

## 胡萝卜软腐果胶杆菌鞭毛钩基因 *flgK* 的功能

杨钟灵, 邓亚岷, 杜硕, 李婷, 蒋欢, 刘凤权, 范加勤\*

南京农业大学植物保护学院, 农作物生物灾害综合治理教育部重点实验室, 南京 210095

**摘要:** 【目的】为了研究鞭毛钩基因 *flgK* 在胡萝卜软腐果胶杆菌胡萝卜亚种 (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *P. c. c.*) 的功能。【方法】本研究采用两亲同源交换法构建了基因缺失突变体  $\Delta flgKpcc$  并构建了互补菌株  $\Delta flgKpcc$ -KH, 测定突变体及其互补菌株的菌体形态、运动性、致病因子、致病性等表型。【结果】与野生菌株 PccS1 相比,  $\Delta flgKpcc$  鞭毛缺失, 菌体易沉降, 在 0.3% 半固体培养基上运动能力明显降低, 生长速率无明显变化, 但是纤维素酶和蛋白酶的活性、生物膜形成能力明显下降, 对感病寄主的致病力显著减弱。基因互补可以使上述突变表型恢复。【结论】实验表明, 鞭毛基因 *flgK* 突变导致了菌体的运动性降低、病原菌毒性相关的酶活力下降, 从而导致致病力下降。

**关键词:** 胡萝卜软腐果胶杆菌胡萝卜亚种, 鞭毛, *flgK*, 致病因子

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012)06-0703-07

鞭毛是细菌的重要组成结构, 它在细菌鉴别与分类、致病性、运动性和环境适应性等方面具有重要意义<sup>[1-2]</sup>。鞭毛由基体、鞭毛钩、鞭毛丝三部分组成, 其中鞭毛钩作为分子铰链, 连接马达的主轴和鞭毛丝, 在传递扭矩中起着重要的作用<sup>[3, 19]</sup>。FlgK 蛋白是鞭毛钩中钩状体的组成之一, 且在组装中起作用<sup>[2]</sup>。

胡萝卜软腐果胶杆菌胡萝卜亚种 (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, 简称 *P. c. c.*) 是多种植物细菌性软腐病的病原菌<sup>[4]</sup>。*P. c. c.* 引起的软腐病一直都是植物病理学研究的重要内容之一, 特别是在其全基因序列公布 (2002) 后<sup>[5]</sup>, 与其致病相关的研究<sup>[6-7]</sup> 更有所增加。本研究室前期研究发现 *P. c. c.* 与黄花马蹄莲 (*Zantedeschia elliotiana*) 组织离体互作, FlgK 蛋白表达量显著增加 (未发表)。在许多病原细菌中, 鞭毛

已被证实具有重要的生物学功能<sup>[8, 17-18]</sup>, 然而, 鞭毛钩基因 *flgK* 在 *P. c. c.* 鞭毛形成、致病性、运动性等方面的作用和功能尚未见报道。

为了分析 *flgK* 基因的生物学功能, 特别是在 *P. c. c.* 与病菌致病性之间的关系。本研究从 *P. c. c.* 基因组克隆 *flgKpcc* 基因, 用同源重组的方法构建了 *P. c. c.* 的 *flgK* 基因缺失突变株  $\Delta flgKpcc$ , 并进行基因互补获得互补菌株  $\Delta flgKpcc$ -KH。将其与野生菌株 PccS1 比较, 分析了 *flgKpcc* 基因突变对病原菌的鞭毛形成、毒性相关因子、致病性和致敏性等表型的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 供试菌株、质粒及其培养条件 本研究使用

基金项目: 江苏高校优势学科建设工程资助项目

\* 通信作者。Tel: +86-25-84396726; Fax: +86-25-84395325; E-mail: fanjq@njau.edu.cn

作者简介: 杨钟灵 (1986-), 男, 福建漳州人, 硕士研究生, 主要从事细菌性软腐病菌研究。E-mail: 2009102004@njau.edu.cn

收稿日期: 2011-12-28; 修回日期: 2012-03-26

的菌株和质粒见表 1。胡萝卜软腐果胶杆菌胡萝卜亚种菌株 PccS1 于 Luriar Bertani (LB) 培养基中 28℃ 培养,大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 于 LB 中 37℃

