

紫云英根瘤菌种内不同菌株群体感应信号分子差异性和交互性分析^①

郑会明, 毛怡玲, 凌 军, 钟增涛*

(南京农业大学生命科学学院, 南京 210095)

摘 要: 根瘤菌可以和豆科植物共生固氮, 在很多根瘤菌中群体感应系统参与了结瘤固氮等相关生理过程的调节。本研究从野外不同生境紫云英宿主根部瘤体中分离了 26 株根瘤菌, 体外定量检测了各菌株产生自体诱导物(AI)信号分子的能力, 以及不同菌株 AI 激活中慢生华癭根瘤菌 Mh 菌株 AHLs 合成酶基因 *mrhI* 表达的情况, 发现紫云英根瘤菌种内不同菌株间存在群体感应交互性。通过导入外源 AttM 水解酶观察菌株 AI 活性的变化, 应用薄层层析法定性分析不同菌株的 AI 结构, 初步揭示了不同紫云英根瘤菌产生 AI 特性的差异和多样性。

关键词: 紫云英根瘤菌; 群体感应; 自体诱导物; 交互性; AttM 水解酶

中图分类号: 093

在细菌胞外信号分子调节系统中群体感应的调节尤为重要, 群体感应(quorum sensing)是细菌根据细胞密度变化进行基因表达调控的一种生理行为, 具有群体感应的细菌能产生并释放一种被称为自体诱导物(autoinducer, AI)^[1]的信号分子, 它可以被多种生物群落感知并随着细胞密度增加而同步增加, 当自体诱导物累积到一定程度时会改变细菌特定的基因表达。通过对体外自体诱导物的检测, 革兰氏阳性及阴性细菌即可以监控其他细菌的存在完成与周围环境进行信息交流的过程, 从而调整细胞内基因的表达并最终改变细菌的一系列生理活性, 这些细菌的生理活性包括共生、细菌毒性、生物体发光、竞争、接合、抗生素的产生、运动性、孢子及生物膜的形成等^[2]。该信号传递系统最初只是认为在特定的细菌中调节特定的生理功能, 但现在一致认为大多数细菌中至少存在一种群体感应调节系统^[3], 并且有报道群体感应在与植物相互的假单胞菌中比土壤自由生活假单胞菌中更加普遍, 揭示了群体感应对细菌与真核生物间相互作用是非常重要的, 表明群体感应在调整细菌种内和种间细胞间的通讯上具有重要意义^[4]。

与大多数革兰氏阴性细菌一样, 紫云英根瘤菌群体感应系统产生的信号分子主要是具有两亲性的酰基高丝氨酸内酯类化合物(AHLs)。这类化合物的特

点是含有一个疏水性的高丝氨酸内酯环和一个亲水性的酰胺侧链。不同 AHLs 的酰胺链碳原子数目不同(碳原子数从 4 个到 18 个, 多为偶数个, 奇数仅为 7 个碳), 并且在酰胺链上的第 3 位碳原子上具有不同的取代基团(氢、羟基、羰基)^[5]。中华苜蓿根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*) Rm1021 菌株中的 *sinI* 可产生目前碳链最长的 AHLs 分子(C18-HSL)^[6]。在根瘤菌中群体感应系统被认为与根瘤菌的侵入和有效瘤的形成相关^[7], 可以影响结瘤的数量及根瘤的发育。在 *S. meliloti* 中 *cin* 系统与根瘤的正常发育密切相关, *cinI* 在侵入线及类菌体中表达, *cinI* 突变导致固氮能力下降, 同时产生非正常类菌体形态和生长, 而且不能引发结瘤过程。在中慢生华癭根瘤菌(*Mesorhizobium huakuii*)和中慢生型天山根瘤菌(*M. tianshanense*)中均发现根瘤菌群体感应系统的缺失都可以直接导致菌株结瘤能力的丧失^[8-9]。

