



# 根瘤菌 TtsI 突变对大豆根瘤菌固氮酶活性的影响及转录组分析

于燕雨<sup>1</sup>, 马胜男<sup>2</sup>, 辛大伟<sup>1</sup>, 陈庆山<sup>1</sup>, 王锦辉<sup>1</sup>

(1. 东北农业大学 农学院/教育部大豆生物学重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省农垦科学院 农作物开发研究所, 黑龙江 哈尔滨 150030)

**摘要:** 根瘤菌与大豆建立的共生模式为大豆提供了生长发育所必须的氮素, 在共生建立时根瘤菌Ⅲ型效应因子是影响结瘤发生的重要信号分子之一。为了解析根瘤菌Ⅲ型效应因子在结瘤中的作用, 进行 TtsI 突变根瘤菌 HH103 (*Sinorhizobium fredii* HH103) 结瘤鉴定以及根瘤转录组分析, 并对差异基因进行富集分析。结果显示: TtsI 突变可以降低绥农 14 根瘤的固氮酶活性, 但不影响野生豆 ZYD00006 的根瘤固氮酶活性。TtsI 突变根瘤菌 HH103 (HH103 $\Omega$ TtsI) 使绥农 14 根瘤内部分编码氮转运的相关基因以及 *NLP7* 下调表达, 并且接种 HH103 $\Omega$ TtsI 与接种 HH103 相比, *Glyma.11G235200* 和 *NLP7* 在 ZYD00006 的根瘤中的相对表达没有显著差异。通过 GO 富集、KEGG 富集以及 GSEA 富集分析显示, 差异基因主要涉及信号传导以及代谢进程等, 差异基因主要在植物激素信号传导以及 MAPK 信号通路上富集。研究结果为后续Ⅲ型效应因子的功能和机制的解析以及大豆高效固氮设计提供了新的思路; 同时氮转运相关基因的表达差异可为进一步选育高结瘤、高固氮效率以及高氮利用率的大豆品种提供理论支撑。

**关键词:** 大豆; 根瘤菌; *Sinorhizobium fredii* HH103; Ⅲ型效应因子; TtsI; 固氮酶活性; RNA-Seq

## Effects of TtsI Mutations in Rhizobia on the Nitrogenase Activity in Nodules and Its Transcriptome Analysis

YU Yanyu<sup>1</sup>, MA Shengnan<sup>2</sup>, XIN Dawei<sup>1</sup>, CHEN Qingshan<sup>1</sup>, WANG Jinhui<sup>1</sup>

(1. Ministry of Education Key Laboratory of Soybean Biology, Agricultural College, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 2. Crop Development Research Institute, Heilongjiang Academy of Reclamation Sciences, Harbin 150030, China)

**Abstract:** The symbiotic model established between rhizobia and soybeans provides the necessary nitrogen for soybean growth and development. In the establishment of symbiosis, type Ⅲ effector factors of rhizobia is one of the important signaling molecules that affect nodulation. In order to elucidate the role of type Ⅲ effector factors of rhizobia in nodulation, this study identified TtsI mutants for nodulation and conducted transcriptome analysis of nodules, as well as enrichment analysis of differentially expressed genes. The results showed that the TtsI mutation (HH103 $\Omega$ TtsI) could reduce the nitrogenase activity of Suinong 14 nodules, but did not affect the nitrogenase activity of wild soybean ZYD00006 nodules. And after the HH103 $\Omega$ TtsI, some of the Suinong 14 nodules encoded nitrogen transport related genes and *NLP7* were down regulated. Moreover, compared with the inoculation of HH103, there was no significant difference in the relative expression of *Glyma.11G235200* and *NLP7* in the ZYD00006 nodules. Finally, GO enrichment, KEGG enrichment, and GSEA enrichment analysis showed that differential genes mainly involve signal transduction and metabolic processes. The differential genes were mainly enriched in plant hormone signaling and MAPK signaling pathway. This study provides new ideas for the analysis of the functions and mechanisms of subsequent Type Ⅲ effector factors, as well as the design of efficient nitrogen fixation in soybeans. At the same time, based on the expression differences of nitrogen transport related genes, theoretical support can be provided for further breeding of soybean varieties with high nodulation, high nitrogen fixation efficiency, and high nitrogen utilization efficiency.

**Keywords:** soybean; rhizobia; *Sinorhizobium fredii* HH103; type Ⅲ effectors; TtsI; nitrogenase activity; RNA-Seq

大豆是起源于中国的重要粮油作物之一, 是优质的植物蛋白和油分来源<sup>[1]</sup>。我国是大豆的主产国之一, 但也是全球最大的大豆进口国<sup>[2]</sup>。由于大豆的高依存度, 以及贸易的不确定性, 大豆安全面临巨大的挑战, 为我国的粮食安全带来巨大压力<sup>[3-4]</sup>。

代农业为了提高大豆产量, 高度依赖工业氮肥的使用, 这不仅大大增加了农业的成本, 同时也造成了土壤板结等一系列环境问题<sup>[5]</sup>。而大豆与根瘤菌共生模式下的生物固氮, 不仅能为大豆提供生长发育所需的氮素, 增加其产量, 并且有利于农业的可持续发展。

氮素是大豆生长发育所需的重要元素。但现

费氏中华根瘤菌 (*Sinorhizobium fredii*) HH103

收稿日期: 2024-03-21

基金项目: 国家自然科学基金 (32072014, U20A2027)。

第一作者: 于燕雨 (1999—), 女, 硕士研究生, 主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: 15836715092@163.com。

