

余福燕,邹倩,阎春兰,等.华癸中慢生根瘤菌 $atpA$ 基因在共生固氮中的功能研究[J].华中农业大学学报,2025,44(4):133-142.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2025.04.013

华癸中慢生根瘤菌 $atpA$ 基因在共生固氮中的功能研究

余福燕,邹倩,阎春兰,程国军

中南民族大学生命科学学院,武汉 430074

摘要 为探究华癸中慢生根瘤菌7653R ABC转运体渗透酶基因 $atpA$ 在根瘤菌与豆科植物共生固氮中的作用,利用单交换插入突变获得 $atpA$ 基因突变体,研究其在自生生长及与紫云英共生条件下的功能。结果显示: $atpA$ 基因突变会使根瘤菌提前进入稳定期,减弱其生物膜形成能力。接种突变株的植株叶片泛黄、缺氮症状突出,其植株高度、地上部分鲜质量、结瘤数和固氮酶活性分别降低了14.3%、33.3%、31.5%和18.8%。通过蛋白质组学分析,突变株类菌体中共鉴定到78个差异表达蛋白,其中23个表达上调,55个表达下调。在这些差异表达蛋白中,有10个氨基酸转运相关蛋白和12个固氮复合物形成相关蛋白。研究表明,华癸中慢生根瘤菌ABC转运体渗透酶基因 $atpA$ 在根瘤菌生长及与宿主紫云英共生过程中起着至关重要的作用。

关键词 华癸中慢生根瘤菌7653R; ABC转运体渗透酶; 共生固氮; 蛋白组学分析

中图分类号 S154.3 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2025)04-0133-10

自然界中氮元素很丰富,但植物却不能直接利用,可用氮的缺乏常常限制植物的生长^[1]。植物获取养分的一个主要途径是通过固氮作用,其中与农业最为直接相关的是根瘤菌将二氮(N_2)还原为铵(NH_4^+)来获得氮化合物以弥补土壤中的低氮环境^[2]。华癸中慢生根瘤菌7653R (*Mesorhizobium huakuii* 7653R)可与宿主豆科植物紫云英(*Astragalus sinicus* L.)建立共生关系形成不定型根瘤^[3-4]。其中,根瘤内含有大量的可以固氮的类菌体,而类菌体内的固氮酶能将空气中的游离氮转变成植物可利用的化合氮,同时植物为根瘤菌提供所需要的营养物质,两者实现互惠互利^[5]。

ABC转运体渗透酶(ABC transporter permease)来自膜转运ABC蛋白家族,广泛存在于各种生物体中,包括细菌、古菌、真菌、植物和动物等^[6]。它们能利用ATP水解产生的能量来驱动离子、氨基酸、糖类、肽类等多种底物的跨膜转运^[7-8]。细菌ABC转运体渗透酶也参与多种生化过程,如多药耐药性、蛋白质分泌、群体感应以及营养摄取等^[9]。在建立根瘤菌与豆科植物的共生关系之前,细菌必须在土壤环境中茁壮成长,与其他生物体竞争营养物质。关键营养物质的转运体,如氨基酸,可能会给根瘤菌提供竞

争优势,使它们能够更好地在根部定植从而获取营养。有研究报道在豆科植物根瘤菌中编码ABC转运体的基因突变后会消除甘油的所有运输途径^[10]。编码氨基酸透性酶基因 aap 和 bra 双突变后,会导致根瘤菌不能吸收相应必需氨基酸,使其生长受到影响^[9]。因此,这也是为什么根瘤菌中存在大量高亲合力ABC转运体的原因^[11-12]。

为进一步探究ABC转运体渗透酶在共生固氮中的功能,本研究通过生物信息学分析发现,在华癸中慢生根瘤菌7653R基因组中存在编码ABC转运体渗透酶的基因 $atpA$,并通过基因同源重组技术构建了7653R $atpA$ 基因突变株,研究该菌株在自生生长及与紫云英共生条件下的功能,旨在阐明ABC转运体渗透酶在共生固氮中的功能及作用机制,为农业生产中提高豆科植物的固氮能力提供新的策略。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒与培养基

本研究所用菌株及质粒见表1,除 *E. coli* DH5 α 外均来自笔者所在生物技术国家重点实验室。使用TY培养基培养根瘤菌(*Mesorhizobium huakuii*

收稿日期:2024-06-17

基金项目:国家自然科学基金项目(32372809)

余福燕,E-mail:2445370419@qq.com

通信作者:阎春兰,E-mail:yanchunlan@mail.scuec.edu.cn

7653R)。使用AMS培养基筛选突变体,培养条件为28℃。使用LB培养基培养大肠杆菌(*Escherichia coli*,*E. coli*),培养条件为37℃。所用抗生素及质量浓度:卡那霉素(Kan)20μg/mL,链霉素(Str)500μg/mL,新霉素(Neo)80μg/mL、250μg/mL,均溶于ddH₂O且需要0.2μm无菌滤膜过滤。

表1 本研究所用菌株和质粒
Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株(质粒) Strains(Plasmids)	描述 Description	来源 Sources
<i>E.coli</i> DH5α	F lacZDM15 recA1 hsdR17 supE44 D(lacZYA argF)	TaKaRa
<i>M.huakuii</i> 7653R	Wild-type, Nod ⁺ on <i>Astragalus sinicus</i> 7653R	笔者实验室 This lab
pK19mob	pK19mob pUC19 derivative lacZ mob; Km ^r	笔者实验室 This lab
pRK2033	用于接合转移的辅助质粒 Helper plasmid used for mobilizing plasmids; Km ^r	笔者实验室 This lab
pBBR1MCS-5	lacPOZ mob, broad host range, Gm ^r	笔者实验室 This lab
pKatP	atpA-F/atpA-R PCR product in pK19mob, Km ^r	笔者实验室 This lab
pBBRatpA	C-atpA-F/C-atpA-R PCR product in pBBR1MCS-5, Gm ^r	笔者实验室 This lab
HKatpA	7653R:: atpA, Str ^r Neo ^r	笔者实验室 This lab
HKatpA(pBBRatpA)	HKatpA carrying atpA gene, Str ^r Neo ^r Gm ^r	笔者实验室 This lab

