



# 荧光假单胞菌 2P24 中 *opgGH* 基因影响抗生素 2,4-二乙酰基间苯三酚的产生

覃凡栖<sup>1#</sup>, 杨青青<sup>1#</sup>, 李长洪<sup>1</sup>, 罗永杰<sup>1</sup>, 张力群<sup>2</sup>, 吴小刚<sup>1\*</sup>

1 广西大学农学院 广西农业环境与农产品安全重点实验室, 广西 南宁 530004

2 中国农业大学植物保护学院, 北京 100193

覃凡栖, 杨青青, 李长洪, 罗永杰, 张力群, 吴小刚. 荧光假单胞菌 2P24 中 *opgGH* 基因影响抗生素 2,4-二乙酰基间苯三酚的产生[J]. 微生物学报, 2023, 63(9): 3591-3601.

QIN Fanqi, YANG Qingqing, LI Changhong, LUO Yongjie, ZHANG Liqun, WU Xiaogang. The *opgGH* genes regulate 2,4-diacetylphloroglucinol production in *Pseudomonas fluorescens* 2P24[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(9): 3591-3601.

**摘要:** 【目的】抗生素 2,4-二乙酰基间苯三酚(2,4-diacetylphloroglucinol, 2,4-DAPG)是生防菌株荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*) 2P24 防治植物病害的关键因子, 然而对 2,4-DAPG 生物合成的调控通路并未完全解析。【方法】前期利用 Tn5 随机突变的方法获得一株对棉花立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)拮抗能力完全丧失的突变菌株 W3, 本研究利用基因互补等方法研究该突变体中被破坏的基因对菌株 2P24 分泌 2,4-DAPG 和其他生防相关性状的影响。【结果】Tn5 插入位点及其序列分析表明突变菌株 W3 中 Tn5 破坏了 *opgG* 基因。鉴于 *opgG* 和 *opgH* 基因组成操纵子, 利用同源重组技术构建了 *opgGH* 内缺失突变菌株。与野生菌株 2P24 相比, *opgGH* 突变菌株中 2,4-DAPG 的产量显著降低。对其他生防相关性状的检测发现, 突变 *opgGH* 基因并不影响群体感应系统(quorum sensing, QS)信号分子的产生、氢氰酸的产生以及生物膜的形成, 但可抑制菌株 2P24 的游动性。转录融合实验进一步表明 *opgGH* 基因并不调控 *gacA* 基因及其调控的小 RNA 分子编码基因的表达, 这些结果表明 *opgGH* 基因可能不通过 Gac/Rsm 信号通路影响 2,4-DAPG 的产生。另外, 高渗透势条件下, 菌株 2P24 可通过 *opgGH* 基因调控 2,4-DAPG 的产生。【结论】菌株 2P24 中 *opgGH* 基因正调控抗生素 2,4-DAPG 的产生、游动性以及抑菌能力, 是该菌株中一个与生防性状相关的重要调控因子。

**关键词:** 荧光假单胞菌; *opgGH*; 2,4-二乙酰基间苯三酚(2,4-DAPG); 游动性; 群体感应

资助项目: 广西壮族自治区自然科学基金(2021GXNSFDA220006)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Guangxi Zhuang Autonomous Region (2021GXNSFDA220006).

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-771-3234576, E-mail: wuxiaogang@foxmail.com

Received: 2023-01-08; Accepted: 2023-03-15; Published online: 2023-03-20

# The *opgGH* genes regulate 2,4-diacetylphloroglucinol production in *Pseudomonas fluorescens* 2P24

QIN Fanqi<sup>1#</sup>, YANG Qingqing<sup>1#</sup>, LI Changhong<sup>1</sup>, LUO Yongjie<sup>1</sup>, ZHANG Liqun<sup>2</sup>, WU Xiaogang<sup>1\*</sup>

1 Guangxi Key Laboratory of Agro-environment and Agro-product Safety, College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530004, Guangxi, China

2 College of Plant Protection, China Agricultural University, Beijing 100193, China

**Abstract:** [Objective] The polyketide antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol (2,4-DAPG) is essential for the biocontrol effect of *Pseudomonas fluorescens* 2P24. However, the genetic elements that modulates 2,4-DAPG production remains to be ascertained. [Methods] Previously, Tn5 transposon mutagenesis was employed to get *P. fluorescens* W3 with the complete loss of antagonism to *Rhizoctonia solani*, and the strain W3 was then used to screen out the novel gene that influencing the production of 2,4-DAPG. In this study, the effect of the mutated gene in W3 on the 2,4-DAPG production and biocontrol effect of 2P24 was explored. [Results] One of the insertion mutations, exhibiting no activity against *R. solani*, was mapped to *opgG*, which encodes the protein for the synthesis of osmoregulated periplasmic glucan (OPG). The deletion of *opgGH* impaired the production of 2,4-DAPG and bacterial swimming motility, while it did not affect the production of quorum sensing (QS) signals, the generation of hydrocyanic acid, or the biofilm formation. The transcriptional fusion assay indicated that the expression levels of *rsmY*, *rsmXI*, and *gacA* were not changed in the *opgGH* mutant compared with the wild type. The data suggested that *opgGH* regulated the production of 2,4-DAPG in a Gac/Rsm-independent manner. [Conclusion] The *opgGH* operon is essential for the regulation of 2,4-DAPG production, swimming mobility, and antifungal effect, serving as a key regulator for the biocontrol capacity of *P. fluorescens* 2P24. **Keywords:** *Pseudomonas fluorescens*; *opgGH*; 2,4-diacetylphloroglucinol (2,4-DAPG); motility; quorum sensing

荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 2P24 分离自小麦全蚀病自然衰退土壤, 可防治多种植物病原细菌、真菌引起的土传病害<sup>[1]</sup>。前期研究表明菌株 2P24 可以产生多种抗菌次生代谢产物, 如 2,4-二乙酰基间苯三酚 (2,4-diacetylphloroglucinol, 2,4-DAPG)、氢氰酸 (HCN)、嗜铁素和蛋白酶等<sup>[1]</sup>。经遗传学研究发现, 2,4-DAPG 在菌株 2P24 防治植物病害过程中起到关键作用, 缺失该抗生素可明显降低菌株 2P24 对番茄青枯病的防治效果<sup>[2]</sup>。2,4-DAPG

