

RsmB Involved in Modulation of the Pyrrolnitrin Biosynthesis in *Serratia plymuthica*

Xiaoli Yu*, Guang Huang*, Song Guo, Yunfei Duan, Yan Wu, Xiaoguang Liu#

School of Life Sciences, Jiangsu University, Zhenjiang Jiangsu

Email: #xgliu66@yahoo.com

Received: May 1st, 2020; accepted: May 15th, 2020; published: May 22nd, 2020

Abstract

The Csr/Rsm-family small RNAs (sRNAs) have been established as major post-transcriptional regulators of gene expression in γ -proteobacteria, implicated in a variety of biological process and social behavior such as cell motility, biofilm formation, especially the biosynthesis pathway of several antibiotics such as hydrogen cyanide and phenazines. However, whether they affect production of the antibiotic pyrrolnitrin remains unclear. In this work, using the endophytic *Serratia plymuthica* wild type G3 and its RsmB mutant as model strains, mutational analysis of pyrrolnitrin production, antifungal activity and other phenotypes, combined with TLC bioassay of AHL production demonstrated for the first time that in *S. plymuthica* G3, RsmB functions as a pleiotropic regulator to be involved in controlling the pyrrolnitrin biosynthesis at both transcriptional and translational levels via affecting the globally transcriptional regulation system such as quorum sensing at least. In addition, RsmB also upregulated antifungal activity accordingly, along with protease and biofilm formation. This will help get some insight into the role of the Rsm system in pyrrolnitrin biosynthesis.

Keywords

Serratia plymuthica, Small Regulatory RNA RsmB, Pyrrolnitrin Biosynthesis, Quorum Sensing, N-Acylhomoserine Lactone (AHL)

RsmB调控普城沙雷氏菌硝吡咯菌素的生物合成

于晓莉*, 黄光*, 郭松, 段云飞, 吴岩, 刘晓光#

*作者贡献相同。

#通讯作者。

文章引用: 于晓莉, 黄光, 郭松, 段云飞, 吴岩, 刘晓光. RsmB 调控普城沙雷氏菌硝吡咯菌素的生物合成[J]. 农业科学, 2020, 10(5): 285-291. DOI: 10.12677/hjas.2020.105042

江苏大学生命科学学院, 江苏 镇江
Email: "xgliu66@yahoo.com

收稿日期: 2020年5月1日; 录用日期: 2020年5月15日; 发布日期: 2020年5月22日

摘要

研究表明 γ -变形杆菌中的Csr/Rsm家族小RNA主要在转录后水平参与全局调控基因表达、控制多种生物学过程, 以及调节细菌运动性和生物膜形成等社会行为, 并参与调控氢氰酸和酚嗪等抗生素的生物合成。本研究使用内生菌普城沙雷氏菌野生菌株G3及其小RNA突变株 $\Delta rsmB$ 为试验菌株, 组合表型突变分析、定性TLC层析和LC-MS定量分析, 检测了抗生素硝吡咯菌素PRN和群体感应信号分子N-乙酰基高丝氨酸内酯AHL (N-acylhomoserine lactone)的合成水平。结果表明G3菌株RsmB小RNA作为全局调控子可正向控制PRN和AHL产生, 以及蛋白酶活性和生物膜的形成。首次证明RsmB小RNA可通过影响AHL介导的群体感应系统, 分别在转录和转录后水平上调PRN生物合成水平。为进一步通过操纵细菌Rsm系统遗传改良生防菌提供了新策略。

