



拐枣七内生细菌溶磷相关基因的鉴定

李欣, 张磊, 胡景江*

(西北农林科技大学 生命科学院, 陕西杨陵 712100)

摘要: 为了鉴定拐枣七内生细菌 *Pseudomonas* sp. GZJR-8 的 *pqqE* 和 *GDH* 基因在溶磷方面的功能, 该研究通过同源重组技术分别获得 *pqqE* 和 *GDH* 基因的缺失突变体 $\Delta pqqE$ 和 ΔGDH , 采用电转法获得它们的互补菌株 $\Delta pqqE(pqqE)$ 和 $\Delta GDH(GDH)$; 难溶性无机磷培养基(PKO)定性检测结果显示, 与野生型菌株(WT)相比, $\Delta pqqE$ 和 ΔGDH 不能产生溶磷圈, $\Delta pqqE(pqqE)$ 和 $\Delta GDH(GDH)$ 能够产生溶磷圈; 抗坏血酸-钼蓝显色定磷法定量检测结果显示, WT、 $\Delta pqqE$ 、 $\Delta pqqE(pqqE)$ 、 ΔGDH 、 $\Delta GDH(GDH)$ 产生的有效磷总量分别为 1 939.000 mg/L、1 279.000 mg/L、1 999.000 mg/L、439.000 mg/L、2 314.000 mg/L, 与 WT 产生的有效磷总量相比, $\Delta pqqE$ 降低 1.52 倍, $\Delta pqqE(pqqE)$ 增加 1.03 倍, ΔGDH 降低 4.42 倍, $\Delta GDH(GDH)$ 增加 1.19 倍; 培养液离心后上清的 pH 测定结果显示, WT、 $\Delta pqqE$ 、 $\Delta pqqE(pqqE)$ 、 ΔGDH 、 $\Delta GDH(GDH)$ 的 pH 分别为 4.08、4.34、4.03、4.71、4.00, 与 WT 的 pH 相比, $\Delta pqqE$ 上升 1.06 倍, $\Delta pqqE(pqqE)$ 降低 0.27 倍, ΔGDH 上升 1.15 倍, $\Delta GDH(GDH)$ 降低 1.02 倍。研究表明: *pqqE* 和 *GDH* 基因具有溶磷能力, 其中 $\Delta pqqE$ 和 ΔGDH 较 WT 的溶磷能力下降, 但并未完全丧失溶磷能力, 而 $\Delta pqqE(pqqE)$ 和 $\Delta GDH(GDH)$ 可以恢复到 WT 的溶磷能力, 拐枣七内生细菌 *Pseudomonas* sp. GZJR-8 是通过产生酸性物质来溶磷, 在农业生产方面具有潜在应用价值。

关键词: 溶磷能力; *pqqE*; *GDH*; 促生作用

中图分类号: Q785; Q786; Q789 **文献标志码:** A

Identification of Phosphate Solubilizing-related Genes in Endophytic Strains Isolated from *Hylomecon japonica*

LI Xin, ZHANG Lei, HU Jingjiang*

(College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: In order to identify the function of *pqqE* and *GDH* genes of *Pseudomonas* sp. GZJR-8 isolated from *Hylomecon japonica* in the case of dissolved phosphorus, we knocked out *pqqE* and *GDH* genes by the homologous recombination technology, marked as $\Delta pqqE$ and ΔGDH , and we constructed the complementary strain by electro transformation, marked as $\Delta pqqE(pqqE)$ and $\Delta GDH(GDH)$. The results of qualitative analysis with insoluble inorganic phosphorus medium (PKO) showed that $\Delta pqqE$ and ΔGDH could not produce dissolved phosphorus ring, $\Delta pqqE(pqqE)$ and $\Delta GDH(GDH)$ could produce dissolved phosphorus ring, compared with the wild type strain (WT). The total amount of available phosphorus produced by WT, $\Delta pqqE$, $\Delta pqqE(pqqE)$, ΔGDH and $\Delta GDH(GDH)$ was 1 939.000 mg/L, 1 279.000 mg/L, 1 999.000 mg/L, 439.000 mg/L and 2 314.000 mg/L, respectively. Compared with WT, $\Delta pqqE$ decreased by 1.52 times, $\Delta pqqE(pqqE)$ increased by 1.03 times, ΔGDH decreased by 4.42 times, and

收稿日期: 2017-05-02; 修改稿收到日期: 2017-08-06

基金项目: 陕西省自然科学基金(2016JM3014)

作者简介: 李欣(1989—), 在读研究生, 主要从事生物多样性与资源利用。E-mail: 1031251137@qq.com

* 通信作者: 胡景江, 教授, 硕士生导师, 主要从事植物逆境分子生物学。E-mail: hujj@nwsuaf.edu.cn

ΔGDH (GDH) increased by 1.19 times. The pH of the supernatant after centrifugation of the culture medium showed that the pH of WT, $\Delta pqqE$, $\Delta pqqE(pqqE)$, ΔGDH and $\Delta GDH(GDH)$ was 4.08, 4.34, 4.03, 4.71 and 4.00, respectively. Compared with WT, $\Delta pqqE$ increased by 1.06 times, $\Delta pqqE(pqqE)$ decreased by 0.27 times, ΔGDH increased by 1.15 times, $\Delta GDH(GDH)$ decreased by 1.02 times. The research showed that $pqqE$ and GDH genes had the ability to dissolve phosphorus, in which $\Delta pqqE$ 和 ΔGDH were lower than WT, but they did not completely lose it, while the complementary strains could restore the ability. The *Pseudomonas* sp. GZJR-8 isolated from *Hylomecon japonica* could dissolve phosphorus through the acid-producing mechanism. It had potential application value in agricultural production.