是间苯三酚(phloroglucinol, PG)的一种衍生物, 菌株 2P24 中 *phlACBD* 操纵子负责合成该物质。其中 *phlD* 基因编码三型聚酮合成酶, 该酶以丙二酰辅酶 A 为底物, 生成间苯三酚<sup>[3]</sup>。而 *phlA*、*phlC* 和 *phlB* 基因的编码产物组成乙酰转移酶复合体(acetyl transferase), 负责将 PG 转化为单乙酰基间苯三酚(monoacetylphloroglucinol, MAPG)以及后续 MAPG 的乙酰化, 最终合成 2,4-DAPG<sup>[3-4]</sup>。

虽然通过产生抗生素 2,4-DAPG 可增强菌株在土壤根围的竞争力, 但细胞内过多的

2,4-DAPG 也对细菌本身造成不利影响, 因此 2,4-DAPG 的合成受到多种因素的严格调控。首先, 环境因素如不同碳氮源可影响 2,4-DAPG 的产生。前期研究发现, 菌株 2P24 以葡萄糖为碳源可促进 2,4-DAPG 的产生; 而以果糖为碳源时则完全不产生 2,4-DAPG, 对棉花立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*) 也没有拮抗能力<sup>[5]</sup>。葡萄糖进入细菌细胞后, 细菌有多种途径可对葡萄糖进行代谢, 其中一条代谢途径是在葡萄糖脱氢酶 Gcd 作用下生成葡萄糖酸, 进而被进一步代谢<sup>[6]</sup>。有意思的是, 菌株 2P24 可通过硫氧还蛋白 DsbA1 调控 Gcd 的酶活, 从而影响 2,4-DAPG 的产生<sup>[7]</sup>。另外, 多个遗传因子在不同信号通路中调控 2,4-DAPG 的产生。特异性因子 PhIF 和 PhIH 分别通过结合 *phlACBD* 启动子区域和影响 *phlG* (编码 2,4-DAPG 特异性降解酶) 表达调控 2,4-DAPG 的产生<sup>[8-9]</sup>。GacS/GacA 双组份调控系统可促进小 RNA (small non-coding RNA, sRNA) RsmX、RsmX1、RsmY 和 RsmZ 的表达, 这些小 RNA 分子能竞争性结合 RsmA 和 RsmE, 解阻遏 RsmA 和 RsmE 对 *phlACBD* mRNA 的结合, 促进了 *phlACBD* mRNA 的翻译<sup>[10-11]</sup>, 从而促进 2,4-DAPG 的产生。

本实验室前期研究以拮抗能力为筛选指标对菌株 2P24 进行 Tn5 随机突变, 在大约 4 000 株突变体中筛选得到 18 株拮抗能力明显降低的突变体, 其中 1 个突变体中 Tn5 破坏了 *opgG* 基因。许多细菌中, *opgG* 基因和 *opgH* 基因组成一个操纵子, 负责渗透调节的周质葡聚糖 (osmoregulated periplasmic glucans, OPGs) 生物合成。前期研究表明, 许多病原细菌中, *opgGH* 操纵子调控多个致病性相关基因的表达。如 *Escherichia coli* 中, *opgGH* 操纵子参与调控趋化性及游动性等, 而流产布鲁氏菌 (*Brucella abortus*) 中, OPGs 的分泌是该菌株入

侵寄主的早期阶段所必需的<sup>[12-13]</sup>。同样在小肠结肠炎耶尔森菌 (*Yersinia enterocolitica*) 中, OPGs 则影响其生物膜结构<sup>[14]</sup>。然而在生防相关细菌中 *opgGH* 操纵子对次生代谢产物的影响还未有报道。

本文在前期研究基础上, 构建了 *opgGH* 突变菌株, 检测该突变菌株中抗生素 2,4-DAPG、QS 信号分子、生物膜和游动性等变化, 探究了菌株 2P24 中 *opgGH* 操纵子对上述生防相关性状的调控作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

荧光假单胞菌 (*P. fluorescens*) 2P24 菌株 (其全基因组在 GenBank 登录号: CP025542)、棉花立枯丝核菌 (*R. solani*) 由中国农业大学张力群实验室分离保存。

LB (lysogenic broth) 固体培养基: 胰蛋白胨 10 g, 酵母粉 5 g, NaCl 5 g, 琼脂 10 g, H<sub>2</sub>O 1 000 mL; LB 液体培养基: 胰蛋白胨 10 g, 酵母粉 5 g, NaCl 5 g, H<sub>2</sub>O 1 000 mL; KB (King's B) 液体培养基: 蛋白胨 29 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 1.96 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.96 g, 甘油 8 mL, H<sub>2</sub>O 1 000 mL; 马铃薯葡萄糖琼脂 (potato dextrose agar, PDA) 培养基: 马铃薯 100 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 10 g, H<sub>2</sub>O 1 000 mL。

### 1.2 突变菌株 W3 中 Tn5 的定位

十六烷基三甲基溴化铵 (cetyltrimethylammonium bromide, CTAB) 法提取突变菌株 W3 基因组后利用鸟枪法克隆 Tn5 及其两侧 DNA 序列并测序, 所得序列经在线 BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 对比后, 即可确定 Tn5 插入位置。

### 1.3 *opgGH* 基因内缺失突变体的构建

利用引物 *opgGH*-HindIII-F1 (5'-ATGAAGC

TTAACTACCGTGTGTTTCAGCGACG-3')/opgGH-R1 (5'-ATACGCCAAGGCGTTCTGTTGTGGA CATCTCGCGGAATTTCGTTTCGGCAGA-3') 和 opgGH-F2 (5'-TCTGCCGAACGAATTCGCGA GATGTCCACAACAGAACGCCTTGGCGTAT-3')/ opgGH-XbaI-R2 (5'-CGTCTAGATCGGGTTTACG AGCCTGGACAATC-3')通过 PCR 的方法获得 *opgGH* 基因上下游两端 DNA 片段, 将得到的片段经 *Hind* III-*Xba* I 酶切后, 连接到自杀载体 p2P24Km 中, 获得自杀质粒 p2P24- $\Delta$ opgGH。将该质粒通过电击转化转入菌株 2P24 中, 二次同源重组后即可获得 *opgGH* 内缺失突变菌株。为互补 *opgGH* 内缺失突变菌株, 利用引物 opgGH-HindIII-F1/opgGH-XbaI-R2, 以 2P24 基因组 DNA 为模板扩增得到完整的 *opgGH* 基因, 克隆到质粒 pRK415 中得到用于互补实验的互补载体 p415-opgGH。

