

gacS 基因插入失活对绿针假单胞菌 G-05 的两种胞外次生代谢物合成的影响

葛宜和¹, 陈丽娟², 王磊¹, 宿红艳¹, 周金凤¹, 程显好¹

(鲁东大学¹生命科学学院,²医院, 烟台 264000)

摘要: 一株来自大棚温室甜椒根际的绿针假单胞菌 *Pseudomonas chlororaphis* G-05, 可分泌抗生物物质吩嗪-1-羧酸, 并具有抑制辣椒疫霉的生物防治功效。【目的】为了系统研究该菌株的生物防治功能及抗生物物质合成与分泌机制。【方法】首先通过生化法和 16S rDNA 同源比对法对该菌株进行系统分类的初步鉴定, 再根据基因的同源性从 G-05 基因组 DNA 中克隆长 1.4 kb 的 *gacS* 基因的部分保守区段, 采用抗庆大霉素基因 (gentamycin resistance cassette, *aacC1*) 插入失活的策略构建了该基因突变株 G-05S。【结果】在 King's B (KMB) 或 PPM 培养基中, 突变株 G-05S 合成吩嗪-1-羧酸的能力受到明显抑制。然而, 突变株 G-05S 分泌的吲哚乙酸与野生株相比无显著差异。互补实验表明, *gacS* 基因的表达可以使突变株 G-05S 的吩嗪-1-羧酸的合成恢复到野生株水平。【结论】由此推测, GacS(Global activator sensor) 对不同次生代谢物的调控具有特异性。

关键词: 绿针假单胞菌; 代谢调控; *gacS*; 吩嗪-1-羧酸; 生长素

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 12-1595-07

在植物根际土壤中, 定植的微生物群落中除了危害作物生长的病原真菌、细菌外, 还存在一些可抑制病原真菌、细菌定植和生长的细菌, 因它们一定程度上可防止病害的发生而具有一定生物防治功能。根据文献报道, 除芽孢杆菌外, 根际周围具生物防治功能的主要类群为假单胞菌属^[1]。假单胞菌不仅可通过分泌某些调控因子诱导植物抵御不良环境的胁迫, 促进植物生长, 而且还通过合成并分泌抗生物物质, 籍以抑制或杀死植物根际有害的细菌和真菌, 以控制植物的病害发生^[2]。不同的假单胞菌菌株所分泌抗生物物质的种类和数量不同, 目前已报道的由假单胞菌合成的抗生物物质主要有吩嗪及其衍生物、藤黄绿脓菌素 (Pyoluteorin, Plt)、2, 4-二乙酰基间苯三酚 (2,4-diacetylphloroglucinol, Phl)、硝吡咯菌素、氢氰酸 (Hydrogen cyanide, HCN) 和脂多肽等^[3]。这些抗生物物质在其合

成的过程中, 像其它次生代谢物一样受多种调控因子的调控。在众多的调控网络中, 双组分调控系统 GacS/GacA 在多种革兰阴性细菌的次生代谢中起着极为重要全局调控作用^[4]。研究显示, GacS 属一种跨膜传感磷酸激酶 (Sensor kinase), 当菌体生长达到一定密度后, GacS 接受某种胞外信号, 使位于胞质内的配位因子 GacA (Activator) 因磷酸化而激活, 从而引发转录或转录后水平上全局性调控细菌的次生代谢、菌体移动及色素合成等^[2,3]。在假单胞菌 CHA0 中, 抗生物物质 Phl、Plt 和 HCN 的合成必须 GacS/GacA 的激活^[4]。而在荧光假单胞菌 2P24 中, 当 *gacS* 基因失活后, 其次生代谢物 2, 4-二乙酰基间苯三酚的合成受到明显抑制^[5]; 在假单胞菌 M18 中, 当 *gacA* 基因突变以后, 次生物物质吩嗪-1-羧酸的合成量却显著提高^[6]。显然, 不同菌株的同一双组分调控系统的调控

基金项目: 江苏省高校自然科学基金计划(05KJB180010); 鲁东大学科技基金(20063302); 鲁东大学实验室开放计划

作者简介: 葛宜和(1969-), 男, 江苏宿迁人, 副教授, 理学博士, 研究方向为细菌、真菌次生代谢调控方式与机制。Tel: +86-535-6681053;

