

研究报告

绿针假单胞菌 HT66 中 *ompR* 基因的功能

侯博文 郭树奇 彭华松* 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:【背景】植物根部存在大量对植物生长有促进或对病原菌有拮抗作用的有益细菌,是当前农业微生物研究的热点之一。其中,绿针假单胞菌 HT66 是一株可高效合成吩嗪-1-甲酰胺(PCN)的环境友好型生防菌株。【目的】探究在绿针假单胞菌 HT66 中 *ompR* 基因的生理功能,以及其对菌株生防作用的影响。【方法】通过基因无痕敲除的方法构建 HT66 菌株的 *ompR* 基因缺失突变株,对比研究突变株与野生株在生长速率、渗透压感应、生物膜的合成、pH 耐受性、群集运动和 PCN 产量的变化。【结果】与野生株相比, *ompR* 基因缺失突变株的细胞生物量微量减少,生物膜的合成减少 31.5%,群集运动以及对渗透压和 pH 的耐受性明显下降,但是其 PCN 产量较野生株提高了 57.8%。【结论】在 HT66 菌株中, *ompR* 基因对其运动性、环境耐受性和生理生防功能均有一定程度的调控作用。本研究丰富了绿针假单胞菌的代谢通路,此报道将对后续 PCN 合成机制的研究和应用提供一定的理论依据。

关键词: 假单胞菌, 基因敲除, *ompR*, 吩嗪-1-甲酰胺

Function of *ompR* gene in *Pseudomonas chlororaphis* HT66

HOU Bo-Wen GUO Shu-Qi PENG Hua-Song* ZHANG Xue-Hong

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

Abstract: [Background] Plant rhizosphere growth-promoting bacteria are one of the hotspots in the current research of agricultural microorganisms because they promote plant growth or have antagonistic effects on pathogenic bacteria. Among them, *Pseudomonas chlororaphis* HT66 is a non-pathogenic biocontrol strain that can efficiently synthesize phenazine-1-carboxamide (PCN) — a promising and environmental friendly agricultural antibiotic. [Objective] To study the physiological function of *ompR* gene in *P. chlororaphis* HT66 and its biocontrol efficiency. [Methods] The *ompR* gene deletion mutant of HT66 strain was constructed by scar-less gene knockout method. We studied the effects of the mutation on the growth rate, biofilm synthesis, tolerance to pH and osmotic

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31270084); National High-Tech Research and Development Program of China (863 Program) (2012AA022107); National Key Basic Research Program of China (973 Program) (2012CB721005)

*Corresponding author: Tel: 86-21-34206083; E-mail: hspeng@sjtu.edu.cn

Received: March 09, 2018; **Accepted:** April 09, 2018; **Published online** (www.cnki.net): May 29, 2018

基金项目: 国家自然科学基金(31270084); 国家高技术研究发展计划(863 计划) (2012AA022107); 国家重点基础研究发展规划(973 计划) (2012CB721005)

*通信作者: Tel: 86-21-34206083; E-mail: hspeng@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2018-03-09; **接受日期:** 2018-04-09; **网络首发日期**(www.cnki.net): 2018-05-29

pressure, swarming mobility and PCN production. **[Results]** Compared with the wild-type strain, the *ompR* gene deletion inactivated mutant showed a slight reduction in cell biomass. The biofilm decreased by 31.5%, whereas the swarming mobility of the strain and the tolerance to osmotic pressure and pH decreased. However, the yield of PCN increased by 57.8% in the mutant strain. In HT66 strain, the *ompR* gene has a certain degree of regulation of its motility, environmental tolerance and physiological and biological functions. **[Conclusion]** Our findings enriched the metabolic pathway of *P. chlororaphis*, and will provide a basis for the research and application of the subsequent PCN synthesis mechanism.

