



# BldM 对密旋链霉菌 Act12 形态发育及抗生素合成的调控

张媛<sup>1</sup>, 周涵奇<sup>1</sup>, 赵康康<sup>1</sup>, 薛泉宏<sup>2</sup>, 贾良辉<sup>1</sup>, 颜霞<sup>1\*</sup>, 颜华<sup>1\*</sup>

1 西北农林科技大学生命科学院, 陕西 杨凌 712100

2 西北农林科技大学资源环境学院, 陕西 杨凌 712100

张媛, 周涵奇, 赵康康, 薛泉宏, 贾良辉, 颜霞, 颜华. BldM 对密旋链霉菌 Act12 形态发育及抗生素合成的调控[J]. 微生物学报, 2024, 64(1): 130-142.

ZHANG Yuan, ZHOU Hanqi, ZHAO Kangkang, XUE Quanhong, JIA Lianghui, YAN Xia, YAN Hua. BldM regulates morphological development and antibiotic synthesis in *Streptomyces pactum* Act12[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(1): 130-142.

**摘要:** 【目的】以多效生防菌株——密旋链霉菌(*Streptomyces pactum*) Act12 为研究材料, 探究转录因子 BldM 对生防链霉菌 Act12 形态发育及抗生素合成的调控作用。【方法】通过基因工程手段构建 *bldM* 基因缺失突变株  $\Delta bldM$  及过表达突变株 OE-*bldM*, 利用扫描电镜观察、抑菌实验、高效液相色谱检测和实时荧光定量 PCR 探究缺失突变株  $\Delta bldM$  及过表达突变株 OE-*bldM* 与野生型(wild) Act12 在形态发育、生长速率、寡霉素产量及抗病原菌能力等方面的差异。【结果】经测序验证 *bldM* 基因缺失突变体  $\Delta bldM$  及过表达突变体 OE-*bldM* 均构建成功, 其中  $\Delta bldM$  寡霉素 D 产量明显降低且无法形成气生菌丝, 而过表达突变株 OE-*bldM* 的气生菌丝更加密集, 产孢更为丰富。与野生型菌株相比, OE-*bldM* 的寡霉素 D 产量增加了 23%, 编码寡霉素核心合成酶基因的转录水平上调了 2–3 倍, 抑菌活性显著增强。【结论】全局性转录调控因子 BldM 不但能影响 Act12 气生菌丝及孢子形成, 并且参与正调控 Act12 寡霉素的合成, 本研究结果为转录因子 BldM 的调控功能进行了新的挖掘和补充, 并为后续深入研究密旋链霉菌 Act12 的生长代谢途径和调控机制提供了参考。

**关键词:** 密旋链霉菌 Act12; 寡霉素; *bldM*; 形态发育

资助项目: 国家自然科学基金(31601700, 32072477); 陕西省自然科学基金(2021JM-105)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31601700, 32072477) and the Natural Science Basic Research Program of Shaanxi Province (2021JM-105).

\*Corresponding authors. E-mail: YAN Xia, luckyx@126.com; YAN Hua, Yanhua@nwsuaf.edu.cn

Received: 2023-05-04; Accepted: 2023-09-13; Published online: 2023-09-25

# BldM regulates morphological development and antibiotic synthesis in *Streptomyces pactum* Act12

ZHANG Yuan<sup>1</sup>, ZHOU Hanqi<sup>1</sup>, ZHAO Kangkang<sup>1</sup>, XUE Quanhong<sup>2</sup>, JIA Lianghui<sup>1</sup>, YAN Xia<sup>1\*</sup>, YAN Hua<sup>1\*</sup>

1 College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

2 College of Natural Resources and Environment, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

**Abstract: [Objective]** To investigate the regulatory role of the transcription factor BldM in the morphological development and antibiotic synthesis of *Streptomyces pactum* Act12, a biocontrol strain with multiple effects. **[Methods]** The *bldM*-deleted mutant strain  $\Delta bldM$  and the *bldM*-overexpressing mutant strain OE-*bldM* were constructed by genetic engineering. The scanning electron microscopy, antibacterial experiment, high performance liquid chromatography, and real-time quantitative PCR were employed to compare the morphological development, growth rate, oligomycin yield, and resistance to pathogens, respectively, between  $\Delta bldM$ , OE-*bldM*, and the wild-type strain Act12. **[Results]** The sequencing results proved that  $\Delta bldM$  and OE-*bldM* were successfully constructed.  $\Delta bldM$  showed significantly reduced production of oligomycin D and was incapable of forming aerial hyphae. OE-*bldM* presented dense aerial hyphae and active sporulation. Compared with the wild type, OE-*bldM* showed an increase of 23% in the yield of oligomycin D and the up-regulation of 2–3 times in the transcriptional levels of the genes encoding oligomycin core synthetase. Moreover, the antimicrobial activity of OE-*bldM* remarkably enhanced. **[Conclusion]** The global transcriptional regulator BldM can not only affect the formation of aerial hyphae and sporulation but also participate in the positive regulation of oligomycin synthesis in Act12. The results of this study supplement the knowledge about the regulatory function of BldM and provide a reference for further research on the growth, metabolism, and regulation mechanism of *S. pactum* Act12.

**Keywords:** *Streptomyces pactum* Act12; oligomycin; *bldM*; morphological development

链霉菌是一类具有分枝状菌丝体的革兰氏阳性菌, 作为生物活性化合物、医药化学品及新型药物的重要来源, 其次生代谢产物得到了广泛的研究和应用<sup>[1]</sup>。据统计, 目前超过 2/3 的抗菌和抗肿瘤生物活性物质均来自链霉菌属的次生代谢产物<sup>[2]</sup>, 但由于大部分的次生代谢产物合成基因簇 (secondary metabolites-synthesize gene clusters, SM-BGCs) 是沉默或低表达的, 链霉菌属中潜在的天然活性产物资源还未得到充分的

挖掘和利用<sup>[3]</sup>, 而相关研究表明, 对玫瑰孢链霉菌中 TetR 蛋白家族调控因子 DepR1 基因高表达后, 达托霉素的产量较于野生型提升了 41%<sup>[4]</sup>; 全局性调控因子 AveI 基因的缺失则导致阿维链霉菌中阿维菌素的生物合成增加了 10 倍<sup>[5]</sup>, 相关研究证明通过基因工程手段对部分转录因子进行抑制或过表达已成为激活链霉菌次生代谢产物合成的有效方法。

