

研究报告

荧光假单胞菌 2P24 中 *gidA* 基因对 PcoI/PcoR 群体感应系统的影响

张伟 张博 吴小刚 张力群*

(中国农业大学 植物病理系 北京 100193)

摘要: 【目的】荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*) 2P24 中 PcoI/PcoR 群体感应系统是调控生物膜形成与植物根部定殖能力的重要元件,同时该系统也受到多种上游因子的调控。利用遗传学方法研究 *P. fluorescens* 2P24 中 *gidA* 基因对群体感应系统的调控作用。【方法】将群体感应信号合成基因 *pcol* 的转录报告质粒 p970km-pcoIp 转入菌株 2P24 和 *gidA* 基因突变体中以检测 *gidA* 对 *pcol* 基因表达的影响,并利用报告菌 *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4)测定菌株 2P24 及其衍生菌的信号 *N*-乙酰高丝氨酸内酯(AHL)产量。【结果】*gidA* 基因突变后 *pcol* 基因的转录表达和 AHL 产量与野生型 2P24 相比显著降低。*gidA* 基因突变体的游动能力没有受到明显的影响,但生物膜的形成显著低于野生型和互补菌株。小麦根部定殖实验表明,温室条件下 *gidA* 突变菌株在灭菌土和自然土中对小麦根尖和根围的定殖量较野生型和互补菌显著减少。此外,突变 *gidA* 基因并不影响菌株在 LB 培养基中的生长,但以葡萄糖、蔗糖、果糖、甘油、半乳糖、阿拉伯糖、甘露糖、木糖或山梨醇为唯一碳源时, *gidA* 突变体的生长受到明显的抑制。【结论】GidA 对假单胞菌 2P24 中的 PcoI/PcoR 群体感应系统、生物膜形成、定殖和碳源利用具有显著的正调控作用。

关键词: 荧光假单胞菌, 群体感应, GidA

Effect of the *gidA* gene on the PcoI/PcoR quorum-sensing system in *Pseudomonas fluorescens* 2P24

ZHANG Wei ZHANG Bo WU Xiao-Gang ZHANG Li-Qun*

(Department of Plant Pathology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: [Objective] The PcoI/PcoR quorum-sensing (QS) system in *Pseudomonas fluorescens* 2P24, important for biofilm formation and plant root colonization, was influenced by multiple upstream regulatory elements. In this study, the effect of the *gidA* gene on QS system was studied by genetic analysis. [Methods] The transcriptional reporter of *pcol* gene on plasmid p970km-pcoIp was used to monitor the *pcol* expression in the wild type strain 2P24 and its *gidA* gene mutant. *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4) was used as the reporter strain to detect QS signal

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2011AA10A205); 国家自然科学基金项目(No. 31071725, 31272082)

*通讯作者: Tel/Fax: 86-10-62731464; ✉: zhanglq@cau.edu.cn

收稿日期: 2013-03-07; 接受日期: 2013-04-24; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-25

molecule *N*-acyl-homoserine lactone (AHL) production. [Results] Mutation of the *gidA* gene in strain 2P24 did not influence its swimming capacity, but significantly decreased *pcrI* transcription and AHL production. Furthermore, the biofilm formation and the colonization on the wheat rhizosphere and tips in both the gnotobiotic and natural soil were remarkably reduced in the *gidA* gene mutant compared with the wild type and the complementary strain. Although the *gidA* mutation in strain 2P24 did not affect the bacterial growth in the rich medium (LB), it significantly affected the utilization of multiple carbon sources in the minimal medium, including glucose, sucrose, fructose, glycerol, galactose, arabinose, mannose, xylose and sorbitol. [Conclusion] These results suggest that GidA function as a global regulatory element influenced the PcoI/PcoR QS system, biofilm formation, colonization ability and carbon source utilization in *P. fluorescens* 2P24.

Keywords: *Pseudomonas fluorescens*, Quorum-sensing, GidA

群体感应(Quorum-sensing, QS)是细菌细胞内一种重要的信号传递途径。细菌在繁殖过程中向周围环境中分泌特定的信号分子,并利用信号分子感知周围环境中自身或其他细菌群体密度的变化。信号分子会随着群体密度的增加而增加,当群体密度达到一定阈值时,信号分子参与启动菌体中特定基因的表达,改变和协调细胞之间的行为,呈现某种生理特性,从而实现单个细菌无法完成的某些生理功能^[1-2]。

在革兰氏阴性细菌中,主要的 QS 信号分子是 *N*-乙酰基高丝氨酸内酯(Acyl-homoserine lactones, AHLs)类物质。QS 系统主要包括两种组分: LuxI 蛋白和 LuxR 蛋白。LuxI 蛋白是信号分子 AHL 的合成酶, LuxR 蛋白是细胞内 AHL 的感受因子,同时也是一种 DNA 结合转录激活元件。当外界 AHL 浓度达到一定阈值时就会与 LuxR 结合,所形成的复合物能够激活某些生物学特性的基因表达^[3]。目前已知 QS 系统参与调控许多细菌的重要生理功能,如抗生素的产生、生物发光、固氮基因的表达、Ti 质粒的接合转移、毒性基因的表达、细菌的群游和生物膜的形成等^[4-5]。

荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*) 2P24, 分离自小麦全蚀病自然衰退土壤,可以有效防治多种植物病原真菌、细菌引起的土传病害。前期研究表明,菌株 2P24 中存在类似的群体感应系统 PcoI/PcoR。该系统影响生物膜的形成和菌株在植物根部的定殖能力,间接影响其对土传病害的生物防治效果^[6]。PcoI/PcoR 系统受到许多因子的

调控,除自体反馈调控外^[7],还包括 GacS/GacA 双因子调控系统^[8]、Sigma 因子 RpoS^[8]、PhoP/PhoQ 双因子调控系统^[9]、RNA 结合蛋白 Hfq^[10]以及 H-NS DNA 结合蛋白家族 MvaV/MvaT 等^[11]。实验室前期研究在 *P. fluorescens* 2P24 中利用转座子 Tn5 随机突变的方法得到一株 *pcrI* 基因转录明显降低的突变体 PM112,突变体中 Tn5 侧翼序列的克隆和测序结果表明 Tn5 的插入发生在 *gidA* 基因内部。GidA 最先在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中被发现,当有葡萄糖存在时突变 *gidA* 基因后细胞分裂受到影响^[12]。最近的研究表明,GidA 调控了许多病原菌的生物学特性和致病能力,包括铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)^[13]、丁香假单胞菌(*P. syringae*)^[14]、鼠伤寒沙门菌(*Salmonella enterica* serovar Typhimurium)^[15-17]、化脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)^[18]、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)^[19]和黄色黏球菌(*Myxococcus Xanthus*)^[20]。本文在前期研究的基础上,从遗传学角度研究了 GidA 对 *P. fluorescens* 2P24 中 PcoI/PcoR 群体感应系统的调控作用,同时明确了 GidA 对菌株生物膜、游动性、定殖能力和碳源利用的影响。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和培养条件

本实验所用的菌株和质粒见表 1。*P. fluorescens* 2P24 及其衍生菌株在 LB 或假单胞菌基本培养基(PBMM)^[21]中 28 °C 培养 36–48 h。*E. coli* DH5α 在 LB 培养基中 37 °C 培养 12–16 h。

表 1 本实验所用菌株和质粒
Table 1 Bacteria strains and plasmids used in this study

菌株或质粒 Strain or plasmid	描述 Description	参考文献或来源 Reference or source
Strains		
<i>P. fluorescens</i>		
2P24	Wild type; Amp ^r	[22]
PM112	<i>gidA</i> ::Tn5 in strain 2P24; Amp ^r , Km ^r	Laboratory stock
PM701	<i>gidA</i> gene in-frame deletion in strain 2P24; Amp ^r	This study
<i>Escherichia coli</i> DH5α	<i>supE44 lacU169 (ϕ80lacZ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	[23]
Plasmids		
pBSKm	Suicide plasmid for <i>Pseudomonas</i> spp., used for homologous recombination; Km ^r	Laboratory stock
pBSKΔ <i>gidA</i>	Plasmid pBSKm carrying an in-frame deleted <i>gidA</i> gene; Km ^r	This study
pBBR1MCS-5	Broad-host-rang cloning vector; Gm ^r	[24]
pBBR5- <i>gidA</i>	pBBR1MCS-5 containing the <i>gidA</i> gene; Gm ^r	This study
p970Km- <i>pcolp</i>	pRG970Km containing a <i>pcol-lacZ</i> transcriptional fusion; Km ^r	[9]

注：Amp^r、Km^r和 Gm^r：抗氨苄青霉素、卡那霉素和庆大霉素。
Note: Amp^r, Km^r and Gm^r: Ampicillin, kanamycin and gentamicin, respectively.

抗生素使用终浓度分别为：氨苄青霉素(Amp) 50 mg/L，卡那霉素(Km) 50 mg/L，庆大霉素(Gm) 10 mg/L。5-溴-4-氯-3-吡啶-β-D-半乳糖苷(X-Gal)使用终浓度为 40 mg/L。

1.2 DNA 操作和序列分析

DNA 操作参照文献[25] ,序列测定由北京六合华大基因科技股份有限公司完成。核苷酸序列分析由 DNAMAN 软件和在线 BLAST 搜索引擎 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)完成。

1.3 *gidA* 基因内缺失突变菌株的构建

gidA 基因内缺失突变体的构建方法如下：以 *P. fluorescens* 2P24 基因组为模板，分别利用引物 *gidA*-F1/*gidA*-R1 (5'-ATGTCGACGAGTCCAGTTGCTGAAGTTC-3'和 5'-ATGGATCCGAGAGTATCGAGCTGGAAG-3'，下划线分别为 *Sal* I 和 *Bam*H I 位点)和引物 *gidA*-F2/*gidA*-R2 (5'-ATGGATCCTGCAAACCGATGTGGATAAG-3'和 5'-ATGAATTCATCCACAGGCTTACACC-3'，下划线分别为 *Bam*H I 和 *Eco*R I 位点) PCR 扩增 *gidA* 基因上下游片段。所得片段分别用 *Sal* I -*Bam*H I 和 *Bam*H I -*Eco*R I 酶切，与经 *Sal* I -*Eco*R I 酶切的 pBSKm 连接得到自杀载体 pBSKΔ*gidA*。将该载

