

# 桃褐腐病生防细菌 FD6 硝吡咯菌素合成基因簇的克隆及 *prnA* 功能分析

张清霞<sup>1,\*</sup>, 何玲玲<sup>1</sup>, 单海焕<sup>1</sup>, 童蕴慧<sup>1</sup>, 陈夕军<sup>1</sup>, 纪兆林<sup>1</sup>, 刘凤权<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>扬州大学园艺与植物保护学院, 江苏扬州 225009; <sup>2</sup>江苏省农业科学院植物保护研究所, 南京 210014)

**摘要:** 荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) FD6 分离自福建闽侯青口青菜根围土壤, 采用凹玻片法和离体果实接种法测定菌株 FD6 对桃褐腐病菌 (*Monilinia fructicola*) 的抑制能力。PCR 法克隆硝吡咯菌素合成基因簇结构基因 (*prn*), 利用同源重组构建 *prnA* 缺失突变体并分析其功能。结果表明, 菌株 FD6 处理桃后可完全抑制桃褐腐病发生; 细菌悬浮液对褐腐病菌分生孢子的萌发抑制率达 93.18%, 细菌培养滤液的抑制率为 69.36%; 细菌悬浮液对黄瓜根结线虫也具有较强的致死作用。序列分析表明荧光假单胞菌 FD6 硝吡咯菌素合成基因簇全长为 5 868 bp, 内含 4 个开放阅读框 *prnA*、*prnB*、*prnC* 和 *prnD*, 这 4 个基因组成 1 个共转录单元。系统发育进化树显示菌株 FD6 与 *P. protegens* CHA0、Pf-5 的 *prn* 基因相似性达 94%。利用遗传学方法证实 *prnA* 基因是硝吡咯菌素合成的必需因子, 此外该基因还影响 2,4-二乙酰基间苯三酚和藤黄绿脓菌素的合成。

**关键词:** 荧光假单胞菌; 桃褐腐病菌; 硝吡咯菌素; 基因克隆

**中图分类号:** S 662.1; S 436.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0513-353X (2016) 08-1473-09

## Cloning of Pyrrolnitrin Synthetic Gene Cluster *prn* and *prnA* Functional Analysis from Antagonistic Bacteria FD6 Against Peach Brown Rot

ZHANG Qing-xia<sup>1,\*</sup>, HE Ling-ling<sup>1</sup>, SHAN Hai-huan<sup>1</sup>, TONG Yun-hui<sup>1</sup>, CHEN Xi-jun<sup>1</sup>, JI Zhao-lin<sup>1</sup>, and LIU Feng-quan<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>College of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China; <sup>2</sup>Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** *Pseudomonas fluorescens* FD6 was isolated from the canola rhizosphere in Fujian. To define the inhibit ability of the strain FD6 to *Monilinia fructicola*, the causal agent of peach brown rot was detected using microscope concave slides method and on detached peach fruits. The pyrrolnitrin biosynthetic gene cluster was cloned using PCR amplification, and a *prnA*-deletion mutant was generated by homologous recombinant to identify its function. The results showed that strain FD6 could control completely brown rot on peach fruits. The bacterial culture of strain FD6 inhibited the spores of *M. fructicola* germination significantly by 93.18%, whereas the cultural filtrate of the strain FD6 only showed a lower inhibition to *M. fructicola* by 69.36%. The bacterium culture showed that high nematicidal activity

**收稿日期:** 2016-03-28; **修回日期:** 2016-08-04

**基金项目:** 江苏省重点研发计划 (现代农业) 重点项目 (BE2015354); 江苏省农业科技自主创新基金项目 [CX (15) 1037]; 国家自然科学基金项目 (C140601-31000875)

\* E-mail: zqx817@sohu.com

to *Meloidogyne incognita*. The obtained 5 868 bp *prn* contained four genes *prnA*, *prnB*, *prnC* and *prnD* organized in a single transcript unit. The phylogenetic analysis indicated that *prn* of strain FD6 identified with that of *P. protegens* CHA0 and Pf-5 by 94%. *prnA* was required for PRN synthesis in *P. fluorescens* FD6, and involved in the biosynthesis of 2,4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin as well.

