

荧光假单胞菌 M18 的 *rpoS* 基因克隆及其功能分析

徐汪节 朱栋华 张雪洪 许煜泉*

(上海交通大学生命科学技术学院 上海 200240)

摘 要: 从荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens* sp.) M18 基因组中克隆了 RNA 聚合酶的稳定期 σ^s 因子编码基因 *rpoS*, 推测其氨基酸序列与铜绿假单胞菌、荧光假单胞菌和恶臭假单胞菌的同源性分别为 99.1%、87.35% 和 87.8%。利用体外定点插入突变和同源重组技术, 构建了 M18 的 *rpoS* 突变株 M18R⁻。对突变株 M18R⁻ 合成抗生素吩嗪-1-羧酸(PCA)和藤黄绿菌素(Plt)的动力学分析结果表明, 在 KB 或 PPM 培养基中, 突变株合成 PCA 的能力比野生型分别提高了 25 或 5.78 倍, 但 Plt 的积累量不受影响。与野生型相比, 突变株对碳源饥饿的耐受性下降。同时, 在碳源饥饿条件下对过氧化氢、乙醇和氯化钠等环境胁迫的交叉保护性减小, 存活率显著降低。

关键词: 荧光假单胞菌 M18, *rpoS* 突变株, 吩嗪-1-羧酸, 藤黄绿菌素, 环境胁迫

中图分类号: Q785 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-6209(2004)03-0309-06

在细菌中, RNA 聚合酶的核心酶只执行转录延伸和终止功能。核心酶结合各种不同的 σ 因子, 识别专一性的特定启动子并起始转录, 实现基因的差别性表达。*rpoS* 基因编码 σ^s , 又称为 RpoS, 是细菌进入稳定期的调控因子。大肠杆菌开始进入稳定期时, σ^s 在菌体内积累, 参与多种基因的特异性表达, 增强对外界不良环境的抗逆性和适应能力^[1]。在荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*) Pf-5 中, *rpoS* 的突变具有多重效应, 对氧胁迫的存活率降低, 次生代谢物的合成谱发生改变, 藤黄绿菌素(Pyoluteorin, Plt)和 2,4-二乙酰藤黄酚(2,4-diacetylphloroglucinol, Phl)生产过量, 硝吡咯菌素(Pyrrolnitrin, Pln)合成停止, 表明 *rpoS* 基因能同时控制胁迫反应和抗生素的合成^[2]。在恶臭假单胞菌株(*P. putida*) KT2440 中, RpoS 蛋白控制着 50 多种多肽表达, *rpoS* 突变, 在碳源饥饿胁迫下的存活率降低^[3]。在哈氏弧菌(*Vibrio harveyi*)中, *rpoS* 基因突变, 菌体在高乙醇条件下存活率下降, 但不影响对高渗透压和过氧化氢的抗逆性, RpoS 蛋白与这些环境胁迫的应答无关。各种研究表明, *rpoS* 基因在不同微生物类群中的功能具有特异性^[4]。

荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens* sp.) M18 是一株促进植物生长的根际细菌(Plant growth promoting rhizobacteria)^[5], 能合成抗生素抑制土壤中植物病原菌繁殖, 防止植物病害发生。已经查明, M18

菌株能同时产生两种不同类型的抗生素: 吩嗪-1-羧酸(PCA, 吩嗪类抗生素)和藤黄绿菌素(Plt, 聚酮类抗生素), 在迄今为止的国内外文献报道中, M18 是唯一能同时产生这两种抗生素的假单胞菌株^[6]。PCA 对小麦全蚀病菌(*Gaeamauomyces graminis* Var. tritici, Ggt)和尖镰孢菌(*Fusarium oxysporum*)具有很强的抑制作用; Plt 能有效抑制终极腐霉(*Pythium ultimum*)引起的棉花、甜菜立枯病。因此, 与其他假单胞菌株相比, M18 的代谢产物对植物病原菌具有更大的抑菌谱。

