

豌豆根瘤菌*ohrB* 基因的抗氧化和共生固氮表型

田梦洋 何冬兰 李晓华 周艳琳 曾小波 程国军

中南民族大学生命科学院, 武汉 430074

摘要 采用基因敲除构建豌豆根瘤菌 *ohrB* 基因突变株, 研究突变株的抗氧化和共生固氮表型。结果表明: *ohrB* 基因不影响菌株在自生培养条件下的生长能力, 但对氢过氧化枯烯(cumene hydroperoxyde, CuOOH)、过氧化氢(H₂O₂)、次氯酸钠(NaClO)等氧化物敏感, 且在 CuOOH 胁迫下, 相比野生型菌株, 突变株的存活率显著下降。荧光定量 RT-PCR 结果显示, 豌豆根瘤菌 *ohrB* 基因表达不受 H₂O₂ 诱导, 且 *ohrB* 基因的缺失对其他抗氧化基因的表达没有影响。共生实验表明, *ohrB* 基因对根瘤菌共生固氮能力及根际定殖能力没有影响, 但在 7 d 瘤龄的豌豆根瘤类菌体中表达水平显著提高, 并对根瘤菌结瘤能力有影响。*ohrB* 基因虽对豌豆根瘤菌的自生生长、共生固氮、根圈定殖没有影响, 但在抗氧化及竞争结瘤中发挥重要作用。

关键词 豌豆根瘤菌; *ohrB* 突变株; 抗氧化活性; 基因表达; 共生固氮
中图分类号 S 154.38⁺1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)03-0054-07

机体在正常的生理代谢中会产生一定量的活性氧(ROS)^[1-2], 如 H₂O₂、超氧阴离子自由基、氢氧根和有机过氧化物, 同时动植物体为了防止微生物的入侵引起的 DNA、脂质和蛋白质的损伤^[3], 也会产生相应的氧化反应阻止其侵入。

在根瘤菌侵染豆科植物根部、产生根瘤并固氮期间, 根瘤中的固氮酶有着关键作用, 然而根瘤需要一个氧压较低的环境, 才能维持固氮酶的活性^[4], 尿酸酶、铁氧还蛋白、豆血红蛋白等在维持低氧环境中均发挥重要作用。其中, 豆血红蛋白在类菌体中能截留和释放氧分子, 并有效控制氧浓度; 氧化物的清除则由复杂的抗氧化系统完成^[5]。

生物体中已进化出了复杂的抗氧化系统抵抗产生的 ROS, 但当积累量超出清除系统的能力时, ROS 就会对机体有毒害作用^[6]。而在 ROS 中, 由于有机过氧化物会与细胞膜及其他大分子反应生成自由基, 故而有更高的毒性。细菌中主要抵抗有机过氧化物损害的体系是由 *ahpCF* 操纵子编码的烷基过氧化氢还原酶, 属于过氧化物还原酶家族^[7]; 而另一道防线则是 Ohr 家族, 这种蛋白最早由 Mongkolsuk 等^[8]在 *Xanthomonas campestris* 的缺失突变体中发现, Hong 等^[9]在枯草芽胞杆菌中,

Ochsner 等^[10]在铜绿假单胞菌中对其抗氧化性均有研究。Ohr 家族中的 *ohrA* 基因和 *ohrB* 基因对有机氧化物的损害都有抵抗作用, *ohrA* 基因需在 *ohrR* 的调控下发挥作用, 而 *ohrB* 基因则需 σ^B 调控^[11]。Ohr 家族在根瘤菌-豆科植物共生固氮体系中的作用或机制鲜有报道, 本研究构建了豌豆根瘤菌 *ohrB* 基因的突变株及其互补菌株, 在此基础上, 通过菌株自生以及菌株与甜豌豆共生固氮试验, 研究 *ohrB* 基因对氧化物的敏感性及在共生固氮中的功能, 并分析了 *ohrB* 基因及其他抗氧化相关基因的表达, 为阐明根瘤菌 *ohrB* 基因的抗氧化机制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

1) 菌株和培养基。文中所用菌株、质粒见表 1。试验所用甜豌豆种籽: 笔者所在实验室保藏; 豌豆根瘤菌培养用 AMS 或 TY 培养基, 培养温度 30 ℃; 大肠杆菌培养用 LB 培养基, 培养温度 37 ℃。豌豆根瘤菌培养所用抗生素: 四环素(Tc) 2 μg/mL, 新霉素(Neo) 80 μg/mL, 链霉素(Str) 500 μg/mL; 大肠杆菌培养使用抗生素: 四环素(Tc) 5 μg/mL; 卡那

