pqq 基因簇在 *Escherichia coli* DH5α 中表达及 对其溶磷促生的影响

焦子伟1,张相锋1,努尔买买提1,任艳利1,吾尔恩1,郭岩彬2*

(1.伊犁师范学院化学与生物科学学院,新疆 伊宁 835000; 2.中国农业大学资源与环境学院,北京 100193)

摘 要:为丰富植物促生菌的构建模式,本文以 Escherichia coli DH5α 为供试菌株,通过遗传转化,将水生拉恩氏菌(Rahnella aqautilis)HX2的 pqq 基因簇导入 E. coli DH5α,获得 DH5α(pqq)菌株,采用平板溶磷、钼锑抗比色法、HPLC 法、温室盆栽等试验分析研 究 DH5α(pqq)菌株溶磷产酸促生作用机理。DH5α(pqq)菌株与 E. coli DH5α 相比,溶磷圈直径、有效磷浓度增加,溶解矿质磷的能 力显著增强;有机酸代谢显著增加,以产葡萄糖酸为主。DH5α(pqq)处理与对照相比对玉米株高、茎鲜重、植株鲜重、茎干重、植株干 重、全磷、土壤有效磷分别提高了 5.2%、30.0%、32.5%、18.5%、7.7%、30.8%和 24.0%,并呈显著性差异(P<0.05)。表明来自 HX2 菌株 的 pqq 基因簇通过异源表达具有活性,能够实现对溶磷促生的遗传改造。

关键词:pqq 基因簇;DH5α(pqq)菌株;矿质磷;有机酸;溶磷促生

中图分类号:S144.1 文献标志码:A 文章编号:2095-6819(2016)01-0043-06 **doi**: 10.13254/j.jare.2015.0176 引用格式:

焦子伟, 张相锋, 努尔买买提,等. pqq 基因簇在 Escherichia coli DH5α 中表达及对其溶磷促生的影响[J]. 农业资源与环境学报, 2016, 33(1): 43-48.

JIAO Zi-wei, ZHANG Xiang-feng, NUER Maimaiti, et al. Expression *pqq* Gene Cluster and Its Effects on Mineral Phosphate Solubilization and Plant Promotion *in Escherichia coli* DH5α[J]. *Journal of Agricultural Resources and Environment*, 2016, 33(1): 43–48.

Express ion pqq Gene Cluster and Its Effects on Mineral Phosphate Solubilization and Plant Promotion in *Escherichia coli* DH5 α

JIAO Zi-wei¹, ZHANG Xiang-feng¹, NUER Maimaiti¹, REN Yan-li¹, WU Er-en¹, GUO Yan-bin^{2*}

(1.College of Chemistry and Biological Sciences, Yili Normal University, Yining 835000, China; 2.College of Resources and Environmental Science, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: In this study, in order to increase the ability of phosphate solubilization of *Escherichia coli* DH5 α , *pqq* gene cluster from *Rahnella aqautilis* HX2 was transformed into *E. coli* DH5 α to create DH5 α (*pqq*). Mechanisms of *E. coli* DH5 α and DH5 α (*pqq*) phosphate solubilization were analyzed by using solubilizing phospate on plate, molybdenum-blue method, HPLC, and greenhouse experiment. Compared with *E. coli* DH5 α , strain DH5 α (*pqq*) showed stronger mineral phosphate solubilizing ability, more gluconic acid production. Maize plant height, shoot fresh weight, plant fresh weight, shoot dry weight, plant dry weight, total phosphorus and soil solubling–P of DH5 α (*pqq*) treatment were significantly(*P*<0.05) improved by 5.2%, 30.0%, 32.5%, 18.5%, 7.7%, 30.8%, and 24.0% respectively, compared with DH5 α treatment. It was shown that *pqq* gene cluster from *R. aqautilis* HX2 strain showed activity in *E. coli* DH5 α . This method may modify the other plant growth promoting rhizobacteria on phosphate solubilization trait.

