



CbrB 在防御假单胞菌 Pf-5 生物防治中的作用

饶光耀¹, 万成², 石红璆², 董小林^{1*}, 查代明^{2*}

1 长江大学 农学院, 农业农村部长江中游作物绿色高效生产重点实验室(部省共建), 湖北 荆州 434025

2 九江学院 药学与生命科学学院, 江西 九江 332005

饶光耀, 万成, 石红璆, 董小林, 查代明. CbrB 在防御假单胞菌 Pf-5 生物防治中的作用[J]. 微生物学报, 2024, 64(9): 3506-3520.
RAO Guangyao, WAN Cheng, SHI Hongqiu, DONG Xiaolin, ZHA Daiming. Role of CbrB in the biocontrol strain *Pseudomonas protegens* Pf-5[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(9): 3506-3520.

摘要:【目的】从基因水平探究碳分解代谢阻遏调控系统中 CbrB 对防御假单胞菌(*Pseudomonas protegens*) Pf-5 生物防治能力的影响。【方法】通过基于 pJQ200SK 的二次同源重组法构建 *cbrB* 编码区无痕缺失突变菌株 Pf5274, 采用基于 pBBR1Am 的质粒回补法构建 *cbrB* 互补菌株及其对照菌株, 通过测定菌株 OD_{600} 、结晶紫染色法、琼脂平板法、平板对峙法和 *pltL'*-*lacZ* 融合报告菌株, 分析 CbrB 对防御假单胞菌 Pf-5 生长、生物膜形成、运动性、抗真菌活性和藤黄绿脓菌素合成的影响。【结果】CbrB 在天然培养基 LB 中显著抑制 Pf-5 的生长, 而在基础培养基 M9-葡萄糖中则显著促进 Pf-5 的生长; CbrB 显著促进 Pf-5 的运动性, 但是却抑制其生物膜形成、抗真菌活性及藤黄绿脓菌素合成。【结论】CbrB 在调控防御假单胞菌 Pf-5 生物防治方面具有一定的作用, 具体表现在菌株生长、生物膜形成、运动性、抗真菌活性及藤黄绿脓菌素合成等方面。本研究为利用基因工程技术提高生防菌株生物防治能力提供理论依据, 并为深度发掘藤黄绿脓菌素生物合成奠定基础。

关键词: 防御假单胞菌; CbrB; 生物防治; 藤黄绿脓菌素; 运动性; 生物膜形成

资助项目: 国家自然科学基金(31760534); 江西省自然科学基金(20202BAB213022)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31760534) and the Natural Science Foundation of Jiangxi Province (20202BAB213022).

*Corresponding authors. E-mail: DONG Xiaolin, dongxl@yangtzeu.edu.cn; ZHA Daiming, dmzha@jju.edu.cn

Received: 2024-03-19; Accepted: 2024-06-03; Published online: 2024-06-05

Role of CbrB in the biocontrol strain *Pseudomonas protegens* Pf-5

RAO Guangyao¹, WAN Cheng², SHI Hongqiu², DONG Xiaolin^{1*}, ZHA Daiming^{2*}

1 MARA Key Laboratory of Sustainable Crop Production in the Middle Reaches of the Yangtze River (Co-construction by Ministry and Province), College of Agriculture, Yangtze University, Jingzhou 434025, Hubei, China

2 School of Pharmacy and Life Sciences, Jiujiang University, Jiujiang 332005, Jiangxi, China

Abstract: [Objective] To explore the effects of CbrB from the carbon catabolite repression system on the biocontrol performance of *Pseudomonas protegens* Pf-5. [Methods] The mutant Pf5274 with the markerless deletion of the coding region of *cbrB* was constructed by a double-crossover recombination event based on pJQ200SK. Moreover, the complementary strain of *cbrB* and the control strains were constructed by the plasmid complementation method based on pBBR1Am. Lastly, the effects of CbrB on the growth, biofilm formation, motility, antifungal activity, and pyoluteorin synthesis of Pf-5 were analyzed by the measurement of OD_{600} , crystal violet staining, agar plate culture, plate confrontation method, and *pltL'*-*lacZ* fusion report strains, respectively. [Results] CbrB greatly slowed the growth of Pf-5 in the natural medium LB, but greatly sped up the growth of Pf-5 in the basic medium M9-glucose. In addition, CbrB significantly promoted the motility but inhibited the biofilm formation, antifungal activity, and pyoluteorin synthesis of Pf-5. [Conclusion] CbrB plays a role in regulating the growth, biofilm formation, motility, antifungal activity, and pyoluteorin synthesis of *P. protegens* Pf-5, thus regulating the biocontrol performance of this strain. This study provides a theoretical basis for the biocontrol capabilities of strains by genetic engineering and lays a foundation for probing into the biosynthesis of pyoluteorin.

Keywords: *Pseudomonas protegens*; CbrB; biocontrol; pyoluteorin; motility; biofilm formation

绿水青山就是金山银山, 生态文明建设离不开农业的可持续发展^[1]。可持续发展理念的提倡以及公众对化学农药对人类健康造成潜在危害的关注, 激发了人们对植物病虫害生物防治研究的兴趣, 迫切希望寻找更环保、更健康的病虫害防治策略。目前研究热点之一的植物根际促生细菌(plant growth promoting rhizobacteria, PGPR)通过产生促生物质促进植物生长, 同时分泌生物活性物质和竞争病原菌生态位抑制土壤中的植物病原菌, 其生物防治的主要能力在于通过分泌抗生素、运动和定殖竞争生态位等实现^[2-4]。本研究聚焦

的模式生物防御假单胞菌(*Pseudomonas protegens*) Pf-5 以抑制植物病害和广谱的生防活性而著称, 它能够分泌一系列具有生防活性的次级代谢产物, 如藤黄绿脓菌素、2,4-二乙酰基间苯三酚、硝吡咯菌素、氰化氢、铁载体、脂肽 A 等^[5-7]。这些生防活性物质能有效抵抗多种农作物土传病原菌, 如大麻霉斑病、玉米褐斑病、棉花和甜菜立枯病、番茄根腐病等病原菌^[8-9], 在生物防治和生防菌剂的开发及应用方面具有巨大潜力。

藤黄绿脓菌素(pyoluteorin, Plt)作为一种芳香族聚酮类抗生素, 其对多种真菌尤其卵菌属真

菌具有显著抑制作用^[9-11]。此外 Plt 还具有抗肿瘤活性,可在体外诱导人三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 发生细胞凋亡^[12]。菌株 Pf-5 中负责 Plt 合成和转运的基因簇由两对相反转录的操纵子 *pltRM-pltLABCDEFG*^[5]和 *pltZ-pltIJKNOP*^[13]构成,其中 LysR 家族的调控蛋白 PltR 在转录水平上激活合成操纵子 *pltLABCDEFG*^[14], TetR 家族的调控蛋白 PltZ 则负调控转运操作子 *pltIJKNOP*^[15], Plt 生物合成还受全局调控系统 GacS/A-RsmXYZ-RsmE、RNA 伴侣蛋白 Hfq 与非典型调控蛋白(Lon、RpoS 和 RpoN)的调节,除了上述参与假单胞菌抗生素生物合成的调控系统和因子,碳分解代谢阻遏调控系统 CbrA/B-CrcY/Z-Crc 也可能参与控制假单胞菌抗生素生物合成^[16-17]。

目前假单胞菌 CbrB 功能的研究主要集中在碳氮代谢相关的基因表达调控机制。CbrB 最早于 1985 年在菊欧文氏菌(*Erwinia chrysanthemi*) 3937 中被发现, *cbr* 基因簇编码的 CbrA 是一个蛋白激酶,感受外界信号磷酸化后活化相应的调节子 CbrB^[18]。2001 年在铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)中发现 CbrA/B 双组分系统控制菌体碳氮代谢, *cbrA* 和 *cbrB* 基因突变体不能使用精氨酸、组氨酸和脯氨酸等氨基酸及胍丁胺作为氮源,也无法使用甘露醇、葡萄糖、丙酮酸和柠檬酸作为碳源^[19]。2009 年在铜绿假单胞菌中发现了新的 sRNA CrcZ,同时揭示了 Crc 蛋白功能与 CbrA/B 系统密切相关,碳分解代谢阻遏调控系统赋予细菌灵活适应多种碳源的能力^[20]。2011 年在铜绿假单胞菌中发现 CbrA 和 CbrB 协同调节细菌毒力相关过程,包括生物膜形成、细胞毒性和对抗生素的耐药性^[21]。2011 年在铜绿假单胞菌中发现 RsmY 和 RsmZ 既是 GacS/A 信号转导通路中的中心调控元件,也是 CbrA/B 信号转导通路中的关键调节因子^[22]。2012 年在恶臭假单

