

假单胞菌属生防菌株的遗传工程改良*

陈晓斌¹ 张炳欣¹ 何勇强²

(浙江大学植物保护系 杭州 310029)¹ (浙江大学资源与环境学院 杭州 310029)²

关键词: 假单胞菌属菌株, 生防活性, 遗传改良

中图分类号: Q789, S154.32 **文献标识码:** A

文章编号: 0253-2654(2000)04-0293-04

拮抗细菌的利用是植物病害生物防治的重要内容,其中利用最多的为假单胞菌属菌株,特别是用于土传病害的生物防治。假单胞菌类容易在植物根际定殖,也是根际最普遍的微生物类群,许多菌株具有防病促生的能力,如引起人们广泛注意的植物根际促生菌(Plant Growth-promoting Rhizobacteria, 简称 PGPR),其研究大多集中在该类群。假单胞菌类筛选菌株能够抑制多种植物病害特别是土传病害已成为植病生防工作者之共识,其作用机制包括:有效的根部定殖、抗生作用、根际的营养竞争(特别是对铁的竞争)、诱导植物

抗性和分泌降解病原微生物的酶等^[1]。随着分子生物学向不同学科领域的广泛渗入,通过对这些作用机制的遗传性状进行分析,进而采用遗传工程来加以改良已成为可能。假单胞菌属生防活性可以通过两类方法得以加强:(1)向具基础生防活性的菌株中导入添加的有益性状,(2)涉及抑病机制的性状的超量表达。目前,一些遗传改良后的假单胞菌株已显出诱人的生防效

* 澳大利亚国际农业发展中心(ACIAR)资助的中澳合作项目(No. PN9680)

收稿日期:1999-01-22, 修回日期:1999-09-12

果。本文综述了近年来这方面的研究进展。

1 转基因生防菌株的构建

1.1 有关抗生素作用 抗生素作用一直以来都被认为是假单胞菌类生防菌作用的重要方面。抗生素吩噻酸(PCA)和2,4-二乙酰蒽醌(Phl)为荧光假单胞菌土壤分离物中最典型的两种次生代谢产物。它们对防治由小麦全蚀病菌Ggt(*Gaeamauomyces graminis* var. *tritici*)引起的小麦全蚀病起着重要的作用^[2]。有趣的是,自然界中的假单胞菌似乎只产生PCA或Phl中的一种^[2]。由于控制PCA和Phl生物合成的基因是成簇的并已被克隆^[3,4]。因此,现在使用同一菌株产生PCA和Phl已成为可能。已有初步的实验证实将控制PCA生物合成的质粒导入到Phl产生菌株中,可以提高对Ggt的生防活性^[4]。

硝吡咯菌素(Pm)作为另一种假单胞菌抗生素,由于能抑制相应的真菌病害已被开发作为农用杀菌剂。现在来自*P. fluorescens* BL914的控制Prn生物合成的基因簇已被克隆,并已被构建表达转prn基因菌株^[5]。

1.2 有关嗜铁素方面 在荧光假单胞菌类中,铁的输出基本上依靠高亲和力的螯合体产物绿脓菌素(假单胞菌素)和水杨酸,以及对金属具低亲和力的绿脓菌螯合蛋白^[6]。因此,这些能特异性地与Fe³⁺结合的化合物称为嗜铁素,并能被位于假单胞菌细胞外膜上的特异受体所识别。荧光嗜铁素绿脓菌素由一个二羟基喹啉生色团和一个可变的线型寡肽组成,寡肽的长度和氨基酸组成决定了与之作用的嗜铁素受体的特异性,例如:PGPR菌株恶臭假单胞菌*P. putida* WCS358,产生的受体PapA蛋白,能够特异性地促进其自身的嗜铁素高铁假单胞菌素358的吸收,而对其他高铁假单胞菌素无作用。WCS358菌株还有一个明显的特征是具有接受其他各种异源假单胞菌素的受体。相比之下,*P. fluorescens* WCS374菌株只能利用特定范围的假单胞菌素。在胡萝卜根上的竞争实验显示,WCS374菌株明显不如WCS358菌株。然而,在基因工程衍生菌株*P. fluorescens* WCS374 / PMR(PupA⁺)中,即接受假单胞菌素358的受体蛋白PupA在其中能得到表达,该菌株则能与WCS385竞争,保持其种群密度^[7]。因此,拥有一种对异源嗜铁素的受体能在根际获得一种竞争的优势。不过,也有报道能利用另外的嗜铁素的能力并非

