

假单胞菌株 M18 *psrA* 突变株的构建及其对 吩嗪-1-羧酸和藤黄绿菌素合成的调控

王国昊 魏雪 李赛男 黄显清* 许煜泉

(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】假单胞菌 M18 是一株能同时合成吩嗪-1-羧酸(PCA)和藤黄绿菌素(Plt)两种抗生素的植物根际促生细菌。PsrA 为细菌 TetR 家族转录调控因子。为了研究 PsrA 对 PCA 与 Plt 生物合成的影响,从 M18 菌株基因组中扩增 *psrA* 基因。【方法】通过同源重组技术,构建庆大霉素抗性片段置换 *psrA* 的突变菌株 M18*psrA*。利用基因互补、*lacZ* 报告基因融合分析实验,验证 PsrA 对抗生素合成基因的调控作用。【结果】在 PPM 和 KMB 培养基中,分别比较野生型菌株 M18 和突变菌株 M18*psrA* 的 PCA 与 Plt 产量,突变菌株 M18*psrA* 的 PCA 产量显著下降;Plt 产量显著升高,为野生型菌株的 10–15 倍。基因互补、*lacZ* 报告基因融合分析,进一步证明了 *psrA* 正调控 PCA 的 *phz2* 合成基因簇,负调控 Plt 的合成基因簇。【结论】PsrA 区别性调控抗生素 PCA 与 Plt 的生物合成。

关键词: 假单胞菌株 M18, *psrA*, 吩嗪-1-羧酸, 藤黄绿菌素

Construction of *Pseudomonas* sp. M18 *psrA* mutant and its regulation on PCA and Plt biosynthesis

WANG Guo-Hao WEI Xue LI Sai-Nan HUANG Xian-Qing* XU Yu-Quan

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

Abstract: [Objective] The rhizobacterium *Pseudomonas* sp. M18 can produce two antibiotics,

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30800009); 国家 863 计划项目(No. 2007AA02Z215); 国家 973 计划项目(No. 2009CB118906)

*通讯作者: Tel: 86-21-34204347; 信箱: xqhuang11@gmail.com

收稿日期: 2011-11-25; 接受日期: 2011-12-27

phenazine-1-carboxylic acid (PCA) and pyoluteorin (Plt). PsrA belongs to the TetR family bacterial transcription regulator. To investigate the effect of PsrA on the PCA and Plt biosynthesis, the *psrA* gene was amplified from M18 strain genome. **[Methods]** The *psrA* mutant (M18psrA) was constructed through gene replacement of *psrA* by gentamicin resistance cassette and homologous recombination. Gene complement experiment and *lacZ* gene fusion report analysis further identified whether PsrA regulates the expression of antibiotics biosynthesis gene clusters. **[Results]** PCA and Plt production was respectively assayed in PPM and KMB media. PCA production of *psrA* mutant was significantly lower than that of its parent strain M18. However, Plt production of M18psrA was obviously increased 10–15 times as much as that of M18 strain. Gene complement experiment and *lacZ* gene fusion report analysis further confirmed that PsrA strongly up-regulated PCA biosynthesis and down-regulated Plt biosynthesis. **[Conclusion]** PsrA regulates distinctively on the PCA and Plt biosynthesis.

Keywords: *Pseudomonas* sp. M18, PsrA, Phenazine-1-carboxylic acid, Pyoluteorin

细菌经常通过基因表达的调控来快速应答各种环境条件的急剧变化。大部分应答调控子属于转录调控因子, TetR 家族就是其中最大的细菌转录调控蛋白家族之一。TetR 家族调控蛋白主要作为膜转运蛋白和膜通透蛋白编码基因或操纵子的转录阻抑子, 控制细胞对疏水性抗生素等物质的敏感性水平^[1]。已有研究显示, TetR 家族转录调控子 PsrA 可以作为 RpoS 的转录激活子及其自身的转录抑制子^[2]。PsrA 可以激活 *exsCEBA* 的转录从而正调控 III 型分泌系统的表达^[3]。调控因子 RsmA 和 AefR 的转录也受到 PsrA 的负调控^[4]。PsrA 可以应答长链脂肪酸信号分子, 抑制脂肪酸 β 氧化酶 *fadBA5* 操纵子的启动子区域, 进而阻遏该基因簇的表达^[5]。同时, 长链脂肪酸信号分子可以竞争性结合 PsrA 蛋白从而抑制 PsrA 激活 *rpoS* 和 *exsC* 基因的表达^[6]。在绿针假单胞菌 PCL1391 中, 关于 PsrA 对吩嗪-1-酸酰胺(PCN)合成的调控已有部分报道。PhzI/PhzR 菌群传感系统正调控 PCN 合成基因簇的表达, 而 PsrA 可以负调控 N-乙酰高丝氨酸内酯(C6-HSL)的合成进而负调控 PCN 的合成^[7]。PsrA 对其它假单胞菌抗生素合成的调控, 尚未