体电击转入野生型 2P24 中，经继代培养，两次同源重组后得到 *gidA* 基因内缺失突变体 PM701。以 PM701 基因组为模板，利用引物 *gidA*-F1 和 *gidA*-R2 PCR 扩增的方法验证 *gidA* 基因的缺失。为互补突变菌 PM701，用引物 *gidA*-HBF/*gidA*-HBR (5'-ATGAGCTCAGGTTGTAGGCCTTGTTTC-3'和 5'-ATGTCGACAGATAGGGTGCTCAGTAAG-3'，下划线分别为 *Sac* I 和 *Sal* I 位点)扩增得到含有完整 *gidA* 基因的片段并克隆到穿梭载体 pBBR1MCS-5 上得到互补载体 pBBR5-*gidA*。将互补载体转入突变体 PM701 中即可得到互补菌株。

1.4 信号分子 AHL 的提取和定量

将 2P24 及其衍生菌株接种于 5 mL LB 液体培养基中，28 °C 培养 48 h。各取菌液 600 μL，12 000 r/min 离心 1 min。将上清用等体积的乙酸乙酯萃取，风干有机相后溶于 100 μL 甲醇。各取 5 μL 与报告菌 *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4 ,OD₆₀₀=0.8) 混合，培养 3 h 后，检测 β-半乳糖苷酶活性。β-半乳糖苷酶活性的定性和定量检测参照文献[25]。

1.5 生物膜与游动性的测定

生物膜的测定方法如下：将各待测菌株接种于

LB 培养基中培养至稳定生长期, 以 1:1 000 (体积比) 稀释后取 500 μL 到 2 mL 的 PVC 离心管中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 24 h。每管加入 200 μL 浓度为 0.1% (质量体积比) 的结晶紫, 染色 15 min。将培养物倒出, 用蒸馏水冲洗离心管, 在管壁与液面交界处细菌形成坚固的生物膜被染成紫色。最后用 95% 的乙醇充分溶解与生物膜结合的结晶紫, 测定 OD_{570} 吸光值。

游动性的测定方法为: 取 3 μL 培养过夜的待测菌液, 滴于游动性检测平板上(0.5% Tryptone、0.3% Yeast extract、2.0% Glycerol 和 0.2% Bacto agar), 晾干后 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h, 测量细菌迁移直径。

1.6 小麦根部定殖能力的测定

小麦种子表面消毒后于 28 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中催芽, 然后浸泡在 2P24 及其衍生菌株的菌悬液 (10^8 CFU/mL) 中 30 min, 晾干后播种在分别装有灭菌土和自然土的营养钵中, 置于温室中培养, 白天 25 $^{\circ}\text{C}$, 夜晚 20 $^{\circ}\text{C}$ 。在播种后 7、14 和 21 d 随机取苗并检测各处理菌株在小麦根尖和根围的定殖数量。实验重复 2 次, 每个处理设 3 次重复, 每次重复检测 10 株苗。菌落形成单位(CFU)在数据统计之前进行了 \lg/\log_{10} 的转化^[10]。

2 结果与分析

2.1 *P. fluorescens* 2P24 中 *gidA* 基因的鉴定及缺失突变体的构建

实验室前期研究利用 mini-Tn5 转座子在 *P. fluorescens* 2P24 基因组中随机插入突变的方法, 筛选得到 1 株 *pcoI* 基因表达明显降低的突变体(PM112)。对该突变体中 Tn5 侧翼序列进行鸟枪克隆并测序, 序列分析表明突变体 PM112 中被 Tn5 破坏的基因为 *gidA*, 该基因的上下游分别为 *trmE* 和 *gidB* 基因(图 1)。*gidA* 基因推测的产物(632 个氨基酸; 69 kD)与其他假单胞菌中的 GidA 蛋白具有高度的相似性, 其中与 *P. fluorescens* Pf0-1 (登录号 YP351465)、*P. syringae* B728a (登录号 YP238197)、*P. putida* GB-1 (登录号 YP001671659) 和 *P. aeruginosa* PAO1 (登录号 NP254252) 的 GidA 蛋

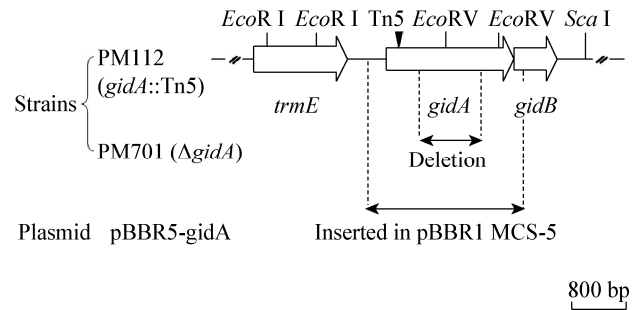


图 1 *P. fluorescens* 2P24 中 *gidA* 基因结构示意图

Figure 1 Physical map of the *gidA* gene locus in *P. fluorescens* 2P24

注: 直线代表 2P24 基因组, 箭头表示基因的排列位置、ORF 大小和转录方向。黑色三角表示菌株 PM112 (*gidA*::Tn5) 中的 Tn5 插入位点。gidA 基因内缺失突变体 PM701 (Δ *gidA*) 和互补质粒 pBBR5-*gidA* 的构建参照实验方法。缺失和互补片段分别用两端为菱形和箭头的实线表示。标注了主要的酶切位点。

Note: The single-headed arrows represent the location and orientation of the genes in the strain 2P24 chromosome. The location of the Tn5 insertion in strain PM112 (*gidA*::Tn5) is indicated by black triangle. The constructions of deletion mutant PM701 (Δ *gidA*) and complementation plasmid pBBR5-*gidA* are described in methods. The solid bars with the diamond ends and the arrow ends correspond to the deleted fragment and the segment for complementation, respectively. The main restriction enzyme sites are shown.

