

藤黄绿脓菌素的自诱导及假单胞菌 M18 抗生物质 代谢相关性初步分析

葛宜和^{1,2} 赵彦宏² 陈丽娟³ 缪 静² 温 鲁^{1*}

(¹ 淮阴师范学院生物系 淮阴 223001)

(² 鲁东大学生命科学学院 烟台 264025) (³ 鲁东大学医院 烟台 264025)

摘 要 假单胞菌 M18 的生防功能归功于其分泌吩嗪-1-羧酸和藤黄绿脓菌素。为了研究抗生物质合成代谢相关性
及调控机制,分别构建了两种抗生物质合成基因簇插入突变株 M18T 和 M18Z1。用翻译融合表达载体 pMEAZ
(*pltA*'-'*lacZ*) 分别转化野生株和突变株 M18T、发酵培养并测定 β -半乳糖苷酶活性。结果显示,添加藤黄绿脓菌素使
突变株 M18T(pMEAZ)的 β -半乳糖苷酶活性比野生株 M18(pMEAZ)增加约 6 倍,表明藤黄绿脓菌素对自身基因簇具
正向自诱导作用。抗生物质的测定结果显示,突变株 M18T 无藤黄绿脓菌素合成,而吩嗪-1-羧酸的合成量与野生株
相同,突变株 M18Z1 与野生株相比,吩嗪-1-羧酸明显减少,藤黄绿脓菌素却显著提高。过量的吩嗪-1-羧酸又抑制
藤黄绿脓菌素的合成。表明,假单胞菌 M18 中独有的代谢相关方式为:藤黄绿脓菌素不影响吩嗪-1-羧酸,但吩嗪-
1-羧酸负调控藤黄绿脓菌素。

关键词: 假单胞菌 M18; 生物防治; 藤黄绿脓菌素; 吩嗪-1-羧酸; 自诱导

中图分类号: Q935 **文献标识码**: A **文章编号**: 1001-6209(2007)03-0441-06

在作物病虫害防治过程中,过去一直以喷施化学农药为主的化学防治所造成的食品农药残留、土壤板结硬化以及环境污染等已经成为人们关注的焦点。而采用高效、安全的生物农药开展生物防治已成为现代、绿色农业的首选方法。假单胞菌是一类定植于植物根际,能够分泌多种抗生物质,具生物防治功能并促进植物生长的根际促生细菌(Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR)。研究表明,PGPR 促进作物生长主要体现在 3 个方面:(1)诱导作物产生系统抗性(Induced Systemic Resistance, ISR)^[1];(2)合成并分泌抗生物质,抑制或杀死作物病原真菌^[2];(3)与病原真菌竞争营养或空间^[3]。目前研究显示,土壤中假单胞菌大多可通过合成并分泌一定种类和数量的抗生物质而起到生物防治功能。分泌的抗生物质主要包括吩嗪、2,4-二乙酰基间苯三酚、藤黄绿脓菌素、硝吡咯菌素、脂多肽、氢氰酸以及它们的衍生物等^[4]。

在合成多种抗生物质的假单胞菌中,抗生物质的合成与表达具有一定的相关性。当一种抗生物质的表达量降低或受到抑制时,它种抗生物质的表达

量就因内部的一种平衡系统调节而提高,藉以维持对作物病原菌生物防治功能的稳定。此种现象称作次生代谢的代偿作用。如在荧光假单胞菌 CHA0 中,2,4-二乙酰基间苯三酚与藤黄绿脓菌素在表达量上相互遏制,即 2,4-二乙酰基间苯三酚过表达则抑制藤黄绿脓菌素的合成,藤黄绿脓菌素的超量表达则抑制 2,4-二乙酰基间苯三酚的合成。同时它们各自对自身都有自诱导作用^[5]。

