

# *ssuA* 基因敲除对生防菌吡咯伯克霍尔德氏菌 JK-SH007 定殖和生防功能的影响

张丽慧<sup>1</sup> 曹永清<sup>1</sup> 晋婷婷<sup>1</sup> 鲁世金<sup>2</sup> 任嘉红<sup>1\*</sup>

(1. 长治学院生命科学系, 山西 长治 046011; 2. 广西中医药大学附属瑞康医院中西医结合转化医学中心, 广西 南宁 530011)

**摘要:** 吡咯伯克霍尔德氏菌 *Burkholderia pyrrocinia* JK-SH007 是一株对杨树溃疡病具有良好防治效果的内生生物。基于 JK-SH007 菌株基因组数据设计特异性引物进行 *ssuA* 基因克隆, 利用生物信息学分析 *ssuA* 蛋白与其他物种同源蛋白的相似性、系统进化和理化性质, 并使用同源重组双交换获得 JK-SH007 菌株 *ssuA* 基因敲除株 (JK-SH007  $\Delta ssuA$ )。在此基础上, 分别测定野生株 (WT) 和敲除株的生长曲线、运动能力、胞外多糖、产嗜铁素、cyclic Dimeric Guanosine Monophosphate (c-di-GMP)、生物膜形成、抗菌能力、*prn* 基因簇组成基因的表达及内生定殖动态。结果显示: *ssuA* 基因序列全长 1 107 bp, 编码 366 个氨基酸, 其编码的蛋白质二级结构及三级结构元件一致; 系统发育分析发现, *ssuA* 蛋白质与 *Burkholderia arboris* 亲缘关系最近;  $\Delta ssuA$  菌株的胞外多糖合成、生物膜形成、产嗜铁素以及抗菌能力较 WT 减弱, 但生长能力未发生改变; *prnA* 和 *prnB* 显著下调, 而 *prnC* 和 *prnD* 上调; c-di-GMP 含量减少 4.97%; 在杨树组培苗根、茎和叶的内生定殖能力分别下降 78.57%、80.77% 和 66.67%。因此, *ssuA* 基因正调控 JK-SH007 菌株生物膜形成, 与胞外多糖产生、产嗜铁素和 c-di-GMP 合成密切相关, 同时影响抑菌能力和内生定殖能力, 但对菌株生长无影响。这为揭示 *ssuA* 基因对 JK-SH007 菌株定殖和生防能力的影响奠定了基础, 也为杨树溃疡病生防微生物菌剂的研发与高效应用提供了科学依据。

**关键词:** 吡咯伯克霍尔德氏菌 JK-SH007; *ssuA* 基因; 生物膜; 定殖; 生防能力

中图分类号: Q939.99 文献标识码: A 文章编号: 2097-5279(2025)01-0055-17

## Effect of *ssuA* gene knockout on the colonization and biocontrol function of the biocontrol bacterium *Burkholderia pyrrocinia* JK-SH007

ZHANG Lihui<sup>1</sup> CAO Yongqing<sup>1</sup> JIN Tingting<sup>1</sup> LU Shijin<sup>2</sup> REN Jiahong<sup>1\*</sup>

(1. The Department of Biological Science and Technology, Changzhi University, Changzhi 046011, China; 2. Centre for Translational Medical Research in Integrative Chinese and Western Medicine, Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, China)

**Abstract:** *Burkholderia pyrrocinia* JK-SH007 is an effective biocontrol agent against poplar canker. Based on the genomic data of JK-SH007 strain, specific primers were designed to clone the *ssuA* gene, and bioinformatics were used to analyze the similarity, phylogeny, and physicochemical properties of the *ssuA* protein to homologous proteins of other species, and the *ssuA* knockout mutant of JK-SH007 (JK-SH007  $\Delta ssuA$ ) was obtained by double crossover of homologous recombination. On this basis, the growth curve, motility, exopolysaccharide, siderophore production, cyclic Dimeric Guanosine Monophosphate (c-di-GMP), biofilm formation, antibacterial ability, expression of *prn* gene cluster and endophytic colonization dynamics of wild-type strain (WT) and knockout strain were determined. The results showed that the full-length sequence of *ssuA* gene is 1 107 bp, encoding 366 amino acids, and the secondary structure and tertiary structure of the encoded protein are identical. Phylogenetic analysis showed that the *ssuA* protein was the most closely related to *Burkholderia arboris*. The exopolysaccharide synthesis, biofilm formation, siderophore production and antibacterial ability of the  $\Delta ssuA$  strain were weaker than those of WT, but the growth ability was not changed. Two genes (*prnA* and *prnB*) were significantly down-regulated, while *prnC* and *prnD* were up-regulated. The content of c-di-GMP decreased by 4.97%. The endophytic colonization ability of roots, stems and leaves of poplar tissue-cultured seedlings decreased by 78.57%, 80.77% and 66.67%, respectively. Therefore, the *ssuA* gene positively regulated biofilm formation of JK-SH007, which was closely related to exopolysaccharide production, siderophore production and c-di-GMP synthesis, and affected the antibacterial ability and endogenous colonization ability, but had no effect on the growth of the strain. This study lays a

收稿日期: 2024-12-17; 修回日期: 2025-01-08。

基金项目: 国家自然科学基金项目(32071770); 山西省回国留学人员科研资助项目(2023-172); 山西省“1331工程”资助项目(1331KSC)。

\* 通信作者: 任嘉红 (E-mail: renjiahong@163.com), 教授。

foundation for revealing the effect of *ssuA* gene on the colonization and biocontrol ability of strain JK-SH007, and also provides a scientific basis for the development and efficient application of biocontrol microbial agents for poplar canker disease.

**Key words:** *Burkholderia pyrrocinia* JK-SH007; *ssuA* gene; biofilm; colonization; biocontrol ability

杨树 *Populus* spp. 在中国广泛种植, 具有重要的经济和生态价值。杨树在植树造林、生态修复、美化环境以及防沙固沙等方面发挥着重要作用, 同时也是生产人造板和纤维材料的关键原料(梁军等, 2005; 黄烈健和苏晓华, 2003; 杨蕾等, 2014)。杨树溃疡病 (poplar canker) 是一种危害杨树主枝、树干等部位的寄主主导型病害, 对幼树危害严重, 可导致其枝梢枯萎、减产, 甚至死亡(陈一凡等, 2024; Li et al., 2020)。杨树溃疡病严重阻碍了中国杨树人工林产业的持续发展。目前, 杨树溃疡病的防治主要依赖于林业管理和化学方法, 但林业管理耗时且效果缓慢, 化学方法则对环境造成污染和破坏。

生防细菌在植物病害防治等方面具有重要意义。吡咯伯克霍尔德氏菌 *Burkholderia pyrrocinia* JK-SH007 是一株从杨树树干分离出的安全高效的内生防菌, 该菌株能够显著促进杨树生长并有效防治溃疡病 (Ren et al., 2011)。课题组前期研究表明, JK-SH007 菌株的生防机制有多种, 主要包括产生抑菌性挥发性有机化合物 (volatile organic compounds, VOCs) (张鹏飞, 2018)、诱导宿主植物抗病性 (Liu et al., 2020)、分泌嗜铁素 (闵莉静等, 2019)、分泌抗菌蛋白 (任嘉红等, 2010) 以及分泌多种水解酶 (Ren et al., 2011) 等。

有研究表明, *Escherichia coli* 的 *ssuEADCB* 基因簇在利用特定硫源方面具有重要作用且在特定条件下表达 (Eichhorn et al., 2000)。ATP 结合盒 (ATP-binding cassette, ABC) 转运蛋白是一种膜蛋白, 负责在 ATP 水解过程中通过细胞膜转运多种底物, 而 *ssuA* 基因是调控 ABC 转运蛋白吸收硫酸或硫酸盐的关键基因。柑桔黄单胞菌 *Xanthomonas citri* 中编码硫酸结合蛋白 *ssuA* 的 *ssuA2* 基因缺失会影响黄原胶体外生成 (Sampaio et al., 2017), 而黄原胶对细胞吸附增殖有影响 (欧杰等, 2003)。因此, *ssuA* 基因极有可能在生防细菌的代谢、生物膜形成和生防功能等方面有着潜在的重要作用。

内生防细菌在宿主植物内的定殖能力往往影响其对病害的生防效果 (Wang et al., 2024)。而生物膜的形成可以使菌株在宿主植物体内高效定殖、持续存在并发挥作用 (Chen et al., 2012)。研究表明, 运动能力 (Verstraeten et al., 2008)、胞外多糖 (刘佳文等, 2022)、嗜铁素 (Hasmik et al., 2016)、c-di-GMP (Ha and O'Toole,

2015) 等对细菌生物膜的形成均有影响。另外, 生物膜的形成与菌株的定殖和生防能力相关 (司方洁等, 2022; Bais et al., 2004)。如嗜铁素是许多生防菌株如 *Bacillus velezensis* YL2021 (沈佳慧等, 2022)、*Rahnella aquatilis* JZ-GX1 (孔维亮等, 2019)、*B. pyrrocinia* JK-SH007 (闵莉静等, 2019) 等发挥生防作用的重要抑菌物质。对 JK-SH007 菌株进行全基因组注释分析, 发现其存在 *prn* 基因簇。*prn* 基因簇已在荧光假单胞菌属 *Pseudomonads* (Someya et al., 2020; Chen et al., 2015)、沙雷氏菌属 *Serratia* (Liu et al., 2018)、伯克霍尔德氏菌属 *Burkholderia* (Schmidt et al., 2009) 中证实与合成抗菌物质一硝吡咯菌素 (Pyrrolnitrin, PRN) 密切相关。基于以上原因, 本研究拟通过同源重组双交换构建 JK-SH007 菌株 *ssuA* 基因敲除突变株, 通过测定菌株生长情况、运动能力、胞外多糖、生物膜形成、抗菌能力、产嗜铁素、*prn* 基因簇的表达、c-di-GMP 及定殖动态, 进一步探讨 *ssuA* 基因缺失对细菌定殖和生防能力的影响, 以期深入理解 JK-SH007 菌株在杨树树体内有效定殖并发挥其生物防治功能提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 供试细菌菌株、质粒

供试细菌菌株: *Burkholderia pyrrocinia* JK-SH007、*Escherichia coli* S17-1、*Escherichia coli* Sm10( $\lambda$ pir) 由西北农林科技大学沈锡辉教授赠予; 质粒 PHKT2 由加拿大卡尔加里大学 Howard Ceri 教授惠赠, 带有组成型表达的绿色荧光蛋白标记 (green fluorescent protein, GFP) 基因以及甲氧苄胺嘧啶 (Trimethoprim, 1.5  $\mu$ g/mL) 抗性; 敲除质粒 pDM4-*phes* 由中国科学院邵峰院士赠予。

#### 1.1.2 供试病原菌

金黄壳囊孢 *Cytospora chrysosperma*、拟茎点霉 *Phomopsis macrospore* 以及七叶树壳梭孢 *Fusicoccum aesculi* 3 株杨树溃疡病病原真菌由南京林业大学森林病理实验室提供, 现保存于本实验室。

#### 1.1.3 供试培养基

NA 培养基 (任嘉红等, 2012), NB 培养基为 NA 培养基不加琼脂; PDA 培养基 (杨荣等, 2020); TSB 培养基 (Fu et al., 2020); SM 培养基 (曹永清, 2022); CAS 检测平板 (Louden et al., 2011); MKB 培养基 (甘油 15 mL/L、

$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  3.28 g/L、酸水解酪素 5 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  2.5 g/L, pH 7.2)。

#### 1.1.4 主要试剂和仪器

试剂: DL2000 DNA Marker、DL10000 DNA Marker 和 10×loading buffer 均购自 TaKaRa 公司; 4-氯-DL-苯丙氨酸、硫酸链霉素 (Streptomycin Sulfate)、氯霉素 (Chloramphenicol)、甲氧苄胺嘧啶 (Trimethoprim) 和 2.5% 戊二醛固定液均购自 Solarbio 公司; 普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒和质粒提取试剂盒, 均购自天根公司; *Xma* I、*Spe* I、Q5 polymerase 均购自 NEB 公司; PrimeStart GXL DNA、pMD18-T、T4 DNA Ligase、RnaseA、TB Green® Premix Ex Taq™ II、PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 均购自 TaKaRa 公司; Rapid Taq Master Mix 购自 Vazyme 公司; 其余药品为常规分析纯。