影响链霉菌属的次生代谢的转录调控因子

分为 3 种类型,包括全局性调控因子、簇内调控因子和多效调控因子<sup>[6]</sup>。其中,全局性转录调控因子控制多种代谢途径并且可以通过直接或间接的方式调控生物合成,双组分系统(two-component system, TCS)作为全局性调控因子中最主要的成分,其调控模式的复杂性和组成成分的多样性成为了转录因子研究的热点,大量研究表明 TCS 作为链霉菌中重要的信号传导系统,能参与到各种生理代谢过程中,特别是与链霉菌的形态分化和抗生素合成密切相关<sup>[7]</sup>。BldM 属于双组分调控系统 LuxR 家族 NarL/FixJ 亚家族的 DNA 结合响应调控因子,包含螺旋-转角-螺旋(helix-turn-helix, HTH)结构域,在对委内瑞拉链霉菌和天蓝色链霉菌的 BldM 功能研究中发现,该转录因子不受磷酸化控制<sup>[8]</sup>,通过形成同源二聚体 BldM-BldM 与异源二聚体 BldM-WhiI 激活下游靶基因,包括 *ssgR*、*rshA*、*whiB*、*smeA-sffA* 和 *whiE*,进而在链霉菌的形态分化中发挥着关键调控作用<sup>[9]</sup>,但 BldM 是否参与调控链霉菌次生代谢产物合成仍鲜有报道。

本研究则以一株分离自青藏高原的拮抗性放线菌——密旋链霉菌(*Streptomyces pactum*) Act12 为研究对象,该链霉菌对多种病原真菌都有明显的抑制作用,对草莓、甜瓜、人参等多种园艺作物具有良好的促生作用,可以减轻受污染土壤中的金属胁迫,还可以调节作物次生代谢,改善作物根际微生物群落结构,维持土壤微生态平衡,具有多种生物学活性<sup>[10-13]</sup>。通过对 Act12 生物合成基因簇进行分析,可能存在 30 个次生代谢合成基因簇,目前,Act12 的次生代谢产物寡霉素已得到分离鉴定,通过对相关转录调控因子 SPA7074、SPA0520、LuxR-2306 进行敲除及过表达,Act12 的寡霉素合成基因簇表达得到激活,寡霉素 D 产量和抑菌活性均得到大幅提高<sup>[14-16]</sup>。在前期通过对构建得到的基因缺失突变

株  $\Delta spa7074$  进行转录组学分析<sup>[17]</sup>,发现 *bldM* 基因在  $\Delta spa7074$  菌株中的转录水平较野生型 Act12 高出 2.69 倍,推测 BldM 转录因子不仅参与形态发育的调控,同时对 Act12 抗生素的合成也起到一定的调控作用。鉴于此,本研究以密旋链霉菌 Act12 为研究对象,通过对 *bldM* 基因进行敲除及过表达,探究 *bldM* 基因对 Act12 形态发育及寡霉素合成的影响,对转录因子 BldM 的调控功能进行补充,并为后续利用分子生物学手段对其他链霉菌次生代谢产物的挖掘提供新的改造靶点。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 菌株和质粒

本研究所用菌株:密旋链霉菌(*Streptomyces pactum*) Act12;基因缺失突变株  $\Delta bldM$  (在野生型 Act12 基础上通过同源重组法构建得到);基因过表达突变株 OE-*bldM* (通过位点特异性重组构建得到);大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$ 、S17-1;苹果腐烂菌(*Valsa mali*)、油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)和烟草赤星病菌(*Alternaria alternata*)。

本研究所用质粒:大肠杆菌-链霉菌穿梭质粒 pKC1139,带有安普霉素抗性基因,含链霉菌温度敏感 pSG5 复制子,温度高于 39 °C 时不能自主复制,用于构建基因缺失突变株<sup>[18]</sup>;pSET152::PermE\*,带有安普霉素抗性基因,含红霉素抗性基因的强启动子,用于构建过表达菌株;pET28a,带有卡那霉素抗性基因,用来扩增 *kan* 基因片段(以上菌株、质粒均由本实验室保存)。

#### 1.1.2 培养基和抗生素使用浓度

大肠杆菌培养基为 LB,培养温度为 37 °C;链霉菌种子培养基为 TSB,发酵培养基为 SPY,

接合转移采用 2CMY 培养基(胰蛋白胨 0.2%, 可溶性淀粉 1%, 氯化钠 0.1%, 硫酸铵 0.2%, 磷酸氢二钾 0.1%, 碳酸钙 0.2%, 硝酸钾 0.1%, 无机盐溶液, 琼脂 1.6%), 固体培养基为 NP 培养基、高氏一号培养基、MS 培养基及 R2YE 培养基, 培养温度为 28 °C; 真菌培养基为马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA), 培养温度为 28 °C, 具体培养基的配制参照《微生物学实验手册》<sup>[19]</sup>。LB 培养基中氨苄青霉素(ampicillin, Amp)和卡那霉素(kanamycin, Kan)使用终浓度均为 50 µg/mL。高氏一号培养基中卡那霉素和安普霉素(apramycin, Apr)使用终浓度为 10 µg/mL, 萘啶酮酸(nalidixic acid, Nd)终浓度为 25 µg/mL。

### 1.1.3 引物

本研究所用引物(表 1)由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

## 1.2 基因缺失突变株的构建

以密旋链霉菌 Act12 基因组为模板,

*bldM-U-F/bldM-U-R*、*bldM-D-F/bldM-D-R* 两对引物分别扩增 *bldM* 上、下游同源臂, 以 pET28a 质粒载体为模板, *bldM-KANA-F/bldM-KANA-R* 引物对扩增替换目的基因的 *kan* 基因片段, 并通过多片段同源重组酶与经 *Hind* III 和 *EcoR* I 双酶切的载体 pKC1139 连接得到敲除重组质粒 PKC1139::Δ*bldM*, 随后通过热激法转化至大肠杆菌 S17-1, 经接合转移将敲除重组质粒转至 Act12, 40 °C 高温培养, 随后通过抗性筛选出只含 Kan 抗性的单克隆菌株, 推测其为双交换缺失突变株, 随后进行测序验证, 获得基因缺失突变株 Δ*bldM*。

## 1.3 基因过表达突变株的构建

通过同源重组的方法构建重组载体 pSET152::PermE\**-bldM*, 随后转至 S17-1, 经过接合转移方法将重组载体整合至 Act12 基因组中, 安普霉素抗性筛选及测序验证后, 得到基因过表达突变株 OE-*bldM*。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primers	Sequence (5'→3')
<i>bldM-U-F</i>	CTATGACATGATTACGAATTCTTCGCGACCGACGACTATCC
<i>bldM-U-R</i>	TATCCAGGGGACATCTCTACGCAGACGAGGACGGAAGT
<i>bldM-KANA-F</i>	GTAGAGATGTCCCCTGGATACCG
<i>bldM-KANA-R</i>	TCCTCGGAGAGAACCCAGAGTCCCGCTC
<i>bldM-D-F</i>	TCTGGGGTTCTCTCCGAGGACACCGTCAAG
<i>bldM-D-R</i>	ACGACGGCCAGTGCCAAGCTTTCCATGCTAACGGGAAGTGG
152-erm- <i>bldM-F</i>	TCGTGCCGGTTGGTAGGATCCGCGGAGGACGGCCATGAC
152-erm- <i>bldM-R</i>	CAGGTCGACTCTAGAGGATCCCTAGCGGACCAGGCCCA
<i>oli2298-qPCR-F</i>	TGGGTGGGAACCGAGAAATC
<i>oli2298-qPCR-R</i>	GTCAGATCCCCGTCCGGTA
<i>oli2302-qPCR-F</i>	GGTTCTTCGGGATCTCACCC
<i>oli2302-qPCR-R</i>	GTACCGCCCACGAAGACTC
<i>oli2305-qPCR-F</i>	CCACCGAGGAGGAACCTCGTA
<i>oli2305-qPCR-R</i>	CATGTGCGGTGAGTGGAAGG
<i>hrdB-F</i>	CATCCGTATCCCGGTGCA
<i>hrdB-R</i>	GTCACCGAACTCGCTGTCG
<i>bldM-qPCR-F</i>	CCTCGTCTGCGACGACTC
<i>bldM-qPCR-R</i>	ATGCGCACGTCCATCA GAA

