

# 内生菌 *Pseudomonas* sp. G5 *phzIR* 基因的克隆与表达

李惠<sup>1,2</sup>, 刘晓光<sup>1</sup>, 高克祥<sup>2</sup>, 贾金丽<sup>1</sup>

1 江苏大学生命科学研究院, 镇江 212013

2 山东农业大学植物保护学院, 泰安 271018

**摘要:** 假单胞菌菌株 G5 是分离自香菜 (*Coriandrum sativum* L.) 茎内的一株内生菌, 经 BIOLOG 系统分析其底物利用图谱, 初步鉴定为桔黄假单胞菌 *Pseudomonas aurantiaca*。大量研究已表明许多革兰氏阴性细菌应用群体感应系统, 通过感应扩散性小信号分子—乙酰基高丝氨酸内酯 (N-acyl homoserine lactones, AHLs), 以种群密度依赖的方式调控基因表达, 控制植物相关细菌的多种表型。本研组合应用 AHLs 检测菌株 *Chromobacterium violaceum* CV026 和薄层层析分析, 初步检测出菌株 G5 可产生几种可检测水平的 AHLs 信号分子, 其中以 N-hexanoyl-homoserine lactone (C6-HSL, HHL) 为主, 迁移率  $R_f$  值为 0.4。进一步克隆和测序了该菌株中由 PhzI 和 PhzR 组成的群体感应 quorum sensing 系统的编码基因 *phzIR*, 并在大肠杆菌中异源表达了 AHLs 信号分子合成酶基因 *phzI*。序列和系统进化分析表明它们与假单胞菌属其他的 *phzIR* 基因有高度同源性和进化上的保守性。

**关键词:** 假单胞菌 G5 菌株, 内生细菌, 吩嗪, 群体感应

## Cloning of *phzIR* from the endophytic *Pseudomonas* sp. G5 and its expression in *Escherichia coli*

Hui Li<sup>1,2</sup>, Xiaoguang Liu<sup>1</sup>, Kexiang Gao<sup>2</sup>, and Jinli Jia<sup>1</sup>

1 Institute of Life Sciences, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China

2 College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China

**Abstract:** We isolated a new strain of endophytic *Pseudomonas* G5 from the stems of Chinese parsley (*Coriandrum sativum* L.), and it is tentatively identified as *Pseudomonas aurantiaca* according to analysis of the entire substrate utilization profiles using BIOLOG Microstation™ system (BIOLOG, Inc, Hayward CA). An array of evidence established that many Gram-negative bacteria employ Quorum sensing (QS) system to regulate gene expression in response to cell density using small diffusible signal molecules, N-acyl homoserine lactones (AHLs), and control diverse phenotypic traits in plant-associated bacteria. In this study, we showed that *Pseudomonas* sp. strain G5 can produce several types of AHLs at a detectable level using Thin Layer Chromatography (TLC) analysis combined with bioreporter *Chromobacterium violaceum* CV026 bioassay, and N-hexanoyl-homoserine lactone (HHL, C6-HSL) with  $R_f$  value 0.4 is the major signal molecule. Furthermore, we have identified its quorum sensing system composed of PhzI and PhzR by cloning and sequencing of *phzI-phzR*. PhzI is responsible for synthesis of AHLs signal molecules, and PhzR is a transcriptional regulator. Finally, we heterologously expressed the recombinant plasmid pMD-*phzIR* in *Escherichia coli* JM109 and verified it using *C. violaceum* CV026 bioassay. The phylogenetic analysis using MEGA4 revealed highly similarities exist among the *phzIR* homologs, suggesting it is evolutionary well conserved in the genus *Pseudomonas*.

**Received:** December 29, 2008; **Accepted:** March 26, 2009

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (Nos. 30670030, 30370954, 30811130218), Senior Talent Funds of Jiangsu University (No. 07JDG030).

**Corresponding author:** Xiaoguang Liu. Tel: +86-511-88791702; E-mail: xgliu66@yahoo.com

Kexiang Gao. Tel: +86-538-8249824; E-mail: kexianggao@yahoo.com

国家自然科学基金项目 (Nos. 30670030, 30370954, 30811130218), 江苏大学启动基金 (No. 07JDG030) 资助。

**Keywords:** *Pseudomonas* G5, endophytic bacteria, phenazine, quorum sensing

非病原性的内生假单胞菌(*Pseudomonas* spp.)目前已从不同地理来源、不同器官和组织的大量植物种中被分离和鉴定。它们与植物有益互动,在促进植物生长和病害生物防治,以及开发其中某些天然产物,应用于工农业和医药等方面具有广阔的前景<sup>[1]</sup>。内生假单胞菌刺激植物生长的机制是多方面的。可能是由于产生植物激素 IAA 等,促进植物对营养和矿物质吸收的直接作用;另一方面可能通过抑制植物病原菌的侵染从而间接促进植物生长。而生防活动的作用机制包括铁元素的竞争和抗生作用等。其中许多假单胞菌可产生抗生素吩嗪(Phenazine, *phz*)及其衍生物,与内生菌竞争营养和空间、形成生物膜,以便于成功定殖;以及抑制病原菌和诱导植物系统抗性等方面有举足轻重的作用<sup>[2-4]</sup>。