**Key words:** *Pseudomonas fluorescens*; *Monilinia fructicola*; pyrrolnitrin; gene clone

中国是世界上主要的桃产区,产量占世界桃总产量的43%,褐腐病是桃生产上最主要的病害之一(Hu et al., 2011)。目前防治桃褐腐病的主要方法仍是使用化学药剂,并辅以合理的农业措施。传统杀菌剂防治易引起病菌产生抗药性,并影响产品安全性(尹良芬等, 2010),因此利用有益微生物控制该病害具有重要意义。假单胞菌可产生多种生防相关的次生代谢产物,如抗生素、氢氰酸、嗜铁素和蛋白酶等。抗生素的产生被认为是其主要的生防机制之一(Haas & Keel, 2003)。硝吡咯菌素是一种氯化苯基吡咯类抗生素,在吡咯伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia pyrrocinia*)中首次分离(Arima et al., 1964),后来发现假单胞菌属(*Pseudomonas*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、粘球菌(*Myxococcus*)和沙雷氏菌属(*Serratia*)等的细菌也可产生这种抗生素(Chernin et al., 1996; Schmidt et al., 2009)。该抗生素抑菌谱广,可防治多种病原真菌引起的土传、气传病害,尤其对立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)和灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)的抑菌效果好,还可以抑制链霉菌(*Streptomyces* sp.)气生菌丝和孢子的形成(Chernin et al., 1996; El-Banna & Winkelmann, 1998)。近年来,已衍生出许多新型苯基吡咯类农业杀菌剂,如咯菌腈及拌种咯,并在生产实践中卓有成效(Wang et al., 2009)。

荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*) FD6 分离自福建闽侯青口青菜(*Brassica chinensis*)根围土壤,抑菌谱广,对多种植物病原真菌都有抑制作用。前期研究结果表明该菌株能产生多种抗菌物质,其中抗生素硝吡咯菌素(Pyrrolnitrin, PRN)、2,4-二乙酰基间苯三酚(2,4-diacetylphloroglucinol, PHL)及藤黄绿脓菌素(Pyoluteorin, PLT)是主要抗菌物质,其合成受到 GacS/GacA 双因子系统的 *gacS* 基因的正调控(常琳等, 2014),感应激酶 RetS (Zhang et al., 2015) 的负调控。

本研究中首先测定菌株 FD6 对桃褐腐病菌和黄瓜根结线虫的抑制能力,通过 PCR 方法克隆菌株 FD6 中硝吡咯菌素合成基因簇,利用基因缺失、互补回复突变分析基因功能,为进一步解析 PRN 在生防细菌 FD6 防治褐腐病中的作用机制提供参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料及菌株培养条件

2012年7月5日至8月15日在江苏无锡阳山镇水蜜桃种植基地采摘‘柳条白凤’水蜜桃,用于桃褐腐病防病试验。

2014年8月20日采自内蒙赤峰市松山区当铺地设施蔬菜园区‘津研11’黄瓜用于根结线虫卵的分离。

本试验所用菌株和质粒见表1。荧光假单胞菌 FD6 菌株在 LB 培养基中 28 °C 培养 36 ~ 48 h,大肠杆菌 37 °C 培养 12 ~ 16 h。所用抗生素浓度分别为:氨苄青霉素 50  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,卡那霉素 50  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,四环素 20  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ )、30  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (荧光假单胞菌 *P.*

*fluorescens*)。

表 1 本研究中的菌株、质粒和引物

Table 1 Strains, plasmids and primers used in this study

菌株、质粒和引物 Strains, plasmids or primers	特征 Characteristics	来源 Source
菌株 Strain		
荧光假单胞菌 <i>P. fluorescens</i>		
FD6	wild type, Prn <sup>+</sup> , Ap <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> ,	常琳 等, 2011
ΔprnA	Derivative of FD6, <i>prnA</i> in-frame deletion, Ap <sup>r</sup>	本研究 This study
FD6-A	Ap <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup> , ΔprnA containing pME6032-P	本研究 This study
大肠杆菌 <i>E. coli</i> DH5α	<i>supE44ΔlacU169 (Φ80 lacZΔM15) hdsR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Hanahan, 1983
质粒 Plasmid		
pEX18Km	Suicide plasmid for <i>Pseudomonas</i> spp. used for homologous recombination, Km <sup>r</sup>	Shanks et al., 2009
pEX-ΔprnA	Km <sup>r</sup> , suicide plasmid pEX18Km carrying a deleted <i>prnA</i> gene	本研究 This study
pME6032	<i>lacI</i> q_Ptac expression vector, Tc <sup>r</sup>	Heeb et al., 2002
pME6032-P	pME6032 containing a 5.8 kb <i>Nco</i> I / <i>Bgl</i> II fragment of PRN ORF	本研究 This study
引物 Primer		
prnA1	GAATATCGTCATCGTGGGCGG	
prnA2	GTCGAACGACGTGGTGGTCAG	
prnA-F1	GCTCAACCAGATCAAGTTCC	
prn-3k 5pp	ACATATGCTTGGCGAAGT	
prnCF	CCACAAGCCCGCCAGGAGC	
prnDD	TCACGCATYACYGCTCAC	
RprnA1699	GGCCGACACTCGGGCGAAG	
RprnA175	GTGATGTTACCTGCTGTTG	
prnF1	TACGTGCATTACGCCAATGG	
prnA396	ATGGATCCAGACTCGATGAGCGTGATG	<i>Bam</i> H I
prnA883	ATGGATCCGCGGCTACATCTCTACCCTG	<i>Bam</i> H I
prnA1739	ATGAGCTCCTTCTCGATCGACTCCGGTC	<i>Sac</i> I
prn106	AACCATGGCCTTCCTCTATAGCCAACG	<i>Nco</i> I
prn5848	AAGGATCCTCACGCATTACTGCTCAC	<i>Bgl</i> II

注: 下划线表示限制性内切酶。

Note: Underline indicates the restriction enzyme.

