



华癸根瘤菌 7653R *hfq* 基因突变株的构建及其生物学特性

马春草, 周雪娟, 谢福莉, 李友国*

农业微生物学国家重点实验室, 华中农业大学, 湖北 武汉 430070

摘要:【目的】研究 *hfq* 基因在 *Mesorhizobium huakuii* 7653R 抵抗外界不利环境和共生固氮中的功能特性。【方法】利用 pK19mob 同源重组方法构建 7653R *hfq* 基因的插入失活突变株 7653R Δ *hfq*, 并构建互补菌株 7653R Δ *hfq*-C, 对 *hfq* 在压力胁迫和共生固氮中的功能特性进行研究。【结果】与野生型 7653R 相比, 突变株 7653R Δ *hfq* 的生长速率降低, 热激处理后致死率升高; *hfq* 突变影响了 7653R 中部分 sRNA 的表达; 在 4.5%乙醇和 50 mmol H₂O₂ 生长胁迫下, 突变株适应性明显较野生型差。另外, 接种突变株的紫云英结瘤能力和固氮酶活性都明显降低。【结论】*hfq* 基因作为重要的转录后调控因子, 在 7653R 抵御外界胁迫环境和与宿主紫云英的共生固氮中发挥了重要作用。

关键词: 华癸中慢生根瘤菌 7653R, *hfq* 基因, 共生固氮, sRNA, 胁迫应答

非编码 RNA (Non-coding RNA, ncRNA) 是近年来研究细菌调控网络的热点, 原核生物中 sRNA 通过与其调控目标 mRNA 的特定区域形成碱基对以实现调节的功能^[1-3]。在大肠杆菌中, 绝大多数的反式作用 sRNA 都需要 Hfq (Host factor) 蛋白才能够有效地发挥其功能^[4]。Hfq 蛋白是一个广泛存在且高度保守的 RNA 伴侣蛋白, 结构与 Sm 蛋白类似, 通过参与 ncRNAs 与其靶标 mRNAs 的互作过程, 从而影响 mRNAs 的稳定性, 进而发挥其调控作用^[5]。大量研究表明, 不同细菌中 Hfq 的功能不尽相同, 会影响细菌对压力应答及细胞内环境适应能力, 因此 *hfq* 突变株会形成细菌复杂表型。

如在大肠杆菌中, *hfq* 突变株生长速度变慢, 对温度、氧化条件、渗透压及紫外线敏感性增强^[6]。在布鲁氏菌, 李斯特菌, 沙门氏菌中突变株的毒性均降低^[7-9]。在苜蓿中华根瘤菌中, *hfq* 突变株会影响与苜蓿的共生固氮功能并影响碳代谢途径^[10]。更有研究表明 Hfq 能参与 RpoS 的调控从而影响细菌抗压能力和毒力; Hfq 也能影响细菌的密度感应系统 (quorum sensing, QS) 进而形成多效的复杂表型^[11-13]。

华癸中慢生根瘤菌 (*Mesorhizobium huakuii*) 是属于 α -变形菌纲的革兰氏阴性杆菌, 能专一识别宿主紫云英并进行共生固氮。在与植物构建共生

基金项目: 国家自然科学基金(31371549, 31460056)

*通信作者。Tel: +86-27-87281685; Fax: +86-27-87280670; E-mail: youguoli@mail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2016-05-06; 修回日期: 2016-06-08; 网络出版日期: 2016-07-01

固氮网络的过程中，根瘤菌需要形成不同的应答机制来感受外界环境信号的变化，从而形成良好的共生固氮关系^[14]。本研究通过同源重组方法构建了 *Mesorhizobium huakuii* 7653R *hfq* 插入失活突变株，并对突变株的生长特性和对共生固氮的影响作了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒：华葵中慢生根瘤菌 7653R (*Mesorhizobium huakuii* 7653R)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 、大肠杆菌 S17-1、自杀质粒 pK19mob (kan)均由本实验室保存；PMD19-T 购自 TaKaRa 公司。

1.1.2 植物材料：紫云英：*Astragalus sinicus* L. 为本实验室保存。

1.1.3 主要试剂和仪器：DNA 回收试剂盒购自上海华舜公司；限制性核酸内切酶 Fermentas 公司产品；*Taq* DNA 聚合酶、*Ex Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、DNA 分子标准量 marker 均购自东胜科技公司；氨

苄青霉素、卡那霉素、新霉素均为 Duchefa 公司产品；PCR 仪为 Bio-Rad 生产，摇床、离心机购自 Thermo，Step one Real-time PCR system 购自 ABI。