#### 1.4 不同固体培养基中菌体形态观察

分别将 wild Act12、 $\Delta bldM$  和 OE-*bldM* 接种至 4 种不同的固体培养基, 28 °C 培养 7 d 后观察 3 个菌体在形态、产孢等方面差异。

#### 1.5 扫描电镜观察

将 wild Act12、 $\Delta bldM$  和 OE-*bldM* 孢子在高氏一号培养基上划线培养, 随后用直径  $\leq 7$  mm 的灭菌盖玻片 45° 扞片培养 7 d, 用 2.5% 戊二醛常温浸渍固定 1 h 以上, 随后 4 °C 低温固定 2 h 以上, 用 pH 7.2、浓度 0.1 mol/L 的磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS) 浸洗 2–3 次, 再用 30%、50%、70%、80% 和 90% 乙醇进行梯度脱水, 每次 10 min, 再用无水乙醇进行脱水 2 次, 每次 10 min, 最后用乙酸异戊酯进行置换, 时间 10 min。随后对样品干燥喷金并进行扫描电镜观察。

#### 1.6 生长曲线测定

挑取高氏平板上培养 7 d 的单个菌落接种至 TSB 培养基, 28 °C、180 r/min 培养 3 d, 随后按照 1:100 (体积比) 的比例接种至 SPY 发酵培养基中, 28 °C、180 r/min 发酵培养。从第 24 小时开始, 每隔 12 h 取样, 抽滤、蒸发至恒重后, 称量细胞干重, 每组 3 个重复, 取平均值并绘制生长曲线。

#### 1.7 发酵液抑菌活性检测及寡霉素 D 产量分析

将培养 3 d 的 TSB 培养基中菌体按照 1:100 (体积比) 的比例接种至 200 mL SPY 发酵培养基, 每组设置 3 个重复, 28 °C、180 r/min 发酵培养 10 d。采用菌丝生长速率法<sup>[20]</sup>对各菌株发酵液抑菌能力进行检测, 取适量发酵液 8 000 r/min 离心 10 min, 将上清液经 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤除菌, 随后按照 1:10 (体积比) 的比例加至约 60 °C 已融化的 PDA 培养基, 混匀后倒入直径 9 mm 的灭菌培养皿中, 同时以加灭菌水的 PDA 培养基作为空白对照, 再取直径为 5 mm 的病原菌菌饼置于平板中心, 于 28 °C 培养 5 d。采用十字交叉法测量病原菌菌落生长直径, 并计算抑菌率<sup>[21]</sup>(公式 1)。

菌落直径(mm)=测量直径-菌饼直径

抑菌率=[(对照菌直径-处理菌直径)/对照菌直径]×100% 公式(1)

剩余发酵液则按照 1:1 (体积比) 的比例向其中加入乙酸乙酯进行萃取, 共萃取 2 次, 随后用分液漏斗进行分液, 获得萃取后的乙酸乙酯, 用圆底烧瓶进行旋蒸, 蒸干后吸取 2 mL 甲醇溶解, 用 0.22  $\mu$ m 有机滤膜过滤除菌后用于高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 检测, HPLC 的条件为: 使用 Symmetry 5  $\mu$ m 的 C18 反向层析柱; 以甲醇为流动相 A, 水为流动相 B。梯度洗脱程序为: 0–10 min 80% 甲醇、10–13 min 95% 甲醇、13–14 min 95% 甲醇–80% 甲醇、14–20 min 80% 甲醇。温度为 25 °C, 柱温范围为  $\pm 5$  °C, 进样量 10  $\mu$ L, 流速 1 mL/min, 检测波长 215 nm。

#### 1.8 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 分析

采用实时荧光定量 PCR 分析野生型菌株 wild Act12 与突变菌株  $\Delta bldM$  和 OE-*bldM* 中寡霉素合成相关基因的转录水平, 以 cDNA 为模板, *hrdB* 基因为内参, 根据  $\Delta\Delta C_t$  的计算公式<sup>[22]</sup>, 通过比较  $C_t$  值计算目标基因在各突变菌株和野生菌株的转录水平差异。

提取菌体总 RNA, 方法依照 TaKaRa RNAiso Plus 试剂盒操作说明书进行, gDNA 的去除及 RNA 反转录参照 Thermo Fisher Scientific 试剂公司相关产品的说明书, qRT-PCR 反应按照上海翌圣公司染料法定量 PCR 检测试剂盒 Hieff<sup>®</sup> qPCR SYBR Green Master Mix 操作说明进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 Act12 中 BldM 的序列分析

*Streptomyces pactum* Act12 基因组中 *bldM*

(B1H29\_14650), 其编码蛋白为 LuxR 家族 NarL/FixJ 亚家族的 DNA 响应调控因子, 该蛋白共由 203 个氨基酸组成, 预测分子量为 22.0 kDa, 与大多数响应转录因子一样, 蛋白结构预测 BldM 有 1 个 N 端受体结构域 REC 以及 C 末端的 HTH 的 DNA 结合结构域。为研究 BldM 的功能, 通过生物信息学分析找到不同链霉菌基因组中对应的同源蛋白编码序列并进行比对分析, 发现 Act12 中 BldM 的氨基酸序列与灰色链霉菌 (*Streptomyces griseus*)、白色链霉菌 (*Streptomyces albus*)、天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*)

和委内瑞拉链霉菌 (*Streptomyces venezuelae*) 中同源蛋白氨基酸序列均为 100% 一致 (图 1), 说明该调控因子具有高度的保守性。随后, 对 Act12 基因组中 *bldM* 上下游基因座与天蓝色链霉菌和委内瑞拉链霉菌进行比对分析 (图 2), 发现 Act12 基因组中 *bldM* 上下游临近的 4 个基因与天蓝色链霉菌和委内瑞拉链霉菌中 *bldM* 上下游 4 个基因非常类似, 且在 Act12 基因组中 *bldM* 基因上下游 40 kb 范围内并未发现组氨酸激酶结构基因, 表明转录因子 BldM 属于孤立响应调控因子<sup>[23]</sup>。