白序列相似性分别为 97%、93%、91% 和 90%。为进一步确定 *gidA* 基因在菌株 2P24 中的调控作用, 本研究构建了 *gidA* 基因缺失突变体(PM701)及其互补菌株(图 1)。缺失突变体经 PCR 验证, 结果发现在 PM701 中扩增到长约 1 400 bp 的片段, 明显小于野生型菌株 2P24 (约 2 300 bp)(数据未显示), 说明 PM701 构建成功。

2.2 GidA 对 *pcoI* 基因的转录表达和 AHL 信号分子合成的影响

将 *pcoI* 基因转录报告融合质粒(p970Km-*pcoI*p)转入野生型 2P24 和 *gidA* 缺失突变体 PM701 中, 分别得到衍生菌株 2P24 (p970Km-*pcoI*p) 和 Δ *gidA* (p970Km-*pcoI*p)。p*pcoI* 基因转录表达的检测结果显示, 与野生型 2P24 相比, *gidA* 基因突变后 *pcoI* 的转录水平显著下降(图 2A), 说明 *gidA* 正调控 *pcoI* 基因的转录表达。信号分子 AHL 定量检测结果显

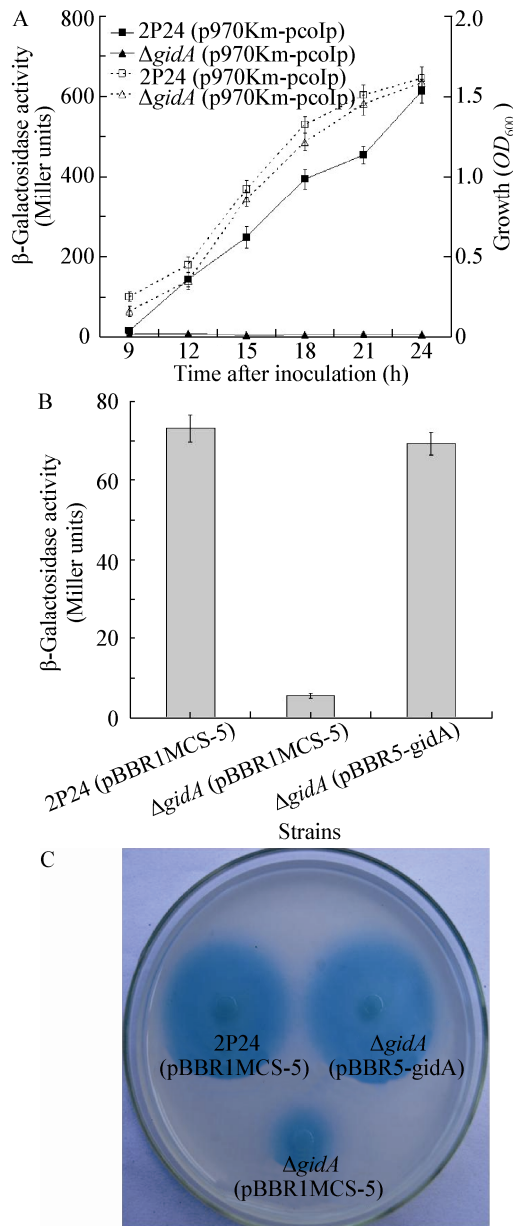


图2 *GidA* 对 *pcoI* 基因转录(A)和 AHL 信号分子合成(B, C)的影响

Figure 2 Effect of the *gidA* gene on the *pcoI* transcription (A) and the production of AHL molecules (B, C)

注:将含有质粒 p970Km-pcoIp 的菌株 2P24 和 *gidA* 基因突变体用 LB 培养基培养,于各时间点测定其 β -半乳糖苷酶活性。虚线表示各菌株的生长情况。AHL 的定量采用报告菌 *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4)与信号分子作用后测定酶活的方法。

Note: β -Galactosidase activities of the plasmid p970Km-pcoIp in *P. fluorescens* 2P24 and its *gidA* gene mutant were measured at various time points after inoculation into LB medium. Growth is indicated by the dotted line. For quantification of AHL, the β -galactosidase activity of *traG-lacZ* fusion in *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) was measured after incubation with AHL signals from strain 2P24 and its derivatives. All experiments were performed in triplicate, and the $\bar{x} \pm s$ are indicated.

