

研究报告



碳源影响水稻根际假单胞菌 PA1201 藤黄绿菌素的生物合成

崔莹 金子靖 何亚文*

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 代谢与发育科学国际合作联合实验室
上海 200240

摘要:【背景】假单胞菌 PA1201 是一株水稻根际促生菌, 其产生的次生代谢物藤黄绿菌素(pyoluteorin, Plt)能够有效抑制多种植物病原真菌和细菌的生长, 但在常规培养条件下 Plt 产量极低。【目的】研究碳源对 Plt 生物合成的影响, 为提高 Plt 的产量以及应用提供理论基础。【方法】将基本培养基(minimal medium, MM)中甘露醇替换为不同的碳源及碳源组合作为 PA1201 的培养基, 生长过程中不同时间点取样提取 Plt, 利用高效液相色谱(HPLC)法分析 Plt 的产量变化。【结果】建立了基于 HPLC 定性和定量检测 Plt 的方法; 比较了 PA1201 菌株在不同培养基中菌株生长和 Plt 的产量, 发现果糖和甘露醇促进 Plt 生物合成; 果糖和甘露醇对 Plt 生物合成没有增效作用; 在含有甘露醇或果糖作为唯一碳源的培养基中, 添加葡萄糖或琥珀酸抑制 Plt 生物合成。【结论】果糖和甘露醇促进水稻根际假单胞菌 PA1201 合成藤黄绿菌素, 这为提高藤黄绿菌素的生物合成效率和促进藤黄绿菌素的应用奠定了基础。

关键词: 假单胞菌, 藤黄绿菌素, 甘露醇, 果糖, 碳源

Effects of carbon sources on pyoluteorin biosynthesis in rice rhizobacterium *Pseudomonas* strain PA1201

CUI Ying JIN Zi-Jing HE Ya-Wen*

State Key Laboratory of Microbial Metabolism, Joint International Research Laboratory of Metabolic & Developmental Sciences, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract: [Background] *Pseudomonas* PA1201 strain is a plant growth promoting rhizobacterium isolated from rice rhizosphere. Pyoluteorin (Plt) is one of the secondary metabolites produced by PA1201, which can effectively inhibit the growth of a variety of phytopathogenic fungi and bacteria. Under normal culture conditions, Plt yield is extremely low. [Objective] This study aimed to analyze the effects of different carbon sources for optimal Plt biosynthesis. [Methods] PA1201 was cultured in minimal medium (MM) supplemented with different carbon sources as the sole carbon source, or MM medium with different combinations of carbon sources. Plt was extracted at different time points after inoculation, and then

Foundation item: National Key Research and Development Program of China (2018YFD0200500)

*Corresponding author: Tel: 86-21-34207941; E-mail: yawenhe@sjtu.edu.cn

Received: 08-03-2020; Accepted: 22-04-2020; Published online: 26-05-2020

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD0200500)

*通信作者: Tel: 021-34207941; E-mail: yawenhe@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2020-03-08; 接受日期: 2020-04-22; 网络首发日期: 2020-05-26

quantitatively analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC). **[Results]** A HPLC-dependent method for quantitative analysis of Plt levels was established; MM medium supplemented with fructose and mannitol were found to be optimal for Plt production; no additive effect between fructose and mannitol was observed on Plt biosynthesis; In the MM medium containing mannitol or fructose, addition of glucose or succinic acid inhibited Plt biosynthesis. **[Conclusion]** Fructose and mannitol promote the synthesis of Plt in rice rhizobacterium *Pseudomonas* PA1201, laying a foundation for improving the biosynthesis efficiency of pyoluteorin and promoting the application of pyoluteorin.

Keywords: *Pseudomonas*, Pyoluteorin, Mannitol, Fructose, Carbon source

藤黄绿菌素(pyoluteorin)是微生物产生的次级代谢产物,具有广谱抑菌活性,化学名称为2,3-二氯-5-(2',6'-二羟基苯甲酰基)吡咯,简称Plt,属于芳香族聚酮化合物^[1-2]。Plt最早由Takeda^[3]从铜绿假单胞菌 T359 和 IFO3455 产生的代谢产物中分离和鉴定;随后 Ohmori 等^[4]又从铜绿假单胞菌 S10B2 产生的代谢产物中分离到 Plt,发现 Plt 对棉花立枯病有较好的防治效果;Maurhofer 等^[5]发现荧光假单胞菌 CHA0 产生的 Plt 对水芹腐霉有较强的抑制效果。还有研究表明,Plt 对多种细菌和真菌有较强的抗菌活性,主要抑制卵菌,其中对植物病原菌终极腐霉(*Pythium ultimum*)抑制效果显著^[6]。

为了满足农业可持续性发展的需求,采用天然代谢产物农药控制植物病害受到了广泛的关注,藤黄绿菌素作为新型生物农药具有良好的应用潜力^[7]。Plt 的生物合成受群体感应系统、全局性转录因子和小 RNA 等多种遗传因素调控^[8-9]。此外,培养环境中的营养成分对 Plt 的合成也有影响。Duffy 等^[10]检测了不同矿物质和碳源对荧光假单胞菌 CHA0 中次生代谢物的影响,发现 Zn^{2+} 、 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 、葡萄糖可以促进 2,4-二乙酰藤黄酚的合成; Zn^{2+} 、 Co^{2+} 、甘油促进 Plt 的合成,葡萄糖抑制 Plt 的合成。Yuan 等^[11]发现荧光假单胞菌 S272 可以利用乙醇、葡萄糖、甘油、果糖等 8 种碳源生长,但是仅在利用乙醇和甘油的条件下可以产生 Plt。

PA1201 是一株从水稻根际分离得到的铜绿假单胞菌,可产生多种有抑菌活性的代谢产物,包

括 Plt^[12-13]。PA1201 基因组中的 Plt 生物合成基因簇与其他假单胞菌属的 Plt 生物合成基因簇高度一致。但是,在常规培养条件下,PA1201 培养液中 Plt 含量极低,不利于大规模的生产和应用。因此,本文系统研究了不同碳源对 Plt 生物合成的影响,以期为进一步开发利用 Plt 为新型代谢产物农药奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

