

假单胞菌 GP72 *rpeB* 突变株的构建及其对吩嗪类抗生素合成的调控

赵嘉 陈明敏 胡洪波 张雪洪*

(上海交通大学生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室 上海 200240)

摘要:【目的】绿针假单胞菌 GP72 是一株可生产吩嗪类抗生素吩嗪-1-羧酸 (PCA) 及 2-羟基吩嗪(2-OH-PHZ) 的生防假单胞菌。RpeA/RpeB 二元调控系统是其二元调控系统中的一组, 本文旨在研究这一系统中的应答调控子(RR)RpeB 对于 PCA 及 2-OH-PHZ 的生物合成影响。【方法】通过生物信息学分析获得了 *rpeA/rpeB* 二元调控系统的序列, 并从 GP72 中扩增出 *rpeB* 基因, 通过同源重组技术构建卡那霉素抗性片段插入突变 *rpeB* 的突变菌株 GP72BN。利用发酵实验、*rpeB* 基因回补实验及荧光定量 PCR 实验, 验证 *rpeB* 对于吩嗪类抗生素合成及相关基因表达的调控作用。【结果】在 KMB 培养基中, *rpeB* 突变株的 PCA 产量下降为野生型的 49.5%, 2-OH-PHZ 产量下降为野生型的 67.3%。*rpeB* 基因的回补可以在一定程度上回复 PCA 及 2-OH-PHZ 的产量。荧光定量 PCR 实验结果表明, *rpeB* 突变株中群体感应系统基因 *phzI/phzR* 及吩嗪合成基因簇基因 *phzE* 转录水平均显著下调, 而 PCA 转化为 2-OH-PHZ 的修饰基因 *phzO* 转录水平变化不显著。【结论】RpeB 正调控 PCA 与 2-OH-PHZ 合成途径的表达。RpeB 很可能是通过调控群体感应基因 *phzI/phzR* 和 *phz* 基因簇的表达, 从而影响 PCA 的合成, 并间接调控其衍生物 2-OH-PHZ 的合成。

关键词: 假单胞菌 GP72, *rpeB*, 吩嗪-1-羧酸, 2-羟基-吩嗪

Construction of *Pseudomonas* sp. GP72 *rpeB* mutant and its regulation on PCA and 2-OH-PHZ biosynthesis

ZHAO Jia CHEN Ming-Min HU Hong-Bo ZHANG Xue-Hong*

(School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, State Key Laboratory of Microbial Metabolism, Shanghai 200240, China)

Abstract: [Objective] Rhizobacterium *Pseudomonas chlororaphis* GP72 produces two antibiotics, phenazine-1-carboxylic acid (PCA) and 2-hydroxyphenazine (2-OH-PHZ). RpeB is the response regulator (RR) of RpeA/RpeB two-component signal transduction system. We studied the effect of RpeB on PCA and 2-OH-PZH biosynthesis and its genes expression. [Methods] The *rpeB* gene was amplified from the GP72 genome. The *rpeB* mutant (GP72BN) was constructed through inserted inactivation of kanamycin resistance cassette and homologous recombination. Phenazines production assay, gene complement experiment and qRT-PCR analysis were used to assess the influence of RpeB on PCA and 2-OH-PHZ biosynthesis and its gene expression. [Results] In KMB media, PCA and 2-OH-PHZ production of *rpeB* mutant was decreased by 49.5% and 67.3%. The complementation of *rpeB* could recover the production of these two phenazine antibiotics. The results of qRT-PCR showed that the transcription of *phzI/phzR* and *phzE* strongly decreased in *rpeB* mutant, but the transcription of *phzO* only decreased a little. [Conclusion] RpeB positively regulates PCA and 2-OH-PHZ biosynthesis, and it might work for upstream of quorum sensing gene *phzI/phzR* to influence the expression of *phz* operon.