目前较多的研究已经对多种不同种属的根瘤菌群体感应系统的信号类别、基因组成、调控类型进行了研究, 使我们对群体感应在根瘤菌中存在的普遍性和多样性有了深刻的了解, 但大多研究局限于某一单菌, 局限于某一个个体菌株自体诱导物的种类及合成酶的基因定位; 而对于种间尤其是信号分子及其合成酶基因的水平同源性或差异性研究, 及这种信号交流

^①基金项目: 国家重大基础研究“973”项目(2010CB126500-G)和国家自然科学基金面上项目(31170077)资助。

* 通讯作者(ztzhong@njau.edu.cn)

作者简介: 郑会明(1982—), 女, 江苏射阳人, 博士, 讲师, 主要从事分子微生物学与生物固氮研究。E-mail: hmzheng@njau.edu.cn

模式对菌植共生过程中一系列的生理反应研究则非常少。由此,本研究以在中国广泛作为紫云英(*Astragalus sinicus* L.)绿肥菌剂的紫云英华癸根瘤菌 Mh 菌株,以及采集自不同地区的 26 株紫云英根瘤菌作为研究材料,考察了群体感应信号分子在紫云英根瘤菌种内分布的特异性和交流性,以充分了解中慢生紫云英根瘤菌中的群体感应系统。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 菌株和质粒 试验所用菌株和质粒及其特性如表 1 所示。根瘤菌在 TY 培养基中于 28℃下培养,

大肠杆菌在 LB 培养基中于 37℃下培养。TY 培养基:胰蛋白胨 5 g,酵母粉 3 g, CaCl₂·6H₂O 1.3 g, dH₂O 1 L, pH 7.0。LB 培养基:胰蛋白胨 10 g,酵母粉 5 g, NaCl 10 g, dH₂O 1 L, pH 7.2。

1.1.2 实验试剂和仪器 PCR 试剂为 TaKaRa 产品,PCR 引物由北京华大基因公司合成,邻硝基苯-β-D-半乳吡喃糖苷(ONPG)采购于 Sigma 公司,生化与分子生物学试剂购于南京寿德仪器试剂公司。庆大霉素(Gen)20 μg/ml, Km^R 20 μg/ml, Spe^R 100 μg/ml, Gm^R 100 μg/ml, Tc^R 2 μg/ml。5-溴-4-氯-3-吡啶-β-D-半乳糖苷(X-gal)50 μg/ml。C₁₈ 反相薄层层析板购于 Merck 公司。

表 1 供试菌株及质粒
Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株和质粒	特征	来源
紫云英根瘤菌 Mh	野生型菌株	本实验室保存
1-26	不同生境紫云英根瘤菌分离菌	本实验室保存
YQ3	<i>mrhI-lacZ</i> 融合表达菌株, Km ^R	本实验室保存
JZA1	自体诱导物检测菌株, Spe ^R , Gm ^R , Tc ^R	[10]
质粒 pYC12	携带有 <i>Plac</i> 启动子的表达载体, Gm ^R	[11]
pYC146	AttM 水解酶基因于 pYC12 质粒载体中, Gm ^R	[11]

1.2 实验方法

1.2.1 自体诱导物活性检测(β-半乳糖苷酶法) 将待测菌株于 TY 培养基中培养至稳定期, 12 000 r/min 离心 2 min, 取其上清。按 1:10 的比例将待测上清加入到含有检测菌株 JZA1 的 AT 培养基中, 按照 Miller^[12]的方法进行检测。

1.2.2 C₁₈ 反相薄层层析(TLC) 将待测菌株的稳定期培养物上清液等体积乙酸乙酯萃取, 灰干浓缩 100 倍后, 点加在 C₁₈ 反相薄层层析板(TLC, Merck)上, 以 60% 甲醇为流动相进行层析, 经风干后在薄板上铺一层含有 X-Gal 和检测菌株(JZA1)的 AT 琼脂培养基, 培养 12~16 h 后观察薄板的颜色变化。