仪器: DMC 6200 研究级 DIC 正置显微镜 (德国

Leica)、TM3000 台式扫描电子显微镜 (日本 Hitachi)、Centrifuge 5804R 台式冷冻离心机 (德国 Eppendorf)、1-4 LSC 冻干机 (德国 Christ)、ND2000 微量分光光度计 (美国 Thermo)、SYNERGY H1 Gene 5 酶标仪 (美国 BioTeK)、ChemiDoc XRs 凝胶成像系统 (美国 BIO-RAD) 和 QuantStudio3 荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI)。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 *ssuA* 基因克隆和生物信息学分析

基因的克隆: 根据 JK-SH007 菌株全基因组测序结果 (序列号: GCA\_022809715.1), 利用 Primer 5 设计引物 *ssuA*-F 和 *ssuA*-R (表 1), 以基因组 DNA 为模板, 扩增 *ssuA* 基因片段, 产物经普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收, 然后连接 pMD18-T, 经 M13F 和 M13R 引物检测正确后, 挑选阳性克隆子送至北京华大测序公司进行测序。具体方法参照产品说明书。

表 1 PCR 引物

Tab. 1 Primer sequence

引物名 Primer name	序列 (5'→3') Sequence(5'→3')
007_ <i>ssuA</i> FW	CCCCCGGGCGACGTGTCGTCGATCAG
007_ <i>DelssuA</i> FW	CGGCATCAGCGGCTCGCGACGAGGGAGAGCGTGTGCTTCAT
007_ <i>ssuA</i> RV	GGACTAGTAACGCATATTGATGGGCCGCAT
007_ <i>DelssuA</i> RV	ATGAAGCACACGCTCTCCCTCGTCGCGAGCCGCTGATGCCG
007_ <i>ssuA</i> SQFW	GACCACGCTTACCCAGACAG
007_ <i>ssuA</i> SQRV	GAGATCGGTCGCGAGTTTC
<i>ssuA</i> -F	ATGAAGCACACGCTCTCCCTC
<i>ssuA</i> -R	TCAGCGGCTCGCGACGCGCGAT
M13F	TGTAAACGACGGCCAGT
M13R	CAGGAAACAGCTATGACC

基因的生物信息学分析: 利用 ProtParam (ExPASy-ProtParam tool) 分析预测 *ssuA* 蛋白的基本理化性质; 利用 NetPhos 3.1 Server (NetPhos-3.1-Services-DTU Health Tech) 进行磷酸化位点分析; 利用 SignalP 5.0 server (SignalP-5.0-Services-DTU Health Tech) 进行信号肽分析; 利用 TMHMM (TMHMM-2.0-Services-DTU Health Tech) 进行蛋白序列跨膜区分析; 利用 NCBI CDD 数据库 (NCBI Conserved Domain Search) 对蛋白质保守结构域进行分析; 利用 SMART [SMART: Main page (embl.de)] 对蛋白质结构功能域进行预测; 利用 SOPMA [NPS@: SOPMA secondary structure prediction (ibcp.fr)] 预测基因编码蛋白的二级结构; 利用 SWISS-MODEL (swissmodel.expasy.org) 预测基因编码蛋白的三级结构; 利用 DNAMAN 软件完成氨基酸序列多重比对分析; 利用 MEGA 7.0 对 *ssuA* 蛋白序列用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树。

### 1.2.2 *ssuA* 基因敲除突变菌株的构建

以 JK-SH007 菌株的基因组 DNA 为模板, 采用表 1

中 007\_ *ssuA*FW/007\_ *DelssuA*FW 及 007\_ *ssuA*RV/007\_ *DelssuA*RV 引物分别扩增出 *ssuA* 基因同源前臂片段 A 和同源后臂片段 B; 采用表 1 中 007\_ *ssuA*FW/007\_ *ssuA*RV 引物对, 利用 Overlap PCR 技术将 A、B 片段连接, 命名为 *ssuA*-A+B, 产物经普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收。利用 *Xma* I 和 *Spe* I 对 *ssuA*-A+B 和质粒 pDM4-*phes* 进行酶切, 利用 T4 DNA Ligase 进行连接, 转化至 *E. coli* 感受态, 通过筛选获得敲除载体, 命名为 pDM4-*phes-ssuA*-A+B。利用接合 (王俞苹等, 2019) 方式将 pDM4-*phes-ssuA*-A+B 导入 JK-SH007 中, 在含有 St (100 μg/mL) + Cm (150 μg/mL) 的 LB 固体平板上涂布, 30℃ 恒温培养 2 d, 待平板长出单菌落, 接种至含 St (100 μg/mL) 的 LB 液体培养基中, 30℃ 过夜培养, 将菌液稀释至 10<sup>-5</sup> 倍, 取其 90 μL 涂布于含 15 mmol/L p-Cl-Phe 的 M9 固体平板上, 30℃ 恒温培养 4-5 d。之后分别在含有 St (100 μg/mL) 的 LB 平板及含有 Cm (150 μg/mL) 的 LB 平板上进行筛选, 仅能在含有 St (100 μg/mL) 的 LB 平板上生长的为双交换菌

株。最后使用表1中007\_ *ssuASQFW*/007\_ *ssuASQRV*引物对进行验证,将验证正确的双交换菌株送至北京华大测序公司进行测序,测序正确即为 *ssuA* 基因敲除突变株,命名为 JK-SH007 $\Delta$ *ssuA*(简称 $\Delta$ *ssuA*)。

### 1.2.3 野生菌株和 $\Delta$ *ssuA* 突变菌株抑菌活性测定

采用平板对峙法和带毒平板法进行拮抗 *C. chrysosperma*、*P. macrospore* 和 *F. aesculi* 3种杨树溃疡病病原真菌能力测定,以只接种病原菌的平板为对照(CK),28℃ 恒温培养 4~5 d 后计算抑菌率。平板对峙法具体步骤参照张丽慧等(2024)方法,计算公式为:

$$\text{抑菌率}(\%) = (1 - \text{处理组植物病原菌直径}) / \text{对照组植物病原菌直径} \times 100 \quad (1)$$

带毒平板法参照任嘉红等(2010)方法,计算公式为:

$$\text{抑菌率}(\%) = (\text{对照平板菌落直径} - \text{带毒平板菌落直径}) / (\text{对照平板菌落直径} - \text{菌块直径}) \times 100 \quad (2)$$

### 1.2.4 野生菌株和 $\Delta$ *ssuA* 突变菌株生长情况测定

将 JK-SH007 野生株(WT)与 *ssuA* 基因敲除突变株( $\Delta$ *ssuA*)分别划线接种于 NA 平板,30℃ 恒温培养 2 d 后,分别挑取单菌落接种至 20 mL NB 液体培养基中,30℃,180 r/min 振荡培养 24 h,利用 NB 培养基调整菌液浓度为  $5 \times 10^7$  CFU/mL 作为接种液,吸取 75  $\mu$ L 接种液至含有 1.425 mL NB 液体培养基的 24 孔板中,使用 Gene 5 酶标仪测定其 OD<sub>600</sub>。

### 1.2.5 影响野生菌株和 $\Delta$ *ssuA* 突变菌株生物膜的形成相关指标测定

#### 1.2.5.1 运动能力

以步骤 1.2.4 中菌浓度为  $5 \times 10^7$  CFU/mL 的 WT 与  $\Delta$ *ssuA* 菌液作为接种液,取 2.5  $\mu$ L 点种于 SM 培养基正中央,30℃ 连续培养 7 d,每处理 3 个重复。具体步骤参考 Deng 等(2012)方法。

#### 1.2.5.2 胞外多糖的合成量

将 JK-SH007(WT)与  $\Delta$ *ssuA* 菌株于 NA 平板活化后,挑取单菌落至 NB 液体培养基,30℃,180 r/min 振荡培养 24 h,利用 NB 液体培养基将各菌株菌液浓度调整为  $1 \times 10^8$  CFU/mL,制成接种液,按 1% 的接种量接种至 50 mL NB 液体培养基中,30℃,180 r/min 振荡培养 5 d 后进行菌株胞外多糖的测定,具体步骤参考徐坤山等(2017)方法。

#### 1.2.5.3 c-di-GMP 的合成水平

分别吸取 3 mL 培养至对数生长期的 JK-SH007(WT)与  $\Delta$ *ssuA* 菌液,4℃,8 000 r/min,离心 10 min 收集菌体。通过双抗体一步夹心法酶联免疫吸附实验试剂盒(ELISA)检测 WT 与  $\Delta$ *ssuA* 菌株 c-di-GMP 的产量变化。

### 1.2.5.4 生物膜产量定性和定量测定

定性测定:将 WT 与  $\Delta$ *ssuA* 菌株划线接种于 TSB 固体平板上,30℃ 恒温培养 2 d 后,分别挑取单菌落接种至 20 mL TSB 液体培养基中,30℃,180 r/min 振荡培养 24 h,利用 TSB 培养基调整菌浓度为  $1 \times 10^7$  CFU/mL 作为接种液,在放有无菌爬片(直径 14 mm)的无菌 24 孔细胞培养板中加入 1 mL 接种液,每处理 3 个重复,30℃ 恒温培养 5 d 后弃菌液,利用等量无菌水润洗爬片表面浮游菌 3 次,加入等量 2.5% 戊二醛固定液,4℃ 静置 24 h 后进行无水乙醇梯度脱水 15 min、叔丁醇梯度置换 15 min,重复 2 次。最后将 24 孔板置于 -80℃ 冻干机进行冷冻,待干燥后对其进行喷金并进行电镜观察。

定量测定:以上述菌浓度为  $1 \times 10^7$  CFU/mL 的 WT 与  $\Delta$ *ssuA* 菌液作为接种液接种 5 mL 至试管中,每处理 3 个重复,30℃ 恒温培养 5 d,进行生物膜的定量测定,具体步骤参考 Huber 等(2001)方法。

### 1.2.6 产嗜铁素能力测定

对 JK-SH007(WT)与  $\Delta$ *ssuA* 菌株开展产嗜铁素能力的测定,以步骤 1.2.4 中菌浓度为  $5 \times 10^7$  CFU/mL 的 WT 与  $\Delta$ *ssuA* 菌液作为接种液,取 2.5  $\mu$ L 点种于 CAS 平板上,30℃ 恒温连续培养 5 d,每处理 3 个重复。同时将 WT 与  $\Delta$ *ssuA* 菌株接种至 MKB 液体培养基中,30℃,180 r/min 连续振荡培养 5 d,以空白培养基为对照,计算产嗜铁素能力。计算公式为:

$$\text{嗜铁素单位}(\%) = (\text{对照组 OD}_{630} - \text{实验组 OD}_{630}) / \text{对照组 OD}_{630} \times 100 \quad (3)$$

$$\text{嗜铁素能力} = \text{嗜铁素单位数} / \text{细菌 OD}_{600} \quad (4)$$

### 1.2.7 菌株 *prn* 基因簇组成基因表达量测定

以步骤 1.2.4 中菌浓度为  $5 \times 10^7$  CFU/mL 的 WT 与  $\Delta$ *ssuA* 菌液作为接种液,按 1% 的接种量接种至 20 mL NB 液体培养基中,30℃,180 r/min 振荡培养 24 h,收集发酵液 2 mL,使用 Trizol 法提取 WT 与  $\Delta$ *ssuA* 菌株 RNA。参照 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒说明书合成 cDNA,按照 TB Green® Premix Ex Taq™ II 试剂盒说明书进行实时荧光定量 PCR。以 *pyrG* 作为内参基因(Wu et al., 2017),目标基因表达水平以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法进行计算。所用引物详见表 2。

### 1.2.8 菌株在杨树组培苗内的定殖能力测定

利用反复冻融法将带有绿色荧光(GFP)的质粒 PHKT2 转化至 WT 与  $\Delta$ *ssuA* 感受态中,将成功获得带有 GFP 基因的 WT 与  $\Delta$ *ssuA* 菌株划线接种于含 Tmp (20  $\mu$ g/mL)的 TSB 固体平板上,30℃ 恒温培养 2 d,待

表 2 QPCR 引物

Tab. 2 Primer sequence

引物名 Primer name	序列 (5'→3') Sequence(5'→3')
007_pyrG-QPCR-FW	AGTCACCCTCCTCAAACCTCG
007_pyrG-QPCR-RV	TCGTGAAGTTGTTGGCCTTG
007_prnA-QPCR-FW	GCCATCAAGGAAAAGGTTCA
007_prnA-QPCR-RV	TCCGTTCAACCAGAAGTTCC
007_prnB-QPCR-FW	GAAGTGACCGTCGAGCTGTA
007_prnB-QPCR-RV	GAAGCGTAAGCGTAAACGA
007_prnC-QPCR-FW	CGACGACATCTTCAAGGTCA
007_prnC-QPCR-RV	GGTTGTTGAACGGAATCACC
007_prnD-QPCR-FW	ACAAGCTGCTCCAGTGTGTG
007_prnD-QPCR-RV	AACCCGAACAGCACGTAGTC

