



# 田菁根瘤菌 YIC4027 可溶性趋化受体 Tlp1 的功能鉴定

黄炜妮<sup>1</sup>, 王艺璇<sup>2</sup>, 孙丽<sup>2</sup>, 董小燕<sup>2</sup>, 解志红<sup>1\*</sup>

1 山东农业大学资源与环境学院, 山东 泰安 271018

2 中国科学院烟台海岸带研究所, 山东 烟台 264003

黄炜妮, 王艺璇, 孙丽, 董小燕, 解志红. 田菁根瘤菌 YIC4027 可溶性趋化受体 Tlp1 的功能鉴定[J]. 微生物学报, 2023, 63(2): 775-785.

HUANG Weiwei, WANG Yixuan, SUN Li, DONG Xiaoyan, XIE Zhihong. Characterization of the soluble chemoreceptor Tlp1 in *Sinorhizobium alkanisoli* YIC4027[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(2): 775-785.

**摘要:** 【目的】初步探究田菁根瘤菌 *Sinorhizobium alkanisoli* YIC4027 中唯一含有 PAS 结构域可溶性趋化受体 Tlp1 的功能机理。【方法】本研究基于 Red 重组系统以及三亲接合技术进行缺失突变株的构建。对野生型和突变株的生长情况、趋化能力、趋氧性、细胞凝结、生物膜的形成、胞外多糖产量、在宿主根表的定殖及竞争性结瘤等表型进行了测定。【结果】与野生型相比, 突变株的生长不受影响, 趋化和趋氧能力降低, 在宿主根表的定殖及竞争性结瘤能力降低, 而细胞凝结能力、生物膜形成以及胞外多糖产生能力等均有所提高。【结论】本研究首次证实了 *S. alkanisoli* YIC4027 中可溶性趋化受体 Tlp1 影响细胞的趋化运动。

**关键词:** *Sinorhizobium alkanisoli* YIC4027; 可溶性趋化受体; PAS 结构域; 趋化

资助项目: 国家重点研发计划(2019YFD1002702); 国家自然科学基金(31870020); 山东省重点研发计划(2021CXGC010804)  
This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2019YFD1002702), the National Natural Science Foundation of China (31870020), and the Key Research and Development Program of Shandong Province (2021CXGC010804).

\*Corresponding author. E-mail: zhihongxie211@163.com

Received: 2022-06-27; Accepted: 2022-08-27; Published online: 2022-09-05

# Characterization of the soluble chemoreceptor Tlp1 in *Sinorhizobium alkalisoli* YIC4027

HUANG Weiwei<sup>1</sup>, WANG Yixuan<sup>2</sup>, SUN Li<sup>2</sup>, DONG Xiaoyan<sup>2</sup>, XIE Zhihong<sup>1\*</sup>

1 College of Resources and Environment, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, Shandong, China

2 Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, Shandong, China

**Abstract:** [Objective] To decipher the functional mechanism of Tlp1 which is the only soluble chemoreceptor containing PAS domain in *Sinorhizobium alkalisoli* YIC4027. [Methods] We constructed the gene-deleted mutant strain based on the Red homologous recombination system and triparental conjugation. The growth rate, chemotaxis, aerotaxis, cell flocculation, biofilm formation, exopolysaccharide (EPS) production, colonization, and competitive nodulation of the wild type and the mutant strain were studied. [Results] Compared with the wild type, the mutant strain showed unaffected growth, weakened chemotaxis, aerotaxis, colonization, and competitive nodulation, and increased cell coagulation, biofilm formation, and EPS production. [Conclusion] This study confirmed that the soluble chemoreceptor Tlp1 in YIC4027 affected the chemotactic movement of the cells for the first time.

**Keywords:** *Sinorhizobium alkalisoli* YIC4027; soluble chemoreceptor; PAS domain; chemotaxis

田菁(*Sesbania cannabina*)因具有高产、耐盐以及可以适应营养缺乏环境的特点,被认为是改良滨海盐渍地的理想植物<sup>[1]</sup>。田菁根瘤菌是一类革兰氏阴性细菌,能够与田菁共生固氮后形成根瘤,将大气中的氮气还原为氨,向宿主植物提供可直接吸收的氮营养<sup>[2]</sup>,从而降低宿主对土壤中氮的需求<sup>[3]</sup>。*Sinorhizobium alkalisoli* YIC4027 是本实验室从黄河三角洲盐渍土上生长的田菁根瘤中分离的一株优势根瘤菌,具有良好的竞争性、宿主特异性、耐盐碱能力和促生效果,并被证实对黄河三角洲盐渍土壤具有较好的改良效果<sup>[4]</sup>。

趋化使细菌具有主动移向营养丰富或者远离有害物质的能力。植物的根释放出被细菌感知的化合物,并沿着浓度梯度触发趋化作用,这在根际细菌定殖过程中起着重要作用。在根表面定殖过程中,趋化作用也给了可动细菌一个显著的竞争优势<sup>[5]</sup>。趋化受体(methyl-accepting

chemotaxis proteins, MCPs)是细菌感受外界刺激并实现信号放大的第一步,在菌株与宿主建立共生关系的起始阶段起着至关重要的作用<sup>[6]</sup>。革兰氏阴性菌中,以大肠杆菌作为模式菌株对趋化受体及其信号转导进行了系统的研究<sup>[7]</sup>。其他细菌的基因组分析表明,大多数细菌拥有多个趋化受体,平均每个基因组有 14 个趋化受体基因<sup>[8]</sup>;但是在某些特定物种中,趋化受体可超过 80 个<sup>[9]</sup>。细菌的生活方式决定趋化受体的数量<sup>[10]</sup>,例如在复杂多变环境中生存的细菌比生活在特定生态位的细菌大约多 5 倍<sup>[8]</sup>。

可溶性趋化受体由于缺少跨膜区域而游离于细胞质中,这类受体中存在着广泛结合具有还原活性或小分子感应的辅基<sup>[11]</sup>。可溶性趋化受体中常见的结构域如图 1 所示。*Escherichia coli* 的可溶性受体 Aer 含有 FAD 辅基的 PAS 结构域传递<sup>[12]</sup>,并由此介导对氧和能量趋化的反应<sup>[13]</sup>。而在 *Helicobacter pylori* 的受体 TlpD 中首次发现