1.2.3 *mrhI* 基因同源片段的扩增 根据袁全等^[8]克隆鉴定的 *mrhI* 基因的序列信息, PCR 扩增 *mrhI* 基因的编码基因。引物序列如下: *mrhI*-1: GCGGAA TTCTCGACCAGTTCGACCATGAC ;*mrhI*-2 :GCGTCT AGATGCCGTAGGTGCGCTGATAG。将 PCR 产物进行琼脂糖电泳检测。

1.2.4 AttM 水解酶基因的导入 分别在 2 ml TY 和 LB 培养基中培养根瘤菌和大肠杆菌 SM10λpir (pYC12), SM10λpir (pYC146)至对数生长期, 12 000 r/min 离心 2 min 后, TY 培养基和 LB 培养基洗涤菌体 2 次, 悬浮于 100 μl 的 TY 培养基中。各取 80 μl 根瘤菌和大

肠杆菌菌液混合, 滴加到铺在 TY 平板上的孔径为 0.22 μm 的灭菌微孔滤膜上。28℃培养 12 h 后, 用 1 ml TY 洗涤滤膜制成菌悬液, 取 100 μl 涂布于含 Str 100 μg/ml、Gen 20 μg/ml 的 TY 平板表面, 28℃培养 4 天至长出单菌落。剩余的 20 μl 根瘤菌和大肠杆菌菌液滴加到其他滤膜上, 进行相同处理后涂布于含 Str、Gen 的 TY 平板, 作为阴性对照。

2 结果与分析

2.1 紫云英根瘤菌自体诱导物活性检测

从野外不同生境紫云英根部瘤体中采集分离了 26 株根瘤菌, 其生境分别为: 江苏淮安水田, 江苏淮阴棉花庄丛, 江苏农科院绿肥资源地, 浙江金华傅村红壤地, 浙江金华傅村溪滩地, 浙江金华祝村红壤地, 浙江金华鞋塘红壤地, 浙江义乌吴店红壤地, 浙江义乌吴店溪滩地, 浙江武义水稻田, 浙江开化农庄户池塘边, 浙江永康岩坡, 浙江黄岩加油站旁, 浙江临安横畈镇政府秧田, 浙江临安横畈镇绿景村鸭圈旁, 浙江临安高虹村河沟边, 浙江临安东郊丁桥村石桥旁, 浙江浦江浦阳镇黄豆地, 浙江临安高虹林场, 浙江余杭县瓶窑镇石滩村水田, 浙江余杭县瓶窑镇石滩村苗圃田埂, 云南昆明西郊溪滩黑土地, 云南玉溪玉元高速扬武加油站, 云南西双版纳勐腊县野象观

景台, 云南西双版纳勐养县苗圃园, 云南昆明民族村迎宾楼旁等。将分离纯化后的根瘤菌回接至紫云英宿主植物根部, 均可以观察到结瘤现象, 因此这 26 株根瘤菌被命名为紫云英根瘤菌(1~26)。将 26 株紫云英根瘤菌于 TY 液体培养基中培养至稳定期, 离心取其上清。以根癌土壤杆菌 JZA1 为指示菌株检测其中自体诱导物(AI)产生活性的高低。JZA1 为敲除了 AI 合成酶基因 *trai* 的根癌土壤杆菌, 可超量表达 *TraR* 蛋白, 由于自身不产生 AI, 其 *PtraI-lacZ* 的表达完

全依赖于外源 AI 的诱导^[10]。
在 10% 上清检测浓度下, 不同紫云英根瘤菌菌株产生 AI 分子的活性有较大的差异。如图 1 所示, Mh 为已知的阳性对照菌株, 其 AI 活性达 647 (Miller Unit)。其余 26 株紫云英分离菌株中, 13、15、19 号菌株产生自体诱导物物质的能力较强, 其对应的 AI 活性分别为 538、592 和 416; 11、21、24、25 号菌株则基本不产生明显的 AI 分子; 其他菌株的 AI 活性大都集中在 50~300。