胞菌(*P. putida*)中发现 CbrA/B 双组分系统激活 CrcZ 转录, CrcY/Z 协同作用阻遏翻译抑制因子 Crc 蛋白^[23]。2013 年在恶臭假单胞菌中发现响应调节蛋白 CbrB 是 RpoN 依赖性启动子的激活剂,它直接控制恶臭假单胞菌中 sRNA CrcZ 和 CrcY 的表达,但仍有部分 CrcY 的产生来自独立于 CbrB 的上游启动子^[24]。2016 年利用转座子突变构建了恶臭假单胞菌的 *cbrB* 缺失突变体,全基因组测序检测到 *lapG* 和 *lapD* 中的另外 2 个点突变,这些效应组合产生了生物膜过量表达的表型^[25]。2017 年在假单胞菌科的固氮杆菌瓦恩兰德固氮菌(*Azotobacter vinelandii*)中发现葡萄糖转运蛋白 GluP 的表达受到 CbrA/CbrB 和 Crc/Hfq 系统控制^[26]。2021 年在荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)中发现局部转录因子 HutC 通过 *hut* 启动子处 2 个双组分系统 NtrB/C 和 CbrA/B 间的相互作用维持菌体碳氮稳态^[27]。2022 年在铜绿假单胞菌中发现 CbrA/B 系统是常见变异株 *lasR*⁻出现的关键,损伤肺功能的化合物以 CbrB 控制的形式促进 *lasR*⁻谱系细胞生长^[28]。2022 年在铜绿假单胞菌中发现双 GGDEF/EAL 结构域蛋白 RmcA 与 CbrB 蛋白相互作用, CbrB 参与 RmcA 对生物膜形成和 III 型分泌系统基因的表达,拓展了对细菌二级信号分子环二鸟苷酸信号传导调控网络的理解^[29]。目前, CbrB 对防御假单胞菌 Pf-5 生物防治功能的影响尚不清楚。

本研究从根际促生细菌生物防治功能出发,检测了 CbrB 对防御假单胞菌 Pf-5 生长、运动性、生物膜形成、抗真菌活性和抗生素生物合成的影响,研究结果为利用基因工程技术优化生防菌株生物防治能力提供理论依据^[30]。此外,野生型 Pf-5 中藤黄绿脓菌素等生防活性物质的产量通常较低,本研究通过敲除 *cbrB* 有效增强了藤黄绿脓菌素的表达,为深度发掘藤黄绿脓菌素生物合成关键基因奠定了基础^[17]。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株和质粒

本研究所使用的菌株和质粒如表 1 所示。

1.1.2 主要试剂

PrimeSTAR[®] HS (Premix)、限制性内切酶和 T4 DNA Ligase 均购自 TaKaRa 公司; 2×*Es Taq* MasterMix (Dye)、Gel Extraction Kit 和 PurePlasmid Mini Kit 均购自康为世纪生物科技股份有限公司; 氨苄青霉素钠(Amp)、硫酸庆大霉素(Gm)、硫酸阿布拉霉素(Am)、硫酸卡那霉素(Km)、X-Gal、胰蛋白胨、蛋白胨、酵母提取物、琼脂粉等均购自生工生物工程(上海)股份有

限公司; 其他试剂均为分析纯。

1.1.3 培养基

LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.00, 酵母提取物 5.00, NaCl 10.00; 固体培养基另加琼脂粉 15.00 g/L。M9-葡萄糖培养基(g/L): Na₂HPO₄ 7.10, KH₂PO₄ 2.72, NaCl 0.58, NH₄Cl 1.07, MgSO₄ 0.19, CaCl₂ 0.01, 葡萄糖 20.00。运动性培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.00, NaCl 5.00, 琼脂粉 3.00/5.00。PDA 培养基(g/L): 马铃薯 100.00, 葡萄糖 20.00, 琼脂粉 15.00。38 号固体培养基(g/L): 酵母提取物 4.00, 葡萄糖 4.00, 麦芽浸粉 5.00, 琼脂粉 15.00。必要时培养基中添加的 Amp、Gm、Am、Km 和 X-Gal 终浓度分别为 100、50、50、30 和 200 μg/mL。

表 1 本研究所用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Relevant characteristics	Sources
<i>Escherichia coli</i>		
Top10	<i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i> , used for cloning	Invitrogen
ET12567(pUZ8002)	<i>dam-13T::Tn9 dcm-6 hsdM cml^R, kan^R</i> , used for biparental mating	[31]
<i>Pseudomonas protegens</i>		
Pf-5	Rhizosphere isolate, Amp ^r	[32]
Pf5274	Δ <i>cbrB</i> derivative of Pf-5, Amp ^r	This study
Pf-5 pBBR1Am	Pf-5 harboring pBBR1Am plasmid, Amp ^r and Am ^r	This study
Pf5274 pBBR1Am	Pf5274 harboring pBBR1Am plasmid, Amp ^r and Am ^r	This study
Pf-5 pAm-cbrB	Pf-5 harboring pAm-cbrB plasmid, Amp ^r and Am ^r	This study
Pf5274 pAm-cbrB	Pf5274 harboring pAm-cbrB plasmid, Amp ^r and Am ^r	This study
<i>Pythium ultimum</i>		
ACCC 37386	Soil isolate	Agricultural culture collection of China
Plasmids		
pJQ200SK	Suicide vector with <i>sacB</i> counter-selectable marker used for homologous recombination, Gm ^r	[33]
PJQΔ <i>cbrB</i>	pJQ200SK carrying a 2 067 bp <i>Xba</i> I/ <i>Spe</i> I insert with a deletion in the coding region of <i>cbrB</i> ; Gm ^r	This study
pBBR1MCS-5	Broad-host-range vector; Gm ^r	[34]
pBBR001	pBBR1MCS-5 with a translational ' <i>lacZ</i> fusion, Gm ^r	[35]
pBBR- <i>pltL</i> '-' <i>lacZ</i>	pBBR001 with a translational <i>pltL</i> '-' <i>lacZ</i> fusion; Gm ^r	This study
pBBR1Am	<i>Nco</i> I/ <i>Bgl</i> II-digested apramycin resistance cassette subcloned in pBBR1MCS-5 digested with the same endonucleases, Am ^r	This study
pAm-cbrB	pBBR1Am carrying a 1 504 bp <i>Xba</i> I/ <i>Hind</i> III insert with the coding region of <i>cbrB</i> , Am ^r	This study

1.1.4 引物

本研究所使用的引物如表 2 所示,其合成由武汉天一华煜基因科技有限公司完成,后续质粒测序由北京擎科生物科技股份有限公司武汉分公司完成。

1.2 *cbrB* 编码区无痕缺失突变菌株 Pf5274 的构建

为了探究 CbrB 对菌株 Pf-5 生物防治能力的影响,采用基于 pJQ200SK 的二次同源重组法^[35]构建 *cbrB* 编码区无痕缺失突变菌株 Pf5274,其构建图谱如图 1A 所示。以野生型菌株 Pf-5 基因组 DNA 为模板,利用 2 对引物 *cbrBU-U-Xba* I/*cbrBU-L-Xho* I 与 *cbrBD-U-Xho* I/*cbrBD-L-Spe* I 分别扩增 *cbrB* 开放阅读框的上、下游 DNA 片段,然后将这 2 个双酶切的 DNA 片段同时克隆到 pJQ200SK 的 *Xba* I-*Spe* I 位点,得到重组质粒 pJQΔ*cbrB*。将 pJQΔ*cbrB* 转化至大肠杆菌 ET12567(pUZ8002)中,通过双亲本杂交将 pJQΔ*cbrB* 从大肠杆菌 ET12567(pUZ8002)接合转移至防御假单胞菌 Pf-5 中;第 1 次同源重组在包含 Amp 和 Gm 的 LB 固体培养基上进行,用引物 *cbrBF/cbrBR* 筛选能同时扩增出 2 条带的单菌落,因为 pJQ200SK