平板长出单菌落后分别挑取 WT 与  $\Delta ssuA$  单菌落于 20 mL 含 Tmp(20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的 TSB 液体培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ , 180 r/min 振荡培养 24 h。发酵液(4 $^{\circ}\text{C}$ , 8000 r/min)离心 5 min, 利用等量无菌水润洗菌体 3 次后, 将各菌株浓度调整为  $1 \times 10^8$  CFU/mL 作为接种液, 接种杨树组培苗(苗龄 30 d), 以无菌水为对照, 接种量为 2 mL/株。每处理 3 个重复, 置于组培室培养。

接种 15 d 后对组培苗根、茎、叶组织进行定量取样, 无菌水润洗一次; 体积分数 70% 乙醇处理(根 50 s, 茎 1 min, 叶 50 s), 无菌水润洗 4 次; 0.1% 升汞处理(根 10 s, 茎 1 min, 叶 45 s), 无菌水润洗 4 次, 晾干; 加 2 mL 无菌水研磨至充分后, 静置 15 min, 分别吸取 100  $\mu\text{L}$

上清液梯度稀释至  $10^{-3}$  倍, 各吸取 100  $\mu\text{L}$  菌液涂布于 NA 平板, 每处理 3 个重复, 30 $^{\circ}\text{C}$  恒温培养 2 d, 统计单菌落数, 明确菌株定殖情况。

### 1.2.9 数据处理

采用 Excel 2017 对数据进行处理, SPSS V11.0 和 Origin 2024 软件进行方差分析和绘图。使用 Image J 软件对 WT 与  $\Delta ssuA$  菌株定殖于杨树组培苗根部、茎部和叶部的荧光图像进行分析, 记录杨树组培苗根部、茎部和叶部的平均荧光强度 (Mean Fluorescence Intensity, MFI) 并用于比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 *ssuA* 基因的克隆及其生物信息学分析

根据 JK-SH007 菌株全基因组中 *ssuA* 基因的 DNA 序列, 在线软件设计其 PCR 扩增的特异性引物, 对 *ssuA* 基因进行克隆。测序结果显示, *ssuA* 基因全长 1107 bp, 经 Blast 比对与全基因组片段结果相一致。据 ProtParam 在线软件分析, 该开放阅读框共编码 366 个氨基酸(表 3)。*ssuA* 基因编码蛋白理论分子量约为 39.5 KDa; 理论等电点 (isoelectric point, pI) 为 9.52, 为碱性蛋白质; 脂肪系数为 94.76, 平均疏水性为 -0.027, 分子式为  $\text{C}_{1779}\text{H}_{2812}\text{N}_{494}\text{O}_{519}\text{S}_2$ , 不稳定系数为 24.75, 是稳定蛋白。

表 3 *ssuA* 的氨基酸组成Tab. 3 Amino acid composition of *ssuA*

氨基酸残基 Amino acid residue	个数 Number	比例/% Proportion	氨基酸残基 Amino acid residue	个数 Number	比例/% Proportion
丙氨酸 Ala (A)	57	15.5	赖氨酸 Lys (K)	19	5.2
精氨酸 Arg (R)	22	6.0	蛋氨酸 Met (M)	2	0.5
天冬酰胺 Asn (N)	10	2.7	苯丙氨酸 Phe (F)	9	2.4
天冬氨酸 Asp (D)	22	6.0	脯氨酸 Pro (P)	19	5.2
谷氨酰胺 Gln (Q)	10	2.7	丝氨酸 Ser (S)	30	8.2
谷氨酸 Glu (E)	10	2.7	苏氨酸 Thr (T)	23	6.3
甘氨酸 Gly (G)	24	6.5	色氨酸 Trp (W)	9	2.4
组氨酸 His (H)	6	1.6	酪氨酸 Tyr (Y)	13	3.5
异亮氨酸 Ile (I)	14	3.8	缬氨酸 Val (V)	32	8.7
亮氨酸 Leu (L)	37	10.1			

*ssuA* 蛋白磷酸化、信号肽及跨膜结构域。用 NetPhos 3.1 Server 在线软件, 对 *ssuA* 蛋白进行磷酸化位点分析。结果显示, *ssuA* 蛋白有 22 个 Ser、7 个 Thr、5 个 Tyr 可能成为蛋白磷酸化位点; 据 SignalP 5.0 server 在线软件分析, *ssuA* 蛋白具有信号肽, 剪切位点位于 35~36 号氨基酸之间(图 1A); 据 TMHMM 在线软件分析, 该蛋白无跨膜结构域, 为非跨膜蛋白, 位于膜外侧(图 1B)。

*ssuA* 蛋白结构功能域。应用 NCBI CCD 数据库

对 *ssuA* 基因编码的氨基酸序列进行蛋白质保守结构域预测。结果显示, 该蛋白质属于 Type 2 periplasmic binding fold superfamily 家族, 该蛋白通常由 2 个球状亚结构域组成, 作为转运、信号转导和通道门控的初始受体。采用 SMART 软件对 *ssuA* 蛋白的结构功能域进行预测, 在位于 5~33 和 192~200 的区域各存在一个低复杂性区域。

*ssuA* 蛋白结构分析: 用 SOPMA 在线软件对 *ssuA* 蛋白二级结构进行预测。结果显示, 其主要以  $\alpha$ -螺旋、

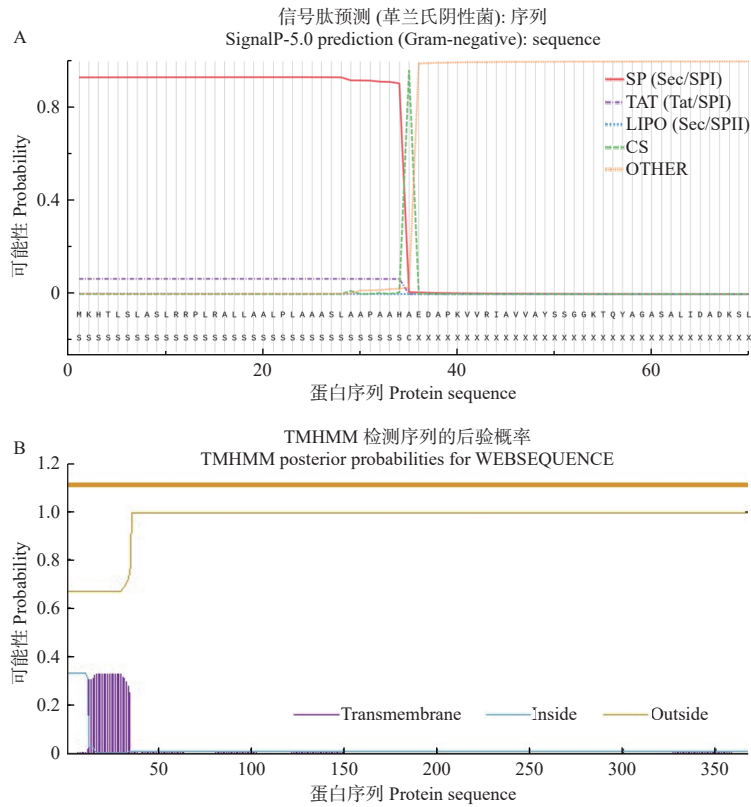


图1 ssuA 蛋白信号肽及跨膜结构域预测

Fig. 1 ssuA protein signal peptide and its transmembrane domain prediction

注: A. ssuA 蛋白信号肽预测; B. ssuA 蛋白跨膜结构域预测, X 轴和 Y 轴分别表示检测的氨基酸长度和后验概率。SP (Sec/SPI): 信号肽; TAT (TAT/SPI): TAT 信号肽; LIPO (Sec/SPII): 脂蛋白信号肽; CS: 切割位点; OTHER: 其他; Transmembrane: 跨膜; Inside: 内侧; Outside: 外侧。

Notes: A. Prediction of ssuA protein signal peptide; B: Prediction of ssuA protein transmembrane domain, The X and Y axes denote amino acid length and posterior probabilities. SP (SEC/SPI): Signal peptide (Sec/SPI). TAT (TAT/SPI): TAT signal peptide (Tat/SPI). LIPO (Sec/SPII): Lipoprotein signal peptide (Sec/SPII). CS: Cleavage site. Other. Transmembrane. Inside. Outside.

延伸链和无规则卷曲等为蛋白大量的结构原件。在该氨基酸序列中,  $\alpha$ -螺旋有 164 处, 占总二级结构的 44.57%; 延伸链有 51 处, 占总二级结构的 13.86%; 无规则卷曲有 153 处, 占总二级结构的 41.58%。用 SWISS-MODEL 在线软件对 ssuA 蛋白三级结构进行预测, 结果如图 2 所示, 该模型是以硝酸盐 ABC 转运体底物结合蛋白(A0A228QMS4.1.A)为模板进行构建,

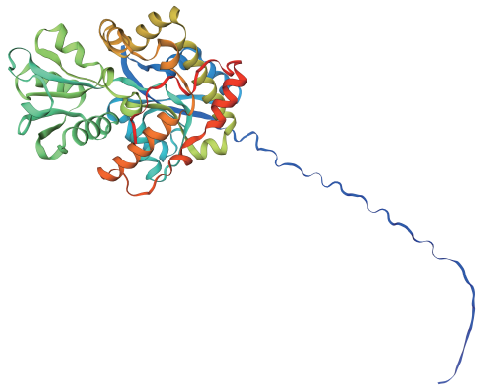


图2 ssuA 蛋白三级结构预测  
Fig. 2 Tertiary structure of ssuA protein

二者的序列一致性达到 96.74%, 预测可信度为 89.75%, ssuA 蛋白主要由  $\alpha$ -螺旋、无规卷曲和延伸链组成, 这也与 ssuA 蛋白二级结构预测结果一致。

ssuA 蛋白同源序列分析和进化树分析: 自 NCBI 数据库中获得 4 个不同细菌属的 14 条与 ssuA 同源的氨基酸序列(表 4), 利用生物信息学软件对 15 条氨基酸序列进行对比和系统发育树构建。使用 DNAMAN 软件对 15 条氨基酸序列进行多重序列比对分析, 结果显示, 不同细菌属的 ssuA 蛋白氨基酸序列同源性较低, 该蛋白序列与大肠杆菌属相关蛋白序列一致性为 27.07%~27.68%, 与柑橘黄单胞菌变种相关蛋白序列一致性为 26.85%~34.78%, 而与假单胞菌属相关蛋白序列一致性较高, 均在 58% 以上(图 3)。使用 MEGA 7.0 的 NJ 法对上述蛋白序列进行进化树构建, 结果表明, 不同属细菌亲缘关系较远, 大肠杆菌与柑橘黄单胞菌亲缘关系比较近, 而伯克霍尔氏菌与假单胞菌亲缘关系比较近。ssuA 蛋白与 *Burkholderia arboris*(WP\_175845596.1)亲缘关系最近(图 4), 推测 ssuA 蛋白功能与 *B. arboris* 的 ssuA 同源蛋白相似。