1.1.4 引物：表 1 为本研究中所用引物，根据 GenBank 登录的基因序列用 Primer 5.0 软件设计，引物由南京金斯瑞公司合成。

1.2 *hfq* 突变株及互补菌株的构建

1.2.1 重组质粒构建：以 7653R 菌株基因组 DNA 为模板，用 *hfq*-F 和 *hfq*-R 引物扩增同源交换臂。PCR 反应条件：95 °C 5 min；95 °C 30 s，55 °C 30 s，72 °C 30 s，30 个循环；72 °C 10 min。PCR 产物经 DNA 回收试剂盒纯化回收后连接载体 pMD19-T 并转化 DH5 α ，PCR 验证后将阳性克隆送金斯瑞公司测序。抽提测序正确阳性克隆质粒和载体 pK19mob 质粒，以 *Bam*H I 和 *Eco*R I 分别双酶切阳性克隆及载体 pK19mob，纯化回收后用 T4 连接酶进行酶连，并转化 S17-1。PCR 验证阳性克隆并将测序正确的阳性克隆命名为 *hfq*-pK19mob。

表 1. 目的基因引物序列

Table 1. Primers sequences of target genes

Primers	Sequences (5'→3')	Restriction site
<i>hfq</i> -F	CGGGATCCAATTCAGTTCGCAAGAGCAA	<i>Bam</i> H I
<i>hfq</i> -R	CGGAATTCTGGAAATGGCGTGCTTGT	<i>Eco</i> R I
<i>hfq</i> -F'	ATAACCGCACAGGTGGAATG	
<i>hfq</i> -R'	CAGCCGTATGGACAGGGTC	
<i>hfq</i> -pbbr-F	GCTCTAGATAA <u>CTCGAG</u> CTGAACGAGGAGGAGAACAATGGCGGAACGAT	<i>Xho</i> I
<i>hfq</i> -pbbr-R	GG <u>ACTAGT</u> TCAGGCGCCCTGGCTTTCCTCG	<i>Spe</i> I
M13-F	GAGCGGATAACAATTTACACAGG	
M13-R	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	
MCHK-R0020-F	GCAAGTTCACCGTGGGTTTCG	
MCHK-R0020-R	TTGTTGCGCTGGTGAATGC	
MCHK-R0023-F	TTAGGACACCGCCCTTTCAC	
MCHK-R0023-R	GGGAGGTCGCCAAGTGTTT	
MCHK-R0036-F	AGCCCGTAGCTCGTCAGG	
MCHK-R0036-R	CGGACGGCTGATGAGGGTT	

1.2.2 7653R Δ hfq 突变株的筛选：以 7653R 为受体菌株，以 hfq-pk19mob 为供体菌株进行两亲本接合转移，在含有 Str 和 Neo 的 AMS 抗性平板上筛选突变株。引物 hfq-F'和 hfq-R'是 7653R 基因组上 hfq 基因上下游引物，M13F 和 M13R 是载体 pk19mob 上引物，用 M13 引物与 hfq 上下游引物匹配验证正确的菌株 7653R Δ hfq。

1.2.3 互补菌株 7653R Δ hfq-C 的构建及筛选：为了确定 7653R Δ hfq 与紫云英共生表型是由 hfq 基因突变引起的，本研究构建了功能互补菌株，以观察其表型能否恢复。以 *M. huakuii* 7653R 总 DNA 为模板，以带有核糖体结合位点及酶切位点的引物 hfq-pbbr-F 和 hfq-pbbr-R 进行 PCR 扩增得到 hfq 的开放阅读框，经酶切回收后与同样双酶切的载体 pBBRMCS-5 酶连，构建组成型转化载体 pBBR-hfq，测序正确后进行两亲本接合转移导入突变株 7653R Δ hfq 中，在含有 Str、Neo 和 Gm 的 AMS 抗性平板上筛选。

1.3 7653R Δ hfq 共生表型鉴定

1.3.1 植株表型分析：挑取颗粒饱满紫云英种子进行表面灭菌后平铺于素琼脂平板，22 °C 培养箱倒置培养 2 d 后种植到灭菌沙子中，约 5 d 后分别接菌 7653R、7653R Δ hfq 和 7653R Δ hfq-C，以不接菌作为空白对照进行盆栽实验。光照培养箱中培养 28 d 后收集植株，观察植株长势并测定植株地上部分鲜重、瘤数和瘤重。

1.3.2 固氮酶活测定：根瘤中的固氮酶可将乙炔还原为乙烯，因此我们一般使用乙炔还原法来衡量其固氮酶活性。将接菌植物根部放于 PA 瓶中，用橡皮塞密封。用注射器吸取 PA 瓶中 2 mL 空气，并注入 2 mL 乙炔。放于 28 °C 培养箱中反应 2 h。用微量吸样器吸取 PA 瓶中 100 μ L 反应后的气体，用气象色谱仪测定乙烯吸峰值。在相同条件下测