1.2 主要试剂与仪器

本研究所用的 *Xba* I、*Hind* III 等限制性内切酶以及 Ex *Taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶等购自 TaKaRa 公司。细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自北京索莱宝公司。DNA 凝胶回收试剂盒和质粒 DNA 提取试剂盒购自南京诺唯赞公司。PCR 仪购自 BIO-RAD 公司, PCR 引物的合成和 DNA 的测序工作由武汉擎科公司完成。蛋白质组学分析所用试剂购自国药集团、Sigma-Aldrich、ThermoFisher Scientific、Solarbio 以及 Merck Millipore。BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.3 引物

所用引物见表 2, 引物由 Primer 5.0 软件设计。

1.4 生物信息学分析

在 NCBI 网站查找华癸中慢生根瘤菌(*Mesorhizobium huakuii*)7653R 的全基因组 DNA 序列, 根据目的基因的 ID 名称 MCHK_8397 获取其编码的氨基酸序列。然后使用 NCBI 的 Protein BLAST 工具进行比对分析, 确定目的基因编码蛋白所属家族及其保守结构域, 并通过 ExPASy ProtParam 网站预测目的基因编码蛋白的分子质量、等电点、氨基酸组成稳定性等理化性质。

表2 本研究所用引物及其序列
Table 2 The primers and sequences used in this study

引物名称 Primers	序列 Sequences (5'→3')	描述 Description
atpA-F	TTTA <u>AAGCTT</u> GACGAAGACTAGGGCGATGA	Sense primer for atpA mutation
atpA-R	TTTT <u>CTAGA</u> ATCCTGATGGCGATGGTCTG	Antisense primer for atpA mutation
atpA-MP	TTGTAACCGCCTATTGGAC	Mapping PCR primer for atpA mutation
C-atpA-F	TTT <u>GGTACCA</u> GAGGCCGTGCCGGATTAC	Sense primer for atpA complementary mutation
C-atpA-R	TTT <u>TCTAGA</u> CGCGCGCTCTCATGGAAT	Antisense primer for atpA complementary mutation
pK19-F	ATCAGATCTTGATCCCCTGC	pK19mob mapping primer
pK19-R	GCACGAGGGAGCTTCAGGG	pK19mob mapping primer
M13-F	CGCCAGGGTTTCCAGTCACGAC	Sense primer for LacZ
M13-R	CACACAGAACAGCTATGAC	Antisense primer for LacZ
QatpA-F	CCCCGGTCGTTGGTCATCTT	Sense primer for qRT-PCR of atpA
QatpA-R	ATCGACTGGCTTGATCAAGGT	Antisense primer for qRT-PCR of atpA
QgyrB-F	TTCGACCAGAACATTCCTACAA	Sense primer for qRT-PCR of gyrB
QgyrB-R	GCTCATTTCGAAGATCTGGC	Antisense primer for qRT-PCR of gyrB

注:引物序列中划线部分为限制性位点。Note: Restriction sites in primer sequences are underlined.

1.5 $atpA$ 基因突变株及回复菌株的构建

利用单交换插入突变获得 $atpA$ 基因突变体^[13]。构建过程如下:以 $M. huakuii$ 7653R总DNA为模板, $atpA$ 基因的PCR引物扩增出目的片段,测序正确后进行双酶切,与消化的pK19mob载体进行连接,得到重组质粒pKatpA。以 $M. huakuii$ 7653R作为受体菌,以含有pRK2013质粒以及pKatpA质粒的大肠杆菌分别作为辅助菌和供体菌,三者进行杂交后,通过抗生素筛选以及以pK19-F/R和 $atpA$ -MP为引物进行菌落PCR验证,获得 $atpA$ 基因突变体菌株HKatpA。

使用表达载体pBBR1MCS-5构建重组质粒pB-BRatpA:以 $M. huakuii$ 7653R总DNA为模板,C- $atpA$ -F和C- $atpA$ -R为引物进行PCR扩增,扩增出含有启动子区的 $atpA$ 基因片段。对经过回收纯化后的 $atpA$ 基因片段进行双酶切,并与质粒pBBR1MCS-5连接,将酶连产物转入感受态DH5 α 中,转化子用单酶切和测序进行验证,获得阳性转化子pBBRatpA。以 $atpA$ 基因突变株HKatpA为受体菌,pRK2013为辅助菌,阳性转化子(重组质粒pBBRatpA)为供体菌进行有效三亲本接合,经抗生素筛选后挑取单菌落,以M13-F和M13-R为引物进行菌落PCR验证,获得回复菌株HKatpA(pBBRatpA)。

1.6 菌株生长曲线的测定

将华癸中慢生根瘤菌7653R、突变株HKatpA以及回复菌株HKatpA(pBBRatpA)接种到含相应抗生素的TY斜面上,28℃培养箱培养2 d。用无菌水洗脱菌体,以1%的接种量接种到TY和AMS液体培养基中,并使其初始OD_{600 nm}=0.01,置于恒温振荡摇床培养,间隔时间取样测定菌液OD_{600 nm}值并绘制生长曲线,每个菌进行3组平行重复。

1.7 菌株生物膜形成能力的测定

参考Tian等^[14]的方法,对根瘤菌生物膜形成能力进行测定。将野生型7653R、突变株HKatpA接种到含相应抗生素的TY斜面上,28℃培养2 d。用无菌水将菌体洗脱下来接种到装有1 mL YMA液体培养基的试管中,恒温振荡培养2 d。将培养基倒出,用蒸馏水洗涤2次后,加入结晶紫溶液染色,再用蒸馏水冲洗未结合生物膜的结晶紫溶液。待试管风干后,加入95%乙醇室温静置2 h,测定其OD_{590 nm},用t检验分析其显著性($P<0.05$)。

1.8 植物盆栽试验

紫云英种子分别用75%乙醇和2%次氯酸钠消

毒,再用无菌水清洗8~10遍并浸泡7 h使其饱胀,用镊子挑选粒形饱满的种子均匀平铺至1%的琼脂平板上,室温避光倒置催芽2 d使其发芽。夹取已发芽的种子播种于已灭菌蛭石中,根部朝下,薄盖一层蛭石。每盆种4株,用保鲜膜封口后置于光照培养箱中,16 h光照、8 h黑暗培养7 d,接种不同根瘤菌于紫云英根部。继续培养,期间观察植株长势并用营养液定期浇灌。