Keywords: pqq gene cluster; strain DH5 $\alpha(pqq)$; mineral phosphate; organic acid; phosphate solubilization and promotion

近年来,越来越多的研究表明植物促生菌在磷 缺乏的土壤中使难溶性磷变为有效的磷促进植物生

*通信作者:郭岩彬 E-mail:guoyb@cau.edu.cn

长,降低化学肥料的应用,减少对环境的影响,并逐步 得到广泛应用^[1-3]。截至目前,已报道的植物溶磷促生 细菌主要有芽孢杆菌属(Bacillus)、假单胞菌属(Pseudomonas)、拉恩氏菌属(Rahnella)、埃希氏菌属(Escherichia)、克雷白氏杆菌属(Klebsiella)、土壤杆菌属 (Agrobacterium)等菌属^[4-6],产有机酸是细菌溶解矿质磷 主要机制之一^[1]。已有报道的克隆获得吡咯喹啉醌

收稿日期:2015-07-16

基金项目:新疆自治区高校科研计划项目(XJEDU2014I041)

作者简介: 焦子伟(1973—), 男, 博士, 副教授, 研究方向为微生物生态 及绿色有机农业有害生物综合防控研究与示范。 E-mail; 741285332@qq.com

(pyrroloquinoline quinone, PQQ) 合成基因簇的革兰氏 阴性菌如中间肠杆菌(Enterobacter intermedium 60-2G)^[7]、葡萄杆菌属(Gluconobacter oxydans)^[8]和拉恩氏 菌属(Rahnella aquatilis HX2)⁹⁹等。有些细菌如鼠伤寒 沙门氏菌(Salmonella typhimurium)、大肠杆菌(E. coli) 等只合成脱辅基蛋白(apo-enzyme)而不合成PQQ^[10-11]。 但 PQQ 对大肠杆菌来说具有趋化的吸引力¹¹²。PQQ 生 物合成中涉及 4~7 个相关基因(pqqABCDEFG)基因 簇,在一些细菌中如 Enterobacter intermedium 60-2G、 Klebsiela pneumoniaeNCTC418, Rahnella aquatilis HX2 中 PQQ 合成基因通常由 6 个基因构成的基因簇 $(pqqA, pqqB, pqqC, pqqD, pqqE 和 pqqF)^{[9,13]}$ 。水生拉 恩氏菌 HX2 是一株优良的植物溶磷促生菌株,Guo 等^[13]成功地通过 Tn5 插入突变 pqq 基因簇获得了不 能合成 PQQ 的突变菌株,以及构建了含有 pqq 基因 簇的 pCH15 质粒。本文通过采用平板溶磷、钼锑抗比 色法、HPLC法、温室接种盆栽等试验,分析研究导入 R. aquatilis HX2 菌株中的 pqq 基因簇的 DH5α(pqq) 菌株溶磷促生结果分析,明确 DH5α(pqq) 菌产酸溶 解矿质磷促生机理,为进一步明确采用 pqq 基因簇改 造 E. coli DH5α 及其他细菌可能成为植物促生菌株 提供技术理论依据。

材料与方法

1.1 供试菌株及培养基

1.1.1 供试菌株、质粒

E. coli DH5α^[14],及含有*R. aquatilis* HX2 菌株中的 *pqq* 基因簇的质粒 pCH15^[13]。各供试菌株和质粒特征见表 1。

1.1.2 供试培养基

国际植物研究所磷酸盐生长培养基(NBRIP)^[15-16]: 葡萄糖 10 g,磷酸三钙(Ca₃(PO₄)₂)5 g,六水氯化镁 (MgCl₂・6H₂O)5g,七水硫酸镁(MgSO₄・7H₂O)0.25g, 氯化钾(KCl)0.2g,硫酸铵((NH₄)₂SO₄)0.1g,蒸馏水 1000mL,pH 7.0。

NBRIP 固体培养基: 在 NBRIP 液体培养基中加入琼脂 16~18 g·L⁻¹,其他成分不变。

Luria-Bertani(LB)液体培养基:胰蛋白胨 10g, 酵母提取物 5g,氯化钠(NaCl)10g,蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0。