见报道。

生防假单胞菌株 M18 能同时产生吩嗪-1-羧酸(PCA)和藤黄绿菌素(Plt)两种抗生素^[8]。本课题针对 PsrA 对 M18 菌株中抗生素合成的调控开展研究。结果表明, PsrA 正调控 PCA 的合成, 而负调控 Plt 合成。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒: 本研究所用的菌株、质粒及其来源见表 1。

1.1.2 培养基和菌株生长条件: LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母提取物 5, NaCl 10, pH 7.0; PPM 培养基(g/L): 蛋白胨 22, 葡萄糖 20, KNO₃ 5, pH 7.5; 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。假单胞菌 M18 培养基中抗生素用量(mg/L): 庆大霉素(Gm) 40、壮观霉素(Sp) 100、四环素(Tc) 120。大肠杆菌 LB 培养基中抗生素用量(mg/L): 庆大霉素(Gm) 10、四环素(Tc) 10。*E. coli* 在 37 °C 培养; 假单胞菌在 28 °C、200 r/min 振荡培养。

表 1 菌株与质粒
Table 1 Strains and plasmids

Materials	Genotype and relevant characteristics	Source
<i>E. coli</i>		
SM10	<i>thi-1 thr leu tonA lacY supE recA::RP4-2-Tc::Mu Km^r</i>	This lab
DH5 α	<i>supE44 ΔlacU169(Φ80 <i>lacZ</i>ΔM15) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i></i>	This lab
<i>Pseudomonas</i> sp. M18		
M18	Rhizosphere isolate, Plt ⁺ PCA ⁺ Sp ^r	This lab
M18 <i>psrA</i>	Δ <i>psrA::Gm^r, Sp^r Gm^r</i>	This study
Plasmids		
pME6032	pVS1-p15A <i>E. coli</i> - <i>Pseudomonas</i> shuttle vector, <i>lacI^q</i> - <i>Ptac</i> expression vector, Tc ^r	This lab
pUCGm	Source of Gm ^r cassette, Gm ^r	This lab
pEX18Tc	Gene replacement vector with MCS from pUC18, <i>oriT⁺</i> <i>sacB⁺</i> , Tc ^r	This lab
pEXTc-pf1pf2	pEX18Tc containing a 818 bp <i>EcoR</i> I- <i>Pst</i> I upstream fragment and a 849 bp <i>Pst</i> I- <i>Hind</i> III downstream fragment flanking the <i>psrA</i> gene, Tc ^r	This study
pEXTc- pf1pf2-Gm ^r	Δ <i>psrA::Gm^r</i> in pEX18Tc-pf1pf2, Tc ^r Gm ^r	This study
pOE <i>psrA</i>	A 702 bp <i>EcoR</i> I- <i>Xho</i> I fragment containing the entire <i>psrA</i> ORF was cloned into pME6032, Tc ^r	This study
pMP1L	A translational <i>phz1</i> '-' <i>lacZ</i> fusion containing a 692 bp of the 5'UTR and the first 9 codons of <i>phzA1</i> in pME6015, Tc ^r	This lab
pMP2L	A translational <i>phz2</i> '-' <i>lacZ</i> fusion containing a 544 bp of the 5' UTR and the first 9 codons of <i>phzA2</i> in pME6015, Tc ^r	This lab
pMEAZ	A translational <i>pltLA</i> '-' <i>lacZ</i> fusion containing a fragment covering from -353 to +367 bp of the <i>pltL</i> TSS in pME6015, Tc ^r	This lab

Note: r: Antibiotics-resistant; Km: Kanamycin; Gm: Gentamicin; Sp: Spectinomycin. Tc: Tetracycline.

1.1.3 主要试剂和仪器: 高保真 KOD 聚合酶购自 Toyobo 公司; 各种限制性内切酶、DNA *Taq* 聚合酶、T4 DNA 连接酶、DNA Marker 购自 MBI 公司; DNA 胶回收试剂盒购自 Axygen 公司; 质粒抽提采用 TaKaRa 试剂盒 miniBEST plasmid purification kit Ver 2.0。基因组抽提试剂盒、X-Gal、IPTG、抗生素购自上海 Sangon 公司。安捷伦 HPLC (型号 G1328B)、分析柱为反相 C18 色谱柱(4.6 mm i. d. \times 150 mm, 5 μ m)购自安捷伦公司。

1.2 引物和 PCR 反应

本文所用引物依据假单胞菌株 M18 的基因组序列进行设计。*psrA* 上游片段 PCR 引物: P1: 5'-ACGCGAATTCTCAAGCCTTCGATGATC-3'