总是能提高假单胞菌菌株的生态适应性^[8]。

1.3 有关细菌的定殖 细菌在根部的定殖是一个复杂的多步过程。最初由于细菌对根分泌物趋化性而向根部移动,之后附着在根系并随根的生长而增殖,这一过程还涉及到与土著微生物的竞争。因此,定殖依靠细菌的许多基因,包括那些编码鞭毛的基因,控制化学信号传导途径的基因,编码细胞表面结构如纤毛、脂多糖等涉及附着的基因等。L. Dekkers及其合作者研究发现,对荧光假单胞菌*P. fluorescens* WCS365根部的有效定殖而言,巧妙的两组分调节系统,即ColS蛋白和ColR蛋白,以及一位点特异性重组酶Sss(即XerC蛋白)是必需的。sss基因最初是在铜绿假单胞菌*P. aeruginosa* 7NSK2上确定的;在Zn²⁺胁迫下sss⁻突变子不能诱导产生嗜铁素绿脓菌素,而野生型的7NSK2却能。虽然通过ColR蛋白和Sss酶调节根部定殖功能的机制还不清楚,但把含sss基因的质粒导入到*P. fluorescens* WCS307和*P. fluorescens* F113中后,这两种菌株的根部定殖能力均显著提高。WCS307菌株的生防活性在镰刀菌(*Fusarium* spp.)与番茄交互系统中也由于引入了sss⁺质粒而相应的提高,这些结果均说明了假单胞菌菌株的定殖能力能够通过基因工程的方法加以提高。

1.4 有关HCN 多种荧光假单胞菌生防菌株均能产生HCN,作为一种生物杀菌剂(生物农药),有助于抑制烟草黑根腐病^[9]。*P. fluorescens* CHAO中的生物合成HCN的基因为hcnABC基因簇。将CHAO的hcn基因转入荧光假单胞菌P5菌株(一种原本不产生HCN且很少具有生防活性的菌株),得到的P5重组菌生防活性明显提高^[9]。同样,一种叶面定殖的假单胞菌被构建后能超量产生HCN,与其亲本菌株相比,更能有效地防治小麦叶枯病(*Septoria tritici*)。

1.5 有关诱导抗性 一些根部定殖细菌能够诱导某些植物如黄瓜、烟草、拟南芥等对病毒、细菌和真菌叶部病原的系统抗性。其中,水杨酸的积累被认为是引发植物抗病基因的表达的重要因素。在*P. aeruginosa*中,水杨酸生物合成的基因pchA和pchB已被克隆,它们各自编码邻-香豆酸合成酶和邻-香豆酸-丙酮酸裂解酶,均是pchDCB操纵子的一部分^[6]。这两种酶在离体状况或在原位均能催化邻-香豆酸转变为水杨酸。铁对pchDCBA操纵子有很强的抑制作用。当pchBA基因被

融合到组成型启动子上时,水杨酸的形成则与铁有效性相互独立。缺少水杨酸生物合成功能的 *P. fluorescens* P5 菌株,通过导入组成型表达的 *pchBA* 基因,则被赋予了水杨酸产生器,当把这一转基因菌株施于烟草根部,则能部分地防止 TNV(烟草坏死病毒)的侵染。根据病斑数目和大小显示,其诱抗水平比其亲本菌株要显著得多^[10]。

1.6 有关酶方面 几丁质酶具分解真菌细胞壁的特性,来自粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)的一个几丁酶基因(*chiA*)已被克隆并在 *P. putida* 中组成型表达,含 *chiA* 的重组菌株能提高大豆对白绢病菌 *Sclerotium rolfii*,棉花对立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani* 的抗性。只是奇怪的是这一结果中重组子很快失去 *chiA*⁺ 质粒,而且,还不清楚是否异源寄主能主动分泌几丁酶,或者还是部分菌体的分解而导致培养上清液具几丁酶活性。另外, *Enterobacter agglomerans* 的 *chiA* 基因也被克隆并被转至假单胞菌中,编码表达的几丁酶能抑制立枯丝核菌 *R. solani* 菌丝的生长和尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum* 孢子的萌发^[11]。