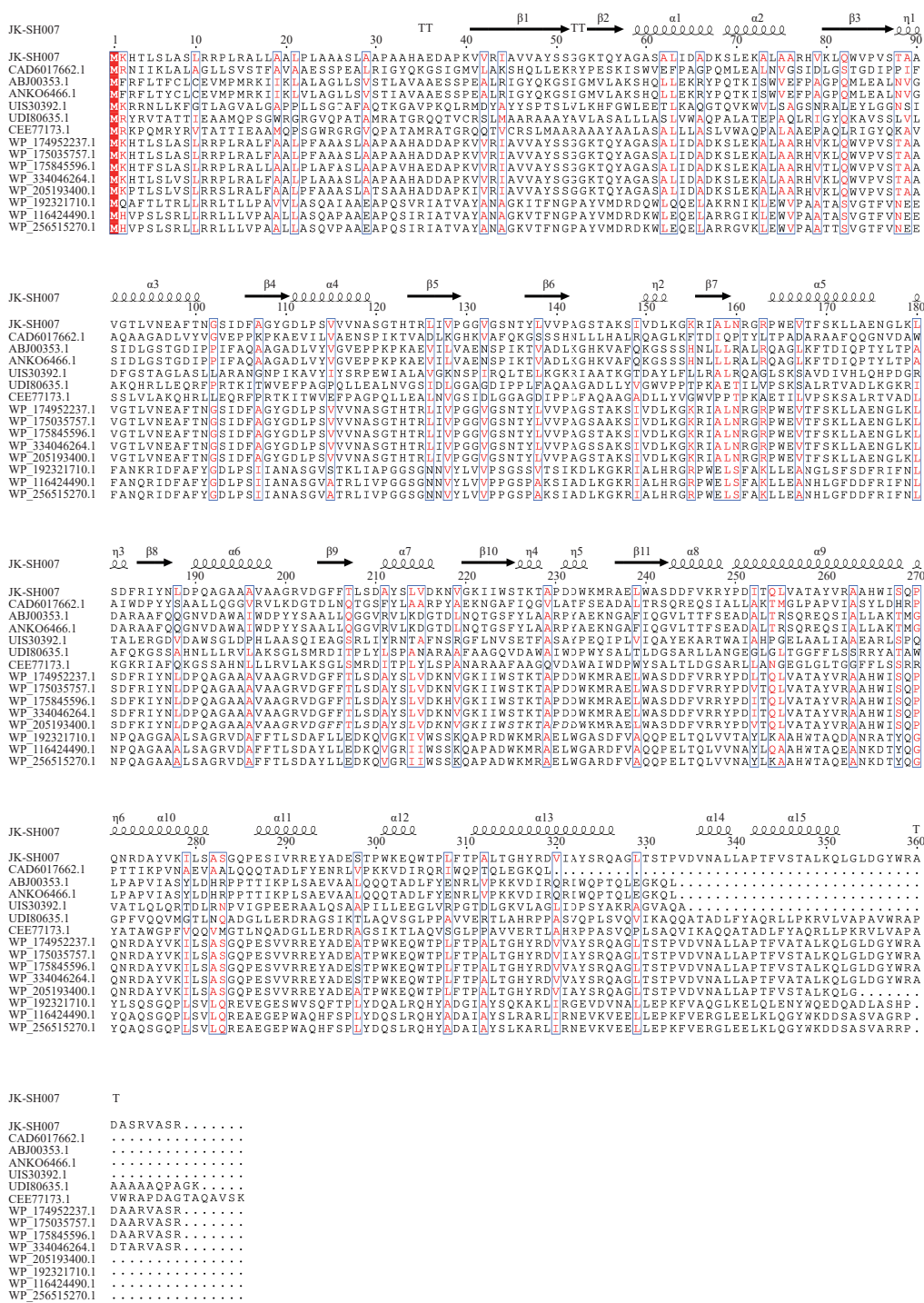


图 3 不同菌株 *ssuA* 蛋白氨基酸序列比对

Fig. 3 Multiple alignment of *ssuA* from different strain

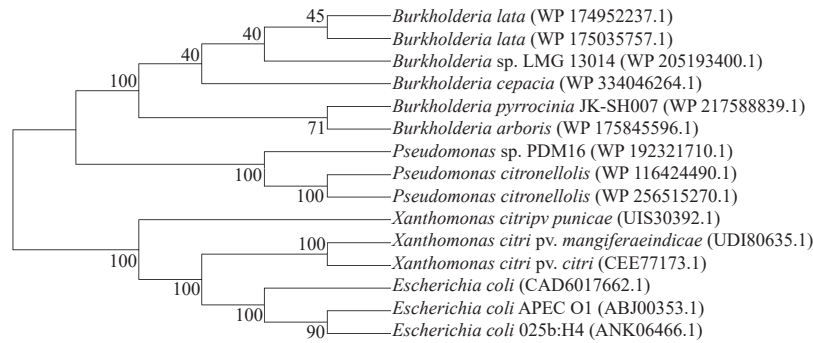
2.2 *ssuA* 基因敲除突变株的构建

通过同源重组技术获得 *ssuA* 基因敲除突变株 JK-SH007Δ*ssuA*, 结果如图 5 所示, 泳道 2 扩增出的条带大小约为 2 214 bp, 明显小于阳性对照 JK-SH007 野生株 (WT) 的大小 (3 285 bp)。通过测序进一步表明, *ssuA* 基因敲除突变株构建成功。

2.3 *ssuA* 基因对 JK-SH007 菌株抑菌活性的影响

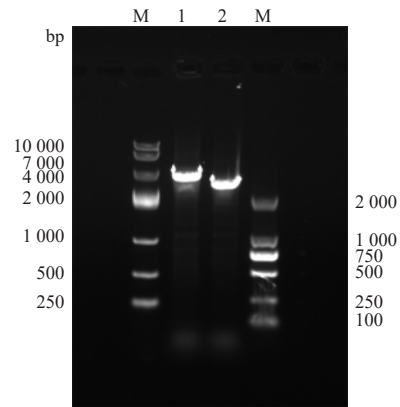
采用平板对峙法对 JK-SH007 野生株 (WT) 和 Δ*ssuA*

菌株的抑菌能力进行测定。对于供试的 3 株杨树溃疡病原真菌 *C. chrysosperma*、*P. macrospore* 和 *F. aesculi*, WT 和 Δ*ssuA* 菌株均表现出拮抗作用, 与空白对照 (CK) 相比, WT 对 *C. chrysosperma*、*P. macrospore* 和 *F. aesculi* 的抑制率分别为 67.70%、59.10% 和 59.34%; *ssuA* 基因缺失后, JK-SH007 菌株对 *C. chrysosperma*、*P. macrospore* 和 *F. aesculi* 的抑菌率分别下降了 0.25%、1.40% 和 0.43% (图 6, 表 5)。

图4 不同菌株 *ssuA* 蛋白系统进化树分析Fig. 4 Phylogenetic tree analysis of *ssuA* proteins from different strain表4 不同菌株 *ssuA* 蛋白Tab. 4 *ssuA* protein from different strain

细菌名称 Bacterial name	蛋白登录号 Protein number
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	CAD6017662.1
大肠杆菌 APEC O1 菌株 <i>E. coli</i> APEC O1	ABJ00353.1
大肠杆菌 O25b:H4 菌株 <i>E. coli</i> O25b:H4	ANK06466.1
柑橘黄单胞菌石榴致病变种 <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>punicea</i>	UIS30392.1
柑橘黄单胞菌芒果致病变种 <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i>	UDI80635.1
柑橘黄单胞菌致病变种 <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>	CEE77173.1
宽广伯克霍尔德氏菌 <i>Burkholderia lata</i>	WP_174_952_237.1
<i>B. lata</i>	WP_175_035_757.1
油桐枯萎病拮抗菌伯克氏菌 <i>B. arboris</i>	WP_175_845_596.1
<i>B. arboris</i>	
洋葱伯克霍尔德氏菌 <i>B. cepacia</i>	WP_334_046_264.1
<i>B. cepacia</i>	
伯克霍尔德氏菌 LMG 13 014 菌株 <i>B. sp.</i> LMG 13 014	WP_205_193_400.1
<i>B. sp.</i> LMG 13 014	
假单胞菌 PDM16 菌株 <i>Pseudomonas sp.</i> PDM16	WP_192_321_710.1
<i>Pseudomonas sp.</i> PDM16	
香茅醇假单胞菌 <i>P. citronellolis</i>	WP_116_424_490.1
<i>P. citronellolis</i>	
香茅醇假单胞菌 <i>P. citronellolis</i>	WP_256_515_270.1
<i>P. citronellolis</i>	

为了进一步验证 *ssuA* 基因对 JK-SH007 菌株抑菌能力的影响,同时采用带毒平板法对 WT 和  $\Delta ssuA$  菌株的抑菌能力进行测定。对于供试的 3 株杨树溃疡病病原真菌 *C. chrysosperma*、*P. macrospore* 和 *F. aesculi*, WT 和  $\Delta ssuA$  菌株均表现出拮抗作用(图 7)。与空白对照(CK)相比,WT 对 *C. chrysosperma*、*P. macrospore* 和 *F. aesculi* 的抑制率分别为 79.50%、46.00% 和 13.47%; *ssuA* 基因缺失后,JK-SH007 菌株对 *C. chrysosperma*、*P. macrospore* 和 *F. aesculi* 的抑菌率分别下降了 7.81%、18.73% 和 4.47%(表 5)。以上结果显示, *ssuA* 基因与 JK-SH007 菌株的生防能力有一定联系。

图5 JK-SH007 (WT) 和  $\Delta ssuA$  PCR 鉴定Fig. 5 PCR verification of JK-SH007 (WT) and  $\Delta ssuA$ 

注:泳道 1. JK-SH007(WT); 泳道 2. JK-SH007 $\Delta ssuA$ ; M. DNA Maker。

Notes: lane 1. JK-SH007(WT); lane 2. JK-SH007 $\Delta ssuA$ ; M. DNA Maker.

## 2.4 *ssuA* 基因敲除对 JK-SH007 菌株生长的影响

以 JK-SH007 野生株(WT)为对照,可见 WT 与  $\Delta ssuA$  菌株生长情况相似,均在 10 h 达到对数生长期,而 18 h 后进入生长平台期(图 8)。这说明 *ssuA* 基因敲除后不影响 WT 自身的生长,即 *ssuA* 基因与 JK-SH007 的生长没有相关性。

## 2.5 *ssuA* 基因敲除对 JK-SH007 菌株生物膜形成相关指标的影响

### 2.5.1 运动能力

为了验证 *ssuA* 基因在 JK-SH007 中运动的重要性,本研究将 JK-SH007 野生株(WT)与  $\Delta ssuA$  菌株进行连续 7 d 的静置 SM 培养。WT 与  $\Delta ssuA$  菌株连续 7 d 的运动如图 9 所示。结果表明,随培养时间增加,WT 与  $\Delta ssuA$  菌株的游动直径均增大,但  $\Delta ssuA$  菌株运动能力相比 WT 较弱。

### 2.5.2 胞外多糖的合成量

利用苯酚-硫酸法定量检测 JK-SH007 野生株(WT)与  $\Delta ssuA$  菌株的胞外多糖含量。结果表明,  $\Delta ssuA$  菌株的胞外多糖含量比 WT 下降了 18.47%(图 10)。因

此, *ssuA* 基因对 JK-SH007 菌株产胞外多糖起正调控作用。胞外多糖是生物膜的主要成分, 且该结果与 2.5.4 中生物膜定性定量检测结果一致。因此, 进一步说明 *ssuA* 基因正调控 JK-SH007 菌株生物膜的形成。

### 2.5.3 c-di-GMP 的合成水平

通过双抗体一步夹心法酶联免疫吸附实验试剂盒(ELISA)检测 JK-SH007 野生株(WT)和  $\Delta ssuA$  菌株中 c-di-GMP 的产量。结果发现, 与 WT 相比,  $\Delta ssuA$  菌株中 c-di-GMP 产量减少了 4.97%(图 11)。

### 2.5.4 生物膜产量定性和定量分析

扫描电镜观察结果如图 12 所示, JK-SH007 野生株(WT)形成了较厚且结构复杂的生物膜, 细菌之间相互黏连, 形成了密集菌群网络结构, 并且有大量的胞外聚合物存在。而  $\Delta ssuA$  突变株形成的生物膜较薄, 细菌分布较为稀疏, 胞外聚合物明显减少, 进一步证实了敲除 *ssuA* 基因后生物膜形成能力下降。这表明 *ssuA* 基因缺失显著影响 JK-SH007 菌株生物膜的形成, 同时也暗示 *ssuA* 基因对生物膜的产生为

