



碳代谢基因 *gabT* 调控生防菌 *Snea253* 的 γ -氨基丁酸代谢途径影响杀线虫活性

于冬梅¹ 朱峰² 邢志富¹ 范海燕¹ 朱晓峰¹ 段玉玺¹ 王媛媛³ 刘晓宇⁴ 陈立杰^{*1}

1 沈阳农业大学植物保护学院 辽宁 沈阳 110866

2 吉林省农业科学院植物保护研究所 吉林 公主岭 130033

3 沈阳农业大学生物科学技术学院 辽宁 沈阳 110866

4 沈阳农业大学理学院 辽宁 沈阳 110866

摘要:【背景】委内瑞拉链霉菌 *Snea253* 是本实验室前期获得的具有杀植物线虫活性的生防放线菌, 通过生物信息学分析, γ -氨基丁酸转氨酶基因(*gabT*)是参与 *Snea253* 碳代谢的重要基因之一。【目的】明确 *gabT* 基因通过调控 *Snea253* 的 γ -氨基丁酸(γ -Aminobutyric acid, GABA)代谢通路, 从而影响菌株的活性。【方法】以紫外诱变所得弱毒株(*Snea253*-R)为材料, 以南方根结线虫为靶标, 在弱毒株中过表达 *gabT* 基因, 通过酶联免疫法(ELISA)和高效液相色谱法(HPLC)分别检测菌株中 GABA 和下游代谢产物琥珀酸的含量及杀线虫活性, 同时检测在不同碳源培养条件下野生型菌株 *gabT* 基因表达水平、产物含量和杀线虫活性。【结果】过表达菌株 R-pIB139 的 *gabT* 基因上调表达, GABA 含量降低, 琥珀酸含量升高, 杀线虫活性提高了 39%; 在 8 种不同碳源培养条件下, *gabT* 基因在野生株中相对表达量较高的培养基碳源是可溶性淀粉和玉米淀粉, 其发酵液中 GABA 含量较低, 发酵液中下游代谢产物增多, 杀线虫活性较高。【结论】通过改变 *gabT* 基因的表达, 明确 GABA 支路在调控 *Snea253* 代谢以提高杀线虫的过程中发挥重要作用。

关键词: γ -氨基丁酸转氨酶基因 *gabT*, 委内瑞拉链霉菌, γ -氨基丁酸(GABA), 琥珀酸, 杀线虫活性

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2017YFD0201104); National Natural Science Foundation of China (31471748)

*Corresponding author: Tel: 86-24-88487148; E-mail: chenlijie0210@163.com

Received: 12-01-2019; Accepted: 28-05-2019; Published online: 04-06-2019

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0201104); 国家自然科学基金(31471748)

*通信作者: Tel: 024-88487148; E-mail: chenlijie0210@163.com

收稿日期: 2019-01-12; 接受日期: 2019-05-28; 网络首发日期: 2019-06-04

Carbon metabolism gene *gabT* regulates γ -aminobutyric acid metabolism of *Streptomyces venezuelae* Snea253 on nematicidal activity

YU Dong-Mei¹ ZHU Feng² XING Zhi-Fu¹ FAN Hai-Yan¹ ZHU Xiao-Feng¹
DUAN Yu-Xi¹ WANG Yuan-Yuan³ LIU Xiao-Yu⁴ CHEN Li-Jie^{*1}

1 College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866, China

2 Institute of Plant Protection, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling, Jilin 130033, China

3 College of Bioscience and Biotechnology, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866, China

4 College of Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866, China

Abstract: [Background] *Streptomyces venezuelae* Snea253 is an actinomycete with nematicidal activity to plant-parasitic nematode. Bioinformatics analysis showed that γ -aminobutyrate transaminase gene (*gabT*) is one of the important genes involved in carbon metabolism in Snea253. [Objective] The purpose of this research is to clarify that the *gabT* gene affects the activity of the strain by regulating the γ -aminobutyric acid metabolic pathway of Snea253. [Methods] First, the mutant strain (Snea253-R) obtained by UV mutation was used to overexpress the *gabT* gene, and *Meloidogyne incognita* J2 was used as the target nematode. γ -aminobutyric acid and the metabolite succinic acid were detected by enzyme-linked immunoassay (ELISA) and high performance liquid chromatography (HPLC), and the nematicidal activity was also detected. Meanwhile, the *gabT* gene expression level, product content and nematicidal activity of wild-type strain with eight carbon sources culture were detected. [Results] The expression of *gabT* gene in overexpression strain R-pIB139 was up-regulated, γ -aminobutyric acid content was decreased, the content of succinic acid was increased, and the nematicidal activity was increased by 39% in comparison with the control. In eight carbon sources cultures, the carbon source medium with the higher relative expression of *gabT* gene in wild plants was soluble starch and corn starch. Under this condition, γ -aminobutyric acid content in fermentation broth was lower, the other products of metabolism were increased, and the nematicidal activity was higher. [Conclusion] By changing the expression of *gabT* gene, we confirmed that γ -aminobutyric acid shunt plays an important role in regulating the metabolism of Snea253 to enhance nematicidal activity.

Keywords: γ -Aminobutyrate transaminase gene *gabT*, *Streptomyces venezuelae*, γ -Aminobutyric acid (GABA), Succinic acid, Nematicidal activity

根结线虫是世界上最具有破坏性的植物内寄生线虫,可寄生 3 000 多种植物^[1],且分布范围极广。随着东北地区设施蔬菜种植面积逐年增加,适宜的生存环境和重茬连作的种植方式使当地根结线虫病害日趋严重,辽宁省保护地蔬菜以南方根结线虫为主要危害,其中以连作 7 年以上的黄瓜、番茄、苦瓜易感寄主为主的老菜棚的发病率达到 100%,病情指数达到 80 以上^[2]。采用化学方法防治蔬菜根结线虫病,不仅会降低蔬菜品质,还会破坏生态平衡^[3],因此越来越多的研究者将目光转向生物防治。利用生防微生物代谢产物防治根结线虫是有效措施,其代谢产物中有多种有机酸具有较强的杀线

虫活性,如亚油酸^[4]、柠檬酸^[5]、草酸等^[6]。Morgunov 等^[7]研究发现,微生物合成的琥珀酸也具有较强的杀线虫活性,Kamzolova 等^[8]报道了微生物来源的琥珀酸对植物寄生线虫具有毒性,Botura 等^[9]的研究表明琥珀酸对山羊胃肠道线虫卵有明显的抑制作用。

