



茎瘤固氮根瘤菌 ORS571 中 *motA* 基因的功能分析

孙丽¹, 王丹丹¹, 殷志秋¹, 油勇强², 刘润进³, 解志红^{1*}

¹ 山东农业大学资源与环境学院, 山东 泰安 271000

² 中国科学院烟台海岸带研究所, 山东 烟台 264003

³ 青岛农业大学植物医学学院, 山东 青岛 266000

摘要: 【目的】MotA是细菌的鞭毛马达蛋白, 是跨膜质子通道的重要组成结构之一, 在调控鞭毛运动中具有至关重要的作用。本研究探究了*Azorhizobium caulinodans* ORS571中鞭毛马达基因*motA*对菌株表型和植物互作的影响。【方法】通过同源重组原理和三亲接合转移方法构建突变菌株 Δ *motA*, 测定野生型与突变体在菌体生长、运动、固氮、胞外多糖合成、生物膜形成及根系定殖能力的差异。【结果】与野生型相比, 突变体菌体生长没有明显差异, 但其运动能力完全丧失, 固氮、胞外多糖合成、生物膜形成及根系定殖能力减弱。【结论】MotA鞭毛马达蛋白对*A. caulinodans* ORS571的运动、固氮、胞外多糖合成、生物膜形成及根系定殖能力均有调控作用。

关键词: 茎瘤固氮根瘤菌 ORS571, 鞭毛马达蛋白, *motA*

茎瘤固氮根瘤菌(*Azorhizobium caulinodans* ORS571)为运动型的革兰氏阴性菌, 分离自热带豆科植物毛萼田菁(*Sesbania rostrata*)的茎瘤中^[1]。相较于其他根瘤菌, ORS571 具有独特的生理功能: 其一, ORS571 可以与宿主植物在根部和茎部共生结瘤; 其二, ORS571 既可以和宿主植物共生固氮, 也可以自生固氮, 为宿主增加获取氮源的途径, 因此, *A. caulinodans* ORS571 成为根瘤菌植物促生方向的研究热点。ORS571 需

要依赖鞭毛的定向运动到达宿主植物的根部, 即鞭毛的趋化运动是根瘤菌定殖结瘤的前提^[2-3]。鞭毛是细菌长期进化过程中适应环境的结果, 在定向运动、细菌底物吸附、生物膜形成、定殖过程中均具有十分重要的作用^[3-5], 由此可见, 鞭毛对细菌的生存和发展至关重要。

鞭毛是由嵌在细胞壁与细胞膜中的基体、近端的钩状体和远端的丝状体构成的超大分子运动器官。基体作为双向旋转马达产生跨越细胞质

基金项目: 国家自然科学基金(31870020); NSFC-山东省联合基金重点支持项目(U1806206)

*通信作者。E-mail: zhihongxie211@163.com

收稿日期: 2021-03-12; 修回日期: 2021-04-30; 网络出版日期: 2021-09-29

膜的驱动力,接着由钩状体和丝状体分别控制运动的方向和推进^[6]。鞭毛的调控机制复杂有序,感觉信号传导器感知外界刺激(如化学物质、温度或者 pH 变化),通过胞内趋化信号网络将这些胞外信号传递给马达,使鞭毛马达产生逆时针和顺时针旋转的交替变化^[5],马达的运转由一个转子和多个定子单元高度配合完成,跨膜蛋白 MotA 和 MotB 形成的 MotA/B 定子复合物起到跨膜质子通道的作用,向转子传递质子和动力^[7]。MotA 作为质子通道的组分之一,在鞭毛运动调控中具有至关重要的作用。MotA 蛋白是大肠杆菌鞭毛马达中的质子传递蛋白^[8];并在沙门氏菌中参与扭矩的产生和定子装配, MotA-Arg90-FliG-Asp289 相互作用使定子在转子周围正确定位, MotA-Glu98-FliG-Arg281 负责控制扭矩的产生^[9-10]。motA 基因是空肠弯曲菌鞭毛动力和致病性相关趋化和定殖的必需基因^[11]。在 ORS571 菌株基因组中,存在 MotA 鞭毛蛋白编码基因,但 MotA 在 ORS571 中的生物学功能至今未见研究报道。

本研究从 ORS571 菌株基因组中克隆 motA 基因,利用同源重组原理和三亲接合转移的方法成功构建了 motA 基因缺失突变株(Δ motA),通过与野生型生理特性比较,分析 motA 基因缺失对

ORS571 菌体生长、运动、固氮、胞外多糖合成、生物膜形成以及定殖能力的影响。本研究丰富了对 MotA 的认识,明确了其作为鞭毛马达蛋白重要的组成成分在 ORS571 中的具体作用,为今后 ORS571 趋化信号转导机制分子水平的进一步研究提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验所用试剂及试剂盒:限制性内切酶和 T₄连接酶购自 NEB 公司,基因组 DNA 抽提试剂盒购自北京诺贝莱生物科技有限公司,质粒小提试剂盒购自天根生物科技有限公司,切胶回收试剂盒购自全式金生物技术有限公司。引物合成由华大基因完成,测序由北京奥克鼎盛生物科技有限公司完成。

1.1.2 实验所用菌株和质粒:详见表 1。

1.1.3 引物:详见表 2。

1.1.4 菌株所用培养基及培养条件:茎瘤固氮根瘤菌 ORS571 接种于含 Amp 和 NaI 抗生素的 TY 或 L3 培养基,37 °C 培养;大肠杆菌 DH5 α 接种于 LB 培养基,37 °C 培养^[14]。

表 1. 实验所用菌株和质粒

Table 1. Bacteria strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Relevant characteristics	Source and reference
Strains		
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	General cloning strain	Transgen
<i>A. caulinodans</i> ORS571	Wild-type strain, Amp ^R and NaI ^R	[1]
Δ motA	ORS571 derivative, Amp ^R , Gen ^R	This study
Plasmids		
pEASY Blunt Cloning Vector	The vector cloning PCR products, Kan ^R	Transgen
pCM351	The construction of mutant, Gen ^R	[12]
pRK2013	Helper plasmid, Kan ^R	[13]

Amp^R, NaI^R, Gen^R and Kan^R indicate ampicillin, nalidixic acid, gentamycin and kanamycin resistance, respectively.