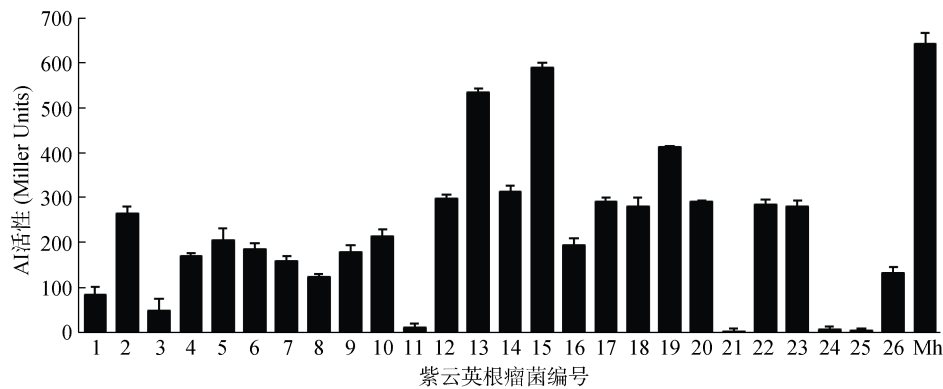


图 1 紫云英分离菌株 AI 活性检测
Fig. 1 Autoinducer production of rhizobia isolates

2.2 紫云英根瘤菌与 Mh 菌株群体感应系统的交互性

中慢生华癸根瘤菌(*M. huakuii*) Mh 基因组中含有一对 *luxR/I* 型的群体感应系统 *mrhR/I*, 其 AI 合成酶基因 *mrhI* 受其自身产物 AHLs 分子的诱导^[8]。在根瘤菌中, *luxI* 基因还可以被其他的非自身产生的 AHLs 分子诱导表达, 表现出 *luxI* 基因产物之间的交互性^[14]。本研究即以 Mh 的 *mrhI* 基因作为指示基因, 检测了 26 株紫云英根瘤菌分离菌株产生 AI 激活 *mrhI* 基因表达的情况, 以研究紫云英根瘤菌菌株间群体感应交互性的情况。

以 Mh 菌株 *mrhI* 基因和 *lacZ* 指示基因的融合表达菌株 YQ3 作为检测菌株, 添加 10% 外源紫云英根瘤菌菌株的 AI 培养上清, 结果如图 2 所示。从图中可以看出, 有 17 株菌株产生的 AI 可以有效激活 Mh 菌株中 *mrhI* 基因的表达, 而且 *mrhI* 基因的表达强度较高, 活性单位大多在 400 (Miller Unit) 以上; 另外 9 株根瘤菌菌株则未表现出激活 Mh 中 *mrhI* 基因表达的能力。

根据 26 株紫云英根瘤菌产生 AI 活性的能力, 进而交互性激活 Mh 菌株中 *mrhI* 基因表达的情况, 将 26 株菌株所产生 AI 进行了如表 2 所示