#### 1.4 平板对峙培养

在 PDA 培养基平板中央放入直径为 5 mm 的棉花立枯丝核菌菌饼, 然后在距菌饼 2.5 cm 处接种 5 mL 过夜培养的菌株 2P24 及其衍生菌株。晾干, 28 °C 培养 48 h 后测量记录抑菌带直径。

#### 1.5 2,4-DAPG 定量检测

2,4-DAPG 定量检测方法如下: 将 2P24 及其衍生菌株接种于 KB 液体培养基中, 28 °C 培养 24 h 后, 取 1 mL 菌液, 加入 10% 三氟乙酸调节 pH 值至 2.0。然后加入 1 mL 乙酸乙酯, 充分混合后将萃取物旋转蒸干, 干物质溶解于 0.2 mL 甲醇中。2,4-DAPG 具体检测方法参考文献[15]。

#### 1.6 菌株游动性、生物膜形成、群体感应信号分子和 HCN 的检测

菌株 2P24 及其衍生菌株过夜培养后, 取 5 mL 菌液滴到琼脂浓度为 0.2% 的 LB 平板上, 28 °C 培养 16 h, 测量细菌菌落的直径, 即为细菌游动直径。生物膜的检测方法如下: 各待测菌株培养至稳定期后, 按 1:1 000 (体积比) 稀释后取

0.5 mL 菌液到 2 mL 离心管中, 28 °C 静置培养 32 h。各处理加入 0.2 mL 0.1% (质量体积比) 结晶紫溶液染色 15 min 后轻轻倒掉培养物, 加入 1.0 mL 无水乙醇溶解结晶紫后在 570 nm 处检测吸光值。群体感应信号分子的检测方法参照文献[5]。HCN 的检测方法参考文献[1]。

#### 1.7 qRT-PCR

本实验利用 Trizol 法提取细菌总 RNA, 之后利用宝生物反转录试剂盒去除基因组 DNA 并反转 1 mg RNA, 获得的 cDNA 稀释 10 倍后用于后续实时荧光定量 PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)。引物对 *pcoI*-F (5'-ACGCGAGAATATTTCCACCAG-3')/*pcoI*-R (5'-AGCTGGGGAAGGTGTCTTT-3')、*hcnA*-F (5'-GATGCAACCTCAAGACTCTCTACG-3')/*hcnA*-R (5'-TCGATCTGCATGCCTGGCGTACCAG-3') 和 *pelF*-F (5'-CACGGTTATGACGGCCGTTCCCTCG-3')/*pelF*-R (5'-CAGTTGGCTGTTGGCTGGCAGGTATG-3') 分别用于检测 *pcoI*、*hcnA* 和 *pelF* 基因表达水平。选取 30 S 核糖体蛋白编码基因 *rspL* 作为内参基因。本实验用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算基因相对表达水平。

#### 1.8 $\beta$ -半乳糖苷酶的测定

为检测 *gacA*、*phlA*、*rsmX1* 和 *rsmY* 基因的表达水平, 将转录融合质粒 p970Km-*gacAp*、p970Gm-*phlAp*、p970Km-*rsmX1p* 和 p970Km-*rsmYp* 分别电击转化到菌株 2P24 及其衍生菌株中。将获得的菌株接种到 40 mL LB 培养液中, 9 h 后开始取样, 之后每隔 2 h 取样。 $\beta$ -半乳糖苷酶活性测定参考文献[11]。

#### 1.9 高渗透势条件影响菌株 2P24 中 2,4-DAPG 产生

将菌株 2P24 及其 *opgGH* 内缺失突变菌株置于 28 °C 培养 48 h 后, 离心收集菌体后, 用 ddH<sub>2</sub>O 清洗 1 次。将清洗后的细胞用灭菌水重新悬浮后, 转接到含有 100 mmol/L 山梨醇的

KB 液体培养基中, 28 °C 培养 24 h 后取样检测 2,4-DAPG 的含量。

### 1.10 数据统计与分析

试验数据用 Excel 和 SPSS 软件进行统计和分析, 用 Duncan 新复极差法进行显著性分析 ( $P < 0.05$ )。所有试验包含 3 次生物重复, 且每个生物重复进行 3 次技术重复。

## 2 结果与分析

### 2.1 2P24 菌株中 *opgGH* 的筛选与鉴定

实验室前期在筛选影响抗生素 2,4-DAPG 产生的突变体过程中, 利用 Tn5 随机突变获得一株对棉花立枯丝核菌 (*R. solani*) 抑制能力完全消失的突变菌株 W3 (表 1)。遗传学分析表明该突变体中 Tn5 破坏了 *opgG* 基因, *opgG* 与其下游的 *opgH* 基因组成操纵子, 负责渗透调节的质葡聚糖生物合成 (图 1)。

### 2.2 *opgGH* 基因正调控 2,4-DAPG 的产生

为进一步研究 *opgGH* 基因的功能, 本研究构建了 *opgGH* 基因内缺失突变菌株 (图 1)。拮抗实验表明, 缺失 *opgGH* 基因, 菌株 2P24 完全不能抑制病原菌 *R. solani* 的生长, 而野生型菌株

及其互补菌株可明显抑制 *R. solani* 的生长 (表 1)。定量检测相关菌株中 2,4-DAPG 产量发现, 缺失 *opgGH* 基因后, 2,4-DAPG 的产量较野生菌株 2P24 明显降低, 而其互补菌株中 2,4-DAPG 的产量可恢复到野生型菌株水平 (图 2A)。检测 2,4-DAPG 合成基因 *phlA* 发现, 与野生型菌株及其互补菌株相比, *opgGH* 基因内缺失突变菌株中 *phlA* 基因的表达并没有发生显著变化 (图 2B)。该结果表明, 菌株 2P24 中 *opgGH* 基因正调控 2,4-DAPG 的产量。

表 1 菌株 2P24 及其突变体对 *Rhizoctonia solani* 抑制作用及其对 HCN 产生的影响

Table 1 Inhibition of *Rhizoctonia solani* and biosynthesis of HCN by strain 2P24 and its derivatives

Strains	Inhibitory zone (cm)*	HCN <sup>#</sup>
2P24 (pRK415)	0.22±0.03a	+
<i>opgGH</i> mutant (pRK415)	0b	+
<i>opgGH</i> mutant (p415- <i>opgGH</i> )	0.22±0.05a	+
W3	0b	+

\*: Data are averages of three repeats and different letters in the same column indicate a significant difference between the strains at the 0.05 level; <sup>#</sup>HCN detection: “+” indicates HCN-sensitive paper became blue after 48 h incubation.