不能在假单胞菌中复制,在 Gm 选择压力下通过第 1 次同源重组事件将重组质粒整合到基因组上进行复制;第 2 次同源重组在包含 Amp 和蔗糖的 LB 固体培养基上进行,用引物 *cbrBF/cbrBR* 筛选仅扩增出小条带的单菌落,因为在蔗糖压力下通过第 2 次同源重组事件消除基因组中的 pJQ200SK 序列,从而解除 SacB 的蔗糖致死效应并达到删除靶序列的目的;最后在包含 Gm 的 LB 固体培养基中过夜培养以验证 pJQ200SK 的消除,无 Gm 抗性的菌株即为 *cbrB* 缺失突变菌株 Pf5274。

1.3 *cbrB* 互补菌株的构建

为了对 *cbrB* 缺失突变菌株进行互补实验,使用引物 *cbrBF-Hind* III/*cbrBR-Xba* I 扩增包含完整 *cbrB* 开放阅读框的 DNA 片段,纯化后的 DNA 片段用 *Hind* III 和 *Xba* I 进行双酶切,然后克隆到 pBBR1Am 的 *Hind* III-*Xba* I 位点得到 *cbrB* 过表达质粒 pAm-*cbrB*,将其转化至大肠杆菌 ET12567(pUZ8002)中,通过双亲本杂交将 pAm-*cbrB* 分别转移至 Pf-5 和 Pf5274 中得到重组菌株 Pf-5 pAm-*cbrB* 和 Pf5274 pAm-*cbrB*,通过同样的方法同时得到对照菌株 Pf-5 pBBR1Am 和 Pf5274 pBBR1Am。

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Name	Sequences (5'→3')	Usage
<i>cbrBU-U-Xba</i> I	cctctagATCTCGCGTATCGTCCAGT	Upstream homologous arm of <i>cbrB</i>
<i>cbrBU-L-Xho</i> I	gtactcgaGATTTCGCCATTGTTGTTG	
<i>cbrBD-U-Xho</i> I	gtactcGAGCTGGCACGCAAACCT	Downstream homologous arm of <i>cbrB</i>
<i>cbrBD-L-Spe</i> I	gactagTGGGGGTGATATTGAGCAG	
<i>cbrBF</i>	TACATCGCCAAGCCGTTT	Verification of <i>cbrB</i> deletion
<i>cbrBR</i>	TGACCTTTCGATCCAACCAG	
<i>cbrBF-Hind</i> III	ctcaagcttATGCCGCATATTCTGAT	Coding region of <i>cbrB</i>
<i>cbrBR-Xba</i> I	ctctctagaCCTGTTACGTGCGATG	
<i>pltL-PF-Xba</i> I	ccttctagaGCCAAGTAGTCTTCTGTTTC	Promoter and partial coding region of <i>pltL</i>
<i>pltL'-PR-Xho</i> I	catctcgaGCCCCGATCAAATCTTCCATG	

小写字母为保护碱基和限制性内切酶酶切位点

Lowercase letters represent protecting bases and restriction enzyme cleavage sites.

1.4 *pltL'*-*'lacZ* 融合报告菌株的构建

为了检测 CbrB 对藤黄绿脓菌素生物合成基因簇 *pltL-G* 表达的影响, 使用引物 *pltL*-PF-*Xba* I/*pltL'*-PR-*Xho* I 扩增包含 *pltL* 启动子和部分开放阅读框的 DNA 片段, 将双酶切的 DNA 片段克隆到 pBBR001 的 *Xba* I-*Xho* I 位点得到 pBBR-*pltL'*-*'lacZ*, 然后将其转化至大肠杆菌 ET12567(pUZ8002) 中, 通过双亲本杂交将 pBBR-*pltL'*-*'lacZ* 转入到 Pf-5 及其衍生菌。

1.5 生长曲线的检测

将 Pf-5 及其衍生菌株划线培养 2 d, 挑取单菌落分别接种到添加了 Amp 或 Am 的 10 mL LB 培养基中, 28 °C、120 r/min 振荡培养至菌液 OD_{600} 为 1.0 左右; 取 2 mL 菌液, 5 000 r/min 离心 5 min 收集菌体。用新鲜的 LB 液体培养基洗 2 次并重新悬浮, 随后调节种子液的浓度为 OD_{600} 为 1.0; 将种子液按 1:1 000 的比例转接到装有 100 mL 新鲜 LB 培养基或 M9-葡萄糖培养基的 500 mL 锥形瓶中, 28 °C、120 r/min 振荡培养; 接种 6 h 时取 1 mL 菌液离心后重悬在等体积去离子水中, 以去离子水作空白对照, 检测 OD_{600} 值, 随后每隔 12 h 取样, 绘制生长曲线; 培养基中根据需要添加适量抗生素。

1.6 菌株生物膜形成的检测

生物膜形成的检测参照 Gu 等^[9]的方法并作适当修改, 使用结晶紫染色法评估玻璃试管中菌株生物膜的形成能力。Pf-5 及其衍生菌株培养参考 1.5 节, 取 10 μ L 调节后的种子液接种到含有 10 mL LB 培养基的试管中, 28 °C 静置培养 2 d, 轻柔地倒出培养基并用 0.9% 的生理盐水清洗 3 次去除非贴壁细胞; 附着在管壁上的生物膜自然晾干, 用 11 mL 1% 结晶紫溶液室温染色 20 min; 再用 0.9% 的生理盐水清洗 3 遍, 洗去未被生物膜结合的多余结晶紫; 试管自然晾干后加入 5 mL 无水乙醇溶解与生物膜结合的结晶紫; 测量溶液

在结晶紫吸收峰 595 nm 处的吸光值并采集试管图像。

1.7 菌株运动性的检测

运动性的检测参照 Liu 等^[36]的方法并作适当修改, 使用琼脂平板法检测菌株的运动性。Pf-5 及其衍生菌株培养参考 1.5 节, 取 2 μ L 调节后的种子液垂直接种于不同琼脂浓度(0.3%、0.5%)的运动性培养基中央内部, 28 °C 条件下培养 2 d, 测量迁移区直径并采集平板图像。

1.8 平板对峙培养

植物病原菌选用终极腐霉 ACCC 37386, 使用平板对峙法评估 CbrB 对菌株 Pf-5 抗真菌活性的影响, 参照李哲等^[37]的方法并作适当修改。将终极腐霉接种在 PDA 培养基上, 28 °C 培养 2 d 得到活化菌体, 使用打孔器切取直径 5 mm 的终极腐霉菌饼接种到含有 38 号固体培养基的培养皿中培养 24 h, 然后将 1 μ L 调节后的种子液接种于距菌饼 5 cm 处, 28 °C 静置培养 48 h, 测量抑菌带宽度并采集平板图像。

1.9 β -半乳糖苷酶活力的测定

为了检测 CbrB 是否影响 *pltL-G* 的表达, 各 *pltL'*-*'lacZ* 融合报告菌株所表达的 β -半乳糖苷酶的活力采用 Miller 法^[38]进行测定。将各报告菌株按 1:1 000 的比例分别接种至装有 50 mL 新鲜 LB 液体培养基的 250 mL 锥形瓶中, 在 28 °C、120 r/min 条件下培养, 每隔 4 h 取样 500 μ L 检测细胞密度、取样 500 μ L 反应 5 min 检测 β -半乳糖苷酶活力, 绘制 Pf-5 和 *cbrB* 缺失突变菌株的酶活力曲线, 测定互补菌株对数期及稳定期的酶活力, 辅助验证 CbrB 的影响。根据公式(1)使用 Miller U 计算 β -半乳糖苷酶活力。

$$\text{Miller U} = \frac{1000}{OD_{600} \times \text{样品体积}(\text{mL}) \times \text{反应时间}(\text{min})} (OD_{420} - 1.75 \times OD_{550}) \quad (1)$$

1.10 统计分析

本研究中的每个实验分别进行了 3 次以上,

使用 IBM SPSS Statistics 26 统计软件分析数据、Origin 2022 软件进行图表制作；在每个实验中，至少包含了 3 次重复的平行样本，所有数据采用平均值±标准差(mean±SD)表示；数据采用 Student's *t*-test 法比较不同处理间的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 *cbrB* 编码区无痕缺失突变菌株 Pf5274 的构建

