

仲惟, 李涛, 刘文亮, 等. 不同强度启动子 ACC 脱氨酶工程菌株的构建及功能研究 [J]. 福建农业学报, 2022, 37 (1): 96–102.
ZHONG W, LI T, LIU W L, et al. Construction of Rhizobacteria with High-efficiency ACC Deaminase Using Promoter Replacement Technology [J].
Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2022, 37 (1): 96–102.

不同强度启动子 ACC 脱氨酶工程菌株的 构建及功能研究

仲 惟¹, 李 涛^{1*}, 刘文亮², 赵 君¹, 陈 玮¹

(1. 河南科技大学应用工程学院, 河南 三门峡 472000; 2. 哈密市疾病预防控制中心, 新疆 哈密 839000)

摘 要:【目的】探究细菌对代谢型趋化物的代谢速率对其趋化作用强弱的影响, 同时为选育高效植物根际促生菌 (Plant growth promoting rhizobacteria, PGPR) 菌株开辟新路径。【方法】采用基因克隆得到 4 种含不同强弱启动子序列的基因片段, 将其连至表达载体 pBBR1MCS-2, 通过三菌杂交接合转移成功构建出生长速率基本一致的 4 种目标菌株。【结果】ACC 脱氨酶活性及 *AcdS* 基因表达量测定结果说明 *AcdS* 基因表达量、ACC 脱氨酶活与启动子强弱之间呈现正相关关系; 定性趋化结果表明菌株的 ACC 代谢速率越高, 其对 ACC 的趋化能力也越强; 各菌株在小麦根际定殖数量及对小麦生物量影响结果显示: UW4 Δ *AcdS*+*Bra20A* 菌株定殖数量最多, UW4 Δ *AcdS* 和 UW4 Δ *AcdS*+*Bra1A* 菌株定殖数量较少; UW4 Δ *AcdS*+*Bra20A* 菌株处理后小麦茎干及根部重量均最重, UW4 Δ *AcdS*+*Bra1A* 和 UW4 Δ *AcdS* 菌株处理后的小麦茎干较轻, UW4 Δ *AcdS* 菌株处理后的小麦根部重量也最轻。【结论】ACC 脱氨酶活性基本与启动子序列强弱呈正相关。菌株的 ACC 脱氨酶活性越高, 其对 ACC 代谢速率越高, ACC 代谢速率越高, 其趋化作用越强, 对植株的促生效果也越好。

关键词: 启动子; 三菌杂交; ACC 脱氨酶; 趋化作用; 代谢速率; 定殖

中图分类号: Q 93

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2022) 01-0096-07

Construction of Rhizobacteria with High-efficiency ACC Deaminase Using Promoter Replacement Technology

ZHONG Wei¹, LI Tao^{1*}, LIU Wenliang², ZHAO Jun¹, CHEN Wei¹

(1. College of Applied Engineering, Henan University of Science and Technology, Sanmenxia, Henan 472000, China;

2. Hami Disease Control and Prevention Center, Hami, Xinjiang 839000, China)

Abstract: 【Objective】Strains of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) with varied ACC metabolic strengths were constructed by promoter replacement technology, and the resulting chemotaxis and effects on the growth of wheat seedlings analyzed. 【Methods】Four gene fragments containing different promoter sequences were cloned and connected to the expression vector pBBR1MCS-2. Using the 3-parent hybridization method, strains of a similar growth rate was constructed. 【Results】Four strains with basically a same growth rate were obtained by the hybridization and transformation method. The *AcdS* gene expression and ACC deaminase activity were found positively correlated to the strength of the promoter transferred to the strain. The higher the ACC metabolism rate, the greater the chemotactic ability of the strain. In the experiment on wheat seedling root growth and plant biomass with or without the PGPR strains, the colonization number in rhizosphere of UW4 Δ *AcdS*+*Bra20A* was the highest, while those of UW4 Δ *AcdS* and UW4 Δ *AcdS*+*Bra1A* lower; the stem and root weight of wheat treated with UW4 Δ *AcdS*+*Bra20A* the highest, the stem weight of wheat treated with UW4 Δ *AcdS*+*Bra1A* and UW4 Δ *AcdS* lower, and the root weight of wheat treated with UW4 Δ *AcdS* lowest. 【Conclusion】The promoter-replaced PGPRs with high enzyme activity displayed high ACC metabolic rate, which enhanced the chemotaxis and the plant-growth promotion ability.