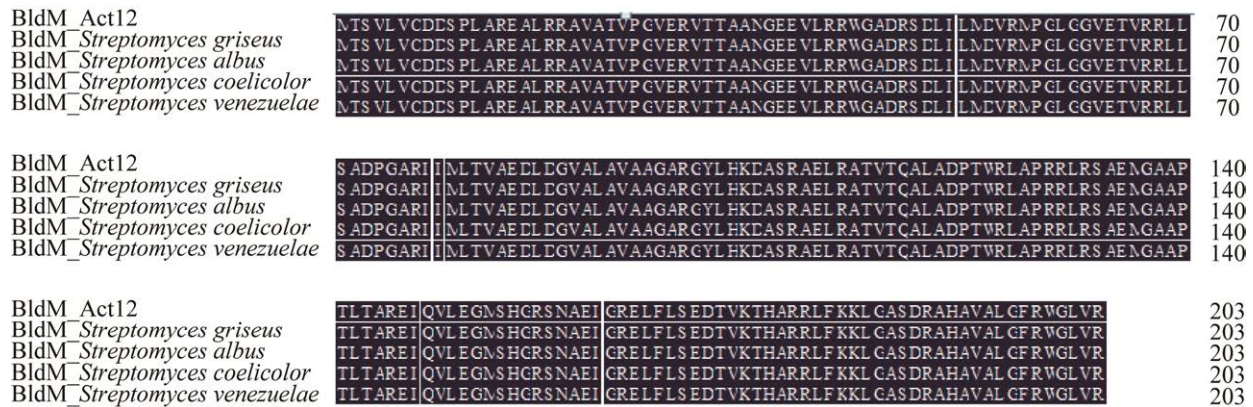


图 1 不同菌株来源 BldM 同源蛋白的氨基酸多序列比对结果

Figure 1 The result of multiple amino acid sequence alignment of BldM homologous proteins from different strains.

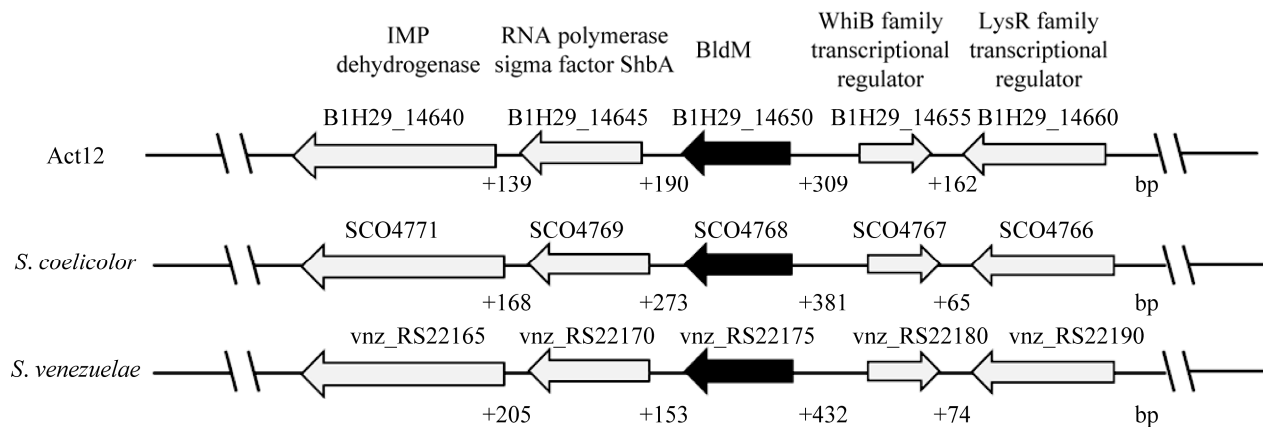


图 2 Act12 与 Streptomyces coelicolor 及 Streptomyces venezuelae 中 *bldM* 上下游基因座比较

Figure 2 The alignment of the locus of *bldM* (Act12) to the locus of *bldM* in *Streptomyces coelicolor* and *Streptomyces venezuelae*. The black arrows represent *bldM* (Act12), *bldM* (*S. coelicolor*), and *bldM* (*S. venezuelae*). The gray arrows represent homologous genes between the three strains. The numbers above the genes are the gene numbers in the genome sequence of the three strains. The numbers below the gene line indicate the gene spacing.



## 2.2 *bldM* 基因缺失突变株与过表达突变株的构建

为了探究 *bldM* 基因在密旋链霉菌 *Act12* 的功能,通过同源重组法构建成功的基因敲除载体 PKC1139:: $\Delta bldM$  与过表达载体 pSET152::PerME\*-*bldM* 转至大肠杆菌 S17-1 后,分别与 *Act12* 进行接合转移,通过抗性筛选得到可能的双交换基因缺失突变株和过表达突变株。设计引物进行 PCR 扩增和 DNA 测序,用于验证基因双交换缺

失突变体的引物设计如图 3 所示,筛选得到正确的 *bldM* 敲除突变株和 *bldM* 过表达突变株(图 4)。

## 2.3 *bldM* 基因缺失及过表达对 *Act12* 形态发育的影响

如图 5 所示,将 wild *Act12*、 $\Delta bldM$  和 OE-*bldM* 接种至不同的固体培养基,28 °C 培养 7 d 后观察到,菌株 wild *Act12* 和 OE-*bldM* 菌落表面呈现干燥、不透明呈致密的丝绒状态,上层有可以轻易挑取的干粉状孢子,且 OE-*bldM* 形成的孢子

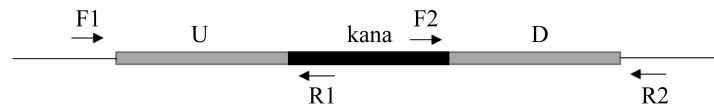


图 3 验证基因缺失突变体的引物设计

Figure 3 Primers design for validation of gene deletion mutant strain.