Fax: +86-535-6697636; E-mail: geyihe@ldu.edu.cn

收稿日期: 2008-04-16; 修回日期: 2008-09-14

方式和调控结果并非完全相同。

从江苏淮安市淮阴区沈渡村大棚温室的甜椒根际土壤中分离并获得一株假单胞菌。平板对峙实验显示,该菌在 PDA 平板上对辣椒疫霉、终极腐霉等病原真菌的生长具较明显的抑制作用。经培养液的 TLC 和 HPLC 分析,该菌株可合成吩嗪-1-羧酸。此外,根据 16S rDNA 的克隆与序列比对分析,显示该菌株与致金色假单胞菌 (*P. aureofaciens*) 和绿针假单胞菌 (*P. chlororaphis*) 同源性最高。根据上述初步分析结果,将该菌株定为绿针假单胞菌 G-05 (*P. chlororaphis* G-05)。

目前,在大棚温室果蔬生产过程中,因致病性真菌、细菌而引起的病害尤为严重,而传统的防治方法仍是大量、频繁使用化学农药。然而这种化学防治所造成的果蔬、粮食中农药残留超标以及土壤微环境恶化等问题,已引起了社会的广泛关注,因此研究、开发可替代化学农药的微生物制剂或生物农药具有巨大的市场潜力和应用前景。而目前市场上已有的生物农药或相关产品生防功能不强、防治效果不太理想,极大地阻碍了生物农药的推广使用。因此,设法促进

生防菌株抗生物质的合成量、提高生防菌株的生防功能自然成为研究者关注的焦点。基于此点,在初步探明了绿针假单胞菌 G-05 的生防功能的基础上,从基因水平上研究其抗生物质合成代谢的调控机制,将为构建生防功能强的工程菌株、提高该菌株的生防效果奠定基础。

为了鉴定该菌株吩嗪-1-羧酸及其它次生代谢物合成代谢是否与 GacS/GacA 调控相关及可能的调控方式,本研究通过设计引物和 PCR,从该菌基因组 DNA 中克隆了 *gacS* 基因相对保守区段,并以此构建了 *gacS* 的抗庆大霉素基因插入失活突变株 G-05S。通过分别对突变株和野生株的合成代谢的动力学分析,验证了吩嗪-1-羧酸和吡啶乙酸等次生代谢物生物合成及积累与 GacS/GacA 双组分调控系统的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 本研究所涉及的菌株、质粒及其来源见表 1。

表 1 菌株和质粒
Table 1 Strains and plasmids

Strains and plasmids	Characteristics	Source
Strains		
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(rk⁻mk⁺)supE44 re1A1</i>	Lab collection
<i>E. coli</i> SM10	F ⁻ <i>thi-1 thr-1 leuB6 recA tonA21 lacY1 supE44</i> (Mu ^{c+}) λ^- Km ^r	Lab collection
<i>P. chlororaphis</i> G-05	PHz ⁺ producer, Amp ^R Spe ^R	Lab collection
<i>P. chlororaphis</i> G-05S	PHz ⁻ producer, Amp ^R Spe ^R Gen ^R , <i>gacS</i> :: <i>aacCI</i>	This study
Plasmids		
pUCm-T	ColE, cloning and sequencing vector, Amp ^R	Sangon, Shanghai
pUC-S	pBluscriptSK containing 1.4 kb <i>gacS</i> gene fragment	This study
pME6032	<i>LacI</i> ^q -p _{tac} expression vector; Tet ^R	Haas D
pE-S	pME6032 containing 3.0 kb <i>Bam</i> HI fragment of <i>gacS</i> gene	reference[5]
pEX18Tc	Suicide vector; ColEI replicon, IncP-1-mob, Tet ^R	Haas D
pEXT-S	A <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III fragment of the <i>gacS</i> gene inserted in pEX18Tc, Tet ^R	This study
pUCGm	Resource of gentamycin resistance cassette (<i>aacCI</i>)	Thomashow LS
pEXT-SG	0.8 kb <i>aacCI</i> cassette inserted into <i>gacS</i> gene in pEXT-S, Tet ^R , Gen ^R	This study

1.1.2 培养基和培养条件: 大肠杆菌的培养基为 Luria-Bertani (LB), 在 37 条件下振荡培养; 绿针假单胞菌 G-05 的培养基为 King's B (KMB) 和 PPM, 在 28°C 振荡培养。LB 培养基按文献 [7] 配制; KMB 培养基: 每升含胰蛋白胨 20 g, K₂HPO₄ 0.392 g, 甘油 15 mL, MgSO₄ 0.732 g, pH 7.5; PPM 培养基: 每升含胰蛋白胨 22 g, 葡萄糖 20 g, KNO₃ 5 g, pH 7.5。相应固体培养基每升加 12.0 g 琼脂粉。根据培养需要, *E. coli* 培养基中添加的抗生素用量 (μ g/mL) 分

