

研究报告

荧光假单胞菌 CLW17 菌株 *pqqE* 和 *GDH* 基因的功能刘艳^{1,2}, 曹永清^{1,2}, 孟静^{1,2}, 晋婷婷², 任嘉红^{*2}

1 山西师范大学生命科学学院, 山西 临汾 041000

2 长治学院生命科学系, 山西 长治 046011

刘艳, 曹永清, 孟静, 晋婷婷, 任嘉红. 荧光假单胞菌 CLW17 菌株 *pqqE* 和 *GDH* 基因的功能[J]. 微生物学通报, 2022, 49(2): 529-544

Liu Yan, Cao Yongqing, Meng Jing, Jin Tingting, Ren Jiahong. Functional analysis of *pqqE* and *GDH* genes in *Pseudomonas fluorescens* CLW17 strain[J]. Microbiology China, 2022, 49(2): 529-544

摘 要:【背景】磷是植物生长所必需的大量元素, 但绝大多数不能被植物吸收利用。然而溶磷微生物能够分泌有机酸来溶解土壤中难溶性磷, 提高土壤中磷的利用率, 促进植物生长, 提高作物的产量和品质。【目的】探究高效解磷荧光假单胞菌 CLW17 菌株的 *pqqE* 和 *GDH* 基因的生理学功能。【方法】利用生物在线软件对 2 个基因编码蛋白进行生物信息学分析。利用同源重组技术分别获得 *pqqE* 和 *GDH* 基因缺失突变株(CLW17 Δ *pqqE*, CLW17 Δ *GDH*), 并使用接合转移的方式获得回补菌株(Δ *pqqE*/*pqqE*, Δ *GDH*/*GDH*)。分别采用 NBRIP 培养基、钼锑抗比色法及高压液相色谱法(HPLC)对野生型、突变株及互补株的溶磷及产有机酸能力进行检测。【结果】*pqqE* 和 *GDH* 基因编码氨基酸数目分别为 390 和 803, 均无信号肽。*pqqE* 无跨膜结构域, 而 *GDH* 预测有 5 个跨膜结构域。*pqqE* 和 *GDH* 基因是 CLW17 菌株的溶磷相关基因, 2 个基因的缺失均使该菌株的溶磷能力显著下降, 而回补株可以恢复溶磷能力。CLW17 野生株能分泌多种有机酸, 其中葡萄糖酸(gluconic acid, GA)含量最多, 其次是乙酸; 但敲除株产有机酸的能力明显降低, 尤其是产 GA 能力与空白培养基对照相差甚微, 而且无乙酸产生。【结论】*pqqE* 和 *GDH* 基因是 CLW17 溶磷能力发挥的关键基因, 该菌株溶磷能力与产有机酸尤其是产 GA 和乙酸密切相关。本研究为进一步研究该菌株与南方红豆杉的互作和溶磷机制奠定了基础。

关键词: 荧光假单胞菌; 溶磷基因; 基因敲除; 同源重组; 南方红豆杉

基金项目: 国家自然科学基金(31100471); 山西省“1331 工程”资助项目

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31100471); The Fund for Shanxi Province“1331 Project”

*Corresponding author: E-mail: renjiahong@163.com

Received: 2021-08-05; Accepted: 2021-09-13; Published online: 2021-10-28

Functional analysis of *pqqE* and *GDH* genes in *Pseudomonas fluorescens* CLW17 strain

LIU Yan^{1,2}, CAO Yongqing^{1,2}, MENG Jing^{1,2}, JIN Tingting², REN Jiahong^{*2}

1 School of Life Science, Shanxi Normal University, Linfen 041000, Shanxi, China

2 Department of Life Science, Changzhi College, Changzhi 046011, Shanxi, China

Abstract: [Background] Phosphorus is a macronutrient for plant growth, but most of it cannot be absorbed by plants. Phosphate-solubilizing microorganism (PSM) can secrete organic acids to dissolve the insoluble soil phosphates, improve plant growth, crop yield and quality by increasing phosphorus utilization. [Objective] The research aims to study the physiological functions of *pqqE* and *GDH* genes in the *Pseudomonas fluorescens* CLW17 strain. [Methods] Bioinformatics analyses have been done for two gene encoding proteins using bioinformatics software. We obtain two deletion mutant strains (CLW17 Δ *pqqE* and CLW17 Δ *GDH*) of *pqqE* and *GDH* gene by homologous recombination technology, and the corresponding supplementary strains (Δ *pqqE*/*pqqE* and Δ *GDH*/*GDH*) were obtained using the combined transfer method. The phosphate solubilizing abilities and organic acid production abilities of wild-type, mutant strains, and complementary strains were detected by NBRIP medium, molybdenum anti colorimetry method, and high-pressure liquid chromatography (HPLC) method, respectively. [Results] The numbers of amino acids encoded by *pqqE* and *GDH* genes were 390 and 803, respectively. There is no signal peptide for both genes. *pqqE* had no transmembrane domain, while *GDH* predicted five transmembrane domains. The *pqqE* and *GDH* genes are the phosphate-solubilizing genes of the CLW17 strain, and the deletion of the two genes greatly reduces the phosphate-solubilizing ability of this strain, moreover, the complementary strains of these two genes can restore the phosphate-solubilizing ability. Wild strain CLW17 can secrete a variety of organic acids, among which gluconic acid content is the highest, followed by acetic acid. The ability to produce organic acids in the knocked-out strain was greatly reduced, especially the ability to produce gluconic acid and acetic acid. [Conclusion] The *pqqE* and *GDH* genes are the key genes for the phosphate solubilization of the CLW17 strain, the phosphate solubilization ability of the strain is closely related to the production of organic acids, especially gluconic acid and acetic acid. This study laid the foundation for further study on the interaction and phosphorus solubilization mechanism between the strain and *Taxus chinensis* var. *mairei*.

Keywords: *Pseudomonas fluorescens*; phosphate-solubilizing gene; gene knockout; homologous recombination; *Taxus chinensis* var. *mairei*

磷(phosphorus)是植物生长所必需的营养元素之一,在植物生长发育的各个方面都起着至关重要的作用^[1]。在土壤中,磷以有机化合物和无机化合物的形式存在,其中大多数都不能被植物利用,导致植物因缺磷而阻碍生长发育。在土壤中分布有大量具有很强溶磷能力的微生物,能够

将植物难以吸收的磷转化为可利用的形态,人们把具有这种能力的微生物称为溶磷微生物(phosphate-solubilizing microorganism, PSM)^[2]。PSM的种类繁多,不同微生物的溶磷方式不一样。目前已报道的不少溶磷细菌菌株的溶磷机制被认为是主要是葡萄糖酸(gluconic acid, GA)的分泌^[3]。

其中, 溶磷细菌分泌的主要 GA 来自细菌葡萄糖氧化作用的第一步, 需要葡萄糖脱氢酶(glucose dehydrogenase, GDH)催化, 而 GDH 通常需要辅助因子才能催化 GA 的生成, 目前在多个属细菌中发现吡咯喹啉醌(pyrroloquinoline quinone, PQQ)作为 GDH 的氧化辅助因子^[4]。截至目前所报道的产 GDH 细菌菌株的 *pqq* 突变体往往丧失分泌 GA 的能力^[5]。以 PQQ 为辅酶的醌蛋白葡萄糖脱氢酶与 PQQ 结合成具有活性的全酶后便能催化葡萄糖生成 GA。微生物的 PQQ 合成相关基因往往以基因簇的形式存在, 不同来源的 *pqq* 基因数目不同^[6]。目前报道的产 PQQ 细菌均具有 *pqqA*、*pqqB*、*pqqC*、*pqqD*、*pqqE* 和 *pqqF* 这 6 个基因簇^[7-8], 在一些细菌如荧光假单胞菌 B16 中还有 *pqqG*、*pqqH*、*pqqI*、*pqqJ*、*pqqK* 和 *pqqM* 基因^[9]。其中, *pqqE* 对 PQQ 的生物合成至关重要^[10]。

荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) CLW17 是分离自南方红豆杉根际的一株高效溶磷细菌, 该菌株具有产生长素、嗜铁素及固氮、解钾、溶解无机磷等促生长特性, 对南方红豆杉有明显的促生长作用^[11]。前期实验结果表明, CLW17 菌株有较强的溶无机磷能力, 但其溶磷机

制尚未见报道。目前该菌株已完成全基因组测序和注释, 通过基因组注释分析, CLW17 菌株中具有 *GDH* 和 *pqqE* 基因。鉴于此, 本研究对 CLW17 菌株 *GDH* 和 *pqqE* 基因的功能进行研究, 以期揭示 CLW17 菌株的溶磷促生机制奠定基础, 并为构建更有效的植物根际促生菌(plant growth promoting rhizobacteria, PGPR)提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株和质粒

本实验所采用的菌株及质粒如表 1 所示。

1.1.2 主要试剂和仪器

感受态制备试剂盒, 宝生物工程(大连)有限公司; 质粒提取试剂盒、酶切产物纯化试剂盒以及胶回收试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; 限制性内切酶 *Bam*H I-HF, *Eco*R I-HF, *Hind* III-HF, *Nhe* I-HF 和 *Spe* I-HF, 北京 NEB 公司; 庆大霉素、氨苄青霉素, 上海 Sigma 公司。