通讯作者: 陈庆山 (1973—), 男, 博士, 教授, 主要从事大豆分子育种研究。E-mail: qshchen@126.com;

王锦辉 (1991—), 男, 博士, 副教授, 主要从事大豆微生物互作机制研究。E-mail: jinhuiwang113@126.com。

是世界上最早发现的一株快生型根瘤菌,其全基因组序列已经公布,并且有结瘤率高,宿主范围广谱等特点,一直作为根瘤菌研究的模式菌株。随着HH103基因组序列的特征分析和基因的转录活性分析的开展,已经解析了Ⅲ型效应因子在根瘤菌基因组中的分布,明确了基因的编码序列特征。与其他革兰氏阴性菌相似,根瘤菌中存在多种分泌系统,其中Ⅲ型分泌系统(T3SS)在根瘤菌中广泛存在,目前,将近10种Ⅲ型效应因子(T3Es)可以通过T3SS从根瘤菌中分泌到大豆宿主细胞内,调控大豆共生结瘤。其中NopA、NopB、NopX、RhcN和RhcJ等是Ⅲ型分泌系统Needle的组成部分,参与根瘤菌Ⅲ型效应因子(T3E)的分泌<sup>[6-8]</sup>。T3Es是共生建立时的重要对话者之一,其转录受到根瘤菌转录因子TtsI的诱导<sup>[8-10]</sup>。在共生建立初期,宿主分泌的黄酮类化合物诱导根瘤菌*NodD*的表达,其作为一个重要的转录因子激活*TtsI*表达<sup>[8]</sup>。TtsI通过结合不同T3Es的启动子区的tts box已激活下游基因的表达<sup>[10]</sup>。不同的T3Es在共生的过程中发挥不同的功能,共同影响共生的建立以及信号传导。截止目前,许多T3Es已被报道与研究。其中NopAA、NopC、Bel2-5(NopD)、NopL、NopM、NopP、ErnA以及Sup3被认为是潜在的效应蛋白<sup>[8, 11-16]</sup>。NopAA属于苷水解酶家族(GH12)具有纤维素和半纤维素的水解酶活性,能够促进共生过程的细胞壁重塑,并诱导*GmARP*的表达<sup>[17-18]</sup>。NopC可能通过调控*GmCRP*的表达而影响共生建立时的侵染线的形成,从而调控共生的建立<sup>[19]</sup>。NopP会被大豆的R蛋白GmNNL1所识别,激活ETI反应而抑制结瘤发生<sup>[20]</sup>。除此之外,NopP还参与Rj2介导的宿主免疫<sup>[21]</sup>。NopT具半胱氨酸蛋白酶的活性,可以与GmPBS1互作,介导根瘤菌侵染时的宿主免疫反应<sup>[22]</sup>。Bel2-5(NopD)能够挟持大豆共生建立时结瘤因子(NFs)的信号,并参与Rj4的信号传导抑制WRKY33在内的一些免疫基因的表达<sup>[23-24]</sup>。与Bel2-5相似的是,ErnA是慢生型根瘤菌特有的T3E,能够赋予NFs信号缺失下的豆科宿主结瘤能力。并且ErnA在豆科植物根部的异位表达能够引发豆科宿主自发结瘤的现象<sup>[14]</sup>。sup3是近期新鉴定出的T3E,能够恢复ErnA突变后的结瘤表型<sup>[25]</sup>。

现阶段对于根瘤菌中T3Es的研究主要停留于

T3Es在侵染前期的功能研究上,而T3Es在固氮过程中的功能以及对根瘤发育影响的研究较少。本研究通过对绥农14和野生豆ZYD00006进行结瘤鉴定,分析根瘤菌HH103(*Sinorhizobium fredii* HH103)的TtsI突变(HH103 $\Omega$ TtsI)能否影响野生豆ZYD00006根瘤的固氮酶活性,通过RNA-Seq、qRT-PCR分析、GO富集和GSEA富集分析进一步明确HH103 $\Omega$ TtsI对绥农14根瘤固氮酶活性的影响,并为大豆—根瘤菌共生建立后的高效固氮,以及大豆高效氮利用的解析提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

供试根瘤菌为*Sinorhizobium fredii* HH103(简称HH103)及其TtsI突变体,具有利福平抗性(Rif<sup>+</sup>)。

供试大豆材料为栽培大豆绥农14和野生大豆ZYD00006。

1.2 试验设计

为了研究T3Es对共生结瘤的影响,对HH103 $\Omega$ TtsI进行结瘤鉴定。在结瘤试验中,大豆材料在25℃、16h光照/8h黑暗条件下,使用缺氮的植物营养液进行培养<sup>[26]</sup>。为了进一步研究TtsI突变对绥农14固氮酶活性的影响,对接种28d的绥农14的根瘤进行转录组测序分析。为了验证候选基因是否在野生大豆ZYD00006接种TtsI突变体的根瘤中也是下调表达,通过qRT-PCR分析这些基因的相对表达量。为了进一步分析DEGs参与的信号通路以及行使功能,对DEGs进行了GO富集分析。

1.3 方法

1.3.1 固氮酶酶活测定 采用乙炔还原试验<sup>[27]</sup>测定固氮酶活性。将整个植物根瘤收集到1mL密封的棕色玻璃瓶中,注入2mL乙炔,反应2h,然后用气相色谱仪(Shimadzu GC2010)测定0.2mL气体中的乙烯,计算每小时根瘤中固氮酶还原的乙炔的量,3次生物学重复。