表 1 菌株、质粒及 PCR 引物
Table 1 Strains, plasmids and primers

菌株、质粒或引物 Strains, plasmids or primers	特征 Description	参考文献、来源、序列 Reference, sources, sequences
菌株 Strains		
Rlv3841	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>viciae</i> , Str ^r	[12]
RLohrB	Rlv3841 <i>ohrB</i> :: pKohrB, Str ^r Neo ^r	本研究 This study
RLohrB(pRKohrB)	RLohrB carrying pohrB, Str ^r Neo ^r Tc ^r	本研究 This study
DH5α	F ⁻ <i>lacZ</i> DM15 <i>recA1 hsdR17 supE44</i> D(<i>lacZYA argF</i>)	本研究 This study
质粒 Plasmids		
pRK415	IncP 广宿主克隆载体 IncP broad host range cloning vector, Tc ^r	笔者实验室保存 This lab
pK19mob	pUC19 衍生质粒 pUC19 derivative <i>lacZ mob</i> ; Km ^r	笔者所在实验室保存 This lab
pRK2013	三亲本接合辅助质粒 Helper plasmid for triparental mating; Km ^r	笔者所在实验室保存 This lab
pKohrB	含 pr1373/pr1374 扩增片段的 pK19mob 质粒 pr1373/pr1374 PCR product in pK19mob, Km ^r	本研究 This study
pRKohrB	含 pr1490/pr1491 扩增片段的 pRK415 质粒 pr1490/pr1491 PCR product in pRK415, Tc ^r	本研究 This study
引物 Primers		
ohrUP	<i>ohrB</i> 基因定点突变引物	5'TTTA <u>AGCTT</u> CTATAGATGGCCCGATTCCCG3'
ohrLW	Primers for RL2927 (<i>ohrB</i>) mutation	5'TTTT <u>TCTAGAT</u> ATTGTCCGTGTGTCCGCTTGG3'
ohrMP	检测 <i>ohrB</i> 基因的引物 Mapping PCR primer for <i>ohrB</i>	5'GGCCCTCCGCATCAAATCCTC3'
pK19A	pK19mob 质粒的通用引物	5'ATCAGATCTTGATCCCCTGCG3'
pK19B	Primers for pK19mob	5'GCACGAGGGAGCTTCCAGGG3'
ohrBhbUP	<i>ohrB</i> 基因互补引物	5'TTTGGT <u>TACGCGCAGCA</u> ACCCATGGAAACC3'
ohrBhbLW	Primers for <i>ohrB</i> complementation	5'TTTGGAT <u>CCGAGCCCTCCGCATCAAATC</u> 3'
M13-F	<i>LacZ</i> 引物 <i>LacZ</i> primers	5'CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC3'
M13-R		5'CACACAGGAAACAGCTATGAC3'
gyrB1-for	<i>gyrB1</i> 荧光定量 PCR 引物	5'GGCATCACCAAAAAGGGAAAA3'
gyrB1-rev	<i>gyrB1</i> primers for qRT-PCR	5'GCGAGGAGAATTTCCGATCA3'
ohrB-QF	<i>ohrB</i> 荧光定量 PCR 引物	5'CGGGCAGGCTGACATTGAGG3'
ohrB-QR	<i>ohrB</i> primers for qRT-PCR	5'GCTGCTCAGAGAAAGATCAC3'
gpx-QF	<i>gpx</i> 荧光定量 PCR 引物	5'AAACAGTGGATGGTCGTGAG3'
gpx-QR	<i>gpx</i> primers for qRT-PCR	5'GAGCTTTTCCAATCCCTCAT3'
prx-QF	<i>prx</i> 荧光定量 PCR 引物	5'CAGTGCTCATTGGGTTGTTC3'
prx-QR	<i>prx</i> primers for qRT-PCR	5'CTGTGATGCGCTTTCTCCTG3'
grxC-QF	<i>grxC</i> 荧光定量 PCR 引物	5'GAAGAAAAGGGTGTCGAATA3'
grxC-QR	<i>grxC</i> primers for qRT-PCR	5'AGATCTGCGGAAAAGTGGTA3'

注：下划线为限制性酶切位点 Note: The restriction sites are underlined.

霉素 (Km) 20 μg/mL。所用抗生素均购于 Sigma 公司。

2) 试剂与仪器。T4 DNA 连接酶、RNAiso Plus、限制性内切酶均购于 TaKaRa 公司；*Taq* DNA 聚合酶、phusion 高保真酶购于 Thermo Scientific 公司；反转录试剂分别使用 PrimeScript™ RT reagent Kit 和 FastStart Universal SYBR Green Master (Rox)。

1.2 RLohrB 突变菌株和 RLohrB(pRKohrB)互补菌株的构建

1)构建 RLohrB 突变菌株。参照 Luo 等^[13]方法构建 *ohrB* 基因突变株,以 ohrUP/ohrLW 为引物(表 1),根瘤菌 3841 的总 DNA 作为扩增模板,进行 PCR 反应。用 *Xba* I 和 *Hind* III 双酶切 pK19mob 载体与目的片段,经 T4 DNA 连接酶过夜连接,转化大肠杆菌 DH5α 感受态,转化子经酶切