1.9 $atpA$ 基因在不同时期根瘤中的表达

1)根瘤菌RNA的抽提。将野生型7653R和突变株HKatpA接种到含相应抗生素的TY斜面上,28℃培养2 d。洗脱菌体,接种到AMS液体培养基中培养至对数期,离心收集沉淀。加入Trizol试剂进行裂解,再加入氯仿剧烈振荡,静置分层后取上清。接着加入异丙醇混匀静置,离心收集RNA沉淀,并用75%乙醇洗涤,离心静置5 min。最后将RNA沉淀溶解于RNase-free水中,轻轻混匀于-20℃冰箱保存。

2)根瘤RNA的抽提。摘取接种野生型7653R培养14、21、28、35、42 d的紫云英根瘤,用液氮将其研磨成粉末,按本文“1.9.1)”的方法提取根瘤RNA并反转录成cDNA,于-20℃冰箱保存。

3)qRT-PCR。以在自生条件下生长的野生型7653R菌体的cDNA为对照, $gyrB$ 基因作为内参基因,通过荧光定量PCR检测 $atpA$ 基因在根际以及不同时期根瘤中的表达量。

1.10 根瘤类菌体蛋白质组学分析

1)根瘤蛋白的提取与酶解。收集野生型菌株和突变型菌株的28 d根瘤,用液氮充分研磨后加入裂解液超声裂解。离心取上清,用BCA试剂盒检测蛋白的浓度。使用尿素等变性剂对蛋白进行变性,加入二硫苏糖醇进行还原处理,最后用碘乙酰胺进行烷基化。

2)LC-MS/MS及数据分析。使用液相色谱-质谱串联分析,将肽段样品加载到色谱柱上,通过梯度洗脱分离肽段。使用质谱(MS)和串联质谱(MS/MS)技术采集肽段的一级和二级质谱图。借助数据库搜索软件将质谱数据与蛋白数据库比对,进行肽段和蛋白水平的质控分析,再利用生物信息学工具对鉴定的蛋白质进行功能注释、定量分析以及筛选分类。

2 结果与分析

2.1 atpA基因生物信息学分析

利用NCBI中的Protein Blastp对atpA基因编码蛋白的氨基酸序列及保守结构域进行分析,结果如

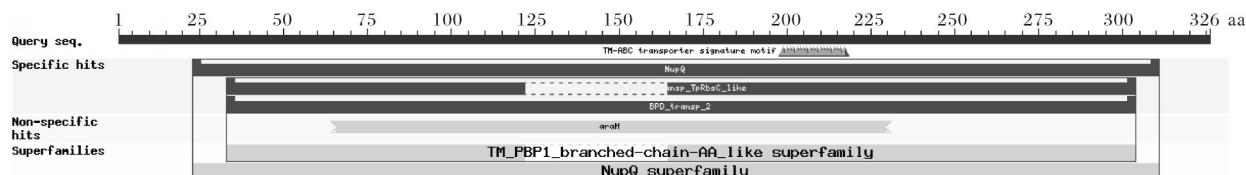
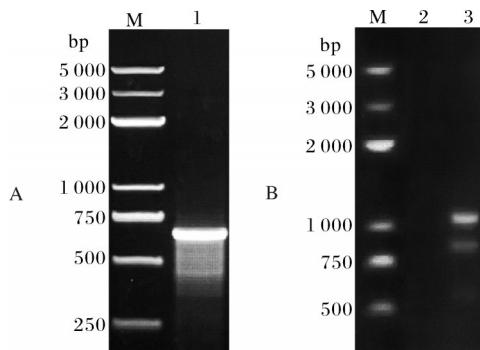


图1 atpA编码蛋白的结构域分析

Fig.1 Analysis of the protein domains encoded by atpA

2.2 atpA基因突变菌株及回复菌株的构建与鉴定

以*M. huakuii* 7653R总DNA为模板,atpA-F/atpA-R为引物,扩增出大小为681 bp的atpA基因片段,电泳结果显示大小与预期相符(图2A)。将扩增片段与载体pK19mob经双酶切后进行连接,转化至*E. coli* DH5 α 中。对转化子进行质粒酶切及测序验证后,进行有效的三亲本接合。通过抗生素筛选以及以atpA-MP/pK19-R为引物进行菌落PCR验证,电泳结果显示突变体在1.2 kb左右处扩增出相应条带,而野生型7653R并未出现相应条带,证明载体同源重组已整合到野生型7653R基因组中,即获得atpA基因插入失活突变株HKatpA(图2B)。



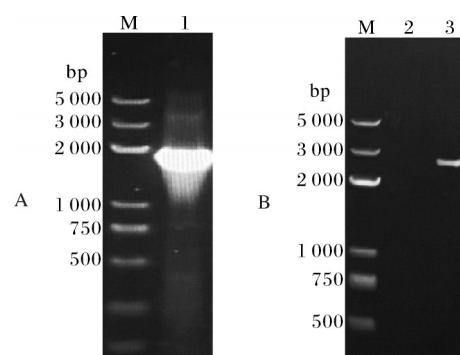
A: atpA基因的PCR扩增 PCR amplification of the atpA gene; B: 突变株HKatpA的菌落PCR检测 Colony PCR detection of HKatpA mutant strain; M为DL5000 DNA Marker,泳道1为atpA基因扩增片段,泳道2为野生型7653R对照,泳道3为HKatpA突变株M means DL 5000 DNA Marker, lane 1 was an amplified fragment of the atpA gene, lane 2 was wild-type 7653R control, lane 3 was HKatpA mutant strain.

图2 atpA基因突变株的验证

Fig.2 Verification of atpA gene mutant strains

以*M. huakuii* 7653R总DNA为模板,C-atpA-F/C-atpA-R为引物扩增出含启动子区的atpA基因片段,大小约为1.9 kb(图3A)。将目的片段与pB-

BR1MCS-5连接并转入到感受态DH5 α 。对转化子进行质粒酶切及测序验证后进一步通过三亲本接合实验,将重组质粒pBBRatpA导入受体菌*M. huakuii* HKatpA。通过抗生素筛选及以M13F和M13R为引物进行菌落PCR验证,扩增出了2.2 kb左右的片段(图3B),表明atpA基因的回复菌株HKatpA(pB-BRatpA)构建成功。



A: 含启动子区的atpA基因片段PCR扩增 PCR amplification of the atpA gene fragment containing the promoter region; B: 回复菌株的菌落PCR检测 Colony PCR detection of complementary strains; M为DL5000 DNA Marker,泳道1为含启动子区的atpA基因片段扩增,泳道2为HKatpA突变株;泳道3为回复菌株HKatpA(pBBRatpA) M means DL 5000 DNA Marker, lane 1 was the amplification of the atpA gene fragment containing the promoter region, lane 2 was HKatpA mutant strain, lane 3 was complementary strain HKatpA (pBBRatpA).

