

茎瘤固氮根瘤菌甲基化受体蛋白 Tlp1 的功能

杨金保^{1,2} 刘卫² 姜南² 吴海龙² 李岩² 李润植¹ 张红梅^{1*} 解志红^{2*}

(1. 山西农业大学 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中趋化基因簇上游的受体蛋白 Tlp1 编码基因的突变表型,初步探究其功能机理。【方法】利用同源重组和三亲本接合转移的方法构建突变株,在 TY 培养基中测定生长情况,半固体平板法观察趋化圈,刚果红固体培养基观察胞外多糖和次生代谢产物的分泌,乙炔还原法测定菌株的固氮酶活性。【结果】与野生型菌株相比, *tlp1* 突变株的生长速率没有影响。在以甘油为碳源的 L3 半固体平板上突变株的趋化圈变小,其回补菌株能部分回补趋化能力。突变株的胞外多糖分泌与野生型没有区别,但其次生代谢产物黑色素出现的时间比野生型稍早。在固氮酶活性测定中,发现突变株酶活性明显比野生型降低,回补菌株能够部分回补。【结论】茎瘤固氮根瘤菌 Tlp1 蛋白对甘油表现出一定的趋化能力,并且影响细菌的次生代谢产物和固氮能力。

关键词: 茎瘤固氮根瘤菌 ORS571, 趋化, 黑色素, 固氮酶活性

Function of a methyl-accepting chemotaxis protein Tlp1 in

Azorhizobium caulinodans ORS571

YANG Jin-Bao^{1,2} LIU Wei² JIANG Nan² WU Hai-Long² LI Yan²

LI Run-Zhi¹ ZHANG Hong-Mei^{1*} XIE Zhi-Hong^{2*}

(1. Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801, China)

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

Abstract: [Objective] To study the mutation phenotype of the methyl-accepting chemotaxis protein Tlp1 (transducer-like protein) located in the upstream of the gene cluster of *Azorhizobium caulinodans* ORS571, and to explore its functional mechanism. [Method] The *tlp1* mutant strain was constructed by the homologous recombination and triparental conjugation. Growth of the wild-type strain ORS571 and the *tlp1* mutant was compared by measuring OD600 over time of

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31370108, 31570063); Key Research Program of the Chinese Academy of Sciences (No. KZZD-EW-14); Shandong Independent Innovation and Achievement Transformation Program (No. 2014ZZCX07303); One Hundred-Talent Plan of Chinese Academy of Sciences (CAS); Yantai Science and Technology Project (No. 2013JH021)

*Corresponding author: ZHANG Hong-Mei: Fax: 86-354-6286908; E-mail: tgzhhm@163.com

XIE Zhi-Hong: Tel: 86-535-2109183; Fax: 86-535-2109000; E-mail: zhxie@yic.ac.cn

Received: March 31, 2016; **Accepted:** June 13, 2016; **Published online** (www.cnki.net): July 19, 2016

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31370108, 31570063); 中科院重点部署项目(No. KZZD-EW-14); 山东省自主创新及成果转化专项(No. 2014ZZCX07303); 中科院百人计划项目; 烟台市科技发展计划(No. 2013JH021)

*通信作者: 张红梅: Fax: 86-354-6286908; E-mail: tgzhhm@163.com

解志红: Tel: 86-535-2109183; Fax: 86-535-2109000; E-mail: zhxie@yic.ac.cn

收稿日期: 2016-03-31; **接受日期:** 2016-06-13; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2016-07-19

cultures in TY medium. The semi-solid plate assay was used to test the ability of chemotaxis. The production of extracellular polysaccharide and secondary metabolites was measured through Congo red solid culture medium. The acetylene reduction assay was used to measure nitrogen fixation ability. [Results] Compared with the wild type, the growth of the mutant in rich media was the same as that of the wild type. The *tlp1* mutant was impaired in chemotaxis to glycerol, and the complemented strain's chemotactic capability could be partially complemented. The production of extracellular polysaccharides secreted from *tlp1* mutant and wild type has no difference, but one of the secondary metabolites -- the melanin *tlp1* mutant appeared earlier than the wild type. The nitrogenase activity of *tlp1* mutant strain was weaker than that of the wild type, and the complemented strain could complement part of the nitrogen fixation ability. [Conclusion] The methyl-accepting chemotaxis protein Tlp1 of *A. caulinodans* ORS571 showed a certain ability of chemotaxis to glycerol, and also affected the secondary metabolites and the nitrogenase activity in ORS571.