蛋白胨、胰蛋白胨、酵母提取物、甘露醇、果糖、甘油、蔗糖、乳糖、葡萄糖、乳糖、半乳糖、琥珀酸等碳源、壮观霉素(spectinomycin, Sp)以及各种无机盐试剂购自生工生物工程(上海)有限公司;无水甲醇、乙腈和乙酸乙酯等分析纯级别的有机试剂购自国药集团化学试剂有限公司;高效液相色谱(HPLC)级别的有机试剂购自 Sigma-Aldrich 公司。分光光度计, Thermo Scientific 公司;高效液相色谱系统,安捷伦科技(中国)有限公司。

1.2 菌株及其培养条件

PA1201^[13]是本实验室保存菌株,本实验中所用培养基分别为 KMB 培养基^[14]、PPM 培养基^[15]、MM 培养基^[16]、M 培养基(MM 培养基中不添加甘露醇),以及 LB 培养基(g/L):酵母提取物 5.0,胰蛋白胨 10.0,氯化钠 5.0, pH 为 7.0。PA1201 培养过程中需加入壮观霉素,终浓度为 50 mg/L。

菌株培养:从-80 °C 冰箱中取出保存于甘油管中的菌株置于冰上,在含 50 mg/L Sp 的 LB 平板上采用四区法划线,置于 28 °C 恒温培养箱中培

养 24 h。待平板上长出单个菌落后, 用接种环挑取单菌落接种于 10 mL 的液体 KMB 培养基中, 28 °C、200 r/min 培养 12 h 作为种子液。种子液经 4 倍稀释使用分光光度计检测 OD_{600} 后, 调整 OD_{600} 为 1.0。向 250 mL 摇瓶中加入 50 mL KMB 液体培养基(含 50 mg/L Sp), 按 2% 的体积比接种 1 mL 种子液, 检测初始 OD_{600} ; 于 28 °C、200 r/min 培养 24 h 和 48 h 后, 分别取 500 μ L 菌液用于提取 Plt, 每次每个样品设 2 个重复。

1.3 Plt 提取方法

向 500 μ L 菌液中加入 1 mL 乙酸乙酯, 利用振荡仪连续涡旋振荡 5 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 将上层乙酸乙酯相提取物转移至另一个 1.5 mL 离心管中, 置于真空离心浓缩仪中 30 °C 条件下抽提 30 min, 最后将蒸干样品存放于 -20 °C 冰箱中待测。

1.4 Plt 检测与定量分析方法

用 100 μ L 甲醇将 1.3 中蒸干的样品完全溶解, 涡旋振荡 2 min, 在 12 000 r/min 条件下离心 15 min, 取上层 70 μ L 甲醇提取物至高效液相色谱样品瓶中的内插管内。HPLC 分析方法: 上样量 5 μ L; C18 反向色谱柱(4.6 \times 150 mm); 流动相 A 相: H₂O+0.1% 乙酸, B 相: 乙腈+0.1% 乙酸; 洗脱: 前 2 min A 90%+B 10%, 后 20 min 内按梯度洗脱逐步变为 A 0%+B 100%, 最后 5 min 保持 A 90%+B 10%; 流速 1 mL/min, 柱温为 25 °C; 检测系统: Agilent Technologies 1260 Infinity system with DAD G1315D VL detector。在 HPLC 洗脱过程中, Plt 的保留时间为 11.05 min, 最大紫外吸收波长为 310 nm。

2 结果与分析

2.1 建立基于 HPLC 技术定量检测 Plt 的方法

为了能够定量检测 Plt, 从深圳振强生物技术有限公司购买了 Plt 纯品。称取 1.9 mg 的 Plt 标品(黄色粉末)加入 38 μ L 甲醇溶解, 制成浓度为 50.0 mg/mL 的母液。依次稀释, 配制成浓度分别

为 0.5、1.0、5.0、10.0、50.0、500.0 mg/L 的标准样品; 每个样品取 5 μ L 进行 HPLC 检测。以 310 nm 波长下紫外吸收的峰面积(peak area, PA)为纵坐标, Plt 浓度(pyoluteorin concentration, PC)为横坐标, 绘制标准曲线。Plt 浓度范围在 0.5–500.0 mg/L 时, 其线性方程为 $PA=15.15PC-3.119$, 相关系数 $R^2=0.9999$ 。图 1 显示了 Plt 标准样品 HPLC 峰图、

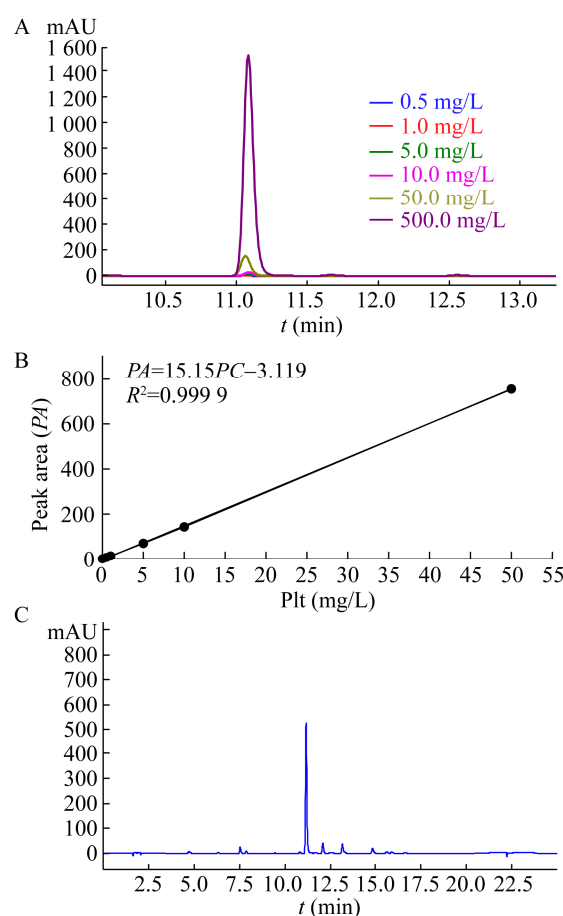


图 1 利用 Plt 标准样品建立基于高效液相色谱(HPLC)技术定量检测 Plt 产量的方法

Figure 1 A method for quantitatively detecting Plt yield based on high performance liquid chromatography (HPLC) using a Plt standard sample

注: A: 5 μ L 0.5–500.0 mg/L Plt 样品经过 HPLC 分析后的峰图和峰面积; B: Plt 浓度与 HPLC 峰面积之间的关系曲线; C: Plt 粗提物的 HPLC 峰图。

Note: A: Peak plot and peak area after HPLC analysis of 5 μ L 0.5–500.0 mg/L Plt sample; B: Relationship between Plt concentration and HPLC peak area; C: HPLC spectrum of Plt crude extract.