γ -氨基丁酸(γ -Aminobutyric acid, GABA)是一种非蛋白质氨基酸,广泛存在于动物、植物和微生物中^[10]。在植物中 GABA 有两条合成转化途径,即三羧酸循环旁路(GABA 支路)和多胺降解途径^[11-12]。微生物中 GABA 代谢成琥珀酸是通过 GABA 支路完成^[13]。GABA 由谷氨酸合成,在 γ -氨基丁酸转氨

酶(GABA-T)的作用下生成琥珀酸半醛,随后在琥珀酸半醛脱氢酶的作用下生成琥珀酸,参与生物的生理代谢^[14]。研究发现,过量表达或沉默 *GABA-T* 基因会降低或提高 GABA 的含量。周露等^[15]利用 RNA 干扰水稻 *GABA-T* 基因提高水稻中 GABA 的含量, Simpson 等^[16]在拟南芥中过表达了 *GABA-T* 基因,降低了 GABA 含量, Renault 等^[17-19]发现拟南芥中 *GABA-T* 功能的破坏会导致 GABA 含量升高而琥珀酸含量降低,然而 *GABA-T* 不直接作用于琥珀酸。在植物中关于 *GABA-T* 基因表达调控的研究很活跃,但在微生物中,尤其关于链霉菌中 *GABA-T* 基因表达调控还不清楚。

委内瑞拉链霉菌 (*Streptomyces venezuelae*) *Snea253* 是本实验室从土壤中分离获得的具有杀线虫活性的菌株^[20]。田成丽等^[21]经紫外诱变得得到 *Snea253* 杀线虫活性不同的强毒株(*Snea253-Q*)和弱毒株(*Snea253-R*)。利用 RNA-Seq 进行转录组分析,筛选到碳代谢过程的重要基因—— γ -氨基丁酸转氨酶基因 *gabT*, *gabT* 基因在强毒株中的相对表达量高于弱毒株。但是, *gabT* 基因是否可以通过调控代谢影响 *Snea253* 杀线虫活性,以及不同碳源对 *gabT* 基因表达有何影响仍然未知。为探究 *gabT* 基因对 *Snea253* 的代谢调控,本研究通过在 *Snea253* 弱毒株中过表达 *gabT* 基因和改变菌株生长条件的碳源,检测 *gabT* 基因的表达对发酵液中 GABA 和琥珀酸合成及杀线虫活性的影响,从而为 *gabT* 基因或 GABA 支路调控生防菌 *Snea253* 碳代谢途径,以提高杀线虫效果提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、载体和根结线虫

供试委内瑞拉链霉菌 *Snea253* 由沈阳农业大学北方线虫研究所提供; pGEM-T Easy 载体购自 Promega 公司;质粒 pIB139 购自武汉森灵生物科技有限公司;大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购自天根生化科技有限公司。南方根结线虫 (*Meloidogyne incognita*) 由沈阳农业大学北方线虫研究所提供。

1.1.2 主要试剂和仪器

试验所用 PCR 引物和实时荧光定量 PCR 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(表 1); 氨苄霉素、安普霉素、PEG1000、LB 培养基购自生工生物工程(上海)股份有限公司;植物基因组 DNA 提取试剂盒(Hi-DNAsecure Plant Kit)、DNA 产物纯化试剂盒(TIANgel Midi Purification Kit)、质粒提取试剂盒(TIANprep Mini Plasmid Kit)、RNAprep Pure 培养细胞/细菌总 RNA 提取试剂盒(RNAprep Pure Cell/Bacteria Kit)购自北京天根生化科技有限公司;限制性内切酶 *Xba* I、*Nde* I 购自宝生物工程(北京)有限公司; GABA 检测试剂盒购自上海岚派生物有限公司。

电泳仪,北京六一生物科技有限公司;PCR 仪, Bio-Rad 公司;空气恒温摇床,北京北方同正生物技术发展公司;冷冻离心机,基因有限公司;恒温培养振荡器,上海智城分析仪器制造有限公司;超净工作台,苏州净化有限公司。

1.1.3 试验所用培养基和缓冲液

高氏一号培养基(g/L): 可溶性淀粉 20.00, MgSO₄·7H₂O 0.50, KNO₃ 1.00, K₂HPO₄ 0.50, NaCl 0.50, FeSO₄ 0.001 0, 琼脂 10.00。

优化高氏一号培养基: 固定其他成分,再加入 (NH₄)₂SO₄ 0.50 g/L, 花生饼粉 20.00 g/L。

SM 培养基(g/L): 葡萄糖 10.00, 蛋白胨 4.00, 酵母抽提物 4.00, K₂HPO₄ 4.00, KH₂PO₄ 0.20, MgSO₄ 0.05。

表 1 实验所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primers name	引物序列 Sequences (5'→3')
RT-PCR- <i>gabT</i> -F1	CGTTCTAGAATCCCCGGTCCGAAGTCGCAGGA
RT-PCR- <i>gabT</i> -R1	CGTTCTAGAGTGACCCAGGACCTCTCCAAGA
qRT-PCR- <i>gabT</i> -F2	TTGGCGGTGGTGATGAG
qRT-PCR- <i>gabT</i> -R2	CAACGGCATCGTCTTCGT
16S rRNA-F	GCAGGCTAGAGTTCGGTAG
16S rRNA-R	CTCCTCAGCGTCAGTATCG

R2YE 培养基(g/L): 蔗糖 103.0, 琼脂 20.0, 蛋白胨 2.0, 葡萄糖 10.0, 酵母抽提物 1.0, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 4.0, 100.0 mL 2.78% $CaCl_2$, 2.0 mL 微量元素溶液。

微量元素溶液(Trace element solution, g/L): $ZnCl_2$ 0.04, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.01, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.20, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.01, $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ 0.01, $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ 0.01。

高渗溶液(PB, g/L): 蔗糖 103.00, K_2SO_4 0.25, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 2.02, KH_2PO_4 0.05, 2.00 mL 微量元素溶液, 0.25 mol/mL TES 溶液 100.00 mL, 2.78% $CaCl_2$ 溶液 100.00 mL。