LB 固体培养基:在 LB 液体培养基中加入琼脂 16~18 g·L⁻¹,其他成分不变。

无磷元素的 Hoagland 营养液^{17]}:硝酸钙(Ca(NO₃)₂) 945 mg·L⁻¹, 硝酸钾(KNO₃)607 mg·L⁻¹, 七水硫酸镁 (MgSO₄·7H₂O)493 mg·L⁻¹, 铁盐溶液 2.5 mL·L⁻¹(七水 硫酸亚铁(FeSO₄·7H₂O)2.78 g, 乙二胺四乙酸二钠 (EDTA)3.73 g,蒸馏水 500 mL, pH 5.5)。

1.2 实验方法

1.2.1 DH5α(pqq)菌株的获取

将含有 HX2 菌株中 *pqq* 基因簇的质粒 pCH15, 采用热击和转化的方法^[18],导入感受态 *E. coli* DH5α 细胞,将其加入含有四环素(Tc)20 μg·mL⁻¹ 的 LB 固 体培养基上,37 ℃培养,筛选并获得 DH5α(*pqq*)菌株, 放入冰箱保存。

1.2.2 溶磷平板定性检测

将 E. coli DH5α、DH5α(pqq)接种活化后,以0.1% 接种量分别接种于含有 5 mL LB 液体培养基的试管 中,37 ℃、170 r·min⁻¹摇培,制备成 10⁸ CFU·mL⁻¹ 的菌 悬液。无菌操作下将灭菌的滤纸片(直径=5 mm)放于 NBRIP 固体培养基平板中央,分别吸取 10 μL 各菌 株处理的菌悬液点接于滤纸片上,吹干。将 E. coli DH5α、DH5α(pqq)处理的所有平板在 37 ℃生化培养 箱中培养 7 d,然后观测每个处理的溶磷圈,并测量其 直径。每个处理重复 3 次。

表 1	实验所	用菌	朱及月	贡粒
-----	-----	----	-----	----

Table 1 Bacterial strains and plasmids used in experiment

菌株 Strains/质粒 Plasmids	特征 Characteristics	来源 Reference
菌株 Strains		
大肠杆菌 Escherichia coli		
$DH5\alpha$	F–recA1 endA1 hsdR17 supE44 thi–1 gyrA96 relA1 Δ (argE–lacZYA)169 Φ 80lazA Δ M15	Hanahan ^[14]
质粒 Plasmids		
CP465	Tc ^r , pLAFR-5 containing pqq genes, cosmid	Guo et al. ^[13]
pCH15	Gm ^r , Tc ^r , pRK415G containing approximately 8.0 kb BamHI	Guo et al. ^[13]
	fragment including pqq genes from cosmid CP465	

Note: Gmr and Tcr indicate resistance to gentamicin and tetracycline, respectively.

http://www.aed.org.cn

1.2.3 有效磷定量、pH 检测

将 E. coli DH5α、DH5α(pqq)活化后,分别制成 10⁸ CFU·mL⁻¹ 菌悬液,以 0.1%接种量接种到 100 mL NBRIP 培养基的锥形瓶中,37 ℃、170 r·min⁻¹ 摇培,无 菌操作下将所有处理样品于第 1、3、5、7 d 分别抽取 1 mL 菌液,将菌液以 12 000 r·min⁻¹、4 ℃离心 5 min,留 上清液放入-20 ℃冰箱中保存待测。溶磷定量测定方 法参照钼锑抗比色法^[19-20],每个样品重复 3 次。此外无 菌操作下将所有处理样品于第 1、3、5、7 d 分别取 2 mL 菌悬液,将培养液以 12 000 r·min⁻¹、4 ℃离心 5 min,取上清液,并将上清液放在 10 mL 塑料管中,完 成取样后,立即用 pH 计检测 pH 值,并记录数值,进 行数据分析。每个样品重复 3 次。