许多革兰氏阴性细菌通过产生和感应小分子信号分子酰基高丝氨酸内酯(N-acyl homoserine lactones, AHLs),进行细胞与细胞之间的交流,并以种群密度依赖的方式调控基因表达,称为群体感应(Quorum sensing, QS)。这种通过分泌化学分子协调种群及微生物群落的行为,赋予细菌以某种程度多细胞高等生物的特性。QS 系统可调控植物相关细菌包括质粒接合转移、根瘤形成、致病性等多种生理过程;许多植物根际促生菌(Plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR)中,关键生防因子吩嗪(Phenazine, *phz*)、硝吡咯菌素(Pyrrolnitrin, *prn*)、藤黄绿脓菌素(Pyoluteorin, *plt*)等抗生素及其几丁质酶、蛋白酶等胞外酶的产生,生物膜形成、运动性以及与寄主植物的互作等也受 QS 系统的调控<sup>[5-8]</sup>。QS 系统由信号分子(N-acylhomoserine lactones, AHLs)合成酶 LuxI 和转录调控蛋白 LuxR 组成。细菌感知细胞内外扩散的信号分子的浓度,随种群密度的增加,信号分子浓度也增加。当超过一定阈值时,与 LuxR 形成复合物,并与靶基因启动子上游的反向回文序列 *lux-box* 结合,调控靶基因的转录<sup>[9]</sup>。

由生防假单胞菌产生的吩嗪衍生物,如常见的吩嗪-1-羧酸(Phenazine-1-carboxylic acid, PCA)和吩嗪-1-甲酰胺(Phenazine-1-carboxamide, PCN),具有广谱抗性,是关键生防因子,同时有助于增强生防

菌株的生态适应性。在荧光假单胞菌 *P. fluorescens* 2-79 和绿针假单胞菌 *P. chlororaphis* PCL1391 中, *phz* 生物合成操纵子包括 7 个基因 *phzA*、*B*、*C*、*D*、*E*、*F*、*G* 组成的基因簇,其上游是由 *PhzI-PhzR* 组成的 QS 系统,而 *phz* 基因簇的启动子区存在一个 *lux-box*,表明 *PhzI-PhzR* 调控 *phz* 的生物合成。尽管在假单胞菌中 *phzI* 基因同源性很高,但不同菌株所产生的 AHL 信号分子在乙酰基侧链长度和 C3 取代基性质上却有所不同<sup>[10]</sup>。

*Pseudomonas* sp. G5 是分离自香菜茎内的一株产吩嗪的内生细菌,本研究以菌株 G5 为试材,使用紫色色杆菌 *Chromobacterium violaceum* CV026 检测到菌株 G5 能产生几种 AHLs 信号分子;进一步克隆和鉴定了该菌株中由 LuxIR 家族蛋白 *PhzIR* 组成的 QS 系统,并在大肠杆菌中异源表达了 AHLs 信号分子合成酶基因 *phzI*,为研究该系统对生防相关性状的全局调控机制奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 质粒载体及菌株

内生菌株 *Pseudomonas* sp. G5 是本实验室在山东农业大学试验田从表面消毒的香菜茎内分离纯化的内生菌。检测 AHLs 信号的报告菌株 *Chromobacterium violaceum* CV026、大肠杆菌 *E. coli* JM 109 和克隆表达载体 pMD19-T 均由本实验室保存。

#### 1.1.2 酶及主要试剂

T4 DNA 连接酶、LA *Taq* 酶、基因组和质粒提取试剂盒、IPTG 和 X-gal 购自大连 TaKaRa 公司。DNA 凝胶回收试剂盒购自 Promega 公司,引物合成和测序由上海生工完成。HHL(N-hexanoyl-L-homoserine lactone)和 OHHL(N-3-oxo-hexanoyl-L-homoserine lactone)标样购自 Sigma 公司,其余试剂均为国产分析纯。

#### 1.1.3 培养基

LB(Luria-bertani broth)培养基:配方为胰蛋白胨 10 g,酵母浸出粉 5 g,氯化钠 5 g,加水至 1 L。LB 固体培养基:LB 中加 2%琼脂粉固化。

## 1.2 方法

### 1.2.1 BIOLOG 分析鉴定 *Pseudomonas sp.* 菌株 G5

利用 BIOLOG Microstation™ System MicroLog3 4.20 (BIOLOG Inc., Hayward, CA), 依据仪器使用说明, 菌株 G5 于 28°C 恒温培养 16~24 h。通过在 GN2 鉴定板上检测对 95 种底物利用的代谢模式, 鉴定细菌的分类地位。