示, *gidA* 基因突变体的 AHL 产量较野生型降低了大约 13 倍,并且将含有完整 *gidA* 基因的互补载体 (pBBR5-*gidA*) 转入该突变体中,可使其合成的 AHL 产量恢复到野生型水平(图 2B)。而且利用报告菌 *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) 信号检测平板的定性检测结果与 AHL 定量检测结果一致(图 2C)。以上结果表明,菌株 2P24 中 *GidA* 对 *pcoI* 基因的转录表达和 AHL 信号分子的合成具有显著的正调控作用。

2.3 *GidA* 对游动性和生物膜形成的影响

许多细菌利用群体感应系统对自身运动能力和生物膜的形成进行调控^[26-27]。本研究进一步检测了 *gidA* 基因对菌株 2P24 游动性和生物膜形成的影响。结果显示, *gidA* 基因突变后菌株的游动能力并无明显变化(图 3A),但生物膜的形成较野生型和互补菌株降低了大约 3 倍(图 3B)。以上结果表明, *GidA* 不参与菌株 2P24 游动能力的调控,但正调控生物膜的形成。

2.4 *GidA* 对菌株 2P24 在小麦根部定殖的影响

前期研究表明, *P. fluorescens* 2P24 中 *PcoI/PcoR* 群体感应系统正调控菌株在小麦和番茄根部的定殖能力^[28]。为了验证 *gidA* 基因的突变是否同样影响到菌株在植物根部的定殖,本研究检测了野生型 2P24、*gidA* 基因突变体及其互补菌株在小麦根尖和根围的定殖数量。结果表明,在灭菌土中接种各菌株 7、14 和 21 d 后, *gidA* 基因突变体定殖在小麦根尖的群体密度与野生型相比分别降低了 8.5、9.6 和 9.8 倍,这种变化可以通过转入互补载体 pBBR5-*gidA* 得到恢复(图 4A)。各处理菌株在小麦根围的定殖数量要高于根尖,但 *gidA* 突变体的根围定殖数量同样低于野生型和互补菌株(图 4B)。在自然土中也进行了相同的实验,结果反应了相似的趋势(图 4C, D)。以上结果表明 *GidA* 对菌株 2P24 在小麦根部的定殖起到了重要的作用。

2.5 *GidA* 对菌株 2P24 生长和碳源利用的影响

将菌株 2P24、*gidA* 基因突变体及其互补菌接种在 LB 培养基中培养,并检测其生长情况。结果

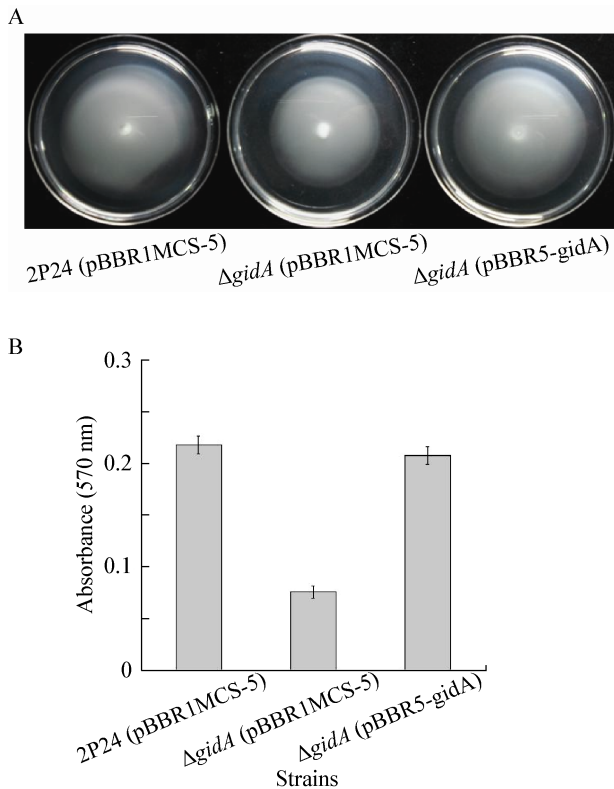


图3 *GidA* 对游动性(A)和生物膜形成(B)的影响

Figure 3 Effect of the *gidA* gene on swimming (A) and biofilm formation (B)

注:菌株 2P24 及其衍生菌的游动性在 0.2% 的琼脂平板上检测。生物膜在 PVC 塑料离心管中检测,样品于 28 °C 培养 24 h,然后用结晶紫染色,被染色的生物膜用乙醇溶解,测定其 OD₅₇₀ 吸光值。

Note: The swimming assay of the wild type 2P24 and its derivatives were performed on the soft agar (0.2%) plates. Biofilm formation was quantified on PVC plastic tube. The samples were incubated for 24 h at 28 °C and stained with crystal violet. The residual dye was solubilized in ethanol and determined at 570 nm. All experiments were performed in triplicate, and the $\bar{x} \pm s$ are indicated.

显示, *gidA* 基因突变体表现出与野生型和互补菌相似的生长量(图 5A)。而将各菌株接种在以葡萄糖、蔗糖、果糖、甘油、麦芽糖、半乳糖、阿拉伯糖、甘露糖、木糖、山梨醇和肌醇为唯一碳源的 PBMM 基本培养基中,培养 72 h 后的检测结果发现以麦芽糖和肌醇作为唯一碳源, *gidA* 基因突变体的生长与野生型相比没有显著的差异;以葡萄糖、蔗糖、果糖、甘油、半乳糖、阿拉伯糖、甘露糖、木糖和山

梨醇作为唯一碳源, *gidA* 基因突变体的生长量与野生型 2P24 相比明显下降(图 5B)。这些结果表明, *GidA* 参与了菌株 2P24 对部分碳源代谢的调控。