Keywords: *Pseudomonas*, Gene knockout, *ompR*, Phenazine-1-carboxamide

绿针假单胞菌 (*Pseudomonas chlororaphis*) HT66 是本实验室从水稻根际土壤中分离得到的一株重要的生防菌株。该菌株营养需求简单, 生长迅速, 可高效合成吩嗪-1-甲酰胺 (Phenazine-1-carboxamide, PCN), 具有显著的生物防治作用^[1]。

天然吩嗪化合物是一类色彩丰富的含氮次级代谢产物, 具有广谱抗真菌活性^[2-3], 可用于防治植物真菌性病害。目前, 生物合成的吩嗪类抗生素已成为农药开发的重要领域之一^[4], 其高效合成菌株包括铜绿假单胞菌 M18^[5]、PA1201^[6], 以及绿针假单胞菌 PCL1391^[7]、GP72^[8]和 HT66。研究表明, 与吩嗪-1-羧酸(PCA)相比, 菌株 PCL 1391 产生的 PCN 对尖孢镰刀菌具有更高的抗真菌活性^[9]。从铜绿假单胞菌 PA1201 提取的 PCN 对 *Rhizoctonia solani* Kühn 和 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 抑菌效果优于多菌灵和利福霉素^[10]。PCN 作为高效的抗真菌剂^[11], 对环境友好, 具有良好的农业应用与开发前景^[12]。

EnvZ-OmpR 是一个全局性的双组分调控系统^[13], 在许多革兰氏阴性菌中通过调控外膜孔蛋白表达来应对渗透压变化。其中, OmpR 是目前肠杆菌科中研究最多的渗透压调节因子, 能协同调节部分细菌毒力基因的表达^[14]。该系统还可通过鞭毛途径调控共生细菌之间的相互作用, 比如在细菌 *Xenorhabdus nematophila* 中 OmpR 具有调控鞭毛途径、细菌的运动能力及抗生素分泌的作用^[15]。

经文献调研, 尚未见 EnvZ-OmpR 系统影响假单胞菌生防能力的报道。本论文在绿针假单胞菌 HT66 中构建了 *ompR* 基因缺失突变株, 对比了细菌生物膜、群集运动和吩嗪类抗生素的合成以及对环境 pH、渗透压耐受性的变化, 探讨了该基因对植物根际微生物生防功能的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

实验用菌株和质粒参见表 1。

表 1 菌株和质粒
Table 1 Strains and plasmid used in this study

Strains/Plasmid	Genotype and relevant characteristics	Sources
Strains		
<i>P. chlororaphis</i> HT66	Wild type, Amp ^r , Sp ^r	This lab
<i>P. chlororaphis</i> HT66Δ <i>ompR</i>	Gene deleted in HT66	This study
<i>E. coli</i> DH5α	<i>supE44</i> <i>AlacU169</i> (Φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i>) <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i>	This lab
<i>E. coli</i> S17	<i>res⁻</i> <i>pro</i> <i>mod⁺</i> integrated copy of RP4, <i>mob⁺</i>	This lab
Plasmid		
pK18- <i>ompR</i>	pK18 <i>mob</i> sacB carrying <i>EcoR</i> I- <i>Bam</i> HI insert of 476 bp and 421 bp segments flanking <i>ompR</i> ; SacB, Kan ^r	This study

注: Amp^r: 氨苄青霉素抗性; Sp^r: 壮观霉素抗性; Kan^r: 卡那霉素抗性。
Note: Amp^r: Ampicillin resistance; Sp^r: Spectinomycin resistance; Kan^r: Kanamycin resistance.

1.1.2 培养基及菌株生长条件

LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, 氯化钠 10.0, pH 7.5, 固体培养基中含 14.0 g 琼脂。KB 培养基(g/L): 蛋白胨 20.00, 磷酸氢二钾 0.51, 硫酸镁 0.73, 甘油 15 mL, pH 7.0。群集运动(Swarming mobility)检测培养基(g/L): 葡萄糖 5.0, 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, 琼脂 5.0, 0.68×10^5 Pa 灭菌 30 min 后制作成平板。抗生素用量: 硫酸卡那霉素(Kan) 50 mg/L, 氨苄青霉素钠(Amp) 100 mg/L。液体培养时在 250 mL 凹角三角瓶中装入 60 mL 培养基, 1.0×10^5 Pa 灭菌 20 min。大肠杆菌在 37 °C、180 r/min 培养; 假单胞菌在 28 °C、180 r/min 培养。每组实验设置 3 个平行。