表 2. 实验涉及引物

Table 2. PCR primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')	Restriction site
<i>motA</i> -up-F	<u>GGTACCTCGCGGGTGTAGGCGACG</u>	<i>Kpn</i> I
<i>motA</i> -up-R	<u>CATATGGCCCATGGCCATGAAGCC</u>	<i>Nde</i> I
<i>motA</i> -down-F	<u>ACCGGTAAGACCATTCGCGGAAGGC</u>	<i>Age</i> I
<i>motA</i> -down-R	<u>GAGCTCACCGCGAAGTCCATGCGGGT</u>	<i>Sac</i> I

1.2 基因片段 *motA* 的克隆和重组载体的构建

ORS571 菌株培养在含 Amp (100 µg/mL)和 NaI (25 µg/mL)的液体 TY 培养基中振荡过夜培养。收集菌液($OD_{600}=0.6$), 10000 r/min 离心 1 min, 收集菌体, 通过 DNA 提取试剂盒提取细菌的基因组, 并检测其浓度和纯度。4 °C 备用。

以 ORS571 基因组 DNA 为模板, 以 *motA*-up-F/R 为引物扩增上游片段 *motA*-up, 同样以 *motA*-down-F/R 为下游引物扩增 *motA*-down 片段。将 *motA*-up 和 *motA*-down 片段分别与克隆载体 *pEASY*-Blunt Simple 连接, 并将连接产物转入大肠杆菌感受态细胞, 通过蓝白斑和 PCR 确定转化成功的阳性克隆子。将连有上游片段的 *pEASY* 克隆载体与 pCM351 进行酶切与酶连反应, 得到 pCM351::*motA*-up 重组质粒, 将重组质粒导入大肠杆菌感受态细胞, PCR 和质粒酶切确定转化成功的阳性克隆子。以同样的方法, 将连有下游片段的 *pEASY* 克隆载体与 pCM351::*motA*-up 质粒进行酶切与酶连反应, 得到构建成功的 pCM351::*motA*-down 重组质粒。

1.3 突变株 Δ *motA* 的构建

通过三亲接合转移的方法构建茎瘤固氮根瘤菌 Δ *motA* 突变株。按照 10:3:2 的比例混合野生型菌株、含 pCM351::*motA*-down 重组质粒的大肠杆菌 DH5 α 和含辅助质粒 pRK2013 的大肠杆菌 DH5 α , 涂布于含 Amp、NaI 和 Gen 抗生素的 TY

平板上, 37 °C 恒温静置培养。根据同源重组原理, 野生型菌株基因组中的 *motA* 基因会与 pCM351::*motA*-down 重组质粒中的庆大霉素抗性基因发生互换。通过抗生素抗性筛选可能的突变株并通过 PCR 确定构建成功的 Δ *motA* 突变株。

1.4 生长曲线测定

将野生型和突变菌株分别在含抗生素的液体 TY 培养基中振荡过夜培养(37 °C、180 r/min)。分别取 1% 菌液转接至新的 TY 培养基培养至指数生长期($OD_{600}=0.6$), 吸取适量菌液转接至 50 mL TY 培养基中, 使培养液的初始 OD_{600} 为 0.02, 37 °C、180 r/min 振荡培养, 每隔 2 h 取样通过酶标仪测定野生菌和突变菌的 OD_{600} 吸光值。

1.5 趋化能力测定

离心(5000 r/min)收集过夜培养的野生株和突变株菌体, 用不含抗生素的无菌 L3 培养基清洗并将 ORS571 和 Δ *motA* 的 OD_{600} 分别调为 1.0。各取 5 µL 细菌悬浮液分别滴在以乳酸钠为碳源的含氮(10 mmol/L NH₄Cl) L3 (L3+N)半固体(0.3%琼脂)培养基上, 37 °C 静置培养, 观察菌株形成的运动圈的大小。

1.6 固氮能力测定

利用乙炔还原法测定菌株的固氮酶活。方法如下: 将野生型和突变株过夜培养并将 OD_{600} 调

至 0.8, 备用。将 3 mL L3 半固体培养基加入到 5 mL 无菌的青霉素小瓶中, 培养基凝固后接种 10 μ L 菌液, 放入 37 $^{\circ}$ C 培养箱培养 8 h。在无菌条件下将体积分数 10% 的空气抽出并注入 10% 体积(200 μ L) 的乙炔气体, 用封口膜密封; 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h。用微量进样器抽取 100 μ L 气体, 利用气相色谱测定乙烯含量, 并计算固氮酶活性^[15]。

1.7 胞外多糖的观察与定量测定

离心(5000 r/min)收集过夜培养的野生株和突变株菌体, 用不含抗生素的无菌 L3 培养基清洗并将培养液的 OD_{600} 调为 1.0。各取 20 μ L 细菌悬浮液滴在含 40 μ g/mL 刚果红和不含刚果红的 L3+N 固体(0.8% 琼脂)培养基(以乳酸钠为碳源)上, 37 $^{\circ}$ C 静置培养 72 h。刚果红染色平板用于观察菌株产胞外多糖的情况并拍照; 不含刚果红平板利用蒽酮-浓硫酸氧化法进行胞外多糖的定量分析^[3]。以 D-葡萄糖标准液来绘制标准曲线, 胞外多糖的产量以每 OD_{600} 细菌生成多糖的浓度计算。