为了研究 CbrB 的功能,采用基于 pJQ200SK 的二次同源重组法构建了 *cbrB* 编码区无痕缺失突变菌株 Pf5274, 其构建流程如图 1A 所示。利用引物 *cbrB*F/*cbrB*R 进行 *cbrB* 缺失突变菌株的 PCR 鉴定, 以 Pf-5 基因组为对照, 缺失突变菌株 Pf5274 可扩增出 658 bp 条带, Pf-5 可扩增出

1 543 bp 条带, 与图 1B 所示结果相符, 表示缺失突变菌株构建成功。

2.2 CbrB 调控菌株 Pf-5 的生长

通过检测菌液的 OD_{600} 值反映 CbrB 对菌株 Pf-5 生长的影响, Pf-5 及其衍生菌株的生长曲线如图 2 所示。

在 LB 培养基中, *cbrB* 缺失突变菌株 Pf5274 的 OD_{600} 值最高为 3.090, 较野生型菌株 Pf-5 显著性上升了 12.7% (图 2A)。从互补实验结果可知, 在 Pf-5 和 Pf5274 中过表达 *cbrB* 会导致菌株的 OD_{600} 值分别显著性降低 13.2% 和 9.2%, Pf-5 和 Pf5274 中包含空载质粒 pBBR1Am 不会干扰 CbrB 对菌株生长的影响, Pf5274 较 Pf-5 的 OD_{600} 值显著性上升了 12.9% (图 2B)。这些结果表明, CbrB 在天然培养基 LB 条件下显著性负调控菌株 Pf-5 的生长。

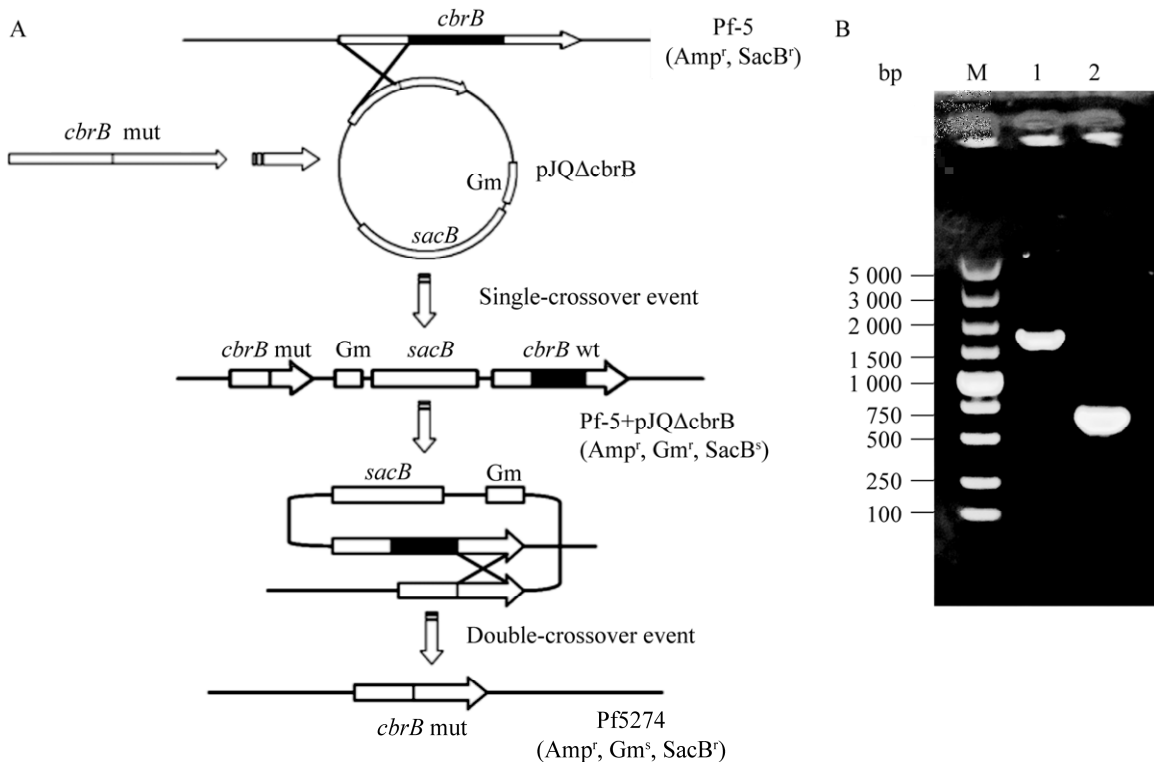


图 1 *cbrB* 编码区无痕缺失突变菌株的构建流程(A)及 PCR 验证(B)

Figure 1 Schematic diagram depicting the construction (A) and PCR confirmation (B) of a markerless deletion mutant of the coding region of *cbrB*. M: DNA marker; 1: Pf-5; 2: Pf5274.

在 M9-葡萄糖培养基中, Pf5274 的 OD_{600} 最高值为 1.514, 较 Pf-5 显著性下降了 33.1% (图 2C)。从互补实验结果可知, 在 Pf-5 中过表达 *cbrB* 会导致菌株 OD_{600} 值显著性上升 11.7%, 而在 Pf5274 中过表达 *cbrB* 仅能部分恢复生长, 较 Pf-5 pBBR1Am 的 OD_{600} 值仍下降了 20.8%, Pf-5 和 Pf5274 中包含空载质粒 pBBR1Am 不会干扰 CbrB 对菌株生长的影响, Pf5274 较 Pf-5 的 OD_{600} 值显著性下降了 29.2% (图 2D)。这些结果表明, CbrB 在基础培养基 M9-葡萄糖条件下显著性正

调菌株 Pf-5 的生长。

此外, CbrB 在对数生长期和稳定期对菌株 Pf-5 生长的调控趋势相同, 而且各菌株的生长曲线不相交, 表明 CbrB 对 Pf-5 生长的调控在整个细胞周期上具有连续性。

2.3 CbrB 负调控菌株 Pf-5 的生物膜形成

细菌定殖植物的过程中, 生物膜形成起着决定性作用, 是许多细菌毒力的决定因素^[39], 生物膜形成的检测结果如图 3 所示。*cbrB* 缺失突变菌株 Pf5274 的 OD_{595} 值为 0.674, 较野生型菌株

