

生防菌 Bs-916 突变菌株 M49 芽胞形成和感受态形成能力

王晓宇, 罗楚平, 刘永锋, 刘卹洲, 聂亚锋, 陈志谊*

(江苏农业科学院植物保护研究所, 南京 210014)

摘要:生防枯草芽胞杆菌 Bs-916 (*Bacillus subtilis*) 在水稻纹枯病的防治上效果显著。应用离子注入突变对 Bs-916 进行了突变, 获得了一系列的突变菌株。其中突变菌株 M49, 其表面活性素 Surfactin 分泌量比出发菌株 Bs-916 大大降低并导致其防效降低。【目的】为了确认影响该菌株防效降低的影响因子, 对其表型和相关基因表达水平进行了研究。【方法】应用生孢培养基, 通过芽胞形成能力评测方法比较该菌株和野生菌株 Bs-916 的芽胞形成能力, 通过转化质粒的实验评测突变菌株 M49 和野生型 Bs-916 的感受态形成能力; 应用 RT-PCR (Semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain-reaction) 分析感受态形成重要的调控基因 *comS*, 影响芽胞形成的 *rapA*、*rapC* 基因的表达水平。【结果】发现二者的生长及生理有很明显的差异, 突变菌株 M49 的芽胞形成能力大大降低了, 和野生型 Bs-916 相比其芽胞数下降了约 75%。而且其转化能力也大大减弱。在相同的转化条件下, M49 转化效率下降了 90%。RT-PCR 结果显示 M49 突变菌株中未检测到 *comS*、*rapC* 基因的表达。通过基因互补获得了 *comA* 互补菌株, 其抗真菌活性恢复到和野生型相似的水平。【结论】影响表面活性素 surfactin 合成的主要因子是两个, *srfA* 操纵元启动子序列和 *comA* 基因。通过对二者的分析, 发现 *comA* 基因发生了突变。结合 M49 的芽胞形成能力和感受态形成能力均受到了严重影响, 且其芽胞形成相关基因 *rapC* 和感受态相关基因 *comS* 表达水平也大大下降的结果, 提示我们导致 M49 表型发生变化的深层分子机理是否就是由于 *comA* 基因编码的 *ComA* 蛋白发生了点突变, 从而导致 *ComA* 蛋白的生物活性发生改变, 继而影响到相关调控过程。随后 *comA* 基因互补菌株又恢复了其抗真菌活性的证据支持了我们的上述推论。

关键词:芽胞形成; 感受态; 表面活性素; 基因突变

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)10-1295-06

由立枯丝核菌属 (*Rhizoctonia solani*) 引起的水稻纹枯病是水稻三大病害之一, 其爆发流行往往使农业遭受巨大损失。随着高产、优质和杂交稻的推广种植以及氮肥水平的不断提高, 水稻纹枯病发生日趋严重, 尤其在高产稻区, 为害更加严重。我国目前对水稻纹枯病的防治完全依赖于井冈霉素, 在过去 20 多年中, 单一使用井冈霉素已使井冈霉素防治纹枯病的药量和次数不断提高。因此开拓新型替代防

治药剂和防治技术便成为水稻纹枯病防治的难点和焦点。与传统的化学农药相比, 生物农药具有对人畜和非靶标生物安全, 环境兼容性好, 不易产生抗性, 易于保护生物多样性, 来源广泛等优点。因此, 高效生物农药的开发应用对人类健康、环境保护和农业的可持续发展都有极其重要的意义。

枯草芽胞杆菌在植物病害的生物防治中得到了广泛应用, 对其防治机理的研究也日益深入。枯草

基金项目: 中国博士后科学基金(20080431108); 江苏博士后基金(0801036B)

