

一株连香树根际促生细菌 LWK2 的分离鉴定及其全基因组序列分析

晋婷婷¹, 曹永清^{1,2}, 李云玲¹, 白凤麟¹, 白变霞¹, 任嘉红^{*1}, 孟静^{1,2}, 李琳¹, 王莹¹

1 长治学院生命科学系, 山西 长治 046011

2 山西师范大学生命科学学院, 山西 太原 030031

晋婷婷, 曹永清, 李云玲, 白凤麟, 白变霞, 任嘉红, 孟静, 李琳, 王莹. 一株连香树根际促生细菌 LWK2 的分离鉴定及其全基因组序列分析[J]. 微生物学通报, 2023, 50(5): 1917-1940.

JIN Tingting, CAO Yongqing, LI Yunling, BAI Fenglin, BAI Bianxia, REN Jiahong, MENG Jing, LI Lin, WANG Ying. Isolation, identification, and whole-genome sequence analysis of a plant growth-promoting bacterium LWK2 from *Cercidiphyllum japonicum* rhizosphere[J]. Microbiology China, 2023, 50(5): 1917-1940.

摘要:【背景】植物根际促生细菌是一类位于植物根际并能对植物生长产生促进作用的有益菌, 在微生物肥料领域具有重要的应用价值。【目的】对濒危植物连香树根际的植物根际促生细菌进行分离筛选和连香树接种效应评价, 挑选对连香树生长促进作用最为显著的菌种进行促生特性分析、菌种鉴定及全基因组序列测定与促生相关基因分析。【方法】利用相应筛选培养基对连香树根际土壤中解有机磷、溶无机磷和解钾细菌进行分离筛选, 通过根际接种验证各菌株对连香树实生苗的促生能力。从中选取促生作用最为显著的细菌, 进行解钾能力、产吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)和 1-氨基环丙烷-1-羧酸(1-aminocyclopropane-1-carboxylate, ACC)脱氨酶能力测定。利用菌体形态观察、16S rRNA 基因序列分析及全基因组序列的平均核苷酸一致性比对进行菌种鉴定。最后利用基因组功能注释和比较基因组学分析对该菌株中的植物促生及重金属抗性相关基因进行解析。【结果】从连香树根际土壤中共筛选得到 3 株解有机磷细菌、2 株溶无机磷细菌和 2 株解钾细菌, 其中解钾细菌 LWK2 对连香树实生苗的生长促进作用最为显著。该菌株能够产 IAA 和 ACC 脱氨酶。经鉴定菌株 LWK2 为吡咯伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia pyrrocinia*)。LWK2 全基因组包括 2 条染色体和 1 个质粒, 大小分别为 3 713 209、3 026 422 和 880 277 bp, GC 含量分别为 66.50%、66.37% 和 65.69%。其基因组包括 IAA、铁载体、硝吡咯菌素合成, 以及 ACC 脱氨酶和溶磷相关基因。

资助项目: 国家自然科学基金(31100471); 山西省高等学校科技创新项目(2021L509); 山西省“1331 工程”资助项目; 长治学院大学生创新创业训练计划项目(2022DC04)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31100471), the Scientific and Technological Innovation Programs of Higher Education Institutions in Shanxi Province (2021L509), the Fund for Shanxi Province “1331 Project”, and the Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students in Changzhi University (2022DC04).

*Corresponding author. E-mail: renjiahong76@hotmail.com

Received: 2022-11-15; Accepted: 2022-12-27; Published online: 2023-02-10

上述植物促生相关基因在另外 13 株植物促生性伯克霍尔德氏菌中普遍存在, 但每株菌所含有的 IAA 合成途径种类及催化各反应相关酶的种类却存在显著的多样性。此外, LWK2 基因组还含有大量铜、钴-锌-镉和砷等重金属抗性基因, 重金属抗性实验表明该菌株对 CuSO_4 、 ZnSO_4 、 CdCl_2 和 CoCl_2 均具有抗性, 对这 4 种重金属盐的最高耐受浓度分别为 4、10、3 和 1 mmol/L。【结论】分离自连香树根际的吡咯伯克霍尔德氏菌 LWK2 具有多种植物促生特性, 能显著促进连香树实生苗的生长, 对于濒危植物连香树微生物肥料的开发具有重要应用价值。LWK2 全基因组序列的测定, 丰富了目前为数不多的植物促生性吡咯伯克霍尔德氏菌基因组数据库, 其基因组序列中植物促生及重金属抗性相关基因的分析, 对进一步深入揭示该菌株的植物促生机制, 扩展其在重金属胁迫环境下植物促生菌剂中的应用具有重要意义。

关键词: 植物根际促生细菌; 连香树; 吡咯伯克霍尔德氏菌; 全基因组分析; 促生特性; 重金属抗性

Isolation, identification, and whole-genome sequence analysis of a plant growth-promoting bacterium LWK2 from *Cercidiphyllum japonicum* rhizosphere

JIN Tingting¹, CAO Yongqing^{1,2}, LI Yunling¹, BAI Fenglin¹, BAI Bianxia¹, REN Jiahong^{*1}, MENG Jing^{1,2}, LI Lin¹, WANG Ying¹

1 Department of Life Sciences, Changzhi University, Changzhi 046011, Shanxi, China

2 School of Life Science, Shanxi Normal University, Taiyuan 030031, Shanxi, China

Abstract: [Background] Plant growth-promoting rhizobacteria are beneficial bacteria inhabiting the rhizosphere of plants, with a promising prospect of application in the development of microbial fertilizers. [Objective] We isolated the plant growth-promoting rhizobacteria from the rhizosphere of the endangered plant *Cercidiphyllum japonicum* and evaluated their effects on *C. japonicum* seedlings. We then chose the strain with the greatest growth-promoting effect on *C. japonicum* seedlings, characterized its plant growth-promoting properties, and carried out strain identification, whole genome sequencing and plant growth-promoting related gene analysis. [Methods] The plant growth-promoting rhizobacteria capable of solubilizing organophosphate, inorganic phosphorus, and potassium were isolated with the corresponding selective media. The inoculation assay was employed and the strain with the greatest growth-promoting effect on *C. japonicum* seedlings was selected to verify the abilities for potassium solubilization, IAA and ACC deaminase production. The strain was identified based on cell morphology observation, 16S rRNA gene sequence analysis and the average nucleotide identity of the whole genome sequence. Furthermore, the genes conferring plant growth promotion and heavy metal resistance in the genome of this strain were identified by genome functional annotation and comparative genomics analysis. [Results] Three, two, and two strains capable of solubilizing organophosphate, inorganic phosphate, and potassium, respectively,

were isolated from the rhizosphere soil of *C. japonicum*. Among them, the potassium-solubilizing bacterial strain LWK2 had the best performance of promoting the growth of *C. japonicum* seedlings. Strain LWK2 can produce IAA and ACC deaminase and was identified as a strain of *Burkholderia pyrrocinia*. The whole genome of LWK2 consisted of two chromosomes and a plasmid, with the lengths of 3 713 209, 3 026 422, and 880 277 bp and the GC proportions of 66.50%, 66.37%, and 65.69%, respectively. The genes associated with IAA, siderophore, pyrrolnitrin biosynthesis, ACC deaminase production, and phosphorus solubilization were identified in the LWK2 genome. These genes are ubiquitous in the other 13 strains of *Burkholderia* spp. with plant growth-promoting activities, while the IAA synthesis pathways and the enzymes catalyzing the reactions vary between different strains. In addition, the LWK2 genome carried the genes involved in the resistance to heavy metals, including copper, cobalt-zinc-cadmium, and arsenic. Heavy metal resistance experiments showed that LWK2 was resistant to CuSO_4 , ZnSO_4 , CdCl_2 , and CoCl_2 , with the maximum tolerance concentrations of 4, 10, 3, and 1 mmol/L for these four heavy metal salts, respectively. **[Conclusion]** *B. pyrrocinia* LWK2 isolated from *C. japonicum* rhizosphere has plant growth-promoting properties. It can significantly promote the growth of *C. japonicum* seedlings, demonstrating the potential of application in the development of microbial fertilizers for the endangered plant *C. japonicum*. The whole genome sequencing of LWK2 enriches the genome data of plant growth-promoting *B. pyrrocinia*. The identification of the genes associated with plant growth promotion and heavy metal resistance in the LWK2 genome is critical for further elucidating the plant growth-promoting mechanism of LWK2 and expanding its application in the development of plant growth-promoting agents used in the environment with heavy metal stress.

Keywords: plant growth-promoting rhizobacteria; *Cercidiphyllum japonicum*; *Burkholderia pyrrocinia*; whole genome analysis; plant growth-promoting properties; heavy metal resistance

连香树(*Cercidiphyllum japonicum* Sieb. et Zucc.)为连香树科连香树属落叶乔木,在白垩纪和第三纪曾广泛分布于北半球,从第四纪冰川后期开始,其分布区急剧缩小,现间断零散分布在中国和日本^[1]。连香树为第三纪孑遗植物,对研究第三纪植物区系起源及中国与日本植物区系的关系具有重要的科研价值;该树种叶片含焦性儿茶酚,可以入药^[1]。此外,连香树树干通直,树冠开阔,叶型美观,是观赏价值很高的园林绿化树种^[1]。因此,连香树是集科研、药用、观赏价值于一身的重要树种资源。然而,由于连香树幼苗自然生长能力较差,致使我国的连香树自然资源呈逐年减少的

状态。目前,连香树已被列入《中国珍稀濒危植物名录》《中国植物红皮书》及第一批《国家重点保护野生植物名录》,属于国家二级保护稀有种^[1]。因此,提高连香树生长繁殖能力并延缓其濒临灭绝的速度,是当前亟须解决的问题之一。目前,施用化学肥料是提高植物生长繁殖能力的主要手段,但化学肥料的长期施用会加快土壤中重金属富集及土壤酸化,导致土壤板结、营养失衡,在促进植物生长的同时会带来环境污染问题。目前,以植物有益微生物为基础开发的微生物肥料已在农林业生产中得到广泛应用,该类肥料具有肥效高、改善土壤肥力、不污染环境等特点,是化学肥料的有效

替代品或半替代品^[2]。

在植物根际存在一类被称为植物根际促生细菌(plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR)的有益菌类,它们可以通过提高植物对土壤矿物质的吸收、产生植物激素、抑制病原真菌生长等方式直接或间接地促进植物生长^[3]。PGPR对植物的促生作用主要包括以下几个方面:(1)提高植物对土壤中矿物质的吸收,最典型的作用就是将土壤中难以被植物直接吸收利用的磷和钾转变为可被直接吸收的形式,从而减少化学肥料的施用^[4-5];(2)产生植物激素(如 IAA)供植物吸收利用^[6];(3)固氮作用^[7];(4)利用自身合成的 1-氨基环丙烷-1-羧酸(1-aminocyclopropane-1-carboxylate, ACC)脱氢酶对乙烯的前体物质 ACC 进行降解,从而缓解逆境胁迫条件下产生的乙烯对植物造成的不良影响^[8];(5)分泌铁载体与植物病原菌竞争性夺取环境中有限的铁元素,为植物生长提供必需的铁元素的同时抑制植物病原真菌的生长^[9];(6)产生抗生素抑制植物病原真菌的生长^[10];(7)诱导和激活植物自身的抗病性^[10]。此外,研究发现许多 PGPR 在重金属过量的环境中可以通过外排作用或是将重金属转化为低毒性的价态来抵御重金属毒性^[11],这些具有重金属抗性的 PGPR 接种生长在重金属污染土壤中的植物后,能够显著提高植物的生物量^[12-15],甚至可以提高植物的光合速率^[16]。由于 PGPR 的诸多促生特性及其环境友好性,使其在微生物肥料领域具有重要的应用价值。

为了在保持良好的生态环境基础上提高濒危物种连香树的生长繁殖能力,我们拟从生长在山西历山国家级自然保护区较为健壮的连香树根际土壤中进行 PGPR 的分离,挑选对连香树实生苗的生长促进作用最为显著的菌种进行植物促生特性分析、菌种鉴定、全基因组测序

和功能基因组分析,以期为濒危植物连香树微生物肥料的开发提供良好的候选菌种,同时为进一步揭示连香树 PGPR 的促生机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株

Burkholderia pyrrocinia LWK2 分离自山西历山国家级自然保护区连香树根际土壤中,现保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏编号为 CCTCC M2016007。

1.2 培养基和主要试剂、仪器

LB 培养基(g/L):胰蛋白胨 10.0,酵母粉 5.0,NaCl 10.0。

蒙金娜基础培养基(g/L):蔗糖 10.00,(NH₄)₂SO₄ 0.50,MgSO₄·7H₂O 0.30,NaCl 0.30,FeSO₄·7H₂O 0.03,KCl 0.30,MnSO₄·4H₂O 0.03,CaCO₃ 5.00。

蒙金娜卵磷脂培养基:蒙金娜基础培养基于 121 °C 灭菌 20 min 后置于 50 °C 水浴锅中保温,新鲜鸡蛋在 75% 酒精中浸泡 24 h,去蛋清后将蛋黄和 0.85% 生理盐水等体积混合后制备成卵黄液,每 100 mL 灭菌后的蒙金娜基础培养基中加入 5 mL 卵黄液即为蒙金娜卵磷脂培养基。