### 1.2.2 培养上清液中 AHLs 信号分子的萃取

取 50 mL *Pseudomonas sp.* 菌株 G5 的过夜培养物, 离心除去细菌菌体。上清液经过滤灭菌后, 用等体积的乙酸乙酯萃取 2 次, 合并有机相, 加入无水硫酸钠, 过滤后通过旋转蒸发干燥, 回溶于 1.5 mL 乙酸乙酯中。进一步通过真空旋转蒸发浓缩, 最终残余物溶解于 50  $\mu$ L 乙腈中, 于 -20°C 冰箱中保存, 用于 TLC 分析<sup>[11]</sup>。

### 1.2.3 AHLs 信号分子的 TLC 分析

通常取 5  $\mu$ L 的乙酸乙酯提取液点样于 RP18, F<sub>254S</sub> 反相 TLC 平板 (德国 Merck), 展开剂为甲醇: 水 (60: 40, V/V)。约 4 h 充分展开后, 溶剂被蒸发, 干燥的 TLC 平板用混有 *C. violaceum* CV026 检测菌株的软琼脂 (0.6% agar) 覆盖。琼脂凝固后, 置于密闭的塑料容器中, 30°C 恒温箱中过夜培养, 观察结果并拍摄照片。以合成的 AHLs 标样 BHL 和 OHHL (Sigma) 作对照<sup>[11]</sup>。

### 1.2.4 *phzIR* 编码基因的克隆

搜索 GenBank 数据库中相关细菌 *luxIR* 同源序列进行比对, 在保守区借助软件 Primer5.0 设计引物, 上游引物为 *phzIR*-F: 5'-GAAGCCCCTACCAGATCT T-3'; 下游引物 *phzIR*-R: 5'-CCTTCAGGTTGGTCTA GTCTA-3'。使用 TaKaRa MiniBEST Bacterial Genomic DNA Kit Ver. 2.0 试剂盒提取菌株 G5 基因组 DNA。使用引物 *phzIR*-F 和 *phzIR*-R 扩增 *phzIR* 基因片段, PCR 扩增程序为: 94°C 预变性 5 min; 94°C 30 s, 58°C 1 min, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 延伸 10 min。反应结束后 100 V 恒压下进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 观察结果。将 PCR 扩增出的目标带纯化产物与 pMD19-T 载体连接, 于 16°C 反应 30 min, 然后 42°C 热击转化 *E. coli* JM109 感受态细胞。在添加氨苄青霉素 (Amp, 100  $\mu$ g/mL)、IPTG (24  $\mu$ g/mL) 和 X-gal (40  $\mu$ g/mL) 的 LA 平板上涂板, 37°C 过夜培养后进行蓝白斑挑选和菌落 PCR 鉴定。

### 1.2.5 重组质粒 *pMD-phzIR* 的 PCR 鉴定

对经蓝白斑挑选和菌落 PCR 初步鉴定为阳性克隆的菌落, 用 TaKaRa MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver. 2.0 试剂盒提取质粒。以提取的重组质粒作为模板进行 PCR 扩增鉴定。反应程序同上。反应结束后 1% 琼脂糖凝胶电泳, 观察结果。

### 1.2.6 *phzI* 在 *E. coli* JM109 中异源表达

经 PCR 鉴定呈阳性的菌落进一步在添加氨苄青霉素 (100  $\mu$ g/mL) 的 LA 平板上纯化, 然后挑取单菌落在 LA 平板上与 *C. violaceum* CV026 划 T 形线, 检测在 *E. coli* JM109 中异源表达 *phzI* 所产生的 AHL 信号。并以野生菌作阳性对照, *E. coli* JM109/pMD19-T 空载体作阴性对照。

### 1.2.7 基因测序及系统进化分析

将提取的阳性质粒寄送上海生工公司测序, 采用 DNAMAN 6.0 进行序列编辑和 ORF 预测。并将测序结果通过 NCBI 网络系统将获得的 *phzIR* 基因序列与其他同源基因进行 nucleotide blast 和 blastx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>) 分析, 与 GenBank 数据库中已公布的相关同源基因序列进行核苷酸和蛋白同源性比对。利用 MEGA 4 软件构建系统进化树。

## 2 结果与分析

### 2.1 *Pseudomonas sp.* 菌株 G5 的分类地位

经 BIOLOG 鉴定, *Pseudomonas sp.* 菌株 G5 为革兰氏阴性好氧菌, 氧化酶阳性。基于完全的底物利用图谱 (Substrate utilization profiles, 表 1) 的检测结果, 菌株 G5 为桔黄假单胞菌 *Pseudomonas aurantiaca* (species ID)。其中与标准菌株匹配程度 SIM>0.5; 可以与其他鉴定系统比较的参数 PROB% 为 99%。

### 2.2 TLC 分析 *Pseudomonas sp.* G5 菌株的 AHLs 信号图谱

经 TLC 平板分离后, 使用混有 *C. violaceum* CV026 菌株的软琼脂铺平板, 与标准样品的迁移率  $R_f$  值进行比较, 结果显示 *Pseudomonas sp.* G5 菌株至少产生 3 种可检测水平 AHLs (图 1), 其中以 N-hexanoyl-L-homoserine lactone (C6-HSL, HHL) 为主, 迁移率  $R_f$  值为 0.4。由于某些信号分子, 如 BHL