培养。根据需要加入的抗生素的终浓度为:庆大霉素 (Gm) 50 μg/mL,卡那霉素 (Km) 50 μg/mL 和利福平 (Rif) 100 μg/mL。

表 1 本研究所用菌株与质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains ,plasmids	Characteristics	Source
<i>Escherichia coli</i>		
S17-λpir	λpir pro hsdR recA	Lab collection
DH5α	Φ80 lacZΔM15, Δ(lacZYA-argF) U169. recA1, endA1. thi-1	Lab collection
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>		
PccS1	Wild type	This lab
PccS1-R	Rif <sup>r</sup> , induced from PccS1 with resistance to Rif	This study
ΔflgKpcc	Rif <sup>r</sup> , The flgKpcc gene knock-out mutant of strain PccS1	This study
ΔflgKpcc-KH	Rif <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> , ΔflgKpcc complemented with pHMI-D	This study
Plasmid		
pMD19-T (simple)	Ap <sup>r</sup> , T-cloning vector, colE1 origin, without MCS	Takara
pMD19-F1	Ap <sup>r</sup> , FlgK-1 gene ligated in pMD19-T (simple)	This study
pMD19-F2	Ap <sup>r</sup> , FlgK-2 gene ligated in pMD19-T (simple)	This study
pEX18Gm	Gm <sup>r</sup> , Allelic exchange suicide vector, sacB oriT (RP4) LacZ	Lab collection
pEX18-K	Gm <sup>r</sup> , a 1224 bp fusion fragment of FlgK-1, FlgK-2 gene ligated in pEX18Gm	This study
pBBR034	Gm <sup>r</sup> , Broad-host-range cosmid vector	Lab collection
pBBR-flgK	Gm <sup>r</sup> , FlgK-H gene ligated in pBBR034	This study

1.1.2 主要试剂和仪器 引物合成和测序由 Invitrogen 公司完成;基因组 DNA 提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒均由 Axygen 公司提供;连接所用 pMD19-T 载体、连接酶、限制性内切酶、r-Taq 酶和 DNA marker 均由 TaKaRa 公司提供;冷冻离心机、PCR 仪和分光光度计为 Eppendorf 公司产品,凝胶成像系统为 Bio-Rad 公司产品。

## 1.2 缺失突变体及其互补菌株的构建

参照 Josenhans 介绍的方法<sup>[8]</sup>进行 flgKpcc 基因缺失突变体构建。以 PccS1 基因组 DNA 为模板,以 K1 和 K2、K3 和 K4 (表 2) 为引物分别扩增得到 flgKpcc 基因的上下游片段 FlgK-1、FlgK-2,均连接到 pMD19-T,转化 DH5α 分别获得 pMD19-F1 和 pMD19-F2。分别用 EcoRI 和 Hind III、Hind III 和 KpnI 双酶切,一并与经 EcoRI 和 KpnI 双酶切的自杀载体 pEX18Gm 连接,获得重组质粒 pEX18-K (图 1),提取质粒 pEX18-K 并转化到 *E. coli* S17-λpir。两亲同源交换得到一次交换子,用 Rif + Gm + LB 平板筛选、PCR 验证。挑取阳性单菌落过夜培养,从中取 50.0 μL 用 LB 培养基稀释 100 倍培养 2-4 h,其间每隔 1 h 吸取 50.0 μL 培养液涂含 10.0% 蔗糖 + Rif 的 LB 平板进行筛选。同时,PCR 验证获得二次交换子,即为突变体 ΔflgKpcc。

表 2 本研究所用引物及其序列

Table 2 The sequences of PCR primers used in this study

Primers	Sequence (5'→3')	Source
K1	CCGGAATTCACACGCCCGCTTTGATGAC	This study
K2	CCCAAGC TTAGTCCGTATGGTGAACACTAC	This study
K3	CCCAAGCTT ATTCGTTGTATTGGCGGTTG	This study
K4	CGGGGTACCACCACG ACAGATATGAGCA	This study
KH1	CGCGGATCCACGCTGTGAAATGGCCTGAT	This study
KH2	CGGGGTACCAGCGGAAAGAGCCTGTGATAA	This study
PCC1	TCAATCCCAGTTTCTGACCG	This study
PCC2	TGTAGCGGCTACCTGTCTG	This study

以 PccS1 基因组 DNA 为模板,KH1 和 KH2 为引物,PCR 扩增得到互补片段 FlgK-H (flgKpcc 基因全长 + 启动子),将其连接到表达载体 pBBR034,构建重组质粒 pBBR-flgK。利用两亲同源交换法将该质粒转化到突变体 ΔflgKpcc,Rif + Gm + LB 平板筛选、PCR 进行验证后,获得互补菌株 ΔflgKpcc-KH。

