

抗生素 2,4-二乙酰基间苯三酚作为荧光假单胞菌 2P24 菌株 生防功能因子的实证分析

魏海雷 周洪友 张力群* 王 焯 唐文华

(中国农业大学植物病理系 北京 100094)

摘 要 荧光假单胞杆菌 2P24 菌株分离自小麦全蚀病自然衰退土壤,它是酚类抗生素 2,4-二乙酰基间苯三酚(2,4-DAPG)的高产菌,对多种土传病害具有较好的防治能力。利用同源重组构建 2,4-DAPG 合成基因的定位突变体,并对突变体进行基因互补,通过检测突变菌株和恢复突变菌株抗生素产量和生防效果确定 2,4-DAPG 在菌株 2P24 生防功能中的作用。实验中,定位突变体丧失产生抗生素和拮抗病原菌的能力,而恢复突变体的抗生素产量和拮抗能力均恢复至野生菌水平。在对番茄青枯病的防病试验中,2,4-DAPG 突变体的防效低且下降快,而恢复突变体的生防能力与野生菌相当,且效果稳定。由此可确定 2,4-DAPG 是菌株 2P24 防治番茄青枯病的主要因子,在防效上起关键作用。

关键词 生物防治, 2,4-二乙酰基间苯三酚, 荧光假单胞杆菌, 番茄青枯病

中图分类号 S476 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(2004)05-0663-04

假单胞菌(*Pseudomonas* spp.)用于植物病害的生物防治已有许多报道,不同菌株的生防机理不尽相同,其中生防微生物的次生代谢产物对保护植物免受病原物侵染起重要作用。在许多生防系统中,产生抗生素被证实是生防菌抵抗病原菌的重要机制^[1]。例如许多生防荧光假单胞杆菌(*Pseudomonas fluorescens*)产生的酚类抗生素 2,4-二乙酰基间苯三酚(2,4-Diacetylphloroglucinol, 2,4-DAPG, PhI)^[2],由于它对多种植物病原真菌、细菌、线虫具有抑制或杀死作用,因而近年来已成为众多植物病理学者研究的对象。*P. fluorescens* CPF-10 是一株防治土传病害的高效生防菌株,其 2,4-DAPG 合成基因已被克隆、测序[^]。核苷酸分析表明该序列与 *P. fluorescens* CHA0 和 F113 的 2,4-DAPG 合成基因簇相似,其中结构基因 *phlACBD* 作为一个操纵子负责合成 2,4-DAPG 及其前体;*phlE* 可能与 2,4-DAPG 输出细胞有关;*phlF* 基因位于 2,4-DAPG 合成基因簇的上游,它与许多微生物的转录抑制基因具有较高的同源性^[3]。这种 2,4-DAPG 合成基因结构与许多聚酮类化合物合成基因簇非常相似^[4]。

生防菌 *P. fluorescens* 2P24 分离自山东麦田全蚀病自然衰退(Take-all decline, TAD)土壤,它是一

株对小麦全蚀病、棉花立枯病、番茄青枯病都具有显著防效的生防菌^[5,7]。该菌株可产生 2,4-DAPG、HCN、嗜铁素、蛋白酶等次生抗菌物质^[5],但各相关因子在菌株 2P24 生防中的作用还未知,本文通过遗传学方法确定抗生素 2,4-DAPG 在菌株 *P. fluorescens* 2P24 生防功能中的作用。

1 材料和方法

1.1 菌株、质粒和培养条件

本实验所用菌株和质粒见表 1。培养条件参照文献[5]。三亲杂交后在 M9 培养基上筛选转化子。相应的抗性质粒所用抗生素浓度分别为:氯霉素 50 μ g/mL,卡那霉素 50 μ g/mL,氯霉素 20 μ g/mL,四环素 20 μ g/mL。

1.2 DNA 操作和序列分析

DNA 操作参照文献[6]。克隆片段由上海申友生物技术有限责任公司测序。采用 BLAST 对序列进行同源性分析。硅胶板(GF254)购自青岛海洋化工厂。

1.3 构建 2,4-DAPG 定位突变体

以 2P24 基因组 DNA 为模板,*Phl2a* (5'-GAG-GACGTCGAAGACCACCA-3')和 *Phl2b* (5'-ACCGCAG-

基金项目 国家自然科学基金项目(30100120,30370952)

* 通讯作者 Tel: 86-10-62893037; Fax: 86-10-62891464; E-mail: zhanglq@cau.edu.cn

作者简介 魏海雷(1979-)男,山东博兴人,硕士研究生,研究方向为植物病害生物防治与细菌分子生物学。

收稿日期 2003-12-19,修回日期 2004-04-23

^王 焯. 产抗生素 2,4-diacetylphloroglucinol (PhI) 荧光假单胞菌的分离、鉴定及 PhI 合成基因的克隆. 中国农业大学博士论文, 2001.