从上海郊区甜瓜根际土壤中分离并获得的假单胞菌菌株 M18 对引起多种农作物病害的病原真菌、细菌具有显著的抑制或杀灭作用。已有研究表明,假单胞菌 M18 的生防功能主要归功于其合成并分泌的吩嗪-1-羧酸(Phenazine-1-carboxylic acid, PCA)和藤黄绿脓菌素(Pyoluteorin, Plt)两种抗生物质^[6]。在已有报道中,能够同时合成并分泌吩嗪-1-羧酸和藤黄绿脓菌素的菌株仅此一种。在过去 20 多年中,吩嗪-1-羧酸主要用于防治因镰刀菌等引起的小麦“全蚀病”^[7],而藤黄绿脓菌素则用于由卵菌属真菌等引起的黄瓜、番茄等“根腐病”的防治^[8]。由于两种抗生物质具有各自的抗(抑)菌谱,所以假单胞菌

基金项目:江苏省高校自然科学研究计划(05KJB180010);鲁东大学科技基金(20063302)

* 通讯作者。Tel/Fax 86-517-3525086 E-mail: ijlqgj@163.com

作者简介:葛宜和(1969-)男,江苏宿迁人,副教授,理学博士,研究方向为细菌、真菌次生代谢的分子调控方式与机制。现任职于鲁东大学生命科学学院。E-mail: geyihe@126.com

收稿日期:2006-08-24;接受日期:2006-11-24;修回日期:2006-12-01

M18 理论上应具有更广泛的生物防治功能并在现代农业中具有更广阔的应用前景。为此,深入开展该菌抗生物物质合成代谢机制及两种抗生物物质的代谢相关性研究,有利于提高其生物防治功效,进一步扩大假单胞菌 M18 在未来农业领域的使用范围。本研究旨在分别构建吩嗪-1-羧酸和藤黄绿脓菌素合成基因簇插入突变株等的基础上,开展对抗生物物质代

谢相关性的研究与分析。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 :本研究所涉及的菌株、质粒及其来源见表 1。

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids		
Strains and plasmids	Characteristics	Source
Strains		
<i>E. coli</i> DH5α	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(rk⁻ mk⁺)supE44 relA1</i>	Lab collection
<i>E. coli</i> SM10	<i>F thi-1 thr-1 leuB6 recA tonA21 lacY1 supE44(Mu_C⁺)λ⁻ Kan^R</i>	[14]
<i>Pseudomonas</i> sp. M18	PCA ⁺ *, Plt ⁺⁺ producer, Amp ^R Spe ^R	Lab collection
<i>Pseudomonas</i> sp. M18Z1	PCA ⁺⁺ , Plt ⁺⁺⁺ producer, <i>phz1</i> : <i>:aacC1</i> , Amp ^R Spe ^R Gen ^R	This study
<i>Pseudomonas</i> sp. M18S	PCA ⁺ , Plt ⁺⁺⁺ producer, <i>rpoS</i> : <i>:aacC1</i> , Amp ^R Spe ^R Gen ^R	[17]
<i>Pseudomonas</i> sp. M18T	PCA ⁺⁺ , Plt ^{§-} producer, <i>pldD</i> : <i>:aacC1</i> , Amp ^R Spe ^R Gen ^R	[15]
Plasmids		
pBluescript SK	ColE, cloning and sequencing vector, Amp ^R	Lab collection
pLFAR5	Cosmid vector for constructing the genomic library, Tet ^R	Lab collection
pBZF	pBluescript SK carrying 380bp-PCR product of <i>phzF</i> gene	This study
pPCA	7.3kb- <i>Bam</i> HI fragment containing partial <i>phz</i> gene cluster in pBluescript SK	This study
pBZGm	4.6kb- <i>Stu</i> I fragment replaced with <i>aacC1</i> cassette in pPCA	This study
pEX18Tc	Suicide plasmid, Tet ^R	[14]
pEXZ	3.5kb- <i>Bam</i> HI fragment containing <i>aacC1</i> cassette in pEX18Tc	This study
pMEAZ	pME6010 with 0.6-kb <i>plta</i> upstream fragment and a translational <i>plta</i> '-' <i>lacZ</i> fusion carrying first 8 <i>plta</i> codons	[9]
pUCGm	Resource of gentamycin resistant cassette	[13]

* , + + indicates production of antibiotics by the wild type strain M18 ; + , + indicates less production of antibiotics by the derivative strain of M18 ; + , + + indicates more production of antibiotics by the derivative strain of M18 ; § , - indicates no production of antibiotics by the derivative strain of M18 .