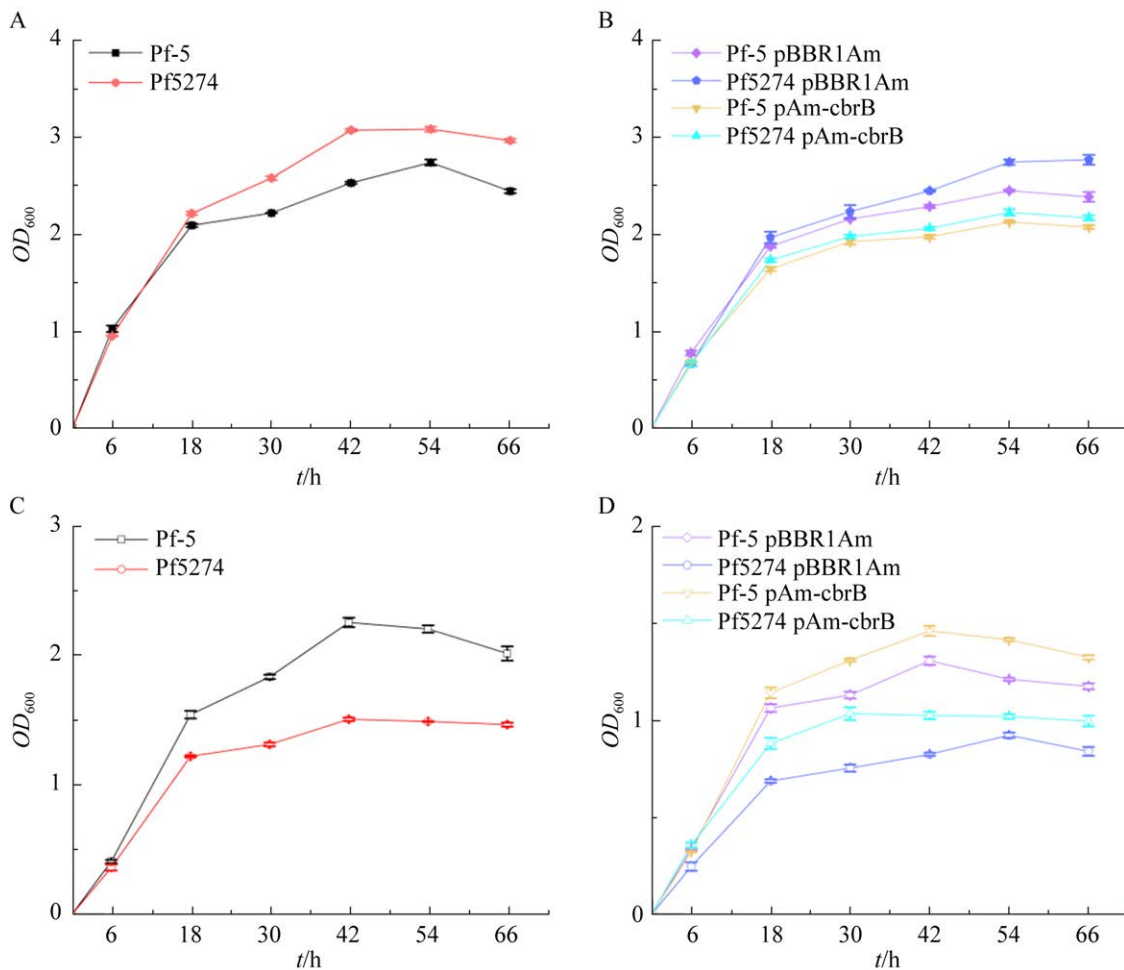


图 2 *cbrB* 敲除或过表达对菌株 Pf-5 生长的影响 Pf-5 及其衍生菌在 LB 培养基(A、B)和 M9-葡萄糖培养基(C、D)中的生长情况

Pf-5 及其衍生菌在 LB 培养基(A、B)和 M9-葡萄糖

Figure 2 Effects of *cbrB* knockout or overexpression on the growth of strain Pf-5. Growth status of Pf-5 and its derivatives in LB broth (A, B) and M9-glucose broth (C, D).

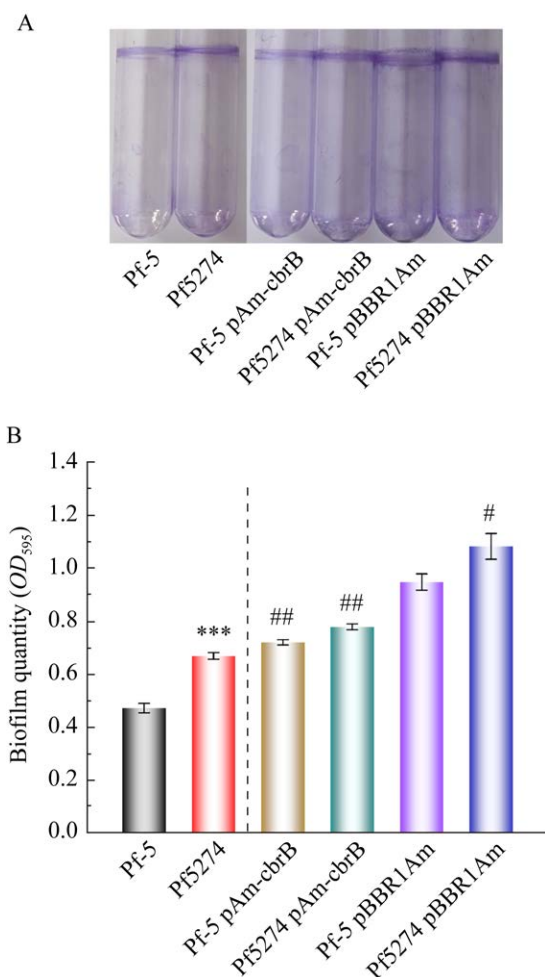


图 3 *cbrB* 敲除或过表达对菌株 Pf-5 生物膜形成的影响 A: Pf-5 及其衍生菌生物膜的结晶紫染色结果. B: Pf-5 及其衍生菌生物膜结晶紫染色后的 OD_{595} 值

Figure 3 Effects of *cbrB* knockout or overexpression on the biofilm formation of strain Pf-5. A: The crystal violet staining results on the biofilm formation of Pf-5 and its derivative strains. B: The OD_{595} value on the biofilm formation of Pf-5 and its derivative strains after crystal violet staining. ***: $P \leq 0.001$; #: $0.01 < P \leq 0.05$; ##: $0.001 < P \leq 0.01$.

Pf-5 上升了 41.0%，而且生物膜结构厚度也有所增加；尽管 Pf5274 的生物膜形成量较 Pf-5 提升了 41.0%，但其 OD_{600} 的增长率仅为 12.7%，这表明生物膜形成量的增加不是由于

生长速度加快导致的。从互补实验结果可知，在 Pf-5 和 Pf5274 中过表达 *cbrB* 会导致菌株的生物膜形成量分别显著性下降 23.9% 和 17.7%，Pf-5 和 Pf5274 中包含空载质粒 pBBR1Am 不会干扰 CbrB 对菌株生物膜形成的影响，Pf5274 较 Pf-5 的生物膜形成量上升了 17.6%。这些结果表明，CbrB 显著抑制菌株 Pf-5 的生物膜形成。

2.4 CbrB 正调控菌株 Pf-5 的运动性

很多细菌都具有运动性，这一特性在生态学和病理学具有重要的意义，影响着生物防治菌株的防治能力，细菌的运动性主要包括浮泳运动 (swim motility) 和群集运动 (swarm motility) 两种方式^[40]。运动性检测结果如图 4 所示，无论是浮泳运动还是群集运动，*cbrB* 缺失后菌株的运动能力急剧降低 (Pf5274 vs. Pf-5)，而过表达 *cbrB* 则显著提高菌株的运动能力 (Pf-5/Pf5274 pAm-cbrB vs. Pf-5/Pf5274 pBBR1Am)，Pf-5 和 Pf5274 中包含空载质粒 pBBR1Am 不会干扰 CbrB 对菌株运动性的影响，Pf5274 较 Pf-5 的运动能力显著性降低。以上结果表明，CbrB 显著促进菌株 Pf-5 的运动性。

2.5 CbrB 负调控菌株 Pf-5 的抗真菌活性

Pf-5 及其衍生菌株对终极腐霉的抑制效果显著，平板对峙培养结果如图 5 所示。*cbrB* 缺失菌株 Pf5274 的抑菌带宽度为 18 mm，较野生型菌株 Pf-5 显著性增加了 18.7%，而过表达 *cbrB* 则导致菌株的抑菌带宽度显著性缩小 26.7% (Pf-5 pAm-cbrB vs. Pf-5 pBBR1Am) 或 18.3% (Pf5274 pAm-cbrB vs. Pf5274 pBBR1Am)，Pf-5 和 Pf5274 中包含空载质粒 pBBR1Am 不会干扰 CbrB 对菌株生防活性的影响，Pf5274 较 Pf-5 的抑菌带宽度显著性增加了 10.8%。以上结果表明，CbrB 显著抑制菌株 Pf-5 的抗真菌活性。

