

研究报告

*suhB* 基因对绿针假单胞菌 HT66 生防能力的影响

宗媛娜 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】绿针假单胞菌(*Pseudomonas chlororaphis*) HT66 是一株兼具生防安全性和吩嗪-1-甲酰胺(Phenazine-1-Carboxamide, PCN)高产的植物根际促生菌,在生物防治、生态农业及可持续发展农业领域具有广阔的应用前景。非编码 RNA(ncRNA) *SuhB* 参与了细胞中多个过程的代谢调控。【目的】探究 *suhB* 基因对绿针假单胞菌 HT66 生防能力的影响。【方法】以同源重组的方法无痕敲除 *suhB* 基因构建突变菌株 HT66Δ*suhB*, 利用质粒回补 *suhB* 基因构建突变菌株 HT66Δ*suhB*-pBBR-*suhB*, 研究 *suhB* 基因对菌株生长状态、生物膜形成、群集运动及 PCN 合成的影响。【结果】缺失 *suhB* 基因后,菌株 HT66 生长缓慢,平台期滞后 12 h,而且生物量减少为野生型的 61.6%;在 KMB 培养基中单位细胞 PCN 产量最高达 109.5 mg/g,为野生株的 2.1 倍;生物膜形成量明显增加,为野生型的 1.8 倍;在运动性检测平板上,野生株的运动半径为 21 mm,而 *suhB* 突变株的运动半径缩减至 9.7 mm,群集运动能力明显下降。*suhB* 基因回补突变株上述生物学功能同野生株相似。在突变株 HT66Δ*suhB* 中, pME6015-*phzI-lacZ* 融合质粒表达的 LacZ 酶活与野生型差异不显著; pME6015-*phzR-lacZ* 融合质粒表达的 LacZ 酶活显著上升,为野生型的 3.1 倍; pME6522-*phzAp-lacZ* 融合质粒表达的 LacZ 酶活为野生型的 1.8 倍。【结论】绿针假单胞菌 HT66 中 *suhB* 基因参与了菌株生长、生物膜形成、群集运动及 PCN 合成等多个过程的调控。本研究为该菌株的代谢改造与生防应用提供了理论基础。

关键词: 绿针假单胞菌 HT66, 吩嗪-1-甲酰胺, *suhB*Effect of *suhB* gene on biocontrol ability of *Pseudomonas chlororaphis* HT66

ZONG Yuanna PENG Huasong* ZHANG Xuehong

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

Abstract: [Background] *Pseudomonas chlororaphis* HT66 is a plant growth-promoting rhizobacterium (PGPR) with biocontrol safety and high yield of phenazine-1-carboxamide (PCN). It has broad application prospects in biological control, ecological agriculture and sustainable agriculture. *SuhB*, a small non-coding RNA, involved in the metabolic regulation of multiple processes in cells. [Objective] This study explored the effect of *suhB* gene on the biocontrol ability of in *P. chlororaphis* HT66. [Methods] We

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31670033); National Key Research and Development Program of China (2019YFA0904302)

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

Received: 16-03-2020; Accepted: 11-04-2020; Published online: 21-05-2020

基金项目: 国家自然科学基金(31670033); 国家重点研发计划(2019YFA0904302)

*通信作者: Tel: 021-34206083; E-mail: hspeng@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2020-03-16; 接受日期: 2020-04-11; 网络首发日期: 2020-05-21

constructed the *suhB* deletion mutant HT66 Δ *suhB* by homologous recombination method and the *suhB* complemented mutant HT66 Δ *suhB*-pBBR-*suhB* by plasmid. They were used to explore the effect of *suhB* gene on strain growth, biofilm formation, swarming motility and PCN synthesis. **[Results]** The mutant HT66 Δ *suhB* grew slowly, the plateau period delayed by 12 h and its biomass decreased to 61.6% of the wild type. The maximum yield of mutant strain in KMB medium can reach 109.5 mg/g (per DCW), which was 2.1 times that of wild type. The biofilm formation increased significantly, which was 1.8 times that of the wild type. However, the swarming motility of HT66 Δ *suhB* was defective. On the swarm plate, the movement radius of the wild strain was 21 mm, while the movement radius of the mutant strain was 9.7 mm. The *suhB* gene complemented mutant is similar to wild type in the above aspects. Compared with the wild type, there is no difference on the expression of *phzI* at the overall level in mutant HT66 Δ *suhB*. On the contrary, the expression of *phzR* increased significantly, which is 3.1 times that of the wild type. In addition, the expression of *phzAp* at the transcriptional level is 1.8 times that of the wild type. **[Conclusion]** The regulation of *suhB* gene in *P. chlororaphis* HT66 participates in the growth, biofilm formation, swarming motility and PCN synthesis. This research provides a theoretical basis for the metabolic transformation and biocontrol applications of *P. chlororaphis* HT66.

Keywords: *Pseudomonas chlororaphis* HT66, phenazine-1-carboxamide, *suhB*

植物根际促生菌(Plant Growth-Promoting Rhizobacterium, PGPR)是指在植物生长发育过程中附着于其根际或根系的土壤微生物^[1]。这类微生物一方面可以合成并分泌植物类激素(如吡啶乙酸等),促进植物的生长发育^[2-3];另一方面能够分泌抗生素或抗性诱导因子来防治病原菌和有害昆虫,降低植物发病率^[4]。因此,PGPR在植物病害生物防治及生态农业领域具有重要意义。

假单胞菌属(*Pseudomonas*)细菌因其强大的环境适应能力和分泌吩嗪类抗生素等多种次级代谢产物的能力而受到广泛关注,被认为是最具前景的生防菌株之一^[5]。绿针假单胞菌(*Pseudomonas chlororaphis*) HT66是从水稻根际分离的一株公认安全的PGPR,该菌株可分泌多种次级代谢产物,包括农用抗生素吩嗪-1-甲酰胺(Phenazine-1-Carboxamide, PCN)、生物活性物质 Orfamide A及铁载体 Pyoverdine (Pvd)等^[6]。其中,吩嗪类抗生素PCN对多种植物病原菌有显著的抑制作用^[7]。绿针假单胞菌 HT66经过多轮紫外和亚硝基胍诱变并筛选,得到了一株突变菌株 P3,其PCN产量提高了3.99倍,并能利用强化的莽草酸途径合成有价值的化合物^[8]。可见,绿针假单胞菌 HT66具有显著的吩嗪类抗生素生产潜力,可开发为底盘细胞,广泛应用于农业生产及生物制造领域。

