

温度对假单胞菌 *rsmA* 突变株 M-18R 合成 Plt 和 PCA 的区别性影响

Differential Effect of Temperature on Plt and PCA Synthesis in A *rsmA* Inactivated Mutant Strain of *Pseudomonas* sp. M-18

王 震, 何 幸, 王素莲, 张雪洪, 许煜泉*

WANG Zhen, HE Xing, WANG Su-Lian, ZHANG Xue-Hong and XU Yu-Quan*

上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240

College of Life Science & Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

摘 要 次生代谢物阻遏蛋白 (Repressor of secondary metabolite, Rsm)A 是一种全局性调控因子, 与 mRNA 的 RBS 结合, 转录后水平上抑制基因翻译。运用同源重组技术, 构建了假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) M-18 的 *rsmA* 突变菌株 M-18R。在 37℃、28℃ 恒温和短期升温 (37℃、4h 培养, 转 28℃ 继续培养) 条件下, 比较野生株 M-18 和突变株 M-18R 生物合成藤黄绿菌素 (Plt) 和吩嗪-1-羧酸 (PCA) 的量。在 37℃ 条件下, M-18 和 M-18R 合成这两种抗生物质的能力几乎受到完全抑制。在 28℃ 条件下, M-18R 合成 Plt 的量约为野生型 M-18 的 10 倍, 达到 270 μg/mL, 但是合成 PCA 的量仅为野生型的 50%。经短期升温培养, M-18 的 Plt 合成量明显下降, PCA 产量降低不显著; 相反, M-18R 合成 Plt 的量达到 400 μg/mL, 但 PCA 产量的变化仍不明显。推测, M-18 菌株细胞内存在着某种与 RsmA 相关联的温度敏感因子, 在 RsmA 缺失条件下, 作为专一性激活剂促进 Plt 的生物合成, 但是, 并不参与对 PCA 合成的调控。

关键词 假单胞菌 M-18, *rsmA*, 吩嗪-1-羧酸, 藤黄绿菌素, 温度

中图分类号 TQ92 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2005)01-0118-05

Abstract Rsm (repressor of secondary metabolite) A is an mRNA binding protein which functions as a global repressor to control multiple genes at the posttranscriptional level. Using homologous recombination technique a chromosomal *rsmA* inactivated mutant strain M-18R was constructed in *Pseudomonas* sp. M-18, a strain of plant-growth-promoting rhizobacteria, which could inhibit several soilborn phytopathogens by producing secondary metabolites including phenazine-1-carboxylic acid (PCA) and pyoluteorin (Plt) in one single strain. To further study the effect of RsmA on the synthesis of Plt and PCA in the wild type strain M-18, the dynamic curves of Plt and PCA produced respectively by M-18 and M-18R were measured in KMB medium under different temperature conditions such as 37℃ constant, 28℃ constant and nonconstant (37℃ 4 hours at first and then 28℃ constant) cultivation. The synthesis of both Plt and PCA were almost inhibited in the cultures under the condition of 37℃. At 28℃, however, compared with the wild type strain M-18, the mutant strain produced tenfold amount of Plt, while the production of PCA decreased only about 50%. When cultivated under the nonconstant condition, the amount of Plt produced by M-18R could reach 400 μg/mL while the PCA production was not significantly affected, but in the wild type strain M-18, the amount of Plt production decreased obviously while the PCA production was not affected in comparison with the results at 28℃ constant. These results

Received: July 12, 2004; Accepted: September 6, 2004

This work was supported by Grants from PRP (No.080411) and Tang's foundation program.

* Corresponding author. Tel:86-21-54745025; E-mail: xuyq@sjtu.edu.cn

上海交通大学 PRP 项目 (No.080411) 和唐氏基金资助。

suggest that a temperature sensitive factor exists to function as an activator independent of RsmA to promote the synthesis of Plt in the *rsmA* mutant strain M-18R while it may bind with RsmA to repress the synthesis of Plt in the wild type strain M-18. But this factor did not exert any affect on the synthesis of PCA.