Plt 浓度与峰面积线性图以及 Plt 粗提物的 HPLC 峰图。标准样品经过多次分析均获得单一且稳定的峰,表明该方法的稳定性和重复性较好。

2.2 PA1201 在 4 种培养基中的 Plt 产量分析

为了研究不同培养基对 PA1201 菌株 Plt 产量的影响,PA1201 种子液分别接种在 4 种培养基(LB、KMB、PPM、MM)中,培养 24 h 和 48 h 后分别检测生长量(OD_{600})和 Plt 产量。LB、KMB、PPM 培养基含有较多的蛋白胨和酵母提取物,为微生物生长提供丰富的碳、氮源;MM 培养基包含无机盐类和甘露醇作为唯一碳源,属于相对贫瘠的培养基。PA1201 菌株在 LB、KMB 和 PPM 中生长迅速,接种培养 24 h 后 OD_{600} 达到 3.0 以上(图 2A);PA1201 菌株在 MM 培养基中生长缓慢,接种 48 h 后最高 OD_{600} 只有 1.0 左右(图 2A)。HPLC 分析结果表明:在 LB、KMB 和 PPM 培养基中,Plt 的产量最高为 $0.4 \text{ mg}/(OD_{600} \cdot \text{L})$ (48 h);在 MM 培养基中 Plt 的最高产量达到 $34.0 \text{ mg}/(OD_{600} \cdot \text{L})$ (48 h),比其他培养基中的 Plt 产量高 80 倍以上(图 2B)。

2.3 降低 KMB 的营养成分和向 KMB 中添加甘露醇均不能显著增加 Plt 产量

为了研究培养基的营养成分对 Plt 生物合成的影响,首先将丰富培养基 KMB 的营养组分降低为原来的 1/3,然后比较 PA1201 在 1/3 KMB 和 KMB 培养基中的生长和 Plt 的产量。在 1/3 KMB 培养基中,PA1201 生长没有受到明显影响,接种培养 24 h 和 36 h 后,菌液 OD_{600} 几乎与 KMB 中菌液 OD_{600} 一致;接种 48 h 后,1/3 KMB 中的菌则更早进入静止期(图 3A)。HPLC 分析结果显示:在 1/3 KMB 培养基中 Plt 的产量依然非常低,但比 KMB 培养基中稍高(图 3A)。

进一步探究了在 KMB 培养基中添加 MM 培养基中的甘露醇是否可以提高 Plt 的产量。将 PA1201 接种到含有 10 mmol/L 甘露醇的 KMB 培养基中培养 24 h 和 48 h,分别检测生长(OD_{600})和 Plt 产量。结果表明:添加甘露醇到 KMB 培养基中对 PA1201 的生长没有显著作用(图 3B);在 KMB 培养基中加

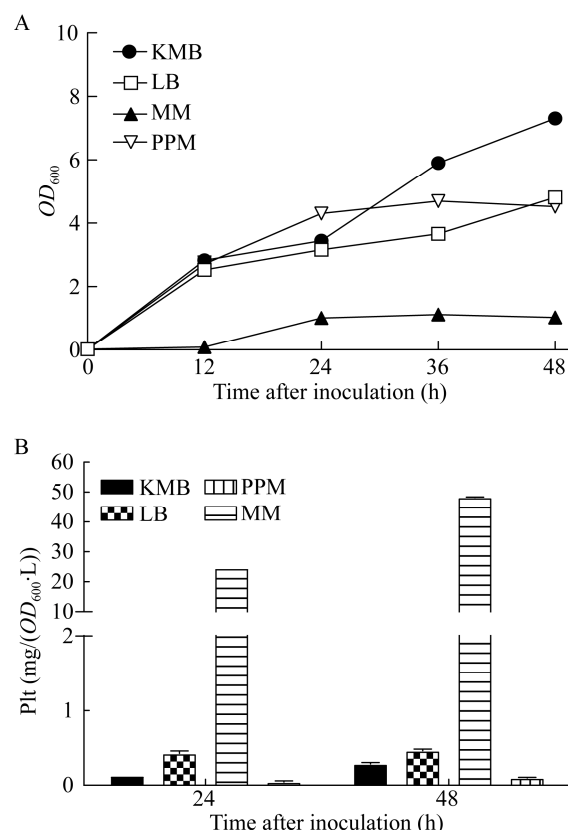


图 2 PA1201 菌株在 4 种培养基中的生长和 Plt 产量分析

Figure 2 Growth and Plt yield analysis of PA1201 strain in four media

注: A: PA1201 在 KMB、LB、MM 和 PPM 培养基中的生长曲线; B: 接种 24 h 和 48 h 后, 4 种培养基中 Plt 的产量。所有实验重复 3 次后, 数据代表平均值 \pm 标准偏差。

Note: A: Growth curve of PA1201 in KMB, LB, MM and PPM medium; B: Yield of Plt in four medium after 24 h and 48 h inoculation. Averages for three technical repeats with standard deviation are shown.