(*EcoR* I), P2: 5'-CAATCTGCAGCTCCGCCTGA CAAACAC-3' (*Pst* I)。 *psrA* 下游片段 PCR 引物: P3: 5'-ATTGCTGCAGAGAGCGGCATCGACGA T-3' (*Pst* I), P4: 5'-CGATAAGCTTATTTCTCGA GACTGCG-3' (*Hind* III)。构建 *psrA* 过表达质粒 (pOE*psrA*) 所采用的引物: Po1: 5'-GCGGTAGCG GAATTCATGGCCCAGTCGGAAACC-3' (*EcoR* I), Po2: 5'-TTACATGCGCTCGAGTCAGGCCTT GGCGGGCGT-3' (*Xho* I)。

PCR 反应体系(25 μ L): 10 \times KOD 酶缓冲液 2.5 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 2.5 μ L, 引物 1 和引物 2 各 1.5 μ L, 模板 DNA (10 ng/ μ L) 1.0 μ L, KOD 酶 (5 U/ μ L) 0.25 μ L, ddH₂O 17.25 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C-65 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1-3 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.3 *psrA* 基因及上下游片段的克隆及测序

DNA 片段回收、质粒抽提、酶切、酶连等均参照试剂(盒)说明书进行操作,相关分子生物学方法参照文献[9],DNA 测序委托华大基因科技股份有限公司。

1.4 *psrA* 基因突变

采用细菌结合转移、双亲杂交、同源重组等方法进行基因突变^[10]。

1.5 PCA 与 Plt 产量测定

PCA 与 Plt 的测定方法均参照文献[9-10]。每隔 12 h 取一次样,每个菌株每次实验中设 3 个平行样,测定 PCA、Plt 产量及细胞生长密度(OD_{600})。独立重复实验 2-3 次。

1.6 β -半乳糖苷酶活性的测定

β -半乳糖苷酶活性的测定按照参考文献所示方法进行试验^[10-11],每个样品设 3 个重复,独立实验 2-3 次。

2 结果

2.1 M18*psrA* 突变株的构建

为了研究 M18 菌株中 *psrA* 基因对抗生素合

成的调控作用,我们采用庆大霉素抗性片段(Gm^r)置换 *psrA* 基因的方法构建突变株 M18*psrA*。如图 1A 所示,以野生型 M18 菌株的基因组为模板,利用 P1/P2 和 P3/P4 两对引物分别扩增 *psrA* 基因上、下游大小为 818 bp (pf1)和 849 bp (pf2)的 2 个片段,分别采用 *EcoR* I /*Pst* I、*Pst* I /*Hind* III 进行酶切,与经 *EcoR* I /*Hind* III 酶切的假单胞菌自杀载体 pEX18Tc 重组,得到 pEXTc-p1p2 重组质粒。利用 *Pst* I 酶切 pUCGm 质粒,回收大小为 825 bp 的庆大霉素抗性片段,插入到 pEXTc-pf1pf2 质粒的 *Pst* I 位点,获得 Gm^r 替代 *psrA* 基因的体外重组质粒 pEXTc-pf1pf2- Gm^r ,并转化至 *E. coli* SM10。将其作为供体菌, M18 野生型菌株作为受体菌,经固相滤膜结合转移。质粒 pEXTc-pf1pf2- Gm^r 转入 M18 菌株后,不能在染色体外自主复制,质粒携带的 pf1- Gm^r -pf2 片段与受体菌 M18 染色体上 *psrA* 基因的两端同源序列发生同源重组。用含 Gm 和 Tc 抗生素的平板分别进行筛选。在 Tc 平板上不生长而在 Gm 平板上生长的相应克隆表明已发生双交换,即为 *psrA* 基因突变株 M18*psrA*。抽提该突