定其标准乙烯绘制标准曲线，并计算样品的固氮酶活。

固氮酶活的表示公式：

$$\text{固氮酶活} = \frac{C_2H_2 \text{ } \mu\text{mol}}{[\text{瘤鲜重}(\text{g}) \times \text{反应时间}(\text{hr})]}$$

$$C_2H_2 \text{ } \mu\text{mol} = C_2H_2 \text{ 体积}(\mu\text{L}) \times (1/22.4) \times [273/(273 + t_{oc})] \times P/760$$

公式中： t_{oc} ，气体温度；P，气压，毫米汞柱。

1.4 7653R 和 7653R Δ hfq 自生及共生条件下部分 sRNA 表达量测定

Hfq 能与 sRNA 茎环结构中富含 AU 的区域结合，根据本实验室对自生及共生固氮期对 sRNA 进行的高通量深度测序结果分析，表达丰度较高，大小合适，对其二级结构进行分析，可能与 Hfq 互作的 3 条 sRNA，MCHK-R0020、MCHK-R0023 和 MCHK-R0036，设计荧光定量引物。抽提自生条件下 7653R 和 7653R Δ hfq 的总 RNA 及接种 7653R 和 7653R Δ hfq 28 d 后紫云英的根瘤 RNA，并反转录为 cDNA，以得到的 cDNA 为模板进行 RT-PCR。按照 SYBR Green Realtime PCR Master Mix (TOYOBO) 说明书配制 Real-time PCR 反应体系。反应条件：95 °C 30 s；95 °C 5 s，60 °C 20 s，72 °C 20 s，40 个循环。

1.5 生长曲线测定

为观测 hfq 突变对自生状态下 7653R 菌株生长状态是否有影响，进行了 OD_{600} 曲线测定。分别将 7653R、7653R Δ hfq 和 7653R Δ hfq-C 活化后的菌体以 1 : 100 接种量接种于新鲜 TY 培养基，于 28 °C、200 r/min 振荡培养，每隔 4 h 取样测定 OD_{600} 值。

1.6 7653R 和 7653R Δ hfq 抗胁迫能力测定

1.6.1 hfq 基因突变对热应激的影响：挑取 7653R 及 7653R Δ hfq 单菌落接种到新鲜 TY 培养基中，

28 °C 摇床振荡培养 2 d 后以 1 : 100 接种量接种于 TY 培养基, 培养至对数后期时取 1 mL 菌液 42 °C 处理 30 min, 分别对未处理组和处理组进行细菌计数, 重复 3 次。

1.6.2 *hfq* 基因突变对乙醇和 H₂O₂ 耐受性实验: 挑取 7653R 及 7653RΔ*hfq* 单菌落接种到新鲜 TY 培养基中, 28 °C 摇床振荡培养 2 d 后以 1 : 100 接种量接种于正常 TY 培养基及含 4.5% 乙醇、50 mmol H₂O₂ 的 TY 培养基中, 恒温摇床 180 r/min 条件下振荡培养。每隔 4 h 用酶标仪检测其 OD₆₀₀ 值, 并绘制生长曲线, 观察 *hfq* 基因缺失对 7653R 在乙醇及氧化胁迫下耐受性影响。

2 结果和分析

2.1 重组菌株构建

2.1.1 重组质粒构建: 以 7653R 总基因组 DNA 为模板, 扩增大小为 156 bp 的同源片段, 电泳结果显示大小与预期相符(图 1); 测序正确克隆经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切与同样双酶切载体 pK19mob 酶连后转化 *E. coli* S17-1, 抽提质粒酶切验证, 得到大小 156 bp 和 3793 bp 的片段, 电泳显示大小正确(图 2)。

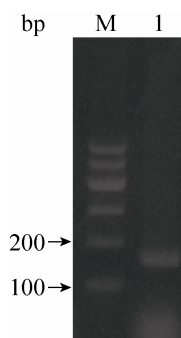


图 1. PCR 扩增同源臂

Figure 1. Homologous arms amplified by PCR. M: marker 1; 1: homologous arm products.

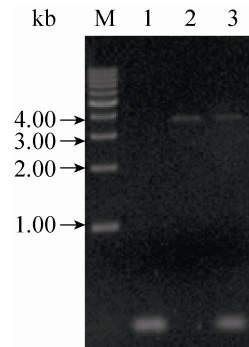


图 2. 重组质粒酶切验证

Figure 2. Recombinant plasmid enzyme digestion. M: 1 kb DNA ladder; 1: homologous arm products; 2: pK19mob by double enzyme digestion; 3: recombinant plasmid identified by double enzyme digestion.