Key words *Pseudomonas* sp. M-18, *rsmA*, pyoluteorin, phenazine-1-carboxylic acid, temperature

促进植物生长的根际细菌 (plant growth promoting rhizosphere), 能分泌多种抗生物质抑制土壤病原菌的繁殖, 保护植物免受病害感染, 已经成为一类重要的生物防治菌受到广泛关注^[1]。PGPR 分泌的抗生物质主要包括吩嗪、间苯三酚、藤黄绿菌素 (pyoluterion, Plt) 和硝吡咯菌素等及其衍生物。假单胞菌株 (*Pseudomonas* sp.) M-18 是从上海郊区甜瓜根际土壤中分离到的一个 PGPR 菌株, 是国际上首次发现的能同时分泌 Plt 和吩嗪-1-羧酸 (phenazine-1-carboxylic acid, PCA) 的假单胞菌株^[2]。

次生代谢物阻遏蛋白 (Repressor of secondary metabolite, Rsm) 存在于大部分革兰氏阴性菌和某些革兰氏阳性菌中^[3], 能与 mRNA 的 RBS 结合, 在转录后水平上, 对细菌的次生代谢和行为起着全局性调控作用^[4-6]。在 *Erwinia carotovora subsp. carotovora* 中, Rsm 系统由三个主要成分组成: RsmA (mRNA 结合蛋白, 促使其衰退)、rsmB (不被翻译的 RNA, 隔离并消除 RsmA 的功能) 和 RsmC (正调控 *rsmA* 表达, 负调控 *rsmB* RNA 水平)。在多种 *Erwinia* 菌中,

RsmA 与 rsmB 结合, 控制胞外酶、植物激素、抗生素、色素和多糖的生成以及鞭毛的形成和菌群传感 (quorum sensing) 信号分子 OHL (N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone) 的水平; 它们同时影响 harpin 的产量及毒性。在荧光假单胞菌 CHA0 (*Pseudomonas fluorescens* CHA0) 中, RsmA 是一个负调控因子, 与不被翻译的 RNA 分子 RsmZ 结合, 控制着受 GacA/GacS 系统调节的次生代谢相关基因的表达^[6]。

为深入研究假单胞菌株 M-18 中 RsmA 对 Plt 和 PCA 的调控方式, 提高抗生物质的产量, 构建了 *rsmA* 突变的工程菌株 M-18R, 测定不同温度特别是短期升温 (37℃、4h 培养, 转 28℃继续培养) 条件下, M-18R 合成 Plt 和 PCA 动力学曲线。结果表明, RsmA 作为整体调控因子, 对这两种抗生物质的合成具有区别性调控作用, 并且与发酵的温度条件密切相关。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒及菌种: 见表 1。

表 1 菌株与质粒

Table 1 Strains and plasmids

Strains		
<i>E. coli</i> S17-1	<i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>hsdR</i> , <i>recA</i> ; mobilizer strain	Simon <i>et al.</i>
<i>Pseudomonas</i> sp. M18	PCA, Plt producer, Amp ^r Sp ^r	This Lab
<i>Pseudomonas</i> sp. M18R	PCA, Plt producer, Amp ^r Sp ^r <i>rsmA</i>	This study
<i>Pseudomonas</i> sp. M18S01	pMOR-chromosome plasmid integrate	This study
Plasmids		
pDSK519	resource of kanamycin resistant cassette	N. T. Keen
pBluescript SK	ColE, Amp ^r	This Lab
pMOB3	Km ^r Cm ^r SacBR oriT	H. P. Schweizer
pSKrsmA	pBluescript SK with 1.5kb <i>pst</i> I fragment carrying <i>rsmA</i> ; Ap ^r	This study
pRSK8171	pSKrsmA inactivated with Km ^r ; Km ^r Ap ^r	This study
pMOR	A <i>Not</i> I fragment of 5.8 kb containing <i>sacBR</i> gene from pMOB3 was inserted into pRSK8171	This study