1.2 方法

1.2.1 杀线虫活性的检测

Snea253 杀线虫活性的检测: 选取活跃的南方根结线虫二龄幼虫(J2)作为靶标线虫, 在每个贝氏小皿中加入 500 μ L 生防菌 Snea253 发酵滤液和约 100 条南方根结线虫 J2, 以 500 μ L 液体培养基为对照, 每个处理均重复 3 次, 于 24 h 后观察 J2 的死亡情况, 计算线虫死亡率和校正死亡率:

$$\text{线虫死亡率}(\%) = \frac{\text{死亡线虫数}}{\text{供试线虫数}} \times 100;$$

$$\text{线虫校正死亡率}(\%) = \frac{\text{处理线虫死亡率} - \text{对照线虫死亡率}}{1 - \text{对照线虫死亡率}} \times 100。$$

琥珀酸杀线虫活性检测: 选取活跃的南方根结线虫 J2 作为靶标线虫, 用琥珀酸溶液对 J2 进行杀线虫活性检测。在贝氏小皿中分别加入 500 μ L 浓度为 50、100、200、500、1 000、2 000 μ g/mL 的琥珀酸标准品和 100 条南方根结线虫 J2, 以 500 μ L ddH₂O 为对照, 共 7 个处理, 均重复 3 次, 将其置于 25 $^{\circ}$ C 温箱中, 分别于 24、48 h 后观察线虫的死亡情况, 并计算线虫死亡率和校正死亡率。

1.2.2 发酵液中 GABA 和琥珀酸含量的检测

用高氏一号液体培养基摇瓶培养菌株 5 d 后, 检测菌株发酵液中 GABA 和琥珀酸含量。GABA 含量按照 GABA 试剂盒操作说明书进行。

用高效液相色谱法检测琥珀酸含量, 色谱条件为: 色谱柱为 Kromasil C18 色谱柱, 柱温为 30 $^{\circ}$ C,

流动相为 100% 甲醇: 0.02 mol/L KH_2PO_4 (pH 2.5) 为 7:93, 流速为 0.5 mL/min, 进样量为 10 μ L, 检测波长为 214 nm。标准品的制备: 称取适量的琥珀酸标准品分别用流动相稀释到浓度为 2 000、1 500、1 000、500、200、100 μ g/mL 的储备液。样品的处理: 将 500 mL 发酵滤液旋蒸浓缩至 5 mL, 用等体积的乙酸乙酯萃取 3 次, 回收乙酸乙酯液继续旋转蒸发浓缩至 2 mL, 微孔滤膜过滤, 液相色谱检测。

1.2.3 表达载体 pIB139-gabT 的构建

根据 *gabT* 基因的序列信息, 设计含 *Nde* I 和 *Xba* I 位点的引物(表 1), 以生防菌 Snea253 野生型的 DNA 为模板, 用高保真酶进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: 高保真酶 Prime STAR HS DNA Polymerase 25 μ L, *gabT* 基因的上下游引物各 2 μ L (0.2 μ mol/L), 总 DNA 4 μ L (约 50 ng/ μ L), ddH₂O 17 μ L。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}$ C 2 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 55 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 55 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 2 min。使用 PCR 产物纯化试剂盒对 PCR 产物进行纯化后, 用 T4 连接酶将基因片段和载体 pGEM-T Easy 室温连接 3 h, 通过热激法将连接产物转化到 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞中, 经 50 μ g/mL 氨苄霉素(Amp)抗性筛选, 挑取白色单菌落进行菌落 PCR, 将阳性单菌落于含终浓度为 50 μ g/mL Amp 的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养过夜, 提取质粒 pGEM-gabT, 酶切鉴定。

经酶切验证成功后, 用限制性内切酶 *Nde* I 和 *Xba* I 分别对重组质粒 pGEM-gabT 和载体 pIB139 进行双酶切, 用 T4 连接酶连接载体与目的片段, 采用热激法转化到 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中。经氨苄霉素(50 μ g/mL, Apr)抗性筛选, 挑取白色单菌落进行菌落 PCR, 将阳性单菌落于含终浓度为 50 μ g/mL Apr 的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养过夜, 提取质粒 pIB139-gabT, 酶切鉴定。

1.2.4 生防菌 Snea253 原生质体的制备与转化

孢子悬液和原生质体的制备方法如下: 将 100 μ L 生防菌 Snea253 弱毒株孢子悬液接入 25 mL SM 液体培养基中, 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 36 h 后, 取 5 mL

转接到含有 0.5% 甘氨酸的 25 mL SM 培养基中, 30 °C、200 r/min 培养 24 h。取 5 mL 分装到离心管中, 8 000 r/min 离心 4 min, 弃上清。先加入 5 mL 10.3% 蔗糖溶液, 8 000 r/min 离心 4 min, 重复此步骤一次。再加入 5 mL PB 溶液, 操作与加入蔗糖溶液相同。加入 5 mg/mL 的溶菌酶 2 mL, 30 °C 消化 3 h 后再加入 5 mL PB 溶液, 4 000 r/min 离心 10 min, 弃上清。加入 5 mL PB 溶液, 充分振荡, 收集滤液, 4 000 r/min 离心 10 min 后重悬于 1 mL PB 溶液中。

取制备完好的原生质体加入 10 μ L pIB139-*gabT* 的质粒, 迅速加入 1 mL 33% PEG 1000, 混匀后加入 8 mL PB 溶液。4 000 r/min 离心 10 min, 去上清, 将原生质体重悬在 1 mL PB 溶液中。将转化的原生质体均匀涂布到 R2YE 培养基上, 30 °C 培养 12 h 后加入 1 mL 终浓度为 150 μ g/mL 的 Apr 溶液, 在恒温培养箱中 30 °C 培养 2–3 d。将转化子接到含有 30 μ g/mL Apr 的链霉菌斜面孢子培养基连续培养 3 代, 挑取菌落进行摇瓶培养, 保存菌种。

1.2.5 *gabT* 基因表达量的检测

用细菌组织提取试剂盒提取过表达菌株的 RNA, 对其反转录得到 cDNA。使用 CFX96 Real-Time PCR System, 按照 SYBR Green PCR Master Mix 说明书进行实时荧光定量 PCR, 16S rRNA 基因作为看家