1.1.2 酶和试剂 :限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶、DNA Marker 和 O-硝基苯-β-D-半乳糖苷(ONPG)等购自上海生工生物工程有限公司。DNA 胶回收试剂盒等购自天根生化科技(北京)有限公司。同位素[α-³²P]dCTP 购自北京亚辉生物科技公司。

1.1.3 培养基和培养条件 :假单胞菌 M18 培养基为 KMB(King's medium B)^[9]。配制时所需的氮源采用 trypton(Oxide 原装) ,其它所用生化试剂纯度级别均为分析纯。大肠杆菌 LB 培养基中的抗生素用量(μg/mL) :卡那霉素(Kan)50、氨基青霉素(Amp)100、庆大霉素(Gen)20、壮观霉素(Spe)50、四环素(Tet)20。假单胞菌 M18 野生株及衍生株培养基中抗生素用量分别为(μg/mL) :卡那霉素(Kan)50、氨基青霉素(Amp)100、庆大霉素(Gen)40。吩嗪-1-羧酸和藤黄绿脓菌素为实验室细菌代谢纯化产物。

1.2 细菌基因组 DNA 的提取

假单胞菌 M18 基因组 DNA 提取采用上海华舜

生物工程公司的细菌基因组 DNA 抽提试剂盒。具体方法参照该试剂盒说明书。

1.3 7.3kb-*Bam*HI 吩嗪-1-羧酸基因簇片段的筛选与克隆

1.3.1 *phzF* 基因的 PCR、克隆与测序 :根据荧光假单胞菌 2-79(*P. fluorescens* 2-79)和致金色假单胞菌 30-84(*P. aureofaciens* 30-84)菌株中吩嗪-1-羧酸基因簇(*phzABCDEFG*)的一个关键合成酶基因 *phzF* 的编码序列^[10],设计 PCR 引物 PZ1 和 PZ2(PZ1 : 5'-GCGCGGATCCTGGACCAGTCAC-3' ; PZ2 : 5'-TCTGGAATTCGCATCGGGTCGCT-3')。以假单胞菌 M18 的基因组 DNA 为模板 ,PCR 扩增 *phzF* 基因片段。反应条件 :94℃ 8min ,94℃ 1min ,55℃ 1.5min ,72℃ 2min ,30 个循环 ,72℃ 10min。回收 PCR 产物(约 380bp)经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切后连接并克隆于 pBluescript SK 中。所得克隆为 pBZF。其中质粒提取、酶切、电泳、DNA 胶回收和连接反应 ,感受态细胞制备和质粒 DNA 转化均参照文献^[11]进行。酶切验证后的

pBZF 委托上海博亚生物技术公司测序。

1.3.2 基因组文库的构建及 *phzF* 基因阳性克隆的筛选 构建假单胞菌 M18 的基因组文库载体为粘粒 pLFAR5 构建过程参见文献[11,12]。用同位素标记的 380bp *phzF* 基因 PCR 产物探针与位于 4 张杂交膜上的 1920 个菌落(基因组文库)进行原位杂交。其中杂交膜的制备与杂交的方法按文献[11]进行。通过杂交共获得 5 个阳性克隆,分别为 pRKZ1 至 pRKZ5。通过 PCR 再次验证后的克隆 pRKZ1 经上海博亚生物工程公司酶切、克隆和测序鉴定,获得一条 7.3kb-*Bam*HI 吩嗪-1-羧酸基因簇片段。此片段克隆于 pBluescript SK 得 pPCA。