别为: 氨苄青霉素 (Amp) 100、盐酸四环素 (Tet) 25、庆大霉素 (Gen) 20、壮观霉素 (Spe) 100; *P. chlororaphis* 培养基中添加的抗生素用量 (μ g/mL) 分别为: 盐酸四环素 (Tet) 100、庆大霉素 (Gen) 40、壮观霉素 (Spe) 100。菌体液体培养时, 摇床转速为 180 r/min (大肠杆菌) 和 220 r/min (假单胞菌)。

1.1.3 主要试剂和仪器: 多种限制性内切酶、T₄-DNA 连接酶及 DNA 分子量标记物皆为 Fermentas (MBI) 公司产品并购于上海生工生物工程技术有限公司。

司; *Taq* DNA 聚合酶、dNTP 购于天根生化科技(北京)有限公司; 吩嗪-1-羧酸标准品由上海交通大学生命科学与技术学院许惠泉教授课题组惠赠; 吲哚乙酸(IAA) 标准品购自 Sigma-Aldrich 公司; 其它生化试剂级别均为分析纯。

1.2 菌株的生化鉴定和 16S rDNA 区段的扩增

为了深入研究该菌株的生物防治功能, 有必要对菌株作初步的系统鉴定。首先利用全自动微生物鉴定仪(VEELK 32) 对该菌种进行生理、生化等方面的鉴定。然后根据假单胞菌 16S rRNA 的编码序列的同源性设计一对引物 P1 (5'-ACGCTAATACCGCATACGTC-3') 和 P2 (5'-CCGAAGGTTAGACTAGCTAC-3') 并以假单胞菌 G-05 的基因组 DNA 为模板进行 PCR。其中 PCR 的反应程序及条件参数为: 94 4 min; 94 1 min, 50 1 min, 72 1.5 min, 30 个循环; 最后一个循环为 95 1 min, 55 1 min, 72 10 min。PCR 产物纯化回收后直接交由上海生工生物工程技术有限公司进行测序。

1.3 *gacS* 的 PCR 扩增、克隆和测序

根据 GenBank 中假单胞菌属的不同假单胞菌株的 *gacS* 基因编码序列中的保守区段, 设计一对引物 (PS1: 5'-CCTGACCATCCTCGCCCCGG-3'; 引物 PS2: 5'-CGGCGGCCAGGCGCAAACCT-3') 并以假单胞菌 G-05 的基因组 DNA 为模板进行 PCR, 以期获得该菌株相应的 *gacS* 片段。其中 PCR 的反应程序及条件参数于 1.2 部分相似。不同之处在于该 PCR 的退火温度为 55, 其它完全相同。

质粒抽提, 限制性内切酶酶切、DNA 片段胶回收与纯化、连接、感受态细胞制备、转化等步骤参照文献[7]或相关试剂盒提供的方法进行。绿针假单胞菌的基因组 DNA 提取参照文献[7,8]进行。PCR 获得的 1.4 kb 片段, 与 T 载体 pUCm-T 相连。T 载体的连接反应、*E. coli* DH5 α 的转化等按上海生工生物工程技术有限公司试剂盒操作手册进行。所获质粒命名为 pUC-S。

1.4 *gacS* 插入失活突变株 G-05S 的构建

采用 *Bam*HI、*Hind* 双酶切方法从 pUC-S 质粒中切下 *gacS* 片段(约 1.4 kb), 通过胶回收纯化技术与用相同限制性内切酶酶切并回收的自杀质粒 pEX18Tc 相连接^[9]。连接产物转化大肠杆菌 DH5 α , 涂布于含四环素的平板并在 37 条件下培养。挑取克隆提取质粒并酶切验证, 所获得的阳性克隆称 pEXT-S。

用 *Pst* 酶切质粒 pUCGm, 获得 0.8 kb 的庆大霉素基因片段 (gentamycin resistance cassette,

accCI)^[10]。同样, 用 *Pst*I 酶切 pEXT-S。采用相同的连接方法, 使庆大霉素基因片段插入位于 pEXT-S 上的 *gacS* 基因片段内的唯一的 *Pst*I 位点中。所获得的阳性克隆称 pEXT-SG, 至此用于构建突变株的自杀质粒构建完成。