2.1.2 突变株的鉴定: 重组质粒导入 7653R 后通过同源重组引起 *hfq* 基因的插入失活, 菌落 PCR 鉴定转化结果, 突变体在 390 bp 处扩增出相应条带, 而野生型 7653R 并未出现相应条带, 证明载体同源重组整合到 7653R 基因组中, 得到 *hfq* 基因插入失活突变株(图 3)。

2.2 互补菌株构建及筛选

以 7653R 总基因组 DNA 为模板, 扩增包括酶切位点在内的 *hfq* 完整的开放阅读框 282 bp, 与酶切后的载体 pBBRMCS-5 酶连构建互补载体 pBBR-*hfq*,

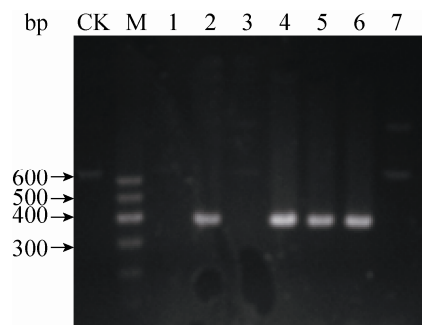


图 3. *hfq* 突变体验证

Figure 3. Identify of *hfq* mutant. CK: 7653R wild type; M: marker 1; 1-7: PCR amplification with M13F and *hfq*-F'.

以测序正确的载体 pBBR-*hfq* 为供体质粒, 以 7653R Δ *hfq* 为供体菌进行两亲本接合转移, 经过抗性筛选并进行菌落 PCR 验证(图 4)。构建成功的互补菌株中有插入突变后可扩增得到的 390 bp 的片段, 也有完整的 *hfq* 基因, 证明互补菌株 7653R Δ *hfq*-C 构建成功。

2.3 *hfq* 突变株对共生作用的影响

收集接菌 28 d 后紫云英进行共生表型观察及测定, 由地上部分表型可看出接种 7653R 的紫云英植株, 长势正常、叶片绿色, 而接种 7653R Δ *hfq* 的紫云英植株长势矮小、叶片发黄, 表现出明显的缺氮表型, 接种互补菌株 7653R Δ *hfq*-C 的紫云英植株长势也恢复正常(图 5-A)。由植株地下部分可以看出接种 7653R 的植株根系发达, 根瘤数量多且为粉色椭圆形根瘤, 而突变株根瘤为白色圆

形根瘤, 互补菌株根瘤也为粉色, 对照植株不结瘤(图 5-B)。

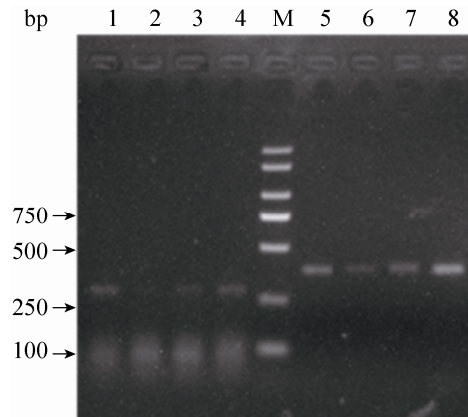


图 4. 互补菌株菌落 PCR 鉴定

Figure 4. Identification of the complementation strain by colony PCR. 1-4: PCR amplification with *hfq*-pbbr-F and *hfq*-pbbr-R; M: DL2000; 5-8: PCR amplification with M13F and *hfq*-F'.



图 5. 供试菌株在紫云英上的结瘤情况

Figure 5. Nodules induced by strains tested on *Astragalus sinicus* L.. A: from left to right are plants inoculated with 7653R, 7653R Δ *hfq*-C, 7653R Δ *hfq* and CK; B: from left to right are the roots of plants inoculated with 7653R, 7653R Δ *hfq*-C, 7653R Δ *hfq* and CK.

定量检测结果表明：突变株的紫云英植株地上部分鲜重下降、根瘤数量和根瘤鲜重都减少，用乙炔还原法测定根瘤固氮酶活性与接种野生型 7653R 的对照组相比固氮酶活显著降低，互补菌株的各项指标都回复到野生型水平，证明互补菌株可以回复突变株的固氮功能(表 2)。以上结果表明 *hfq* 在 7653R 与紫云英共生固氮过程中发挥重要作用。

2.4 7653R 和 7653R Δ *hfq* 中部分 sRNA 表达量变化

以 *M. huakuii* 7653R 编码 RNase P 的 *rnpB* 基因为内部参照基因进行 RT-PCR，结果显示在自生条件下 7653R Δ *hfq* 中 3 个 sRNA 的表达量均降低

(图 6)，而在共生条件下 *hfq* 突变后 MCHK-R0023 和 MCHK-R0036 的表达量降低，MCHK-R0020 的表达量与野生型基本相同(图 7)。大部分 sRNA 行使功能都需要 Hfq 的参与，利用 RNAfold 软件在线分析这 3 条 sRNA，形成的茎环结构中含有富含 AU 的序列，符合与 Hfq 互作的 RNA 结构模式，*hfq* 的突变在一定程度上影响了这些 sRNA 的表达，表明 *hfq* 可能通过调控这些 sRNA 与靶基因的作用从而影响 7653R 与植物正常固氮关系的建立。