高效液相色谱仪, 安捷伦科技有限公司; PCR 仪, Eppendorf 公司; 凝胶成像仪, Bio-Rad 公司; 恒温培养箱, 上海一恒科学有限公司; 紫

表 1 本实验中使用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this experiment

Strains or plasmids	Description	Reference or source
Strains		
<i>Pseudomonas fluorescens</i> CLW17	Wild-type isolated from rhizosphere of <i>Taxus chinensis</i> var. <i>mairei</i>	Lab collection
CLW17Δ <i>pqqE</i>	<i>pqqE</i> in-frame deletion in CLW17	This study
CLW17Δ <i>GDH</i>	<i>GDH</i> in-frame deletion in CLW17	This study
Δ <i>pqqE</i> / <i>pqqE</i>	CLW17Δ <i>pqqE</i> complementation	This study
Δ <i>GDH</i> / <i>GDH</i>	CLW17Δ <i>GDH</i> complementation	This study
<i>Escherichia coli</i> S17-1	<i>recA</i> , <i>thi</i> , <i>pro</i> , RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7	Lab collection
Plasmids		
pEX18Gm	Suicide vector, <i>sacB</i> , Gm ^R	Lab collection
pJN105	Replenishment vector, Gm ^R	Gift from University of Washington
S17-1/pEx18Gm- <i>pqqE</i>	pEx18Gm containing <i>pqqE</i> upstream and downstream, Gm ^R	This study
S17-1/pEx18Gm- <i>GDH</i>	pEx18Gm containing <i>GDH</i> upstream and downstream, Gm ^R	This study
S17-1/pJN105- <i>pqqE</i>	pJN105 containing <i>pqqE</i> , Gm ^R	This study
S17-1/pJN105- <i>GDH</i>	pJN105 containing <i>GDH</i> , Gm ^R	This study

外/可见分光光度计,上海美谱达仪器有限公司。

1.1.3 培养基

LB: 胰蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, NaCl 10 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0–7.5。

NA: 牛肉膏 3 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0–7.2, 琼脂 18–20 g。

NB: 无琼脂的 NA。

LAS: 胰蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, 15% 蔗糖, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0–7.5。

NBRIP: 葡萄糖 10 g, 磷酸三钙 5 g, MgCl₂ 5 g, KCl 0.2 g, 七水硫酸镁 0.25 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析

利用 ProtParam、SignalP 5.0、TMHMM、SOPMA、Motif Scan 和 Conserved Domains 等在线分析软件,分析荧光假单胞菌 CLW17 菌株中 *pqqE* 和 *GDH* 基因编码蛋白的性质,同时使用 MEGA 7.0 对其编码蛋白进行系统发育树的构建。

1.2.2 菌株抗生素敏感性测试

取荧光假单胞菌 CLW17 野生菌株菌悬液 (10^8 CFU/mL)各 100 μ L,分别涂布于含常用抗生素的 LB 固体培养基上,并倒置于 30 $^{\circ}$ C 恒温培养箱 24–36 h 后,观察其生长状况,以确定该菌株对不同抗生素的敏感性。

1.2.3 敲除载体的构建

以 CLW17 菌株的基因组 DNA 为模板,采用表 2 中的 CLW17_*DpqqE*_FW/CLW17_*DelpqqE*_FW、CLW17_*DpqqE*_RV/CLW17_*DelpqqE*_RV、CLW17_*DGDH*_FW/CLW17_*DelGDH*_FW、CLW17_*DGDH*_RV/CLW17_*DelGDH*_RV 引物对,运用表 3 的 PCR 反应体系,通过 PCR 反应条件(94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 50 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min)扩增 *pqqE* 和 *GDH* 基因上、下游同源臂片段;采用表 2 的 CLW17_*DpqqE*_FW/CLW17_*DpqqE*_RV、CLW17_*DGDH*_FW/CLW17_*DGDH*_RV 引物对,利用 Overlap PCR 技术将上、下游片段连接在一起,用 *Hind* III-HF

表 2 研究中使用的引物

Table 2 Primers used in this study

Primer name	Sequence (5'→3')
CLW17_ <i>DpqqE</i> _FW	GGCAAGCTTAGGCTACGAATATTTCCGCA
CLW17_ <i>DelpqqE</i> _FW	AAAGGCTCAGCCTTTGGCGATCGATGACTCAGGCAAGTTCTGA
CLW17_ <i>DpqqE</i> _RV	CGCGGATCCCGGAAAATCCTTTCTCGGAG
CLW17_ <i>DelpqqE</i> _RV	TCGAACTTGCTGAGTCATCGATCGCCAAAGGCTGAGCCTTT
CLW17_ <i>DpqqE</i> _SQFW	GATCCGGATCAATTGCGTTCCCAAGAACTG
CLW17_ <i>DpqqE</i> _SQRV	CTAGCTAACGGTTGCAAACCATTTGCCGAC
CLW17_Comp <i>DpqqE</i> _FW	CCGGAATTCTCATGGAGGTTGCCCATGC
CLW17_Comp <i>DpqqE</i> _RV	CGGACTAGTTCAGCCTTTGGCGATGAGGC
CLW17_ <i>DGDH</i> _FW	CCCAAGCTTGAACCTATTACGGCGTGACG
CLW17_ <i>DelGDH</i> _FW	GCCGCCGGCGGTGACGATCGAGGCGTACAGGCCCAATGCCGC
CLW17_ <i>DGDH</i> _RV	CCGGAATTCTGGTCGACCAGGGAATGGATAC
CLW17_ <i>DelGDH</i> _RV	GCGGCATTGGGCTGTACGCTCGATCGTACCGCCGGCGGC
CLW17_ <i>DGDH</i> _SQFW	ATCGACAACCTACGTCCAGGCCAGTCTGGT
CLW17_ <i>DGDH</i> _SQRV	TCTTTGAATCGGCGGATTTCGTAGGGTGAG
CLW17_Comp <i>DGDH</i> _FW	CTAGCTAGCACGGAGAACCACACTATGAG
CLW17_Comp <i>DGDH</i> _RV	CGGACTAGTTTATTCGGCAGTTTGTACG
M13_FW	TGTAACACGACGGCCAGT
M13_RV	CAGGAAACAGCTATGACC

表 3 Q5 polymerase PCR 反应体系

Table 3 Q5 polymerase PCR reaction system

Component	Volume (μL)
5×Q5 Reaction Buffer	10.0 μL
10 μmol/L dNTP Mix	1.0 μL
10 μmol/L primer FW	2.5 μL
10 μmol/L primer RV	2.5 μL
Template DNA	Variable
Q5 Polymerase (2 U/μL)	0.5 μL
H ₂ O	To 50.0 μL

和 *Bam*H I-HF 对 *pqqE* 基因重叠片段和质粒 pEX18Gm 进行双酶切, 用 *Hind* III-HF 和 *Eco*R I-HF 对 *GDH* 基因重叠片段和质粒 pEX18Gm 进行双酶切, 将片段和载体连接转化进大肠杆菌感受态中, 通过筛选得到敲除载体。将该载体命名为 S17-1/pEX18Gm-*pqqE* 和 S17-1/pEX18Gm-*GDH*。

1.2.4 敲除株的构建

将敲除载体 S17-1/pEX18Gm-*pqqE* 和 S17-1/pEX18Gm-*GDH* 分别与 CLW17 野生型菌株进行接合转移: 取 0.5 mL 供体菌, 9 000 r/min 离心 3 min 收集菌体, 用 LB 重悬 2 次, 收集菌体。取 0.5 mL 受体菌株, 9 000 r/min 离心 3 min, 弃上清, 用 50 μL LB 重悬。将受体菌与供体菌混合并全部转移至不含抗生素的 LB 平板中, 30 °C 培养过夜。通过菌落 PCR 验证筛选单交换阳性克隆株, 将验证正确的单交换阳性克隆划线在 LAS 平板中发生同源重组, 利用 15% 蔗糖平板筛选出不含 *sacB* 基因的重组子, 分别使用 CLW17_*DpqqE*_FW/CLW17_*DpqqE*_RV 和 CLW17_*DGDH*_FW/CLW17_*DGDH*_RV 引物对进行 PCR 验证, 将验证正确的单菌落使用 CLW17_*DpqqE*_SQFW/CLW17_*DpqqE*_SQRV 和 CLW17_*DGDH*_SQFW/CLW17_*DGDH*_SQRV 引物对进行 PCR 验证, 将验证正确的单菌落送去测序, 测序正确的突变体命名为 $\Delta pqqE$ 和 ΔGDH 。

1.2.5 回补株的构建

以 CLW17 为模板, 分别采用 CLW17_Comp

*DpqqE*_FW/CLW17_Comp*DpqqE*_RV 和 CLW17_Comp*DGDH*_FW/CLW17_Comp*DGDH*_RV 引物对扩增 *pqqE* 和 *GDH* 基因。使用 *Eco*R I-HF/*Spe* I-HF 和 *Nhe* I-HF/*Spe* I-HF 对胶回收后的产物和载体 pJN105 分别进行双酶切, 并使用 T4 DNA ligase 进行连接。将连接产物通过热转法转入到大肠杆菌 S17-1 感受态细胞中, 37 °C 培养过夜。挑选单克隆进行菌落 PCR 验证, 将验证正确的单克隆送去测序。将测序正确的回补载体命名为 S17-1/pJN105-*pqqE* 和 S17-1/pJN105-*GDH*。

