

未知蛋白 CcdC 调控瓦雷兹芽孢杆菌 FZB42 的生物膜分散影响其促生作用

沈紫竹^{1,2}, 邵林^{1,2}, 陈芃^{1,2}, 李美橘^{1,2}, 樊奔^{1,2}, 赵银娟^{1,2*}

(1.南方林业协同创新中心; 2.南京林业大学 林草学院、水土保持学院 210037)

摘要:【目的】细菌生物膜的发育是一个复杂的循环过程,包括初始附着、形成、成熟和分散等。已有大量研究表明生物膜形成对细菌发挥功能具有重要作用。瓦雷兹芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*) FZB42 是一株商品化的根际植物促生菌 (PGPR),能以生物膜方式定殖于植物根部并促进植物生长。然而 PGPR 的应用存在不稳定和时效性差的问题。生物膜分散是否会对 PGPR 的持续应用产生影响。本研究从 FZB42 突变体文库中筛选到一个与生物膜分散相关的新基因——*ccdC*,深入探讨了该基因在生长、运动性、芽孢形成、生物膜形成与分散、定殖和促生中的功能,并从第二信使 c-di-GMP 的角度初步揭示了 *ccdC* 基因的调节机制,为 PGPR 的高效应用探寻了一条新的路径。【方法】利用同源重组法构建敲除株、采用半固体平板法、24 孔板培养等方法对敲除株进行芽孢形成、运动、生物膜形成和分散等生物学功能的检测。并通过 GFP 标记法比较野生型 FZB42 和敲除株在本氏烟根部的定殖能力和促生能力的差异。进一步用 ELISA 和 qPCR 的方法探究 *ccdC* 的调控机理。【结果】*ccdC* 基因缺失会降低细菌运动能力,并使细菌无法形成芽孢和分散生物膜。在盆栽实验中,*ccdC* 突变株具有比野生型更突出的促生能力,但荧光显微镜观察结果显示,两者在定殖第二天均能以聚集形态存在,且在定殖数量上无明显差异,说明 *ccdC* 突变株促生能力的增强可能不仅仅是因为定殖能力增强。进一步实验结果发现,*ccdC* 突变株能产生更多的 IAA 及嗜铁素等物质。这说明 PGPR 生物膜分散的发生可能不利于 PGPR 的促生抗逆功能的完全发挥。*ccdC* 基因除了介导细菌生长、分散、芽孢形成等行为外,也参与调节促生物质的合成。利用信号普查数据库分析 FZB42 中含有参与第二信使 c-di-GMP 合成和降解相关结构域的基因 *ykuI*、*yuxH* (含有参与 c-di-GMP 降解结构域的基因),*ydaK*、*yhcK*、*yybT* (含有参与 c-di-GMP 合成结构域的基因)。荧光定量 PCR 结果显示 *ccdC* 基因缺失下调了 *ykuI*、*yuxH* 的表达,上调了 *ydaK*、*yhcK*、*yybT* 的表达,说明突变 *ccdC* 基因有助于细胞内 c-di-GMP 浓度积累,ELISA 实验检测胞内 c-di-GMP 水平也证实了在 *ccdC* 敲除株中 c-di-GMP 浓度要高于野生型。这说明 *ccdC* 很可能通过调节 c-di-GMP 的合成和降解来实现多细胞行为的调控。【结论】未知蛋白 CcdC 调控了瓦雷兹芽孢杆菌 FZB42 的生物膜分散多细胞行为,并影响了 PGPR FZB42 在促生作用中的发挥。本研究结果不仅从生物膜分散的角度了解了这一时期细菌的发育特征及分子调控方式,还探究了生物膜分散的发生对 PGPR 发挥促生作用的影响,为高效利用 PGPR 打下了理论基础。

关键词: CcdC 蛋白; 生物膜分散; c-di-GMP; 定植促生