1.4 吩嗪-1-羧酸基因簇插入突变株的构建

从 pUCGm 中切取 0.8kb-*Sma*I 基因片段(含有 *aacC1* 抗庆大霉素基因盒)^[13]。并以此替换位于 7.3kb-*Bam*HI 吩嗪-1-羧酸基因簇片段中间的 4.6kb-*Stu*I 片段。然后将插有抗庆大霉素基因盒的 3.5kb-*Bam*HI 基因片段从 pBZGm 上切下并克隆于自杀质粒 pEX18Tc^[14],所得 pEXZ 以化学转化法转化 *E. coli* SM10。以野生株 M18 为受体菌,*E. coli* SM10(pEXZ)为供体菌,进行双亲杂交^[14]。根据同源重组原理构建并获得抗庆大霉素插入突变株 M18Z1。

1.5 翻译融合表达载体的构建和转化

翻译融合表达载体 pMEAZ(*plta'*-*lacZ*)的构建参见文献[9],用电转法转化假单胞菌及衍生株。

1.6 野生株 M18 及衍生株的生长状况测定

为了比较野生株 M18 和相关衍生株的生长状况,将待测菌株分别接种在 KMB 培养基中于 28℃、220r/min 下振荡培养,定时取样测定其光密度(OD_{600})。根据测定结果绘制生长曲线。

1.7 吩嗪-1-羧酸和藤黄绿脓菌素的定量测定

两种抗生物质的定量测定通过摇瓶发酵法进行。根据吩嗪-1-羧酸和藤黄绿脓菌素的不同性质,采用不同方法处理发酵液,并通过 HPLC 进行定量测定。具体方法及测定条件参照文献[9]进行。

1.8 β -半乳糖苷酶活性的定量测定

为鉴定抗生物质藤黄绿脓菌素对自身或它种抗生物质合成代谢的影响,利用已构建的翻译融合表达载体 pMEAZ(*plta'*-*lacZ*)转化野生株和突变株。分别同时在 KMB 培养基中培养,定时取样并测定 β -半乳糖苷酶活性。 β -半乳糖苷酶活性测定方法参照 Miller 法^[11]进行。

2 结果

2.1 野生株 M18 及其衍生株的生长曲线

为了比较野生株 M18 和相关衍生株的生长状况,将 3 种菌株分别接种在 KMB 培养基中于 28℃、220r/min 下振荡培养,定时取样测定其光密度(OD_{600})并绘制相关生长曲线(结果未显示)。据生长曲线反映,突变株 M18T^[15]、M18Z1 与野生株在 KMB 培养基中生长状况无显著差异。表明编码两种抗生物质基因簇的突变并不影响菌株生长。

2.2 藤黄绿脓菌素的缺失不影响吩嗪-1-羧酸表达

为了验证藤黄绿脓菌素的合成代谢对抗生物质吩嗪-1-羧酸合成的影响,我们构建了藤黄绿脓菌素合成基因簇的抗庆大霉素基因插入突变株 M18T。将突变株 M18T 与野生株 M18 分别同时接种于 KMB 培养基中,在 28℃、220r/min 条件下经过 72h 的发酵,测定结果如图 1-A、B 所示。由图显示,突变株 M18T 在发酵的过程中因其合成的基因簇已发生突变,不能合成相应的酶,故没有藤黄绿脓菌素的产生,与预期结果相符。然而,与野生株相比,突变株 M18T 的吩嗪-1-羧酸合成量未发生明显改变。表明,藤黄绿脓菌素合成能力的缺失没有影响吩嗪-1-羧酸的合成。