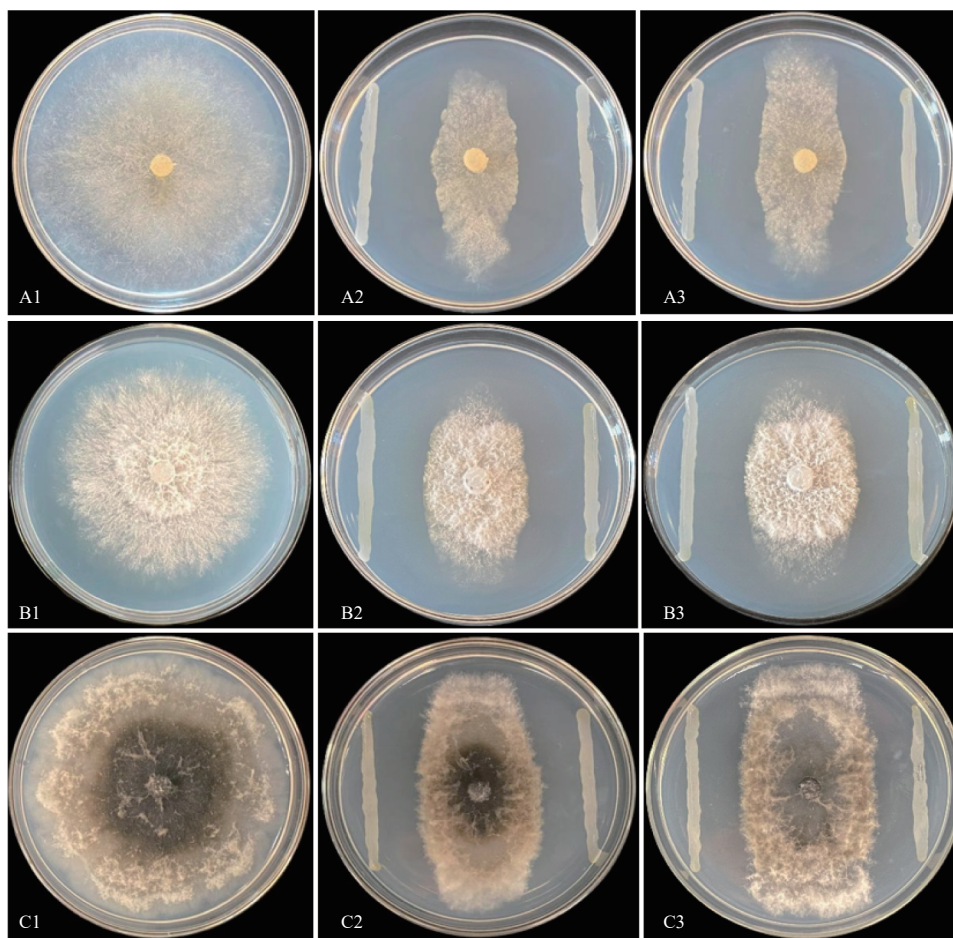


图 6 JK-SH007 野生株及其 *ssuA* 基因敲除株对 3 株杨树溃疡病原真菌的拮抗作用

Fig. 6 Antagonistic effect of JK-SH007 and its *ssuA* gene on three strains of pathogenic fungi

注: A1. CK1(*C. chrysosperma*); A2. WT; A3.  $\Delta ssuA$ ; B1. CK2(*P. macrospore*); B2. WT; B3.  $\Delta ssuA$ ; C1. CK3(*F. aesculi*); C2. WT; C3.  $\Delta ssuA$ 。

Notes: A1. CK1(*C. chrysosperma*); A2. WT; A3.  $\Delta ssuA$ ; B1. CK2(*P. macrospore*); B2. WT; B3.  $\Delta ssuA$ ; C1. CK3(*F. aesculi*); C2. WT; C3.  $\Delta ssuA$ 。

表 5 *ssuA* 敲除株与野生株对 3 株病原真菌的抑菌率

Tab. 5 Inhibition rate of *ssuA* knockout strain and wild-type strain against three strains of pathogenic fungi

病原真菌 Pathogenic fungi	平板对峙法 Flat panel confrontation method		带毒平板法 Poisonous tablet method	
	WT/%	$\Delta ssuA$ /%	WT/%	$\Delta ssuA$ /%
<i>C. chrysosperma</i>	67.70±0.52	67.45±0.37	79.50±0.69	71.69±0.74
<i>P. macrospore</i>	59.10±0.12	57.70±1.48	46.00±2.00	27.27±2.18
<i>F. aesculi</i>	59.34±2.73	58.91±1.89	13.47±1.75	9.00±1.23

注: WT为JK-SH007野生株;  $\Delta ssuA$  为敲除株JK-SH007 $\Delta ssuA$ 。

Notes: JK-SH007 wild strain (WT); JK-SH007 $\Delta ssuA$  ( $\Delta ssuA$ ).

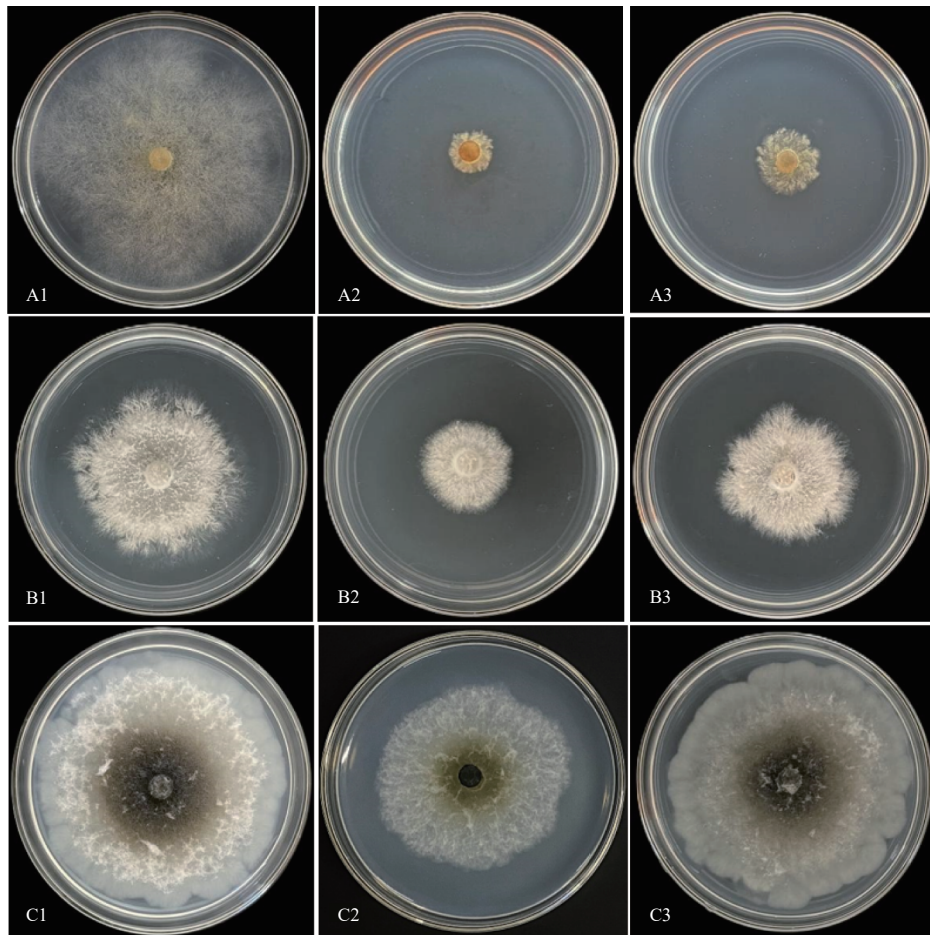


图7 JK-SH007野生株及其 $ssuA$ 基因敲除株对3株杨树溃疡病原真菌的拮抗作用

Fig. 7 Antagonistic effect of JK-SH007 and its  $ssuA$  gene on three strains of pathogenic fungi

注: A1. CK1(*C. chrysosperma*); A2. WT; A3.  $\Delta ssuA$ ; B1. CK2(*P. macrospore*); B2. WT; B3.  $\Delta ssuA$ ; C1. CK3(*F. aesculi*); C2. WT; C3.  $\Delta ssuA$ 。

Notes: A1. CK1(*C. chrysosperma*); A2. WT; A3.  $\Delta ssuA$ ; B1. CK2(*P. macrospore*); B2. WT; B3.  $\Delta ssuA$ ; C1. CK3(*F. aesculi*); C2. WT; C3.  $\Delta ssuA$ 。

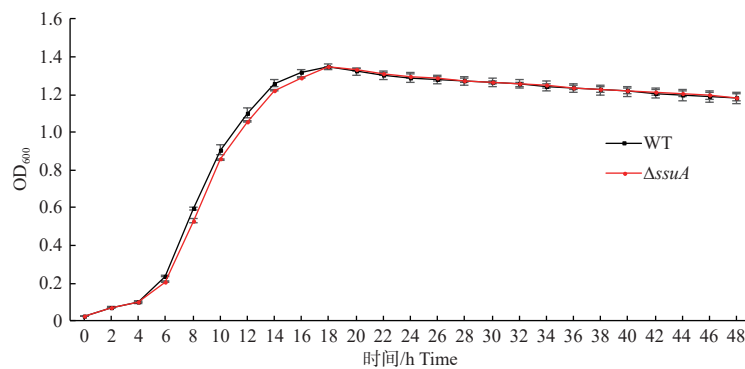


图8  $ssuA$ 敲除株与野生株的生长曲线

Fig. 8 Growth curves of  $ssuA$  knockout strain and wild-type strain

正调控。这与运动性试验结果一致,敲除株运动能力增强后,导致其生物膜形成能力明显减弱。

采用结晶紫法检测 JK-SH007 野生株(WT)与  $\Delta ssuA$  菌株在试管中形成的生物膜产量。结果发现,与 WT 相比,  $\Delta ssuA$  菌株生物膜产量下降了 53.31%(图 13)。这进一步证实  $ssuA$  基因正调控 JK-SH007 菌株生物膜的形成。

## 2.6 $ssuA$ 基因敲除对 JK-SH007 菌株产嗜铁素能力的影响

定性检测发现, JK-SH007 野生株(WT)与  $\Delta ssuA$  菌株均能在 CAS 检测平板上形成明显的黄色晕圈—嗜铁圈,  $\Delta ssuA$  菌株所形成的黄色晕圈较 WT 小(图 14A); 定量检测表明,与 WT 相比,  $\Delta ssuA$  菌株产嗜铁素能力减弱(图 14B)。因此,  $ssuA$  基因对菌株产嗜铁素能

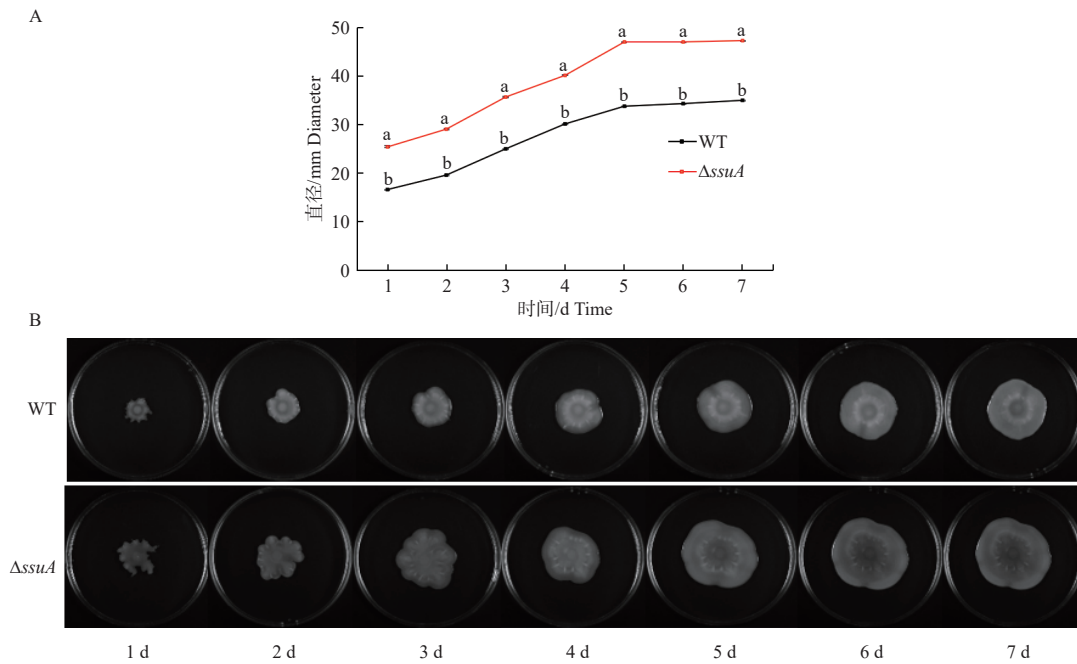


图 9 *ssuA* 敲除株与野生株的游动

Fig. 9 Swimming motility of *ssuA* knockout strain and wild-type strain

注: A. 连续培养 7 d 的 WT 与  $\Delta ssuA$  的游动直径; B. 连续培养 7 d 的 WT 与  $\Delta ssuA$  SM 固体平板; 不同小写字母代表差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Notes: A. Swimming diameter of WT strain and  $\Delta ssuA$  strain cultured continuously for 7 days; B. SM solid plates of WT strain and  $\Delta ssuA$  strain cultured continuously for 7 days, Values with the different small letters were significantly different at the level of 0.05.

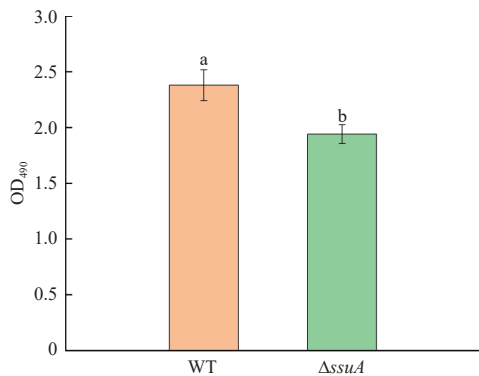


图 10 *ssuA* 敲除株与野生株的胞外多糖含量

Fig. 10 Exopolysaccharide content in *ssuA* knockout strain and wild-type strain

注: 不同小写字母代表差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Notes: Values with the different small letters were significantly different at the level of 0.05.

