

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (8) :1010-1017; 4 August 2015
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140546

青枯菌 Rsc1285 参与 III 型分泌系统及致病力的调控

李牧原, 徐鹏霞, 张洵琪, 张勇*

西南大学资源环境学院, 重庆 400715

摘要: 【目的】研究青枯菌 Rsc1285 参与调控其 III 型分泌系统 (Type III secretion system, T3SS) 及致病力的途径。【方法】通过基因敲除、基因互补等研究 Rsc1285 对 T3SS 基因表达和致病力的影响。【结果】青枯菌 *rsc1285* 基因缺失突变体对寄主西红柿植株的致病力明显减弱, 其 *hrpB*、T3SS 等基因表达水平较野生型明显降低, 但 *hrpG*、*prhG* 的表达不受影响。【结论】青枯菌通过一个全新的途径利用 Rsc1285 调控 *hrpB* 及 T3SS 的转录表达并决定其致病力。

关键词: 青枯菌, III 型分泌系统, *hrp* 基因簇, 致病力

中图分类号: Q935 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 08-1010-08

青枯菌 (*Ralstonia solanacearum*) 是一种革兰氏阴性土传植物病原菌, 可侵染 50 多科 450 余种植物并导致毁灭性枯萎 (bacterial wilt, 又称青枯病), 是世界上分布最广、危害最严重的十大植物病原细菌之一^[1]。和其它革兰氏阴性病原细菌一样, 注射器状的 III 型分泌系统 (Type III secretion system, T3SS) 是青枯菌的一个决定性致病因子。青枯菌利用 T3SS 与寄主细胞互作, 将各种效应蛋白 (Type III effectors, T3Es) 注射到寄主细胞中, 以抑制寄主的免疫反应, 从而引起寄主感病^[2-3]。青枯菌 T3SS 由 *hrp* (hypersensitive response and pathogenicity) 基因簇编码, 而 *hrp* 基因簇及众多 T3Es 基因的转录表达受 AraC 家族转录调控因子 HrpB 直接控制, HrpB 通过对含 *hrp_n* 框 (TTTCG-N16-TTTCG) 启动子的结合控制 *hrp* 基因簇及众多 T3Es 基因的转录表达, 决定致病性^[4-6]。青枯菌 *hrpB* 的转录表达受到 OmpR/PhoB 家族二组分反应调节子 HrpG 和 PrhG 的共同正向

调控, 其中 *hrpG* 的转录表达受到 PrhA-PrhI/R-PrhJ 信号通路的正调控和 LysR 家族转录调控因子 PhcA 的间接负向调控, 而 *prhG* 的转录表达受 PhcA 的正调控但和 PrhA 信号通路无关^[8-10]。基于 PhcA 的群体效应特性 (quorum sensing), Zhang 等根据研究结果提出青枯菌可根据自身浓度变化切换 HrpG 和 PrhG 动态调控 *hrpB* 及 T3SS 表达的观点^[8]。青枯菌运用精密网络对 *hrp* 基因簇及 T3SS 进行全局性调控, 但迄今仍有大量的调控过程有待揭示^[3-4, 11-12]。为进一步阐明青枯菌 *hrp* 基因簇及 T3SS 表达被调控的分子机理, 我们构建了 *popA-lacZYA* 融合报告基因以表征青枯菌 *hrp* 基因簇的表达水平 (*popA* 基因位于 *hrp* 基因簇的左侧外端, 受 HrpB 的直接调控, 具有和 *hrp* 基因簇相同的表达特性, 其结构示意图可见^[8]), 通过构建转座子突变体文库筛选了一批可能影响青枯菌 T3SS 基因表达的未知因子^[8], 本文以 Rsc1285 为研究对象 (*rsc1285*

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31200067); 中央高校基本科研业务费 (XDJK2013C156, SWU113016)

* 通信作者。Tel: +86-23-68250994; Fax: +86-23-68250109; E-mail: biyongzhang@gmail.com

作者简介: 李牧原 (1990-), 女, 重庆人, 硕士, 主要从事微生物功能基因研究。E-mail: limuyuanjr@163.com

收稿日期: 2014-11-19; 修回日期: 2015-01-26

基因位于青枯菌染色体上, 编码产物推定和原核细胞染色体分离、染色质凝聚等相关), 通过构建 *rsc1285* 基因缺失突变体和基因互补等实验, 初步研究了 Rsc1285 对青枯菌 *hrp* 基因簇转录表达及致病性的影响, 有助于我们从分子水平进一步了解青枯菌致病的全局性调控网络。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株、质粒及培养条件: 本实验所用菌

株、质粒等见表 1。青枯菌及其衍生菌株均来自 OE1-1 (生理小种 1, 生化型 4, 对番茄和烟草都具有强致病力)^[13], 大肠杆菌 DH5 α 和 S17-1^[14] 分别用于质粒构建和融合。青枯菌采用 B 培养液 (rich medium) 和基础培养液 (*hrp*-inducing medium, 又称 sucrose medium), 在 28 °C 条件下振荡培养^[15]。大肠杆菌采用 LB 培养液, 37 °C 振荡培养。抗生素使用浓度: 氨苄青霉素 (Ap) 100 μ g/mL; 卡那霉素 (Km) 50 μ g/mL; 庆大霉素 (Gm) 20 μ g/mL; 多粘菌素 B (Polymyxin B, PB, 用于青枯菌培养) 50 μ g/mL。