次生代谢物的合成受到环境和生理信号的调控, 深入研究 M18 合成抗生素的调控机制以及对外界环境的适应性, 对于提高 M18 的生物防治效果具有一定的理论意义和经济价值。本实验采用 PCR 技术, 从 M18 基因组中克隆了 *rpoS* 基因, 并进行测序和同源性比对分析。通过定点插入突变和同源重组方法, 构建了 *rpoS* 突变株 M18R⁻, 分析了 *rpoS* 基因突变对次生代谢物 PCA 和 Plt 的合成以及对外界环境胁迫(碳源饥饿、有机溶剂、过氧化物和渗透压)应答的可能作用。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

本实验使用的菌株和质粒列于表 1。

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目(2001BA308A02-14); 国家自然科学基金项目(30370041)

* 通讯作者。Tel: 86-21-54753347; Fax: 86-21-54743348; E-mail: xuyq@sjtu.edu.cn

作者简介: 徐汪节(1977-), 男, 安徽安庆人, 硕士研究生, 研究方向为微生物次生代谢的分子调控。

收稿日期: 2003-08-18, 修回日期: 2003-12-08

表 1 菌株和质粒
Table 1 Strains and plasmids

Strains and plasmids	Character	Source
Strains		
<i>E. coli</i> DH5α	<i>recA⁻ F⁻ endA1 gyr96 thi-1 hsdR1(Δ⁻ <i>rk⁻ mk⁺</i>)sup44 re1A1</i>	Lab. collection
<i>E. coli</i> HB101	Ap ^r Tc ^s containing pME497	Lab. collection
<i>Pseudomonas</i> sp. M18	PCA Plt producer , Ap ^r Sp ^r Km ^s	Lab. collection
<i>Pseudomonas</i> sp. M18R ⁻	PCA Plt producer ; Ap ^r Sp ^r Km ^r , <i>rpoS⁻</i>	This study
Plasmids		
pGEM-Teasy	ColE , Ap ^r	Promega
pME497	Mobilizing plasmid ,IncP-1 ,Tra RepA(Ts) , Ap ^r	D. Hass
pME3087	ColEI replicon , IncP-1-mob ,Tc ^r suicide vector ;	D. Hass
pDSK519	resource of Km resistant cassette	N.T. Keen
pM18S1	pGEM-T with a 1.0kb PCR fragment containing <i>rpoS</i> gene	This study
pM18S2	pM18S1 derivative with a Km resistant cassette in blunted <i>Bam</i> H I from pDSK519	This study
pMERpoS	pME3087 with a 2.6kb <i>Bgl</i> II fragment from pM18S2	This study

1.2 培养基和生长条件

M18 产抗生素培养基 PPM 和 KB 以及培养条件参见文献[6]。环境因子耐受性试验参见文献[3] ,基本培养基 M9 ,分别添加 1%和 10% 柠檬酸钠 ,见文献[7 ,8]。抗生素用量 :卡那霉素(Km)50μg/mL ,氨苄青霉素(Ap)100μg/mL ,庆大霉素(Gm)40μg/mL ,氯霉素(Chl)100μg/mL ,壮观霉素(Sp)100μg/mL。

1.3 工具酶和试剂

限制性内切酶、连接酶、DNA Marker 购自 MBI ,*Taq* DNA 聚合酶购于上海生工生物工程技术服务有限公司 [α-³²]P dCTP 同位素试剂盒购于 TaKaRa 公司 ,PCR 回收、胶回收、染色体 DNA 提取试剂盒购自华舜生物工程公司。

1.4 DNA 的操作技术

1.4.1 M18 菌株染色体 DNA 的提取 :按照华舜试剂盒说明书进行。

1.4.2 基因操作 :质粒 DNA 提取、DNA 酶切、电泳、胶回收和连接 ,感受态细胞制备和质粒 DNA 转化均参照文献[9] ,上海申友生物技术有限责任公司测序。

1.4.3 细菌的接合转移 :采用固相纤维滤膜杂交方法[9]。

1.4.4 M18 *rpos* 基因的克隆 :根据 GenBank 中已经公布的 *rpoS* 基因保守区域核苷酸序列设计简并引物 :5'-GGGGAGATCTATGGCWCTCARWAAAGAAG-3' ; 5'-GAATAGATCTTCACTGGAACAGCGWGTRG-3'(划线