Key words: promoter; 3-parent hybridization; ACC deaminase; chemotaxis; metabolic rate; colonization

收稿日期: 2021-09-02 初稿; 2021-10-26 修改稿

作者简介: 仲惟 (1981-), 男, 硕士, 副教授, 研究方向: 生化工艺及农业生物技术 (E-mail: zhongweiw@163.com)

* 通信作者: 李涛 (1983-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 环境微生物及农业生物技术 (E-mail: litao83929@163.com)

基金项目: 河南省科技攻关项目 (162102110009)

0 引言

【研究意义】植物根际促生细菌 (Plant growth promoting rhizobacteria, PGPR) 是指能够自主定殖于植物根际, 通过产生某些特殊代谢物质可促进植物种子萌发、植株生长并提高其对矿质营养的吸收和利用, 同时可抑制有害病原菌繁殖的有益微生物群落^[1]。大量研究表明, 农业生产中使用 PGPR 菌肥, 可有效减少化肥及农药的施用量各 30% 以上, 对农作物增产效果亦十分显著, 甚至高达 80%, 因此在当前发展绿色农业、减肥增效上应用前景十分广阔^[2-3]。

【前人研究进展】然而 PGPR 菌剂在大田应用场景中的施用效果并不稳定, 会受到地块位置、土壤营养状况、种植年份、种植气候及植株品系等因素的影响, 如何使得在实验室有良好促生效果的 PGPR 菌剂能够在大田表现优良, 需要探讨影响 PGPR 菌剂在植物根际定殖并良好稳定传代存活的机理^[4]。有研究表明, PGPR 在植物根际的定殖数量与其对植株的促生效果呈显著正相关^[5], 且 PGPR 在植物根际定殖行为与其对植物根系分泌物的趋化作用有关^[6], 将其与趋化相关的基因敲除后, PGPR 在植物根际的定殖能力显著下降^[7]。【本研究切入点】本课题组前期研究发现, PGPR 菌的典型代表 *Pseudomonas putida* UW4 能够趋化 1-氨基环丙烷-1-羧酸 (ACC), 而敲除了其 ACC 脱氨酶 (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase, AcdS) 基因的 UW4 Δ AcdS 和趋化蛋白 (CheR) 基因的 UW4 Δ cheR 均丧失了对 ACC 的趋化作用^[8], 表明 ACC 是 UW4 的一种新的代谢依赖型趋化物。另外, AcdS 活力高的菌株在根系定殖量也明显较多^[9], 基于此我们推测 ACC 脱氨酶的催化反应速度可能影响 PGPR 菌株对 ACC 的趋化响应强度, 进而影响其定殖及促生效果。【拟解决的关键问题】选用典型的产 AcdS 的 UW4 及其 AcdS 基因敲除突变株 UW4 Δ AcdS, 采用同源重组技术将其 ACC 脱氨酶启动子进行替换, 从而构建一系列不同 ACC 脱氨酶活性菌株, 以此探究 ACC 脱氨酶活性对 PGPR 趋化作用的影响, 分析 ACC 趋化反应强度与代谢速率之间的关系, 从而为选育高效 PGPR 菌株、稳定和提高 PGPR 的应用效果提供理论支撑, 切实为我国农业增产增收作出贡献。

1 材料与方法

1.1 菌剂、质粒及其他

恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* UW4、

UW4 Δ AcdS 为本实验室保藏菌株, 由加拿大滑铁卢大学 Glick 教授馈赠; 大肠杆菌 *E.coli* DH5 α 购自 TaKaRa 公司; 克隆用 ZT4-Blunt 质粒购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司; pBBR1MCS-2 表达质粒购自上海泽叶生物科技有限公司; 三菌杂交辅助质粒 pRK2013 由广西大学生命科学学院惠赠; 硝酸纤维素薄膜购自北京索莱宝科技有限公司。

1.2 不同 ACC 脱氨酶活性菌株的构建

1.2.1 分别构建含 4 种启动子的表达质粒 参照文献 [10] 中 Braatsch20 强启动子、Braatsch10 中等强度启动子、Braatsch1 弱启动子及 UW4 菌 Acds 基因自身启动子与目的 Acds 基因和终止子融合片段的序列分别进行引物设计、片段扩增及测序 (表 1)。将测序成功的 4 个片段 Bra20A/ Bra10A/ Bra1A/PAA 分别连接至 pBBR1MCS-2 质粒的 MCS 区, 构建出含 4 种不同启动子序列的表达质粒。

1.2.2 三菌杂交构建目标菌株 采用三菌杂交接合转移, 先将 4 类含不同强度启动子的 pBBR1MCS-2 质粒转化大肠杆菌 DH5 α (供体菌), 分别活化 UW4 Δ AcdS (受体菌) 及含质粒 pRK2013 的帮助菌 (大肠杆菌 HB101, Kana), 以 pBBR1MCS-2 空载质粒为阴性对照。分别挑取供体菌、UW4 Δ AcdS 及帮助菌单菌落添加对应抗性, 供体菌和帮助菌置于 37 °C, UW4 Δ AcdS 置于 30 °C 过夜培养。培养至各菌液 OD_{600nm} $\approx$ 1.0, 按 1:100 (*V/V*) 分别接至 LB 液体培养基中培养 3~4 h。培养结束后将供体菌、受体菌和帮助菌按 2:2:1 体积比进行混合, 将混合菌液滴加在置于 LB 固体平板的硝酸纤维素膜上, 30 °C 恒温静置培养 24 h。吸取 750 μ L 0.85% 的 NaCl 溶液将菌体从硝酸纤维素膜冲洗下来, 超纯水重悬菌液 (可梯度稀释) 涂布于含抗性 LB 固体培养基, 30 °C 恒温静置培养过夜, 待菌落长出后进行转化子鉴定。