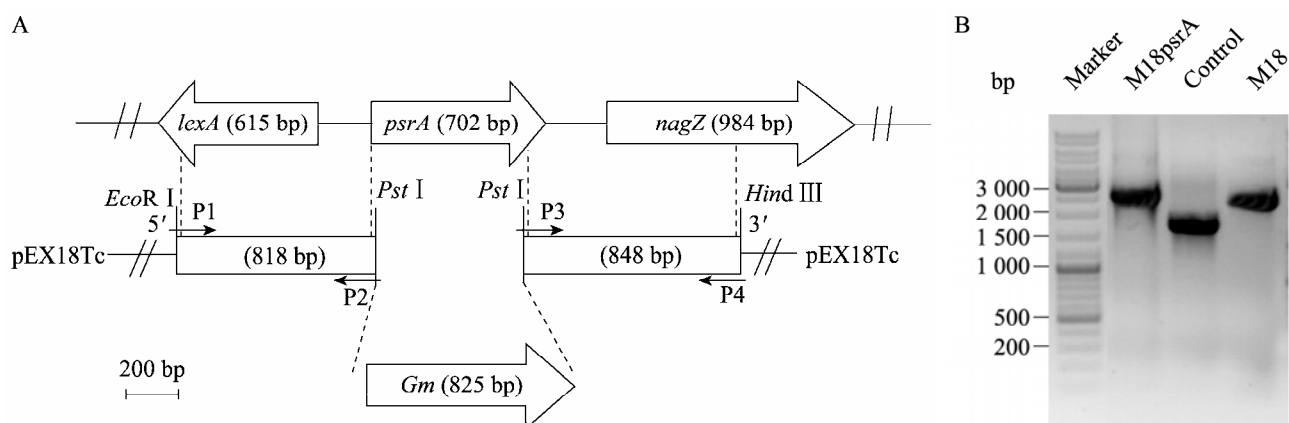


图 1 Gm^r 抗性片段置换 *psrA* 基因的物理图谱(A)及突变株 M18*psrA* 的 PCR 鉴定(B)

Fig. 1 Physical map for the replacement of *psrA* by Gm^r resistant cassette (A) and confirmation of the *psrA* mutant M18*psrA* by PCR (B)

注: M18*psrA*: 突变株 PCR 片段; Control: pExTc-pf1pf2 质粒 PCR 片段; M18: 野生型菌株 PCR 片段。

Note: M18*psrA*: PCR amplifying fragment of M18*psrA* genome; Control: PCR fragment of pExTc-pf1pf2; M18: PCR fragment of M18.

变菌株的基因组 DNA 作为模板, 利用 P1 和 P4 引物进行 PCR 并测序验证(图 1B)。突变株的 PCR 扩增片段比野生型 M18 菌株的扩增片段长 192 bp。

2.2 *psrA* 基因对抗生素生物合成的影响

2.2.1 *PsrA* 正调控 PCA 合成: M18 和 M18*psrA* 菌株于 PPM 培养基中, 在 28 °C、200 r/min 振荡培养。每隔 12 h 取一次样, 经氯仿萃取后, 用 HPLC 定量 PCA 的浓度。结果如图 2A 所示, 整个发酵过程中, 与野生型菌株相比, M18*psrA* 突变菌株的 PCA 产量均显著下降。在 24 h 时, M18 菌株的产量为 37 mg/L, 而突变株 M18*psrA* 的产量为 24 mg/L 左右。从 36 h 至 72 h, M18 和 M18*psrA* 的产量都呈下降趋势, 野生型菌株为 25 mg/L 左右, 而突变株仅为 2 mg/L。结果表明: *PsrA* 对 PCA 的合成存在显著的正调控作用。而 *psrA* 基因的突变对菌株的生长没有明显的影响。

将 *psrA* 的过表达质粒 pOE*psrA* 分别转化至野生型和突变菌株中, 以空质粒 pME6032 作为对照。分别测定携带 pOE*psrA* 或 pME6032 的 M18 与 M18*psrA* 菌株的 PCA 产量, 结果如图 3A 所示, *psrA* 基因可以促进 PCA 的合成。在 *psrA* 突变株内过表达外源 *psrA* 基因, PCA 产量回复到野生型水平。而野生型菌株过表达 *psrA* 基因, 同样导致 PCA 产量的明显升高。结果进一步说明了 *PsrA* 对 PCA 合成的正调控作用。

2.2.2 *PsrA* 负调控 Plt 合成: Plt 是假单胞菌分泌的一种广谱聚酮类抗生素, 由一个间苯二酚和含有两个氯原子的吡咯环组成。为了研究 *psrA* 基因对 Plt 生物合成的影响, M18 与 M18*psrA* 菌株以 KMB 为培养基, 于 28 °C、200 r/min 摇床

振荡培养, 定时取样, 利用乙酸乙酯提取, 通过 HPLC 检测 Plt 浓度。结果如图 2B 所示, *psrA* 基因的突变导致 Plt 产量显著升高, 是 M18 野生型菌株的 10–15 倍, 表明 *psrA* 基因对 Plt 合成具有显著的负调控作用。在 KMB 培养基中, *psrA* 基因的突变对生长也没有产生明显的影响。通过反式互补实验, 进一步证明了在 M18 菌株中, *psrA* 基因对 Plt 的生物合成存在较强的负调控作用(图 3B)。