Keywords: *P. chlororaphis* GP72, *rpeB*, Phenazine-1-carboxylic acid, 2-Hydroxyphenazine

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31270084); 国家 863 计划项目(No. 2012AA022107)

*通讯作者: Tel: 86-21-34204854; 邮箱: xuehzhang@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2014-09-24; 接受日期: 2014-11-03; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-12-11

假单胞菌可以通过次级代谢生产多种吩嗪类抗生素^[1], 由于这类抗生素具有环境兼容性好、毒性低等特点, 因此大多具有良好的农业应用与研发前景^[2]。在假单胞菌中, 一般先合成这些吩嗪衍生物的共同前体吩嗪-1-羧酸(PCA), 这一反应主要由一个较为保守的吩嗪合成基因簇 *phzABCDEFG* 负责^[3-4], 之后由修饰基因负责 PCA 向其他吩嗪衍生物的转化^[5-6]。而吩嗪衍生物的调控机制较为复杂并未被清晰阐述。现已知假单胞菌中主要存在着二元信号转导系统(TCST)、群体感应系统(QS)及小 RNA 控制的转录后调控系统等^[7]。其中二元调控系统一般由一组同源蛋白组成, 包含一个位于细胞膜上的组氨酸激酶(Histidine kinase, HK)感应子和一个位于细胞质中的应答调控子(Response regulator, RR)。当其中的组氨酸激酶感应子被环境中的某种信号激活时, 就会作用于应答调控子, 应答调控子再通过调控其他基因或蛋白从而对环境变化做出应答^[8]。

绿针假单胞菌 GP72 是从甜椒根际土壤中分离得到的一株生防假单胞菌, 主要生产 PCA 和 2-羟基-吩嗪(2-OH-PHZ)^[9]。通过基因组分析发现 GP72 中存在着大量的二元调控系统, 其中一组即为 RpeA/RpeB。本文针对其中的应答调控子 RpeB 对吩嗪衍生物合成的调控作用展开研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒及引物: 本研究所用的菌株、质粒及引物见表 1。

1.1.2 培养基和菌株生长条件: LB 培养基(g/L): 国产胰蛋白胨 10, 酵母提取物 5, NaCl 10, pH 7.0; KMB 培养基(g/L): 蛋白胨 20, 甘油 15 mL, MgSO₄ 0.732, K₂HPO₄ 0.514, pH 7.5; 固体培养基每升加琼脂 15 g; 1×10⁵ Pa 灭菌 20 min。假单胞菌 GP72 培养基中抗生素用量(mg/L): 壮观霉素(Sp) 100、四环素(Tc) 125、卡那霉素(Km) 50。大肠杆菌 LB 培养基中抗生素用量(mg/L): 卡那霉素(Km) 50、四环素(Tc) 10。E. coli 在 37 °C 培养; 假单胞菌在 28 °C、220 r/min 振荡培养。

1.1.3 主要试剂和仪器: Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、各种限制性内切酶、DNA Marker 均购自 TaKaRa 公司; DNA 纯化试剂盒、质粒抽提试剂盒、基因组 DNA 提取试剂盒均购自北京全式金生物技

术有限公司。IPTG、抗生素购自上海生工生物工程有限公司。安捷伦 HPLC (型号 A1260)、分析柱为反相 C18 色谱柱, 购自安捷伦公司。

1.2 引物和 PCR 反应

根据绿针假单胞菌 GP72 基因组草图 *rpeB* 的基因序列设计引物(见表 1-rpeBF 及 rpeBR), 以 GP72 基因组为模板, 通过 PCR 扩增全长的 *rpeB* 基因的编码序列。PCR 反应体系为: 2×GC buffer 为 25 μL; GP72 基因组 DNA (10 mg/L) 为 1.0 μL; dNTP (2.5 mmol/L) 为 4 μL; 引物 F1 (10 μmol/L) 为 1.5 μL; 引物 R1 (10 μmol/L) 为 1.5 μL; LA Taq (100 U/μL) 为 0.5 μL; 双蒸水为 16.5 μL; 反应总体积为 50.0 μL。PCR 反应条件为: 94 °C 30 s; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 50 s (1 min/kb), 30 个循环; 72 °C 10 min。

1.3 克隆 *rpeB* 基因片段及测序

质粒抽提、酶反应、DNA 片段回收、连接、感受态细胞制备等均参照文献[14]或相关试剂盒说明书进行, DNA 测序委托英骏生物技术有限公司完成。

1.4 细菌结合转移

采用固相滤膜杂交方法^[15]进行细菌结合转移。

1.5 生长曲线测定及吩嗪类抗生素产量的 HPLC 测定

OD₆₀₀ 值的测定及 PCA 的抽提和 HPLC 测定方法参照文献[15]。每种样品设有 3 个平行样, 每隔 12 h 取样测其 OD₆₀₀ 值和 PCA、2-OH-PHZ 产量。