非编码小RNA(sRNA)SuhB是一种肌醇单磷酸酶,在细胞多个过程的代谢调控中发挥重要作用。在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中SuhB与Nus因子结合形成复合体促进rRNA的成熟^[9-10],在铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)中SuhB参与生物膜形成、细菌运动、III型分泌系统(T3SS)、IV型分泌系统(T6SS)以及核糖体活性调节等多个过程的调控^[11]。目前关于*suhB*基因的研究报道较少,其与不同途径基因之间的关系及调控的具体分子机制有待进一步阐明。此外,*suhB*基因在绿针假单胞菌中发挥的功能尚不明确。因此,本文构建了*suhB*基因缺失和回补的绿针假单胞菌 HT66突变菌株,从菌株生长状态、生物膜形成、群集运动、吩嗪化合物合成(如PCN)和调控等方面,探究*suhB*基因对菌株 HT66生物学功能的影响,挖掘非编码RNA在假单胞菌次级代谢产物合成中的作用,以为后续生防菌株代谢调控方面的研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和引物

研究中所用菌株和质粒及特性见表1,为本实验室保存或本研究构建。研究所用引物委托上海睿勉生物科技有限公司进行合成,引物序列见表2。

表 1 本研究所用菌株和质粒
Table 1 Main strains and plasmids used and developed in this study

菌株和质粒 Strains and plasmids	特征 Relevant characteristics	来源 Sources
<i>P. chlororaphis</i>		
HT66	Wild type, Amp ^r , Sp ^r	Lab stock
HT66Δ <i>suhB</i>	In-frame deletion of <i>suhB</i>	This study
<i>E. coli</i>		
DH5α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU</i> 169 (Φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M</i> 15) <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i>	Lab stock
S17-1(λ <i>pir</i>)	<i>E. coli</i> res- pro mod ⁺ integrated copy of <i>RP4</i> , <i>mob</i> ⁺ , used for incorporating constructs into <i>P. chlororaphis</i>	Lab stock
Plasmids		
pK18 <i>mobsacB</i>	Broad-host-range gene replacement vector, Kan ^r	Lab stock
pK18- <i>suhB</i>	pK18 <i>mobsacB</i> containing <i>suhB</i> upstream and downstream; SacB, Km ^r	This study
pBBR1MCS-2	Lac expression vector, Kan ^r	Lab stock
pME6015	pVS1-p15A shuttle vector for constructing the translational <i>lacZ</i> fusions, Tc ^r	Lab stock
pME6522	pVS1-p15A shuttle vector for constructing the transcriptional <i>lacZ</i> fusions, Tc ^r	Lab stock
pBBR- <i>phzR-lacZ</i>	pBBR1MCS containing a 460 bp fragment covering -413 bp to +48 bp relative to the <i>phzR</i> TSS and <i>lacZ</i> gene from pME6015, Kan ^r	This study
pBBR- <i>phzI-lacZ</i>	pBBR1MCS containing a 386 bp fragment covering -160 bp to +227 bp relative to the <i>phzI</i> TSS and <i>lacZ</i> gene from pME6015, Kan ^r	This study
pBBR- <i>phzAp-lacZ</i>	pBBR1MCS containing a 324 bp fragment upstream of the <i>phzA</i> TSS and <i>lacZ</i> gene from pME6522, 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; Tc^r: 四环素抗性
Note: Amp^r: Ampicillin resistance; Sp^r: Spectinomycin resistance; Kan^r: Kanamycin resistance; Tc^r: Tetracycline resistance

表 2 本研究所用引物信息
Table 2 Main primers designed and used in this study

引物名称 Primers name	序列 Sequences (5'→3')	用途 Applications
<i>suhB</i> -F1	TGACATGATTACGAATTCGGGCGCTGGTACCAAACACC	<i>suhB</i> deletion
<i>suhB</i> -R1	TGCATGGATAGGTCACCTAAGGTTG	
<i>suhB</i> -F2	AGGTGACCTATCCATGCAGCTAAGCGCCAGCGACAAAA	
<i>suhB</i> -R2	GTCGACTCTAGAGGATCCGTGGTTACGCGGGTAACAAGGT	
<i>suhB</i> -pBBR-F	GGTATCGATAAGCTTGGGAGGCGCTCTCGGACAC	<i>suhB</i> complementation
<i>suhB</i> -pBBR-R	AGAACTAGTGGATCCGCGTTTGAGCGTCAATCATGAAA	
<i>phzI</i> '-F	CAAAAGCTTCGAATTCCTGTGTAGCCACCAAGTACCTCAAC	β-galactosidase activity determination
<i>phzI</i> '-R	CGAAGCTTGGCTGCAGGTGCTCTTCCATGTGCATCGCTGGG	
<i>phzR</i> '-F	CAAAAGCTTCGAATTCAGGCATGGCGGCATCCTCCTTAGTTG	β-galactosidase activity determination
<i>phzR</i> '-R	CGAAGCTTGGCTGCAGCTGCTGCCCTAACTCCATTTTGAGC	
<i>phzAp</i> -F	CAAAAGCTTCGAATTCCTCCATTTTGAGCACCCTAAAGTTG	β-galactosidase activity determination
<i>phzAp</i> -R	GCTCACAATTCTGCAGGGTGTGTTTATACACCTGCATTTCTTG	
<i>lacZ</i> -F	AACAGTTTTTATGCATGAGAATGGCAAAAGCTTCGAATTC	β-galactosidase activity determination
<i>lacZ</i> -R	TGGCGGCCGCTCTAGAGGGAAACGTCTTGCTCGAGATCAA	

1.1.2 主要试剂和仪器

Prime STAR Max DNA 高保真聚合酶、Infusion 同源重组酶、限制性核酸内切酶及 EasyPure Genomic DNA 快速纯化试剂盒, 宝生物工程(大连)有限公司; 质粒提取试剂盒、DNA 片段纯化试剂

盒及胶回收试剂盒, 美基生物(中国)有限公司; EasyTaq Mix DNA 聚合酶、Trans2K Plus II DNA Marker, 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; 氨苄青霉素、卡那霉素, 北京普博欣生物科技有限公

司;甘油、乙酸乙酯、盐酸、磷酸盐缓冲液(PBS)等试剂,国药集团化学试剂有限公司;酵母粉、胰蛋白胨,赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

PCR 仪, Eppendorf 公司;高效液相色谱分析仪、反向 C18 色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm), 安捷伦科技(中国)有限公司。

1.1.3 培养基和培养条件

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0, pH 7.5。LB 蔗糖固体培养基另加入蔗糖 150.0 g/L。

KMB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 20.0, K₂HPO₄ 0.5, MgSO₄ 0.7, 甘油 15 mL/L。