关键词

普城沙雷氏菌, RsmB小RNA, 硝吡咯菌素合成, 群体感应, N-乙酰基高丝氨酸内酯

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

表观遗传学研究表明, 非编码调控 RNA, 也称为小 RNA (sRNA)在调控细菌基因表达方面发挥多元化重要作用, 因而也备受关注[1] [2]。在革兰氏阴性细菌中已知有两种主要类型的调控 sRNA。一种属于依赖 Hfq 的 sRNAs, 通过 RNA 分子伴侣 Hfq 介导靶基因 mRNA 的 5'-非翻译区(5'-UTR)与某些 sRNAs 的碱基配对, 干扰或促进靶基因 mRNA 与核糖体的结合, 从而调控 mRNA 的翻译或稳定性。第二种是 CsrB 家族 sRNAs, 他们与 RNA 结合蛋白 CsrA/RsmA, 以及 sRNA 分解因子 GGDEF/EAL 域蛋白 CsrD 等一起组成 Csr/Rsm 转录后全局调控系统, 位于细菌调控网络的中心, 并整合其他调控因子协同控制细菌的碳代谢、分泌系统、毒力或生防因子、运动性以及生物膜形成、胁迫反应和细菌定植等生理活动和行为, 从而影响其适应性。其中 CsrA/RsmA, 通常与核糖体的 SD 序列结合, 导致靶基因 mRNA 的翻译受抑制。而 CsrB/CsrC sRNAs 及其同源物 RsmB/RsmC 等, 包含多个 CsrA/RsmA 的结合位点 A(N)GGA, 作为 CsrA/RsmA 翻译阻遏蛋白的拮抗物发挥作用。可与多个 CsrA/RsmA 蛋白结合释放核糖体结合位点, 解除其翻译抑制[3] [4]。

生防因子普城沙雷氏菌 *S. plymuthica*, 可产生多种抗真菌因子, 包括几丁质酶、 β -1,3-葡聚糖酶等细胞壁降解酶, 以及硝吡咯菌素(pyrrrolnitrin, PRN)和植物生长素吲哚乙酸 IAA 等, 在德国已经被开发并注册为生物农药。其中抗生素 PRN 具有广谱抗真菌、抗细菌和抗线虫活性, 作为苯吡咯家族杀真菌剂 (fludioxonil and fenpiclonil)的天然前导化合物在农业和制药领域具有广阔的应用前景。更重要的是, 30 多年来鲜有田间应用产生抗药性的报道[5] [6]。PRN 由操纵子 *prnABCD* 编码, 核酸序列高度保守, 仅由

少数细菌 *Pseudomonas Burkholderia* 和 *Serratia* 等产生。我们前期已经克隆和鉴定了 *S. plymuthica* 内生菌株 G3 中的 *prn* 操纵子, 并且阐明 PRN 生物合成在 G3 菌株中受到严格调控。例如转录水平的 *N*-乙酰基高丝氨酸内酯(*N*-acyl-homoserine lactones, AHLs)介导的群体感应系统(quorum sensing, QS)和稳定期的 Sigma 因子 RpoS [7] [8] [9] [10], 以及转录后调控子 Hfq [11]及其相互作用形成了调控 PRN 的网络。本研究在前期已构建获得 G3 菌株 RsmB 突变体 $\Delta rsmB$ 的基础上[12], 通过组合突变分析和 LC-MS 液质联用定量分析等, 首次证明细菌 sRNA RsmB 可通过与 QS 互作, 分别在转录和翻译水平上参与全局调控 G3 菌株 PRN 的生物合成和生物膜形成等。为进一步通过遗传操纵 Rsm 系统改良生防菌的效率和稳定性提供了新策略。

2. 材料与方法

2.1. 细菌菌株及其生长条件

内生菌株 *S. plymuthica* G3 (Rif^R)野生型是分离自小麦的内生菌, 具有自然利福平抗性。野生型 G3 和前期研究中已经构建完成的 RsmB 突变体 $\Delta rsmB$ (Gm^R), 和检测 AHLs 信号的报告菌株产紫色杆菌 *Chromobacterium violaceum* CV026 (Km^R) [8] [12]等生长于 LB 或 LBA 培养基, 置于 28℃ 恒温培养。抗生素使用的终浓度如下: 利福平 (Rif) 30 μg/ml; 卡那霉素(Km) 50 μg/ml; 庆大霉素(Gm) 25 μg/ml。

2.2. 试验方法

2.2.1. 抗生素 PRN 的提取与定性和定量分析

挑取野生菌 G3 及其 RsmB 突变体 $\Delta rsmB$ 的单菌落接种添加利福平或庆大霉素的 LB, 过夜培养 16 h。OD₆₀₀ 调至 0.1, 分别取等量菌液涂布于含 2% 甘油的 PDA 平板上, 每个菌株设四个重复, 28℃ 培养 5 天。经乙酸乙酯萃取 2 次合并上清有机相, 旋转蒸发干燥后, 用甲醇溶解。真空干燥后, 重新溶解于 20 μL 甲醇, 置于 -20℃ 冰箱中避光密封保存待用。