Key words:phosphorus solubilizing capacity; $pqqE$; GDH ; promoting growth

植物内生细菌^[1]是一个十分丰富的微生物类群,不引起植物组织明显侵染及症状改变,它们存活于健康植物的各种组织和器官内部的细胞或细胞间隙中,是植物微生态系统的重要组成部分,它们与寄主植物保持长期的共同进化,在进化过程中建立起互惠共生的关系。磷(P)是植物必需的仅次于氮(N)的大量元素,但是磷肥施入土壤后,有 75% 转化为不溶的磷酸盐形态,不能被植物吸收利用^[2]。19 世纪末 20 世纪初,Staltrom 和 Sachett 发现土壤溶磷微生物以来,研究工作在许多国家相继展开。Sachett 从土壤中筛选出 50 株溶磷菌,将这些菌株施入到土壤中,促进了作物的生长,提高了磷肥的利用率^[3-5]。溶磷微生物在土壤内分布广泛,它们能够减少磷肥的固定、提高施入磷肥的利用率以及溶解土壤内不溶性磷,在农业生产方面发挥着重要的作用,这类微生物已经被世界公认为高效环保低廉型的土壤内磷被有效利用的一个生物活化剂^[6]。溶磷微生物可以通过分泌出有机酸来溶解土壤中难溶性磷,提高土壤中可溶性磷的含量,进而提高植物对 P 元素的吸收。100 多年来,研究人员相继报道了大量溶磷微生物的溶磷促生作用^[7-9]。

微生物可以通过分泌的磷酸酶、葡萄糖脱氢酶(GDH)、核酸酶以及植酸酶来溶解一些难溶性的无机磷或者有机磷^[10]。研究发现假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)溶解磷灰石与其分泌的葡萄糖酸有关^[11]。该过程需要 GDH 参与,同时 GDH 的激活需要辅因子吡咯喹啉醌(PQQ)参与产生葡萄糖酸,该酸能将不溶性无机磷转化成可被植物吸收利用的有效磷,两者缺一不可。PQQ 是一种阴离子水溶性醌类化合物,是 GDH 的辅因子^[12]。PQQ 由 $pqqABCDEF$ 操纵子编码合成,该操纵子是包含 $pqqA$ 、 $pqqB$ 、 $pqqC$ 、 $pqqD$ 、 $pqqE$ 和 $pqqF$ 6 个基因在内的基因簇,其中 $pqqE$ 对 PQQ 的生物合成至关重要。PQQ 有多种生理功能,其中之一就是它能够

增强微生物对极端环境的适应力以及促进生长作用^[13-15]。以上关于溶磷微生物的溶磷基因功能已有一些相关报道,但是药用植物拐枣七内生细菌的溶磷机制还未见报道。

本研究在拐枣七内发现 1 株具有高效溶磷能力的假单胞菌,溶磷机制未知。通过将拐枣七内生细菌 *Pseudomonas* sp. GZJR-8 溶磷相关基因进行敲除、回补、可溶性磷的定性定量实验来阐明其溶磷性的可能作用机理,以期为进一步研究其更深层次的分子机制提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材 料

1.1.1 实验材料 拐枣七(*Hylomecon japonica*)于 2012 年 6 月采自陕西省秦岭太白山地区;拐枣七内生细菌 *Pseudomonas* sp. GZJR-8 分离于拐枣七的茎部。大肠杆菌(*Escherichia coli* Tg1、 S_{17-1})、载体 pK18mobSacB、载体 pBBR1MCS-2、氯霉素(Cm, 终浓度 20 $\mu\text{g/mL}$)、卡那霉素(Km, 终浓度 50 $\mu\text{g/mL}$)均由本实验室保存。

1.1.2 培养基 LB 培养基:10 g/L NaCl+ 10 g/L 蛋白胨+ 5 g/L 酵母提取物+ 15 g/L 琼脂。

PKO 培养基:10 g/L 葡萄糖+ 2.0 g/L $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ + 0.5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 0.2 g/L NaCl+ 0.2 g/L KCl+ 0.03 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + 0.034 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ + 0.005 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + 0.5 g/L 酵母膏+ 20 g/L 琼脂;pH 6.80~7.00。

NBRIP^[16-17] 培养基:10 g/L 葡萄糖+ 5 g/L $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ + 5 g/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ + 0.25 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + 0.2 g/L KCl+ 0.1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$;pH 6.75。

1.1.3 主要试剂和仪器 *EcoR* I、*Bam*H I、*Hind* III、*Xba* I 限制性内切酶购买于 TaKaRa 公司;T₄ DNA 连接酶购买于 New England Biolab(NEB)公