抗生素: 卡那霉素(Kan)浓度为 50 mg/L, 氨苄青霉素(Amp)浓度为 100 mg/L, 四环素(Tc)浓度为 15 mg/L (绿针假单胞菌培养基中四环素浓度为 30 mg/L)。

液体培养: 将液体培养基分装于 100 mL 三角烧瓶中, 每瓶装 60 mL 培养基。大肠杆菌、绿针假单胞菌分别于 37 °C、28 °C 培养, 转速为 200 r/min。

1.2 实验方法

1.2.1 基因缺失突变株的构建

利用同源重组的方法构建基因缺失菌株^[12], 流程见图 1。根据 HT66 基因组数据库(<http://www.pseudomonas.com/>) BLAST 比对 *suhB* 基因序列, 根据 *suhB* 基因的上、下游序列, 设计基因敲除引物 *suhB*-F1、*suhB*-R1、*suhB*-F2 及 *suhB*-R2。以 HT66 基因组为模板 PCR 扩增获得 *suhB* 基因的上、下游同源臂序列。PCR 反应体系(50 μL): 2×Prime STAR Max DNA Polymerase 25 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 1.5 μL, HT66 基因组(100 ng) 0.5 μL, ddH₂O 21.5 μL。PCR 反应条件: 98 °C 2 min; 98 °C 20 s, 60.7 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 7 min。将获得的上、下游同源臂 PCR 产物纯化, 并用 In-fusion 同源重组酶将片段连接到 *EcoR* I/*Bam*H I 酶切后的 pK18*mobsacB* 载体上, 转化 *E. coli* DH5α 细胞。目的片段测序正确后, 提取重组质粒 pK18-*suhB*, 转化 *E. coli* S17-1(λpir)细胞。其中基因组 DNA 的提取、质粒提取、凝胶回收纯化等均按试剂盒说明书操作。

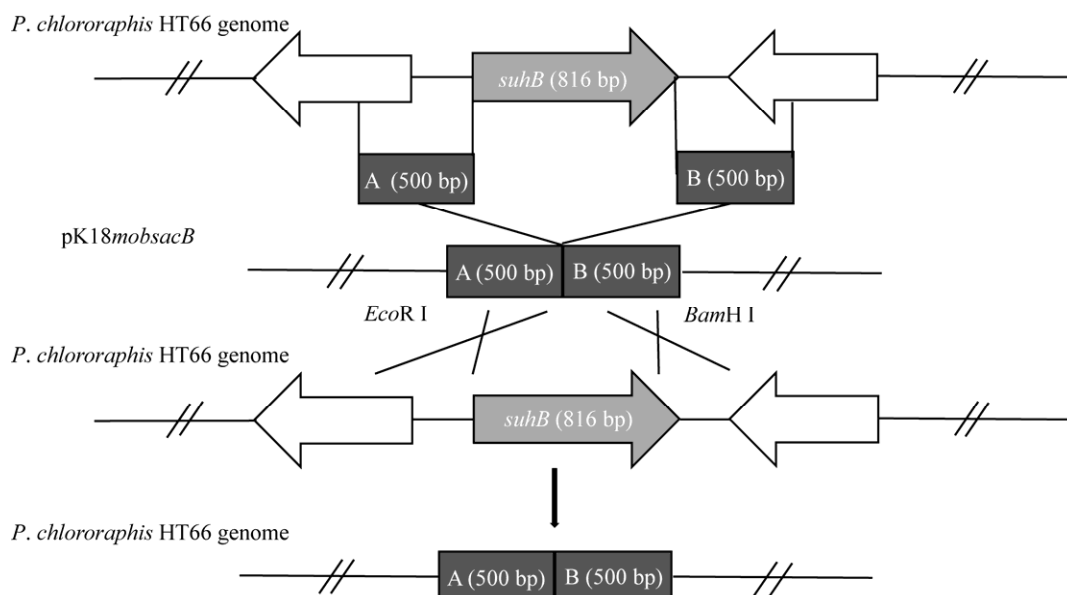


图 1 HT66Δ*suhB* 突变株构建图谱

Figure 1 Construction map of HT66Δ*suhB* mutant

将携带质粒 pK18-*suhB* 的 *E. coli* S17-1(λ pir)和 *P. chlororaphis* HT66 在 LB 固体培养基上混合培养(28 °C, 24–36 h), 5 000 r/min 离心 3 min 收集菌体, 涂布至含 Kan、Amp 的双抗培养基平板上, 挑取单交换菌落, 稀释后涂布于含 15% (质量分数)蔗糖的 LB 平板上, 诱导发生双交换。随后, 将获得的单克隆菌落分别影印在 LB 和含 Kan 的 LB 平板上, 选取仅能在 LB 平板中生长的双交换菌株进行 PCR 验证和测序, 最终获得缺失 *suhB* 的 HT66 突变菌株。

1.2.2 基因回补菌株的构建

根据 *suhB* 基因序列设计引物 *suhB*-pBBR-F 和 *suhB*-pBBR-R, 构建回补质粒。以 HT66 基因组为模板 PCR 扩增获得含 *suhB* 基因的开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)和上游的核糖体结合位点及启动子序列, PCR 体系和反应条件同 1.2.1。PCR 产物回收纯化后, 通过 In-Fusion 同源重组酶将片段连接到酶切后的 pBBR1MCS2 载体上, 转化 *E. coli* DH5 α 细胞。目的片段测序正确后, 提取重组质粒 pBBR-*suhB*, 转化绿针假单胞菌 HT66 细胞获得 *suhB* 质粒回补菌株。与此同时, 以 HT66 野生型细胞中转入空载体作为对照组。

1.2.3 生长曲线和 PCN 产量测定

每 12 h 取 1 mL 发酵菌液于 1.5 mL EP 管中, 12 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清, 用等体积 ddH₂O 重悬。适当稀释, 使 OD_{600} 数值介于 0.2–0.8 之间。以 ddH₂O 作空白对照, 利用紫外分光光度计测定 OD_{600} 值。以发酵时长为横坐标、以 OD_{600} 值为纵坐标绘制菌株生长曲线, 并根据 OD_{600} 与菌体干重(Dry Cell Weight, DCW)的标准曲线计算菌体浓度(1 OD_{600} =0.413 DCW)(g/L)。

采用高效液相色谱(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)检测 PCN 产量, 色谱柱为安捷伦反向 C18 色谱柱(4.6 mm \times 150 mm, 5 μ m), 待测样品的制备方法和 HPLC 分析检测条件参考文献[13]。PCN 的保留时间为 17.3 min, 根据峰面积和 PCN 浓度制作标准曲线方程($y=0.010\ 15x-3.610\ 98$, $R^2=0.999\ 05$; y 为产物浓度, 单位为 mg/L; x 为峰面

