克隆及转基因百脉根的抗盐分析. *草业学报*, 2018, 27(8): 95–106.
- [3] Schmid A C, Woscholski R. Phosphatases as small-molecule targets: inhibiting the endogenous inhibitors of kinases. *Biochemical Society Transactions*, 2004, 32(2): 348–349.
- [4] Singh A, Jha S K, Bagri J, *et al.* ABA inducible rice protein phosphatase 2C confers ABA insensitivity and abiotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0125168.
- [5] Zhang F, Wei Q H, Shi J C, *et al.* *Brachypodium distachyon* BdPP2CA6 interacts with BdPYLs and BdSnRK2 and positively regulates salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 264.
- [6] Schweighofer A, Kazanaviciute V, Scheikl E, *et al.* The PP2C-type phosphatase AP2C1, which negatively regulates MPK4 and MPK6, modulates innate immunity, jasmonic acid, and ethylene levels in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2007, 19(7): 2213–2224.
- [7] Umbrasaitte J, Schweighofer A, Kazanaviciute V, *et al.* MAPK phosphatase AP2C3 induces ectopic proliferation of epidermal cells leading to stomata development in *Arabidopsis*. *PLoS One*, 2010, 5(12): e15357.
- [8] Kapranov P, Jensen T J, Poulsen C, *et al.* A protein phosphatase 2C gene, *LjNPP2C1*, from *Lotus japonicus* induced during root nodule development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(4): 1738–1743.
- [9] Guan X M. *LjPP2C*, a protein phosphatases 2C from *Lotus japonicus*, functions as a negative regulator of MPK6 pathway. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2015.
官晓敏. 百脉根 *LjPP2C* 蛋白磷酸酶负调控 MPK6 信号转导途径. 武汉: 华中农业大学, 2015.
- [10] Lu X, Lai Y C, Du W G, *et al.* A PP2C-1 allele underlying a quantitative trait locus enhances soybean 100-seed weight. *Molecular Plant*, 2017, 10(5): 670–684.
- [11] Chen C, Yu Y, Ding X D, *et al.* Genome-wide analysis and expression profiling of PP2C clade D under saline and alkali stresses in wild soybean and *Arabidopsis*. *Protoplasma*, 2018, 255(2): 643–654.
- [12] Bai G, Yang D H, Zhao Y, *et al.* Interactions between soybean ABA receptors and type 2C protein phosphatases. *Plant Molecular Biology*, 2013, 83(6): 651–664.
- [13] Yang X X, Tang M S, Zhang B. Identification of soybean *PP2C* family genes and transcriptome analysis in response to salt stress. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2022, 34(2): 207–220.
杨昕霞, 唐满生, 张斌. 大豆 *PP2C* 家族基因鉴定与响应盐胁迫的转录组分析. *浙江农业学报*, 2022, 34(2): 207–220.
- [14] Zhang B. Functional analysis of soybean *GmPP2C89* gene under salt stress. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2022, 37(4):

20—27.

张斌. 大豆 *GmPP2C89* 基因在盐胁迫中的功能分析. 华北农学报, 2022, 37(4): 20—27.