1.1.2 试剂和培养基: DNA 聚合酶 (Klenow)、限制性内切酶、DNA 连接酶及 DNA 分子量标记物购自 MBI 公司; 地高辛试剂盒购自 Roche 公司。LB 培养基按文献 [7] 配制。蔗糖选择培养基: LB 培养基另加 5% 蔗糖; KMB 培养基: 每升含蛋白胨 20g, 甘油 15mL, MgSO₄·7H₂O 1.5g, K₂HPO₄ 0.3g, pH 7.5; 相应

固体培养基每升加琼脂 15g。抗生素用量 (μg/mL): 卡那霉素 (Km) 50, 氨苄青霉素 (Ap) 100, 庆大霉素 (Gm) 40, 氯霉素 (Chl) 100, 壮观霉素 (Sp) 100。
1.1.3 主要仪器: 高效液相仪 (HPLC, 型号 SHIMADZU LC-8A)。分析柱为反相 C-18 色谱柱 (5μm, 4.6mm i. d. * 150 mm, Phenomenex LUNA)。

1.2 方法

1.2.1 引物和 PCR 反应:根据 *E. coli*、*P. aeruginosa* 和 *E. carotovora* 中的 *rsmA* 基因保守序列,设计简并引物,经 PCR,扩增假单胞菌 M-18 基因组的 *rsmA* 片段。引物 1: 5'-CGTGGATCCATGCTKATTYT-GACTCG, 引物 2: 5'-TGAATAAGCTTCHCGGTGWACSGMVAC, 其中简并碱基 K = G/T, Y = C/T, H = A/C/T, W = A/T, M = A/C, V = A/C/G, 在引物的 5' 端分别增添 *Bam*H I 或 *Hind* III 酶切点。PCR 反应体系 (50 μ L): 10 \times Taq 聚合酶缓冲液 5 μ L, $MgCl_2$ (25mmol/L) 3 μ L, dNTP (2.5mmol/L) 4 μ L, 引物 1 和引物 2 各 1 μ L, 模板 DNA 1 μ L, Taq 酶 (5u/ μ L) 0.5 μ L, 重蒸水 34.5 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 6min; 95 $^{\circ}$ C 1 min, 57 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 45s, 35 次循环后, 72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.2.2 克隆 *rsmA* 片段及测序:质粒抽提、酶反应、DNA 片段回收、连接、感受态细胞制备和 32 P 探针标记及 Southern 杂交等, 均根据分子克隆实验手册^[7], 染色体 DNA 提取参照文献^[8], 地高辛探针标记及 Southern 杂交按 Roche 试剂盒说明书进行, DNA 序列委托上海申友生物公司测定。

1.2.3 原位杂交和细菌接合转移:原位杂交参照文献^[7], 细菌接合转移采用固相滤膜杂交法^[9]。

1.2.4 生长曲线测定及 PCA 和 Plt 的提取和定量测定:从平板中挑取单菌落, 接种于小瓶 (150mL 三角瓶, 含培养基 50mL), 28 $^{\circ}$ C 下振荡培养 12h 后, 转入大瓶, 每隔 12h 取样, 测定 OD_{600} 值及 PCA 和 Plt 产量, 3 次重复, 取平均值。 OD_{600} 值的测定及 PCA 和 Plt 的提取和定量测定方法, 参照文献^[2]。短期升温处理: 转入大瓶 (500mL 三角瓶, 培养基 150mL), 在 37 $^{\circ}$ C 条件下, 振荡培养 4h, 然后置于 28 $^{\circ}$ C 下继续培养。发酵时, 摇床转速 220 r/min。