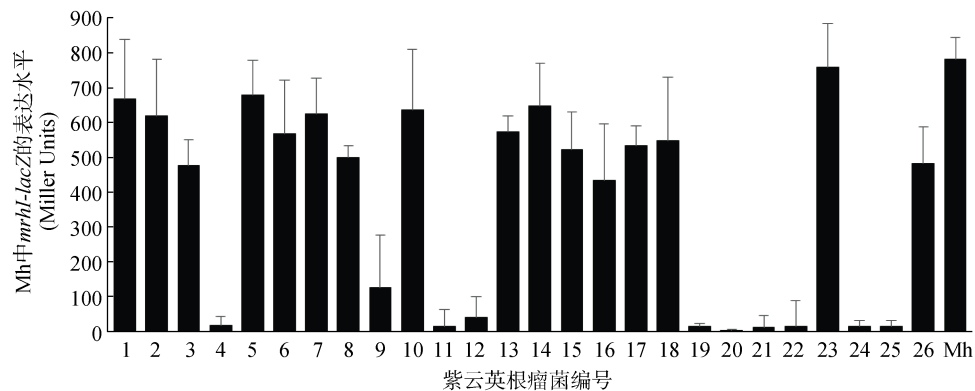


图 2 紫云英分离菌株与 Mh 群体感应交互性检测
Fig. 2 Cross-activation between rhizobia isolates and Mh

表 2 紫云英根瘤菌产生 AI 分型
Table 2 Characters of autoinducers produced by different *M. huakuii* strains

菌株	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
交互性	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+		-	+	+	+	+	+	+	-	-		-	+			+

的分类。可以发现，在图 1 中未表现出 AI 产生能力的 11、21、24、25 号菌株，在图 2 中也未表现出激活 *mrhI* 基因的能力；而在能够产生 AI 的菌株中，大多数表现出了显著激活 AI 的特性，但也有 5 株菌株例外，如 4、12、19、20、22 号菌株，虽然具备 AI 产生活性，但其 AI 并不具有能有效激活 *mrhI* 的能力。由此，不同紫云英菌株产生群体感应 AI 分子特性是有差异性的。

2.3 紫云英根瘤菌 *mrhI* 基因同源片段的检测

菌株间群体感应系统的交互性可以在一定程度上反映其系统同源性的差异。在 22 株具有 AI 产生能力的菌株间，一些菌株表现出了与 Mh 中 *mrhI* 基因的交互性，另一些则无此交互性。为了研究交互性的存在是否与群体感应的同源性有关，对几株紫云英根瘤菌中可能存在的 AI 合成酶基因进行了检测。

在中慢生紫云英根瘤菌 Mh 中，其 AI 分子类别为 AHLs，由 *mrhI* 基因编码产生。为了了解与 Mh 菌株的群体感应系统可以产生交互性的 17 株菌中 AI 分子特性的情况，以 Mh 中 *mrhI* 基因中间片段设计引物，对这 17 株菌中可能存在的 *luxI* 基因进行了同源性检测。在这 17 株菌中，均可以扩增出相近大小的 *mrhI* 基因的同源片段，这提示 17 株紫云英根瘤菌之所以能够激活 *mrhI* 基因的表达，可能是产生 AI 分子的合成酶基因的高度同源所致。而在另 5 株未表现出与 Mh 群体感应交互性的菌株中则未扩增出 *mrhI* 基因的同源性片段，进一步验证了以上推测存在的可能性。

2.4 紫云英根瘤菌产生 AI 特性的研究

在根癌农杆菌、铜绿假单胞菌、红球菌等细菌中发现了 AttM 类内酯酶基因，该类基因编码的内酯酶可通过水解 AHLs 的内酯环从而降解 AHLs 类 AI 信号分子^[11]，因此 AttM 水解酶可以特异性的检测 AHLs 类 AI。在 4、19、1 号菌株中分别导入含有 *attM* 水解酶基因的质粒 pYC146，检测培养上清中 AI 活性的变化。如图 3A 所示，在 4 号菌株中，*attM* 水解酶基因的导入使其培养上清中的 AHLs 活性稍有降低，但在统计学分析上差异未达显著性。在 19 号菌株中，*attM* 基因的导入则完全未造成菌株 AI 活性的降低。但在 Mh 和 1 号菌株中，*attM* 水解酶基因的导入则使菌株完全失去了产生 AI 的能力。Mh 菌株产生的 AI