和测序验证后,获得阳性转化子大肠杆菌 DH5 α (pKohrB)。再进行三亲本结合实验:以根瘤菌 3841 为受体菌,大肠杆菌 DH5 α (pKohrB) 为供体菌,大肠杆菌 DH5 α (pRK2013) 为辅助菌,通过抗生素平板筛选及 ohrMP/ pK19A 为引物的 PCR 验证,最终获得突变菌株 RLohrB。

2) 构建 RLohrB (pRKohrB) 互补菌株。以豌豆根瘤菌 Rlv3841 总 DNA 为模板,ohrBhbUP/ohrB-hbLW 为引物(表 1),进行 PCR 反应,得到目的片段。采用 *Kpn* I 和 *Bam* H I 双酶切 pRK415 载体和目的片段,经 T4 DNA 连接酶过夜连接,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态,转化子经酶切和测序验证后,获得阳性转化子 pRKohrB。三亲本接合方法同上,采用引物 M13F/M13R PCR 验证,获得回复突变菌株 RLohrB (pRKohrB)。

1.3 菌株自生生长试验

1) 无 H₂O₂ 胁迫条件下菌株的生长。已活化的突变菌株 RLohrB 与野生型豌豆根瘤菌 3841 接种于添加相应抗生素的 TY 斜面,30 ℃ 培养 2 d,经 AMS 培养基洗脱后,接种于 AMS 培养基中,培养条件为 30 ℃、200 r/min,每隔 6 h 取 3 mL 测 D_{600} 值,每组 3 个重复。

2) 抑菌试验。已活化的突变菌株 RLohrB、互补菌株 RLohrB (pRKohrB) 和野生型豌豆根瘤菌 3841 接种于添加相应抗生素的 TY 斜面,30 ℃ 培养 2 d,无菌水洗脱,使菌液 D_{600} 为 1,涂布 100 μ L 菌液于 AMS 平板,然后将含有不同浓度的氢过氧化枯烯(cumene hydroperoxyde, CuOOH)、过氧化氢(H₂O₂)、次氯酸钠(NaClO)的圆滤纸片置于平板中央,每组均 3 个重复,30 ℃ 正置培养,24 h 后测量抑菌圈直径。CuOOH 溶于 95% 无水乙醇,以润有 95% 无水乙醇的圆滤纸片作为对照。

3) 氧化物条件下存活率测定。将突变菌株 RLohrB 与野生型 3841 菌株分别接种于液体培养基,30 ℃、200 r/min 摇床培养至对数期(D_{600} 为 0.3~0.6),每组 3 个重复。取 6 管 10 mL 菌液,离心,用生理盐水清洗 3 遍,再用浓度分别为 0、0.5、1、2、3、5 mmol/L 的 10 mL CuOOH 在 30 ℃ 培养箱中处理 1 h^[14],菌体经生理盐水洗涤后,稀释涂布 TY 平板。30 ℃ 培养 2 d,测定细菌存活率,每组 3 个重复。

1.4 qRT-PCR 检测基因表达量检测

将突变菌株 RLohrB 与野生型 3841 菌株分别

接种于 AMS 液体培养基,30 ℃、200 r/min 摇床培养至 D_{600} 值为 0.3~0.6,每组 3 个重复。菌体经清洗后,用 0.5 mmol/L H₂O₂ 处理 1 h,对照用生理盐水处理。RNA 提取采用 Trizol 方法,经试剂盒反转录成 cDNA,再对 cDNA 模板进行荧光定量 PCR。相关抗氧化基因引物见表 1, *gyrB1* 为内参基因。

提取类菌体 RNA 时,采集接种 25 d 的豌豆植株根瘤,加入液氮,将根瘤研磨成粉状。RNA 提取、cDNA 制备方法与细菌 RNA 制备方法相同。进行类菌体中相关抗氧化基因表达分析时,以 AMS 培养的对数期野生型菌株为对照。

1.5 植物盆栽试验

使用蛭石作为基质^[15]种植甜豌豆,豌豆种籽经 95% 乙醇、2% 次氯酸钠水溶液表面消毒后,播种于已灭菌并含有无菌无氮营养液的蛭石塑料烧杯中,每钵 2 粒豌豆,3 钵重复,每粒豌豆接种 1 mL 相应菌液。播种完毕保鲜膜封口,置于光照培养箱培养。培养条件:22 ℃、湿度 70% 光照培养 16 h;20 ℃、湿度 70% 黑暗培养 8 h。3~4 d 后,用无菌牙签将保鲜膜挑破,让幼苗长出。