积, 单位为 mAu)。

1.2.4 群集运动分析

配制运动性检测平板, 按照 Rashid 等^[14]的方法进行实验。待检测的菌株在 LB 液体培养基中培养过夜, 培养条件参见 1.1.3, 将菌液稀释至 OD_{600} 为 0.1, 吸取 2 μ L 菌液点在检测平板中央, 28 °C 静置培养并观察运动情况。

1.2.5 生物膜测定

参照 O'Toole 等^[15]的孔板实验法测定菌株生物膜。取活化后培养 12 h 的菌液, 稀释至 OD_{600} 为 0.1, 接种于 24 孔板。每株设置 3 个平行, 28 °C 静置培养 48 h 吸去菌液, 加入结晶紫溶液染色, 0.01 mol/L PBS 缓冲液洗去多余染液后, 用乙醇脱色并用酶标仪检测脱色液 OD_{600} 值。

1.2.6 *lacZ* 融合报告质粒的构建

以 pBBR1MCS2 为载体构建 *phzR* 和 *phzI* 翻译水平的 *lacZ* 融合报告质粒 pBBR-*phzI*-*lacZ* 和 pBBR-*phzR*-*lacZ*。首先, 以 HT66 基因组为模板, 利用引物对 *phzI*'-F/*phzI*'-R 和 *phzR*'-F/*phzR*'-R, 分别 PCR 扩增获得包含 *phzI* 基因上游部分非编码区序列(368 bp)和 *phzI* 基因的前 6 个密码子的 DNA 片段, 以及 *phzR* 基因上游部分非编码区序列(442 bp)和 *phzR* 基因的前 6 个密码子的 DNA 片段。然后用 In-Fusion 同源重组酶将纯化后的 2 个片段分别连接到 *EcoR* I/*Pst* I 双酶切后的 pME6015 载体上, 转化 *E. coli* DH5 α 细胞。测序正确后, 提取重组质粒 p6015-*phzI* 和 p6015-*phzR* 并以其为模板, 以 *lacZ*-F/*lacZ*-F 为引物, PCR 扩增获得 *phzI*-*lacZ* (*phzI* 与 *lacZ* 基因的融合片段)和 *phzR*-*lacZ* (*phzR* 与 *lacZ* 基因的融合片段)。通过 In-Fusion 同源重组酶将纯化后的 2 个片段分别连接到 *Nsi* I/*Xba* I 双酶切后的 pBBR1MCS2 载体上, 转化 *E. coli* DH5 α 细胞。测序正确后, 提取得到重组质粒 pBBR-*phzI*-*lacZ* 和 pBBR-*phzR*-*lacZ* (图 2A、2B)。

以 pBBR1MCS2 为载体构建 *phzA* 转录水平的 *lacZ* 融合报告质粒 pBBR-*phzAp*-*lacZ*, 具体方法与上述类似。pBBR-*phzAp*-*lacZ* 包含 *phzA* 转录起始位点到其上游 324 bp 的核苷酸序列及来源于 pME6522 的 *lacZ* 基因(图 2C)。

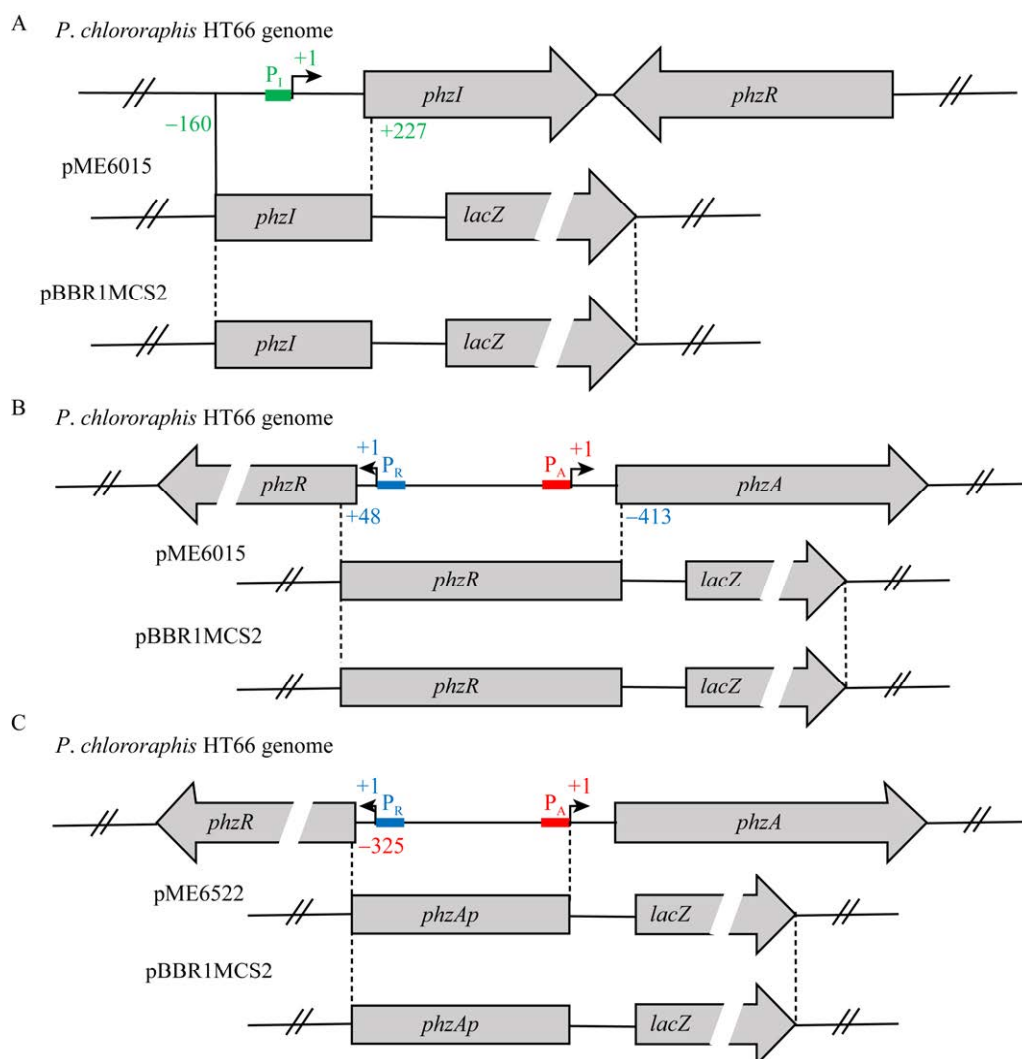


图2 *lacZ* 融合报告质粒构建图谱

Figure 2 Construction map of *lacZ* fusion reporter plasmid

注: A: pBBR-*phzI*-*lacZ* 报告质粒的构建; B: pBBR-*phzR*-*lacZ* 报告质粒的构建; C: pBBR-*phzAp*-*lacZ* 报告质粒的构建

