

研究报告

生防菌 Act12 铁载体合成酶 *Ser* 基因的功能赵玉玲^{1,2} 董奉鑫^{1,2} 李素俭^{1,2} 黄丽丽^{1,3*} 颜霞^{1,2*}

(1. 国家旱区作物逆境生物学国家重点实验室 陕西 杨凌 712100)

(2. 西北农林科技大学生命科学院 陕西 杨凌 712100)

(3. 西北农林科技大学植物保护学院 陕西 杨凌 712100)

摘要:【目的】通过敲除生防菌 Act12 铁载体合成酶 *Ser* 基因, 研究该铁载体在植物防病促生中的作用。【方法】以自杀型质粒 pKC1132 作为基本载体, 两侧为 *Ser* 基因上下游片段作为同源交换臂, 两个同源臂之间为卡那霉素抗性基因, 构建重组质粒 pCT12; 借助接合转移技术, 将该质粒导入 Act12, 筛选突变株并进行 PCR 验证; 研究 *Ser* 基因缺失突变体和野生型菌株 Act12 在生长速率、铁载体产量、甜瓜种子促生、抗苹果轮纹病菌(*Macrophoma kawatsukai*)等方面的差异。【结果】经 PCR 验证及测序均证实 *Ser* 基因缺失突变体构建成功。*Ser* 基因突变后, 铁载体合成量明显减少, 抑制甜瓜种子的萌发及生长, 对苹果轮纹病菌拮抗作用降低。【结论】生防菌 Act12 *Ser* 合成酶基因参与控制合成的铁载体在对甜瓜种子促生作用和拮抗苹果轮纹病菌中发挥一定作用, 为进一步研究 Act12 防病促生机制奠定基础。

关键词: 生防菌 Act12, *Ser* 基因, 基因敲除, 防病, 促生

Functional analysis of *Ser* gene from biological bacterium Act12ZHAO Yu-Ling^{1,2} DONG Feng-Xin^{1,2} LI Su-Jian^{1,2} HUANG Li-Li^{1,3*} YAN Xia^{1,2*}

(1. State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas, Yangling, Shaanxi 712100, China)

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

(3. College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: [Objective] To explore the effects of bio-control and growth-promoting of the siderophore involved with *Ser* gene in Act12, the siderophore synthase *Ser* gene knock-out mutant was generated. [Methods] For generating deletion mutant, suicide plasmid pKC1132 was chosen as a basic vector, kanamycin resistance gene as a marker, upstream and downstream of *Ser* gene as homology arms to

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31101476, 31171796); Science Technology Research and Development Program of Shaanxi Province (No. 2013K01-45); Science and Technology Program of Yangling Demonstration Zone (No. 2014NY-41)

***Corresponding authors:** HUANG Li-Li: Tel: 86-29-87091312; E-mail: huanglili@nwsuaf.edu.cn
YAN Xia: Tel: 86-29-87092262; E-mail: luckyx@126.com

Received: April 15, 2016; **Accepted:** May 30, 2016; **Published online** (www.cnki.net): June 07, 2016

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31101476, 31171796); 陕西省科学技术研究发展计划项目(No. 2013K01-45); 杨凌示范区科技计划项目(No. 2014NY-41)

***通讯作者:** 黄丽丽: Tel: 86-29-87091312; E-mail: huanglili@nwsuaf.edu.cn

颜霞: Tel: 86-29-87092262; E-mail: luckyx@126.com

收稿日期: 2016-04-15; **接受日期:** 2016-05-30; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2016-06-07

construct the recombinant plasmid named pCT12. Then, it was transferred into Act12 by conjugal transfer. Putative deletion mutants were verified by PCR. Whereafter, biological analysis was conducted to assess the role of *Ser* gene in bio-control and growth promoting. [Results] The *Ser* deletion mutant Δser was obtained by PCR and sequencing. Results of biological analysis showed that Δser synthesizes less siderophores compared to wild strain Act12. Furthermore, the seed germination rate of *Cucumis melo* L and the antagonism against *Macrophoma kawatsukai* both significant declined. [Conclusion] These results suggest that *Ser* gene of Act12 has a certain impact on bio-control and growth promoting, which would establish the foundation for further mechanism study.