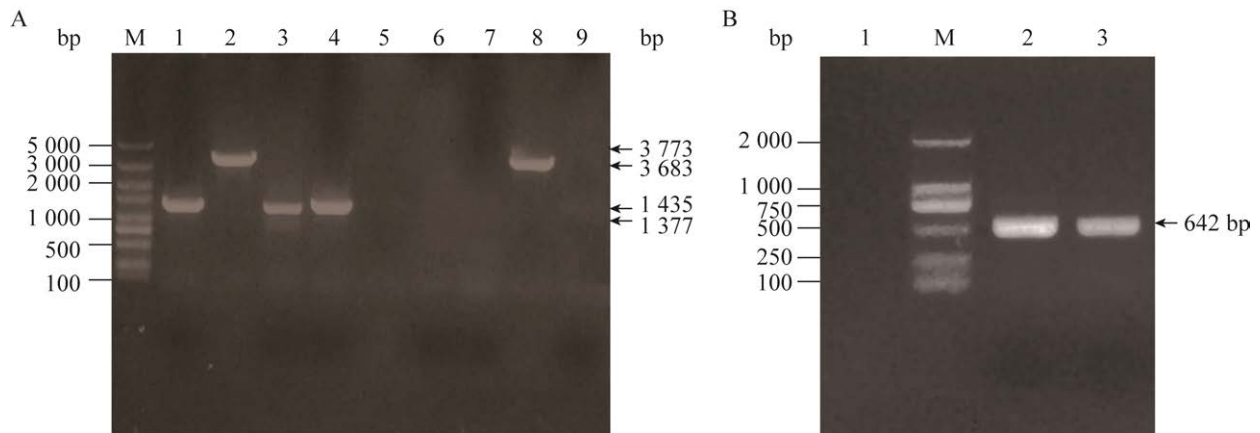


图 4 *bldM* 双交换缺失突变株及过表达菌株电泳验证

Figure 4 Electrophoresis verification of the *bldM*-double exchange deleted mutant strain and the *bldM*-overexpressing mutant strain. A: Electrophoresis detection of the *bldM*-double exchange deleted mutant strain. M: DL5000 DNA marker; Lane 1–3: Electrophoretic detection of the *bldM*-double exchange deleted mutant strain. Lane 1: Primers F1/R1 were amplified to obtain the upstream homologous arm; Lane 2: Primers F1/R2 were amplified to obtain the homologous knockout box; Lane 3: Primers F2/R2 were amplified to obtain the downstream homologous arm. Lane 4–6: Using the total DNA of the single-exchange mutant strain as the template. Lane 4: Primers F1/R1 were amplified to obtain a gene fragment containing the upstream homology arm. Lane 7–9: Using the total DNA of the wild type strain *Act12* as the template. Lane 8: Primers F1/R2 were amplified to obtain a gene fragment containing the upstream homology arm, the target gene and the downstream homology arm. B: Electrophoresis detection of the *bldM*-overexpressing strain. M: DL2000 DNA marker; Lane 1: Negative control using total DNA of the wild type strain *Act12* as the template; Lane 2: Amplified product using total DNA of the *bldM*-overexpressing strain as the template; Lane 3: Positive control using the overexpressing vector pSET152::PerME\*-*bldM* as the template.

更加浓密, 而 $\Delta bldM$ 菌落表面较为湿润, 表现出“光秃”表型, 并未产生孢子。根据扫描电镜的进一步观察, 如图6所示, 野生型菌株正常发育形成气生菌丝和孢子,  $\Delta bldM$ 未观察到孢子丝的形成和孢子的分化, 菌丝表面光滑无气生菌丝和孢子表面特有的粗糙疏水鞘结构<sup>[24]</sup>, 而 OE-*bldM*则产生生长而紧密盘绕的气生菌丝并分化成大量柔曲、钩环状至松散或紧密螺旋形, 且具有频繁隔壁的孢子丝以及密集的孢子分布。

## 2.4 *bldM* 基因缺失及过表达对 Act12 生长状态的影响

通过对发酵培养基中菌体分时间段进行取

样并称重, 绘制得到 wild Act12、 $\Delta bldM$  与 OE-*bldM* 生长曲线, 如图7所示, 生长曲线表明  $\Delta bldM$  和 OE-*bldM* 相较于 wild Act12 存在一定的差异。在早期(48 h 之前),  $\Delta bldM$  生长较为缓慢, 随着时间的推移, 从 60 h 到 84 h, 它继续生长并获得更高的生物量, 而 OE-*bldM* 则在早期表现出更快的生长速率, 但从 60 h 开始则进入了生长稳定期, 产生了相对较低的生物量。

## 2.5 *bldM* 基因缺失及过表达对 Act12 抑菌活性的影响

采用菌丝生长速率法对各菌株发酵液抑菌能力进行检测, 如图8所示, 菌株 OE-*bldM* 发

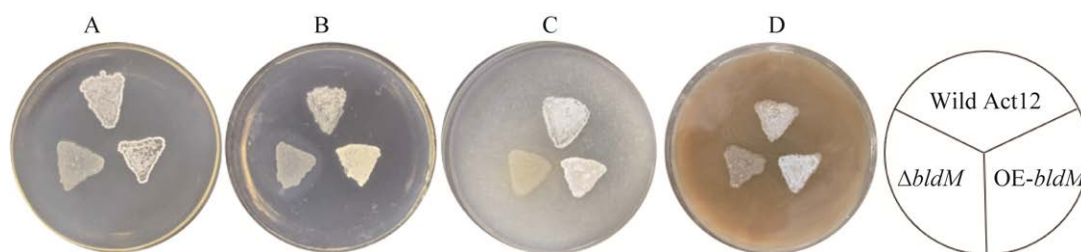


图5 不同培养基上野生型与各突变菌株的菌落形态比较

Figure 5 Comparison of colony morphology between the wild type strain and mutant strains on different solid media. A: NP medium. B: Gauze's synthetic medium No.1. C: MS medium. D: R2YE medium.

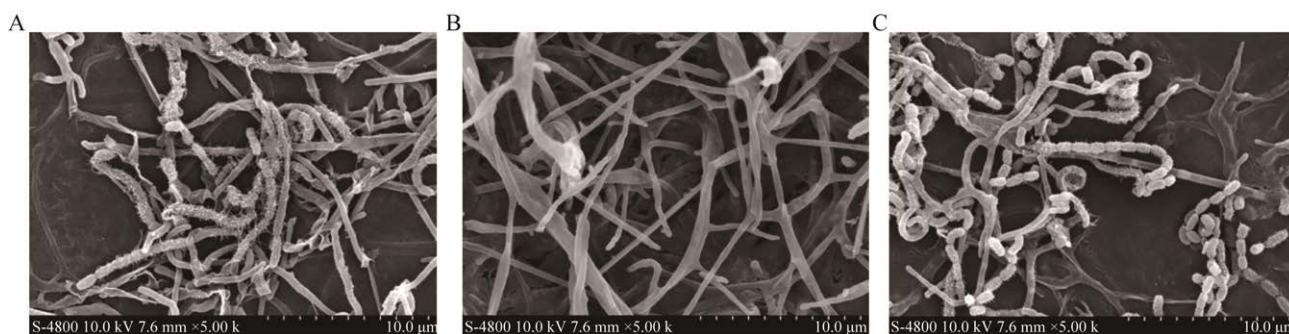


图6 扫描电镜观察 *bldM* 对 Act12 形态发育的影响

Figure 6 Scanning electron micrographs (SEM) showing effects of *bldM* on morphological development of Act12. The results of SEM show the developmental changes of the wild-type strain Act12 and the deleted mutant strain  $\Delta bldM$  and the overexpressing mutant strain OE-*bldM*, which grew on Gauze's synthetic medium No.1 at 28 °C for 7 days. The scale is shown in the figure. A: Mycelium morphology of wild Act12. B: Mycelium morphology of  $\Delta bldM$ . C: Mycelium morphology of OE-*bldM*.