1.6 荧光定量 PCR

RNA 提取、反转录 cDNA、实时荧光定量 PCR 均使用 TIANGEN 公司试剂盒, 严格按照试剂盒说明书进行实验。选用 *rpoD* 作为看家基因^[16], 按照 GP72 基因组相关基因序列设计引物(表 1), 片段大小为 150–200 bp。所有荧光 RT-PCR 反应均重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 *rpeB* 基因的克隆和分析

根据绿针假单胞菌 GP72 基因组草图进行 *rpeB* 基因的引物设计, 分别为 rpeBF 和 rpeBR, 并以基因组为模板扩增 *rpeB* 基因片段。通过 NCBI 基因库 BLAST 工具对其上下游基因进行比对。结果表明, GP72 中 *rpeA/rpeB* 二元调控系统在基因组上的位置与其他已公布的假单胞菌序列排列次序一致。其中

表 1 菌株、质粒及引物 Table 1 Strains, plasmids and primers		
Materials	Genotype and relevant characteristics	Source
<i>E. coli</i>		
DH5α	<i>supE44</i> , Δ <i>lacU169</i> (Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15), <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>	[10]
SM10	<i>thi-1</i> , <i>thr</i> , <i>leu</i> , <i>tonA</i> , <i>lacY</i> , <i>supE</i> , <i>recA::RP4-2-Tc::Mu</i> , Km ^r	[11]
<i>Pseudomonas</i> sp. M18		
GP72	Wild type, Sp ^r	[9]
GP72BN	GP72, <i>rpeB::Km^r</i> , Sp ^r , Km ^r	This study
Plasmids		
pMD19T simple	<i>LacZ</i> , operator cloning vector, Amp ^r	TaKaRa
pEX18Tc	Gene replacement vector with MCS from pUC18, <i>oriT</i> ⁺ , <i>sacB</i> ⁺ , Tc ^r	[12]
pMD19TB	pMD19T with <i>Sal</i> I- <i>Xba</i> I insert of 1.7 kb, including gene <i>rpeB</i> sequence, Amp ^r	This study
pMD19TK	pMD19T with <i>Cla</i> I- <i>Cla</i> I insert of 900 bp, including gene Km ^r sequence, Amp ^r , Km ^r	This study
pMD19TBK	pMD19T with <i>EcoR</i> I- <i>Xba</i> I insert of 2.6 kb, including <i>rpeB::Km^r</i>	This study
pEX18TcBK	pEX18Tc with <i>rpeB::Km^r</i>	This study
pMMB207	RSF1010 derivative, <i>IncQ</i> , <i>lacI</i> ^q , Cm ^r , Ptac, <i>oriT</i>	[13]
pMMB207RB	pMMB207 with <i>rpeB</i> fragment insert, Cm ^r	This study
Primer		
	Sequence (5'→3')	
rpeBR	ATGCCCAAATTCTTCTGTCTCGAAG	This study
rpeBF	TCAGCATTCCTCCACTCGGAACG	This study
rpeB1	TATTCCAAGCTTATGCCCAAATTCTTCTGTCTCGAAG	This study
rpeB2	AATTATGAATTCTCAGCATTCCCACTCGGAACG	This study
km1	CGGCGCGGATCCGAATTCAGCAGAGCGAGGTATGTAGG	This study
km2	GCGACTGGATCCGAATTCAGGTGGCACTTTTCGGGGA	This study
rpeBU1	TATTCGAGCTCACCCGGGCGCGGACTTCGGCGAT	This study
rpeBR2	AATTATGGTACCTCAGCATTCCCACTCGGAACG	This study
RT-PCR primer		
phzIRT1	CTACCTCCTGGCGTTCAATG	This study
phzIRT2	GAAGCGAGTCATTTCCAGA	This study
rpeART1	GTCGACGACGAACTGGAATC	This study
rpeART2	CTGGATACGCTTTTCGCAAT	This study
rpeBRT1	CTGGATACGCTTTTCGCAAT	This study
rpeBRT2	AGGTCGAGAATCACCAGGTC	This study
rpoD1	CAGCAGTCTCGCCTCAA	This study
rpoD2	CGGTAGTGCGACCAATGT	This study
phzO1	AGCACCGCAGTCCAATGA	This study
phzO2	AATACCACCATCGCCTCG	This study
phzE1	ATCACCGAGCAGCAATCC	This study
phzE2	GATGGCGAAAGAACGACA	This study
phzR1	GGATTACATTTATGCCACG	This study
phzR2	ATCACATTCCCGCCCACT	This study