无机磷细菌分离(NBRIP)培养基(g/L):葡萄糖 10.00,MgSO₄·7H₂O 0.25,MgCl₂·6H₂O 5.00,KCl 0.20,(NH₄)₂SO₄ 0.10,Ca₃(PO₄)₂ 5.00。

无机磷细菌筛选(NBRI-BPB)培养基:在 NBRIP 基础上加入 0.025 g/L pH 指示剂溴酚蓝。

解钾细菌筛选培养基(g/L):蔗糖 5.000,MgSO₄·7H₂O 0.500,FeCl₃ 0.005,土壤矿物 2.000,Na₂HPO₄ 2.000;土壤矿物:1份土壤加 10份 6 mol/L 的 HCl,煮沸 0.5 h,用蒸馏水淋洗至无氯离子反应为止。

King B 培养基(g/L,甘油单位为 mL/L):

蛋白胨 20.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5, K_2HPO_4 1.5, 甘油 10.0。制备固体培养基时加入终浓度为 20.0 g/L 的琼脂。

Salkowski 比色液 R2: 称取 4.5 g FeCl_3 溶于 300 mL 去离子水中, 缓慢加入 587 mL 浓硫酸, 冷却后定容至 1 L。

真空冷冻干燥仪, CHRIST 公司; 扫描电镜, 日立高新技术公司; 酶标仪, BioTek 有限公司。

1.3 PGPR 分离筛选

1.3.1 解有机磷和溶无机磷细菌的分离筛选

土壤悬液梯度稀释后取 10^{-3} – 10^{-7} 稀释液分别涂布于蒙金娜卵磷脂固体培养基, 30 °C 培养 4–7 d, 挑取解磷圈较大的菌落纯化后再次点种蒙金娜有机磷固体培养基验证解有机磷能力后保存。

土壤悬液梯度稀释后取 10^{-3} – 10^{-7} 稀释液分别涂布于 NBRI 固体培养基, 30 °C 培养 4–7 d, 挑取溶磷圈较大的菌落进行纯化后, 将其接种至含有 20 mL NBRI-BPB 培养基的 150 mL 三角瓶中, 使用未接菌的 NBRI-BPB 培养基作为空白对照, 30 °C、180 r/min 振荡培养 3 d, 取培养液 12 000 r/min 离心 10 min, 测定上清 OD_{600} 。 OD_{600} 小于 -1 具有较强的溶无机磷能力, OD_{600} 介于 -1 到 -0.5 具有中等的溶无机磷能力。

1.3.2 解钾细菌的分离筛选

土壤悬液梯度稀释后取 10^{-3} – 10^{-7} 稀释液分别涂布于以土壤矿物为唯一钾源的解钾细菌筛选固体培养基上, 30 °C 培养 4–7 d, 挑取生长速度较快、菌落形态较大的单菌落划线于解钾细菌筛选固体培养基上进行纯化后保存。

1.4 解钾细菌解钾能力的测定

在含有 50 mL 解钾细菌筛选培养基的 300 mL 三角瓶中接种 0.5 mL 在 LB 培养基中 28 °C、180 r/min 培养过夜的解钾细菌菌液, 未接种的

解钾细菌筛选培养基作为空白对照。30 °C、180 r/min 振荡培养 5 d 后, 将三角瓶中的所有培养液转移至蒸发皿中, 在水浴锅中浓缩至 10 mL 左右。加入体积分数为 6% 的 H_2O_2 , 继续蒸煮, 期间不断搅拌, 反复处理, 直至解钾细菌黏液消失。将上述液体过滤的滤液转移至 50 mL 容量瓶中定容。采用火焰分光光度法测定钾含量。

1.5 连香树实生苗接种

挑取 PGPR 单菌落接种于 50 mL LB 液体培养基中, 28 °C、180 r/min 振荡培养 48 h 后于 6 000 r/min 离心 5 min。菌体沉淀用无菌生理盐水洗涤 3 次后, 用无菌生理盐水调节至 10^8 CFU/mL。将上述菌悬液接种至一年生连香树实生苗(栽培于长治市规划和自然资源局苗圃大棚内)根际, 接种量为 5 mL/株, 对照组加等量无菌生理盐水, 每种处理设置 10 个重复。连香树实生苗置于温室中, 使用自然光照, 适时浇水。接种后 30 d 测量实生苗的苗高和地径。

1.6 植物促生特性的检测

1.6.1 IAA 分泌

将 LWK2 菌株单菌落接种至 LB 液体培养基中, 于 28 °C、120 r/min 培养 16 h, 使用无菌水调节 OD_{600} 至 0.05, 取 0.1 mL 接种至含有 100 mg/L 色氨酸的 King B 液体培养基(50 mL)中, 使用等体积无菌水接种的 King B 液体培养基作为空白对照。上述菌液于 28 °C、120 r/min 培养 7 d 后取 2 mL 菌液 12 000 r/min 离心 5 min, 取 1 mL 上清与 2 mL Salkowski 比色液 R2 混合, 避光静置 30 min 后测定 OD_{530} 。使用 IAA 标准曲线计算出培养液上清中 IAA 浓度。

1.6.2 ACC 脱氨酶

ACC 脱氨酶活性的测定参照文献[17]。将每分钟生成 1 μmol α -丁酮酸的量定义为 1 个酶活力单位, 单位酶活除以总蛋白含量即为 ACC

脱氨酶比活力(U/mg)。

1.7 菌种鉴定

1.7.1 扫描电镜观察

取 3 mL 在 LB 培养基中 28 °C、180 r/min 培养至 14 h 的菌液离心去上清, 本部分所有的离心条件均为 8 000 r/min 离心 3 min。0.2 mol/L pH 7.2 的磷酸缓冲液洗涤菌体 3 次。加入 1 mL 4% 戊二醛溶液(使用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液稀释)重悬菌体, 室温固定过夜后, 离心弃上清, 再次用 0.1 mol/L pH 7.2 的磷酸缓冲液洗涤 3 次。依次用 30%、50%、70%、90%和 100%乙醇脱水, 每次脱水处理时间为 15 min, 每种浓度乙醇分别脱水 2 次, 脱水处理后离心去上清。叔丁醇洗涤菌体 2 次, 每次 15 min。加入 1 mL 叔丁醇重悬菌体沉淀, 置于-80 °C冷冻 4 h 后, 使用真空冷冻干燥仪进行冷冻干燥。干燥后的样品粉末均匀撒在电导胶带上, 喷金处理后, 使用扫描电镜观察菌体形态。

1.7.2 16S rRNA 基因扩增

16S rRNA 基因序列扩增引物、PCR 反应体系及条件参考文献[18]。

1.8 全基因组序列测定及注释

LWK2 全基因组序列测定由杭州沃森生物技术有限公司完成。使用牛津纳米孔(Oxford nanopore technologies, ONT)三代测序平台。对接头、低质量和短片段 reads (长度<2 000 bp)进行过滤后, 使用 CanuV1.5 软件进行组装。组装结果经 RaconV3.4.3 软件矫正后, 利用 Circlator V1.5.5 软件进行环化和起始位点调整, 最终获得 LWK2 全基因组序列完成图。LWK2 全基因组序列由 NCBI 和 IMG/M (Integrated Microbial Genomes & Microbiomes, <https://img.jgi.doe.gov/>)分别进行注释和功能预测。

1.9 比较基因组分析

LWK2 与其他菌株全基因组序列的平均核苷酸序列一致性(average nucleotide identity,

ANI)使用在线工具 ANI calculator (<http://enve-omics.ce.gatech.edu/ani/index>)进行计算。利用 MEGA 6.0 构建基于 6 个看家基因(*recA*、*gyrB*、*rpoA*、*rpoB*、*rpoC* 和 *rpoD*)核苷酸串联序列的系统发育树。

1.10 植物促生及重金属抗性相关基因分析

IAA 合成通路及其相关基因使用 MetaCyc Pathway 和 KEGG Pathway 进行预测分析。铁载体和硝吡咯菌素合成基因簇使用 antiSMASH 进行分析。其他植物促生基因和重金属抗性相关基因通过基因组功能注释结果进行分析。

1.11 重金属抗性实验

LWK2 单菌落接种至 LB 液体培养基 30 °C、180 r/min 培养过夜。将其 OD_{600} 稀释至 0.5 后按 5%接种量分别接种至含有不同浓度重金属盐的新鲜 LB 液体培养基中。各重金属盐的检测浓度分别为: $CuSO_4$: 2、4 和 5 mmol/L; $ZnSO_4$: 4、8、10 和 12 mmol/L; $CdCl_2$: 2、3 和 4 mmol/L; $CoCl_2$: 1 和 2 mmol/L。各取 600 μ L 上述菌液加入 48 孔培养板中, 48 孔培养板最外部的孔中不添加检测菌液, 仅加入等体积的 LB 液体培养基。将 48 孔培养板放置于酶标仪中 30 °C振荡培养, 进行生长曲线测定。酶标仪振板振荡方式为连续双轨道, 振荡频率为 365 c/min, 检测波长 600 nm, 每 15 min 读取一次数据。

2 结果与分析

2.1 连香树根际 PGPR 的分离筛选及其对连香树实生苗的接种效应

为了得到能够促进连香树生长的 PGPR, 我们挑选了生长在山西历山国家级自然保护区较为健壮的连香树植株, 采集其根际土壤, 从中进行解有机磷、溶无机磷和解钾细菌的分离。从蒙金娜卵磷脂培养基中得到 19 株可形

成解磷圈的菌株, 经纯化复筛后筛选出 3 株解磷圈较大的解有机磷细菌(菌株 LOP45、LOP15 和 LOP51); 在 NBRIP 固体培养基上共得到 19 株菌, 将其分别接种至 NBRI-BPB 培养基, 15 株菌培养液上清的 OD_{600} 均低于 1, 从中筛选出 2 株 OD_{600} 最低的溶无机磷细菌菌株(菌株 LIP62 和 LIP54)用于后期的接种效应验证; 解钾细菌筛选固体培养基上共得到 2 株解钾细菌(菌株 LWK4 和 LWK2)。为了验证筛选到的这 7 株 PGPR 是否对连香树具有生长促进作用, 将其菌剂分别接种至一年生连香树实生苗根际, 温室培养 1 个月后, 测定连香树实生苗的苗高和地径。如表 1 所示, 除菌株 LIP54 和 LOP45 之外, 其他 5 株菌接种后连香树实生苗的苗高和地径分别增长了 4.88%–15.95% 和 9.94%–23.29%。其中以菌株 LWK2 对连香树实生苗的生长促进作用最为显著。因此挑选 LWK2 进行后续的促生特性及全基因组序列分析。

2.2 LWK2 菌株的促生特性分析

为了进一步挖掘菌株 LWK2 的植物促生潜力, 对菌株 LWK2 的解钾能力、产 IAA 能力、ACC 脱氨酶能力分别进行了测定。结果显

表 1 PGPR 接种对连香树实生苗的促生作用

Table 1 Effect of PGPR inoculation on the growth of *Cercidiphyllum japonicum* seedlings

Treatment	Seedling height (cm)	Ground diameter (mm)
LOP45	60.28±7.87bc	3.61±0.58bc
LOP15	62.42±10.63abc	3.54±0.52bcd
LOP51	62.32±5.83abc	3.65±0.40abc
LIP62	64.92±7.62ab	3.78±0.40ab
LIP54	55.64±6.45c	3.30±0.38cd
LWK4	63.44±8.25abc	3.55±0.45bcd
LWK2	68.90±14.64a	3.97±0.59a
Control	59.42±8.78bc	3.22±0.50d

不同小写字母代表显著性差异($P<0.05$)

The different lowercase letters represent significant differences ($P<0.05$).

示, 解钾细菌筛选培养基接种菌株 LWK2 振荡培养 5 d 后, 培养液中可溶性钾的浓度为 40.56 mg/L, 是对照组的 2.1 倍(图 1)。在 King B 培养基中培养 7 d 后, 菌液上清中的 IAA 浓度为 11.41 mg/L。LWK2 菌体细胞中检测到的 ACC 脱氨酶酶活高达 0.92 U/mg。综合以上结果, LWK2 是一株兼具解钾、产 IAA 和产 ACC 脱氨酶的 PGPR。

2.3 LWK2 菌株的鉴定

菌株 LWK2 为一株革兰氏阴性细菌。菌体呈短杆状, 大小约(0.4–0.6) $\mu\text{m}\times(0.9\text{--}1.9)$ μm (图 2)。将扩增得到的 LWK2 16S rRNA 基因序列上传至 EzTaxon-e 数据库中进行序列比对, 菌株 LWK2 的 16S rRNA 基因序列与伯克霍尔德氏菌属 11 个种模式菌株的 16S rRNA 基因序列相似度均大于 99.5%。因此确定菌株 LWK2 属于伯克霍尔德氏菌科(*Burkholderiaceae*)伯克霍尔德氏菌属(*Burkholderia*)。

2.4 LWK2 菌株全基因组特性分析

鉴于菌株 LWK2 的多种促生特性及其对连香树实生苗的促生作用, 为了进一步从分子水

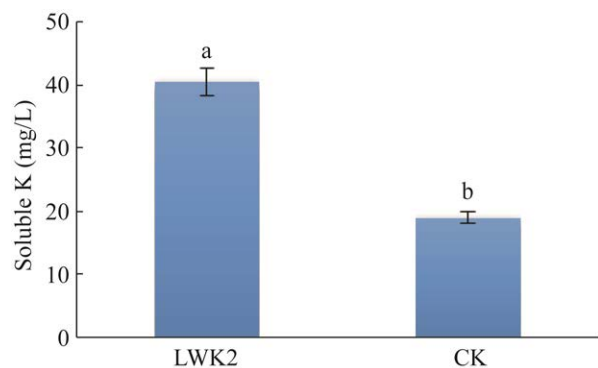


图 1 LWK2 菌株解钾能力 不同小写字母代表显著性差异($P<0.05$)

Figure 1 Potassium dissolving ability of strain LWK2. Different lowercase letters represent significant differences ($P<0.05$).

