



华癸中慢生根瘤菌 7653R *MCHK-3535* 基因在自生和与紫云英共生中的功能

于艳霞, 侣再勇, 曾小波, 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】探究 *Mesorhizobium huakuii* 7653R *MCHK-3535* 基因在共生固氮中的功能。【方法】构建 *MCHK-3535* 插入失活突变体、超表达和互补菌株, 对其进行共生表型鉴定; 并测定各菌株的生长曲线、运动性及生物膜形成; 利用 qRT-PCR 方法和组织表达定位分析 *MCHK-3535* 在共生过程中的时空表达特征。【结果】与野生型 7653R 相比, 突变体 $\Delta 3535$ 达到稳定期的生物量增加, 运动性下降, 生物膜形成增加。此外, *MCHK-3535* 基因的失活会显著提高紫云英固氮能力和植物地上部分鲜重, 但不影响根瘤数量及重量; 且互补菌株 *C3535* 能部分回补到野生型性状, 超表达菌株 *OV3535* 均无显著性差异; qRT-PCR 和启动子组织表达定位发现, *MCHK-3535* 基因主要在根瘤的侵染区、过渡区及固氮区表达, 并且表达持续整个固氮期。【结论】*MCHK-3535* 基因在自生及与紫云英共生过程中发挥重要功能, 参与根瘤的正常发育并负向调控固氮酶活性。

关键词: 生物固氮, 华癸中慢生根瘤菌 7653R, 共生表型, 时空表达

华癸中慢生根瘤菌 7653R (*Mesorhizobium huakuii* 7653R) 属于 α -变形菌纲, 是一种窄宿主范围根瘤菌, 豆科植物对人类社会是必不可少的, 它们提供了重要的燃料、纤维素和富含蛋白的食物。在自然界中, 根瘤菌可与豆科植物紫云英 (*Astragalus sinicus*) 建立共生固氮关系, 根瘤菌把空气中的氮气转化为植物可以利用的氨, 弥补土壤中的低氮环境^[1], 同时, 植物为根瘤菌提供生活所必需的碳源^[2], 根瘤菌-豆科植物共生固氮体系

每年大约固定 2 亿 t 的氮元素^[3], 解决了氮肥过量使用所导致的一系列环境污染问题^[4]。植物能感应周边环境的变化, 在植物营养缺乏时, 在根际周围分泌类黄酮, 根瘤菌吸附在根毛细胞顶端, 从而形成共生固氮关系^[5-7]。

环二鸟苷酸(c-di-GMP)是广泛存在于细菌中的第二信使分子^[8], 在生物膜的形成、胞外多糖的合成、III 型分泌系统及致病因子调控中发挥重要作用。在 *Rhizobium etli* 和 *R. leguminosarum* 中,

基金项目: 国家自然科学基金(31670243, 31772401); 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: 2018-04-27; 修回日期: 2018-05-22; 网络出版日期: 2018-05-26

异源表达 DGCs 时,胞内 c-di-GMP 浓度升高,导致 EPS 产量、生物膜形成及根瘤菌附着到植物根部能力均增加,运动性降低^[9]。此外,c-di-GMP 可能在根瘤菌和植物共生过程中发挥调节作用^[10]。细胞内存在两种与 c-di-GMP 合成与降解相关的酶,他们分别是二鸟苷酸环化酶(DGCs)和磷酸二酯酶(PDE)。DGCs 通常含有 GGDEF 结构域,能把 2 分子 GTP 转化为 1 分子的 c-di-GMP; PDE 含有 EAL 或者 HD-GYP 结构域,可将 c-di-GMP 降解为 GMP 或者 pGpG^[11]。胞内存在多种响应 c-di-GMP 浓度变化的效应蛋白,包括含有 PilZ 或 GIL 结构域的蛋白、退化的 GGDEF 结构域、核糖体开关等^[12-16],从而调控下游基因的表达,影响细胞生命进程^[17]。

在大豆慢生型根瘤菌 *Bradyrhizobium japonicum* 基因组中存在 55 个与 c-di-GMP 信号相关蛋白,苜蓿中慢生根瘤菌 *S. meliloti* Rm1021 中含有 20 个 c-di-GMP 信号蛋白^[18],本室前期研究表明,在 *Mesorhizobium huakuii* 7653R 中存在 36 个与 c-di-GMP 信号相关蛋白,预测它们可能具有 DGC、PDE 活性,参与 c-di-GMP 的代谢过程^[19]。

在共生条件下,7653R *MCHK-3535* 基因上调表达 10 倍,因此本实验为探究 7653R *MCHK-3535* 基因在共生固氮过程中的功能,分别构建了 7653R *MCHK-3535* 基因突变体(Δ 3535)、超表达(*OV3535*)和互补菌株(*C3535*),研究各菌株在自生及共生条件下的功能。

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(*Mesorhizobium huakuii* 7653R)采用 TY 培养基,筛选突变体时采用 AMS 培养基,培养条件是 28 °C;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: 紫云英(*Astragalus sinicus*)种子是信紫一号,购自河南省信阳市。

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 TaRaKa 公司,PCR 反应相关试剂、琼脂糖凝胶电泳 Marker 购自东盛公司;