1.8 生物膜的测定

生物膜的测定参照结晶紫染色法^[16]。收集过夜培养的野生菌和突变菌, 利用无菌 L3 液体培养基清洗 3 次并调整 OD_{600} 为 1.0。取 300 μ L 细菌悬浮液接种于 2 mL 以乳酸钠为碳源的 L3+N 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 静置培养 5 d 后, 弃细菌培养液, 并用无菌水清洗试管 3-5 次。向清洗后的试管中加入 3 mL 0.1% 的结晶紫溶液染色 20 min, 移除染色液, 无菌水清洗试管 3-5 次, 观察野生菌和突变菌的生物膜形成情况并拍照。为了定量测定生物膜的形成情况, 将同样染色处理的试管清洗并烘干, 加入 1 mL 30% 乙醇溶解与生物膜结合的结晶紫, 利用酶标仪检测在 590 nm 波长下的吸

光值。

1.9 菌株根系黏附效果测定

毛萼田菁种子在浓硫酸中浸泡 30 min 催芽, 无菌水洗涤 3 次后在无菌培养皿中 37 $^{\circ}$ C 浸泡发芽 72 h, 每 12 h 换水 1 次去除种子分泌物。将过夜培养的野生型 ORS571 细菌培养液和突变株细菌培养液转接至新的 TY 培养基, 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养至对数期, 清洗并重悬菌液至 $OD_{600}=0.8$, 将野生株和突变株菌液分别浸泡田菁根芽 1 h, 用无菌水充分清洗根芽 7 次去除未黏附的细菌。无菌条件下捣碎根芽并添加 1 mL 无菌水混合, 将混合液稀释 10^3 倍后吸取 50 μ L 涂布在含 Amp 和 NaI 抗生素的 TY 培养基(培养野生株)或者含 Amp 和 Gen 抗生素的 TY 培养基(培养突变株)。将平板放置在 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱静置培养 2 d 后计数各个平板上生长的菌落数。

1.10 数据分析

每个实验至少重复 3 次。实验数据利用 SPSS 中的 t 检验进行数据分析, $P < 0.05$ 表示差异明显。

2 结果和分析

2.1 鞭毛马达蛋白 *motA* 基因分析

由图 1 可知, 鞭毛马达蛋白 *motA* 基因位于 ORS571 基因组中(714856...715746=891 bp), 该基因中含有一个预测的 MotA 质流通道结构域 MotA/TolQ/ExbB proton channel (IPR002898), 负责向转子传递质子和动力。*motA* 基因位于鞭毛基因簇的中部(图 1-A), 左侧为鞭毛运动基因, FliG、FliM 和 FliN 构成作为转子并控制马达旋转方向的 C 环, MotA、MotB、FliG、FliM 和 FliN 共同负责细菌鞭毛运动的旋转。右侧为鞭毛合成基因,

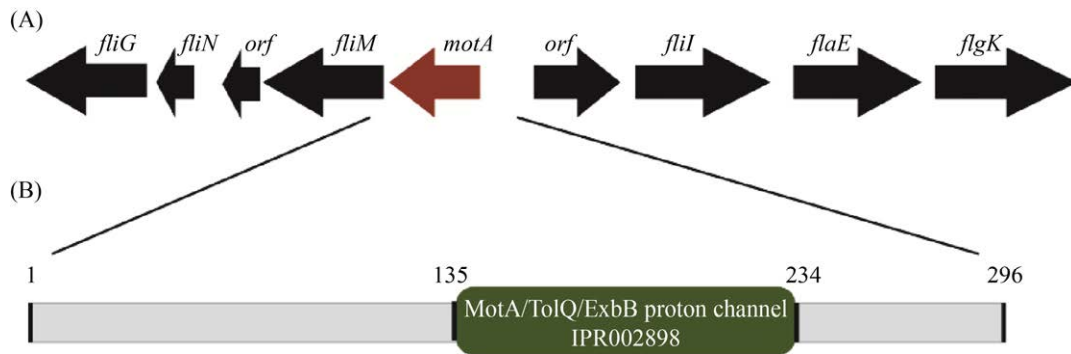


图 1. 鞭毛马达蛋白 *motA* 基因在 ORS571 染色体上的排布(A)及其结构域(B)

Figure 1. Physical map (A) of *motA* gene and the domain (B) of the MotA protein. The arrows indicate the direction of transcription.

可溶蛋白 FliI 参与构成鞭毛第三分泌系统；FlgK 与 FlgL 组成连接钩子与鞭毛丝的钩子相关蛋白；FlaE 是受 σ^{28} 控制的极性鞭毛蛋白。

2.2 突变株 $\Delta motA$ 的构建

根据同源重组原理(图 2-A)，野生株 ORS571 基因组的 *motA* 基因与 pCM351 重组质粒的庆大霉素抗性基因发生替换，筛选到能够在含 Amp

和 Gen 抗生素的 TY 培养基中生长的接合子。利用 *motA*-up-F 和 *motA*-down-R 引物对野生型和接合子进行 PCR 扩增验证，结果表明(图 2-B)，野生型中扩增出的片段与接合子扩增出的片段大小明显不同，将接合子扩增片段测序，结果显示接合子中 *motA* 基因片段被庆大霉素抗性基因代替，结果表明成功构建了突变株 $\Delta motA$ 。