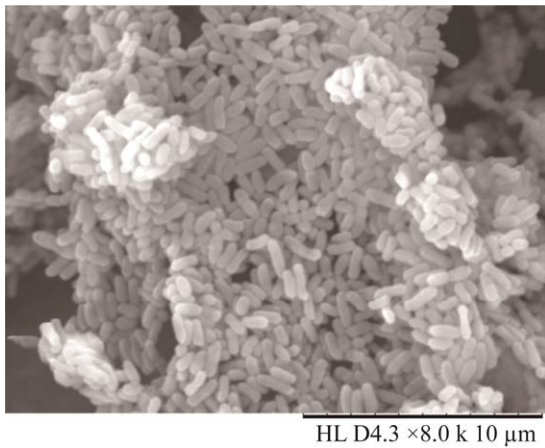


图2 LWK2菌株扫描电镜观察

Figure 2 Scanning electron microscopic observation of strain LWK2.

平上揭示菌株 LWK2 的促生机制, 对其进行了全基因组序列测定, 以挖掘出更多的促生相关基因。LWK2 全基因组包含 2 条染色体(染色体 1 和染色体 2)和 1 个质粒(图 3)。染色体 1、染色体 2 和质粒的大小分别为 3 713 209、3 026 422 和 880 277 bp; GC 含量分别为 66.50%、66.37%

和 65.69%。LWK2 全基因组共含有 6 743 个蛋白编码基因、18 个 rRNA、70 个 tRNA 和 127 个假基因。LWK2 全基因组序列已上传至 NCBI, 染色体 1、染色体 2 和质粒的序列号分别为 CP091307、CP091308 和 CP091309。

2.5 LWK2 菌株系统发育及比较基因组分析

通过 16S rRNA 基因序列比对, 初步判定 LWK2 属于伯克霍尔德氏菌属。为了进一步确定菌株 LWK2 的分类地位, 我们将 EzTaxon-e 数据库中与 LWK2 16S rRNA 基因序列相似度排在前面 21 位模式菌株的全基因组序列(使用 NCBI 数据库公布的基因组)进行提取, 与 LWK2 分别进行了平均核苷酸一致性比对。对于尚未公布全基因组信息的模式菌株, 我们使用 NCBI 数据库中与该菌株同种的参考基因组进行替代。LWK2 与吡咯伯克霍尔德氏菌 (*B. pyrrocinia*) 模式菌株 DSM 10685 全基因组之间的 ANI 值最高, 为 95.26%。该比值高于 ANI 分类阈值 95%。LWK2 与另外 20 株伯克霍尔

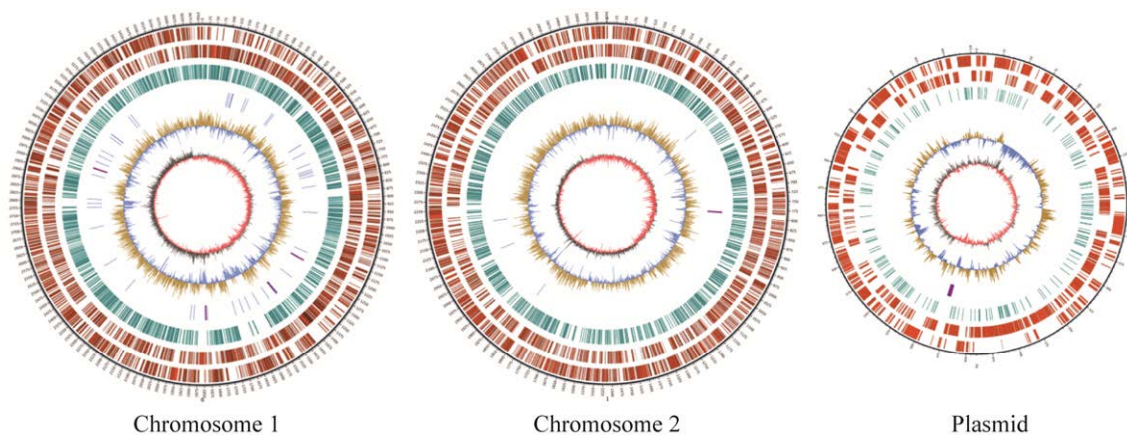


图3 LWK2菌株基因组圈图 由外向内每一圈分别代表: 圈1: 基因组大小标注; 圈2、3: 基因组正链和负链基因分布; 圈4: 重复序列; 圈5: tRNA(蓝色)和rRNA(紫色); 圈6: GC含量; 圈7: GC偏移

Figure 3 Circular genome map of strain LWK2. Each circle from outside to inside represents: Circle 1: Genome size; Circle 2 and 3: Genes distribution of positive and negative chains respectively; Circle 4: Repetitive sequence; Circle 5: tRNA (blue) and rRNA (purple); Circle 6: GC content; Circle 7: GC-skew.

德氏菌全基因组之间的 ANI 值均低于 95%。与此同时, 我们将 LWK2 和上述 21 株菌的 6 个看家基因 (*recA*、*gyrB*、*rpoA*、*rpoB*、*rpoC* 和 *rpoD*) 进行串联构建了系统发育树(图 4)。与 ANI 比对结果一致, LWK2 与 *B. pyrrocinia* DSM 10685 聚在同一分支。结合 ANI 比对结果, 判定 LWK2 为吡咯伯克霍尔德氏菌。

2.6 吡咯伯克霍尔德氏菌 LWK2 促生相关基因分析

为了从分子水平上揭示菌株 LWK2 对植物的促生机理, 对 LWK2 全基因组序列中的促生相关基因进行了分析。同时选取了另外 13 株已

公布全基因组序列的具有促生或生防作用的伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia*)菌株进行相应促生基因的分析, 并且与 LWK2 菌株进行了比较。

PGPR 通常以色氨酸为前体进行 IAA 的合成。根据 IAA 合成中间产物的不同, 目前在细菌中已发现 5 种以色氨酸为前体的 IAA 合成途径: 吲哚-3-丙酮酸(indole-3-pyruvate, IPyA)途径、3-吲哚乙酰胺(indole-3-acetamide, IAM)途径、吲哚-3-乙腈(indole-3-acetonitrile, IAN)途径、色胺(tryptamine, TAM)途径和色氨酸侧链氧化酶(tryptophan side chain oxidase, TSO)途径^[6]。通过基因注释及功能预测分析, 在 LWK2

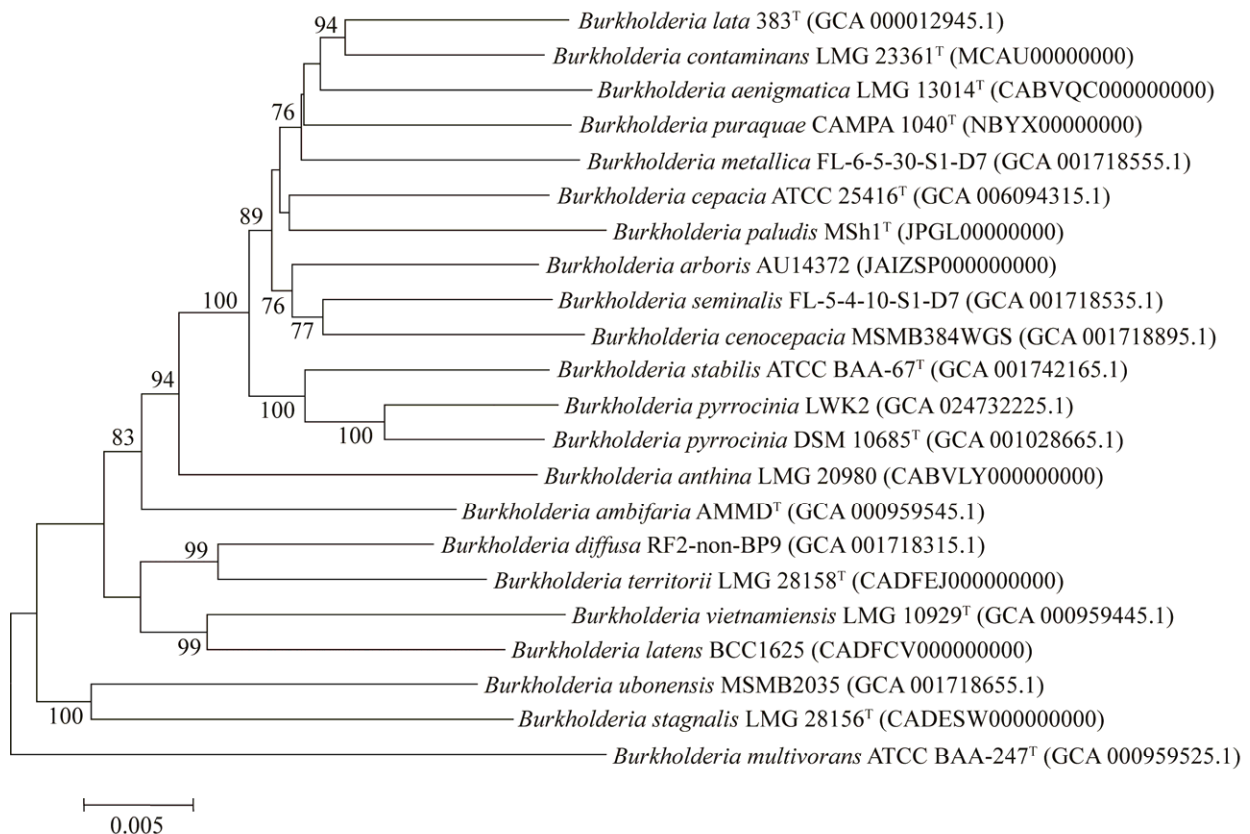


图 4 看家基因系统发育树 分支上的数字表示 bootstrap 值(1 000 次重复); 标尺: 每个位点核苷酸有 0.005 个取代; 括号中的序号代表菌株全基因组的 GenBank 登录号

Figure 4 Phylogenetic tree based on house-keeping genes. The number on each node represents the bootstrap value (1 000 replications); Bar: 0.005 substitutions per nucleotide position; The GenBank accession number of the whole genome of each strain was shown in each bracket.

全基因组中发现了 3 条 IAA 合成通路, 分别为 IAM 途径、IAN 途径和 TAM 途径(表 2)。IAM 途径包含两步催化反应, IAA 在色氨酸-2-单加氧酶的催化下形成 IAM, IAM 通过 IAM 水解酶或酰胺酶的作用形成 IAA^[6,19-20]。在 LWK2 全基因组中, 我们发现了 1 个色氨酸-2-单加氧酶编码基因(*L2Y90_27150*)和 4 个酰胺酶编码基因(*L2Y90_07025*、*L2Y90_24775*、*L2Y90_25285* 和 *L2Y90_33480*)。 *L2Y90_33480* 的编码产物与 PGPR *Variovorax boronicumulans* CGMCC 4969 中已知功能的酰胺酶 IamA (ATA56605)^[19]的氨基酸序列一致性为 53.8%, 而 *L2Y90_07025*、*L2Y90_24775* 和 *L2Y90_25285* 的编码产物与 IamA 的氨基酸序列一致性仅为 25.8%–27.8%。因此, 我们推测菌株 LWK2 有可能利用 *L2Y90_33480* 编码的酰胺酶将 IAM 转化为 IAA。 *L2Y90_27150* 编码的色氨酸-2-单加氧酶和 *L2Y90_33480* 编码的酰胺酶构成了 LWK2 中完整的 IAM 途径。对于 IAN 途径, 我们仅在 LWK2 基因组中发现了腈水解酶编码基因

(*L2Y90_04840*), 该酶是 IAN 途径中的关键催化酶, 可将 IAN 催化生成 IAA。然而催化色氨酸前体形成 IAN 的相关酶编码基因并未在 LWK2 全基因组中发现。TAM 途径由 3 步酶催化反应构成, 色氨酸脱羧酶催化色氨酸形成 TAM, 胺氧化酶催化 TAM 产生吲哚-3-乙醛(indole-3-acetaldehyde, IAAld), IAAld 经乙醛脱氢酶催化最终形成 IAA。LWK2 基因组中缺少色氨酸脱羧酶编码基因, 含有 2 个胺氧化酶编码基因(*L2Y90_23345* 和 *L2Y90_23395*)和 6 个乙醛脱氢酶编码基因(*L2Y90_12600*、*L2Y90_16465*、*L2Y90_20730*、*L2Y90_24525*、*L2Y90_33705* 和 *L2Y90_34375*)。因此, LWK2 基因组中含有完整的 IAM 途径和不完整的 IAN 及 TAM 途径。