表 1 内生菌株 G5 的底物利用图谱

Table 1 Entire substrate utilization profiles of the endophytic bacterium strain G5

Test	G5	Test	G5
Water	-	D-Gluconic acid/ 5-ketogluconate?	+
a-Cyclodextrin	-	D-Glucosaminic acid	+
Dextrin	-	D-Glucuronic acid	-
Glycogen	-	a-Hydroxybutyric acid	+
Tween 40	+	b-Hydroxybutyric acid	+
Tween 80	+	Hydroxybutyric acid	+
N-Acetyl-D-galactosamine	-	p-Hydroxyphenyl-acetic acid	+
N-Acetyl-D-glucosamine	+	Itaconic acid	+
Adonitol	-	a-Ketobutyric acid	+
L-Arabinose	+	a-Ketoglutaric acid	+
D-Arabitol	+	a-Ketovaleric acid	+
D-Cellobiose	+	D,L-Lactic acid	+
i-Erythritol	+	Malonic acid	+
D-Fructose	+	Propionic acid	+
L-Fucose	-	Quinic acid	+
D-Galactose	+	D-Saccharic acid	+
Gentiobiose	+	Sebacic acid	+
a-D-Glucose	+	Succinic acid	+
m-Inositol	+	Bromosuccinic acid	+
a-D-Lactose	-	Succinamic acid	+
Lactulose	-	Glucuronide	+
Maltose	+	L-Alaninamide	+
D-Mannitol	+	D-Alanine	+
D-Mannose	+	L-Alanine	+
D-Melibiose	+	L-Alanyl-glycine	+
b-Methy-D-glucoside	-	L-Asparagine	+
D-Psicose	-	L-Aspartic acid	+
D-Raffinose	-	L-Glutamic acid	+
L-Rhamnose	-	Glycyl-L-A-spartic acid	-
D-Sorbitol	-	Glycyl-L-glutamic acid	+
Sucrose	+	L-Histidine	+
D-Trehalose	+	Hydroxy-L-proline	+
Turanose	-	L-Leucine	+
Xylitol	-	L-Ornithine	+
Pyruvic acid methyl ester	+	L-Penylalanine	+
Succinic acid mono-methyl ester	+	L-Proline	+
Acetic acid	+	L-Pyroglyutamic acid	+
Cis-aconitic acid	+	D-Serine	+
Citric acid	+	L-Serine	+
Formic acid	+	L-Threonine	+
D-Galactonic acid lactone	+	D,L-Carnitine	+
D-Galacturonic acid	+	g-Aminobutyric acid	+
Urocanic acid	+	2-Aminoethanol	+
Inosine	+	2,3-Butanediol	-
Uridine	+	Glycerol	+
Thymidine	-	D,L-a-Glycerol phosphate	-
Phenylethylamine	+	a-D-Glucose-1-phosphate	+
Putrescine	+	D-Glucose-6-phosphate	-

“-”: no activity; “+”: activity.

(C4-HSL)和 OHHL (3-oxo-C6-HSL)的迁移率  $R_f$  值相近, 所以其他信号还有待于更高分辨率的 LC-MS 液相色谱和质谱联用技术等进一步鉴定。以上结果与菌株 *P. chlororaphis* PCL1391 产生的 AHLs 信号具有相似的模式<sup>[12]</sup>。

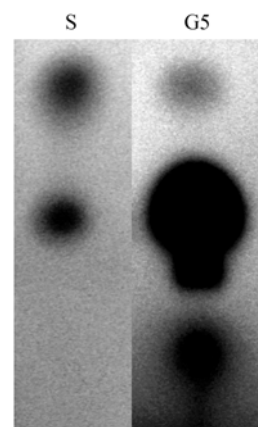
图 1 *Pseudomonas* sp. G5 信号分子的 TLC 平板检测

Fig. 1 TLC analysis of AHLs signals produced by *Pseudomonas* sp. G5 with *C. violaceum* CV026 overlay. S indicates AHLs standards: OHHL (up) and HHL (down).

### 2.3 *phzIR* 基因的 PCR 扩增

以菌株 G5 基因组 DNA 为模板, 经 PCR 扩增获得的 *phzIR* 基因约为 1.5 kb。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 在 1000~2000 bp 之间出现一特异性条带, 与理论值大小相符。

### 2.4 重组质粒 pMD-*phzIR* 的构建、PCR 鉴定及测序结果

PCR 纯化产物与载体 pMD19-T 经 T4 DNA 连接酶连接后, 热击转化 *E. coli* JM109 感受态细胞。经蓝白斑挑选和菌落 PCR 鉴定的阳性克隆, 过夜培养后提取重组质粒 pMD-*phzIR* 作为模板, 以 *phzIR*-F 和 *phzIR*-R 为引物进行 PCR 扩增。电泳检测 PCR 产物, 可见一条 1.5 kb 左右的条带, 与预期的大小一致。进一步测序和同源比对, 表明所构建的载体完全正确, GenBank 登录号为 FJ267646。