Keywords: Biological bacterium Act12, *Ser* gene, Knock-out, Bio-control, Growth-promoting

铁元素在生命有机体的代谢过程中起着重要的作用,铁元素缺乏时会产生不良的影响。但自然界中的铁元素主要以难溶性铁化合物的形式存在,大部分不能被生物直接吸收利用,生物有效性很低。随着生物的进化,微生物获得了活化、吸收和运输难溶性铁的特殊机制,即通过分泌铁载体(Siderophore)利用环境中的铁。铁载体是指微生物在限铁条件下产生的小分子量铁螯合剂,被分泌到细胞表面或细胞外捕获 Fe^{3+} 或将难溶性铁变成可溶形式以便为微生物吸收和利用^[1]。

植物根围促生菌(Plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR)是指自由生活在土壤或附生于植物根系的、可以直接或间接地促进植物生长的一类有益菌^[2]。PGPR 的促生机理很多,其中之一是通过自身合成的各种对铁具有高亲和力的铁载体对寄主植物起到防病促生作用。一方面,PGPR 分泌的铁载体可结合 Fe^{3+} 并将其还原成能被植物高效利用的 Fe^{2+} , 因此在植物铁营养方面发挥着重要作用^[3-5]; 另一方面,PGPR 通过铁载体与病原微生物争夺环境中有限的铁营养,抑制病原微生物的生长繁殖。随着对 PGPR 铁载体的深入研究,将可产铁载体的 PGPR 研发为细菌菌剂具有重要的意义。

生防菌 Act12 是分离自青藏高原的一株拮抗性放线菌,具有广谱性拮抗作用,经 16S rRNA 基因序列分析,鉴定其为密螺旋菌(*Streptomyces pactum*)^[6]。Act12 及其发酵液对草莓疫霉(*Phytophthora fragariae*)、木贼镰刀菌(*Fusarium equiseti*)等多种土壤病原真菌均有明显的抑制作用^[6-7],对草莓、甜瓜、人参等作物表现良好的促生效果^[6,8-9],但其防病促

生机制还不清楚。前期试验结果表明,Act12 有较强的铁载体分泌能力。目前已完成其全基因组测序和注释,通过基因组注释分析,Act12 中有两个铁载体基因簇,一种是已知的 Desferrioxamine 类铁载体;另一种基因簇暗示其可能是一种新型铁载体,*Ser* 基因是这个基因簇的一个合成酶基因,预测其在这种铁载体的合成过程中起关键作用。鉴于此,本研究对 Act12 的铁载体合成酶 *Ser* 基因进行功能研究,为揭示 Act12 防病促生机制奠定基础,并为构建更有效的生防菌株奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株和质粒: 供试生防菌 Act12 由西北农林科技大学资源与环境学院薛泉宏教授惠赠;苹果轮纹病菌(*Macrophoma kawatsukai*)、苹果树腐烂病菌(*Valsa mali*)、基因克隆受体菌 *E. coli* DH5 α 、接合转移供体菌 *E. coli* ET12567 (pUZ8002)、自杀型质粒 pKC1132 [*aac(3)IV*, *oriT*]、整合型质粒 pSET152 [*aac(3)IV*, *oriT*]均为本实验室保存; pMD19-T-*Km*^R 由西北农林科技大学生命科学院贾良辉老师馈赠;克隆载体 pMD19-T 购自 TaKaRa 公司。

1.1.2 培养基: 放线菌培养采用高氏 I 号培养基(g/L):可溶性淀粉 20.00、KNO₃ 1.00、NaCl 0.50、MgSO₄·7H₂O 0.50、K₂HPO₄ 0.50、FeSO₄·7H₂O 0.01、琼脂 15.00;铁载体诱导发酵液采用无铁高氏 I 号培养基:可溶性淀粉 20.00、KNO₃ 1.00、NaCl 0.50、MgSO₄·7H₂O 0.50、K₂HPO₄ 0.50;大肠杆菌培养采用 LB 培养基(g/L):酵母提取物 5.00、胰蛋白胨

10.00、NaCl 10.00、琼脂 15.00；放线菌提取 DNA 发酵液采用 TSB 培养基(g/L)：大豆蛋白胨 5.00、胰蛋白胨 15.00、NaCl 5.00；接合转移培养基采用 MS 培养基(g/L)：黄豆粉 30.00、甘露醇 20.00，琼脂 15.00；病原真菌的培养采用 PDA 培养基：马铃薯 200.00、葡萄糖 20.00、琼脂 15.00。

LB 培养基中抗生素终浓度：氨苄青霉素(Amp) 100 mg/L、安普霉素(Apr) 50 mg/L、卡那霉素(Km) 50 mg/L；接合转移培养基中抗生素终浓度：萘啶酮酸(Nal) 25 mg/L、卡那霉素(Km) 10 mg/L。