司;Taq DNA 聚合酶,Trans2K[®] Plus DNA Marker 购买于北京全式金生物有限公司,质粒小量提取试剂盒和 DNA 胶回收试剂盒购买于天根生物科技(北京)有限公司。

1.1.4 引物序列 本研究中所用引物见表 1。pqqE-F1 为 *pqqE* 基因上游片段正向扩增引物;pqqE-R1 为 *pqqE* 基因上游片段反向扩增引物;pqqE-F2 为 *pqqE* 基因下游片段正向扩增引物;pqqE-R2 为 *pqqE* 基因下游片段反向扩增引物;GDH-F1 为 *GDH* 基因上游片段正向扩增引物;GDH-R1 为 *GDH* 基因上游片段反向扩增引物;GDH-F2 为 *GDH* 基因下游片段正向扩增引物;GDH-R2 为 *GDH* 基因下游片段反向扩增引物;pqqE-F 为 *pqqE* 基因正向扩增引物;pqqE-R 为 *pqqE* 基因反向扩增引物;GDH-F 为 *GDH* 基因正向扩增引物;GDH-R 为 *GDH* 基因反向扩增引物。

1.2 方法

1.2.1 *pqqE* 和 *GDH* 缺失突变体构建^[18-19] 根据 *pqqE* 和 *GDH* 基因的上下游片段设计敲除引物(pqqE-F1/pqqE-R1、pqqE-F2/pqqE-R2、GDH-F1/GDH-R1、GDH-F2/GDH-R2),进行 PCR 扩增,PCR 扩增条件:95 ℃预变性 5 min,94 ℃变性 30 s,58 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 3 min,共进行 35 轮循环,最后 72 ℃延伸 8 min。利用重叠 PCR 将上下游片段重叠在一起,酶切重叠片段(*pqqE* 1 542 bp;*GDH* 1 545 bp)和载体 pK18mobSacB 后,将片段和载体连接转化进 *E. coli* Tg1,最终获得重组质粒 pK18mobsacB-*pqqE* 和 pK18mobsacB-*GDH*。将含

有重组质粒的 *E. coli* S₁₇₋₁ 分别与 *Pseudomonas* sp. GZJR-8 按照如下方法进行接合反应:首先将供体菌 *E. coli* S₁₇₋₁ 与受体菌 *Pseudomonas* sp. GZJR-8 按照 7 : 3(总体积 1 mL)混匀,4 000 r/min 离心 3 min,收集菌体,用新鲜且不含抗生素的 LB 洗涤 2 遍,收集菌体,吸 2 μL 菌体点到 LB 平板上,于 37 ℃静置培养 2 d 后,将全部菌苔转入 800 μL 新鲜且不含抗生素的 LB 培养基中混匀,吸取 100 μL 涂布在含 Cm 和 Km 的 LB 双抗性平板上,30 ℃培养观察,通过 PCR 验证筛选单交换阳性克隆,将单交换成功的阳性克隆活化培养后涂在含有 Cm 和 12%蔗糖的 LB 平板上,第二次筛选发生同源重组的阳性克隆。将蔗糖板上长出的单菌落分别在含有 Cm 和 Km 的 LB 平板上划线,30 ℃培养,挑选能在 Cm 板上生长但不能在 Km 板上生长的克隆(即已经丢失 pK18mobSacB 质粒的克隆)。分别用引物 pqqE-F1/pqqE-R2 和 GDH-F1/GDH-R2 进行 PCR 验证,筛选得到的突变体分别命名为 Δ*pqqE* 和 Δ*GDH* 并进行甘油保存。

1.2.2 突变体回补实验 以 *Pseudomonas* sp. GZJR-8 为模板,分别使用引物 pqqE-F/pqqE-R 和 GDH-F/GDH-R 扩增 *pqqE*(1 152 bp)和 *GDH*(2 418 bp)基因,PCR 扩增条件:95 ℃预变性 5 min,94 ℃变性 30 s,58 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 3 min,共进行 35 轮循环,最后 72 ℃延伸 8 min。将扩增产物 *pqqE* 和 *GDH* 基因于 1%琼脂糖凝胶电泳分离回收;*Hind* III/*Xba* I 于 37 ℃双酶切载体 pBBR1MCS-2 和 *pqqE* 与 *GDH* 基因片段,纯化回收并 16 ℃连接