1.1.3 主要试剂和仪器

PrimeSTAR DNA 聚合酶、限制性内切酶、Solution I, 宝生物工程(大连)有限公司; 2×Taq Master Mix, 南京诺唯赞生物科技有限公司; 基因组 DNA 提取采用 Genomic DNA Kit、质粒抽提采用 Plasmid MiniPrep Kit、电泳凝胶片段回收采用 Quick Gel Extraction Kit、酶切产物纯化采用 PCR Purification Kit, 北京全式金生物技术有限公司; IPTG、X-gal, 生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 引物和 PCR 反应条件

根据绿针假单胞菌 HT66 全基因组序列进行 *ompR* 基因前后同源臂克隆的引物设计, 其上游同源臂的引物对为: ompR-F1 : 5'-CCGGGGATCCTCTAGACGGTCACTTCCTTCCGGTAGC-3' (*EcoR* I) 和 ompR-R1 : 5'-CTGCTCAGCCCAGGGTCGT-3'; 下游同源臂的引物对为: ompR-F2 : 5'-CGACCCTGGGCTGAGCAGTCTGGGGCGTGGGTTACGT-3' 和 ompR-R2 : 5'-GGCCAGTGCCAAGCTTTGGGCGATGGCTGGCTG-3' (*BamH* I)。以 HT66 基因组为模板, 通过 PCR 扩增 *ompR* 基因序列。PCR 反应体系 (50 μ L): 2×GC Buffer 25 μ L, HT66 基因组 DNA (10 mg/L) 1 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 4 μ L, 引物 ompR-F1 和 ompR-R1 (10 μ mol/L) 各 1.5 μ L, *LA Taq* (100 U/ μ L) 0.5 μ L, 双蒸水 16.5 μ L。PCR 反应条件:

94 °C 30 s; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C, 50 s (1 min/kb), 30 个循环; 72 °C 10 min。

1.3 *ompR* 基因缺失突变株的构建

基因组及质粒提取、电泳凝胶片段回收、酶切、产物的纯化和连接等均按试剂盒说明书进行操作。采用基于同源重组的无痕敲除方法构建基因缺失突变株, 操作方法参考文献[16]。以菌株 HT66 基因组为模板, 使用 ompR-F1 和 ompR-R1、ompR-F2 和 ompR-R2 分别扩增 *ompR* 基因簇的上、下游同源臂。将产物纯化后作为模板, 用引物 ompR-F1 和 ompR-R2 扩增获得融合片段。将融合片段和质粒 pK18mobsacB 酶切并连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态, 之后进行蓝白斑筛选和 PCR 验证, 测序正确后即获得重组质粒 pK18-*ompR*。提取质粒, 转化大肠杆菌 S17 感受态, 在 Kan、Amp 双抗培养基中将该菌株与菌株 HT66 共培养, 将获得的菌液稀释, 涂布于含 10% 蔗糖的 LB 平板上, 分别在 LB 和含 Kan 的 LB 平板上影印筛选, 仅能在 LB 平板中生长的为双交换菌株。最后, 使用引物 ompR-F1 和 ompR-R2 进行原位菌落 PCR 验证, 获得敲除突变菌株 HT66 Δ *ompR*。DNA 测序委托上海桑尼生物科技有限公司完成。

1.4 生长曲线的绘制

将待测菌株在 KB 平板上充分活化, 分别接种至添加不同浓度 NaCl 的 KB 液体培养基中, 初始 OD_{600} 值为 0.02, 于 28 °C、180 r/min 培养, 每隔 12 h 取样, 稀释 OD_{600} 值至 0.3–0.8, 以分光光度计检测其 OD_{600} 值。

1.5 生物膜分析

将活化后的待测菌株接种到 KB 液体培养基中, 分装于 24 孔板, 28 °C 静置培养 48 h 后吸去菌液。然后用结晶紫对生物膜染色, 清洗多余的染色液。用乙醇进行脱色, 将脱色液转到酶标板中, 用酶标仪检测其 OD_{600} 值, 具体方法参考文献[17]。