序列为 *Bgl* II 酶切位点 ,W = A or T ,R = G or C) ,以 M18 染色体基因组 DNA 为模板 ,为了在 PCR 产物 3' 加 A ,采用 *Tth* DNA 聚合酶(*Taq* DNA 聚合酶一种) ,PCR 反应条件为 94℃ 5min ; 94℃ 30s ,55℃ 45s , 72℃ 1min ,30 个循环 ,72℃ 6min。扩增出长度约为 1.0kb 的 DNA 片段 ,经纯化 ,T-A 克隆入 pGEM-Teasy ,得重组质粒 pM18S1。

1.5 PCA 和 Plt 的制备、提取分离和定量测定

分别挑取野生型 M18 和突变株 M18R⁻ 单菌落 ,接种到 KB 培养基 ,28℃ 培养过夜 ,按 5% 的接种量分别转接至含有 150mL PPM 或 KB 培养基的三角瓶 (体积为 500mL)中 ,6 个重复 ,在 28℃ 220r/min 继续培养。隔 8h 取样 ,测 *OD*₆₀₀ 值、PCA 和 Plt 含量。PCA 和 Plt 的提取和测定 :取一定量发酵液 ,经氯仿和乙酸乙酯分别萃取 ,离心分层 ,含 PCA 的氯仿相 ,经微孔(2μm)膜过滤。含 Plt 的乙酸乙酯相真空抽干 ,溶于等量甲醇 ,再经微孔(2μm)膜过滤。各取 5μL 进样 ,经 C¹⁸ 柱 HPLC 逆向定量分析 ,具体方法见文献[6]。

2 结果

2.1 *rpoS* 基因的克隆、测序和蛋白同源性比较

根据已发表的 *rpoS* 基因保守序列 ,设计简并引物 ,从 *Pseudomonas fluorescent* sp. M18 菌株中扩增出长度为 1.0kb 的 PCR 片段 ,经测序 ,送入 NCBI 进行 Blasting ,根据核苷酸序列推测的 RpoS 蛋白含有 335

个氨基酸残基(结果未显示),与铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa* PAO1)荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)和恶臭假单胞菌(*P. putida*)的 RpoS 同源程度分别为 99.1%、87.35%和 87.8% ,与 *E. coli* 的 RpoS 同源性只有 63.6%。其 N 端的 20 个残基以及从 55 至 C 端氨基酸残基 ,与假单胞菌属内其他菌株的氨基酸序列几乎完全相同,但从 20 位氨基酸残基开始至 55 位氨基酸残基的序列与其它菌株有差异,可能表明 M18 是假单胞菌属中的一个新成员。