基因, 其引物序列见表 1。qPCR 反应体系: SYBR Green PCR Master Mix 12.5 μ L, 上、下游引物各 1 μ L (0.2 μ mol/L), cDNA 1.5 μ L (100 ng/ μ L), ddH₂O 9 μ L。反应条件: 95 °C 2 min; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 采集一次荧光, 40 个循环; 72 °C 5 min。

1.2.6 碳源的改变对 *Snea253* 的影响

以高氏一号培养基的优化配方为基础, 固定其他成分, 分别加入 8 种不同的碳源: 可溶性淀粉、玉米粉、玉米淀粉、马铃薯淀粉、蔗糖、乳糖、葡萄糖、D(+)麦芽糖, 培养 *Snea253* 菌株, 28 °C 培养 5 d 后检测生防菌 *Snea253* 菌体中 *gabT* 基因的相对表达量、发酵液的杀线虫活性及 GABA 和琥珀酸的含量。

2 结果与分析

2.1 *gabT* 基因过表达结果

2.1.1 pIB139-*gabT* 过表达载体的构建

以野生型菌株 DNA 为模板, 进行 PCR 反应后得到片段大小约为 1 300 bp 的单一一条带(图 1A)。重组质粒 pGEM-*gabT* 经限制性内切酶 *Xba* I 和 *Nde* I 酶切后得到大小也为 1 300 bp 的目的条带(图 1B)。用限制性内切酶对 pIB139-*gabT* 质粒酶切鉴定, 得到大小为 1 300 bp 的片段(图 1C), 表明 pIB139-*gabT* 过表达载体构建成功。

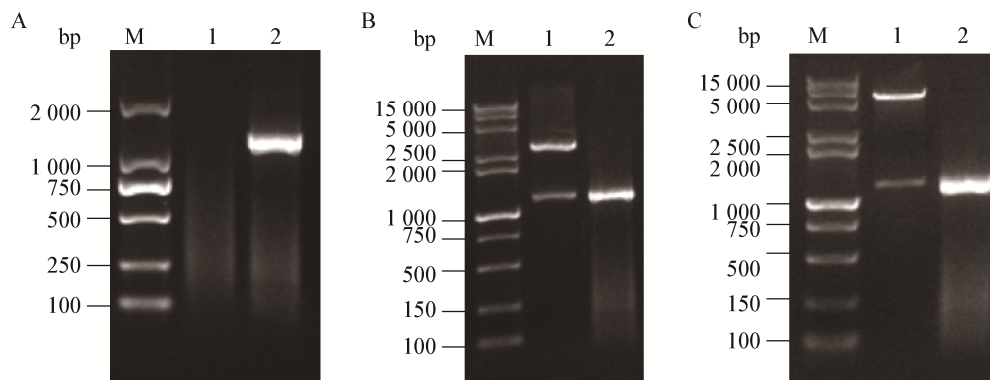


图 1 pIB139-*gabT* 的凝胶电泳分析

Figure 1 Electrophoretic analysis of pIB139-*gabT*

注: A: *gabT* 基因 PCR 产物; M: DL2000 DNA marker; 1: 空对照; 2: PCR 产物。B: 重组质粒 pGEM-*gabT* 双酶切鉴定; M: DL15000+2000 DNA marker; 1: 酶切产物; 2: PCR 产物。C: 重组质粒 pIB139-*gabT* 双酶切鉴定; M: DL15000+2000 DNA marker; 1: 双酶切产物; 2: PCR 产物。

Note: A: PCR products of *gabT* gene; M: DL2000 DNA marker; 1: Empty control; 2: PCR products. B: Verification of recombinant plasmid pGEM-*gabT* by double enzyme digestion; M: DL15000+2000 DNA marker; 1: Digest products; 2: PCR products. C: Verification of recombinant plasmid pIB139-*gabT* by double enzyme digestion; M: DL15000+2000 DNA marker; 1: Digest products; 2: PCR products.

2.1.2 过表达菌株 R-pIB139 中 *gabT* 基因的表达量检测

提取 R-pIB139 菌株的 RNA, 经 RT-qPCR 检测, 过表达菌株 R-pIB139 中 *gabT* 基因的表达量是弱毒株 Snea253-R 的 3.69 倍(图 2)。

2.1.3 Snea253-R 和 R-pIB139 中 GABA、琥珀酸含量检测

经不同浓度的琥珀酸(SA)处理南方根结线虫 J2, 观察线虫死亡情况。如图 3 所示, 在接种线虫 24 h 时, 琥珀酸的浓度在 50–2 000 $\mu\text{g/mL}$ 时线虫校正死亡率由 28.87% 逐渐升高到 84.30%; 在接种线

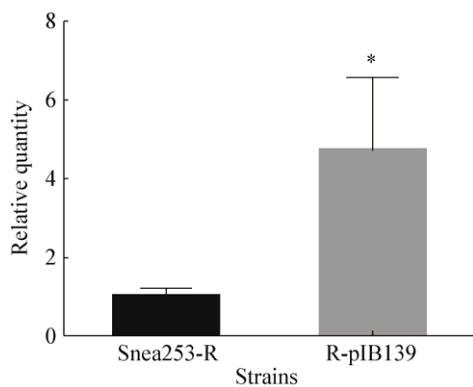


图 2 R-pIB139 中 *gabT* 基因相对表达量

Figure 2 Relative quantity level of *gabT* gene in R-pIB139

注: *表示经 *t* 检验在 $P < 0.05$ 水平差异显著。

Note: * indicate significant different at $P < 0.05$ level by *t* test.

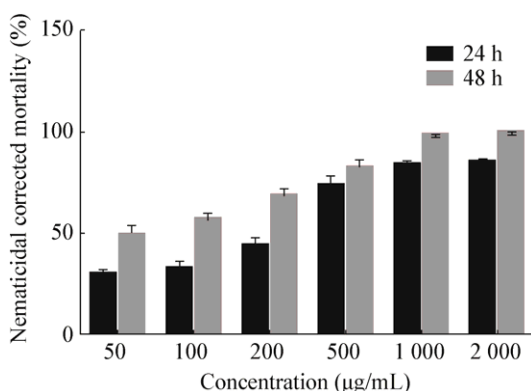


图 3 琥珀酸处理南方根结线虫 J2 的线虫校正死亡率

Figure 3 The corrected mortality of *Meloidogyne incognita* treated with SA

注: 不同浓度的琥珀酸处理南方根结线虫 J2 在 24、48 h 的线虫校正死亡率。

Note: The corrected mortality of *Meloidogyne incognita* J2 treated with different concentrations of SA at 24 h and 48 h.