3 讨论

GidA 蛋白广泛存在于自然界的生物体内,在真细菌中十分保守。最近的研究表明, *GidA* 是一个黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)结合蛋白,催化了几种 tRNAs (tRNA^{Lys}, tRNA^{Glu}, tRNA^{Gln}, tRNA^{Leu} 和 tRNA^{Arg})第 34 位尿嘧啶上 CH₂-NH-CH₂-COOH 基团的合成,使摆动位置 U34 特异性地与 G 和 A 配对^[29-32]。这种修饰能够阻止碱基的错误插入和移码,保证蛋白翻译的准确性。根据 *GidA* 对特殊 tRNAs 的修饰功能,推测它调控细菌多种表型特征是发生在转录后水平。在本实验中,证明了 *GidA* 对 *P. fluorescens* 2P24 中 PcoI/PcoR 群体感应系统的调控作用。缺失突变和互补实验表明 *GidA* 对群体感应系统中 *pcoI* 基因的转录表达以及信号分子 AHL 的合成具有明显的正调控作用。*GidA* 对群体感应系统的调控在铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)中也有类似的报道。*P. aeruginosa* 中有两套群体感应系统, LasR/LasI(*las*)和 RhIR/RhlI(*rhl*)。Gupta 等(2009)将 *P. aeruginosa* 中的 *gidA* 基因失活后,特异性的降低了 RhIR 蛋白的翻译,而 *rhlR* 依赖的群体感应表现型,如: LasA 蛋白酶、绿脓菌素和鼠李糖脂也受到明显的影响^[13]。在 *P. fluorescens* 2P24 中 PcoR 在转录水平上正调控 *pcoI* 基因的表达以及 AHL 信号分子的产生^[7]。但对 *pcoR* 基因转录表达的检测结果显示 *gidA* 突变体中 *pcoR* 基因的转录与野生型相比没有显著的差异(数据未显示),这与 Gupta 等(2009)的实验结果一致。然而菌株 2P24 中 *GidA* 是否参与了 PcoR 蛋白的翻译调控,进而间接影响了 *pcoI* 基因的转录和 AHL 信号分子的合成,仍是今后需要证明的问题。

在 *P. syringae* 和 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 中, *gidA* 基因突变后细菌的运动能力受到明显的抑制^[14,17]。但在 *P. fluorescens* 2P24 中,

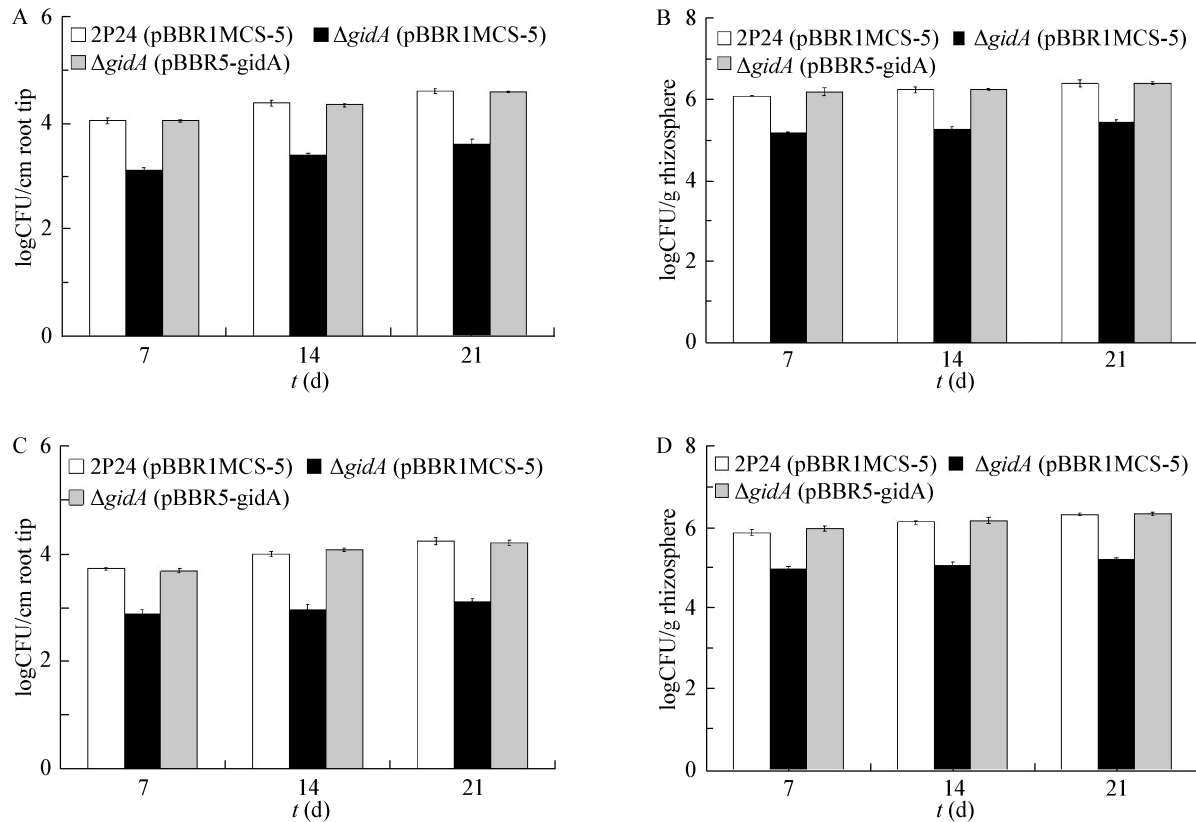


图4 *gidA* 基因对菌株 2P24 在小麦根部定殖的影响

Figure 4 Colonization of wheat rhizospheres and root tips by *P. fluorescens* 2P24 and its derivatives in sterile and natural soils
注：A：无菌土中根尖的定殖量；B：无菌土中根围的定殖量；C：自然土中根尖的定殖量；D：自然土中根围的定殖量。

Note: A: Root tip population in sterile soil; B: Rhizosphere population in sterile soil; C: Root tip population in natural soil; D: Rhizosphere population in natural soil. All experiments were performed in triplicate, and the $\bar{x} \pm s$ are indicated.