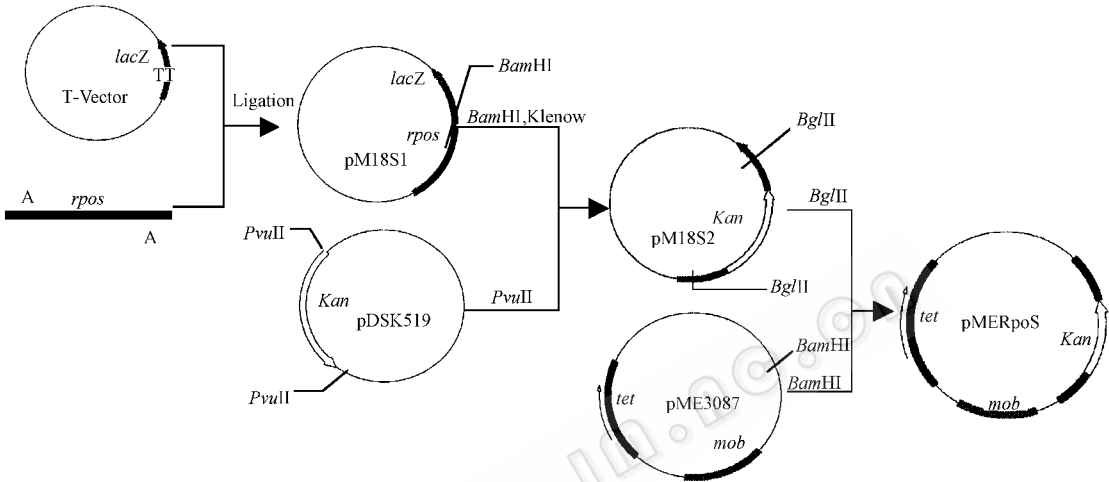


图 1 重组质粒 pM18RpoS 的构建流程图
Fig.1 Construction of recombinant plasmid of pM18RpoS

将 pMERpoS 转化 *E. coli* DH5 α ,以此为供体菌 ,在带有 pME497 *E. coli* HB101 为辅助菌的辅助下 ,与受体菌 M18 野生型菌株进行固相纤维滤膜三亲杂交。质粒 pMERpoS 转入 M18 野生型菌株 ,不能自主复制,但携带的 *rpoS* :Km 片段与 M18 菌株染色体中的 *rpoS* 基因同源重组。M18 本身抗壮观霉素(Sp)所以在含 Km 和 Sp 的 LB 平板上 ,筛选共整合重组突变株 M18S-1。然后 ,随机挑选单个菌落 ,分别点样于含 Km、Tet 和 Sp 以及仅含 Km 和 Sp 的 LB 平板诱导筛选出第二次重组的接合子。因共整合接合子含有 Tet^r 抗性基因片段 ,在第二次重组时带有 tet 的 pME3087 连同 *rpoS* 一起从接合子基因组中剔除 ,而只留下 *rpoS* :Km 片段 ,因此在含 Km 和 Sp 的 LB 对照平板上生长 ,而在含 Km ,Tet 和 Sp 的 LB 平板不能生长的菌落 ,为 M18 *rpoS* 基因的突变株 ,命名为 M18R⁻。

2.3 Southern 杂交验证突变株 M18R⁻

分别提取野生型 M18、共整合接合子 M18S-1 和 M18R⁻ 菌株的基因组 DNA ,经 *Pst* I 和 *Pvu* II 双酶切后 ,电泳 转膜。以 pM18S1 经 *Bgl* II 酶切得到近 1kb

2.2 构建荧光假单胞菌 M18 的 *rpoS* 突变株

pM18S1 经 *Bam*H I 酶切 ,用 Klenow 进行补平 ,从 pDSK519 中切出含有 Km^r 抗性基因的 *Pvu* II 片段 ,长度为 1.6kb ,与补平的线状 pM18S1 连接后 ,转化大肠杆菌 DH5 α ,筛选转化子酶切予以验证 ,阳性克隆命名为 pM18S2。pM18S2 经 *Bgl* II 酶切 ,回收 2.6kb 片段 ,克隆至自杀性质粒 pME3087 中 ,命名为 pMERpoS(图 1)。

片段作为探针([α -³²P] 随机标记 DNA 片段) ,Southern 杂交结果见图 2。泳道 1 为野生型 M18 染色体 DNA ,得到 1kb 左右片段 ,泳道 2 为共整合接合子 M18S-1 染色体 DNA ,获得 2.6kb 和 1kb 左右片段 ,而泳道 3 为 M18R⁻ 染色体 DNA ,只有一条 2.6kb 片段 ,比野生型 M18 条带长 1.6kb 左右 ,正好是 Km^r 抗性基因片段长度 ,表明 Km^r 盒已经插入 *rpoS* 基因内。

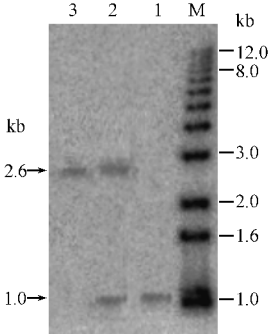


图 2 染色体经 *Pst* I 和 *Pvu* II 双酶切后的 Southern 杂交图

Fig.2 Southern blot analysis of chromosome digested with *Pst* I and *Pvu* II
1. M18 2. M18S-1 3. M18R⁻ M. Marker.