2.5 生长曲线测定

将 7653R 野生型、7653R Δ *hfq* 和 7653R Δ *hfq*-C 在 TY 培养基中扩大培养，每隔 4 h 取样测定 OD_{600} 吸光度绘制生长曲线。由图 8 结果可知在自然生

表 2. *M. huakuii hfq* 基因突变株共生表型

Table 2. Symbiotic phenotype of *M. huakuii hfq* mutant

Strains	Fresh weight of plant (g/plant)	Number of nodule (/plant)	Fresh weight of nodule (g/plant)	Nitrogen fixation activity [μ mol/(g·h)]
<i>M. huakuii</i> 7653R	0.532 ^a ±0.090	30.33 ^a ±6.30	0.047 ^a ±0.021	9.50 ^a ±2.56
7653R Δ <i>hfq</i>	0.227 ^b ±0.016	17.60 ^b ±4.10	0.013 ^b ±0.001	4.92 ^b ±0.98
7653R Δ <i>hfq</i> -C	0.495 ^a ±0.057	26.70 ^a ±5.30	0.047 ^a ±0.005	8.10 ^a ±1.56
CK	0.120 ^b ±0.002	0	0	0

*: The date is average of three replicate. a, b, c values in each column followed by the same letter are not significance difference ($P < 0.05$).

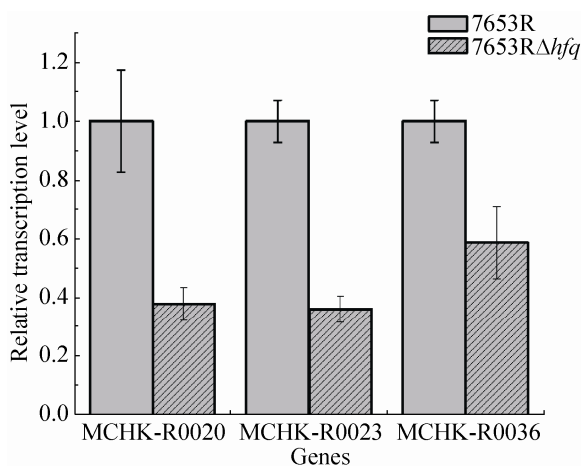


图 6. 自生条件下 RT-PCR

Figure 6. RT-PCR under free living.

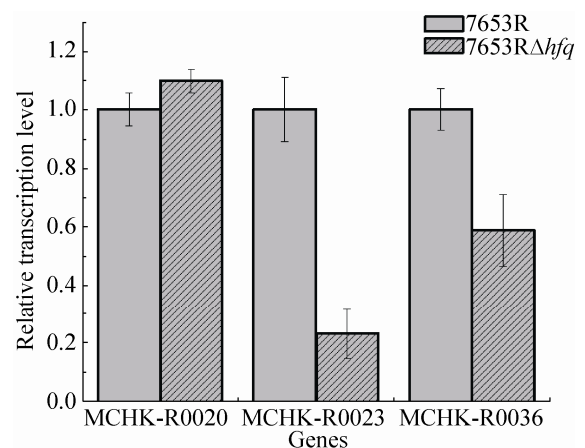


图 7. 共生条件下 RT-PCR

Figure 7. RT-PCR under the symbiotic condition.

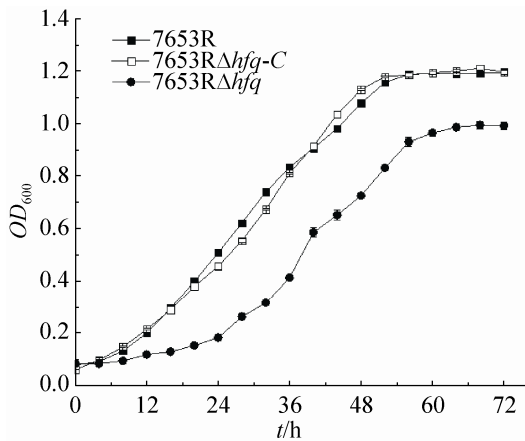


图 8. 7653R、7653RΔhfq 和 7653RΔhfq-C 生长曲线
Figure 8. Growth characteristics of 7653R, 7653RΔhfq and 7653RΔhfq-C.