将回补载体 S17-1/pJN105-*pqqE* 和 S17-1/pJN105-*GDH* 通过接合转移的方法分别转入 $\Delta pqqE$ 和 ΔGDH 菌株中, 即可得到回补株 $\Delta pqqE/pqqE$ 和 $\Delta GDH/GDH$, 采用引物 M13-FW 和 M13-RV 对回补株进行 PCR 电泳检测。

1.2.6 溶磷能力的检测

(1) 溶磷圈的检测: 用接种针将 CLW17 的野生菌株、 $\Delta pqqE$ 、 ΔGDH 、 $\Delta pqqE/pqqE$ 和 $\Delta GDH/GDH$ 菌株点接于 NBRIP 固体培养基平板^[12]上, 30 °C 恒温培养箱中培养 7 d 后, 观察菌落周围是否产生透明圈。

(2) 可溶性磷含量的测定: 将野生菌株 CLW17、 $\Delta pqqE$ 、 ΔGDH 、 $\Delta pqqE/pqqE$ 和 $\Delta GDH/GDH$ 菌株在 NA 培养基中活化, 30 °C、180 r/min 培养过夜, 后分别接种于 NB 培养基, 30 °C、180 r/min 振荡培养 18–24 h 制成种子液, 取 0.5 mL 种子液接种于含 50 mL NBRIP 培养液的 100 mL 三角瓶中, 以接 0.5 mL 空白种子液的 NBRIP 培养基为对照, 每个处理 3 个重复。30 °C、180 r/min 振荡培养 4 d 后, 收集发酵液于 4 °C、12 857×g 离心 10 min, 取上清液, 采用钼锑抗比色法测定上清液的有效磷含量。

1.2.7 产有机酸测定

将荧光假单胞菌 CLW17 的野生株、*GDH* 及 *pqqE* 基因敲除株分别接种于牛肉膏蛋白胨培养

基, 28 °C、180 r/min 培养 18–24 h 制成种子液, 按 1%接种量接入 NBRIP 培养基中, 以不接菌的培养基为对照, 30 °C、180 r/min 振荡培养 72 h 后, 6 000 r/min 离心 30 min 收集发酵液, 取 5 mL 发酵液上清液用 0.22 μm 孔径滤膜过滤, 采用高效液相色谱仪测定有机酸的种类和含量。色谱条件为: 色谱柱为菲罗门 C18 柱, 缓冲液为 0.05 mol/L 磷酸二氢钾 (pH 2.0–3.0), 柱温为 30 °C, 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 214 nm。

2 结果与分析

2.1 *pqqE* 和 *GDH* 基因及其编码蛋白的生物信息学分析

2.1.1 理化性质分析

使用 ProtParam 在线软件对 *pqqE* 和 *GDH* 基

因进行在线分析, 结果如表 4 所示, *pqqE* 基因的开放阅读框为 1 188 bp, 编码的蛋白理论分子质量为 44.03 kDa, pI 为 6.04, 平均亲水指数为 -0.391, 脂溶指数是 78.10, 分子式为 $\text{C}_{1949}\text{H}_{3035}\text{N}_{549}\text{O}_{575}\text{S}_{21}$, 不稳定指数 (PI) 为 36.59, 为稳定蛋白; *GDH* 基因的开放阅读框为 2 427 bp, 编码的蛋白理论分子质量为 86.35 kDa, pI 为 6.13, 平均亲水指数为 -0.079, 脂溶指数是 85.54, 分子式 $\text{C}_{3879}\text{H}_{6046}\text{N}_{1034}\text{O}_{1137}\text{S}_{31}$, 不稳定指数 (PI) 为 35.14, 为稳定蛋白。

2.1.2 信号肽预测

使用 SignalP 5.0 在线软件对 *pqqE* 和 *GDH* 编码蛋白进行信号肽的预测, 结果如图 1、图 2 所示, 2 个基因的编码蛋白 *pqqE* 和 *GDH* 均无信号肽。

表 4 CLW17 菌株溶磷基因的基本理化性质分析

Table 4 Basic physicochemical properties of CLW17 phosphate-solubilizing gene

Gene name	Gene length (bp)	Theoretical relative molecular mass (kDa)	Theoretical isoelectric point (pI)	Instability index (PI)	Average hydrophilic index	Lipolysis index	Molecular formula
<i>pqqE</i>	1 188	44.03	6.04	36.59	-0.391	78.10	$\text{C}_{1949}\text{H}_{3035}\text{N}_{549}\text{O}_{575}\text{S}_{21}$
<i>GDH</i>	2 427	86.35	6.13	35.14	-0.079	85.54	$\text{C}_{3879}\text{H}_{6046}\text{N}_{1034}\text{O}_{1137}\text{S}_{31}$

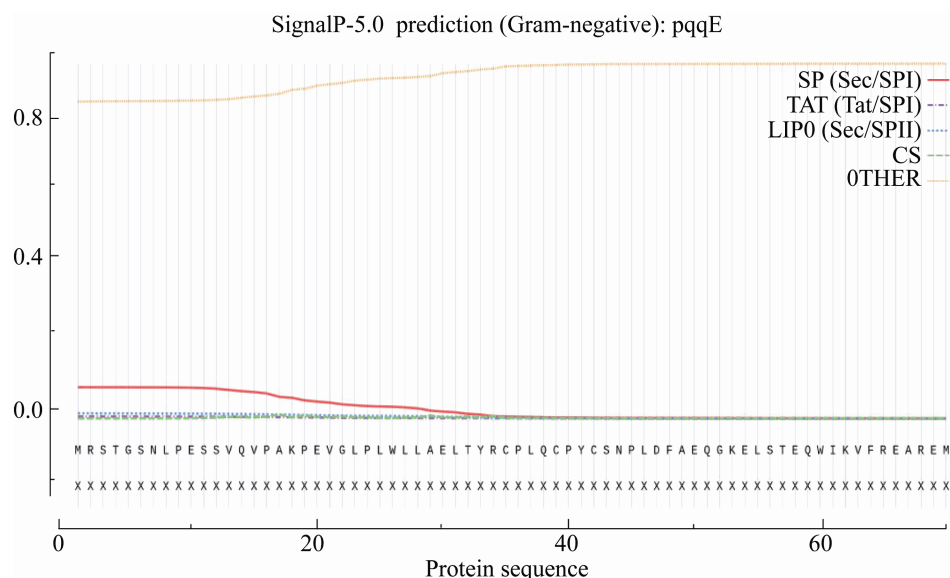


图 1 *pqqE* 蛋白信号肽预测

Figure 1 Signal peptide prediction of *pqqE* protein.

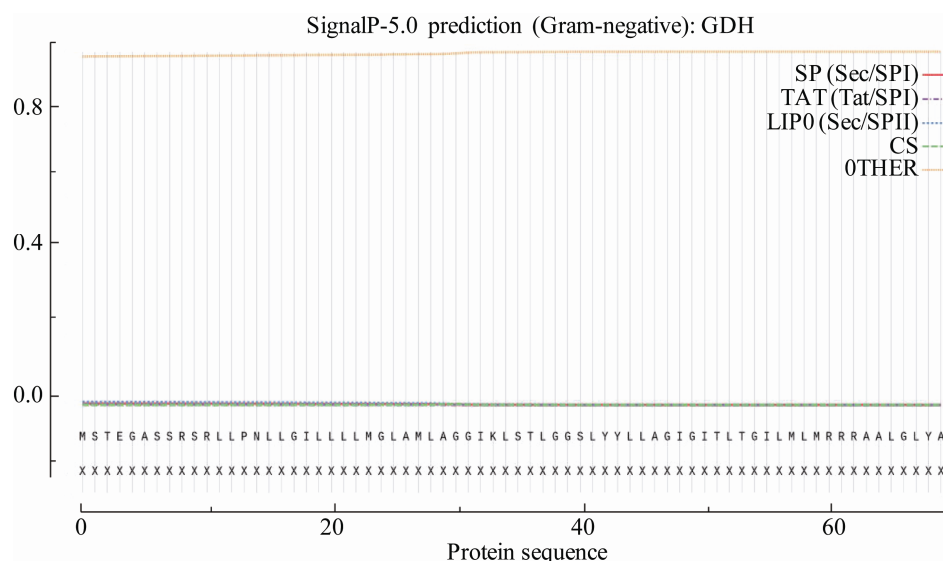


图2 GDH 蛋白信号肽预测

Figure 2 Signal peptide prediction of GDH protein.