了 CZB 结构域<sup>[14]</sup>, TlpD 可以介导能量趋化<sup>[15]</sup>以及对酸碱度<sup>[16]</sup>和活性氧<sup>[17]</sup>的趋化。*Campylobacter jejuni*的可溶性受体 Tlp8 具有双 PAS 结构域,在引导 *C. jejuni* 向最佳能量区域前进时可抵消 CetA/B 趋化系统带来的影响<sup>[18]</sup>,可溶性受体 Tlp5 包含一个 FIST 结构域,能感应氨基酸信号<sup>[19]</sup>;另一个可溶性受体是 Tlp6,它具有 CZB 结构域,与 *H. pylori* TlpD 受体呈正相

关<sup>[14]</sup>。*Pseudomonas aeruginosa* 的可溶性受体 BdlA, 含有 2 个 PAS 结构域,可监测电子转运系统的氧化还原状态变化情况<sup>[20]</sup>。*Bacillus subtilis* 的可溶性受体 HemAT 含有原珠蛋白(proto globin)结构域,利用 HemAT 感知氧浓度变化,从而向有利环境游动<sup>[21]</sup>。

有关 *S. alikisoli* YIC4027 的趋化受体研究国内外鲜有报道。可溶性趋化受体 Tlp1 在 *S. alikisoli* 趋化系统中的作用还不清楚。因此,本文选择 YIC4027 中唯一一个含有 PAS 结构域的趋化受体基因 *tlp1* (GenBank 登录号: CP034909.1),利用基因敲除手段构建 Tlp1 突变株,通过与野生型的生理特性进行比较,研究 Tlp1 基因缺失对 YIC4027 趋化、趋氧能力、细胞凝结、生物膜的形成、胞外多糖(exopolysaccharide, EPS)以及在宿主根表的定殖及竞争性结瘤的调控作用。

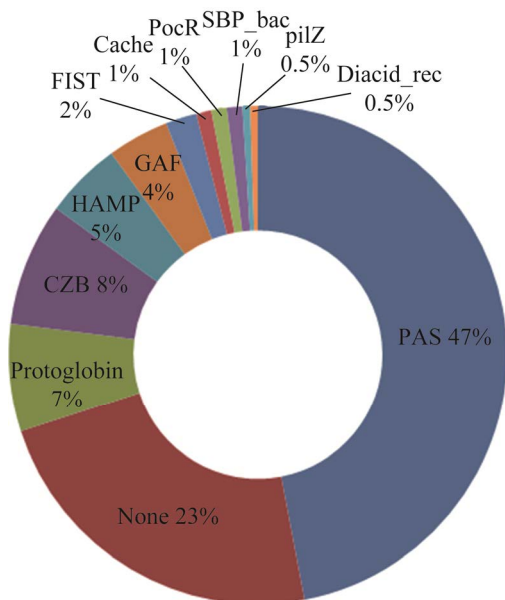


图 1 可溶性趋化受体常见的结构域<sup>[11]</sup>

Figure 1 Domains most commonly found in soluble chemoreceptors<sup>[11]</sup>.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和质粒

实验采用的菌株与质粒如表 1 所示。

#### 1.1.2 引物

实验所用的引物如表 2 所示。

表 1 实验采用的菌株和质粒

Table 1 Plasmids and bacterial strains used in this study

Strains and plasmids	Relevant characteristics	Source and reference
<b>Strains</b>		
<i>Sinorhizobium alikisoli</i> YIC4027	Wild type strain, Nal <sup>+</sup>	[22]
$\Delta$ <i>tlp1</i>	YIC4027 derivative, Nal <sup>+</sup>	This study
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	General cloning strain	Transgen
<b>Plasmids</b>		
pEASY blunt simple	The vector cloning PCR products, Kan <sup>+</sup>	TaKaRa
pK18 <i>mobSacB</i>	Suicide vector for gene deletion; <i>lacZ</i> <i>mob sacB</i> Kan <sup>+</sup>	[23]
pRK2013	Helper plasmid, carries <i>tra</i> genes, Kan <sup>+</sup>	[24]
pK18 <i>mobSacB</i> - $\Delta$ <i>tlp1</i>	pK18 <i>mobSacB</i> with 592 bp upstream fragment and 542 bp downstream fragment of <i>tlp1</i> cluster, Kan <sup>+</sup>	This study

Kan<sup>+</sup>: Kanamycin; Nal<sup>+</sup>: Nalidixic acid.

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primer names	Direction (5'→3')	Restriction enzyme cutting site
<i>tlp1</i> -up-F	CGGGATCCGATTGCATCCTCATCGACGACATC	<i>Bam</i> H I
<i>tlp1</i> -up-R	GAACAAGTCGCAGGCCATCATCGTCATGGCAAC	
<i>tlp1</i> -down-F	CCATGACGATGATGGCCTGCGACTTGTTCATCGC	
<i>tlp1</i> -down-R	CCCAAGCTTCCTTCCACACGTACAAAGATCGG	<i>Hind</i> III
<i>tlp1</i> -out-F	GACCAGGAGATCTTCGTCGAAATC	
<i>tlp1</i> -out-R	CAGACGAAGAACATGCTGGTGAG	

### 1.1.3 菌株培养条件

*S. alkalisoli* YIC4027 使用 TY<sup>[25]</sup>以及 L3<sup>[25]</sup>培养基, 30 °C 培养。大肠杆菌使用 LB<sup>[26]</sup>培养基, 37 °C 培养。实验所使用抗生素的工作浓度: 卡那霉素(kanamycin, Kan) 50 µg/mL, 萘啶酮酸(nalidixic acid, Nal) 25 µg/mL。

### 1.1.4 主要试剂与仪器

PCR 扩增仪以及凝胶成像系统(Bio-Rad)、超微量分光光度计 NanoDrop 2000c、低温高速离心机(D-37520 Osterode)、所用引物的合成来自北京睿博兴科生物技术有限公司。质粒提取、胶回收等试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。T4 连接酶、限制性内切酶购自 NEB 公司。DNA 样品的测序工作由睿博兴科生物技术有限公司完成。抗生素来自烟台鼎锐生物科技有限公司。