Note: ^r: Antibiotics-resistant; Km: Kanamycin; Sp: Spectinomycin; Tc: Tetracycline; Cm: Chloromycetin.

rpeB 位于 *rpeA* 上游, 二元调控系统上游的两个基因编码 RND 型外排转运系统, 而其下游一个基因则编码烟酰胺酶(图 1)。

通过 NCBI 的 BLAST 比对, GP72 中的 *rpeB* 基因与 *Pseudomonas protegens* Pf-5 及 *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 的相似度分别为 92% 及 90%。通过蛋白结构分析, *rpeA/rpeB* 二元调控系统中的 RpeA 具备一个 ATP 结合位点及一个磷酸化位点, 通过同源性分析可归类为组氨酸激酶(HK)感应子; 而 RpeB 具备一个 DNA 结合位点及一个磷酸化位点, 通过同源性分析可归类为应答调控子。这表明 RpeA/RpeB 可能具备二元调控系统的基本特性, 其中 RpeB 应该作为应答调控子主要发挥调控作用。

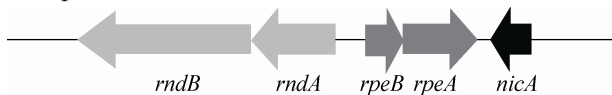


图 1 绿针假单胞菌 GP72 中 *rpeB* 上下游基因图谱

Figure 1 The map of the two component system *rpeA/rpeB* in *Pseudomonas Chlororaphis* GP72

2.2 *rpeB* 基因突变株的获得

基因突变使用双亲杂交进行抗性片段插入染色体失活, 具体方法为: 以 *rpeB1* 和 *rpeB2* 为引物, 以 GP72 基因组 DNA 为模板, 扩增基因组中的相应片段。以 *km1* 和 *km2* 为引物, 扩增卡那霉素抗性基因片段。分别将 PCR 产物与 pMD19T 载体相连接, 转化大肠杆菌后提取质粒验证, 获得质粒 pMD19TB 和 pMD19TK, 将这两种质粒分别使用 *Bam*H I 酶切, 经过 DNA 纯化试剂盒纯化, 使用 T4 连接酶连接, 获得质粒 pMD19TBK, 验证成功后通过 *Eco*R I-*Xba* I 双酶切与 pEX18Tc 相连接, 得到质粒 pEX18TcBK。将质粒转化进入 SM10, 与 GP72 进行双亲杂交, 通过含有 15% 蔗糖的抗性平板(Tc, Sp)进行第一次筛选, 第二次筛选出在含 Km、Sp 的平板上生长, 而在含 Tc、Sp 平板上不生长的单克隆, 即为双交换菌株。通过 PCR 及测序验证突变结果。PCR 结果如图 2 所示, 测序结果用 NCBI 的 BLAST 程序比对分析, 结果证明, 序列正确, 突变株 GP72BN 构建成功。

2.3 *rpeB* 突变对 GP72 菌株生长及吩噻类抗生素合成的影响

PCA 及 2-OH-PHZ 均是生防假单胞菌 GP72 产生的重要吩噻类抗生素。本研究通过菌株发酵验证

了 *rpeB* 突变对于菌株生长及两种抗生素合成的影响。分别将野生型菌株 GP72 与 *rpeB* 突变菌株 GP72BN 在 KMB 培养基中活化后 28 °C、220 r/min 振荡培养, 每隔 12 h 取样, 测定细胞密度 OD_{600} , 并利用高效液相色谱(HPLC)测定样品中 PCA 及 2-OH-PHZ 的浓度变化。每个样品均是 3 个平行样。

实验结果如图 3 所示。图 3A 中, 在整个测定周期, *rpeB* 的突变可以使菌体密度增加, 生长状况变好。说明 RpeB 对于绿针假单胞菌 GP72 的生长存在着一定影响。96 h 时 PCA 及 2-OH-PHZ 测定结果如图 3B 所示, 当 *rpeB* 突变后, PCA 及 2-OH-PHZ 的产量均有所下降, 其中 PCA 产量下降显著, 由 230.1 mg/L 下降为 113.2 mg/L, 下降了 50.5%。2-OH-PHZ 产量由 55.0 mg/L 下降到 37.0 mg/L, 下降了 32.7%。结果表明, *rpeB* 基因对于 PCA 及 2-OH-PHZ 的合成均起正调控作用。