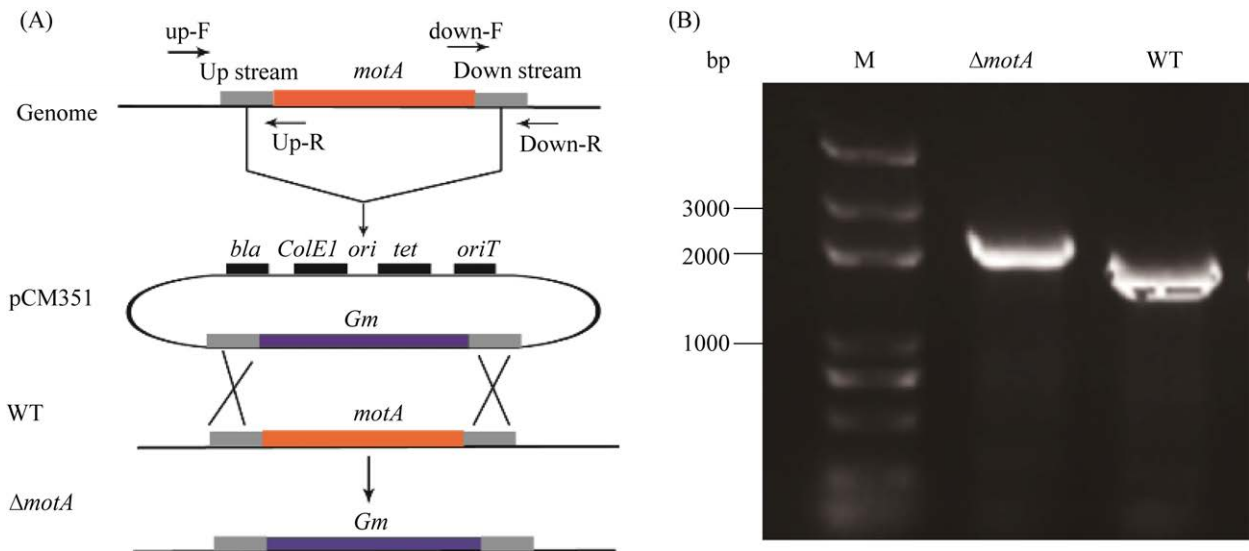


图 2. 突变株 $\Delta motA$ 敲除原理(A)与 PCR 验证(B)

Figure 2. The strategy for *motA* knockout (A) and PCR confirmation (B) of the mutant $\Delta motA$. M: marker; $\Delta motA$: the genomic DNA of $\Delta motA$ mutant strain; WT: the genomic DNA of wild-type strain.

2.3 *motA* 对菌株生长的影响

为了观察 *motA* 基因敲除之后对菌株的生长是否产生影响, 将野生型和突变株接种在 TY 培养基中, 37 °C 振荡培养, 测定 40 h 内细菌的 OD_{600} 值并绘制成图。如图 3 所示, 突变体与野生型在 2 h 后进入指数增长期, 20 h 后进入稳定期, 两者生长曲线无明显差异, 结果表明 *motA* 的缺失不影响菌株的生长。

2.4 *motA* 对运动能力的影响

MotA 属于鞭毛蛋白, 在鞭毛运动调控中具有至关重要的作用, 缺失 *motA* 基因的空肠弯曲菌在半固体平板上的迁移能力明显下降^[11]。为了探究 $\Delta motA$ 突变株的运动能力, 对野生型和突变株进行了运动能力测定, 并以丧失趋化能力的 $\Delta fliM$ 突变株作为阴性对照。由图 4 可知, $\Delta motA$ 突变株在 L3+N 半固体平板(以乳酸钠为碳源)上无法形成运动圈。说明 *motA* 的缺失使得 ORS571 的运动能力丧失, *motA* 基因在菌株的运动方面起着关键性的作用。

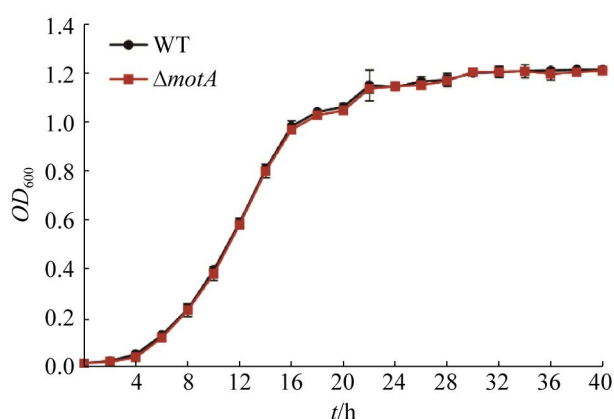


图 3. 野生型(WT)和突变株 $\Delta motA$ 的生长曲线
Figure 3. The growth curves of wild-type (WT) and $\Delta motA$ mutant.

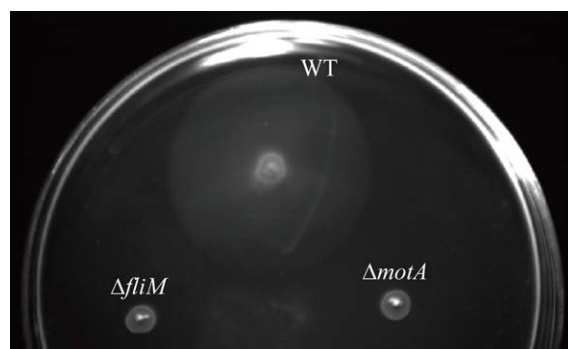


图 4. 野生型(WT)和突变株 $\Delta motA$ 的运动能力
Figure 4. The motility abilities of wild-type (WT) and $\Delta motA$ mutant to sodium lactate. $\Delta fliM$ ^[17]: *fliM* deletion mutant without motility ability, indicates negative control.