表 1. 本文所用的菌株及质粒

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in the study

Strain or plasmid	Description	Source or references
strain		
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>mcrA</i> ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15, <i>recA1</i> , <i>endA1</i>	Laboratory stock
<i>E. coli</i> S17-1	<i>TpR</i> , <i>SmR</i> , <i>recA</i> , <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>hsdR-M</i> + RP4	[15]
<i>R. solanacearum</i> OE1-1	wild type, race 1, biovar 4, virulence on tobacco and tomato	[13]
RK5050	OE1-1 (<i>popA-lacZYA</i>)	[17]
RK5046	OE1-1 (<i>hrpB-lacZYA</i>)	[17]
RK5120	OE1-1 (<i>hrpG-lacZYA</i>)	[17]
RK5212	OE1-1 (<i>prhG-lacZYA</i>)	[8]
RK5701	RK5050 (Δ <i>rsc1285</i>)	This study
RK5704	RK5046 (Δ <i>rsc1285</i>)	This study
RK5707	RK5120 (Δ <i>rsc1285</i>)	This study
RK5710	RK5212 (Δ <i>rsc1285</i>)	This study
RK5713	RK5701 (<i>rsc1285</i> complementation)	This study
plasmid		
pBluescript II KS (+)	Amp ^r , <i>LacZ</i> α ,	Laboratory stock
pK18mobSacB	Kam ^r , oriT (RP4), <i>SacB</i> , <i>LacZ</i> α	[16]
pUC18-miniTn7T-Gm	Gm ^r , Tn7T,	[18]
pTNS2	Amp ^r , T7 transposase expression vector	[18]
pK18d1285	Kam ^r , <i>SacB</i> , for <i>rsc1285</i> gene deletion	This study
pUC1285	Gm ^r , for <i>rsc1285</i> complementation	This study

1.1.2 主要试剂: PCR 聚合酶 (Primstar HS polymerase, 添加 GC-rich buffer、dNTP 等)、限制性内切酶 (*Bam*H I、*Hind* III、*Eco*R I、*Eco*R V 等)、DNA 连接酶 (DNA Ligation Kit V2.1) 等购自大连宝生物 (TaKaRa) 公司; DNA Marker、DNA 染料 (Gold View) 等购置于天根公司; 质粒大、小提试剂盒、琼脂糖凝胶中 DNA 回收试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒等购自 Omega 公司 (EZNA 系列); 所用抗生素、IPTG、X-gal 等购自 Sigma 公司; 无机盐试剂、蔗糖、葡萄糖等购自上海生工公司; 引物合成及 DNA 测序由上海生工公司完成。

1.2 青枯菌 *rsc1285* 基因缺失突变体的构建

本实验利用基于质粒 pK18mobSacB 的同源重组技术对目标基因进行敲除 (图 1)^[16]。构建 *rsc1285* 基因 (1008 bp) 缺失质粒时, 参照 GMI1000 全基因组序列 (<https://iant.toulouse.inra.fr/bacteria/annotation/cgi/ralso.cgi>) 分别在 *rsc1285* 基因的上下游设计成对引物: 上游引物对 *rsc1285A1x* (5'-CGTCTAGAGAACCTGCTGATGATGTC-3', 含 *Xba* I 酶切位点) 和 *rsc1285B1* (5'-TCGCCGGCAGACA CGGCCGGTTGAGCGGCTCGTCAT-3'), 下游引物对 *rsc1285A2* (5'-ATGACGAGCCGCTCAACCCGGCCGT GTCTGCCGCGCA-3') 和 *rsc1285B2H* (5'-CGAAGC

TTCACGTACTGGAAGACGT-3', 含 *Hind* III 酶切位点)。其中, *rsc1285B1* 和 *rsc1285A2* 完全互补, 各含 *rsc1285* 上下游 18 bp DNA 序列。以青枯菌 OE1-4 基因组 DNA 为模板分别 PCR 扩增 *rsc1285* 基因的上下游 DNA 片段 (大小各为约 600 bp), PCR 扩增条件: 98 °C 1 min; 98 °C 10 s, 62 °C 5 s, 72 °C 50 s, 30 个循环; 72 °C 5 min; 4 °C。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳纯化, 提取目标 DNA 片段, 将上下游 DNA 片段混合并用引物对 (*rsc1285A1X* 和 *rsc1285B2H*) 进行扩增, 所得 PCR 产物 (大小约 1.2 kb) 经琼脂糖凝胶电泳纯化提取。所提 DNA 经 DNA 连接酶 (DNA Ligation Kit V2.1) 作用插入到 *EcoR* V 酶切的 pBluescript II KS(+) 质粒 (16 °C, 1 h), 然后转化到 *E. coli* DH5 α , LB + Ap + X-gal + IPTG 平板涂布并挑选白菌落, 液体 (LB + Ap) 培养并提取质粒。提取质粒经 *Bam*H I-*Hind* III 双酶切检验合格后, 交由上海生工进行序列测定, 取测序验证无突变的质粒用于下一步实验, 命名为 pKSd1285。用 *Bam*H I-*Hind* III 双酶切 pKSd1285, 琼脂糖凝胶电泳分离、提取