2.4 *rpeB* 基因的回补对吩噻类抗生素产量的回复作用

为了进一步验证 GP72BN 菌株中抗生素产量的下降是由于 *rpeB* 基因突变带来的, 因此构建了含有 *rpeB* 基因的 pMMB207RB 重组质粒。将 pMMB207 空质粒分别电转化进入 GP72 野生型菌株以及 GP72BN 突变菌株, pMMB207RB 重组质粒电转化进入 GP72BN 突变菌株 验证成功后进行发酵实验。在菌体 OD_{600} 为 0.1 时添加 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L。发酵结果如图 4 所示, 结果证明, *rpeB* 基因在 *rpeB* 突变株中的回补表达可以在一定程度上回复 PCA 及 2-OH-PHZ 的产量, 说明 *rpeB* 突变株中吩噻类抗生素产量的下降是由于 *rpeB* 基因的突变引起, 进一步证实了 *rpeB* 正调控 PCA 及 2-OH-PHZ 的合成。

2.5 *rpeB* 突变对吩噻合成相关基因转录水平的影响

为了进一步检测 RpeB 在转录水平对于吩噻合成相关基因的影响, 选取了群体感应系统调控基因 *phzI/phzR*, 吩噻合成基因簇基因 *phzE* 以及 PCA 转化为 2-OH-PHZ 的修饰基因 *phzO*, 进行荧光定量 PCR 实验。据文献[17-18]报道, 在绿针假单胞菌 30-84 中, *phzI/phzR* 作为群体感应系统的调控基因, 通过 *phzI* 产生 N-AHL 信号分子, 信号分子与 PhzR 结合从而激活 *phz* 基因簇的表达。实验结果如图 5 所示。

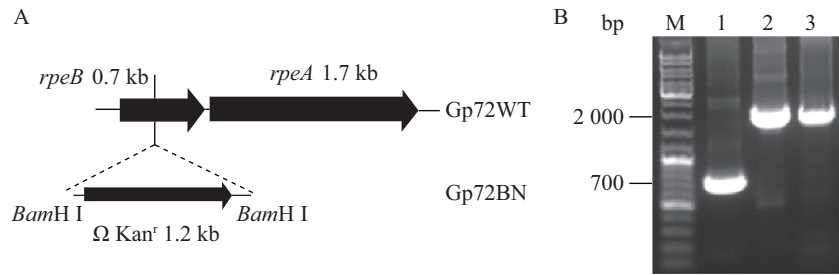


图 2 双亲杂交构建 *rpeB* 突变株 GP72BN 的物理图谱(A)及 PCR 验证电泳图谱(B)

Figure 2 Physical map of the *rpeB* gene with inserted *Km*^r gene cassette (A), confirmation of the *rpeB* mutant GP72BN by PCR (B)

注：M：DNA marker；1：野生型 GP72 中 *rpeB* 基因的 PCR 扩增片段；2：质粒 pEX18TcBK 中 *rpeB* 基因之抗性基因插入后的扩增片段；3：突变株 GP72BN 中 *rpeB* 基因之抗性基因插入后的扩增片段。

Note: M: DNA marker; 1: PCR product of *rpeB* of GP72WT; 2: PCR product of the *rpeB* gene with inserted *Km*^r gene cassette of plasmid pEX18TcBK; 3: PCR product of the *rpeB* gene with inserted *Km*^r gene cassette of GP72BN.