入甘露醇, Plt 的产量也未显著提高(图 3B)。

2.4 甘油、甘露醇和果糖促进 PA1201 合成 Plt

为了研究不同碳源对 Plt 产量的影响,以最基本 M 培养基为基础,分别添加其他碳源作为唯一碳源,包括甘露醇(mannitol)、甘油(glycerol)、葡萄糖(glucose)、果糖(fructose)、山梨糖醇(sorbitol)、蔗糖(sucrose)、乳糖(lactose)、半乳糖(galactose)、麦芽糖(maltose)和木糖(xylose)。为了保证相同的碳摩尔量,不同碳源根据其碳原子数目做出调整。培养 24 h 后,在含有 10 mmol/L 甘露

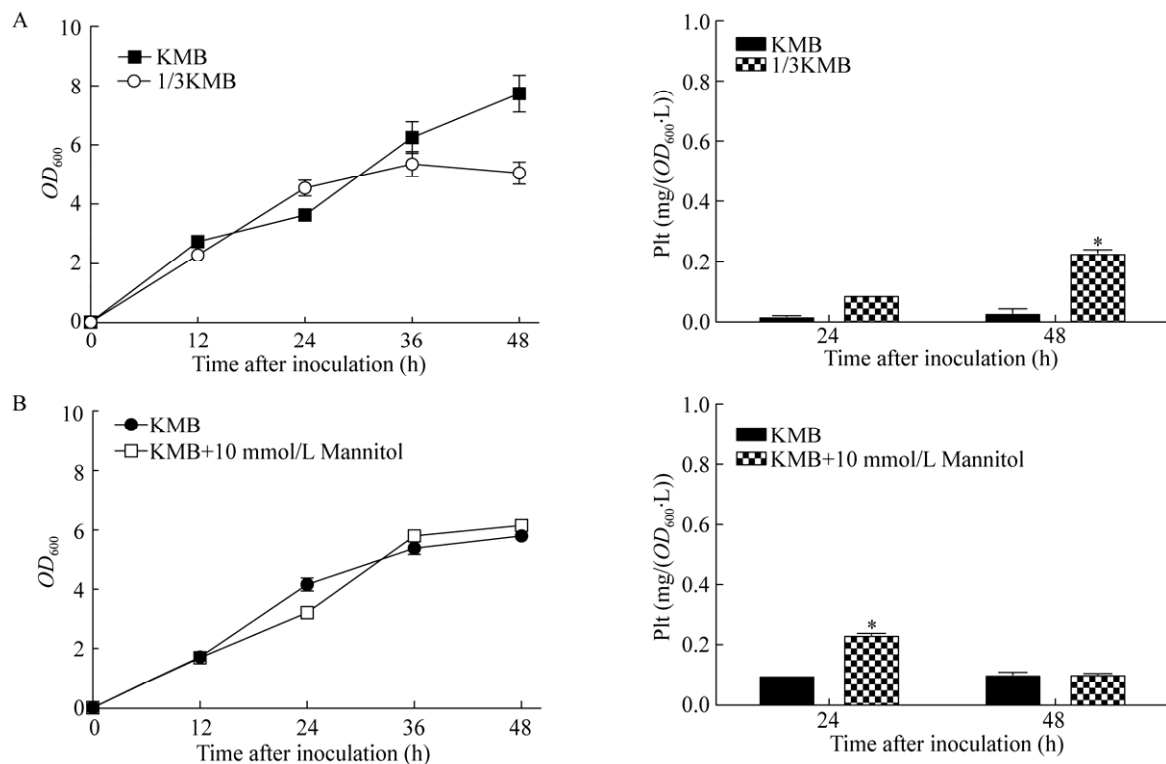


图3 PA1201在1/3KMB、KMB、KMB加甘露醇培养基中的生长曲线及Plt产量

Figure 3 Growth curve and Plt yield of PA1201 in 1/3KMB, KMB and KMB with mannitol

注: A: 在KMB和1/3KMB培养基中的生长曲线和Plt产量; B: 在KMB和KMB加甘露醇培养基中菌株的生长和Plt产量。所有实验重复3次后, 数据代表平均值±标准偏差。*: 显著差异($P < 0.05$)。

Note: A: Growth curve and Plt yield in KMB and 1/3KMB medium; B: Growth curve and Plt yield in KMB and KMB with mannitol medium. Averages for three technical repeats with standard deviation are shown. *: Significant value ($P < 0.05$).

醇或10 mmol/L葡萄糖的培养基中PA1201菌液的 OD_{600} 可以达到在0.5以上; 培养48 h后, 在以甘露醇、果糖、葡萄糖、甘油为唯一碳源的培养基中菌液 OD_{600} 接近1.0; 在以山梨糖醇、蔗糖、乳糖、半乳糖、木糖为唯一碳源的培养基中菌液的 OD_{600} 仅为0.2左右(图4A、B)。HPLC分析结果显示: 添加甘露醇、甘油和果糖能显著提高Plt产量, 具体效果是果糖>甘露醇>甘油。接种48 h后, 在含有10 mmol/L果糖的培养基中Plt产量达138.7 $mg/(OD_{600} \cdot L)$, 是以甘露醇作为唯一碳源的培养基中Plt产量的3倍; 在以山梨糖醇、葡萄糖、蔗糖、乳糖、半乳糖、麦芽糖、木糖作为唯一碳源的培养基中, Plt产量极低(图4A、B)。

进一步探索了甘露醇和果糖促进Plt生物合成

的浓度效应。随着甘露醇浓度从5 mmol/L提高到20 mmol/L, PA1201的生长以及Plt的产量都有所改进; 接种48 h后, 在含20 mmol/L甘露醇的发酵液中Plt的产量达到99.6 $mg/(OD_{600} \cdot L)$ (图4C)。PA1201在含有20 mmol/L果糖的培养基中48 h后生长更好; 在含有3种果糖浓度发酵液中, 培养24 h时Plt的产量没有显著差异; 接种培养48 h, Plt的产量随果糖浓度增加而升高, 最高产量为211.4 $mg/(OD_{600} \cdot L)$ (图4D)。

2.5 甘露醇和果糖对Plt生物合成没有累加效应

为了进一步探究甘露醇和果糖对Plt生物合成的累加效应, 在以果糖作为唯一碳源的培养基中添加了1、5或10 mmol/L甘露醇, 接种PA1201后分别检测生长和Plt产量。结果表明: 随