* 通信作者。Tel: +86-25-84390393 E-mail: chzy@jaas.ac.cn

作者简介: 王晓宇(1972-), 男, 新疆人, 博士后, 主要从事分子植物病理方向的研究。E-mail: wxzy999@126.com

收稿日期: 2009-04-21; 修回日期: 2009-07-06

芽胞杆菌分泌的一类脂肽类化合物,由于具有抗真菌活性高、抑菌谱广、对人畜安全的特点,正越来越受到人们的关注。表面活性素 Surfactin 即属于该类脂肽类化合物,其化学结构为含有 7 个氨基酸和具有 13、14 或 15 个碳原子的 β -羟基脂肪酸链的大环内酯型化合物,它不仅是高活性的生物表面活性剂,同时还对多种病原菌表现抑菌活性,如抗病毒、抗支原体、抗真菌及细菌等^[1]。Bs-916 是江苏农科院植保所与国际水稻研究所在合作研究中筛选到的一株高效生防菌株,在 20 世纪 90 年代经中科院微生物所鉴定为枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)。陈志谊等对该菌株的防效进行了研究,发现 Bs-916 对纹枯病防效达 75%~85%,对稻曲病防效达 63.8~85.7%^[2-3]。为进一步提高该菌株的防效,本实验室前期对生防菌株 Bs-916 进行了离子注入突变,获得了一系列的突变菌株。其中突变菌株 H74 与出发菌株 Bs-916 相比,对水稻纹枯病的防效提高 10%~20%,对其抗病因子的分析表明表面活性素 Surfactin 是主要的抗菌物质。进一步的 HPLC 分析结果显示,H74 菌株的 Surfactin 分泌量是出发菌株 Bs-916 分泌量的 2.7 倍,这说明 Surfactin 分泌量和菌株对纹枯病的防效存在正相关。同时,另一突变菌株 M49,其 Surfactin 分泌量比出发菌株 Bs-916 大大降低并导致其防效降低^[4]。本研究试图从 M49 突变菌株的相关表型出发,为突变菌株 M49 防效降低的分子机理的阐明提供一些基础性的成果。在此情况下,我们通过对 M49 突变菌株芽胞形成和感受态形成表型的差异分析以探讨其可能的影响因子,为今后进一步的深入研究作了初步的探索。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:本研究所涉及菌株、质粒及其来源见表 1。

1.1.2 主要试剂和仪器:RNAprep 试剂盒(北京天根生化公司),DNase I(TaKaRa 公司)。

1.2 枯草芽胞杆菌感受态制备和转化方法

1.2.1 试剂配制:Sp-A(0.4 g 硫酸铵,0.2 g 磷酸二氢钾,3.66 g 三水磷酸氢二钾,加水至 100 mL);Sp-B(0.04 g 硫酸镁,加水至 100 mL),CAYE(0.1 g Casamino acid,0.5 g 酵母提取物,加水至 5 mL);Sp1(Sp-A 和 Sp-B 各 98 mL,2 mL 50% 葡萄糖,2 mL CAYE);Sp2(58.8 mL Sp1,0.6 mL 50 mmol/L CaCl₂,0.6 mL 250 mmol/L MgCl₂)。

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids

Strain or plasmid	Characteristics	Source or reference
Strains		
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	SupE44 Δ lacU169 (ϕ 80 lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1	Our lab
<i>Bacillus subtilis</i>	Wild type	Our lab
916		
<i>Bacillus subtilis</i>	Surfactin-decreased mutant	Our lab
M49		
Plasmids		
pMD18-T	T-clone site vector; Amp ^r	Takara
pDG1728	<i>amyE</i> ' ... ' <i>amyE</i> 5' and 3' segments of the <i>B. subtilis</i> 168 <i>amyE</i> gene; <i>spoVG-lacZ</i> ; <i>Spec</i> ^r ; <i>Erm</i> ^r ; <i>Amp</i> ^r	BGSC

Amp^r: ampicillin resistance; Km^r: kanamycin resistance; Erm^r, erythromycin resistance; Spec^r, spectinomycin resistance; BGSC, *Bacillus Genetic Stock Center*.

1.2.2 转化步骤:挑 Bs-916 和 M49 单菌落接种至 2.5 mL Sp1 培养基,30℃、180 r/min 振荡培养过夜。以 1:25 体积接种到新鲜的 Sp1 培养基,30℃、250 r/min 振荡培养 OD₆₀₀ 至 2.0,约 3.5 h;以 1:10 体积接种到 Sp2 培养基,37℃、150 r/min 振荡培养 1.5 h 后,以 6000 \times g 离心收集。菌体以上清液 1/10 体积进行悬浮即用作感受态细胞。在 250 μ L 感受态细胞中加入终浓度为 1 mmol/L EGTA,37℃,150 r/min 振荡培养,10 min 后加入 1 μ g DNA,37℃,150 r/min 振荡培养 1 h,再以 37℃,250 r/min 继续振荡培养 30 min。最后涂布在含相应抗生素 LB 平板上^[5]。