2 结果

2.1 *rsmA* 基因的 PCR 克隆及其两侧序列的获得和测序

以野生型菌株 M-18 的染色体 DNA 为模板进行 PCR, 获得长度为 130bp 左右的片段, *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切后, 插入载体 pBluescript SK, 测序。经 DNAMAN 软件分析, M-18 的 *rsmA* 基因序列与 *P. aeruginosa*、*P. fluorescens* 和 *E. carotovora* 的 *rsmA* 基因的同源程度分别为 94.74%、71.94% 和 68.38%。

PCR 获得的 *rsmA* 基因片段较短, 为提高同源重组频率, 需获得含有 *rsmA* 基因两侧的核苷酸片段。为此, 以 130bp DNA 片段为探针, 从 M-18 的柯斯

(cosmid) 基因组文库中^[12], 筛选出 5 个阳性克隆 pM18J-pM18N。分别经 *Pst* I, *Xho* I, *Bgl* II 酶切后, 电泳结果见图 1A。以 *rsmA* 基因片段为探针, Southern 杂交结果 (图 1B) 表明, 含有 *rsmA* 基因的片段长度分别为 1.5、2.3 和 4.8kb。回收 1.5kb 的 *Pst* I 片段, 插入 pBluescript SK, 获得 pSKrsmA。测序得知 *rsmA* 基因的中心含有 *Aat* II 位点。pSKrsmA 经 *Pst* I 和 *Aat* II 双酶切后, 获得长度约为 600bp 和 900bp 两个片段, 表明 *rsmA* 基因位于该片段的中间区段。

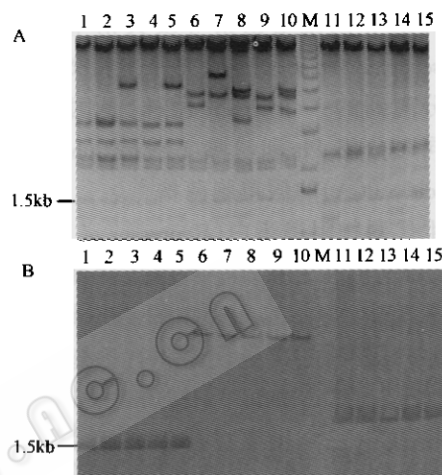


图 1 阳性克隆的酶切图谱 (A) 和 southern 杂交分析 (B)

Fig. 1 Restriction map of positive clones (A) and Southern-blot analysis (B)

M: 1kb ladder; 1~5: pM18J-pM18N/*Pst* I; 6~10: pM18J-pM18N/*Xho* I; 11~15: pM18J-pM18N/*Bgl* II.

2.2 *rsmA* 基因阻断突变体的构建

从 pDSK519 中获得含有 Km^r 抗性基因的 *Pvu* II 片段 1.7kb, 插入到经 T4 DNA 聚合酶钝化末端的 pSKrsmA 的 *Aat* II 酶切位点, 获阳性克隆 pRSK8171。从质粒 pMOB3 中, 切取含有 *sacBR* 基因的 *Not* I 片段 5.8kb, 作为同源重组的反向选择标记, 插入 pRSK8171 获重组质粒 pMOR, 转化 *E. coli* S17-1。

以 pMOR 转化的 *E. coli* S17-1 为供体菌, 野生株 M-18 为受体菌, 进行固相滤膜接合转移。质粒 pMOR 转入到 M-18 菌株后, 不能在染色体外自主复制, 从而促使质粒携带的 *rsmA*:: Km^r 突变基因与受体菌的 *rsmA* 基因发生同源重组。野生型 M-18 抗壮观霉素 (Sp), 因此可在含 Km 和 Sp 的 LB 平板中, 选出具有 Km^r Sp r 抗性的共整合接合子 M-18S01。随机挑选菌落接种于含 Km 的蔗糖选择培养基中, 质粒 pMOR 携带的蔗糖反选择基因 *sacBR* 经蔗糖诱导表达, 对 M-18S01 致死; 但是, 接合子经第二次重组, 消