## 1.2 对桃褐腐病菌的抑制作用试验

将桃褐腐病菌 (*M. fructicola*) 孢子用无菌水配成悬浮液 (孢子浓度为  $10^5$  个  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>), 分别取 FD6 悬浮液和褐腐病菌孢子悬浮液 20  $\mu$ L 置于凹玻片内混匀, 滤纸保湿并置于 25  $^{\circ}$ C 恒温培养箱内培养, 16 ~ 24 h 内观察孢子萌发情况, 计算孢子萌发抑制率。

将大小一致的成熟水蜜桃用清水洗净, 用酒精擦洗后晾干, 用灭菌打孔器在每个果实表面对称打孔 (直径 5 mm), 用灭菌刀片除去孔口表面果皮, 用移液器分别吸取 20  $\mu$ L FD6 菌液滴入孔口, 以接种等体积 LB 培养液为对照, 在无菌室晾干后在孔口处接种褐腐菌菌饼, 每处理接种 10 个果实, 置入铺有保湿纱布的塑料盒中, 用保鲜膜密封置于 25  $^{\circ}$ C (光周期为 12 h  $\cdot$  d<sup>-1</sup>) 培养, 4 d 后测量病斑直径。试验重复 2 次。

## 1.3 对黄瓜根结线虫二龄幼虫的抑制作用试验

从黄瓜根部挑取根结线虫新鲜卵块, 置于 28  $^{\circ}$ C 温箱中的蒸馏水中孵化, 24 h 后开始收集幼虫, 每天收集 1 次, 共收集 3 d。线虫液稀释为含二龄幼虫 (J2) 100 条  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>, 4  $^{\circ}$ C 保存备用 (付鹏 等, 2004)。

将过夜培养的 FD6 细菌悬浮液 1 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心 10 min 后, 用无菌水将沉淀溶解配成  $10^8$

CFU·mL<sup>-1</sup> 细菌悬液，再加入 0.3 mL 线虫液（内含约 30 条 J2），在 28 °C 恒温培养，分别在 2、6 和 12 h 观察线虫的死亡情况，记录死亡率。以无菌水作为对照（秦博 等，2008）。

#### 1.4 硝吡咯菌素合成基因簇的克隆及序列分析

根据 GenBank 中发布的硝吡咯菌素合成基因簇序列保守区，设计 4 对引物 *prnA1/prnA2*、*prnA-F/prn-3k* 5pp、*prnCF/prnDD* 和 *RprnA1699/RprnA175*（表 1），利用 PCR 法分段扩增。PCR 反应条件为：94 °C 变性 5 min；94 °C 变性 40 s，55 ~ 60 °C 复性 40 s，72 °C 延伸 1 ~ 3 min，循环 35 次；72 °C 延伸 10 min。

PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测符合预期片段大小，送交生工生物工程（上海）股份有限公司测序，并拼接序列。

#### 1.5 *prnA* 内缺失突变菌株及互补菌株的构建

菌株 FD6 的 *prnA* 内缺失突变菌株  $\Delta$ *prnA* 通过双交换同源重组的方法得到。分别利用引物 F1/*prnA396* 和 *prnA883/prnA1739*（表 1）扩增 *prnA* 基因上下两段侧翼序列，将得到的产物酶切后克隆到 pEX18Km 中，获得 *prnA* 基因内部缺失 465 bp 的自杀载体 pEX- $\Delta$ *prnA*（图 1）。利用电击转化将此自杀载体转入野生菌株 FD6 中，二次同源重组后获得 *prnA* 的内缺失突变株  $\Delta$ *prnA*。利用引物 F1 和 *prnA1739* 对野生菌及突变菌进行 PCR 验证。

为互补突变菌株  $\Delta$ *prnA*，利用引物 *prn106* 和 *prn5848*（表 1），以 FD6 基因组为模板，PCR 扩增到完整的硝吡咯合成基因簇并克隆到穿梭载体 pME6032 中，得到互补载体 pME6032-P（图 1），将其导入突变株  $\Delta$ *prnA* 后得到互补菌株 FD6-A。