Keywords: *Azorhizobium caulinodans* ORS571, Chemotaxis, Melanin, Nitrogenase activity

茎瘤固氮根瘤菌(*Azorhizobium caulinodans* ORS571)属于 α -变形菌, 与其它根瘤菌一样, 可以固定大气中游离的氮, 为宿主提供氮素养料, 从而减少宿主对土壤中氮肥的需求。此外, 它还有一个与其它根瘤菌不同的特点: 它既可以与豆科宿主毛萼田菁(*Sesbania rostrata*)共生固氮, 又可以自生或作为内生菌在其它植物体内固氮^[1], 能够同时在根部和茎上结瘤^[2]。这样, 茎瘤固氮根瘤菌具有根瘤菌的共性和自生固氮的特点, 赋予其比其它根瘤菌更为独特的研究价值。

细菌趋化性是指运动性细菌对其生长环境中存在的化学物质的浓度梯度所进行趋向或远离该化学物质的反应, 是细胞对碳源、能源竞争的一种表现^[3-4]。土壤中的细菌能够感受植物根部释放出的信号物质, 因此趋化作用是许多种属植物的根系细菌侵染、定殖的起始^[5], 也在固氮菌与植物共生关系建立中发挥重要作用^[6]。对根瘤菌趋化性研究较多的是苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)和豌豆根瘤菌(*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*)。目前, 对于茎瘤固氮根瘤菌趋化研究的报道并不多见。

信号受体蛋白是趋化系统的重要组成部分。它是位于细菌细胞质膜上、可以感受外界或细胞内部的趋化物质并将信号向下游传递的蛋白。通常由位于胞外的与配体物质结合的细胞外结构域, 两个跨膜区和多个胞内结构域组成, 胞内结构域包括 HAMP 区域、甲基化区域和信号区。

基因组分析发现, 茎瘤固氮根瘤菌与其它菌属相比趋化系统具有高度同源性, 但同时存在自身的独特性^[7]。其含有大量与细菌运动和趋化性相关的基因: 43 个信号受体蛋白, 一个趋化基因簇(由 CheA 组氨酸蛋白激酶、CheW 蛋白、CheY1 反应调节蛋白、CheR/CheB 适应蛋白组成), 以及 CheY2 反应调节蛋白及 CheZ 磷酸酯酶^[8]。AZC0660 位于基因簇上游, 是一个甲基化受体蛋白, 我们把它命名为 Tlp1 (Transducer-like protein), 由一个高度可变的负责与刺激物结合的细胞周质感受区和一个保守的提供与 CheA 和 CheW 结合平台的细胞质信号区构成, 推测其是一个与趋化相关的受体蛋白。深入研究受体蛋白 *tlp1* 的功能及调控机理, 有助于我们更为深入和全面的了解茎瘤固氮根瘤菌 ORS571 的趋化机制。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒：实验中用到的菌株和质粒详见表 1。

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
Strain		
<i>A. caulinodans</i>		
ORS571	Wild type strain , NaI and Amp	[9]
mutant strain	ORS571 derivative , Gen	This study
complemented strain	<i>tlp1</i> mutant derivative , Kan	This study
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	General cloning strain	Transgen
Plasmids		
pMD-18T	The vector cloning PCR products , Kan	TaKaRa
pCM351	The construction of mutant , Gen , Tc	[10]
pRK2013	Helper plasmid , carries <i>tra</i> genes , Kan	[11]
PBBR1MSC-2	The construction of complemented strain , Kan	[12]

Note:NaI represent nalidixic acid, Amp represent ampicillin, Gen represent gentamicin, Tc represent tetracycline, Kan represent kanamycin.

1.1.2 引物：实验中用到的各引物详见表 2。

Primer	Sequence (5'→3')	Restriction site
0660-up-F	GGGGTACCCCACCAGCCTGTCGATCTG	<i>Kpn</i> I
0660-up-R	GGAATTCCATATGTGGCTCGGCTTAGCATCG	<i>Nde</i> I
0660-down-F	TCCCCGCGCCGCTCCGTGCTTAACCCT	<i>Sac</i> I
0660-down-R	CGACGCGTTGACCGCGACTTCCTTCTTC	<i>Mlu</i> I
0660-F	GCTCGATAACGTGGACCAAC	
0660-R	CCGTCTGAACGTTGCTTGT	
0660-com-F	CGTCTAGAGCCAGGGCTCGAGTACAAG	<i>Xba</i> I
660-com-R	CGAGCTCCCTCTCCCCTGAGGGTTAAG	<i>Sac</i> I