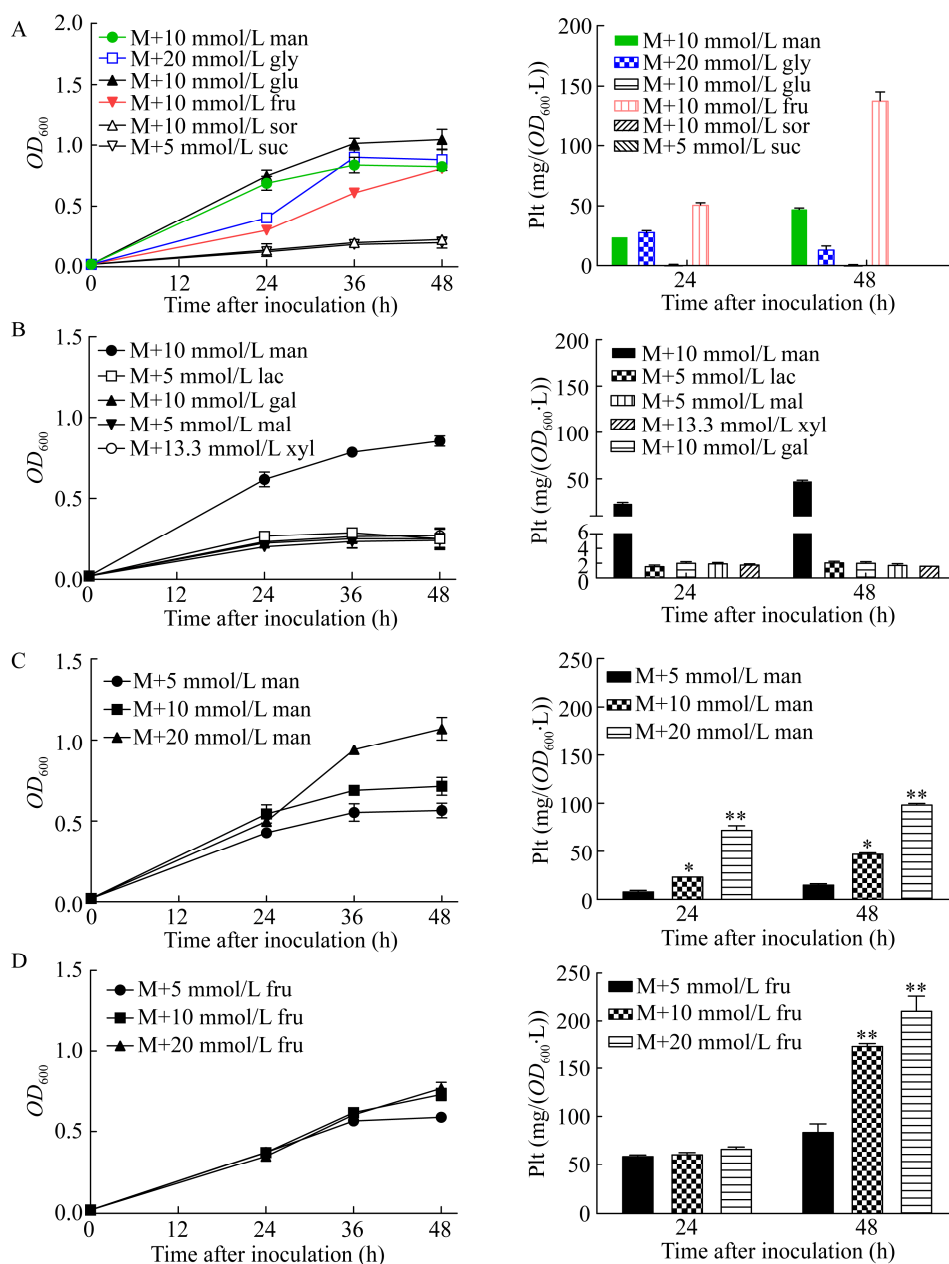


图4 PA1201在不同碳源作为唯一碳源培养基中的生长曲线和Plt产量

Figure 4 Growth curve and Plt yield of PA1201 in medium with different carbon sources as the sole carbon source

注: A: 在甘露醇(man)、甘油(gly)、葡萄糖(glu)、果糖(fru)、山梨糖醇(sor)、蔗糖(suc)分别作为唯一碳源的 M 培养基中, PA1201 的生长曲线和 Plt 产量; B: 在甘露醇(man)、乳糖(lac)、半乳糖(gal)、麦芽糖(mal)、木糖(xyl)分别作为唯一碳源的 M 培养基中, PA1201 的生长曲线和 Plt 产量; C: 在含有 5、10、20 mmol/L 甘露醇的 M 培养基中, PA1201 生长曲线和 Plt 产量; D: 在含有 5、10、20 mmol/L 果糖的 M 培养基中, PA1201 生长曲线和 Plt 产量; 所有实验重复 3 次后, 数据代表平均值±标准偏差。*: 显著差异($P<0.05$); **: 极显著差异($P<0.01$)。

Note: A: In M medium with mannitol (man), glycerol (gly), glucose (glu), fructose (fru), sorbitol (sor), sucrose (suc) as the sole carbon source, PA1201 growth curve and Plt yield; B: Mannitol (man), lactose (lac), galactose (gal), maltose (mal), xylose (xyl) as the sole carbon source, PA1201 growth curve and Plt yield of PA1201 in M medium; C: PA1201 growth curve and Plt yield in M medium containing 5, 10, 20 mmol/L mannitol; D: PA1201 growth curve and Plt yield in M medium containing 5, 10, 20 mmol/L fructose; Averages for three technical repeats with standard deviation are shown. *: Significant value ($P<0.05$); **: Extremely significant value ($P<0.01$).