虫 48 h 时, 琥珀酸的浓度在 50–2 000 $\mu\text{g/mL}$ 线虫校正死亡率由 48.23% 逐渐升高到 98.75%。试验结果表明琥珀酸对南方根结线虫 J2 有毒杀效果, 其毒杀线虫的效果随着浓度的增大和处理时间的延长而增强。

利用 GABA 试剂盒检测菌株 Snea253-R 和 R-pIB139 发酵液中 GABA 含量, Snea253-R 中 GABA 含量比过表达菌株 pIB139-*gabT* 中 GABA 含量高(图 4A)。用高效液相色谱法分别对菌株 Snea253-R 和 R-pIB139 中的琥珀酸含量进行检测, 色谱图如 4C、D。以进样浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得回归方程为 $Y = 0.3889X + 0.6714$ ($R^2 = 0.9998$), 琥珀酸标准品在浓度为 100–2 000 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与峰面积呈良好的线性关系。根据回归方程, 得到 Snea253-R 和 R-pIB139 中琥珀酸含量(图 4B), Snea253-R 中琥珀酸含量比 R-pIB139 中含量低。

2.1.4 过表达菌株 R-pIB139 杀线虫活性检测

南方根结线虫 J2 经 Snea253-R 和 R-pIB139 发酵滤液处理 24 h 时, R-pIB139 的线虫校正死亡率是 66.26%, 与线虫校正死亡率是 27.47% 的 Snea253-R 相比, 线虫校正死亡率提高了 39% (图 5)。结果表明, 过表达 *gabT* 基因能提高 Snea253 的杀线虫效果。

2.2 不同碳源对生防菌 Snea253 的影响

2.2.1 不同碳源对 *gabT* 基因表达量的影响

在优化高氏一号培养基中, 分别用马铃薯淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、麦芽糖、玉米粉、玉米淀粉和可溶性淀粉作为碳源培养生防菌 Snea253。如图 6 所示, 在可溶性淀粉和玉米淀粉作为培养基的碳源时, *gabT* 基因的表达量最高, 在马铃薯淀粉和葡萄糖作为培养基的碳源时 *gabT* 基因的表达量最低, 蔗糖、麦芽糖、玉米粉作为培养基的碳源时 *gabT* 基因的表达量差别较小。

2.2.2 发酵液中 GABA 和琥珀酸的含量检测

使用酶联免疫法对 GABA 含量进行检测, 如图 7 所示, 碳源为马铃薯淀粉、葡萄糖时的发酵液中 GABA 含量较高, 其浓度为 8.70 ng/mL 和 9.37 ng/mL; 碳源为玉米淀粉和可溶性淀粉时的发酵液中 GABA 的含量较低, 其浓度为 6.21 ng/mL 和 6.11 ng/mL。

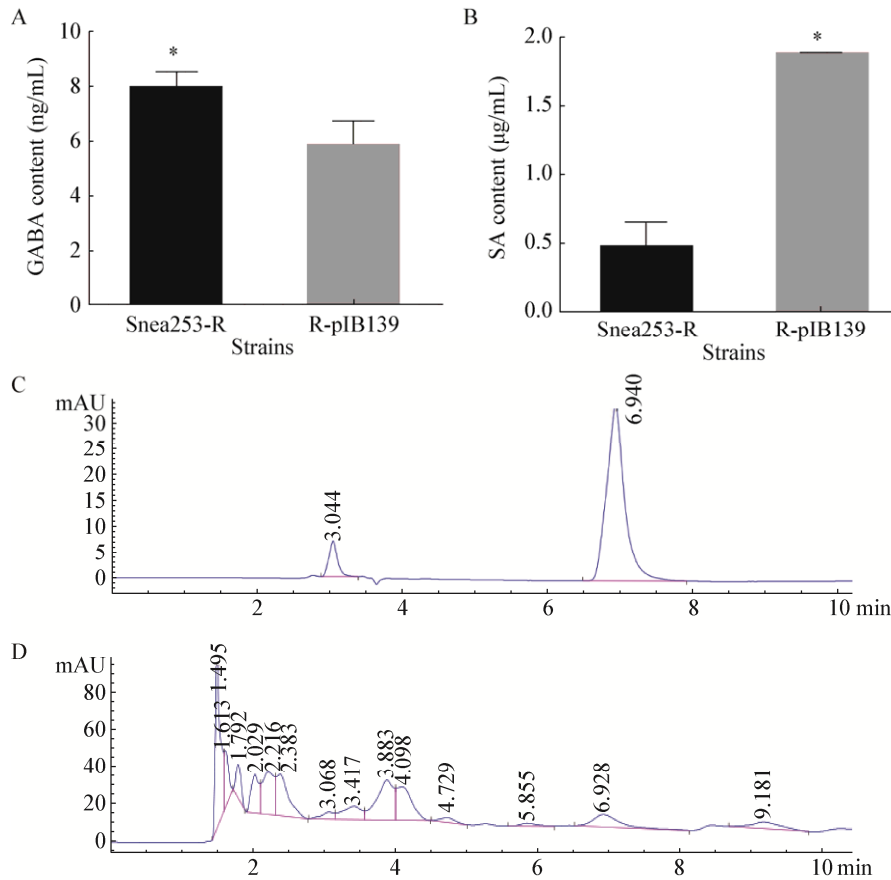


图 4 菌株 *Snea253-R* 和 *R-pIB139* 中 GABA 和琥珀酸含量

Figure 4 The GABA and SA content of *Snea253-R* and *R-pIB139* strains

注: A: 菌株 *Snea253-R* 和 *R-pIB139* 中 GABA 的含量; B: 菌株 *Snea253-R* 和 *R-pIB139* 中琥珀酸含量; C: 标准品 HPLC 色谱图; D: 试验样品 HPLC 色谱图. *: $P < 0.05$.

Note: A: The GABA content of *Snea253-R* and *R-pIB139*; B: The SA content of *Snea253-R* and *R-pIB139*; C: HPLC chromatograms of standard; D: HPLC chromatograms of SA sample. *: $P < 0.05$.