长条件下, 与野生型相比, 7653RΔhfq 的生长速率变慢, 而互补菌株的生长速度恢复到野生型的状态, 说明 hfq 基因突变影响了 7653R 的正常生长。

2.6 不同胁迫环境中处理结果

2.6.1 hfq 基因突变对热应激影响的实验结果:

7653R 正常在 28 °C 生长, 本实验探索了 42 °C 处理时 7653R 与 7653RΔhfq 细菌存活数的差异。图 9 中的实验结果显示 42 °C 处理 30 min 后, 野生型存活率比突变株高 3 倍左右, 表明 hfq 对 7653R 的热应激有正调控作用。

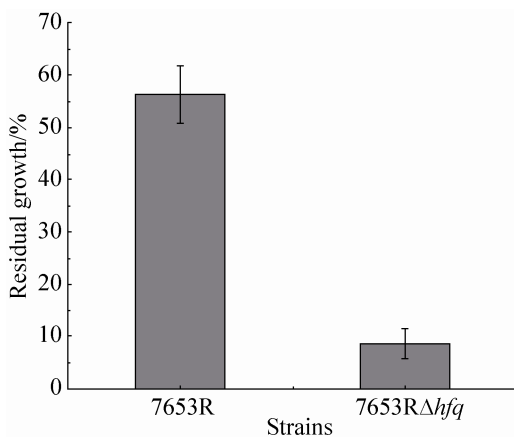


图 9. 7653R 和 7653RΔhfq 热应激实验结果
Figure 9. Heat stress tolerance of 7653R and 7653RΔhfq.

2.6.2 突变株耐受乙醇和 H₂O₂ 的实验结果:

将 7653R 及 7653RΔhfq 在含 4.5%乙醇以及 50 mmol H₂O₂ 的 TY 培养基中培养, 每隔 4 h 检测其 600 nm 处 OD 值并绘制生长曲线。图 10 和图 11 结果显示 hfq 突变株生长速率较野生型明显降低, 表明 hfq 基因参与了 7653R 对 4.5%乙醇以及 50 mmol H₂O₂ 的适应过程, 对 7653R 的压力应答及氧化应激过程有正调控作用。

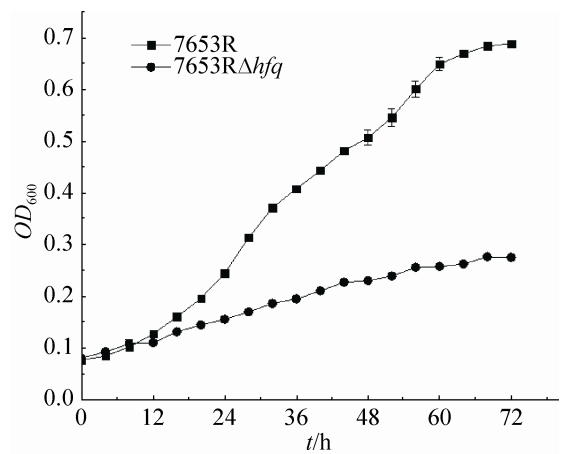


图 10. 7653R 和 7653RΔhfq 耐受乙醇实验结果
Figure 10. Ethanol stress tolerance of 7653R and 7653RΔhfq.

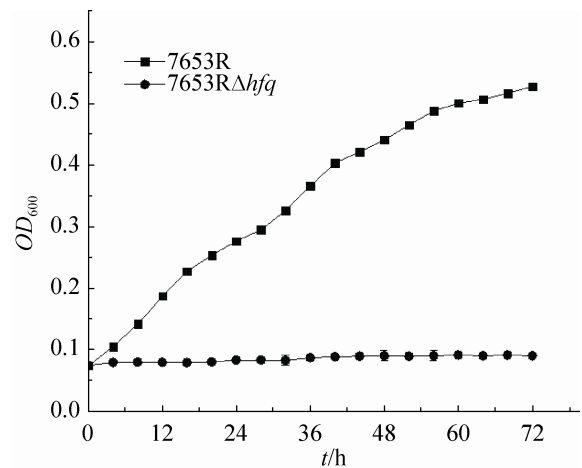


图 11. 7653R 和 7653RΔhfq 耐受 H₂O₂ 实验结果
Figure 11. H₂O₂ stress tolerance of 7653R and 7653RΔhfq.

3 讨论

Hfq 是广泛存在于细菌中的一种重要的转录后调节因子,其主要生物学功能是通过与 RNA 结合影响其稳定性或通过辅助 sRNA 与 mRNA 的结合来调节靶基因的表达^[14]。已有研究表明,细菌中有大量靶基因受 Hfq 调控,如苜蓿根瘤菌 *hfq* 突变失活后蛋白质组分析显示大量与压力应答,蛋白转运等相关的基因表达发生变化^[15]。本研究通过同源重组方法成功构建了华葵根瘤菌 7653R *hfq* 突变株,并通过一系列实验对 *hfq* 在共生固氮和根瘤菌抵御外界胁迫环境中发挥的作用进行了研究。