1.3 芽胞形成能力评测方法

芽胞染色:采用 schaeffer & Fulton 氏芽胞染色法,将枯草芽胞杆菌和突变菌株接种于芽胞形成培养基(10 mL 浓度 1.2% 的 MgSO₄,10 mL 浓度 50% 葡萄糖,100 mL 的 10 \times T base [20 g 的 (NH₄)₂SO₄,140 g 的 K₂HPO₄,60 g KH₂PO₄ 和 10 g 柠檬酸钠,加水到 1000 mL],和 20 mL 的 0.5% 谷氨酸钠,加水到 1000 mL),37℃ 下 150 r/min 振荡培养 24 h。取 1 白金耳振荡混匀的培养物混悬于 1 mL 灭菌生理盐水中,充分摇匀使成均质液。再用灭菌 0.1 mL 吸管取 1 滴在载玻片上,自然干燥,火焰固定进行芽胞染色。放大 1000 倍,油浸镜检,记录染色标率上下左右及中央 5 个视野中的芽胞数量。

1.4 RT-PCR 方法

使用 RNAprep 试剂盒提取 M49 和 Bs-916 菌株 RNA, DNase I 处理, 定量后吸取适量 RNA 加入 oligo (dT) 引物进行反转录, 反转录条件为 (42℃, 30 min)。反转录产物进行 PCR 扩增, 扩增程序为 95℃ 30 s, 52℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共进行 30 个循环; 然后 72℃ 7min; 4℃ 保持。以 16S RNA 为内参比较基因表达水平。16S RNA 见表 2, 扩增片段大小为 432 bp。

1.5 *comA* 基因和 *srfA* 操纵元启动子的扩增、克隆

根据 Bs-168 菌株 *comA* 基因和 *srfA* 操纵元启动子序列设计引物, 见表 2, 分别从 M49 和 Bs-916 基因组中进行 PCR 扩增, 扩增程序为: *comA* 基因, 95℃ 5 min; 以下条件为 30 个循环: 95℃ 30 s, 52℃ 30 s, 72℃ 30 s; 然后 72℃ 7 min, 4℃ 保持。*srfA* 操纵元启动子序列, 95℃ 5 min; 以下条件为 30 个循环: 95℃ 30 s, 55℃ 45s, 72℃ 45 s; 然后 72℃ 7 min, 4℃ 保持。PCR 产物用 TaKaRa 公司 pMD18-T 载体克隆后测序。

表 2 基因扩增所用引物

Table 2 Primer used in competence and sporulation-associated genes PCR

Gene sequence	Prime(5'→3')
<i>comA</i>	ATGAAAAAGATACTAGTGTGATG TTAAAGTACACCGTCTGATTTTC
<i>Psrfa</i>	AAAATGTCATGAAAGAATCGTTGTAAG CGCAAGATTGAAATGCTCGTGTGA
<i>comS</i>	AAGCATCTTATCAGCAGCAT TATCTACTTCTCCCTCCAGCA
<i>rapA</i>	TTCCGCATTCTATCTACTCTT TTTCGGGCTGTCCGTTTT
<i>rapC</i>	CCTTTGTGCGAGACCATA ATAGCATAACCCGAGATT
16S RNA	GCCTGTAAGACTGGGATAACT GACAACGCTTGCCACCTA

1.6 序列比对

扩增得到的 *srfA* 操纵元启动子和 *comA* 基因序列用欧洲生物信息中心(EBI, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>)网站在线多序列比对程序 ClustW 进行比对。

1.7 *comA* 基因互补菌株的获得

以 Bs-916 基因组 DNA 为模板, 扩增得到未突变全长 *comA* 基因序列(扩增引物: 上游 5'-TTA GAATTCGGGGCTTTCTGG-3'; 下游 5'-TATGGATCCT-TAAAGTACACCGTCT-3'), 将此片段和整合载体 pDG1728 分别用 *Hind* III 和 *Bam*H I 双酶切, 然后连