1.1.3 培养基与生长条件：LB 培养基用于大肠杆菌培养，37 °C 培养。TY^[13]和 L3^[14]培养基用于茎瘤固氮根瘤菌，37 °C 培养。抗生素的使用浓度为 Amp (氨苄霉素) 100 mg/L，Kan (卡那霉素) 50 mg/L，Gen (庆大霉素) 30 mg/L，Tc (四环素) 10 mg/L，NaI (萘啶酮酸) 25 mg/L。

1.1.4 主要试剂和仪器：限制性内切酶购自 NEB 公司。切胶回收试剂盒、片段纯化试剂盒、DNA 提取试剂盒、T4 连接酶均购自宝生物工程有限公司。7890A 气相色谱购自 Agilent 公司。

1.2 基因片段的克隆和重组载体的构建

使用引物分别扩增 *tlp1* 基因的上游臂 782 bp 和下游臂 768 bp，纯化后分别连接到 *pEASY* 载体上进行测序验证。验证正确的上游片段用 *Kpn* I 和 *Nde* I 酶切后，将酶切产物与经过 *Kpn* I 和 *Nde* I 酶切的 PCM351 质粒使用 T4 连接酶经行连接，得到 PCM351::0660up 质粒。将 PCM351::0660up 质粒转入大肠杆菌感受态中，菌落 PCR 验证，并将验证正确的克隆子进行质粒提取后酶切验证。用同样的方法，将测序验证正确的下游片段连接在酶切验证正确的 PCM351::0660up 质粒上，得到 PCM351::0660up-down 质粒。

1.3 茎瘤固氮根瘤菌 *tlp1* 突变株的构建

将含有 PCM351::0660up-down 质粒的大肠杆菌 DH5 α 、含有辅助质粒 PRK2013 的大肠杆菌 DH5 α 、野生型菌株 ORS571 按一定比例做三亲本结合^[15]，用 PCM351 质粒中 914 bp 的庆

大基因片段和 *tlp1* 基因的 1913 bp 片段重组互换。用抗性的方法在 TY 平板上筛选突变株，并用在 *tlp1* 基因内部设计的一对引物 0660-up&0660-down 来验证重组载体是否整合到野生型 ORS571 的染色体上，得到 *tlp1* 突变株。

1.4 回补菌株的构建

以 *tlp1* 基因全长加启动子区域及其下游 30 bp 共 2 139 bp 作为回补片段，连接到 *pEASY* 载体上进行测序。验证正确的回补片段用 *Xba* I 和 *Sac* I 酶切后，将酶切产物与经过 *Xba* I 和 *Sac* I 酶切的 PBBR1MSC-2 质粒使用 T4 连接酶进行连接获得包含回补序列的载体 PBBR1MSC-2::0660-com，运用三亲本接合转移的方法将该载体转入 *tlp1* 突变株中。挑选在含有 NaI、Gen 和 Kan 抗性的 TY 平板上的单菌落，通过 PCR 验证得到 *tlp1* 回补菌株。为了排除 PBBR1MSC-2 质粒的影响，我们在野生型菌株和 *tlp1* 突变株中转入了该空载质粒。

1.5 生长曲线的测定

将待测菌株在 TY 固体平板上进行活化，取单菌落于 TY 液体培养基中，37 °C、200 r/min 进行再次活化培养至 OD_{600} 为 0.6–0.8。然后取适量菌液转接至 50 mL 的 TY 液体培养基中，起始 OD_{600} 值设为 0.05。每隔 2 h 取样，测定 OD_{600} 。

1.6 趋化实验

趋化实验用半固体平板方法来测定^[16]。将 37 °C 200 r/min 培养过夜的野生型菌株、突变株和回补菌株的 OD_{600} 值调为 0.6–0.8，各取 5 μ L 滴到 0.3% 的 TY 半固体培养基上。在 37 °C 温箱培养 3 d 左右，观察各菌株的趋化圈大小。

1.7 胞外多糖和次生代谢物的观察

配制以甘油(10 mmol/L)为碳源的含氮和无氮刚果红固体培养基，其中琼脂的量为 15 g/L，刚果红浓度为 0.04%。将 OD_{600} 为 0.6–0.8 的同浓度的野生型菌株、突变株和回补菌株的菌液滴到两种固体刚果红平板上，37 °C 培养 3 d 以后，每天观察各菌株的胞外多糖和次生代谢产物的分泌情况。