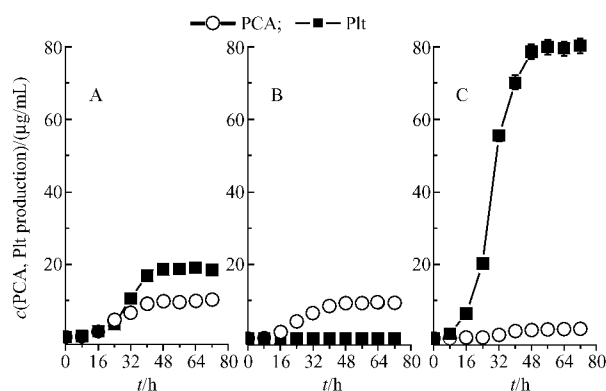


图1 野生株 M18 及其衍生株在 KMB 培养基中的两种抗生物质的合成曲线

Fig.1 Phenazine-1-carboxylic acid and pyoluteorin produced by the wild type strain M18 and its derivatives in KMB medium.

2.3 吩嗪-1-羧酸的弱表达引起藤黄绿脓菌素的过表达

为了验证吩嗪-1-羧酸的合成代谢对抗生物质藤黄绿脓菌素合成的影响,我们又构建了一个吩嗪-1-羧酸合成基因簇的抗性基因插入突变株 M18Z1。将突变株与野生株分别同时接种于 KMB 培养基进行发酵培养。根据所测定的抗生物质的量绘制曲线

(图 1-C)。据图 1-C 所示,与野生株相比,突变株 M18Z1 的吩噻-1-羧酸合成量明显减少,藤黄绿脓菌素合成量显著提高。此结果表明,吩噻-1-羧酸的减少促进了另一抗生物质藤黄绿脓菌素相关合成基因的表达。此外,该突变株中吩噻-1-羧酸的基因簇突变以后,吩噻-1-羧酸只是减少而不是零表达,表明该菌株极有可能与铜绿假单胞菌 PAO1(*P. aeruginosa* PAO1)一样^[16],拥有两个相对独立的吩噻合成基因簇。

2.4 藤黄绿脓菌素的自诱导作用

为了检验藤黄绿脓菌素是否具有自诱导作用,将翻译融合表达载体 pMEAZ 通过电转化法分别导入野生株和突变株 M18T。将携带 pMEAZ 的野生株和突变株同时分别接种于 KMB 培养基中,在其发酵过程中添加一定量的藤黄绿脓菌素,使其浓度达 10 μ g/mL。每隔 8h 取样,以 Miller 法测定 β -半乳糖苷酶活性,测定结果如图 2 所示。由图可知,当突变株 M18T(pMEAZ)在未添加藤黄绿脓菌素的条件下,其 β -半乳糖苷酶活性最高可达 180U。但培养基中添加一定的藤黄绿脓菌素后,其 β -半乳糖苷酶活性显著提高约 6 倍并与野生株 M18(pMEAZ)相当,可达到 1100U。由此证明,在假单胞菌 M18 中,藤黄绿脓菌素对自身基因簇的表达具有正向的自诱导作用。

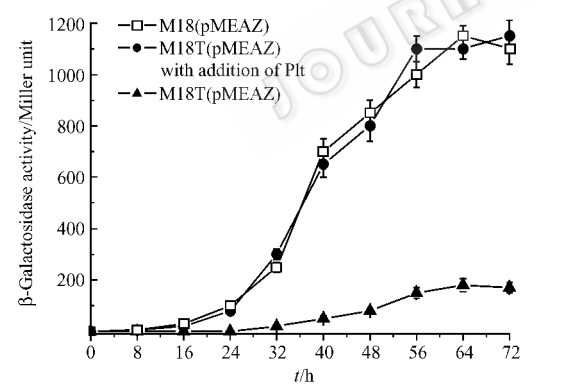


图 2 野生株 M18 和突变株 M18T 中 pMEAZ 在添加藤黄绿脓菌素前后的 β -半乳糖苷酶的活性分析

Fig.2 Analysis of β -galactosidase activities of pMEAZ in the wild type strain M18 (A), the mutant M18T with addition of pyoluteorin (B) or the mutant M18T with no pyoluteorin (C) in KMB medium, respectively.