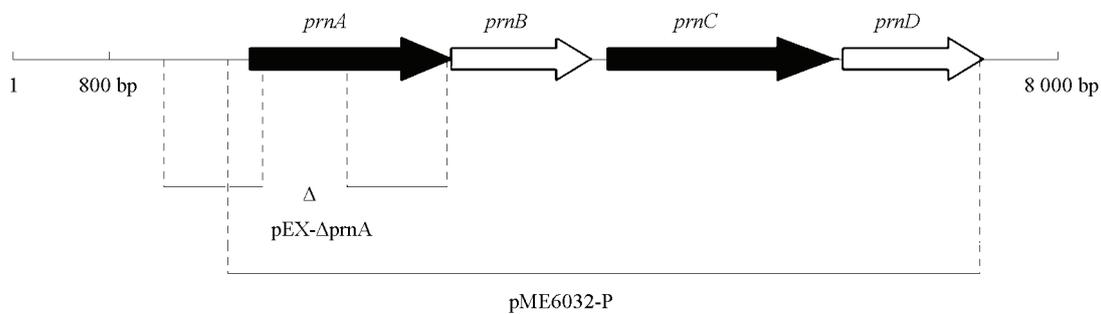


图 1 荧光假单胞菌 FD6 中 *prn* 合成基因簇结构示意图

箭头表示 FD6 基因组中基因位置与转录方向， $\Delta$  表示 *prnA* 基因缺失。

Fig. 1 Schematic diagram of the *prn* in *P. fluorescens* FD6

The single-headed arrows represent the location and orientation of the *prn* synthetic gene cluster in *P. fluorescens* FD6 chromosome.

$\Delta$  = region deleted in strain  $\Delta$ *prnA*.

#### 1.6 抗生素的定性与定量分析

抗生素提取、色谱分析方法参照 Zhang 等（2015）的报道。硝吡咯菌素标准品购自 Sigma 公司，2,4-二乙酰基间苯三酚和藤黄绿脓菌素标准品由中国农业大学张力群教授和上海交大张雪洪教授馈赠。

## 2 结果与分析

### 2.1 生防活性测定

果实接种试验表明, 接种桃褐腐病菌 4 d 后, 对照处理桃表面病菌扩展较快, 病斑直径可达 4.2 cm, 且可见大量聚集成团的白色菌丝, 而荧光假单胞菌 FD6 处理后, 病斑不扩展 (图 2), 说明 FD6 对桃褐腐病具有较好的防治效果。

孢子萌发试验的结果表明, 荧光假单胞菌 FD6 的悬浮液与无菌发酵液都能抑制褐腐病菌分生孢子萌发。以细菌悬浮液对分生孢子萌发的抑制能力较强, 抑制率达 93.18%, 而经过 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤后的无菌发酵液的抑制率显著降低, 为 69.36%。

此外, 荧光假单胞菌 FD6 悬浮液对黄瓜根结线虫具有较强的致死作用。由表 2 可见, 随着处理时间增加, FD6 菌悬液对根结线虫二龄幼虫活力抑制作用增强, 其中稀释 10 倍的 FD6 菌悬液可完全抑制幼虫的活力, 而稀释 50 倍处理 6 h 与对照差异不显著。这说明高浓度菌悬液在短期内对幼虫就具有较强抑制作用。

### 2.2 荧光假单胞菌株 FD6 中硝吡咯菌素合成基因簇克隆与序列分析

将 PCR 扩增的 4 个序列拼接后, 得到硝吡咯菌素合成基因簇全长 5 868 bp 片段 (序列登录号 JQ732181)。在 NCBI 上进行同源性比对分析, 结果表明, 拼接后的片段与绿针假单胞菌 *P. chlororaphis*、假单胞菌 *P. protegens* Pf-5、CHA0 的硝吡咯菌素合成基因相似性最高, 均达到 94% 以上, 其次与伯克氏菌 (*Burkholderia* spp.) 和沙雷氏菌 (*Serratia* spp.) 属细菌的相似性在 87% ~ 92%。系统发育进化树 (图 3) 显示, 菌株 FD6 与 *P. protegens* CHA0 和 Pf-5 位于同一个分支, 说明这 3 个细菌的硝吡咯菌素合成基因同源性最高。

已获得的 5 868 bp 片段内含完整的 *prnABCD* 基因, 预测的启动子 - 35 区序列为 ttgcat, - 10 区序列为 ggctagagt, *prnA* ~ *prnD* 这 4 个开放阅读框都位于同一个转录单元内, 转录方向从 *prnA* → *prnD* (图 1)。*prnA* 全长 1 563 bp, 预测的核糖体结合位点 AAGGAG, 起始密码子 ATG, 终止密码子 TAG; *prnB* 基因全长 1 085 bp, 与 *prnA* 基因终止子直接相连, 起始密码子 GTG, 终止密码子 TGA; *prnC* 基因全长 1 704 bp, 与 *prnB* 基因间隔 41 bp, 预测的核糖体结合位点 AGGAG, 起始密码子 ATG, 终止密码子 TAG; *prnD* 基因全长 1 092 bp, 预测的核糖体结合位点 GAGG, 起始密码子 ATG, 终止密码子 TAA (图 4)。