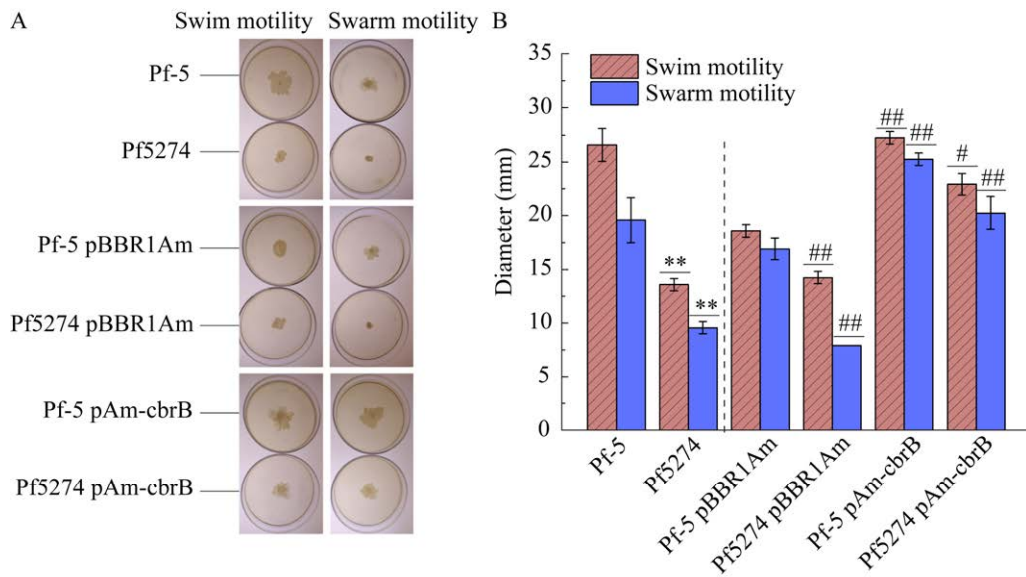


图4 *cbrB* 敲除或过表达对菌株 Pf-5 运动性的影响 A: Pf-5 及其衍生菌在半固体培养基中的运动情况。B: Pf-5 及其衍生菌在半固体培养基中的运动晕直径

Figure 4 Effects of *cbrB* knockout or overexpression on the motility of strain Pf-5. A: The motility of Pf-5 and its derivative strains in semisolid media. B: The diameter of the motility halo of Pf-5 and its derivative strains in semisolid media. **: 0.001P≤0.01; #: 0.01P≤0.05; ###: 0.001P≤0.01.

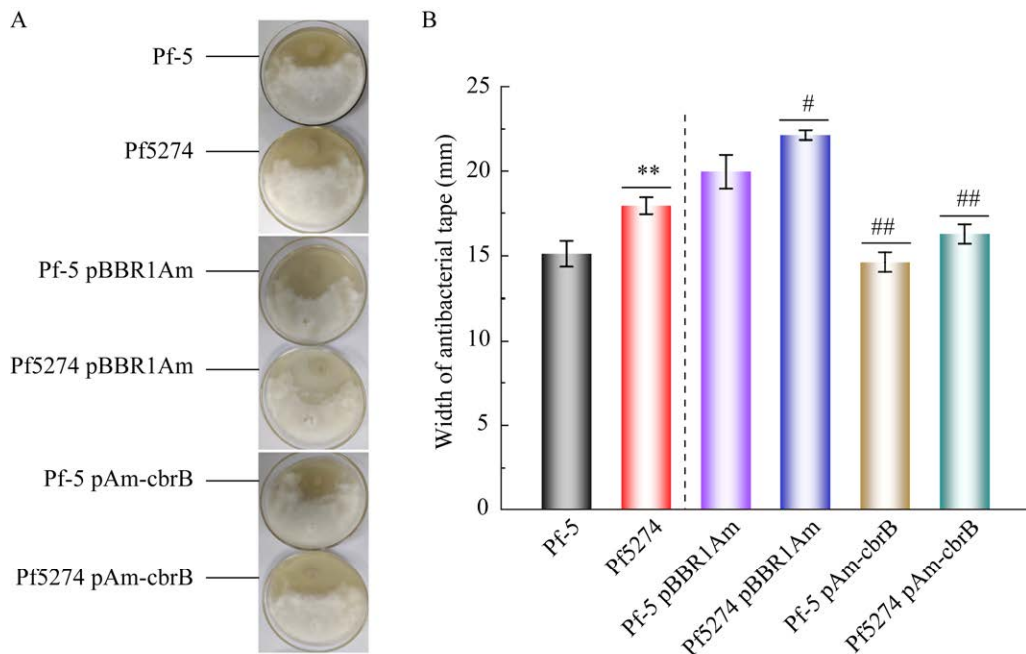


图5 *cbrB* 敲除或过表达对菌株 Pf-5 抗真菌活性的影响 A: Pf-5 及其衍生菌与终极腐霉 ACCC 37386 的平板对峙结果。B: Pf-5 及其衍生菌与终极腐霉 ACCC 37386 平板对峙的抑菌带宽度

Figure 5 Effects of *cbrB* knockout or overexpression on the antifungal activity of strain Pf-5. A: Plate confrontation results of Pf-5 and its derivative strains with *Pythium ultimum* ACCC 37386. B: The width of the inhibition zone between Pf-5 and its derivative strains with *Pythium ultimum* ACCC 37386 after plate confrontation. **: 0.001P≤0.01; #: 0.01P≤0.05; ###: 0.001P≤0.01.

2.6 CbrB 负调控 Plt 合成操纵子 *pltL-G* 的表达

通过检测 *pltL'-lacZ* 融合报告菌株的 β -半乳糖苷酶活力，可以反映 CbrB 对 Plt 合成操纵子 *pltL-G* 表达的影响。如图 6 所示，*cbrB* 缺失突变菌株 Pf5274 的 β -半乳糖苷酶活力显著高于野生型菌株 Pf-5，而过表达 *cbrB* 则显著降低报告菌株的 β -半乳糖苷酶活力 (Pf-5/Pf5274 pAm-*cbrB* vs. Pf-5/Pf5274 pBBR1Am)，Pf-5 和 Pf5274 中包含空载质粒 pBBR1Am 不会干扰 CbrB 对报告菌株 β -半乳糖苷酶活力的影响，Pf5274 较 Pf-5 的 β -半乳糖苷酶活力显著提高。以上结果表明，CbrB 通过直接或间接途径显著抑制 Plt 合成操纵子 *pltL-G* 的表达。

3 讨论与结论

作为碳分解代谢阻遏调控系统 CbrA/B-CrcY/Z-Crc 中的关键调控因子，CbrB 在假单胞菌属的不同菌株中发挥着多种生物学功能，主要涉及碳氮代谢的调控、生物膜形成、运动性以及对环境适应性的基因表达调控。在铜绿假单胞菌中，CbrB 显著影响着菌体的碳氮代谢，*cbrB* 缺

失突变体表现出对多种氨基酸和糖类的利用障碍^[19]；此外，CbrB 还参与调控细菌的毒力相关过程，如生物膜形成、细胞毒性和对抗生素的耐药性，*cbrB* 的缺失会增强细菌毒性并提高对抗生素的耐药性^[21]。在恶臭假单胞菌中，CbrB 作为 RpoN 依赖型启动子的激活剂，直接调控 sRNA CrcY 和 CrcZ 的转录，并抑制生物膜形成^[25]。在瓦恩兰德固氮菌中，CbrB 通过调节葡萄糖转运蛋白 GluP 的表达影响菌体的碳源利用和能量代谢^[26]。在荧光假单胞菌中，CbrB 与局部转录因子 HutC 相互作用，通过与 *hut* 启动子处的双组分系统 NtrB/C 相互作用，共同维持菌体碳氮代谢的稳态^[27]。

碳分解代谢阻遏调控级联系统能保证细菌处于混合碳源时优先利用速效碳源中的单碳化合物^[41]。我们的结果表明，在天然培养基 LB 条件下 CbrB 显著负调控菌株 Pf-5 的生长，而在基础培养基 M9-葡萄糖条件下 CbrB 对菌株 Pf-5 的生长具有显著正调控作用，这一发现与同属假单胞菌科的固氮杆菌瓦恩兰德固氮菌的报道相一致，当葡萄糖是唯一碳源时，Crc 蛋白的过表达会抑制细胞生长^[26]。研究报道，在碳分解代谢