2.5 过量的吩噻-1-羧酸抑制藤黄绿脓菌素的合成

为了系统研究吩噻-1-羧酸对藤黄绿脓菌素合成的影响,我们选取已构建的转录因子 σ^S 缺失突变株 M18S 作实验材料^[17]。已有研究表明,突变株 M18S 在 KMB 培养基中发酵时吩噻-1-羧酸的合成被完全抑制,而藤黄绿脓菌素却增加高达 180 μ g/mL。鉴于突变株 M18S 有此特征,我们在其发酵培养基

中逐级添加一定量的吩噻-1-羧酸,使其浓度从 0 μ g/mL 至 200 μ g/mL。按同样方法测定发酵过程中的藤黄绿脓菌素的合成量(图 3)以及菌体的生长量(OD_{600})。

在发酵过程中,添加不同浓度的吩噻-1-羧酸对突变株 M18S 的生长未产生显著的影响(结果未显示)。据图 3 所示,在 KMB 培养基中添加吩噻-1-羧酸,在低浓度条件下,藤黄绿脓菌素的合成未有显著变化,但当吩噻-1-羧酸的浓度高于 120 μ g/mL 以上时,藤黄绿脓菌素的合成量显著降低。由此表明,过量吩噻-1-羧酸的合成一定程度上对藤黄绿脓菌素的合成具有抑制作用。

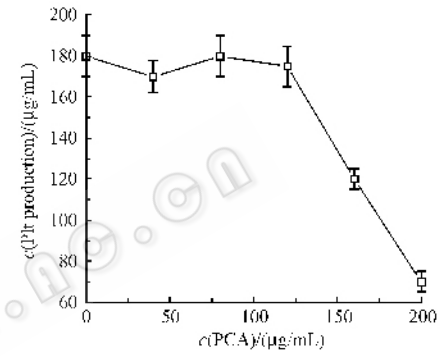


图 3 添加不同浓度吩噻-1-羧酸对突变株 M18S 合成藤黄绿脓菌素的影响

Fig.3 Pyoluteorin production of the mutant M18S with addition of phenazine-1-carboxylic acid in KMB medium.

3 讨论

假单胞菌 M18 因合成并分泌对多种作物病原真菌的生长具有显著抑制作用的抗生物质吩噻-1-羧酸和藤黄绿脓菌素,在现代绿色农业中极具应用前景。但是,从土壤中直接分离所得的野生型菌株分泌的抗生物质的量相对较低,同时在不同作物根际定植情况差异明显,这些特征限制了假单胞菌 M18 在农业中的大面积推广使用。构建两种抗生物质高表达的基因工程菌株,使之成为定植稳定、高效安全的生防菌株成为现阶段的主攻目标。因此,有必要首先开展两种抗生物质在代谢合成上的相关性研究。

已有研究表明,能够分泌多种抗生物质的生防菌株具有自身的平衡机制。一种抗生物质的表达受抑制而减少,必然引起它种抗生物质的表达,反之亦然。在荧光假单胞菌 Pf-5 和 CHAO 中都有相似报道^[5,18]。通过相关的突变株构建及抗生物质代谢的测定和比较发现,假单胞菌 M18 具有独特的抗生物

质合成代谢相关机制。其中, 藤黄绿脓菌素零表达并不导致吩嗪-1-羧酸的过表达。在已有假单胞菌 M18 的研究表明, 一个藤黄绿脓菌素的负调控基因 *pltZ* 突变后, 使得藤黄绿脓菌素的合成量比野生株提高近 5 倍, 而吩嗪-1-羧酸的表达量却维持野生株水平不变^[12]。表明, 藤黄绿脓菌素的超量表达并不抑制吩嗪-1-羧酸的表达。由此证明, 藤黄绿脓菌素的合成代谢并不影响吩嗪-1-羧酸的合成代谢。