TLC 板 37℃ 过夜预热, 点样时以 2 μL 的标准样品(2 mg/mL)为对照, 提取的样品各 10 μL 上样, 展开剂为正己烷:乙酸乙酯 = 2:1, 进行 TLC 层析。完成后使用 2% 对二甲氨基苯甲醛喷雾显色观察, 待 TLC 板干燥后, 拍照。同时, 以上样品参照 Liu *et al.*, 2018 的方法[10], 采用 LC-MS 液质联用方法定量分析 PRN 的产量, 进一步验证 TLC 薄层层析的结果。

2.2.2. 抗真菌活性等表型分析

在 PDA 平板中央接入直径为 6 mm 的板栗疫病菌(*Cryphonectria parasitica*)菌丝饼, 在距菌中心 2 cm 处的同心圆上接种 2 μL 28℃ 过夜培养的野生菌 G3 或 $\Delta rsmB$ 突变株。25℃ 恒温培养 4 天, 观察测量抑菌圈的大小。野生菌与 RsmB 突变株的蛋白酶和生物膜检测方法参见 Liu *et al.* 2016 的方法[9]。每个实验处理设置至少三个重复。

2.2.3. 群体感应信号分子的提取和 TLC 分析

参照李惠等方法[13], 主要用乙酸乙酯提取不同细菌菌株的 QS 信号分子 AHLs。然后取 5 μl 提取液点样于 RP18、F254S 反相 TLC 平板(德国 Merck), 展开剂为甲醇:水 (60:40, V/V)。约 4 h 充分展开后, 取出置于通风橱中干燥。待溶剂被蒸发后, 干燥的 TLC 平板用混有 *C. violaceum* CV026 检测菌株的软琼脂(0.6% agar)覆盖。琼脂凝固后, 置于密闭的容器中, 于 30℃ 恒温箱中培养过夜, 观察结果并拍照。分别以合成的 AHLs 标准样品 *N*-丁酰基高丝氨酸内酯 BHL (*N*-butanoyl-homoserinylactone)、*N*-己酰基高丝氨酸内酯 HHL (*N*-hexanoyl-homoserinylactone)和 *N*-3-O-己酰基高丝氨酸内酯 OHHL (*N*-3-oxo-hexanoyl-homoserine lactone)作对照[7]。

2.3. 数据处理

每个实验处理至少设置 3 个重复，数据采用 SPSS 软件进行统计分析。

3. 结果与分析

3.1. RsmB sRNA 突变显著影响抗生素 PRN 的合成水平

首先 TLC 检测分析 PRN 提取物,结果显示 $\Delta rsmB$ 突变体通过 TLC 方法几乎检测不到 PRN 的生成,而野生菌 G3 形成明显的蓝紫色斑点,与标准样品一致。为了验证该结果的准确性,进一步采用 LC-MS/MS 方法定量分析了上述提取样品。图 1 表明,与野生菌 G3 (2.28×10^6)相比,RsmB 突变导致 PRN 合成水平急剧下降, $\Delta rsmB$ 突变体仅为野生菌 PRN 产量的 0.034 倍 (7.70×10^4)。以上实验数据说明,RsmB sRNA 正调控 PRN 的生物合成。野生菌 G3 产生抗生素 PRN 的二级质谱鉴定图谱见图 2。