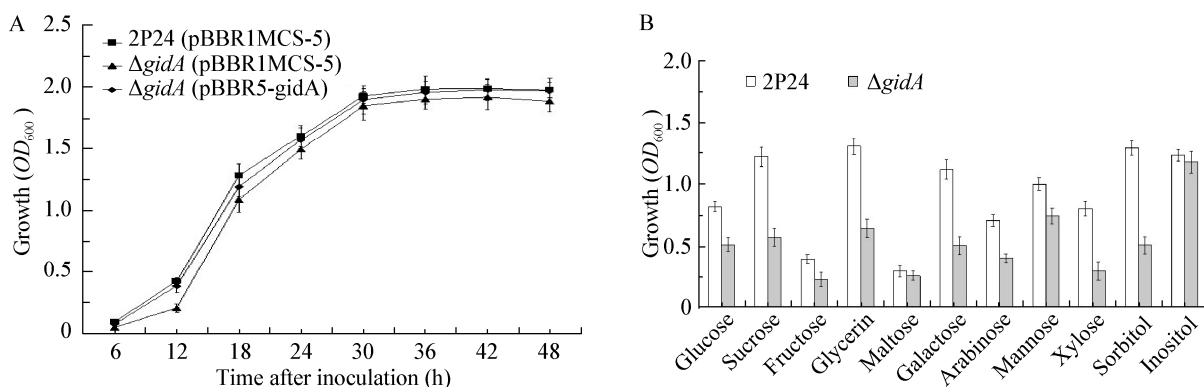


图5 *GidA* 对菌株 2P24 生长和碳源利用的影响

Figure 5 Effect of the *gidA* gene on the bacterial growth (A) and carbon source utilization (B) in *P. fluorescens* 2P24

注：菌株 2P24 及其衍生菌的生长曲线在 LB 培养基中检测。碳源利用在 PBMM 培养基中检测。各菌株的生长情况用 OD₆₀₀ 吸光值表示。

Note: The growth curves of *P. fluorescens* 2P24 and its derivatives were determined at 28 °C in LB medium. For quantification of carbon source utilization, strain 2P24 and its *gidA* mutant were cultured in PBMM media containing different carbohydrates as sole carbon source, respectively, and the growth was determined at 600 nm.

gidA 基因突变体的运动能力与野生型相比差异不显著, 说明了在不同的细菌中 GidA 对运动性相关基因的调控并不一致。在菌株 2P24 中, *pcoI* 基因的突变可降低菌株 2P24 的生物膜形成和定殖能力^[6-7], 本文研究表明 *gidA* 基因突变后其生物膜形成和在小麦根部的定殖同样受到明显的影响。因此推测 *P. fluorescens* 2P24 中 GidA 对生物膜形成和小麦根部定殖的调控可能是通过 QS 系统来实现的, 但也不排除会有其他基因参与的可能。

在 *E. coli* 和 *S. Typhimurium* 中, 将 *gidA* 基因突变菌株接种在添加葡萄糖(2%, 质量体积比)的 LB 中培养, 菌体会变成细丝状^[12,17]。在菌株 2P24 的 *gidA* 突变体中也观察到了相似的结果(数据未显示), 说明 2P24 中 GidA 也参与了细菌的细胞分裂过程。此外, 在 PBMM 基本培养基中当以葡萄糖、蔗糖、果糖、甘油、半乳糖、阿拉伯糖、甘露糖、木糖和山梨醇作为唯一碳源时, *gidA* 基因突变体的生长都受到了明显的抑制, 表明 GidA 参与了菌株 2P24 对多种碳源的利用过程。然而 GidA 对细胞分裂的作用机理以及突变 *gidA* 基因后对碳源利用能力的差异机制还需要进一步的试验解析。

GidA 是一个全局性的调控因子。本研究证明了 GidA 正调控 *P. fluorescens* 2P24 的 *pcoI* 基因表达, 信号分子产生、生物膜形成、定殖能力和碳源利用, 为更加深入地了解菌株 2P24 中 QS 系统的调控网络提供了新的遗传材料。但 GidA 调控多种性状的作用机制还有待于进一步的研究阐明。

参 考 文 献

- [1] Waters CM, Bassler BL. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria[J]. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2005, 21: 319-346.
- [2] 郭静, 李慕岩, 孙朋, 等. 细菌群体感应及其研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(1): 58-60.
- [3] Whitehead NA, Barnard AM, Slater H, et al. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2006, 25(4): 365-404.
- [4] Fuqua C, Parsek MR, Greenberg EP. Regulation of gene

expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing[J]. Annual Review of Genetics, 2001, 35(1): 439-468.