1.6 群集运动分析

配制运动性检测平板, 在平板上进行菌株的群

集运动实验, 相关操作参照文献[18]。

1.7 PCN 产量测定

样品中 PCN 浓度用高效液相色谱(HPLC)检测。色谱柱为安捷伦 WondaSil-WR C18 反相柱 (5 μm ×250 mm)。样品的处理方法、HPLC 检测条件参照文献[19]。

2 结果与分析

2.1 *ompR* 基因克隆和分析

设计 *ompR* 基因的引物, 以绿针假单胞菌 HT66 基因组为模板扩增 *ompR* 基因片段, 并将扩增片段回收纯化后测序。将测序结果与 NCBI 数据库相关序列进行比对。结果表明, 菌株 HT66 中 *ompR* 基因片段长度为 941 bp, 与 *Pseudomonas fluorescens* F113 的 *ompR* 基因一致性最高, 为 96.3%。

2.2 突变株 HT66 Δ *ompR* 的构建

为研究 *ompR* 基因对菌株 HT66 生物学功能的影响, 构建了 *ompR* 基因缺失突变株 HT66 Δ *ompR*。以突变株基因组为模板, *ompR*-F1 和 *ompR*-R2 为引物扩增出长度约为 850 bp 的上、下游同源臂融合片段; 以野生株基因组为模板, 扩增片段长度约为 1 800 bp, 与 *ompR* 基因及上、下游同源臂的长度一致, 表明突变株构建成功(图 1)。

2.3 *ompR* 基因缺失对菌株 HT66 生物功能的影响

在不同 NaCl 浓度梯度的 KB 培养基中分别接种菌株 HT66 和 HT66 Δ *ompR* 后, 在相同条件下进行培养, 定时取样测定 OD_{600} 值并绘制其生长曲线, 对比野生株和突变株在不同渗透压条件下生长的差异, 结果如图 2 所示。在 KB 培养基中, 当 *ompR* 基因敲除后与野生株相比的生物量减少, 而且随着培养基中 NaCl 浓度的增加, 突变株的生长受抑制程度则越来越明显。加入 5 g/L 的 NaCl 时, 突变株较野生株在对数生长期的生长速率略有降低, 但 48 h 后菌体浓度接近; 加入 20 g/L 的 NaCl 后, 野生株和突变株生物量均受到渗透压的抑制, 突变株 HT66 Δ *ompR* 受抑制的程度尤其明显, 表

明 *ompR* 基因的缺失降低了菌株对高渗透压的耐受性。

为对比野生株和突变株对外界 pH 耐受性的差异, 配制了不同初始 pH 的 KB 培养基, 定时取样检测菌体浓度, 结果如图 3 所示。HT66 菌

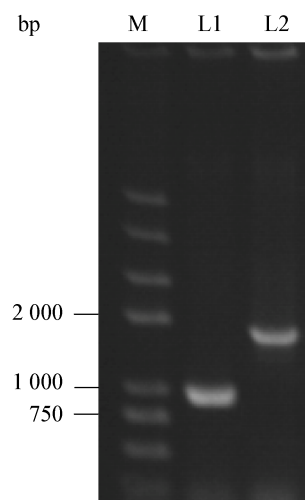


图 1 菌株 HT66 Δ *ompR* 原位 PCR 验证

Figure 1 Confirmation of strain HT66 Δ *ompR* by PCR

注: M: Marker; L1: 以菌株 HT66 Δ *ompR* 的基因组为模板; L2: 以菌株 HT66 的基因组为模板。

Note: M: Marker; L1: Using genome of strain HT66 Δ *ompR* as template; L2: Using genome of strain HT66 as template.