图3 atpA基因回复菌株的验证

Fig.3 Verification of atpA gene complementary strains

2.3 atpA基因突变对菌株生长的影响

将华癸中慢生根瘤菌7653R、突变株HKatpA以及回复菌株HKatpA(pBBRatpA)分别以初始OD_{600 nm}=0.01接种到TY完全培养基和AMS基本培养基中,观察菌株的生长情况,间隔时间取样测定它们的OD_{600 nm}并绘制生长曲线。在TY完全培养基

中,培养12 h后,三者进入对数生长期,且突变株HKatpA的生长速度明显比野生型7653R以及回复菌株HKatpA(pBBRatpA)快;到30 h时,突变株HKatpA开始进入稳定期,而野生型7653R和回复菌株HKatpA(pBBRatpA)继续生长直到60 h才进入稳定期(图4A)。在AMS基本培养基中,突变株HKatpA在12~24 h时处于生长旺盛期,生长速度也明显快于野生型7653R和回复菌株HKatpA(pBBRat-

pA);在24~48 h时,突变株HKatpA生长速度有所减缓直至在48 h时进入稳定期,而野生型7653R以及回复菌株HKatpA(pBBRatpA)继续生长直到48 h后才开始进入稳定期(图4B)。由此表明,*atpA*基因突变会使根瘤菌提前进入稳定期,但不改变其最终的生物量。同时也说明ABC转运体渗透酶可能在根瘤菌的营养物质转运中起到重要作用,其缺失可能导致菌株代谢途径改变,从而影响其生长速率。

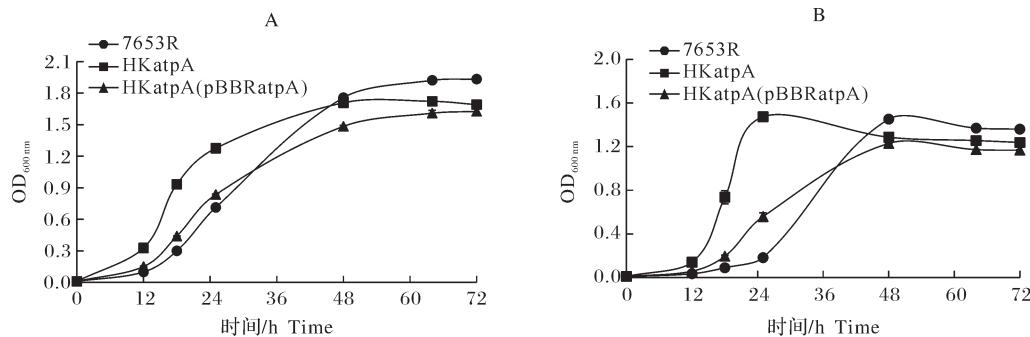


图4 *M. huakuii* 菌株在TY培养基(A)和AMS培养基(B)中的生长曲线

Fig.4 Growth curve of *M. huakuii* strains in TY medium(A) and AMS medium(B)

2.4 *atpA*基因突变对菌株生物膜形成的影响

生物膜是细菌为适应自然环境而形成的微菌落,由胞外多糖和蛋白质构成,还含有少量核酸和脂类等物质^[15-16]。生物膜的形成不仅能增强微生物对环境压力、抗生素和宿主免疫的抵抗能力,还有利于细菌在恶劣的环境中生存以及与宿主建立共生关系^[17]。由图5可见,与野生型7653R相比较,突变株HKatpA的生物膜形成能力减弱。*atpA*基因在根瘤菌的生物膜形成过程中发挥一定作用,这可能是因为ABC转运体渗透酶参与了细胞外聚合物的转运或调控^[18],从而影响了生物膜的结构以及稳定性,进一步影响根瘤菌抵御外界氧化胁迫的能力。

2.5 *atpA*基因突变株的共生表型

为了探究*atpA*基因突变是否对根瘤菌与紫云英共生固氮过程有影响,本研究将野生型菌株7653R

和突变型菌株HKatpA分别接种到紫云英根部培养28 d,测定植株的共生表型。与接种野生型7653R菌株相比,接种突变株HKatpA的植株叶片黄化,表现出明显的缺氮症状(图6A)。从结瘤情况来看,接种野生型7653R的根瘤较大,数量较多且呈浅红色,而接种突变株HKatpA的根瘤数较少,呈白色(图6B)。与接种野生型7653R的植株相比,突变株HKatpA的植株高度、地上部分鲜质量、结瘤数以及固氮酶活性分别降低了14.3%、33.3%、31.5%和18.8%(表3)。表明*atpA*基因突变会影响根瘤菌的结瘤固氮能力以及植株的生长状态。这可能是因为*atpA*基因突变导致其编码的ABC转运体渗透酶发生改变,进而影响某些必需营养物质的转运,打破根瘤菌与豆科植物共生固氮过程中的物质平衡和信号传递。

2.6 *atpA*基因在不同时期根瘤中的表达

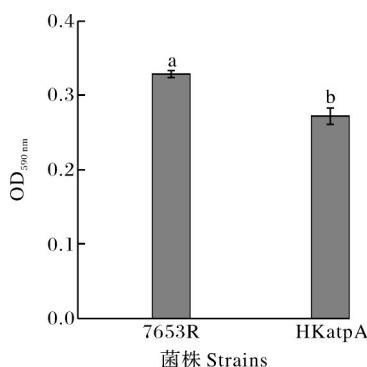
提取接种野生型7653R后生长7 d的根际RNA

表3 *M. huakuii* 接种植株的共生表型

Table 3 Symbiotic phenotype of plants inoculated by *M. huakuii*

菌株 Strains	株高/cm Plant height	植株鲜质量/g Plant fresh weight	根瘤数 Number of nodules	固氮酶活/[nmol/(g·h)] Activity of nitrogenase
WC	5.61±0.14c	0.081±0.007c	0	0
7653R	7.14±0.44a	0.152±0.012a	16.55±2.05a	43.43±6.24a
HKatpA	6.12±0.10b	0.101±0.002b	11.34±0.80b	35.28±9.09a