2 涉及增强生防活性基因表达的基因工程

在离体培养时发现,高细胞密度和生长速度慢的情况下荧光假单胞菌类常典型地产生胞外酶和次生代谢产物。因此假单胞菌类在根际要显示出生防活性,需要达到一个相对较高水平的种群密度^[3,7],若从经济实用的观点出发,工程改良到那种在低细胞密度下就产生抗生物物质的根部定殖菌株是很吸引人的,这样细菌在接种后立即就能够发挥生防活性,并且不需要通常采用的那种高浓度的接种。Ligon等^[12]基于这种设想构建了 *P. fluorescens* BL915-ATG / *gacA* 菌株,能超量表达全局反应调节子 *GacA* 蛋白。反应调节子 *GacA* 蛋白受其同族的敏感蛋白 *LemA* 作用而激活,受至今尚不能明确的细胞外和细胞内信号的影响。*LemA* / *GacA* 系统控制着假单胞菌属和其他革兰氏阴性菌中次生代谢物和胞外酶的产生, *GacA* 蛋白超量表达能够部分地绕过对胞内外信号的需求,导致于相对较低的细胞密度下增加次生代谢产物^[10]。在铜绿假单胞菌 *P. aeruginosa* 和致金假单胞菌 *P. aureofaciens* 菌株中, *GacA* 控制着称为自体诱导物的可扩散信号 N-酰基高丝氨酸内酯的产生^[4,10]。自体诱导物是细菌之间信息交流的基本信号,当达到一个阈值浓度后,则能诱发多

种功能的表达(如抗生素的产生;酶,毒力因子的合成;生物发光等)。因此,从上述这些观点出发,似乎能这样解释:工程菌 BL-ATG / *gacA* 能超量产生一些自体诱导物,进而 *Pm* 产物增多,于是在低的接种浓度时,重组菌株与野生型菌株 BL915 相比,则能增强黄瓜对 *R. Solani* 的抗病力^[12]。另一例子是 *P. fluorescens* CHAO 菌株,它的特点是产生少量的 *Pm*,大量的 *Phl* 和膝黄素 (*Plt*),也被工程转化超量表达 *gacA* 基因,但发现在 CHAO 中这种超表达的 *gacA* 基因不能稳定地保持。

σ 因子为细菌各种代谢功能中的关键因子,在 *P. fluorescens* Pf-5 菌株中,与编码 σ 因子密切相关的 *rpoS* 基因的突变失活,会导致菌株失去合成的 *Pm* 的能力,而有趣的是,即使 *Phl* 和 *Plt* 超量产生, *rpoS*⁻ 突变株比 Pf-5 野生菌株更能有效地防治黄瓜中由终极腐霉 *P. ultimum* 引起的苗期猝倒病。终极腐霉对 *Plt* 特别敏感,这就解释了为什么 *rpoS*⁻ 突变株提高了生防效果。在 *P. fluorescens* CHAO 中, *rpoD* 基因(编码管家的 σ 因子)的超量表达同样也导致 *Phl* 和 *Plt* 的超量产生,并伴随对终极腐霉生防活性的增强。对这一影响似乎合理的解释是:过量的 *RpoS* 从核心 RNA 聚合酶中置换出来,因而导致 *RpoS* 缺乏,不过 *RpoD* / *RpoS* 平衡和抗生素(过量)产生之间的联系尚未被阐明。

限铁条件下的铁竞争和过量铁刺激抗生素合成是影响荧光假单胞菌类生防活性的两个方面因素^[2,13]。在荧光假单胞菌中,推定的 σ 因子 *PbrA* 蛋白(也曾被命名为 *PrdS* 或 *PfrI*)正向控制铁调节基因的表达。在 *P. fluorescens* F113 菌株中, *pbrA* 基因的超量表达能刺激限铁条件下的 *Phl* 合成(在野生型 F113 菌株中,铁不足限制 *Phl* 产生)。因此,在 *P. fluorescens* 的工程菌株中组成型地提高 *pbrA* 表达,能提高这类细菌在低铁环境下抑制病原的能力^[13]。

荧光假单胞菌中,生物合成 *Phl* 的结构基因^[2,3], *Pm* 的结构基因^[5]和 *Hcn* 的结构基因^[9]已被克隆(并已基本全部测序),而且,与调节这些代谢有关的基因已被发现^[2,3,5]。在 *P. fluorescens* BL915 菌株中,增强 *Pm* 基因的表达则能提高黄瓜对 *R. solani* 的抗病力^[12]。相反,在 *P. fluorescens* CHAO 中 *hcn* 基因簇的高丰度的组成型表达却不能提高烟草对黑根腐病菌 *Thielaviopsis basicola* 的抗病力。*Phl* 和 *Plt* 在 CHAO 中的超量产生对一些植物如十字花科植物,烟草和玉米

是有害的。总之,由根部定殖的假单胞菌类产生的抗生素在一定范围内对植物是有益的,相反浓度太高会没有效果甚至对植物有害。同样,利用 *P. fluorescens* 菌株的工程菌来超量产生植物激素 3-吲哚乙酸时也要考虑到这一点。