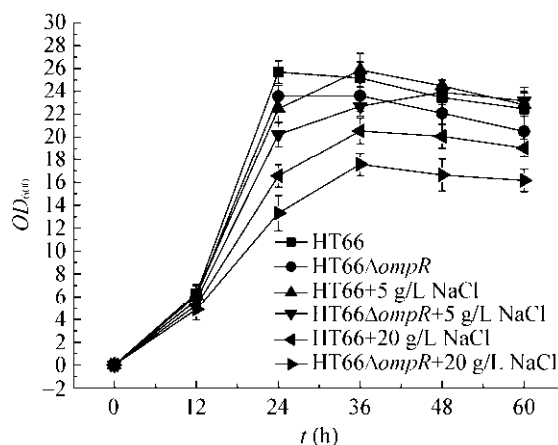


图 2 敲除 *ompR* 基因后渗透压对菌株 HT66 生长的影响

Figure 2 Effect of *ompR* gene knockout on the growth of strain HT66 under different osmotic pressure

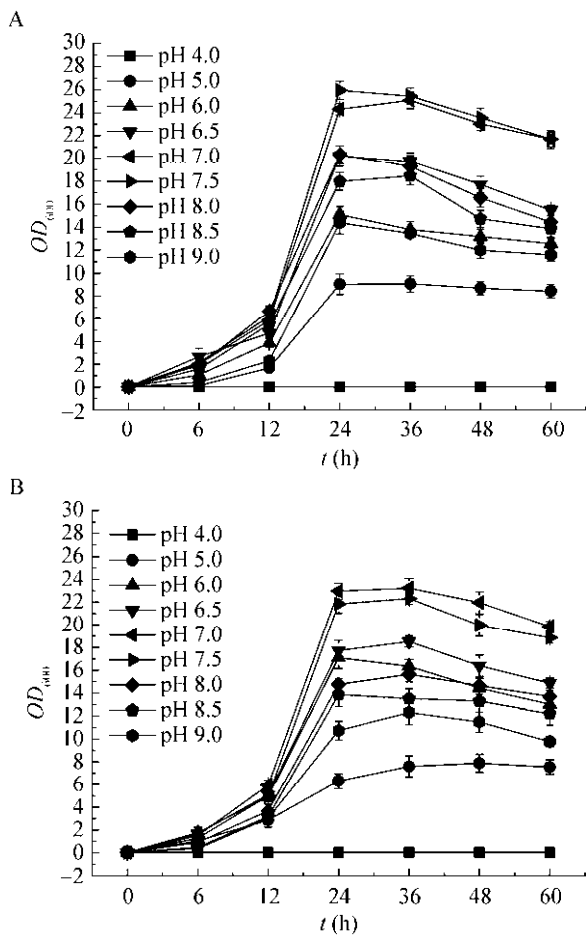


图 3 不同 pH 条件下野生型 HT66 (A) 和突变株 HT66 Δ *ompR* (B) 的生长曲线

Figure 3 Growth curve of wild-type strain HT66 (A) and mutant HT66 Δ *ompR* (B) under different pH condition

株的最适生长 pH 值为 7.5, OD_{600} 值可达到 25.7 (图 3A)。突变株 HT66 Δ *ompR* 的最适生长 pH 值为 7.0, OD_{600} 最大值为 23.2 (图 3B)。当 pH 增加或者减少时, 其生长均开始减弱。可见, *ompR* 基因缺失后突变株对环境酸性和碱性的耐受性下降更为明显。

为测定 *ompR* 基因缺失对菌株 HT66 生物膜合成量的影响, 以初始培养液为空白对照, 于 24 孔板中测定了菌株 HT66 和 HT66 Δ *ompR* 的生物膜合成量, 结果如图 4 所示。与野生型相比, 突变株生物膜的形成受到一定程度的抑制, 合成量约为野生型的 68.5%。

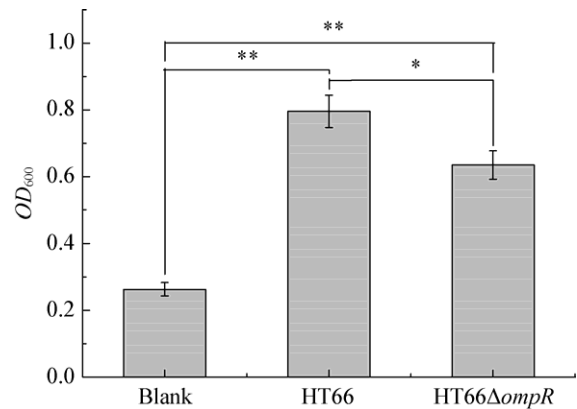


图 4 *ompR* 基因缺失对菌株 HT66 生物膜形成的影响
Figure 4 Effects of *ompR* gene's deletion on the biofilm formation of strain HT66