表 1. 本实验室所用菌株和质粒

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strains/Plasmids	Functions/Antibiotics	Source
<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
<i>M. huakuii</i> 7653R	Wide type of <i>Mesorhizobium huakuii</i> , Str ^r	This lab
Δ 3535	In frame deletion of <i>MCHK-3535</i> from 7653R, kan ^r	This study
<i>OV3535</i>	7653R pBBR1MCS5- <i>MCHK-3535</i> , Gm ^r	This study
<i>C3535</i>	7653R Δ MCHK-3535pBBR1MCS5- <i>MCHK-3535</i> , Gm ^r	This study
pMD19-T (simple)	TA cloning vector, Amp ^r	TaKaRa
pK19 mob	Mutant strains construction vector, Kan ^r	This lab
pK19- <i>MCHK-3535</i>	pK19 plasmid containing <i>MCHK-3535</i> gene fragment, Kan ^r	This study
pRG960	Promoter expression vector, Spe ^r	This lab
pRG960-P _{MCHK-3535}	pRG960 vector containing the promoter of <i>MCHK-3535</i> , Spe ^r	This study

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 的测序工作由武汉天一辉远有限公司进行; 荧光定量 PCR 仪为 ABI Step One, 气相色谱仪 GC4000A。

1.1.4 引物: 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

利用 NCBI 网站查找目的基因序列, 然后通过 identify Conserved Domain 网页分析靶蛋白的保守结构域并预测靶蛋白的功能; 通过 BLAST 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

紫云英种子经表面消毒灭菌后, 平铺于素琼脂平板上, 置于 22 °C 光照室培养 3 d, 将紫云英幼苗移栽到无菌沙子中, 待幼苗长出第一片真叶时, 接菌华癸中慢生根瘤菌 7653R, 分别收取接菌后 12、15、20、25、30、35、40、45、50 d 的根瘤组织, 抽提以上各组根瘤及自生条件下 7653R

中的 RNA, 并反转录成 cDNA, 以得到的 cDNA 为模板, 以 *rnpB* 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 $\Delta\Delta C_T$ 值的方法。

1.4 启动子组织表达定位分析

1.4.1 MCHK-3535 启动子-GUS 融合表达载体的构建: 从 NCBI 数据库获取 MCHK-3535 启动子序列, 以 7653R 总 DNA 为模板, 经引物 MCHK-3535-P-F/R PCR 扩增目的片段, 经连接到 pMD19-T (simple)、测序、酶连等步骤, 将目的片段连接到载体 pRG960, 构建融合表达载体 pRG960-MCHK-3535, 再电转化到宿主菌 7653R。

1.4.2 GUS 染色显微观察: 挑选紫云英种子, 表面灭菌后, 平铺于素琼脂平板, 22 °C 光照培养 2 d, 将紫云英幼苗移植于无菌沙中, 待长出第一片真叶时, 接菌 7653R (pRG960-MCHK-3535), 分别收取接菌 3、7、9、14、21、28 d 的植物根部组织, GUS 染色 3–4 h 后, 在显微镜下观察并拍照。

表 2. 研究所用引物

Table 2. PCR primer used in this study

Primers	Sequences (5'→3')	Restriction sites
MCHK-3535-F	GCCTCAAGCGGTTCTACTACG	<i>Hind</i> III
MCHK-3535-R	CCGGAATTCGCGGTGCGGACGTTCTTCT	<i>Eco</i> R I
MCHK-3535-y-F	CCGCATCCGGTCCAAAC	
MCHK-3535-y-R	CCGATCTTGAATAGACGCTTT	
MCHK-3535-ORF-F	CCCAAGCTTTCGGATCCATTTGATTCTC	<i>Eco</i> R I
MCHK-3535-ORF-R	GGAATTCCTATGCTTGCGTTTCGC	<i>Bam</i> H I
MCHK-3535-p-F	AACTGCAGGTGAATGCAGGTTGGATGGA	<i>Pst</i> I
MCHK-3535-p-R	GGAATTCTCATGAAGTCCGCCCGG	<i>Eco</i> R I
MCHK-3535-q-F	CACAACCTGCACGCTATTACGG	
MCHK-3535-q-R	GCGGTGCGGACGTTCTTCT	
M13-F	GAGCGGATAACAATTTACACAGG	
M13-R	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	

1.5 MCHK-3535 基因缺失突变体、超表达及互补菌株的构建

1.5.1 Δ 3535 突变体的筛选与鉴定: 利用 pK19 mob 单交换插入失活的方法^[20], 构建 MCHK-3535 基因缺失突变体。以 7653R 基因组 DNA 为模板, 采用 MCHK-3535 F/R 引物, 扩增 MCHK-3535 同源交换臂, 将产物连接到载体 pMD19-T (simple), 测序正确后经过双酶切后与消化的 pK19 载体连接, 得到质粒 pK19-MCHK-3535; 转化 *E. coli* S17-1, 经两亲本结合转移, 稀释涂布于 AMS+Str+Neo 平板上, 经引物 MCHK-3535-y-F/R 及 M13F/R 筛选转化子, 进行 PCR 验证突变体。