图 2 FD6 对桃褐腐病的生防效果

Fig. 2 The biocontrol effect of strain FD6 to *Monilinia fructicola*

表 2 FD6 对黄瓜根结线虫二龄幼虫活力的抑制率

Table 2 Inhibit effect of strain FD6 to

*Meloidogyne incognita* Chitwood

%

处理 Treatment	稀释倍数 Dilution factor	2 h	6 h	12 h
FD6	10	55.08 a	79.17 a	100.00 a
FD6	50	3.40 b	10.13 b	35.28 b
H <sub>2</sub> O		0 b	0 b	0 c

注: 同一列中的不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Note: Different letters in the same column of same position indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

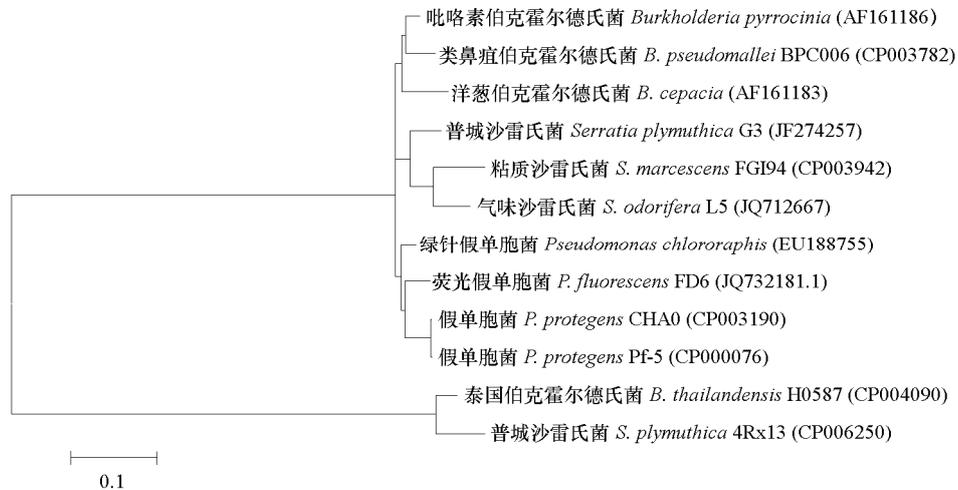


图3 硝吡咯菌素合成基因簇系统发育进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on pyrrolnitrin synthetic gene sequence

```

.....AAGGAG.....ATG.....TAGTGG...TGACGCGCACGGCCAGGTCCTATCT
GACAAGGAGAGTTTGCCCCATG.....TAGTCGGCCGAGGACGACAC
AAAAGCGATG.....TAA

```

图4 硝吡咯菌素合成基因簇序列特征

方框表示起始密码子，黑体表示终止密码子，下划线表示推测的核糖体结合位点。

Fig. 4 Characteristics of pyrrolnitrin biosynthetic gene cluster

The square frame, bold and underline represent initiation codon, stop codon and ribosome binding site, respectively.

### 2.3 *prnA* 缺失突变体和互补菌株的构建

通过 PCR 扩增获得 *prnA* 基因左右两个侧翼序列，中间缺失 *prnA* 基因 465 bp 片段，以此构建缺失载体 pEX- $\Delta$ *prnA* (图 1)。转化野生型 FD6 后，通过二次同源重组，获得了 *prnA* 基因的缺失突变体  $\Delta$ *prnA*。以 *prnF1* 和 *prnA1739* 为引物，以野生型菌株 FD6 和  $\Delta$ *prnA* 为模板，可分别扩增到 2 290 bp 和 1 825 bp 的片段，电泳结果显示 *prnA* 基因片段有明显缺失 (图 5)，与预期结果一致。将互补质粒 pME6032-P 电击转化到缺失突变体  $\Delta$ *prnA* 中，得到互补菌 FD6-A。

### 2.4 *prnA* 基因缺失对抗生素产生的影响

HPLC 定量检测数据表明，野生型菌株 FD6 与互补菌株 FD6-A 均可产生硝吡咯菌素，*prnA* 基因缺失突变体  $\Delta$ *prnA* 不能产生硝吡咯菌素，而且 2,4 - 二乙酰基间苯三酚和藤黄绿脓菌素合成量也显著减少 (图 6)。以上结果说明 *prnA* 基因是硝吡咯菌素合成所必需的基因，同时该基因也影响抗生素 2,4 - 二乙酰基间苯三酚和藤黄绿脓菌素的合成。

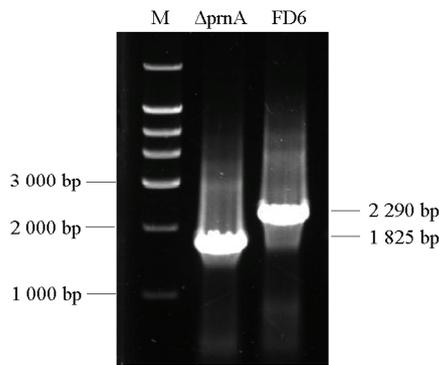


图5 菌落 PCR 验证 *prnA* 基因缺失突变体  
Fig. 5 PCR identification of *prnA* deletion mutant