除共整合质粒后,能在含 Km 的蔗糖选择培养基上存活,可获得 *rsmA* 突变的菌株 M-18R。

2.3 *rsmA* 阻断突变体的 Southern 杂交验证

分别提取野生型菌株 M-18、共整合接合子 M-18S01 和突变菌株 M-18R 的染色体 DNA,经 *Pst* I 酶切,电泳,转膜。从质粒 pSK*rsmA* 切取长度为 1.5kb 的 *Pst* I 片段(含 *rsmA* 基因及其临近序列)为探针,进行 Southern 杂交(图 2)。泳道 3 为野生型染色体 DNA,见到长度为 1.5 kb 的条带;泳道 2 为共整合菌株的染色体 DNA,见到长度为 1.5kb 和 3.2kb 的两个条带;泳道 1 为 M-18R 染色体 DNA,只能见到长度为 3.2 kb 的条带,表明 Km^r盒已经插入 *rsmA* 基因内,是共整合消除的突变菌株。

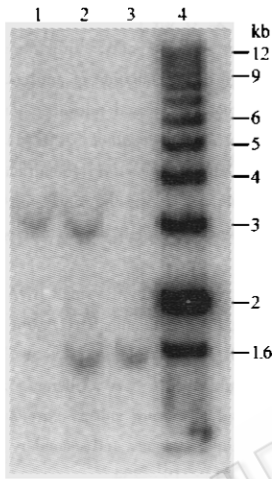


图 2 Southern 杂交验证 *rsmA* 基因的插入突变

Fig. 2 Southern-blot analysis of insertional mutation in *rsmA* gene
1: M-18R-; 2: M-18S01; 3: M-18; 4: molecular marker

2.4 野生型菌株 M-18 和突变菌株 M-18R 在不同温度条件下的生长曲线

在 KMB 培养基中,无论野生型菌株 M-18 还是 *rsmA* 突变株 M-18R,提高温度有利于菌体生长。37℃条件下,菌体生长速率最大;短期升温条件下次之;28℃条件下,生长最慢。但是,在不同温度条件下,突变株 M-18R 在各个发酵时期的生长量,都相应低于野生株 M-18(图 3A)。长时间培养后,更不利于菌体生长;培养 48h 后,菌体生长趋缓,培养 60h 后,菌体密度呈下降趋势。短期升温培养对 M-18R 菌体生长的抑制作用最大。

2.5 温度对 M-18 和 M-18R 合成 Plt 的影响

在 3 种不同温度培养条件下,野生型菌株 M-18 和 *rsmA* 突变菌株 M-18R 合成 Plt 的动态曲线见图 3B。37℃恒温发酵条件,不利于次生代谢物积累,野生株 M-18 和突变株 M-18R 的 Plt 合成几乎受到完

全抑制。

与 37℃相比,28℃恒温发酵条件,有利于菌体合成次生代谢物。但是,两种菌株合成 Plt 的能力表现出显著的差异,发酵 60h 后,突变株 M-18R 合成 Plt 的水平达到 270 μg/mL,野生株 M-18 的 Plt 合成量只有 26 μg/mL。在整个发酵过程中,突变株合成 Plt 的能力为野生株的 1 至 10 倍,表明 Plt 的合成受到 *RsmA* 的负调控。

经 37℃培养 4h,然后转入 28℃继续培养发酵,短期升温进一步提高突变株 M-18R 合成 Plt 的能力,经 72h 发酵,发酵单位比 28℃恒温培养提高约 50%,Plt 产量达到 400μg/mL。但是,短期升温抑制野生株 M-18 的 Plt 合成量,使之下降到10μg/mL。

2.6 温度对 M-18 和 M-18R 合成 PCA 的影响

在 3 种不同温度培养条件下,野生型菌株 M-18 和 *rsmA* 突变菌株 M-18R 合成 PCA 的动态曲线见图 3C。37℃恒温条件,不利于次生代谢物 PCA 的积累,野生株 M-18 和突变株 M-18R 的 PCA 合成都受到明显的抑制。野生株 M-18 合成 PCA 的量为 1.5μg/mL,突变株 M-18R 的 PCA 合成量为5μg/mL。