1.5.2 超表达 OV3535 及互补 C3535 菌株的构建: 以华癸根瘤菌 7653R 基因组 DNA 为模板, 用 MCHK-3535-ORF-F/R 引物, 扩增得到 MCHK-3535 基因完整的开放阅读框, 经酶切回收后与同样双酶切的载体 pBBR1MCS-5 酶连, 构建重组表达载体 pBBR5-MCHK-3535, 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 7653R 及突变体 7653R Δ MCHK-3535 中, 稀释涂布于含有相应抗性的平板上, 倒置于 28 °C 培养箱中, 培养 3-4 d 后, 以 M13-F/R 为引物, PCR 验证阳性转化子。

1.6 植物盆栽实验

挑选紫云英种子, 表面灭菌后平铺于素琼脂平板上, 置于 22 °C 光照培养箱中倒置培养 2 d, 将幼苗移植到无菌沙子中, 待紫云英长出第一片真叶时, 分别接野生型 7653R、突变体菌株 Δ 3535、超表达菌株 OV3535 及互补菌株 C3535, 以不接菌为空白对照, 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变化。

1.7 细菌生长曲线、运动性及生物膜生成的测定

平板活化野生型 7653R、突变体 Δ 3535、超表达 OV3535、互补菌株 C3535, 接菌于含有 TY 培养基的 PA 瓶中, 28 °C 摇床振荡培养 2-3 d 后, 按 1% 接种量转接到含 50 mL TY 培养基中, 28 °C、200 r/min 摇菌, 每 4 h 取样检测, 测定 λ_{600} 处的 OD 值, 记录数据并作图分析。

运动性检测方法参考文献[21]。当菌液 OD₆₀₀ 约为 0.5 时, 取 2 μ L 菌液点板于 20% TY 半固体培养基(含 0.3% 琼脂), 每次作 3 个重复, 将平板置于 28 °C 培养箱培养 3 d, 对平板拍照记录, 图像处理软件 GIMP version 2 测量运动圈直径。

生物膜形成检测方法参考文献[22]。测定菌液浓度, 用 30% MM 培养基稀释 OD 值至 0.2, 取 100 μ L 接种于聚乙烯材质的 96 孔板中, 28 °C 静置培养 3 d。弃培养液并用 ddH₂O 清洗 2 遍, 缓慢加入 1% 200 μ L 结晶紫溶液, 静置 30 min 后弃上清, 用去离子水冲洗 3 次 96 孔板洗去未结合生物膜的结晶紫溶液。加 100 μ L 的 80% 无水乙醇-20% 丙酮溶解, 测定 A₅₇₀, 计算比值 A₅₇₀/OD₆₀₀。

2 结果和分析

2.1 生物信息学分析

生物信息学分析表明, MCHK-3535 基因全长 1542 bp, 编码 513 个氨基酸, 包含 HD-GYP、HTH-LuxR 和 DUF3391 三个结构域(图 1)。其中 HD-GYP 结构域属于 II 型 c-di-GMP 磷酸水解酶, 主要参与 c-di-GMP 的降解; HTH-luxR 结构域属于转录调控因子, 两者均可以调控毒性因子合成, 在细菌与植物的共生或联合共生中起到重要作用; DUF3391 超家族目前功能未知。

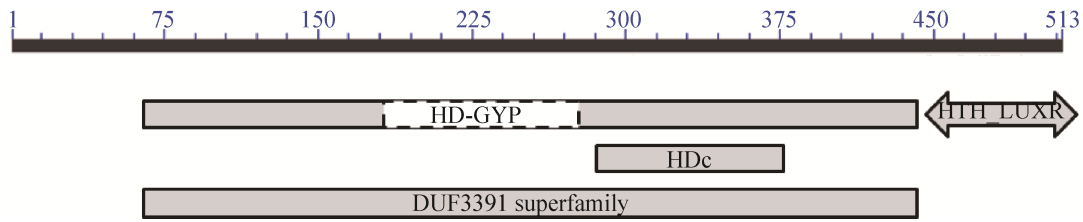


图 1. MCHK-3535 蛋白保守结构域分析

Figure 1. Putative conserved domains of MCHK-3535 protein.

分别用 BLASTp 和 BLASTn 检索, 我们发现 MCHK-3535 的同源蛋白几乎只存在于中慢生根瘤菌(*Mesorhizobium*)中, 且相似度较高(>90%), 但没有检索到该同源蛋白在其他根瘤菌属中的存在。同时, 结果显示, 该同源蛋白在大量非根瘤菌中存在, 但相似度较低(<40%), 如 *Streptacidiphilus jeojiense* 和 *Rhodococcus aetherivorans* 等。这些同源蛋白都标注为含 HD-GYP 结构域蛋白(HD domain-containing protein)。

利用 MEGA 7.0 软件构建系统进化树(图 2), 结果显示, MCHK-3535 的同源蛋白分为两簇, 一簇

为相似度较高的中慢生根瘤菌属(*Mesorhizobium*), 且与百脉根根瘤菌的同源关系最近; 另一簇为相似度较低的非根瘤菌属。因此, MCHK-3535 同源蛋白在中慢生根瘤菌中保守性较高。