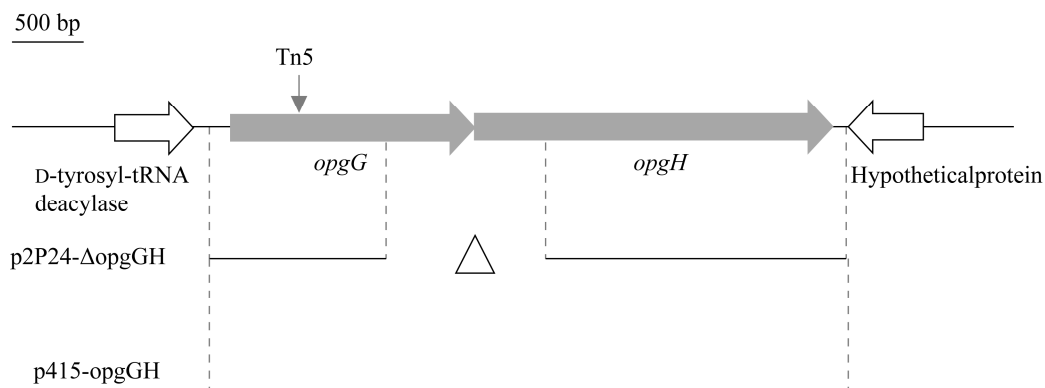


图 1 菌株 2P24 中 *opgGH* 基因物理图谱

Figure 1 Organization of the *opgGH* operon in *Pseudomonas fluorescens* 2P24. The Tn5 insertion in the chromosome of the mutant W3 is indicated as arrow. The bar indicates the fragments cloned into p2P24Km to create the suicide plasmid p2P24- $\Delta$ *opgGH*. The fragment inserted into pRK415 was used to complement the *opgGH* mutant.

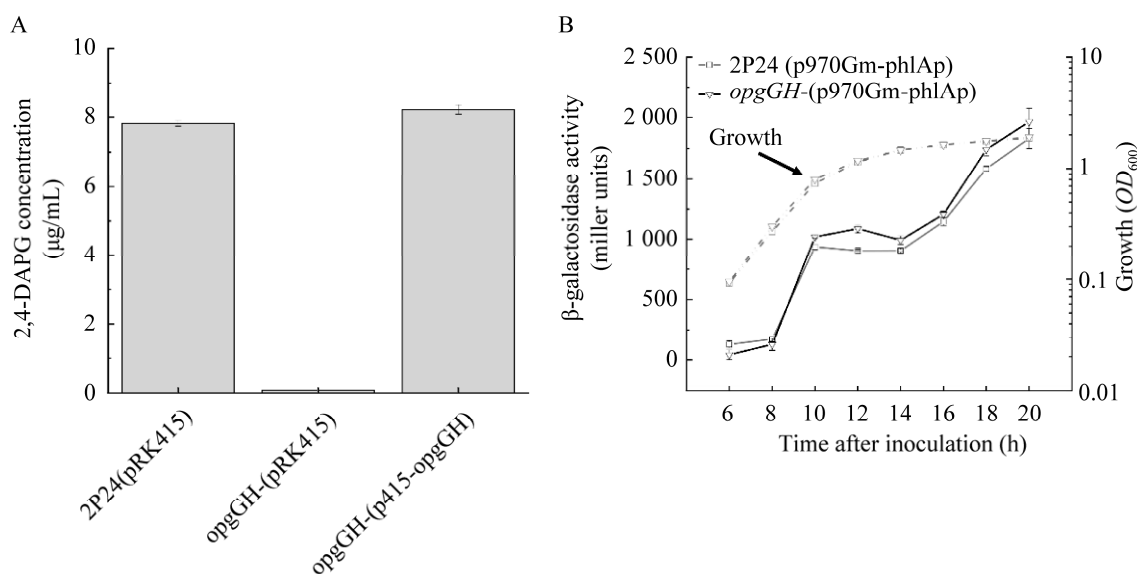


图 2 菌株 2P24 中 *opgGH* 基因调控抗生素 2,4-DAPG 产生

Figure 2 The production of 2,4-DAPG was positively regulated by the *opgGH* operon in *Pseudomonas fluorescens* 2P24. A: HPLC analysis of the concentration of 2,4-DAPG by the strains 2P24 (pRK415), the *opgGH* mutant (pRK415), and the *opgGH* mutant (p415-*opgGH*). B: The expression of *phlA-lacZ* transcriptional fusion was determined in strains 2P24 and its *opgGH* mutant. Growth is indicated by dotted lines. Means with different letters are significantly different at  $P < 0.05$ .

### 2.3 *opgGH* 基因对其他生防相关因子的影响

为研究 *opgGH* 基因是否影响菌株 2P24 中其他生防相关因子的产生, 本文检测了菌株 2P24 中 HCN、QS 系统信号分子、生物膜和游动性是否受到 *opgGH* 基因的影响。结果表明, 突变 *opgGH* 基因并不影响 QS 系统信号分子产量(图 3A)、生物膜的形成(图 3B)及 HCN 的产生(表 1)。为进一步验证 *opgGH* 基因对上述表型的影响, 本研究利用 qRT-PCR 检测了菌株 2P24 及其 *opgGH* 突变体中 QS 系统信号合成基因 *pcol*、HCN 合成基因 *hcnA* 和参与多糖(polysaccharide)合成过程的 *pelF* 基因(polysaccharide 对生物膜的形成至关重要)<sup>[16]</sup> 的表达情况。结果表明, 突变 *opgGH* 基因并不影响 *pcol*、*hcnA* 和 *pelF* 基因的表达(图 3C)。然而, 与野生型菌株 2P24 及其互补菌株相比, 缺失 *opgGH* 基因可显著降低菌株 2P24 的游动性, 该结果表明 *opgGH* 基因正调控菌株 2P24 的游动能力(图 3D)。