2.1.3 跨膜结构域预测

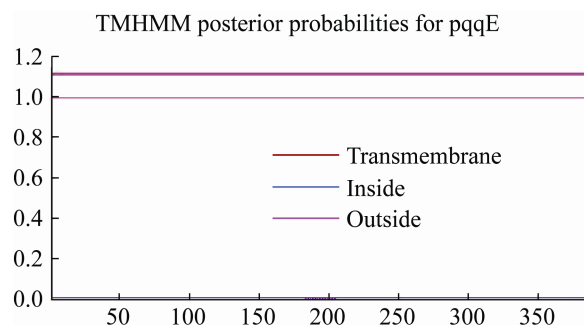
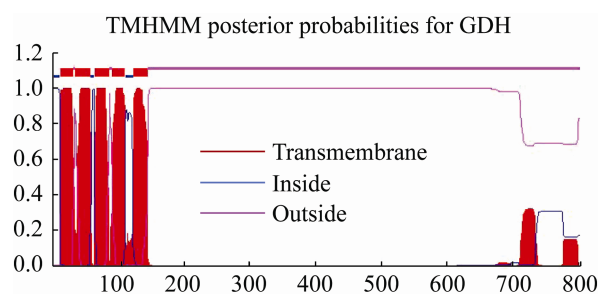
使用 TMHMM 在线软件对 *pqqE* 和 *GDH* 蛋白进行分析, 结果如图 3、图 4 所示, *pqqE* 蛋白无跨膜结构域, 是一种外膜蛋白; *GDH* 蛋白预测拥有 5 个跨膜结构域, 为跨膜蛋白。

2.1.4 蛋白质二级结构分析与预测

使用 SOPMA 在线软件对 *pqqE* 和 *GDH* 蛋白进行分析与预测, 结果如图 5、图 6 所示, *pqqE* 和 *GDH* 蛋白均含有 α -螺旋、 β -链、 β -折叠和无规则卷曲, 在 *pqqE* 蛋白中分别占 40.0%、39.0%、3.9%和 46.1%; 在 *GDH* 蛋白中分别占 18.6%、22.2%、8.1%和 51.2%。

2.1.5 蛋白功能结构域分析

运用 Motif Scan 在线软件对 *pqqE* 和 *GDH* 蛋白进行分析, 结果表明: *pqqE* 蛋白中酪蛋白激酶 II 磷酸化位点为 78–81、321–324、344–347、351–354, N-肉豆蔻酰化位点为 108–113、144–149、212–217、330–335, 蛋白酶 K 磷酸化位点为 32–34、145–147、172–174; *GDH* 蛋白中, N-糖基化位点为 374–377、701–704, 蛋白激酶磷酸化位点为 646–649, 酪蛋白激酶 II 磷酸

图3 *pqqE* 蛋白跨膜结构预测Figure 3 Prediction across membrane region of *pqqE* protein.图4 *GDH* 蛋白跨膜结构预测Figure 4 Prediction across membrane region of *GDH* protein.

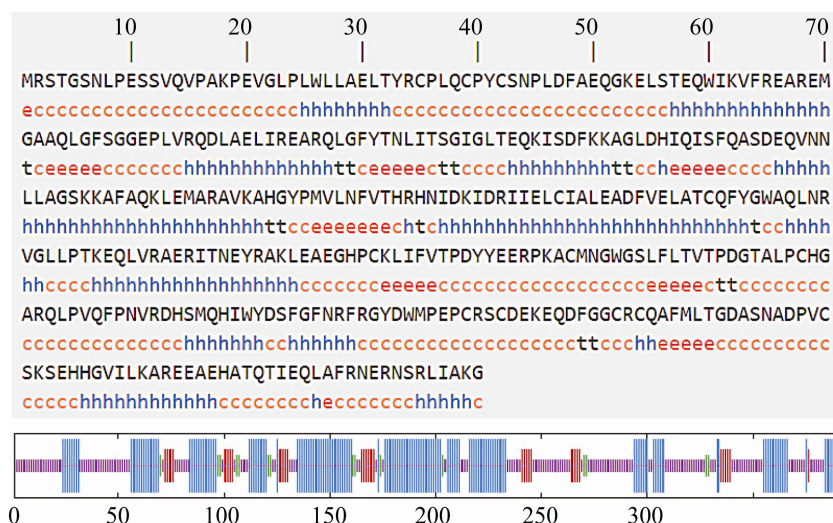


图 5 pqqE 蛋白二级结构分析 h: α -螺旋; e: β -链; t: β -折叠; c: 无规则卷曲

Figure 5 Secondary structure analysis of pqqE protein. h: α -helix; e: β -chain; t: β -fold; c: Random coil.

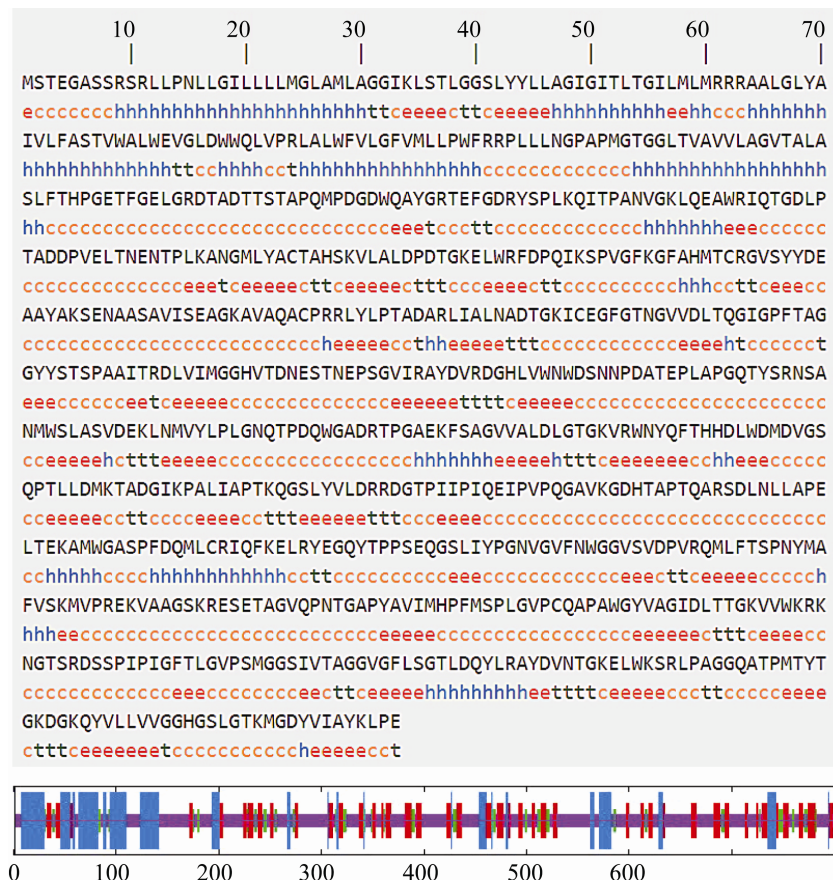


图 6 GDH 蛋白二级结构分析 h: α -螺旋; e: β -链; t: β -折叠; c: 无规则卷曲

Figure 6 Secondary structure analysis of GDH protein. h: α -helix; e: β -chain; t: β -fold; c: Random coil.

化位点为 149–152、211–214、247–250、276–279、372–375、376–379、427–430、479–482、493–496、570–573、645–648、703–706、749–752、770–773, N-肉豆蔻酰化位点为 32–37、48–53、126–131、229–234、350–355、368–373、382–387、412–417、489–494、502–507、538–543、653–658、659–664、687–692、723–728、783–788、789–794, 蛋白酶磷酸化位点为 7–9、247–249、271–273、325–327、469–471、562–564、645–647、692–694、703–705、749–751、770–772。

2.1.6 蛋白保守结构域分析

运用 Conserved Domains 在线软件对 *pqqE* 和 *GDH* 蛋白进行分析, 结果表明: *pqqE* 蛋白含有 1 个 PQQ-syn-*pqqE* 功能域, 是一种典型的肽环化自由基 SAM 酶, 其将 Try 连接到 Glu 中, 作为前体肽 *pqqA* 合成辅酶 PQQ 的第一步。该蛋白含有 radical SAM superfamily, 该家族的酶通过 4Fe-4S 簇与 S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosyl methionine, SAM)近距离结合产生自由基。它们的特征是一个保守的 CxxxCxC 基序, 该基序协调了保守的铁硫团簇。从机理上讲, 它们共同将单个电子从铁硫簇转移到 SAM 上, 导致

其还原裂解为甲硫氨酸和 5'-脱氧腺苷酸自由基, 进而从适当位置的碳原子处抽出氢气。根据酶的不同, SAM 在此过程中被消耗或被恢复和重复使用。自由基 SAM 酶具有催化代谢、DNA 修复、维生素和辅酶的生物合成以及多种抗生素的生物合成的作用(图 7)。

GDH 蛋白含有 4 个功能域, 分别为 PQQ-membr-DH、PQQ-mGDH、Gcd 和 PQQ; 有 2 个超家族蛋白结构, 最主要的是 PQQ-DH-like superfamily。PQQ-membr-DH 功能域具有与辅酶 PQQ 生物合成酶非常相似的系统发育分布, 如部分系统发育分析所示, 该家族成员在 N 端区域有多个预测的跨膜螺旋, 包括大肠杆菌的喹蛋白葡萄糖脱氢酶和不动杆菌属的酸/莽草酸脱氢酶 ADP1; PQQ-mGDH 功能域的细菌亚家族的酶属于以 PQQ 为辅因子的脱氢酶家族, 是唯一与膜结合的亚家族。葡萄糖脱氢酶将 D-葡萄糖转化为 D-葡萄糖-1,5-内酯, 在革兰氏阴性菌糖和醇的周质氧化过程中与呼吸链偶联。PQQ_DH_like 超家族蛋白家族是由 PQQ 作为辅因子的脱氢酶组成, 如乙醇、甲醇和膜结合葡萄糖脱氢酶(图 8)。