2.5 *motA* 对菌体固氮能力的影响

茎瘤固氮根瘤菌 ORS571 具有共生固氮和自生固氮的双重功能, 利用乙炔还原法测定菌株的固氮酶活, 用气相色谱测定乙烯转化为乙炔的转化率表示固氮能力。由图 5 可知, 野生型固氮酶活性是 0.450 nmol/h, 突变体的固氮酶活性为 0.035 nmol/h, 仅为野生型的 7.8%, 突变体几乎失去固氮能力, 结果表明 *motA* 在茎瘤固氮根瘤菌的固氮体系中起着关键性作用。

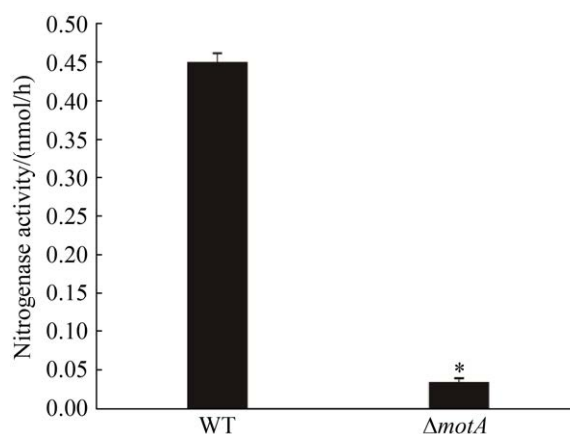


图 5. 野生型(WT)和突变株 $\Delta motA$ 的固氮酶活性
Figure 5. The nitrogenase activity of wild-type (WT) and $\Delta motA$ mutant. *: statistically significant difference $P < 0.05$.

2.6 *motA* 对胞外多糖合成的影响

胞外多糖(EPS)在细菌的定殖、宿主识别、宿主侵染过程中具有非常重要的作用,同时还可以作为结构成分或信号分子保护根瘤菌免受植物分泌物的侵害^[18-20]。为了探究 *motA* 对 ORS571 分泌 EPS 的影响,定量测定了野生型和突变株 EPS 的产生能力。如图 6 所示,野生 ORS571 合成胞外多糖 0.075 mg/OD₆₀₀,菌落表面湿润, Δ *motA* 突变株胞外多糖的合成量相比于野生型 ORS57 减少 26.7%,结果表明 *motA* 缺失会明显减少菌体胞外多糖的合成。

2.7 *motA* 对生物膜形成的影响

生物膜是指细菌依附于生命体或非生命体表面形成的被细菌胞外聚合物包裹的群落,包含

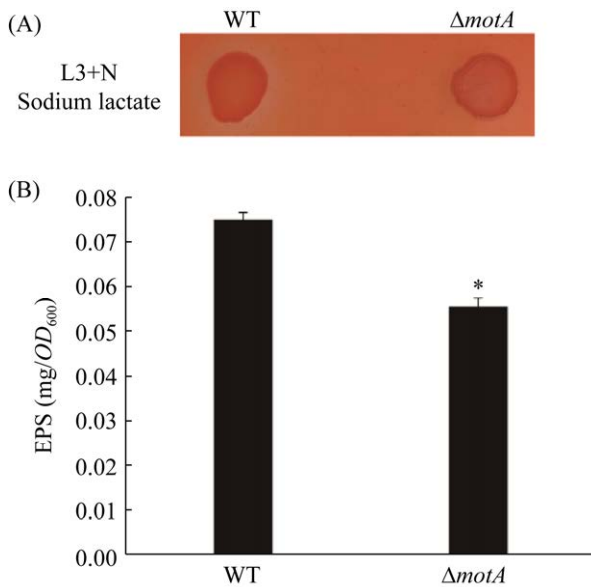


图 6. 野生型(WT)和突变株 Δ *motA* 产胞外多糖的表型(A)和定量(B)测定

Figure 6. The colony morphology of wild-type (WT) and Δ *motA* mutant grown on L3 plates containing Congo red (A) and quantitative analysis of EPS produced by wild-type (WT) and Δ *motA* mutant (B). *: statistically significant difference $P < 0.05$.

多糖、蛋白质、核酸和脂质。生物膜的形成有利于细菌在恶劣的环境中生存或与宿主建立共生关系^[21]。为了探究突变株 Δ *motA* 生物膜的形成能力是否受到影响,通过结晶紫染色法观察突变株和野生型的生物膜形成情况。结晶紫染色后观察发现(图 7),野生型比突变株形成的生物膜颜色更深,边际线也更粗;相比于野生型, Δ *motA* 突变株形成生物膜的量减少 34.2%。结果说明 *motA* 的缺失抑制了生物膜的形成,*motA* 在茎瘤固氮根瘤菌的生物膜形成中起着重要的作用。