虽然藤黄绿脓菌素合成代谢的变化并不影响吩嗪-1-羧酸的合成代谢, 但反之(逆命题)未必成立。试验结果表明, 与野生株相比, 突变株 M18Z1 的吩嗪-1-羧酸合成量的显著降低明显促进了藤黄绿脓菌素的表达。而在突变株 M18S 的 KMB 培养基中添加一定浓度的吩嗪-1-羧酸, 导致藤黄绿脓菌素合成的抑制。由此证实, 吩嗪-1-羧酸对藤黄绿脓菌素的合成代谢具有一定的负调控作用。吩嗪-1-羧酸对藤黄绿脓菌素的影响充分展示了假单胞菌自身的次生代谢的平衡机制。为何藤黄绿脓菌素却不影响吩嗪-1-羧酸的合成代谢呢? 一种可能的解释是, 假单胞菌 M18 可能还合成另外一种或几种未被鉴定的抗生物物质或次生代谢物, 它或它们的合成与表达可能受藤黄绿脓菌素调控。此外, 我们只是初步证实藤黄绿脓菌素具有正向自诱导作用。藤黄绿脓菌素的直接作用位点或间接作用途径等命题需进一步研究加以证实。

参 考 文 献

- [1] Van Loon LC, Bakker PAHM, Pieterse CMJ. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu Rev Phytopathol*, 1998, **36**: 453 – 483.
- [2] Weller DM, Raaijmakers JM, McSpadden Gardener BB, et al. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol*, 2002, **40**: 309 – 348.
- [3] Haas D, Defago G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat Rev Microbiol*, 2005, **3**(4): 307–319.
- [4] Haas D, Keel C. Regulation of antibiotic production in root-colonizing and relevance for biological of plant disease. *Annu Rev Phytopathol*, 2003, **41**: 117–153.
- [5] Schnider-Keel U, Seematter A, Maurhofer M, et al. Autoinduction of 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and repression by the bacterial metabolites salicylate and pyoluteorin. *J Bacteriol*, 2000, **182**(5): 1215 – 1225.
- [6] Hu HB, Xu YQ, Cheng F, et al. Isolation and characterization of a new fluorescent *Pseudomonas* strain produced both phenazine 1-carboxylic acid and pyoluteorin. *J Microbiol Biotechnol*, 2005, **15**(1): 86 – 90.
- [7] Thomashow LS, Weller DM. Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *J Bacteriol*, 1988, **170**(8): 3499 – 3508.
- [8] Howell CR, Stipanovic RD. Suppression of *Pythium ultimum* induced damping-off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoluteorin. *Phytopathology*, 1980, **70**(7): 712 – 715.
- [9] Ge YH, Huang XQ, Wang SL, et al. Pyoluteorin is positively regulated and phenazine-1-carboxylic acid negatively regulated by *gacA* in *Pseudomonas* sp. M18. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, **237**(1): 41 – 47.
- [10] Blankenfeldt W, Kuzin AP, Skarina T, et al. Structure and function of the phenazine biosynthetic protein PhzF from *Pseudomonas fluorescens*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(47): 16431 – 16436.
- [11] Ausubel FM, Kingston RE, Seidman JG, et al. 精编分子生物学实验指南. 马学军, 舒跃龙, 等译. 第四版. 北京: 科学出版社, 2005.
- [12] Huang XQ, Zhu DH, Ge YH, et al. Identification and characterization of *pltZ*, a gene involved in the repression of pyoluteorin biosynthesis in *Pseudomonas* sp. M18. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, **232**(2): 197 – 202.
- [13] Schweizer HP. Small broad-host-range gentamycin resistance cassettes for site-specific insertion and deletion mutagenesis. *BioTechniques*, 1993, **15**(5): 831 – 834.
- [14] Hoang TT, Karkhoff-Schweizer RR, Kutchma AJ, et al. A broad-host-range Flp-*FRT* recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene*, 1998, **212**(1): 77 – 86.
- [15] 葛宜和, 黄显清, 王素莲, 等. 假单胞菌 *gacA* 插入突变对藤黄绿脓菌素和吩嗪-1-羧酸合成代谢的差异性调控. 微生物学报, 2004, **44**(6): 761 – 765.
- [16] Mavrodi DV, Bonsall RF, Delaney SM, et al. Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol*, 2001, **183**(21): 6454 – 6465.
- [17] Ge YH, Pei DL, Li WW, et al. Insertional mutation of the *rpoS* gene contributes to alteration in production of antifungal agents in *Pseudomonas* sp. M18. *Biol Control*, 2006, **39**(2): 186 – 192.
- [18] Brodhagen M, Henkels MD, Loper JE. Positive autoregulation and signaling properties of pyoluteorin, an antibiotic produced by the biological control organism *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**(3): 1758 – 1766.