1.1.3 供试甜瓜：供试甜瓜种子品种“白雪公主”购自中国山西运城河东种业科技开发中心。

1.1.4 主要试剂和仪器：T4 DNA 连接酶为 TaKaRa 公司产品；ExTaq Master Mix、质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒为康为世纪生物科技公司产品；限制性内切酶为赛默飞世尔科技公司产品；其他生化试剂为国产分析纯。NanoDrop 2000 型紫外分光光度计为 Thermo 公司产品；Bio-Rad S1000TM 型 PCR 仪为 Thermalcycler 公司产品；电泳仪为 JUNYI 公司产品等。

1.1.5 引物：引物由上海生工生物工程有限公司合成，引物序列见表 1。

表 1 实验所用引物

Table 1 Primers used for PCR amplification and detection

| 引物 Primers | 序列 Primers sequence (5'→3') | 酶切位点 Restriction sites |
|---------------|-----------------------------------|---------------------------|
| L-F | CCGGAATTCGAGTTGACGCGGA TGAC | <i>EcoR</i> I |
| L-R | GGAATTCATATGGCACGATGGT GCAGAAG | <i>Nde</i> I |
| R-F | CGCGGATCCACGGACGGAGCAC CC | <i>BamH</i> I |
| R-R | GCTCTAGACCGCCCTGTCATCC | <i>Xba</i> I |
| KY-F | ATGATTGAACAAGATGG | — |
| KY-R | TCAGAAGAACTCGTCAA | — |
| QY-F | GCACCTTAGCCGAGTCA | — |
| QY-R | TCCCAGTGGAAGAGCGT | — |
| BH-F | CCGGAATTCGCACCTTAGCCGA GTCA | <i>EcoR</i> I |
| BH-R | GCTCTAGATCCCAGTGGAAGAG CGT | <i>Xba</i> I |

1.2 Act12 *Ser* 基因敲除载体的构建

CTAB 法^[10]提取 Act12 基因组 DNA 作为模板，以 L-F、L-R 和 R-F、R-R 为引物分别进行 PCR，扩增得到两个同源交换臂 BL 和 BR，长度分别为 1 590 bp 和 1 547 bp。按照 Fermentas Fastpfu 说明书设置 PCR 体系和程序，PCR 体系：5×Buffer 10 μL，正、反向引物(10 μmol/L)各 1 μL，2.5 mmol/L dNTPs 5 μL，DNA 1 μL (<0.5 μg)，DNA polymerase (2.5 U/μL) 1 μL，ddH₂O 补足至 50 μL。PCR 条件：98 °C 2 min；98 °C 30 s，(*T_m*-5) °C 30 s，72 °C 1.5 min；72 °C 5 min。

参照康为世纪质粒提取试剂盒提取大肠杆菌质粒，用相应的限制性内切酶分别酶切 BL、BR、pKC1132 和 pMD19-T-*Km^R*，T4 连接酶连接后转化入 DH5α，筛选阳性转化子，PCR、酶切验证并测序，正确的重组质粒命名为 pCT12。

1.3 Act12 *Ser* 基因敲除突变株的获得和鉴定

将 pCT12 转入 ET12567 (pUZ8002)中，通过接合转移法^[11]将重组质粒转入 Act12，筛选 Apr^S、Km^R 的菌落，采用 PCR 进行验证并测序，命名为 Δ*ser*。

1.4 生物学特性分析

1.4.1 菌落形态观察：采用三区划线法，分别将突变株 Δ*ser* 与野生株 Act12 单菌落接种于高氏 I 号平板，28 °C 培养 8 d，观察二者菌落形态、大小和产孢情况。

1.4.2 生长速率的测定：分别制备突变株 Δ*ser* 与野生株 Act12 的孢子悬液，调整浓度使一致，按 1% 接种量接种于无铁高氏 I 号培养基，28 °C、180 r/min 培养，每隔 1 d 称菌体干重，直至菌体生长至稳定期，绘制生长曲线。

1.4.3 无菌发酵滤液的制备：制备 Δ*ser* 与 Act12 同等浓度的孢子悬液，按 1% 接种量接种于无铁高氏 I 号培养基，28 °C、180 r/min 培养 8 d，发酵液于 8 000 r/min 离心 10 min、真空抽滤后用 0.45 μm 灭菌微孔滤膜过滤除菌，得无菌发酵滤液。

1.4.4 无菌发酵滤液铁载体产量的测定：Δ*ser* 与 Act12 的发酵滤液采用 CAS 检测法检测，并用紫

外-可见分光光度计测样品在 630 nm 波长下的光吸收值,利用 $S_e = (A_r - A) / A_r \times 100\%$ 计算铁载体的含量^[12],其中 A 和 A_r 分别为待测样品和对照样品(无铁高氏 I 号培养基)在 630 nm 处的光吸收值, S_e 表示铁载体的含量。