1.2.3 菌株生长曲线及 ACC 脱氨酶活性测定 将恶臭假单胞菌 UW4、UW4 Δ AcdS 及鉴定过的 4 种含不同启动子序列的转化株进行 LB 培养基划线培养, 待长出单菌落后各自挑取一环接至液体 LB 培养基, 30 °C, 220 r $\cdot$ min⁻¹ 培养过夜后调节菌液 OD_{600nm} $\approx$ 1.0, 1:100 (*V/V*) 转接至新鲜液体 LB 培养基中, 30 °C, 220 r $\cdot$ min⁻¹ 开始培养, 每隔 1 h 测定菌液 OD_{600nm} 直至平台期, 每个菌株平行测定 3 次。以菌液培养时间为横坐标, 所测 OD 值为纵坐标, 绘制各菌株生长曲线。ACC 脱氨酶活力测定采用 Penrose 等^[11]的方法, 于 540 nm 下测定 AcdS 催化 ACC 裂解生成的 α -酮丁酸的含量。

表 1 含不同强度启动子片段的引物设计
Table 1 Primers with promoters of different strength

引物名称 Name	引物序列 Sequence	扩增产物 PCR product
Bra20A-F	CGGGATCCAATACTTGACATATCACTGTGATTA	Bra20A
	CATATAATATGCGAAATCTGTAAGGCTAGCCAG	
	GCTACACAGGGAATGAACCTGAATCGTTTTG	
Bra10A-F	CGGGATCCACCTATTGACAATTAAGGCTAAAA	Bra10A
	TGCTATAATTCCACAAATCTGTAAGGCTAGCCA	
	GGCTACACAGGGAATGAACCTGAATCGTTTTG	
Bra1A-F	CGGGATCCTCCCTTTGATATTGCATCCCGGTAT	Bra1A
	ATAATATGTCAAATCTGTAAGGCTAGCCAGGCT	
	ACACAGGGAATGAACCTGAATCGTTTTG	
A-R	CCAAGCTTGTCAATCACGTATTTGGGTAAC	各片段下游引物
PAA-F	CGGGATCCGGTTGAAACTCTGG	PAA
PAA-R	CCAAGCTTTTGTACCCAGAC	

注：上游酶切位点为 *Bam* H I，下游酶切位点为 *Hind* III，分别以下划线标注。
Note: Upstream restriction sites *Bam* H I and downstream restriction sites *Hind* III are underlined.

1.2.4 菌株 *AcdS* 基因表达量测定 吸取 1.2.3 中过夜培养的各菌液接至新鲜液体 LB 中，30 ℃，220 r·min⁻¹ 培养至菌体 OD_{600nm} 约 0.5，各取 6 mL，4 ℃，12000 r·min⁻¹，离心 5 min 后弃去上清，将菌体重悬转移至 1.5 mL EP 管中 4 ℃ 离心 1 min，液氮速冻后作为处理前样品。将剩余菌液中添加 3.0 mmol·L⁻¹ ACC 诱导培养 45 min 后按上述操作进行处理后样品采集。提取各样品 RNA 后反转录合成 cDNA 第一链，分别设计假单胞菌属管家基因 *gyrB* 荧光定量 PCR 扩增 F 引物：5'-CCTGTCGGAAGAGCTGGT-3'，R 引物：5'-ACCGTGGACGTAAGTCTGTT-3'，*AcdS* 片段荧光定量 PCR 扩增 F 引物：5'-ACTACATCGTGGTCTGCTCGGT-3'，R 引物：5'-CA CATCCTCTTCAGTGATTTCG-3'。进行各菌株 *gyrB* 及 *AcdS* 基因的荧光定量 PCR 扩增，采用 2^{-ΔΔCt} 法进行各菌株 *AcdS* 基因表达量分析。

1.2.5 定性趋化试验 采用改良的点滴趋化方法^[12]，将构建好的 4 种目标菌株与 UW4、UW4Δ*AcdS* 分别进行活化培养，各吸取菌液 10 mL，4 ℃，8 000 r·min⁻¹ 离心 5 min 收集菌体，用甘油盐液体培养基洗菌 2 次后重悬至 10 mL，吸取 2.5 mL 接至 250 mL 甘油盐液体培养基中培养 24 h（需添加 ACC 3 mmol·L⁻¹，UW4Δ*AcdS* 培养瓶中以硫酸铵代替 ACC）。吸取 15 mL 菌液 4 ℃，8 000 r·min⁻¹ 离心 5 min 后弃上清，吸取 10 mL 经 4 ℃ 预冷的趋化缓冲液（CMB）洗菌 3 次后，将菌体重悬至 OD_{600nm}≈1.0。取 2 μL 菌液滴加于

10% 稀释 LB 游动平板中央，每个平皿中倒入 10% 稀释 LB 培养基 15 mL，在其中添加 ACC 3 mmol·L⁻¹。将此游动平板置于 30 ℃ 培养 24 h 观察各菌株的定性趋化。