### 2.5 重组质粒 pMD-*phzIR* 在 *E. coli* 中的异源表达

从鉴定的阳性克隆中随机挑取单菌落, 与 *C. violaceum* CV026 在 LA 平板上划 T 形线, 检测信号分子的产生。结果部分阳性重组质粒使检测菌株产生蓝紫色色素, 表明 *phzI* 在 *E. coli* JM109 中成功地异源表达, 产生了 AHLs 信号(图 2)。

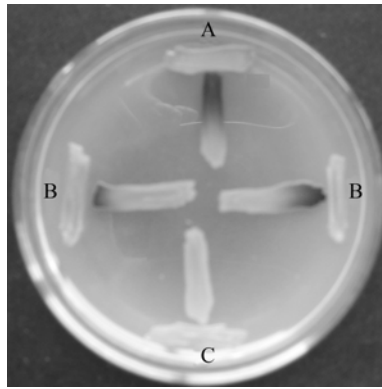


图 2 CV026 平板检测 *phzI* 在 *E. coli* JM109 中异源表达  
Fig. 2 Heterologous expression of *phzI* gene in *E. coli* JM109 with CV026 bioassay. A: *Pseudomonas* sp. G5 as positive control; B: *E. coli* JM109 carrying the positive recombinant plasmid pMD-*phzIR*; C: *E. coli* JM109 carrying the vector of pMD19-T as negative control.

### 2.6 *Pseudomonas* sp. G5 *phzIR* 基因序列和系统进化分析

以菌株 G5 基因组为模板, *phzIR*-F 和 *phzIR*-R 为引物进行 PCR 扩增, 克隆测序后得到长度为 1461 bp 的基因片段。经分析, *phzI* 基因长 591 bp, 编码 196 个氨基酸。*phzR* 基因全长 726 bp, 编码 241 个氨基酸。*phzI* 基因编码 AHL 合成酶, 产生可扩散的 AHLs 信号分子。氨基酸序列分析表明, AHL 信号分子合成酶 PhzI 有 2 个结构域, 一个是 C-末端结构域编码乙酰载体蛋白(ACP), 另一个 N-端编码酶的活性域。AHL 调节蛋白 PhzR, C-末端 DNA 结合域同其他 LuxR 一样有一个螺旋-转角-螺旋的基序, N-末端结构域有 AHL 信号分子结合域<sup>[12]</sup>。

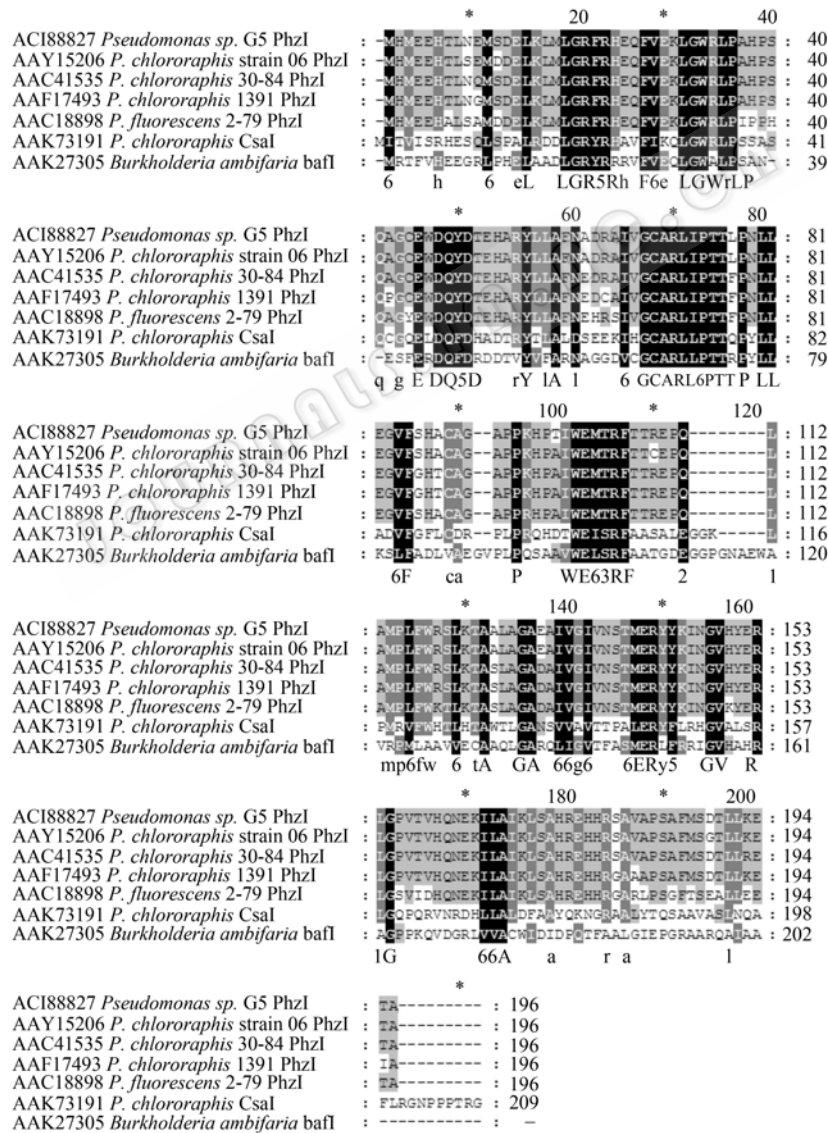


图 3 *Pseudomonas* sp. G5 与其他细菌 PhzI 家族蛋白的氨基酸序列比对  
Fig. 3 Amino acid sequence alignment of PhzI from *Pseudomonas* sp. G5 and other bacteria.