通过化学转化法(CaCl₂法)用 pEXT-SG 转化 *E. coli* SM10^[7]。

以 pEXT-SG 所在的 *E. coli* SM10 为供体菌, 野生型绿针假单胞菌 G-05 菌株为受体菌进行固相纤维滤膜接合转移。主要步骤如下: 将以上两种菌分别接种于 4 mL 含相应抗生素(庆大霉素、四环素)的 LB 和不含抗生素的 LB 中, 在 37、180 r/min 条件下振荡培养, 过夜。分别取 1 mL 菌液离心弃上清, 用 1 mL 新鲜 LB 培养基或无菌水洗涤 2~3 次。将菌体混合并悬浮于 150 μ L 新鲜 LB 中, 吸取混合菌液转移至无抗生素的 LB 固体培养皿中央的一片圆形微孔滤膜(孔径 \varnothing 0.22 μ m、已灭菌)上, 30 下培养 24 h。刮取上述菌体涂布于含有 Spe¹⁰⁰、Gen⁴⁰ 的筛选平板并在 28 条件下培养 48~72 h。随机刮取少量菌落混合后用含 15% 蔗糖的 LB 培养基连续培养几代(>5 代), 然后稀释涂布含 Gen⁴⁰ 的平板。挑取所获克隆分别接种于各含 Gen⁴⁰、Tet¹⁰⁰ 的平板上。筛选 Tet 平板不生长、Gen 平板上生长的相应克隆, 即假单胞菌 G-05 的 *gacS* 基因插入失活突变体。

1.5 *gacS* 基因的互补实验

为了检验 *gacS* 基因对胞外次生代谢物合成的影响, 我们将来自荧光假单胞菌 2P24 的同源基因借助穿梭质粒(pE-S)导入突变株 G-05S。质粒的导入采用电转化方法进行^[11]。

1.6 生长曲线的测定

将野生菌株 G-05 和突变株 G-05S 分别同时培养于 KMB 或 PPM 中, 28 培养且每隔 8 h 取样测定光密度(OD_{600}), 3 次重复, 取平均值。为了减少培养过程中胞外次生代谢物对吸光度值的影响, 测定时, 先将样品用无菌水洗涤 2 次后再测定。

1.7 次生代谢物吩嗪-1-羧酸的测定

为了确定 *gacS* 基因失活后对次生代谢物吩嗪-1-羧酸合成的影响。将野生菌株 G-05 和突变菌株 G-05S 分别接种于 PPM 和 KMB 培养基中进行 28 培养。接种过程为: 挑取相应的单菌落接种于 50 mL 的 KMB 种子培养基中, 28、220 r/min 条件下培养 12 h。按 5% 的接种量将种子放大培养。具体做法为: 用移液管吸取

7.5 mL 培养后的种子培养基,接种于含有 150 mLPPM 或者 KMB 液体培养基的 500 mL 烧瓶中,在 28 、 220 r/min 条件下进行摇瓶培养。每 8 h 取样分析,吩嗪-1-羧酸的 HPLC 定量测定按相关文献进行^[12]。

1.8 次生代谢物吲哚乙酸的测定

据文献报道,某些根际假单胞菌可通过合成并分泌吲哚乙酸 (Indole-3-acetic acid, IAA) 促进作物生长^[13]。为了检验绿针假单胞菌 G-05 是否合成 IAA 以及调控基因 *gacS* 是否影响 IAA 的合成过程,将绿针假单胞菌野生株和突变株分别接种于添加有色氨酸的 KMB 培养基中,在 28 、 220 r/min 条件下进行摇瓶培养。定时测定菌体生长量和培养液中 IAA 的合成量。IAA 的测定方法有比色法、免疫测定法和 HPLC 等,其中比色法是一种常用、快捷的方法。IAA 测定的基本原理为:通过吲哚乙酸与 FeCl_3 反应生成红色螯合物,根据该螯合物在 530 nm 下有最大吸收峰的特征,故可采用分光光度计法测定。绿针假单胞菌 G-05 的 IAA 具体测定方法(比色法)概括如下:分别将完成 72 h 培养的野生株和突变株的培养液进行离心,取上清。取一定量的培养液与等体积 Salkowski 试剂(由 FeCl_3 配制而成)混合,室温条件下反应 25 min。反应结束后,在 530 nm 波长条件下测定反应液的吸光度值,再根据标准曲线计算样品的 IAA 浓度。其中突变株和野生株各设三个重复,最后结果取其平均值。详细 IAA 的测定原理和方法可参考文献^[13,14]进行。