1.2.6 盆栽小麦生物量及根际定殖菌数测定 将小麦种子消毒后浸泡于 OD_{600nm}=1 的 UW4、UW4Δ*AcdS* 及 4 种目标菌株菌悬液中吸胀处理，无菌水做空白对照，之后培养箱中催芽，将一端露白的籽粒种植于育苗穴盘，初始培养前 2 d 分别以不同菌液浇灌小麦植株，待植株生长约 15 d 后，拔出植株抖落培养土剪取根茎进行生物量测定。另剪取根部组织研磨后将匀浆上清梯度稀释后涂布于含 Amp 抗性 100 μg·mL⁻¹ 的 LB 固体平皿，以长出的菌落数计各菌株在小麦根际的定殖数量。

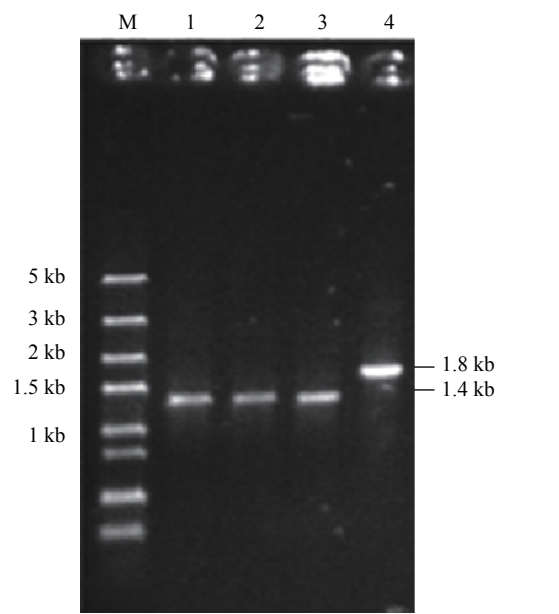
1.3 数据分析方法

采用 SPSS Statistics 24.0 中的 Duncan 检验对数据进行统计及显著性分析（*P*<0.05）。

2 结果与分析

2.1 目标菌株的菌液 PCR 鉴定

挑取三菌杂交所得转化子接至液体 LB 培养基中培养过夜，分别进行菌液 PCR 鉴定（图 1），所得 Bra20A、Bra10A、Bra1A 目标片段约 1 400 bp，PAA 片段约 1 800 bp，均符合预期大小，说明 4 种含不同启动子序列的目标菌株 UW4Δ*AcdS*+*Bra20A*、UW4Δ*AcdS*+*Bra10A*、UW4Δ*AcdS*+*Bra1A*、UW4Δ*AcdS*+*PAA* 构建成功。



注：M：Trans5k DNA Marker；1：Bra20A 片段；2：Bra10A 片段；3：Bra1A 片段；4：PAA 片段。
Notes: M: Trans5k DNA marker; 1: Bra20A fragment; 2: Bra10A fragment; 3: Bra1A fragment; 4: PAA fragment.

图 1 4 种目标菌株菌液 RCR 凝胶电泳图
Fig. 1 Gel electrophoresis of 4 target strains

2.2 菌株生长曲线测定

由图 2 可见，UW4、UW4Δ*AcdS* 及 4 种含不同启动子序列的目标菌株培养过程中生长速率基本一致，无显著性差异。

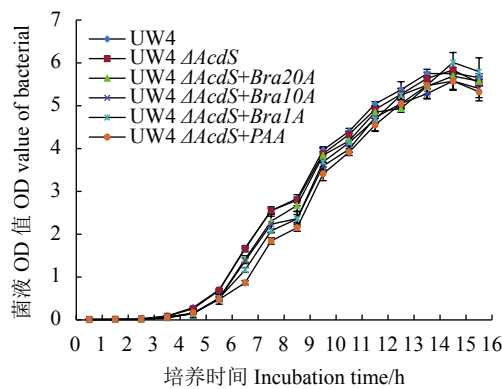
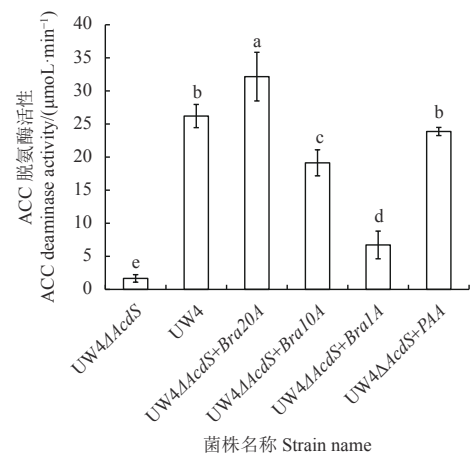


图 2 各菌株生长曲线对比
Fig. 2 Growth of individual strains

2.3 菌株 ACC 脱氨酶活性对比

将 UW4、UW4Δ*AcdS*、UW4Δ*AcdS*+*Bra20A*、UW4Δ*AcdS*+*Bra10A*、UW4Δ*AcdS*+*Bra1A*、UW4Δ*AcdS*+*PAA* 菌株在含 3 mmol·L⁻¹ ACC 的液体 LB 培养基中过夜诱导培养，收集菌体破碎细胞进行酶活测定，结果（图 3）发现，除 UW4 和 UW4Δ*AcdS*+*PAA* 以外，各菌株 ACC 脱氨酶活性差异均较大（*P*<0.05），且酶活数值基本与启动子序列强弱呈正比关系，因此推测各菌株对 ACC 的趋化为代谢依赖型。



注：柱形图上所标小写字母不同表示不同处理间差异显著（*P*<0.05）。图 4、6、7 同。
Notes: Different lowercase letters indicate significant differences (*P*<0.05). Same for Figs. 4, 6, and 7.