1.2 kb 的插入片段, 连接到 *Bam*H I-*Hind* III 双酶切的 pk18mobsacB 质粒中并转化到 *E. coli* DH5 α , 涂布到 LB + Km + X-gal + IPTG 平板, 挑选白菌落, 液体 (LB + Km) 培养并提取质粒。提取的质粒经 *Bam*H I-*Hind* III 双酶切、基因测序验证合格后, 命名为 pK18d1285, 用于基因敲除实验。质粒 pK18d1285 经 *E. coli* S17-4 转化、融合到青枯菌中 (青枯菌和大肠杆菌混合后用 0.45 μ m 膜过滤), 分别经 Km 和蔗糖筛选后, 用引物对 *rsc1285A1x* 和 *rsc1285B2H* 对所得菌落进行菌落 PCR 验证, 其中 DNA 片段为 1.2 kb 的菌落为 *rsc1285* 缺失菌株 (野生型所得 DNA 片段为 2.2 kb)。

利用该方法将 pK18d1285 分别融合到青枯菌 RK5050 (OE1-4 *popA-lacZAY*)^[17]、RK5046 (OE1-4 *hrpB-lacZAY*)、RK5120 (OE1-4 *hrpG-lacZAY*)、5212 (OE1-4 *prhG-lacZAY*) 中, 最终得到 *rsc1285* 基因缺失菌株 RK5701 (*popA-lacZAY*, Δ *rsc1285*)、RK5704 (*hrpB-lacZAY*, Δ *rsc1285*)、RK5707 (*hrpG-lacZAY*, Δ *rsc1285*) 和 5710 (*prhG-lacZAY*, Δ *rsc1285*)。

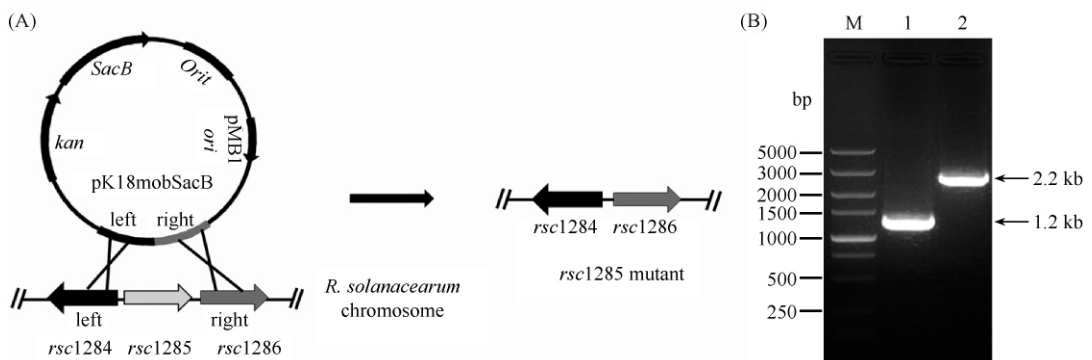


图 1. 青枯菌 *rsc1285* 基因缺失突变体的构建

Figure 1. Construction of *rsc1285* mutant with in-frame deletion using pK18mobSacB based homologous recombination (modified from^[16]); B: Confirmation of *rsc1285* mutant via PCR.

M: 5000 bp DNA ladder (TaKaRa); lane 1: *rsc1285* deletion mutant RK5701; lane 2: wild type strain RK5050.

1.3 互补菌株的构建

本实验利用 Tn7T (pUC18mini-Tn7T-Gm) 介导的定点插入体系进行互补研究, 目标 DNA 经该系统可定点插入到青枯菌 *glms* 基因下游 25 bp 处 (图 2)^[18]。以青枯菌 OE1-4 基因组 DNA 为模板, *rsc1285A1x* 和 *rsc1285B3H* (5'-CGAAGCTTCTATGGATGTTTCGTTGCCGGTA-3') 为引物扩增 *rsc1285* 基因 (含上游约 600 bp 区域, 可能包含其启动子), 所得 PCR 产物 (1.6 kb) 经琼脂糖凝胶

电泳纯化、连接到 *EcoR* V 酶切的 pBluescript II KS(+) 质粒上。所得质粒经酶切、测序验证后, 命名为 pKS1285C, 并用于下一步互补质粒构建。用 *Bam*H I-*Hind*III 双酶切 pKS1285C, 琼脂糖凝胶电泳分离, 提取 1.6 kb 片段并连接到 *Bam*H I-*Hind*III 双酶切的 pUC18mini-Tn7T-Gm 中。所得质粒经酶切、测序验证合格后, 用于互补实验, 命名为 pUC1285。pUC1285 和含转座酶的质粒 pTNS2 经电击, 共同导入到 RK5701 菌株中, 并进