- [5] 张力群, 田涛, 梅桂英. 群体感应淬灭-防治植物细菌病害的新策略[J]. 中国生物防治, 2010, 26(3): 241-247.
- [6] Wei HL, Zhang LQ. Quorum-sensing system influences root colonization and biological control ability in *Pseudomonas fluorescens* 2P24[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2006, 89(2): 267-280.
- [7] 吴小刚, 付承梅, 张力群. 荧光假单胞菌 2P24 中 PcoI/PcoR 群体感应系统的自体反馈调控[J]. 微生物学通报, 2009, 36(7): 981-987.
- [8] Yan Q, Wu XG, Wei HL, et al. 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.
- [9] Yan Q, Gao W, Wu XG, et al. Regulation of the PcoI/PcoR quorum-sensing system in *Pseudomonas fluorescens* 2P24 by the PhoP/PhoQ two-component system[J]. Microbiology, 2009, 155(1): 124-133.
- [10] Wu XG, Duan HM, Tian T, et al. Effect of the *hfq* gene on 2,4-diacetylphloroglucinol production and the PcoI/PcoR quorum-sensing system in *Pseudomonas fluorescens* 2P24[J]. FEMS Microbiology Letters, 2010, 309(1): 16-24.
- [11] 吴小刚, 魏亚蕊, 刘九成, 等. 生防假单胞菌 2P24 中 *mvaT* 和 *mvaV* 基因对 PcoI/PcoR 群体感应系统的调控作用[J]. 微生物学报, 2012, 52(6): 710-717.
- [12] Meyenburg K, Jørgensen BB, Nielsen J, et al. Promoters of the *atp* operon coding for the membrane-bound ATP synthase of *Escherichia coli* Mapped by Tn10 insertion mutations[J]. Molecular and General Genetics MGG, 1982, 188(2): 240-248.
- [13] Gupta R, Gobble TR, Schuster M. GidA posttranscriptionally regulates *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of Bacteriology, 2009, 191(18): 5785-5792.
- [14] Kinscherf TG, Willis DK. Global regulation by *gidA* in *Pseudomonas syringae*[J]. Journal of Bacteriology, 2002, 184(8): 2281-2286.
- [15] Shippy DC, Heintz JA, Albrecht RM, et al. Deletion of glucose-inhibited division (*gidA*) gene alters the morphological and replication characteristics of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium[J]. Archives of Microbiology, 2012, 194(6): 405-412.
- [16] Shippy DC, Fadl AA. Immunological characterization of

- a *gidA* mutant strain of *Salmonella* for potential use in a live-attenuated vaccine[J]. BMC Microbiology, 2012, 12: 286.
- [17] Shippy DC, Eakley NM, Bochsler PN, et al. Biological and virulence characteristics of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium following deletion of glucose-inhibited division (*gidA*) gene[J]. Microbial Pathogenesis, 2011, 50(6): 303-313.
- [18] Kyu HC, Caparon MG. tRNA modification by GidA/MnmE is necessary for *Streptococcus pyogenes* virulence: A new strategy to make live attenuated strains[J]. Infection and Immunity, 2008, 76(7): 3176-3186.
- [19] Sha J, Kozlova EV, Fadl AA, et al. Molecular characterization of a glucose-inhibited division gene, *gidA*, that regulates cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas hydrophila*[J]. Infection and Immunity, 2004, 72(2): 1084-1095.
- [20] White DJ, Merod R, Thomasson B, et al. GidA is an FAD-binding protein involved in development of *Myxococcus xanthus*[J]. Molecular Microbiology, 2001, 42(2): 503-517.
- [21] Atlas RM. Handbook of microbiological media, 4th ed.[M]. Boca Raton: CRS Press, 2010: 1441.
- [22] 魏海雷, 王焱, 张力群, 等. 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.
- [23] Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids[J]. Journal of Molecular Biology, 1983, 166(4): 557-580.
- [24] Kovach ME, Elzer PH, Steven Hill D, et al. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes[J]. Gene, 1995, 166(1): 175-176.
- [25] Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [26] Daniels R, Vanderleyden J, Michiels J. Quorum sensing and swarming migration in bacteria[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2006, 28(3): 261-289.
- [27] Dickschat JS. Quorum sensing and bacterial biofilms[J]. Natural Product Reports, 2010, 27(3): 343-369.
- [28] 张清霞, 吴小刚, 张力群, 等. 荧光假单胞菌2P24调控基因突变体定殖能力和生防效果分析[J]. 中国生物防治, 2008, 24(1): 40-45.
- [29] Yim L, Moukadiri I, Björk GR, et al. Further insights into the tRNA modification process controlled by proteins MnmE and GidA of *Escherichia coli*[J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34(20): 5892-5905.
- [30] Moukadiri I, Prado S, Piera J, et al. Evolutionarily conserved proteins MnmE and GidA catalyze the formation of two methyluridine derivatives at tRNA wobble positions[J]. Nucleic Acids Research, 2009, 37(21): 7177-7193.
- [31] Shi R, Villarroja M, Ruiz-Partida R, et al. Structure-function analysis of *Escherichia coli* MnmG (GidA), a highly conserved tRNA-modifying enzyme[J]. Journal of Bacteriology, 2009, 191(24): 7614-7619.
- [32] Armengod M, Moukadiri I, Prado S, et al. Enzymology of tRNA modification in the bacterial MnmEG pathway[J]. Biochimie, 2012, 94(7): 1510-1520.