Note: A: Construction of pBBR-*phzI*-*lacZ* reporter plasmid; B: Construction of pBBR-*phzR*-*lacZ* reporter plasmid; C: Construction of pBBR-*phzAp*-*lacZ* reporter plasmid

1.2.7 β -半乳糖苷酶活性测定

β -半乳糖苷酶活性测定采用 Miller 方法, 具体操作参考文献[16]。其中每个样品设置 3 个平行, 而且实验独立重复 3 次以上。

2 结果与分析

2.1 HT66 Δ *suhB* 突变菌株的构建

为探究 *suhB* 基因对菌株 HT66 生物学功能的影响, 构建 *suhB* 缺失菌株 HT66 Δ *suhB*。根据 *suhB* 基因的上、下游序列设计引物 *suhB*-F1、

suhB-R1、*suhB*-F2、*suhB*-R2, 敲除 *suhB* 基因片段长度为 816 bp, 其中, 设计同源臂融合片段长度为 1 000 bp。

对获得的突变株进行 PCR 验证, 分别以野生型菌株和突变株为模板, 将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳分析。以野生型菌株为模板, 扩增条带大小为 1 816 bp; 而以突变株为模板, 扩增条带大小为 1 000 bp, 证明突变株中缺失了 *suhB* 基因(图 3A)。

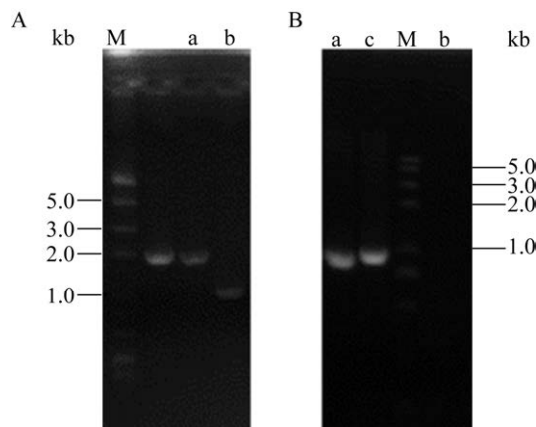


图3 HT66菌株中 *suhB* 基因的敲除和回补的PCR验证
Figure 3 PCR confirmation of the *suhB* deletion and complemented in HT66 strain

注: M: *Trans2K Plus II* DNA Marker; a: 野生株 HT66; b: *suhB* 敲除株 HT66Δ*suhB*; c: *suhB* 回补菌株 HT66Δ*suhB*-pBBR-*suhB*
Note: M: *Trans2K Plus II* DNA Marker; a: Wild-type HT66; b: *suhB* deletion mutant HT66Δ*suhB*; c: *suhB* complemented mutant HT66Δ*suhB*-pBBR-*suhB*

2.2 *suhB* 回补菌株的构建

BLAST 比对 *suhB* 基因序列, 设计一对引物 *suhB*-pBBR-F/*suhB*-pBBR-R 构建回补质粒, 对获得的突变株进行 PCR 验证。分别以野生型菌株、*suhB* 敲除菌株及 *suhB* 回补菌株为模板, 将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳分析。其中回补菌株 PCR 结果与野生型菌株条带相同, 扩增获得长度为 816 bp 的 *suhB* 片段(图 3B), 样品测序正确, 表明突变株成功回补了 *suhB* 基因。

2.3 *suhB* 缺失对 HT66 菌株生物学功能的影响

在 KMB 培养基中培养野生型 HT66、基因缺失型 HT66Δ*suhB* 和回补型 HT66Δ*suhB*-pBBR-*suhB* 菌株, 每 12 h 取样, 测定细胞生长曲线(图 4)。在 28 °C、200 r/min 的培养条件下, 缺失 *suhB* 基因的菌株生长缓慢, 而且稳定期最大生物量减少为野生型的 61.6%, 回补 *suhB* 基因后菌株恢复生长表型, 与野生型无显著性差异, 表明 *suhB* 基因缺失后抑制 HT66 菌株的生长, 推测 *suhB* 与细胞生长代谢相关。取 36、48、60 h 的发酵液, 进行 HPLC 分析和测定 PCN 产量。图 5 结果表明, 基因缺失型

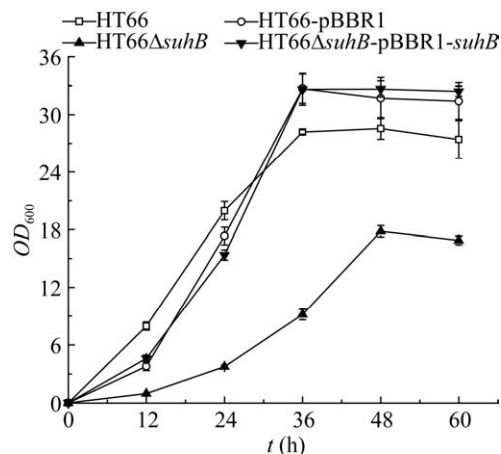


图4 *suhB* 基因敲除和回补对 HT66 菌株生长的影响
Figure 4 Effects of *suhB* gene's deletion and complemented on the growth in HT66 strain

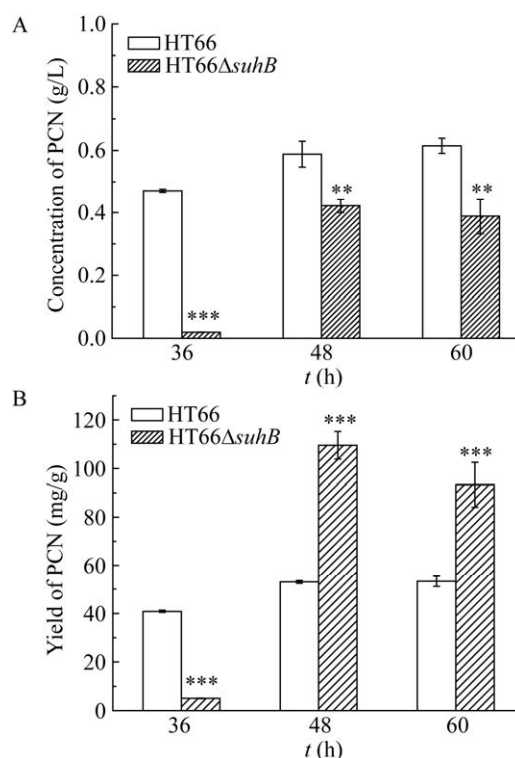


图5 *suhB* 基因敲除对 HT66 菌株 PCN 合成的影响
Figure 5 Effects of *suhB* gene's deletion on the yield of PCN in HT66 strain