图 3 各菌株 ACC 脱氨酶活性对比
Fig. 3 ACC deaminase activity of strains

2.4 菌株 *AcdS* 基因表达量

通过实时荧光定量 PCR 测定各菌株在 ACC 诱导下的 *AcdS* 基因表达量，以未经 ACC 诱导的野生株 UW4 的表达量作为对照，测得 UW4、UW4Δ*AcdS*+*Bra20A*、UW4Δ*AcdS*+*Bra10A*、UW4Δ*AcdS*+*Bra1A* 及 UW4Δ*AcdS*+*PAA* 菌株 *AcdS* 基因表达量。结果（图 4）发现，UW4Δ*AcdS*+*Bra20A* 的 *AcdS* 基因表达量最高，其次是 UW4，UW4Δ*AcdS*+*Bra10A*、UW4Δ*AcdS*+*PAA* 表达量较低且两者无显著性差异，UW4Δ*AcdS*+*Bra1A* 表达量最低（*P*<0.05），此结果与 ACC 脱氨酶活测定结果规律基本一致，说明 *AcdS* 基因表达量、ACC 脱氨酶活与启动子强弱之间呈现正相关，菌株的 ACC 脱氨酶活性越高，其对 ACC 代谢速率也越高。

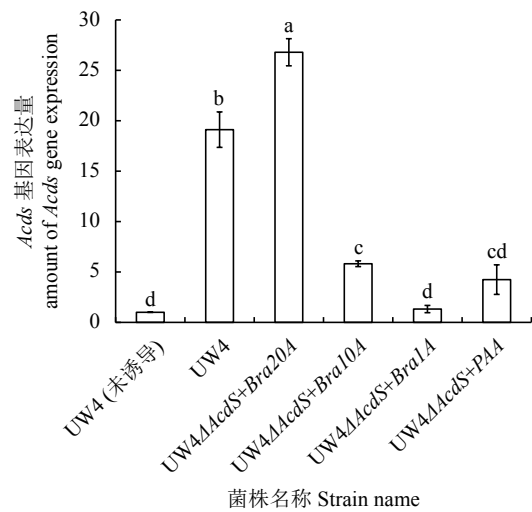


图 4 各菌株 *AcdS* 基因表达量对比
Fig. 4 *AcdS* expressions of strains

2.5 菌株对 ACC 的定性趋化

采用稀释 LB 半固体平板进行各菌株对 ACC 的定性趋化能力验证, 结果见图 5。敲除了 ACC 脱氨酶基因的 *UW4ΔAcdS* 丧失对 ACC 的趋化能力, 含强启动子序列的 *UW4ΔAcdS+Bra20A* 菌株形成的趋化圈直径最大, *UW4ΔAcdS+PAA* 和野生 *UW4* 形成

趋化圈直径较大且数值基本一致, *UW4ΔAcdS+Bra10A* 形成趋化圈略小于上述两个菌株, 含弱启动子序列的 *UW4ΔAcdS+Bra1A* 菌所形成趋化圈直径最小, 说明菌株对 ACC 代谢速率直接影响其 ACC 趋化能力的大小。