行 Gm 抗性筛选, 对所得菌落用引物对 *glms*down (5'-GCGCTCAAGCTCAAGGAGATC-3')^[7] 和 Tn7R (5'-CACAGCATAACTGGACTGATTC-3')^[18] 进行菌落

PCR 验证后用于互补实验 (目标片段为 500 bp), 所得菌株命名为 RK5713 (*popA-lacZYA Δrsc1285/rsc1285*)。

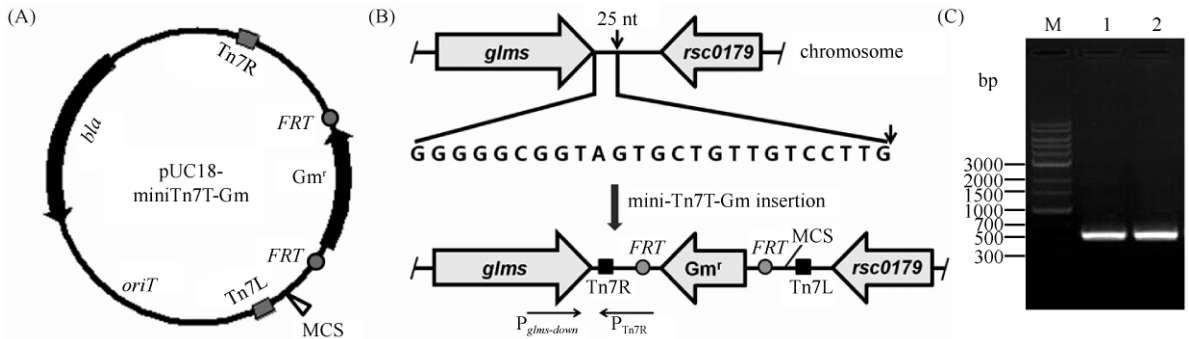


图 2. 基于 Tn7T 定点插入体系的互补菌株构建

Figure 2. Construction of complemented strains using Tn7T based site-specific integration system. A: Structure of pUC18-mini-Tn7T-Gm (modified from^[18]); B: Schematic diagram of site-specific integration into the chromosome of *R. solanacearum*; C: Confirmation of *rsc1285* complemented strain via PCR. M: 10 kb DNA ladder (TaKaRa); lane 1, 2: two complemented strains (including RK5713).

1.4 β-半乳糖苷酶活性测定

本实验以报告基因 *lacZYA* 的表达水平来表征融合基因的表达水平, *lacZ* 编码 β-半乳糖苷酶活性的测定参照 Yoshimochi 等^[17] 方法。青枯菌在 *hrp* 诱导培养液中培养一定时间后 (OD_{600} 约为 0.1) 用于酶活测定, 每个实验至少重复 3 次后计算平均值和标准方差。

1.5 致病性测定

参照 Zhang 和 Yao 等^[8,19] 接种法, 采用灌根接种和叶柄伤口接种两种方法侵染番茄易感品种 (*Solanum lycopersicum* cv. MoneyMaker)。灌根接种时按 10^7 CFU/g 土壤的标准进行, 叶柄伤口接种时, 将 2 μL 的 10^7 CFU/mL 菌液滴到新切的叶柄伤口处。每菌至少侵染 12 株番茄植株, 每天观察发病情况, 持续观察 2-3 周, 参照 Meng 等^[20] 调查方法按 0-4 级记录病情指数。每个实验至少重复 3 次后计算平均值和标准方差。

1.6 青枯菌在番茄植株内生长测定

参照 Zhang 等^[8] 方法测定青枯菌在番茄植株内的生长情况。青枯菌以叶柄伤口接种番茄植株后, 分别在接种 4 d 和 7 d 后 (分别对应病情指数 1 和 4), 切取地上 5 cm 处番茄茎部 (约 1 cm 长), 称重、研磨后稀释铺平板、计算菌数。每个实验至少重复 3 次后计算平均值和标准方差。

2 结果和分析

2.1 青枯菌 *rsc1285* 基因缺失突变体的构建与鉴定

青枯菌 $\Delta rsc1285$ 突变体的构建分别经过 Km 和蔗糖筛选, 其中第二步的蔗糖筛选是利用质粒上蔗糖致死基因挑选不含质粒的菌株 (即基因缺失突变体和野生型回复突变体)。对最终筛选到的菌落以 *rsc1285A1x* 和 *rsc1285B2H* 为引物进行 PCR 扩增, 其中 PCR 片段大小为 1.2 kb 的菌落为 *rsc1285* 基因敲除突变体 (野生型对应 2.2 kb 片段, 图 1-B)。从琼脂糖凝胶中提取 1.2 kb 的 DNA 片段并送交上海生工公司进行测序, 选 *rsc1285* 基因缺失, 但其上下游基因序列未发生碱基突变的菌落为 *rsc1285* 基因缺失突变体。通过该方法分别得到 *rsc1285* 基因敲除菌株 RK5701 (*popA-lacZAY Δrsc1285*)、RK5704 (*hrpB-lacZAY Δrsc1285*)、RK5707 (*hrpG-lacZAY Δrsc1285*) 和 5710 (*prhG-lacZAY Δrsc1285*)。