1.3.2 RNA提取及RNA-Seq分析 取分别接种HH103和HH103 $\Omega$ TtsI后28d的绥农14的根瘤,使用FreeZol Reagent(诺唯赞)提取总RNA,采用Illumina NovaSeq Reagent Kit方法进行文库构建,使用Illumina NovaSeq 6000平台测序。使用R语言包DEseq2-edgeR进行差异基因分析,差异倍数(Fold Change,FC)大于2为DEGs的筛选条件,使用

TBtools 进行 GO 富集和 KEGG 富集分析。

1.3.3 qRT-PCR 分析 使用 HiScript III RT SuperMix for qPCR( + gDNA wiper) (诺唯赞)对 RNA 进行反转录,合成 cDNA。使用  $2^{-\Delta CT}$  计算基因的相对表达量<sup>[28]</sup>,以 *GmUKNI* (*Glyma. 12g020500*) 为内参基因进行均一化定量。

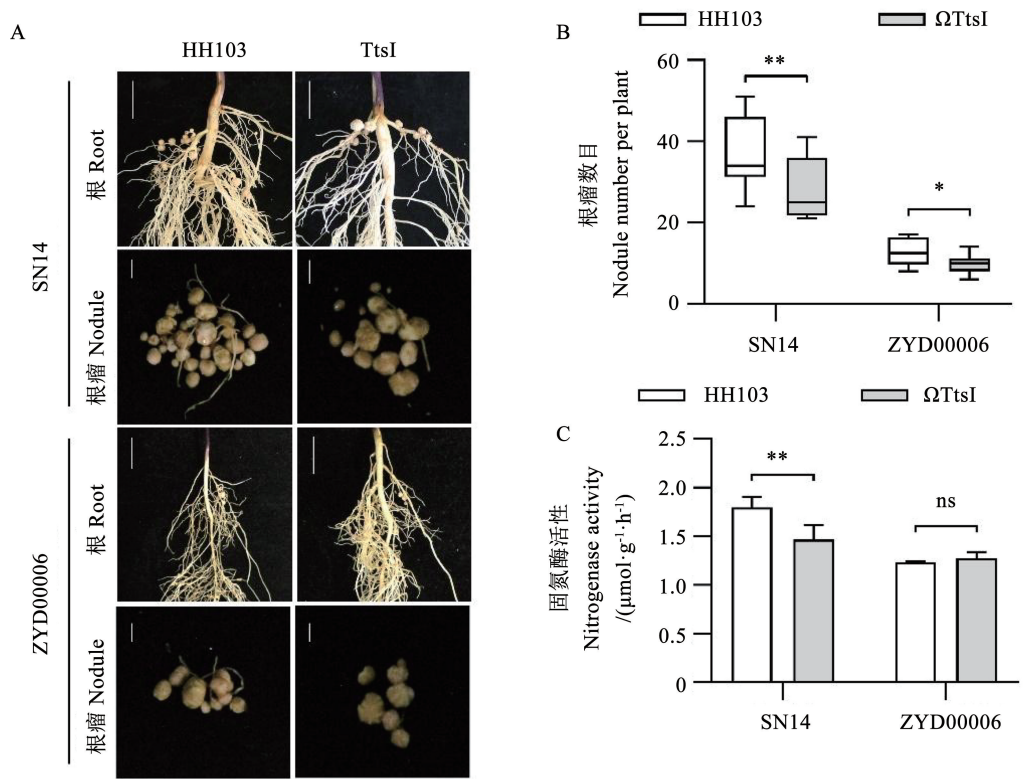
1.4 数据分析

使用 GraphPad Prism 8 (GraphPad software, <http://www.graphpad.com>) 进行数据统计与分析。进行 T 测验,*P* 值小于 0.05 记为显著,小于 0.01 为极显著。

2 结果与分析

2.1 TtsI 突变不影响野生大豆 ZYD00006 的根瘤固氮酶活性

接种 28 d 后,统计结瘤表型,结果显示 HH103 根瘤菌的 TtsI 基因突变造成绥农 14 和野生大豆 ZYD00006 的根瘤数量显著减少(图 1A 和 B)。除此之外,接种 HH103 $\Omega$ TtsI 根瘤菌的绥农 14 根瘤的固氮酶活性显著低于接种 HH103 的绥农 14 根瘤。但与接种 HH103 相比,HH103 $\Omega$ TtsI 根瘤菌不能引起野生豆 ZYD00006 根瘤固氮酶活性的显著变化(图 1C)。



注:A. 接种不同根瘤菌的大豆根系及根瘤形态,根 Bars = 1 cm, 根瘤 Bars = 2 mm; B. 绥农 14 与野生大豆 ZYD00006 的根瘤数统计; C. 绥农 14 与野生豆 ZYD00006 的根瘤固氮酶活性统计。\*. *P* < 0.05; \*\*. *P* < 0.01; ns. 没有显著性。下同。

Note: A. Information of soybean roots and nodules inoculated with different rhizobia, bars of root = 1 cm, bars of nodule = 2 mm; B. Statistics on the number of nodule of Suinong 14 and ZYD00006; C. Statistics of nitrogenase activity in nodule of Suinong 14 and ZYD00006. \*. *P* < 0.05; \*\*. *P* < 0.01; ns. No significance. The same below.