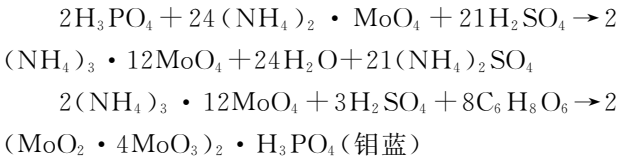
表 1 本研究所用引物
Table 1 The primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Sequence(5'→3')	限制性内切酶 Restriction endonuclease
pqqE-F1	CCGGAATTCAAGACGGCGGTATCGAAGC	<i>Eco</i> R I
pqqE-R1	GAGTAGCCACAGCGGCAAGC	
pqqE-F2	GCTTGCCGCTGTGGCTACTCGAAGAAGCCGAACATGCCAC	
pqqE-R2	CGCGGATCC TCGAACACTTGCCAAAACCTTATGAA	<i>Bam</i> H I
GDH-F1	CCGGAATTCACTACACCCGCGCCACCAA	<i>Eco</i> R I
GDH-R1	CATGATCAGCAGCAAGACCC	
GDH-F2	GGGTCTTGCTGCTGATCATGACCAAGCAGGGTGACTATGTGATG	
GDH-R2	CGCGGATCC AGAACATCGGTTGGCCCTG	<i>Bam</i> H I
pqqE-F	CCCAAGCTTGTGCTGAGCACTGGATCACC	<i>Hind</i> III
pqqE-R	CTAGTCTAGATCAGCCTTTTGCAATGAGC	<i>Xba</i> I
GDH-F	CCCAAGCTTATGAGCACTGATGGTGCCTCA	<i>Hind</i> III
GDH-R	CTAGTCTAGATTAATCCGGCAGTTTGAACG	<i>Xba</i> I

基因片段和载体,将获得的重组质粒通过电转化法^[20]转进构建好的突变体内,复苏培养后涂布在含有 Cm 和 Km 的 LB 平板上,30 ℃ 过夜培养。挑取单克隆进行菌落 PCR 和双酶切验证。将筛选得到的互补菌株分别命名为 $\Delta pqqE(pqqE)$ 和 $\Delta GDH(GDH)$ 并进行甘油保存。

1.2.3 溶磷能力检测 将 WT、 $\Delta pqqE$ 、 ΔGDH 、 $\Delta pqqE(pqqE)$ 、 $\Delta GDH(GDH)$ 转接到含有 Cm 和 Km 的 5 mL LB 试管中过夜培养,当 $OD_{600}=1.0$ 时收集菌体,用 0.85% NaCl 洗 2~3 次后用 0.85% NaCl 悬浮,调整 $OD_{600}=1.0$,吸 10 μ L 菌悬液垂直滴加到含 0.2% $Ca_3(PO_4)_2$ 的 PKO 板上,30 ℃ 培养观察,若菌株能够分解培养基中的 $Ca_3(PO_4)_2$,则菌苔周围的培养基就会变透明而产生溶磷圈,否则不产生溶磷圈。

抗坏血酸-钼蓝显色定磷法定量检测各菌的溶磷能力 在酸性环境下,定磷试剂中的钼酸铵以钼酸形式与样品中的磷酸反应生成磷钼酸,当有还原剂抗坏血酸存在时,磷钼酸可转变成蓝色的还原产物-钼蓝^[21]。在钼蓝的最大吸收波长 660 nm 处测定吸光度。



将 WT、 $\Delta pqqE$ 、 ΔGDH 、 $\Delta pqqE(pqqE)$ 、 $\Delta GDH(GDH)$ 转接到含有 Cm 和 Km 的 5 mL LB 试

管中过夜培养,当 $OD_{600}=1.0$ 时,收集菌体,用 0.85% NaCl 洗 2~3 次后用 0.85% NaCl 悬浮,调整 $OD_{600}=1.0$,吸取 20 μ L 的菌悬液转移到 20 mL NBRIP 培养基中,30 ℃、150 r/min 培养 5 d,收集上清,移取 30 μ L 检测可溶性磷含量,每个处理 3 个重复。最后通过测定剩余上清的 pH 值来间接证明其溶磷能力。

2 结果与分析

2.1 *pqqE* 和 *GDH* 缺失突变体筛选

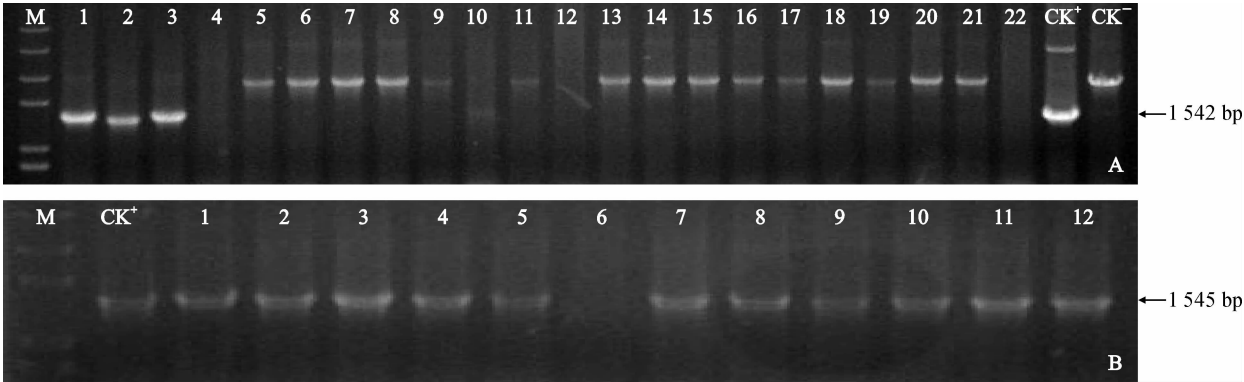
由图 1,A 可知,与阳性结果(CK^+)相比,1~3 号泳道扩增出大小相等的条带,说明 *pqqE* 基因缺失突变体构建成功,4~22 号泳道扩增出的条带和阴性结果(CK^-)一致;由图 1,B 可知,与阳性结果(CK^+)相比,1~5、7~12 这 11 个泳道扩增出大小相等的条带,说明 *GDH* 基因缺失突变体构建成功,6 号泳道未扩增出目标大小的条带。