## 1.3 细菌生长、游动性、沉降性及生物膜的测定

参照殷芳群介绍的方法<sup>[9]</sup>,利用 LB 培养基培养 PccS1、突变株及互补菌株,测定其生长量、电镜观察形态,重复 3 次。根据傅本重介绍的方法<sup>[10]</sup>,用含 0.3% 琼脂的半固体培养基测定各菌株的游动性。将细菌培养至 OD<sub>600</sub> = 1.2,取 3.0 mL 于灭过菌的试管中静置 12 h,观察细菌沉降现象。参照 Wakimoto 介绍的方法<sup>[11]</sup>进行生物膜形成的测定。

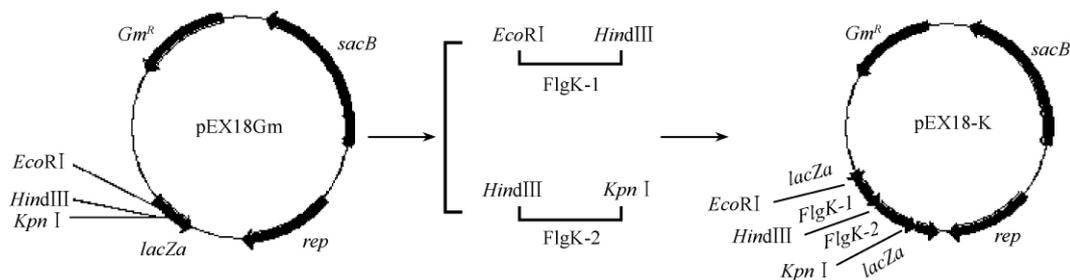


图1 敲除载体 pEX18-K 的构建

Fig. 1 Construction of knock-out vector pEX18-K.

待测菌株培养至  $OD_{600} = 1.2$ , 取 2.0 mL 培养液于已灭菌的试管中, 28℃ 静置培养 48 h. 弃培养液, 每管加 0.1% 结晶紫 3.0 mL 染色 20 min, 移出染色液, 再用蒸馏水洗 3-5 次。

#### 1.4 致病因子的测定

参照 Barnard 介绍的方法<sup>[12]</sup> 测定各菌株的胞外纤维素酶、胞外果胶酶活性。待测菌株过夜培养后, 稀释至  $OD_{600} = 1.0$ , 取 5.0  $\mu$ L 点样于分析平板, 于 28℃ 培养 48 h. 胞外纤维素酶分析平板用 0.2% 刚果红染色 20 min, 1.0 mol/L NaCl 漂洗 15 min, 1.0 mol/L HCl 着色 5 min. 果胶酶分析平板用 7.5% 乙酸铜染色 1 h。

参照陈磊介绍的方法<sup>[13]</sup> 测定胞外蛋白酶活性。待测菌株过夜培养后, 稀释至  $OD_{600} = 1.0$ , 取 5.0  $\mu$ L 点样于添加 10.0% 无脂牛奶的 LB 平板, 28℃ 培养 48 h 后观察透明圈的大小。

#### 1.5 细菌致病性的测定

参照谷春燕介绍的方法<sup>[14]</sup> 测定各菌株的致病性。使用无菌注射器吸取  $1.0 \times 10^8$  CFU/mL 的菌悬液, 在经 75.0% 乙醇表面消毒的黄花马蹄莲叶片或大白菜叶柄背面, 用注射针头挑起表皮, 注入菌悬液 2.5  $\mu$ L, 28℃ 保湿培养 12 h, 观察发病情况, 测量病斑长度, 重复 3 次。所得结果用 SPSS 软件 Duncan's 多重比较法进行统计分析。

## 2 结果和分析

### 2.1 突变菌株与互补菌株的构建

含蔗糖致死基因 *sacB* 的重组质粒 pEX18-K 与 PccS1-R 发生两亲同源交换获得突变体  $\Delta$ flgKpcc 后, 以 K1 和 K4 为引物进行 PCR 扩增验证, 突变体  $\Delta$ flgKpcc 可扩增出大小为 1.2 kb 的条带, 与预期一

致, 而野生型 PccS1 中条带大小为 2.5 kb (图 2-B), 同时, 利用 *P. c. c.* 特异性引物在野生和突变体菌株中均扩增出 350 bp 大小的条带 (图 2-A) 由此表明成功构建了缺失突变体  $\Delta$ flgKpcc。互补菌株在 LB + Gm + Rif 平板上筛选, 进行质粒提取和酶切分析验证 (未列出资料), 获得了互补菌株  $\Delta$ flgKpcc-KH。