注:WC为水分控制组,不接菌。表中数据为20个重复的平均值(±SEM),每列中有不同字母表示显著差异($P<0.05$)。Note: WC means water control, not inoculated. The data is average (±SEM) of 20 replicates. Different letters in each column indicated a significant difference($P<0.05$)。



使用试管结晶紫染色法测定根瘤菌的生物膜形成能力,与野生型7653R相比较,突变株HKatpA的生物膜形成能力减弱。数据是来自3个独立样品的平均值(±SEM),不同字母表示具有显著差异($P<0.05$)。In this study, the biofilm forming ability of rhizobia was measured by crystal violet staining *in vitro*. Compared with wild type 7653R, the biofilm forming ability of HKatpA mutant was weakened. Data are averages (±SEM) from 3 independent biological samples. Different letters indicate a significant difference ($P<0.05$)。

图5 *M. huakuii*菌株的生物膜形成能力

Fig.5 Biofilm-forming ability of *M. huakuii* strains

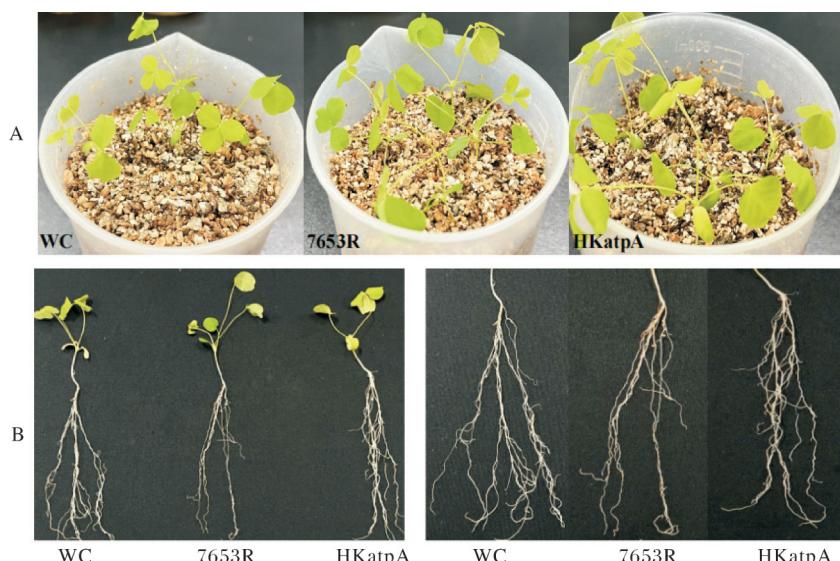
以及不同时期的根瘤RNA,以DNA促旋酶B亚基基因 $gyrB$ 为内参基因,用qRT-PCR实时检测 $atpA$ 基因在不同时期根瘤及根际中的表达量。结果表明,与根瘤菌在自然生长条件下相比,随着根瘤的生长发育, $atpA$ 基因在根瘤发育的早中晚期均表达上调(图7),这表明 $atpA$ 基因在根瘤菌与紫云英共生过程中被诱导表达,可能与根瘤的生长发育及固氮能

力相关。

2.7 蛋白差异表达分析

对野生型菌株7653R和突变型菌株HKatpA诱导的根瘤类菌体进行蛋白质组学分析,共鉴定到2 837个蛋白,其中有2 367个可定量蛋白。以差异表达量变化 >3 作为显著上调的变化阈值,差异表达量变化 <0.33 为显著下调变化的阈值($P\leq 0.05$)统计突变型菌株诱导的根瘤类菌体中相对于野生型差异表达的蛋白质数量。经LC-MS/MS分析鉴定得到差异表达蛋白共78个,其中与野生型7653R类菌体相比,突变株HKatpA类菌体中上调表达蛋白有23个,下调表达蛋白有55个。

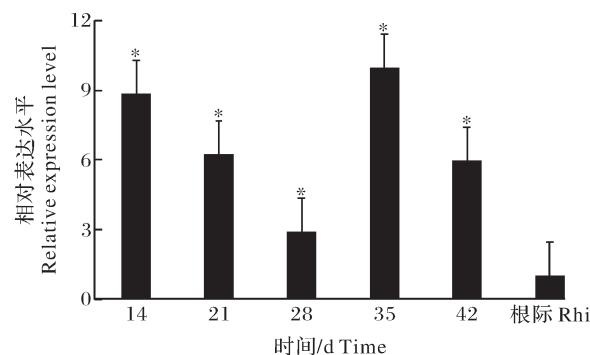
与野生型7653R诱导的根瘤类菌体相比,突变株HKatpA诱导的根瘤类菌体中共鉴定到10个与氨基酸转运相关的差异表达蛋白(表4),其中有1个蛋白表达上调,9个表达下调,且这些蛋白编码基因大多位于染色体上。在上调蛋白中,MCHK_3276编码硫酸盐ABC转运体底物结合蛋白,负责硫酸盐和硫代硫酸盐吸收,其上调表达可能提高了硫酸盐的转运效率^[19]。在下调蛋白中,MCHK_2453(*urtA*)编码尿素ABC转运体底物结合蛋白,可能参与尿素代谢及支链氨基酸转运^[20]。有研究报道,*urtA*基因缺失会导致根瘤发育异常且固氮酶活性显著降低,推测可能影响根瘤中氮的转运或同化,进而影响根瘤发



A:各植株生长的整体情况 The overall growth of each plant; B:各植株的根部结瘤情况 Root nodulation of each plant; 测定了28 d的植株共生表型,WC为不接菌的空白对照植株,7653R为接种野生型菌株的对照植株,HKatpA为接种突变体的植株。The plant symbiotic phenotype was measured at 28 days. WC was the blank control plant without inoculation, 7653R was the control plant inoculated with wild-type strain, and HKatpA was the plant inoculated with mutant.