细菌的运动能力与其定殖行为密切相关, 运动能力强则有利于其生防功能^[20]。我们对比研究了菌株 HT66 和 HT66 Δ *ompR* 在群集运动检测平板上的生长情况, 结果如图 5 所示。野生株和突变株的菌落形态较为类似, 呈现发散状, 且带有晕圈; 但 *ompR* 基因缺失后, 突变株的运动半径从 4.1 cm 减小至 2.5 cm, 表明其群集运动能力明显降低。推测 *ompR* 基因对细菌鞭毛基因的表达起正调控作用, HT66 敲除 *ompR* 后影响了鞭毛表达, 造成运动能力显著减弱^[15]。

高效合成 PCN 的能力是绿针假单胞菌 HT66 的重要生防能力之一。分别将野生株和突变株在相同条件下培养, 定时取样检测 PCN 浓度, 结果如图 6 所示。在 *ompR* 基因缺失后, 突变株 PCN 合

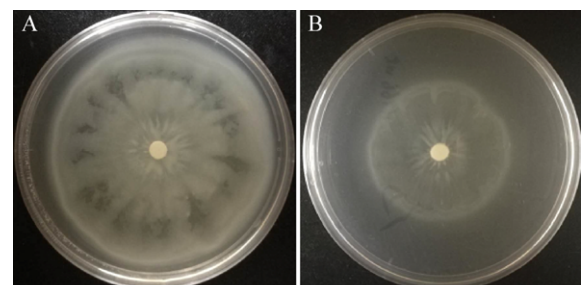


图 5 菌株 HT66 (A) 以及 HT66 Δ *ompR* (B) 的群集运动
Figure 5 The swarming motility of strain HT66 (A) and HT66 Δ *ompR* (B)

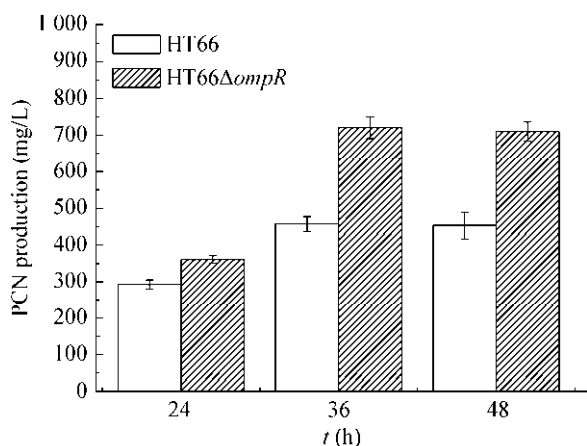


图6 *ompR* 基因敲除对菌株 HT66 合成 PCN 的影响
Figure 6 Effects of *ompR* gene's deletion on PCN production of strain HT66

成能力大幅增加,在36 h时达到最高产量720.9 mg/L,比野生株提高了57.8%。

3 讨论与结论

植物根际细菌的间接促生作用包括产生抗生素、抗菌蛋白等抑制真菌性病害而促进植物生长,并通过形成生物膜及群集运动以增强其在植物根际的定殖^[21]。

EnvZ-OmpR 双组分调节系统由感受激酶 EnvZ 和响应调节因子 OmpR 组成。EnvZ 镶嵌于细胞膜上,可以感受环境条件如渗透压和 pH 的变化,通过磷酸基团转移将信号传导到位于胞内的调节因子 OmpR 上来调节^[22]。研究表明,EnvZ-OmpR 系统对蛋白酶、脂肪酶的分泌以及群集运动、鞭毛基因、三型分泌系统等多种生理活动均有调控作用^[23-24]。这方面研究主要集中在病原细菌,OmpR 直接作用于编码膜孔道蛋白 OmpC 及 OmpF 基因的启动子区,从而对高渗透压、酸性环境以及毒性物质等胁迫作用进行响应^[25-26]。目前尚未有 EnvZ-OmpR 双组分系统影响植物根际假单胞菌生防功能的报道。