1.2.4 有机酸检测

试验方法在参照文献[16]HPLC 法检测细菌产有 机酸的基础上做了修改。*E. coli* DH5α、DH5α(*pqq*)接 种于 NBRIP 培养基中,在 37 ℃、170 r·min⁻¹ 中进行摇 培,摇培 5 d。从每个样品中抽取 1 mL 菌悬液,12 000 r·min⁻¹、4 ℃离心 5 min,留上清液,通过 0.22 µm 微孔 滤膜过滤后,保存-20 ℃冰箱中备用。采用葡萄糖酸、 柠檬酸、乳酸、琥珀酸、丙酸 5 种有机酸(色谱纯)作为 标样,将样品进行液相色谱分析(高效液相色谱仪waters 2998,色谱柱:Agilent Zorbax SB-C18 250 mm×4.6 mm,5 µm),流动相为 0.5%磷酸氢二铵(pH 2.81),进 样量 20 µL,流速 0.4 mL·min⁻¹,室温下 214 nm 处测 量 UV 的吸收值,绘制标准曲线,计算样品中的各种 有机酸的含量。每个样品重复 3 次。 1.2.5 溶磷效果温室实验

将 E. coli DH5α、DH5α(pqq)分别以 0.1%的接种 量接种于 LB 液体培养基的三角瓶中,37 ℃、170 r· min⁻¹摇培 48 h,得到浸种拌土的菌悬液;CK 对照为 LB 液体培养基;配制无磷元素的 Hoagland 营养液。 将采集的砂和土过 2 mm 的筛分装高温灭菌,准备 180 mm × 160 mm 规格的塑料花盆,每盆盛放混合好 的砂土基质 1.5 kg(砂:土=1:1,W/W),盛放前每个花 盆基质分别均匀拌入 7.5 g磷酸钙、各处理菌液 100 mL及20mL配好的无磷的Hoagland营养液。选择玉 米种子,放入75%的酒精消毒30s,并用无菌水冲3 次,放入灭菌的培养皿中进行催芽2~3d,挑选一致的 催芽种子浸种3h,每盆埋入3粒种子,埋好后浇10 mL无菌水;采用完全随机设计摆放,重复9次,定期 定量浇无菌水。出苗后间苗,每盆留1株,玉米苗生长 42d后收获,测定玉米株高,称取鲜重、干重(地上部 分和根),采用钒钼黄吸光光度法测定植株磷含量、 NaHCO₃浸提钼锑抗吸光光度法测定土壤有效磷含 量^[21]。

1.2.6 数据处理分析

本实验数据以平均值为依据,数据分析采用 EX-CEL 软件、SPSS 软件(Version 11.5,USA)进行数据处 理及方差分析。

2 结果与分析

2.1 溶磷及 pH 值的影响分析

导入 pqq 基因簇的 DH5 $\alpha(pqq)$ 菌株产生的溶磷 圈直径为 19.8 mm, 而 *E. coli* DH5 α 的为 12.3 mm, 溶 磷圈直径相比增加了 7.5 mm。两者之间存在显著性 差异(P<0.05)(表 2)。此外, DH5 α 、DH5 $\alpha(pqq)$ 菌株在 NBRIP 培养基上培养前 3 d, 有效磷的浓度逐渐增加, pH 值逐渐降低;培养 3 d 后, 有效磷的浓度及 pH 值 趋于稳定(图 1)。溶磷定量分析表明(表 2), DH5 $\alpha(pqq)$ 菌株产生较高的有效磷浓度, 为 416.96 mg·L⁻¹, 是 *E. coli* DH5 α 产生的有效磷浓度(106.46 mg·L⁻¹)的4 倍 左右, DH5 $\alpha(pqq)$ 菌株的 pH 值从最初的 6.15 降到 3.62, 低于 DH5 α 菌株所产生的 pH 值(4.74)。两菌株 产生有效磷浓度、pH 值之间均表现出显著性差异显 著。导入 pqq 基因簇的 DH5 $\alpha(pqq)$ 溶解矿质磷的能 力显著增强。