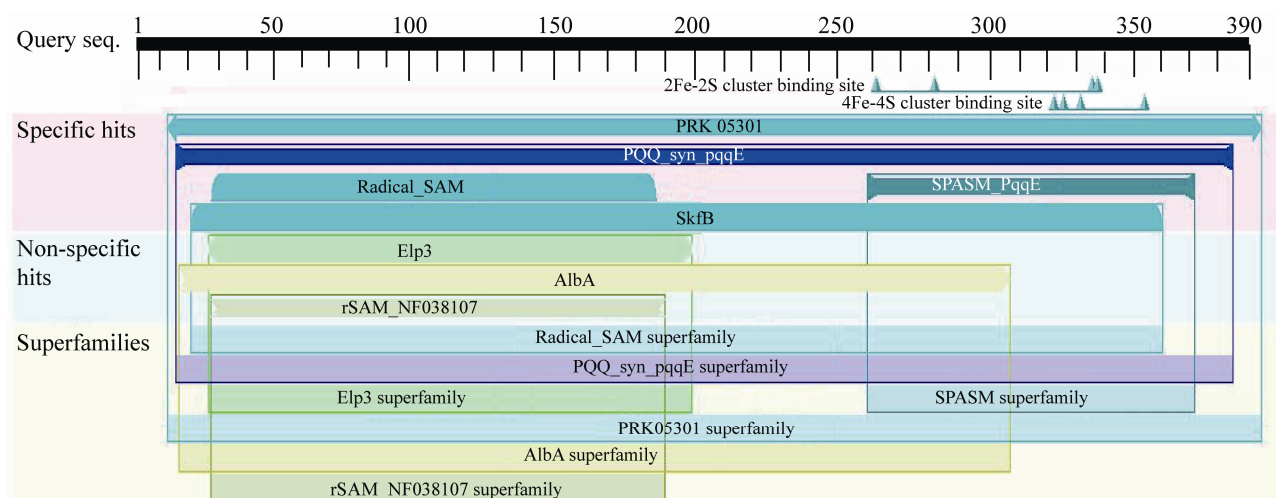


图 7 *pqqE* 保守结构域分析

Figure 7 Conserved domains of *pqqE*.

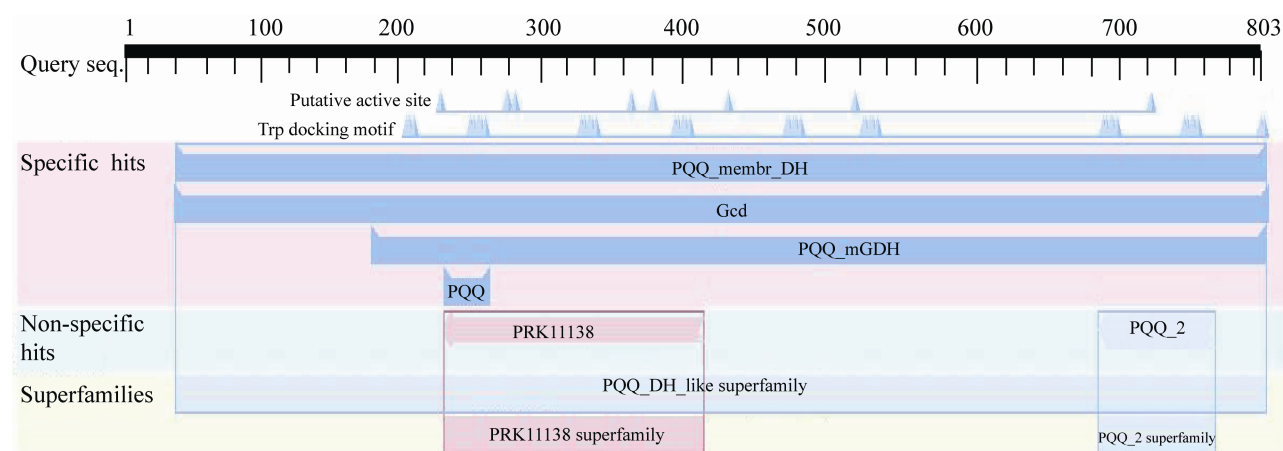


图8 GDH 保守结构域分析

Figure 8 Conserved domains of GDH.

2.1.7 氨基酸序列同源性分析

使用 MEGA 7.0 软件构建进化树, 结果如图 9、图 10 所示, 菌株 CLW17 的 *pqqE* 和 GDH 蛋白与假单胞菌属的亲缘关系最近。

2.2 荧光假单胞菌 CLW17 抗生素敏感性测试

对 CLW17 菌株进行氨苄青霉素、庆大霉素这 2 种抗生素的敏感性检测, 实验结果表明, 将荧光假单胞菌 CLW17 原始菌株涂布于分别含有氨苄青霉素、庆大霉素的 LB 固体培养基上, CLW17 原始菌株均无生长迹象, 说明该菌株对 2 种抗生素均敏感。这表明后续可以采用携带庆大霉素筛选标记的 pEX18Gm 和 pJN105 载体进行 CLW17 菌株的基因敲除和回补。

2.3 敲除株的筛选

通过同源重组技术分别获得 $\Delta pqqE$ 和 ΔGDH 的缺失突变株, 结果如图 11 所示, 1-4 泳道扩增出的条带大小约为 1 300 bp, 明显小于阳性对照野生株的大小, 说明 *pqqE* 基因缺失突变体构建成功; 泳道 5-10 扩增出的条带大小约为 1 500 bp, 明显小于阳性对照野生株的大小, 通过测序进一步表明 *GDH* 基因缺失突变体构

建成功。

2.4 回补株的筛选

由图 12 可知, 与阳性对照(CK+)相比, 泳道 1-6 扩增出大小相等的条带, 说明回补质粒已成功导入 $\Delta pqqE$ 内, 回补菌株 $\Delta pqqE/pqqE$ 构建成功; 泳道 12-17 扩增出与阳性对照大小相等的条带, 说明回补质粒已成功导入进 ΔGDH 内, 回补菌株 $\Delta GDH/GDH$ 构建成功。

2.5 溶磷能力的比较

分别将 CLW17 的野生菌株、 $\Delta pqqE$ 、 ΔGDH 、 $\Delta pqqE/pqqE$ 和 $\Delta GDH/GDH$ 菌株点种于 NBRIP 培养基平板上, 30 °C 恒温培养箱中培养 7 d 后, 如图 13 所示, 敲除株 $\Delta pqqE$ 和 ΔGDH 在 NBRIP 培养基上生长较弱, 菌落周围无溶磷圈出现, 而野生型 CLW17、回补株 $\Delta pqqE/pqqE$ 和 $\Delta GDH/GDH$ 有明显的溶磷圈出现, 其中 $\Delta pqqE/pqqE$ 和 $\Delta GDH/GDH$ 产生的溶磷圈比野生型 CLW17 略大一些, 周围未降解完全。这说明 *pqqE* 和 *GDH* 基因的敲除使 CLW17 菌株几乎丧失了溶磷能力, 同时也暗示 2 个基因的功能与溶磷相关。

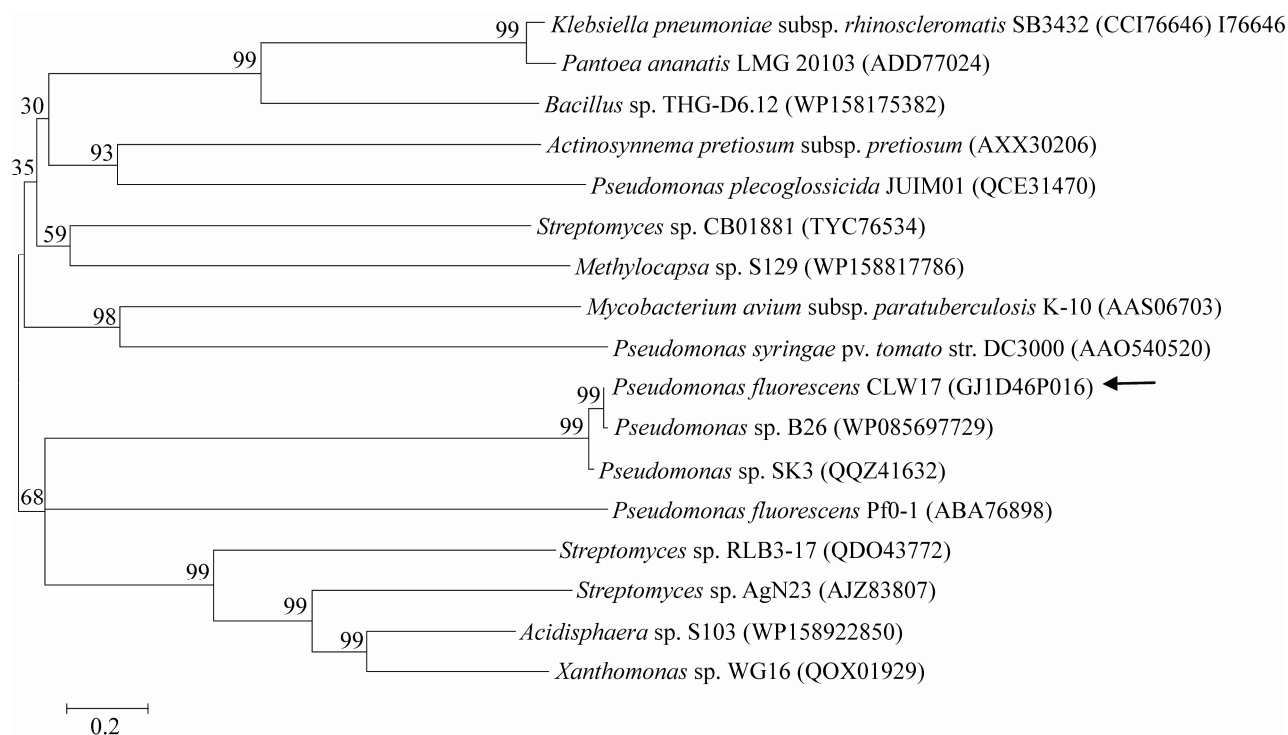


图 9 荧光假单胞菌 CLW17 菌株 *pqqE* 蛋白与其他不同菌株 *pqqE* 蛋白的进化关系 邻接法构建系统发育树；节点上数字表示 interior-branch 值；括号内表示菌株 GenBank 号；箭头所指为本项目的 CLW17 菌株；比例尺表示核苷酸替换率