1) 根瘤固氮酶活测定。接种突变菌株 RLohrB、互补菌株 RLohrB (pRKohrB) 和野生型菌株 3841 于添加相应抗生素的 TY 斜面上,30 ℃ 培养 2 d,用无菌水洗脱,稀释至相同 D_{600} 值,每粒豌豆接种 1 mL 上述菌液,于光照培养箱中培养 3 周。根瘤固氮酶活采用乙炔还原法测定。

2) 竞争结瘤试验。从相应 TY 斜面上用无菌水洗脱菌体,配置不同比例的 3841 与 RLohrB 混合菌液,使每毫升中 3841 与 RLohrB 的 CFU 比例为 $10^6 : 10^6$ 、 $10^6 : 10^7$ 、 $10^7 : 10^6$ 。播种时,接种 1 mL 上述混合菌液。4 周后,每钵取根瘤 50 个,捣破根瘤沾其液体划线于 TY+Str+Neo 和 TY+Str 平板上,30 ℃ 恒温培养箱培养 3 d,统计突变株。

3) 突变株根圈定殖能力测定。将 3841 与 RLohrB 菌液按不同体积比混合成 1 mL, RLohrB : 3841 比例分别为 0 : 1、1 : 0、1 : 1、10 : 1^[16],每组 8~10 个重复。接种 1 mL 菌株混合液于种植 1 周的豌豆植株根部,置光照条件下培养 1 周后,去除根部以上部分,加入 PBS 缓冲液 20 mL,高速震荡 30 min 后,取上清菌液并 10 倍梯度稀释,分别涂布于抗生素平板 TY+Str 和 TY+Str+Neo。30 ℃ 培养 3 d 后,统计菌落数。其中, TY+Str 长出的菌为

野生型和突变体菌落的总和,而 TY+Str+Neo 平板长出的菌为突变体 RLohrB。

2 结果与分析

2.1 RLohrB 突变菌株和 RLohrB(pRKohrB)互补菌株构建

以含 Str、Neo 的抗性平板筛选出来的单菌落为模板,用 *ohrMP*/Pk19A 引物成功扩增出 1 kb 左右的 PCR 产物,获得 *ohrB* 基因插入突变株 RLohrB。

将 pRKohrB 质粒通过三亲本接合导入突变株 RLohrB, Tc 抗性筛选接合子。以 M13-F/M13-R 引物,成功从接合子中扩增出 1.1 kb 左右的目的片段,获得阳性互补菌株 RLohrB(pRKohrB)。

2.2 菌株自生生长

1)*ohrB* 突变对菌株生长的影响。将突变菌株 RLohrB 与野生型豌豆根瘤菌 3841 接种于 AMS 液体培养基中,每隔 6 h 取样测 D_{600} 值,并记录。数据显示,RLohrB 生长情况与野生型菌株 3841 生长状况没有显著差别,表明 *ohrB* 基因突变不影响豌豆根瘤菌正常生长。

2)*ohrB* 突变对菌株抗氧化物的影响。不同氧化物对 RLohrB、3841 和互补菌株的抑菌能力结果见表 2。 H_2O_2 浓度为 20、100、500、1 000 mmol/L, 20 h 时,与对照 3841 相比,突变菌株抑菌圈直径均较大,且在 H_2O_2 浓度为 1 000 mmol/L 时,两者有显著差异;CuOOH 浓度为 5、20、100、500 mmol/L, 20 h 时,与对照 3841 相比,在 CuOOH 浓度为 100 mmol/L 时,两者有显著差异;NaClO 浓度为 12、64、320、640 mmol/L, 20 h 时,与对照 3841 相比,在 NaClO 浓度为 320 mmol/L 时,两者有显著差异。而这 3 种氧化物对 *ohrB* 基因的互补菌株 RLohrB(pRKohrB)抑菌圈大小与 3841 没有显著差别,表明互补菌株中 *ohrB* 基因成功恢复了 *ohrB* 突变菌株的抗氧化能力。

表 2 不同氧化物的抑菌能力(抑菌圈直径)				
Table 2 Inhibition zone diameters of different oxides cm				
菌株 Strain	氧化物 Oxides			
	1 000 mmol/L H_2O_2	100 mmol/L CuOOH	320 mmol/L NaClO	
3841	5.17±0.31	3.37±0.15	4.43±0.12	
RLohrB	6.37±0.29*	4.03±0.21*	6.63±0.15*	
RLohrB(pRKohrB)	5.23±0.25	3.70±0.46	4.40±0.10	

注: * 表示在 0.05 水平上 RLohrB(pRKohrB) 和 Rlv3841 存在显著差异 Note: * shows significant difference compared to RLohrB(pRKohrB) and Rlv3841 at $P<0.05$.