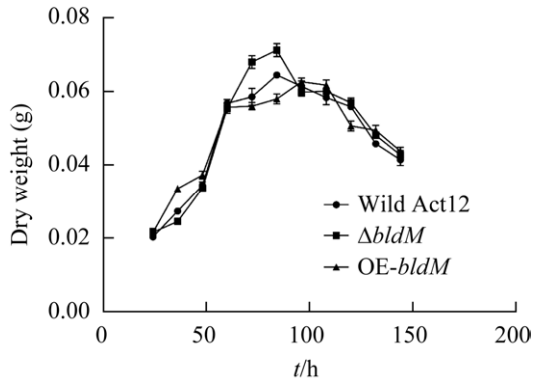


图7 各菌株生长曲线

Figure 7 Growth curve of each strain.

酵液对病原真菌苹果腐烂菌、油菜菌核病菌和烟草赤星病菌都表现出更高的抑菌活性,病原菌菌丝生长受到了更强的抑制,而 $\Delta bldM$ 则相反。随后统计抑菌直径和抑菌率数据,如表2所示,菌株OE-*bldM*发酵液对病原菌的拮抗能力显著增强,而 $\Delta bldM$ 则显示出最弱的抑制效果。在3个病原真菌中,对油菜菌核盘菌的抑菌活性最强,wild Act12、 $\Delta bldM$ 与OE-*bldM*的抑菌率分别为42.08%、27.29%和73.96%。

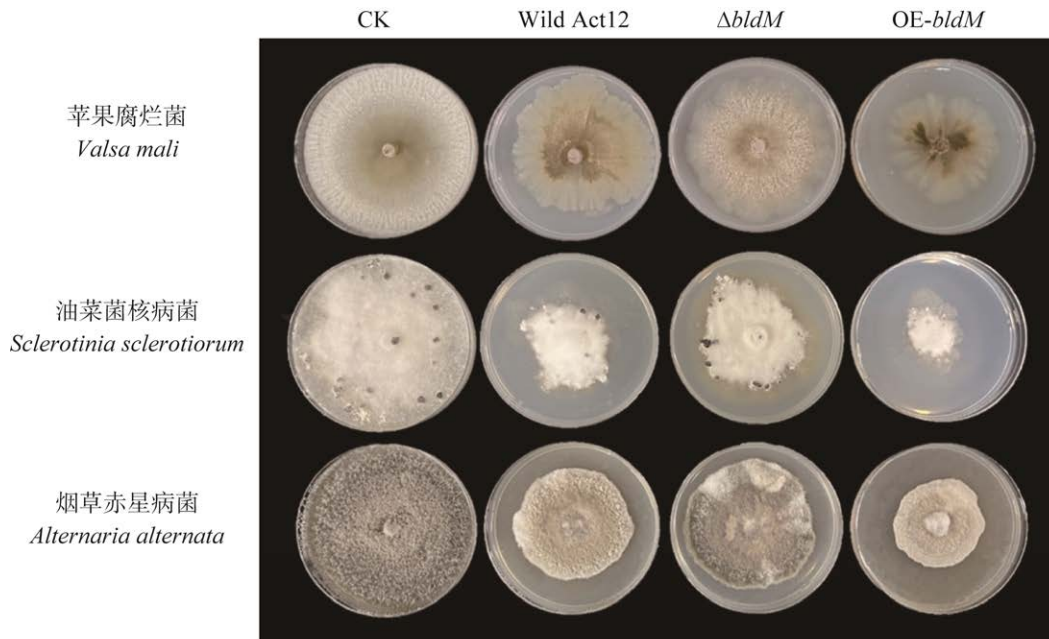


图8 各菌株发酵液对病原真菌的拮抗作用

Figure 8 Inhibition activity of each strain against pathogenic fungi.

表2 各菌株发酵液对病原真菌抑菌率测定结果

Table 2 Results of inhibition rate of each strain fermentation broth to pathogenic fungi

<i>Actinomyces</i>	<i>Valsa mali</i>		<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>		<i>Alternaria alternata</i>	
	Inhibitory diameter (mm)	Inhibitory rates (%)	Inhibitory diameter (mm)	Inhibitory rates (%)	Inhibitory diameter (mm)	Inhibitory rates (%)
CK	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d
Wild Act12	14.67±1.26b	18.33b	33.67±0.76b	42.08b	29.00±0.87b	36.25b
$\Delta bldM$	8.83±0.29c	11.04c	21.83±1.04c	27.29c	22.33±0.76c	27.91c
OE- <i>bldM</i>	29.50±1.00a	36.88a	59.16±0.58a	73.96a	40.16±0.76a	50.21a

The data represent means±SD, and different letters in the same column indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

## 2.6 *bldM* 基因缺失及过表达对 Act12 产寡霉素能力的影响

为进一步探究 *bldM* 对寡霉素合成调控影响, 将上述各菌株的发酵萃取液进行 HPLC 检测, 结果如图 9 所示,  $\Delta bldM$  寡霉素 D 产量较野生型 wild Act12 减少了约 19%, OE-*bldM* 的寡霉素 D 产量则增加了 23%, 随后, 通过实时荧光定量 PCR 检测在转录水平上寡霉素合成的差

异, 如图 10 所示, 在  $\Delta bldM$  菌株中, 3 个编码寡霉素核心合成酶基因 *oli2298*、*oli2302* 和 *oli2305* 的相对表达量均显著下降, 而 OE-*bldM* 菌株中编码寡霉素核心合成酶基因的转录水平相较于野生型则有了显著的提高, 提高了 2-3 倍。以上结果表明 BldM 转录因子可以通过正调控 Act12 中编码寡霉素核心合成酶基因的转录, 进而促进寡霉素 D 的生物合成。

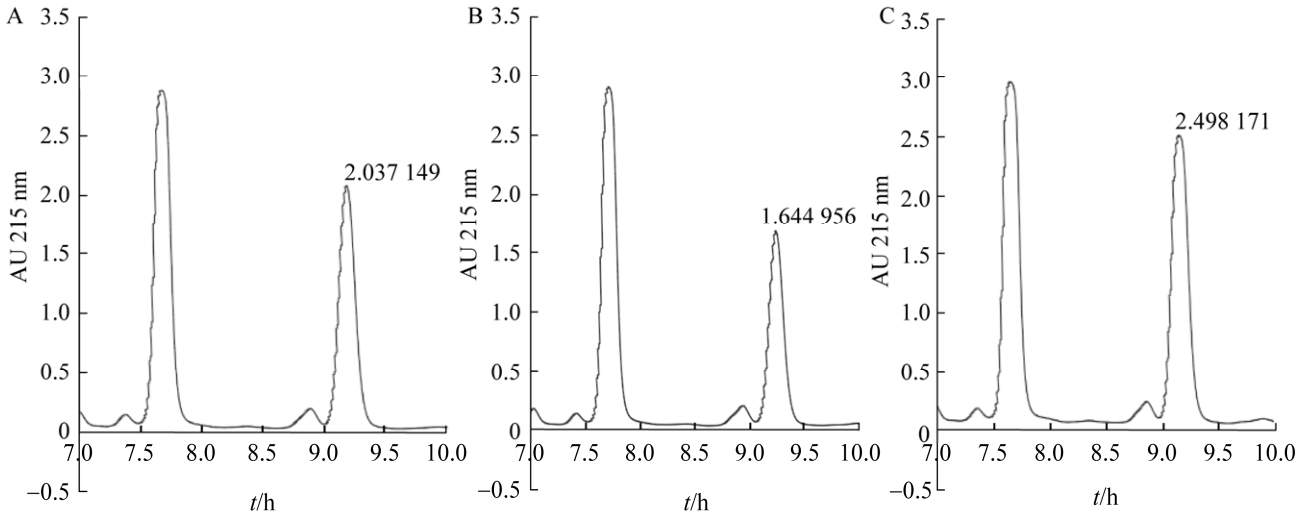


图 9 菌株发酵萃取液中寡霉素 D 含量检测

Figure 9 Determination of oligomycin D in fermentation extracts of different strains. A: Wild Act12. B:  $\Delta bldM$ . C: OE-*bldM*.