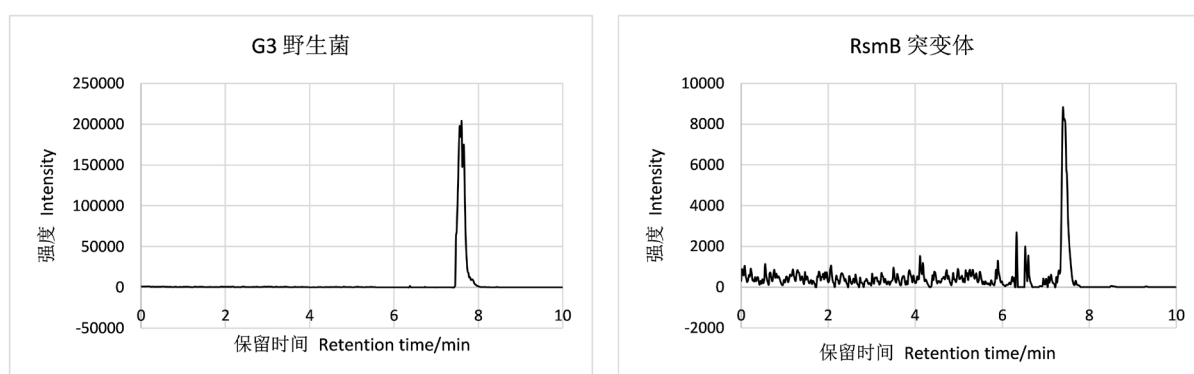


Figure 1. HPLC analysis of PRN produced by strain G3 and the RsmB mutant

图 1. HPLC 分析菌株 G3 及其 RsmB 突变株的 PRN 产生水平

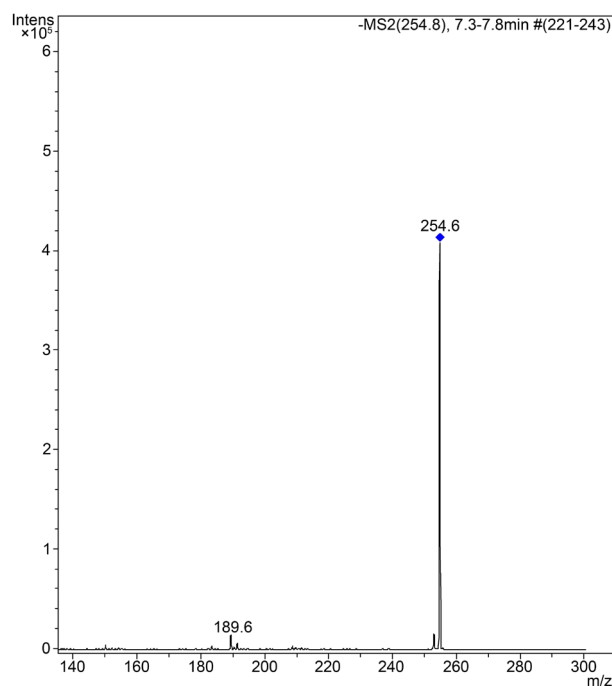


Figure 2. MS spectra of PRN produced by *S. plymuthica* G3

图 2. 抗生素 PRN 液质联用鉴定图谱

3.2. RsmB sRNA 正调控 G3 菌株对板栗疫病原真菌的拮抗活性

如上所述, RsmB 突变导致 G3 菌株合成抗生素 PRN 的能力显著下降, 因而可能相应地影响其抗真菌活性。为了检验该假说, 通过平板对峙方法分别检测了野生菌 G3 及其突变株 $\Delta rsmB$ 对板栗疫病菌 *C. parasitica* 的拮抗活性。实验结果表明(图 3), 与野生菌 G3 相比, RsmB 突变株的抑菌圈明显减小, 几乎消失不见, 表明普城沙雷氏菌 G3 菌株的抑菌活性与其 PRN 合成的水平正相关。此外 RsmB 分别引起蛋白酶活性(图 3 右)和生物膜形成(图 4)的减少, 说明 RsmB 是作为全局调控子也正调控 *S. plymuthica* G3 菌株的其他生防相关表型。

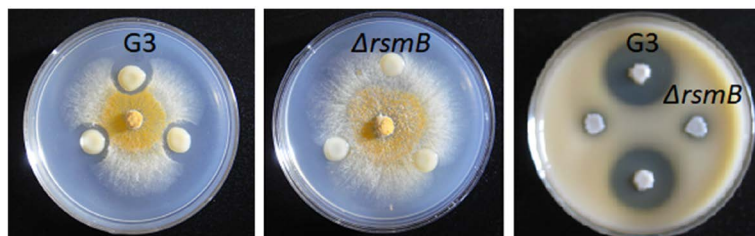


Figure 3. RsmB upregulated antifungal activity and protease (right) in *S. plymuthica* G3
图 3. RsmB 正调控抗真菌活性和蛋白酶活性(右)