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids

| Strains or plasmids | Characteristics | Source |
|--------------------------------------|--|----------------|
| Strains | | |
| <i>P. fluorescens</i> | | |
| 2P24 | 2 <i>A</i> -DAPG ⁺ , Ap ^r , wild type | 5 |
| 2P24MP | 2 <i>A</i> -DAPG ⁻ , Ap ^r , Km ^r | This study |
| 2P24MP-ME | 2 <i>A</i> -DAPG ⁻ , Ap ^r , Km ^r , Tcr, 2P24MP containing pME6032 | This study |
| 2P24-P | 2 <i>A</i> -DAPG ⁺ , Ap ^r , Km ^r , Tc ^r , 2P24MP containing pME-84 | This study |
| <i>Gaeumannomyces graminis</i> | Fungal pathogen caused wheat take-all | Lab collection |
| <i>Ralstonia solanacearum</i> | Bacterial pathogen caused tomato bacterial wilt | Lab collection |
| <i>Rhizoctonia solani</i> | Fungal pathogen caused cotton damping-off | Lab collection |
| <i>Escherichia coli</i> DH5 α | ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>hsdR17 recA1 endA1 thi-1</i> | 6 |
| Plasmids | | |
| pMD18-T | Ap ^r , ColE1 origin, T-vector | TaKaRa |
| pBluescript II SK+ | Ap ^r , ColE1 origin | Stratagene |
| pMDHL | Ap ^r , pMD18-T with 0.75 kb fragment of <i>phlD</i> | This study |
| pHSG299 | Km ^r , ColE1 origin | TaKaRa |
| p299HL | Km ^r , pHSG299 with 0.75 kb <i>Pst</i> I - <i>Eco</i> R I <i>phlD</i> fragment from pMDHL | This study |
| p415-12 | Tc ^r , pRK415 with 10.8 kb <i>Bam</i> H I fragment expressing <i>phlACBDE</i> from <i>P. fluorescens</i> CPF-10 | Δ |
| pBS-84 | Ap ^r , pBluescript with 8.4 kb <i>Bam</i> H I - <i>Cla</i> I fragment from p415-12 | This study |
| pME6032 | Tc ^r , <i>lacI</i> q-Ptac expression vector | 8 |
| pME-84 | Tc ^r , pME6032 with 8.4 kb <i>Bam</i> H I - <i>Xho</i> I fragment from pBS-84 | This study |
| pRK600 | Cm ^r , ColE1 RK2-Mob ⁺ RK2-Tra ⁺ , helper plasmid | 9 |

Ap^r, Km^r, Cm^r, and Tc^r indicate resistance to ampicillin, kanamycin, chloramphenicol and tetracycline, respectively.

CATCGTGTATGAG-3')¹⁰¹为引物扩增 2 *A*-DAPG 合成基因片段。PCR 反应程序 94℃ 5min, 94℃ 40s, 65℃ 40s, 72℃ 1min, 35 个循环, 72℃ 10min。扩增产物用 Omega E.Z.N.A[®] Gel Extraction Kit (D2501-01) 回收后连接质粒 pMD18-T 构建载体 pMDHL。对质粒所连片段测序并通过同源性比较确定 PCR 扩增片段的正确性。用 *Pst* I 与 *Eco*R I 双酶切 pMDHL 将酶切片段连接质粒 pHSG299 建成自杀载体 p299HL。

将自杀载体 p299HL 电击转化野生菌 *P. fluorescens* 2P24, 在添加卡那霉素的 LB 平板上筛选转化子。电击转化条件为: 电压 2.5kV, 电容 2.5 μ F, 电阻 300 Ω 。电击仪为 Bio-Rad Gene pulser[®] II。

1.4 定位突变体的基因互补

亚克隆含 2 *A*-DAPG 合成基因簇的质粒 p415-12。用 *Bam*H I 和 *Cla* I 双酶切 p415-12, 将 8.4 kb 大片段连接相应酶切的质粒 pBluescript II SK+, 定名为 pBS-84。用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切 pBS-84, 将大片段接入 *Bgl* II 与 *Xho* I 消化过的 pME6032, 定名为 pME-84。利用助手质粒 pRK600, 通过三亲杂交^[7]分别将穿梭质粒 pME-84 和 pME6032 从 DH5 α 转入突变菌 2P24MP。