分子类型为 AHLs 型，因此 AttM 水解酶可以专一性地降解其中的 AI。在图 2 中，1 号菌株产生的 AI 可以有效激活 Mh 中 *mrhI* 基因的表达，并且能够扩增出 *mrhI* 基因的同源片段。这些结果均表明，1 号菌株可能是产生了 AHLs 性的 AI 分子，而 4、19 号菌株则可能是产生了非 AHLs 型的 AI。

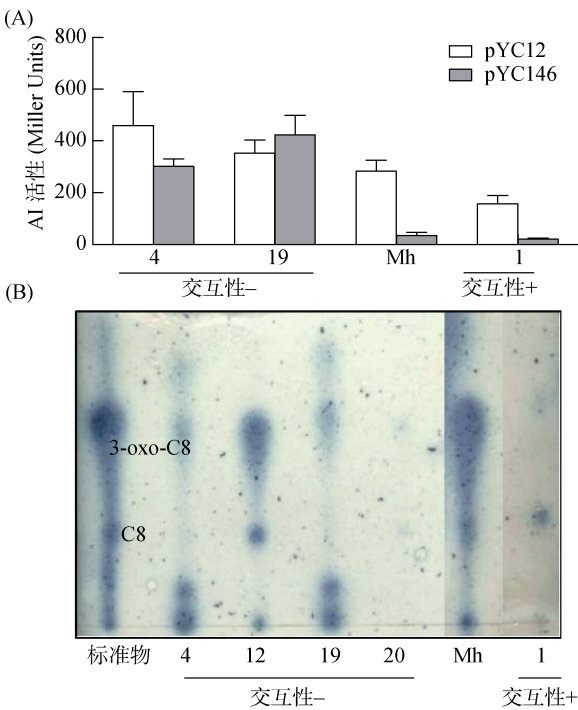


图 3 紫云英分离菌株 AI 内酯酶水解特性(A)及薄层层析分析(B)

Fig. 3 AttM lactonase (A) and TLC (B) analysis for AIs from rhizobia isolates

为了进一步了解与 Mh 群体感应系统无交互性的 4 种菌株中 AI 分子的特性，对其培养液上清中的 AI 分子进行了 C₁₈ 反相薄层层析(TLC)，结果如图 3B 所示。C₁₈ 反相薄层层析被广泛用于检测和鉴定 AHLs 物质的结构和特征，根据其迁移率的变化可以推测 AI 分子碳链的长度，以及酰基链第三位 C 原子被修饰的特性情况^[13]。从图中可以看出，在对照菌株 Mh 中，可以明显检测出 3 种不同迁移率的 AHL 分子。在 AHLs 型产生菌株 1 号中也检测到了两种 AI 分子结构。4 株与 Mh 中 AHLs 型群体感应系统无交互性的菌株，在 TLC 层析板下呈现出不一样的结构特征，其中 4 号菌株和 Mh 的结构非常类似，但 12 号和 20 号菌株间 AI 结构差异则较大，表

明这4株紫云英根瘤菌中AI结构的差异性。根据图3A的结果推测其AI结构可能是非AHLs型,其具体的分子结构,可以进一步用质谱等方法分析鉴定。

3 讨论

本文从不同生境紫云英植株分离到了26株根瘤菌,通过植株回接实验,确定该26株菌可以与紫云英植株共生结瘤。群体感应系统在根瘤菌中普遍存在,其类型大多为*luxR/luxI*型,产生的AI分子也多为AHLs型,碳链长度为C4~C16。朱军等人^[10]构建了一株超敏感AI检测菌株,首次对中慢生紫云英根瘤菌Mh3产生AI进行了检测。袁全等人^[8]还鉴定了中慢生紫云英根瘤菌Mh菌株中AHLs合成酶基因*mrhI*及其调控蛋白基因*mrhR*。