1.4.5 无菌发酵滤液对甜瓜种子萌发的影响: 挑选饱满的甜瓜种子 50 粒,用 1% 的 NaClO 溶液消毒后,用无菌水反复冲洗,用灭菌的纱布包住,各取 50 粒浸泡于装有 Δser 与 Act12 的无菌发酵滤液的小烧杯中,28 °C 遮光浸种 24 h。弃去浸液,无菌水冲洗种子,放入装有无菌水浸润滤纸的培养皿中,28 °C 恒温培养 24 h 观察种子萌发情况,统计种子萌发率,96 h 时测量幼苗根长和胚轴长度。

1.4.6 对病原真菌血内拮抗作用的测定: 苹果轮纹病菌和苹果树腐烂病菌在 PDA 平板上,25 °C 培养 2 d, Δser 与 Act12 在无铁高氏 I 号平板上 28 °C 培养 8 d,分别用 7 mm 打孔器切取下来制成菌饼,将一个放线菌菌饼置于 PDA 平板中央,距培养皿中央 2 cm 处以对角线方式点接 4 个病原真菌菌饼,菌丝面朝下,25 °C 培养 3 d,观察生长情况,十字交叉法测量抑菌圈直径。

2 结果与分析

2.1 Ser 基因敲除载体的构建及验证

两个同源臂、pMD19-T- Km^R 和 pKC1132 分别进行酶切、连接和转化后,在含卡那霉素(10 mg/L)和安普霉素(25 mg/L)的 LB 平板上筛选转化子,此转化子同时包含 Km^R 基因片段和 pKC1132 片段,再将该转化子进行两个同源臂的 PCR 验证和酶切验证,结果见图 1。PCR 验证和酶切验证片段大小均与预期相符,并经测序、比对,没有发生碱基突变,证明基因敲除载体 pCT12 构建成功。

2.2 Ser 基因敲除突变株的构建及验证

利用含有重组质粒 pCT12 的 ET12567 (pUZ8002),通过接合转移法将重组质粒转入 Act12,筛选 Apr^S 、 Km^R 的菌落。如图 2 所示,利用 Km^R 基因设计的引物 KY-F/R 对 Δser 进行 PCR,

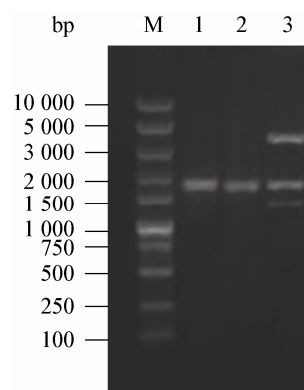


图 1 Ser 基因敲除载体的鉴定

Figure 1 Identification of the Ser knock-out plasmid

注: M: Super DNA marker; 1: L-F/R PCR 扩增上游同源臂; 2: R-F/R PCR 扩增下游同源臂; 3: 转化子的酶切验证($EcoR$ I / Nde I / Bam H I / Xba I)。

Note: M: Super DNA marker; 1: L-F/R PCR amplification using plasmid of the transformant; 2: R-F/R PCR amplification using plasmid of the transformant; 3: Digestion of plasmid of the transformant ($EcoR$ I / Nde I / Bam H I / Xba I)。

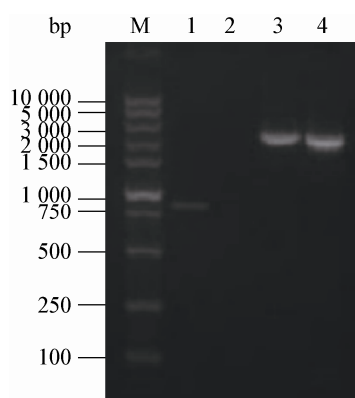


图 2 Δser 的 PCR 验证

Figure 2 PCR analysis of Δser

注: M: Super DNA marker; 1: KY-F/R PCR 扩增 Δser 基因组 DNA; 2: KY-F/R PCR 扩增 Act12 基因组 DNA; 3: QY-F/R PCR 扩增 Δser 基因组 DNA; 4: QY-F/R PCR 扩增 Act12 基因组 DNA。

Note: M: Super DNA marker; 1: KY-F/R PCR amplification using DNA of Δser ; 2: KY-F/R PCR amplification using DNA of Act12; 3: QY-F/R PCR amplification using DNA of Δser ; 4: PCR amplification using DNA of Act12.