1.5 抗生素 2 *A*-DAPG 的检测

操作方法参照文献 [5]。

1.6 对病原真菌、细菌的平板拮抗作用

分别以小麦全蚀菌(*Gaeumannomyces graminis*)、

棉花立枯菌(*Rhizoctonia solani*)和番茄青枯菌(*Ralstonia solanacearum*)为拮抗对象, 检测 2P24 及其衍生菌的拮抗能力, 具体方法参照文献 [5]。

1.7 温室防治番茄青枯病试验

操作方法参照文献 [5]。

2 结果和分析

2.1 抗生素 2 *A*-DAPG 突变体和恢复突变体构建

以 *Phl*2a 和 *Phl*2b 为引物扩增 2P24 基因组可得到 745 bp 的片段, 基因库比对结果显示此片段与多个已发表的 *phlD* 基因同源性高达 99%, 因此确定此片段属于 2 *A*-DAPG 合成基因序列。将含有该片段的自杀质粒 p299HL 转入菌株 2P24, 由于同源重组, 质粒 p299HL 整合到 2P24 染色体上, 造成 2 *A*-DAPG 合成基因的插入突变, 从而可以得到抗卡那霉素的定位突变体 2P24MP。

重组质粒 p415-12 的 *Bam*H I 位点所接入是一段 10.8 kb 的包含 2 *A*-DAPG 合成基因簇的功能片段, 此 DNA 片段来自菌株 2P24 的近源菌 *P. fluorescens* CPF-10^Δ。本实验对质粒 p415-12 上的大片段进行亚克隆, 得到 8.4 kb 含有完整的 *phlACBDE* 的功能性片段, 将此片段正向接入带有强启动子的穿梭载体 pME6032, 转化 2 *A*-DAPG 突变菌株 2P24MP, 得到互补突变菌株 2P24-P。

2.2 抗生素 2,4-DAPG 的检测

以抗生素 2,4-DAPG 标样为参照,将 2P24 及其衍生菌株的抽提物在硅胶薄层层析板上展开(图 1)。突变菌 2P24MP-ME 泳道没有可检测的抗生素 2,4-DAPG,而野生菌株 2P24 与互补菌株 2P24-P 均可产生 2,4-DAPG。由此说明自杀载体 p_{299HL} 转化野生菌 2P24 后造成了 2,4-DAPG 合成基因的插入突变,质粒 pME-84 能够使突变体恢复产生抗生素 2,4-DAPG 的能力。

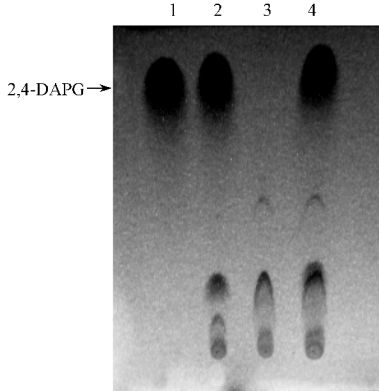


图 1 薄层层析(TLC)检测假单胞菌株 2P24 及其衍生菌株的 2,4-DAPG 产生情况

Fig.1 TLC analysis of 2,4-DAPG production of *P. fluorescens* 2P24 and its derivatives

1. Sample of 2,4-DAPG ; 2. 2P24 ; 3. 2P24MP-ME ; 4. 2P24-P.

2.3 拮抗测定

试验条件下抗生素 2,4-DAPG 突变体 2P24MP-ME 对供试 3 种病原菌都失去拮抗作用,而野生菌 2P24 与互补突变体 2P24-P 对供试病原菌均表现出较强的拮抗作用,且 2P24-P 的拮抗能力较野生菌略强(表 2),说明抗生素 2,4-DAPG 在 *P. fluorescens* 2P24 拮抗病原菌的过程中起主要作用。

表 2 假单胞菌株 2P24 及其衍生菌株对病原菌的拮抗能力

Table 2 Antagonistic ability of *P. fluorescens* 2P24 and its derivatives

| Pathogens | Antagonistic zone of no pathogen growth/mm | | |
|--------------------------------|--|-----------|-----------|
| | 2P24 | 2P24MP-ME | 2P24-P |
| <i>Gaeumannomyces graminis</i> | 8.5 ± 0.4 | 0 | 8.8 ± 0.3 |
| <i>Rhizoctonia solani</i> | 8.0 ± 0.2 | 0 | 8.4 ± 0.2 |
| <i>Ralstonia solanacearum</i> | 7.2 ± 0.1 | 0 | 7.5 ± 0.2 |

Data are averages of three repeats.