图6 *M. huakuii*接种植株的生长表型及结瘤情况

Fig.6 The growth phenotypes of plants inoculated and nodulation by *M. huakuii*



数据是来自3个独立样品的平均值(±SEM)。*表示与自然生长条件下相比,*atpA*基因在根瘤中的表达量具有显著性差异(>2倍, $P \leq 0.05$)。Rhi表示紫云英根际。Data are averages(±SEM) from 3 independent biological samples. * indicated that the expression level of *atpA* gene in root nodules was significantly different (>2-fold, $P \leq 0.05$) compared with that under autogenous growth condition. Rhi represents the rhizosphere of *Astragalus sinicus* L..

图7 *atpA*基因在根际和不同时期根瘤中的表达

Fig.7 Expression of *atpA* gene in rhizosphere and root nodules at different stages

育和共生固氮过程。由于*atpA*基因突变会导致大部分与氨基酸ER4转运相关的蛋白表达都下调,因此可以表明其缺失会紊乱根瘤类菌体中与氨基酸转运

相关蛋白的表达,进一步影响根瘤菌的共生固氮能力。

根瘤菌的固氮基因包括固氮酶基因(*nif*)和固氮基因(*fix*),其中*nif*基因编码固氮酶复合物及其调控蛋白,*fix*基因控制共生固氮作用和维持低氧分压^[21-22]。与野生型7653R相比,突变株HKatpA诱导的根瘤类菌体中鉴定到12个与固氮相关的且都位于共生质粒pMHb上的差异表达蛋白,包括10个*nif*基因和2个*fix*基因(表5)。在这些固氮酶基因中*nifA*激活与氮代谢相关的基因,包括钼固氮酶、辅因子生物合成、氮调节蛋白编码和转录后修饰,以增强N₂的融合;而*nifD*和*nifK*编码固氮酶MoFe蛋白,*nifH*编码固氮酶Fe蛋白;*nifB*、*nifE*和*nifN*则参与MoFe蛋白辅助因子(NiBEQNVXY)的编码和装配,以确保固氮酶复合物的稳定性和正常功能^[23]。突变株HKatpA诱导的类菌体中所有固氮基因的显著下调表明了*atpA*基因突变会导致固氮酶复合物的组装以及与固氮相关电子传递蛋白的形成,进而可能阻碍根瘤菌与宿主的共生固氮进程,减弱其固氮能力。

表4 相对于野生型,突变株诱导的根瘤类菌体中与氨基酸转运相关的蛋白

Table 4 Amino acid transporter in mutant-induced nodule bacteroids relative to wild type-induced nodule bacteroids

基因ID Gene ID	基因名称 Gene name	蛋白描述 Protein description	比率 Ratio	P值 P value	基因定位 Gene localization
MCHK_4782	<i>phnD</i>	磷酸化ABC转运蛋白底物结合蛋白 Phosphonate ABC transporter substrate-binding protein	4.150	0.002 201 015	Chr
MCHK_5203		硫胺素结合周质蛋白硫胺素ABC转运蛋白底物结合亚基 Thiamine-binding periplasmic protein thiamine ABC transporter substrate binding subunit	0.264	0.003 087 61	Chr
MCHK_3276		硫酸盐ABC转运蛋白底物结合蛋白 Sulfate ABC transporter substrate-binding protein	0.228	0.000 914 625	Chr
MCHK_5900		HlyD家族外排转运体外质适配亚基 HlyD family efflux transporter periplasmic adaptor subunit	0.207	0.006 634 323	Chr
MCHK_6270		ABC转运蛋白底物结合蛋白 ABC transporter substrate-binding protein	0.178	0.000 829 048	Chr
MCHK_3270		硫酸盐ABC转运体底物结合蛋白 Sulfate ABC transporter substrate-binding protein	0.172	0.001 106 932	Chr
MCHK_0505		含底物结合域的转运蛋白 Transporter substrate-binding domain-containing protein	0.170	0.000 796 079	Chr
MCHK_2453	<i>urtA</i>	尿素ABC转运体底物结合蛋白 Urea ABC transporter substrate-binding protein	0.130	0.000 897 119	Chr
MCHK_12665		核转运因子2家族蛋白 Nuclear transport factor 2 family protein	0.097	0.009 042 824	pMHb
MCHK_8218		电子传递黄蛋白亚基α Electron transfer flavoprotein subunit alpha	0.016	0.003 196 461	Chr

注:Chr表示染色体,Ratio表示HKatpA/7653R的比值。Note:Chr means chromosome, and ratio means HKatpA/7653R ratio.

表5 相对于野生型,突变株诱导的根瘤类菌体中与固氮相关的蛋白
Table 5 Nitrogen-fixing proteins in mutant-induced nodule bacteroids relative to wild type-induced nodule bacteroids

基因 ID Gene ID	基因名称 Gene name	蛋白描述 Protein description	比率 Ratio	P 值 P value	基因定位 Gene localization
MCHK_8176	<i>nifH</i>	氮酶铁蛋白 Nitrogenase iron protein	0.051	0.002 501 227	pMHb
MCHK_11830	<i>nifA</i>	NifA 特异性转录激活剂 Nif-specific transcriptional activator NifA	0.045	0.000 206 472	pMHb
MCHK_8219		蛋白 FixCFAD 结合蛋白 Protein FixC FAD-binding protein	0.028	0.016 027 623	pMHb
MCHK_8175	<i>nifD</i>	固氮酶钼铁蛋白 α 链 Nitrogenase molybdenum-iron protein alpha chain	0.024	0.007 924 052	pMHb
MCHK_8217		固氮蛋白 FixA Nitrogen fixation protein FixA	0.023	0.008 648 375	pMHb
MCHK_8174	<i>nifK</i>	固氮酶钼铁蛋白 β 链 Nitrogenase molybdenum-iron protein beta chain	0.021	0.000 466 67	pMHb
MCHK_12735		Nif11 样先导肽家族天然产物前体 Nif11-like leader peptide family natural product precursor	0.021	0.000 553 872	pMHb
MCHK_11255	<i>nifX</i>	固氮蛋白 NifX Nitrogen fixation protein NifX	0.017	3.39346E-05	pMHb
MCHK_8172	<i>nifE</i>	固氮酶铁钼辅助因子生物合成蛋白 NifE Nitrogenase iron-molybdenum cofactor biosynthesis protein NifE	0.016	0.019 363 87	pMHb
MCHK_8171	<i>nifN</i>	固氮酶铁钼辅助因子生物合成蛋白 NifN Nitrogenase iron-molybdenum cofactor biosynthesis protein NifN	0.005	0.001 743 086	pMHb
MCHK_11005	<i>nifT</i>	推测为固氮蛋白 NifT Putative nitrogen fixation protein NifT	0.002	1.11333E-06	pMHb
MCHK_8226	<i>nifB</i>	固氮酶辅助因子生物合成蛋白 NifB Nitrogenase cofactor biosynthesis protein NifB	0.001	7.75257E-07	pMHb

注: Ratio 表示 HKatpA/7653R 的比值。Note: Ratio means HKatpA/7653R ratio.