## 1.2 PAS 结构域蛋白序列比对

*S. alkalisoli* YIC4027 的全基因组序列已被注释<sup>[25]</sup>, 序列的数据来源为 NCBI (GenBank: LYBW00000000.1, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/LYBW00000000.1>), YIC4027 基因组中含 PAS 结构域蛋白质的查询利用 SMART 在线数据库(<http://smart.embl.de/>)和 MIST2 在线数据库([http://mistdb.com/genomes/GCF\\_001723275.1](http://mistdb.com/genomes/GCF_001723275.1))。PAS 结构域蛋白的序列比对使用 MAFFT 软件(<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server>)在线进行。

## 1.3 *tlp1* 缺失突变体的构建

YIC4027 基因组的提取使用天根基因组

DNA 提取试剂盒, 利用此模板进行上下游引物 *tlp1*-up-F/R 和 *tlp1*-down-F/R 的 PCR 扩增, 得到 592 bp 上游片段以及 542 bp 下游片段, 融合 PCR 连接 *tlp1*-up 和 *tlp1*-down 这 2 个片段。将融合片段连接到 pEASY, 筛选菌落, 测序验证。含载体 pK18*mobSacB* 的菌株以及测序结果正确的菌株提取质粒, 使用 Thermo 内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 进行酶切后用 T4 连接酶连接至 pK18*mobSacB*, 从而获得重组质粒。利用三亲接合的方法<sup>[27]</sup>构建缺失突变株, 将携带辅助质粒 pRK2013 的 *E. coli*、携带 pK18*mobSacB*:*tlp1*-up-down 质粒的 *E. coli* 以及野生型 YIC4027 按照比例 2:3:10 混合, 基于同源重组交换的原理进行 2 次交换, 实现无痕敲除<sup>[28]</sup>: 第 1 次交换时, 重组染色体带有 Kan 抗性且将其作为第 1 次筛选的标识; 第 2 次交换时, 目的菌株利用蔗糖敏感性进行筛选标识。然后利用 *tlp1*-out-F 和 *tlp1*-out-R 引物进行 PCR 验证, 同时用野生型 YIC4027 作为阳性对照, 最终结果正确的则是  $\Delta$ *tlp1* 突变体。

## 1.4 生长能力检测

首次在 TY 平板上活化野生型 YIC4027 以及突变株  $\Delta$ *tlp1*, 然后挑取活化好的菌株接种到至含 Nal 抗性的 5 mL TY 培养基中, 30 °C 摇培 20 h。在 50 mL 离心管中加入 10 mL TY 培养基和 200 µL 菌液, 使得菌液的起始  $OD_{600}$  为 0.02 左右。0–24 h, 每隔 2 h 测 1 次菌液  $OD_{600}$  值;

24–36 h, 每隔 3 h 测 1 次; 36–48 h, 每隔 6 h 测 1 次, 每组 3 次重复。

### 1.5 毛细管实验

趋化试验参考 Rudrappa 等的方法<sup>[29]</sup>。挑取野生型以及突变株  $\Delta tlp1$  菌落至含 NaI 抗性的 5 mL TY 培养基中, 摇培 20 h。用无抗性 TY 反复清洗 2–3 次去除残留培养基。然后用无抗性 TY 将菌液重悬并将菌液浓度  $OD_{600}$  调为 0.01。用无菌的 200  $\mu$ L 枪头吸取 100  $\mu$ L 处理好的重悬液, 用 4 cm-25 G 规格针头的 1 mL 注射器吸取 100  $\mu$ L 四叶一心田菁根系分泌物, 然后把注射器针头缓慢插入枪头, 静置于无菌的室温环境下 30 min, 采用稀释平板计数法将注射器中的样品涂在 TY 平板上, 置于 30  $^{\circ}$ C 培养箱培养 2 d, 利用菌落计数仪来计算菌落数(CFU), 每组 3 次重复。

### 1.6 趋氧能力检测

趋氧检测参考 Xie 等的方法<sup>[20]</sup>, 将活化好的菌株接种于 5 mL TY 培养基中摇培 20 h, 调  $OD_{600}=0.2$ , 载玻片中央滴 10  $\mu$ L 菌液后放置在特制小方盒内, 空气和氮气的气体流速维持在 800 mL/min。开空气阀门, 通气 2 min, 平衡液滴后关闭空气阀门。开氮气阀门, 通气 1–3 min, 关闭后打开空气阀门。利用 Cellsens Dimension 1.7 软件来记录菌株由不动状态变成运动状态的时间。

### 1.7 细胞凝结实验

在 50 mL 离心管中加入 10 mL L3+1/2 N 寡营养培养基, 然后分别取 200  $\mu$ L 菌液加入其中, 做 3 组平行, 竖直振荡培养, 分别培养 24 h 和 48 h 后进行细胞凝结的观察与测定。(1) 凝结量观察: 选择产生凝结量相对较多的 48 h 菌液, 将离心管中的样品倒入平板, 拍照, 进行凝结量的观察。(2) 凝结量测定: 取出 24 h 和 48 h 的培养物, 静置 30 min, 取上清菌液测定  $OD_{600}$  值, 记作  $OD_s$ , 再利用组织研磨器把上清以及沉淀混合研磨, 然后测定  $OD_{600}$  值, 记作  $OD_t$ , 每组 3

次平行。最后通过公式进行细胞凝结量的计算: % 凝结(% flocculation)=[ $(OD_t-OD_s) \times 100$ ]/ $OD_t$ 。

### 1.8 生物膜实验

生物膜实验参照 Barnard 等的方法<sup>[30]</sup>。(1) 生物膜观察: 使用 TY 培养基, 向含 1.5 mL 培养基的试管中加入菌液 150  $\mu$ L, 30  $^{\circ}$ C 竖直静置培养 3 d, 做 3 组平行。清洗后加入 0.1% 结晶紫溶液, 静置染色 30 min, 最后对生物膜进行拍照观察。(2) 生物膜测定: 将菌液 15  $\mu$ L 加入至含 150  $\mu$ L TY 培养基的无菌 PVC96 孔板, 做 5 次平行。密封后放置于 30  $^{\circ}$ C 培养箱培养 2 d, 0.1% 结晶紫染色, 静置 30 min。室温晾晒后加入 30% 乙酸溶液进行结晶紫的溶解, 最后通过酶标仪测  $OD_{540}$  处的吸光值。