为了检测菌株在有氧化物胁迫下的生存能力,用不同浓度的 CuOOH 处理对数期的菌株,计算存活率(图 1)。在 CuOOH 处理下,菌株的生长均受到一定的影响,但是 RLohrB 突变菌株更加敏感。在 CuOOH 浓度分别为 0.5、1、2 mmol/L 时,RLohrB 突变菌株存活率分别为 42%、24%、0.7%,相比野生型 3841 菌株,其存活率均显著下降。

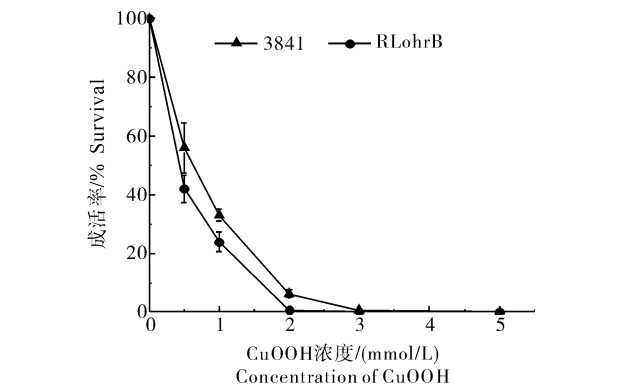
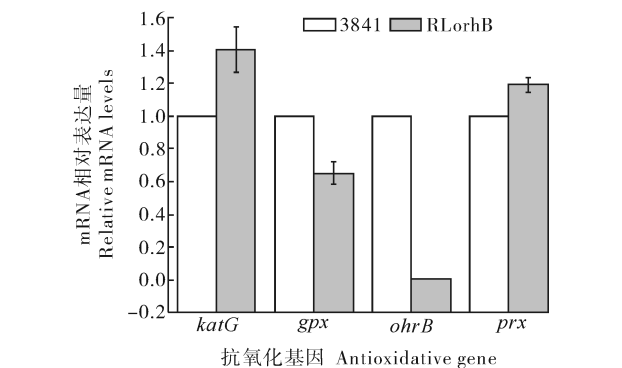


图 1 CuOOH 胁迫下菌株抑制曲线
Fig.1 Inhibition of the growth of RLohrB and Rlv3841 in the presence of CuOOH

2.3 RT-PCR 分析抗氧化相关基因的表达量

将对数期的菌体用生理盐水及 0.5 mmol/L H_2O_2 处理 1 h 后,提取 RNA,进行荧光定量 RT-PCR 后,将所得到的数据用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行处理,结果如图 2 所示。用 0.5 mmol/L H_2O_2 处理 3841 和 RLohrB 菌株时,突变体 RLohrB 菌株中 *ohrB* 表达量是 3841 的 0.009 ± 0.001 倍,其他抗氧化基因表达量分别为 *katG* 为 3841 的 1.463 ± 0.14 倍, *gpx* 为 3841 的 0.617 ± 0.07 倍, *prx* 为 3841 的 1.19 ± 0.05 倍。

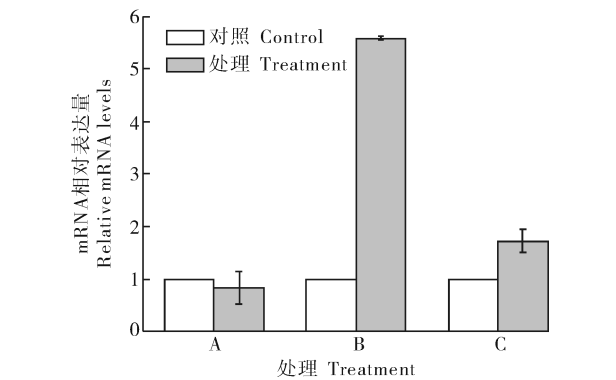


ohrB: Organic hydroperoxide; *gpx*: Glutathione peroxidase; *prx*: Peroxiredoxin.

图 2 菌株抗氧化基因在 H_2O_2 胁迫下的表达量
Fig.2 The antioxidative gene expression of RLohrB and 3841 in the presence of H_2O_2

倍,其表达量均没有达到显著差异水平。结果表明:在 H_2O_2 胁迫下,*ohrB* 基因对其他抗氧化相关基因的表达没有影响。此外,用浓度为 0.5 mmol/L 的 H_2O_2 处理 3841 菌株 1 h,*ohrB* 基因的表达量为未处理的 0.83 ± 0.30 倍,尚未达到显著差异水平(图 2)。

ohrB 在形成 25 d 根瘤类菌体中表达量为在自生条件下的 1.73 ± 0.22 倍,表达量有一定提高,但没有达到显著水平。然而,*ohrB* 基因在形成 7 d 根瘤类菌体中的表达已有文献报道,其表达量为在自生条件下的 5.59 ± 0.04 倍^[17],表明在根瘤形成初期 *ohrB* 基因表达显著上调(图 3)。



以自由生长下 *ohrB* 基因表达对照。A:0.5 mmol/L H_2O_2 ; B: 7 d类菌体; C:25 d 类菌体。The expression of *ohrB* in free living condition was used as control.A: 0.5 mmol/L H_2O_2 ; B:7-day-old pea bacteroids; C:25-day-old pea bacteroids.