2.4 *rpoS* 基因突变对 PCA 和 Plt 生物合成的影响

将野生型 M18 和突变株 M18R⁻ 分别接种至 KB 培养液中培养过夜,然后分别放大到 PPM 和 KB 培养液中,每隔 8h 取样,分别测 OD_{600} 值、PCA 和 Plt 产量。实验结果显示,在 PPM 和 KB 两种培养基中,突变株 M18R⁻ 的 OD_{600} 值都比野生型 M18 的 OD_{600} 值低,特别是进入稳定期,差距更大,降低了 2 至 4 个 OD_{600} 单位(图 3-A)。说明无论在 PPM 或 KB 培养基中,*rpoS* 基因突变后,不利于菌体生长。

无论在 KB 还是在 PPM 培养基中,突变株 M18R⁻ 合成 PCA 的能力显著高于野生型 M18,突变

株 PCA 累积量可分别达到 166.8mg/L 和 118.3mg/L,而野生型 M18 的 PCA 产量只有 19.9mg/L 和 66.8mg/L(图 3-B),分别增加 8.3 倍和 1.76 倍。如果考虑到菌体密度的因素,以单位菌体的生产量为基础,突变株与野生型相比,在 KB 和 PPM 培养基中 PCA 的产量分别提高了 25 倍和 5.78 倍。野生型 M18 菌株和突变株 M18R⁻ 在 PPM 培养基中的 Plt 积累量均未检出,在 KB 培养基中,突变株的 Plt 产量为 41.5 mg/L,野生型产量为 110 mg/L(图 3-C),但是,以单位菌体的合成量为单位,两种菌株的 Plt 合成量差异不显著。

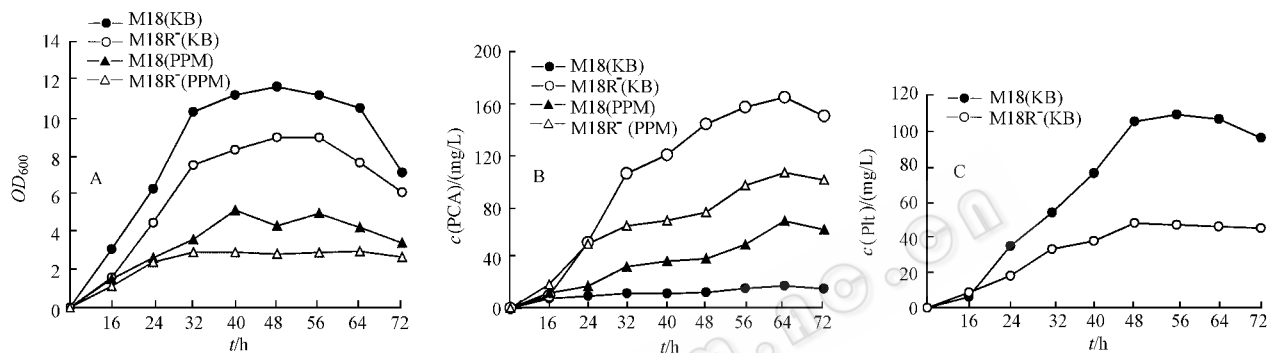


图 3 *rpoS* 突变对 PCA 和 Plt 在 M18 菌株中生物合成的影响

Fig.3 Influence of *rpoS* mutation on PCA and Plt production in M18 strain

A. Strains' growth was measured as OD_{600} ; B. PCA production; C. Plt production.

2.5 *rpoS* 基因突变影响对环境胁迫的应答

对碳源饥饿胁迫的应答。离心收集对数生长的 M18 和 M18R⁻ 菌株的细胞, M9 培养基洗涤, 再接种到添加 1mmol/L 柠檬酸钠的 M9 培养基中, 每隔 3d 取样稀释, 涂布平板计数(图 4)。接种时的菌体数都为 4.4×10^8 CFU/mL(每毫升菌悬液中菌落形成单位), 在以后的 24d 中, 突变株 M18R⁻ 的存活数明显低于野生型, 比野生菌株的存活率下降 3 个数量级。表明突变菌株 M18R⁻ 对碳源饥饿的抗逆性降低。