注: 所有数据均代表 3 次独立实验。数据表示为均值±SEM (n=3), 误差棒为标准差。与野生型相比, **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$

Note: All the data represent three independent experiments, and data are presented as mean±SEM (n=3). Compared with wild type, **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$

HT66 Δ *suhB* 菌株的 PCN 产量为野生型的 71.8%，但分析其单位细胞 PCN 产量在 48 h 达到最大值 109.5 mg/g，为野生株的 2.1 倍。

为考察 *suhB* 基因的缺失对 HT66 菌株生物膜形成的影响，将野生型和 *suhB* 敲除突变株接种于 24 孔培养板中，培养至 48 h 测定 OD_{600} 值。图 6 结果表明，敲除 *suhB* 基因后 HT66 菌株的生物膜形成量增加，为野生型的 1.8 倍，而 *suhB* 基因的回补菌株则与野生型无明显差异，说明 *suhB* 负调控 HT66 菌株生物膜的形成。

在运动性检测平板上测定 *suhB* 基因的缺失对 HT66 菌株群集运动的影响(图 7)。野生型菌株的运动半径为 21 mm，而缺失型菌株的运动半径缩减至 9.7 mm，群集运动能力明显下降；回补 *suhB* 基因后回补株的生物膜恢复至野生型状态，推测 *suhB* 基因正调控 HT66 菌株鞭毛的表达。

2.4 *SuhB* 对 PCN 合成的调控作用

在假单胞菌中，吩嗪合成基因簇 *phzABCDEFG* 分别编码催化合成吩嗪化合物的功能酶。在

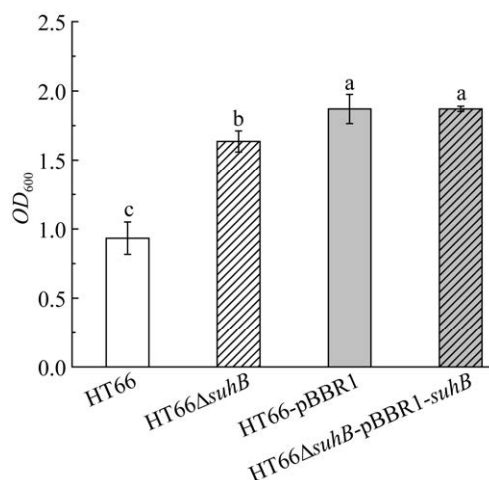


图 6 *suhB* 基因敲除对 HT66 菌株生物膜形成的影响
Figure 6 Effects of *suhB* gene's deletion on the biofilm formation of HT66 strain

注：所有数据均代表 3 次独立实验。数据表示为均值 \pm SEM ($n=3$)，误差棒为标准差。误差棒上的字母代表方差分析和多重比较的显著性差异($P<0.05$)

Note: All the data represent three independent experiments. The data are presented as mean \pm SEM ($n=3$), and bars represent standard errors. Different letters above the bars indicate significant differences based on the basis of on the variance analysis (ANOVA), followed by the Duncan test ($P<0.05$)

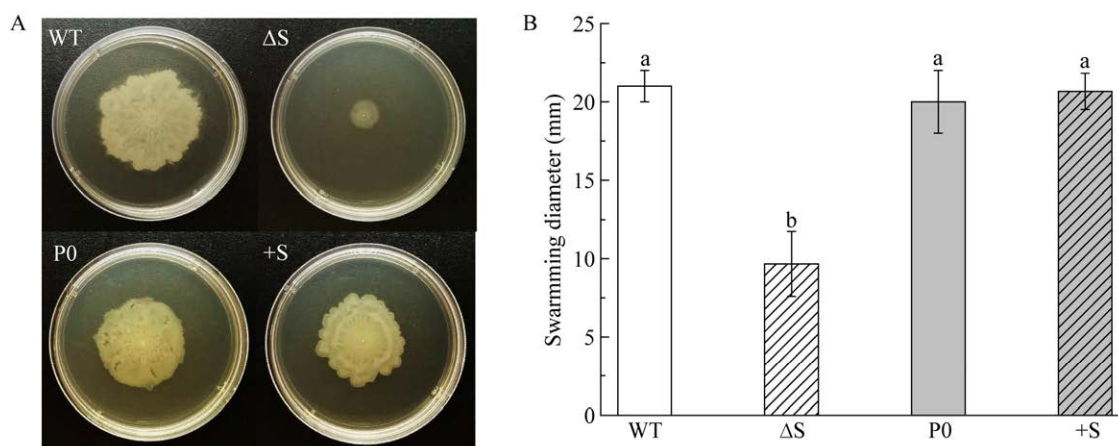


图 7 *suhB* 基因敲除对 HT66 菌株群集运动的影响($P<0.05$)

Figure 7 Effects of *suhB* gene's deletion and complemented on the swarming motility of HT66 strain ($P<0.05$)

注：A：菌株在平板上的运动能力；B：菌株运动直径的测量；WT：野生株 HT66； Δ S：*suhB* 敲除株 HT66 Δ *suhB*；P0：含空载体 HT66 菌株 HT66-pBBR1；+S：*suhB* 回补菌株 HT66 Δ *suhB*-pBBR-*suhB*。所有数据均代表 3 次独立实验。数据表示为均值 \pm SEM ($n=3$)，误差棒为标准差。误差棒上的字母代表方差分析和多重比较的显著性差异($P<0.05$)

Note: A: The motility of the strain on the tablet; B: Measurement of bacterial movement diameter; WT: Wild type HT66; Δ S: *suhB* deletion mutant HT66 Δ *suhB*; P0: HT66-pBBR1; +S: *suhB* complemented mutant HT66 Δ *suhB*-pBBR-*suhB*. All the data represent three independent experiments. The data are presented as mean \pm SEM ($n=3$), and bars represent standard errors. Different letters above the bars indicate significant differences based on the basis of on the variance analysis (ANOVA), followed by the Duncan test ($P<0.05$)

Pseudomonas chlororaphis PCL 1391、*Pseudomonas chlororaphis* 30-84 及 *Pseudomonas fluorescens* 2-79 中, *phz* 操纵子上游存在 2 个吩嗪合成必需基因 *phzI/R*^[17]。在 *P. chlororaphis* HT66 中, 吩嗪的生物合成基因簇 *phzABCDEFG* 的转录需要转录激活蛋白 PhzR 结合 PhzI 合成的 AHL 类信号分子才能被激活^[18]。