对 13 株具有促生或生防作用的 *Burkholderia* 基因组中 IAA 合成途径进行分析(表 3)。所有菌株均含有 2 条或 2 条以上 IAA 合成通路相关基因。IAA 合成通路在各菌株中的分布、每株菌所含有的 IAA 合成途径种类及催化各反应相关

表 2 植物促生和重金属抗性相关基因

Table 2 List of genes related to plant growth-promotion and heavy metal resistance

LWK2 ORF ID (<i>L2Y90_</i>)	Gene	Function
27150		Tryptophan 2-monooxygenase (EC: 1.13.12.3)
33480		Amidase (EC: 3.5.1.4)
04840		Nitrilase (EC: 3.5.5.1)
23345, 23395		Monoamine oxidase (EC: 1.4.3.4)
12600, 16465, 20730, 24525, 33705, 34375		Aldehyde dehydrogenase (EC: 1.2.1.3)
23995		1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase (EC: 3.5.99.7)
24000		AcdR, Lrp/AsnC family transcriptional regulator
30880		Glucose dehydrogenase
20010	<i>pqqE</i>	Pyrroloquinolinequinone biosynthesis protein PqqE
20015	<i>pqqD</i>	Pyrroloquinolinequinone biosynthesis peptide chaperone PqqD
20020	<i>pqqC</i>	Pyrroloquinolinequinone synthase PqqC
20025	<i>pqqB</i>	Pyrroloquinolinequinone biosynthesis protein PqqB
20030	<i>pqqA</i>	Pyrroloquinolinequinone precursor peptide PqqA
00145	<i>orbL</i>	Acetyltransferase

(待续)

(续表 2)

LWK2 ORF ID (L2Y90_)	Gene	Function
00150	<i>pvdF</i>	<i>N</i> ⁵ -hydroxyornithine transformylase PvdF
00155	<i>orbA</i>	TonB-dependent ferric-ornibactin receptor
00160	<i>pvdA</i>	L-ornithine <i>N</i> ⁵ -oxygenase
00165	<i>orbK</i>	Acetyltransferase
00170	<i>orbJ</i>	Non-ribosomal peptide synthase
00175	<i>orbI</i>	Non-ribosomal peptide synthase
00180	<i>orbE</i>	ATP-binding cassette transporter
00185	<i>orbB</i>	Iron-siderophore ABC transporter substrate-binding protein
00190	<i>orbF</i>	Siderophore-iron reductase
00195	<i>orbD</i>	Fe ³⁺ -hydroxamate ABC transporter permease
00200	<i>orbC</i>	Iron-chelate-transporting ATPase
00205	<i>orbG</i>	TauD/TfdA family dioxygenase
00210	<i>orbH</i>	MbtH family NRPS accessory protein
00215	<i>orbS</i>	RNA polymerase factor sigma-70
31085	<i>prnD</i>	Aminopyrrolnitrin oxygenase
31090	<i>prnC</i>	Monodechloroaminopyrrolnitrin halogenase
31095	<i>prnB</i>	Monodechloroaminopyrrolnitrin synthase
31100	<i>prnA</i>	Tryptophan 7-halogenase (EC: 1.14.19.9)
24305		TolC family outer membrane protein
24310	<i>cusB</i>	Efflux RND transporter periplasmic adaptor
24315	<i>cusA</i>	Efflux RND transporter permease subunit
24320	<i>cusF</i>	Copper-binding proteinCusF
24385	<i>copS</i>	Two-component system heavy metal sensor histidine kinase CopS
24390	<i>copR</i>	Two-component system heavy metal response regulator CopR
24405		TolC family outer membraneprotein
24410		Copper oxidase
24415		Copper-binding protein CusF
24420	<i>copC</i>	Copper homeostasis periplasmic binding protein
24425		CopD family protein
13855	<i>cueR</i>	Cu(I)-responsive transcriptional regulator
22005		Cu(I)-exporting P-type ATPase
09585		Copper chaperone
25665	<i>czcC</i>	Cobalt-zinc-cadmium efflux system outer membrane protein
25670	<i>czcB</i>	Cobalt-zinc-cadmium efflux system membrane fusion protein
25675	<i>czcA</i>	Cobalt-zinc-cadmium efflux RND transporter
25680	<i>czcR</i>	Two-component system heavy metal response regulator CzcR
25685	<i>czcS</i>	Two-component system heavy metal sensor histidine kinaseCzcS
23235		CDF family Co(II)/Ni(II) efflux transporter
23675	<i>arsR</i>	ArsR family transcriptional regulator
23680	<i>arsC</i>	Arsenate reductase ArsC
23685	<i>arsB</i>	ACR3 family arsenite efflux transporter
23690	<i>arsH</i>	Arsenical resistance protein ArsH

表3 *Burkholderia pyrrocinia* LWK2 与 13 株促生性伯克霍尔德氏菌的植物促生基因比较Table 3 Comparison of plant growth-promoting genes between *Burkholderia pyrrocinia* LWK2 and 13 plant beneficial *Burkholderia* strains

Strain	Source	IAA synthesis pathways	ACC deaminase gene <i>acdS</i>	P solubilization genes	Siderophores	Pyrrrolnitrin gene cluster <i>prnABCD</i>
<i>B. pyrrocinia</i> LWK2	<i>C. japonicum</i> rhizosphere	TAM, IAN, IAM	+	<i>gdh, pqqABCDE</i>	Ornibactin	+
<i>B. pyrrocinia</i> DSM 10685	Soil	TAM, IAN, IAM	+	<i>gdh, pqqC</i>	Ornibactin	+
<i>B. pyrrocinia</i> mHSR5	Rhizosphere of sugar beet plants	TAM, IAN, IAM	+	<i>gdh, pqqABCDE</i>	Ornibactin	-
<i>B. pyrrocinia</i> Hargis	Mixed forest near oak tree	IAN, IAM	+	<i>gdh, pqqABCDE</i>	Ornibactin	+
<i>B. pyrrocinia</i> Lyc2	Tobacco rhizosphere	IAN, IAM	+	<i>gdh, pqqABCDE</i>	Ornibactin	+
<i>B. pyrrocinia</i> CH-67	Forest soil	TAM, IAM, IPyA	+	<i>gdh, pqqC</i>	/	+
<i>B. pyrrocinia</i> JK-SH007	Poplar endophyte	TAM, IAN, IAM	+	<i>gdh, pqqABCDE</i>	Ornibactin	+
<i>B. seminalis</i> 869T2	Vetiver grass endophyte	IAN, IAM	+	<i>gdh, pqqABCDE</i>	Ornibactin	+
<i>B. contaminans</i> NZ	<i>Corchorus olitorius</i> seed	IAN, IAM	+	<i>gdh, pqqABCDE</i>	/	+
<i>B. ambifaria</i> AMMD	Pea rhizosphere	IAN, IAM	+	<i>gdh, pqqABCDE</i>	Ornibactin	+
<i>B. cenocepacia</i> CR318	Roots of starch corn	TAM, IAN, IAM	+	<i>gdh, pqqABCDE</i>	Ornibactin	-
<i>Burkholderia</i> sp. Nafp2/4-1b	Rhizosphere of pristine grassland	TAM, IAN, IAM	+	<i>gdh, pqqABCDE</i>	Ornibactin	-
<i>Burkholderia</i> sp. BE17	Maize rhizosphere	IAN, IAM	+	<i>gdh, pqqABCDE</i>	/	+
<i>Burkholderia</i> sp. BE24	Maize rhizosphere	TAM, IAM	+	<i>gdh, pqqABCDE</i>	Ornibactin	+

+: 基因组中含有相应基因; -: 基因组中不含相应基因; /: 基因组为草图无法分析

+: The genome contains detected genes; -: The genome doesn't contain detected genes; /: Synthesis gene clusters cannot be analyzed due to draft genomes.

酶的种类却存在多样性。其中仅有 *B. pyrrocinia* JK-SH007 携带有与 LWK2 类似的 IAA 合成途径。所有菌株均含有 IAM 途径相关基因, 分别有 11、7 和 1 个菌株含有 IAN、TAM 和 IPyA 途径相关基因。因此, IAM、IAN 和 TAM 途径在植物有益 *Burkholderia* 的 IAA 合成途径中占主导地位。尽管调查的 13 株 *Burkholderia* 均含有 IAA 合成相关基因, 但仅有 5 株菌含有完整的 IAA 合成途径, 其中, 1 株菌(*B. pyrrocinia* JK-SH007)同时含有完整的 IAM 和 TAM 途径, 4 株菌(*B. pyrrocinia* Hargis、*B. pyrrocinia* Lyc2、*B. seminalis* 869T2、*Burkholderia* sp. BE17)仅含

有一条完整的 IAA 合成途径且均为 IAM 途径。

通过基因组功能注释, 我们在 LWK2 基因组中找到了 ACC 脱氨酶编码基因 *acdS* (*L2Y90_23995*)及其调控基因 *acdR* (*L2Y90_24000*) (表 2)。LWK2 菌株中 *AcdS* 和 *AcdR* 与目前 ACC 脱氨酶编码基因及其调控机制研究较为清楚的 *Pseudomonas* sp. UW4^[21-22] 中对应蛋白 (PputUW4_04154、PputUW4_04155) 的氨基酸序列一致性分别为 84.0% 和 65.9%。在挑选的另外 13 株植物促生性 *Burkholderia* 的基因组中均含有 *acdS* 和 *acdR* 基因(表 3)。通过氨基酸序列比对, 菌株 LWK2 中 *AcdS* 与这 13 株 *Burkholderia*

中 AcdS 氨基酸序列一致性介于 92.0%–99.7%, AcdR 氨基酸序列一致性介于 91.7%–99.4%。以上结果说明植物促生性 *Burkholderia* 普遍具有产 ACC 脱氨酶能力, 且在该属中 ACC 脱氨酶氨基酸序列高度保守。Nascimento 等对 AcdS 序列进行功能分析后发现 5 个氨基酸残基位点 (Lys51、Ser78、Tyr294、Glu295 和 Leu322, 以 *Pseudomonas* sp. UW4 中 AcdS 氨基酸序列作为参考标准) 对于 ACC 脱氨酶活性至关重要^[23]。尤其是 Glu295 和 Leu322, 其突变会直接导致 ACC 脱氨酶活性的丧失^[24]。LWK2 菌株及 13 株植物促生性 *Burkholderia* 中的 AcdS 均含有这 5 个关键氨基酸残基。因此我们推测这 13 株 *Burkholderia* 均可以产生具有活性的 ACC 脱氨酶。

PGPR 主要通过分泌有机酸将土壤中难溶性磷转化为植物可直接利用的磷, 从而提高植物对磷元素的吸收。其中葡萄糖酸是转化难溶性磷最主要的有机酸之一^[25]。许多溶磷细菌可以合成葡萄糖脱氢酶, 葡萄糖脱氢酶在辅因子吡咯喹啉(pyrroloquinolinequinone, PQQ)的参与下将葡萄糖氧化为葡萄糖酸^[26]。在 LWK2 基因组中, 我们发现了葡萄糖脱氢酶的编码基因 *gdh* (L2Y90_30880) 及 PQQ 的合成基因簇 *pqqABCDE* (L2Y90_20030、L2Y90_20025、L2Y90_20020、L2Y90_20015 和 L2Y90_20010) (表 2, 图 5)。另外 13 株促生性 *Burkholderia* 基因组上均携带有 *gdh* 基因, 其中 11 株菌基因组含有 *pqqABCDE* 基因簇, 2 株菌 (*B. pyrrocinia* DSM 10685 和 *B. pyrrocinia* CH-67) 仅携带有 *pqqC* 基因 (表 3)。

Burkholderia 主要产生 2 种类型的铁载体, 分别为 ornibactin 和 malleobactin^[27]。利用 antiSMASH 分析, 我们在 LWK2 基因组上找到了一个完整的 ornibactin 类铁载体合成基因簇