得到的扩增片段为 795 bp,而 Act12 没有得到相应片段;利用 Ser 全长基因设计引物 QY-F/R, Act12 扩到约 2 000 bp 的片段, Δser 扩到的片段比 Act12 的片段大 144 bp,并将该片段测序、比对。PCR 验证结果和测序结果均表明 Km^R 基因插入到 Ser 基因中。

2.3 生物学特性分析

2.3.1 菌落形态: 在高氏 I 号平板上分别划线接种 Δser 与 Act12, 28 °C 培养 8 d, Δser 与 Act12 菌落大小和形态没有明显区别(图 3), 均产生灰色孢子。

2.3.2 生长速率的测定: 在无铁高氏 I 号培养基中, 28 °C、180 r/min 培养, 从培养第 1 天开始, 每隔 1 d 测一次菌体干重得到 Δser 与 Act12 的生长曲线, 如图 4 所示, Δser 的生长速率与 Act12 没有明显区别, 从第 2 天开始快速生长, 到第 8 天达到最大值, 之后进入衰亡期。

2.3.3 铁载体产量的测定: Δser 与 Act12 用无铁高氏 I 号培养基, 28 °C、180 r/min 培养, 其铁载体

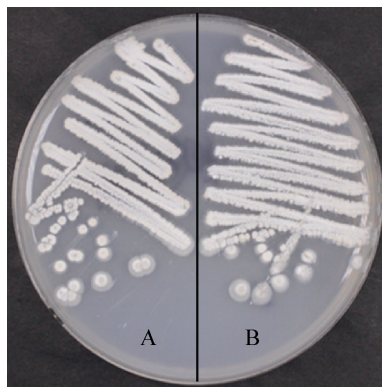


图 3 Δser (A)与 Act12 (B)的菌落形态
Figure 3 Colony of Δser (A) and Act12 (B)

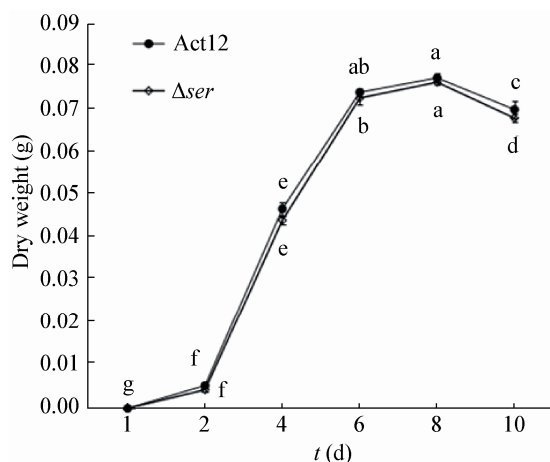


图 4 Δser 与 Act12 的生长速率

Figure 4 Growth curves of Δser and Act12

注: 图中误差线为标准偏差, 不同小写字母表示差异显著性($P<0.05$). 同图 5.

Note: The error bars represent SD, and different letters indicate significant difference ($P<0.05$). The same as figure 5.

产量曲线如图 5 所示, 前 3 d 二者的铁载体产量无显著性差别, 从第 4 d 开始, Δser 铁载体合成显著少于 Act12 产生的铁载体。培养第 8 天时, Δser 的铁载体产量为 64.3%, 而 Act12 的铁载体产量为 75.0%。

2.3.4 无菌发酵滤液对甜瓜种子萌发的影响: 由表 2 可知, 96 h 时, Δser 处理组甜瓜种子萌发率及胚根、胚轴长度均显著小于对照组和 Act12 处理组, 推测可能是铁载体合成酶 *Ser* 基因敲除后, 该铁载体合成受阻, 导致其他微生物生长而产生毒素, 从而抑制了甜瓜种子的萌发, 或许另有他因。

Act12 处理组萌发率和胚根长度与对照组没显著性差异, 但胚轴长度显著长于对照组, Act12 对甜瓜种子胚轴的促生作用可能与 *Ser* 基因控制合成的铁载体相关。

2.3.5 与病原真菌血内对峙实验: 在 Δser 和 Act12 对病原真菌的拮抗作用中, 形成正方形的抑菌圈(图 6), 正方形的边长即为抑菌圈直径。如表 3 所示, Δser 和 Act12 对苹果轮纹病菌对峙试验中, 25 °C 培养 36 h 抑菌圈直径达到最大, 且 Δser 对苹果轮纹病菌的抑制作用小于 Act12 对苹果轮纹病菌的抑制作用; 48 h 时, Δser 对苹果轮纹病菌的抑菌圈直径明显减小, 而 Act12 对苹果轮纹病菌的抑菌圈直径几乎没变化。 Δser 和 Act12 对苹果树腐烂病菌对峙试验中, 25 °C 培养 36 h 抑菌圈直径达到