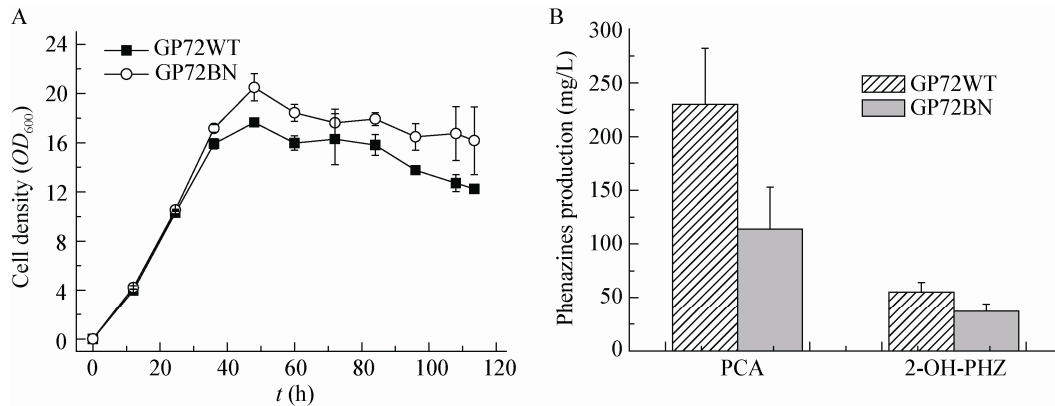


图 3 假单胞菌 GP72 和 GP72BN 菌株细胞生长曲线及吩嗪类抗生素的产量

Figure 3 Cell growth (OD₆₀₀) and phenazines production of the wild-type GP72 strain and GP72BN strain in KMB broth

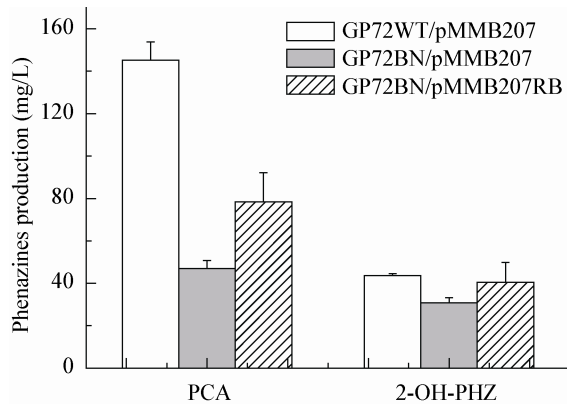


图 4 *rpeB* 基因回补对吩嗪类抗生素产量的影响

Figure 4 Effect of *rpeB* complementation on phenazines production

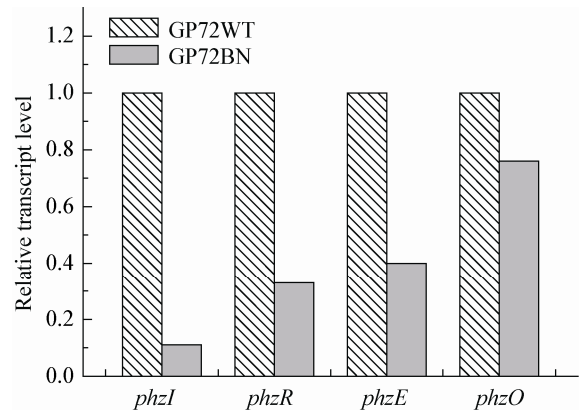


图 5 *rpeB* 突变对吩嗪类抗生素合成相关基因转录水平的影响

Figure 5 Effect of *rpeB* on phenazines biosynthesis gene transcription compared with GP72 wild type

结果表明,在 *rpeB* 突变株中, *phzI* 基因的转录水平仅为野生株的 11%, *phzR* 为野生型的 33%, *phzE* 为野生型的 40%, 这 3 个基因表达均有显著下调。说明 *rpeB* 正向调控 *phzI/phzR* 以及 *phz* 基因簇的表达。而 *phzO* 基因表达量下调小于 1.5 倍, 变化并不显著, 说明 *rpeB* 突变对于 *phzO* 基因没有显著影响, 2-OH-PHZ 的产量下降主要可能是由于其合成前体 PCA 的产量下降导致, 而这一结果也解释了为何 2-OH-PHZ 的产量下降幅度小于 PCA 的产量下降幅度。

3 讨论

在绿针假单胞菌 GP72 中, *RpeA/RpeB* 是一组重要的二元调控系统, 其中 *RpeA* 为组氨酸激酶(HK)感应子, 而 *RpeB* 作为应答调控子(RR), 直接对其他基因进行调控。本文通过实验发现, 在 KMB 培养基中, *RpeB* 对吩嗪衍生物 PCA 及 2-OH-PHZ 的合成均起到正调控作用。结合荧光定量 PCR 实验结果及现有报道^[17-18]中 *phzI/phzR* 对于吩嗪合成基因簇调控作用的研究, 我们推测 *rpeB* 可能是通过正向调控群体感应系统的 *phzI/phzR* 基因, 促进 *phzI/phzR* 的表达, 增加 N-AHL 信号分子及 *PhzR* 的数量, 从而进一步激活 *phz* 基因簇的表达, 达到对 PCA 合成的正向调控; 而 *rpeB* 对于 *phzO* 的调控作用并不显著, 说明其对 2-OH-PHZ 的正向调控作用主要是通过对其前体 PCA 的调控来达到的。