2.3 *psrA* 基因区别性调控 *phz* 基因簇和 *plt* 基因簇的表达

假单胞菌株 M18 中 *phz1* (*phzA1–G1*)与 *phz2* (*phzA2–G2*)基因簇的编码序列之间同源性达到 97% 以上, 而各自上游的非编码区具有完全不同的核苷酸序列。将两个 *phz* 基因簇与 *lacZ* 报告基因的翻译融合质粒 pMP1L 和 pMP2L 分别转入 M18 和 M18*psrA* 菌株中, 测定 β -半乳糖苷酶活性。结果显示, *phz1*'-*lacZ* 融合质粒 pMP1L 在野生型 M18 与突变株 M18*psrA* 中的 β -半乳糖苷酶活性表达量基本相同(图 4A); 然而, M18 菌株中 *phz2*'-*lacZ* 融合质粒 pMP2L 所表达的酶活显著高于 M18*psrA* 突变菌株, 约提高 100 miller units (图 4B)。结果表明: *psrA* 基因主要通过调控 *phz2* 基因簇的表达来控制 PCA 合成, 而对 *phz1* 基因簇没有明显的影响。

将 *plt* 基因簇(*pltLABCDEFG*)与 *lacZ* 报告基因的 *pltL*'-*lacZ* 翻译融合质粒 pMEAZ 分别转入野生型菌株和 M18*psrA* 突变菌株, 测定各自表达的半乳糖苷酶活性。如图 4C 所示, *psrA* 基因的突变导致 *pltL*'-*lacZ* 表达显著提高, 为野生型 M18 菌株的 1.4 倍左右。这一结果表明, *PsrA* 对 Plt 合成基因簇的表达具有抑制作用。