本论文克隆了绿针假单胞菌 HT66 中的 *ompR* 基因,通过比对发现其与 *Pseudomonas fluorescens* F113 中 *ompR* 基因的一致性高达 96.3%。通过基因

无痕敲除技术构建菌株 HT66 的 *ompR* 基因缺失菌株,其 PCN 产量提高 57.8%,增强了其对植物根际病原真菌的抑制,有利于提高其生防功能。除了合成抗生素外,细胞生物膜的合成和菌株的运动性也在影响着根际微生物的生防功能。*ompR* 基因突变株对 pH 和渗透压的耐受性、生物膜的合成及运动性均下降,不利于其在植物根际的定殖,反而降低其生防能力。因此,我们认为该基因对绿针假单胞菌的生防功能存在比较复杂的调控机制,对不同的生物学功能进行差异性调控。此外,鉴于 *ompR* 基因对多种膜孔道蛋白具有重要的调节作用^[25-26],我们推测 *ompR* 基因敲除突变株中 PCN 产量的提高可能与 PCN 的外排分泌系统调控有关,但该推测有待进一步研究。

本研究在绿针假单胞菌 HT66 中初步研究了 *ompR* 基因的功能,丰富了研究者对 *ompR* 基因生理功能的认知,对了解绿针假单胞菌 HT66 的 PCN 产物合成与代谢调控具有重要意义。由于 PCN 在生物农药上具有较广阔的应用前景,本研究将为后续生防菌株的合成代谢调控方面的研究提供参考。

REFERENCES

- [1] Chen YW, Shen XM, Peng HS, et al. Comparative genomic analysis and phenazine production of *Pseudomonas chlororaphis*, a plant growth-promoting rhizobacterium[J]. Genomics Data, 2015, 4: 33-42
- [2] Mavrodi DV, Parejko JA, Mavrodi OV, et al. Recent insights into the diversity, frequency and ecological roles of phenazines in fluorescent *Pseudomonas* spp.[J]. Environmental Microbiology, 2013, 15(3): 675-686
- [3] Pierson LS, Pierson EA. Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 86(6): 1659-1670
- [4] 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. 高产申喹霉素和吩嗪-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
- [5] Ren B, Shen HF, Lu ZJ, et al. The *phzA2-G2* transcript exhibits direct RsmA-mediated activation in *Pseudomonas aeruginosa* M18[J]. PLoS One, 2014, 9(2): e89653