着甘露醇浓度的提高, PA1201 的生长速率加快(图 5A), 但两者同时添加对 Plt 生物合成没有累加效应(图 5B)。根据假单胞菌的代谢通路分析, 甘露醇的代谢至少有两条代谢途径, 其中一条途径是通过甘露醇脱氢酶将甘露醇转化为果糖, 再被降解利用, 这可能是两者之间没有累加效应的原因。

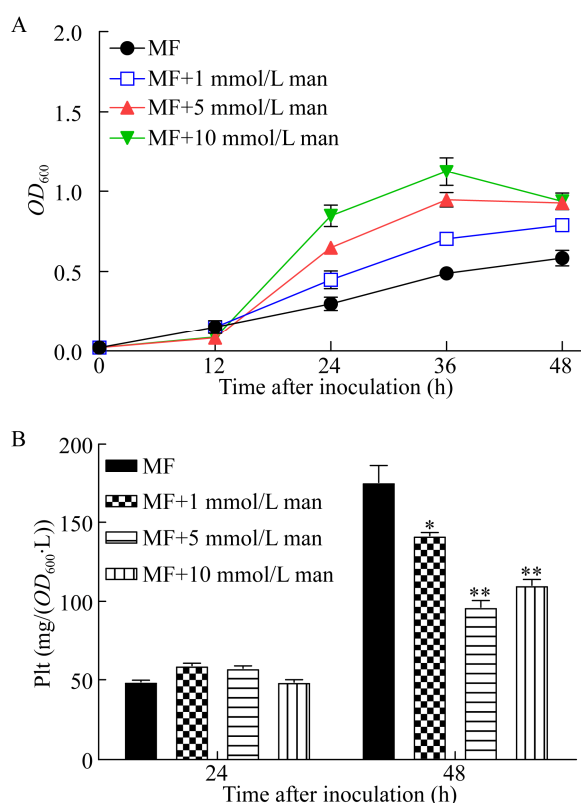


图 5 PA1201 在同时含有果糖和甘露醇的培养基中的生长曲线和 Plt 产量

Figure 5 PA1201 growth curve and Plt yield in medium containing both fructose and mannitol

注: A: 在添加 1、5、10 mmol/L 甘露醇的在 MF 培养基中, PA1201 生长曲线; B: 接种 24 h 和 48 h 后, PA1201 在添加甘露醇的 MF 培养基中 Plt 产量。所有实验重复 3 次后, 数据代表平均值±标准偏差。*: 显著差异($P<0.05$); **: 极显著差异($P<0.01$)。

Note: A: PA1201 growth curve in MF medium supplemented with 1, 5, 10 mmol/L mannitol; B: Plt yield of PA1201 in MF medium supplemented with mannitol after 24 h and 48 h of inoculation. Averages for three technical repeats with standard deviation are shown. *: Significant value ($P<0.05$); **: Extremely significant value ($P<0.01$).

2.6 葡萄糖或琥珀酸能够拮抗甘露醇或果糖对 Plt 生物合成的促进作用

图 4A 表明葡萄糖和琥珀酸能够显著促进 PA1201 的生长。为了结合葡萄糖或琥珀酸的生长促进作用和甘露醇或果糖对 Plt 合成的促进作用, 在以果糖或甘露醇作为唯一碳源的 MF 或 MM 培养基中, 分别添加了 1、5、10 mmol/L 葡萄糖或琥珀酸, 接种培养 12、24、48 h 后, 分别检测 PA1201 的生长和 Plt 产量。在 MM 或 MF 培养基中, 随着葡萄糖浓度增高, PA1201 生长速率越来越快, 但 Plt 的产量越来越低(图 6A、B)。在 MM 或 MF 培养基中, 随着琥珀酸浓度的增加, PA1201 生长速率加快, Plt 的产量却显著降低(图 6C、D)。

3 讨论与结论

本研究从探究 Plt 产生的最优条件出发, 建立了基于 HPLC 检测藤黄绿菌素的方法, 通过初步筛选, 确定营养条件不丰富的 MM 培养基为 Plt 生物合成的基本培养基。在此基础上, 发现甘油、甘露醇和果糖能分别促进 Plt 生物合成, 葡萄糖和琥珀酸促进 PA1201 生长, 但显著抑制 Plt 的产生; 果糖和甘露醇对 Plt 的生物合成没有累加效应, 葡萄糖或琥珀酸能够拮抗甘露醇或果糖促进 Plt 生物合成。研究结果为提高藤黄绿菌素的生物合成效率和促进藤黄绿菌素的应用奠定了基础。

次级代谢产物对于微生物的生长和繁殖不是必需的, 但却能提高细菌在生存环境中的竞争力, 帮助细菌在有限资源条件下具有较强的竞争力^[17-18]。微生物通常在感应到营养耗尽、诱导剂添加、群体密度达到阈值、生长速率降低的条件下才会激活次级代谢产物合成基因簇, 产生次级代谢产物^[19]。Plt 是假单胞菌产生的一类天然次生代谢产物, 能抑制多种植物病原真菌的生长, 对假单胞菌在特定土壤或根际环境的定殖有促进作用^[2]。Duffy 等^[10]发现, 添加葡萄糖至 NBY 培养基中能抑制荧光假单胞菌 CHA0 产生 Plt, 而 CHA0 利用果糖、甘露醇、甘油为唯一碳源产生更多的 Plt。这一发现与本研究观察到的现象基本一致。