3 讨 论

华癸中慢生根瘤菌作为与豆科植物形成共生关系的固氮菌,生长和代谢都需要大量的营养物质和离子,而获取这些都必须依赖高效的跨膜转运机制。ABC 转运体渗透酶参与众多生命活动过程:通过转运氨基酸、铁离子等关键营养物质,并将代谢产物排出细胞,维持细胞内外的物质平衡;参与能诱导根瘤菌根部形成根瘤的信号分子的转运,如 Nod 因子等^[24];转运抗性物质和排出毒性物质,应对多种环境胁迫压力等。

通过生物信息学分析,发现华癸中慢生根瘤菌 7653R 中 MCHK_8397 编码 ABC 转运体渗透酶 AtpA,通过同源重组技术构建华癸中慢生根瘤菌 7653R *atpA* 基因突变株 HKatpA,研究 *atpA* 基因突变在根瘤菌生长、生物膜形成能力以及与紫云英共生固氮中的功能,并对其诱导的根瘤类菌体进行差异蛋白质组学分析。结果表明,与野生型菌株相比, *atpA* 基因突变会使根瘤菌提前进入稳定期,但是其生物膜形成能力渐弱。接种突变株的植株叶片泛黄,缺氮症状突出,其植株高度、地上部分鲜质量、结瘤数以及乙炔还原酶活性都显著降低。以上结论表

明 *atpA* 基因突变会显著影响根瘤菌生长代谢以及与宿主紫云英的共生状态。运用 LC-MS/MS 分析研究根瘤类菌体差异表达蛋白,与野生型 7653R 相比,在突变株 HKatpA 所诱导的根瘤类菌体中共鉴定到 78 个差异表达蛋白(23 个上调,55 个下调),其中与氨基酸转运相关的蛋白有 10 个,参与固氮复合物形成以及固氮相关电子传递的蛋白有 12 个。进一步说明了 *atpA* 基因突变对根瘤类菌体内部代谢和蛋白表达的影响,尤其是与氨基酸转运和固氮过程相关的蛋白表达。

本研究可为了解 ABC 转运体渗透酶基因在根瘤菌与豆科植物共生固氮关系中的功能奠定一定基础,并为改良植物品种、增强农作物固氮能力提供新的思路和策略。然而,ABC 转运体渗透酶基因具体是如何调控根瘤菌与宿主的共生固氮过程仍需进一步研究证明。

参考文献 References

- [1] GALLOWAY J N, TOWNSEND A R, ERISMAN J W, et al. Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions [J]. Science, 2008, 320(5878): 889-892.

- [2] YANG J, LAN L Y, JIN Y, et al. Mechanisms underlying legume - *Rhizobium* symbioses [J]. Journal of integrative plant biology, 2022, 64(2):244-267.
- [3] HAAG A F, ARNOLD M F F, MYKA K K, et al. Molecular insights into bacteroid development during *Rhizobium* - legume symbiosis [J]. FEMS microbiology reviews, 2013, 37 (3):364-383.
- [4] 胡珍珍, 谢华伦, 彭杰丽, 等. *MCHK_7135* 基因在华癸中慢生根瘤菌共生固氮中的功能[J]. 华中农业大学学报, 2023, 42(2):123-130. HU Z Z, XIE H L, PENG J L, et al. Function of *MCHK_7135* gene in symbiotic nitrogen fixation of *Mesorhizobium huakuii* [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2023, 42(2) : 123-130 (in Chinese with English abstract).
- [5] MASSON-BOIVIN C, SACHS J L. Symbiotic nitrogen fixation by rhizobia: the roots of a success story [J]. Current opinion in plant biology, 2018, 44:7-15.
- [6] BERGER E A, HEPPEL L A. Different mechanisms of energy coupling for the shock-sensitive and shock-resistant amino acid permeases of *Escherichia coli* [J]. Journal of biological chemistry, 1974, 249(24):7747-7755.
- [7] 曲俊泽, 陈天华, 姚明东, 等. ABC 转运蛋白及其在合成生物学中的应用[J]. 生物工程学报, 2020, 36(9):1754-1766. QU J Z, CHEN T H, YAO M D, et al. ABC transporter and its application in synthetic biology [J]. Chinese journal of biotechnology, 2020, 36 (9) : 1754-1766 (in Chinese with English abstract)..
- [8] THEODOULOU F L. Plant ABC transporters [J]. Biochimica Et biophysica acta-bioenergetics, 2000, 1465(1/2):79-103.
- [9] HOSIE A H F, ALLAWAY D, GALLOWAY C S, et al. *Rhizobium leguminosarum* has a second general amino acid permease with unusually broad substrate specificity and high similarity to branched-chain amino acid transporters (bra/LIV) of the ABC family [J]. Journal of bacteriology, 2002, 184 (15) : 4071-4080.
- [10] DING H, YIP C B, GEDDES B A, et al. Glycerol utilization by *Rhizobium leguminosarum* requires an ABC transporter and affects competition for nodulation [J]. Microbiology, 2012, 158(5):1369-1378.
- [11] GALIBERT F, FINAN T M, LONG S R, et al. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti* [J]. Science, 2001, 293(5530):668-672.
- [12] KANEKO T, NAKAMURA Y, SATO S, et al. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti* [J]. DNA research, 2000, 7(6):331-338.
- [13] ABD-EL-KAREM Y, ELBERS T, REICHELT R, et al. Heterologous expression of *Anabaena* sp. PCC7120 cyanophycin metabolism genes *cphA1* and *cphB1* in *Sinorhizobium (Ensifer) meliloti* 1021 [J]. Applied microbiology and biotechnology, 2011, 89(4):1177-1192.
- [14] TIAN Y L, ZHAO Y Q, WU X R, et al. The type VI protein secretion system contributes to biofilm formation and seed-to-seedling transmission of *Acidovorax citrulli* on melon [J]. Molecular plant pathology, 2015, 16(1):38-47.
- [15] CASTIBLANCO L F, SUNDIN G W. New insights on molecular regulation of biofilm formation in plant-associated bacteria [J]. Journal of integrative plant biology, 2016, 58 (4) : 362-372.
- [16] TALLAWI M, OPITZ M, LIELEG O. Modulation of the mechanical properties of bacterial biofilms in response to environmental challenges [J]. Biomaterials science, 2017, 5 (5) : 887-900.
- [17] MITRA S, MUKHERJEE A, WILEY-KALIL A, et al. A rhamnose-deficient lipopolysaccharide mutant of *Rhizobium* sp. IRBG74 is defective in root colonization and beneficial interactions with its flooding-tolerant hosts *Sesbania cannabina* and wetland rice [J]. Journal of experimental botany, 2016, 67(19):5869-5884.
- [18] VANDANA, PRIYADARSHANEE M, DAS S. Bacterial extracellular polymeric substances: biosynthesis and interaction with environmental pollutants [J/OL]. Chemosphere, 2023, 332: 138876 [2024-06-17]. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138876>.
- [19] KERTESZ M A. Bacterial transporters for sulfate and organo-sulfur compounds [J]. Research in microbiology, 2001, 152(3/4):279-290.
- [20] WANG C, ZHU W J, DING H T, et al. Structural and molecular basis for urea recognition by *Prochlorococcus* [J/OL]. Journal of biological chemistry, 2023, 299 (8) : 104958 [2024-06-17]. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.104958>.
- [21] HIRSCH A M, SMITH C A. Effects of *Rhizobium meliloti* nif and fix mutants on alfalfa root nodule development [J]. Journal of bacteriology, 1987, 169(3):1137-1146.
- [22] GUO S Q, ZHANG T Q, CHEN Y H, et al. Transcriptomic profiling of nitrogen fixation and the role of NifA in *Methylo-microbium buryatense* 5GB1 [J]. Applied microbiology and biotechnology, 2022, 106(8):3191-3199.
- [23] WEBB I U C, XU J B, SÁNCHEZ-CAÑIZARES C, et al. Regulation and characterization of mutants of *fixABCX* in *Rhizobium leguminosarum* [J]. Molecular plant-microbe interactions, 2021, 34(10):1167-1180.
- [24] KIDAJ D, KRYSA M, SUSNIAK K, et al. Biological activity of Nod factors [J]. Acta biochimica polonica, 2020, 67(4) : 435-440.