2.2 根瘤发育过程中的基因动态表达特征

由图 3 可知, 7653R MCHK-3535 基因在固氮时期均可表达, 其中在 25 d 表达量最高, 是自生条件的 16 倍, 这与前期转录组数据是一致的, 随后表达量逐渐下降, 并趋于稳定。说明 MCHK-3535 基因在共生固氮的过程中发挥重要功能。

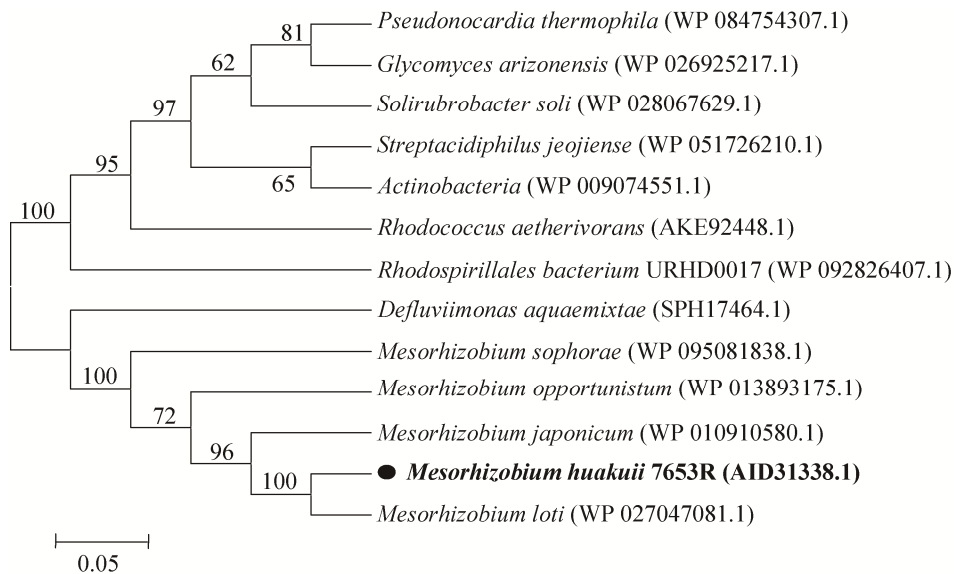


图 2. MCHK-3535 同源蛋白的系统发育进化树

Figure 2. Neighbour-joining phylogenetic tree of MCHK-3535 homologue proteins. 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.

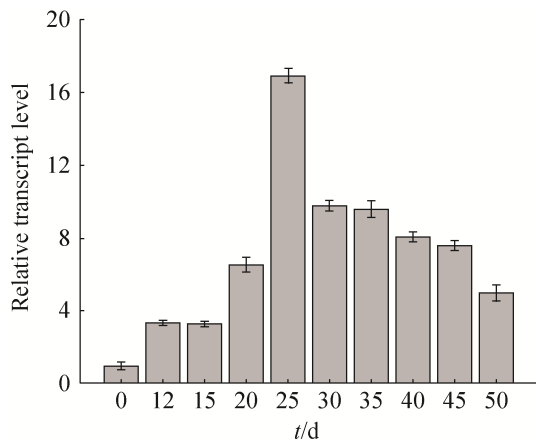


图3. 7653R *MCHK-3535* 基因自生及共生不同时期动态表达

Figure 3. Transcript expression level during different periods. Data presented are means±standard deviations of three independent experiments.

2.3 *MCHK-3535* 基因启动子组织表达定位

从 NCBI 中得到 *MCHK-3535* 基因的启动子序列, 构建启动子融合载体。将启动子融合载体电转入 7653R 感受态中, 获得菌株 7653R (pRG-960-*MCHK-3535*)。种紫云英植物盆栽, 接菌 7653R (pRG-960-*MCHK-3535*), 分别取不同接菌天数

的植物根部, GUS 染色, 染色 3–5 h, 显微观察 (图 4)。结果显示: *MCHK-3535* 基因在早期侵染过程不表达 (图片未展示), 在第 7 天根瘤中开始少量表达, 第 9 天后开始大量表达, 在根瘤的侵染区、过渡区及固氮区均可观察到较高的 GUS 酶活性, 表达持续整个固氮期, 与同源基因表达谱预测结果相一致。

2.4 共生固氮表型检测和分析

为了研究 7653R *MCHK-3535* 基因对共生固氮是否有影响, 本文构建了 *MCHK-3535* 基因单交换插入突变体 7653RΔ*MCHK-3535*, 同时构建了超表达 *OV3535* 及互补 *C3535* 菌株, 并考察各菌株与紫云英的共生表型。结果表明 (图 5), 空白对照 (不接菌) 植物叶片黄色、长势矮小, 接菌野生型 7653R 的紫云英叶片发绿、长势正常、根瘤粉红色, 接种突变体的紫云英植株长势较高, 叶片绿色, 根瘤为粉红色、较大且有畸形现象, 接种超表达的紫云英与野生型相比长势无明显差异, 接种互补菌株的紫云英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。