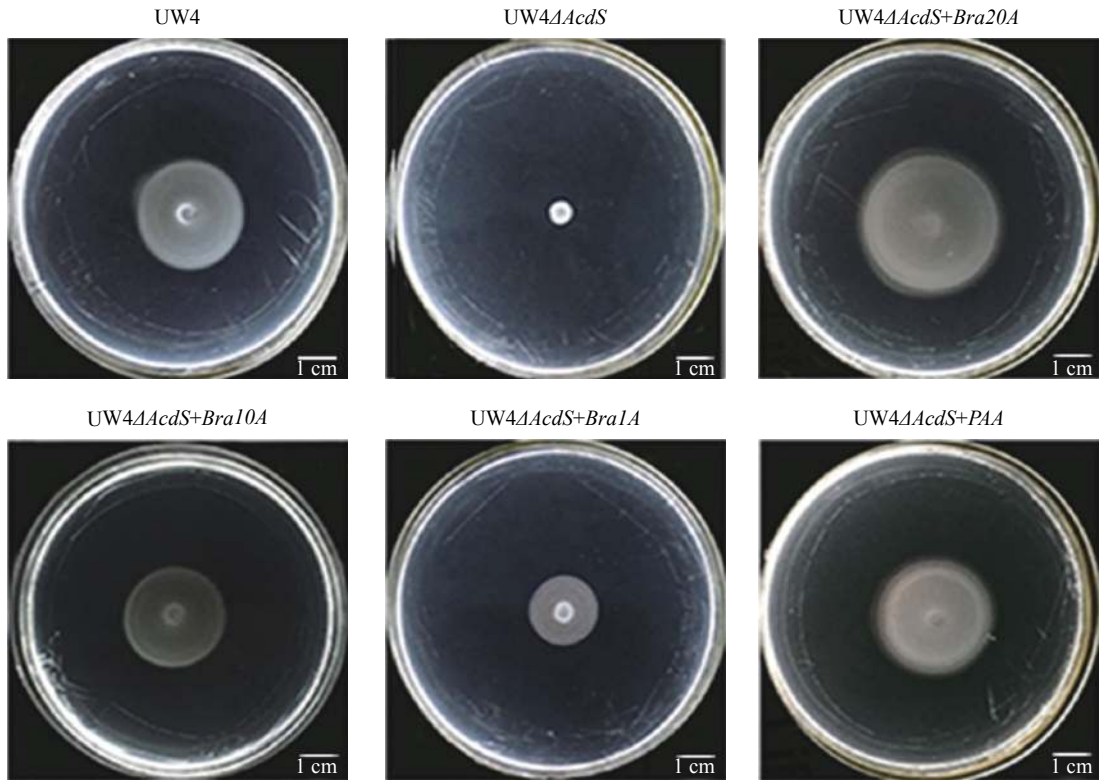


图 5 各菌株对 ACC 的定性趋化
Fig. 5 Qualitative chemotaxis on ACC of various strains

2.6 各菌株在小麦根际定殖数量

剪取各菌株处理过的盆栽小麦的根部组织研磨后将匀浆上清涂布 LB 固体平板, 测得各菌株在小麦根际定殖数量, 结果 (图 6) 发现, *UW4ΔAcdS+Bra20A* 菌株定殖数量最多, *UW4* 和 *UW4ΔAcdS+Bra10A* 定殖数量次之, 此二者间无显著性差异, *UW4ΔAcdS+PAA* 菌株定殖数量一般, *UW4ΔAcdS* 和 *UW4ΔAcdS+Bra1A* 菌株定殖数量较少, 此二者亦无显著性差异 ($P<0.05$)。

2.7 菌株对盆栽小麦生物量影响

各菌悬液进行小麦种子处理后进行盆栽试验, 待植株生长 15 d 后剪取其根部和茎部烘干后准确称重, 结果发现, *UW4ΔAcdS+Bra20A* 菌株处理后小麦茎干最重, 其次是 *UW4*、*UW4ΔAcdS+Bra10A* 和 *UW4ΔAcdS+PAA* 菌株处理后的茎干重, 三者间无显著性差异; *UW4ΔAcdS+Bra1A* 和 *UW4ΔAcdS* 菌株处理后的小麦茎干较轻, 尤其 *UW4ΔAcdS* 菌株处理

后茎干重量与对照差距不显著 ($P<0.05$) (图 7-A)。
UW4ΔAcdS+Bra20A、*UW4ΔAcdS+Bra10A* 和 *UW4*

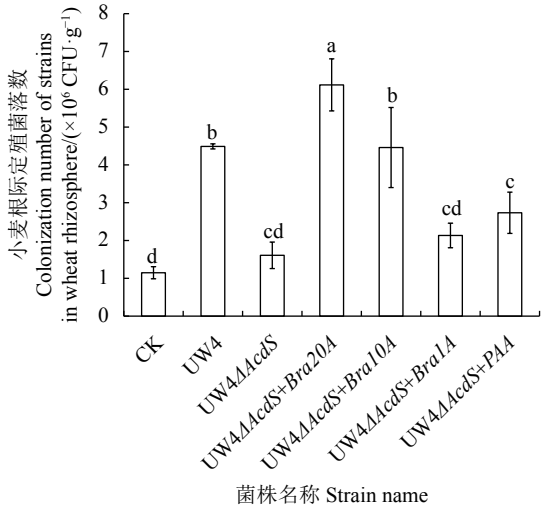


图 6 各菌株在小麦根际定殖数量
Fig. 6 Colonization number of strains in wheat rhizosphere

$\Delta AcdS+Bra1A$ 菌株处理后的小麦根部重量均较重，三者差异不显著；其次 UW4 和 UW4 $\Delta AcdS+PAA$ 菌株处理后的小麦根部较重，二者无显著性差异；UW4 $\Delta AcdS$ 菌株处理后的小麦根部重量最轻，与对照间无显著性差异 ($P<0.05$) (图 7-B)。