(表 2, 图 5)。Ornibactin 是由 L-鸟氨酸-D-羟基天冬氨酸-L-丝氨酸-L-鸟氨酸作为基本结构骨架构成的四肽氧肟酸类铁载体^[28]。Ornibactin 基因簇(L2Y90_00145–L2Y90_00215)位于 LWK2 染色体 1 上, 全长 30 392 bp, 由 15 个基因构成: (1) 1 个转录调节基因 *orbS* (L2Y90_00215); (2) 2 个非核糖体肽合酶编码基因 *orbI* (L2Y90_00175) 和 *orbJ* (L2Y90_00170); (3) 6 个 ornibactin 合成相关基因(*orbH*、*orbG*、*orbK*、*pvdA*、*pvdF* 和 *orbL*), 其中, *orbK* (L2Y90_00165) 和 *orbL* (L2Y90_00145) 编码乙酰转移酶, 负责 N 端 L-鸟氨酸 N^5 位置的乙酰化, *pvdA* (L2Y90_00160) 和 *orbG* (L2Y90_00205) 的编码产物均为加氧酶, 分别负责 N 端 L-鸟氨酸 N^5 位置和 L-天冬氨酸 β 碳原子的羟基化, *pvdF* (L2Y90_00150) 编码 N^5 -羟基鸟氨酸转甲酰酶, 负责 C 端 L-鸟氨酸 N^5 位置的甲酰化, *orbH* (L2Y90_00210) 编码 MbtH 家族铁载体合成辅助蛋白; (4) 6 个 ornibactin 转运相关基因(*orbC*、*orbD*、*orbF*、*orbB*、*orbE* 和 *orbA*), *orbE* (L2Y90_00180) 编码的 ATP 结合转运蛋白负责将 ornibactin 从胞内跨膜转运至外周胞质, ornibactin 与 Fe^{3+} 结合后被 *orbA* (L2Y90_00155) 编码的特异性受体识别, 通过 *orbBDC* (L2Y90_00185、L2Y90_00195 和 L2Y90_00200) 编码的 ATP 结合转运蛋白运送至胞内后, ornibactin- Fe^{3+} 复合物中的 Fe^{3+} 被 *orbF* (L2Y90_00190) 编码的还原酶还原成 Fe^{2+} 并从复合物上释放出来(图 6)^[29]。菌株 LWK2 与 *B. ambifaria* AMMD 中 ornibactin 合成基因簇^[30] 排列方式完全一致且一致性极高, 15 个基因的编码产物的氨基酸序列一致性高达 88.4%–97.5%。在另外 13 株植物促生性 *Burkholderia* (包括 *B. ambifaria* AMMD) 中, 除 3 株菌 (*B. pyrrocinia* CH-67、*B. contaminans* NZ 和 *Burkholderia* sp. BE17) 因基因组草图而无法找到完整的铁载体

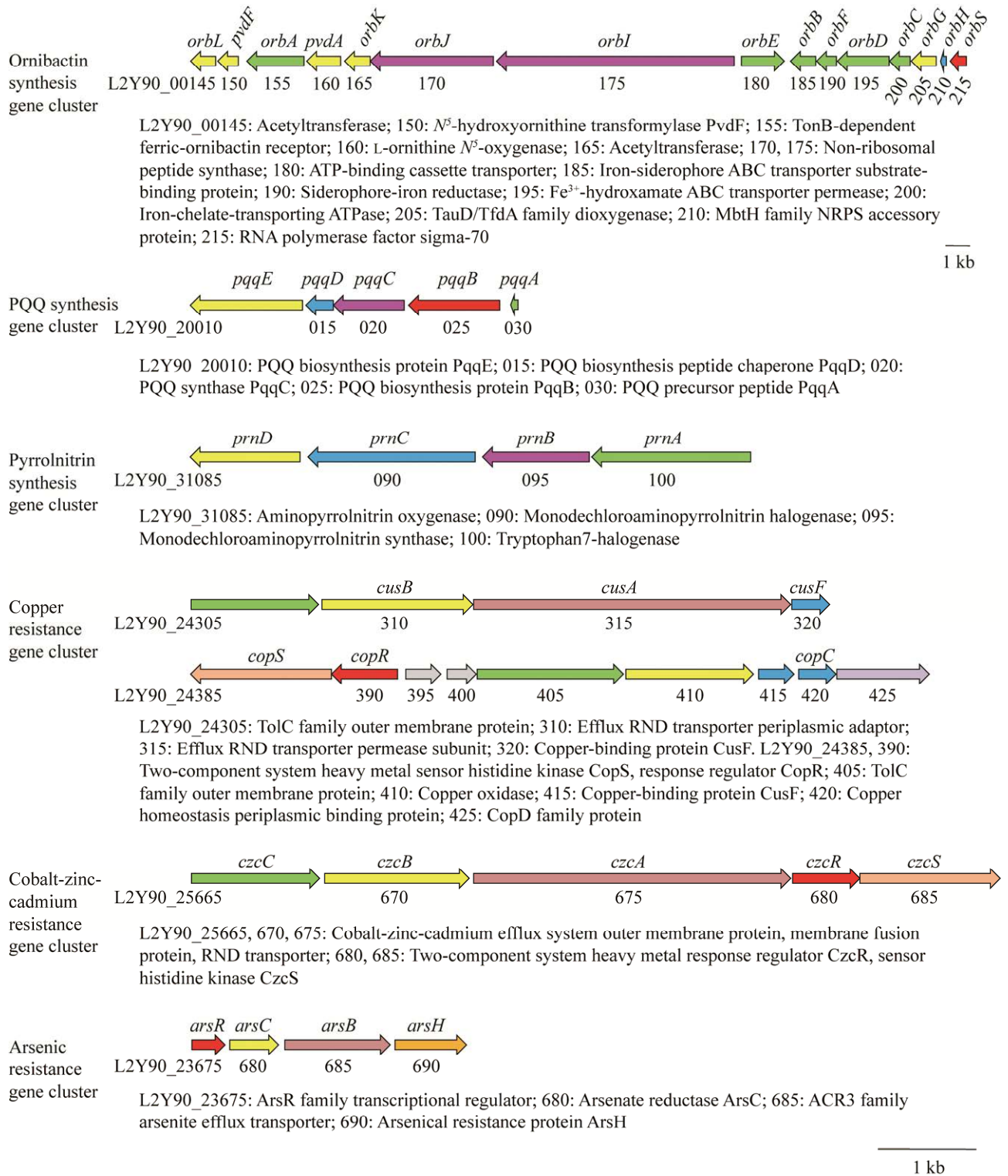


图5 LWK2基因组中植物促生和重金属抗性相关基因簇

Figure 5 Gene clusters related to plant growth-promotion and heavy metal resistance in the LWK2 genome.

合成基因簇外, 另外 10 株 *Burkholderia* 均携带有 ornibactin 类铁载体合成基因簇(表 3)。这说明 ornibactin 类铁载体在植物促生性 *Burkholderia* 中具有一定的普遍性。

Burkholderia 中的许多菌株都可以产生硝吡咯菌素, 它是一种能够拮抗多种植物病原真菌的吡咯卤代代谢产物^[31]。利用 antiSMASH 分析, 在 LWK2 基因组上发现了硝吡咯菌素合成基因簇 *prnABCD* (*L2Y90_31100*、*L2Y90_31095*、*L2Y90_31090* 和 *L2Y90_31085*) (表 2, 图 5)。*prnA* (*L2Y90_31100*) 编码色氨酸 7-卤化酶, 负责向色氨酸前体中添加氯, 生成 7-氯-色氨酸。7-氯-色氨酸依次被 *prnB* (*L2Y90_31095*) 和 *prnC* (*L2Y90_31090*) 编码的单脱氯氨基硝吡咯合成酶和卤化酶催化, 经中间产物单脱氯氨基硝吡咯而形成氨基硝吡咯。*prnD* (*L2Y90_31085*) 编码的氨基硝吡咯加氧酶最终将氨基硝吡咯催化形成硝吡咯菌素(图 6)。在另外 13 株促生性 *Burkholderia* 基因组上, 除 *B. pyrrocinia* mHSR5、*Burkholderia* sp. Nafp2/4-1b 和 *B. cenocepacia* CR318 之外, 剩余 10 株 *Burkholderia* 菌株均携带有 *prnABCD* 基因簇(表 3)。进一步说明了植物有益的 *Burkholderia* 产生硝吡咯菌素的普遍性。

2.7 吡咯伯克霍尔德氏菌 LWK2 重金属抗性基因分析

在 LWK2 基因组中发现了许多重金属抗性相关基因, 包括铜、钴-锌-镉和砷抗性基因。铜抗性基因主要分布在 2 个基因簇上(表 2, 图 5)。第 1 个基因簇包含 4 个基因(*L2Y90_24305*、*L2Y90_24310*、*L2Y90_24315* 和 *L2Y90_24320*), *L2Y90_24310*、*L2Y90_24315* 和 *L2Y90_24320* 的编码产物分别与大肠杆菌中的周质空间接头蛋白 CusB (b0574)、渗透酶蛋白 CusA (b0575) 和周质伴侣 CusF (b0573)^[32] 同源, 氨基酸序列一致性分别为 30.1%、60.8% 和 20.3%。*L2Y90_24305* 位

于 *cusB* (*L2Y90_24310*) 基因上游, 编码产物为 TolC 家族外膜蛋白, 该蛋白与大肠杆菌中属于 OMF 家族的外膜蛋白 CusC (b0572) 的氨基酸序列一致性和相似性分别为 18.2% 和 31.4%, 我们推测该蛋白有可能与大肠杆菌中 CusC 蛋白发挥相同作用。第 2 个基因簇含有 7 个铜抗性基因 (*L2Y90_24385*、*L2Y90_24390*、*L2Y90_24405*、*L2Y90_24410*、*L2Y90_24415*、*L2Y90_24420* 和 *L2Y90_24425*), 其中, *L2Y90_24390/L2Y90_24385* 编码双组分系统 CopR/CopS; *L2Y90_24405* 编码一个 TolC 家族外膜蛋白, 与大肠杆菌中 CusC (b0572) 氨基酸序列一致性为 21.4%; *L2Y90_24410* 编码产物为铜氧化酶, 与 *Cupriavidus metallidurans* CH34 中 CopA (Rmet_5671) 蛋白序列一致性为 22.5%; *L2Y90_24415* 编码铜结合蛋白, 与大肠杆菌中 CusF (b0573) 序列一致性为 24.2%; *L2Y90_24420* 和 *L2Y90_24425* 的编码产物分别与 *C. metallidurans* CH34 中 CopC (Rmet_5669) 和 CopD (Rmet_5668) 蛋白^[33] 同源, 氨基酸序列一致性分别为 37.3% 和 23.9%。

除上述 2 个基因簇外, 还在 LWK2 基因组上其他位置发现了 3 个铜抗性相关基因 (*L2Y90_13855*、*L2Y90_22005* 和 *L2Y90_09585*) (表 2), *L2Y90_13855* 编码产物与大肠杆菌中铜响应转录因子 CueR (b0487) 同源, 氨基酸序列一致性为 40.7%。*L2Y90_22005* 编码产物为铜转运 P 型 ATP 酶, 由 1 032 个氨基酸残基构成。该蛋白 193–1 032 位残基与大肠杆菌中铜转运 ATP 酶 CopA (b0484, 834 个氨基酸残基构成)^[34-35] 1–834 位氨基酸残基的一致性为 40.1%。在大肠杆菌中, *CopA* 的转录受 CueR 调控, 该基因启动子区 -35–-10 区的一段 27 bp 的 DNA 是 CueR 的结合调控区域^[36]。在 *L2Y90_22005* 基因启动子区也发现了一段与上述结合调控区域高度相似的序列, 因此我们推测, *L2Y90_13855* 编码的 CueR 类

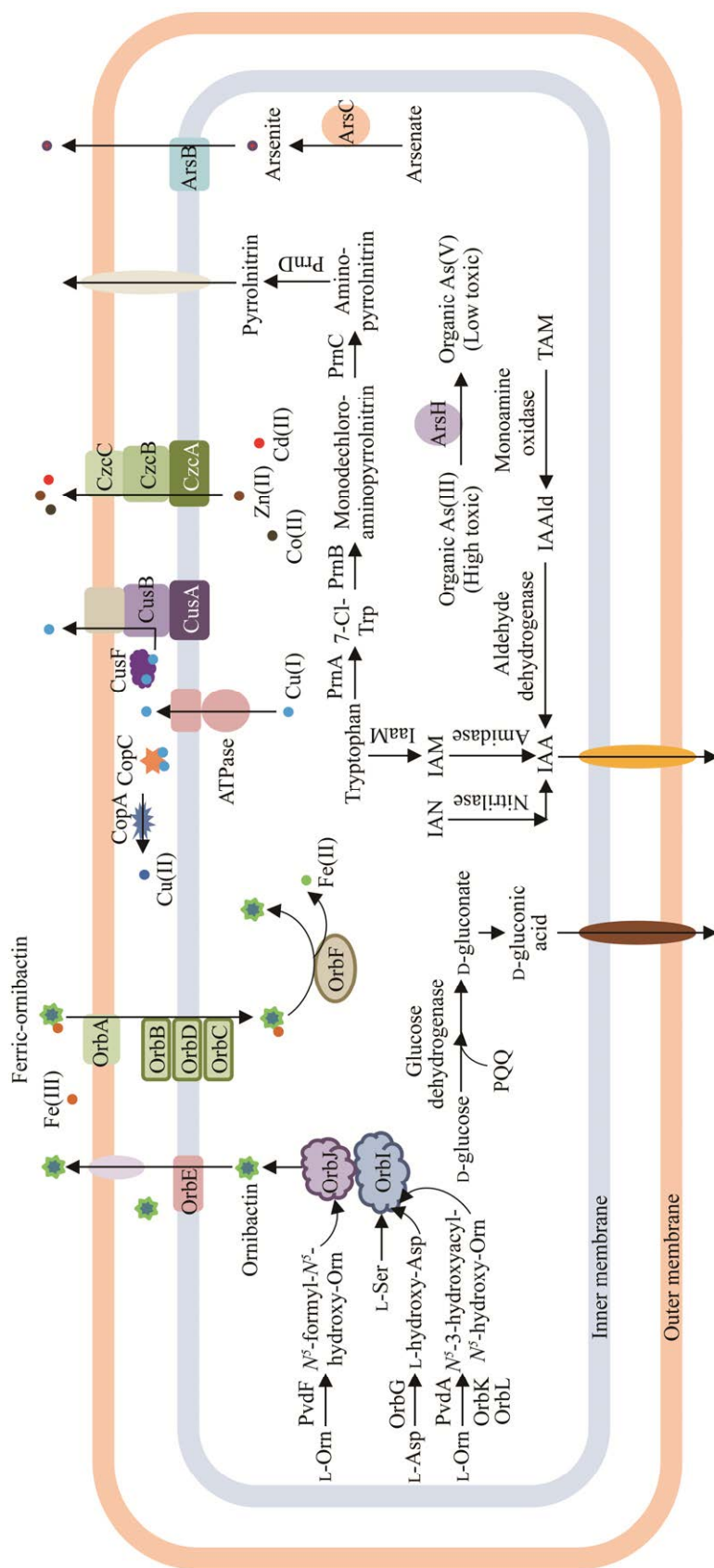


图 6 LWK2植物促生与重金属抗性机制预测模式图 IAN: 吲哚-3-乙腈; IAM: 3-吲哚乙酰胺; TAM: 色胺; IAAld: 吲哚-3-乙醛; 7-Cl-Trp: 7-氯-色氨酸; Organic As: 有机砷化合物; ATPase: 由L2Y90_22005编码的ATP酶; PQQ: 吡咯喹啉