2.8 *motA* 对菌体在植物根系定殖的影响

ORS571 分离自毛茛田菁的茎瘤中,能跟多种田菁属植物建立共生关系^[22]。为了探究 *motA*

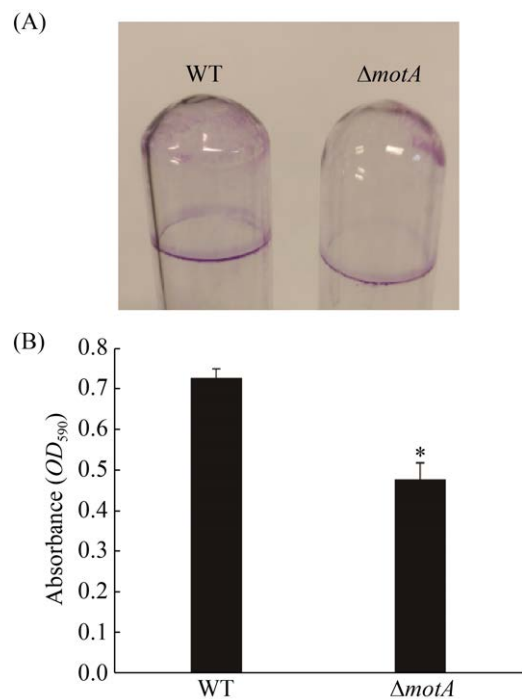


图 7. 野生型(WT)和突变株 Δ *motA* 产生物膜的表型(A)与定量(B)测定

Figure 7. The biofilm morphology (A) and quantification (B) of crystal violet staining between wild-type (WT) and Δ *motA* mutant. *: statistically significant difference $P < 0.05$.

的缺失对 ORS571 在宿主植物根部的黏附能力是否有影响, 本研究通过黏附筛选实验来计算吸附的突变体菌和野生型菌的比例。结果如图 8, 在稀释 10^3 倍的平板中分别分离到野生型菌落 148 个, $\Delta motA$ 突变株菌落 101 个, 黏附比例约为 1.5。这一结果说明 *motA* 的缺失会削弱 ORS571 菌株对宿主植物根系的黏附能力。

3 讨论

在细菌的生存和发展过程中, 鞭毛扮演者重要的角色。与其他结构一样, 鞭毛的形成与表达同样由基因控制, 其中, 由 *motA*、*motB*、*fliG*、*fliM*、*fliN* 编码的蛋白负责鞭毛马达的驱动, 在鞭毛的运动中起关键作用。通过对 ORS571 基因组中 *motA* 基因进行生物学信息分析发现, *motA* 位于鞭毛基因簇中, 其编码的蛋白包含 MotA 质子流通道结构域(MotA/TolQ/ExbB proton channel)。已有研究表明, MotA 可以与 MotB 构成跨膜质子通道; 可以与 FliG 发生静电作用, 使转子产生转

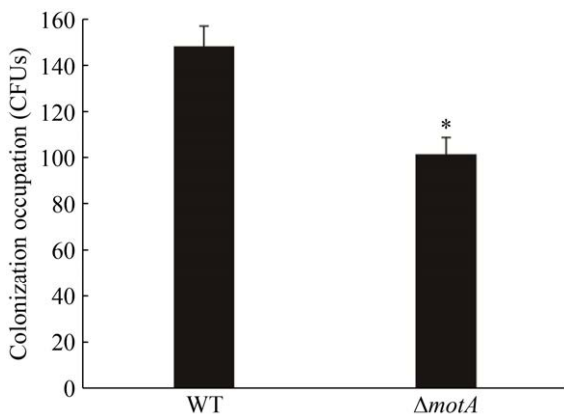


图 8. 野生型(WT)和突变株 $\Delta motA$ 根系定殖能力分析
Figure 8. The analysis of colonization ratio on roots between wild-type (WT) and $\Delta motA$ mutant. CFUs indicates colony-forming units, *: statistically significant difference $P < 0.05$.

矩^[23-24]; 也可以与 MotI (motility inhibitor)相互作用抑制鞭毛旋转^[25]。本研究通过同源重组原理和三亲接合转移方式成功构建 *motA* 缺失突变株 $\Delta motA$, 在不影响生长的前提下, $\Delta motA$ 缺失突变株的运动能力完全丧失。由此可见鞭毛马达基因 *motA* 对 ORS571 菌株的运动至关重要。这一现象在空肠弯曲菌的 *motA* 缺失突变株迁移实验中同样得到证实^[11]。

与野生型菌株相比, $\Delta motA$ 突变株的固氮、EPS 合成、生物膜形成以及根系定殖能力分别下降 92.2%、26.7%、34.2%、31.8%。*A. caulinodans* 属需氧微生物, 在微好氧的情况下固氮^[1]。*motA* 的缺失使 ORS571 丧失运动能力, 我们猜测细菌可能由于无法运动到与空气接触的最适位置而难以维持原有的固氮水平。另一方面, 固氮酶催化的生物固氮是一个耗能过程, 需要消耗大量 ATP。鞭毛 III 型分泌系统中, FliI、FliH 和 FliJ 构成胞质 ATP 酶复合物, 负责水解 ATP, 释放能量^[26-27]; 且研究发现 MotA 参与调控 *fliI* 和 *fliH* 基因的表达^[28], 因此猜测本实验 $\Delta motA$ 突变株固氮能力减弱还可能是因为 *motA* 缺失影响了下游基因 *fliI* 和 *fliH* 的表达, 进而影响了 ATP 的水解以及能量的产生, 具体的调控机制还有待进一步验证。已有研究证明 EPS 会对细菌的运动产生影响, EPS 合成受损的枯草芽孢杆菌其运动能力明显减弱^[29]; Liu 也发现产 EPS 少的突变株其泳动能力减弱^[30]。旋转的鞭毛驱动细菌的运动, 同时消耗大量能量产生粘液层作为表面活性剂或湿润剂降低细菌之间的张力来促进运动^[31-33]。推测由于运动能力的丧失, 细菌不再需要产生过多的 EPS 来配合细菌运动。趋化能力受损的 *cheA* 缺失突变株和运动能力完全丧失的 *fliM* 缺失突变株合成 EPS 的能力减弱, 进一步证实了细菌运动与