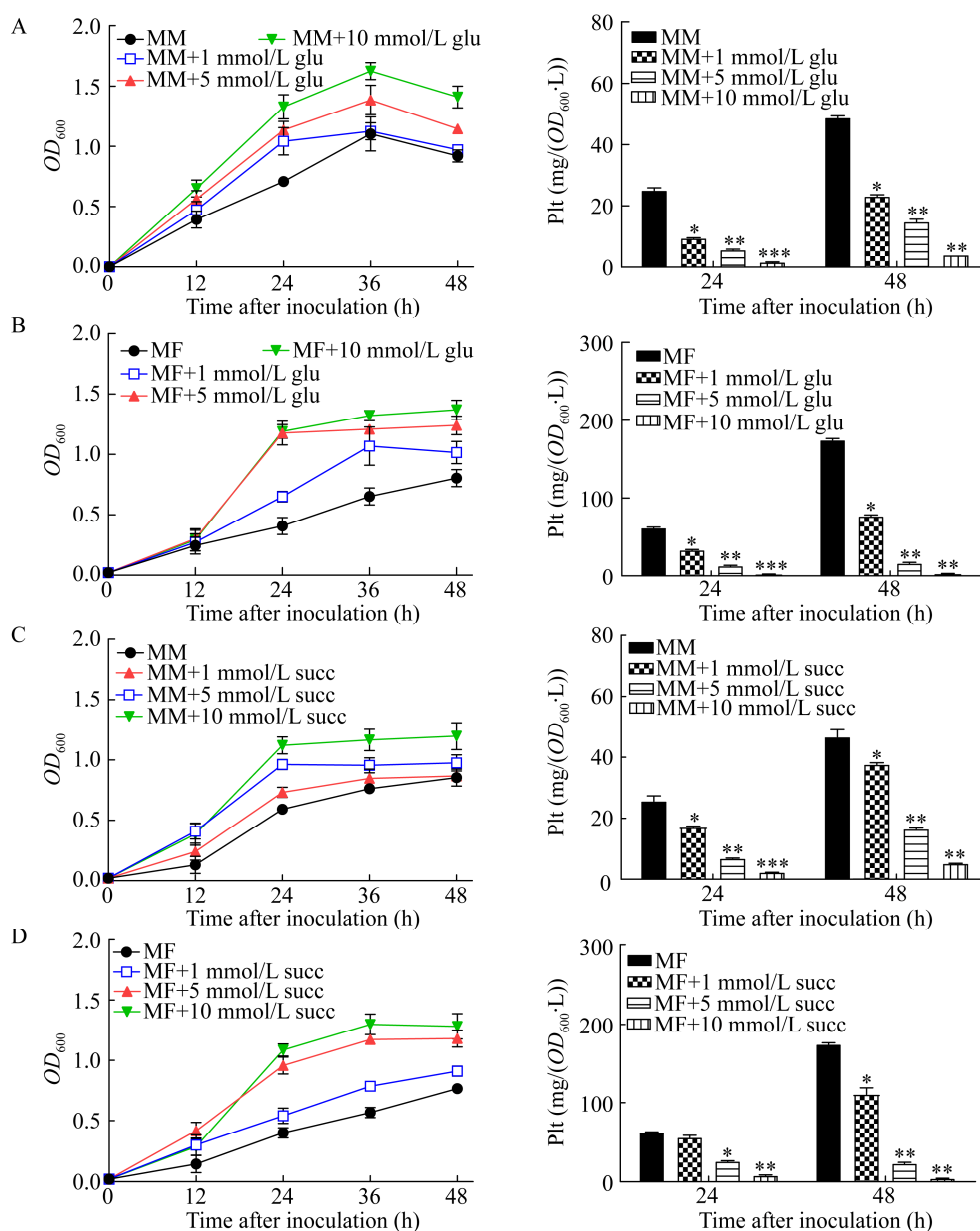


图 6 PA1201 在以甘露醇或果糖作为唯一碳源的培养基中外源添加优选碳源后的生长曲线和 Plt 产量

Figure 6 Growth curve and Plt yield of PA1201 after exogenously adding a preferred carbon source in a medium with mannitol or fructose as the sole carbon source

注: A: 在以甘露醇作为唯一碳源的培养基(MM)中外源添加 0、1、5、10 mmol/L 葡萄糖(glu)的培养基中, PA1201 的生长曲线和 Plt 产量; B: 在以果糖作为唯一碳源的培养基(MF)中外源添加 0、1、5、10 mmol/L 葡萄糖(glu) 的培养基中, PA1201 的生长曲线和 Plt 产量; C: 在以甘露醇作为唯一碳源的培养基(MM)中外源添加 0、1、5、10 mmol/L 琥珀酸(succ)的培养基中, PA1201 的生长曲线和 Plt 产量; D: 在以果糖作为唯一碳源的培养基(MF)中外源添加 0、1、5、10 mmol/L 琥珀酸(succ)的培养基中, PA1201 的生长曲线和 Plt 产量; 所有实验重复 3 次后, 数据代表平均值±标准偏差. *: 显著差异($P<0.05$); **: 极显著差异($P<0.01$).

Note: A: Growth curve and Plt yield of PA1201 in medium supplemented with 0, 1, 5, 10 mmol/L glucose (glu) in medium (MM) with mannitol as the sole carbon source; B: Growth curve and Plt yield of PA1201 in medium supplemented with 0, 1, 5, 10 mmol/L glucose (glu) exogenously in the medium (MF) as the sole carbon source; C: Growth curve and Plt yield of PA1201 in a medium supplemented with 0, 1, 5, 10 mmol/L succinic acid (succ) in a medium (MM) with mannitol as the sole carbon source; D: Growth curve and Plt yield of PA1201 in a medium supplemented with 0, 1, 5, 10 mmol/L succinic acid (succ) exogenously in a single carbon source medium (MF); Averages for three technical repeats with standard deviation are shown. *: Significant value ($P<0.05$); **: Extremely significant value ($P<0.01$).

为了探索不同碳源之间的作用机制, 本研究将甘露醇和果糖同时添加到 M 培养基中, 发现二者对 Plt 生物合成没有累加效应, 这可能与甘露醇的代谢途径有关。根据假单胞菌的代谢通路分析, 甘露醇的代谢至少有两条途径, 其中一部分通过甘露醇脱氢酶转化为果糖再被降解利用。

本研究还探索了甘露醇/果糖与葡萄糖/琥珀酸组合对 Plt 生物合成的影响, 发现葡萄糖或琥珀酸能够拮抗甘露醇或果糖促进 Plt 生物合成。这一现象可能与细菌中存在碳代谢抑制现象(carbon catabolite repression, CCR)有关。当生长环境中存在多种碳源时, 细菌通常先利用“优选碳源”直至消耗殆尽, 再利用“非优选碳源”实现二次生长^[20-21]。这种机制帮助细菌在自然界中争夺有限资源, 提升其在自然栖息地的生存和竞争能力。在假单胞菌生存的土壤中, 有机酸含量比糖的含量高出很多, 在碳代谢抑制机制的介导下, 琥珀酸盐、乙酸盐的存在会抑制甘油、果糖和甘露醇代谢基因的表达^[22]。在琥珀酸、甘露醇、葡萄糖 3 种碳源同时存在时, 铜绿假单胞菌优先利用琥珀酸, 最后利用甘露醇, 葡萄糖处于二者之间^[23]。