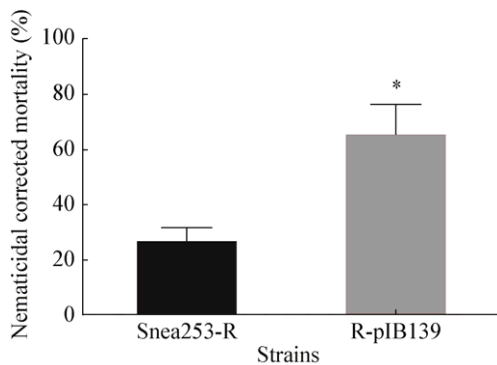


图 5 *Snea253-R* 和 *R-pIB139* 对南方根结线虫 *J2* 的毒力效果

Figure 5 Lethal effect of *Snea253-R* and *R-pIB139* on *J2* of *Meloidogyne incognita*

注: *表示经 t 检验在 $P < 0.05$ 水平差异显著.

Note: * Indicate significant different at $P < 0.05$ level by t test.

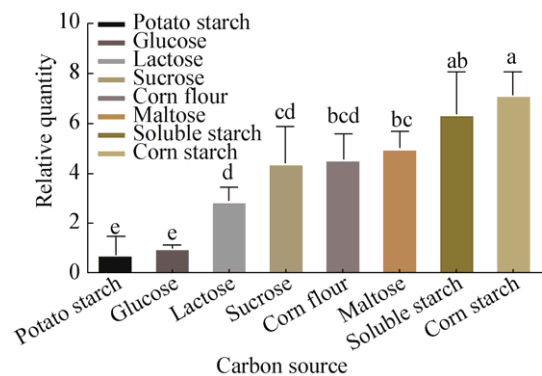


图 6 不同碳源对基因 *gabT* 相对表达量的影响

Figure 6 Effect on gene *gabT* relative quantity of different carbon source

注: 不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P < 0.05$ 水平差异显著.

Note: Different letters indicate significance at $P < 0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

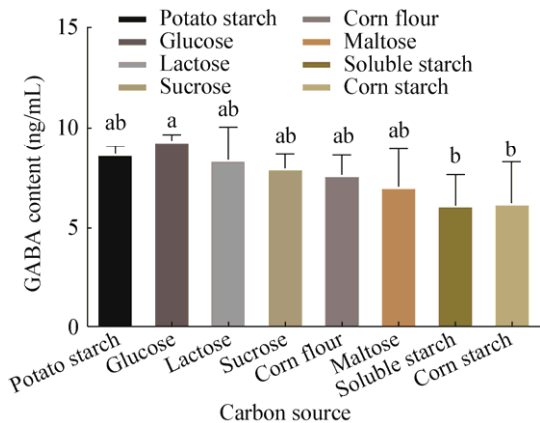


图 7 不同碳源下 Sneha253 中 GABA 的含量

Figure 7 GABA content of Sneha253 in different carbon source

注：不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P < 0.05$ 水平差异显著。

Note: Different letters indicate significance at $P < 0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

利用高效液相色谱法分别对不同碳源发酵液中的琥珀酸含量进行检测，以进样浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，得回归方程为 $Y = 0.3889X + 0.6714$ ($R^2 = 0.9998$)，琥珀酸标准品在浓度为 $100\text{--}2000\ \mu\text{g/mL}$ 范围内与峰面积呈良好的线性关系。琥珀酸标准品色谱图如图 4C 所示，不同碳源发酵液的琥珀酸色谱图谱如图 8 所示。可能是由于其他的代谢产物增多或者不同碳源培养基的发酵液颜色、pH 值等存在差异，导致干扰了琥珀酸的检测，也可能由于琥珀酸含量过低，进行了 2 次试验均未检测出琥珀酸。