### 1.9 EPS 实验

分别配置以丁二酸(10 mmol/L)、乳酸钠(10 mmol/L)、脯氨酸(10 mmol/L)为碳源, 含刚果红(40  $\mu$ g/mL)和不含刚果红的 L3+N 固体培养基, 将各菌液的  $OD_{600}$  调至 0.8, 各取 20  $\mu$ L 细菌悬浮液分别滴加至培养基上, 倒置于 37  $^{\circ}$ C 培养箱中培养 72 h, 做 3 次生物学重复。含刚果红平板的用于定性观察 EPS 的生成, 不含刚果红的培养基采用浓硫酸-萘酚氧化法进行胞外多糖的定量分析。

### 1.10 定殖实验

用浓硫酸浸泡普通田菁种子 30 min, 再用无菌水进行清洗, 然后把种子置于 30  $^{\circ}$ C 培养箱中培养 2 d, 其中每 12 h 更换 1 次无菌水。用事先处理好的菌液浸泡发芽的种子, 野生型与突变株按照 1:1、1:5、1:10 比例浸泡 2 h。将浸泡的种子取出, 利用双层钵体法种于蛭石盆中, 每盆放 2 个种子, 每个处理 3 个重复, 培养 8 d, 将根系取出, 清洗消毒后截取根系放入无菌 EP 管中, 加入 30  $\mu$ L 无菌水后捣碎划线于 TY 平板, 培养一段时间, 对平板上的菌落进行 PCR 验证, 计算突变体与野生型的比例。

### 1.11 竞争性结瘤实验

结瘤实验参照定殖实验, 后续放于 25 °C 人工气候室培养 30 d 左右。取成熟健康的瘤体经消毒处理后捣碎划线于 TY 平板, 30 °C 倒置培养, 对平板上的菌落进行 PCR 验证, 最后计算突变体与野生型的比例。

## 2 结果与分析

### 2.1 PAS 结构域的比对分析

PAS 结构域具有高度保守性, 且能与多种辅基结合, 其中与 FAD 辅基结合的 PAS 序列具有极高的相似性, 而且负责作用于 FAD 的色氨酸位点(Trp, W)保守性最高。有研究表明, *A. brasilense* 的可溶性趋化受体 AerC 与辅基 FAD 相结合, 可感受氧化还原过程, 将细菌的趋化运动行为和能量代谢相关联。因此我们将 YIC4027 中的 PAS 序列与 AerC 的 PAS 序列进行了比对, 发现趋化蛋白 Tlp1 的 2 个 PAS 序列与 AerC 的 PAS 序列具有较高的相似性, 最关键的色氨酸位点高度保守。因此可推测出这 2 个 PAS 结构域是与 FAD 相结合的。

### 2.2 突变株 $\Delta tlp1$ 的构建

筛选符合以下状态的菌落: 能在含 10% 蔗糖的 TY 平板生长、不能在含 Kan 的 TY 平板生长的菌落, 即为可能构建成功的  $\Delta tlp1$  突变株。再利用含有目的基因 *tlp1* 以及上下游片段的引物 *tlp1-out-F* 和 *tlp1-out-R* 进行菌落 PCR 验证, 在 YIC4027 中能够扩增出 3 850 bp 的完整片段, 其中目的基因的长度为 1 794 bp (图 2 泳道 1-4); 突变株由于目的基因的缺失, 因此缺失了 1 794 bp 的片段长度(图 2 泳道 6), 所以再次验证  $\Delta tlp1$  是构建成功的突变株。

### 2.3 Tlp1 对菌株生长的影响

我们利用 TY 培养基记录不同生长时期的  $OD_{600}$  值, 从而检测菌株的生长能力。野生型 YIC4027 与突变株  $\Delta tlp1$  的生长情况如图 3 所示。

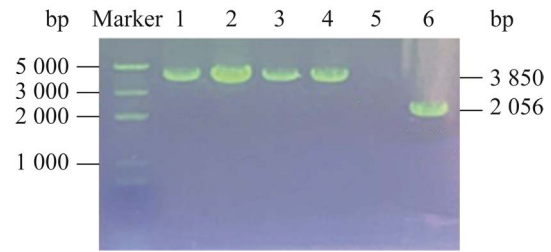


图 2 突变株的 PCR 验证

Figure 2 The mutant strain was verified by PCR. Lane 1-4: Wild type genomic DNA; Lane 5: Blank control; Lane 6: Mutant genomic DNA.

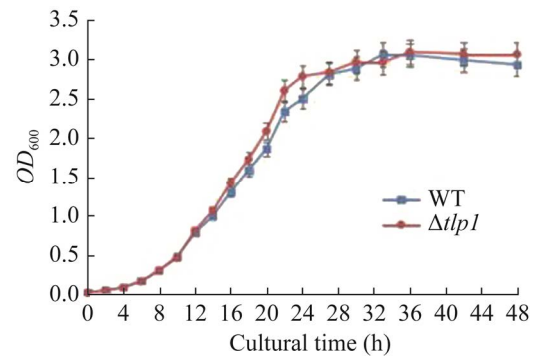


图 3 野生型与突变株的生长曲线

Figure 3 Growth curves of wild type and mutant.