接转化至 DH5α, 100 mg/mL 氨苄霉素抗性平板筛选转化子后挑取阳性克隆, 进一步转化入 M49 菌株(芽胞杆菌感受态制作和转化见 1.2)。转化子用 100 mg/mL 壮观霉素抗性平板筛选。

2 结果

2.1 M49 和 Bs-916 的转化效率比较

将和 Bs-916 分别制作感受态, 将质粒 pDG1728 转化到这两个菌株中。通过抗性平板筛选转化子, 转化子平板计数后计算转化效率。结果发现突变菌株 M49 的转化效率要远远低于野生型 Bs-916 菌株, 其效率下降了 90%。

2.2 M49 和 Bs-916 的芽胞形成能力的比较

M49 和 Bs-916 在生胞培养基培养后, 进行芽胞染色镜检。结果显示 M49 的芽胞形成能力受到了严重影响, 其芽胞形成数和 Bs-916 相比约下降了 75%。

2.3 M49 和 Bs-916 的 *comS*, *rapA* 和 *rapC* 基因的表达水平分析

提取 M49 和 Bs-916 二者的总 RNA, 经反转录后进行 RT-PCR 检测, 该检测设 16S RNA 为内参基因。检测结果表明, 在 M49 中未检测到 *comS*, *rapC* 基因的表达, 而 *rapA* 基因的表达水平和 Bs-916 没有差异(图 1)。

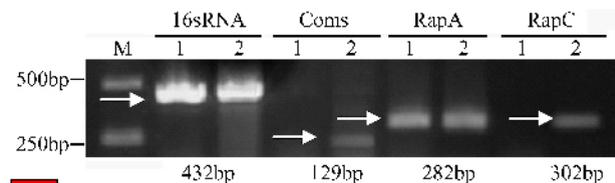


图 1 M49 和 Bs-916 的 *comS*, *rapA* 和 *rapC* 基因的表达水平分析

Fig.1 Expression of *comS*, *rapA* and *rapC* genes in M49 and Bs-916. Molecular weights of *comS* (129 bp), *rapA* (282 bp), *rapC* (302 bp), and 16S rRNA (432 bp) are shown. M. DL2000; 1. M49; 2. Bs-916.

2.4 M49 和 Bs-916 的 *comA* 基因和 *srfA* 操纵元启动子序列比对

我们提取了 M49 和 Bs-916 的基因组 DNA, 以 Bs168 的 *comA* 基因和 *srfA* 操纵元启动子序列设计引物, 扩增了 *comA* 基因和 *srfA* 操纵元启动子序列。得到的序列进行比对后发现, *srfA* 操纵元启动子序列和 Bs168 的序列同源性 100%, 且 M49 和 Bs-916 的序列无变化。Bs-916 的 *comA* 基因序列和 Bs168 的序列同源性 100%, 但 M49 的序列却有几处核苷酸发生了突变, 并且这些变异导致其编码氨基酸发

生了突变(图2)。其中在106、125、141位的氨基酸被替换。

2.5 M49的 comA 基因互补菌株的获得和抑菌活性测定

通过整合载体,将完整的 comA 基因 ORF 插入

了M49基因组DNA的 amyE 位点,得到了 comA 基因互补菌株 M49C3。对水稻纹枯病菌的抑菌活性的测试表明,该互补菌株恢复了对水稻纹枯病菌(Rhizoctonia solani)的抑菌活性,并且其抑菌圈大小和野生型 Bs-916 几乎相同(图3)。

Bs-916	MKKILVIDDHPAVMEGKTKILETDSNLSVDCLSPPEPSEQFIKQHDFFSSYDLILMDLNLGG 60
M49	MKKILVIDDHPAVMEGKTKILETDSNLSVDCLSPPEPSEQFIKQHDFFSSYDLILMDLNLGG 60
Bs-916	EVNGMELSKQILQENPHCKIIVYTGVEVEDYFEEAIRAGLHGAISSATESKEKITQYIYHV 120
M49	EVNGMELSKQILQENPHCKIIVYTGVEVEDYFEEAIRAGLHGAISSATESKEKITQYIYHV 120
Bs-916	LNGEILVDFAYFKQLMTQOKPKPAPSSQKEQDVLTPRECLILQVEVEKGFINQEIADALHL 180
M49	LNGEILVDFAYFKQLMTQOKPKPAPSSQKEQDVLTPRECLILQVEVEKGFINQEIADALHL 180
Bs-916	SKRSIEYSLTSIFNKLNVGSRTEAVLIAKSDGVL 214
M49	SKRSIEYSLTSIFNKLNVGSRTEAVLIAKSDGVL 214

图2 Bs-916 和 M49 菌株 ComA 蛋白的氨基酸序列分析。斜体加粗标注的是突变的氨基酸

Fig.2 Amino acid sequence analysis of ComA protein in Bs-916 and mutant M49 strains. Amino acid residues that are identical (*), conserved (:), similar (.), and different (boldface italic) between the wild-type strain and M49 are all indicated.