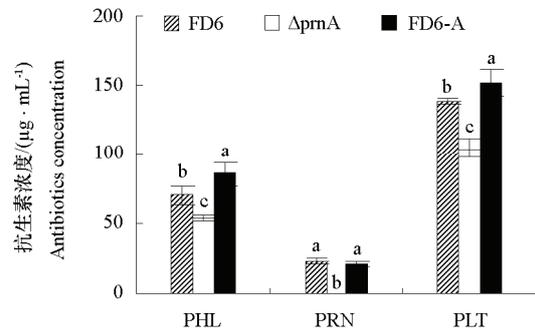


图6 *prnA* 基因对菌株 FD6 抗生素合成的影响  
Fig. 6 Effect of *prnA* from strain FD6 on biosynthesis of antibiotics

### 3 讨论

利用拮抗微生物防治采后病害发生已被国内外广泛应用。目前已发现多个属细菌对桃褐腐病菌有抑制作用 (Sharma et al., 2009)。如枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* B-912 与扑海因配合使用可显著降低贮藏期桃褐腐病的发生 (范青 等, 2000)。拮抗细菌 CE 产生的抑菌物质可引起桃褐腐病菌菌丝细胞膜透性改变、菌丝和分生孢子形态异常 (杨海清 等, 2011)。前期研究结果表明, 荧光假单胞菌 FD6 抑菌谱广, 对多种病原真菌均有不同程度的拮抗效果, 用细菌悬浮液处理果实可显著降低番茄灰霉病发病率 (常琳 等, 2014), 这说明生防细菌 FD6 在不同植物多种病害防治中具有潜在应用价值。

*P. protegens* Pf-5 中已克隆到 5 868 bp 具有合成硝吡咯菌素能力的基因组片段, 该片段包含 4 个开放阅读框 *prnA* ~ *prnD*, 通过异源表达、缺失突变证实每个基因都是合成硝吡咯菌素所必需的 (Hammer et al., 1997)。普城沙雷氏菌 *S. plymuthica* G3 主要通过合成硝吡咯菌素抑制植物病原菌, 当 *prnA* 缺失后突变体不能合成 PRN, 也丧失了对板栗疫病菌的拮抗活性 (于晓莉和刘晓光, 2012)。本研究中 *prnA* 缺失后仍具有拮抗活性, 可能是因为突变体产生的 PHL 和 PLT 起作用。菌株 FD6 中 *prnA* 突变后, 抗生素 PHL 和 PLT 合成也显著降低, 说明 *prnA* 也影响另外 2 种抗生素合成。类似的结果在其他生防细菌中有报道。如 *P. chlororaphis* PA23 可产生吩嗪和硝吡咯菌素, 高效液相色谱检测结果显示, 吩嗪突变体中硝吡咯菌素合成量增加 2 倍 (Selin et al., 2010)。*P. fluorescens* Pf-5 生物信息学分析显示 *phlD* 基因具有双重作用, 既是 PHL 生物合成结构基因, 也能调控 PLT 的产生 (Kidarsa et al., 2011), 因此推测 *prnA* 基因在菌株 FD6 中也具有类似 *phlD* 的多重调节功能。本研究中克隆到的 PRN 合成基因簇在 GenBank 中比对分析与 *P. protegens* Pf-5 和 CHA0 相似性最高, 且菌株 FD6、Pf-5 和 CHA0 都可以产生 2,4 - 二乙酰基间苯三酚、硝吡咯菌素、藤黄绿脓菌素 3 种抗生素, 每种抗生素都有独特的抑菌谱, 因此产生多种抗生素的生防细菌 FD6 在今后病害防治中具有更大优势。

通常生防菌可产生多种类型的抗菌物质, 因此不同拮抗细菌的生防作用机制也有差异。*B. subtilis* CPA-8 可产生丰原素、伊枯草菌素和表面活性素, 其中丰原素类脂肽化合物在桃褐腐病生物防治中发挥主要作用 (Yáñez-Mendizábal et al., 2012)。*Bacillus* sp. B91 产生可溶的挥发性有机化合