图 3 *ohrB* 基因在 H_2O_2

胁迫条件下与类菌体中相对表达量

Fig.3 The expression of *ohrB* during symbiosis and free-living growth under the H_2O_2

2.4 菌株与植物共生

1)根瘤固氮酶活。盆栽 4 周后,突变株 RLo-hrB 接种植株形成红色有效根瘤,而且与野生型 3841 相比,突变株和互补菌株 RLohrB(pRKohrB)形成根瘤数没有显著差异(表 3)。进一步利用乙炔还原法测定固氮酶活,结果表明:突变株与野生型菌株及互补菌株固氮酶活没有差异(表3),证明*ohrB*

表 3 突变体的共生固氮能力

Table 3 The symbiotic nitrogen fixation ability of the mutant RLohrB

菌株 Strain	根瘤数/株 Nodule numbers per plant	单株固氮酶活/(nmol/h) Nitrogenase activity per plant
Rlv3841	123.0±23.0	3.32±0.36
RLohrB	133.0±58.1	3.08±0.55
RLohrB(pRKohrB)	141.6±21.9	3.10±0.91

基因的突变对菌株固氮能力没有影响。

2)竞争结瘤能力。突变株 RLohrB 形成类菌体能在 TY+Str+Neo 平板上长出,而野生型则不能。当植株接种 3841 和 RLohrB 的比例分别为 $10^7 : 10^7$ 、 $10^7 : 10^6$ 和 $10^6 : 10^7$ 时,突变体 RLohrB 的根瘤占有率分别为 32%、16%和 45%(图 4)。其中在接种比例为 $10^7 : 10^7$ 时,3841 和 RLohrB 的根瘤菌占有率仅为野生型的 1/3 左右,表明根瘤菌 *ohrB* 突变显著影响其竞争结瘤能力。

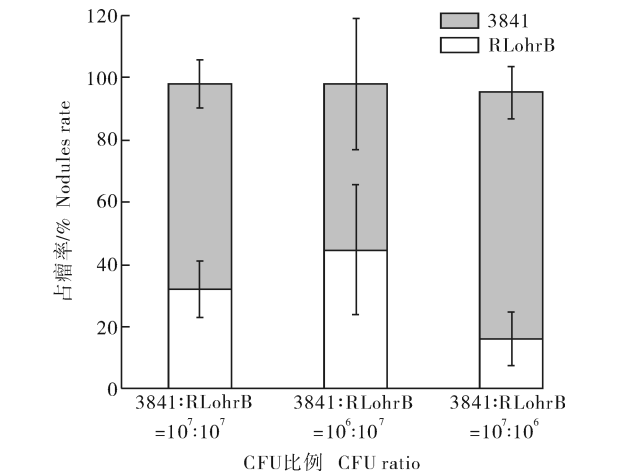


图 4 突变株 RLohrB 竞争结瘤能力实验

Fig.4 A test on competition in nodulation ability of the mutant RLohrB

3)根圈定殖能力。将不同浓度的 3841 和 RLo-hrB 混合菌液接种豌豆植株,研究 *ohrB* 突变对根瘤菌根瘤定殖能力的影响。分别接种 3841 和 RLo-hrB 时,3841 菌数为 RLohrB 的 1.12 倍;当 3841 和 RLohrB 按 1 : 1 混合接种时,3841 菌数为 RLohrB 的 1.21 倍;当 RLohrB 的接种量为 3841 的 10 倍时,RLohrB 的菌数仅为 3841 是的 1.28 倍。结果表明,*ohrB* 基因突变对根瘤菌在根圈的定殖能力没有显著影响。

3 讨 论

H_2O_2 等氧化物会通过损害蛋白质、脂质及 DNA,影响细胞的正常生理代谢,而机体已进化出了许多复杂的机制来保护自身不受 ROS 的损害。本研究发现 *ohrB* 基因的突变对豌豆野生型根瘤菌 3841 的生长没有影响,但对 H_2O_2 、 CuOOH 、 NaClO 等氧化物十分敏感。在 *Burkholderia thailandensis*、*Mycobacterium smegmatis*^[18] 等细菌中,已证明了 Ohr-OhrR 在抵抗氧化物过程中有重要地位。说