2.4 温室生测效果

温室盆栽试验中,接种番茄青枯菌 5d 后开始出现发病植株。从病情指数上看(表 3),第 10d 病对照的病情指数达到 62.5,2,4-DAPG 突变菌处理的病情指数达 46.7,而野生菌处理和互补菌处理的病指均低于 25。第 16d 的调查显示,2,4-DAPG 突变菌处理的病情指数为 70.5,接近于病对照处理,而

野生菌处理和互补菌处理的病情指数在 30 左右,显著低于病对照和 2,4-DAPG 突变菌处理。从防效上看(表 3),野生菌和 2,4-DAPG 互补菌对番茄青枯病的防效均达到 60% 以上,且较稳定。而 2,4-DAPG 突变菌的防效较野生菌显著降低,不足 20%,且下降较快。由此可见,抗生素 2,4-DAPG 是菌株 2P24 的重要生防因子。

表 3 假单胞菌株 2P24 及其突变菌株对番茄青枯病的防治效果

Table 3 Control efficiency of *P. fluorescens* 2P24 and its derivate mutants on tomato bacterial wilt

| Treatments | Disease index | | Control efficiency/% | |
|-----------------|---------------|-------|----------------------|-------|
| | 10 d | 16 d | 10 d | 16 d |
| Disease control | 62.5a | 84.6a | — | — |
| 2P24 | 24.6c | 32.9c | 60.8a | 61.6a |
| 2P24MP-ME | 46.7b | 70.5b | 25.4b | 16.8b |
| 2P24-P | 22.5c | 30.0c | 64.1a | 64.5a |

Data followed by different letters in the same column mean significant difference at 0.05 level.

3 讨论

随着分子生物学技术在植物病害生防机制研究中的应用,微生物之间的拮抗作用成为生防机理研究中最清楚的部分。一般来说,与野生生防菌株相比,如果抗生素产生能力降低或丧失的突变菌株的抑菌和防病能力大大降低,恢复突变后,抑制病菌和防病能力又能够随之恢复,则认为该菌产生的抗生素对病害防治起关键性作用^[12]。本研究即利用分子遗传学手段证明抗生素 2,4-DAPG 在菌株 2P24 生防功能中的作用。

对已发表的 2,4-DAPG 合成基因分析发现,其同源性非常高,几个转录单元的氨基酸序列同源性都高于 85%,尤其 *PhlD* 更为保守。*Phl2a* 和 *Phl2b* 就是在 *phlD* 上设计的特异性引物。该引物可用于筛选 *Phl* 产生菌,它对于已采集到的全世界范围内 *Phl* 产生菌是保守的^[12]。本研究利用此引物从菌株 2P24 中克隆到 *phlD* 片段,并通过同源重组构建菌株 2P24 的 *phlD* 插入突变体。由于 *phlD* 负责合成 2,4-DAPG 的前体,因此该突变菌株将直接影响到 2,4-DAPG 的产生。对菌株 2P24 及其突变菌株的抑菌能力进行检测后发现,2,4-DAPG 突变菌株失去拮抗病原菌的能力,而恢复突变后又重新获得拮抗能力,充分说明抗生素 2,4-DAPG 是生防菌 2P24 拮抗病原菌的主要因子。在对番茄青枯病的防病试验中,2,4-DAPG 突变菌的防效显著低于野生菌和互补菌,且在短时间内迅速下降,由此可以证明抗生素 2,4-DAPG 在生防菌 2P24 防病过程中起关键作用。

但实验中同样发现 2 A-DAPG 突变菌并没有完全丧失生防能力,在接种病原菌后的第 10d 和第 16d,突变菌株仍分别具有 25.4% 和 18.6% 的防效,说明抗生素 2 A-DAPG 并不是生防菌 2P24 发挥生防功能的唯一因素。其原因可能与其他生防因子如氢氰酸、嗜铁素、蛋白酶等有关,也可能与营养的竞争和在根围的定殖有关。实验中发现,虽然 2 A-DAPG 的突变对氢氰酸和蛋白酶的产生无明显影响,但突变体的嗜铁素产量明显升高。虽然目前还没有证据说明 2 A-DAPG 与嗜铁素之间的关系,但作为一种产量较大的次生代谢产物,2 A-DAPG 的缺失必然会影响到物质和能量的代谢。这种影响是否触及到宿主菌的生长、定殖以及对环境的适应能力尚需进一步研究证实。