### 2.4 *opgGH* 基因不通过 Gac/Rsm 信号通路影响 2,4-DAPG 的产生

菌株 2P24 中 2,4-DAPG、QS 信号分子和 HCN 等生防相关性状受到 Gac/Rsm 信号通路的严格调控<sup>[1]</sup>, 而本研究结果表明 *opgGH* 基因正调控 2,4-DAPG 的产生, 但不影响 QS 信号分子等其他生防相关性状的表达, 推测 *opgGH* 基因可能不通过 Gac/Rsm 信号通路影响 *phlA* 基因的表达。为验证这一假设, 本研究检测了 Gac/Rsm 信号通路相关基因的表达。转录报告融合实验表明, 与野生菌株 2P24 相比, 突变 *opgGH* 基因并没有明显影响 *gacA* 基因的表达(图 4A)。另外, 受 GacA 调控的 sRNA 分子编码基因 *rsmX1* 和 *rsmY* 的表达也没有发生显著变化(图 4B、4C)。这些结果表明 *opgGH* 基因调控 2,4-DAPG 的产生可能不依赖于 Gac/Rsm 信号传导系统, 推测其可能通过 RcsCD-RcsB 调控系统影响 2,4-DAPG 的产生。

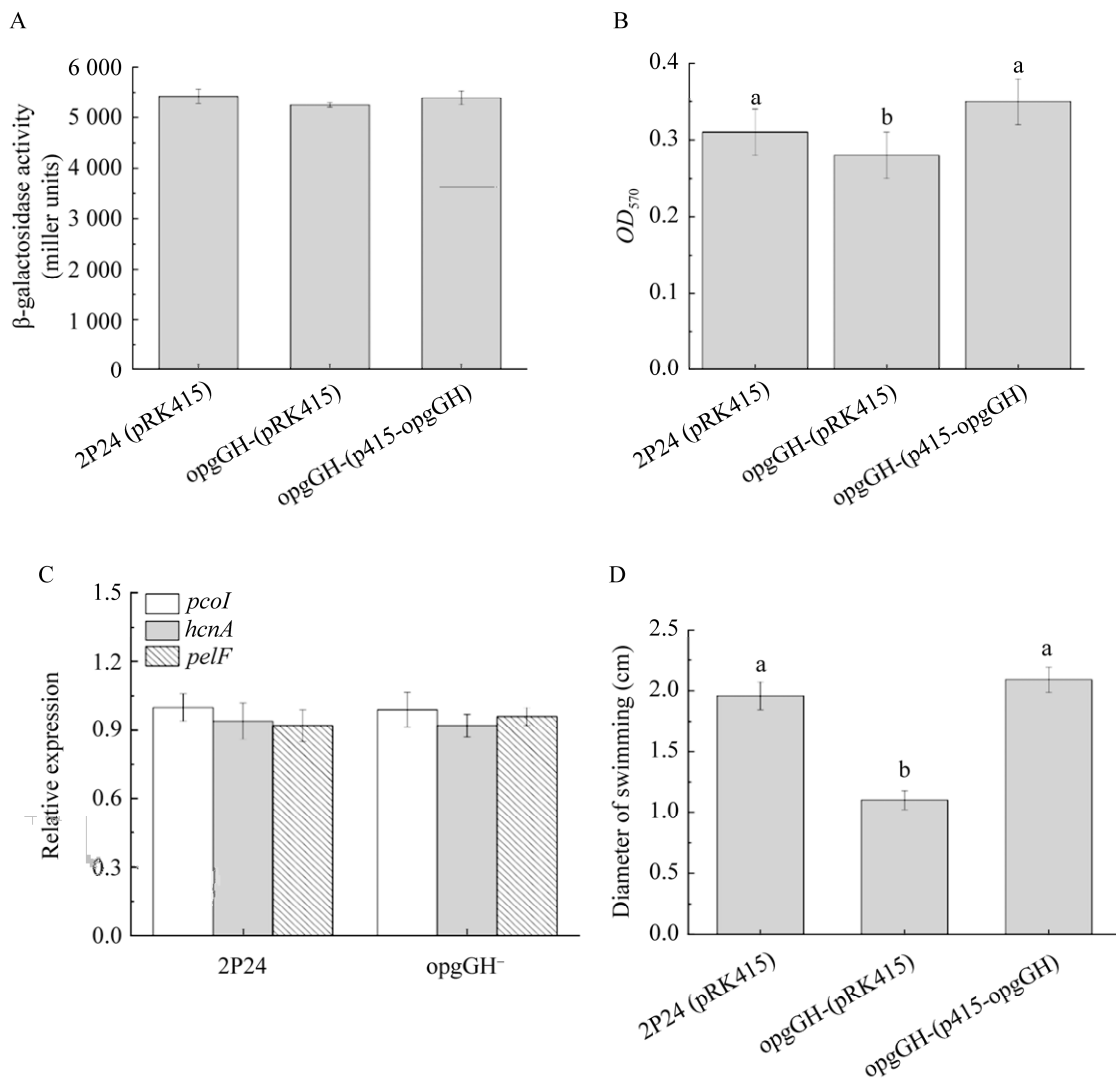


图3 *opgGH* 基因影响菌株 2P24 其他生防相关性状

Figure 3 The effect of the *opgGH* operon on other biocontrol traits of *Pseudomonas fluorescens* 2P24. The production of QS signals (A), the formation of biofilm (B), the expression of *pcoI*, *hcnA*, and *pelF* (C), and swimming motility (D) were determined in *P. fluorescens* 2P24 and its derivatives. Means with different letters are significantly different at  $P < 0.05$ .