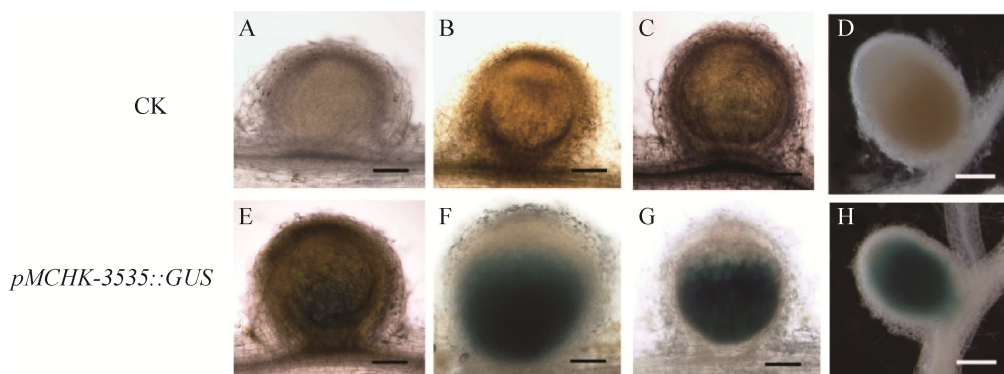


图4. *MCHK-3535* 启动子组织表达定位分析

Figure 4. Spatial pattern of *MCHK-3535* gene expression in nodules. A and E: nodules of 7 d for GUS staining observation; B and F: nodules of 9 d for GUS staining observation; C and G: nodules of 15 d for GUS staining observation; D and H: nodules of 28 d for GUS staining observation. D and H: Bar=500 μm; A–C, E–G: Bar=50 μm.



图 5. 植物盆栽共生表型

Figure 5. Symbiotic phenotype induced by strains tested on *Astragalus sinicus*. A, B, C: from left to right are plants inoculated with CK, 7653R, Δ3535, OV3535 and C3535.

分别统计野生型、突变体、超表达及互补菌植物的地上部分鲜重、根瘤数量、根瘤重量及固氮酶活。由表 3 可知, 与野生型 7653R 植株相比, 突变体植株地上部分鲜重及固氮酶活性显著性升高($P < 0.05$, $n=9$), 根瘤数量及重量没有明显变化; 超表达与野生型相比没有显著性差异, 互补菌株

各数据介于野生型和突变体之间, 可部分恢复至野生型性状。

2.5 MCHK-3535 基因对细胞生长及生物膜形成的影响

根据文献[20], 本文分别测定了 7653R、Δ3535、OV3535 和 C3535 菌株的生长曲线、运动性及生物

表 3. *M. huakuii* MCHK-3535 基因共生表型

Table 3. Symbiotic phenotype of *M. huakuii* MCHK-3535 gene

Strains	Fresh weight of plant/(g/plant)	Number of nodules/plant	Fresh weight of nodules/(g/plant)	Nitrogen fixation activity/[$\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{h})$]
CK	0.123c \pm 0.090	0	0	0
7653R	0.561b \pm 0.035	27.780b \pm 3.901	0.039b \pm 0.006	15.650b \pm 0.869
Δ3535	0.682a \pm 0.060	22.778b \pm 3.150	0.0373b \pm 0.003	23.460a \pm 0.798
OV3535	0.522b \pm 0.110	28.789b \pm 2.030	0.031a \pm 0.002	15.660b \pm 1.265
C3535	0.561b \pm 0.110	31.667b \pm 2.080	0.035b \pm 0.004	16.560b \pm 1.747

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

膜生成,来探究 *MCHK-3535* 基因对菌自身生长是否有影响,相对于野生型 7653R,生长曲线测定结果表明(图 6), $\Delta 3535$ 在约 40 h 后进入对数生长期,生长速度略快,在稳定期的生物量增加了约 30%,而超表达及互补菌株的生物量则无明显变化(前期生长速度略慢,可能是加入了抗生素的影响),说明 *MCHK-3535* 基因突变提高了菌株自身的生长速率;生物膜及运动性测定结果表明(图 7

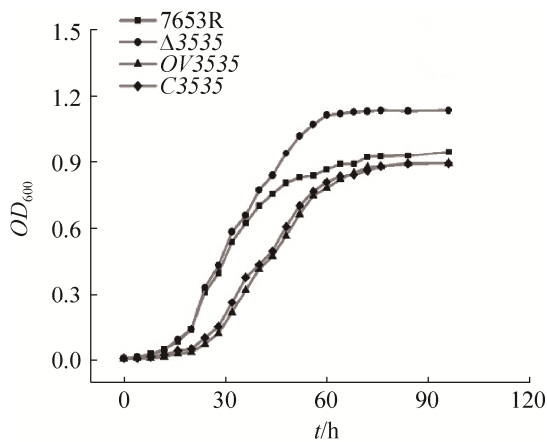
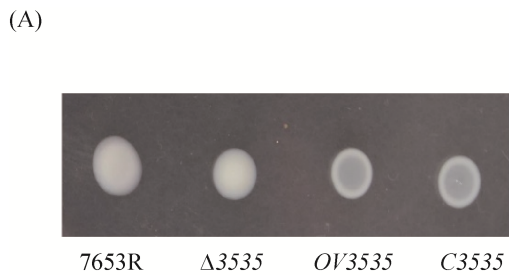