2.2 互补菌株的构建与鉴定

1.6 kb 的 *rsc1285* 基因 (含上游约 600 bp 区域, 可能包含启动子) 经 pUC18-mini-Tn7T-Gm 介导插入到青枯菌 *glms* 基因下游 25 bp 处, 筛选具有 Gm 抗性的菌落并以 *glms*down 和 Tn7R 为引物进行 PCR

扩增,所得片段为 500 bp 的菌落表示 *rsc1285* 基因的插入(图 2-C),所得互补菌株命名为 RK5713 (*popA-lacZAY Δrsc1285/rsc1285*)。

2.3 Rsc1285 对青枯菌 *popA* (T3SS) 表达的影响

当 *rsc1285* 因转座子插入失活后,青枯菌 OE1-1 的 *popA* 表达水平明显降低,表明 Rsc1285 可能是 *popA* (T3SS) 基因表达必需的。在 RK5701 (*popA-lacZAY Δrsc1285*) 中,其 *popA* 的表达水平降低为 98 (± 19) Miller 单位,明显低于野生型的 341 (± 25) Miller 单位(图 3),该结果和转座子突变体结果一致。而在互补突变体 RK5713 (*popA-lacZAY Δrsc1285/rsc1285*) 中,*rsc1285* 基因的导入可以把 RK5701 的 *popA* 表达水平恢复到野生型水平(图 3)。这些结果证实 Rsc1285 是青枯菌 *popA* (T3SS) 基因表达的一个重要影响因子。

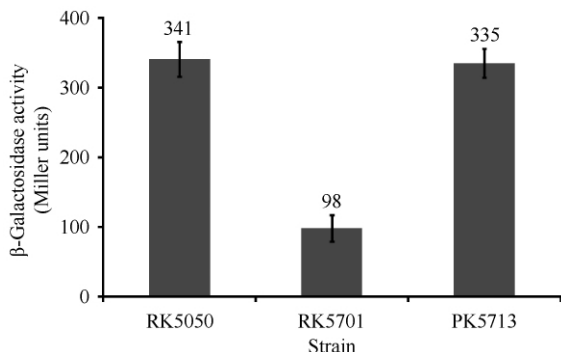


图 3. Rsc1285 对青枯菌 *popA* 表达水平的影响

Figure 3. Effect of Rsc1285 on *popA* expression in *R. solanacearum*. RK5050 : *popA-lacZAY*; RK5701 : *popA-lacZAY Δrsc1285*; RK5713 : *popA-lacZAY Δrsc1285/rsc1285*.

2.4 Rsc1285 对青枯菌致病力的影响

以伤根接种法侵染番茄植株时,青枯菌 RK5050 接种的番茄植株在接种 4 d 后出现枯萎症状(病情指数为 1),接种 10 d 后全部枯萎死亡(病情指数为 4); RK5701 接种的番茄植株在接种 6 d 后出现枯萎症状(病情指数约为 0.5),接种 10 d 后病情指数达 2.1,接种 16 d 后病情指数达到最高,约为 3.3,两者差异显著 ($P < 0.05$ 或 0.01),而在互补突变体 RK5713 中,*rsc1285* 基因的导入可以把 RK5701 的弱致病力恢复到野生型水平(图 4)。这些结果证实 Rsc1285 是青枯菌对寄主植物致病的一个重要因子。

2.5 Rsc1285 与青枯菌在培养液和寄主体内生长的关系

液体培养时(B 培养液和 *hrp* 诱导培养液)中,

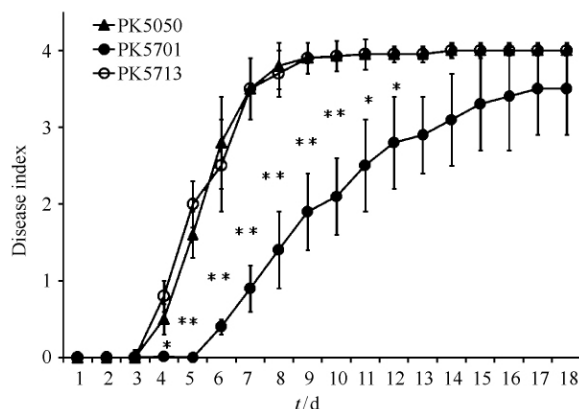


图 4. 青枯菌 Rsc1285 对致病力的影响

Figure 4. Effect of Rsc1285 on pathogenicity of *R. solanacearum*. RK5050 : *popA-lacZAY*; RK5701 : *popA-lacZAY Δrsc1285*; RK5713 : *popA-lacZAY Δrsc1285/rsc1285*. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

RK5701 展现出和野生型 (RK5050) 完全相同的生长曲线(数据未显示)。当以叶柄伤口接种法侵染番茄植株时,RK5701 在番茄茎部也展现和 RK5050 相同的生长趋势,4 d 后约为 10^8 CFU/g,7 d 后约为 10^{10} CFU/g(图 5),表明 Rsc1285 不影响青枯菌在培养液和寄主体内的生长。