28℃恒温培养条件,与 37℃恒温发酵相比,有利于 PCA 的合成,野生株 M-18 合成 PCA 的量为 20μg/mL,突变株 M-18R 合成 PCA 的量为10μg/mL,两者的 PCA 合成量无显著差别。表明,在 KMB 培养基中,*rsmA* 突变对 PCA 的合成具有一定抑制作用,但是,抑制作用不明显。

经 37℃培养 4h,然后转入 28℃继续培养发酵,野生株 M-18 的 PCA 合成量为 15μg/mL,突变株 M-18R 的 PCA 合成量为 13μg/mL。与 28℃恒温条件下的产量基本一致,表明变温培养对野生株和突变株的 PCA 产量均无显著影响。

3 讨论

对假单胞菌株 M-18 及其 *rsmA* 突变的工程菌株 M-18R 的生长曲线和合成 Plt 及 PCA 的动力学分析表明,37℃条件下,有利于菌体的生长,但不利于次生代谢物的分泌,Plt 及 PCA 的合成几乎受到完全抑制。在 28℃条件下,菌体的生长量有所下降,却有利于 Plt 及 PCA 的合成,表明温度条件对菌株合成次生代谢物具有重要的影响。对野生株 M-18 和突变株 M-18R 合成 Plt 及 PCA 的动力学分析表明,*rsmA*基因产物对它们的合成具有区别性影响,它对 Plt 的合成具有显著的抑制作用,而对 PCA 合成具有一定的促进作用,但是促进效果不显著。在野生株

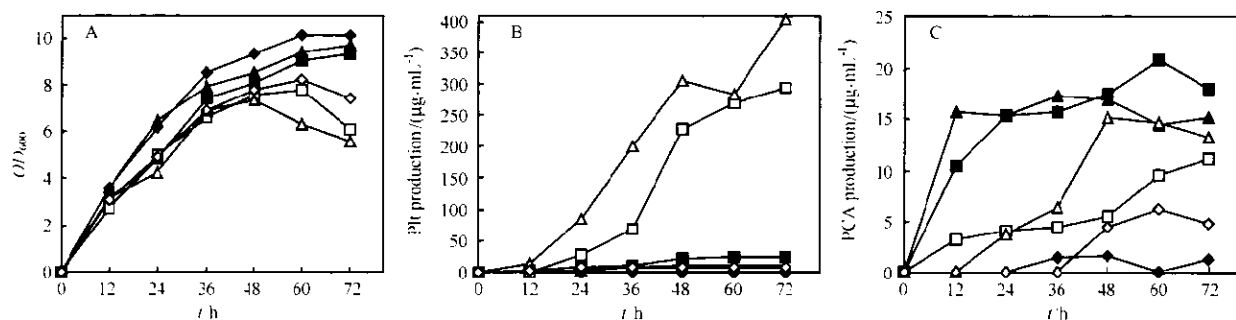


图3 野生株 M-18 和 *rsmA* 突变株 M-18R 的生长曲线(A)及 Plt (B)和 PCA(C)生物合成曲线

Fig. 3 Growth curves (A) and Plt (B) or PCA (C) production of wild type strain M-18

and mutant strain M-18R cultured under the conditions of different temperature

◇ 37℃; △ 37℃, 28℃; □ 28℃; *rsmA* mutant strain of M-18R; ◆ 37℃; ▲ 37℃, 28℃; ■ 28℃; wild type strain of M-18.