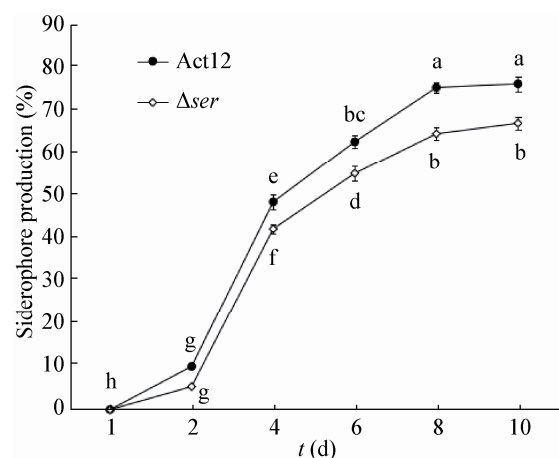


图 5 Δser 与 Act12 发酵滤液铁载体产量曲线

Figure 5 Siderophore production curves of Δser and Act12

表2 Δser and Act12 对甜瓜种子萌发及根长、胚轴长的影响

Table 2 Influences of Δser and Act12 on germination and growth of seeds of *Cucumis melo* L.

| 放线菌 Actinomycete | 萌发率 Rate of germination (%) | 胚根长度 Length of radicle (cm) | 胚轴长度 Length of hypocotyl (cm) |
|---------------------|--------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| CK | 40.70±2.10a | 4.20±0.72a | 2.02±0.53b |
| Δser | 9.00±4.00b | 0.12±0.13b | 0c |
| Act12 | 41.00±1.00a | 4.54±0.26a | 2.86±0.15a |

注：表中数据为平均值±标准偏差，同列不同小写字母表示差异显著性($P<0.05$)。

Note: The datas represent means±s, and different letters in the same column indicate significant difference ($P<0.05$).

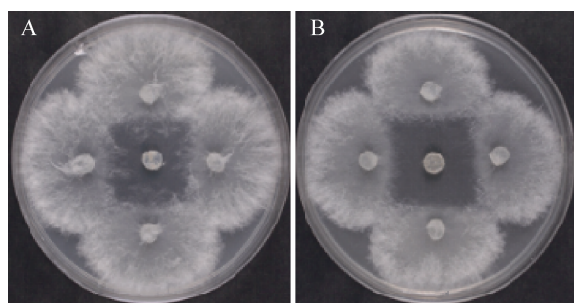


图6 Δser (A)与 Act12 (B)对苹果轮纹病菌的拮抗作用
Figure 6 Inhibition activity of Δser (A) and Act12 (B) against *M. kawatsukai*

最大，48 h 时抑菌圈直径减小，但 Δser 和 Act12 对苹果树腐烂病菌的抑菌圈直径几乎没区别。图 6 是 48 h 时 Δser 和 Act12 对苹果轮纹病菌的拮抗作用图。

2.4 Ser 基因回补实验

以 Act12 基因组 DNA 为模板，利用引物 BH-F 和 BH-R，通过 PCR 扩增得到包含完整 *Ser* 基因的片段，用限制性内切酶 *EcoR* I / *Xba* I 分别酶切 *Ser* 片段和 pSET152，通过 T4 连接酶连接，构建重组

质粒 pSET-Ser，筛选阳性转化子，测序正确后转入 ET12567(pUZ8002)中，通过接合转移法将重组质粒转入 Δser ，随机挑选 3 个转化子进行铁载体含量检测，其铁载体含量得以回复，表明基因缺失突变体铁载体产量的变化是由基因 *ser* 被敲除引起的，进而初步验证基因 *ser* 的功能。

3 讨论

铁在生命有机体的代谢过程中起着重要的作用，当高等生物和微生物缺铁时，它们的代谢过程均会受到不利影响。研究证明铁载体在抑制病原微生物及植物促生方面发挥着重要作用。许多产铁载体微生物可利用铁载体和病原菌竞争环境中的铁营养而达到抑菌作用。恶臭假单胞(*Pseudomonas putida*)菌株 wcs358r 只依靠铁载体与镰刀霉枯萎病菌(*Fusarium fungus*)竞争铁从而抑制其生长^[13]。朱慧明^[14]等报道铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)菌株 Z158 产生的铁载体对 4 种常见致病菌都有抑制作用。产铁载体的植物内生菌能通过铁载体整合环境中铁离子或其他重金属离子形成复合物被植物吸收而促进植物的生长，并且可以通过铁载体抑制病原微生物的生长繁殖间接促进植物的生长^[15]。另有报道称，细菌分泌的铁载体在某些情况下可以诱导植物系统抗性^[13]，增强植物的抗病能力而促进植物生长。