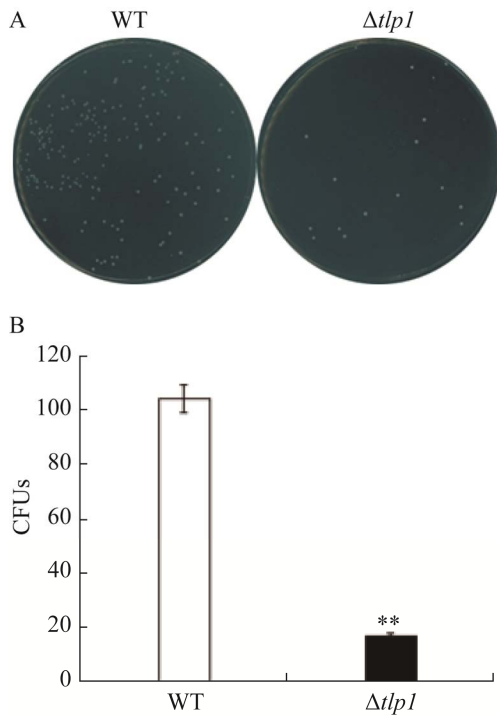
从结果来看, 突变株  $\Delta tlp1$  和野生型 YIC4027 的生长曲线基本一致, 表明趋化受体单基因的缺失对菌株的生长速率没有影响。

### 2.4 Tlp1 对趋化运动的影响

以其宿主田菁的分泌物作为趋化物, 毛细管趋化实验发现  $\Delta tlp1$  的菌落数(CFU)明显少于野生型 YIC4027 (图 4), 说明 Tlp1 具有调控趋化行为的能力。

### 2.5 Tlp1 对趋氧能力的影响

结果如表 3 所示, 野生型通氮气的反应时间在 62.0–67.4 s 之间, 突变株  $\Delta tlp1$  的反应时间在 50.5–54.7 s 之间; 通氧气后, 野生型的反应时间在 55.8–59 s 之间, 突变株  $\Delta tlp1$  的反应时间在 47.8–50.2 s 之间。2 种不同的通气环境下, 突变株  $\Delta tlp1$  的适应时间明显小于野生型 YIC4027, 可见 Tlp1 在氧气变化的过程中起重要作用。



**图 4** 突变株  $\Delta tlp1$  与野生型的趋化能力  
Figure 4 Mutant strain and wild type chemotaxis analysis. A: Capillary assay. B: The analysis of chemotaxis. \*\*:  $P < 0.01$ .

**表 3** Tlp1 在 YIC4027 中的作用

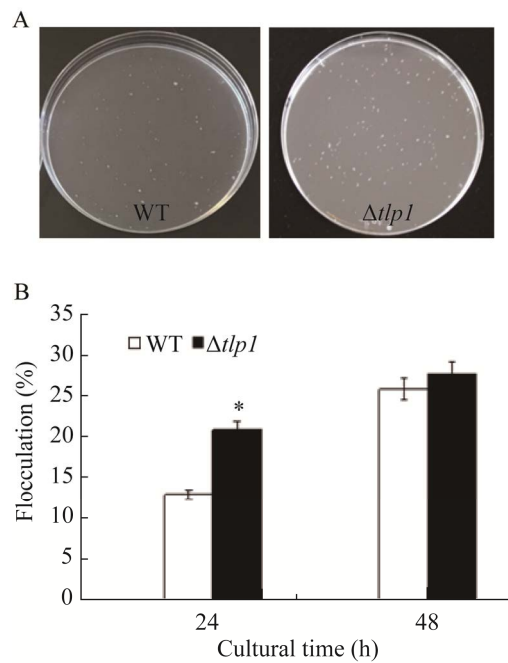
Strains	Response time in seconds to adaptation in a temporal assay for aerotaxis, $\pm$ SD	
	-air	+air
WT	64.7 $\pm$ 2.7	57.4 $\pm$ 1.6
$\Delta tlp1$	52.6 $\pm$ 2.1	49.0 $\pm$ 1.2

### 2.6 Tlp1 对细菌凝结能力的影响

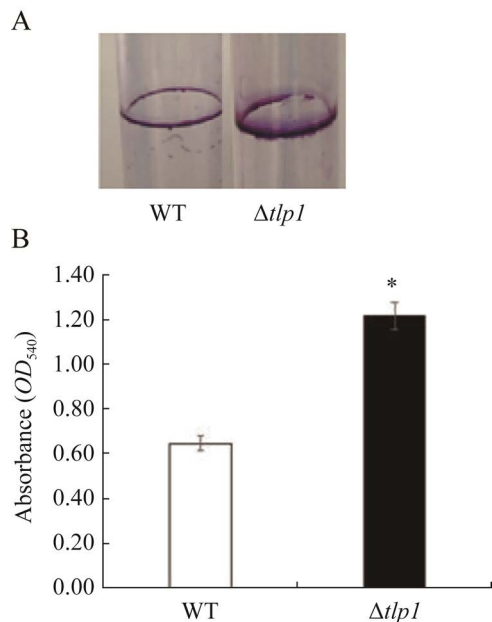
结果如图 5 所示,前期突变株的凝结量比野生型提高了 61.5%,到 48 h 后两者的凝结量差异不大,但随着时间的延长,因为生物量的增加,所以 48 h 的凝结量要高于 24 h,说明在凝结的前期 Tlp1 对胞外具有调控作用。

### 2.7 Tlp1 对生物膜形成的影响

试管培养的生物膜定性结果如图 6A 所示,突变株  $\Delta tlp1$  的生物膜产生量明显高于野生型。从 96 孔板的定量结果(图 6B)发现,与野生型相比,突变株  $\Delta tlp1$  的生物膜产量增加了 87.7%。



**图 5** 突变株  $\Delta tlp1$  与野生型凝结能力比较  
Figure 5 Comparison of flocculation results of two strains. A: Photographed after 24 hours of cultivation. B: Analysis of quantitative results of flocculation. \*:  $P < 0.05$ .



**图 6** 突变株  $\Delta tlp1$  与野生型生物膜形成能力  
Figure 6 Comparison of biofilm formation. A: Biofilm morphologies upon crystal violet staining of the WT and  $\Delta tlp1$ . B: Biofilm quantitative measurement results. \*:  $P < 0.05$ .