## 2.5 高渗透势影响菌株 2P24 中 2,4-DAPG 的产生

前期研究表明高渗透势可影响 OpgGH 蛋白水平, 本研究检测了 100 mmol/L 山梨醇逆境条件是否通过 OpgGH 影响菌株 2P24 中 2,4-DAPG 的产量。结果(图 5)表明, 100 mmol/L 山梨醇高

渗透势条件可显著降低菌株 2P24 中 2,4-DAPG 的产生; 而突变 *opgGH* 基因后, 100 mmol/L 山梨醇高渗透势条件并未明显影响菌株 2P24 中 2,4-DAPG 的产生(图 5)。因此, 菌株 2P24 中高渗透势可能是通过 OpgGH 影响 2,4-DAPG 的产量。

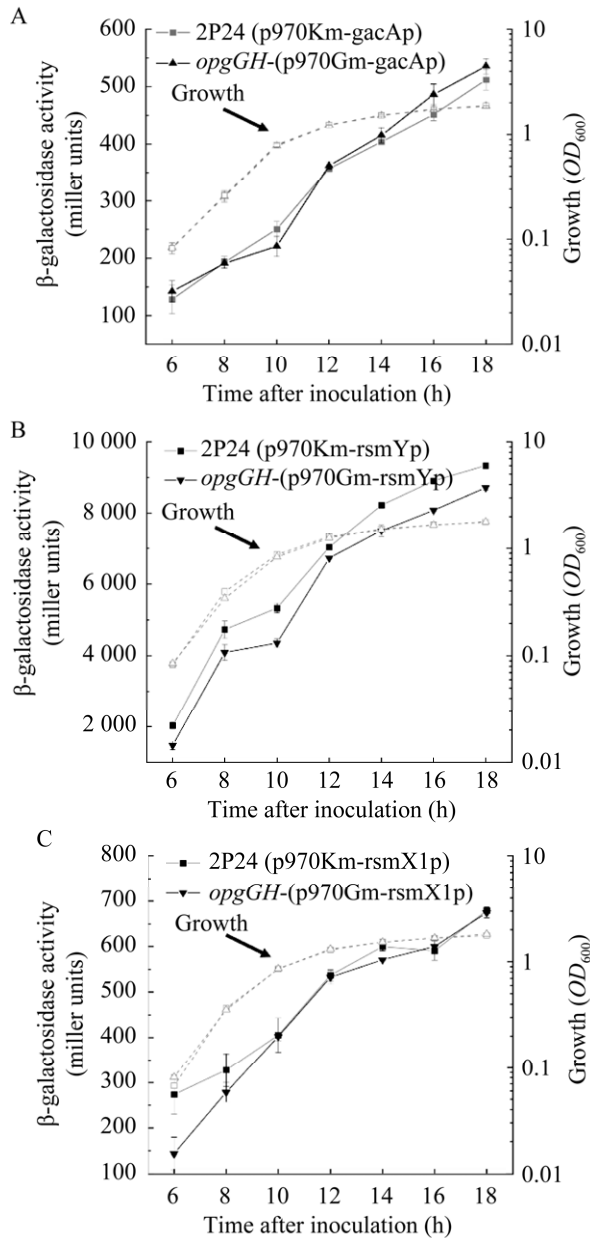


图4 *opgGH* 基因不通过 Gac/Rsm 信号系统影响 2,4-DAPG 的产生

Figure 4 The *opgGH* operon regulating the production of 2,4-DAPG was not through the Gac/Rsm signaling pathway in *Pseudomonas fluorescens* 2P24. The expression of the *gacA-lacZ* transcriptional fusion (A), the *rsmY-lacZ* transcriptional fusion (B), and the *rsmX1-lacZ* transcriptional fusion (C) was determined in strain 2P24 and its *opgGH* mutant, respectively. Growth is indicated by dotted lines. The experiments were performed in triplicate, and the mean values $\pm$ standard deviations are indicated.

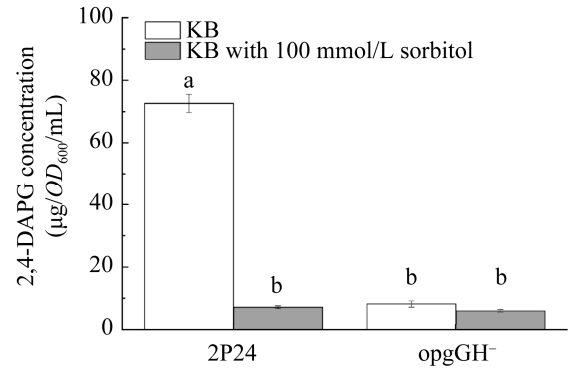


图5 菌株 2P24 中渗透压调控 2,4-DAPG 的产生  
Figure 5 Osmoregulation of 2,4-DAPG production in *Pseudomonas fluorescens* 2P24. Quantification of 2,4-DAPG in strain 2P24 and its *opgGH* mutant in KB medium and KB medium supplemented with sorbitol (100 mmol/L). Means with different letters are significantly different at  $P < 0.05$ .

### 3 讨论与结论

前人的研究表明, 抗生素 2,4-DAPG 的产生、代谢受到多种环境因子以及遗传因子的严格调控, 2,4-DAPG 产量过低不利于产生菌在环境中的竞争; 而过量产生 2,4-DAPG 不仅对作物有毒害作用, 还会影响菌株本身的正常生理代谢, 从而影响菌株自身生长<sup>[8,17]</sup>。因此对抗生素 2,4-DAPG 调控的进一步研究有利于在农业生产过程中更合理的利用生防菌株资源。

本研究利用遗传学方法证明 *opgGH* 操纵子正调控抗生素 2,4-DAPG 的产生, 缺失该操纵子可显著影响菌株 2P24 中抗生素 2,4-DAPG 的产量。前期研究表明, *opgGH* 操纵子编码蛋白 OpgG 和 OpgH 负责合成渗透调节的周质葡聚糖, 是细菌细胞壁重要组成成分, 在许多细胞过程如毒性、游动性、抗生素抗性、渗透适应性、细菌细胞大小和定殖等方面起到重要作用<sup>[18]</sup>。OPGs 与环境渗透势有密切关系, 对 *E. coli*、肠道沙门氏菌 (*Salmonella enterica*)、*Dickeya dadantii* 和 *P. aeruginosa* 等细菌的研究中发现,