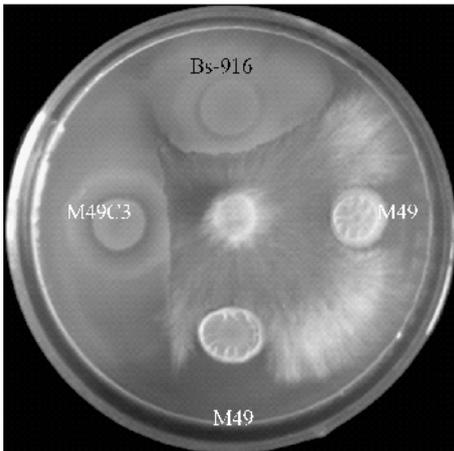


图3 野生型 Bs-916、突变菌株 M49 和 comA 基因互补菌株 M49C3 的抗真菌(Rhizoctonia solani)活性

Fig.3 Antifungal activity of wildtype Bs-916 strain, mutant M49 strain and comA complement M49C3.

3 讨论

离子注入突变菌株 M49 的表型发生了变化,其芽胞形成和感受态形成受到了严重影响。探讨这些表型变化的内在分子机理,需要从影响表面活性素,芽胞形成和感受态形成等方面加以分析。表面活性素 surfactin 是一类脂肽类化合物,其生物合成受多种因子影响。其中 Surfactin 生物合成中一个必需基因是一个长达 25 kb 的被称为 srfA 的操纵元,它负责编码催化表面活性蛋白合成的几个酶^[6-10]。SrfA

操纵元启动子序列的转录是由群体感应系统(Quorum Sensing System)所调控,其中一个重要的感应系统是 ComXQPA 系统^[11]。Michiko 等利用启动子探针载体克隆到了 srfA 操纵元的启动子,对其的突变研究表明该启动子对 srfA 的表达是必需的,同时其转录受 comA 的正向调控^[12-14]。

而影响 surfactin 生物合成的另一重要因子是 ComXQPA 系统。comA 基因编码的是枯草芽孢杆菌中一个双组分调控元中的应答调控蛋白,它和 ComP(组氨酸激酶)共同组成了一个双组分调控系统^[11,15];而 comX 编码的是含有 55 个氨基酸残基的信息素 ComX 前体物,经过 comQ 编码的 ComQ 蛋白的修饰处理后,产生了由 10 个氨基酸残基组成的具有活性的信息素 ComX^[16-17]。细胞通过一种特殊的转运系统将 ComX 分泌到胞外,随后 ComX 与跨膜的信号感应蛋白——一种组氨酸激酶(由 comP 编码)发生相互作用而激活了 ComP,使其发生自磷酸化,随后 ComP 将相应的应答调节蛋白 ComA(由 comA 编码)磷酸化,磷酸化的 ComA 和 srfA 操纵元启动子相结合,激活该操纵子的转录而产生了 ComS 蛋白;在枯草芽孢杆菌中有一种同 ComS、ClpC 蛋白和感受态转录因子 ComK 特异结合的 MecA 蛋白,MecA 同 ComK 或 ComS 结合后进一步和蛋白水解复合体 ClpC-ClpP 结合而使 ComK 或 ComS 被水解。当 MecA 和 ComS 结合后,其构象发生改变而不能有效地和

ComK 结合,从而避免 ComK 被进一步降解。因此当胞内 ComS 的浓度高时就可以显著降低 ComK 被水解的速度,ComK 可以进一步激活自身的转录而大幅度提高其浓度并使晚期感受态基因(包括与 DNA 吸附、吸收和重组的有关的基因)开始转录^[18]。同时磷酸化的 ComA 还是一种调节子,它不仅对感受态的形成起着调节作用,还参与调节其他一些与晚期生长过程有关的基因如 *degQ*、*rapA* 和 *rapC* 的表达,*degQ* 同降解酶的合成控制有关,*rapA* 和 *rapC* 编码与感受态形成和孢子形成的控制有关的磷酸酶^[19-21]。