- [6] Jin KM, Zhou L, Jiang HX, et al. Engineering the central biosynthetic and secondary metabolic pathways of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA1201 to improve phenazine-1-carboxylic acid production[J]. Metabolic Engineering, 2015, 32: 30-38
- [7] Chin-A-Woeng TF, Bloemberg GV, van der Bij AJ, et al. Biocontrol by phenazine-1-carboxamide-producing *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 of tomato root rot caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1998, 11(11): 1069-1077
- [8] Chen MM, Cao HX, Peng HS, et al. Reaction kinetics for the biocatalytic conversion of phenazine-1-carboxylic acid to 2-hydroxyphenazine[J]. PLoS One, 2014, 9(6): e98537
- [9] Chin-A-Woeng TFC, Bloemberg GV, Mulders IHM, et al. Root colonization by phenazine-1-carboxamide-producing bacterium *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 is essential for biocontrol of tomato foot and root rot[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2000, 13(12): 1340-1345
- [10] Shanmugaiah V, Mathivanan N, Varghese B. Purification, crystal structure and antimicrobial activity of phenazine-1-carboxamide produced by a growth-promoting biocontrol bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* MML2212[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 108(2): 703-711
- [11] Bloemberg GV, Lugtenberg BJJ. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2001, 4(4): 343-350
- [12] 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
- [13] Tian T, Sun BB, Zhang W, et al. OmpR regulates the intracellular concentration of 2,4-diacylphloroglucinol by affecting the transcriptional activity of the hydrolase *phlG* in *Pseudomonas fluorescens* 2P24[J]. Journal of Pure and Applied Microbiology, 2015, 9(1): 189-200
- [14] Kakuda T, Hirota T, Takeuchi T, et al. VirS, an OmpR/PhoB subfamily response regulator, is required for activation of *vapA* gene expression in *Rhodococcus equi*[J]. BMC Microbiology, 2014, 14(1): 243
- [15] Park D, Forst S. Co-regulation of motility, exoenzyme and antibiotic production by the EnvZ-OmpR-FlhDC-FlhA pathway in *Xenorhabdus nematophila*[J]. Molecular Microbiology, 2006, 61(6): 1397-1412
- [16] Xiong X, Hou BW, Jin XJ, et al. Identification and characterization of a lipopeptide produced by a biocontrol *Pseudomonas chlororaphis* strain HT66[J]. Microbiology China, 2017, 44(3): 611-619 (in Chinese)
熊欣, 侯博文, 金雪洁, 等. 生防绿针假单胞菌 HT66 中脂肽的鉴定与功能[J]. 微生物学通报, 2017, 44(3): 611-619
- [17] Selin C, Fernando WGD, de Kievit T. The PhzI/PhzR quorum-sensing system is required for pyrrolnitrin and phenazine production, and exhibits cross-regulation with RpoS in *Pseudomonas chlororaphis* PA23[J]. Microbiology, 2012, 158(4): 896-907
- [18] Wei X, Huang XQ, Tang LL, et al. Global control of GacA in secondary metabolism, primary metabolism, secretion systems, and motility in the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* M18[J]. Journal of Bacteriology, 2013, 195(15): 3387-3400
- [19] Tan J, Xiong X, Liang WL, et al. Breeding of a phenazine-1-carboxamid-producing strain by ARTP mutation and its optimization of fermentation[J]. Biotechnology Bulletin, 2016, 32(1): 174-179 (in Chinese)
谭剑, 熊欣, 梁万利, 等. ARTP 技术选育吩嗪-1-甲酰胺高产菌株及发酵优化[J]. 生物技术通报, 2016, 32(1): 174-179
- [20] Guo JH, He YY, Chen RH, et al. Influence of *mexS* gene on motility in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis, 2015, 48(5): 44-50 (in Chinese)
郭建慧, 何沿沿, 陈荣浩, 等. 铜绿假单胞菌 *mexS* 基因对其运动能力的影响[J]. 南开大学学报: 自然科学版, 2015, 48(5): 44-50
- [21] Dekkers LC, Bloemendaal CP, de Weger LA, et al. A two-component system plays an important role in the rootcolonizing ability of *Pseudomonas fluorescens* strain WCS365[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1998, 11(1): 45-56
- [22] Steenackers H, Hermans K, Vanderleyden J, et al. *Salmonella* biofilms: an overview on occurrence, structure, regulation and eradication[J]. Food Research International, 2012, 45(2): 502-531
- [23] Garmendia J, Beuzón CR, Ruiz-Albert J, et al. The roles of SsrA-SsrB and OmpR-EnvZ in the regulation of genes encoding the *Salmonella typhimurium* SPI-2 type III secretion system[J]. Microbiology, 2003, 149(9): 2385-2396
- [24] McCarthy CN, Woods RG, Beacham IR. Regulation of the *aprX-lipA* operon of *Pseudomonas fluorescens* B52: differential regulation of the proximal and distal genes, encoding protease and lipase, by *ompR-envZ*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 241(2): 243-248
- [25] Jubelin G, Vianney A, Beloin C, et al. CpxR/OmpR interplay regulates curli gene expression in response to osmolarity in *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(6): 2038-2049
- [26] Sun BB, Zhang W, Duan HY, et al. Cloning of EnvZ/OmpR two-component system from *Pseudomonas fluorescens* 2 P24 and prokaryotic expression of OmpR[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2014, 29(3): 41-45 (in Chinese)
孙冰冰, 张伟, 段红英, 等. 生防荧光假单胞菌 2 P24 中 EnvZ/OmpR 双因子系统克隆与 OmpR 原核表达[J]. 华北农学报, 2014, 29(3): 41-45