为了探究 *SuhB* 对 PCN 合成相关基因表达的调控作用, 先后构建了 *phzR* 和 *phzI* 翻译水平的 *lacZ* 融合报告质粒 pBBR-*phzI-lacZ* 和 pBBR-*phzR-lacZ*。将构建好的 2 个 *lacZ* 融合报告质粒转化野生型 HT66 和突变株 HT66Δ*suhB*, 进行 β-半乳糖苷酶活性检测(图 8A)。敲除 *suhB* 基因后, *phzI* 的表达量变化不大, 22 h 的表达量降低了 11%; 图 8B 数据显示, 突变株 HT66Δ*suhB* 中 *phzR* 的表达量显著上升, 为野生型的 3.1 倍。实验结果表明, *SuhB* 在翻译水平上对 *phzI* 表达的影响不显著, 而负调控 *phzR* 的表达, 与 PCN 产量数据结果相符。

为了进一步研究 *SuhB* 对 *phzABCDEFG* 的转录调控, 构建了 *phzA* 转录水平的 *lacZ* 融合报告质粒 pBBR-*phzAp-lacZ*。pBBR-*phzAp-lacZ* 包含 *phzA* 转录起始位点到其上游 322 bp 的核苷酸序列及来源于 pME6522 质粒的 *lacZ* 基因序列。按上述方法检测酶活, 结果如图 8C 所示。缺失 *suhB* 基因时, *phzA* 转录水平的表达量为野生型的 1.8 倍。综合上述结果分析, 在绿针假单胞菌 HT66 中, *SuhB* 可以通过调控 *phzR* 的表达进而影响 *phzABCDEFG* 的转录。

3 讨论与结论

PGPR 因其能够分泌抗生素或诱导系统抗性阻遏病原菌生长而被广泛应用于植物病害生物防治领域^[4], *P. chlororaphis* HT66 是一株可高效合成 PCN 的 PGPR, 可开发作为生物防治剂或生物肥料应用于农业生产。

本研究成功构建了 *suhB* 基因缺失型菌株

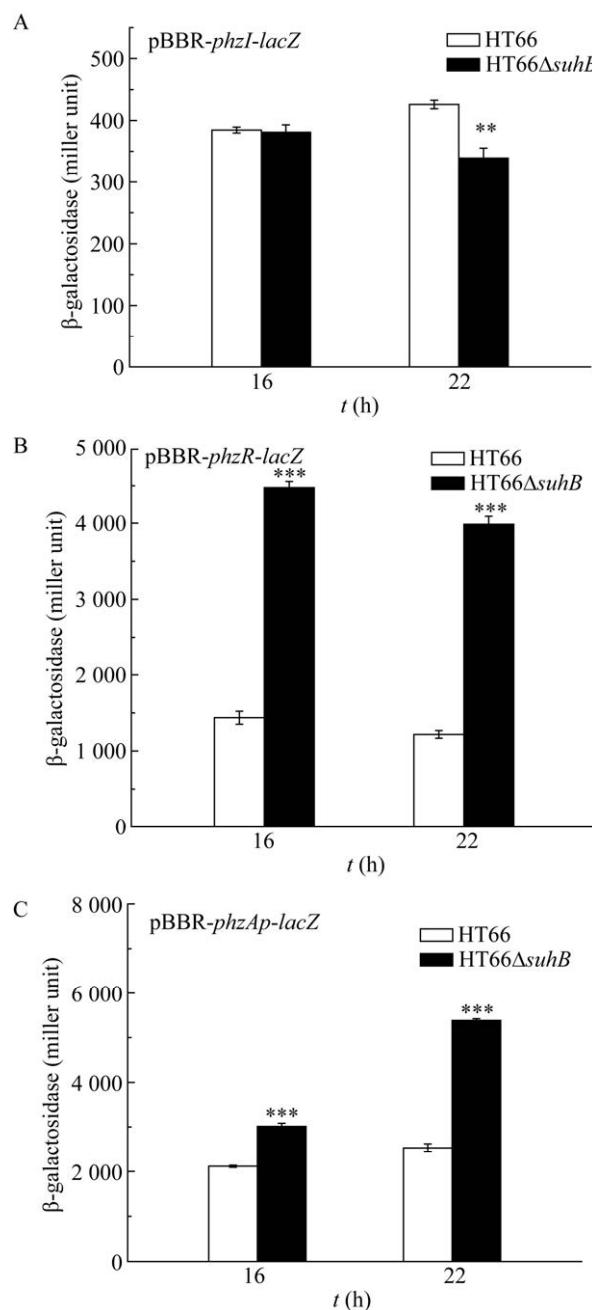


图 8 *SuhB* 对菌株 HT66 中 PCN 合成相关基因表达的调控作用

Figure 8 Effects of *SuhB* on expression of the PCN biosynthetic operon in HT66 strain

注: 所有数据均代表 3 次独立实验。数据表示为均值±SEM ($n=3$), 误差棒为标准差。与野生型相比, **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$

Note: All the data represent three independent experiments, and data are presented as mean±SEM ($n=3$). Compared with wild type, **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$

HT66 Δ *suhB* 和回补型菌株 HT66 Δ *suhB*-pBBR-*suhB*, 探究了 *suhB* 基因对 *P. chlororaphis* HT66 生防能力的影响。研究发现, 缺失 *suhB* 基因后, 突变菌株生长缓慢, 平台期滞后, 与报道的在 *E. coli*、*Pseudomonas aeruginosa* 中 *suhB* 及其同系物的突变株呈现的不生长或生长缓慢的结果相似^[19-20]。HT66 Δ *suhB* 突变菌株单位细胞的 PCN 产量为野生株的 2.1 倍, 但其生长受到明显抑制, 而且 PCN 达到最高产量的时间滞后了 12 h, 其是否能在根际土壤中竞争存活并发挥生防功能需进一步研究。

除分泌抗生素外, 能否在植物根系的局部或整个表面有效成膜定殖, 对于 PGPR 能否发挥促生和生防作用至关重要^[21], 而细菌在植物根表的定殖则与其运动趋化性能相关^[22]。突变菌株 HT66 Δ *suhB* 的生物膜形成量显著增加, 有利于其发挥生防功能; 但群集运动性下降, 这种运动缺陷可能是由于突变菌株中鞭毛基因表达减少或鞭毛功能失效所致^[20]。不过, 有报道 *P. aeruginosa* 中运动性的缺陷可能促进形成结构更为稳定的生物膜^[23]。因此, 对于突变菌株 HT66 Δ *suhB* 是否能够有效定殖于植物根系, 有待进一步阐明。