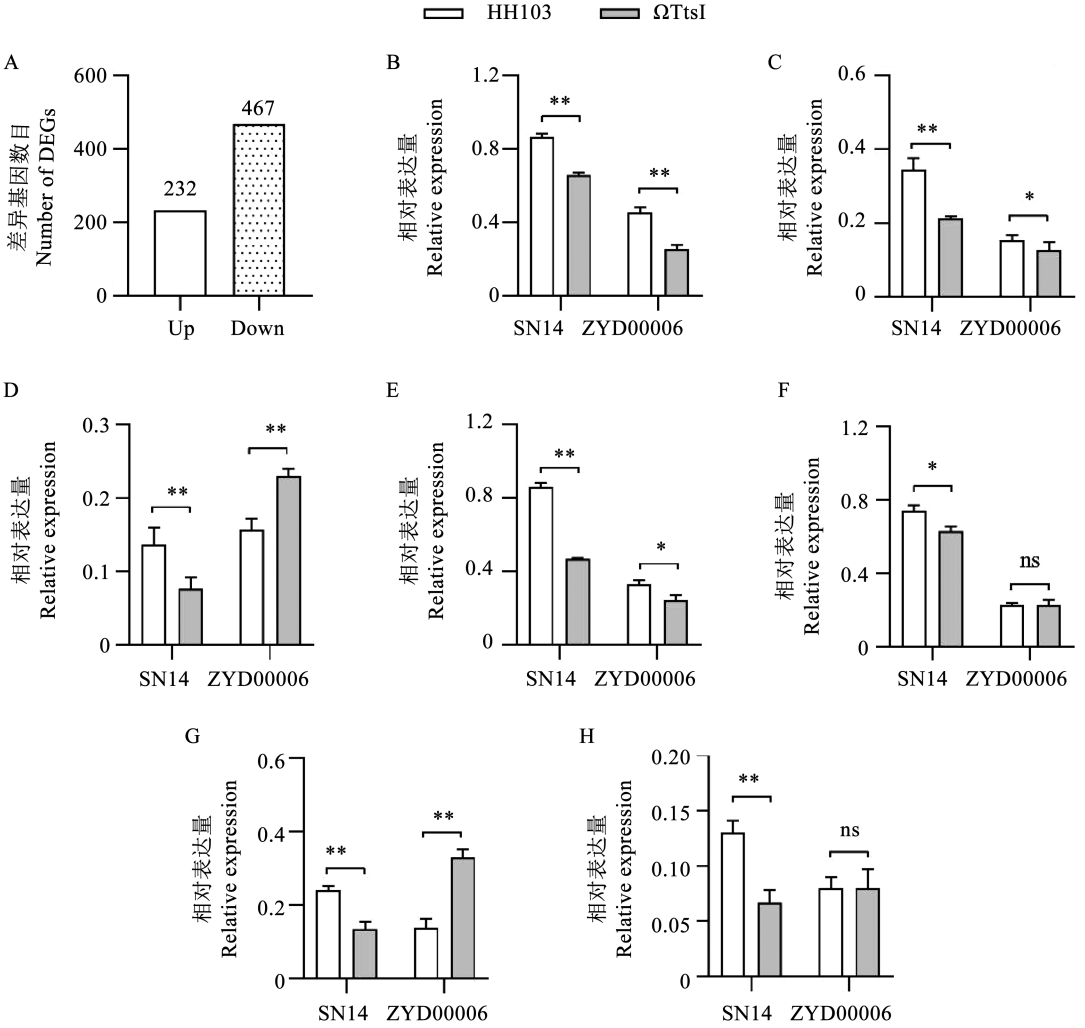
图 1 接种 HH103 以及 HH103 $\Omega$ TtsI 根瘤菌的结瘤表型

Fig. 1 Nodule phenotypes inoculated with HH103 or HH103 $\Omega$ TtsI mutant

2.2 TtsI 突变使根瘤 NLP7 以及部分氮转运体的下调表达

与接种 HH103 根瘤菌的根瘤相比, 接种 HH103ΩTtsI 根瘤菌的根瘤共产生了 699 个差异基因 (DEGs), 其中上调表达 232 个, 下调表达 467 个 (图 2A, OSID 附表 1)。对差异表达基因进行分析表明 TtsI 突变导致了绥农 14 根瘤中 NLP7 以及一些编码氮转运蛋白的基因下调表达 (表 1, 附表 1)。而这可能是造成绥农 14 接种 HH103ΩTtsI 根瘤的根瘤固氮酶活性降低的原因。

进一步利用 qRT-PCR 分析这些基因的相对表达量的结果显示: TtsI 突变后可以使 *Glyma. 11G235200* (*NRT1/PTR FAMILY 5.1*) 和 *Glyma. 16G182400* (*NLP7*) 在绥农 14 根瘤中的表达量显著降低, 但野生豆 ZYD00006 接种野生型 HH103 或者 HH103ΩTtsI 的根瘤中 *NRT1/PTR FAMILY 5.1* 和 *NLP7* 的相对表达量并没有显著差异 (图 2B ~ H)。说明可能由于 *NRT1/PTR FAMILY 5.1* 和 *NLP7* 的表达并没有显著差异, 使野生大豆 ZYD00006 接种 TtsI 突变体的固氮酶活性并没有显著降低。



注: A. 转录组中差异基因数目; B ~ H. 差异基因中下调的氮转运相关基因的相对表达量; B. *Glyma. 04G036100*; C. *Glyma. 06G036200*; D. *Glyma. 10G183900*; E. *Glyma. 11G176800*; F. *Glyma. 11G235200*; G. *Glyma. 14G191300*; H. *Glyma. 16G182400*。

Note: A. Number of DEGs in the transcriptome; B-H. Relative expression level of nitrogen transport related genes downregulated in differentially expressed genes; B. *Glyma. 04G036100*; C. *Glyma. 06G036200*; D. *Glyma. 10G183900*; E. *Glyma. 11G176800*; F. *Glyma. 11G235200*; G. *Glyma. 14G191300*; H. *Glyma. 16G182400*.