EPS 合成可能存在相互影响^[3]。细菌产生生物膜(多糖、蛋白质、核酸和脂质)来抵御外界不良环境的胁迫或者促进定殖^[34–35]。EPS 作为生物膜的关键成分^[36], 同样对细菌在宿主植物表面的定殖和结瘤至关重要^[18,37]。由此推测, *motA* 缺失后, ORS571 的生物膜形成能力和定殖能力减弱可能与突变株 EPS 分泌减少有关。

本文研究了茎瘤固氮根瘤菌鞭毛马达蛋白 MotA 对细菌生理特性的影响。研究表明, *motA* 缺失突变株在不影响细菌正常生长的前提下, 使得细菌趋化能力完全丧失, 固氮、EPS 分泌和生物膜形成能力减弱, 进而导致细菌与植物共生能力即根系定殖能力减弱。定殖是结瘤的前提, ORS571 的 *motA* 缺失突变株定殖能力减弱, 固氮能力几乎完全丧失, 因此有可能导致细菌在植物表面结瘤能力减弱, 后续还需要进一步验证 MotA 蛋白对细菌结瘤作用的影响; 并从分子水平上探究 *motA* 基因缺失时固氮酶活性明显下降的原因。总之, ORS571 中 *motA* 基因的发现为探究鞭毛马达调控作用增加了新的内容, 同时为探究根瘤菌共生固氮机理提供了新的方向。

参 考 文 献

- [1] Dreyfus B, 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 Bacteriology*, 1988, 38(1): 89–98.
- [2] Scharf BE, Hynes MF, Alexandre GM. Chemotaxis signaling systems in model beneficial plant-bacteria associations. *Plant Molecular Biology*, 2016, 90(6): 549–559.
- [3] Liu W, Sun Y, Shen RM, Dang XX, Liu XL, Sui F, Li Y, Zhang ZP, Alexandre G, Elmerich C, Xie ZH. A chemotaxis-like pathway of *Azorhizobium caulinodans* controls flagella-driven motility, which regulates biofilm formation, exopolysaccharide biosynthesis, and competitive nodulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2018, 31(7): 737–749.
- [4] Appelt S, Heuner K. The flagellar regulon of *Legionella*—A review. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017, 7: 454. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00454.
- [5] Minamino T, Kinoshita M, Namba K. Directional switching mechanism of the bacterial flagellar motor. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2019, 17: 1075–1081.
- [6] Minamino T, Imada K. The bacterial flagellar motor and its structural diversity. *Trends in Microbiology*, 2015, 23(5): 267–274.
- [7] Garza AG, Harris-Haller LW, Stoebner RA, Manson MD. Motility protein interactions in the bacterial flagellar motor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, 92(6): 1970–1974.
- [8] Blair DF, Berg HC. The MotA protein of *E. coli* is a proton-conducting component of the flagellar motor. *Cell*, 1990, 60(3): 439–449.
- [9] Morimoto YV, Nakamura S, Hiraoka KD, Namba K, Minamino T. Distinct roles of highly conserved charged residues at the MotA-FliG interface in bacterial flagellar motor rotation. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195(3): 474–481.
- [10] Suzuki Y, Morimoto YV, Oono K, Hayashi F, Oosawa K, Kudo S, Nakamura S. Effect of the MotA (M206I) mutation on torque generation and stator assembly in the *Salmonella* H⁺-driven flagellar motor. *Journal of Bacteriology*, 2019, 201(6): 18–31.
- [11] Ruan P, Sun AH, Zhao X, Yan J. Contribution of *motA* gene in pathogenesis-associated chemotaxis and colonization of *Campylobacter jejuni*. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology*, 2010, 30(3): 195–200. (in Chinese)
阮萍, 孙爱华, 赵欣, 严杰. *motA* 基因在空肠弯曲菌致病性相关趋化和定植中的作用. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2010, 30(3): 195–200.
- [12] Marx CJ, Lidstrom ME. Broad-host-range cre-lox system for antibiotic marker recycling in gram-negative bacteria. *BioTechniques*, 2002, 33(5): 1062–1067.
- [13] Ditta G, Stanfield S, Corbin D, Helinski DR. Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1980, 77(12): 7347–7351.