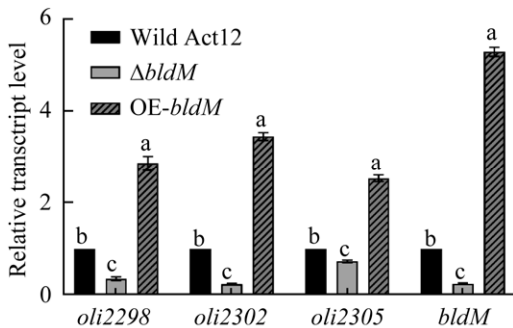


图 10 各菌株中编码寡霉素核心合成酶基因及 *bldM* 基因转录水平差异分析

Figure 10 Analysis of transcription differences of the genes encoding oligomycin core synthetase and *bldM* gene in different strains. The relative expression levels of three genes encoding oligomycin core synthetase and *bldM* in different strains are displayed with *hrdB* as the internal reference gene ( $n=3$ ). The error line represents the standard deviation, and different lowercase letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

## 3 讨论与结论

通过平板和扫描电镜观察发现,  $\Delta bldM$  表现出“光秃”的表型特征, 未能形成气生菌丝且无法正常分化成孢子, 而 OE-*bldM* 则与之相反, 可以清楚地观察到其密集盘绕的气生菌丝形态和丰富的孢子生成。气生菌丝的形成与两类表面活性分子——SapB 和 chaplins 有关, 二者可使气生菌丝打破基质菌丝体水环境的表面张力, 从而在空气中生长。研究表明, SapB 和 chaplins 是在丰富培养基上正常气生菌丝形成所必需的。对于大多数 *bld* 突变体, 其气生菌丝体形成可以通过在含有甘露醇作为唯一碳源的 NL19 培养基上来恢复<sup>[25-27]</sup>。然而, 菌株  $\Delta bldM$  在含有甘露醇

的 MS 以及其他固体培养基上仍然呈现“光秃”的表型特征。表明 *bldM* 对于 Act12 气生菌丝和孢子的形成起到了关键的调控作用,且无法通过外源物质改变进行恢复。同时由于菌株  $\Delta bldM$  不产孢子的特性,在构建回补菌株时无法通过回收孢子进行接合转移实验,后续可选择原生质体转化等方法构建回补菌株进行进一步验证。

通过绘制生长曲线,发现相较于 wild Act12, 突变株  $\Delta bldM$  和 OE-*bldM* 表现出了不同的生长情况,  $\Delta bldM$  生长缓慢,但随着时间推移,其生物量的积累却超过了 wild Act12 与 OE-*bldM*, 而 OE-*bldM* 虽然在早期生长速率更快,但其生物量的积累却并未表现出突出的优势。可能是由于早期 OE-*bldM* 的快速生长,造成培养基中的菌体密度快速增长,营养物质被快速消耗,进而抑制了菌体的生长。

本研究检测了野生型菌株与突变菌株的抗病原菌能力及编码寡霉素合成酶基因表达量与寡霉素 D 产量之间的差异,结果显示  $\Delta bldM$  发酵液的抗病原菌能力相较于野生型有所减弱,而 OE-*bldM* 的抑菌能力得到显著提高,与之结果相同的,其编码寡霉素核心合成酶基因的表达量及寡霉素 D 的产量也在 wild Act12、 $\Delta bldM$  和 OE-*bldM* 3 个菌株中表现出与抑菌实验同样的趋势。前期研究发现,当 Act12 中转录因子 LuxR-2306 基因缺失后,  $\Delta LuxR-2306$  菌株发酵液中几乎检测不到寡霉素 D 的存在,且抑菌活性几乎彻底丧失,推测 Act12 发挥抑菌活性的主要贡献成分为寡霉素 D<sup>[16]</sup>。本研究中,重组菌株的病原真菌活性也与寡霉素 D 产量以及寡霉素核心合成酶基因的表达量显著相关,因此推测转录因子 BldM 通过参与正调控 Act12 寡霉素 D 的生物合成从而增强了菌株发酵液对病原真菌的抑菌活性。同时,研究发现 BldM 直接调控的下游靶标基因 *whiE* 不仅参与调控链霉菌孢子色素

的合成,还涉及了聚酮类化合物的生物合成<sup>[28]</sup>。综合以上信息,推测转录因子 BldM 可能通过激活 *whiE* 或其他调控聚酮类化合物的基因表达间接调控了寡霉素 D 的生物合成,后续可通过构建 *whiE* 基因缺失突变株和过表达突变株进行验证。

Act12 作为一株根际促生菌,因其优良的生防活性现已得到了广泛的研究和应用,本文通过研究 Act12 中 BldM 转录因子的调控作用,探究得到 BldM 对 Act12 的形态发育起到了关键的调控作用,并且可以正向调控 Act12 中寡霉素的合成,提高 Act12 对病原菌的拮抗能力。本研究进一步补充了全局性转录因子 BldM 的调控功能,菌株 OE-*bldM* 密集的气生菌丝生成和孢子的大量产生以及拮抗能力的显著增强为更高效的生防菌株的挖掘改造提供了新的可能,后续可通过相关的促生实验进行进一步的探究。

## 参考文献

- [1] LACEY HJ, RUTLEDGE PJ. Recently discovered secondary metabolites from *Streptomyces* species[J]. *Molecules* (Basel, Switzerland), 2022, 27(3): 887.
- [2] XIE X, ZHU JW, LIU Y, JIANG H. Application of genetic engineering approaches to improve bacterial metabolite production[J]. *Current Protein & Peptide Science*, 2020, 21(5): 488-496.
- [3] ONAKA H. Novel antibiotic screening methods to awaken silent or cryptic secondary metabolic pathways in actinomycetes[J]. *The Journal of Antibiotics*, 2017, 70(8): 865-870.
- [4] YUAN PH, ZHOU RC, CHEN XP, LUO S, WANG F, MAO XM, LI YQ. DepR1, a TetR family transcriptional regulator, positively regulates daptomycin production in an industrial producer, *Streptomyces roseosporus* SW0702[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(6): 1898-1905.
- [5] CHEN L, CHEN J, JIANG YQ, ZHANG WW, JIANG WH, LU YH. Transcriptomics analyses reveal global roles of the regulator Avel in *Streptomyces avermitilis*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2009, 298(2): 199-207.