2.2 产有机酸的影响分析

DH5 $\alpha(pqq)$ 、*E. coli* DH5 α 在 NBRIP 中培养,溶磷 代谢产 2 种酸,即葡萄糖酸和琥珀酸(图 2)。DH5 α (*pqq*)、*E. coli* DH5 α 处理分别产生总有机酸为 8.67、 0.69 g·L⁻¹,处理之间呈显著性差异(图 3)。DH5 $\alpha(pqq)$ 、

表 2 不同处理下培养基溶磷圈直径、pH 值和有效磷浓度

Table 2 Phosphate-solubilizing halo diameter, pH and soluble-P concentration of NBRIP in different treatments

菌株 Strains	溶磷圈直径 Phosphate solubilizing halo diameter/mm	有效磷浓度 Soluble-P concentration/mg·L ⁻¹	pH 值
DH5a	12.3±0.03 b	106.46±4.98 b	4.74±0.03 a
$DH5\alpha(pqq)$	19.8±0.04 a	416.96±8.71 a	$3.62{\pm}0.03~\mathrm{b}$

注:数据为平均值±标准误差,不同字母表示显著性差异(P<0.05)。下同。

Note: Data was mean \pm standard error values, different letters indicate significant difference(P < 0.05). The same below.

E. coli DH5α处理分泌的葡萄糖酸浓度分别占有机酸的浓度的 99.3%、88.4%。结果表明导入 pqq 基因簇后,DH5α(pqq)有机酸代谢明显增加,以产葡萄糖酸为主。

2.3 溶磷促生效果的影响分析

DH5α(pqq)处理对玉米株高、茎鲜重、植株鲜重、 茎干重、植株干重、全磷、土壤有效磷比 LB(对照)培 养基分别提高了 5.2%、30.0%、32.5%、18.5%、7.7%、 30.8%和 24.0%(表 3);该处理在茎干重、植株干重、 全磷、土壤有效磷方面与 LB 培养基相比有显著性差 异。然而,经过 E. coli DH5α 接种处理过的玉米株高、 茎鲜重、植株鲜重、茎干重、植株干重、全磷、土壤有效 磷比对照培养基分别降低了33.2%、62.8%、64.0%、 48.1%、58.9%、23.1%和24.8%,并有显著性差异。 DH5α(pqq)处理与LB培养基相比促进了植物的生长, 在玉米株高、茎鲜重、植株鲜重、茎干重、植株干重、 全磷、土壤有效磷均有了增加。然而,E. coli DH5α处 理与对照培养基相比,反而抑制了玉米的生长。导入 pqq 基因簇的 DH5α(pqq)处理增加土壤有效磷含量, 增强了植物对磷的吸收,促进了玉米的生长。



图 2 DH5 $\alpha(pqq)$ 、大肠杆菌 DH5 α 产有机酸色谱图

Figure 2 Chromatogram of organic acids produced by DH5 α (pqq) and DH5 α strains in NBRIP

表 3	不同处理对玉米株高。	重量、全磷	、有效磷的促生效果
-----	------------	-------	-----------

Table 3 Effect of different treatments on plant height, weight, total P and soluble-P							
菌株 Strains	株高 Plant height/cm —	鲜重 Fresh weight/g•plant-1		干重 Dry weight/g·plant ⁻¹		全磷含量	有效磷含量 Soluble-P
		茎 Shoot	植株 Plant	茎 Shoot	植株 Plant	Total P/%	$concentration/mg \boldsymbol{\cdot} kg^{\text{-}1}$
$\mathrm{DH5}\alpha$	36.2±1.31b	$2.58{\pm}0.42{\rm b}$	$2.92 \pm 0.50 \mathrm{c}$	$0.56 \pm 0.04 \mathrm{c}$	$0.69{\pm}0.05{\rm c}$	$0.10 \pm 0.01 \mathrm{c}$	3.85±0.24c
$DH5\alpha(pqq)$	57.0±2.51a	9.02±0.49a	10.76±0.45a	1.28±0.06a	1.81±0.05a	0.17±0.01a	6.35±0.41a
LB 培养基	54.2±0.86a	6.94±1.23a	$8.12 \pm 1.61 \mathrm{b}$	$1.08 \pm 0.09 \mathrm{b}$	$1.68{\pm}0.07{\rm b}$	$0.13 \pm 0.01 \mathrm{b}$	$5.12\pm0.30b$