参 考 文 献

- [1] Haas D, Keel C. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu Rev Phytopathol*, 2003, **41**: 117 - 153.
- [2] Keel C, Schneider U, Maurhofer M, et al. Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: importance of the bacterial secondary metabolite 2 A-diacetylphloroglucinol. *Mol Plant Microbe Interact*, 1992, **5**: 4 - 13.
- [3] Abbas A, Morrissey J P, Marquez P C, et al. Characterization of interactions between the transcriptional repressor PhlF and its binding

- site at the *phlA* promoter in *Pseudomonas fluorescens* F113. *J Bacteriol*, 2002, **184**: 3008 - 3016.
- [4] Bender C L, Rangaswamy V, Loper J. Polyketide production by plant-associated *Pseudomonas*. *Ann Rev Phytopathol*, 1999, **37**: 175 - 196.
- [5] 魏海雷,王 焯,张力群,等. 生防菌株 2P24 和 CPF-10 的鉴定及其生防相关性状的初步分析. *植物病理学报*, 2004, **34** (1): 80 - 85.
- [6] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [7] 闫小雪,张力群,杨之为,等. 调控基因 *gacA* 在荧光假单胞菌 2P24 防治土传病害中的作用. *植物病理学报*, 2004, **34** (3): 272 - 279.
- [8] Heeb S, Blumer C, Haas D. Regulatory RNA as mediator in GacA/RsmA-dependent global control of exoproduct formation in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J Bacteriol*, 2002, **184**: 1046 - 1056.
- [9] De Lorenzo V, Timmis K N. Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol*, 1994, **235**: 386 - 405.
- [10] Raaijmakers J M, Weller D M, Tomashow L S. Frequency of antibiotic producing *Pseudomonas* spp. in natural environment. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**: 881 - 887.
- [11] King E O, Ward M K, Raney D E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J Lab Clin Med*, 1954, **44**: 301 - 307.
- [12] Lam S T, Graffney T D. *Biological activities of bacteria used in plant pathogens control*. Biotechnology in Plant Diseases Control. Chet I. ed. New York: Wiley-Interscience, 1993, 291.

Experimental Evidence on The Functional Agent of 2 A-diacetylphloroglucinol in Biocontrol Activity of *Pseudomonas fluorescens* 2P24

WEI Hai-Lei ZHOU Hong-You ZHANG Li-Qun* WANG Ye TANG Wen-Hua

(Department of Plant Pathology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: *Pseudomonas fluorescens* 2P24, a plant disease biocontrol agent isolated from wheat take-all decline soil, is characterized with efficient production of antibiotic 2 A-diacetylphloroglucinol (2 A-DAPG). In this study, the 2 A-DAPG was investigated as a functional agent in antibiosis and biocontrol activity using genetic methods. A 2 A-DAPG negative mutant of *P. fluorescens* 2P24, named 2P24MP-ME, was constructed through site-directed mutagenesis. The mutant was unable to inhibit the growth of plant pathogens *Gaeumannomyces graminis*, *Rhizoctonia solani* and *Ralstonia solanacearum* in Petri dish and to control the development of tomato bacterial wilt in greenhouse. A plasmid-bearing 2 A-DAPG biosynthetic locus inserted into 2P24MP-ME resulted in a complemented strain 2P24-P. The restored 2 A-DAPG production and strong antibiosis against the phytopathogens were observed in the 2P24-P. Moreover, the efficacy of the 2P24-P for control of tomato bacterial wilt was also recovered to the level of the wild type in the greenhouse. The results indicate that the 2 A-DAPG was one of the key biocontrol factors in *P. fluorescens* 2P24 and played an important role in controlling tomato bacterial wilt.

Key words: Biological control, 2 A-diacetylphloroglucinol, *Pseudomonas fluorescens*, Tomato bacterial wilt

Foundation item: Chinese National Natural Science Foundation(30100120, 30370952)

* Corresponding author. Tel: 86-10-62893037; Fax: 86-10-62891464; E-mail: zhanglq@cau.edu.cn

Received date: 12-19-2003