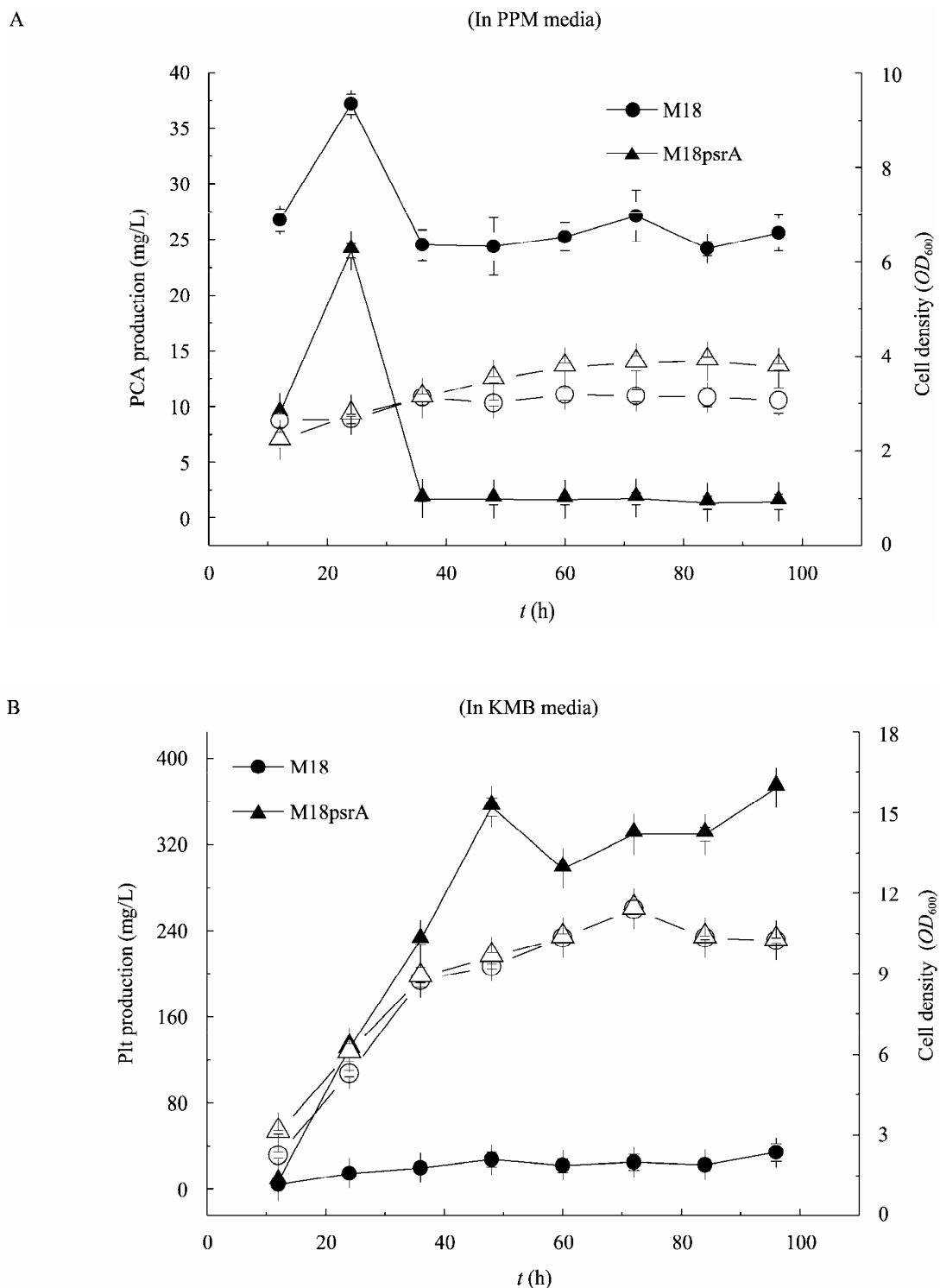


图 2 假单胞菌 M18 和 M18psrA 菌株的 PCA (A)、Plt (B)合成(实心标志)及细胞生长曲线(空心标志)

Fig. 2 PCA (A), Plt (B) production (solid symbols), and cell growth (open symbols) of the wild-type M18 strain and the *psrA* mutant

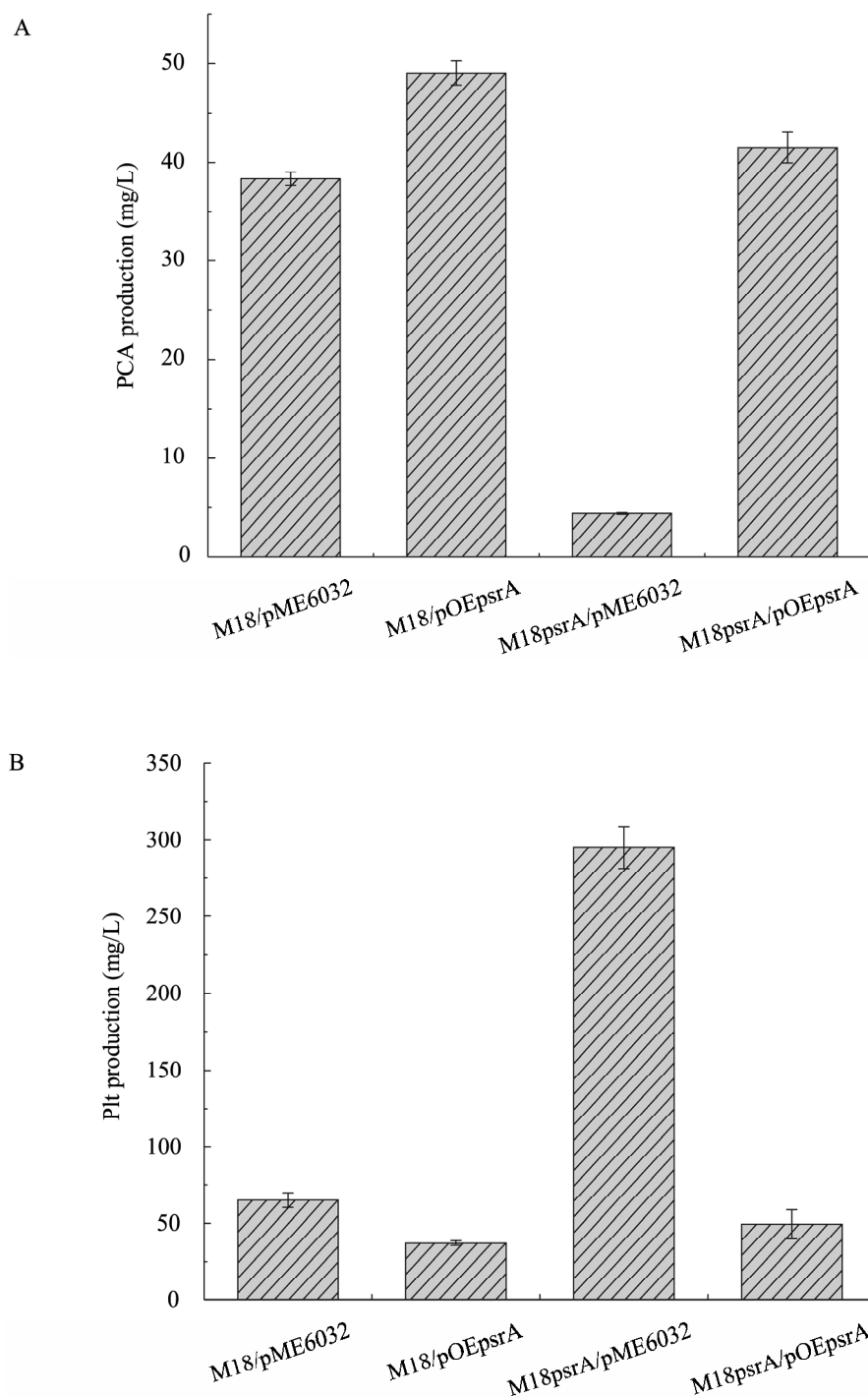


图3 *psrA* 基因的过表达对 PCA 与 Plt 产量的影响

Fig. 3 Influence of the *psrA* overexpression on PCA and Plt production

注: 携带 *psrA* 过表达质粒 pOEpsrA 或空质粒 pME6032 的野生型菌株 M18 和突变株 M18psrA, 在 PPM (A)和 KMB (B)培养基中发酵 60 h 后的 PCA 和 Plt 产量。