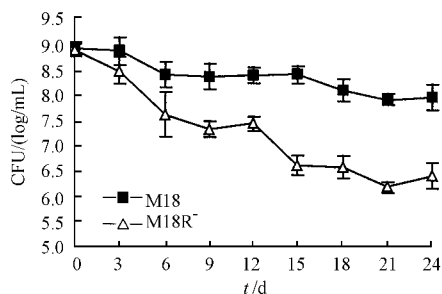


图 4 碳源饥饿条件下 *RpoS* 对菌体存活率的影响

Fig.4 Influence of *rpoS* gene on survival of M18 strains in carbon starvation

在碳源饥饿条件下, 对乙醇、过氧化氢和氯化钠

胁迫的交叉应答。收集对数生长的 M18 和 M18R⁻ 细胞, 经 M9 培养基洗涤, 再接种到添加 10mmol/L 柠檬酸钠的 M9 培养基中, 分别加入终浓度为 18 % (V/V) 乙醇、200 μ mol/L 过氧化氢和 2.4mol/L 氯化钠。定时取样, 稀释涂平板, 计算菌落(图 5)。42min 后, 突变株 M18R⁻ 在乙醇中的活菌数比野生型 M18 降低近 1000 倍, 在过氧化氢中降低近 100 倍, 突变株 M18R⁻ 的存活率大幅度地快速下降。但是, 在高浓度的氯化钠, 菌体死亡率的变化较小。以上结果表明, 在碳源饥饿条件下, *rpoS* 突变株 M18R⁻ 对有机溶剂乙醇和过氧化物的环境胁迫高度敏感, 对氯化钠高渗透压的抗逆性变化较小。

3 讨论

M18 是迄今为止在国内外文献中未见报道的一株假单胞菌菌株, 能同时合成 PCA 和 Plt 两种不同类型抗生素。通过 *rpoS* 基因的测序, 推测的氨基酸序列与其他假单胞菌株的同源性比对结果表明, 它与铜绿假单胞菌 PAO1、荧光假单胞菌株 Pf-5 和恶臭假单胞菌株 KT2440 菌株都具有高度的同源性, 说明 M18 可能是假单胞菌属中的一个新成员, 它的分类

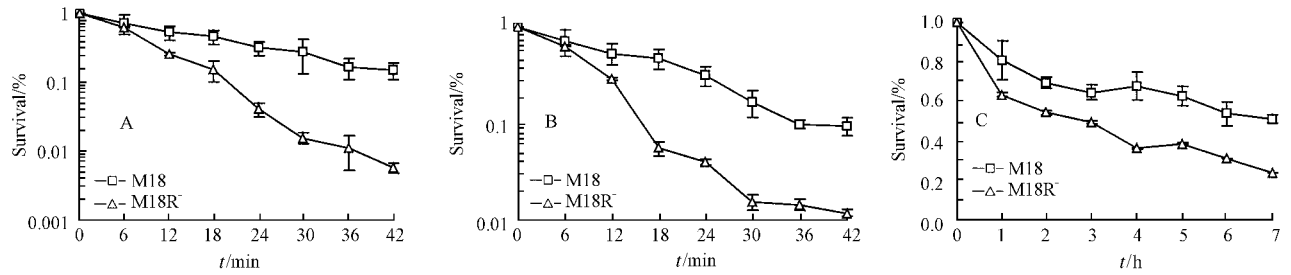


图 5 在 3 种胁迫条件下 M18 菌株和突变株 M18R⁻ 菌株对环境胁迫的耐受性

Fig.5 Effect of various environment stresses on survival of the M18 and M18R⁻ strain

A. Challenging with 18% (V/V) ethanol .B. Challenging with 200μmol/L H₂O₂ .C. Challenging with 2.4 mol/L NaCl. Viable counts present in each of the pre-challenge samples (time zero) were normalized to 1. Survival was determined as relative viable counts.