本研究首先检测了26株根瘤菌产生AI的能力,发现紫云英根瘤菌菌株间存在差异性,22株菌具有AI分子产生活性,4株菌则无明显的AI活性。为了了解具有AI活性的22株菌中其群体感应系统的特征,本研究以中慢生紫云英根瘤菌Mh的*mrhI-lacZ*融合菌株作为报告菌株,该*mrhI*基因可以被其自身基因合成产物AHLs激活,探讨外源AI异源性激活*mrhI*基因表达的情况。如图2、3可以看出,22株具有AI产生活性的菌株间表现出了群体感应交互性的差异,其中12株菌可以有效激活Mh菌株中*mrhI*基因的表达,而其他5株菌则未表现出相关的交互性。在细菌的*luxR/I*型群体感应系统中,LuxR是一类重要的调节蛋白,该蛋白可以与AHLs信号分子结合使自身转录活性增强,进而激活下游特异的靶基因启动子。LuxR类蛋白通常包括两个结构域,其氨基端含有一特定区域负责结合AHLs分子并调节蛋白的寡聚化,而羧基端含有一高度保守的螺旋-转角-螺旋结构,负责与DNA结合从而调控基因的转录^[14]。在*R. leguminosarum*中,存在4种群体感应系统,并且不同系统间表现出了交互性,如*rail*基因可以被其自身合成AHLs分子3-OH-C8-OH强烈诱导,也可以被另一套群体感应系统*cinI*基因产物:3-OH-C14:1-AHLs诱导,但该诱导过程都需要同源性RaiR调控蛋白的存在^[15]。

细菌间这种群体感应系统的交互性暗示了细菌之间信号交流的存在,这种信号交流可能是通过异源性的AI、其他的环境因子或者生理功能的介导,而且主要是通过影响LuxR蛋白进行作用的。目前对这种信号交流存在的生理意义尚不明确,但推测可能与细菌对环境的适应性有关,尤其是一些共生菌或病

原菌,其侵入宿主过程中可能会遇到复杂的生态环境的变化。如在中费氏弧菌(*Vibrio fischeri*)与其宿主夏威夷墨鱼(*Euprymna scolopes*)共生的过程中,费氏弧菌通过AHLs型群体感应系统调节*luxCDABE*基因的表达以产生光亮,而墨鱼本身又通过组织中光亮的强度调节共生组织中费氏弧菌细胞密度的大小,以达到两种生物共生的生态平衡^[16]。

应用AttM水解酶处理及TLC检测分析后,发现有4株紫云英根瘤菌所产生的AI可能是非AHLs型的信号分子。在根瘤菌中,AHLs是最主要存在的一类信号分子,在慢生型大豆根瘤菌(*Bradyrhizobium* sp.)中还发现了一类非AHLs型的信号分子,为Bradyoxetin^[17]。在紫云英根瘤菌中存在的非AHLs型信号分子的结构目前尚不清楚,但在同一属种不同根瘤菌内,AI分子类型的差异性可能是在其与环境和其他生物的互作过程中发展起来的,为了更好地适应环境条件,也可能对低等生物的进化有重要的作用。

参考文献:

- [1] Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: The LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators[J]. J. Bacteriol., 1994, 176(2): 269
- [2] Von B, Susanne BB, Bauer WD Coplin DL. Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria[J]. Annual Review of Phytopathology, 2003, 41(1): 455-482
- [3] Schauder S, Bassler BL. The languages of bacteria[J]. Genes Dev., 2001, 15(12): 1468-1480
- [4] Bassler BL. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing[J]. Curr. Opin. Microbiol., 1999, 2(6): 582-587
- [5] Gonzalez JE, Marketon MM. Quorum sensing in nitrogen-fixing rhizobia[J]. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 2003, 67(4): 574-592
- [6] Marketon MM, Gronquist MR, Eberhard A, González JE. Characterization of the *Sinorhizobium meliloti* *sinR/sinI* locus and the production of novel N-acyl homoserine lactones[J]. J. Bacteriol., 2002, 184(20): 5686-5695
- [7] Zheng HM, Zhong ZT, Lai X, Chen WX, Li SP. A LuxR/LuxI-type quorum-sensing system in a plant bacterium, *Mesorhizobium tianshanense*, controls symbiotic nodulation[J]. J. Bacteriol., 2006, 188(5): 1943-1949
- [8] 袁全, 杨梦华, 郑会明, 钟增涛, 朱军. 中慢生型紫云英根瘤菌 *Mesorhizobium huakuii* MH 自体诱导物合成酶基因的筛选及其功能分析[J]. 土壤, 2009, 41(3): 459-463
- [9] Wang H, Zhong ZT, Cai T, Li SP, Zhu J. Heterologous overexpression of quorum-sensing regulators to study cell-density-dependent phenotypes in a symbiotic plant bacterium *Mesorhizobium huakuii*[J]. Archives of Microbiology, 2004, 182(6): 520-525
- [10] Zhu J, Chai YR, Zhong ZT, Li S, Winans SC. Agrobac-