1.8 固氮酶活实验

采用乙炔还原法(ARAs)来测定固氮酶活。将待测的野生型、突变株和回补菌株同时活化，保持生长状态一致，然后接入含有 NaI 和 Amp 抗性的液体 L3 培养基，37 °C 200 r/min 振荡培养 20 h 后，把各菌株用生理盐水洗两次去掉抗性并调 OD_{600} 值到 1。在体积为 7 mL 的小瓶中加入 3 mL 的 L3 半固体培养基，并各接入 10 μ L 菌液，然后注入 400 μ L 的新制乙炔并在 37 °C 温箱静置培养 12 h 左右。从每个半固体小管中用微量进样器取出 100 μ L 气体用气相色谱法测定乙烯含量，根据各样品乙烯峰值的高低来比较其固氮酶活性高低。固氮酶活测定公式如下：

固氮酶活性=记录仪上乙烯峰的面积×(瓶体积 7 mL/进样量 100 μ L)/(1 nmol 标准乙烯峰的面积×反应时间 1.3 min)。

2 结果与分析

2.1 *tlp1* 基因的结构分析

对茎瘤固氮根瘤菌 ORS571 进行基因组序列分析，发现甲基化受体蛋白 Tlp1 位于趋化基因簇的上游(如图 1A)。此外，在其结构的 C 端含有保守的甲基化受体结构域，该结构能够感应外界信号；并且还有一个 HAMP 结构域，其能够通过细胞外结构域感应外界刺激，是一个高度可变的负责与刺激物结合的细胞周质感受区(如图 1B)。因此，推测 Tlp1 是一个重要的趋化受体蛋白。

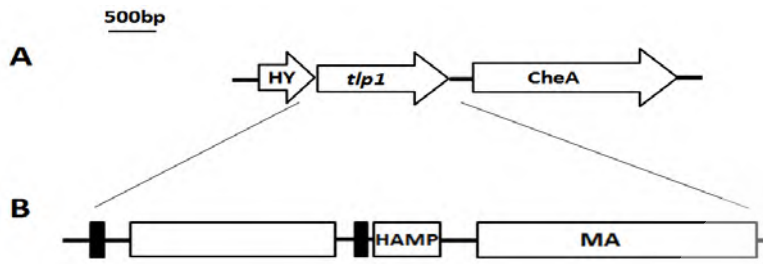


图 1 *tlp1* 基因与其上下游在 ORS571 染色体上的排布(A)及其结构域(B)

Figure 1 Physical map of *tlp1* gene as well as the region of its both ends and the predicted domain architecture

Note: A: The arrows indicate the direction of transcription; HY, hypothetical protein. B: Domains of the predicted Tlp1 protein, as defined by the SMART database. HAMP: Histidinekinase, Adenylylcyclases, Methylbindingproteins, Phosphatases; MA: methyl-accepting chemotaxis-like domain. Black rectangles depict transmembrane regions.

2.2 *tlp1* 突变株及其回补菌株的构建

三亲本接合转移以后，筛选在含有 NaI 和 Gen 抗性的 TY 平板上能够生长，同时不能在含有 NaI、Gen 和 Tc 抗性的 TY 平板上生长的接合子即为潜在的 *tlp1* 突变株。利用引物 0660-F/0660-R，能在野生型 ORS571 中扩增出预期 764 bp 大小的片段，同时不能在潜在菌株中扩增出相应大小片段，即表明突变株构建成功(如图 2A); 能够用引物 0660-com-F/0660-com-R 在潜在回补菌株中扩增出和野生型中一样 2 139 bp 的片段，表明回补菌株构建成功; 用该引物在突变株里可以扩增出重组交换后相应的 1 340 bp 大小片段再次验证了突变株的成功构建(如图 2B)。另外我们把 PBBR1MSC-2 空质粒转入野生型菌株和突变株中，这样就获得了 WT(PBBR2)、 $\Delta tlp1$ (PBBR2)、 $\Delta tlp1$ (PBBR2-*tlp1*)这 3 株菌株，分别代表野生型菌株、突变株和回补菌株。