物能抑制 *M. laxa* 生长 (Rungjindamai et al., 2013)。*Bacillus subtilis* F3 产生的抗菌蛋白可抑制桃褐腐病菌菌丝生长和孢子萌发, 并导致菌丝形态异常、细胞壁塌陷 (Zhao et al., 2013)。抗生素硝吡咯菌素也可用于防治植物病害。Janisiewicz 等 (1991) 报道 *P. cepacia* 产生的硝吡菌素可用于防治采后病害苹果绿霉病和梨灰霉病。生防细菌 FD6 产生的 PRN 可直接抑制番茄灰霉病菌菌丝生长及孢子萌发 (常琳 等, 2011)。为明确 PRN 在桃褐腐病防治中的作用, 今后可通过检测 PHL 和 PLT 双缺失突变体表型或 PRN 的体外表达两种手段进行进一步分析。薄层层析显示 PRN 已在大肠杆菌中实现异源表达 (数据未列出), 但由于 PRN 异源表达量较低且抑菌活性不明显, 将来可采用带有强启动子的载体、优化培养条件等手段提高 PRN 产量, 这对了解其抑菌机制有重要意义, 对该抗生素的开发利用等都具有重要的理论参考和实用价值。

## References

- Arima K, Imanaka H, Kousaka M, Fukuda A, Tamura G. 1964. Pyrrolnitrin, a new antibiotic substance produced by *Pseudomonas*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 28 (8): 575 - 576.
- Chang Lin, Li Qian, Tong Yun-hui, Xu Jing-you, Zhang Qing-xia. 2011. Identification of the biocontrol bacterial strain FD6 and antimicrobial study of this bacterium against tomato grey mould pathogen *Botrytis cinerea*. *Acta Phytopythologica Sinica*, 38 (6): 487 - 492. (in Chinese)  
常琳, 李倩, 童蕴慧, 徐敬友, 张清霞. 2011. 生防细菌 FD6 的鉴定及其对番茄灰霉病菌的作用机制. *植物保护学报*, 38 (6): 487 - 492.
- Chang Lin, Xiao Qi, Tong Yun-hui, Xu Jing-you, Zhang Qing-xia. 2014. Functional analysis of the *gacS* gene in a tomato grey mould suppressive bacterium *Pseudomonas fluorescens* FD6. *Acta Horticulturae Sinica*, 41 (4): 681 - 686. (in Chinese)  
常琳, 肖琦, 童蕴慧, 徐敬友, 张清霞. 2014. *gacS* 基因在荧光假单胞菌 FD6 防治番茄灰霉病中的功能分析. *园艺学报*, 41 (4): 681 - 686.
- Chernin L, Brandis A, Ismailov Z, Chet I. 1996. Pyrrolnitrin production by an *Enterobacter agglomerans* strain with a broad spectrum of antagonistic activity towards fungal and bacterial phytopathogens. *Current Microbiology*, 32 (4): 208 - 212.
- El-Banna N, Winkelman G. 1998. Pyrrolnitrin from *Burkholderia cepacia*: antibiotic activity against fungi and novel activities against streptomycetes. *J Appl Microbiol*, 85 (1): 69 - 78.
- Fan Qing, Tian Shi-ping, Li Yong-xing, Xu Yong, Wang Yi. 2000. Biological control of postharvest brown rot in peach and nectarine fruits by *Bacillus subtilis* (B-912). *Acta Botanica Sinica*, 42 (11): 1137 - 1143. (in Chinese)  
范青, 田世平, 李永兴, 徐勇, 汪沂. 2000. 枯草芽孢杆菌 (B-912) 对桃和油桃褐腐病的抑制效果. *植物学报*, 42 (11): 1137 - 1143.
- Fu Peng, Li Hong-mei, Ding Guo-chun, Guo Jian-hua. 2004. Control of biocontrol agent GJ23 against *Meloidogyne incognita*. *Jiangsu Agricultural Sciences*, (5): 43 - 47. (in Chinese)  
付鹏, 李红梅, 丁国春, 郭坚华. 2004. GJ23 生防菌剂防治南方根结线虫研究. *江苏农业科学*, (5): 43 - 47.
- Haas D, Keel C. 2003. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu Rev Phytopathol*, 41 (4): 117 - 153.
- Hammer P E, Hill D S, Lam S T, Van Pée K H, Ligon J M. 1997. Four genes from *Pseudomonas fluorescens* that encode the biosynthesis of pyrrolnitrin. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (6): 2147 - 2154.
- Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, 166 (4): 557 - 580.
- Heeb S, Blumer C, Haas D. 2002. Regulatory RNA as mediator in GacA/RsmA-dependent global control of exoproduct formation in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J Bacteriol*, 184 (4): 1046 - 1056.
- Hu Meng-jun, Cox K D, Schnabel G, Luo Chao-xi. 2011. *Monilinia* species causing brown rot of peach in China. *PLoS ONE*, 6 (9): e24990.
- Janisiewicz W, Yourman L, Roitman J, Mahoney N. 1991. Postharvest control of blue mold and gray mold of apples and pears by dip treatment with pyrrolnitrin, a metabolite of *Pseudomonas cepacia*. *Plant Disease*, 75 (5): 490 - 494.
- Kidarsa T A, Goebel N C, Zabriskie T M, Loper J E. 2011. Phloroglucinol mediates cross-talk between the pyoluteorin and