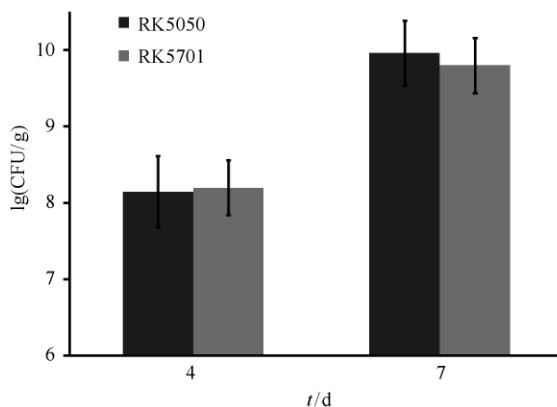


图 5. Rsc1285 与青枯菌在寄主体内生长的关系

Figure 5. Effect of Rsc1285 on bacterial growth *in planta*. RK5050 : *popA-lacZAY*; RK5701 : *popA-lacZAY Δrsc1285*.

2.6 Rsc1285 调控青枯菌 *hrpB* 基因的表达,但和 *hrpG*、*prhG* 表达无关

青枯菌 *hrp* 基因簇及众多 T3Es 基因的表达受 HrpB 的直接控制,而 *hrpB* 基因的表达受 HrpG 和 PrhG 的正向调控。当 *rsc1285* 基因被敲除后,*hrpB-lacZAY* 的表达水平降低为 65 (± 9) Miller 单位,明显低于野生型的 173 (± 11) Miller 单位(图 6),表明

Rsc1285 是青枯菌 *hrpB* 基因表达的一个重要因子。而 *rsc1285* 基因的缺失并不影响 *hrpG*、*prhG* 的表达水平 (图 6), 表明 Rsc1285 通过 HrpB 控制 T3SS 基因的表达, 但和 HrpG、PrhG 无关。

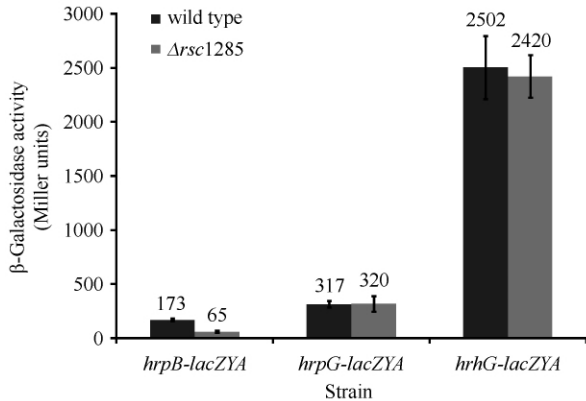


图 6. 青枯菌 Rsc1285 与 *hrpB*、*hrpG* 和 *prhG* 表达的关系

Figure 6. Effect of Rsc1285 on the expression of *hrpB*, *hrpG* and *prhG* in *R. solanacearum*. From left to right, RK5046 (*hrpB-lacZAY*), RK5704 (*hrpB-lacZAY* $\Delta rsc1285$); RK5120 (*hrpG-lacZAY*), RK5707 (*hrpG-lacZAY* $\Delta rsc1285$); RK5212 (*prhG-lacZAY*), 5710 (*prhG-lacZAY* $\Delta rsc1285$). Black bar, wild type; gray bar, *rsc1285* deletion mutant.

3 讨论

作为世界上分布最广、危害最严重的十大植物病原细菌之一, 青枯菌的致病机理一直都是大家广泛研究的热点。其中注射器状的 T3SS 是青枯菌与寄主细胞互动、产生致病性的一个决定因子, 而 HrpB 直接控制 *hrp* 基因簇、T3SS 及众多 T3Es 的表达。迄今, 大量研究揭示了青枯菌调控 *hrp* 基因簇及 T3SS 的精密网络, 但最近的一些研究表明青枯菌 T3SS 被调控的机制远比科学家想象的复杂和精妙^[21-22]。如 Schmidtke 等通过转录组研究发现一些小 RNA 和 T3SS 相关^[23]; Monteiro 和 Jacobs 等从体内 (*in planta*) 互动角度重新审视青枯菌的致病过程并取得了一些全新的发现^[24-25]; 我们之前也通过构建转座子突变体文库也筛选到了一些影响青枯菌 *hrp* 基因簇表达的未知因子^[8], 因此研究青枯菌 *hrpB*、T3SS 等转录表达被调控的途径, 有助于我们从分子水平进一步了解青枯菌致病的全局性调控网络。