将 *phzIR* 基因序列与其他同源基因通过 nucleotide blast 和 blastx(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>)进行核苷酸和氨基酸序列比对分析, 结果表明菌株 G5 的 *phzI* 和 *phzR* 基因与 *P. chlororaphis* strain 06 中 *phzI* 和 *phzR* 基因的同源性最高, 核苷酸序列具有 98% 的一致性。采用 MEGA4 和 Genedoc 软件对 7 种相关细菌 (*Pseudomonas* sp. G5, *P. Chlororaphis* 06, *P. chlororaphis* 30-84, *P. chlororaphis* PCL1391, *P. fluorescens* 2-79, *P. chlororaphis*, *Burkholderia ambifaria*) 的 LuxIR 家族蛋白的氨基酸序

列进行保守性分析, 表明这些基因编码的氨基酸序列之间存在着高度保守区域(图 3、4 中的黑色区域)。

使用 MEGA 4 中邻近归并法(Neighbor Joining, NJ)将菌株 G5 *phzIR* 基因与其他相关同源基因序列构建进化树, 结果表明, *Pseudomonas* sp. G5 *phzIR* 基因与其他假单胞菌属 *phzIR* 同源基因进化关系密切, 其中与 *P. chlororaphis* strain 06 的 *phzIR* 基因的遗传进化距离最近, 其次是 *P. chlororaphis* PCL1391(图 5)。