## 2.8 Tlp1 对 EPS 合成的影响

采用 3 种不同的碳源培养基进行了培养,不同碳源之间产生了较大的差异(图 7A),在乳酸钠培养基上的菌落染色最为明亮光滑且四周会有凸起,在脯氨酸培养基上的菌落染色最浅且比较干燥,丁二酸培养基上的菌落形态则介于二者之间。定量检测 EPS 含量进一步确定结果,如图 7B 所示。在以乳酸钠为碳源的培养基上,突变株 $\Delta tlp1$ 的 EPS 含量约为野生型的 2 倍。在以丁二酸与脯氨酸为碳源的培养基上,突变株 $\Delta tlp1$ 的 EPS 含量约为野生型的 1 倍,明显高于野生型。

## 2.9 定殖实验结果

将培养 8 d 的根系取出,捣碎后涂板,利用 *tlp1* 引物做 PCR 鉴定,对野生型以及突变体的定殖能力进行计算,结果如图 8 所示。突变株

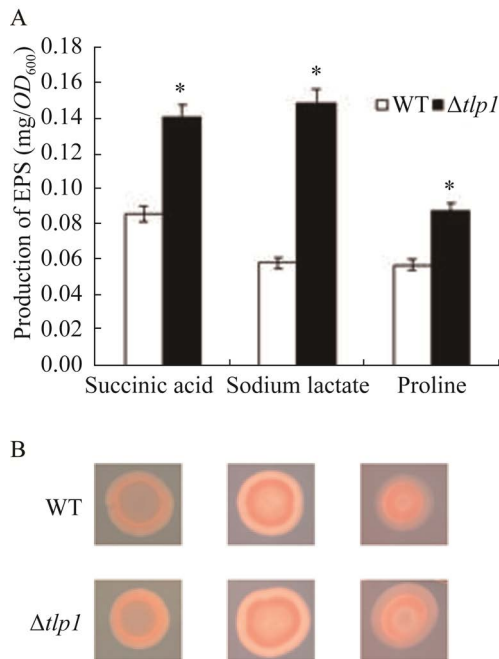


图 7 突变株  $\Delta tlp1$  与野生型 EPS 的形态及测定结果  
 Figure 7 Colony morphology and EPS determination of the two strains. A: Observation of colony morphology of two strains. B: The EPS quantitative analysis results. \*:  $P < 0.05$ .

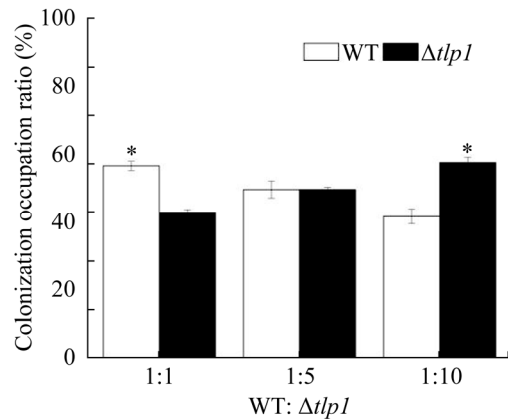


图 8 定殖能力测定

Figure 8 The tests of colonization. \*:  $P < 0.05$ .

$\Delta tlp1$  所占的比例分别是 43%、50%、58%。结果表明,与野生型相比,突变株 $\Delta tlp1$ 的定殖能力减弱,说明 *tlp1* 基因的缺失导致定殖能力减弱。

## 2.10 竞争性结瘤实验结果

取普通田菁上长势良好的瘤体,捣碎后涂板,利用基因 *tlp1* 内部引物做 PCR 鉴定,对野生型以及突变体的定殖能力进行计算,结果如图 9 所示。野生型及突变株 $\Delta tlp1$  比例为 1:1、1:5、1:10 时,  $\Delta tlp1$  的占比分别是 23%、35%、50%。结果表明,趋化受体基因 *tlp1* 的缺失,影响了菌株在田菁根部的竞争性结瘤能力。

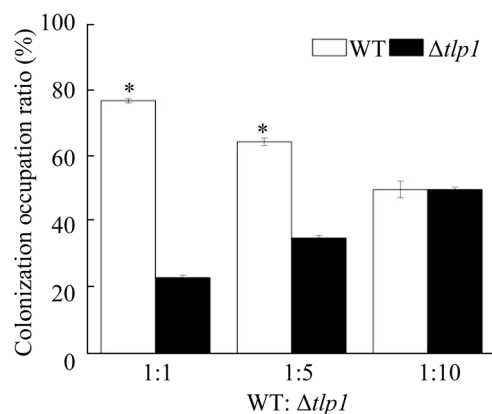


图 9 竞争结瘤能力的测定

Figure 9 Competitive nodulation tests. \*:  $P < 0.05$ .



### 3 讨论与结论

趋化受体可分为跨膜趋化受体和可溶性趋化受体 2 类。受体有一部分是位于细胞质内的。据 SMART 数据库统计, 8 384 个受体蛋白中, 14.5% 的蛋白缺乏跨膜部分, 游离于细胞质中, 此类受体称为可溶性受体<sup>[8]</sup>。可溶性受体介导的趋化作用在细菌种群的生态中起着十分重要的作用<sup>[31]</sup>, 包括子果体的形成<sup>[32]</sup>、介导胞内能量代谢<sup>[20]</sup>等。可溶性趋化受体以同源二聚体的形式存在并且可以形成反平行四螺旋束线圈相互作用<sup>[33]</sup>, 其在可溶性受体 Tsr 和 Tm1143c 的细胞质片段中均有发现<sup>[34-35]</sup>。Upadhyay 等<sup>[36]</sup>通过生信分析以及建模, 发现 PAS 结构域全部存在于细胞溶质内。这些趋化受体能监测各种基于细胞质的信号, 但是其中大多数仍有待确定<sup>[37]</sup>。在植物根际细菌中, 可溶性趋化受体的缺失会削弱细菌感应外界信号的能力, 与野生型菌株竞争能力的减弱<sup>[38]</sup>。与 YIC4027 相似性最高的 *S. meliloti* 中, McpY 缺失后在不同程度上导致对糖类、氨基酸等趋化作用的减弱<sup>[39]</sup>。在 *R. leguminosarum* 中, 缺失 McpB 导致趋化和竞争性结瘤的能力降低<sup>[40]</sup>。在 *A. brasilense* Sp7 中 Tlp1 的缺失导致趋化和根际定殖的能力降低<sup>[41]</sup>。