Rsc1285 是我们前期通过转座子突变技术筛选到的一个可能影响 *hrp* 基因簇及 T3SS 表达的正向调控因子^[8]。本文通过基因敲除、基因互补等实验初步研究了 Rsc1285 对青枯菌 *hrpB*、T3SS 转录表达和致病性的影响。在青枯菌 GMI1000 基因组中, Rsc1285 被注释为可能和原核细胞染色体分离及染色质凝集相关的蛋白 B (Putative prokaryotic chromosome segregation and condensation protein B, SepB), 可能和细胞的分裂过程相关^[26-27]。此外, 通过和 *Ralstonia eutropha* ATCC 17699、H16、DSM 428、337 等菌株比较, Rsc1285 也可能是一个转录调控因子 (<https://iant.toulouse.inra.fr/bacteria/annotation/cgi/ralso.cgi>)。但本研究发现, 无论在营养丰富型、贫瘠型培养液中, 还是在寄主番茄植株体内, *rsc1285* 缺失突变体都展现出和野生型菌株相同的生长特性, 表明 Rsc1285 可能并不是青枯菌细胞分裂过程的重要影响因子。当 *rsc1285* 基因缺失时, 青枯菌 *hrpB*、T3SS 的转录表达水平明显降低, 表明 Rsc1285 通过 HrpB 影响了青枯菌 T3SS 的转录表达。青枯菌 *hrpB* 的转录表达受到 HrpG 和 PrhG 的共同正向调控^[8-9], 但 Rsc1285 的有无并不影响青枯菌 *hrpG* 和 *prhG* 的转录表达水平, 因此, Rsc1285 可能通过一个全新的途径调控青枯菌 *hrpB* 的转录表达。当侵染寄主番茄植株时, *rsc1285* 缺失突变体较野生型菌株的致病力显著减弱, 其较野生型菌株发病晚 2 d, 且发病程度相对减弱, 但致病性并未完全丧失, 表明 Rsc1285 在一定程度上参与了青枯菌对寄主植物的致病过程, 但不是致病的决定因子。此外, 进一步研究表明: 在运动性和生物膜形成方面, *rsc1285* 缺失突变体较野生型无明显差异 (数据未显示)。因此, Rsc1285 通过一个全新的途径控制青枯菌的致病过程, 该结果有助于我们从分子水平进一步了解青枯菌致病的全局性调控过程。

参考文献

- [1] Mansfield J, Genin S, Magori S, Citovsky V, Sriariyanum M, Ronald P, Dow M, Verdier V, Beer SV, Machado MA, Toth I, Salmond G, Foster GD. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 2012, 13:614-629.
- [2] Büttner D, He SY. Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria. *Plant Physiology*, 2009, 150 (4): 1656-1664.

- [3] Poueymiro M, Genin S. Secreted proteins from *Ralstonia solanacearum*: a hundred tricks to kill a plant. *Current Opinion in Microbiology*, 2009, 12:44-52.
- [4] Coll NS, Valls M. Current knowledge on the *Ralstonia solanacearum* type III secretion system. *Microbial Biotechnology*, 2013, 6:614-620.
- [5] Peeters N, Carre`re S, Anisimova M, Plener L, Cazale AC, Genin S. Repertoire, unified nomenclature and evolution of the Type III effector gene set in the *Ralstonia solanacearum* species complex. *BMC Genomics*, 2013, 14:859.
- [6] Mukaihara T, Tamura N, Iwabuchi M. Genome-wide identification of a large repertoire of *Ralstonia solanacearum* type III effector proteins by a new functional screen. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2010, 23: 251-262.
- [7] VanGijsegem F, Gough C, Zischek C, Niqueux E, Arlat M, Genin S, Barberis P, German S, Castello P & Boucher C. The *hrp* gene locus of *Pseudomonas solanacearum*, which controls the production of a type III secretion system, encodes eight proteins related to components of the bacterial flagellar biogenesis complex. *Molecular Microbiology*, 1995, 15:1095-1114.
- [8] Zhang Y, Chen L, Yoshimochi T, Kiba A, hikichi Y, Ohnishi K. Functional analysis of *Ralstonia solanacearum* PrhG regulating the *hrp* regulon in host plants. *Microbiology-SGM*, 2013, 159: 1695-1704.
- [9] Plener L, Manfredi P, Valls M, Genin S. PrhG, a transcriptional regulator responding to growth conditions, is involved in the control of the type III secretion system regulon in *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(4) :1011-1019.
- [10] Yoshimochi T, Hikichi Y, Kiba A, Ohnishi K. The global virulence regulator PhcA negatively controls the *Ralstonia solanacearum* *hrp* regulatory cascade by repressing expression of the PrhIR signaling proteins. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191:3424-3428.
- [11] Hikichi Y, Yoshimochi T, Tsujimoto S, Shinohara R, Nakaho K, Kanda A, Kiba A, Ohnishi K. Global regulation of pathogenicity mechanism of *Ralstonia solanacearum*. *Plant Biotechnology*, 2007, 24:149-154.
- [12] Valls M, Genin S, Boucher C. Integrated regulation of the type III secretion system and other virulence determinants in *Ralstonia solanacearum*. *PLoS Pathogen*, 2006, 2:e82.
- [13] Kanda A, Ohnishi S, Tomiyama H, Hasegawa H, Yasukohchi M, Kiba A, Ohnishi K, Okuno T, Hikichi Y. Type III secretion machinery-deficient mutants of *Ralstonia solanacearum* lose their ability to colonize resulting in loss of pathogenicity. *Journal of General Plant Pathology*, 2003, 69: 250-257.
- [14] Simon R, Priefer U, Pühler A. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Nature Biotechnology*, 1994, 1: 784-791.
- [15] Zhang Y, Kiba A, hikichi Y, Ohnishi K. *prhKLM* genes of *Ralstonia solanacearum* encode novel activators of *hrp* regulon and are required for pathogenesis in tomato. *FEMS Microbiology Letter*, 2011, 317: 75-82.
- [16] Sch`afer A, Tauch A, Jager W, Kalinowski J, Thierbach G & P`uhler A. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene*, 1997, 145: 69-73.
- [17] Yoshimochi T, Zhang Y, Kiba A, Hikichi Y & Ohnishi K. Expression of *hrpG* and activation of response regulator HrpG are controlled by distinct signal cascades in *Ralstonia solanacearum*. *Journal of General Plant Pathology*, 2009, 75: 196-204.
- [18] Choi KH, Gaynor JB, White KG, Lopez C, Bosio CM, Karkhoff- Chweizer RR, Schweizer HP. A Tn7-based broad range bacterial cloning and expression system. *Nature Methods*, 2005, 2:443-448.
- [19] Yao J and Allen C. The plant pathogen *Ralstonia solanacearum* needs aerotaxis for normal biofilm formation and interactions with its tomato host. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189: 6415-6424.
- [20] Meng F, Yao J, Allen C. MotN mutant of *Ralstonia solanacearum* is hypermotile and has reduced virulence. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(10) : 2477-2486.
- [21] Nahar K, Matsumoto I, Taguchi F, Inagaki Y, Yamamoto M, Toyoda K, Shiraishi T, Ichinose Y, Mukaihara T. *Ralstonia solanacearum* type III secretion system effector Rip36 induces a hypersensitive response in the nonhost wild eggplant *Solanum torvum*. *Molecular Plant Pathology*, 2014, 15:297-303.
- [22] Deslandes L, Genin S. Opening the *Ralstonia solanacearum* type III effector tool box: insights into host cell subversion mechanisms. *Current Opinion in Plant Biology*, 2014, 20: 110-117.
- [23] Schmidtke C, Findeiss S, Sharma CM, Kuhfuss J,