Note: PCA & Plt production of the wild-type M18 strain or the *psrA* mutant M18psrA strain harboring the *psrA* overexpression plasmid pOEpsrA or the empty vector pME6032 as the control, after 60 h of growth in PPM (A) and KMB (B) broth.

3 讨论

研究细菌 TetR 家族转录调控因子 PsrA 对假单胞菌株 M18 抗生素合成的调控作用, 将有助于深入了解假单胞菌次级代谢的调控途径, 同时为构建高产抗生素工程菌株奠定基础。本文重点研究了 PsrA 对吩噻-1-羧酸和藤黄绿菌素生物合成及其基因表达的调控作用。通过同源重组技

术构建了 *psrA* 突变菌株, 并研究发现 *psrA* 对 PCA 合成具有正调控作用, 而对 Plt 合成具有抑制作用。基因互补实验与 *lacZ* 融合报道分析结果进一步证实了 *psrA* 对 PCA 与 Plt 生物合成的区别性调控。PsrA 主要通过正调控 *phz2* 基因簇的表达来控制 PCA 的合成, 而对 *phz1* 操纵子的表达没有明显影响。PsrA 通过对 Plt 生物合成操纵子的负调控来抑制 Plt 的合成。最初有研究显示,

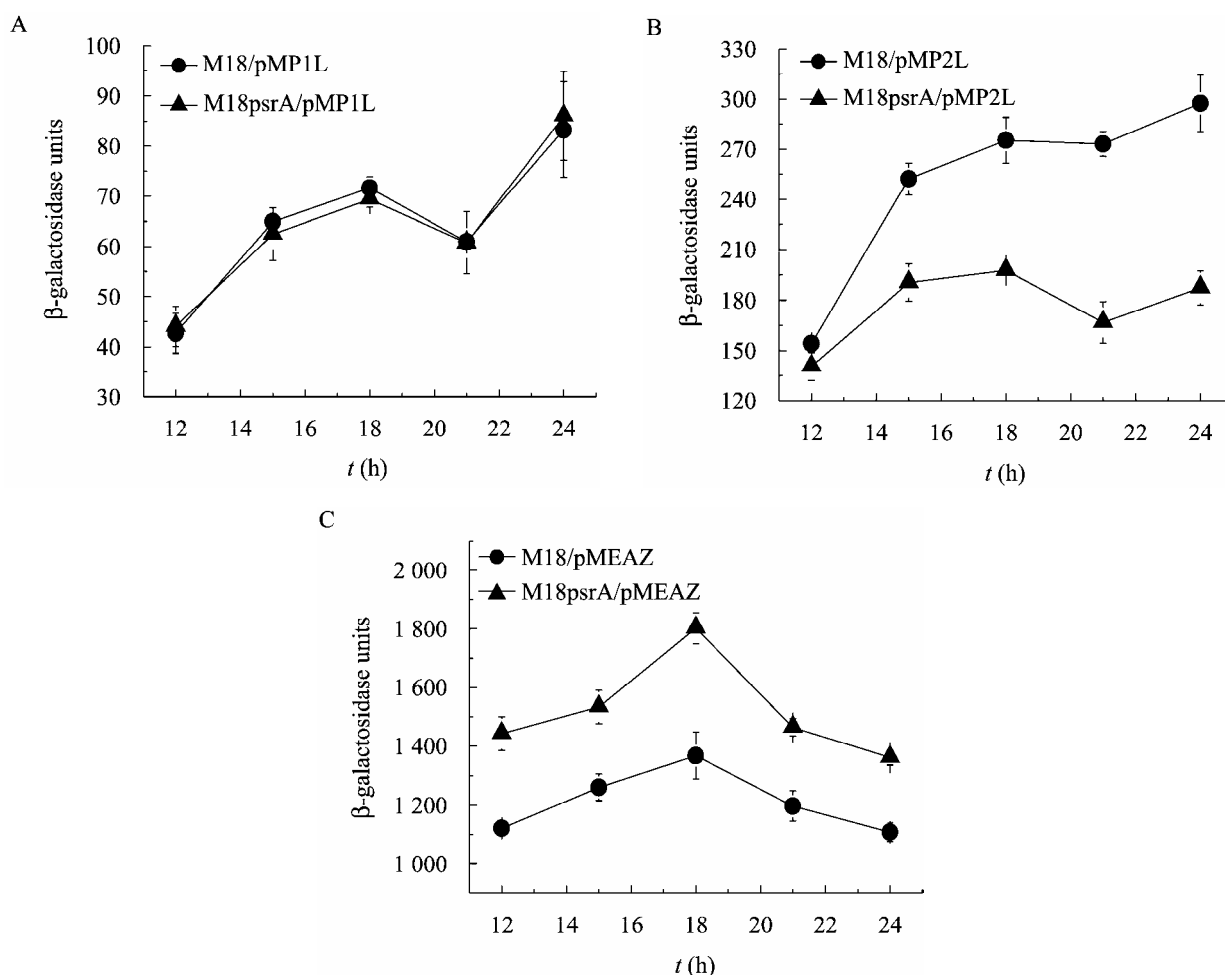


图4 *psrA* 对 PCA 与 Plt 生物合成基因表达的影响

Fig. 4 Effect of *psrA* on PCA and Plt biosynthetic gene expression

注: pMP1L (*phz1'-lacZ*)、pMP2L (*phz2'-lacZ*)和 pMEAZ (*pltL'-lacZ*)翻译融合质粒在野生型菌株 M18 和突变株 M18psrA 中的 β -半乳糖苷酶活性表达情况。

Note: β -galactosidase activities, which resulting from the *phz1'-lacZ*, *phz2'-lacZ* and *pltL'-lacZ* translational fusion on pMP1L, pMP2L and pMEAZ, were determined in the wild-type M18 strain and the *psrA* mutant M18psrA.

PsrA 对稳定期 Sigma 因子 RpoS 具有转录正调控作用^[12]。而我们以前的研究已经显示, 在假单胞菌株 M18 中, *rpoS* 的突变导致 PCA 合成的提高与 Plt 合成的显著下降。本研究中, PsrA 是否通过 *rpoS* 间接调控两种抗生素的合成, 还有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Ramos JL, Martínez-Bueno M, Molina-Henares AJ, et al. The TetR family of transcriptional repressors[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2005, 69(2): 326–356.
- [2] Kojic M, Venturi V. Regulation of *rpoS* gene expression in *Pseudomonas*: involvement of a TetR family regulator[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(12): 3712–3720.
- [3] Shen DK, Filopon D, Kuhn L, et al. PsrA is a positive transcriptional regulator of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Infection and Immunity, 2006, 74(2): 1121–1129.