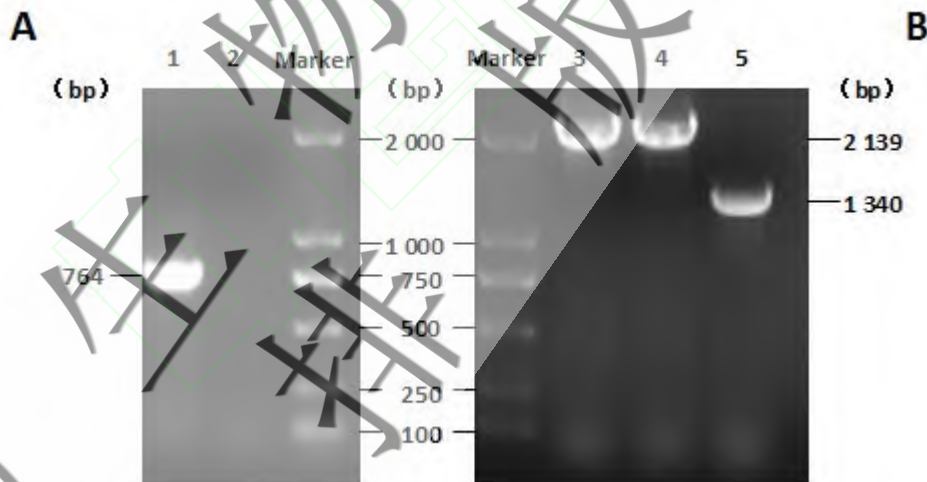


图 2 突变株和回补菌株的 PCR 验证

Figure 2 PCR confirmation of the mutant and complemented strain

Note: A: Primers: 0660-F/0660-R. 1: The genomic DNA of wild strain. 2: The genomic DNA of mutant strain. B: Primers: 0660-com-F/0660-com-R. 3: The genomic DNA of wild strain. 4: The genomic DNA of complemented strain. 5: The genomic DNA of mutant strain.

2.3 生长曲线测定结果

在 TY 液体培养基中测定野生型菌株和 *tlp1* 突变株不同时期的 OD_{600} 值，结果如图 3 所示。从图中可以看出，突变菌株的生长曲线几乎与野生型一致，说明甲基化受体蛋白 Tlp1 缺失后并不影响菌株的生长情况。

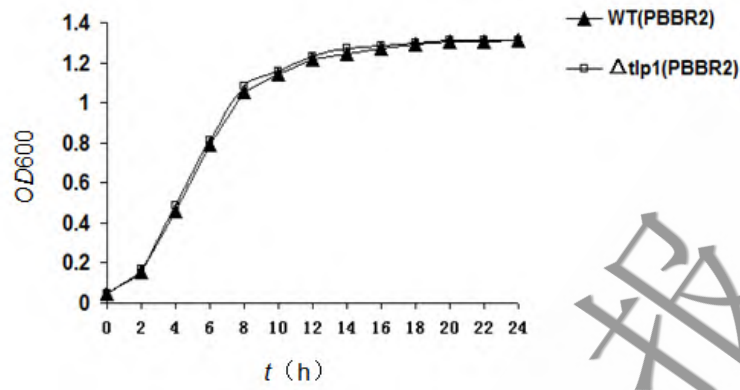


图 3 野生型和 *tlp1* 突变株生长曲线的测定

Figure 3 The growth curve of wild type and *tlp1* mutant

2.4 趋化能力的测定

在 *tlp1* 基因突变以后不影响其生长的前提下，我们进行了趋化能力的测定。取 OD_{600} 为 0.6–0.8 的菌液 5 μ L 滴在半固体 TY 平板上，培养 3–4 d 后观察平板上趋化圈的大小。结果如图 4 所示，与野生型菌株相比，*tlp1* 突变株的趋化圈都有所减小，并且其回补菌株对缺失表型都能够部分回补，说明甲基化受体蛋白 Tlp1 能够感应甘油并对其有一定的趋化性。