图 6. *MCHK-3535* 基因对菌株生长的影响

Figure 6. The impact of *MCHK-3535* gene on cell growth



和图 8), $\Delta 3535$ 菌株的生物膜形成能力显著增强、运动性显著性降低($P < 0.05$, $n = 6$),互补菌株均可部分回补到野生型表型,超表达菌株无显著性变化,猜测可能是 *MCHK-3535* 基因缺失突变后,菌体的胞外基质分泌减少,从而降低了菌株的运动性。

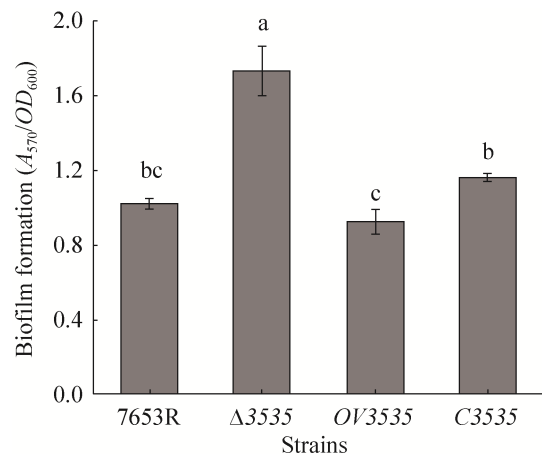


图 7. *MCHK-3535* 基因对菌株生物膜形成的影响

Figure 7. The impact of *MCHK-3535* gene on biofilm formation. The data is average of three replicate. a, b, c values in each column followed by the same letter are significant difference ($P < 0.05$).

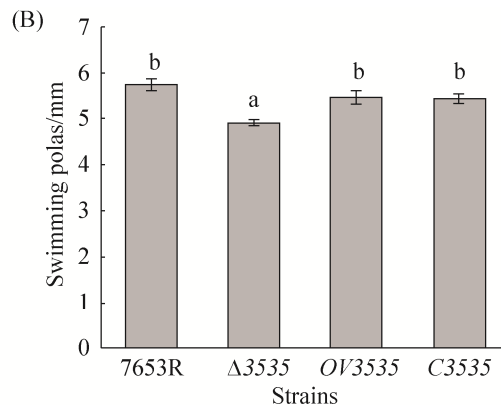


图 8. *MCHK-3535* 基因对菌株运动性的影响

Figure 8. The impact of *MCHK-3535* gene on swimming ability. A: the impact of *MCHK-3535* gene on the phenotype of strains; B: Analysis of halo sizes of strains. The data is average of three replicate. a, b values in each column followed by the same letter are significant difference ($P < 0.05$).

3 讨论

本课题通过构建 *M. huakuii* 7653R 的 *MCHK-3535* 基因突变体, 研究了该基因对紫云英-7653R 共生固氮的影响。*MCHK-3535* 基因的缺失导致植株固氮酶活显著上升。qRT-PCR 的结果显示, *MCHK-3535* 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)。此外, 利用启动子-报告基因($P_{MCHK-3535}$ -GUS)融合的方法, 发现 *MCHK-3535* 基因在根瘤形成早期便开始表达, 且一直持续到根瘤衰老阶段。由此, 我们推测 *MCHK-3535* 蛋白可能通过直接或间接抑制胞内某些蛋白的活性, 进而对共生固氮过程进行负调控。宿主植物与根瘤菌共生体的形成是两者分子对话和相互制约的结果。已有实验表明, 根瘤菌对自身负调控确实存在于共生过程中, 如 SM1021 中的 CLR 蛋白可以通过识别由植物信号诱导产生的第二信使(cAMP), 抑制下游基因的表达(如 *SMc2178*), 进而减少侵染线的形成; 而 *Clr* 的失活会出现侵染线显著增多的表型, 但对最终的结瘤数量和固氮酶活没有影响; 但是该植物信号的成分和诱导方式尚不清楚^[23]。*MCHK-3535* 也有可能受到某种植物信号诱导, 参与根瘤发育过程或者影响固氮酶活。

利用生物信息学数据, 我们分析了 *MCHK-3535* 的结构与功能的保守性。*MCHK-3535* 编码的蛋白包含 3 个保守结构域, 其中, HD-GYP 结构域蛋白属于磷酸水解酶 HD 家族, 可将 c-di-GMP 降解为两分子的 GMP, 目前已在植物病原菌中鉴定出多个 HD-GYP 结构域蛋白, 例如甘蓝黑腐病菌 RpfG 是一种磷酸二酯酶, 可降解 c-di-GMP 及调控病原菌毒性^[24], 目前已经解析出 HD-GYP 结构域的晶体结构, 发现该蛋白发挥催化活性需要金属