2.2.3 不同碳源培养的 Sneha253 杀线虫活性检测

使用优化的高氏一号培养基培养菌株，不同碳源的发酵液中，碳源是可溶性淀粉和玉米淀粉培养的菌株发酵液杀线虫活性较高，线虫校正死亡率是

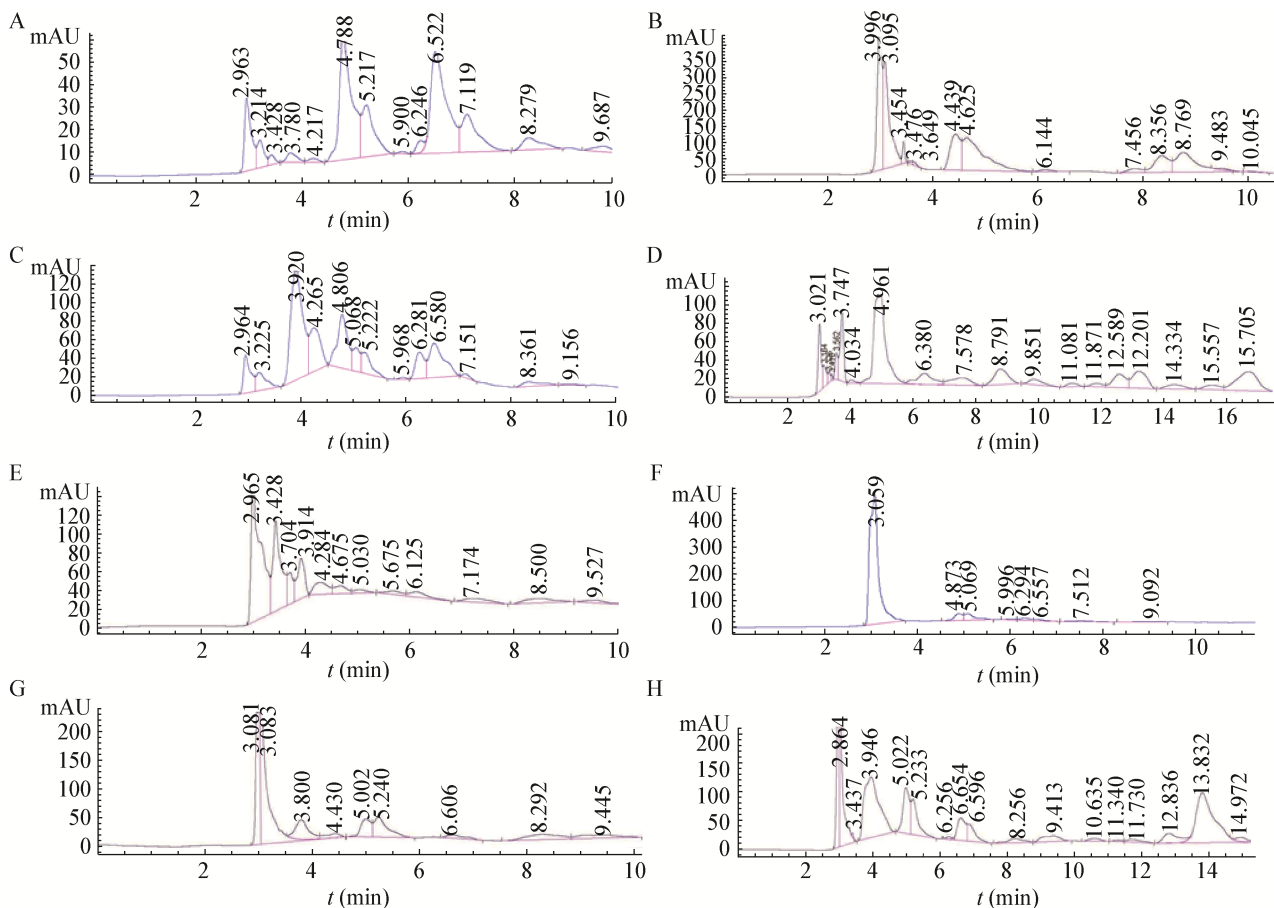


图 8 不同碳源发酵液中琥珀酸的 HPLC 色谱图

Figure 8 HPLC chromatograms of SA in different carbon source

Note: A: Potato starch; B: Glucose; C: Lactose; D: Sucrose; E: Corn flour; F: Maltose; G: Soluble starch; H: Corn starch.

84.8%和 79.98%，碳源是马铃薯淀粉、葡萄糖的菌株发酵液杀线虫活性较低，线虫校正死亡率为 25.97%和 33.27% (图 9)。

3 讨论与结论

γ -氨基丁酸转氨酶基因 *gabT* 是调控委内瑞拉链霉菌 *Snea253* 代谢 GABA 支路, 从而提高杀线虫活性的关键基因之一, GABA 支路下游代谢产物如琥珀酸等的合成影响了发酵液的杀线虫活性。同时, 不同的碳源改变也影响 *gabT* 基因的表达和其他代谢产物的合成从而影响菌株的杀线虫活性。

GABA 支路存在于动物、植物和微生物中, 并发挥重要作用。该途径的另一个尚未充分研究的作用是将 GABA 代谢与其生物活性和功能联系起来, 研究显示突变 *GABA-T* 基因降低了丁香假单胞菌的致病力^[22]。在植物中, Bao 等^[23]在番茄中沉默 *GABA-T* 基因, 导致番茄中 GABA 含量升高而琥珀酸含量下降, 增强了番茄的耐盐性; Xiong 等^[24]在蓝藻中敲除 *GABA-T* 和琥珀半醛脱氢酶基因减少了琥珀酸的产生。

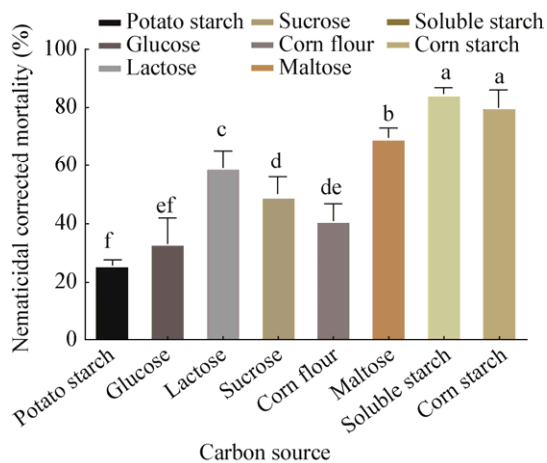


图 9 不同碳源培养条件下 *Snea253* 对南方根结线虫 J2 毒力效果

Figure 9 Lethal effect of *Snea253* on *Meloidogyne incognita* J2 in different carbon source

注: 不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P < 0.05$ 水平差异显著。

Note: Different letters indicate significance at $P < 0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

微生物中 GABA 支路碳氮代谢作用很多时候可作为 TCA 循环的替代途径提供琥珀酸^[25]。Kamzolova 等^[8]发现微生物来源的琥珀酸对植物寄生线虫具有毒杀作用。本研究发现, *gabT* 是存在于链霉菌中参与碳代谢的重要基因之一, 利用过表达 *gabT* 基因调控 GABA 支路, 代谢产物如琥珀酸的合成变化对 *Snea253* 杀线虫活性产生重要的影响: 过表达菌株 R-pIB139 中 GABA 含量降低而琥珀酸含量升高, 杀线虫活性也增强, 说明 GABA 途径确实影响了链霉菌的生物活性。

GABA 支路在微生物应对环境胁迫和致病性方面都产生着重要影响, 如在耐酸性^[26]、应激反应^[27]和细菌毒力^[28]等方面起作用。Renault 等^[17]研究显示 GABA-T 是拟南芥抗盐胁迫代谢调控 GABA 的关键节点。本试验也发现 *gabT* 基因的表达受到不同碳源的影响, 杀线虫活性随之改变。

gabT 基因调控 GABA 代谢支路影响了链霉菌 *Snea253* 杀线虫活性, 其中的 GABA 和琥珀酸都对线虫有一定的作用, 但委内瑞拉链霉菌的代谢产物比较复杂, 需进一步研究其他碳氮代谢相关基因及其代谢产物, 明确其杀线虫产物合成的机理, 为我国农林业生产中根结线虫病害的防治提供新的植保技术支持。

REFERENCES

- [1] Abad P, Favery B, Rosso MN, et al. Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2003, 4(4): 217-224
- [2] Zhao L, Duan YX, Bai CM, et al. Occurrence and control of vegetable root-knot nematodes under protected cultivation in Liaoning province[J]. *Plant Protection*, 2011, 37(1): 105-109 (in Chinese)
赵磊, 段玉玺, 白春明, 等. 辽宁省保护地蔬菜根结线虫发生规律及防治对策[J]. *植物保护*, 2011, 37(1): 105-109
- [3] Gong B, Zhang LL, Sui SL, et al. Effects of garlic straw application on controlling tomato root-knot nematode disease and rhizospheric microecology[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, 49(5): 933-941 (in Chinese)
巩彪, 张丽丽, 隋申利, 等. 大蒜秸秆对番茄根结线虫病及根际微生态的影响[J]. *中国农业科学*, 2016, 49(5): 933-941
- [4] Stadler M, Anke H, Sterner O. Linoleic acid — the nematicidal principle of several nematophagous fungi and its production in trap-forming submerged cultures[J]. *Archives of Microbiology*,