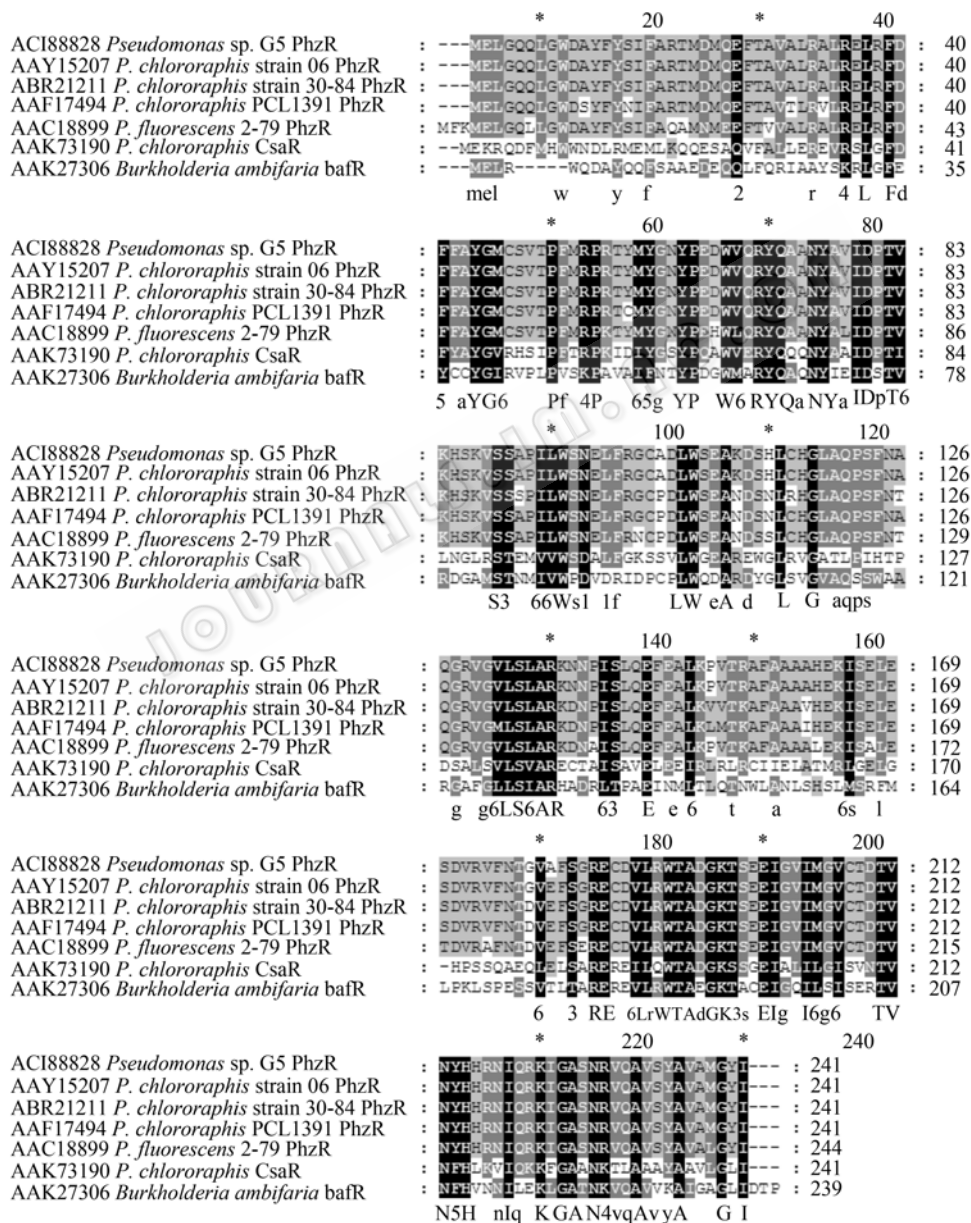


图 4 *Pseudomonas* sp. G5 与其他细菌 PhzR 家族蛋白的氨基酸序列比对

Fig. 4 Amino acid sequence alignment of PhzR from *Pseudomonas* sp. G5 and other bacteria.

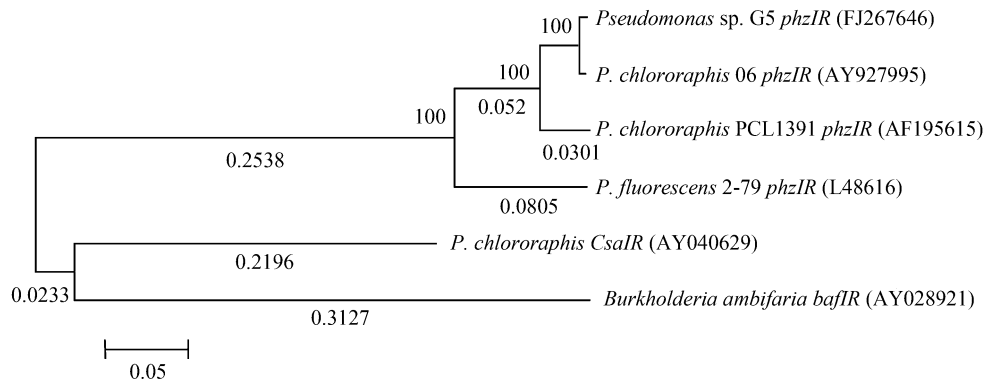


图5 不同细菌来源的 *luxIR* 同源基因系统进化分析

Fig. 5 Phylogenetic analysis of the related *luxIR* homologous genes from different bacteria. The phylogenetic tree was constructed using MEGA 4 (Neighbour-joining). The significance of each branch is bootstrap value calculated for 100 subsets. Bar=5 nucleotide substitutions per 100 nucleotides.

### 3 讨论

番茄根细菌 *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 是防治尖孢镰孢霉 *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radicis-lycopersici* 引起的腐烂病的有效生防因子。抗生素吩嗪衍生物 PCN (Phenazine-1-carboxamide) 作为生防决定因子, 产量最高峰是在指数生长阶段的后期, 表明它的合成受种群密度依赖的 QS 系统的调控。通过 Q-TOF-MS 质谱结构鉴定, 也证实了 C6-HSL (HHL) 是菌株 PCL1391 产生的主要信号分子, 并且是 PCN 生物合成所必需的。而产生的其他 2 种信号分子 C4-HSL (BHL) 和 C8-HSL (OHL) 不影响 PCN 合成<sup>[12]</sup>。

许多假单胞菌, 包括病原性的铜绿假单胞菌 *P. aeruginosa* 和根际生防细菌, 如荧光假单胞菌 *P. fluorescens*、绿针假单胞菌 *P. chlororaphis* 都产生吩嗪及其衍生物。这些次生代谢物不仅具有广谱抑菌活性, 还使它们在微生境中获得更强的竞争优势。所以鉴定 *phz* 基因簇及其调控机制是非常重要的。研究已表明, 在迄今已检验的 *phz* 操纵子中, *phzA*、*B*、*C*、*D*、*E*、*F*、*G* 七个基因的顺序及其产物的氨基酸序列都是保守的。在菌株 G5 中, *phzI* 和 *phzR* 2 个基因相连, 但转录方向相反, 核苷酸和推断的氨基酸序列与已知产吩嗪的其他生防菌株 *P. chlororaphis* PCL1391、*P. chlororaphis* (*aureofaciens*) 30-84 和 *P. fluorescens* 2-79 等具有高度同源性, 都产生 HHL, 但菌株 2-79 主要产生羟基取代基的 AHLs 信号 3-OH-HSLs。 *phzI-phzR* 同源基因的高度

相似性说明在 *Pseudomonas* spp. 中抗生素吩嗪的代谢调控在进化上是保守的, 而且 *phzI* 启动子区高度保守的回文序列 *phz* box, 通过序列分析在菌株 G 中也被鉴定, 位于 -55~85 (CCGAAGCCCCTACCAG ATCTTGCAGGTGCC) 之间, 说明 AHLs 信号分子的合成也依赖细胞密度, 是自我调控的<sup>[12-14]</sup>。