力有一定影响, 基因的缺失会降低菌株的产嗜铁素能力。菌株产嗜铁素能力的降低与前面抑菌试验的检测结果一致。

### 2.7 *ssuA* 基因敲除对 JK-SH007 菌株 *prn* 基因簇组成基因表达量的影响

运用 RT-qPCR 技术, 分析了硝吡咯菌素合成基因簇 (*prn*) 组成基因 *prnA*、*prnB*、*prnC* 和 *prnD* 基因在 JK-SH007 野生株 (WT) 和  $\Delta ssuA$  菌株中的表达情况。结果显示, 与 WT 的表达量相比, *prnA* 和 *prnB* 在  $\Delta ssuA$

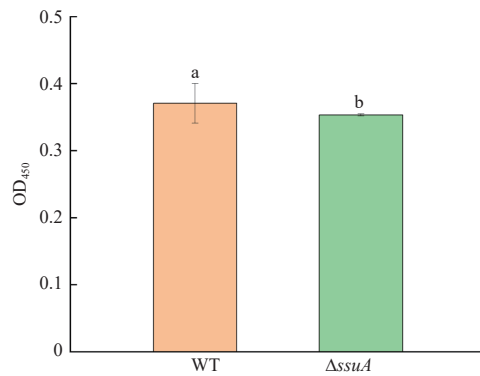


图 11 JK-SH007 野生株 (WT) 及其 *ssuA* 基因敲除株 ( $\Delta ssuA$ ) 中 c-di-GMP 的含量变化

Fig. 11 Changes in the content of c-di-GMP in JK-SH007 wild strain (WT) and *ssuA* knockout strain ( $\Delta ssuA$ )

注: 不同小写字母代表差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Notes: Values with the different small letters were significantly different at the level of 0.05.

敲除突变株中表达显著下调, 而 *prnC* 变化微弱, *prnD* 呈现显著上调趋势 (图 15)。JK-SH007 菌株 *ssuA* 基因敲除后, *prn* 基因簇不同组成基因表达量的变化可能直接影响了菌株抗菌物质 PRN 的合成, 进而导致菌株抑菌能力减弱。

### 2.8 *ssuA* 基因敲除对 JK-SH007 菌株内生定殖能力的影响

为明确 JK-SH007 野生株 (WT) 与  $\Delta ssuA$  菌株在杨

树体内不同部位的定殖规律,本研究利用反复冻融法将带有绿色荧光(GFP)的 PHKT2 质粒导入 WT 与  $\Delta ssuA$  感受态中,通过荧光显微镜观察,GFP 标记的 WT 与  $\Delta ssuA$  菌株均表现出很强的荧光信号(图 16)。

通过平板回收细菌菌落数定量比较 WT 和  $\Delta ssuA$  菌株在杨树组培苗内的定殖能力。结果显示,WT 和  $\Delta ssuA$  菌株均能在杨树苗内定殖。然而,与 WT 相比, $\Delta ssuA$  菌株在杨树苗根、茎和叶的定殖能力大幅度下降,且  $ssuA$  基因缺失后对菌株在茎部定殖能力影响最大, $ssuA$  基因缺失使菌株在杨树茎部的定殖能力同 WT 相比下降 80.77%,在根部、叶部的定殖能力分别下降 78.57% 和 66.67%(图 17A)。利用 ImageJ 软件编辑的宏指令可以成功识别并计数荧光照片中的细菌平均荧光强度(MFI)。如图 17B 所示, $\Delta ssuA$  菌株在杨树组培苗根、茎和叶的 MFI 较 WT 下降,分别下降了 76.10%、81.59% 和 69.80%。

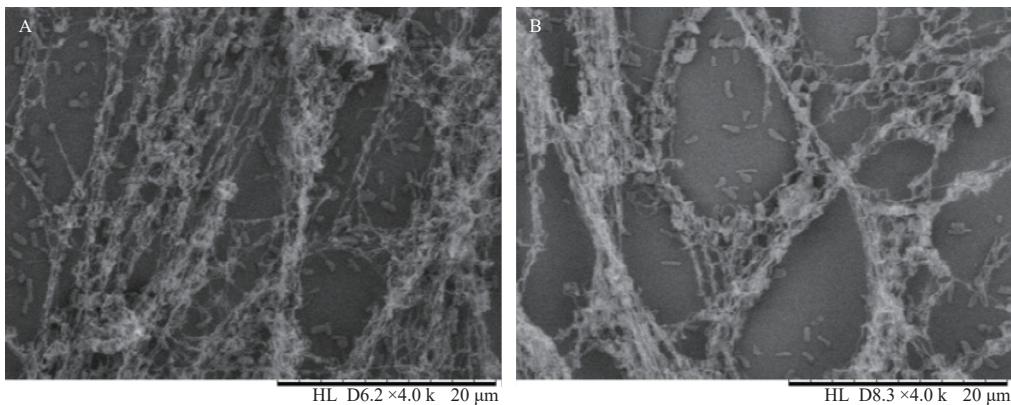


图 12  $ssuA$  敲除株与野生株的电镜观察

Fig. 12 Electron microscopic images of  $ssuA$  knockout strain and wild-type strain

注: A: JK-SH007 野生株(WT); B: JK-SH007 $\Delta ssuA$ 。

Notes: A: JK-SH007 wild strain(WT); B: JK-SH007 $\Delta ssuA$ .

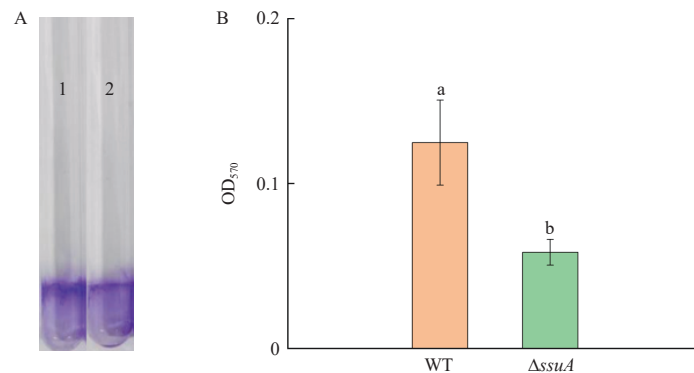


图 13  $ssuA$  基因缺失对 JK-SH007 生物膜形成的影响

Fig. 13 Deletions of  $ssuA$  genes had a significant effect on biofilm formation of JK-SH007

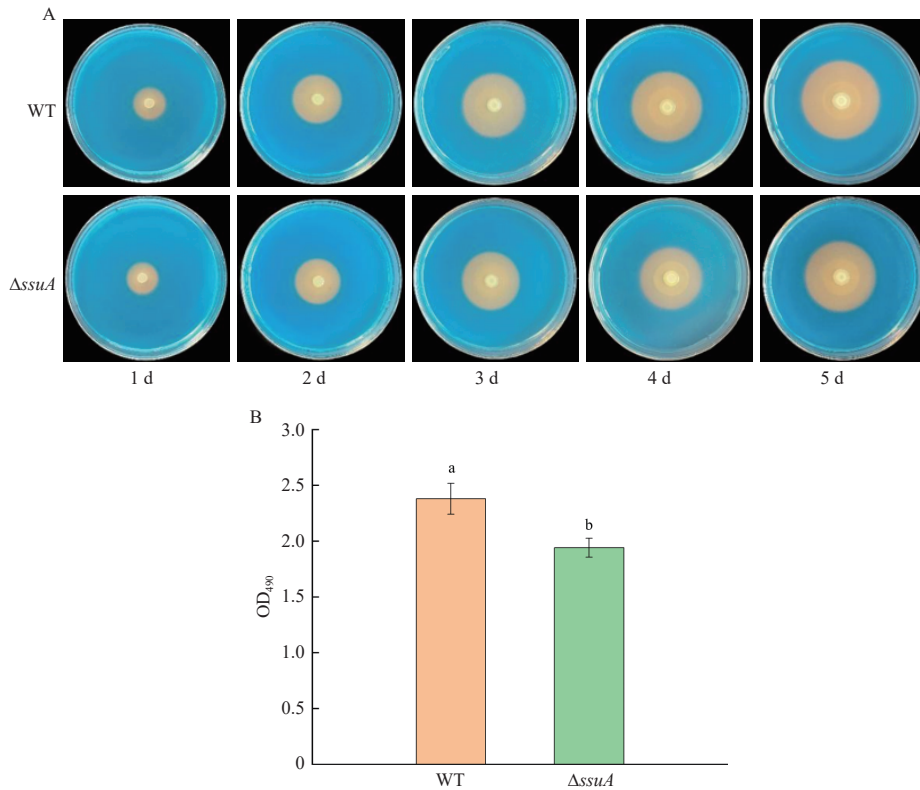
注: A. 1: JK-SH007 野生株 (WT); 2: JK-SH007 $\Delta ssuA$ . B. 生物膜产量柱状图。不同小写字母代表差异显著( $P < 0.05$ )。

Notes: A. 1: JK-SH007 wild strain(WT); 2: JK-SH007 $\Delta ssuA$ ; B. Histogram of biofilm yield. Values with the different small letters were significantly different at the level of 0.05.

结合 2.5.5 中 JK-SH007 野生株及  $\Delta ssuA$  菌株的生物膜产量变化趋势,发现  $ssuA$  基因敲除后,菌株的生物膜产量显著下降,同时菌株在杨树组培苗不同部位的内生定殖能力也显著降低(表 6)。因此, $ssuA$  基因正调节 JK-SH007 菌株的生物膜形成和内生定殖能力,同时也说明  $ssuA$  基因与菌株的生物膜形成和内生定殖能力密切相关。

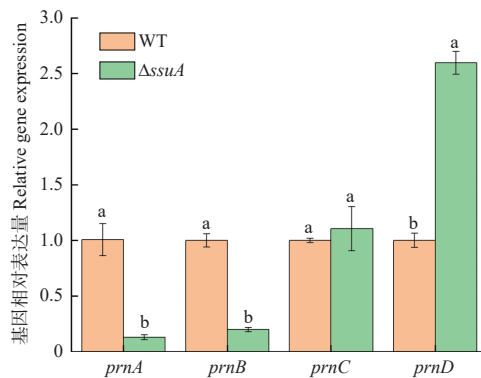
### 3 讨论

本研究在内生菌 *B. pyrrocinia* JK-SH007 菌株中克隆获得  $ssuA$  基因,对其进行生物信息学和同源聚类分析发现,该基因全长序列 1 107 bp,具有一个完整的开放阅读区,编码长度为 366 个氨基酸的蛋白质,其编码的蛋白质二级结构及三级结构均主要由  $\alpha$ -螺旋、延伸链和无规则卷曲等组成, $ssuA$  蛋白在细胞中定位于膜外侧。系统发育分析发现, $ssuA$  蛋白

图 14 *ssuA* 敲除株与野生株的产嗜铁素能力Fig. 14 The siderophore producing ability of *ssuA* knockout strain and wild-type strain

注: 不同小写字母代表差异显著( $P < 0.05$ )。

Notes: Values with the different small letters were significantly different at the level of 0.05.

图 15 JK-SH007 野生株及 *ssuA* 基因敲除株中 *prnA*、*prnB*、*prnC* 和 *prnD* 基因的表达量Fig. 15 The expression levels of *prnA*, *prnB*, *prnC* and *prnD* genes in JK-SH007 wild strain and *ssuA* knockout strain

注: 不同小写字母代表差异显著( $P < 0.05$ )。

Notes: Values with the different small letters were significantly different at the level of 0.05.