种子萌发过程受到多个基因在时间和空间上的调控，在某一阶段，有些基因被激活表达，而有些基因被抑制表达，这些基因表达的抑制对维持正常的萌发十分关键^[16]。 Δser 发酵滤液处理的甜瓜种子萌发率很低，并且萌发时间比对照组明显推迟很

表3 Δser 与 Act12 对苹果轮纹病菌和苹果树腐烂病菌的对峙试验
Table 3 Inhibition activity of Δser and Act12 against *M. kawatsukai* and *V. mali*

| 放线菌 Actinomycete | 对 <i>M. kawatsukai</i> 抑菌圈直径 Inhibitory zone diameter (cm) | | 对 <i>V. mali</i> 抑菌圈直径 Inhibitory zone diameter (cm) | |
|---------------------|---------------------------------------------------------------|------------|---------------------------------------------------------|------------|
| | | | | |
| | 36 h | 48 h | 36 h | 48 h |
| CK | 0c | 0c | 0b | 0b |
| Δser | 2.44±0.10b | 1.50±0.10b | 2.47±0.06a | 1.97±0.06a |
| Act12 | 2.70±0.10a | 2.53±0.06a | 2.50±0.10a | 2.03±0.12a |

注：表中数据为平均值±标准偏差，同列不同小写字母表示差异显著性($P<0.05$)。

Note: The datas represent means±s, and different letters in the same column indicate significant difference ($P<0.05$).

多,可能是铁载体合成酶 *ser* 基因敲除后,影响了 *ser* 基因参与合成的铁载体的合成,导致其他微生物的生长而产生毒素,从而抑制了甜瓜种子的萌发,或许另有他因。Act12 在无铁高氏 I 号培养基培养 8 d 的铁载体产量高达 75%,属于高产铁载体放线菌。但菌株的铁载体产量和对病原菌的抑制作用不具有线性相关性,即使铁载体产量很高,也有可能无抑菌作用^[17]。本实验以苹果轮纹病菌和苹果树腐烂病菌作为靶标菌,Δ*ser* 和 Act12 对苹果轮纹病菌对峙培养前期拮抗作用没差异,后期有差异,可能是由于在对峙培养初期,主要是Δ*ser* 和 Act12 产生的一些抗菌物质发挥拮抗作用;对峙培养后期,这些抗菌物质被消耗掉,Δ*ser* 和 Act12 利用铁载体与病原真菌竞争铁营养而抑制其生长,Δ*ser* 比 Act12 合成的铁载体少,因而拮抗作用比 Act12 弱。Δ*ser* 和 Act12 对苹果树腐烂病菌对峙培养 36 h 时抑菌圈最大,之后抑菌圈均减小。Δ*ser* 和 Act12 对苹果轮纹病菌的抑菌作用有差异,而对苹果树腐烂病菌的拮抗作用没差异,可能是 Act12 对不同病原真菌的抑菌机制不同所致。后期可以对突变体通过实时荧光定量 PCR (RT-PCR)对 *Ser* 基因表达量做研究,并对 Act12 铁载体进行分离纯化,进一步研究其防病促生机制,开发出能有效防治农业病害的生防制剂,应用于农业生产。