图 2 氮转运相关的差异基因相对表达量

Fig. 2 Relative expression levels of DEGs related to nitrogen transport

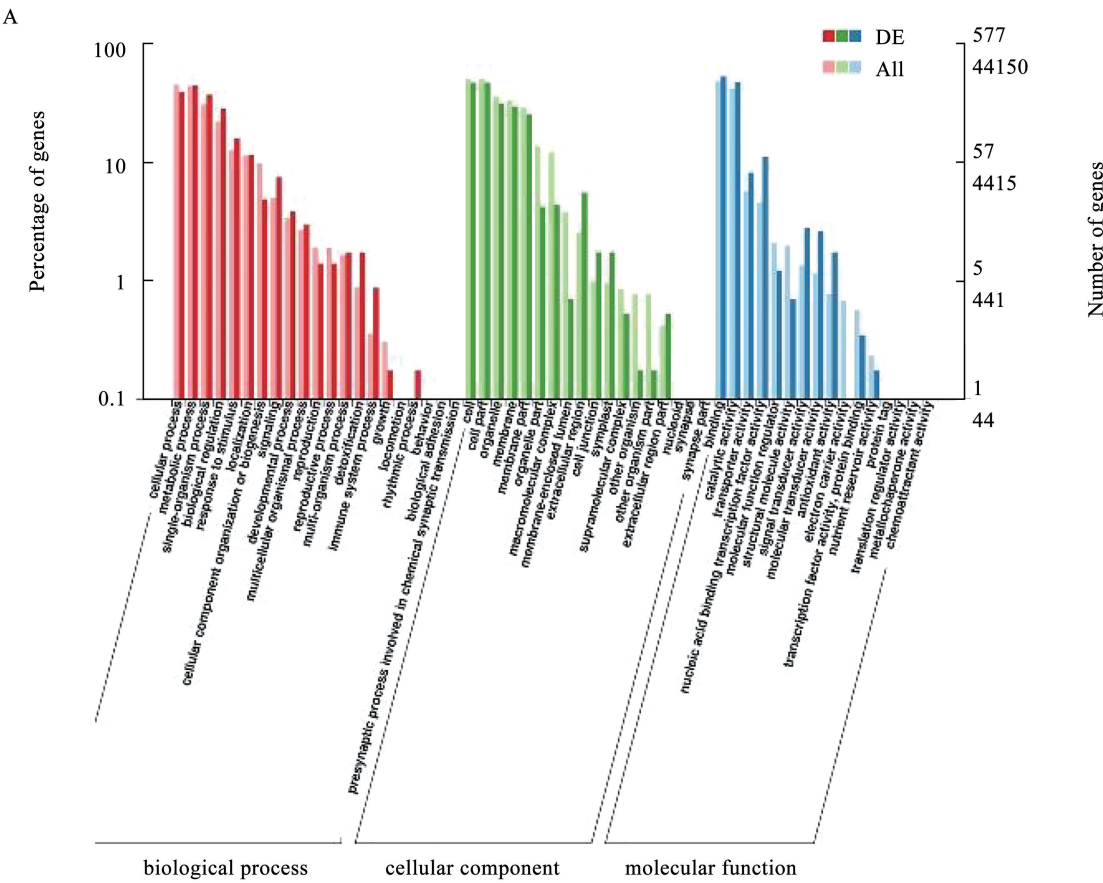
表 1  绥农 14 根瘤中下调的氮转运相关基因

基因名 Gene name	基因注释 Gene annotation
<i>Glyma.04G036100</i>	<i>NRT1/PTR FAMILY 4.6a</i>
<i>Glyma.06G036200</i>	<i>NRT1/PTR FAMILY 4.6b</i>
<i>Glyma.10G183900</i>	<i>NRT1/PTR FAMILY 5.2</i>
<i>Glyma.11G176800</i>	<i>NRT1/PTR FAMILY 8.1a</i>
<i>Glyma.11G235200</i>	<i>NRT1/PTR FAMILY 5.1</i>
<i>Glyma.14G191300</i>	<i>NRT1/PTR FAMILY 8.1b</i>
<i>Glyma.16G182400</i>	<i>NLP7</i>

2.3  T3Es 影响根瘤的激素信号和 MAPK 信号的传导

GO 富集分析显示,TtsI 突变的相关差异基因主要涉及细胞进程、代谢进程、催化活性以及转运活性(图 3A)。KEGG 富集分析显示,差异基因主要富集于植物激素信号传导以及 MAPK 信号通路(图 3B)。进一步的 GSEA 基因集富集分析显示,TtsI 突

变后的差异基因主要富集在信号传导与细胞分化上(图 3C),造成了很多激素相关基因如脱落酸受体基因(*Abscisic acid receptor PYL9*)、乙烯响应转录因子基因(*Ethylene-responsive transcription factor 1B*)和 *BZR1* 等的差异表达(附表 1)。结果表明 TtsI 突变可能通过上述途径使绥农 14 根瘤的固氮酶活性降低。