Hfq 蛋白在根瘤菌中的研究近几年多有报道, Drepper 等^[16]研究了荚膜红细菌 *Rhodobacter capsulatus* 中与 *E. coli* Hfq 蛋白高度相似的 NrfA,表明 NrfA 能通过编码其他固氮基因的转录激活因子在转录水平上调控 *nifA1*, *nifA2* 和 *anfA* 这些监管因子的表达;Lise Barra-Bily 等^[17]研究表明苜蓿根瘤菌中 *hfq* 的突变会影响固氮基因 *nifA* 和 *nfeB* 的表达引起缺氮表型。在 *Sinorhizobium meliloti* 中,*hfq* 的突变主要影响了根瘤菌的入侵,大部分根瘤出现的侵入线形成异常,不能进行正常的延伸和类菌体分化,因此结瘤为没有固氮活性的白色圆形根瘤^[17-19]。本研究中通过 *hfq* 突变株的共生表型分析可以看出其在共生固氮中有重要作用。突变株结瘤多为白色无效根瘤,固氮能力较野生型大大降低,植株长势偏弱,推测可能是影响了根瘤菌的定殖和侵入线的形成,从而影响了共生结瘤过程,进而不能建立正常的共生固氮关系。

Hfq 是一个同源六聚体蛋白,其 Sm 结构域近端(proximal side)结合富含尿嘧啶(U-rich)的单链

RNA,而富含腺嘌呤(A-rich)的单链 RNA 结合在远端(distal side)^[5,20]。3 条 sRNA 的荧光定量 PCR 结果显示,在自生状态下表达量均降低,而共生时 MCHK-R0023 和 MCHK-R0036 表达量降低,*hfq* 突变后会直接影响这些 sRNA 与靶基因互作,间接影响固氮过程中的碳代谢、细胞运输、脂质运输等一系列固氮相关过程,进而影响共生关系建立,但 Hfq 与这些 sRNA 的相互作用及这些 sRNA 的作用还需进一步实验验证。

根瘤菌与豆科植物的共生固氮过程是由大量蛋白参与的复杂调控过程,而 Hfq 作为重要的全局调控因子,基因突变会产生复杂表型,细菌的生长及对外界环境的适应性都会发生变化^[20]。本研究结果显示,*hfq* 突变株的生长速度变慢,热激处理时突变株的生存率较野生型降低。在 4.5%乙醇以及 50 mmol H₂O₂ 的胁迫处理中,野生型和突变株的生长速度均降低,但突变株的耐受性明显比野生型低,证明 Hfq 蛋白在 7653R 抵御外界不利因素中发挥重要作用。

本研究为进一步研究 Hfq 蛋白在共生固氮中的调控功能奠定了基础,但具体是如何影响 7653R 与宿主的共生固氮关系建立还需要进一步研究证明。

参考文献

- [1] Peng JL, Hao BH, Liu L, Wang SM, Ma BG, Yang Y, Xie FL, Li YG. RNA-Seq and microarrays analyses reveal global differential transcriptomes of *Mesorhizobium huakuii* 7653R between bacteroids and free-living cells. *PLoS One*, 2014, 9(4): e93626.
- [2] Repoila F, Darfeuille F. Small regulatory non-coding RNAs in bacteria: physiology and mechanistic aspects. *Biology of the Cell*, 2012, 101(2): 117-131.
- [3] Richards GR, Vanderpool CKV. Molecular call and response: the physiology of bacterial small RNAs. *Biochimica et*