2.2 突变体互补菌株的筛选

由图 2 可知,与阳性结果(CK_1^+)相比,1~11 号泳道扩增出大小相等的条带,说明 *GDH* 基因互补进 ΔGDH 内,互补菌株 $\Delta GDH(GDH)$ 构建成功;12~19 号泳道扩增出与阳性结果(CK_2^+)大小相等的条带,说明 *pqqE* 基因互补进 $\Delta pqqE$ 内,互补菌株 $\Delta pqqE(pqqE)$ 构建成功。

2.3 定性检测菌株的溶磷能力

菌株如果具有溶磷作用,它就能够降解不溶性的磷,在 PKO 板上产生溶磷圈,并且溶磷能力越强,

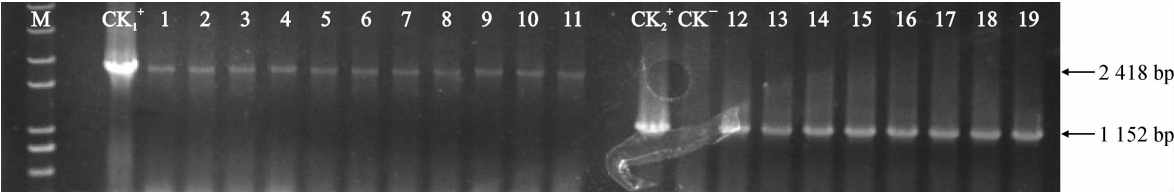


M. Trans2K[®] Plus DNA Marker; A. $\Delta pqqE$ 突变体筛选:1~22. 以不同单菌落菌体为模板 PCR 扩增; CK^+ . 以 pK18mobSacB-*pqqE* 为模板 PCR 扩增; CK^- . 以野生型菌株为模板 PCR 扩增; B. ΔGDH 突变体筛选; CK^+ . 以 pK18mobSacB-*GDH* 为模板 PCR 扩增; 1~12. 以不同单菌落菌体为模板 PCR 扩增

图 1 PCR 验证突变体 $\Delta pqqE$ 和 ΔGDH

M. Trans2K[®] Plus DNA Marker; A. Screening mutants of $\Delta pqqE$; 1—22. Use different single coliform bacteria as the template of PCR; CK^+ . Use pK18mobSacB-*pqqE* as the template of PCR; CK^- . Use wild type strain as the template of PCR; B. Screening mutants of ΔGDH ; CK^+ . Use pK18mobSacB-*GDH* as the template of PCR; 1—12. Use different single coliform bacteria as the template of PCR

Fig. 1 PCR verification of mutant $\Delta pqqE$ and ΔGDH

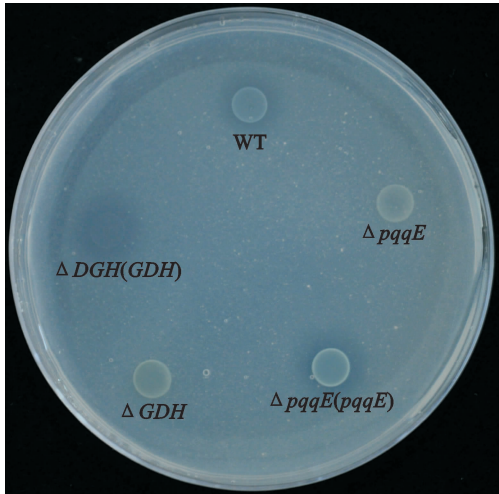


M. Trans2K[®] Plus DNA Marker;CK₁⁺. 以 pBBR1MCS-2-*GDH* 为模板 PCR 扩增;1~11. 以不同单菌落菌体为模板 PCR 扩增;CK₂⁺. 以 pBBR1MCS-2-*pqqE* 为模板 PCR 扩增;CK₂⁻. 以突变体 $\Delta pqqE$ 为模板 PCR 扩增;12~19. 以不同单菌落菌体为模板 PCR 扩增

图 2 PCR 验证互补菌株 $\Delta pqqE(pqqE)$ 和 $\Delta GDH(GDH)$

M. Trans2K[®] Plus DNA Marker;CK₁⁺. Use pBBR1MCS-2-*GDH* as the template of PCR; 1–11. Use different single coliform bacteria as the template of PCR; CK₂⁺. Use pBBR1MCS-2-*pqqE* as the template of PCR; CK₂⁻. Use mutants $\Delta pqqE$ as the template of PCR; 12–19. Use different single coliform bacteria as the template of PCR

Fig. 2 PCR verification of complementary $\Delta pqqE(pqqE)$ and $\Delta GDH(GDH)$