- 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthetic pathways in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Molecular Microbiology*, 81 (2): 395 - 414.
- Qin Bo, Duan Yu-xi, Chen Chang-fa, Chen Li-jie. 2008. Screening, identification and antagonistic effects of biocontrol bacteria against dangerous nematodes. *Plant Quarantine*, 22 (2): 83 - 86. (in Chinese)
- 秦 博, 段玉玺, 陈长法, 陈立杰. 2008. 危险性线虫生防细菌的筛选鉴定和防效试验. *植物检疫*, 22 (2): 83 - 86.
- Rungjindamai N, Xu Xiang-ming, Jeffries P. 2013. Identification and characterisation of new microbial antagonists for biocontrol of *Monilinia laxa*, the causal agent of brown rot on stone fruit. *Agronomy*, 3 (2): 685 - 703.
- Schmidt S, Blom J F, Pernthaler J, Berg G, Baldwin A, Mahenthiralingam M, Eberl L. 2009. Production of the antifungal compound pyrrolnitrin is quorum sensing-regulated in members of the *Burkholderia cepacia* complex. *Environmental Microbiology*, 11 (6): 1422 - 1437.
- Selin C, Habibian R, Poritsanos N, Athukorala S, Fernando D, de Kievit T R. 2010. Phenazines are not essential for *Pseudomonas chlororaphis* PA23 biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum*, but do play a role in biofilm formation. *FEMS Microbiol Ecol*, 71 (1): 73 - 83.
- Shanks J, Burtnick M N, Brett P J, Waag D M, Spurgers K B, Ribot W J, Schell M A, Panchal R G, Gherardini F C, Wilkinson K D, Deshazer D. 2009. *Burkholderia mallei* *tssM* encodes a putative deubiquitinase that is secreted and expressed inside infected RAW 264.7 murine macrophages. *Infection and Immunity*, 77 (4): 1636 - 1648.
- Sharma R R, Singh D, Singh R. 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: a review. *Biological Control*, 50 (3): 205 - 221.
- Wang Ming-zhong, Xu Han, Feng Qi, Wang Li-zhong, Wang Su-hua, Li Zheng-ming. 2009. Design, synthesis, and fungicidal activity of novel analogues of pyrrolnitrin. *J Agric Food Chem*, 57 (17): 7912 - 7918.
- Yáñez-Mendizábal V, Zerriouh H, Viñas I, Torres R, Usall J, de Vicente A, Pérez-García A, Teixidó. 2012. Biological control of peach brown rot (*Monilinia* spp.) by *Bacillus subtilis* CPA-8 is based on production of fengycin-like lipopeptides. *European Journal of Plant Pathology*, 132 (4): 609 - 619.
- Yin Liang-fen, Hu Meng-jun, Jin Xin, Schnabel G, Luo Zhao-xi. 2010. Progress in molecular mechanisms of fungicide resistance in peach brown rot fungi *Monilinia* spp. *Plant Protection*, 36 (5): 28 - 32. (in Chinese)
- 尹良芬, 胡勳郡, 金 鑫, Schnabel G, 罗朝喜. 2010. 桃褐腐病菌抗药性分子机理研究进展. *植物保护*, 36 (5): 28 - 32.
- Yu Xiao-li, Liu Xiao-guang. 2012. Construction of a *prnA* mutant in *Serratia plymuthica*. *Journal of Biology*, 29 (6): 10 - 13. (in Chinese)
- 于晓莉, 刘晓光. 2012. 普城沙雷氏菌硝吡咯菌素 *prnA* 基因突变株的构建. *生物学杂志*, 29 (6): 10 - 13.
- Yang Hai-qing, Zhao Xiao-meng, Zhao Xiao-yan, Liu Zheng-ping. 2011. Antifungal mechanism against *Monilinia fruticola* and stability of the antagonistic substance from bacterium strain CE. *Journal of Fruit Science*, 28 (2): 204 - 208. (in Chinese)
- 杨海清, 赵筱萌, 赵晓燕, 刘正坪. 2011. 桃树根际拮抗细菌 CE 抑菌物质对桃褐腐病菌的抑制作用和稳定性研究. *果树学报*, 28 (2): 204 - 208.
- Zhang Qing-xia, Xiao Qi, Xu Jing-you, Tong Yun-hui, Wen Jia, Chen Xi-jun, Wei Li-hui. 2015. Effect of *retS* gene on antibiotics production in *Pseudomonas fluorescens* FD6. *Microbiol Res*, 180: 23 - 29.
- Zhao Xiao-yan, Zhao Xiao-meng, Wei Yan-min, Shang Qiao-xia, Liu Zheng-ping. 2013. Isolation and identification of a novel antifungal protein from a rhizobacterium *Bacillus subtilis* strain F3. *J Phytopathol*, 161 (1): 43 - 48.