在我国,通过遗传改良提高假单胞菌属菌株生防活性的工作以中国农科院彭于发等利用转座子诱变进行生防细菌遗传改良获得的 D93 菌株为代表^[14,15]。他们首先自宁夏小麦根内分离得到荧光假单胞菌 CN12 菌株,该菌株对小麦全蚀病菌有良好抑菌活性和防病作用,在小麦根部定殖能力强并具有促进小麦生长的作用。经质粒分析试验证实,该菌株不含质粒。经抗生素培养基筛选得到抗利福平的菌株,其基本生物学特性与原 CN12 菌株一致。选用自杀质粒 pSUP2021 为载体,分别以含 pSUP2021 的大肠杆菌 S17-1 菌株和荧光假单胞菌 CN12 菌株为供体菌和受体菌,以接合转移途径将含有卡那霉素抗性基因 Kan 的转座子 Tn5 转移到 CN12 菌株的基因组内,从 5100 株转移接合子中反复筛选获得对小麦全蚀病菌离体拮抗作用提高 1~2 倍和防病效果显著增强的突变菌株 7 个,命名为荧光 93(即 D93)。抗生素耐性测验和质粒分析结果表明, Tn5 已转移到 CN12 体内。采用标记的含 Tn5 质粒的 DNA 为探针进行的 Southern 杂交分析进一步证实 Tn5 已同 CN12 的染色体整合。采用同一技术还获得了对水稻枯病菌、小麦纹枯病菌、棉花立枯病菌和黑根腐病菌离体拮抗作用比亲本菌株 CN12 提高了 1~2 倍的工程菌 3 株。1992~1994 年,对荧光假单胞菌 P303 菌株的转座子诱变获得对全蚀病菌拮抗作用和温室防治效果增强的菌株 8 株。

3 问题与展望

遗传改良假单胞菌菌株其胞外代谢产物如抗生素、嗜铁素等在根病生防中的作用的工作一直在实验探索着,虽然多数报道的构建依赖于带有抗生素标记的寄主广范围质粒,而这不适合应用于开放体系,因为存在质粒水平转移的风险,但是,可以相信,通过对染色体的基因修饰而达到构建相似菌株是可能的,这样位于染色体上表达的基因和(或)异源基因向土著微生物转移的频率将大大降低,虽然潜在的水平转移依然存在。因此,通过对生防菌染色体的基因修饰而达到提高生防活性的遗传改良似乎是可行的。

是否就能证明遗传改良后的假单胞菌比天然存在的该类菌株或其混配物的生防效果更好呢? 在一些限定的植物-病原互作体系(如温室条件下)中,遗传改良后的假单胞菌属的生防菌株被证明更为有效。同时,在田间条件下也有类似的结论,并有应用的例子。但相反,也有在田间条件下不同生防微生物的混配物却表现出比遗传改良后的“超菌”具有更好的防病效果的报道。看来,从现有的资料,要回答这个问题还为时过早,尚有许多工作需要去做。

参 考 文 献

- [1] O'Sullivan D J, O'Gara F. *Microbiological Review*, 1992, **56**(4):662~676.
- [2] Thomashow L S, Weller D M. In: *Plant Microbe Interactions I*. Eds. Stacey G and Keen N T. pp. 1996, 187~235.
- [3] Bonsall R F, Weller D M, Thomashow L S *et al.* *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, **63**: 951~955.
- [4] Pierson I I I L S, Pierson E A. *FEMS Microbiology Ecology*, 1996, **136**:101~108.
- [5] Hammer P E, Hill D S, Lam S T *et al.* *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, **63**:2147~2154.
- [6] Serino L, Reimann C, Visca P *et al.* *Journal of Bacteriology*, 1997, **179**:248~257.
- [7] Raaijmakers J M, van der Sluis I, Koster M *et al.* *Canadian Journal of Microbiology*, 1997, **41**:126~135.
- [8] Moenne-Loccoz Y, McHugh B, Stephens P M *et al.* *FEMS Microbiology Ecology*, 1996, **19**:215~225.
- [9] Voisard C, Keel C, Haas D *et al.* *The EMBO Journal*, 1989, **8**:351~358.
- [10] Reimann C, Beyeler M, Latifi A *et al.* *Molecular Microbiology*, 1997, **24**:309~319.
- [11] Chernin L S, Delafuente L, Sobolev V *et al.* *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, **63**: 834~839.
- [12] Ligon J M, Lam S T, Gaffney T D *et al.* In: *Biology of Plant-Microbe Interactions*, Eds. Stacey G, Mullin B, Gresshoff P M. 1996, 457~463.
- [13] Dowling D N, Sexton R, Fenton A *et al.* In: *Molecular Biology of Pseudomonads*, Eds. Nakazawa T, Furukawa K, Haas D and Silver S 1996, 502~511.
- [14] 彭于发,陈善铭. *植物病理学报*, 1990, **20**(2): 229~232.
- [15] 彭于发,张中鹤,陈彩层等. *植物病理学研究进展*. 北京:中国农业出版社, 1995, 276~282.