- [6] LIU G, CHATER KF, CHANDRA G, NIU GQ, TAN HR. Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*: MMBR, 2013, 77(1): 112-143.
- [7] SÁNCHEZ de la NIETA R, SANTAMARÍA RI, DÍAZ M. Two-component systems of *Streptomyces coelicolor*: an intricate network to be unraveled[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(23): 15085.
- [8] MOLLE V, BUTTNER MJ. Different alleles of the response regulator gene *bldM* arrest *Streptomyces coelicolor* development at distinct stages[J]. *Molecular Microbiology*, 2002, 36(6): 1265-1278.
- [9] AL-BASSAM MM, BIBB MJ, BUSH MJ, CHANDRA G, BUTTNER MJ. Response regulator heterodimer formation controls a key stage in *Streptomyces* development[J]. *PLoS Genetics*, 2014, 10(8): e1004554.
- [10] GUO D, ALI A, ZHANG ZQ. *Streptomyces pactum* and sulfur mediated the rhizosphere microhabitats of potherb mustard after a phytoextraction trial[J]. *Environmental Pollution*, 2021, 281: 116968.
- [11] ALI A, GUO D, LI YM, SHAHEEN SM, WAHID F, ANTONIADIS V, ABDELRAHMAN H, AL-SOLAIMANI SG, LI RH, TSANG DCW, RINKLEBE J, ZHANG ZQ. *Streptomyces pactum* addition to contaminated mining soils improved soil quality and enhanced metals phytoextraction by wheat in a green remediation trial[J]. *Chemosphere*, 2021, 273: 129692.
- [12] YAN Y, ZHANG SC, YANG DF, ZHANG JY, LIANG ZS. Effects of *Streptomyces pactum* Act12 on *Salvia miltiorrhiza* hairy root growth and tanshinone synthesis and its mechanisms[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2014, 173(4): 883-893.
- [13] 赵娟, 杜军志, 薛泉宏, 段春梅, 王玲娜, 申光辉, 陈秦, 薛磊. 3株放线菌对甜瓜幼苗的促生与抗性诱导作用[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2010, 38(2): 109-116.
- ZHAO J, DU JZ, XUE QH, DUAN CM, WANG LN, SHEN GH, CHEN Q, XUE L. The growth-promoting effect and resistance induction of 3 antagonistic actinomycetes on *Cucumis melo* L.[J]. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 2010, 38(2): 109-116 (in Chinese).
- [14] 段雪梅, 赵飞扬, 颜霞, 薛泉宏, 李晓霞, 文冰洁, 贾良辉, 颜华. 生防菌密旋链霉菌 Act12 中 SPA7074 缺失突变株的构建及其次级代谢产物鉴定[J]. *微生物学报*, 2016, 56(12): 1883-1891.
- DUAN XM, ZHAO FY, YAN X, XUE QH, LI XX, WEN BJ, JIA LH, YAN H. Construction of SPA7074-deficient mutant of biocontrol strain *Streptomyces pactum* Act12 and characterization of its secondary metabolites[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(12): 1883-1891 (in Chinese).
- [15] 李晓霞. 生防链霉菌 Act12 中沉默基因簇的激活与产物鉴定[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2017.
- LI XX. The activation of silent gene clusters and products identification in *Streptomyces* Act12[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2017 (in Chinese).
- [16] 颜华, 赵康康, 张媛, 陈欢, 郝鹏泽, 贾良辉. 密旋链霉菌 Act12 中调控因子 AdpA-s 和 LuxR-2306 对寡霉素合成的影响[J]. *中南民族大学学报(自然科学版)*, 2022, 41(4): 418-424.
- YAN H, ZHAO KK, ZHANG Y, CHEN H, HAO PZ, JIA LH. The effects of regulators AdpA-s and LuxR-2306 on oligomycin biosynthesis in *Streptomyces pactum* Act12[J]. *Journal of South-Central University for Nationalities (Natural Science Edition)*, 2022, 41(4): 418-424 (in Chinese).
- [17] 董萌萌. 密旋链霉菌 Act12 中两个 TetR 家族转录因子调控寡霉素生物合成的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2020.
- DONG MM. Study on the regulation of oligomycin biosynthesis by two TetR family transcription factors in *Streptomyces pactum* Act12[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2020 (in Chinese).
- [18] BIERMAN M, LOGAN R, O'BRIEN K, SENO ET, RAO RN, SCHONER BE. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp.[J]. *Gene*, 1992, 116(1): 43-49.
- [19] 周德庆. 微生物学实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986.
- ZHOU DQ. *Handbook of Microbiology Experiments*[M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1986 (in Chinese).
- [20] 刘欢, 安德荣, 慕小倩, 张勤福, 杨文军. 土壤中抗真菌放线菌 LH33 发酵提取物活性研究[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2009, 37(1): 145-150.
- LIU H, AN DR, MU XQ, ZHANG QF, YANG WJ. Study on the inhibitive activity of the fermented extracts of soil of antifungal actinomycetes LH33[J]. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 2009, 37(1): 145-150 (in Chinese).

- [21] 方中达. 植病研究方法[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 1998.  
FANG ZD. Research Methods of Plant Diseases[M]. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 1998 (in Chinese).
- [22] LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [23] HUTCHINGS MI, HOSKISSON PA, CHANDRA G, BUTTNER MJ. Sensing and responding to diverse extracellular signals? Analysis of the sensor kinases and response regulators of *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. *Microbiology*, 2004, 150(9): 2795-2806.
- [24] WILDERMUTH H, WEHRLI E, HORNE RW. The surface structure of spores and aerial mycelium in *Streptomyces coelicolor*[J]. *Journal of Ultrastructure Research*, 1971, 35(1): 168-180.
- [25] WILLEY J, SANTAMARIA R, GUIJARRO J, GEISTLICH M, LOSICK R. Extracellular complementation of a developmental mutation implicates a small sporulation protein in aerial mycelium formation by *S. coelicolor*[J]. *Cell*, 1991, 65(4): 641-650.
- [26] WILLEY J, SCHWEDOCK J, LOSICK R. Multiple extracellular signals govern the production of a morphogenetic protein involved in aerial mycelium formation by *Streptomyces coelicolor*[J]. *Genes & Development*, 1993, 7(5): 895-903.
- [27] CAPSTICK DS, WILLEY JM, BUTTNER MJ, ELLIOT MA. SapB and the chaplins: connections between morphogenetic proteins in *Streptomyces coelicolor*[J]. *Molecular Microbiology*, 2007, 64(3): 602-613.
- [28] DAVIS NK, CHATER KF. Spore colour in *Streptomyces coelicolor* A3(2) involves the developmentally regulated synthesis of a compound biosynthetically related to polyketide antibiotics[J]. *Molecular Microbiology*, 1990, 4(10): 1679-1691.