2 结果

2.1 菌株鉴定与 16S rDNA 的分析

分离的 G-05 菌株氧化酶呈阴性,生理生化反应 8 h 的检测结果表明,该菌株为荧光假单胞菌或恶臭假单胞菌的概率为 97%(具体生化指标未显示)。PCR 获得的该菌株 16S rDNA 序列片段为 1289 bp (GenBank 序列号: FJ147180),该序列与致金色假单胞菌、绿针假单胞菌 (*P. chlororaphis*) 的同源性达 99%。结合该菌株的 *gacS* 基因的同源性分析结果(见 2.2 部分),初步确定该菌株并定名为 *P. chlororaphis* G-05。

2.2 *gacS* 基因片段克隆与序列分析

根据设计的引物,以该菌的基因组 DNA 为模板进行 PCR。通过优化 PCR 反应条件获得了一条小于 1.5 kb 的阳性条带。该条带与预期结果相符。克隆于 pUC-S 中的 PCR 产物经测序表明,该片段共计含

1367 bp。根据核酸序列 BLAST 分析显示,该基因片段与其它多种假单胞菌的 *gacS* 基因相应片段的同源性极高,最高可达 98%,其中与 *P. chlororaphis*、*P. fluorescens* Pf-5、*P. mendocina*、*P. fluorescens* 2P24 和 *P. putida* KT2440 的同源性分别为 98%、97%、94%、86%和 83%。该结果表明 PCR 产物确为该菌株的 *gacS* 基因片段,该片段在 GenBank 中序列号为 EU622874。

2.3 *gacS* 基因插入失活突变株的构建和鉴定

在本实验中,绿针假单胞菌 G-05 的单交换菌株特征为既抗四环素,又抗庆大霉素,而双交换菌株即真正的 *gacS* 基因插入失活突变株仅抗庆大霉素,但对四环素敏感。因此凡是在含四环素平板上不生长、而在含庆大霉素平板上生长的菌落即为 G-05S 突变株。插入失活突变株的构建原理如图 1 所示。为验证突变株的 *gacS* 基因是否插入有 *aacC1* 基因盒,我们采用 PCR 方法对其验证。分别提取野生株 G-05 和突变株 G-05S 的基因组 DNA,以 PS1 和 PS2 为引物、分别以野生株和突变株的基因组 DNA 为模板进行 PCR。琼脂糖凝胶电泳表明(结果未显示),野生株的 PCR 条带约 1.4 kb,而突变株 PCR 条带约 2.2 kb。由于插入的抗庆大霉素基因盒 (*aacC1*) 约 0.8 kb,因此该结果与预期相符,证实已获得 *gacS* 基因插入失活突变株。

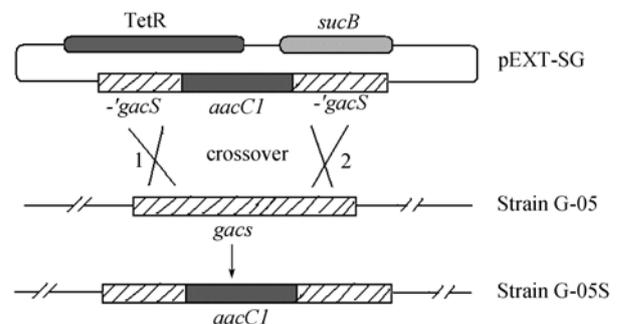


图 1 绿针假单胞菌 G-05 的 *gacS* 基因同源重组与突变
Fig.1 Recombination and mutation of the *gacS* gene in *P. chlororaphis* G-05.

2.4 *gacS* 基因失活对菌体生长的影响

为了比较突变株 G-05S 与野生株 G-05 的生长状况,将它们分别接种在 PPM 和 KMB 培养基中于 28 、 220 r/min 下振荡培养,定时取样测定其光密度 (OD_{600})。根据测定结果绘制生长曲线(曲线未显示)。结果发现,在两种培养基中突变株 G-05S 的生长情况与野生株 G-05 生长状况相似。表明 *gacS* 基因

失活后对该菌株的生长影响甚微。此外,在固体培养基上菌落生长显示,突变株 G-05S 与野生株 G-05 的菌落颜色、大小相似。

2.5 *gacS* 失活对吩嗪-1-羧酸合成的影响

为了验证 *gacS* 基因失活后对次生代谢物吩嗪-1-羧酸合成的影响,分别在 PPM 和 KMB 两种培养基中同时摇瓶培养 G-05 及 G-05S。培养 72 h 后通过 HPLC 测定培养液中吩嗪-1-羧酸的含量。结果如图 2 显示,在 KMB 和 PPM 培养基中,野生株 G-05 合成 PCA 的量明显,分别达到 60 $\mu\text{g/mL}$ 和 72 $\mu\text{g/mL}$;而 *gacS* 插入失活突变株不论在 KMB 培养基中,还是在 PPM 培养基中,都只能检测到痕量的吩嗪-1-羧酸。此结果表明,*gacS* 基因存在时吩嗪-1-羧酸可以正常表达与合成。一旦 *gacS* 基因插入失活后,吩嗪-1-羧酸合成的调控路径被阻断了。这说明吩嗪-1-羧酸的合成需要 *gacS* 基因的调控。