明 *ohrB* 基因在有机氧化物的解毒过程中的作用是其他抗氧化基因不可替代的。用不同浓度的 CuOOH 处理对数期的突变型与野生型菌株时, 菌数生长受到抑制, 且随着氧化物浓度的增加, 菌株逐渐死亡。在 *Pseudomonas aeruginosa* 中, *ohrB* 基因缺失突变体在 1.25 mmol/L CuOOH 及 114 mmol/L *t*-BHP 处理时, 其抑菌圈大小与野生型比较有明显差异^[10]。

本研究中经 H₂O₂ 处理, 野生型菌株 3841 中 *ohrB* 基因的表达量没有显著变化, Ochsner 等^[10] 在 *Pseudomonas aeruginosa* 中也发现 H₂O₂、百草枯等对 *ohrB* 基因的表达没有诱导作用。Prx、Grx、KatG 和 Gpx 在抗氧化系统中发挥重要作用, Prx 能将 ROOH(过氧化物过氧基)还原成 ROH^[19]; 谷胱甘蛋白(Grx)在维持细胞内氧化还原态中发挥重要作用^[20]; 谷胱甘肽过氧化物酶(Gpx)具有清除自由基及其衍生物的作用。研究表明, *gpx*、*prx* 等抗氧化基因在 H₂O₂ 胁迫下的表达并不受 *ohrB* 基因突变的影响, 说明豌豆根瘤菌 *ohrB* 突变不影响其他抗氧化基因的表达^[21], 该基因的表达调控与 OxyR 的调控系统相互独立。研究发现, 在 *Alfalfa-Sinorhizobium meliloti* 共生体中, 根瘤菌感染及结瘤受到早期抗氧化系统的调控^[22], 但 *ohr* 基因的缺失对植物的共生和固氮酶活没有影响^[23]。本研究也发现, *ohrB* 的突变不影响植株的共生固氮能力和根圈定殖能力。Ochsner 等^[10] 发现在 *ohr* 基因缺失时 OxyR 等抗氧化系统会对其缺失有补偿作用, 保持根瘤低氧环境, 从而弥补了因 *ohrB* 基因缺失而导致的抗氧化缺陷, 保证了突变株的共生固氮功能, 但 *ohrB* 基因的突变影响了根瘤菌在豌豆宿主根部的竞争结瘤能力, Smadar 等^[24] 发现 ROS 在共生过程中会对根瘤菌早期感染产生损害。进而推测, *ohrB* 基因突变可能导致早期共生受损, 从而影响突变株的竞争结瘤能力。并且 RT-PCR 检测也表明, 在形成 7 d 和 25 d 的根瘤类菌体中其表达量与自生条件下比较有明显差异, 说明在类菌体分化和根瘤形成阶段, *ohrB* 基因在抵抗 ROS 中有重要作用。

参 考 文 献

- [1] GONZALEZ-FLECHA B, DEMPLE B. Homeostatic regulation of intracellular hydrogen peroxide concentration in aerobically growing *Escherichia coli* [J]. *Journal of bacteriology*, 1997, 179 (2): 382-388.
- [2] HALLIWELL B, GUTTERIDGE J M. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease [J]. *Biochemical journal*, 1984, 219 (1): 1-14.
- [3] TALARCZYK A, HENNIG J. Early defence responses in plants infected with pathogenic organisms [J]. *Cellular and molecular biology letters*, 2001, 6(4): 955-970.
- [4] DALTON D A, POST C J, LANGEBOER L. Effects of ambient oxygen and of fixed nitrogen on concentrations of glutathione, ascorbate, and associated enzymes in soybean root nodules [J]. *Plant physiology*, 1991, 96(3): 812-818.
- [5] DALTON D A, LANGEBOER L, TRENNEMAN N C. Correlations between the ascorbate-glutathione pathway and effectiveness in legume root nodules [J]. *Physiologia plantarum*, 1993, 87(3): 365-370.
- [6] HUNG S H, YU C W, LIN C H. Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants [J]. *Bot Bull Acad Sin*, 2005, 46 (1): 1-10.
- [7] POOLE L B. Bacterial defenses against oxidants: mechanistic features of cysteine-based peroxidases and their flavoprotein reductases [J]. *Archives of biochemistry and biophysics*, 2005, 433(1): 240-254.
- [8] MONGKOLSUK S, PRAITUAN W, LOPRASERT S, et al. Identification and characterization of a new organic hydroperoxide resistance (*ohr*) gene with a novel pattern of oxidative stress regulation from *Xanthomonas campestris* pv. phaseoli [J]. *Journal of bacteriology*, 1998, 180(10): 2636-2643.
- [9] HONG M, FUANGTHONG M, HELMANN J D, et al. Structure of an OhrR-ohrA operator complex reveals the DNA binding mechanism of the MarR family [J]. *Molecular cell*, 2005, 20 (1): 131-141.
- [10] OCHSNER U, HASSETT D J, VASIL M L. Genetic and physiological characterization of *ohr*, encoding a protein involved in organic hydroperoxide resistance in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Journal of bacteriology*, 2001, 183(2): 773-778.
- [11] MAYUREE F, SOPAPAN A, SKORN M, et al. OhrR Is a repressor of *ohrA*, a key organic hydroperoxide resistance determinant in *Bacillus subtilis* [J]. *Journal of bacteriology*, 2001, 183(14): 4134-4141.
- [12] JOHNSTON A W B, BERINGER J E. Identification of the *Rhizobium* strains in pea root nodules using genetic markers [J]. *Journal of general microbiology*, 1975, 87(2): 343-350.
- [13] LUO L, YAO S, BECKER A, et al. Two new *Sinorhizobium meliloti* LysR-type transcriptional regulators required for nodulation [J]. *Journal of bacteriology*, 2005, 187(13): 4562-4572.
- [14] TA P, BUCHMEIER N, NEWTON G L, et al. Organic hydroperoxide resistance protein and ergothioneine compensate for loss of mycothiol in *Mycobacterium smegmatis* mutants [J]. *Journal of bacteriology*, 2011, 193(8): 1981-1990.
- [15] POOLE P S, BLYTH A, REID C J, et al. Myo-inositol catabolism and catabolite regulation in *Rhizobium leguminosarum*