此外, 为了进一步探究 *suhB* 对 PCN 合成的调控机制, 构建了 *phzR* 和 *phzI* 翻译水平的 LacZ 融合报告质粒, 检测 *SuhB* 对 PCN 合成的群体感应调控基因 *phzR* 和 *phzI* 表达量的影响。结果表明, 在绿针假单胞菌 HT66 中, *SuhB* 在翻译水平上对 *phzI* 表达的影响不显著, 但负调控 *phzR* 的表达, *SuhB* 蛋白可以通过调控 *phzR* 的表达而影响 *phzABCDEFG* 的转录。*GacA/GacS* 是吩嗪类化合物产生菌的必需二元调控系统^[24], 研究报道 *P. aeruginosa* 中 *SuhB* 参与 *GacA/GacS* 系统对菌株生物膜形成和运动性的调节过程^[11], 其对吩嗪的调控是否也与 *GacA/GacS* 系统相关, 有待后续进一步研究。

本文初步探究了绿针假单胞菌 HT66 中 *suhB* 基因的功能, 丰富了非编码小 RNA *SuhB* 的功能认

知, 发现其参与了绿针假单胞菌 HT66 复杂的代谢调控, 对进一步深入了解绿针假单胞菌 HT66 的生防功能具有重要作用。与此同时, PCN 在生物农药领域具有巨大的研究价值和应用前景, 本研究也为后续 PCN 的合成调控改造和应用开发提供了理论基础。

REFERENCES

- [1] Bhattacharyya PN, Jha DK. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, 28(4): 1327-1350
- [2] Emami S, Alikhani HA, Pourbabaei AA, Etesami H, Sarmadian F, Motessharezadeh B. Effect of rhizospheric and endophytic bacteria with multiple plant growth promoting traits on wheat growth[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2019, 26(19): 19804-19813
- [3] del Rosario Cappellari L, Santoro MV, Schmidt A, Gershenzon J, Banchio E. Induction of essential oil production in *Mentha x piperita* by plant growth promoting bacteria was correlated with an increase in jasmonate and salicylate levels and a higher density of glandular trichomes[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2019, 141: 142-153
- [4] Goswami M, Deka S. Plant growth-promoting rhizobacteria — alleviators of abiotic stresses in soil: a review[J]. Pedosphere, 2020, 30(1): 40-61
- [5] Silby MW, Winstanley C, Godfrey SAC, Levy SB, Jackson RW. *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2011, 35(4): 652-680
- [6] Chen YW, Shen XM, Peng HS, Hu HB, Wang W, Zhang XH. Comparative genomic analysis and phenazine production of *Pseudomonas chlororaphis*, a plant growth-promoting rhizobacterium[J]. Genomics Data, 2015, 4: 33-42
- [7] Tupe SG, Kulkarni RR, Shirazi F, Sant DG, Joshi SP, Deshpande MV. Possible mechanism of antifungal phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas* sp. against dimorphic fungi *Benjaminiella poitrasii* and human pathogen *Candida albicans*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2015, 118(1): 39-48
- [8] Wang SW, Fu C, Bilal M, Hu HB, Wang W, Zhang XH. Enhanced biosynthesis of arbutin by engineering shikimate pathway in *Pseudomonas chlororaphis* P3[J]. Microbial Cell Factories, 2018, 17: 174
- [9] Dudenhoefter BR, Schneider H, Schweimer K, Knauer SH. *SuhB* is an integral part of the ribosomal antitermination complex and interacts with NusA[J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47(12): 6504-6518
- [10] Huang YH, Said N, Loll B, Wahl MC. Structural basis for the function of *SuhB* as a transcription factor in ribosomal

- RNA synthesis[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(12): 6488-6503
- [11] Li KW, Yang GJ, Debru AB, Li PP, Zong L, Li PZ, Xu T, Wu WH, Jin SG, Bao QY. SuhB regulates the motile-sessile switch in *Pseudomonas aeruginosa* through the Gac/Rsm pathway and c-di-GMP signaling[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1045
- [12] Du XL, Li YQ, Zhou WP, Zhou Q, Liu HM, Xu YQ. Phenazine-1-carboxylic acid production in a chromosomally non-scar triple-deleted mutant *Pseudomonas aeruginosa* using statistical experimental designs to optimize yield[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(17): 7767-7778
- [13] Peng HS, Tan J, Bilal M, Wang W, Hu HB, Zhang XH. Enhanced biosynthesis of phenazine-1-carboxamide by *Pseudomonas chlororaphis* strains using statistical experimental designs[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2018, 34(9): 129
- [14] Rashid MH, Kornberg A. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(9): 4885-4890
- [15] O'Toole GA, Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development[J]. *Molecular Microbiology*, 1998, 30(2): 295-304
- [16] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*[M]. Jin DY, Li MF, trans. 2nd ed. Beijing: Science Press, 1992 (in Chinese)
萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 2 版. 北京: 科学出版社, 1992
- [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] Peng HS, Ouyang Y, Bilal M, Wang W, Hu HB, Zhang XH. Identification, synthesis and regulatory function of the *N*-acylated homoserine lactone signals produced by *Pseudomonas chlororaphis* HT66[J]. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17(1): 9
- [19] Singh N, Bubunenko M, Smith C, Abbott DM, Stringer AM, Shi R, Court DL, Wade JT. SuhB associates with Nus factors to facilitate 30S ribosome biogenesis in *Escherichia coli*[J]. *mBio*, 2016, 7(2): e00114-16
- [20] Li KW, Xu C, Jin YX, Sun ZY, Liu C, Shi J, Chen GK, Chen RH, Jin SG, Wu WH. SuhB is a regulator of multiple virulence genes and essential for pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *mBio*, 2013, 4(6): e00419-13
- [21] Xu ZH, Zhang RF, Wang DD, Qiu MH, Feng HC, Zhang N, Shen QR. Enhanced control of cucumber wilt disease by *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 by altering the regulation of its DegU phosphorylation[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(9): 2941-2950
- [22] Lawrence JR, Delaquis PJ, Korber DR, Caldwell DE. Behavior of *Pseudomonas fluorescens* within the hydrodynamic boundary layers of surface microenvironments[J]. *Microbial Ecology*, 1987, 14(1): 1-14
- [23] Shrout JD, Chopp DL, Just CL, Hentzer M, Givskov M, Parsek MR. The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional[J]. *Molecular Microbiology*, 2006, 62(5): 1264-1277
- [24] Heeb S, Haas D. Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other gram-negative bacteria[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2001, 14(12): 1351-1363