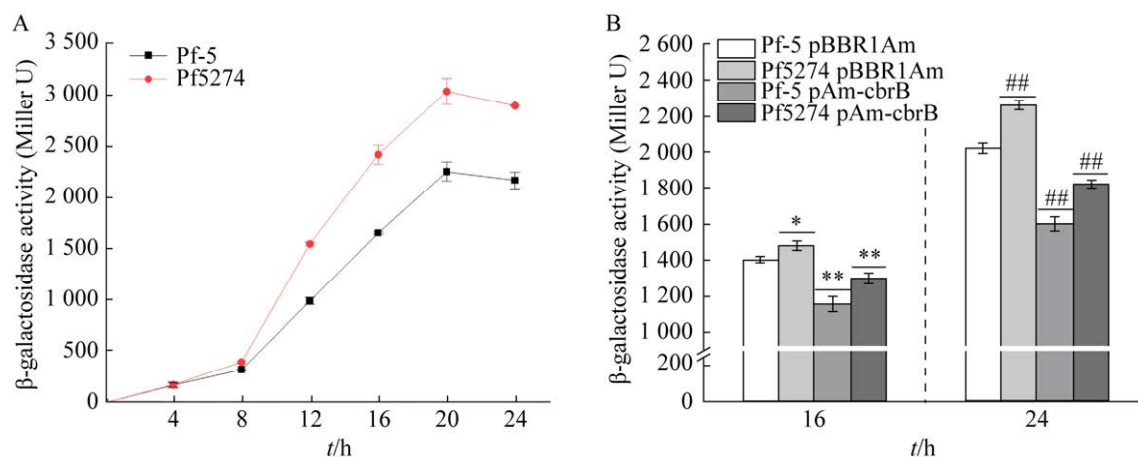


图 6 *cbrB* 敲除(A)或过表达(B)对 Plt 合成操纵子 *pltL-G* 表达的影响

Figure 6 Effects of *cbrB* knockout (A) or overexpression (B) on the expression of Plt synthesis operon *pltL-G*. *: $0.01 < P \leq 0.05$; **: $0.001 < P \leq 0.01$; ##: $0.001 < P \leq 0.01$.

阻遏调控级联系统中 CbrA/B 双组分系统会激活 CrcY/Z sRNAs 的表达, 这反过来隔离翻译抑制因子 Crc 蛋白并消除其对靶标 mRNA 的抑制^[17]。本研究结果和以上报道联系起来, 暗示了 CbrB 是通过碳分解代谢阻遏调控级联系统抑制 Crc 蛋白, 从而解除 Crc 蛋白对生长的抑制, 进而正调控防御假单胞菌生长。

生防菌株在固体表面形成坚固的生物膜使其便于定殖在植物根际, 在定殖早期菌株的运动性也发挥着重要作用, 众所周知定殖能力强的生防菌株往往运动性并不突出。本研究结果表明, CbrB 负调控菌株 Pf-5 生物膜形成的同时正调控其运动性, 这与恶臭假单胞菌的报道相一致^[25,42]。杨国环等^[43]认为假单胞菌属细菌在藤黄绿脓菌素生物合成与转运基因簇上有包括防御假单胞菌(Pf-5、CHA0 和 H78)和铜绿假单胞菌(M18 和 LESB58)在内的两种不同进化起源, 它们虽然在合成及转运基因簇上具有共同的基因组成和布局, 然而其在核苷酸序列上以及合成与转运基因簇之间包含多个顺式作用元件的非编码区上有很大差异。本研究结果和以上报道联系起来, 提示了 CbrB 在防御假单胞菌和恶臭假单胞菌中生物膜形成和运动性的调控模式具有相似性, 暗示这 2 种假单胞菌在进化方向上的高同源性。

Howell 等^[44]发现菌株 Pf-5 的主要次级代谢产物藤黄绿脓菌素在抑制终极腐霉等植物病原菌中起着较大作用。本研究结果表明, CbrB 负调控菌株 Pf-5 的拮抗终极腐霉活性。Gu 等^[9]通过 HPLC 分析鉴定出菌株 Pf-5 抑制玉米叶褐腐病的菠萝泛菌(*Pantoea ananatis*) DZ-12 的主要抑菌成分为藤黄绿脓菌素、2,4-二乙酰基间三苯酚(2,4-diacetylphloroglucinol, 2,4-DAPG)和脂肽 A 这 3 种主要成分, 其中藤黄绿脓菌素表现出最强烈的抗生素特性, 可有效抑制 DZ-12 生长。

通过 *pltL'*-*'lacZ* 融合报告菌株, 发现 CbrB 负调控 *Plt* 的表达, 进一步证明 CbrB 是通过抑制 *Plt* 的合成从而降低拮抗终极腐霉的活性。

综上所述, 本研究首次揭示了 CbrB 在防御假单胞菌 Pf-5 中调控生物膜形成、运动性、抗真菌活性和藤黄绿脓菌素合成方面的作用, 并提供了 CbrB 通过碳代谢调控细菌生长的新见解。这为利用基因工程技术提高生防菌株生物防治能力提供理论依据, 并为深度发掘藤黄绿脓菌素生物合成奠定基础。

参考文献

- [1] 巩前文, 李学敏. 农业绿色发展指数构建与测度: 2005–2018 年[J]. 改革, 2020, 1: 133-145.
GONG QW, LI XM. Construction and measurement of agricultural green development index: 2005–2018[J]. Reform, 2020, 1: 133-145 (in Chinese).
- [2] FOX AR, SOTO G, VALVERDE C, RUSSO D, LAGARES A Jr, ZORREGUIETA Á, ALLEVA K, PASCUAN C, FRARE R, MERCADO-BLANCO J, DIXON R, AYUB ND. Major cereal crops benefit from biological nitrogen fixation when inoculated with the nitrogen-fixing bacterium *Pseudomonas protegens* Pf-5 X940[J]. Environmental Microbiology, 2016, 18(10): 3522-3534.
- [3] JING XS, CUI QW, LI XC, YIN J, RAVICHANDRAN V, PAN D, FU J, TU Q, WANG HL, BIAN XY, ZHANG YM. Engineering *Pseudomonas protegens* Pf-5 to improve its antifungal activity and nitrogen fixation[J]. Microbial Biotechnology, 2020, 13(1): 118-133.
- [4] 但汉鸿, 王道本. 植物促生菌的防病机制[J]. 世界农业, 1995, 1: 40-41.
DAN HH, WANG DB. Disease prevention mechanism of plant growth-promoting bacteria[J]. World Agriculture, 1995, 1: 40-41 (in Chinese).
- [5] PAULSEN IT, PRESS CM, RAVEL J, KOBAYASHI DY, MYERS GSA, MAVRODI DV, DeBOY RT, SESHADRI R, REN QH, MADUPU R, DODSON RJ,

- DURKIN AS, BRINKAC LM, DAUGHERTY SC, SULLIVAN SA, ROISOVITZ MJ, GWINN ML, ZHOU LW, SCHNEIDER DJ, CARTINHO SW, et al. Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5[J]. *Nature Biotechnology*, 2005, 23: 873-878.
- [6] YAN Q, PHILMUS B, HESSE C, KOHEN M, CHANG JH, LOPER JE. The rare codon AGA is involved in regulation of pyoluteorin biosynthesis in *Pseudomonas protegens* Pf-5[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 497.
- [7] LOPER JE, KOBAYASHI DY, PAULSEN IT. The genomic sequence of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5: insights into biological control[J]. *Phytopathology*, 2007, 97(2): 233-238.
- [8] BALTHAZAR C, ST-ONGE R, LÉGER G, LAMARRE SG, JOLY DL, FILION M. Pyoluteorin and 2,4-diacetylphloroglucinol are major contributors to *Pseudomonas protegens* Pf-5 biocontrol against *Botrytis cinerea* in cannabis[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 945498.
- [9] GU Q, QIAO JQ, WANG RY, LU J, WANG ZQ, LI PP, ZHANG LL, ALI Q, KHAN AR, GAO XW, WU HJ. The role of pyoluteorin from *Pseudomonas protegens* Pf-5 in suppressing the growth and pathogenicity of *Pantoea ananatis* on maize[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(12): 6431.
- [10] KRAUS J, LOPER JE. Characterization of a genomic region required for production of the antibiotic pyoluteorin by the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* Pf-5[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(3): 849-854.
- [11] 何延静, 胡洪波, 许煜泉, 张雪洪. 新型生物农药藤黄绿脓菌素[J]. *农药*, 2006, 45(3): 155-157.
- HE YJ, HU HB, XU YQ, ZHANG XH. A new biological pesticide, pyoluteorin[J]. *Agrochemicals*, 2006, 45(3): 155-157 (in Chinese).
- [12] DING T, YANG LJ, ZHANG WD, SHEN YH. Pyoluteorin induces cell cycle arrest and apoptosis in human triple-negative breast cancer cells MDA-MB-231[J]. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2020, 72(7): 969-978.
- [13] WU DQ, YE J, OU HY, WEI X, HUANG XQ, HE YW, XU YQ. Genomic analysis and temperature-dependent transcriptome profiles of the rhizosphere originating strain *Pseudomonas aeruginosa* M18[J]. *BMC Genomics*, 2011, 12(1): 438.
- [14] LI SN, HUANG XQ, WANG GH, XU YQ. Transcriptional activation of pyoluteorin operon mediated by the LysR-type regulator PltR bound at a 22 bp lys box in *Pseudomonas aeruginosa* M18[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e39538.
- [15] GUO DD, LUO LM, MA HL, ZHANG SP, XU H, ZHANG HH, WANG Y, YUAN YN, WANG Z, HE YX. The regulator PltZ regulates a putative ABC transporter system PltIJKNOP of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 in response to the antimicrobial 2,4-diacetylphloroglucinol[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1423.
- [16] WANG Z, HUANG XQ, LIU YJ, YANG GH, LIU Y, ZHANG XH. GacS/GacA activates pyoluteorin biosynthesis through Gac/Rsm-RsmE cascade and RsmA/RsmE-driven feedback loop in *Pseudomonas protegens* H78[J]. *Molecular Microbiology*, 2017, 105(6): 968-985.
- [17] SHI HM, HUANG XQ, WANG Z, GUAN YJ, ZHANG XH. Improvement of pyoluteorin production in *Pseudomonas protegens* H78 through engineering its biosynthetic and regulatory pathways[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(8): 3465-3476.
- [18] MAHÉ B, MASCLAUX C, RAUSCHER L, ENARD C, EXPERT D. Differential expression of two siderophore-dependent iron-acquisition pathways in *Erwinia chrysanthemi* 3937: characterization of a novel ferrisiderophore permease of the ABC transporter family[J]. *Molecular Microbiology*, 1995, 18(1): 33-43.
- [19] NISHIJYO T, HAAS D, ITOH Y. The CbrA-CbrB two-component regulatory system controls the utilization of multiple carbon and nitrogen sources in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Molecular Microbiology*, 2001, 40(4): 917-931.