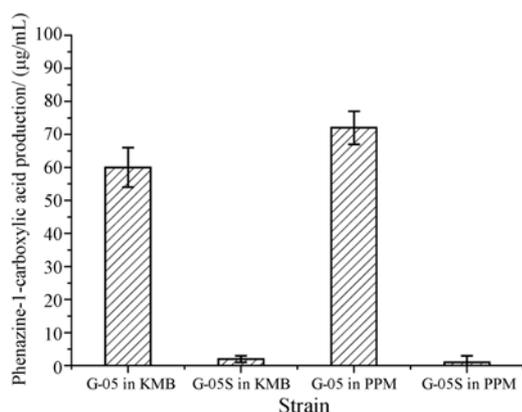


图 2 野生株 G-05 和突变株 G-05S 分别在 PPM 和 KMB 培养基中吩嗪-1-羧酸的含量检测

Fig.2 Phenazine-1-carboxylic acid production of the wild type strain G-05 and the mutant G-05S in PPM or KMB broth.

2.6 *gacS* 基因失活对生长素合成的影响

尽管一些根际细菌可合成 IAA,但不同菌株的 IAA 合成调控方式却截然不同。在 *P. chlororaphis* O6

中,*gacS* 基因突变后,IAA 的合成量显著提高^[14];而在 *Enterobacter cloacae* 中,过表达 *gacS* 基因可引起 IAA 合成量提高 10 倍^[15]。为了检测 *gacS* 基因是否对 IAA 的合成影响,我们将野生株和 *gacS* 基因插入失活突变株分别接种于含色氨酸的 KMB 培养基中培养。每 8 h 取样测定菌体生长量 (OD_{600}) 和 IAA 的合成量,结果显示,添加色氨酸的 KMB 培养基与未添加色氨酸的 KMB 培养基一样,野生株和突变株的生长相似,表明色氨酸不影响菌体的生长(结果未显示)。据图 3 所示,在 KMB 培养基中培养时,突变株和野生株的 IAA 合成量相似。

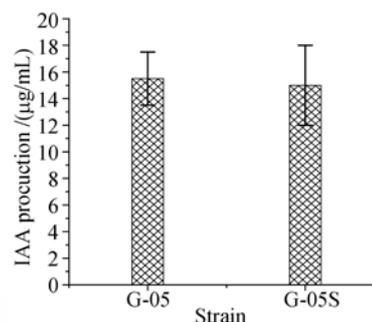


图 3 野生株 G-05 和突变株 G-05S 在 KMB 培养基中吲哚乙酸的含量检测

Fig.3 Indole-3-acetic acid (IAA) production of the wild type strain G-05 and the mutant G-05S in KMB broth.

2.7 *gacS* 基因互补实验验证

为了进一步确认突变株 G-05S 次生代谢的变化是否由 *gacS* 基因引起,将携带 *gacS* 基因的穿梭表达载体 pE-S 分别导入野生株和突变株。该载体上来自于荧光假单胞菌 2P24 的 *gacS* 全基因克隆在 P_{tac} 启动子之下。互补实验统计数据显示(表 2),*gacS* 基因的导入使缺失株 G-05S 恢复了野生株相关抗生物物质代谢的水平。该结果证实,缺失株的抗生物物质的变化确与 *gacS* 缺失相关。

表 2 野生菌株、缺失株及相关菌株的次生代谢物合成量比较

Table 2 Relevant secondary metabolites production in the wild type strain, the mutant G-05S and their derivatives

Strains	Phenazine-1-carboxylic acid ^a (g/mL)		Indole-3-acetic acid ^b (g/mL)	
	KMB	PPM	KMB	PPM
G-05(pME6032)	65 ± 5	70 ± 4	15 ± 3	16 ± 2
G-05S(pME6032)	1 ± 1	2 ± 1	16 ± 3	18 ± 3
G-05(pE-S)	66 ± 5	72 ± 3	18 ± 3	16 ± 3
G-05S(pE-S)	70 ± 4	66 ± 5	16 ± 2	18 ± 2

^aPhenazine-1-carboxylic acid production after inoculation in PPM or KMB medium for 72 h. ^bIndole-3-acetic acid production after inoculation in PPM or KMB medium for 72 h. Each value is expressed as mean ± SD of three independent experiments.