参 考 文 献

- [1] An Z, Zhao Q, McEvoy J, et al. The second finger of Urbs1 is required for iron-mediated repression of *sid1* in *Ustilago maydis*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997, 94(11): 5882-5887
- [2] Malik KA, Bilal R, Mehnaz S, et al. Association of nitrogen-fixing, plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) with kallar grass and rice[J]. Plant and Soil, 1997, 194(1/2): 37-44
- [3] Haselwandter K, Winkelmann G. Siderophores of symbiotic fungi[A]//Varma A, Chincholkar S B. Microbial Siderophores[M]. Berlin Heidelberg: Springer, 2007, 12: 91-103
- [4] Liang JG, Shi YF, Zhu LH. Plant growth promoting mechanism of rhizosphere bacteria[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2008(17): 133-135 (in Chinese)
梁建根, 施跃峰, 竺利红. 植物根围促生细菌作用机制的研究[J]. 现代农业科技, 2008(17): 133-135
- [5] Liu DD, Li M, Liu RJ. Recent advances in the study of plant growth-promoting rhizobacteria in China[J]. Chinese Journal of Ecology, 2016, 35(3): 815-824 (in Chinese)
刘丹丹, 李敏, 刘润进. 我国植物根围促生细菌研究进展[J]. 生态学杂志, 2016, 35(3): 815-824
- [6] Xu YJ, Xue QH, Xing SL, et al. Growth promoting effect and induced endurance of three actinomycetes strains to strawberry[J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2007, 16(6): 146-153 (in Chinese)
许英俊, 薛泉宏, 邢胜利, 等. 3 株放线菌对草莓的促生作用及对 PPO 活性的影响[J]. 西北农业学报, 2007, 16(6): 146-153
- [7] Zhao J, Xue QH, Wang LN, et al. Antagonistic effect of multifunctional actinomycete strain Act12 on soil-borne pathogenic fungi and its identification[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2011, 19(2): 394-398 (in Chinese)
赵娟, 薛泉宏, 王玲娜, 等. 多功能放线菌 Act12 对土传病原真菌的拮抗性及其鉴定[J]. 中国生态农业学报, 2011, 19(2): 394-398
- [8] Zhao J, Du JZ, Xue QH, et al. The growth-promoting effect and resistance induction of 3 antagonistic actinomycetes on *Cucumis melo* L.[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2010, 38(2): 109-116 (in Chinese)
赵娟, 杜军志, 薛泉宏, 等. 3 株放线菌对甜瓜幼苗的促生与抗性诱导作用[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2010, 38(2): 109-116
- [9] Zhang HY, Xue QH, Shen GH, et al. Effects of actinomycetes agent on ginseng growth and rhizosphere soil microflora[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2013, 24(8): 2287-2293 (in Chinese)
张鸿雁, 薛泉宏, 申光辉, 等. 放线菌制剂对人参生长及根域土壤微生物区系的影响[J]. 应用生态学报, 2013, 24(8): 2287-2293
- [10] Liu BH, Cao YY, Yan JF, et al. Comparison among six methods of genome DNA extraction from Streptomyces[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2008(10): 86-89 (in Chinese)
刘炳辉, 曹远银, 闫建芳, 等. 6 种链霉菌基因组 DNA 提取方法比较[J]. 河南农业科学, 2008(10): 86-89
- [11] Yan LB, Hong WR, Fang ZK, et al. Construction of the conjugal transfer system for *Micromonospora purpurea* G1008[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2011, 36(12): 899-904 (in Chinese)
严凌斌, 洪文荣, 方志锴, 等. 绛红色小单孢菌 G1008 接合转移体系的构建[J]. 中国抗生素杂志, 2011, 36(12): 899-904
- [12] Wang P, Dong B, Li FD, et al. Detection and determination of the siderophores produced by wheat rhizo bacteria[J]. Microbiology China, 1994, 21(6): 323-326 (in Chinese)
王平, 董颀, 李阜棣, 等. 小麦根圈细菌铁载体的检测[J]. 微生物学通报, 1994, 21(6): 323-326
- [13] Compant S, Duffy B, Nowak J, et al. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(9): 4951-4959
- [14] Zhu HM, Zhang Y, Yang HJ. Screening of *Pseudomonas* strains producing high-yield siderophore and its utilization of iron hydroxides[J]. Biotechnology Bulletin, 2015, 31(9): 177-182 (in Chinese)
朱慧明, 张彦, 杨洪江. 高产铁载体假单胞菌的筛选及其对铁氧化物的利用[J]. 生物技术通报, 2015, 31(9): 177-182
- [15] Sun L, Shao H, Liu L, et al. Diversity of siderophore-producing endophytic bacteria of *Cymbidium goeringii* roots[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(2): 189-195 (in Chinese)
孙磊, 邵红, 刘琳, 等. 可产生铁载体的春兰根内生细菌多样性[J]. 微生物学报, 2011, 51(2): 189-195
- [16] Zhang Y, Xu XF, Mo BX. Repression regulations of seed germination[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2012, 24(2): 118-122 (in Chinese)
张宇, 徐晓峰, 莫蓓蓓. 种子萌发的抑制调控机制[J]. 生命科学, 2012, 24(2): 118-122
- [17] Raaska L, Mattila-Sandholm T. Effects of iron level on the antagonistic action of siderophores from non-pathogenic *Staphylococcus* spp[J]. Journal of Industrial Microbiology, 1995, 15(6): 480-485