了解了这些影响表面活性素 surfactin、芽胞形成和感受态形成的相关因子,我们扩增了 *srfA* 操纵元启动子序列和 *comA* 基因。序列分析发现,M49 的 *srfA* 操纵元启动子序列没有发生突变,而 *comA* 基因的核苷酸则有几处点突变并导致编码氨基酸变异。这一差异暗示我们,导致 M49 表型发生变化的深层分子机理是否就是由于 *comA* 基因编码的 ComA 蛋白发生了点突变,从而导致 ComA 蛋白的生物活性发生改变,继而影响到相关调控过程。从我们的初步研究结果来看,M49 的芽胞形成能力和感受态形成能力均受到了严重影响,且其芽胞形成相关基因 *rapC* 和感受态相关基因 *comS* 表达水平也大大下降。这些结果都引导我们倾向于上述推论。而当我们完整 *comA* 基因整合到 M49 后,该互补菌株又恢复了其抗真菌活性。这一证据有力的证明了我们的上述推论,而进一步研究这些突变氨基酸在 ComA 蛋白执行其生物功能时具体起何作用,比如对其磷酸化的影响,还是对转录位点的影响,都是未来进一步研究的方向。

参考文献

- [1] Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 2005, 56(4): 845 - 847.
- [2] 陈志谊,许志刚,陆凡,等.拮抗细菌 B-916 培养液对水稻纹枯病菌的抗活性及其抗菌物质的研究. *江苏农业学报*(*Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*), 2000, 16(3): 148 - 152.
- [3] 陈志谊,许志刚,陆凡,等.拮抗细菌 B-916 对水稻植株的抗性诱导作用. *西南农业学报*(*Southwest China Journal of Agricultural Sciences*), 2001, 14(2): 44 - 48.
- [4] Li D, Nie F, Wei L, et al. Screening of high-yielding biocontrol bacterium Bs-916 mutant by ion implantation. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2007, 75(6): 1401 - 1408.
- [5] 罗楚平,陈志谊,刘永锋,等.杀虫晶体蛋白基因 CryIAc 在生防菌 B-916 中的表达. *江苏农业学报*(*Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*), 2007, 23(4): 306 - 311.
- [6] Arima K, Kakinuma ATG. Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1968, 31: 488 - 494.
- [7] Kakinuma A, Hori M, Isono M, Tamura GAK. Determination of amino acid sequence in surfactin, a crystalline peptide lipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*. *Agricultural Biology and Chemistry*, 1969, 33: 971 - 972.
- [8] Hosono KSH. Acylpeptides, the inhibitors of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate phosphodiesterase. I. Purification, physicochemical properties and structures of fatty acid residues. *Journal of Antibiotics (Tokyo)*, 1983, 36: 667 - 673.
- [9] Nakano MM, Marahiel MA, Zuber P. Identification of a genetic locus required for biosynthesis of the lipopeptide antibiotic surfactin in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 1988, 170(12): 5662 - 5668.
- [10] Nakano M M, Magnuson R, Myers A, et al. *srfA* is an operon required for surfactin production, competence development, and efficient sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(5): 1770 - 1778.
- [11] Comella NGA. Conservation of genes and processes controlled by the quorum response in bacteria: characterization of genes controlled by the quorum-sensing transcription factor ComA in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 2005, 57(4): 1159 - 1174.
- [12] Bourret RB, Hess JF, Borkovich KA, et al. Protein phosphorylation in chemotaxis and two-component regulatory systems of bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 1989, 264(13): 7085 - 7088.
- [13] Stock J B, Ninfa A J, Stock A M. Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1989, 53(4): 450 - 490.
- [14] Weinrauch Y, Penchev R, Dubnau E, et al. A *Bacillus subtilis* regulatory gene product for genetic competence and sporulation resembles sensor protein members of the bacterial two-component signal-transduction systems. *Genes and Development*, 1990, 4(5): 860 - 872.
- [15] Guillen N, Weinrauch Y, Dubnau DA. Cloning and characterization of the regulatory *Bacillus subtilis* competence genes *comA* and *comB*. *Journal of Bacteriology*, 1989, 171(10): 5354 - 5361.