Figure 9 The evolutionary relationship between *pqqE* protein of *Pseudomonas fluorescens* CLW17 and *pqqE* protein of other strains. The phylogenetic tree was constructed by neighbor-joining model; The number on the node indicating the interior-branch value; The GenBank accession number of each strain was indicated in brackets; The CLW17 strain used in this study was indicated as black arrow; Scale bar indicates nucleotide substitution rate.

分别采用钼锑抗比色法测定不同菌株发酵 4 d 的 NBRIP 上清液中可溶性磷的含量, 结果如表 5 所示。CLW17 野生株、敲除株 $\Delta pqqE$ 、敲除株 ΔGDH 、回补株 $\Delta pqqE/pqqE$ 和回补株 $\Delta GDH/GDH$ 可溶磷的含量分别是 289.074、146.860、144.983、398.198 和 409.462 mg/L。与野生株相比, 敲除株 $\Delta pqqE$ 和 ΔGDH 发酵液的可溶性磷含量明显下降, 而回补株 $\Delta pqqE/pqqE$ 和 $\Delta GDH/GDH$ 的可溶性磷含量恢复并有明显的提升。以上结果也说明了 *pqqE* 基因和 *GDH* 基因在该菌株的溶磷过程中应该是起着关键性作用。

2.6 荧光假单胞菌 CLW17 产有机酸测定

采用 HPLC 对 CLW17 野生株、敲除株 $\Delta pqqE$ 、 ΔGDH 的 NBRIP 培养基发酵 4 d 的上清液产有机酸情况进行检测。由表 6 可以看出, CLW17 野生株在其溶磷过程中分泌了有机酸, 并且有机酸分泌总量为 5 534.77 $\mu\text{g/mL}$, 显著高于培养基空白对照(716.66 $\mu\text{g/mL}$), 增加了 672.30%, 说明该菌株分泌的有机酸在溶磷过程中起着很重要的作用。CLW17 野生株分泌的有机酸有 4 种, 分别为草酸、GA、乙酸和苹果酸, 相较于对照, GA 和乙酸的含量增加。草酸、苹果酸与空白对照相比相差甚

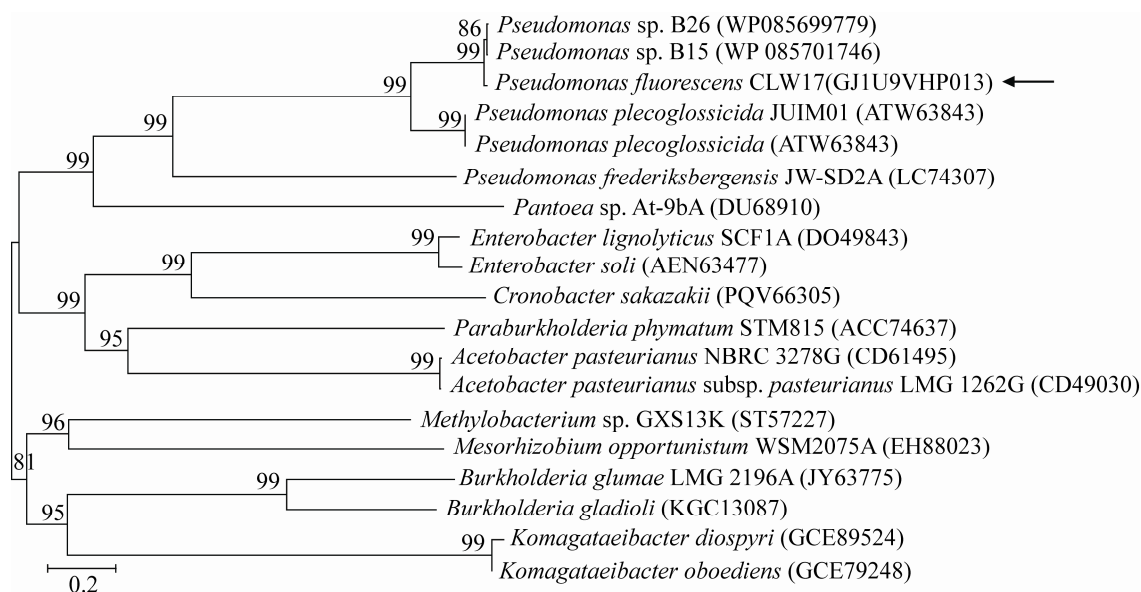


图 10 荧光假单胞菌 CLW17 菌株 GDH 蛋白与其他不同菌株 GDH 蛋白的进化关系 邻接法构建系统发育树；节点上数字表示 interior-branch 值；括号内表示菌株 GenBank 号；箭头所指为本项目的 CLW17 菌株；比例尺表示核苷酸替换率

Figure 10 The evolutionary relationship between GDH protein of *Pseudomonas fluorescens* CLW17 and GDH protein of other strains. The phylogenetic tree was constructed by neighbor-joining model; The number on the node indicating the interior-branch value; The GenBank accession number of each strain was indicated in brackets; The CLW17 strain used in this study was indicated as black arrow; Scale bar indicates nucleotide substitution rate.

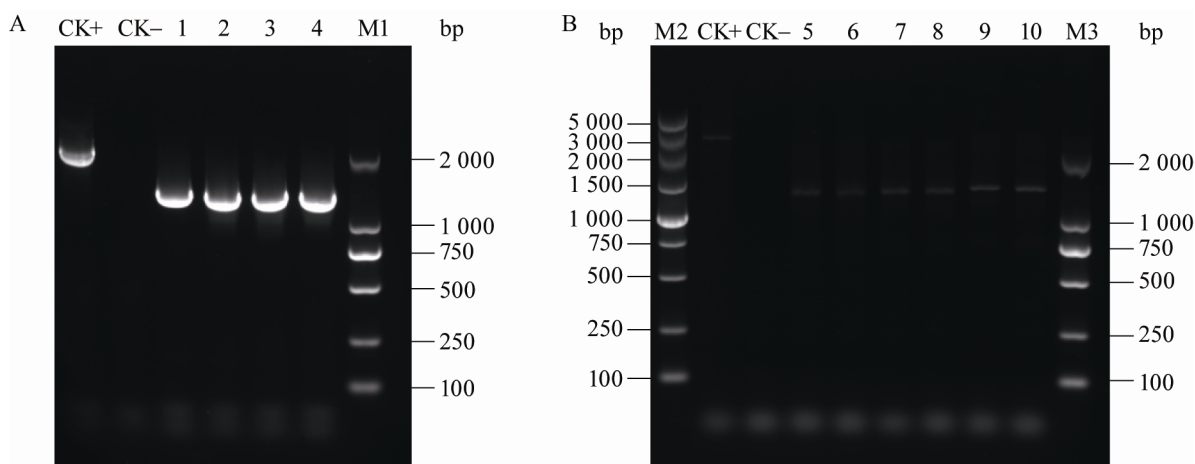


图 11 $\Delta pqqE$ 和 ΔGDH PCR 验证结果电泳图 M1、M3: DL2000 DNA Marker; M2: DL5000 DNA Marker; 1-4: 以不同的 $\Delta pqqE$ 单菌落为模板的 PCR 结果电泳图; 5-10: 以不同的 ΔGDH 单菌落为模板的 PCR 结果电泳图; CK+: 以野生型菌株为模板的 PCR 扩增; CK-: 无模板的 PCR 扩增

Figure 11 PCR validation of $\Delta pqqE$ and ΔGDH . M1, M3: DL2000 DNA Marker; M2: DL5000 DNA Marker; 1-4: Using different $\Delta pqqE$ single colonies as templates of PCR; 5-10: Using different ΔGDH single colonies as templates of PCR; CK+: Use wild type strain as template of PCR; CK-: Without template of PCR.