- [20] SONNLEITNER E, ABDU L, HAAS D. Small RNA as global regulator of carbon catabolite repression in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(51): 21866-21871.
- [21] YEUNG ATY, BAINS M, HANCOCK REW. The sensor kinase CbrA is a global regulator that modulates metabolism, virulence, and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(4): 918-931.
- [22] SONNLEITNER E, HAAS D. Small RNAs as regulators of primary and secondary metabolism in *Pseudomonas* species[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 91(1): 63-79.
- [23] MORENO R, FONSECA P, ROJO F. Two small RNAs, CrcY and CrcZ, act in concert to sequester the Crc global regulator in *Pseudomonas putida*, modulating catabolite repression[J]. Molecular Microbiology, 2012, 83(1): 24-40.
- [24] GARCÍA-MAURIÑO SM, PÉREZ-MARTÍNEZ I, AMADOR CI, CANOSA I, SANTERO E. Transcriptional activation of the CrcZ and CrcY regulatory RNAs by the CbrB response regulator in *Pseudomonas putida*[J]. Molecular Microbiology, 2013, 89(1): 189-205.
- [25] AMADOR CI, LÓPEZ-SÁNCHEZ A, GOVANTES F, SANTERO E, CANOSA I. A *Pseudomonas putida* *cbrB* transposon insertion mutant displays a biofilm hyperproducing phenotype that is resistant to dispersal[J]. Environmental Microbiology Reports, 2016, 8(5): 622-629.
- [26] QUIROZ-ROCHA E, MORENO R, HERNÁNDEZ-ORTÍZ A, FRAGOSO-JIMÉNEZ JC, MURIEL-MILLÁN LF, GUZMÁN J, ESPÍN G, ROJO F, NÚÑEZ C. Glucose uptake in *Azotobacter vinelandii* occurs through a GluP transporter that is under the control of the CbrA/CbrB and Hfq-Crc systems[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 858.
- [27] NAREN NR, ZHANG XX. Role of a local transcription factor in governing cellular carbon/nitrogen homeostasis in *Pseudomonas fluorescens*[J]. Nucleic Acids Research, 2021, 49(6): 3204-3216.
- [28] MOULD DL, STEVANOVIC M, ASHARE A, SCHULTZ D, HOGAN DA. Metabolic basis for the evolution of a common pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* variant[J]. eLife, 2022, 11: e76555.
- [29] KONG WN, LUO W, WANG YY, LIU Y, TIAN QQ, ZHAO C, LIANG HH. Dual GGDEF/EAL-domain protein RmcA controls the type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* by interaction with CbrB[J]. ACS Infectious Diseases, 2022, 8(12): 2441-2450.
- [30] 刘正强. 利用核糖体工程技术提高荧光假单胞菌 Pf-5 菌株活性次级代谢产物产量[D]. 长沙: 湖南师范大学硕士学位论文, 2016.
- LIU ZQ. Improving the production of active secondary metabolites in *Pseudomonas protegens* pf-5 by using ribosome engineering[D]. Changsha: Master's Thesis of Hunan Normal University, 2016 (in Chinese).
- [31] MacNEIL DJ, OCCI JL, GEWAIN KM, MacNEIL T, GIBBONS PH, RUBY CL, DANIS SJ. Complex organization of the *Streptomyces avermitilis* genes encoding the avermectin polyketide synthase[J]. Gene, 1992, 115(1/2): 119-125.
- [32] HOWELL CR. Control of *Rhizoctonia solanion* cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium[J]. Phytopathology, 1979, 69(5): 480.
- [33] QUANDT J, HYNES MF. Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in Gram-negative bacteria[J]. Gene, 1993, 127(1): 15-21.
- [34] KOVACH ME, ELZER PH, HILL DS, ROBERTSON GT, FARRIS MA, ROOP RM 2nd, PETERSON KM. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes[J]. Gene, 1995, 166(1): 175-176.
- [35] ZHA DM, XU L, ZHANG HJ, YAN YJ. The two-component GacS-GacA system activates lipA translation by RsmE but not RsmA in *Pseudomonas protegens* Pf-5[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(21): 6627-6637.
- [36] LIU XX, YE YF, ZHU Y, WANG LF, YUAN LY, ZHU JL, SUN AH. Involvement of RpoN in regulating motility, biofilm, resistance, and spoilage potential of

- Pseudomonas fluorescens*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 641844.
- [37] 李哲, 李璇, 崔婷婷, 任云. 绿色木霉组蛋白去乙酰化酶编码基因 TvRpd3 在木霉生物防治作用中的功能分析[J]. *微生物学报*, 2023, 63(9): 3560-3573.
- LI Z, LI X, CUI TT, REN Y. Role of *Trichoderma viride* histone deacetylase gene TvRpd3 in the biocontrol of *Trichoderma*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(9): 3560-3573 (in Chinese).
- [38] SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*[M]. Second Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- [39] DANHORN T, FUQUA C. Biofilm formation by plant-associated bacteria[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2007, 61: 401-422.
- [40] 丁莉莎, 王瑶. 鞭毛介导的运动性与细菌生物膜的相互关系[J]. *微生物学报*, 2009, 49(4): 417-422.
- DING LS, WANG Y. Relationship between flagella-dependent motility and biofilm in bacteria: a review[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49(4): 417-422 (in Chinese).
- [41] ROJO F. Carbon catabolite repression in *Pseudomonas*: optimizing metabolic versatility and interactions with the environment[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2010, 34(5): 658-684.
- [42] AMADOR CI, CANOSA I, GOVANTES F, SANTERO E. Lack of CbrB in *Pseudomonas putida* affects not only amino acids metabolism but also different stress responses and biofilm development[J]. *Environmental Microbiology*, 2010, 12(6): 1748-1761.
- [43] 杨国环, 王正, 吴玲玉, 张雪洪, 黄显清. *Pseudomonas protegens* H78 中抗真菌剂藤黄绿菌素的合成及其基因簇分析[J]. *基因组学与应用生物学*, 2015, 34(4): 680-684.
- YANG GH, WANG Z, WU LY, ZHANG XH, HUANG XQ. The pyoluteorin (*plt*) biosynthesis and gene cluster analysis in *Pseudomonas protegens* H78[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2015, 34(4): 680-684 (in Chinese).
- [44] HOWELL CR. Suppression of *Pythium ultimum*-induced damping-off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoluteorin[J]. *Phytopathology*, 1980, 70(8): 712.