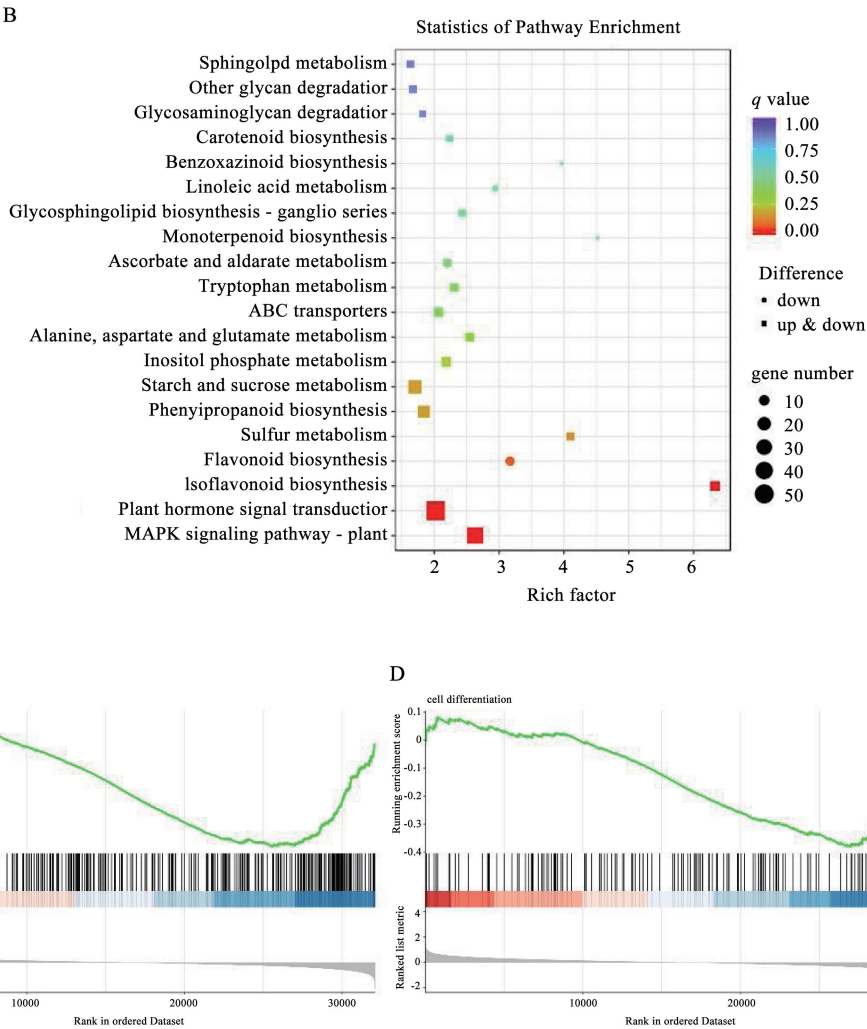


图3 差异表达基因的富集分析  
Fig.3 Enrichment analysis of DEGs

3 讨论

根瘤菌 T3Es 在大豆与根瘤菌共生建立过程中起到了重要作用,如 NopT 通过与 PBS1 互作调控共生的建立<sup>[22]</sup>, NopP 会被一些受体所识别 (GmNNL1、AsNIP43 等),并激活下游的免疫信号等<sup>[21,29]</sup>。但是 T3Es 在根瘤固氮期的功能研究尚不深入。通过对栽培大豆绥农 14 和野生大豆 ZYD00006 的结瘤鉴定发现,与前人研究相似,TtsI 突变可以显著减少根瘤数目<sup>[30]</sup>。本研究发现 TtsI 突变会造成绥农 14 根瘤固氮酶活性降低,这表明 T3Es 在根瘤固氮期对根瘤的维持以及固氮酶活性的稳定具有重要作用。但 TtsI 突变并不影响野生大豆 ZYD00006 的根瘤固氮酶活性,绥农 14 和野生大豆 ZYD00006 在接种 HH103 以及 T3Es 缺失的突变体的根瘤固氮酶活性的差异,可能是由于大豆材料

的基因型和生态型之间差异的原因造成了不同大豆材料对 T3Es 的响应不同<sup>[31-32]</sup>。

通过对绥农 14 接种 HH103 以及 HH103 $\Omega$ TtsI 的根瘤的 RNA-Seq 分析发现,一些硝酸盐转运蛋白以及氮响应核心转录因子 NLP7 都显著下调,除此之外 Oligopeptide 转运体 5 和 Oligopeptide 转运体 7 也存在显著的下调表达(附表 1),表明 T3Es 可能通过影响根瘤内的氮相关的转录因子以及转运体的表达从而影响根瘤的固氮酶活性。进一步的 qRT-PCR 分析接种 HH103 及其突变体 HH103 $\Omega$ TtsI 后,*Glyma. 11G235200* (*NRT1/PTR FAMILY 5. 1*) 和 *Glyma. 16G182400* (*NLP7*) 在野生豆 ZYD00006 的根瘤中并没有显著的表达差异,而这与野生豆 ZYD00006 固氮酶活的表型相吻合,表明 *NLP7* 和 *NRT1* 的表达是造成绥农 14 和野生豆 ZYD00006 在固氮酶活上的差异的原因。KEGG 分析显示差异基