本研究表明, 在 YIC4027 中, Tlp1 基因的缺失并不影响菌株的正常生长, 对宿主普通田菁根系分泌物的趋化能力减弱, 感应氧的时间变短。此外, Tlp1 间接调控 EPS 的产量, 趋化受体感应信号变化后, 调节鞭毛运动<sup>[42]</sup>, 趋化运动能力减弱, 从而间接调控 EPS 的产量、细胞的凝结能力以及生物膜的形成。Tlp1 受体影响细菌的凝结, 生物膜以及 EPS 的产量, 这一现象说明在营养匮乏的环境下菌株自身能够提高适应力, 属于自我保护机制, 也是其内环境稳定的重要保证。趋化受体缺失后可能使细菌无法停

留在最佳氧气浓度位置, EPS 的增产可能成为此缺陷的一种补偿。由于产生了大量的 EPS, 定殖能力处于优势, 但随着时间的延长, 趋化运动受损产生的影响大于 EPS 的作用, 最终导致定殖能力下降, 结瘤能力降低。

### 参考文献

- [1] ZHENG YF, LIANG J, ZHAO DL, MENG C, XU ZC, XIE ZH, ZHANG CS. The root nodule microbiome of cultivated and wild halophytic legumes showed similar diversity but distinct community structure in Yellow River Delta saline soils[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(2): 207.
- [2] TIAN BY, ZHANG CJ, YE Y, WEN JM, WU YM, WANG HZ, LI HM, CAI SX, CAI WT, CHENG ZQ, LEI SN, MA RQ, LU CJ, CAO Y, XU XH, ZHANG KQ. Beneficial traits of bacterial endophytes belonging to the core communities of the tomato root microbiome[J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2017, 247: 149-156.
- [3] PORTER SL, ARMITAGE JP. Chemotaxis in *Rhodobacter sphaeroides* requires an atypical histidine protein kinase[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(52): 54573-54580.
- [4] LI Y, LI XY, LIU YJ, WANG ET, REN CG, LIU W, XU HL, WU HL, JIANG N, LI YZ, ZHANG XL, XIE ZH. Genetic diversity and community structure of rhizobia nodulating *Sesbania cannabina* in saline-alkaline soils[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2016, 39(3): 195-202.
- [5] KENNEDY EN, BARR SA, LIU XL, VASS LR, LIU YN, XIE ZH, BOURRET RB. *Azorhizobium caulinodans* chemotaxis is controlled by an unusual phosphorelay network[J]. *Journal of Bacteriology*, 2022, 204(2): e0052721.
- [6] FERNÁNDEZ M, MOREL B, CORRAL-LUGO A, KRELL T. Identification of a chemoreceptor that specifically mediates chemotaxis toward metabolizable purine derivatives[J]. *Molecular Microbiology*, 2016, 99(1): 34-42.
- [7] ORTEGA Á, ZHULIN IB, KRELL T. Sensory repertoire of bacterial chemoreceptors[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 2017, 81(4): e00033-e00017.
- [8] LACAL J, GARCÍA-FONTANA C, MUÑOZ-MARTÍNEZ F, RAMOS JL, KRELL T.

- Sensing of environmental signals: classification of chemoreceptors according to the size of their ligand binding regions[J]. *Environmental Microbiology*, 2010, 12(11): 2873-2884.
- [9] KANEKO T, MINAMISAWA K, ISAWA T, NAKATSUKASA H, MITSUI H, KAWAHARADA Y, NAKAMURA Y, WATANABE A, KAWASHIMA K, ONO A, SHIMIZU Y, TAKAHASHI C, MINAMI C, FUJISHIRO T, KOHARA M, KATOH M, NAKAZAKI N, NAKAYAMA S, YAMADA M, TABATA S, SATO S. Complete genomic structure of the cultivated rice endophyte *Azospirillum* sp. B510[J]. *DNA Research*, 2010, 17(1): 37-50.
- [10] ALEXANDRE G, GREER-PHILLIPS S, ZHULIN IB. Ecological role of energy taxis in microorganisms[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2004, 28(1): 113-126.
- [11] 姜南, 刘卫, 李岩, 解志红. 茎瘤固氮根瘤菌趋化系统基因的比较基因组学分析及相关蛋白序列分析[J]. *微生物学报*, 2016(8): 1256-1265. Jiang N, Liu W, Li Y, XIE ZH. Comparative genomic and protein sequence analyses of the chemotaxis system of *Azorhizobium caulinodans*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016(8): 1256-1265.
- [12] BIBIKOV SI, BIRAN R, RUDD KE, PARKINSON JS. A signal transducer for aerotaxis in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179(12): 4075-4079.
- [13] GREER-PHILLIPS SE, ALEXANDRE G, TAYLOR BL, ZHULIN IB. Aer and Tsr guide *Escherichia coli* in spatial gradients of oxidizable substrates[J]. *Microbiology: Reading, England*, 2003, 149(Pt 9): 2661-2667.
- [14] DRAPER J, KARPLUS K, OTTEMANN KM. Identification of a chemoreceptor zinc-binding domain common to cytoplasmic bacterial chemoreceptors[J]. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(17): 4338-4345.
- [15] SCHWEINITZER T, MIZOTE T, ISHIKAWA N, DUDNIK A, INATSU S, SCHREIBER S, SUERBAUM S, AIZAWA SI, JOSENHANS C. Functional characterization and mutagenesis of the proposed behavioral sensor TlpD of *Helicobacter pylori*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(9): 3244-3255.
- [16] COLLINS KD, ANDERMANN TM, DRAPER J, SANDERS L, WILLIAMS SM, ARAGHI C, OTTEMANN KM. The *Helicobacter pylori* CZB cytoplasmic chemoreceptor TlpD forms an autonomous polar chemotaxis signaling complex that mediates a tactic response to oxidative stress[J]. *Journal of Bacteriology*, 2016, 198(11): 1563-1575.
- [17] HUANG JY, GOERS SWEENEY E, GUILLEMIN K, AMIEVA MR. Multiple acid sensors control *Helicobacter pylori* colonization of the stomach[J]. *PLoS Pathogens*, 2017, 13(1): e1006118.
- [18] REUTER M, VAN VLIET AHM. Signal balancing by the CetABC and CetZ chemoreceptors controls energy taxis in *Campylobacter jejuni*[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e54390.
- [19] BORZIAK K, ZHULIN IB. FIST: a sensory domain for diverse signal transduction pathways in prokaryotes and ubiquitin signaling in eukaryotes[J]. *Bioinformatics: Oxford, England*, 2007, 23(19): 2518-2521.
- [20] XIE ZH, ULRICH LE, ZHULIN IB, ALEXANDRE G. PAS domain containing chemoreceptor couples dynamic changes in metabolism with chemotaxis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(5): 2235-2240.
- [21] HOU SB, LARSEN RW, BOUDKO D, RILEY CW, KARATAN E, ZIMMER M, ORDAL GW, ALAM M. Myoglobin-like aerotaxis transducers in archaea and bacteria[J]. *Nature*, 2000, 403(6769): 540-544.
- [22] LI Y, YAN J, YU B, WANG ET, LI XY, YAN H, LIU W, XIE ZH. *Ensifer alikalisoli* sp. nov. isolated from root nodules of *Sesbania cannabina* grown in saline-alkaline soils[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2016, 66(12): 5294-5300.
- [23] MARX CJ, LIDSTROM ME. Broad-host-range cre-lox system for antibiotic marker recycling in gram-negative bacteria[J]. *BioTechniques*, 2002, 33(5): 1062-1067.
- [24] FIGURSKI DH, HELINSKI DR. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1979, 76(4): 1648-1652.
- [25] DANG XX, XIE ZH, LIU W, SUN Y, LIU XL, ZHU YQ, STAEHELIN C. The genome of *Ensifer alikalisoli* YIC4027 provides insights for host specificity and environmental adaptations[J]. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 643.
- [26] DELANNOY S, BEUTIN L, BURGOS Y, FACH P. Specific detection of enteroaggregative hemorrhagic *Escherichia coli* O104: H4 strains by use of the CRISPR locus as a target for a diagnostic real-time PCR[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2012, 50(11): 3485-3492.