3 讨论

在革兰氏阴性细菌中,具全局调控功能的双组分 GacS/GacA 系统,能全方位调控细菌的代谢、生理、生长和运动等多种生命过程,尤其是细菌的次生物质代谢过程。初步研究显示,分离的绿针假单胞菌 G-05 不仅具有一定的生物防治功能,而且像其它部分已报道的生防假单胞菌一样可以分泌抗生物质吩嗪-1-羧酸。正因如此,为了深入研究该菌株的生物防治的机制以及 *gacS* 基因对其次生代谢物合成的影响,我们利用定点插入突变技术和同源重组原理构建了 *gacS* 基因插入失活突变株 G-05S。通过对野生株和突变株的吩嗪-1-羧酸和吲哚乙酸合成量的测定,结果表明,*gacS* 基因的功能失活明显抑制了该菌株合成吩嗪-1-羧酸的能力,与以往报道一致^[16]。但突变株 G-05S 与野生株分别在 KMB 培养基中培养时,IAA 的合成量相似,这一结果表明菌株 G-05 的 *gacS* 基因的功能失活对 IAA 的合成与分泌未有明显的影响,该结果与 *P. chlororaphis* O6 中 *gacS* 突变株表现不一致^[14]。同时该实验也表明,*gacS* 基因产物对不同次生代谢物合成调控的方式彼此不同,具差别性和特异性。

虽然我们目前已明确绿针假单胞菌 G-05 可以合成吩嗪-1-羧酸,同时亦有众多报道表明,吩嗪-1-羧酸的确是使许多菌株具生防功能的次生物质,但不能仅仅据此而推断吩嗪-1-羧酸为绿针假单胞菌 G-05 的唯一的或主要的生防物质。因此,我们仍需进一步实验验证。目前,我们正通过平板抑菌实验检验野生株和突变株对真菌生长的抑制作用是否相同。初步结果表明,*gacS* 基因插入失活后,其对辣椒疫霉生长抑制功能虽比野生株弱,但仍具有一定的抑菌半径。根据该结果推测,绿针假单胞菌 G-05 可能合成并分泌其它更多种类的抗生物质。该推论有待进一步实验证实。

致谢 本文突变株 G-05S 的构建由我院 2002 届本科毕业生闫薇薇同学参与并完成;互补实验所需的 *gacS* 基因由中国农业大学植物病理学系张力群博士惠赠,在此向他们致以诚挚的感谢。

参 考 文 献

- [1] Weller DM, Raaijmakers JM, Gardener BB, et al. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol*, 2002, 40: 309-348.
- [2] Haas D, Defago G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat Rev Microbiol*, 2005, 3: 307-319.
- [3] Haas D, Keel C. Regulation of antibiotic production in root-colonizing and relevance for biological of plant disease. *Annu Rev Phytopathol*, 2003, 41: 117-153.
- [4] Lapouge K, Sineva E, Lindell M, et al. Mechanism of hcnA mRNA recognition in the Gac/Rsm signal transduction pathway of *Pseudomonas fluorescens*. *Mol Microbiol*, 2007, 66(2): 341-56.
- [5] 魏海雷, 张力群. 荧光假单胞杆菌 2P24 中生防相关调控基因 *gacS* 的克隆和功能分析. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*, 2005, 45(3): 368-372.
- [6] Ge YH, Huang XQ, Wang SL, et al. Pyoluteorin is positively regulated and phenazine-1-carboxylic acid negatively regulated by *gacA* in *Pseudomonas* sp. M18. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, 237: 41-47.
- [7] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.
- [8] Chen WP, Kuo TT. A simple and rapid method for the preparation of Gram-negative genomic DNA. *Nucleic Acids Res*, 1993, 21: 2260-2261.
- [9] Hoang TT, Karkhoff-Schweizer RR, Kutchma AJ, et al. A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene*, 1998, 212: 77-86.
- [10] Schweizer HP. Small broad-host-range gentamycin resistance cassettes for site-specific insertion and deletion mutagenesis. *BioTechniques*, 1993, 15: 831-834.
- [11] Smith AW, Iglewski BH. Transformation of *Pseudomonas aeruginosa* by electroporation. *Nucleic Acids Res*, 1989, 17: 10509.
- [12] Ge YH, Yang SD, Fang YY, et al. RpoS as an intermediate in RsmA dependent regulation of secondary antifungal metabolites in *Pseudomonas* sp. M18. *FEMS Microbiol Lett*, 2007, 268: 81-87.
- [13] Spaepen S, Vanderleyden J, Roseline Remans R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Rev*. 2007, 31(4): 425-448.
- [14] Beom RK, Kwang YY, Baik HC, et al. Production of indole-3-acetic acid in the plant-beneficial strain *Pseudomonas chlororaphis* O6 is negatively regulated by the global sensor kinase GacS. *Curr Microbiol*, 2006, 52: 473-476.
- [15] Saleh SS, Glick BR. Involvement of *gacS* and *rpoS* in enhancement of the plant growth-promoting capabilities of *Enterobacter cloacae* CAL2 and UW4. *Can J Microbiol*. 2001, 47: 698-705.