- [16] Ansaldi M , Marolt D , Stebe T , et al. Specific activation of the *Bacillus* quorum-sensing systems by isoprenylated pheromone variants . *Molecular Microbiology* , 2002 , 44(6) : 1561 – 1573 .
- [17] Magnuson R , Solomon J , Grossman AD. Biochemical and genetic characterization of a competence pheromone from *B. subtilis* . *Cell* , 1994 , 77(2) : 207 – 216 .
- [18] K Turgay , J Hahn , J Burghoorn ADD. Competence in *Bacillus subtilis* is controlled by regulated proteolysis of a transcription factor . *The EMBO Journal* , 1998 , 17(22) : 6730 – 6738 .
- [19] Msadek T , Kunst F , Klier A , et al. DegS-DegU and ComP-ComA modulator-effector pairs control expression of the *Bacillus subtilis* pleiotropic regulatory gene *degQ* . *Journal of Bacteriology* , 1991 , 173(7) : 2366 – 2377 .
- [20] Mueller J P , Bukusoglu G , Sonenshein A L. Transcriptional regulation of *Bacillus subtilis* glucose starvation-inducible genes : control of *gsiA* by the ComP-ComA signal transduction system . *Journal of Bacteriology* , 1992 , 174(13) : 4361 – 4373 .
- [21] Solomon J M , Lazazzera BA , Grossman AD. Purification and characterization of an extracellular peptide factor that affects two different developmental pathways in *Bacillus subtilis* . *Genes and Development* , 1996 , 10(16) : 2014 – 2024 .

Sporulation , competence development and biopesticide activity of a *Bacillus subtilis* mutant

Xiaoyu Wang , Chuping Luo , Yongfeng Liu , Youzhou Liu , Yafeng Nie , Zhiyi Chen *

(Institute of Plant Protection , Jiangsu Academy of Agricultural Sciences , Nanjing 210014 , China)

Abstract : *Bacillus subtilis* Bs-916 has obvious effects against *Rhizoctonia solani* . We demonstrated that the mutant strain , M49 obtained by means of low energy ion implantation in strain Bs-916 , which produces significantly lower levels of surfactin , had no obvious effects against *R. solani* . [**Objective**] In order to identify the influencing factors of surfactin-decrease mutant strain M49 , its phenotype and related gene expression levels were studied . [**Methods**] Strains to be tested for sporulation were grown for 24 h in sporulation medium . Plasmid pDG1728(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was used for DNA transformation to test competence development of M49 and Bs-916 strains . RT-PCR(Semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain-reaction) was used to determine the expression levels of selected genes involved in competence and sporulation in both the wildtype Bs-916 and mutant M49 strains , such as *comS* , *rapA* , *rapC* gene . [**Results**] Our data showed that mutant strain M49 confers a leaky competence phenotype , typified by a ten-fold reduction . This indicated a fact that DNA fragments are more easily transformed to wildtype strain than M49 mutant . The M49 strain also appeared to exhibit a sporulation-deficient phenotype , compared with the wild-type Bs-916 , its spore's number declined by about 75 % . RT-PCR results showed that both the *comS* and *rapC* genes were expressed in the Bs-916 strain but not in the M49 strain . [**Conclusions**] Both the *srfA* promoter and the ComP-ComA signal transduction system are an important part of the factor that results in the production of surfactin . Blast comparison of the sequences from Bs-916 and M49 indicate that there is no difference in the *srfA* operon promoter , *PsrfA* , but there are differences in the coding sequence of the *comA* gene . These differences result in three missense mutations within the M49 ComA protein . RT-PCR analyses results showed that the expression levels of selected genes involved in competence and sporulation in both the wild type Bs-916 and mutant M49 strains is significantly different . When we integrated *comA* orf into the chromosome of M49 at *amyE* locus , M49 restored antifungal activity . These data suggested that the mutation of three key amino acids in ComA greatly affected the biological activity of *Bacillus subtilis* .

Keywords : Sporulation ; competence development ; surfactin ; gene mutant

(本文责编 : 张晓丽)