- [27] 李岩. *Sinorhizobium* sp. NGR234 的广宿主适应机制研究[D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2013.  
LI Y. The mechanism underlying Broad-host-range Adaptation of *Sinorhizobium* sp. NGR234[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of China Agricultural University, 2013 (in Chinese).
- [28] 谭延振. 谷氨酸棒状杆菌基因敲除系统的构建[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2012.  
TAN YZ. Construction of gene deletion systems in *Corynebacterium glutamicum*[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2012 (in Chinese).
- [29] RUDRAPPA T, SPLAINE RE, BIEDRZYCKI ML, BAIS HP. Cyanogenic pseudomonads influence multitrophic interactions in the rhizosphere[J]. *PLoS One*, 2008, 3(4): e2073.
- [30] BARNARD AML, SIMPSON NJL, LILLEY KS, SALMOND GPC. Mutations in *rpsL* that confer streptomycin resistance show pleiotropic effects on virulence and the production of a carbapenem antibiotic in *Erwinia carotovora*[J]. *Microbiology: Reading, England*, 2010, 156(Pt 4): 1030-1039.
- [31] LIU W, BAI X, LI Y, MIN J, KONG YC, HU XK. CheY1 and CheY2 of *Azorhizobium caulinodans* ORS571 regulate chemotaxis and competitive colonization with the host plant[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(15): e00599-e00520.
- [32] ZUSMAN DR, SCOTT AE, YANG ZM, KIRBY JR. Chemosensory pathways, motility and development in *Myxococcus xanthus*[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2007, 5(11): 862-872.
- [33] POLLARD AM, BILWES AM, CRANE BR. The structure of a soluble chemoreceptor suggests a mechanism for propagating conformational signals[J]. *Biochemistry*, 2009, 48(9): 1936-1944.
- [34] PARK SY, BORBAT PP, GONZALEZ-BONET G, BHATNAGAR J, POLLARD AM, FREED JH, BILWES AM, CRANE BR. Reconstruction of the chemotaxis receptor-kinase assembly[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2006, 13(5): 400-407.
- [35] KIM KK, YOKOTA H, KIM SH. Four-helical-bundle structure of the cytoplasmic domain of a serine chemotaxis receptor[J]. *Nature*, 1999, 400(6746): 787-792.
- [36] UPADHYAY AA, FLEETWOOD AD, ADEBALI O, FINN RD, ZHULIN IB. Cache domains that are homologous to, but different from PAS domains comprise the largest superfamily of extracellular sensors in prokaryotes[J]. *PLoS Computational Biology*, 2016, 12(4): e1004862.
- [37] COLLINS KD, LACAL J, OTTEMANN KM. Internal sense of direction: sensing and signaling from cytoplasmic chemoreceptors[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 2014, 78(4): 672-684.
- [38] LIU XL, LIU W, SUN Y, XIA CL, ELMERICH C, XIE ZH. A *cheZ*-like gene in *Azorhizobium caulinodans* is a key gene in the control of chemotaxis and colonization of the host plant[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(3): e01827-e01817.
- [39] MEIER VM, MUSCHLER P, SCHARF BE. Functional analysis of nine putative chemoreceptor proteins in *Sinorhizobium meliloti*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(5): 1816-1826.
- [40] YOST CK, ROCHEPEAU P, HYNES MF. *Rhizobium leguminosarum* contains a group of genes that appear to code for methyl-accepting chemotaxis proteins[J]. *Microbiology: Reading, England*, 1998, 144(Pt 7): 1945-1956.
- [41] GREER-PHILLIPS SE, STEPHENS BB, ALEXANDRE G. An energy taxis transducer promotes root colonization by *Azospirillum brasilense*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(19): 6595-6604.
- [42] 姜南. 茎瘤固氮根瘤菌(*Azorhizobium caulinodans* ORS571)可溶性趋化受体的功能研究[D]. 烟台: 中国科学院烟台海岸带研究所博士学位论文, 2016.  
JIANG N. Characterization of the soluble chemoreceptors in *Azorhizobium caulinodans* ORS571[D]. Yantai: Doctoral Dissertation of Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, 2016 (in Chinese).