与 *B. arboris* 亲缘关系最近。关于 *ssuA* 基因表达调控的研究很少。在 *E. coli* 中 *ssuA* 基因编码周质烷基磺酸结合蛋白 (Van et al., 1999), 推测杨树溃疡病内生防菌吡咯伯克霍尔德氏菌 (*B. pyrrocinia*) JK-SH007 基因组上的 *ssuA* 基因可能会影响菌株生物膜的形成; 而 Wood 等 (2006) 发现生物膜的形成又与运动性相

对应。因此, 本研究以 JK-SH007 菌株的 *ssuA* 基因为切入点, 敲除该基因后发现 JK-SH007 菌株的泳动能力增加, 可能是因为 *ssuA* 基因参与的代谢途径或调控网络对菌株的运动性存在一定的限制作用 (Sampaio et al., 2017)。当该基因被敲除后, 解除了这种限制, 使得菌株的游动能力增强, 分析其原因可能是 *ssuA* 基因与调控细胞表面某些结构或与运动相关的蛋白质合成有关, 其缺失导致细胞运动相关结构或蛋白质的表达发生改变, 从而增加了泳动能力。*ssuA* 基因参与 JK-SH007 泳动的分子机制后续还需要进一步研究。

生防细菌实现其生防效果的前提是在植物根际或体内的有效定殖, 即生防细菌在植物根际或体内的定殖数量达到能发挥生防作用的最低数量 (DAS et al., 2011; 王娜等, 2016)。其中, 生物膜的形成对生防细菌在植物体内定殖等过程具有重要意义 (沈紫竹等, 2021)。例如, *Bacillus subtilis* 6051 生物膜减弱型突变体的根际定殖能力较野生型相比下降 (Bais et al., 2004)。研究发现, *ssuA* 基因正调控 JK-SH007 菌株的生物膜形成, 该基因的敲除导致 JK-SH007 菌株生物膜形成能力下降, 推测这可能是由于 *ssuA* 基因参与

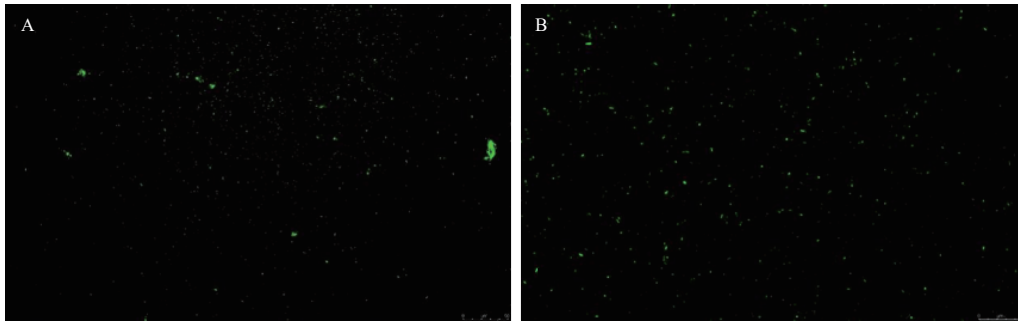


图 16 JK-SH007 野生株及 *ssuA* 基因敲除株 GFP 标记细胞

Fig. 16 GFP labeled cells of JK-SH007 wild strain and *ssuA* gene knockout mutant strains

注: A. JK-SH007 野生株(WT); B. JK-SH007 $\Delta ssuA$ 。

Notes: A. JK-SH007 wild strain (WT); B. JK-SH007 $\Delta ssuA$ .

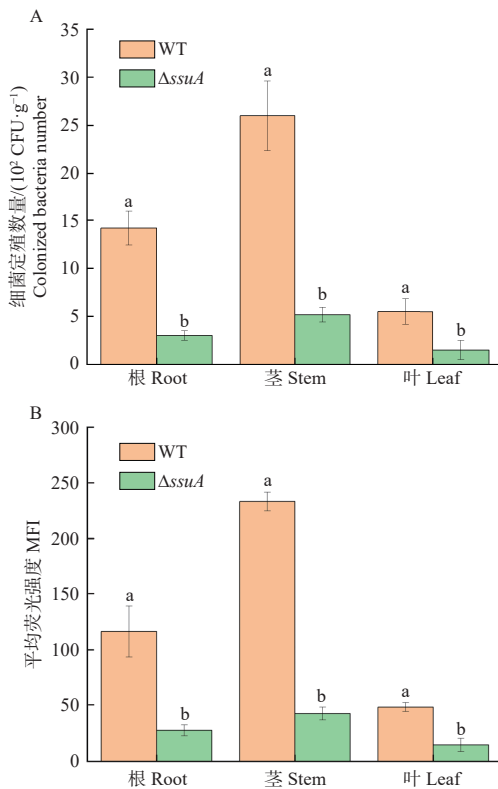


图 17 JK-SH007 野生株及 *ssuA* 基因敲除株在杨树组培苗内的定殖能力

Fig. 17 Colonization ability of JK-SH007 wild strain and its *ssuA* knockout strain in poplar seedlings

注: A. JK-SH007 野生株及 *ssuA* 基因敲除株在杨树组培苗根、茎和叶内的定殖能力; B. JK-SH007 野生株及 *ssuA* 基因敲除株在杨树组培苗根、茎和叶内的平均荧光强度; 不同小写字母代表差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Notes: A. Colonization ability of wild JK-SH007 and *ssuA* gene knockout plants in roots, stems and leaves of poplar tissue culture seedlings WT; B. Mean fluorescence intensity of wild JK-SH007 and *ssuA* knockout plants in roots, stems and leaves of poplar tissue culture seedlings, Values with the different small letters were significantly different at the level of 0.05.

了与生物膜形成相关物质的合成或转运过程(Koch et al., 2005)。生物膜形成过程中的胞外多糖等成分的合成可能与 *ssuA* 基因调控的代谢途径相关(Sampaio et al., 2017)。当 *ssuA* 基因缺失时, JK-SH007 菌株胞

表 6 WT 菌株生物膜产量与菌株定殖能力的关系

Tab. 6 The relationship between biofilm yield and colonization ability of WT strain

菌株 Strain	与WT相比生物膜产量 Biofilm yield compared to WT	与WT相比定殖能力 Colonization ability compared to WT		
		根 Root	茎 Stem	叶 Leaf
$\Delta ssuA$	↓53.31%	↓78.57%	↓80.77%	↓66.67%

外多糖的合成量下降,这可能直接影响生物膜的结构和稳定性,进而导致生物膜形成能力的减弱。

定殖是生防细菌发挥作用的重要环节(杨威等, 2010)。*ssuA* 基因缺失对 JK-SH007 菌株在杨树树体内定殖能力影响较为显著,敲除突变株同野生型 JK-SH007 菌株相比在杨树根部、茎部、叶部的定殖能力分别下降了 78.57%、80.77%、66.67%。因此,推测 JK-SH007 的 *ssuA* 基因正调控菌株内生定殖能力。结合 JK-SH007 菌株及  $\Delta ssuA$  菌株的生物膜产量变化,发现  $\Delta ssuA$  菌株的生物膜产量较 WT 相比下降了 53.31%,这一结果证实  $\Delta ssuA$  定殖能力的大幅下降与其生物膜形成能力下降有关。生物膜可以帮助细菌在植物表面及内部附着并抵御不良环境,生物膜形成能力的降低使得菌株在植物表面及内部的定殖能力减弱(司方洁等, 2022)。此外, *ssuA* 基因可能还通过影响其他与定殖相关的因子,如某些信号分子的合成或分泌来间接影响定殖能力。研究表明, c-di-GMP 细胞水平正调控菌株生物膜形成,负调控菌株的运动能力(路新枝等, 2009)。在本研究中, *ssuA* 基因缺失后, JK-SH007 菌株 c-di-GMP 细胞水平下降,推测 *ssuA* 基因正调控菌株 c-di-GMP 的合成水平。c-di-GMP 细胞水平下降可能与其胞外多糖合成、生物膜形成能力下降有关,从而间接影响定殖能力。

生防细菌是抗菌物质—PRN 的主要来源之一。PRN 作为一种具有广谱抗菌活性的抗生素,在抑制

病原菌生长方面发挥重要作用(Pawar et al., 2019)。*ssuA* 基因缺失后, 编码 PRN 的 *prn* 基因簇组成基因 *prnA* 和 *prnB* 显著下调; 基因 *prnC* 仅微弱上调, 与 WT 无差异, 而 *prnD* 显著上调。这可能直接影响了 PRN 的合成, 进而导致菌株抑菌能力减弱。抑菌试验表明,  $\Delta ssuA$  菌株对这 3 株杨树溃疡病病原真菌的抑制能力减弱。JK-SH007 菌株的抑菌能力在 *ssuA* 基因敲除后有所下降, 说明菌株的抑菌能力可能与生物膜形成、代谢产物分泌等多种因素有关。生物膜可以作为一种物理屏障, 阻止病原真菌与植物组织的接触, 同时生物膜中的细菌可以分泌抗菌物质, 如抗生素、酶等(Jacques and Malouin, 2022)。由于 *ssuA* 基因缺失导致生物膜形成能力下降, 可能影响了 PRN 的分泌和作用效果。此外, 从代谢角度来看, 受 *ssuA* 基因影响的氨基酸合成等代谢过程可能也与 PRN 的合成相关, 从而影响菌株的抑菌能力。嗜铁素是很多生防细菌发挥生防作用的重要抑菌物质(沈佳慧等, 2022)。闵莉静等(2019)研究发现, 嗜铁素是 JK-SH007 菌株的主要促生防因子之一, 嗜铁素的产生对菌株促进植物生长发育及其抗菌作用的发挥具有重要影响。本研究发现, *ssuA* 基因缺失后 JK-SH007 菌株产生嗜铁素能力下降, 进而直接影响到菌株抗菌作用的发挥以及对宿主植物的促生作用。同时也发现 *ssuA* 基因对 JK-SH007 菌株的生长没有明显影响, 说明该基因主要在与生物膜形成、内生定殖、抑菌等功能相关的特定代谢途径或调控过程中发挥作用, 而不参与 JK-SH007 菌株基本的生长代谢过程。

#### 4 结论

本研究克隆得到 JK-SH007 菌株 *ssuA* 基因, 该基因全长 1 107 bp, 编码 366 个氨基酸, 其编码的蛋白质二级结构及三级结构原件均由  $\alpha$ -螺旋、无规则卷曲和延伸链组成, *ssuA* 蛋白定位于膜外侧。系统发育分析发现, *ssuA* 蛋白与 *B. arboris* 亲缘关系最近。通过构建杨树溃疡病内生防菌 *B. pyrrocinia* JK-SH007 菌株的 *ssuA* 基因敲除突变株, 系统地研究了 *ssuA* 基因对 JK-SH007 菌株多种功能的影响。研究发现, *ssuA* 基因正调控菌株的生物膜形成, 与胞外多糖、嗜铁素产生、c-di-GMP 密切相关, 同时影响其抑菌能力和内生定殖能力, 但对菌株生长无影响。*ssuA* 基因还可通过影响 JK-SH007 菌株嗜铁素的产生, 以及抗菌物质合成 *prn* 基因簇的表达, 进而影响到菌株抑菌能力的发挥。这些结果为深入理解吡咯伯克霍尔

德氏菌 JK-SH007 的抗菌促生机制提供了重要依据, 也为进一步开发利用该生防菌提供了理论支持。未来的研究可以进一步探究 *ssuA* 基因调控生物膜形成、定殖等功能的具体分子机制, 以及如何通过调控 *ssuA* 基因来提高生防菌的生防效果等。

#### 参 考 文 献

- 曹永清. 2022. 杨树内生吡咯伯克霍尔德氏菌 JK-SH007 群体感应系统的研究[D]. 太原: 山西师范大学.
- 陈一凡, 谢可欣, 樊雪琦, 等. 2024. 杨树溃疡病拮抗菌防治机制研究进展[J]. 中国农业气象, 45(2): 170-177.
- (Chen Y F, Xie K X, Fan X Q, et al. 2024. Research progress on the mechanisms of controlling poplar canker by antagonistic microbes[J]. Chinese Journal of Agrometeorology, 45(2): 170-177.)
- 黄烈健, 苏晓华. 2003. 我国杨树溃疡病研究进展[J]. 世界林业研究, 16(4): 49-53.
- (Huang L J, Su X H. 2003. The advance of canker disease-resistance breeding in poplar[J]. World Forestry Research, 16(4): 49-53.)
- 孔维亮, 周敏, 吴小芹. 2019. 水拉恩氏菌 JZ-GX1 产嗜铁素特性及其对林木病原菌的拮抗作用[J]. 微生物学通报, 46(12): 3278-3285.
- (Kong W L, Zhou M, Wu X Q. 2019. Characteristics of siderophores production by *Rahnella aquatilis* JZ-GX1 and its antagonism against forest pathogens[J]. Microbiology China, 46(12): 3278-3285.)
- 梁军, 姜俊清, 刘会香, 等. 2005. 我国杨树与溃疡病菌互作的病理学研究[J]. 林业科学研究, 18(2): 214-221.
- (Liang J, Jiang J Q, Liu H X, et al. 2005. Study on the pathology of poplar-canker pathogen interaction in China[J]. Forest Research, 18(2): 214-221.)
- 刘佳文, 吴倩, 张昭寰, 等. 2022. 假单胞菌生物被膜核心胞外多糖生物合成系统研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 49(2): 273-283.
- (Liu J W, Wu Q, Zhang Z H, et al. 2022. Research progress on extracellular polysaccharide biosynthesis system of *Pseudomonas* biofilm core[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 49(2): 273-283.)
- 路新枝, 刘湛军, 于文功. 2009. 环二鸟苷酸: 新型的细菌第二信使[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 25(5): 400-406.
- (Lu X Z, Liu Z J, Yu W G. 2009. Cyclic diguanylate: New second messenger in bacteria[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 25(5): 400-406.)
- 闵莉静, 郭璐, 叶建仁. 2019. 基于嗜铁素介导的吡咯伯克霍尔德氏菌 JK-SH007 促生作用机制研究[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 43(6): 165-172.
- (Min L J, Guo L, Ye J R. 2019. Mechanism of *Burkholderia pyrrocinia* JK-SH007 growth-promoting to plant via siderophore-mediation[J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition), 43(6): 165-172.)
- 欧杰, 李柏林, 金鑫, 等. 2003. 甘蓝黑腐病黄单胞菌胞膜离子通道透性对黄原胶生物合成的影响[J]. 食品科学, 24(1): 43-48.
- (Ou J, Li B L, Jin M, et al. 2003. Effect of membrane ion channel permeability of *Xanthomonas campestris* on xanthan gum biosynthesis[J]. Food Science, 24(1): 43-48.)
- 任嘉红, 班虎栋, 叶建仁, 等. 2010. 吡咯伯克霍尔德氏菌 JK-SH007 的发