- [14] Sun Y, Liu YN, Liu XL, Dang XX, Dong XY, Xie ZH. *Azorhizobium caulinodans* c-di-GMP phosphodiesterase Chp1 involved in motility, EPS production, and nodulation of the host plant. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(6): 2715–2729.
- [15] Wang WS, Yang SQ, Yang ZL. Isolation and characterization of nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria from potato rhizosphere of reclaimed cropland. *Journal of Northwest A & F University: Natural Science Edition*, 2019, 47(8): 127–133, 143. (in Chinese)
王惟帅, 杨世琦, 杨正礼. 新造地马铃薯根际固氮解磷微生物的分离与鉴定. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2019, 47(8): 127–133, 143.
- [16] Liu XL, Zhang KY, Liu YN, Zou DS, Wang DD, Xie ZH. Effects of calcium and signal sensing systems on *Azorhizobium caulinodans* biofilm formation and host colonization. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 563367.
- [17] Shen RM, Liu W, Sun Y, Li RZ, Xie ZH. Function analysis of flagellar genes *fliN* and *fliM* in *Azorhizobium caulinodans* ORS571. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(5): 882–892. (in Chinese)
沈日敏, 刘卫, 孙雨, 李润植, 解志红. 茎瘤固氮根瘤菌 ORS571 鞭毛马达基因 *fliN* 与 *fliM* 的功能分析. *微生物学报*, 2018, 58(5): 882–892.
- [18] Mathis R, Van Gijsegem F, De Rycke R, D’Haeze W, Van Maelsaeke E, Anthonio E, Van Montagu M, Holsters M, Vereecke D. Lipopolysaccharides as a communication signal for progression of legume endosymbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(7): 2655–2660.
- [19] Wakao S, Siarot L, Aono T, Oyaizu H. Effects of alteration in LPS structure in *Azorhizobium caulinodans* on nodule development. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2015, 61(6): 248–254.
- [20] Liu XL, Xie ZH. Inactivation of the phosphatase CheZ alters cell-surface properties of *Azorhizobium caulinodans* ORS571 and symbiotic association with *Sesbania rostrata*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2019, 32(11): 1547–1556.
- [21] Tallawi M, Opitz M, Lieleg O. Modulation of the mechanical properties of bacterial biofilms in response to environmental challenges. *Biomaterials Science*, 2017, 5(5): 887–900.
- [22] Boivin C, Ndoye I, Lortet G, Ndiaye A, de Lajudie P, Dreyfus B. The *Sesbania* root symbionts *Sinorhizobium saheli* and *S. teranga* bv. *sesbaniae* can form stem nodules on *Sesbania rostrata*, although they are less adapted to stem nodulation than *Azorhizobium caulinodans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(3): 1040–1047.
- [23] Zhou J, Lloyd SA, Blair DF. Electrostatic interactions between rotor and stator in the bacterial flagellar motor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(11): 6436–6441.
- [24] Kojima S, Blair DF. Conformational change in the stator of the bacterial flagellar motor. *Biochemistry*, 2001, 40(43): 13041–13050.
- [25] Subramanian S, Gao XH, Dann CE, Kearns DB. MotI (DgrA) acts as a molecular clutch on the flagellar stator protein motA in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(51): 13537–13542.
- [26] Bai F, Morimoto YV, Yoshimura SDJ, Hara N, Kami-Ike N, Namba K, Minamino T. Assembly dynamics and the roles of FliI ATPase of the bacterial flagellar export apparatus. *Scientific Reports*, 2014, 4: 6528.
- [27] Minamino T. Protein export through the bacterial flagellar type III export pathway. *Biochimica et Biophysica Acta: BBA - Molecular Cell Research*, 2014, 1843(8): 1642–1648.
- [28] 邓志文. 禽致病性大肠杆菌 *motA/B*、*cheA/Y* 在 *phoP/Q* 调控鞭毛 T3SS 中的作用研究. 安徽农业大学硕士学位论文, 2019.
- [29] Nagórska K, Ostrowski A, Hinc K, Holland IB, Obuchowski M. Importance of *eps* genes from *Bacillus subtilis* in biofilm formation and swarming. *Journal of Applied Genetics*, 2010, 51(3): 369–381.
- [30] Liu A, Mi ZH, Zheng XY, Yu Y, Su HN, Chen XL, Xie BB, Zhou BC, Zhang YZ, Qin QL. Exopolysaccharides play a role in the swarming of the benthic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. SM9913. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 473.
- [31] Verstraeten N, Braeken K, Debkumari B, Fauvart M, Franssaer J, Vermant J, Michiels J. Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends in Microbiology*, 2008, 16(10): 496–506.
- [32] Kearns DB. A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8(9): 634–644.

- [33] Crespi BJ. The evolution of social behavior in microorganisms. *Trends in Ecology & Evolution*, 2001, 16(4): 178–183.
- [34] Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8(9): 623–633.
- [35] Yaron S, Römmling U. Biofilm formation by enteric pathogens and its role in plant colonization and persistence. *Microbial Biotechnology*, 2014, 7(6): 496–516.
- [36] Fulaz S, Vitale S, Quinn L, Casey E. Nanoparticle-biofilm interactions: the role of the EPS matrix. *Trends in Microbiology*, 2019, 27(11): 915–926.
- [37] Mitra S, Mukherjee A, Wiley-Kalil A, Das S, Owen H, Reddy PM, Ané JM, James EK, Gyaneshwar P. A rhamnose-deficient lipopolysaccharide mutant of *Rhizobium* sp. IRBG74 is defective in root colonization and beneficial interactions with its flooding-tolerant hosts *Sesbania cannabina* wetland rice. *Journal of Experimental Botany*, 2016, 67(19): 5869–5884.

Functional analysis of *motA* gene in *Azorhizobium caulinodans* ORS571

Li Sun¹, Dandan Wang¹, Zhiqiu Yin¹, Yongqiang You², Runjin Liu³, Zhihong Xie^{1*}

¹ College of Resources and Environment, Shandong Agricultural University, Tai'an 271000, Shandong Province, China

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

³ College of Plant Health & Medicine, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266000, Shandong Province, China

Abstract: [Objective] MotA, an important flagellar motor protein regulating flagellar motility, is one of components of transmembrane proton channel. In this study, we explored the role of *motA* in *Azorhizobium caulinodans* ORS571 in the free-living and symbiotic states. [Methods] Δ *motA* mutant was constructed by homologous recombination and tri-parental conjugation. We tested the characterizations of the growth state, swimming motility, nitrogen fixation, exopolysaccharides (EPS) production, biofilm formation, and host colonization between wild-type and Δ *motA* mutant. [Results] Δ *motA* mutant showed defective cell motility ability but the growth property was not impaired, and its nitrogen fixation, EPS production, biofilm formation, and host colonization were lower than that of the wild-type. [Conclusion] In *A. caulinodans* ORS571, MotA plays role in motility, nitrogen fixation, EPS production, biofilm formation, and root colonization.

Keywords: *Azorhizobium caulinodans* ORS571, flagellar motor protein, *motA*

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31870020) and by the NSFC-Shandong Joint Fund Key Projects (U1806206)

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

Received: 12 March 2021; Revised: 30 April 2021; Published online: 29 September 2021