离子的参与^[25]。然而, 检索数据显示, *MCHK-3535* 同源蛋白并没有出现在除了 *Mesorhizobium* 以外的其他根瘤菌属中, 却在相当数量的非根瘤菌中检索到该同源蛋白的存在(尽管保守性不高), 如存在于 *Mycobacterium* sp. 中的同源蛋白, 与病原菌的致病性相关^[26]。根据 *MCHK-3535* 基因在根瘤菌中的分布局限及其在不同微生物中的相似序列的保守性, 我们推测该基因可能是通过基因水平转移获得。

此外, 本文还探究了 *MCHK-3535* 的失活对 *M. huakuii* 7653R 自生状态的影响。生长曲线测定结果表明, 突变体提前到达对数期, 在稳定期的生物量明显增加(约 30%)。且菌体运动性降低, 生物膜生成增加(约 17%, 图 7)。说明在野生型的 7653R 中, *MCHK-3535* 可以抑制宿主的生长速率和生物量, 同时抑制生物膜的形成。研究表明, 菌体内高浓度的 c-di-GMP, 通过调控生物膜形成相关组分如纤维素的表达, 促进生物膜的形成; 另一方面通过促进纤毛表达, 提高菌体之间的附着能力, 抑制菌株运动性^[27], 这与本文实验结果是一致的。

因此, 我们推测 *MCHK-3535* 蛋白所含的 HD-GYP 结构域可能参与宿主细胞中 c-di-GMP 的浓度调节, 进而通过级联反应影响下游基因的表达。在 7653R 与紫云英共生过程中, *MCHK-3535* 的负调控作用会降低根瘤菌运动性, 在共生过程中也可以更有效地吸附到根毛表面, 提高根瘤菌早期侵染效率, 最终调控共生固氮期的固氮酶活。但是, 这些表型变化是单一还是协同效应还有待深入研究。根据目前结果显示 *MCHK-3535* 蛋白在共生固氮体系中的功能并不是单一的, 以后可从降解 c-di-GMP 或者作为转录调控因子调控固

氮相关基因, 来探究 c-di-GMP 在根瘤菌侵染、根瘤形成过程中的作用机制。这是首次在 *Mesorhizobium huakuii* 7653R 中研究与 c-di-GMP 相关的基因, 为深入了解 c-di-GMP 在生物固氮体系中如何进行信号传导提供理论支持。

参考文献

- [1] Mylona P, Pawlowski K, Bisseling T. Symbiotic nitrogen fixation. *The Plant Cell*, 1995, 7(7): 869–885.
- [2] Desbrosses GJ, Stougaard J. Root nodulation: a paradigm for how plant-microbe symbiosis influences host developmental pathways. *Cell Host & Microbe*, 2011, 10(4): 348–358.
- [3] Ferguson BJ, Indrasumunar A, Hayashi S, Lin MH, Lin YH, Reid DE, Gresshoff PM. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2010, 52(1): 61–76.
- [4] Gupta S, Gajbhiye VT, Gupta RK. Effect of light on the degradation of two neonicotinoids viz acetamiprid and thiacloprid in soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2008, 81(2): 185–189.
- [5] Zipfel C, Oldroyd GED. Plant signalling in symbiosis and immunity. *Nature*, 2017, 543(7645): 328–336.
- [6] Müller DB, Vogel C, Bai Y, Vorholt JA. The plant microbiota: systems-level insights and perspectives. *Annual Review of Genetics*, 2016, 50: 211–234.
- [7] Cook DE, Mesarich CH, Thomma BPHJ. Understanding plant immunity as a surveillance system to detect invasion. *Annual Review of Phytopathology*, 2015, 53: 541–563.
- [8] Hengge R. Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 2009, 7(4): 263–273.
- [9] Pérez-Mendoza D, Aragón IM, Prada-Ramírez HA, Romero-Jiménez L, Ramos C, Gallegos MT, Sanjuán J. Responses to elevated c-di-GMP levels in mutualistic and pathogenic plant-interacting bacteria. *PLoS ONE*, 2014, 9(3): e91645.
- [10] Wang YW, Xu J, Chen AM, Wang YZ, Zhu JB, Yu GQ, Xu L, Luo L. GGDEF and EAL proteins play different roles in the control of *Sinorhizobium meliloti* growth, motility, exopolysaccharide production, and competitive nodulation on host alfalfa. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2010, 42(6): 410–417.
- [11] Hengge R, Grundling A, Jenal U, Ryan R, Yildiz F. Bacterial signal transduction by cyclic di-GMP and other nucleotide second messengers. *Journal of Bacteriology*, 2016, 198(1): 15–26.
- [12] Newell PD, Monds RD, O'Toole GA. LapD is a bis-(3', 5')-cyclic dimeric GMP-binding protein that regulates surface attachment by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(9): 3461–3466.
- [13] Amikam D, Galperin MY. PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. *Bioinformatics*, 2005, 22(1): 3–6.
- [14] Sudarsan N, Lee ER, Weinberg Z, Moy RH, Kim JN, Link KH, Breaker RR. Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic di-GMP. *Science*, 2008, 321(5887): 411–413.
- [15] Fang X, Ahmad I, Blanka A, Schottkowski M, Cimdin A, Galperin MY, Romling U, Gomelsky M. GIL, a new c-di-GMP-binding protein domain involved in regulation of cellulose synthesis in enterobacteria. *Molecular Microbiology*, 2014, 93(3): 439–452.
- [16] Duerig A, Abel S, Folcher M, Nicollier M, Schwede T, Amiot N, Giese B, Jenal U. Second messenger-mediated spatiotemporal control of protein degradation regulates bacterial cell cycle progression. *Genes & Development*, 2009, 23(1): 93–104.
- [17] Conner JG, Zamorano-Sánchez D, Park JH, Sondermann H, Yildiz FH. The ins and outs of cyclic di-GMP signaling in *Vibrio cholerae*. *Current Opinion in Microbiology*, 2017, 36: 20–29.
- [18] Chou SH, Galperin MY. Diversity of cyclic Di-GMP-binding proteins and mechanisms. *Journal of Bacteriology*, 2016, 198(1): 32–46.
- [19] 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.
- [20] Abd-El-Karem Y, Elbers T, Reichelt R, Steinbüchel A. Heterologous expression of *Anabaena* sp. PCC7120 cyanophycin metabolism genes *cphA1* and *cphB1* in *Sinorhizobium (Ensifer) meliloti* 1021. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 89(4): 1177–1192.
- [21] Schäper S, Krol E, Skotnicka D, Kaefer V, Hilker R, Søgaard-Andersen L, Becker A. Cyclic di-GMP regulates multiple cellular functions in the symbiotic Alphaproteobacterium *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, 2015, 198(3): 521–535.
- [22] Robledo M, Rivera L, Jiménez-Zurdo JI, Rivas R, Dazzo F, Velázquez E, Martínez-Molina, Hirsch AM, Mateos PF. Role of *Rhizobium* endoglucanase CelC₂ in cellulose biosynthesis and biofilm formation on plant roots and abiotic surfaces. *Microbial Cell Factories*, 2012, 11: 125.
- [23] Tian CF, Garnerone AM, Mathieu-Demazière C,