Figure 6 Speculated model of LWK2 plant growth promotion and heavy metal resistance mechanism. IAN: Indole-3-acetonitrile; IAM: Indole-3-acetamide; TAM: Tryptamin; IAAld: Indole-3-acetaldehyde; 7-Cl-Trp: 7-chloro-tryptophan; Organic As: Organic arsenic compounds; ATPase: ATPase encoded by L2Y90_22005; PQQ: Pyrroloquinoline quinol.

调控因子也对 *L2Y90_22005* 基因具有调控作用。*L2Y90_09585* 编码一个铜伴侣蛋白, 该蛋白含有一个典型的N端一价铜离子结合基序MXCXXC, 其氨基酸序列与目前已报道的 *Enterococcus hirae* 中铜伴侣蛋白 CopZ (EHR_09080)^[37-38] 的序列一致性和相似度分别为 26.4% 和 43.1%。然而 *L2Y90_09585* 并不像目前已知的铜伴侣蛋白基因 *copZ* 一样, 和 1 个铜转运 ATP 酶基因连锁在同一个操纵子上^[37,39], 该基因周围并未发现类似的铜转运 ATP 酶基因, 因此 *L2Y90_09585* 编码蛋白的具体功能还有待进一步验证。

在 LWK2 基因组中 2 号染色体上, 携带有一个钴-锌-镉抗性相关基因簇 *czcCBARS* (*L2Y90_25665*、*L2Y90_25670*、*L2Y90_25675*、*L2Y90_25680* 和 *L2Y90_25685*) (表 2, 图 5)。*L2Y90_25665*、*L2Y90_25670* 和 *L2Y90_25675* 分别编码外膜蛋白、周质空间接头蛋白和内膜蛋白。3 个组分共同构成了钴-锌-镉外排转运系统 (图 6)。*L2Y90_25680* 和 *L2Y90_25685* 共同编码了双组分系统 CzcR/S, 该系统可被 Cd^{2+} 、 Zn^{2+} 或 Co^{2+} 激活, 从而调控 *czcCBA* 的表达。LWK2 中 CzcCBARS 与重金属抗性菌株 *C. metallidurans* CH34^[40-41] 中对应蛋白 (Rmet_5982、Rmet_5981、Rmet_5980、Rmet_5978、Rmet_5977) 的氨基酸序列一致性介于 31.2%–69.8%。在 *C. metallidurans* CH34 的 *czc* 基因簇中, *czcA* 基因下游还存在一个 CDF 家族蛋白编码基因 *czcD*, CzcD 对 *czcCBA* 基因簇的表达具有抑制作用^[42]。在 LWK2 菌株的 *czc* 基因簇中并未发现 *czcD* 基因, 但是在 *czcCBARS* 上游约 524 kb 处发现了一个 CDF 家族蛋白编码基因 (*L2Y90_23235*), 该基因编码产物与 *C. metallidurans* CH34 CzcD (Rmet_5979) 的序列一致性和相似性分别为 21.1% 和 33.1%。该基因编码产物是否行使与 CzcD 相似的调控作用还需进一步验证。

在 LWK2 基因组中 2 号染色体上还发现了一个砷抗性相关基因簇 *arsRCBH* (*L2Y90_23675*、*L2Y90_23680*、*L2Y90_23685* 和 *L2Y90_23690*) (表 2, 图 5)。该基因簇的编码产物包括调节 *ars* 操纵子转录过程的调控因子 ArsR (*L2Y90_23675*), 催化砷酸盐转化为亚砷酸盐的砷酸盐还原酶 ArsC (*L2Y90_23680*), ACR3 家族砷酸盐外排转运蛋白 ArsB (*L2Y90_23685*), 以及砷抗性蛋白 ArsH (*L2Y90_23690*)^[43]。ArsH 是一个有机砷氧化酶, 可以将有机砷三价化合物氧化为五价^[44], 此外, ArsH 对砷引起的细胞氧化损伤还具有一定的保护作用^[45]。

2.8 吡咯伯克霍尔德氏菌 LWK2 重金属抗性表型验证

在通过基因组分析发现了铜、钴-锌-镉和砷抗性基因的基础上, 测定了 LWK2 菌株在添加有不同浓度重金属盐 (CuSO_4 、 ZnSO_4 、 CdCl_2 和 CoCl_2) 的 LB 培养基中的生长曲线, 以此来验证 LWK2 对上述重金属盐的耐受力。如图 7 所示, 当 LB 培养基中分别添加 2 mmol/L CuSO_4 、4 mmol/L ZnSO_4 、2 mmol/L CdCl_2 或 1 mmol/L CoCl_2 时, 菌株 LWK2 的生长受到了一定抑制, LWK2 能够维持生长的最高重金属浓度分别为 CuSO_4 4 mmol/L、 ZnSO_4 10 mmol/L、 CdCl_2 3 mmol/L 和 CoCl_2 1 mmol/L。相较而言, LWK2 对 ZnSO_4 的耐受能力最强, 当培养基中加入 4 mmol/L ZnSO_4 时, LWK2 菌体生长才开始出现一定的抑制现象, 即使在含有高达 10 mmol/L ZnSO_4 的培养基中, LWK2 依然可以维持生长。然而 LWK2 对 CoCl_2 的抗性较差, 该菌株仅能在含有 1 mmol/L CoCl_2 的培养基中维持生长, 当 CoCl_2 浓度提升至 2 mmol/L 时, LWK2 的生长完全被抑制。以上结果说明菌株 LWK2 确实对铜、锌、镉和钴这 4 种重金属具有抗性。

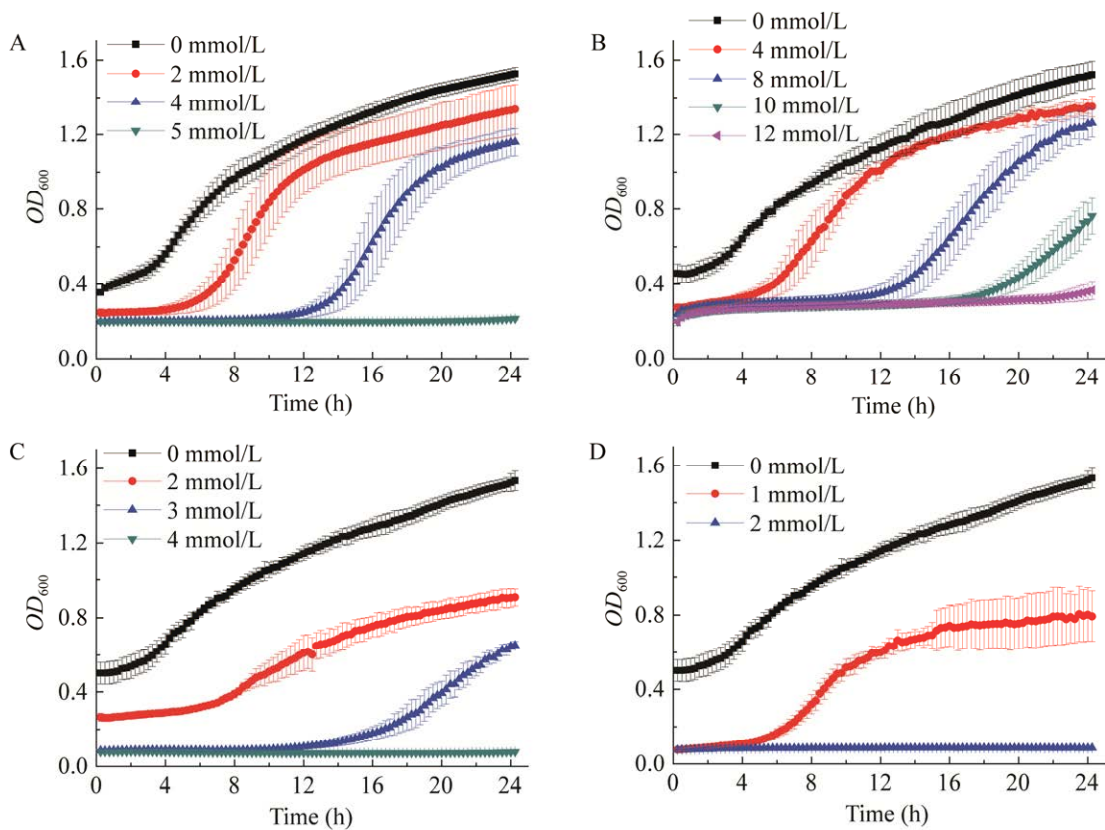


图7 LWK2菌株对不同重金属的抗性验证

Figure 7 Validation of LWK2 strain resistance to various heavy metals. A: CuSO_4 . B: ZnSO_4 . C: CdCl_2 . D: CoCl_2 .

3 讨论与结论

Burkholderia 属于 β -变形菌亚门, 其属内菌种成员十分丰富, 对各种生态位都具有高度的适应性^[46]。尽管 *Burkholderia* 中部分成员对人类、动物或植物具有致病性, 但大量报道表明该属中有相当一部分成员属于植物有益菌类, 不仅能促进植物生长, 还可以提高植物的抗病性^[47]。LWK2 是我们从濒危植物连香树根际土壤中分离得到的一株能显著提高连香树生长的促生细菌, 经过菌种鉴定初步断定该菌株为 *B. pyrrocinia*。目前共有 15 株 *B. pyrrocinia* 在 NCBI 数据库中公布了全基因组序列, 其中有 5 株菌(*B. pyrrocinia* DSM 10685、mHSR5、

Hargis、Lyc2 和 CH-67)属于植物有益菌类。在这 5 株公布全基因组序列的植物有益 *B. pyrrocinia* 中, 仅 *B. pyrrocinia* JK-SH007 有较多文献对其植物促生和生防机制进行了报道^[48-50]。本文在通过实验验证了 LWK2 的解钾、产 IAA 和 ACC 脱氨酶等植物促生特性的基础上, 对其全基因组序列进行了测定和分析, 重点对各种与植物促生相关的基因和基因簇进行了分析, 发现了大量与 IAA 合成、产 ACC 脱氨酶、溶磷、铁载体和硝吡咯菌素合成相关的基因和基因簇。此外, LWK2 基因组中还携带有大量铜、钴-锌-镉和砷等重金属抗性基因(表 2, 图 5), 并且对铜、锌、镉和钴具有抗性, 尤其是对锌的抗性最为显著。这说明 LWK2 不仅可用于微生物肥

料的开发应用, 对于生长在重金属污染土壤环境中植物的抗重金属能力的提高也具有潜在的应用价值。*B. pyrrocinia* LWK2 全基因组序列的测定丰富了目前为数不多的植物促生性 *B. pyrrocinia* 基因组数据库, 更重要的是, 对其植物促生和抗重金属相关基因的深入分析, 对于今后深入解析该菌株的植物促生和抗重金属机制提供了重要的理论基础。