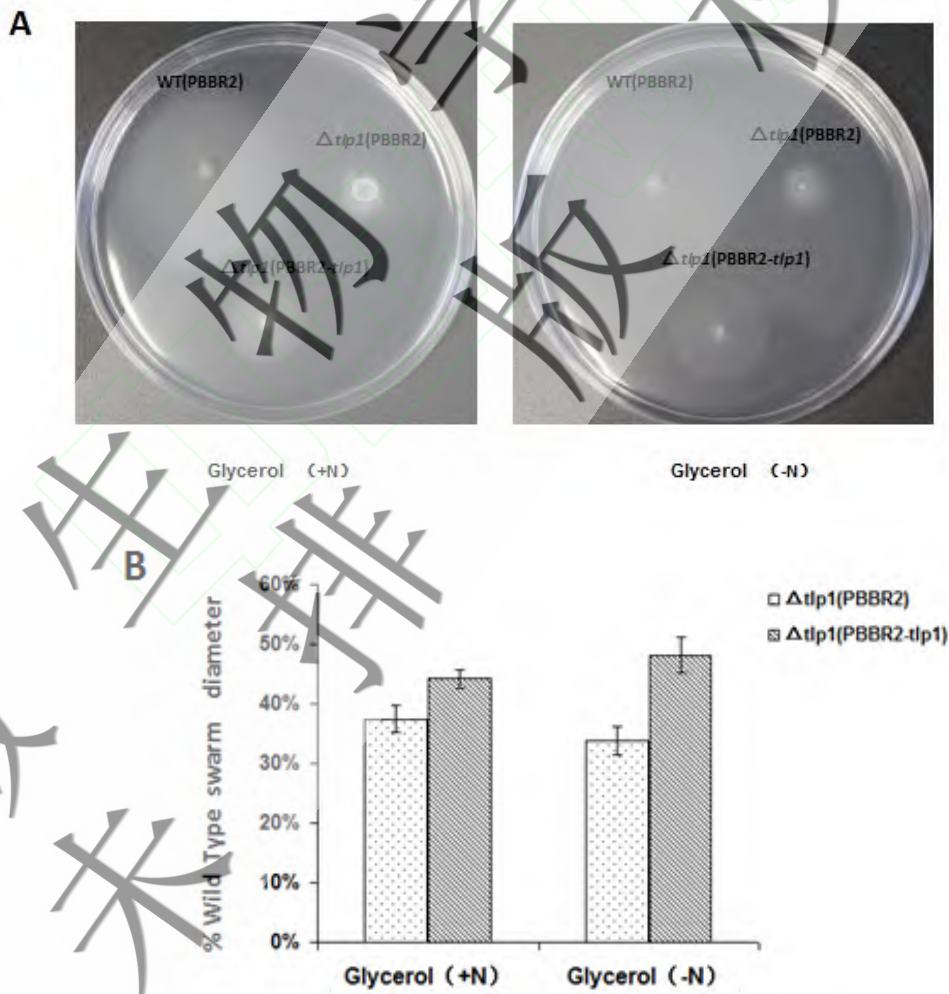


图 4 3 株菌株对甘油的趋化能力

Figure 4 The chemotaxis ability to glycerol of three different strains

Note: A: The chemotaxis ring of three strains in L3 semi-solid plate with the carbon source of glycerol (+/-N). B: The ratio of *tlp1* mutant and its complemented strain swarm diameter to wild type.

2.5 胞外多糖和次生代谢产物分泌的观察

在以甘油为碳源的刚果红固体平板上，野生型菌株和 *tlp1* 突变株的菌落形态没有明显的差异，其胞外多糖的分泌也没有差别。但在存在氮源的情况下(图 5)，培养 5 d 左右的 *tlp1* 突变株菌落中央开始产生黑色素，而野生型菌落仍然没有变化，但在继续培养数天后两菌株菌落全部变黑，说明受体蛋白 Tlp1 可能与菌株的次生代谢产物中黑色素的分泌快慢有关。

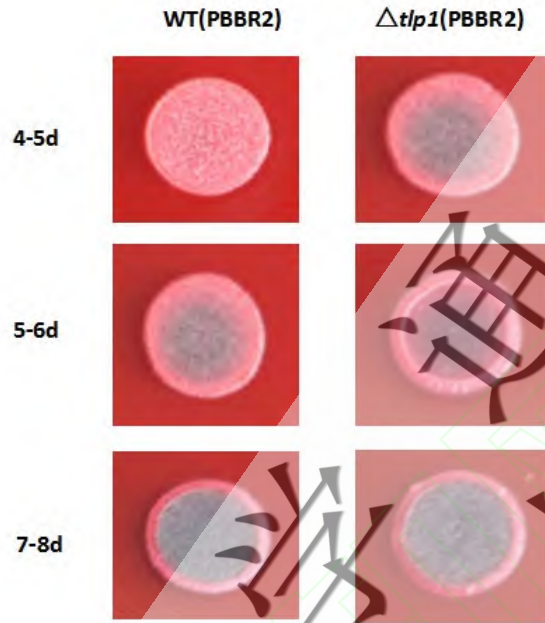


图 5 野生型和突变株在刚果红平板上黑色素的分泌情况

Figure 5 The secretion of melanin of the wild type and mutant strain on Congo red solid culture medium

Note: About 4 to 5 days, the center of mutant strain began to appear shallow black substance, and wild type does not have any similar phenomenon; About 5 to 6 days, wild type began to appear black substance, the black color of mutant strain deepened and have the diffusion trend; About 7 to 8 days, the center of wild type and mutant all become dark black.