- 1993, 160(5): 401-405
- [5] Shemshura ON, Bekmakhanova NE, Mazunina MN, et al. Isolation and identification of nematode-antagonistic compounds from the fungus *Aspergillus candidus*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2016, 363(5): 1-9
- [6] Zuckerman BM, Matheny M, Acosta N. Control of plant-parasitic nematodes by a nematocidal strain of *Aspergillus niger*[J]. Journal of Chemical Ecology, 1994, 20(1): 33-43
- [7] Morgunov IG, Kamzolova SV, Dedyukhina EG, et al. Application of organic acids for plant protection against phytopathogens[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(3): 921-932
- [8] Kamzolova SV, Vinokurova NG, Shemshura ON, et al. The production of succinic acid by yeast *Yarrowia lipolytica* through a two-step process[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(18): 7959-7969
- [9] Botura MB, dos Santos JDG, da Silva GD, et al. *In vitro* ovicidal and larvicidal activity of *Agave sisalana* Perr. (Sisal) on gastrointestinal nematodes of goats[J]. Veterinary Parasitology, 2013, 192(1/3): 211-217
- [10] Dhakal R, Bajpai VK, Baek KH. Production of GABA (γ -Aminobutyric acid) by microorganisms: a review[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2012, 43(4): 1230-1241
- [11] Shelp BJ, Mullen RT, Waller JC. Compartmentation of GABA metabolism raises intriguing questions[J]. Trends in Plant Science, 2012, 17(2): 57-59
- [12] Shelp BJ, Bozzo GG, Trobacher CP, et al. Hypothesis/review: contribution of putrescine to 4-aminobutyrate (GABA) production in response to abiotic stress[J]. Plant Science, 2012, 193-194: 130-135
- [13] Scott EM, Jakoby WB. Soluble γ -aminobutyric-glutamic transaminase from *Pseudomonas fluorescens*[J]. Journal of Biological Chemistry, 1959, 234(4): 932-936
- [14] Shelp BJ, Bown AW, McLean MD. Metabolism and functions of γ -aminobutyric acid[J]. Trends in Plant Science, 1999, 4(11): 446-452
- [15] Zhou L, Shen BB, Bai SY, et al. RNA interference of *OsGABA-T1* gene expression induced GABA accumulation in rice grain[J]. Acta Agronomica Sinica, 2015, 41(9): 1305-1312 (in Chinese)
周露, 沈贝贝, 白苏阳, 等. 以 RNA 干扰 γ -氨基丁酸转氨酶 1 基因(*OsGABA-T1*)表达提高稻米 γ -氨基丁酸(GABA)含量[J]. 作物学报, 2015, 41(9): 1305-1312
- [16] Simpson JP, Clark SM, Portt A, et al. γ -Aminobutyrate transaminase limits the catabolism of γ -aminobutyrate in cold-stressed *Arabidopsis* plants: insights from an overexpression mutant[J]. Botany, 2010, 88(5): 522-527
- [17] Renault H. Fiat lux!: phylogeny and bioinformatics shed light on GABA functions in plants[J]. Plant Signaling & Behavior, 2013, 8(6): e24274
- [18] Renault H, El Amrani A, Berger A, et al. γ -Aminobutyric acid transaminase deficiency impairs central carbon metabolism and leads to cell wall defects during salt stress in *Arabidopsis* roots[J]. Plant, Cell & Environment, 2013, 36(5): 1009-1018
- [19] Renault H, Roussel V, El Amrani A, et al. The *Arabidopsis pop2-1* mutant reveals the involvement of GABA transaminase in salt stress tolerance[J]. BMC Plant Biology, 2010, 10: 20
- [20] Chen LJ, Chen JS, Zheng YN, et al. Identification of actinomycetes strain Snea253 and its activity against soybean cyst nematode[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2009, 25(1): 66-69 (in Chinese)
陈立杰, 陈井生, 郑雅楠, 等. 放线菌 Snea253 的鉴定及对大豆胞囊线虫的抑制作用[J]. 中国生物防治, 2009, 25(1): 66-69
- [21] Tian CL, Zhu F, Chen JS, et al. Variance analysis of *Streptomyces venezuelae* Snea253 mutants against *Meloidogyne incognita*[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2014, 28(9): 1541-1548 (in Chinese)
田成丽, 朱峰, 陈井生, 等. 链霉菌 Snea253 菌株的变异分析及对根结线虫活性影响[J]. 核农学报, 2014, 28(9): 1541-1548
- [22] Tian J, Bryk R, Itoh M, et al. Variant tricarboxylic acid cycle in *Mycobacterium tuberculosis*: identification of α -ketoglutarate decarboxylase[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(30): 10670-10675
- [23] Bao H, Chen XY, Lv SL, et al. Virus-induced gene silencing reveals control of reactive oxygen species accumulation and salt tolerance in tomato by γ -aminobutyric acid metabolic pathway[J]. Plant, Cell & Environment, 2015, 38(3): 600-613
- [24] Xiong W, Brune D, Vermaas WFI. The γ -aminobutyric acid shunt contributes to closing the tricarboxylic acid cycle in *Synechocystis* sp. PCC 6803[J]. Molecular Microbiology, 2014, 93(4): 786-796
- [25] Feehily C, Karatzas KAG. Role of glutamate metabolism in bacterial responses towards acid and other stresses[J]. Journal of Applied Microbiology, 2013, 114(1): 11-24
- [26] Feehily C, O'Byrne CP, Karatzas KAG. Functional γ -aminobutyrate shunt in *Listeria monocytogenes*: role in acid tolerance and succinate biosynthesis[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(1): 74-80
- [27] Metzner M, Germer J, Hengge R. Multiple stress signal integration in the regulation of the complex σ^S -dependent *csiD-ygaF-gabDTP* operon in *Escherichia coli*[J]. Molecular Microbiology, 2004, 51(3): 799-811
- [28] Chevrot R, Rosen R, Haudecoeur E, et al. GABA controls the level of quorum-sensing signal in *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(19): 7460-7464