- [4] Chatterjee A, Cui YY, Hasegawa H, et al. PsrA, the *Pseudomonas* sigma regulator, controls regulators of epiphytic fitness, quorum-sensing signals, and plant interactions in *Pseudomonas syringae* pv. tomato strain DC3000[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(11): 3684–3694.
- [5] Kang Y, Nguyen DT, Son MS, et al. The *Pseudomonas aeruginosa* PsrA responds to long-chain fatty acid signals to regulate the *fadBA5 β* -oxidation operon[J]. Microbiology, 2008, 154(6): 1584–1598.
- [6] Kang Y, Lunin VV, Skarina T, et al. The long-chain fatty acid sensor, PsrA, modulates the expression of *rpoS* and the type III secretion *exsCEBA* operon in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Mol Microbiol, 2009, 73(1): 120–136.
- [7] Chin-A-Woeng TFC, van den Broek D, Lugtenberg BJJ, et al. The *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 sigma regulator PsrA represses the production of the antifungal metabolite phenazine-1-carboxamide[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2005, 18(3): 244–253.
- [8] Lu JS, Huang XQ, Li K, et al. LysR family transcriptional regulator PqsR as repressor of pyoluteorin biosynthesis and activator of phenazine-1-carboxylic acid biosynthesis in *Pseudomonas* sp. M18[J]. Journal of Biotechnology, 2009, 143(1): 1–9.
- [9] Huang XQ, Yan A, Zhang XH, et al. Identification and characterization of a putative ABC transporter PltHIJKN required for pyoluteorin production in *Pseudomonas* sp. M18[J]. Gene, 2006, 376(1): 68–78.
- [10] Huang XQ, Zhu DH, Ge YH, et al. Identification and characterization of *pltZ*, a gene involved in the repression of pyoluteorin biosynthesis in *Pseudomonas* sp. M18[J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 232(2): 197–202.
- [11] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [12] Ge YH, Pei DL, Li WW, et al. Insertional mutation of the *rpoS* gene contributes to alteration in biosynthesis of antifungal agents in *Pseudomonas* sp. M18[J]. Biological Control, 2006, 39(2): 186–192.