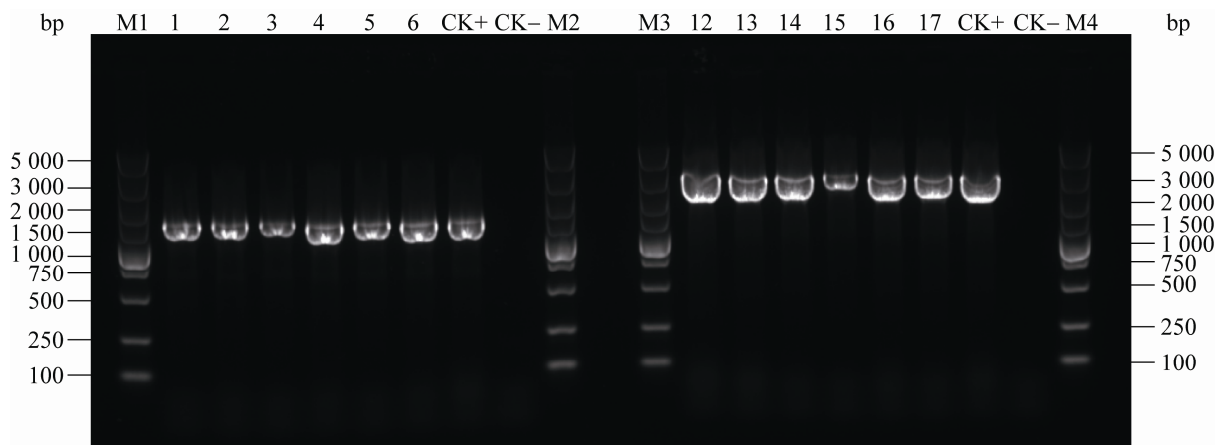


图 12 $\Delta pqqE/pqqE$ 和 $\Delta GDH/GDH$ PCR 验证结果电泳图 M1–M4: DL5000 DNA Marker; 1–6: 以不同的 $\Delta pqqE/pqqE$ 单菌落为模板的 PCR 结果电泳图; 12–17: 以不同的 $\Delta GDH/GDH$ 单菌落为模板的 PCR 结果电泳图; CK+: 以回补载体为模板的 PCR 扩增; CK–: 无模板的 PCR 扩增

Figure 12 PCR validation of $\Delta pqqE/pqqE$ and $\Delta GDH/GDH$. M1–M4: DL5000 DNA Marker; 1–6: Using different $\Delta pqqE/pqqE$ single colonies as templates of PCR; 12–17: Using different $\Delta GDH/GDH$ single colonies as templates of PCR; CK+: Using complementation vector as template of PCR; CK–: Without template of PCR.

微，而 GA 为 4 429.33 $\mu\text{g/mL}$ ，相比其他酸的产量显著提升，同时产乙酸量高达 1 079.63 $\mu\text{g/mL}$ ，而在对照中未检测到乙酸。敲除株 $\Delta pqqE$ 、 ΔGDH 产有机酸检测结果进一步验证了这 2 种有机酸的作用。2 株敲除株除了新出现的乳酸 (87.80 $\mu\text{g/mL}$ ，44.39 $\mu\text{g/mL}$)，产有机酸的种类和量

与空白对照相似，产 GA 的量分别为 516.95 $\mu\text{g/mL}$ 和 560.25 $\mu\text{g/mL}$ ，与对照(679.42 $\mu\text{g/mL}$)差别较小，都明显低于野生株(4 429.33 $\mu\text{g/mL}$)，另外敲除株的发酵液中未检测到乙酸。进一步说明 GA 和乙酸可能在 CLW17 菌株的溶磷过程中起着重要作用。

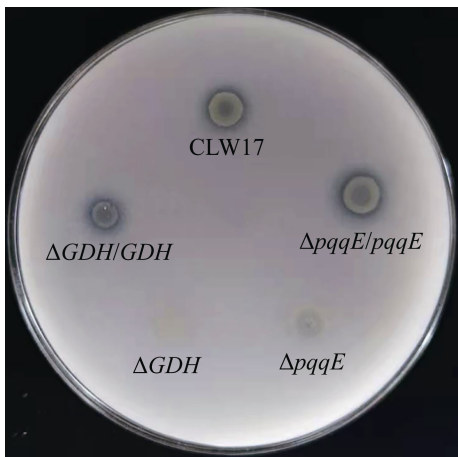


图 13 NBRIP 板上溶磷圈的大小
Figure 13 Solution circle of inorganic phosphate on NBRIP.

表 5 CLW17 野生菌株、 $\Delta pqqE$ 、 ΔGDH 、 $\Delta pqqE/pqqE$ 和 $\Delta GDH/GDH$ 菌株的溶磷能力

Table 5 The ability of soluble phosphorus of original bacteria strain, $\Delta pqqE$, ΔGDH mutants, $\Delta pqqE/pqqE$ and $\Delta GDH/GDH$ complements

Manage	Phosphate-solubilizing quantity (mg/L)
CLW17	289.074±0.007c
CLW17 $\Delta pqqE$	146.860±0.003d
CLW17 ΔGDH	144.983±0.010d
$\Delta pqqE/pqqE$	398.198±0.029b
$\Delta GDH/GDH$	409.462±0.033ab
CK	6.993±0.001e

注：不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)
Note: Different lowercase letters represented significant difference ($P<0.05$).

表 6 荧光假单胞 CLW17 野生株、敲除株 $\Delta pqqE$ 和 ΔGDH 分泌的有机酸种类和浓度

Table 6 The kinds and concentrations of organic acids excreted by wild strain and knocked out strains $\Delta pqqE$ and ΔGDH of *Pseudomonas fluorescent* CLW17

Organic acid	Content ($\mu\text{g/mL}$)			
	CK	CLW17 (Wild type)	$\Delta pqqE$	ΔGDH
草酸 Oxalic acid	29.42	22.35	27.10	24.91
葡萄糖酸 Gluconic acid	679.42	4 429.23	516.95	560.25
酒石酸 Tartaric acid	3.99	—	3.33	4.87
乙酸 Acetic acid	—	1 079.63	—	—
乳酸 Lactic acid	—	—	87.80	44.39
苹果酸 Malic acid	3.82	3.56	4.69	2.75
甲酸 Formic acid	—	—	—	—
Total acid	716.66	5 534.77	639.86	637.17

Note: —: Not detected.

3 讨论与结论

在土壤中接种 PSM 是将不溶性磷转化为植物有效磷的有效途径,可促进植物生长,提高作物产量和品质。可以说,PSM 是无机磷肥的辅助性促生剂,有助于满足植物对磷的需求,促进可持续农业的发展。据报道,接种假单胞菌 MS16 溶磷细菌制备成的菌剂接种小麦后,小麦的籽粒产量和植株磷含量均显著高于对照^[13]。Zhao 等的研究发现,接种溶磷菌株 *Burkholderia cepacia* SCAUK0330 的玉米生物量显著高于对照,并且能够耐受 5% 的 NaCl,在较宽的温度(10–40 °C)和 pH 值(4.0–10.0)范围内生长,说明其在广泛的环境条件下可以被用作植物生长促进剂和生物防治剂^[14]。

微生物的溶磷机制存有多种观点,一般认为是微生物向周围分泌质子、有机酸等物质。有机酸产生的种类和产量已成为筛选和评估 PSM 效率高低的标准^[15]。已经报道的 PSM 分泌的有机

酸主要有 GA、酒石酸、丙烯酸、乳酸、柠檬酸、甲酸、丙酮酸、戊二酸、苹果酸和草酸等,这些有机酸通过与 Fe^{3+} 、 Al^{3+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 发生螯合作用结合,从而将难溶性的磷酸盐溶解^[16],其中 GA 和 2-酮基-葡萄糖是最常见的有机酸。不同的溶磷菌株产生的有机酸种类也有所不同。

一些 *Burkholderia* sp. 菌株通过产生 GA、乙酸、柠檬酸、丁酸、乳酸、琥珀酸、苹果酸、乙醇酸、富马酸、丙酸、甲酸等多种有机酸,从而使该类菌株在溶解不溶性磷酸盐方面具有很高的效率^[17–18]。例如,Zeng 等在解磷细菌伯克霍尔德氏菌 WS-FJ9 的磷酸盐增溶过程中检测到 GA 和丙酮酸^[19]。目前已报道的假单胞菌属的溶磷菌株中,GA 是其发挥溶磷作用时产生的主要有机酸。例如,Chen 等筛选到一株假单胞菌 PSB12,研究发现 PSB12 菌株产生的有机酸组成取决于磷的形式,当初始可溶性磷不足时 GA 是主要有机酸;当仅提供可溶性磷时,甲酸、丁酸和丙二酸是其产生的主要有机酸^[20]。我们通过 HPLC 发现荧光假单胞菌 CLW17 分泌的有机酸主要是 GA 和乙酸,这暗示该菌株的溶磷能力可能与产 GA 和乙酸有关。