Symbiotic nitrogen fixation of *atpA* gene in *Mesorhizobium huakuii* 7653R

YU Fuyan, ZOU Qian, YAN Chunlan, CHENG Guojun

College of Life Sciences, South-Central Minzu University, Wuhan 430074, China

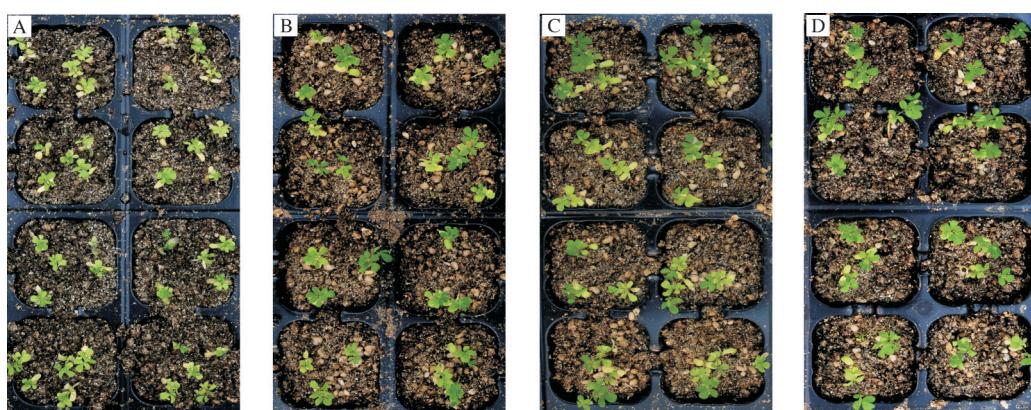
Abstract The role of ABC transporter permease gene *atpA* in the symbiotic nitrogen fixation between *Rhizobium* and legumes in *Mesorhizobium huakuii* 7653R was studied. The *atpA* mutant strain HKatpA was constructed through homologous recombination. The functions of the mutant stain in the growth and symbiosis of *Astragalus sinicus* L. was studied. The results showed that the mutation in the *atpA* gene caused rhizobia to early enter a stable period and weaken its ability to form biofilm. The plants inoculated with the mutant strain had yellow leaves, and prominent symptoms of nitrogen deficiency, with their plant height, fresh weight of the above-ground parts, number of nodules, and the activity of nitrogen fixing enzyme decreased by 14.3%, 33.3%, 31.5%, and 18.8%, respectively. 78 differentially expressed proteins were identified with proteomics analysis. Compared with wild-type bacteroids, 23 proteins in *atpA* gene mutant bacteroids were up-regulated and 55 proteins were down-regulated. Among the differentially expressed proteins, 10 proteins were related to amino acid transport, and 12 proteins were related to nitrogen-fixing complex formation in nodules. It is indicated that the ABC transporter permease gene *atpA* in *Mesorhizobium huakuii* plays an important role in the process of growth and symbiosis with the host plant *Astragalus sinicus* L..

Keywords *Mesorhizobium huakuii* 7653R; ABC transporter permease; symbiotic nitrogen fixation; proteomics analysis

(责任编辑:陆文昌)

勘误:作者更正声明

《华中农业大学学报》2021年第40卷第6期68~74页、王婧仪等作者撰写的《天冬氨酸转氨酶在中慢生根瘤菌MAFF303099共生固氮中的作用》一文中,图5为“回补共生表型的观察与统计”,其中图5A—D百脉根植株生长状态比对图使用有误,现将图5A—D更正为下图。特此声明。



(王婧仪等)