M-18 中, *rsmA* 基因产物对 Plt 合成的负调控作用, 与其它生防菌株中, *rsmA* 基因产物对 HCN 和 Phl 的调控方式一致^[10]; 但是, 在 M-18 中, 首次发现 *rsmA* 基因突变对 PCA 合成具有一定程度的抑制作用。

在 28℃ 恒温和短期升温条件下, *rsmA* 突变引起 PCA 合成量某种程度的下降, 其原因可能是多方面的, 在野生株 M-18 和突变株 M-18R 中, 对 *phz* 基因的转录启动子与半乳糖苷酶基因融合的活性测定结果表明, *rsmA* 基因的突变对半乳糖苷酶活性并无显著影响; 在基因表达水平上, RsmA 并没有参与 PCA 合成的调控^[11]。推测在野生株 M-18 中, PCA 下降的原因可能来自细胞内物质代谢流的平衡和相互影响, 细胞内 Plt 的大量合成, 导致了 PCA 合成量的下降。在发酵过程中向培养基内添加外源 Plt 的实验表明, 外源的 Plt 能抑制野生株 M-18 合成 PCA 的能力(结果未显示)。

短期升温条件下, M-18 合成 Plt 的能力降低, 而 M-18R 合成 Plt 的能力则进一步提高。推测在野生型菌株中, RsmA 可能与某种温度敏感因子结合, 专一地抑制 Plt 的合成, 短期升温可能导致该温度敏感因子与 RsmA 的复合, 增强 RBS 的结合能力, 从而抑制 Plt 的合成; 但是, 当 *rsmA* 基因突变, 该温度敏感因子在游离状态下, 能促进 Plt 的合成, 短期升温可能提高了该温度敏感因子对 Plt 合成的促进作用, 也可能增加了该因子的合成量从而促进 Plt 的合成。但是, 研究结果表明, 该游离因子不具有促进 PCA 合成的功能。对该温度敏感因子的识别以及理化特性和生物学功能的研究有待进一步深入。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Dieter H, Christoph K. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* sp. and relevance for biological control of plant disease. *Ann Rev Phytopathol*, 2003, **41**(21): 1-37
- [2] Huang XQ, Zhu DH, Xu YQ *et al*. Identification and characterization of *pltZ*, a gene involved in the repression of pyoluteorin biosynthesis in *Pseudomonas* sp. M18. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, **232**(2): 197-202
- [3] Romeo T. Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the noncoding RNA molecule CsrB. *Mol Microbiol*, 1998, **29**(6): 1321-1330
- [4] Liu Y, Cui Y, Mukherjee A *et al*. Characterization of a novel RNA regulator of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* that controls production of extracellular enzymes and secondary metabolites. *Mol Microbiol*, 1998, **29**(1): 219-234
- [5] Cui Y, Mukherjee A, Dumenyo CK *et al*. RsmC of the soft-rotting bacterium *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* negatively controls extracellular enzyme and Harpin production virulence by modulating the levels of regulatory RNA (*rsmB*) and RNA binding protein (*RsmA*). *J Bacteriol*, 1999, **181**(19): 6042-6052
- [6] Blumer C, Heeb S, Pessi G *et al*. Global GacA-steered control of cyanide and exoprotease production in *Pseudomonas fluorescens* involves specific ribosome binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**(24): 14073-14078
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [8] Ausubel F, Brent R, Kingston RE *et al*. *Short Protocols in Molecular Biology*. 3rd ed. Boston: John Wiley and Sons, 1995
- [9] Zhang HZ (张惠展). *Pathway Engineering - the Third Generation of Genetic Engineering*. Beijing: China Light Industry Press, 2002
- [10] Heeb S, Blumer C and Dieter H. Regulatory RNA as mediator in GacA/RsmA dependent global control of exoproduct formation in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J Bacteriol*, 2002, **184**(4): 1046-1056
- [11] Zhong XH, Wang SL, Xu YQ *et al*. Differential regulation of *rsmA* gene on biosynthesis of pyoluteorin and phenazine-1-carboxylic acid in *Pseudomonas* sp. M18. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2004 (Submitted)