- Hoffmann S, Vogel J, Stadler PF, Bonas U. Genome-wide transcriptome analysis of the plant pathogen *Xanthomonas* identifies sRNAs with putative virulence functions. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40: 2020-2031.
- [24] Jacobs JM, Babujee L, Meng F, Milling A, Allen C. The *in planta* transcriptome of *Ralstonia solanacearum*: conserved physiological and virulence strategies during bacterial wilt of tomato. *MBio*, 2012, 3: e00114-e212.
- [25] Monteiro F, Genin S, Van Dijk I, Valls M. A luminescent reporter evidences active expression of *Ralstonia solanacearum* type III secretion system genes throughout plant infection. *Microbiology-SGM*, 2012, 158: 2107-2116.
- [26] Soppa J, Kobayashi K, Noirot-Gros MF, Oesterhelt D, Ehrlich SD, Dervyn E, Ogasawara N, Moriya S. Discovery of two novel families of proteins that are proposed to interact with prokaryotic SMC proteins, and characterization of the *Bacillus subtilis* family members SepA and SepB. *Molecular Microbiology*, 2002, 45: 59-71.
- [27] Mascarenhas J, Soppa J, Strunnikov AV, Graumann PL. Cell cycle-dependent localization of two novel prokaryotic chromosome segregation and condensation proteins in *Bacillus subtilis* that interact with SMC protein. *EMBO Journal*, 2002, 21: 3108-3118.

Regulation of *rsc1285* gene in type III secretion system in *Ralstonia solanacearum*

Muyuan Li, Pengxia Xu, Weiqi Zhang, Yong Zhang*

College of Resources and Environment, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: [Objective] Rsc1285 is one of the putative T3SS-regulated factors in *Ralstonia solanacearum*, and the regulation of Rsc1285 on T3SS and pathogenicity was characterized. [Methods] The *rsc1285* deletion mutants were constructed by homologous recombination and characterized by complementation. [Results] The *rsc1285* mutant was significantly less virulent than the wild-type strain to infect tomato plants. Rsc1285 controls the expression of *hrpB* and *HrpB*-regulating genes, but it is dispensable for the expression of *hrpG* and *prhG*. [Conclusion] *R. solanacearum* uses Rsc1285 to control the T3SS and pathogenicity via a novel pathway, and this finding provides insights into overall infection mode of *R. solanacearum*.

Keywords: *Ralstonia solanacearum*, Type III secretion system, *hrp* regulon, pathogenicity

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31200067) and by the Basic Scientific Research Foundation of Central Colleges (XDJK2013C156, SWU113016)

* Corresponding author. Tel: +86-23-68250994; Fax: +86-23-68250109; E-mail: bioyongzhang@gmail.com

Received: 19 November 2014 / Revised: 26 January 2015