WT. 野生型菌株; $\Delta pqqE$. *pqqE* 基因突变体菌株; ΔGDH . *GDH* 基因突变体菌株; $\Delta pqqE(pqqE)$. *pqqE* 基因互补菌株; $\Delta GDH(GDH)$. *GDH* 基因互补菌株

图 3 PKO 板上溶磷圈的大小

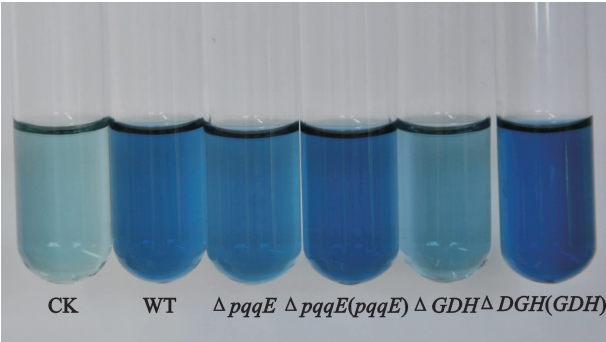
WT. Wild type strain; $\Delta pqqE$. *pqqE* gene mutant strain; ΔGDH . *GDH* gene mutant strain; $\Delta pqqE(pqqE)$. *pqqE* gene complementary strain; $\Delta GDH(GDH)$. *GDH* gene complementary strain

Fig. 3 Solution circle of inorganic phosphate on PKO

溶磷圈越大。如图 3 可知, $\Delta pqqE$ 、 ΔGDH 不能产生溶磷圈, WT、 $\Delta pqqE(pqqE)$ 和 $\Delta GDH(GDH)$ 可以产生溶磷圈; 其中 $\Delta pqqE(pqqE)$ 产生的溶磷圈比 WT 略大一些, 周围未降解完全, 而 $\Delta GDH(GDH)$ 能够产生明显的溶磷圈, 菌体周围降解完全。

2.4 定量检测菌株的溶磷能力

当培养液内含有有效磷时, 试管内的颜色就会变蓝, 而且有效磷浓度越大, 颜色越深。如表 2 和图 4 结果显示, 与 WT 的有效磷产量相比, 突变掉 *pqqE* 基因后, 突变体 $\Delta pqqE$ 的有效磷产量降低 1.52 倍, 颜色变浅, 互补菌株 $\Delta pqqE(pqqE)$ 的有效磷产量增加 1.03 倍, 颜色加深; 突变掉 *GDH* 基因后, 突变体 ΔGDH 的有效磷产量降低 4.42 倍, 颜色



CK. 未接菌的培养液; WT. 接野生型菌株的培养液; $\Delta pqqE$. 接 *pqqE* 基因突变体菌株的培养液; $\Delta pqqE(pqqE)$. 接 *pqqE* 基因互补菌株的培养液; ΔGDH . 接 *GDH* 基因突变体菌株的培养液; $\Delta GDH(GDH)$. 接 *GDH* 基因互补菌株的培养液

图 4 野生型、突变体、互补菌株的溶磷表现

CK. Un-inoculated culture medium as a negative control; WT. Inoculated wild type strain culture medium; $\Delta pqqE$. Inoculated *pqqE* gene mutant strain culture medium; $\Delta pqqE(pqqE)$. Inoculated *pqqE* gene complementary strain culture medium; ΔGDH . Inoculated *GDH* gene mutant strain culture medium; $\Delta GDH(GDH)$. Inoculated *GDH* gene complementary strain culture medium

Fig. 4 Phosphate solubilization of endophytic strains in NBRIP broths

表 2 野生型、突变体、互补菌株的溶磷情况

Table 2 Phosphate solubilization of endophytic strains in NBRIP broths

菌株 Endophytic strain	OD ₆₆₀	KH ₂ PO ₄ /(mg/L)	pH
WT	0.390	1 939.000	4.08
$\Delta pqqE$	0.258	1 279.000	4.34
$\Delta pqqE(pqqE)$	0.402	1 999.000	4.03
ΔGDH	0.090	439.000	4.71
$\Delta GDH(GDH)$	0.465	2 314.000	4.00

接近 CK, 互补菌株 $\Delta GDH(GDH)$ 的有效磷产量增加 1.19 倍, 颜色变深蓝。检测上清的 pH, 结果显示: 与 WT 相比, 当突变体的有效磷产量下降后培

养液的 pH 值上升,互补菌株的培养液 pH 值下降。说明这两个基因均与溶磷相关,并且 *GDH* 基因在溶磷方面起着关键作用;在溶磷过程中该菌株产生了酸性物质。