地位可能与铜绿假单胞菌和荧光假单胞菌都比较接近。

rpoS 基因的突变对稳定期细胞的抗生素合成以及对环境胁迫的抗逆作用具有多重效应^[10,11]。在大肠杆菌和荧光假单胞菌中,细胞内的 σ^{70}/σ^s 比值受到精密的调控,随着细菌进入稳定期, σ^s 开始积累, σ^{70}/σ^s 比值下降, σ^s 与持家因子 σ^{70} 竞争性地与 RNA 聚合酶结合,使一些依赖于 σ^s 因子的基因表达^[10]。在 M18 菌株中, *rpoD* 基因的过量表达,能够同时增加 PCA 和 Plt 的生物合成^[6]。本研究结果表明, *rpoS* 基因的突变,能提高 PCA 生物合成的能力,但 Plt 的合成不受影响,表明高浓度的 σ^{70} 以及高比值的 σ^{70}/σ^s 都能促进 PCA 合成的基因簇的表达;但是, *rpoS* 突变并不促进 Plt 的合成,可能表明 RpoD 能直接参与 Plt 基因的表达,但是, *rpoS* 基因的编码产物可能并不直接参与 Plt 基因的表达。RpoS 可能区别性地影响各种抗生素编码基因的表达。

RpoS 因子对细菌进入稳定期时的次生代谢物的合成以及增强对环境胁迫的抗逆能力起着重要的作用,但是在不同的细菌类群中,具体实施的功能并不相同,存在着一定的差异性。在 *E. coli* 和 *P. fluorescens* Pf-5 等菌株中的 *rpoS* 突变都会导致对环境胁迫的抗逆性下降^[12,13]。在本实验中, M18 菌株中 *rpoS* 突变表出现对碳源饥饿、有机物和过氧化物、高渗透压抗逆性降低。在哈氏弧菌(*Vibrio harveyi*)中, *rpoS* 基因突变,菌体在高乙醇条件下的存活率下降,但对高渗透压和过氧化氢的抗逆性不受影响, RpoS 蛋白与这些环境胁迫的应答无关,表明 *rpoS* 基因在不同微生物类群中的功能不完全相同^[4]。推测 RpoS 因子激活若干依赖于 σ^s 因子的基因,这些基因的编码物对外界胁迫具有交叉保护作用。在不同细菌群体中, RpoS 因子激活的基因不同,这些基因的表达量不同,产生了菌体对不同的胁迫因子的敏感

程度差异。也可能 RpoS 因子与 RpoD、GacA/GacS 以及菌群传感(Quorum sensing)系统的分子网络间存在错综复杂的调控关系。对这种复杂的关系性,有待于进一步阐明。

参 考 文 献

[1] Hengge-Aronis R. Back to log phase : sigma S as a global regulator in the osmotic control of gene expression in *Escherichia coli* . *Mol Microbiol* , 1996 , **21** : 887 – 893 .

[2] Samiguet A , Kraus J , Loper J E , et al . The sigma factor σ^s affects antibiotic production and biological control activity of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 . *Proc Natl Acad Sci USA* , 1995 , **92** : 12255 – 12259 .

[3] Ramos-Gonzalez M I , Molin S. Cloning , sequencing and phenotypic characterization of the *rpoS* gene from *Pseudomonas putida* KT2440 . *Journal of Bacteriology* , 1998 , **180**(13) 3421 – 3431 .

[4] Lin Y H , Miyamoto C , Meighen E A. Cloning , sequencing and functional studies of the *rpoS* gene from *Vibrio harveri* . *Biochim Biophys Research Communi* 2002 , **293** : 456 – 462 .

[5] 许煜泉 ,唐玮宁 ,郑有丽 ,等. 筛选假单胞菌株 M18 防治大棚黄瓜枯萎病害. 上海交通大学报, 1999 , **33**(2) 210 – 213 .

[6] 朱栋华 ,徐汪节 ,许煜泉 ,等. 荧光假单胞菌株 M18 *rpoD* 克隆及其对抗生素合成的影响. 微生物学报, 2003 , **43**(3) 315 – 323 .

[7] Morita R Y. Bioavailability of energy and the starvation state. In : Kjelleberg S. Starvation in bacteria. New York : Plenum Press , 1993 , 1 – 23 .

[8] Williams M D , Ouyang T X , Flickinger M C. Starvation-induced expression of SspA and SspB : the effects of a null mutation in sspA on *Escherichia coli* protein synthesis and survival during growth and prolonged starvation. *Mol Microbiology* , 1994 , **11** : 1029 – 1043 .