- Biophysica Acta*, 2011, 1809(10): 525–531.
- [4] Storz G, Vogel J, Wassarman KM. Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers. *Molecular Cell*, 2011, 43(6): 880–891.
- [5] Faner MA, Feig AL. Identifying and characterizing Hfq-RNA interactions. *Methods*, 2013, 63(2): 144–159.
- [6] Tsui HCT, Leung HCE, Winkler ME. Characterization of broadly pleiotropic phenotypes caused by an *hfq* insertion mutation in *Escherichia coli* K-12. *Molecular Microbiology*, 1994, 13(1): 35–49.
- [7] Cui MQ, Wang TK, Xu J, Ke YH, Du XY, Yuan XT, Wang ZJ, Gong CL, Zhuang YB, Lei SS, Su X, Wang XS, Huang LY, Zhong ZJ, Peng GN, Yuan J, Chen ZL, Wang YF. Impact of Hfq on global gene expression and intracellular survival in *Brucella melitensis*. *PLoS One*, 2013, 8(8): e71933.
- [8] Nielsen JS, Lei LK, Ebersbach T, Olsen AS, Klitgaard JK, Valentin-Hansen P, Kallipolitis BH. Defining a role for Hfq in gram-positive bacteria: evidence for Hfq-dependent antisense regulation in *Listeria monocytogenes*. *Nucleic Acids Research*, 2009, 38(3): 907–919.
- [9] Chao YJ, Vogel J. The role of Hfq in bacterial pathogens. *Current Opinion in Microbiology*, 2010, 13(1): 24–33.
- [10] Torres-Quesada O, Oruezabal RI, Peregrina A, Jofre E, Lloret J, Rivilla R, Toro N, Jimenez-zurdo JI. The *sinorhizobium meliloti* RNA chaperone Hfq influences central carbon metabolism and the symbiotic interaction with alfalfa. *BMC Microbiology*, 2010, 10(71): 1186–1207.
- [11] Fantappiè L, Metruccio MME, Seib KL, Oriente F, Cartocci E, Ferlicca F, Giuliani MM, Scarlato V, Delany I. The RNA chaperone Hfq is involved in stress response and virulence in *Neisseria meningitidis* and is a pleiotropic regulator of protein expression. *Infection and Immunity*, 2009, 77(5): 1842–1853.
- [12] Kakoschke T, Kakoschke S, Magistro G, Schubert S, Borath M, Heesemann J, Rossier O. The RNA chaperone Hfq impacts growth, metabolism and production of virulence factors in *Yersinia enterocolitica*. *PLoS One*, 2014, 9(1): e86113.
- [13] Sonnleitner E, Hagens S, Rosenau F, Wilhelm S, Habel A, Jäger KE, Bläsi U. Reduced virulence of a *hfq* mutant of *Pseudomonas aeruginosa* O1. *Microbial Pathogenesis*, 2003, 35(5): 217–228.
- [14] Haag AF, Arnold MFF, Myka KK, Kerscher B, Dall'Angelo S, Zanda M, Mergaert P, Ferguson GP. Molecular insights into bacteroid development during *Rhizobium*-legume symbiosis. *FEMS Microbiology Reviews*, 2013, 37(3): 364–383.
- [15] Barra-Bily L, Fontenelle C, Jan G, Flechard M, Trautwetter A, Pandey SP, Walker GC, Blanco C. Proteomic alterations explain phenotypic changes in *Sinorhizobium meliloti* lacking the RNA chaperone Hfq. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(6): 1719–1729.
- [16] Drepper T, Raabe K, Giaourakis D, Gendrullis M, Masepohl B, Klipp W. The Hfq-like protein NrfA of the phototrophic purple bacterium *Rhodobacter capsulatus* controls nitrogen fixation via regulation of *nifA* and *anfA* expression. *FEMS Microbiology Letters*, 2002, 215(2): 221–227.
- [17] Barra-Bily L, Pandey SP, Trautwetter A, Blanco C, Walker GC. The *Sinorhizobium meliloti* RNA chaperone Hfq mediates symbiosis of *S. meliloti* and Alfalfa. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(6): 1710–1718.
- [18] Torres-Quesada O, Oruezabal RI, Peregrina A, Jofre E, Lloret J, Rivilla R, Toro N, Jiménez-Zurdo JI. The *Sinorhizobium meliloti* RNA chaperone Hfq influences central carbon metabolism and the symbiotic interaction with Alfalfa. *BMC Microbiology*, 2010, 10(7): 71.
- [19] Pandey SP, Minesinger BK, Kumar J, Walker GC. A highly conserved protein of unknown function in *Sinorhizobium meliloti* affects sRNA regulation similar to Hfq. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(11): 4691–4708.
- [20] Lease RA, Woodson SA. Cycling of the Sm-like protein Hfq on the DsrA small regulatory RNA. *Journal of Molecular Biology*, 2004, 344(5): 1211–1223.

Mutant construction and characterization of *hfq* in *Mesorhizobium huakuii* 7653R

Chuncao Ma, Xuejuan Zhou, Fuli Xie, Youguo Li*

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

Abstract: [Objective] We studied the functions and characteristics of *hfq* gene in *Mesorhizobium huakuii* 7653R in adverse environment and symbiotic with its host plant. [Methods] The *hfq* mutant of 7653R was constructed via homologous recombination with small cloned fragments on suicide plasmids pK19mob to insert target gene. We applied 7653R Δ *hfq* to characterize stress tolerance and symbiosis with host plant, in comparison with the complementary strains 7653R Δ *hfq*-C and the wild type. [Results] Mutant 7653R Δ *hfq* presented lower growth rate, and higher mortality after heat shock-pretreated than that of the wild type, as well as the decreasing adaptability under the stress of 4.5% ethanol and 50 mmol H₂O₂. The defection of *hfq* affected the expression of some sRNAs in 7653R. Moreover, the mutant displayed significant reduced nodulation ability and nitrogenase activity compared with the wild type. [Conclusion] As a crucial post transcriptional regulatory factor, Hfq plays an important role in *Mesorhizobium huakuii* 7653R on both processes of stress resistance and symbiosis with the host plant *Astragalus sinicus* L.

Keywords: *Mesorhizobium huakuii* 7653R, *hfq* gene, symbiotic nitrogen fixation, sRNA, stress response

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31371549, 31460056)

*Corresponding author. Tel: +86-27-87281685; Fax: +86-27-87280670; E-mail: youguoli@mail.hzau.edu.cn

Received: 6 May 2016; Revised: 8 June 2016; Published online: 1 July 2016