-46-

3 讨论

溶磷菌溶解矿质磷的主要机制是经在细胞质膜 外部发生直接氧化反应产生有机酸,并且伴随 pH 值 的下降,导致磷的溶解[22-23]。细菌溶解矿质磷在细菌 的溶磷机理中与碳源相关,溶磷微生物能分泌有机 酸如葡萄糖酸、酮戊二酸、柠檬酸、草酸、苹果酸、琥珀 酸等[7,16,24]。Goldstein[25]提出,把葡萄糖直接氧化成葡萄 糖酸是革兰氏阴性菌的矿质磷酸盐溶解的一个主要 作用机制。除此之外,目前已有研究特定的革兰氏阴 性菌由于缺少 pqq 基因簇,没有能力溶解难溶性磷^[26]。 本试验中,把HX2菌株中的pgq基因簇导入E. coli DH5 α ,获取 DH5 α (*pqq*)菌株,能分泌更多的有机酸, 特别是以产葡萄糖酸为主,与 E. coli DH5α相比,从 溶磷的定性、定量结果表明均有更强的溶解矿质磷能 力。进一步验证了在 DH5 $\alpha(pqq)$ 中有 pqq 的基因表 达,且具有活性,可能是导致 PQQ 的产生,激活了细 菌体内的葡萄糖脱氢酶(glucose dehydrogenase,GDH), 两者的共同作用促进了葡萄糖酸的外泌,加速了对矿 质磷的溶解^[7,27-28]。当然, PQQ 和 GDH 对 DH5α(pqq) 菌株溶磷作用机理有待于做进一步深入研究。

已有相关报道溶磷菌如 Serratia marcescens、 Pseudomonas fluorescens 和 Bacillus spp.均有对植物促 生作用^[20-31]。本试验中 DH5α(pqq)菌株处理的玉米与 DH5α、对照处理相比,提高植株全磷和土壤有效磷的 含量,增强了植物对磷的吸收,促进了玉米的生长。其 主要的原因就是 DH5α(pqq)菌株能分泌葡萄糖酸, 使更多的难溶磷变成可溶性的磷,促进植株的摄入提 高玉米植株的生长,更进一步阐述了其溶解矿质磷机 理及促进农作物玉米的促生效果。

Rodríguez 等^[32]研究报道了导入 pqq 基因的Burkholderia cepacia IS-16 和假单胞菌属 (Pseudomonas sp)两个菌株能增强矿质磷酸盐溶解表型,促进对磷 的溶解。本文采取转化的方法把 R. aquatilis HX2 菌 株中的 pqq 基因簇导入 E. coli DH5 α ,改造 E. coli DH5 α 并高效表达,获得 DH5 α (pqq)菌株,使其具有 植物促生菌的相关功能特性,丰富了植物促生菌的构 建模式,本文采用的方法为后续改造其他植物促生菌 获得溶磷性状提供了新的路径和方法。

4 结论

通过导入 pqq 基因簇的 DH5α(pqq)菌株溶磷促 生分析表明,说明来自 R. aqautilis 的 pqq 基因簇通过 异源表达具有生物活性,实现了 E. coli DH5α 的植物 促生菌的遗传改造。DH5α(pqq)菌株溶解矿质磷的机 制取决于转化 R. aqautilis 的 pqq 基因簇后,实现了葡 萄糖高效代谢为葡萄糖酸,并溶解土壤难溶磷,增加 土壤有效磷含量,提高植株玉米对磷的吸收,促进了 玉米的生长。