因植物激素信号传导以及 MAPK 信号通路具有显著的富集。TtsI 的突变造成了很多激素相关基因如脱落酸受体 (*Abscisic acid receptor PYL9*)、乙烯响应转录因子 (*Ethylene-responsive transcription factor 1B*) 和 *BZR1* 等的差异表达表达(附表 1),表明一些 T3Es 可能挟持豆科宿主根瘤细胞的激素信号,从而影响根瘤菌的定植与后续固氮。MAPK 信号是植物应对复杂多变的环境以及保证自身正常生长发育的重要信号模块,也参与共生的信号传递<sup>[33]</sup>,T3Es 是根瘤菌与豆科宿主共生建立时的主要对话者之一,可以影响前期信号的传递。一些 T3Es 如 NopL 可以与 SIPK 互作从而影响 MAPK 信号的传递<sup>[13]</sup>,而在根瘤中 TtsI 突变导致了許多 MAPK 基因的差异表达,这些结果表明 T3Es 在根瘤固氮期也会影响根瘤内的信号传导,从而稳定根瘤的共生状态。

本研究发现绥农 14 和野生大豆 ZYD00006 在接种 HH103 以及 HH103 $\Omega$ TtsI 的根瘤固氮酶活性存在差异,可以利用两个大豆材料进行大豆群体的构建,为大豆根瘤固氮酶活性响应 T3Es 的基因进行挖掘,提供新的思路。同时本研究通过 RNA-Seq 发现的差异基因可以为大豆高效氮利用以及大豆高效固氮的品种选育提供技术支撑。

### 4 结论

研究通过对绥农 14 和野生大豆 ZYD00006 接种 HH103 和 HH103 $\Omega$ TtsI 的结瘤鉴定表明,TtsI 突变能显著降低绥农 14 根瘤的固氮酶活性,但不影响野生大豆 ZYD00006 的固氮酶活性。RNA-Seq 分析显示,很多编码硝酸盐转运体以及氮素核心响应转录因子 NLP7 的表达存在差异。进一步 qRT-PCR 分析显示,野生大豆 ZYD00006 接种 HH103 或者 HH103 $\Omega$ TtsI 的根瘤的 *Glyma. 11G235200* (*NRT1/PTR FAMILY 5.1*) 和 *Glyma. 16G182400*(*NLP7*) 的相对表达量并没有显著差异。对 DEGs 的富集分析显示,差异基因主要富集在植物激素信号传导以及 MAPK 信号通路上。

### 参考文献

[1] 吴建寨,胡佳璇,邢丽玮,等. 中国与主要大豆进口来源国价格关联和政策应对[J]. 中国农业大学学报, 2023, 28(4): 227-237. (WU J Z, HU J X, XING L W, et al. Spatial

dependence of soybean price and policy responses between China and major soybean import countries [J]. Journal of China Agricultural University, 2023, 28(4): 227-237. )

[2] 中国成为世界上最大的玉米和大豆进口国[J]. 今日养猪业, 2023(4): 77. (China has become the world's largest importer of corn and soybeans[J]. Pigs Today, 2023(4): 77. )

[3] 李丽娥,朱晓玲. 我国大豆进口依存度分析及对策[J]. 合作经济与科技, 2023(10): 77-80. (LI L E, ZHU X L. Analysis and countermeasures of dependence on soybean import in China [J]. Co-Operative Economy & Science, 2023(10): 77-80. )

[4] 涂正健. 基于虚拟耕地视角的中国进口大豆安全研究[D]. 南京: 南京财经大学, 2023. (TU Z J. Research on the security of imported soybeans in China based on the perspective of virtual land [D]. Nanjing: Nanjing University of Finance & Economics, 2023. )

[5] HAN M, OKAMOTO M, BEATTY P H, et al. The genetics of nitrogen use efficiency in crop plants [J]. Annual Review of Genetics, 2015, 49: 269-289.

[6] SAAD M M, STAEHELIN C, BROUGHTON W J, et al. Protein-protein interactions within type III secretion system-dependent pili of *Rhizobium* sp. strain NGR234 [J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(2): 750-754.

[7] DEAKIN W J, MARIE C, SAAD M M, et al. NopA is associated with cell surface appendages produced by the type III secretion system of *Rhizobium* sp. strain NGR234 [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI, 2005, 18(5): 499-507.

[8] TEULET A, CAMUEL A, PERRET X, et al. The versatile roles of type III secretion systems in *Rhizobium*-legume symbioses[J]. Annual Review of Microbiology, 2022, 76: 45-65.

[9] MARIE C, DEAKIN W J, OJANEN-REUHS T, et al. TtsI, a key regulator of *Rhizobium* species NGR234 is required for type III-dependent protein secretion and synthesis of rhamnose-rich polysaccharides [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI, 2004, 17(9): 958-966.

[10] WASSEM R, KOBAYASHI H, KAMBARA K, et al. TtsI regulates symbiotic genes in *Rhizobium* species NGR234 by binding to tts boxes[J]. Molecular Microbiology, 2008, 68(3): 736-748.

[11] JIMÉNEZ-GUERRERO I, PÉREZ-MONTAÑO F, MEDINA C, et al. NopC is a *Rhizobium*-specific type 3 secretion system effector secreted by *Sinorhizobium* (*Ensifer*) *fredii* HH103 [J]. PLoS One, 2015, 10(11): e0142866.

[12] DORIVAL J, PHILYS S, GIUNTINI E, et al. Structural and enzymatic characterisation of the Type III effector NopAA (= GunA) from *Sinorhizobium fredii* USDA257 reveals a xyloglucan hydrolase activity[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 9932.