目前已克隆的溶磷细菌促进无机磷溶解的基因主要是与产有机酸有直接关系或起调节作用的基因。不少溶磷细菌菌株在葡萄糖脱氢酶 GDH 和辅助因子吡咯喹啉醌 PQQ 的共同作用下,将葡萄糖氧化为 GA,降低 pH 值,从而使难溶性无机磷转化为可溶性磷^[21]。Bharwad 等的研究表明,琥珀酸对 *Acinetobacter* sp. SK₂ 的抑制机制是通过抑制 mGDH 和 sGDH 的活性来抑制磷的溶解^[22]。PQQ 作为氧化还原酶的一种辅酶,合成途径一般均具有 *pqqA*、*pqqB*、*pqqC*、*pqqD*、*pqqE* 和 *pqqF* 这 6 个基因。其代谢合成的详细机制截至目前尚未解析清楚。Goldstein 等最早从草生欧文氏菌中分离得到

pqqE 溶磷基因, 该基因能促进细菌对无机磷的吸收, 证明了该基因具有溶磷功能^[23]。Tripura 等从肠杆菌科中成功克隆了 *GDH* 基因, 缺失 *GDH* 基因的敲除株便丧失 *GDH* 的活性, 致使该菌不能溶解土壤中的难溶性磷酸盐^[24]。本文通过同源重组和接合转移的方法成功构建了荧光假单胞菌 CLW17 菌株 *pqqE* 和 *GDH* 基因敲除株及回补株。通过 CLW17 菌株野生株和突变株溶磷能力的定性、定量结果发现, 2 个基因的敲除虽然显著降低了该菌株的溶磷能力, 但并没有使其溶磷能力完全消失, 同时回补株使其溶磷能力得到恢复并有所提高。这些结果表明 *pqqE* 和 *GDH* 基因在 CLW17 菌株的溶磷过程中应该起着关键性作用, 但可能还存在其他的溶磷途径。本研究通过 HPLC 对荧光假单胞菌 CLW17 野生株及敲除株发酵液中有机的检测发现, CLW17 野生株在溶磷的过程中分泌了 4 种有机酸, 分别为草酸、GA、乙酸和苹果酸。其中, 草酸和苹果酸水平与空白对照持平, 而敲除株中分泌 GA 的含量明显下降, 与空白对照持平, 同时在发酵液中未检测到乙酸, 但新出现了乳酸。本研究结果表明 GA 和乙酸是荧光假单胞菌 CLW17 主要分泌的有机酸, 在该菌株的溶磷过程中可能发挥着重要作用。

为了在分子水平真正揭示荧光假单胞菌 CLW17 菌株的溶磷机制, 在后续研究中, 我们仍需要继续开展 CLW17 菌株其他基因的功能研究, 探索这些基因对其溶磷能力的影响, 寻找出其他可能的溶磷途径。此外, 通过对荧光假单胞菌 CLW17 基因组中基因的分析, 我们认为有机酸的产生、植物激素的产生、固氮和产生嗜铁素是促进南方红豆杉生长的主要机制, 而且前期实验也证明了该菌株具有以上功能。同时, 盆栽实验也表明该菌株对南方红豆杉具有显著促生长作用^[25]。因此, CLW17 菌株可作为南方红豆杉

人工栽林土壤微生物磷肥使用的菌株资源之一, 这一方法对减轻化学磷肥的有害影响非常重要。

REFERENCES

- [1] Khan MS, Zaidi A, Wani PA. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture: a review[J]. *Agronomy for Sustainable Development*, 2007, 27(1): 29-43
- [2] Rawat P, Das S, Shankhdhar D, Shankhdhar SC. Phosphate-solubilizing microorganisms: mechanism and their role in phosphate solubilization and uptake[J]. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 2021, 21(1): 49-68
- [3] Lin TF, Huang HI, Shen FT, Young CC. The protons of gluconic acid are the major factor responsible for the dissolution of tricalcium phosphate by *Burkholderia cepacia* CC-A174[J]. *Bioresource Technology*, 2006, 97(7): 957-960
- [4] Mi Z, Sun Z, Huang Z, Zhao P, Li Q, Tian P. Engineering CRISPR interference system to enhance the production of pyrroloquinoline quinone in *Klebsiella pneumonia*[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2020, 71(3): 242-250
- [5] Boiardi J, Galar ML, Neijssel OM. PQQ-linked extracellular glucose oxidation and chemotaxis towards this cofactor in rhizobia[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1996, 140(2/3): 179-184
- [6] Bhanja E, Das R, Begum Y, Mondal SK. Study of pyrroloquinoline quinone from phosphate-solubilizing microbes responsible for plant growth: *in silico* approach[J]. *Frontiers in Agronomy*, 2021, 3: 667339
- [7] Magnusson OT, RoseFigura JM, Toyama H, Schwarzenbacher R, Klinman JP. Pyrroloquinoline quinone biogenesis: characterization of PqqC and its H84N and H84A active site variants[J]. *Biochemistry*, 2007, 46(24): 7174-7186
- [8] Yang XP, Zhong GF, Lin JP, Mao DB, Wei DZ. Pyrroloquinoline quinone biosynthesis in *Escherichia coli* through expression of the *Gluconobacter oxydans pqqABCDE* gene cluster[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2010, 37(6): 575-580
- [9] Choi O, Kim J, Kim JG, Jeong Y, Moon JS, Park CS, Hwang I. Pyrroloquinoline quinone is a plant growth promotion factor produced by *Pseudomonas fluorescens* B16[J]. *Plant Physiology*, 2008, 146(2): 323-324
- [10] Han SH, Kim CH, Lee JH, Park JY, Cho SM, Park SK, Kim KY, Krishnan HB, Kim YC. Inactivation of *pqq*

- genes of *Enterobacter intermedium* 60-2G reduces antifungal activity and induction of systemic resistance[J]. FEMS Microbiology Letters, 2008, 282(1): 140-146
- [11] 任嘉红, 刘辉, 吴晓蕙, 王青, 任英瑜, 刘亚静, 冯玉龙. 南方红豆杉根际溶无机磷细菌的筛选、鉴定及其促生效果[J]. 微生物学报, 2012, 52(3): 295-303
Ren JH, Liu H, Wu XH, Wang Q, Ren YY, Liu YJ, Feng YL. Screening, identification, and promoting effect of phosphate-solubilizing bacteria in rhizosphere of *Taxus chinensis* var. *mairei*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52(3): 295-303 (in Chinese)
- [12] Mehta S, Nautiyal CS. An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria[J]. Current Microbiology, 2001, 43(1): 51-56
- [13] Suleman M, Yasmin S, Rasul M, Yahya M, Atta BM, Mirza MS. Phosphate solubilizing bacteria with glucose dehydrogenase gene for phosphorus uptake and beneficial effects on wheat[J]. PLoS One, 2018, 13(9): e0204408
- [14] Zhao K, Penttinen P, Zhang XP, Ao XL, Liu MK, Yu XM, Chen Q. Maize rhizosphere in Sichuan, China, hosts plant growth promoting *Burkholderia cepacia* with phosphate solubilizing and antifungal abilities[J]. Microbiological Research, 2014, 169(1): 76-82
- [15] Cunningham JE, Kuiack C. Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1992, 58(5): 1451-1458
- [16] Kumar A, Kumar A, Patel H. Role of microbes in phosphorus availability and acquisition by plants[J]. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 2018, 7(5): 1344-1347
- [17] Pande A, Pandey P, Mehra S, Singh M, Kaushik S. Phenotypic and genotypic characterization of phosphate solubilizing bacteria and their efficiency on the growth of maize[J]. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 2017, 15(2): 379-391
- [18] Valverde A, Delvasto P, Peix A, Velázquez E, Santa-Regina I, Ballester A, Rodríguez-Barrueco C, García-Balboa C, Igual JM. *Burkholderia ferrariae* sp. nov., isolated from an iron ore in Brazil[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2006, 56(10): 2421-2425
- [19] Zeng QW, Wu XQ, Wang JC, Ding XL. Phosphate solubilization and gene expression of phosphate-solubilizing bacterium *Burkholderia multivorans* WS-FJ9 under different levels of soluble phosphate[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2017, 27(4): 844-855
- [20] Chen WM, Yang F, Zhang L, Wang JM. Organic acid secretion and phosphate solubilizing efficiency of *Pseudomonas* sp. PSB12: effects of phosphorus forms and carbon sources[J]. Geomicrobiology Journal, 2016, 33(10): 870-877
- [21] 冯月红, 姚拓, 龙瑞军. 土壤解磷菌研究进展[J]. 草原与草坪, 2003, 23(1): 3-7
Feng YH, Yao T, Long RJ. Research progress of phosphate-dissolving microorganisms in plant rhizosphere[J]. Grassland and Turf, 2003, 23(1): 3-7 (in Chinese)
- [22] Bharwad K, Rajkumar S. Modulation of PQQ-dependent glucose dehydrogenase (mGDH and sGDH) activity by succinate in phosphate solubilizing plant growth promoting *Acinetobacter* sp. SK2[J]. 3 Biotech, 2019, 10(1): 1-11
- [23] Goldstein AH, Liu ST. Molecular cloning and regulation of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola*[J]. Nature Biotechnology, 1987, 5(1): 72-74
- [24] Tripura C, Sudhakar Reddy P, Reddy MK, Sashidhar B, Podile AR. Glucose dehydrogenase of a rhizobacterial strain of *Enterobacter asburiae* involved in mineral phosphate solubilization shares properties and sequence homology with other members of *Enterobacteriaceae*[J]. Indian Journal of Microbiology, 2007, 47(2): 126-131
- [25] Bai BX, Yang X, Zhao QS, Liu RX, Ren JH. Inoculations with *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus cereus* affect the soil enzyme activity, growth and rhizosphere microbial diversity of *Taxus chinensis* var. *mairei*[J]. Plant and Soil, 2020, 455(1/2): 41-52