当培养基中渗透势增加时, OPGs 的浓度则显著下降<sup>[18-20]</sup>。然而在植物促生细菌 *Pantoea algagi* 中, 细胞中 OPGs 的浓度随培养基中渗透势的增加而增加<sup>[21]</sup>。同样菌株 2P24 中, 突变 *opgGH* 基因可显著降低菌株 2P24 的游动性, 而互补菌株的游动性可恢复到野生型水平, 表明 *opgGH* 基因正调控菌株 2P24 的游动性。另外, 本研究结果表明, 高渗透势可抑制抗生素 2,4-DAPG 的产生, 然而缺失 *opgGH* 基因并不能观察到这种抑制作用, 推测菌株 2P24 中高渗透势可能通过 OPGs 影响抗生素 2,4-DAPG 的产生。

GacS/GacA 系统是广泛存在于革兰氏阴性细菌中的一套双因子调控系统, 控制着多种细菌重要的生物学功能。其中定位于膜上的感应激酶 GacS 通过感应外界信号分子, 自体磷酸化后, 将磷酸基团传递给其对应的反应调控因子 GacA。磷酸化的 GacA 通过结合非编码 RNA 编码基因启动子区域, 转录激活这些小 RNA 的表达。菌株 2P24 中, 小 RNA 分子 RsmZ、RsmY、RsmX 和 RsmX1 可特异性竞争结合 CsrA 类蛋白 RsmA 和 RsmE, 从而解阻遏 RsmA 和 RsmE 对 2,4-DAPG 和 QS 系统的抑制作用<sup>[11,22]</sup>。有意思的是, 植物病原细菌 *D. dadantii* 中, OpgGH 可通过调控其唯一的小 RNA RsmB 影响下游相关基因如 *hrpA*、*hrpN* 和 *dspE* 等基因的表达<sup>[23]</sup>。然而, 转录融合实验表明, 菌株 2P24 中 OpgGH 并不影响 *gacA* 基因及其调控的 *rsmX1* 和 *rsmY* 基因的表达(图 4); 另外, 与 GacS/GacA 调控系统相比, 缺失 *opgGH* 基因并不影响 QS 信号分子的产生, 表明 OpgGH 不是通过 Gac/Rsm 信号通路调控 2,4-DAPG 的产生(图 3)。前期研究表明, OPGs 可能作为信号分子影响 RcsCD-RcsB 调控系统, 如 *E. coli* 中, OPGs 的缺少可激活 RcsCD-RcsB 调控系统, 进而抑制细菌的游动性; 同时可提高菌株对抗生素的

耐受<sup>[24-25]</sup>; 而 *D. dadantii* 中缺失 *opgGH* 操纵子也能导致该调控系统的组成型表达, 并影响该菌株的致病性及游动性<sup>[26]</sup>。革兰氏阴性细菌中 RcsCD-RcsB 调控系统相对保守<sup>[27]</sup>, 菌株 2P24 中同样存在该系统, 因此下一步工作将进一步研究 OpgGH 对 RcsCD-RcsB 调控系统的影响, 从而阐明 OpgGH 对抗生素 2,4-DAPG 精细的调控。本研究结果也表明缺失 *opgGH* 操纵子并不影响菌株 2P24 中 QS 信号分子的产生和生物膜的形成, 同样在机会性病原细菌 *P. aeruginosa* 中, 无论在低渗透势条件下还是高渗透势条件下缺失 *opgGH* 均不影响生物膜的形成<sup>[18]</sup>; 而病原细菌 *Y. enterocolitica* 中 OPGs 则可诱导生物膜形成相关基因的表达, 从而影响生物膜的结构<sup>[14]</sup>。由于 QS 系统和生物膜的形成受到多种遗传因素的影响<sup>[28]</sup>, 且不同菌株遗传背景存在较大差异, 可能是造成缺失 *opgGH* 操纵子产生不同表型的因素。

综上所述, 本研究明确了菌株 2P24 中 *opgGH* 操纵子对抗生素 2,4-DAPG、游动性等生防相关性状的调控作用。研究结果为遗传改造生防菌株 2P24 以适应高渗透势等外界环境, 从而发挥稳定的防病效果提供新的遗传材料。

## 参考文献

- [1] 魏海雷, 王焯, 张力群, 唐文华. 生防菌株 2P24 与 CPF-10 的鉴定及其生防相关性状的初步分析[J]. 植物病理学报, 2004, 34(1): 80-85.  
WEI HL, WANG Y, ZHANG LQ, TANG WH. Identification and characterization of biocontrol bacterial strain 2P24 and CPF-10[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2004, 34(1): 80-85 (in Chinese).
- [2] 魏海雷, 周洪友, 张力群, 王焯, 唐文华. 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[J]. 微生物学报, 2004, 44(5): 663-666.  
WEI HL, ZHOU HY, ZHANG LQ, WANG Y, TANG