IAA 合成与分泌是 PGPR 重要的促生特性之一。IAA 不仅可以调节植物的生长发育, 作为信号分子介导植物和微生物间相互作用, 对细菌自身的许多生理活动也发挥着重要的调节作用, 如增强细菌对各种胁迫环境的适应性等^[51-53]。在分析的 13 株对植物有益的 *Burkholderia* 以及 LWK2 基因组中, 均分布有 IAA 合成通路相关基因, 说明 IAA 合成在植物有益 *Burkholderia* 中的普遍性。LWK2 基因组中携带的 3 条 IAA 合成通路中仅有 1 条(TAM 途径)为完整的 IAA 合成通路(图 6), 调查的另外 13 株植物有益 *Burkholderia* 中也仅有 5 株菌携带有完整的 IAA 合成途径。这说明并非所有的植物有益 *Burkholderia* 都可以直接以色氨酸为前体合成 IAA。2018 年, Sun 等报道并分析了一株不能利用色氨酸合成 IAA 的植物根际促生细菌 *Variovorax boronicumulans* CGMCC 4969, 该菌株可以利用 IAN 作为前体合成 IAA, 并且 IAN 的添加可以提高脲水解酶的表达量^[19]。细菌中 IAA 合成的中间产物 IAM、TAM、IAN 和 IPyA 都属于植物的内源性化合物^[54-57], 我们推测当 PGPR 进入植物体内后可以利用植物中的这些内源性化合物作为前体合成 IAA。其产 IAA 能力有可能会优于培养基培养条件下的产量。PGPR 通过 IAA 合成途径的交叉和共享加强了其与植物之间的相互作用与联系。

铁载体作为一种铁螯合剂, 在不同的

Burkholderia 中发挥的作用也有所不同。在具有植物促生或生防作用的 *Burkholderia* 中, 铁载体可以竞争性夺取周围环境中有限的铁离子, 从而抑制病原微生物的生长^[9]; 而对于病原性尤其是能引起囊性纤维化(cystic fibrosis, CF)病人肺部感染的 *Burkholderia* 而言, 铁载体的合成和分泌有利于它们在 CF 病人肺部的定殖和存活^[58]。Esmael 等曾对 48 株具有全基因组的 *Burkholderia* 产生的铁载体类型进行了分析, 发现仅有 6 株 *Burkholderia* 不能产生铁载体; 在 42 株可产生铁载体的 *Burkholderia* 中, 包括 33 株病原菌和 9 株植物共生菌; 其中, 合成 ornibactin 和 malleobactin 病原性 *Burkholderia* 的数目分别为 10 和 23, 植物共生性 *Burkholderia* 的数目分别为 7 和 2^[30]。我们的分析结果也发现 ornibactin 类铁载体合成基因簇在植物促生性 *Burkholderia* 中广泛存在。因此, 我们推测对植物有益的 *Burkholderia* 主要产生 ornibactin 类铁载体, 而病原性 *Burkholderia* 主要合成 malleobactin 类铁载体。

随着工业化进程的不断深入, 土壤环境中的重金属污染程度愈发严重。虽然金属离子在植物的生长代谢过程中发挥重要作用, 但其浓度过大也会引发植物细胞毒性, 影响植物的正常生长。研究发现, 许多 PGPR 可以通过自身的重金属抗性机制来帮助植物提高重金属抗性。抗重金属 PGPR 接种处理在重金属胁迫土壤中生长的植物后可显著提高其生物量^[11]。因此, 具有抗重金属能力的 PGPR 在重金属污染环境中的微生物肥料应用领域具有显著的应用前景。基因组序列分析显示菌株 LWK2 携带有多种重金属抗性相关基因和基因簇, 包括铜、钴-锌-镉和砷抗性。此外, *Cus* 铜抗性转运系统还可以转运银离子, 从而发挥银抗性作用^[59]。与此同时, 我们还通过实验验证了

LWK2 确实对铜、锌、镉和钴这 4 种重金属具有抗性。因此, 菌株 LWK2 在重金属胁迫环境中植物的微生物肥料开发领域也具有潜在的应用价值。

目前已知的革兰氏阴性细菌铜抗性分子机制主要包括 *Cue*、*Cus*、*Pco* 和 *Cop* 调控系统^[32]。在 LWK2 基因组中, 我们发现了 *Cue*、*Cus* 和 *Cop* 调控系统的相关基因。*Cue* 是大肠杆菌细胞中最主要的铜抗性调控系统, 该系统由 3 个关键蛋白构成, 分别为 *CueR*、*CopA* 和 *CueO*^[60-61]。*CopA* 属于软金属离子转运 ATP 酶亚家族, 负责一价铜离子从细胞质向周质空间的转运, 在此过程中伴随着 ATP 的水解^[34]; *CueO* 是一个位于周质空间的多铜氧化酶, 可以将一价铜离子氧化为二价形式^[62-63]。*copA* 和 *cueO* 基因均受铜感应蛋白 *CueR* 的调控。然而在 LWK2 基因组中, 我们仅发现了 *Cue* 调控系统中的 *CueR* 和 *CopA* 编码基因。LWK2 中 *Cus* 系统的基本组分与大肠杆菌中类似, 均含有构成铜离子跨膜外排系统的渗透酶 *CusA*、周质空间接头蛋白 *CusB*、周质伴侣 *CusF* 和外膜蛋白。虽然菌株 LWK2 *Cus* 系统中的外膜蛋白(L2Y90_24305)和大肠杆菌 *Cus* 系统中外膜蛋白 *CusC* 的氨基酸序列一致性较低, 但 L2Y90_24305 和 *cusBAF* 连锁在同一个基因簇上, 与 *cusB* 紧邻, 因此我们推测 L2Y90_24305 编码的外膜蛋白发挥的功能与大肠杆菌中的 *CusC* 类似。*Cop* 系统目前已在病原菌 *P. syringae* pathovar *tomato*^[64] 及 *C. metallidurans* CH34^[33] 中有所报道。这 2 株菌中 *Cop* 系统位于质粒上, 其基因簇由 *copSRABCD* 6 个基因构成。LWK2 基因组中 *Cop* 系统(L2Y90_24385、L2Y90_24390、L2Y90_24405、L2Y90_24410、L2Y90_24415、L2Y90_24420 和 L2Y90_24425)位于 2 号染色体上, 其基因排布类似于 *C. metallidurans* CH34 中 *Cop* 系统。其中,

L2Y90_24385、L2Y90_24390、L2Y90_24410、L2Y90_24420 和 L2Y90_24425 的编码蛋白分别与 *C. metallidurans* CH34 中 *CopS*、*CopR*、*CopA*、*CopC* 和 *CopD* 同源, 但 L2Y90_24415 编码蛋白与 *CopB* 一致性较低, 而是与周质伴侣 *CusF* 同源。此外, 在 *copA* (L2Y90_24410) 基因上游, 还存在一个与 *Cus* 系统中类似的 *TolC* 家族外膜蛋白编码基因。因此, 我们推测在 LWK2 中, *Cus* 与 *Cop* 系统之间应当存在某种联系。在 LWK2 基因组上远离上述 3 个铜抗性调控系统的区域, 我们还发现了一个铜伴侣编码基因 L2Y90_09585, 该基因并未像已报道同源基因一样与铜转运 ATP 酶基因连锁^[37,39]。铜伴侣蛋白主要负责将胞内一价铜离子转运给铜转运 ATP 酶^[38], L2Y90_09585 的编码产物是否会与 *Cue* 系统中的铜转运 ATP 酶发生相互作用还有待进一步验证。根据上述 LWK2 基因组中铜抗性相关基因的功能预测, 我们推测菌株 LWK2 中的铜抗性机制为: 当胞内铜离子浓度过高时, *CueR* (L2Y90_13855) 感知高浓度的铜离子并激活 ATP 酶基因(L2Y90_22005)的转录, L2Y90_22005 编码 ATP 酶将胞内过量的一价铜离子转运至周质空间。另一方面, 双组分系统 *CopR/CopS* 中的铜传感器组氨酸激酶 *CopS* (L2Y90_24385) 感知高浓度的铜离子后将信号传递给转录因子 *CopR* (L2Y90_24390), *CopR* 激活 *Cop* 系统中其他基因(L2Y90_24405、L2Y90_24410、L2Y90_24415、L2Y90_24420 和 L2Y90_24425)的转录, 具有铜离子结合特性的 *CopC* (L2Y90_24420) 结合周质空间中过量的一价铜离子并将其转运给 *CopA* (L2Y90_24410), *CopA* 发挥铜氧化酶作用将一价铜离子氧化为低毒性的二价铜离子。另一部分一价铜离子还可以通过 *Cus* 系统中 *CusA*、*CusB* 和外膜蛋白 (L2Y90_24305) 构成的外排泵, 在周质伴侣

CusF 的作用下从周质空间转运到胞外。尽管菌株 LWK2 的 *Cue* 系统中缺少 CueO 蛋白, 但其功能却可以被 *Cop* 系统中的铜氧化酶 CopA (L2Y90_24410) 所替代(图 6)。3 个调控系统紧密联系, *Cue* 系统负责将胞内过量的一价铜离子转运至周质空间, 周质空间的一价铜离子一方面被 *Cop* 系统中的铜氧化酶氧化, 另一方面通过 *Cus* 系统被转运至胞外, 从而实现了胞内过量铜离子的解毒作用。目前, *Burkholderia* 中具体铜抗性机制的报道相对较少。Higgins 等使用转座子测序对 *B. cenocepacia* H111 中铜抗性基因进行了筛选和鉴定, 其中包括 *Cue* 系统中 ATP 酶基因和 *Cop* 系统基因簇, 但并未发现 *Cue* 系统中的 *cueR* 调控基因和 *Cus* 系统基因簇^[65]。此外, Higgins 等发现 *B. cenocepacia* H111 中一个组氨酸激酶传感器基因(*I35_RS15965*)和一个双精氨酸转运相关基因 *tatA* (*I35_RS01625*) 也参与菌株 H111 的铜抗性^[65]。在 LWK2 中我们也找到了这 2 个基因 (*L2Y90_08850* 和 *L2Y90_06160*)。因此, *Burkholderia* 中应当有多个基因参与到了铜抗性过程中, 未来需要进一步通过实验对 *Burkholderia* 中的铜抗性机制进行深入解析。

Ben Fekih 等通过基因组分析发现 *arsRBC* 作为砷抗性核心基因簇, 在原核生物中普遍存在^[43]。在菌株 LWK2 的砷抗性基因簇 *arsRCBH* 中还含有 1 个额外的 *arsH* 基因, 该基因编码催化三价有机砷化合物氧化为五价态的有机砷氧化酶^[44]。*arsH* 基因的存在使菌株 LWK2 对重金属砷的抗性谱从无机态延伸到了有机态, 赋予了 LWK2 更为广泛的砷抗性谱。

接种实验表明 LWK2 对连香树生长具有明显的促进作用, 通过实验也验证了 LWK2 具有解钾、产 IAA、ACC 脱氨酶等多种植物促生特性, 全基因组序列分析也发现了与多种促生特

性相关的基因和基因簇。LWK2 对植物的促生作用应当是多种促生特性共同作用的结果。调控这些促生特性的分子机制以及这些促生特性在连香树的生长促进过程中的贡献度还有待进一步解析。此外, LWK2 基因组中铜、钴-锌-镉和砷等重金属抗性基因的发现, 暗示了 LWK2 有可能像其他已报道的兼具重金属抗性的 PGPR^[12-15] 一样, 能够促进植物在重金属胁迫环境下的生长。当植物处在重金属胁迫环境中时, 重金属抗性和其他植物促生特性之间是如何相互协调从而来完成对植物生长的促进使命也有待进一步研究。本研究对各种促生及重金属抗性相关基因的深入挖掘, 对于今后进一步揭示各个促生特性以及各种重金属抗性的分子机制, 探究各种促生机制与植物促生长过程之间的联系提供了重要的研究思路。

REFERENCES

- [1] 傅立国. 中国植物红皮书-第一册: 稀有濒危植物[M]. 北京: 科学出版社, 1991.
FU LG. China Plant Red Book-Volume1: Rare and Endangered Plants[M]. Beijing: Science Press, 1991 (in Chinese).
- [2] GOUDA S, KERRY RG, DAS G, PARAMITHIOTIS S, SHIN HS, PATRA JK. Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture[J]. Microbiological Research, 2018, 206: 131-140.
- [3] LUGTENBERG B, KAMILOVA F. Plant-growth-promoting rhizobacteria[J]. Annual Review of Microbiology, 2009, 63: 541-556.
- [4] ALORI ET, GLICK BR, BABALOLA OO. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 971.
- [5] SATTAR A, NAVEED M, ALI M, ZAHIR ZA, NADEEM SM, YASEEN M, MEENA VS, FAROOQ M, SINGH R, RAHMAN M, MEENA HN. Perspectives of potassium solubilizing microbes in sustainable food production system: a review[J]. Applied Soil Ecology, 2019, 133: 146-159.