参考文献:

- [1] Zaidi A, Khan M S, Ahemad M, et al. Recent advances in plant growth promotion by phosphate-solubilizing microbes[M]. Microbial Strategies for Crop Improvement, Berlin; Springer, 2009;23–50.
- [2] Nadeem S M, Naveed M, Zahir A Z, et al. Plant-microbe interactions for sustainable agriculture; Fundamentals and recent advances[M]. Plant Microbe Symbiosis; Fundamentals and Advances, Berlin; Springer, 2013; 51–84.
- [3] 焦子伟, 吴文良, 郭岩彬. 不同碳源条件下 GDH 对植物促生菌 HX2 溶解矿质磷影响的研究[J]. 新疆农业科学, 2015, 52(2):268-274. JIAO Zi-wei, WU Wen-liang, GUO Yan-bin. Effect of glucose dehydrogenase on mineral phosphate solubilization with different carbon sources in *Rahnella aquatilis* HX2[J]. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2015, 52(2):268-274.(in Chinese)
- [4]陈 凡.水生拉恩氏菌 HX2 菌株防治葡萄根癌病的初步研究[D]. 北京:中国农业大学, 2007.
 CHEN Fan. Primary studies on biological control of grapevine crown gall by *Rahnella aquatilis* HX2[D]. Beijing: China Agriuclture University, 2007 (in Chinese)
- [5] Ogut M, Er F, Kandemir N. Phosphate solubilization potentials of soil Acinetobacter strains[J]. Biology and Fertility of Soils, 2010, 46:707– 715.
- [6] Chaiharn M, Lumyong S. Screening and optimization of indole-3-acetic acid production and phosphate solubilization from rhizobacteria aimed at improving plant growth[J]. *Current Microbiology*, 2011, 62:173–181.
- [7] Kim C H, Han S H, Kim K Y, et al. Cloning and expression of pyrroloquinoline quinone(PQQ) genes from a phosphate-solubilizing bacterium *Enterobacter intermedium*[J]. *Current Microbiology*, 2003, 47:457– 461.
- [8] Holscher T, Gorisch H. Knockout and overexpression of pyrroloquinoline quinone biosynthetic genes in *Gluconobacter oxydans* 621H[J]. *Journal* of Bacteriology, 2006, 188:7668.
- [9] Li Lei, Jiao Ziwei, Lauren hale, et al. Disruption of gene pqqA or pqqB reduces plant growth promotion activity and biocontrol of grown gall disease by Rahnella aquatilis HX2[J]. PLOS ONE, 2014, 9(12):1–16.
- [10] Neijssel O M. PQQ-linked enzymes in enteric bacteria[J]. Microbiology Science, 1987(4):87–90.
- [11] Duine J A, Jongejan J A. Enzyme with pyrroloquinoline quinine as cofactor[J]. Annual Review of Biochemistry, 1989, 187:213–219.
- [12] De Jonge R, De Mattos M J T, Stock J B, et al. Pyrroloquinoline quinone, a chemotactic attractant for *Escherichia coli*[J]. *Journal Bacteriology*, 1996, 178:1224–1226.