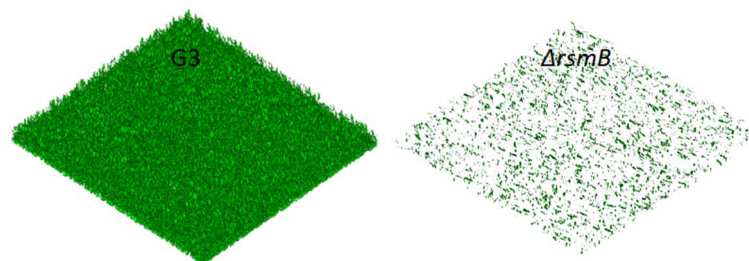
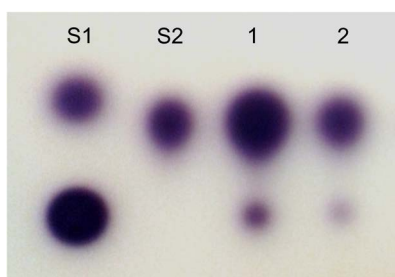


Figure 4. Mutation in RsmB was impaired in biofilm formation
图 4. RsmB 突变影响生物膜的形成

3.3. RsmB sRNA 影响群体感应信号 AHLs 的积累

在假单胞菌属 *Pseudomonas* 相关菌株中, Rsm 系统已经被证明影响 AHL 信号的积累[3]。本研究经薄层层析 TLC 定性分析, 并组合使用紫色杆菌 CV026 检测, 如图 5 所示, 与野生菌 G3 相比, 突变株 $\Delta rsmB$ 产生 AHL 信号分子的水平明显下降。两次独立的 LC-MS/MS 分析证实了 RsmB 突变导致 *S. plymuthica* 主要几种 AHL 信号(OHHL、BHL 和 HHL 等)的产生均有明显下降(数据未显示)。



S1: BHL/HHL 标样; S2: OHHL 标样; 1: 野生菌 G3 样品; 2: 突变体 $\Delta rsmB$ 样品

Figure 5. TLC bioassay of AHL production overlaid with CV026
图 5. TLC 平板检测 AHL 信号分子

4. 讨论

目前非编码小 RNA 在不同细菌种属中已经被广泛鉴定,普遍参与在转录后水平上全局调控细菌基因的表达。其中 γ -变形杆菌中的 Csr/Rsm 系统 sRNAs 已知作为同源二聚体 RNA 结合蛋白 CsrA/RsmA 的拮抗剂,通过捕获阻遏蛋白 CsrA/RsmA,从而释放其对靶标 mRNA 翻译的抑制,对于转录后基因表达的调控至关重要[1] [2]。随着组学和 RNA 测序技术的迅猛发展,最近有报道在鼠伤寒沙门菌 *Salmonella typhimurium* 中通过 CLIP-seq 全基因组测序,进一步揭示了 Csr/Rsm 系统除了作为重要的转录后水平调控子,也可以通过影响大量转录因子的翻译进而广泛参与调节细菌基因的转录[14]。在植物相关细菌中,抗生素对于细菌的生态适应性、竞争力,以及在与寄主植物的互作中均发挥了巨大作用。更重要的是,近期研究发现抗生素 PRN 等自身也可以作为信号分子调控基因表达、影响细菌的生理和行为[10]。尽管迄今氢氰酸和酚嗪等抗生素已经被证明是在细菌 Gas/Rsm 信号转导系统的控制之下,然而,广谱、不易产生抗药性的农用和医用抗生素硝吡咯菌素 PRN 是否也受 Rsm 系统的调控依然是未知的。我们的前期研究已经明确,AHL 介导的 QS 全局转录调控系统是抗生素 PRN 产生所必需的[7]。而且,添加外源 AHL,组合 *luxABCD* 报告基因分析表明 QS 也影响 *prnABCD* 操纵子的转录[10]。本研究通过突变分析 RsmB 表型,以及定性和定量分析其 PRN、QS 信号分子 AHL 的合成水平,证实了在 *Serratia* 属 RsmB 小 RNA 可以通过影响群体感应系统 AHL 信号分子的积累,进而在转录和翻译多个水平上参与精细控制抗生素 PRN 的生物合成,也相应影响内生菌 G3 的抗真菌活性。综上所述,细菌 Csr/Rsm 系统 sRNAs 可分别在转录和转录后水平上调控基因的表达是其保守的性质,也暗示了该系统作为关键调控子处于细菌级联调控网络的中心。该研究结果可为遗传改良生防菌的效率和稳定性提供新策略。