[13] GE Y Y, XIANG Q W, WAGNER C, et al. The type 3 effector NopL of *Sinorhizobium* sp. strain NGR234 is a mitogen-activated protein kinase substrate [J]. Journal of Experimental Botany, 2016, 67(8): 2483-2494.

[14] TEULET A, BUSSET N, FARDOUX J, et al. The rhizobial type III effector *ErnA* confers the ability to form nodules in legumes [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2019, 116(43): 21758-21768.

[15] DAI W J, ZENG Y, XIE Z P, et al. Symbiosis-promoting and deleterious effects of NopT, a novel type 3 effector of *Rhizobium* sp. strain NGR234[J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(14): 5101-5110.

[16] RODRIGUES J A, LÓPEZ-BAENA F J, OLLERO F J, et al. NopM and NopD are rhizobial nodulation outer proteins; Identification using LC-MALDI and LC-ESI with a monolithic capillary column [J]. Journal of Proteome Research, 2007, 6(3): 1029-1037.

[17] JIMÉNEZ-GUERRERO I, PÉREZ-MONTAÑO F, ZDYB A, et al. GunA of *Sinorhizobium* (*Ensifer*) *fredii* HH103 is a T3SS-secreted cellulase that differentially affects symbiosis with cowpea and soybean[J]. Plant and Soil, 2019, 435(1): 15-26.

[18] WANG J, MA C, MA S, et al. *GmARP* is related to the type III effector NopAA to promote nodulation in soybean (*Glycine max*) [J]. Frontiers in Genetics, 2022, 13: 889795.

[19] WANG J, MA C, MA S, et al. Genetic variation in GmCRP contributes to nodulation in soybean (*Glycine max* Merr.) [J]. The Crop Journal, 2022, 11(1/2): 1651-1666.

[20] ZHANG B, WANG M, SUN Y, et al. *Glycine max*>NNL1 restricts symbiotic compatibility with widely distributed bradyrhizobia via root hair infection[J]. Nature Plants, 2021, 7(1): 73-86.

[21] SUGAWARA M, TAKAHASHI S, UMEHARA Y, et al. Variation in bradyrhizobial NopP effector determines symbiotic incompatibility with Rj2-soybeans *via* effector-triggered immunity [J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 3139.

[22] KHAN A, WADOOD S F, CHEN M, et al. Effector-triggered inhibition of nodulation: A rhizobial effector protease targets soybean kinase GmPBS1-1[J]. Plant Physiology, 2022, 189(4): 2382-2395.

[23] RATU S T N, HIRATA A, KALAW C O, et al. Multiple domains in the rhizobial type III effector Bel2-5 determine symbiotic efficiency with soybean[J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 689064.

[24] RATU S T N, TEULET A, MIWA H, et al. Rhizobia use a pathogenic-like effector to hijack leguminous nodulation signalling [J]. Scientific Reports, 2021, 11: 2034.

[25] CAMUEL A, TEULET A, CARCAGNO M, et al. Widespread *Bradyrhizobium* distribution of diverse Type III effectors that trigger legume nodulation in the absence of Nod factor[J]. The ISME Journal, 2023, 17(9): 1416-1429.

[26] WANG J, WANG J, MA C, et al. QTL mapping and data mining to identify genes associated with the *Sinorhizobium fredii* HH103 T3SS effector NopD in soybean [J]. Frontiers in Plant Science, 2020, 11: 453.

[27] MA C, LIU C, YU Y, et al. GmTNRP1, associated with rhizobial type-III effector NopT, regulates nitrogenase activity in the nodules of soybean (*Glycine max*) [J]. Food and Energy Security, 2023, 12(4):

[28] MA C, MA S, YU Y, et al. Transcriptome-wide m<sup>6</sup>A methylation profiling identifies GmAMT1;1 as a promoter of lead and cadmium tolerance in soybean nodules[J]. Journal of Hazardous Materials, 2024, 465: 133263.

[29] LIU Y, LIN Y, WEI F, et al. G-type receptor-like kinase AsNIP43 interacts with rhizobia effector nodulation outer protein P and is required for symbiosis[J]. Plant Physiology, 2023, 193(2): 1527-1546.

[30] 田博宇, 孙志君, 刘函西, 等. 根瘤菌 TtsI 突变体构建及结瘤表型鉴定 [J]. 中国油料作物学报, 2020, 42(1): 17-24. (TIAN B Y, SUN Z J, LIU H X, et al. Construction of TtsI mutant of rhizobia and identification of nodulation phenotype[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2020, 42(1): 17-24.)

[31] 辛大伟, 邹佳男, 刘洋, 等. 寒地大豆根瘤菌与不同大豆种质资源的结瘤能力鉴定 [C]//中国作物学会 (Crop Science Society of China). 中国作物学会——2015 年学术年会论文摘要集, 2015: 1.

[32] 徐巧珍, 张学江, 李志玉, 等. 大豆种质资源共生固氮特性评价及遗传初步研究 [J]. 中国油料作物学报, 2000, 22(1): 19. (XU Q Z, ZHANG X J, LI Z Y, et al. Evaluation and preliminary genetical study of Chinese soybean germplasm for symbiotic characters [J]. Chinese Journal of Oil Crop Scieives, 2000, 22(1): 19.)

[33] GROUP M A P K. Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: A new nomenclature[J]. Trends in Plant Science, 2002, 7(7): 301-308.

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