bv.viciae[J].Microbiology,1994,140(10): 2787-2795.

[16] KARUNAKARAN R,EBERT K,HARVEY S.Thiamine is synthesized by a salvage pathway in *Rhizobium leguminosarum* bv.viciae strain 3841[J].Journal of bacteriology,2006,188(18): 6661-6668.

[17] KARUNAKARAN R, RAMACHANDRAN V K,SEAMAN J C,et al.Transcriptomic analysis of *Rhizobium leguminosarum* b.v.viciae in symbiosis with host plants *Pisum sativum* and *Vicia cracca*[J].Journal of bacteriology,2009,191(12): 4002-4014.

[18] PANDE A,GROVE A.Oxidative stress based response of a transcriptional regulator, OhrR, from *Burkholderia thailandensis* (LB252)[J].The FASEB journal,2014,28(1): 252.

[19] 王蔚,祁婷婷,刘芸,等.过氧化物氧还蛋白家族的功能及调节机制[J].生命的化学,2010(2): 184-188.

[20] HOLMGREN A.Thioredoxin and glutaredoxin systems[J].The Journal of biological chemistry,1989,264(24): 13963-13966.

[21] CHUCHUE T,TANBOON W,PRAPAGDEE B, et al.OhrR and ohr are the primary sensor/regulator and protective genes against organic hydroperoxide stress in *Agrobacterium tumefaciens*[J].Journal of bacteriology,2006,188(3): 842-851.

[22] SANTOS R,HÉROUART D,SIGAUD S, et al.Oxidative burst in alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction [J].Molecular plant-microbe interactions,2001,14(1): 86-89.

[23] FONTENELLE C,BLANCO C,ARRIETA M,et al.Resistance to organic hydroperoxides requires ohr and ohrR genes in *Sinorhizobium meliloti*[J].BMC microbiology,2011,11(1): 100-110.

[24] SMADAR P G,NAOMI M B,ALEX L.ROS production during symbiotic infection suppresses pathogenesis-related gene expression [J].Plant signal behave,2012,7(3):409-415.

Antioxidation and symbiotic nitrogen fixation phenotype
of *ohrB* gene in *Rhizobium leguminosarum*

TIAN Mengyang HE Donglan LI Xiaohua ZHOU Yanlin ZENG Xiaobo CHENG Guojun
College of Life Science, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China

Abstract Through homologous recombination, a *Rhizobium leguminosarum ohrB* mutant was constructed, and its antioxidation and symbiotic nitrogen fixation phenotypes were studied. The growth ability of the *ohrB* mutant was the same as the wild type under free-living condition. However, cells of the *ohrB* mutant were sensitive to CuOOH, H₂O₂ and NaClO. The *ohrB* mutant was highly sensitive after the short exposure to CuOOH. The results of quantitative real-time PCR showed that the expression of *ohrB* was not stimulated by exogenous H₂O₂. The transcription of other antioxidant genes in the *ohrB* mutant strain was not changed. The *ohrB* mutant had normal nitrogenase activity and the same colonization ability in the pea rhizosphere compared to the wild type. However, the *ohrB* gene in 7-day-old pea bacteroids was expressed significantly higher than that in free-living cells. The competition nodule ability of *ohrB* mutant was reduced compared to that of the wild type. It is indicated that *ohrB* is essential in antioxidation and competition of nodule ability, playing an important role in antioxidation and symbiosis.

Keywords *Rhizobium leguminosarum*; *ohrB* mutant; antioxidative activity; gene expression; symbiotic nitrogen fixation

(责任编辑:张志钰)