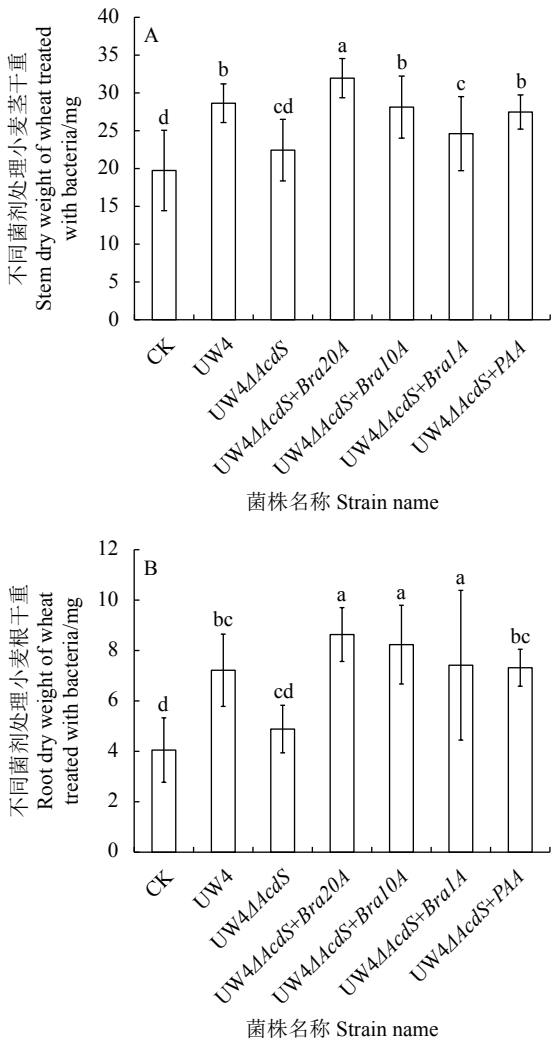


图 7 各菌株对小麦植株促生效果
Fig. 7 Growth promoting effect of strains on wheat plant

综上所述，菌株的 *AcdS* 基因表达量及 ACC 脱氨酶活性均与启动子强弱呈现正相关；菌株对 ACC 代谢速率越高其趋化作用越强，对植株的促生效果也越好。

3 讨论与结论

假单胞菌属的趋化路径与大肠杆菌有所不同，类似另一种类球红细菌 (*Rhodobacter sphaeroides*) 为代表的趋化信号通路，鞭毛除了细胞端部受体复合体的调控外，还要受到位于细胞质的受体复合体的调控作用。目前对细胞质受体复合体所结合配体分子了解甚少，但已有研究发现，细菌对某些氨基酸、糖类及三羧酸循环的中间产物等许多代谢依赖

性趋化物的趋化作用需要细胞质受体的参与^[13-14]。如恶臭假单胞菌 F1 的 McpS 蛋白可作为 6 种三羧酸 (TCA) 循环中间体和丁酸盐的特异性趋化受体，且对苹果酸、琥珀酸、延胡索酸、草酰乙酸有高的亲和力，据此推测 MCP 对趋化物的亲和力大小与趋化反应强度有关^[15]。另外三羧酸循环或 β -酮己二酸循环的中间代谢产物浓度的大小直接影响参与代谢依赖性趋化反应的 MCP 蛋白和转运蛋白的表达^[16]。这也表明某些物质的趋化、转运和代谢密切相关，因此代谢速度可能是影响趋化反应强度的另一个因素。

本研究设计将 4 种不同强弱启动子序列 Bra20A/ Bra10A/ Bra1A/PAA 分别连至 pBBR1MCS-2 质粒，构建出含 4 种不同启动子序列的表达质粒。采用三亲本接合转移将表达质粒导入受体菌株 UW4 $\Delta AcdS$ ，成功构建出 4 种含不同强弱 *AcdS* 启动子序列的目标菌株。研究中所采用的 pBBR1MCS-2 表达质粒在单个菌株细胞中拷贝数约为 5 个，较高的拷贝数和表达强度可提高目标 *AcdS* 基因表达量及 ACC 脱氨酶活，但同时也为宿主菌引入较高代谢负荷^[17]，如各转化株在以 ACC 为氮源的甘油盐培养基中生长缓慢。另外可能受 mRNA 寿命或蛋白折叠构建系统影响，酶活力并未随 *AcdS* 基因表达量增高呈现同等比例增加。

对各菌株生长曲线测定发现各菌株生长速率基本一致无显著性差异。ACC 脱氨酶活数值基本与启动子序列强弱呈正相关。UW4 $\Delta AcdS+Bra20A$ 菌株 *Acds* 基因表达量最高，此结果与 ACC 脱氨酶活测定结果规律基本一致，说明 *AcdS* 基因表达量、ACC 脱氨酶活与启动子强弱之间呈现正相关，菌株的 ACC 脱氨酶活性越高，其对 ACC 代谢速率也越高。定性趋化结果显示：UW4 $\Delta AcdS$ 丧失对 ACC 的趋化能力，含强启动子序列的 UW4 $\Delta AcdS+Bra20A$ 菌株形成的趋化圈直径最大，说明菌株对 ACC 代谢速率直接影响其 ACC 趋化能力的大小。各菌株在小麦根际定殖数量及对小麦生物量影响结果显示：UW4 $\Delta AcdS+Bra20A$ 菌株定殖数量最多，且处理后小麦茎干及根部重量均最重，UW4 $\Delta AcdS+Bra1A$ 和 UW4 $\Delta AcdS$ 菌株处理后的小麦茎干较轻，UW4 $\Delta AcdS$ 菌株处理后的小麦根部重量最轻 ($P<0.05$)，说明 ACC 确实为 UW4 向植物根际定殖的较强趋化物质，是菌株生长的物质来源，与植物间形成互利共赢的共生关系^[8]，因此菌株对 ACC 的代谢速率越高其趋化作用亦越强，UW4 的趋化作用越强其在根系定殖后对植株的促生效果越显著。