- 醇条件及其对杨树溃疡病的防治效果[J]. 中国生物防治, 26(3): 300-306.
- (Ren J H, Ban H D, Ye J R, *et al.* 2010. Fermentation conditions of antagonistic strain *Burkholderia pyrrocinia* JK-SH007 and its control effect on poplar canker disease[J]. Chinese Journal of Biological Control, 26(3): 300-306.)
- 任嘉红, 刘辉, 吴晓蕙, 等. 2012. 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, 52(3): 295-303.
- (Ren J H, Liu H, Wu X H, *et al.* 2012. Screening, identification, and promoting effect of phosphate-solubilizing bacteria in rhizosphere of *Taxus chinensis* var. *mairei*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 52(3): 295-303.)
- 任嘉红, 吴小芹, 刘辉, 等. 2010. 吡咯伯克霍尔德氏菌 JK-SH007 抗菌蛋白的分离纯化[J]. 微生物学通报, 37(6): 872-880.
- (Ren J H, Wu X Q, Liu H, *et al.* 2010. Isolation and purification of antifungal protein from *Burkholderia pyrrocinia* JK-SH007[J]. Microbiology China, 37(6): 872-880.)
- 沈佳慧, 左杨, 乔俊卿, 等. 2022. 贝莱斯芽胞杆菌 *Bacillus velezensis* YL2021 嗜铁素合成基因 *dhbC* 的功能研究[J]. 中国生物防治学报, 38(3): 602-612.
- (Shen J H, Zuo Y, Qiao J Q, *et al.* 2022. Functional analysis of *dhbC* gene from the siderophore producing bacterium *Bacillus velezensis* YL2021[J]. Chinese Journal of Biological Control, 38(3): 602-612.)
- 沈紫竹, 李昱龙, 孙志敏, 等. 2021. 细菌生物被膜分散及分子调控机制研究进展[J]. 微生物学通报, 48(5): 1800-1809.
- (Shen Z Z, Li Y L, Sun Z M, *et al.* 2021. Bacterial biofilm dispersion and molecular regulation mechanism: A review[J]. Microbiology China, 48(5): 1800-1809.)
- 司方洁, 任金瑶, 黄涛祥, 等. 2022. 贝莱斯芽胞杆菌 5YN8 生物被膜在防治番茄灰霉病过程中的功能研究[J]. 中国生物防治学报, 38(5): 1223-1230.
- (Si F J, Ren J Y, Huang T X, *et al.* 2022. The function of *Bacillus velezensis* 5YN8 biofilm in controlling of *Botrytis cinerea* in tomato[J]. Chinese Journal of Biological Control, 38(5): 1223-1230.)
- 王娜, 陶伟, 陈双林, 等. 2016. 植物内生细菌在棉花体内的定殖动态及对棉花黄萎病的生物防治效果[J]. 植物保护学报, 43(2):207-214.
- (Wang N, Tao W, Chen S L, *et al.* 2016. Colonization trends of endophytic bacteria in cotton and their biological control effect on cotton Verticillium wilt[J]. Journal of Plant Protection, 43( 2): 207-214.)
- 王俞苹, 孔令新, 郑涛, 等. 2019. 假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 中转录调控因子 SpfB 负调控 DNA 磷酸酰化修饰[J]. 微生物学报, 59(5): 851-862.
- (Wang Y P, Kong L X, Zheng T, *et al.* 2019. The transcriptional regulator SpfB negatively regulates DNA phosphorothioate modification in *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1[J]. Acta Microbiologica Sinica, 59(5): 851-862.)
- 徐坤山, 王杰, 张星, 等. 2017. 灵芝菌丝体发酵液胞外多糖含量检测结果分析[J]. 泰州职业技术学院学报, 17(1): 41-43.
- (Xu K S, Wang J, Zhang X, *et al.* 2017. Analysis on the results of content detecting for extra-cellular polysaccharide from *G. lucidum* Mycelium by liquid fermentation[J]. Journal of Taizhou Polytechnic College, 17(1): 41-43.)
- 杨蕾, 周国英, 梁军, 等. 2014. 防治杨树溃疡病内生菌的分离筛选及鉴定[J]. 植物保护学报, 41(4): 438-446.
- (Yang L, Zhou G Y, Liang J, *et al.* 2014. Isolation, screening and identification of endophytes for controlling poplar canker[J]. Journal of Plant Protection, 41(4): 438-446.)
- 杨茉, 高婷, 李滢璟, 等. 2020. 辣椒根际促生菌的分离筛选及抗病促生特性研究[J]. 生物技术通报, 36(5): 104-109.
- (Yang M, Gao T, Li Y J, *et al.* 2020. Isolation and screening of plant growth-promoting rhizobacteria in pepper and their disease-resistant growth-promoting characteristics[J]. Biotechnology Bulletin, 36(5): 104-109.)
- 杨威, 刘苏冈, 郭坚华. 2010. 细菌定殖能力与其生物防治功能相关性研究进展[J]. 中国生物防治学报, 26(S1): 90-94.
- (Yang W, Liu S M, Guo J H. 2010. Relationship between bacterial colonization and biocontrol efficacy[J]. Chinese Journal of Biological Control, 26(Sup 1): 90-94.)
- 张丽慧, 冯丹, 白变霞, 等. 2024. 款冬根际促生细菌的筛选、鉴定及其接种效应[J]. 中国农学通报, 40(34): 33-41.
- (Zhang L H, Feng D, Bai B B, *et al.* 2024. Screening and Identification of Plant Growth Promoting Bacteria of *Tussilago farfara* and Its Inoculation Effect[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 40(34): 33-41.)
- 张鹏飞. 2018. 内生吡咯伯克霍尔德氏菌 JK-SH007 挥发性物质诱导杨树抗病性及其机制[D]. 临汾: 山西师范大学.
- (Zhang P F. 2018. Poplar Disease Resistance Induced by Volatile Substances from Endophytic *Burkholderia* JK-SH007 and Its Mechanism[D]. Linfen: Shanxi Normal University.)
- Bais H P, Fall R, Vivanco J M. 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production[J]. Plant Physiology, 134(1): 307-319.
- Chen Y, Cao S G, Chai Y R, *et al.* 2012. A *Bacillus subtilis* sensor kinase involved in triggering biofilm formation on the roots of tomato plants[J]. Molecular Microbiology, 85(3): 418-430.
- Chen Y W, Shen X M, Peng H S, *et al.* 2015. Comparative genomic analysis and phenazine production of *Pseudomonas chlororaphis*, a plant growth-promoting rhizobacterium[J]. Genomics Data, 4: 33-42.
- Das B B. 2011. Rhizosphere microbial populations and physico chemical properties as affected by organic and inorganic farming practices.[J]. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences, (2):10.
- Deng Y Y, Schmid N, Wang C, *et al.* 2012. *Cis*-2-dodecenoic acid receptor RpfR links quorum-sensing signal perception with regulation of virulence through cyclic dimeric guanosine monophosphate turnover[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 109(38): 15479-15484.
- Eichhorn E, van der Ploeg J R, Leisinger T. 2000. Deletion analysis of the *Escherichia coli* taurine and alkanesulfonate transport systems[J]. Journal of Bacteriology, 182(10): 2687-2695.
- Fu H H, Chen F F, Liu W H, *et al.* 2020. Adding nutrients to the biocontrol strain JK-SH007 promotes biofilm formation and improves resistance to stress[J]. AMB Express, 10(1): 32.
- Ha D G, O'Toole G A. 2015. C-di-GMP and its effects on biofilm formation and dispersion: A *Pseudomonas aeruginosa* review[J]. Microbiology

- Spectrum, 3(2): MB-3-2014.
- Hayrapetyan H, Siezen R, Abbe T, *et al.* 2016. Comparative genomics of iron-transporting systems in *Bacillus cereus* strains and impact of iron sources on growth and biofilm formation[J]. *Frontiers in Microbiology*, 7: 842.
- Huber B, Riedel K, Hentzer M, *et al.* 2001. The cep quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility[J]. *Microbiology*, 147(Pt 9): 2517–2528.
- Jacques M, Malouin F. 2022. One health: One biofilm[J]. *Veterinary Research*, 53(1): 51.
- Koch D J, Rückert C, Rey D A, *et al.* 2005. Role of the *ssu* and *seu* genes of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 in utilization of sulfonates and sulfonate esters as sulfur sources[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10): 6104–6114.
- Li Y X, Zhang W, Sun N N, *et al.* 2020. Identification and functional verification of differences in phenolic compounds between resistant and susceptible *Populus* species[J]. *Phytopathology*, 110(4): 805–812.
- Liu A K, Zhang P F, Bai B X, *et al.* 2020. Volatile organic compounds of endophytic *Burkholderia pyrrocinia* strain JK-SH007 promote disease resistance in poplar[J]. *Plant Disease*, 104(6): 1610–1620.
- Liu X G, Yu X L, Yang Y, *et al.* 2018. Functional identification of the *prnABCD* operon and its regulation in *Serratia plymuthica*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(8): 3711–3721.
- Louden B C, Haarmann D, Lynne A M. 2011. Use of blue agar CAS assay for siderophore detection[J]. *Journal of Microbiology & Biology Education*, 12(1): 51–53.
- Pawar S, Chaudhari A, Prabha R, *et al.* 2019. Microbial pyrrolnitrin: Natural metabolite with immense practical utility[J]. *Biomolecules*, 9(9): 443.
- Ren J H, Ye J R, Liu H, *et al.* 2011. Isolation and characterization of a new *Burkholderia pyrrocinia* strain JK-SH007 as a potential biocontrol agent[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(9): 2203–2215.
- Sampaio A, Pegos V R, Oshiro E E, *et al.* 2017. The periplasmic binding protein NrtT affects xanthan gum production and pathogenesis in *Xanthomonas citri*[J]. *FEBS Open Bio*, 7(10): 1499–1514.
- Schmidt S, Blom J F, Pernthaler J, *et al.* 2009. Production of the antifungal compound pyrrolnitrin is quorum sensing-regulated in members of the *Burkholderia cepacia* complex[J]. *Environmental Microbiology*, 11(6): 1422–1437.
- Someya N, Kubota M, Takeuchi K, *et al.* 2020. Diversity of antibiotic biosynthesis gene-possessing rhizospheric fluorescent pseudomonads in Japan and their biocontrol efficacy[J]. *Microbes and Environments*, 35(2): ME19155.
- van der Ploeg J R, Iwanicka-Nowicka R, Bykowski T, *et al.* 1999. The *Escherichia coli* *ssuEADCB* gene cluster is required for the utilization of sulfur from aliphatic sulfonates and is regulated by the transcriptional activator *cbI*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 274(41): 29358–29365.
- Verstraeten N, Braeken K, Debkumari B, *et al.* 2008. Living on a surface: Swarming and biofilm formation[J]. *Trends in Microbiology*, 16(10): 496–506.
- Wang L T, Huang J Q, Chen S, *et al.* 2024. Endogenous cell wall degrading enzyme LytD is important for the biocontrol activity of *Bacillus subtilis*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 15: 1381018.
- Wood T K, González Barrios A F, Herzberg M, *et al.* 2006. Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(2): 361–367.
- Wu B Y, Ye J R, Huang L, *et al.* 2017. Validation of reference genes for RT-qPCR analysis in *Burkholderia pyrrocinia* JK-SH007[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 132: 95–98.