[9] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁 ,黎孟枫 ,等译. 第三版. 北京 : 科学出版社 , 1999 .

[10] Fujita M , Tannaka K , Takahashi H , et al . Transcription of the principal sigma-factor genes , *rpoD* and *rpoS* , in *Pseudomonas aeruginosa* is controlled according to the growth phase . *Molecular Microbiology* , 1994 , **13** : 1071 – 1077 .

- [11] Whiteley M , Parsek M R , Greenberg E P . Regulation of quorum sensing by RpoS in *Pseudomonas aeruginosa* . *Journal of Bacteriology* , 2000 , **182** (15) : 4356 – 4360 .
- [12] Kolter R , Siegele D A , Tormo A . The stationary phase of the bacterial life cycle . *Annu Rev Microbio* , 1993 **47** : 855 – 874 .
- [13] Loewen P C , Hengge-Aronis R . The role of the sigma factor sigma S (katF) in bacterial global regulation . *Annu Rev Microbio* , 1994 **48** : 53 – 80 .

Cloning , Sequencing and Functional Studies of *rpoS* Gene from *Pseudomonas Fluorescent* sp. M18

XU Wang-Jie ZHU Dong-Hua ZHANG Xue-Hong XU Yu-Quan *

(School of Life Science and Biotechnology , Shanghai JiaoTong University , Shanghai 200240 , China)

Abstract : The *rpoS* gene encoding the stationary phase sigma factor σ^s from fluorescent *Pseudomonas* sp. M18 was cloned and sequenced. The deduced RpoS protein of M18 strain showed 99.1%、87.35% and 87.7% identity with that of *Pseudomonas aeruginosa* , *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* respectively but only 63.6% identity with that of *E. coli* . The *rpoS* gene was inactivated by inserting a Km cassette at the site of blunted *Bam*H I *in vitro* and then the resulting reconstruct was introduced into the M18 genome using homologous recombination technique to obtain the null mutant M18R⁻ . Several pleiotropic effects of *rpoS*⁻ mutation in M18R⁻ were observed. The M18R⁻ could overproduce phenazine-1-carboxylic acid 25 and 5 fold more in KB and PPM medium respectively but produce the same amount of pyoluteorin in KB medium in comparison with the wild type strain M18. The M18R⁻ also showed reduced survival of carbon starvation and cross-protection against other types of stress in cells starved for carbon , in particular after a challenge with ethanol and hydrogen peroxide.

Key words : *Pseudomonas* sp. M18 , *rpoS*-mutant , Phenazine-1-carboxic acid , Pyoluteorin

Foundation item : The 10th Five Year Program of Chinese National Science and Technology Development (2001BA 308A02-14) ; Chinese National Natural Science Foundation (30370041)

* Corresponding author . Tel : 86-21-54743347 ; Fax ; 86-21-54743348 ; E-mail : xuyq@sjtu.edu.cn

Received date 08-18-2003

第五届世界食用菌生物学及产品大会将于 2005 年在上海召开

“世界食用菌生物学及产品大会”(以下简称大会)是由世界食用菌生物学及产品学会(简称WSMBMP)主办的世界食用菌大会,内容涉及食用菌生理生化、分子生物学、遗传育种、分类、病虫害防治、栽培技术、菌种制备、营养及药用成分的研发、食品安全及质量控制、产品开发、市场贸易等各个领域。每三年召开一次,前四届已分别在香港、美国、澳大利亚和墨西哥举行。第五届世界食用菌生物学及产品大会将在我国召开,这也是世界食用菌大会首次在中国举行。

第五届大会由WSMBMP和上海市农业科学院主办,中国食用菌协会、中国菌物学会、中国农学会食用菌分会、上海对外科技交流中心协办。大会拟定于2005年4月8日至12日在上海召开,历时5天,有专题演讲、学术讨论、海报展示、产品展览、参观考察等多项内容。欢迎国内外对食用菌生产、研究、开发、贸易有兴趣的单位或个人参加本届大会。

欲知详情,请与大会组委会秘书处联系。

电话 86-21-52630034、86-21-52630137、86-21-62201337,或登录 www.sh-mushroom.com。