- [6] SPAEPEN S, VANDERLEYDEN J, REMANS R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2007, 31(4): 425-448.
- [7] BHATTACHARJEE RB, SINGH A, MUKHOPADHYAY SN. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 80(2): 199-209.
- [8] ALI S, KIM WC. Plant growth promotion under water: decrease of waterlogging-induced ACC and ethylene levels by ACC deaminase-producing bacteria[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1096.
- [9] MIETHKE M, MARAHIEL MA. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2007, 71(3): 413-451.
- [10] LIU K, McINROY JA, HU CH, KLOEPFER JW. Mixtures of plant-growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple plant diseases and plant-growth promotion in the presence of pathogens[J]. Plant Disease, 2018, 102(1): 67-72.
- [11] AHMAD M. Remediation of metalliferous soils through the heavy metal resistant plant growth promoting bacteria: paradigms and prospects[J]. Arabian Journal of Chemistry, 2019, 12(7): 1365-1377.
- [12] MANZOOR M, ABID R, RATHINASABAPATHI B, de OLIVEIRA LM, da SILVA E, DENG F, RENSING C, ARSHAD M, GUL I, XIANG P, MA LQ. Metal tolerance of arsenic-resistant bacteria and their ability to promote plant growth of *Pteris vittata* in Pb-contaminated soil[J]. Science of the Total Environment, 2019, 660: 18-24.
- [13] ADHIKARY A, KUMAR R, PANDIR R, BHARDWAJ P, WUSIRIKA R, KUMAR S. *Pseudomonas citronellolis*; a multi-metal resistant and potential plant growth promoter against arsenic (V) stress in chickpea[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2019, 142: 179-192.
- [14] RAJKUMAR M, FREITAS H. Influence of metal resistant-plant growth-promoting bacteria on the growth of *Ricinus communis* in soil contaminated with heavy metals[J]. Chemosphere, 2008, 71(5): 834-842.
- [15] CHENG C, WANG Q, WANG QX, HE LY, SHENG XF. Wheat-associated *Pseudomonas taiwanensis* WRS8 reduces cadmium uptake by increasing root surface cadmium adsorption and decreasing cadmium uptake and transport related gene expression in wheat[J]. Environmental Pollution, 2021, 268: 115850.
- [16] MESA-MARÍN J, PÉREZ-ROMERO JA, REDONDO-GÓMEZ S, PAJUELO E, RODRÍGUEZ-LLORENTE ID, MATEOS-NARANJO E. Impact of plant growth promoting bacteria on *Salicornia ramosissima* ecophysiology and heavy metal phytoremediation capacity in estuarine soils[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 553018.
- [17] PENROSE DM, GLICK BR. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria[J]. Physiologia Plantarum, 2003, 118(1): 10-15.
- [18] JIN TT, BAI BX, YU XY, REN JH, LIU RX, BAI FL, ZHANG H. Degradation of pyridine by a novel bacterial strain, *Sphingobacterium multivorum* JPB23, isolated from coal-coking wastewater[J]. Desalination and Water Treatment, 2020, 188: 45-97.
- [19] SUN SL, YANG WL, FANG WW, ZHAO YX, GUO L, DAI YJ. The plant growth-promoting rhizobacterium *Variovorax boronicumulans* CGMCC 4969 regulates the level of indole-3-acetic acid synthesized from indole-3-acetonitrile[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(16): e00298-18.
- [20] DUAN J, JIANG W, CHENG ZY, HEIKKILA JJ, GLICK BR. The complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas* sp. UW4[J]. PLoS One, 2013, 8(3): e58640.
- [21] GRICHKO VP, GLICK BR. Identification of DNA sequences that regulate the expression of the *Enterobacter cloacae* UW4 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase gene[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2000, 46(12): 1159-1165.
- [22] SINGH RP, SHELKE GM, KUMAR A, JHA PN. Biochemistry and genetics of ACC deaminase: a weapon to “stress ethylene” produced in plants[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 937.
- [23] NASCIMENTO FX, ROSSI MJ, SOARES CRFS, McCONKEY BJ, GLICK BR. New insights into 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase phylogeny, evolution and ecological significance[J]. PLoS One, 2014, 9(6): e99168.
- [24] TODOROVIC B, GLICK BR. The interconversion of ACC deaminase and D-cysteine desulhydrase by directed mutagenesis[J]. Planta, 2008, 229(1): 193-205.
- [25] 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.

- [26] AN R, MOE LA. Regulation of pyrroloquinoline quinone-dependent glucose dehydrogenase activity in the model rhizosphere-dwelling bacterium *Pseudomonas putida* KT2440[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(16): 4955-4964.
- [27] FRANKE J, ISHIDA K, HERTWECK C. Evolution of siderophore pathways in human pathogenic bacteria[J]. Journal of the American Chemical Society, 2014, 136(15): 5599-5602.
- [28] STEPHAN H, FREUND S, BECK W, JUNG G, MEYER JM, WINKELMANN G. Ornibactins—a new family of siderophores from *Pseudomonas*[J]. Biometals, 1993, 6(2): 93-100.
- [29] AGNOLI K, LOWE CA, FARMER KL, HUSNAIN SI, THOMAS MS. The ornibactin biosynthesis and transport genes of *Burkholderia cenocepacia* are regulated by an extracytoplasmic function σ factor which is a part of the Fur regulon[J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(10): 3631-3644.
- [30] ESMAEEL Q, PUPIN M, KIEU NP, CHATAIGNÉ G, BÉCHET M, DRAVEL J, KRIER F, HÖFTE M, JACQUES P, LECLÈRE V. *Burkholderia* genome mining for nonribosomal peptide synthetases reveals a great potential for novel siderophores and lipopeptides synthesis[J]. MicrobiologyOpen, 2016, 5(3): 512-526.
- [31] PAWAR S, CHAUDHARI A, PRABHA R, SHUKLA R, SINGH DP. Microbial pyrrolnitrin: natural metabolite with immense practical utility[J]. Biomolecules, 2019, 9(9): 443.
- [32] BONDARCZUK K, PIOTROWSKA-SEGET Z. Molecular basis of active copper resistance mechanisms in Gram-negative bacteria[J]. Cell Biology and Toxicology, 2013, 29(6): 397-405.
- [33] MONCHY S, BENOTMANE MA, WATTIEZ R, van AELST S, AUQUIER V, BORREMANS B, MERGEAY M, TAGHAVI S, van der LELIE D, VALLAEYS T. Transcriptomic and proteomic analyses of the pMOL30-encoded copper resistance in *Cupriavidus metallidurans* strain CH34[J]. Microbiology (Reading), 2006, 152(Pt 6): 1765-1776.
- [34] FAN B, ROSEN BP. Biochemical characterization of CopA, the *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(49): 46987-46992.
- [35] RAIMUNDA D, GONZÁLEZ-GUERRERO M, LEEBER BW III, ARGÜELLO JM. The transport mechanism of bacterial Cu⁺-ATPases: distinct efflux rates adapted to different function[J]. Biometals, 2011, 24(3): 467-475.
- [36] OUTTEN FW, OUTTEN CE, HALE J, O'HALLORAN TV. Transcriptional activation of an *Escherichia coli* copper efflux regulon by the chromosomal MerR homologue, CueR[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(40): 31024-31029.
- [37] ODERMATT A, SOLIOZ M. Two *trans*-acting metalloregulatory proteins controlling expression of the copper-ATPases of *Enterococcus hirae*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1995, 270(9): 4349-4354.
- [38] ROBINSON NJ, WINGE DR. Copper metallochaperones[J]. Annual Review of Biochemistry, 2010, 79: 537-562.
- [39] CORBETT D, SCHULER S, GLENN S, ANDREW PW, CAVET JS, ROBERTS IS. The combined actions of the copper-responsive repressor CsoR and copper-metallochaperone CopZ modulate CopA-mediated copper efflux in the intracellular pathogen *Listeria monocytogenes*[J]. Molecular Microbiology, 2011, 81(2): 457-472.
- [40] NIES DH. The cobalt, zinc, and cadmium efflux system CzcABC from *Alcaligenes eutrophus* functions as a cation-proton antiporter in *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 1995, 177(10): 2707-2712.
- [41] van der LELIE D, SCHWUCHOW T, SCHWIDETZKY U, WUERTZ S, BAEYENS W, MERGEAY M, NIES DH. Two-component regulatory system involved in transcriptional control of heavy-metal homeostasis in *Alcaligenes eutrophus*[J]. Molecular Microbiology, 1997, 23(3): 493-503.
- [42] ANTON A, GROSSE C, REISSMANN J, PRIBYL T, NIES DH. CzcD is a heavy metal ion transporter involved in regulation of heavy metal resistance in *Ralstonia* sp. strain CH34[J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(22): 6876-6881.
- [43] BEN FEKIH I, ZHANG C, LI YP, ZHAO Y, ALWATHNANI HA, SAQUIB Q, RENSING C, CERVANTES C. Distribution of arsenic resistance genes in prokaryotes[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2473.
- [44] CHEN J, BHATTACHARJEE H, ROSEN BP. ArsH is an organoarsenical oxidase that confers resistance to trivalent forms of the herbicide monosodium methylarsenate and the poultry growth promoter roxarsone[J]. Molecular Microbiology, 2015, 96(5): 1042-1052.
- [45] PÁEZ-ESPINO AD, NIKEL PI, CHAVARRÍA M, de LORENZO V. ArsH protects *Pseudomonas putida* from oxidative damage caused by exposure to arsenic[J].

- Environmental Microbiology, 2020, 22(6): 2230-2242.
- [46] COENYE T, VANDAMME P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches[J]. Environmental Microbiology, 2003, 5(9): 719-729.
- [47] COMPANT S, NOWAK J, COENYE T, CLÉMENT C, AIT BARKA E. Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2008, 32(4): 607-626.
- [48] REN JH, YE JR, LIU H, XU XL, WU XQ. Isolation and characterization of a new *Burkholderia pyrrocinia* strain JK-SH007 as a potential biocontrol agent[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011, 27: 2203-2215.
- [49] LIU WH, CHEN FF, WANG CE, FU HH, FANG XQ, YE JR, SHI JY. Indole-3-acetic acid in *Burkholderia pyrrocinia* JK-SH007: enzymatic identification of the indole-3-acetamide synthesis pathway[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 2559.
- [50] LIU AK, ZHANG PF, BAI BX, BAI FL, JIN TT, REN JH. Volatile organic compounds of endophytic *Burkholderia pyrrocinia* strain JK-SH007 promote disease resistance in poplar[J]. Plant Disease, 2020, 104(6): 1610-1620.
- [51] BIANCO C, IMPERLINI E, CALOGERO R, SENATORE B, AMORESANO A, CARPENTIERI A, PUCCI P, DEFEZ R. Indole-3-acetic acid improves *Escherichia coli*'s defences to stress[J]. Archives of Microbiology, 2006, 185(5): 373-382.
- [52] BIANCO C, IMPERLINI E, DEFEZ R. Legumes like more IAA[J]. Plant Signaling & Behavior, 2009, 4(8): 763-765.
- [53] IMPERLINI E, BIANCO C, LONARDO E, CAMERINI S, CERMOLA M, MOSCHETTI G, DEFEZ R. Effects of indole-3-acetic acid on *Sinorhizobium meliloti* survival and on symbiotic nitrogen fixation and stem dry weight production[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 83(4): 727-738.
- [54] POLLMANN S, MÜLLER A, PIOTROWSKI M, WEILER EW. Occurrence and formation of indole-3-acetamide in *Arabidopsis thaliana*[J]. Planta, 2002, 216(1): 155-161.
- [55] NEGRI S, COMMISSO M, AVESANI L, GUZZO F. The case of tryptamine and serotonin in plants: a mysterious precursor for an illustrious metabolite[J]. Journal of Experimental Botany, 2021, 72(15): 5336-5355.
- [56] PEDRAS MSC, NYCHOLAT CM, MONTAUT S, XU Y, KHAN AQ. Chemical defenses of crucifers: elicitation and metabolism of phytoalexins and indole-3-acetonitrile in brown mustard and turnip[J]. Phytochemistry, 2002, 59(6): 611-625.
- [57] COONEY TP, NONHEBEL HM. The measurement and mass spectral identification of indole-3-pyruvate from tomato shoots[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1989, 162(2): 761-766.
- [58] BUTT AT, THOMAS MS. Iron acquisition mechanisms and their role in the virulence of *Burkholderia* species[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2017, 7: 460.
- [59] FRANKE S, GRASS G, RENSING C, NIES DH. Molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(13): 3804-3812.
- [60] GRASS G, RENSING C. Genes involved in copper homeostasis in *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(6): 2145-2147.
- [61] OUTTEN FW, HUFFMAN DL, HALE JA, O'HALLORAN TV. The independent *cue* and *cus* systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(33): 30670-30677.
- [62] DJOKO KY, CHONG LX, WEDD AG, XIAO Z. Reaction mechanisms of the multicopper oxidase CueO from *Escherichia coli* support its functional role as a cuprous oxidase[J]. Journal of the American Chemical Society, 2010, 132(6): 2005-2015.
- [63] ROBERTS SA, WEICHSEL A, GRASS G, THAKALI K, HAZZARD JT, TOLLIN G, RENSING C, MONTFORT WR. Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in *Escherichia coli*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(5): 2766-2771.
- [64] SILVER S. Bacterial resistances to toxic metal ions—a review[J]. Gene, 1996, 179(1): 9-19.
- [65] HIGGINS S, GUALDI S, PINTO-CARBÓ M, EBERL L. Copper resistance genes of *Burkholderia cenocepacia* H111 identified by transposon sequencing[J]. Environmental Microbiology Reports, 2020, 12(2): 241-249.