- Masson-Boivin C, Batut J. Plant-activated bacterial receptor adenylate cyclases modulate epidermal infection in the *Sinorhizobium meliloti-Medicago* symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(17): 6751–6756.
- [24] Zhang YB, Wei C, Jiang WD, Wang L, Li CR, Wang YY, Dow JM, Sun WX. The HD-GYP domain protein RpfG of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* regulates synthesis of extracellular polysaccharides that contribute to biofilm formation and virulence on rice. *PLoS ONE*, 2013, 8(3): e59428.
- [25] Lovering AL, Capeness MJ, Lambert C, Hobbey L, Sockett RE. The structure of an unconventional HD-GYP protein from *Bdellovibrio* reveals the roles of conserved residues in this class of cyclic-di-GMP phosphodiesterases. *mBio*, 2011, 2(5): e00163-11.
- [26] Zhang Y, Kitajima M, Whittle AJ, Liu WT. Benefits of genomic insights and CRISPR-Cas signatures to monitor potential pathogens across drinking water production and distribution systems. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2036.
- [27] Gao T, Meng Q, Gao HC. Thioesterase YbgC affects motility by modulating c-di-GMP levels in *Shewanella oneidensis*. *Scientific Reports*, 2017, 7: 3932.
- [25] Lovering AL, Capeness MJ, Lambert C, Hobbey L, Sockett

Role of *Mesorhizobium huakuii* 7653R *MCHK-3535* gene in the free living condition and symbiosis with *Astragalus sinicus*

Yanxia Yu, Zaiyong Si, Xiaobo Zeng, Youguo Li*

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

Abstract: [Objective] To study the function of *MCHK-3535* gene in symbiotic nitrogen fixation between *Mesorhizobium huakuii* 7653R and *Astragalus sinicus*. [Methods] We constructed the deletion mutant $\Delta 3535$, overexpression strains *OV3535* and complementary strains *C3535*, followed by identifying symbiotic phenotypes, detecting the growth curve, swimming motility and biofilm formation. Besides, we used qRT-PCR and promoter-GUS fusion vector to detect the expression characteristics of *MCHK-3535* in the symbiotic process. [Results] Compared with the wild type 7653R, mutant $\Delta 3535$ grew faster, decreased motility, and increased biofilm formation, moreover, $\Delta 3535$ significantly increased the ability of nitrogen fixation and the fresh weight of plants, while the number and weight of root nodules were not affected, in addition, the complementary strain *C3535* partially compensated to the wild-type phenotype, whereas *OV3535* had no significant difference in these aspects. The results of qRT-PCR and the promoter-GUS reporter system showed that *MCHK-3535* expressed in the infection zone, transitional zone and nitrogen fixation zone of the nodules, and the gene expressed lasted for the entire period of nitrogen fixation. [Conclusion] *MCHK-3535* functions in the symbiotic nitrogen fixation process and may participate in the normal development of nodules and negatively regulates nitrogenase activity.

Keywords: biological nitrogen fixation, *Mesorhizobium huakuii* 7653R, symbiotic phenotypes, spatio-temporal expression

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31670243, 31772401) 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: 27 April 2018; Revised: 22 May 2018; Published online: 26 May 2018