参考文献：

[1] PIZARRO-TOBIAS P, UDAONDO Z, ROCA A, et al. Events in root

- colonization by *Pseudomonas putida*[M]. Netherlands: Springer, 2015.
- [2] ZHANG F S, SHEN J B, ZHANG J L, et al. Rhizosphere processes and management for improving nutrient use efficiency and crop productivity[C]//International symposium of molecular environmental soil science at the interfaces in the earth's critical zone; ISMESS. College of Resource and Environmental Sciences, China Agricultural University. Amsterdam: Elsevier, 2009: 1–32.
- [3] 沈德龙, 李俊, 姜昕. 我国微生物肥料产业现状及发展方向 [J]. 微生物学杂志, 2013, 33 (3): 1–4.
- SHEN D L, LI J, JIANG X. Status quo and development of microbial fertilizer industry in China [J]. *Journal of Microbiology*, 2013, 33 (3): 1–4. (in Chinese)
- [4] 胡小加, 余常兵, 李银水, 等. 枯草芽孢杆菌Tu-100对油菜根系分泌物所含氨基酸的趋化性研究 [J]. 土壤学报, 2010, 47 (6): 1243–1248.
- HU X J, YU C B, LI Y S, et al. Chemotaxis of *Bacillus subtilis* tu-100 toward amino acids in root exudates of oilseed rape [J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2010, 47 (6): 1243–1248. (in Chinese)
- [5] BULL C T. Relationship between root colonization and suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* Strain 2-79 [J]. *Phytopathology*, 1991, 81 (9): 954.
- [6] PII Y, MIMMO T, TOMASI N, et al. Microbial interactions in the rhizosphere: Beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2015, 51 (4): 403–415.
- [7] 王淼, 张莉, 刘瑛, 等. 趋化性参与内生细菌336x在小麦根系的内生定殖 [J]. 河南大学学报(自然科学版), 2012, 42 (6): 736–741.
- WANG M, ZHANG L, LIU Y, et al. Chemotaxis of endophytic bacteria 336x involved in endophytic colonization in wheat roots [J]. *Journal of Henan University (Natural Science Edition)*, 2012, 42 (6): 736–741. (in Chinese)
- [8] LI T, ZHANG J, SHEN C H, et al. 1-aminocyclopropane-1-carboxylate: A novel and strong chemoattractant for the plant beneficial rhizobacterium *Pseudomonas putida* UW₄ [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2019, 32 (6): 750–759.
- [9] SHAHAROONA B, JAMRO G M, ZAHIR Z A, et al. Effectiveness of various *Pseudomonas* spp. and *Burkholderia caryophylli* containing ACC-deaminase for improving growth and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2007, 17 (8): 1300–1307.
- [10] BRAATSCH S, HELMARK S, KRANZ H, et al. *Escherichia coli* strains with promoter libraries constructed by Red/ET recombination pave the way for transcriptional fine-tuning [J]. *BioTechniques*, 2008, 45 (3): 335–337.
- [11] PENROSE D M, GLICK B R. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria [J]. *Physiologia Plantarum*, 2003, 118 (1): 10–15.
- [12] TSO W W, ADLER J. Negative chemotaxis in *Escherichia coli* [J]. *Journal of Bacteriology*, 1974, 118 (2): 560–576.
- [13] PORTER S L, WADHAMS G H, ARMITAGE J P. Signal processing in complex chemotaxis pathways [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, 9 (3): 153–165.
- [14] NI B, HUANG Z, FAN Z, et al. *Comamonas testosteroni* uses a chemoreceptor for tricarboxylic acid cycle intermediates to trigger chemotactic responses towards aromatic compounds [J]. *Molecular Microbiology*, 2013, 90 (4): 813–823.
- [15] LACAL J, ALFONSO C, LIU X X, et al. Identification of a chemoreceptor for tricarboxylic acid cycle intermediates: Differential chemotactic response towards receptor ligands [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285 (30): 23126–23136.
- [16] LUU R A, KOOTSTRA J D, NESTERYUK V, et al. Integration of chemotaxis, transport and catabolism in *Pseudomonas putida* and identification of the aromatic acid chemoreceptor PcaY [J]. *Molecular Microbiology*, 2015, 96 (1): 134–147.
- [17] JIANG X Z, LIU H J, NIU Y C, et al. Determination of temperature sensitive plasmid copy number in *Escherichia coli* by absolute and relative real time quantitation PCR [J]. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 2017, 10 (7): e14600.

(责任编辑: 张梅)