- WH. Experimental evidence on the functional agent of 2,4-diacetylphloroglucinol in biocontrol activity of *Pseudomonas fluorescens* 2P24[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2004, 44(5): 663-666 (in Chinese).
- [3] DONG QL, YAN Q, ZHANG B, ZHANG LQ, WU XG. Effect of the monothiol glutaredoxin GrxD on 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis and biocontrol activity of *Pseudomonas fluorescens* 2P24[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 920793.
- [4] LEVENFORS JJ, NORD C, BJERKETORP J, STÅHLBERG J, LARSSON R, GUSS B, ÖBERG B, BROBERG A. Antibacterial pyrrolidiny and piperidiny substituted 2,4-diacetylphloroglucinols from *Pseudomonas protegens* UP46[J]. *The Journal of Antibiotics*, 2020, 73(11): 739-747.
- [5] 张燕, 张阳, 张博, 吴小刚, 张力群. 不同碳源对生防荧光假单胞菌 2P24 产抗生素 2,4-二乙酰基间苯三酚的影响[J]. *微生物学报*, 2018, 58(7): 1202-1212. ZHANG Y, ZHANG Y, ZHANG B, WU XG, ZHANG LQ. Effect of carbon sources on production of 2,4-diacetylphloroglucinol in *Pseudomonas fluorescens* 2P24[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(7): 1202-1212 (in Chinese).
- [6] de WERRA P, PÉCHY-TARR M, KEEL C, MAURHOFER M. Role of gluconic acid production in the regulation of biocontrol traits of *Pseudomonas fluorescens* CHA0[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(12): 4162-4174.
- [7] ZHANG B, ZHAO H, WU XG, ZHANG LQ. The Oxidoreductase DsbA1 negatively influences 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis by interfering the function of Gcd in *Pseudomonas fluorescens* 2P24[J]. *BMC Microbiology*, 2020, 20(1): 39.
- [8] 周宇平, 吴小刚, 周洪友, 何月秋, 张力群. 荧光假单胞菌 2P24 中 *phlF* 基因对抗生素 2,4-二乙酰基间苯三酚产生的影响[J]. *植物病理学报*, 2010, 40(2): 144-150. ZHOU YP, WU XG, ZHOU HY, HE YQ, ZHANG LQ. Effect of gene *phlF* on 2,4-diacetylphloroglucinol production in *Pseudomonas fluorescens* 2P24[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2010, 40(2): 144-150 (in Chinese).
- [9] ZHANG NN, WU J, ZHANG SP, YUAN MR, XU H, LI J, ZHANG PP, WANG MZ, KEMPER ML, TAO XY, ZHANG LQ, GE HH, HE YX. Molecular basis for coordinating secondary metabolite production by bacterial and plant signaling molecules[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2022, 298(6): 102027.
- [10] EVANS AF JR, WELLS MK, DENK J, MAZZA W, SANTOS R, DELPRINCE A, KIM W. Spatial structure formation by RsmE-regulated extracellular secretions in *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1[J]. *Journal of Bacteriology*, 2022, 204(10): e0028522.
- [11] ZHANG Y, ZHANG B, WU X, ZHANG L. Characterization the role of GacA-dependent small RNAs and RsmA family proteins on 2,4-diacetylphloroglucinol production in *Pseudomonas fluorescens* 2P24[J]. *Microbiological Research*, 2020, 233: 126391.
- [12] WEISSBORN AC, RUMLEY MK, KENNEDY EP. Isolation and characterization of *Escherichia coli* mutants blocked in production of membrane-derived oligosaccharides[J]. *Journal of Bacteriology*, 1992, 174(14): 4856-4859.
- [13] BRIONES G, IÑÓN de IANNINO N, ROSET M, VIGLIOCCO A, PAULO PS, UGALDE RA. *Brucella abortus* cyclic beta-1,2-glucan mutants have reduced virulence in mice and are defective in intracellular replication in HeLa cells[J]. *Infection and Immunity*, 2001, 69(7): 4528-4535.
- [14] MENG J, XU JG, CHEN JY. The role of osmoregulated periplasmic glucans in the biofilm antibiotic resistance of *Yersinia enterocolitica*[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2020, 147: 104284.
- [15] SHANAHAN P, O'SULLIVAN DJ, SIMPSON P, GLENNON JD, O'GARA F. Isolation of 2,4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58(1): 353-358.
- [16] GHAFOOR A, JORDENS Z, REHM BHA. Role of PelF in pel polysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(9): 2968-2978.
- [17] REIMMANN C, VALVERDE C, KAY E, HAAS D. Posttranscriptional repression of GacS/GacA-controlled genes by the RNA-binding protein RsmE acting together with RsmA in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0[J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(1): 276-285.
- [18] LEQUETTE Y, ROLLET E, DELANGLE A, GREENBERG EP, BOHIN JP. Linear osmoregulated periplasmic glucans are encoded by the *opgGH* locus of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Microbiology (Reading, England)*, 2007, 153(Pt 10): 3255-3263.

- [19] BHAGWAT AA, JUN W, LIU L, KANNAN P, DHARNE M, PHEH B, TALL BD, KOTHARY MH, GROSS KC, ANGLE S, MENG JH, SMITH A. Osmoregulated periplasmic glucans of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* are required for optimal virulence in mice[J]. *Microbiology (Reading, England)*, 2009, 155(Pt 1): 229-237.
- [20] BONTEMPS-GALLO S, MADEC E, DONDEYNE J, DELRUE B, ROBBE-MASSELOT C, VIDAL O, PROUVOST AF, BOUSSEMART G, BOHIN JP, LACROIX JM. Concentration of osmoregulated periplasmic glucans (OPGs) modulates the activation level of the RcsCD RcsB phosphorelay in the phytopathogen bacteria *Dickeya dadantii*[J]. *Environmental Microbiology*, 2013, 15(3): 881-894.
- [21] LI SY, LIANG H, WEI ZY, BAI HN, LI MY, LI QQ, QU M, SHEN XH, WANG Y, ZHANG L. An osmoregulatory mechanism operating through OmpR and LrhA controls the motile-sessile switch in the plant growth-promoting bacterium *Pantoea alhagi*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85(10): e00077-e00019.
- [22] YAN Q, WU X, WEI HL, WANG H, ZHANG L. Differential control of the PcoI/PcoR quorum-sensing system in *Pseudomonas fluorescens* 2P24 by sigma factor RpoS and the GacS/GacA two-component regulatory system[J]. *Microbiological Research*, 2009, 164(1): 18-26.
- [23] WU XG, ZENG Q, KOESTLER BJ, WATERS CM, SUNDIN GW, HUTCHINS W, YANG CH. Deciphering the components that coordinately regulate virulence factors of the soft rot pathogen *Dickeya dadantii*[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 2014, 27(10): 1119-1131.
- [24] GIRGIS HS, LIU Y, RYU WS, TAVAZOIE S. A comprehensive genetic characterization of bacterial motility[J]. *PLoS Genetics*, 2007, 3(9): 1644-1660.
- [25] MURAKAMI K, NASU H, FUJIWARA T, TAKATSU N, YOSHIDA N, FURUTA K, KAITO C. The absence of osmoregulated periplasmic glucan confers antimicrobial resistance and increases virulence in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2021, 203(12): e0051520.
- [26] MADEC E, BONTEMPS-GALLO S, LACROIX JM. Increased phosphorylation of the RcsB regulator of the RcsCDB phosphorelay in strains of *Dickeya dadantii* devoid of osmoregulated periplasmic glucans revealed by *Phos*-tag gel analysis[J]. *Microbiology (Reading, England)*, 2014, 160(Pt 12): 2763-2770.
- [27] MENG J, YOUNG G, CHEN JY. The *res* system in *Enterobacteriaceae*: envelope stress responses and virulence regulation[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 627104.
- [28] MATILLA MA, MARTÍN-MORA D, GAVIRA JA, KRELL T. *Pseudomonas aeruginosa* as a model to study chemosensory pathway signaling[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2021, 85(1): e00151-20.