基于 *C. violaceum* CV026 的 TLC 分析, 结合对比标准样品的  $R_f$  值, 初步确定无取代基的 HHL 也是 *Pseudomonas* G5 菌株 *phzI* 负责合成的主要信号分子, 这与菌株 PCL1391 的情况相似。但是 HHL 如何参与调控菌株 G5 抗生素生物合成及其生防活性, 有待于进一步研究。其他信号分子的鉴定及其丰度还有赖于 LC-MS 和 NMR 等更灵敏和精确的技术手段鉴定。

经 BIOLOG 系统鉴定和 16S rDNA 序列分析 (GenBank Accession No. EU344963), 参考 Peix 等最新文献的分类标准<sup>[15]</sup>, 本试验暂定 *Pseudomonas* G5 菌株属于绿针假单胞菌属桔黄亚种 *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca*。菌株 G5 作为内生菌与植物协同进化的结果赋予它更多的优势, 克隆组成 QS 系统的 *phzI-phzR* 基因, 对于系统研究 AHL 信号通路对内生细菌与病原菌, 以及寄主植物相互作用的全局调控机制奠定了基础。

### REFERENCES

- [1] Mercado-Blanco J, Bakker PAHM. Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas* spp: Exploiting bacterial traits for crop protection. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2007, **92**: 367-389.

- [2] Compant S, Duffy B, Nowak J, *et al.* Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**: 4951–4959.
- [3] Dubuis C, Keel C, Haas D. Dialogues of root-colonizing biocontrol pseudomonads. *Eur J Plant Pathol*, 2007, **119**: 311–328.
- [4] Haas D, Defago G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat Rev Microbiol*, 2005, **3**: 307–319.
- [5] Liu X, Bimerew M, Ma Y, *et al.* Quorum-sensing signaling is required for production of the antibiotic pyrrolnitrin in a rhizospheric biocontrol strain of *Serratia plymuthica*. *FEMS Microbiol Lett*, 2007, **270**: 299–305.
- [6] Maddula VS, Zhang Z, Pierson EA, *et al.* Quorum sensing and phenazines are involved in biofilm formation by *Pseudomonas chlororaphis* (*aureofaciens*) strain 30-84. *Microb Ecol*, 2006, **52** (2) : 289–301.
- [7] Pang Y, Liu X, Ma Y, *et al.* Induction of systemic resistance, root colonization and biocontrol activities of the rhizospheric strain of *Serratia plymuthica* are dependent on N-acyl homoserine lactones. *Eur J Plant Pathol*, 2009, **124**(2): 261–268.
- [8] Yan A, Huang X, Liu H, *et al.* An *rhl*-like quorum-sensing system negatively regulates pyoluteorin production in *Pseudomonas* sp. M18. *Microbiology*, 2007, **153**: 16–28.
- [9] Waters CM, Bassler BK. Quorum sensing: Cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2005, **21**: 319–346.
- [10] Chin-A-Woeng TFC, Bloemberg GV, Lugtenberg BJJ. Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. *New Phytologist*, 2003, **157**: 503–523.
- [11] Ovadis M, Liu X, Gavriel S, *et al.* The global regulator genes from biocontrol strains *Serratia plymuthica* IC1270: Cloning, sequencing, and functional studies. *J Bacteriol*, 2004, **186**: 4986–4993.
- [12] Chin-A-Woeng TFC, Van den Broek D, de Voer G, *et al.* Phenazine-1-carboxamide production in the biocontrol strain *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 is regulated by multiple factors secreted into the growth medium. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2001, **14**: 969–979.
- [13] Khan SR, Mavrodi DV, Jog GJ, *et al.* Activation of the *phz* operon of *Pseudomonas fluorescens* 2-79 requires the LuxR homolog PhzR, N-(3-OH-hexanoyl)-L-homoserine lactone produced by the LuxI homolog PhzI, and a *cis*-acting *phz* box. *J Bacteriol*, 2005, **187**: 6517–6527.
- [14] Wood DW, Pierson III LS. The *phzI* gene of *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 is responsible for the production of a diffusible signal required for phenazine antibiotic production. *Gene*, 1996, **168**: 49–53.
- [15] Peix A, Valverde A, Rivas R, *et al.* Reclassification of *Pseudomonas aurantiaca* as a synonym of *Pseudomonas chlororaphis* and proposal of three subspecies, *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* subsp. nov., *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* subsp. nov., comb. nov. and *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* subsp. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2007, **57**: 1286–1290.



### 本 期 广 告 索 引

企业	版位	企业	版位
东曹达 ( 上海 ) 贸易有限公司	封底	生物谷网站	内页
Roche 诊断产品有限公司	封二	上海国强生化工程装备有限公司	内页
赛默飞世尔科技有限公司	封三	镇江东方生物工程公司	内页
美国 Promega 公司	内页	泰州贝今生物技术有限公司	内页
上海同田生物技术有限公司	内页		