- [13] Guo Y B, Li J, Li L, et al. Mutations that disrupt either the *pqq* or the GDH gene of *Rahnella aquatilis* abolish the production of an antibacterial substance and result in reduced biological control of grapevine crown gall[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75, 6792.
- [14] Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichi coli* with plasmid[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1983, 166:557–580.
- [15] 黄鹏飞,刘君昂,靳爱仙,等. 马尾松根际土壤溶磷菌分离筛选、鉴定及其溶磷效果研究[J]. 中国农学通报, 2012, 28(19):12-16.
 HUANG Peng-fei, LIU Jun-ang, JIN Ai-xian, et al. Isolation and screening, identification of phosphorus-solubilizing bacteria in rhizosphere soil of *Pinus massonuana* and its phosphate-degradation capacity[J]. *Chinese A gricultural Science Bulletin*, 2012, 28(19):12-16.(in Chinese)
- [16] Yi Y, Huang W, Ge Y. Exopolysaccharide: A novel important factor in the microbial dissolution of tricalcium phosphate[J]. World Journal Microbiology and Biotechnology, 2008, 24:1059–1065.
- [17] Hoagland D R, Arnon D I. The water culture method for growing plants without soil[J]. *California A gricultural Experiment Station Circular*, 1950, 347:1–39.
- [18] 李 磊.水生拉恩氏菌 HX2 菌株 pqqA-F 基因簇生物学功能的初步研究[D]. 北京:中国农业大学, 2009.
 LI Lei. Preliminary study on functions of the pqqA-F gene cluster in Rahnella aquatilis strain HX2[D]. Beijing: China Agriuclture University, 2009.(in Chinese)
- [19] Murphy J, Riley J P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters[J]. *Analytica Chimica Acta*, 1962, 27;31–36.
- [20] Behbahani M. Investigation of biological behavior and colonization ability of Iranian indigenous phosphate solubilizing bacteria[J]. *Scientia Horticulturae*, 2010, 124: 393–399.
- [21] 崔建宇, 陈范骏, 朱洪群. 土壤、植物与环境分析实验[M]. 北京:中国农业大学自编教材, 2007.

CUI Jian-yu, CHEN Fan-jun, ZHU Hong-qun. Soil, plants and environmental analysis experiment[M]. Beijing: China Agriuclture University, 2007.(in Chinese)

[22] Rashid M, Khalil S, Ayub N, et al. Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under in vitro conditions[J]. Pakistan Journal of Biological Sciences, 2004(7):187-196.

- [23] Pradhan N, Sukla L. Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil[J]. *Africal Journal of Biotechnology*, 2009 (5):850–854.
- [24] Patel D K, Archana G, Kumar G N. Variation in the nature of organic acid secretion and mineral phosphate solubilization by *Citrobacter* sp. DHRSS in the presence of different sugars[J]. *Current Microbiology*, 2008, 56:168–174.
- [25] Goldstein A H. Involvement of the quinoprotein glucose dehydrogenase in the solubilization of exogenous phosphates by gram-negative bacteria[M]// Torriani-Gorini A, Yagil E, Silver S. Phosphate in microorganisms: cellular and molecular biology. Washington, DC: ASM Press, 1994, 197–203.
- [26] Vikram A, Alagawadi A R, Krishnaraj P, et al. Transconjugation studies in Azospirillum sp. negative to mineral phosphate solubilization[J]. World Journal of Microbiology Biotechnology, 2007, 23:1333–1337.
- [27] Goldstein A H. Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by gram negative bacteria[J]. *Biology A griculture Horticulture*, 1995, 12:185–193.
- [28] 陈 哲, 吴敏娜, 秦红灵, 等. 土壤微生物溶磷分子研究进展[J]. 土 壤学报, 2009, 46(5):925-931.
 CHEN Zhe, WU Min-na, QIN Hong-ling, et al. Advances in research on molecular mechanisms of phosphate solubilizing microorganisms in
- soil[J]. Acta Pedologica Sinica, 2009, 46(5):925–931.(in Chinese)
 [29] Dey R, Pal K, Bhatt D, et al. Growth promotion and yield enhancement of peanut(Arachis hypogaea L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria[J]. Microbiological Research, 2004, 159:371–394.
- [30] Sahin F, Cakmakci R, Kantar F. Sugar beet and barley yields in relation to inoculation with N₂-fixing and phosphate solubilizing bacteria [J]. *Plant Soil*, 2004, 265; 123–129.
- [31] Hameeda B, Harini G, Rupela O, et al. Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna[J]. *Microbiological Research*, 2008, 163:234–242.
- [32] Rodríguez H, Gonzalez T, Selman G. Expression of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola* in two rhizobacterial strains[J]. *Journal of Biotechnology*, 2000, 84:155–161.