致 谢

作者特别感谢英国诺丁汉大学 M. Ca'mara 教授和 N. Halliday 对 LC-MS2 和生物膜分析提供的支持。

基金项目

国家自然科学基金项目(NSFC No. 31240046); 公益性行业(农业)科研专项(201503110-12)。

参考文献

- [1] Gottesman, S. and Storz, G. (2011) Bacterial Small RNA Regulators: Versatile Roles and Rapidly Evolving Variations. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **3**, pii: a003798. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003798>
- [2] Leistra, A.N., Curtis, N.C. and Contreras, L.M. (2019) Regulatory Non-Coding sRNAs in Bacterial Metabolic Pathway Engineering. *Metabolic Engineering*, **52**, 190-214. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.11.013>
- [3] Lapouge, K., Schubert, M., Allain, F.H., et al. (2008) Gac/Rsm Signal Transduction Pathway of γ -Proteobacteria: From RNA Recognition to Regulation of Social Behavior. *Molecular Microbiology*, **67**, 241-253. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.06042.x>
- [4] Romeo, T. and Babitzke, P. (2018) Global Regulation by CsrA and Its RNA Antagonists. *Microbiology Spectrum*, **6**. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.RWR-0009-2017>
- [5] de Vleeschauwer, D. and Höfte, M. (2007) Using *Serratia plymuthica* to Control Fungal Pathogens of Plant. *CAB Reviews*, **2**, 046. <https://doi.org/10.1079/PAVSNNR20072046>
- [6] Kilani, J. and Fillinger, S. (2016) Phenylpyrroles: 30 Years, Two Molecules and (Nearly) No Resistance. *Frontiers in Microbiology*, **7**, 2014. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02014>
- [7] Liu, X., Bimerew, M., Ma, Y.X., et al. (2007) Quorum-Sensing Signaling Is Required for Production of the Antibiotic Pyrrolnitrin in a Rhizospheric Biocontrol Strain of *Serratia plymuthica*. *FEMS Microbiology Letters*, **270**, 299-305. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00681.x>
- [8] Liu, X., Jia, J., Atkinson, S., et al. (2010) Biocontrol Potential of an Endophytic *Serratia* sp. G3 and Its Mode of Action. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **26**, 465-471. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0321-y>
- [9] Liu, X., Wu, Y., Chen, Y., et al. (2016) RpoS Differentially Affects the General Stress Response and Biofilm Forma-

tion in the Endophytic *Serratia plymuthica* G3. *Research in Microbiology*, **167**, 168-177.

<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.11.003>

- [10] Liu, X., Yu, X., Yang, Y., *et al.* (2018) Functional Identification of the *prnABCD* Operon and Its Regulation in *Serratia plymuthica*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **102**, 3711-3721. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8857-0>
- [11] Zhou, M., Gao, K., Zeng, J., *et al.* (2012) Role of the RNA-Binding Protein Hfq in *Serratia plymuthica*. *Frontiers in Bioscience (Elite Ed)*, **4**, 1263-1275. <https://doi.org/10.2741/e457>
- [12] 黄光, 周敏, 于晓莉, 等. 普城沙雷氏菌 *rsmB* 基因删除插入突变体的构建[J]. 江苏农业学报, 2011(5): 969-973.
- [13] 李惠, 刘晓光, 高克祥, 贾金丽. 内生菌 *Pseudomonas* sp. G5 *phzIR* 基因的克隆与表达[J]. 生物工程学报, 2009, 25(6): 832-839.
- [14] Holmqvist, E., Wright, P.R., Li, L., *et al.* (2016) Global RNA Recognition Patterns of Posttranscriptional Regulators Hfq and CsrA Revealed by UV Crosslinking *in Vivo*. *The EMBO Journal*, **35**, 991-1011. <https://doi.org/10.15252/embj.201593360>