3 讨 论

农业、植物和微生物学家一直致力于研究可以降解矿质磷酸盐(CaPs)的微生物,这类微生物所具有的这种能力称为矿质磷酸盐化(mineral phosphatesolubilizing,MPS)。在农业和生产中,生物体需要的磷是只次于氮的矿质元素。在自然条件下,可被吸收利用的可溶性磷经常是限制农业生产量的一类矿质营养。在全球可耕种的土地中,三分之二的土地都属于盐碱地带,其 pH 值均高于 7.0,因此绝大多数的磷元素皆是以不可溶解的状态存在的。但是生物体只能将可溶解的磷元素通过细胞膜的转运系统转进细胞内才能吸收利用,所以将不可溶解的矿质磷酸盐转化为可溶解性的 $H_2PO_4^-$ 或者 HPO_4^{2-} 则被公认为是全球磷循环生态系统的基本组成。通过研究具有 MPS 性质的革兰氏阴性细菌,发现细菌必须同时具有 GDH 和辅因子 PQQ 才能将不溶性的矿质磷酸盐转化为供生物体吸收利用的可溶性磷,缺少两者中的任何一个,都会影响解磷能力。例如大肠杆菌(*E. coli*)只能产生脱氢酶蛋白,而不能产生 PQQ,人们把耐放射异常球菌(*Deinococcus radiodurans*)中合成吡咯喹啉醌的基因簇转进大肠杆菌体内,在可以被诱导的启动子的生物控制下表达出来,这样被改造的大肠杆菌也具备了 MPS 能力^[22]。实验还发现在水培植物的时候,加入一些活化的 *Rhizobacterium*,能够明显的促进植物的花和果实的数量与质量,相反,加入一些被生物改造过后不能产生吡咯喹啉醌的菌株在促进植物开花结果方面就没有效果了^[23]。MPS 细菌通过将周质空间产生的有机强酸释放到周围环境中来溶解 CaP,所以醌蛋白葡萄糖脱氢酶(pqqEGDH)在土壤细菌的营养生态环境的创造中也发挥着重要的作用。通过研究 MPS 细菌中的脱氢酶和辅酶 PQQ,

或许将来可以将细菌直接接种于土壤,像固氮菌一样直接为生物提供养料,或者用于工业化的生物转化矿质磷酸盐。

本研究从药用植物拐枣七中分离出 *Pseudomonas* sp. GZJR-8,初步验证该菌具有溶磷效果,通过查看相关文献和进行序列比对,找到与溶磷相关的 2 个基因 *pqqE* 和 *GDH*。本研究利用同源重组技术成功获得这 2 个基因的缺失突变体,PKO 实验比较了该菌的野生型、突变体和互补菌株之间的差异,定性地证明了缺失这 2 个基因中任何一个都会影响该菌株的溶磷效果,与预测结果一致;定量测定产磷量的实验结果显示:敲掉 *pqqE* 基因后,该菌株的溶磷能力较野生型菌株下降,但是并未完全丧失溶磷能力;敲掉 *GDH* 基因后,溶磷能力显著下降;2 个基因的互补菌株均能恢复溶磷能力。

比较 PKO 实验和定量实验结果,本研究发现:(1)定量实验证明,溶磷能力越强,则培养液的 pH 越低,推测该菌是通过产酸途径实现溶磷;(2)突变掉 *pqqE* 和 *GDH* 基因后,突变体 ΔGDH 的溶磷能力较突变体 $\Delta pqqE$ 显著下降,推测 *GDH* 基因是在溶磷途径上起到了关键的作用;比较定量和 PKO 实验结果,突变体 $\Delta pqqE$ 和 ΔGDH 产生可溶性磷但是并不能产生溶磷圈,可能是其产生可溶性磷的量还不足以达到产生溶磷圈的程度,定量实验检测时灵敏度高,微量的磷元素可以被检测到,而无机磷固体培养基产溶磷圈灵敏度较低;(3)互补菌株 $\Delta pqqE(pqqE)$ 和 $\Delta GDH(GDH)$ 的有效磷产量均高于野生型菌株,这是因为质粒 pBBR1MCS-2 的高拷贝性,使得 *pqqE* 和 *GDH* 的表达量高于 WT,从而提高了溶磷能力;(4)前人研究,细菌必须同时具有 GDH 和作为辅因子的 PQQ 才会具有溶磷能力,本研究中当该菌缺失 *pqqE* 和 *GDH* 基因后还能产生一定量的有效磷,分析该菌除了具有产酸途径外,还可能存在其它溶磷途径。该研究结果为后续该菌株作为溶磷菌在农业生产上的应用奠定一定的基础,为进一步揭示和解析其分子水平上的作用机制提供一定的参考依据。

参考文献:

[1] STROBE GA. Endophytes as sources of bioactive products [J]. *Microbes and Infection*, 2003,5(6): 535-544.
[2] RODRÍGUEZ H, FRAGA R. Phosphate solubilizing bacteria and theirrole in plant growth promotion[J]. *Biotechnology*

Advances, 1999,17(4): 319-339.
[3] STALSTROM V A. Beitrag zur Kennturs de rein-wisking steriler und in Garung bonfindlicher organischer stroffe auf dil Looslichkeit des phosphoresen der TCP[J]. *Zentralbl Bakte-riol Mikrobiol Hyg B*, 1903,11: 724-732.