PA1201 是来自水稻根际的有益微生物, 对水稻健康生长和发育有显著的促进作用。根据本研究的实验结果, 在进一步的工作中, 可以通过改变土壤碳源、提高果糖和甘露糖的有效浓度促进 PA1201 在水稻根际菌群中的占比或提高 Plt 的合成水平, 从而有效抑制水稻根际病原菌的生长和繁殖, 防治病害的发生。

REFERENCES

- [1] Gross H, Loper JE. Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp.[J]. Natural Product Reports, 2009, 26(11): 1408-1446
- [2] Vinay JU, Naik MK, Rangeshwaran R, et al. Detection of antimicrobial traits in fluorescent pseudomonads and molecular characterization of an antibiotic pyoluteorin[J]. 3 Biotech, 2016, 6(2): 227
- [3] Takeda R. Structure of a new antibiotic, pyoluteorin[J]. Journal of the American Chemical Society, 1958, 80(17): 4749-4750
- [4] Ohmori T, Hagiwara SI, Ueda A, et al. Production of pyoluteorin and its derivatives from *n*-paraffin by *Pseudomonas aeruginosa* S10B2[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1978, 42(11): 2031-2036
- [5] Maurhofer M, Keel C, Haas D, et al. Pyoluteorin production by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 is involved in the suppression of *Pythium* damping-off of cress but not of cucumber[J]. European Journal of Plant Pathology, 1994, 100(3): 221-232
- [6] Brodhagen M, Henkels MD, Loper JE. Positive autoregulation and signaling properties of pyoluteorin, an antibiotic produced by the biological control organism *Pseudomonas fluorescens* Pf-5[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(3): 1758-1766
- [7] Zhang JF. The stability and degradation of a new biological pesticide, pyoluteorin[D]. Shanghai: Doctoral Dissertation of Shanghai Jiao Tong University, 2008 (in Chinese)
张靖方. 新型农药藤黄绿菌素(Plt)的稳定性及其降解特性研究[D]. 上海: 上海交通大学博士学位论文, 2008
- [8] Huang XQ, Zhang XH, Xu YQ. PltR expression modulated by the global regulators GacA, RsmA, LasI and RhII in *Pseudomonas* sp. M18[J]. Research in Microbiology, 2008, 159(2): 128-136
- [9] Wang GH, Huang XQ, Li SN, et al. The RNA chaperone Hfq regulates antibiotic biosynthesis in the Rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* M18[J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(10): 2443-2457
- [10] Duffy BK, Défago G. Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(6): 2429-2438
- [11] Yuan Z, Cang S, Matsufuji M, et al. High production of pyoluteorin and 2,4-diacetylphloroglucinol by *Pseudomonas fluorescens* S272 grown on ethanol as a sole carbon source[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1998, 86(6): 559-563
- [12] Ruiz B, Chávez A, Forero A, et al. Production of microbial secondary metabolites: Regulation by the carbon source[J]. Critical Reviews in Microbiology, 2010, 36(2): 146-167
- [13] Zhou L, Jiang HX, Jin KM, et al. Isolation, identification and characterization of rice rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* PA1201 producing high level of biopesticide “Shenqinmycin” and phenazine-1-carboxamide[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2015, 55(4): 401-411 (in Chinese)
周莲, 蒋海霞, 金凯明, 等. 高产申嗪霉素和吩嗪-1-酰胺的水稻根际铜绿假单胞菌 PA1201 分离、鉴定与应用潜力[J]. 微生物学报, 2015, 55(4): 401-411
- [14] King EO, Ward MK, Raney DEA. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein[J]. Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 1954, 44(2): 301-307
- [15] Shtark OY, Shaposhnikov AI, Kravchenko LV. The production of antifungal metabolites by *Pseudomonas*

- chlororaphis* grown on different nutrient sources[J]. Microbiology, 2003, 72(5): 574-578
- [16] Zhang HB, Wang LH, Zhang LH. Detection and analysis of quorum-quenching enzymes against acyl homoserine lactone quorum-sensing signals[J]. Current Protocols in Microbiology, 2007, 5(1): 1C.3.1-1C.3.15
- [17] Jousset A, Rochat L, Péchy-Tarr M, et al. Predators promote defence of rhizosphere bacterial populations by selective feeding on non-toxic cheaters[J]. The ISME Journal, 2009, 3(6): 666-674
- [18] Yan Q, Philmus B, Chang JH, et al. Novel mechanism of metabolic co-regulation coordinates the biosynthesis of secondary metabolites in *Pseudomonas protegens*[J]. eLife, 2017, 6: e22835
- [19] Zhou L, Jiang HX, Sun S, et al. Biotechnological potential of a rhizosphere *Pseudomonas aeruginosa* strain producing phenazine-1-carboxylic acid and phenazine-1-carboxamide[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2016, 32(3): 50
- [20] Rojo F. Carbon catabolite repression in *Pseudomonas*: optimizing metabolic versatility and interactions with the environment[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2010, 34(5): 658-684
- [21] Poblete-Castro I, Wittmann C, Nikel PI, et al. Biochemistry, genetics and biotechnology of glycerol utilization in *Pseudomonas* species[J]. Microbial Biotechnology, 2020, 13(1): 32-53
- [22] Bharwad K, Rajkumar S. Rewiring the functional complexity between Crc, Hfq and sRNAs to regulate carbon catabolite repression in *Pseudomonas*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2019, 35(9): 140
- [23] Sonnleitner E, Abdou L, Haas D. Small RNA as global regulator of carbon catabolite repression in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(51): 21866-21871

编辑部公告

邀请您关注《微生物学通报》公众微信号

为了更好地与读者、作者、审稿专家和编委朋友们及时沟通、方便服务,《微生物学通报》已开通公众微信服务号。作者通过微信能及时收到稿件各流程通知,第一时间了解稿件进程并及时处理;审稿专家和编委可通过微信及时收到审稿邀请,还可通过手机审稿;读者通过微信可了解《微生物学通报》文章目录,查找阅读感兴趣的文章。

关注办法:

- 1、在微信公众号搜索“微生物学通报”或“wswxtb”;
- 2、用微信扫右边二维码:

