



茎瘤固氮根瘤菌环二鸟苷酸代谢相关基因的功能鉴定

杨学智^{1,2}, 沈日敏^{1,2}, 孙雨², 李润植^{1*}, 解志红^{2*}

¹山西农业大学农学院, 山西 太谷 030801

²中国科学院烟台海岸带研究所, 山东 烟台 264003

摘要:【目的】考察茎瘤固氮根瘤菌 ORS571 中 c-di-GMP 合成酶 AZC-2412 的编码基因缺失的突变表型, 初步探究其功能机理。【方法】本实验构建基于 cre-loxp 重组酶系统的根瘤菌基因敲除系统, 以及采用三亲接合技术构建突变株。测定野生型和突变株的生长速率、趋化能力、胞外多糖产量、生物膜形成等表型。【结果】突变株与野生型生长速率几乎相同。与野生型相比突变株由于细胞内 c-di-GMP 水平降低, 胞外多糖、生物膜产量等均有所下降。【结论】实验表明, 环二鸟苷酸合成酶 AZC-2412 缺失, 使得 c-di-GMP 水平降低, 对胞外多糖生成、细菌的运动能力、生物膜的形成、细胞絮凝、与植物的互作等均有调控作用。

关键词: 茎瘤固氮根瘤菌 ORS571, 环化酶 DGC, 环二鸟苷酸 c-di-GMP, 胞外多糖, 生物膜

茎瘤固氮根瘤菌(*Azorhizobium caulinodans* ORS571)是一种从热带植物毛萼田菁(*Sesbania rostrata*)中分离出来的共生菌株^[1]。ORS571 属于革兰氏阴性菌, 杆状, 具有周生菌毛, 以及一条使之游动的鞭毛^[2]。ORS571 和其他根瘤菌一样能够与宿主植物共生结瘤^[3], 并固定空气中游离的氮, 增加宿主氮源的获取途径。而与其他根瘤菌不同的是, ORS571 不仅可以和宿主根部共生结瘤, 还可在宿主茎杆上结瘤。此外, ORS571 不但

可以和宿主共生固氮, 还能在自生状态下固氮^[4]。因为其具有独特的生存方式和生命特征, 使其存在非同一般的研究价值。

环二鸟苷酸(cyclic diguanylate, c-di-GMP)最初被发现是在木葡糖醋酸杆菌(*Gluconacetobacter xylinus*)中, 作为膜结合纤维素合成酶的变构激活因子^[5]。其被发现之后的十余年间, 关于 c-di-GMP 的报道一直寥寥无几, 直到进入 21 世纪后才引起人们的广泛重视。环二鸟苷酸(c-di-GMP)与钙离子

基金项目: 国家自然科学基金(31570063, 31870020); 山东省重点研发计划(2017GSF17129); 边际土地产能效益扩增机理与藏粮于地技术模式(KFZD-SW-112); 山东省农业科学院农业科技创新工程(+CXGC2016B10)

*通信作者: 李润植, Tel/Fax: +86-354-6288344, E-mail: rli2001@126.com; 解志红, Tel: +86-535-2109183, Fax: +86-535-2109000, E-mail: zhxie@yic.ac.cn

收稿日期: 2018-09-30; 修回日期: 2018-12-17; 网络出版日期: 2019-03-20

Ca⁺、环鸟苷酸(cGMP)、环腺苷酸(cAMP)、1,4,5-三磷酸肌醇(IP3)等一样作为生命体的第二信使,在细胞信号转导中起重要作用,且普遍存在于细菌中。在近十多年的研究中人们认识到,细胞中的某些核糖开关的转录起始、蛋白分子的酶活表达、以及菌毛和鞭毛的运动等行为,都是由c-di-GMP信号来进行调控和启动的^[6]。

如图1所示^[7],环二鸟苷酸(c-di-GMP)是由2分子的GTP通过二鸟苷酸环化酶(diguanylate cyclase, DGC)的催化,脱水缩合形成环状的二核苷酸^[8-9],之后c-di-GMP可以选择性地被磷酸二酯酶(phosphodiesterase, PDE)降解成2分子的GMP^[10]。含有保守结构域GGDEF (Gly-Gly-Asp-Glu-Phe)蛋白在c-di-GMP合成中起作用,而c-di-GMP PDE的活性则与保守结构域EAL (Glu-Ala-Leu)相关^[9,11]。细菌中的c-di-GMP含有广泛的调节作用,包括调控细胞的运动(motility)、细菌生

物膜(biofilm)的形成、胞外多糖(exopolysaccharides, EPS)的产生、细菌的毒力(virulence)等^[12-14]。c-di-GMP能够调节各种生理功能的前提是DGC和PDE可以接受来自感应结构域如PAS、GAF、REC等的信号的传递^[15-16],从而启动或关闭相关基因的转录和翻译,调节细胞内c-di-GMP水平的变化。

低水平的c-di-GMP可降低生物膜的形成,减少多糖产量,并有利于毒性因子的表达,高水平的c-di-GMP则与之相反。本文选择含有感应结构域REC和保守结构域GGDEF的c-di-GMP合成基因AZC-2412 (GenBank 登录号: BAF88410.1),研究该基因的功能,进一步了解c-di-GMP的调节作用,阐明c-di-GMP代谢对细菌生物膜、多糖产生、运动能力等作用的调控。通过对AZC-2412基因的敲除,得到c-di-GMP合成量减少的菌株,通过竞争结瘤试验发现,突变株与宿主的结瘤能力下降,表明c-di-GMP在结瘤过程中起到重要调控作用。

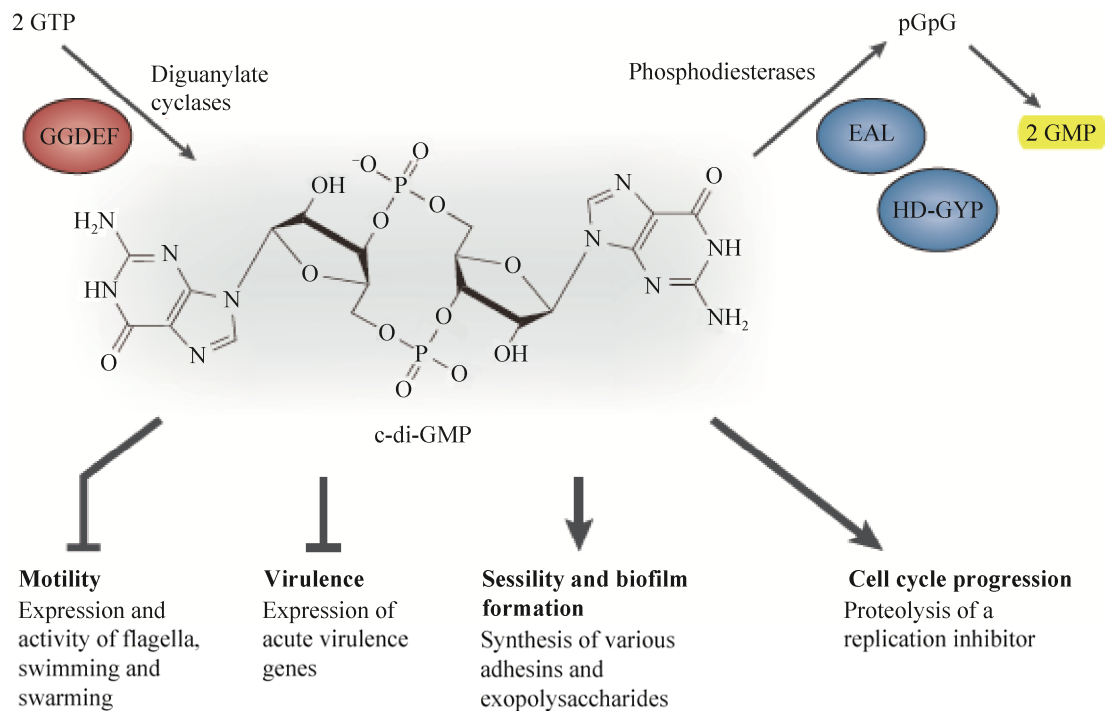


图 1. 第二信使 c-di-GMP 的结构与生理功能

Figure 1. Structure and physiological functions of c-di-GMP.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 表 1 为所用质粒和菌株。

1.1.2 引物: 本实验所用引物详见表 2。

1.1.3 菌株培养条件: 茎瘤固氮根瘤菌 ORS571 使用 TY^[19]和 L3^[20]培养基, 37 °C 培养。大肠杆菌使用 LB^[21]培养基, 37 °C 培养。各抗生素使用浓度: Kan⁺(卡那霉素) 50 μg/mL, Gen⁺(庆大霉素) 30 μg/mL, Tc(四环素) 10 μg/mL, Nal⁺(萘啶酮酸) 25 μg/mL, Amp⁺(氨苄青霉素) 100 μg/mL。

1.1.4 主要仪器及试剂: PCR 扩增仪和凝胶成像系统购自 Bio-Rad。低温高速离心机(D-37520 Osterode, 德国)。超微量分光光度计 NANODROP 2000c。华大基因合成所用引物。限制性内切酶以

及 T4 连接酶 NEB 公司生产。购买天根生物科技有限公司基因组 DNA 提取、质粒提取、切胶回收等试剂盒。DNA 样品测序由瑞博兴科生物技术有限公司完成。抗生素购自烟台鼎锐生物技术有限公司。

1.2 基因片段的克隆及重组载体的构建

使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 提取过夜培养的 ORS571 总 DNA, 以此为模板使用目标片段上下游引物 2412-up-F/R 和 2412-down-F/R (表 2) 进行 PCR 扩增, 得到 710 bp 上游片段和 680 bp 下游片段。将扩增的上下游片段分别连接到 pEASY 载体上, 涂布培养 IPTG 诱导平板, 筛选白色菌落, 并进行测序验证。将测序正确的含上游片段菌株以及含载体 pCM351 的菌株纯培养提取质粒, 使用 NEB 酶 *Mfe* I 和 *Kpn* I 进行酶切胶

表 1. 实验所用菌株和质粒

Table 1. Plasmids and bacterial strains used in this study

| Strains and plasmids | Relevant characteristics | Source and reference |
|------------------------------|--|----------------------|
| Strains | | |
| <i>A. caulinodans</i> ORS571 | Wild type strain, Nal ⁺ and Amp ⁺ | [2] |
| ΔA2C-2412 | ORS571 derivative, Gen ⁺ | This study |
| <i>Escherichia coli</i> DH5α | General cloning strain | Transgen |
| Plasmids | | |
| pEASY Blunt Simple | The vector cloning PCR products, Kan ⁺ | TaKaRa |
| pCM351 | The construction of mutant, Gen ⁺ , Tc | [17] |
| pRK2013 | Helper plasmid, carries <i>tra</i> genes, Kan ⁺ | [18] |

Kan⁺: kanamycin; Gen⁺: gentamicin; Tc: tetracycline; Nal⁺: nalidixic acid; Amp⁺: ampicillin.

表 2. 本实验所用引物

Table 2. Primers used in this study

| The name of the primer | Direction (5'→3') | Restriction enzyme cutting site |
|------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 2412-up-F | <u>CAATTGTCATCCTGCTCGACGTGG</u> | <i>Mfe</i> I |
| 2412-up-R | <u>GGTACCCACGGAATCAGAAGGCAA</u> | <i>Kpn</i> I |
| 2412-down-F | <u>ACCGGTAAGAGGTGTCCGACGTGG</u> | <i>Age</i> I |
| 2412-down-R | <u>GAGCTCAGGATGCCAATGGTCGAA</u> | <i>Sac</i> I |
| 2412-middle-F | CGCGCACCTCGTCATAGTGC | |
| 2412-middle-R | CTCGTAGGCGTCGCTCTCCG | |

回收, 用 T4 连接酶将含有相同酶切位点的两者连接。将得到的 pCM351::2412-up 片段转入大肠杆菌感受态中, 平板涂布过夜培养, 挑取单菌落进行菌落 PCR 验证, 将验证正确的阳性克隆子提取质粒, 用同样方法将下游片段连接到 PCM351::2412-up 上, 最后得到含有上下游片段的 pCM351::2412-up-down 质粒。

1.3 构建 AZC-2412 缺失突变菌株

本实验采用三亲接合方法^[22]构建实验所需突变株, 取过夜摇培的携带辅助质粒 pRK2013 的大肠杆菌、携带 pCM351::2412-up-down 质粒的大肠杆菌 DH5 α 、野生型 ORS571, 按 2:3:10 比例进行混合, 利用同源序列重组交换原理, 将质粒 pCM351 上编码 Gen⁺ 的基因把野生型中 AZC-2412 的基因片段替换掉, 使得突变菌株含有 Gen⁺ 抗性。将三亲接合后的菌株涂布于含 Gen⁺-Amp^r-Nal^r 三种抗性的 TY 平板上筛选生长良好的菌株, 之后用 2412-up-F 和 2412-down-R 引物或用 AZC-2412 基因的内部引物 2412-middle-F 和 2412-middle-R (表 2) 进行 PCR 验证, 并用野生型 ORS571 作阳性对照, 验证正确的即为构建成功的 Δ AZC-2412 突变株。

1.4 生长曲线测定

挑取事先在 TY 平板中活化好的野生型 ORS571 及突变株 Δ AZC-2412 的菌落, 接种到含有 5 mL TY 培养基的相应抗性的试管中, 37 °C 过夜摇培。取适量菌液, 将 OD_{600} 调至 1.0 左右, 选取 100 mL 锥形瓶加入 50 mL TY 培养基, 为保证菌液起始 OD_{600} 为 0.02 左右, 加入 OD_{600} 值 1.0 的菌液 1 mL, 37 °C、180 r/min 培养, 每 2 h 测定 1 次菌液 OD_{600} 值, 每组 3 次重复。

1.5 c-di-GMP 水平测定

取 10 mL 培养至对数生长期的菌液, 4 °C、5000 r/min 下离心收集菌体, 按比例(甲醇:乙腈:水=40:40:20)加入细菌裂解液破碎细胞, 并浸提 c-di-GMP。菌株中 c-di-GMP 含量通过液相色谱串联质谱法(HPLC-MS/MS)^[23]进行检测, 菌内 c-di-GMP 浓度用 pmol/mg 蛋白表示。

1.6 趋化实验

使用半固体平板法进行趋化实验测定^[24], 将活化后的野生型 ORS571 和 Δ AZC-2412 突变株, 接种到含相应抗性的液体培养基中。37 °C、180 r/min 过夜培养。将菌液洗去抗性, 调 OD_{600} 值为 0.5, 各取 5 μ L 点加到 0.3% 琼脂的 L3+N 和 L3-N (碳源: 乳酸钠, 氮源 N: NH₄Cl, 下同) 半固体平板上, 37 °C 正置培养 2 d 左右, 观察趋化圈大小, 并测量趋化圈直径。

1.7 絮凝实验

将野生型和突变株接种至 TY 液体培养基, 37 °C、180 r/min 过夜培养。将 OD_{600} 值调为 1.0 左右, 取每 200 μ L 菌液加入到装有 10 mL L3+1/2N 寡营养培养基的 50 mL 含盖锥形管中, 37 °C、180 r/min 竖直培养, 分别培养至 24 h 和 48 h 进行絮凝观察和测定。(1) 絮凝量观察: 为方便观察, 选取产生絮凝量相对多的 48 h 培养物, 将锥形管中的絮凝菌液倒入平板中, 拍照观察絮凝量。(2) 絮凝量测定: 分别取出 24 h 和 48 h 的锥形管竖直放置 30 min, 取静止后的上清菌液测定 OD_{600} 值, 记为 OD_s , 将沉淀和上清使用组织研磨器混合研磨后测定 OD_{600} 值, 记为 OD_t , 每组 3 次平行。通过公式: %絮凝(% flocculation)=[(OD_t-OD_s) \times 100]/ OD_t 计算细胞絮凝百分比。

1.8 生物膜实验

参照 Barnard 介绍的方法^[25]进行生物膜实验。

(1) 生物膜观察：使用有氮源的 L3+N 和无氮源的 L3-N 培养基，添加乳酸钠(10 mmol/L)为碳源，试管培养观察生物膜。吸取预先调节好 OD_{600} 为 2.5 的各菌液 150 μ L，加入到含 1.5 mL 的各培养基的试管中，37 °C 竖直静置培养 3 d，做 3 组平行。洗去废液及杂菌，加入 2 mL 0.1% 结晶紫染色 30 min，后用流动的清水将多余的结晶紫冲洗干净，最后拍照观察生物膜形态。(2) 生物膜测定：取调至 OD_{600} 为 2.5 的菌液 15 μ L，加入到无菌的 PVC96 孔板中，每种培养基同时做 3 次平行。用封口密封后置于 37 °C 培养 3 d 左右，轻微冲洗弃去培养液，每个孔中加入 0.1% 结晶紫 200 μ L 染色 30 min。用水洗去染色液，室温晾干后加入 30% 乙酸溶解壁上与生物膜结合的结晶紫，最后利用酶标仪测定 OD_{540} 处的吸光度值。

1.9 胞外多糖实验

配置以乳酸钠(10 mmol/L)为碳源的无氮培养基 L3-N，琼脂糖浓度为 8 g/L。将各菌液 OD_{600} 调至 0.8，取 0.5 μ L 菌液滴加到平板上，晾干倒置放入 37 °C 培养箱中培养 3 d，重复 3 组。在灯箱上拍照观察菌株胞外多糖(EPS)的生成情况，最后利用浓硫酸-萘酚氧化法进行定量测定。

1.10 竞争性结瘤实验

取毛茛田菁种子用硫酸浸泡催芽 30 min，用无菌水洗涤数次，将种子放入 37 °C 培养箱中培养 2 d。将生长出芽的种子浸泡于事先培养好的菌液中，按照野生型和突变株 1 : 1、1 : 5、1 : 10 比例浸泡 2 h。将浸泡后的幼苗种植于含有 1×营养液的已灭菌的蛭石土花盆中，每个比例种植 10 盆，置于人工气候室生长 45 d 左右。取生长成熟的瘤

体捣碎，划线于含有 NaI^+ 和 Amp^+ 的 TY 固体平板上，在 37 °C 培养箱中倒置培养，将长出的菌落进行菌落 PCR 验证。统计并计算每个比例的结瘤数量的比值。

2 结果和分析

2.1 Δ AZC-2412 突变株构建

经三亲接合后的突变株，不能在含有三抗 (NaI^+ 、 Gen^+ 、Tc) 的 TY 平板上生长，但可以在含有双抗 (NaI^+ 、 Gen^+) 的 TY 平板上生长，符合该对比生长状态的菌落，可能为构建成功的 Δ AZC-2412 突变株。利用 AZC-2412 内部引物 2412-middle-F 和 2412-middle-R 进行菌落 PCR 验证结果表明，在野生型 ORS571 中可扩增出 703 bp 的片段(图 2 泳道 2)，由于目的基因缺失突变，因此潜在的突变菌株中不能扩增出相应大小的片段(图 2 泳道 1)，即可获得成功构建的 Δ AZC-2412 突变株，如图 2。

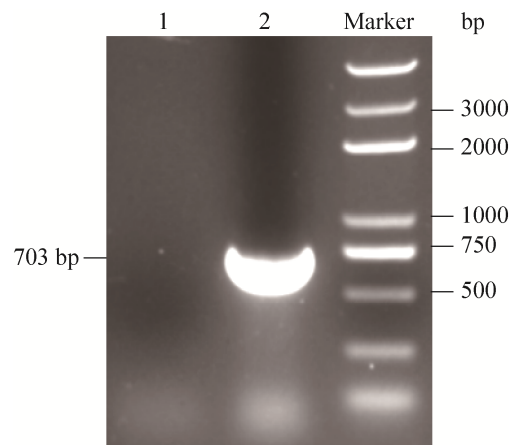


图 2. PCR 验证突变株结果

Figure 2. The mutant strain was verified by PCR. Primers: 2412-middle-F/2412-middle-R; lane 1: Mutant genomic DNA; lane 2: Wild-type genomic DNA. Primer amplification showed a band in wild strain, but not in mutant strain.

2.2 生长曲线测定结果

通过连续测定不同时期的 OD_{600} 值, 来记录菌株的生长情况。野生型 ORS571 和突变株 Δ AZC-2412 的生长状况如图 3。从图中可以明确看出, 突变菌株 Δ AZC-2412 的生长曲线和野生型 ORS571 的生长曲线基本相同, 其结果表明在菌株 ORS571 中 c-di-GMP 环化酶基因 AZC-2412 的缺失并不能导致菌株生长状态的改变。

2.3 c-di-GMP 水平测定结果

验证 AZC-2412 是否合成 c-di-GMP, 试验利用 HPLC-MS/MS 测定了野生型和突变株 c-di-GMP 含量。其结果如图 4 所示, 可以看出突变株中 c-di-GMP 含量低于野生型的, 结果表明单独缺失 AZC-2412 使得 ORS571 中环化酶合成量降低, 导致细胞中 c-di-GMP 的水平下降。

2.4 趋化能力测定

如图 5, 测量结果表明, 突变株 Δ AZC-2412 对运动性有一定影响。在 L3+N 和 L3-N 培养基的趋化圈都略大于野生型 ORS571, 趋化直径增大 18%, 表明运动能力有所增强, 说明 AZC-2412 对细菌的运动性有一定调控作用。

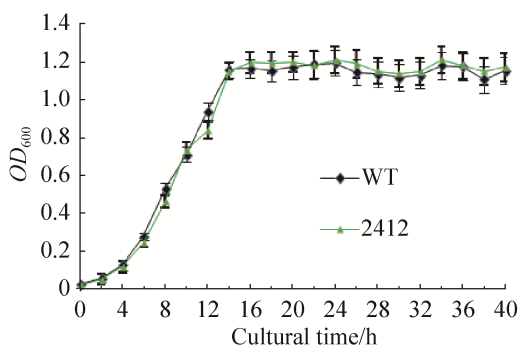


图 3. 菌株的生长曲线测定

Figure 3. The growth curve of the strains were determined.

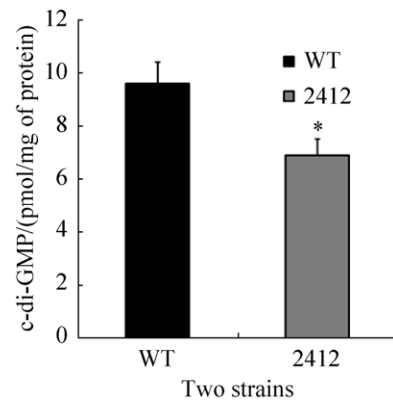


图 4. 各菌株 c-di-GMP 水平测定结果

Figure 4. The c-di-GMP levels of all strains were determined. * $P < 0.05$.

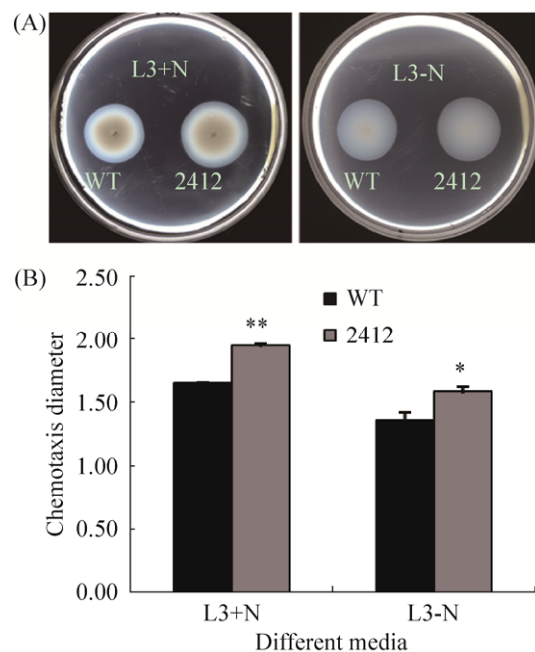


图 5. 菌株的趋化能力表型与定量

Figure 5. Mutant strain and wild type chemotaxis analysis. A: In both L3+N and L3-N, the Δ AZC-2412 had higher chemotaxis than the ORS571; B: The chemotaxis was quantitatively measured using a ruler. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.5 絮凝实验结果

茎瘤固氮根瘤菌 ORS571 在有氧条件下培养^[20], 利用寡营养培养基 L3+1/2N 培养时可产生凝沉淀。如图 6 所示, 结果表明, 突变株

Δ AZC-2412 的凝结能力较野生型 ORS571 降低 30%，表明在 ORS571 凝结过程中 AZC-2412 起到一定调节作用。而随着时间的延长，这里我们选择 48 h 的凝结情况(图 6-A)进行观察。由于菌株不断分裂生长，细胞总量不断增加，在 48 h 的凝结量明显高于 24 h，但此时突变株的絮凝量依然低于野生型菌株。

2.6 生物膜实验结果

环二鸟苷酸(c-di-GMP)对生物膜的形成起到重要作用。在试管试验中生物膜形成状态如图 7-A 所示。从中观察到,在有氮源 L3+N 或无氮源 L3-N 培养时,突变株 Δ AZC-2412 的生物膜形成量都明显少于野生型 ORS571 的生物膜产量,但二者在有氮源时的生物膜产量要明显高于无氮源时的产量。如图 7-B, 通过在 96 孔板中培养, 进行定量

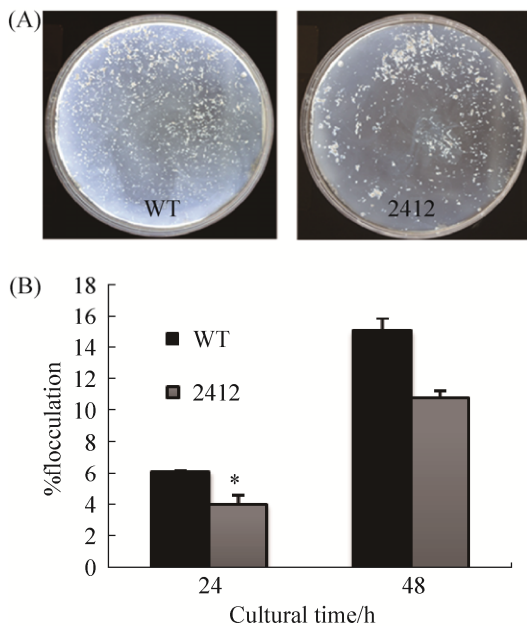


图 6. 两种菌株絮凝结果对比

Figure 6. Comparison of flocculation results of two strains. A: Photographed after 48 hours of cultivation. Flocculation yield results for the wild-type and Δ AZC-2412; B: Analysis of quantitative results of flocculation. * $P < 0.05$.

分析发现,突变株与野生型相比,含氮培养基 L3+N 中生物膜量下降 14.3%,无氮培养基 L3-N 中减少 6.8%。

2.7 胞外多糖实验结果

在以乳酸钠为碳源的 L3-N 平板上培养 3 d 后,如图 8-A 观察发现,突变株 Δ AZC-2412 的 EPS 分泌量明显少于野生型 ORS571 的分泌量。平板中野生型的菌落整体都被覆盖上一层光滑的胞外多糖,而突变株较比于野生型产生了更少的胞外多糖,野生型产生更多的多糖在菌落表面,菌落表面平滑,突变株多糖产量较少,表面多糖覆盖较少,菌落有凹陷。如图 8-B,使用浓硫酸-蒽酮比色法对各菌株 EPS 生产量进行测定,记录 OD_{600} 值。以乳酸为碳源的 L3-N 情况下,突变株的胞外多糖含量比野生型下降了 19.6%。

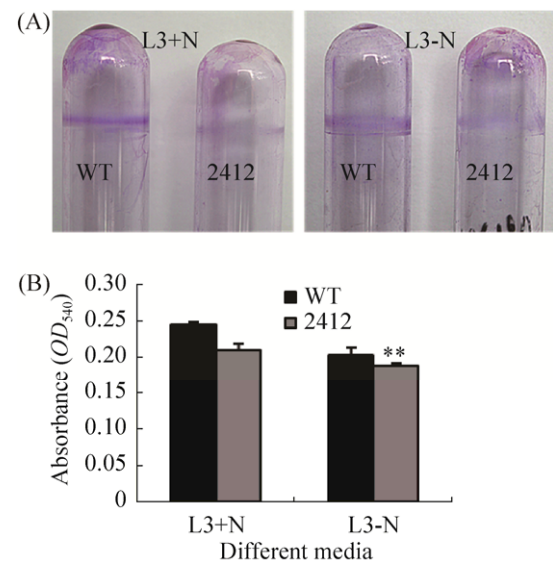


图 7. 两种菌株生物膜形成对比

Figure 7. Comparison of biofilm formation of two strains. A: Biofilm morphologies upon crystal violet staining of the WT and Δ AZC-2412. On the left: Culture strains in L3+N medium; on the right: Culture strains in L3-N medium. B: Biofilm quantitative measurement results. ** $P < 0.01$.

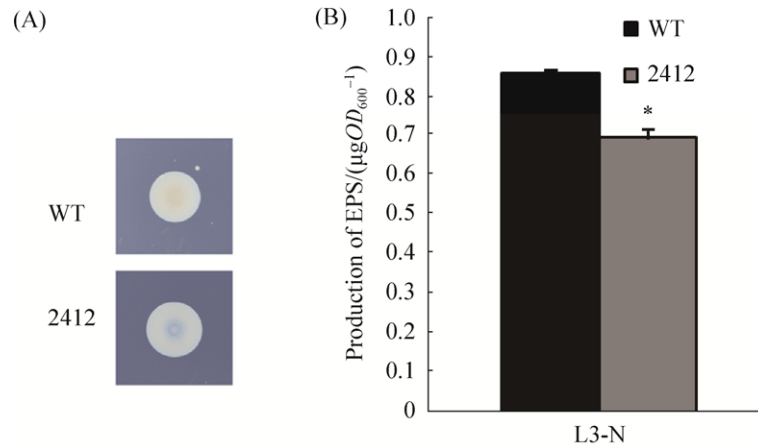


图 8. 两种菌株的菌落形态和 EPS 测定结果

Figure 8. Colony morphology and EPS determination of the two strains. A: Observation of colony morphology of two strains. Wide-type strain and the mutant strains colonies are very different. Photographs were taken after 3 days of incubation; B: The EPS quantitative analysis results. * $P < 0.05$.

2.8 竞争结瘤实验结果

取毛萼田菁上生长的瘤体, 每个比例挑取 100 个长势良好的瘤体, 捣碎后划线, 将长出的菌落用 AZC-2412 基因内部引物做菌落 PCR, 观察扩出片段有无, 进而辨别野生型和突变株数量。结果如图 9, 当野生型和突变株分别按 1 : 1、1 : 5、1 : 10 比例浸泡感染田菁时, 分离的瘤体中突变株所占比例分别为 9%、34%、45%, 提高突变株比例后, 突变株结瘤数明显增加。结果表明, 与野

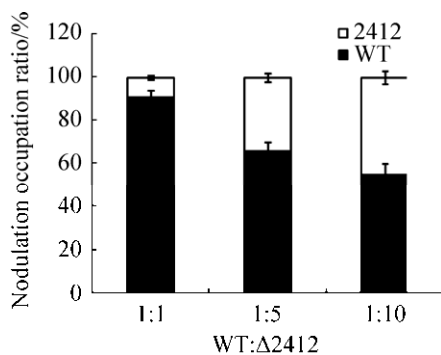


图 9. 野生型与突变株的竞争性结瘤

Figure 9. Competitive nodulation tests between the WT and $\Delta 2412$.

生型相比, 突变株 $\Delta\text{AZC-2412}$ 的竞争结瘤能力明显减弱, 说明该基因的缺失导致 c-di-GMP 水平下降, 促使菌株胞外多糖形成量减少, 不利于菌株在田菁根毛细胞侵染线的形成, 进而影响在宿主根皮层内瘤原基的形成, 最终导致结瘤能力下降。

3 讨论

环二鸟苷酸(c-di-GMP)在过去十年中作为细菌中普遍存在的第二信使而受到广泛的研究, 然而, 我们对 c-di-GMP 的研究还是较为浅显的^[26]。至于 c-di-GMP 信号传导由于细胞功能的多样性以及 c-di-GMP 表现出的多种作用机制, 使得人们对于 c-di-GMP 研究变得更为复杂^[27]。对于这种复杂现象, 原因是许多细菌基因组编码了多种涉及 c-di-GMP 转运的蛋白, 以及细菌的多样性和细菌生活方式的多样性, 以及与宿主之间共同进化的关系^[28]。这些因素与迄今为止已知的相对较少 c-di-GMP 接收器或效应器形成对比, 与 c-di-GMP 的代谢蛋白不同, 其在结构和功能上更为多样化,

并且几乎不能通过生物信息学识别(除了 PilZ 结构域)^[29-30]。因此,有必要使用除了基因组学和生物信息学之外的其他研究方法,用以发现新的 c-di-GMP 的调节途径,特别是在与植物相关的复杂的生活方式的细菌中。这一方法涉及了通过 DGC 或 PDE 的缺失或表达来改变细胞内的 c-di-GMP 水平,用以评定其对特定表型的影响。在我们的研究中,我们使用缺失 DGC 的 AZC-2412 来减少第二信使 c-di-GMP 在细菌中的水平,从而显示出细菌表型上的改变。

正如其他细菌中报道的^[29,31],提高 c-di-GMP 的水平导致细菌运动能力的显著降低,细菌群落形态的显著改变,生物膜形成量的增加,可能是通过胞外多糖增加而导致的,而 c-di-GMP 水平的降低则会起到相反的效应。而大多数细菌的胞外多糖合成会受到 c-di-GMP 的调控,因此 c-di-GMP 是细菌中参与各种生理功能调控十分重要的第二信使^[32]。

总之,c-di-GMP 细胞内水平的降低,增强运动能力,减少 EPS 生产促进生物膜的形成,最终影响细菌群落的变化和细菌与植物共生的方式。然而,也有报告证明 c-di-GMP 对植物病原菌如野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris*)^[33-34]、软腐病菌 (*Dickeya dadantii*)^[35]、黑胫病菌 (*Pectobacterium atrosepticum*)^[36-37]、解淀粉欧文氏菌(*Erwinia amylovora*)^[38]等的不良调控。其中低 c-di-GMP 降低叶缘焦枯病菌(*Xylella fastidiosa*)^[39]毒力水平的情况似乎是独一无二的。而在几种植物有益菌中,如恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)^[40]、荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)^[41-42]和根瘤菌(*Rhizobium*)^[43]中,c-di-GMP 则正向调节这些菌在根际定殖。

我们的研究表明,AZC-2412 的缺失在不影响细菌生长的前提下,使得 DGC 合成减少,低水平的 c-di-GMP 导致胞外多糖的产量降低,运动能力增强,共同作用导致生物膜的减少,细菌群感效应降低,凝结量增加。与宿主植物互作能力下降,结瘤能力降低。

参 考 文 献

- [1] Dreyfus B, Dommergues Y. Nitrogen-fixing nodules induced by *Rhizobium* on the stem of the tropical legume *Sesbania rostrata*. *FEMS Microbiology Letters*, 1981, 10(4): 313-317.
- [2] Dreyfus BL, Garcia JL, Gillis M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1988, 38(1): 89-98.
- [3] Dreyfus BL, Elmerich C, Dommergues YR. Free-living *Rhizobium* strain able to grow on N₂ as the sole nitrogen source. *Applied and Environmental Microbiology*, 1983, 45(2): 711-713.
- [4] Donald RG, Ludwig RA. *Rhizobium* sp. strain ORS571 ammonium assimilation and nitrogen fixation. *Journal of Bacteriology*, 1984, 158(3): 1144-1151.
- [5] Ross P, Weinhouse H, Aloni Y, Michaeli D, Weinberger-Ohana P, Mayer R, Braun S, de Vroom E, van der Marel GA, van Boom JH, Benziman M. Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature*, 1987, 325(6101): 279-281.
- [6] Jain R, Sliusarenko O, Kazmierczak BI. Interaction of the cyclic-di-GMP binding protein FimX and the Type 4 pilus assembly ATPase promotes pilus assembly. *PLoS Pathogens*, 2017, 13(8): e1006594.
- [7] Hengge R. Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 2009, 7(4): 263-273.
- [8] Amikam D, Benziman M. Cyclic diguanylic acid and cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*, 1989, 171(12): 6649-6655.
- [9] Tal R, Wong HC, Calhoon R, Gelfand D, Fear AL, Volman G,

- Mayer R, Ross P, Amikam D, Weinhouse H, Cohen A, Sapir S, Ohana P, Benziman M. Three *cdg* operons control cellular turnover of cyclic di-GMP in *Acetobacter xylinum*: genetic organization and occurrence of conserved domains in isoenzymes. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(17): 4416–4425.
- [10] Christen M, Christen B, Folcher M, Schauerte A, Jenal U. Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(35): 30829–30837.
- [11] Schmidt AJ, Ryjenkov DA, Gomelsky M. The ubiquitous protein domain EAL is a cyclic diguanylate-specific phosphodiesterase: enzymatically active and inactive EAL domains. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(14): 4774–4781.
- [12] Huang BX, Whitchurch CB, Mattick JS. FimX, a multidomain protein connecting environmental signals to twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(24): 7068–7076.
- [13] Jimenez PN, Koch G, Thompson JA, Xavier KB, Cool RH, Quax WJ. The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2012, 76(1): 46–65.
- [14] Tischler AD, Camilli A. Cyclic diguanylate regulates *Vibrio cholerae* virulence gene expression. *Infection and Immunity*, 2005, 73(9): 5873–5882.
- [15] Hurley JH. GAF domains: cyclic nucleotides come full circle. *Science's STKE*, 2003, 2003(164): PE1.
- [16] Okegbe C, Fields BL, Cole SJ, Beierschmitt C, Morgan CJ, Price-Whelan A, Stewart RC, Lee VT, Dietrich LEP. Electron-shuttling antibiotics structure bacterial communities by modulating cellular levels of c-di-GMP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(26): E5236–E5245.
- [17] Marx CJ, Lidstrom ME. Broad-host-range *cre-lox* system for antibiotic marker recycling in gram-negative bacteria. *Biotechniques*, 2002, 33(5): 1062–1067.
- [18] Figurski DH, Helinski DR. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in *trans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1979, 76(4): 1648–1652.
- [19] Beringer JE. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiology*, 1974, 84(1): 188–198.
- [20] Nakajima A, Aono T, Tsukada S, Siarot L, Ogawa T, Oyaizu H. Lon protease of *Azorhizobium caulinodans* ORS571 is required for suppression of *reb* gene expression. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(17): 6251–6261.
- [21] 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. *Journal of Clinical Microbiology*, 2012, 50(11): 3485–3492.
- [22] 李岩. *Sinorhizobium* sp. NGR234 的广宿主适应机制研究. 中国农业大学博士学位论文, 2013.
- [23] Spangler C, Böhm A, Jenal U, Seifert R, Kaefer V. A liquid chromatography-coupled tandem mass spectrometry method for quantitation of cyclic di-guanosine monophosphate. *Journal of Microbiological Methods*, 2010, 81(3): 226–231.
- [24] Bible AN, Stephens BB, Ortega DR, Xie ZH, Alexandre G. Function of a chemotaxis-like signal transduction pathway in modulating motility, cell clumping, and cell length in the alphaproteobacterium *Azospirillum brasilense*. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(19): 6365–6375.
- [25] Barnard AML, Simpson NJL, Lilley KS, Salmond GP. Mutations in *rpsL* that confer streptomycin resistance show pleiotropic effects on virulence and the production of a carbapenem antibiotic in *Erwinia carotovora*. *Microbiology*, 2010, 156(4): 1030–1039.
- [26] Römling U, Galperin MY, Gomelsky M. Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2013, 77(1): 1–52.
- [27] 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.
- [28] Römling U, Gomelsky M, Galperin MY. C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system. *Molecular Microbiology*, 2005, 57(3): 629–639.