- [4] SACKETT W G, PATTEN A J, BROWN C W. The solvent action of soil bacteria upon the insoluble phosphates of raw bonemeal and natural raw rock phosphate[J]. *Centralbl Bakteriol*, 1908, **202**: 688-703.
- [5] GUINÁZ Ú L B, ANDRÉS J A, Del Papa M F, *et al.* Response of alfalfa (*Medicago sativa* L.) to single and mixed inoculation with phosphate-solubilizing bacteria and Sinorhizobium meliloti[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2010, **46**(2): 185-190.
- [6] 毕江涛, 孙 权, 李素剑, 等. 解磷微生物研究进展[J]. 农业科学研究, 2009, (4): 58-64.
BI J T, SUN Q, LI S J, *et al.* Research advances in phosphorous solubilizing microorganisms[J]. *Journal of Agricultural Sciences*, 2009, (4): 58-64.
- [7] 唐朝军, 董发勤, 代群威, 等. 嗜酸氧化硫硫杆菌对低品位磷矿的溶磷效果研究[J]. 矿物学报, 2010, **31**: 111-112.
TANG C J, DONG F Q, DAI Q W, *et al.* A study on leaching effect of acidithiobacillus thiooxidans to phosphorus from low-grade phosphate Ores[J]. *Acta Mineralogica Sinica*, 2010, **31**: 111-112.
- [8] 陆俊昆, 陈 俊, 康丽华. 四株红树林促生菌的遗传分析鉴定及其促生能力[J]. 微生物学报, 2010, **10**: 1 358-1 365.
LU J K, CHEN J, KANG L H. Genotypic analysis and plant growth-promoting ability of four plant growth-promoting bacteria from mangrove[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, **10**: 1 358-1 365.
- [9] NAIK P R, RAMAN G, NARAYANAN K B, *et al.* Assessment of genetic and functional diversity of phosphate solubilizing fluorescent pseudomonads isolated from rhizospheric soil [J]. *BMC Microbiology*, 2008, **8**(1): 230.
- [10] 钟传青, 黄为一. 不同种类解磷微生物的溶磷效果及其磷酸酶活性的变化[J]. 土壤学报, 2005, (2): 286-294.
ZHONG C Q, HUANG W Y. Phosphorus-solubilizing effect and phosphatase activity of different types of phosphorus-solubilizing microorganisms[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2005, (2): 286-294.
- [11] ILLMER P, SCHINNER F. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1992, **24**(4): 389-395.
- [12] BASHAN Y, KAMNEV A A, DE-BASHAN L E. Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2013, **49**(4): 465-479.
- [13] 杨 璐, 熊向华, 王建华, 等. 吡咯喹啉酮研究进展[J]. 生物技术通讯, 2009, **20**(6): 874-879.
YANG L, XIONG X H, WANG J H *et al.* Advances on the research of Pyrroloquinoline Quinone[J]. *Letters in Biotechnology*, 2009, **20**(6): 874-879.
- [14] ZHANG Y, ROSENBERG P A. The essential nutrient pyrroloquinoline quinone may act as a neuroprotectant by suppressing peroxynitrite formation[J]. *European Journal of Neuroscience*, 2002, **16**(6): 1 015-1 024.
- [15] MORITZ M, SANDRA P, STUART J. FISHER. Crystal structure of PqqB from *Pseudomonas putida* at 2.2 Å resolution[J]. *Journal of Biophysical Chemistry*, 2012, **2012**: 206-210.
- [16] 周怡雯, 陈建华. 新辅酶吡咯喹啉酮研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 2008, **29**(4): 279-282.
ZHOU Y W, CHEN J H. Progress in the research of Pyrroloquinoline Quinone[J]. *Chinese Journal of Biochemical and Pharmaceuticals*, 2008, **29**(4): 279-282.
- [17] NAUTIYAL C S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, **170**(1): 265-270.
- [18] HU Y, LU P, WANG Y, *et al.* OmpR positively regulates urease expression to enhance acid survival of *Yersinia pseudotuberculosis*[J]. *Microbiology*, 2009, **155**(8): 2 522-2 531.
- [19] ZHANG W, WANG Y, SONG Y, *et al.* A type VI secretion system regulated by OmpR in *Yersinia pseudotuberculosis* functions to maintain intracellular pH homeostasis[J]. *Manual of Environmental Microbiology*, 2013, **15**(2): 557-569.
- [20] ZHNG J, LEUNG K Y. Dissection of a type VI secretion system in *Edwardsiella tarda* [J]. *Molecular Microbiology*, 2007, **66**(5): 1 192-1 206.
- [21] 王春林, 曾梅珍, 宋荣钊. 分光光度法测定有机磷的研究[J]. 广州化学, 1993, (1): 65-69.
WANG C L, ZENG M Z, SONG R Z. Spectrophotometric determination of phosphorus in organic compound [J]. *Guangzhou Chemistry*, 1993, (1): 65-69.
- [22] KHAIRNAR NP, MISRA HS, APTE SK. Pyrroloquinoline-quinone synthesized in *Escherichia coli* by pyrroloquinoline-quinone synthase of *Deinococcus radiodurans* plays a role beyond mineral phosphate solubilization[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, **312**(2): 303-308.
- [23] CHOI O, KIM J, KIM J G, *et al.* Pyrroloquinoline quinone is a plant growth promotion factor produced by *Pseudomonas fluorescens* B16 [J]. *Plant Physiology*, 2008, **146**(2): 657-668.

(编辑: 宋亚珍)