- terium bioassay strain for ultrasensitive detection of N-acylhomoserine lactone-type quorum-sensing molecules: detection of autoinducers in *Mesorhizobium huakuii*[J]. Appl. Environ. Microbiol., 2003, 69(11): 6 949–6 953
- [11] Gao YJ, Zhong ZT, Sun KJ, Wang H, Zhu J. The quorum-sensing system in a plant bacterium *Mesorhizobium huakuii* affects growth rate and symbiotic nodulation[J]. Plant Soil, 2006, 286: 53–60
- [12] Miller JH. Experiments in Molecular Genetics[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor, 1972, 69(11): 6 949–6 953
- [13] Shaw PD, Ping G, Daly SL, Cha C, Cronan JE, Rinehart KL, Farrand SK. Detecting and characterizing N-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94(12): 6 036–6 041
- [14] Zhang RG, Pappas KM, Brace JL, Miller PC, Oulmassov T, Molyneaux JM, Anderson JC, Bashkin JK, Winans SC, Joachimiak A. Structure of a bacterial quorum-sensing transcription factor complexed with pheromone and DNA[J]. Nature, 2002, 417(6 892): 971–974
- [15] Wisniewski-Dye F, Jones J, Chhabra SA, Downie JA. *railR* genes are part of a quorum-sensing network controlled by *cinI* and *cinR* in *Rhizobium leguminosarum*[J]. J. Bacteriol., 2002, 184(6): 1 597–1 606
- [16] Miyashiro T, Ruby EG. Shedding light on bioluminescence regulation in *Vibrio fischeri*[J]. Mol. Microbiol., 2012, 84(5): 795–806
- [17] Loh J, Carlson RW, York WS, Stacey G. Bradyoxetin, a unique chemical signal involved in symbiotic gene regulation[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002, 99(22): 14 446–14 451

Diversity and Cross-activation about Quorum Sensing System in *Mesorhizobium huakuii*

ZHENG Hui-ming, MAO Yi-ling, LING Jun, ZHONG Zeng-tao*

(College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Rhizobia can symbiotically fix nitrogen from the atmosphere in which quorum sensing system is involved. The quorum sensing system in rhizobia is the typical LuxI/R-type regulatory system in the Gram-negative bacteria. Twenty-six rhizobia were isolated from the nodules of *Astragalus sinicus* from different areas. Examination of AIs production activity and the ability to cross-activation with *luxI/R* quorum sensing system of *M. huakuii* revealed that the quorum sensing patterns in *M. huakuii* species were different. AttM hydrolytic enzyme reaction and TLC analysis indicated that the AIs production of *M. huakuii* were divided into two groups, one was AHLs family and the other one was non-AHLs family. These data suggested that the quorum sensing autoinducer production in *M. huakuii* may be different from each other.

Key words: *Mesorhizobium huakuii*, Quorum-sensing, Autoinducer, Cross talk, AttM hydrolytic enzyme