[16] Chancey ST, Wood DW, Pierson LS. Two-component transcriptional regulation of *N*-acyl-homoserine lactone production

in *Pseudomonas aureofaciens*. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65: 2294–2299.

Effects of insertional inactivation of *gacS* gene on two secondary metabolites in *Pseudomonas chlororaphis* G-05

Yihe Ge^{1*}, Lijuan Chen², Lei Wang¹, Hongyan Su¹, Jinfeng Zhou¹, Xianhao Cheng

(¹School of Life Sciences, ²Hospital, Ludong University, Yantai 264000, China)

Abstract: Phenazine-1-carboxylic acid biosynthesized and secreted by *Pseudomonas chlororaphis* G-05 isolated from the rhizosphere of pepper in greenhouse (Huaian, China), contributes to its biological suppression of *R. solani* growth. **[Objective]** Our aim is to elucidate its biocontrol function and regulation mechanism. **[Methods]** We first identified the strain with biochemical method and homology comparison of 16S rDNA. A conservative DNA fragment of *gacS* gene was then obtained from the genomic DNA of the wild type strain G-05 by polymerase chain reaction (PCR). According to homologous recombination technology, a mutant G-05S was then created with insertional inactivation of gentamycin resistance cassette (*aacC1*). **[Results]** In comparison with the wild type strain G-05, the *gacS*-deficient mutant G-05S produced trace amount of phenazine-1-carboxylic acid in King's B (KMB) or Pigment Production Medium (PPM) medium, respectively. However, it produced indole-3-acetic acid (IAA) in the same way as the wild type strain. When the *gacS* gene was introduced with the shuttle vector pME6032, the mutant G-05S produced the same phenazine-1-carboxylic acid as the wild type strain. **[Conclusion]** The regulation mediated by *gacS* gene on secondary metabolites is specific and differential in some biocontrol agents.

Keywords: *P. chlororaphis*; metabolism regulation; *gacS*; phenazine-1-carboxylic acid; indole-3-acetic acid (IAA)

Supported by the Jiangsu Province High Education Project for Natural Science Research (05KJB180010), the Science and the Technology Foundation of Ludong University (20063302) and the Laboratory's Opening Project of Ludong University

*Corresponding author. Tel: +86-535-6681053; E-mail: geyihe@ldu.edu.cn

Received: 16 April 2008/Revised: 14 September 2008

《微生物学报》对摘要的写作要求

2007年12月修订

1. 研究报告摘要:基本要素包括研究目的、方法、结果和结论,并要求在文中给出“【目的】、【方法】、【结果】和【结论】”等字样。具体地讲就是研究工作的主要对象和范围,采用的手段和方法,得出的结果和重要的结论。在结果和讨论中应写明本文的创新之处。
2. 综述摘要:包括论述内容的发展水平、自己的评论及展望。
3. 英文摘要的撰写要点:英文摘要的内容应与中文摘要一致,但比中文摘要更详尽。要求在文中给出[Objective], [Methods], [Results], [Conclusion]等 words。英文摘要完成后,务必请英文较好、且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。凡不符合要求的,即使学术上可以达到刊出的水平,本刊也将推迟发表。
 - (1) 在英语摘要中,不要使用任何汉字字符,包括标点、括号、温度、希腊字母等。
 - (2) 建议使用第一人称,以此可区分研究结果是引用文献的还是作者的。
 - (3) 建议用主动语态,被动语态表达拖拉模糊尽量不用,这样可以免好多长句,以求简单清晰。
 - (4) 摘要应当使用过去时态,语法正确,句子通顺。
 - (5) 摘要中不用缩写语,除非是人人皆知的,如:DNA, ATP等。
 - (6) 句子的开头处最好不要使用数字。