2.6 固氮酶活性测定

根据公式分别计算出野生型菌株、*tlp1* 突变株及其回补菌株的固氮酶活，结果如图 6 所示。从图中可以看出，*tlp1* 突变株的固氮酶活相对于野生菌株减弱了 87.4%，回补菌株的固氮酶活能够回补 52.7%。数据说明甲基化受体蛋白 Tlp1 可能间接影响茎瘤固氮根瘤菌 ORS571 的自生固氮过程。

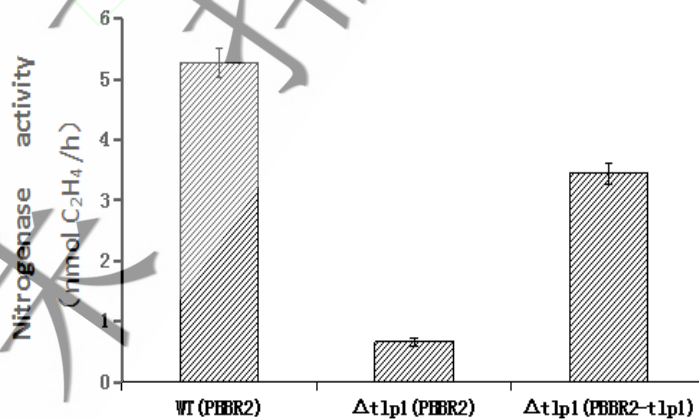


图 6 3 株不同菌株的固氮酶活

Figure 6 The nitrogenase activity of three different strains

3 结论与讨论

本研究采用体外趋化试验技术、分子生物学、生物化学及生物信息学等手段，以各种氨基酸、有机酸等为信号物质，探究茎瘤固氮根瘤菌中趋化基因簇上游甲基化受体蛋白 Tlp1 在趋化能力和茎瘤竞争性以及其此代谢产物的分泌中的功能等，结果表明，在 ORS571 中，甲基化受体蛋白 Tlp1 的缺失影响了菌体对甘油的趋化能力和固氮酶活，同时该受体还与黑色素的分泌相关。

模式菌株大肠杆菌信号转导通路包含五种甲基化受体蛋白：感受天冬氨酸和麦芽糖的受体(Tar)，感受丝氨酸的受体(Tsr)，感受核糖和半乳糖的受体(Trg)，感受二肽的受体(Tap)及感应氧的受体(Aer)。对根瘤菌趋化性研究较多的苜蓿中华根瘤菌 (*Sinorhizobium meliloti*) 的受体有 9 种^[17]，巴西固氮螺菌 (*Azospirillum brasilense*) 的受体有 48 种，其中 AerC 受体蛋白可以感受胞内的氧化还原状态(FAD)从而对外界的氧气浓度变化做出反应^[18]。茎瘤固氮根瘤菌的受体有 43 种^[19]，本实验研究的其中一种甲基化受体蛋白 Tlp1 的缺失突变对菌株感应甘油的能力产生了比较大的影响，也说明了此蛋白在茎瘤固氮根瘤菌中确实是一种趋化受体蛋白，并且对甘油表现出一定的趋化性。我们将进一步研究甲基化受体蛋白 Tlp1 在不同氨基酸和有机酸中对菌株趋化能力的影响，并探索其影响趋化的机理过程。

一般来说，黑色素并不是微生物生长、繁殖、代谢所必须的。固氮菌所产生的黑色素主要为腐殖质和腐殖酸，主要作用是保护细胞免受辐射伤害和微生态环境中其他微生物的溶菌作用。黑色素具有抗氧化、阻止心磷脂脂质体的氧化、清除自由基、抗辐射功能以及在在食品和化妆品中的重要性^[20]。而固氮酶在严格厌氧条件下固氮，甲基化受体蛋白 Tlp1 的缺失突变株提前产生黑色素，可能是固氮酶的一种自我保护作用。但我们用以甘油为碳源的液体 L3 培养基培养菌株，均未发现有黑色素的产生，可能和其培养条件有关。下一步将通过筛选培养基(碳源、氮源)和不断改变培养条件(温度、PH、通气量、菌液浓度等)使茎瘤固氮根瘤菌中的黑色素快速大量的产生并把其提取出来，确定它的类型。