- [15] Zhang Y J, Liu X Y, Chen L, *et al.* Mining for genes encoding proteins associated with NopL of *Sinorhizobium fredii* HH103 using quantitative trait loci in soybean (*Glycine max* Merr.) recombinant inbred lines. *Plant and Soil*, 2018, 431: 245—255.
- [16] Wang J H, Wang J Q, Ma C, *et al.* QTL mapping and data mining to identify genes associated with the *Sinorhizobium fredii* HH103 T3SS effector NopD in soybean. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 453.
- [17] Ke D X, Hou S B, Ma S Y, *et al.* Cloning and expression analysis of the protein phosphatase gene *GmPP2C28* of soybean. *Journal of Xinyang Normal University (Natural Science Edition)*, 2024, 37(3): 343—348.
柯丹霞, 侯仕博, 马斯羽, 等. 大豆蛋白磷酸酶基因 *GmPP2C28* 的克隆与表达分析. 信阳师范学院学报(自然科学版), 2024, 37(3): 343—348.
- [18] Ke D X, Peng K P, Zhang M K, *et al.* Function of the soybean *GmCYS20* gene in symbiotic nodulation of *Lotus japonicus*. *Acta Prataculturae Sinica*, 2018, 27(9): 132—141.
柯丹霞, 彭昆鹏, 张孟珂, 等. 大豆 *GmCYS20* 基因在百脉根共生结瘤过程中的功能研究. 草业学报, 2018, 27(9): 132—141.
- [19] Livak K J, Schmittgen T D. 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] Ke D X, Feng S, Hu Y H, *et al.* Functional identification of soybean NADPH oxidase gene *GmRbohL* in the nodulation process of soybean. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2023, 38(5): 29—38.
柯丹霞, 冯爽, 胡艺涵, 等. 大豆 NADPH 氧化酶基因 *GmRbohL* 在共生结瘤过程中的功能鉴定. 华北农学报, 2023, 38(5): 29—38.
- [21] Yuan S, Ke D, Liu B, *et al.* The Bax inhibitor *GmBI-1a* interacts with a Nod factor receptor and plays a dual role in the legume-rhizobia symbiosis. *Journal of Experimental Botany*, 2023, 74(18): 5820—5839.
- [22] Fan K, Yuan S N, Chen J, *et al.* Molecular evolution and lineage-specific expansion of the PP2C family in *Zea mays*. *Planta*, 2019, 250(5): 1521—1538.
- [23] Shazadee H, Khan N, Wang J J, *et al.* Identification and expression profiling of protein phosphatases (PP2C) gene family in *Gossypium hirsutum* L. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(6): 1395.
- [24] Yu X F, Han J P, Wang E F, *et al.* Genome-wide identification and homoeologous expression analysis of PP2C genes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Frontiers in Genetics*, 2019, 10: 561.
- [25] Wang Y F, Liao Y Q, Wang Y P, *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of *StPP2C* gene family in response to multiple stresses in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of Integrative Agriculture*, 2020, 19(6): 1609—1624.
- [26] Han Y G, Luo Y, Wei Z X, *et al.* Structure prediction and function analysis of protein phosphatase PPH1 from *Arabidopsis thaliana*. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2013, 19(1): 69—73.
韩永光, 骆玥, 魏微霄, 等. 拟南芥蛋白磷酸酶 PPH1 的结构预测与功能分析. 应用与环境生物学报, 2013, 19(1): 69—73.
- [27] Singh A, Pandey A, Srivastava A K, *et al.* Plant protein phosphatases 2C: from genomic diversity to functional multiplicity and importance in stress management. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2016, 36(6): 1023—1035.
- [28] Lin X, Duan X Y, Liang Y Y, *et al.* PPM1A functions as a Smad phosphatase to terminate TGFbeta signaling. *Cell*, 2006, 125(5): 915—928.
- [29] Akhurst R J, Derynck R. TGF-beta signaling in cancer—a double-edged sword. *Trends in Cell Biology*, 2001, 11(11): S44—S51.
- [30] Hanada M, Kobayashi T, Ohnishi M, *et al.* Selective suppression of stress-activated protein kinase pathway by protein phosphatase 2C in mammalian cells. *FEBS Letters*, 1998, 437(3): 172—176.
- [31] Takekawa M, Maeda T, Saito H. Protein phosphatase 2C alpha inhibits the human stress-responsive p38 and JNK MAPK pathways. *The EMBO Journal*, 1998, 17(16): 4744—4752.
- [32] Zhou B, Wang Z X, Zhao Y, *et al.* The specificity of extracellular signal-regulated kinase 2 dephosphorylation by protein phosphatases. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(35): 31818—31825.
- [33] Hu X, Song F, Zheng Z. Molecular characterization and expression analysis of a rice protein phosphatase 2C gene, *OsBIPP2C1*, and overexpression in transgenic tobacco conferred enhanced disease resistance and abiotic tolerance. *Plant Physiology*, 2006, 127: 225—236.
- [34] Seo J K, Kwon S J, Cho W K, *et al.* Type 2C protein phosphatase is a key regulator of antiviral extreme resistance limiting

- virus spread. *Science Report*, 2014, 4: 5905.
- [35] Meskiene I, Baudouin E, Schweighofer A, *et al.* Stress-induced protein phosphatase 2C is a negative regulator of a mitogen-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(21): 18945—18952.
- [36] Cristina M S, Petersen M, Mundy J. Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 2010, 61: 621—649.
- [37] Schoenbeck M A, Samac D A, Fedorova M, *et al.* The alfalfa (*Medicago sativa*) *TDY1* gene encodes a mitogen-activated protein kinase homolog. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1999, 12(10): 882—893.
- [38] Fernandez-Pascual M, Lucas M M, de Felipe M R, *et al.* Involvement of mitogen-activated protein kinases in the symbiosis *Bradyrhizobium-Lupinus*. *Journal of Experimental Botany*, 2006, 57(11): 2735—2742.
- [39] Lee H, Kim J, Im J H, *et al.* Mitogen-activated protein kinase is involved in the symbiotic interaction between *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 and soybean. *Journal of Plant Biology*, 2008, 51(4): 291—296.