目前为止, 因吩嗪衍生物合成调控的复杂机制, *RpeB* 对于吩嗪衍生物合成的详细调节机制还并不完善。研究表明, 吩嗪诱导蛋白 Pip 及 σ 因子 *RpoS* 对群体感应系统均存在调控作用^[19], 因此, 在假单胞菌 GP72 中, *RpeB* 与 Pip 及 *RpoS* 之间是否存在相互作用可以成为进一步研究的目标。此外, 之前的研究表明 *rpeA* 对于吩嗪合成起负调控作用^[15], 而一般情况下二元调控系统中的双组分起到同样的调控作用, 这一现象是如何产生的, 也可以作为今后进一步的研究内容。假单胞菌中吩嗪衍生物合成调控网络的进一步完善, 将为提高吩嗪类抗生素的产量打下坚实的基础。

参考文献

[1] Laursen JB, Nielsen J. Phenazine natural products: biosynthesis,

synthetic analogues, and biological activity[J]. Chemical Reviews, 2004, 104(3): 1663-1686

- [2] Chin-A-Woeng TFC, Bloemberg GV, Lugtenberg BJJ. Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria[J]. New Phytologist, 2003, 157(3): 503-523
- [3] Mavrodi DV, Ksenzenko VN, Bonsall RF, et al. A seven-gene locus for synthesis of phenazine-1-carboxylic acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79[J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(9): 2541-2548
- [4] Mentel M, Ahuja EG, Mavrodi DV, et al. Of two make one: the biosynthesis of phenazines[J]. ChemBiochem, 2009, 10(14): 2295-2304
- [5] Delaney SM, Mavrodi DV, Bonsall RF, et al. *phzO*, a gene for biosynthesis of 2-hydroxylated phenazine compounds in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(1): 318-327
- [6] Chin-A-Woeng TFC, Thomas-Oates JE, Lugtenberg BJJ, et al. Introduction of the *phzH* gene of *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 extends the range of biocontrol ability of phenazine-1-carboxylic acid-producing *Pseudomonas* spp. strains[J]. Molecular Plant-microbe Interactions, 2001, 14(8): 1006-1015
- [7] Gross H, Loper JE. Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp.[J]. Natural Product Reports, 2009, 26(11): 1408-1446
- [8] Heeb S, Blumer C, Haas D. Regulatory RNA as mediator in GacA/RsmA-dependent global control of exoproduct formation in *Pseudomonas fluorescens* CHA0[J]. Journal of Bacteriology, 2002, 184(4): 1046-1056
- [9] Liu H, He Y, Jiang H, et al. Characterization of a phenazine-producing strain *Pseudomonas chlororaphis* GP72 with broad-spectrum antifungal activity from green pepper rhizosphere[J]. Current Microbiology, 2007, 54(4): 302-306
- [10] Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids[J]. Journal of Molecular Biology, 1983, 166(4): 557-580
- [11] Herrero M, de Lorenzo V, Timmis KN. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria[J]. Journal of Bacteriology, 1990, 172(11): 6557-6567
- [12] Keen NT, Tamaki S, Kobayashi D, et al. Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria[J]. Gene, 1988, 70(1): 191-197
- [13] Morales VM, Bäckman A, Bagdasarian M. A series of wide-host-range low-copy-number vectors that allow direct screening for recombinants[J]. Gene, 1991, 97(1): 39-47
- [14] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [15] Huang L, Chen MM, Wang W, et al. Enhanced production of 2-hydroxyphenazine in *Pseudomonas chlororaphis* GP72[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 89(1): 169-177
- [16] Mulet M, Bennasar A, Lalucat J, et al. An *rpoD*-based PCR procedure for the identification of *Pseudomonas* species and for their detection in environmental samples[J]. Molecular and Cellular Probes, 2009, 23(3): 140-147
- [17] 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[J]. Gene, 1996, 168(1): 49-53
- [18] Pierson LS, Keppenne VD, Wood DW. Phenazine antibiotic biosynthesis in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 is regulated by *PhzR* in response to cell density[J]. Journal of Bacteriology, 1994, 176(13): 3966-3974
- [19] Wang D, Lee SH, Seeve C, et al. Roles of the Gac-Rsm pathway in the regulation of phenazine biosynthesis in *Pseudomonas chlororaphis* 30-84[J]. Microbiology Open, 2013, 2(3): 505-524