Autoinduction of pyoluteorin and correlation between phenazine-1-carboxylic acid and pyoluteorin in *Pseudomonas* sp. M18

GE Yi-he^{1,2}, ZHAO Yan-hong², CHEN Li-juan³, MIAO Jing², WEN Lu^{1*}

(¹ Department of Biology, Huaiyin Normal University, Huaiyin 223000, China)

(² School of Life Science, Ludong University, Yantai 264025, China)

(³ Hospital, Ludong University, Yantai 264025, China)

Abstract: A new bacterium with potential biocontrol ability, *Pseudomonas* sp. M18, was isolated from the soil of agricultural field in suburb of Shanghai (China). It had been demonstrated that biosynthesis and secretion of phenazine-1-carboxylic acid and pyoluteorin in *Pseudomonas* sp. M18 contributes to its suppression of soilborne pathogens. In order to study the correlation and regulatory mechanism of two antifungal compounds biosynthesis, the mutant M18T and M18Z1 were constructed with insertion of the gentamycin resistance gene cassette (*aacC1*), respectively. With introduction of the translational fusion pMEAZ (*pltA'* - '*lacZ*') into the wild type strain M18 or the *plt*-mutant M18T, respectively, it was found that β -galactosidase activities of the mutant M18T (pMEAZ) are remarkably enhanced by adding a certain amount of pyoluteorin in KMB medium. The results indicated that pyoluteorin might positively autoinduce expression of the *plt* gene loci. In investigating the correlation of two antifungal agents, it was showed that the pyoluteorin-negative mutant M18T produces the same level of phenazine-1-carboxylic acid in comparison with the wild type strain M18. Overexpression of the *plt* gene loci does not result in decrease of phenazine-1-carboxylic acid in a *pltZ*-mutant of *Pseudomonas* sp. M18. However, the distinct decrease of phenazine-1-carboxylic acid biosynthesis does lead to enhanced biosynthesis of pyoluteorin in the mutant M18Z1. Addition of phenazine-1-carboxylic acid in KMB medium makes the mutant M18S produce less pyoluteorin. These results indicated that a special correlation of secondary antifungal agents biosynthesis seems to be existed in *Pseudomonas* sp. M18, i.e., production of pyoluteorin does not exert any influence on expression of the *phz* gene cluster, while phenazine-1-carboxylic acid makes negative impact on the biosynthesis of pyoluteorin.

Keywords: *Pseudomonas* sp. M18; biological control; pyoluteorin; phenazine-1-carboxylic acid; autoinduction

Foundation item: Jiangsu Province High Education Project for Natural Science Research (05KJB180010); Science and Technology Foundation of Ludong University (20063302)

* Corresponding author. Tel/Fax: 86-517-3525086; E-mail: ijlqgj@163.com

Received 24 August 2006/Accepted 24 November 2006/Revised 1 December 2006

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>