在根瘤菌中，大多数生物固氮作用是由依赖钼的固氮酶进行催化，而固氮酶是由 Fe 蛋白和 MoFe 蛋白组成。之前研究已经证实 *nifE*, *nifN*, *nifX*, *nifB*, *nifQ*, *nifV*, *nifY* 和 *nifH* 基因对于固氮酶中 MoFe 的合成是非常重要的，*nifM* 对于固氮酶中 Fe 蛋白的正确折叠是不可或缺的^[21]。目前趋化受体蛋白影响固氮能力的研究并不多见，受体蛋白究竟是通过何种方式来影响固氮酶活还不清楚，是否与趋化能力的降低相关等将需要进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Tsukada S, Aono T, Akiba N, et al. Comparative genome-wide transcriptional profiling of *Azorhizobium caulinodans* ORS571 grown under free-living and symbiotic conditions[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(15): 5037-5046
- [2] Dreyfus B, Elmerich C, Dommergues Y. Free-living *Rhizobium* strain able to grow on N₂ as the sole nitrogen source[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1983, 45(2): 711-713
- [3] Sourjik V, Wingreen NS. Responding to chemical gradients: bacterial chemotaxis[J]. Current Opinion in Cell Biology, 2012, 24(2): 262-268
- [4] Taylor JR, Stocker R. Trade-offs of chemotactic foraging in turbulent water[J]. Science, 2012, 338(6107): 675-679
- [5] Scharf BE, Hynes MF, Alexandre GM. Chemotaxis signaling systems in model beneficial plant-bacteria associations[J]. Plant Molecular Biology, 2016, 90(6): 549-559, DOI: 10.1007/s11103-016-0432-4
- [6] Wadhams GH, Armitage JP. Making sense of it all: bacterial chemotaxis[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2004, 5(12): 1024-1037
- [7] Bi SY, Lai LH. Bacterial chemoreceptors and chemoeffectors[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2015, 72(4): 691-708
- [8] Wang XX, Wu L, Zhu SF, et al. Bioinformatics analysis of genomic secreted proteins in *Azorhizobium caulinodans* ORS571[J].

Genomics and Applied Biology, 2012, 31(4): 394-400 (in Chinese)

王新新, 吴亮, 朱生凤, 等. 茎瘤固氮根瘤菌 *Azorhizobium caulinodans* ORS571 基因组分泌蛋白的生物信息学分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2012, 31(4): 394-400

[9] Dreyfus B, Garcia L, Gillis M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1988, 38(1): 89-98

[10] Marx CJ, Lidstrom ME. Broad-host-range cre-lox system for antibiotic marker recycling in gram-negative bacteria[J]. Biotechniques, 2002, 33(5): 1062-1067

[11] Figurski DH, Helinski DR. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in *trans*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1979, 76(4): 1648-1652

[12] Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, et al. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBRR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes[J]. Gene, 1995, 166(1): 175-176

[13] Beringer JE. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*[J]. The Journal of General Microbiology, 1974, 84(1): 188-198

[14] Nakajima A, Aono T, Tsukada S, et al. Lon Protease of *Azorhizobium caulinodans* ORS571 is required for suppression of *reb* gene expression[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(17): 6251-6261

[15] Li Y. The Study on the wide host adaptation mechanism of *Sinorhizobium* sp. NGR234[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of China Agricultural University, 2013 (in Chinese)

李岩. *Sinorhizobium* sp. NGR234 的广宿主适应机制研究[D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2013

[16] Bible AN, Stephens BB, Ortega DR, et al. Function of a chemotaxis-like signal transduction pathway in modulating motility, cell clumping, and cell length in the *Alphaproteobacterium Azospirillum brasilense*[J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(19): 6365-6375

[17] Meier VM, Muschler P, Scharf BE. Functional analysis of nine putative chemoreceptor proteins in *Sinorhizobium meliloti*[J]. Journal of Bacteriology, 2007, 198(5): 1816-1826

[18] Xie ZH, Ulrich LE, Zhulin IB, et al. PAS domain containing chemoreceptor couples dynamic changes in metabolism with chemotaxis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(5): 2235-2240

[19] Lee KB, De Backer P, Aono T, et al. The genome of the versatile nitrogen fixer *Azorhizobium caulinodans* ORS571[J]. BMC Genomics, 2008, 9: 271

[20] Zhao LF, Xu YJ. The research progress of microorganism melanin[J]. China Condiment, 2009, 34(9): 31-34 (in Chinese)
赵龙飞, 徐亚军. 微生物黑色素的研究[J]. 中国调味品, 2009, 34(9): 31-34

[21] Hu YL, Ribbe MW. Biosynthesis of the Iron-Molybdenum cofactor of nitrogenase[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2013, 288(19): 13173-13177