- [29] Ryjenkov DA, Simm R, Römling U, Gomelsky M. The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP: the PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(41): 30310–30314.
- [30] Amikam D, Galperin MY. PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. *Bioinformatics*, 2006, 22(1): 3–6.
- [31] Simm R, Morr M, Kader A, Nimtz M, Römling U. GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Molecular Microbiology*, 2004, 53(4): 1123–1134.
- [32] Römling U, Amikam D. Cyclic di-GMP as a second messenger. *Current Opinion in Microbiology*, 2006, 9(2): 218–228.
- [33] Hickman JW, Harwood CS. Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor. *Molecular Microbiology*, 2008, 69(2): 376–389.
- [34] Ryan RP, Fouhy Y, Lucey JF, Jiang BL, He YQ, Feng JX, Tang JL, Dow JM. Cyclic di-GMP signalling in the virulence and environmental adaptation of *Xanthomonas campestris*. *Molecular Microbiology*, 2007, 63(2): 429–442.
- [35] Yi X, Yamazaki A, Biddle E, Zeng Q, Yang CH. Genetic analysis of two phosphodiesterases reveals cyclic diguanylate regulation of virulence factors in *Dickeya dadantii*. *Molecular Microbiology*, 2010, 77(3): 787–800.
- [36] Pérez-Mendoza D, Coulthurst SJ, Humphris S, Campbell E, Welch M, Toth IK, Salmond GPC. A multi-repeat adhesin of the phytopathogen, *Pectobacterium atrosepticum*, is secreted by a Type I pathway and is subject to complex regulation involving a non-canonical diguanylate cyclase. *Molecular Microbiology*, 2011, 82(3): 719–733.
- [37] Pérez-Mendoza D, Coulthurst SJ, Sanjuán J, Salmond GPC. N-Acetylglucosamine-dependent biofilm formation in *Pectobacterium atrosepticum* is cryptic and activated by elevated c-di-GMP levels. *Microbiology*, 2011, 157(12): 3340–3348.
- [38] Barnhart DM, Su SC, Baccaro BE, Banta LM, Farrand SK. CelR, an ortholog of the diguanylate cyclase PleD of *Caulobacter*, regulates cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(23): 7188–7202.
- [39] Chatterjee S, Killiny N, Almeida RPP, Lindow SE. Role of cyclic di-GMP in *Xylella fastidiosa* biofilm formation, plant virulence, and insect transmission. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2010, 23(10): 1356–1363.
- [40] Matilla MA, Travieso ML, Ramos JL, Ramos-González MI. Cyclic diguanylate turnover mediated by the sole GGDEF/EAL response regulator in *Pseudomonas putida*: its role in the rhizosphere and an analysis of its target processes. *Environmental Microbiology*, 2011, 13(7): 1745–1766.
- [41] 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.
- [42] Newell PD, Boyd CD, Sondermann H, O'Toole GA. A c-di-GMP effector system controls cell adhesion by inside-out signaling and surface protein cleavage. *PLoS Biology*, 2011, 9(2): e1000587.
- [43] Ausmees N, Mayer R, Weinhouse H, Volman G, Amikam D, Benziman M, Lindberg M. Genetic data indicate that proteins containing the GGDEF domain possess diguanylate cyclase activity. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 204(1): 163–167.

Characterization of diguanylate cyclase metabolism-related gene in *Azorhizobium caulinodans* ORS571

Xuezhi Yang^{1,2}, Rimin Shen^{1,2}, Yu Sun², Runzhi Li^{1*}, Zhihong Xie^{2*}

¹ College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi Province, China

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

Abstract: [Objective] To study the phenotypes of *Azorhizobium caulinodans* ORS571 mutant strain lacking the diguanylate cyclase AZC-2412, and to explore its functional mechanism. [Methods] We constructed the gene knockout system of rhizobia based on the homologous recombination of cre-loxp, and the mutant strain was constructed by the triparental conjugation. Growth rate, chemotactic ability, exopolysaccharide production, biofilm formation and other phenotypes of the wild type and mutant strains were studied. [Results] The mutant strain had almost the same growth rate as the wild type. Compared with the wild type, the mutant strain impaired in exopolysaccharide production, chemotaxis behavior and biofilm formation due to lower levels of c-di-GMP in cells. [Conclusion] The deletion of the diguanylate cyclase AZC-2412 reduces level of c-di-GMP levels. It had a regulatory effect on the exopolysaccharide production, bacterial motility, biofilm formation, cell flocculation of *Azorhizobium caulinodans* ORS571 and its interaction with host plant.

Keywords: *Azorhizobium caulinodans* ORS571, diguanylate cyclase, c-di-GMP, exopolysaccharide, biofilm

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31570063, 31870020), by the Shandong Key Research and Development Program (2017GSF17129), by the Marginal Land Productivity Benefits Amplification Mechanism and Storing Food in Land Technology Model (KFZD-SW-112) and by the Shandong Academy of Agricultural Sciences (+CXGC2016B10)

*Corresponding author. Runzhi Li, Tel/Fax: +86-354-6288344, E-mail: rli2001@126.com; Zhihong Xie, Tel: +86-535-2109183, Fax: +86-535-2109000, E-mail: zhxie@yic.ac.cn

Received: 30 September 2018; Revised: 17 December 2018; Published online: 20 March 2019