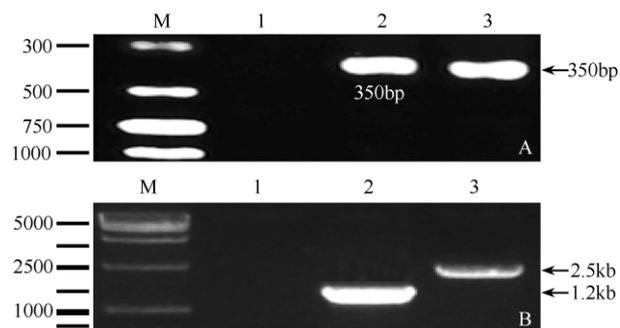
图2 胡萝卜软腐果胶杆菌胡萝卜亚种 *flgKpcc* 基因突变体的分子验证

Fig. 2 Molecular analysis of the *flgKpcc* knock-out mutant of *P. c. c.* A, PCR confirmation by using specific primers; B, PCR confirmation for the deletion *flgKpcc* gene by using primer pair K1 and K4. 1, blank control; 2, PccS1; 3,  $\Delta$ flgKpcc.

### 2.2 运动性、生物膜及生长能力测定

如图 3-A 所示, 将含有 3 个不同菌株的培养液试管静置 12 h 后,  $\Delta$ flgKpcc 细胞培养液与其余两者相比, 清澈透明。从图 3-B 可看出在 0.3% 半固体平板上  $\Delta$ flgKpcc 的菌落很小, 其直径分别为 PccS1、 $\Delta$ flgKpcc-KH 的 1/9 和 1/8。图 3-C 所示,  $\Delta$ flgKpcc 鞭毛丧失, 而  $\Delta$ flgKpcc-KH 恢复了周生鞭毛。 $\Delta$ flgKpcc 的生物膜形成能力明显降低 (图 3-D)。图 4 所示 3 个菌株在 LB 培养基中的生长曲线, 表明三者生长速度差异不显著。

### 2.3 致病相关因子的比较

将 PccS1、 $\Delta$ flgKpcc 和  $\Delta$ flgKpcc-KH 加到各种分

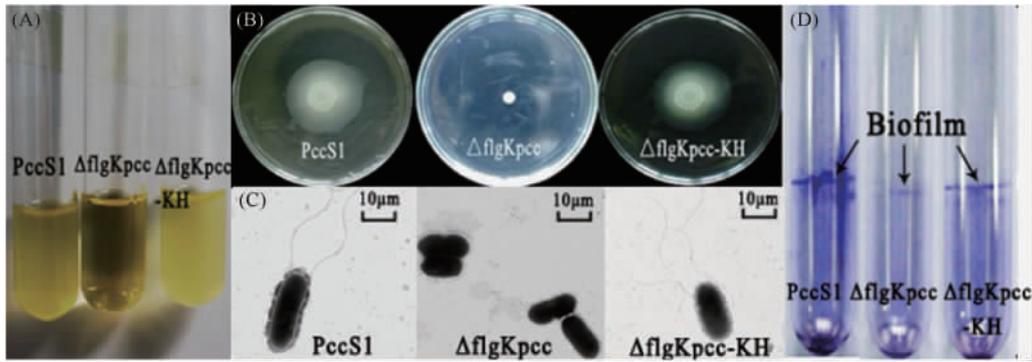


图3 PccS1、 $\Delta flgKpcc$  和  $\Delta flgKpcc$ -KH 的部分生物特性与菌体形态比较

Fig. 3 Biological properties and cell morphology of PccS1,  $\Delta flgKpcc$  and  $\Delta flgKpcc$ -KH. (A), Bacterial settling process; (B), motility; (C), flagellum production; (D), biofilm formation.

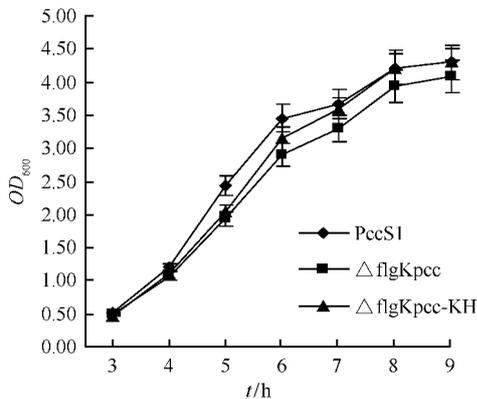


图4 PccS1、 $\Delta flgKpcc$  和  $\Delta flgKpcc$ -KH 的生长能力

Fig. 4 Bacterial growth in vitro of PccS1,  $\Delta flgKpcc$  and  $\Delta flgKpcc$ -KH.

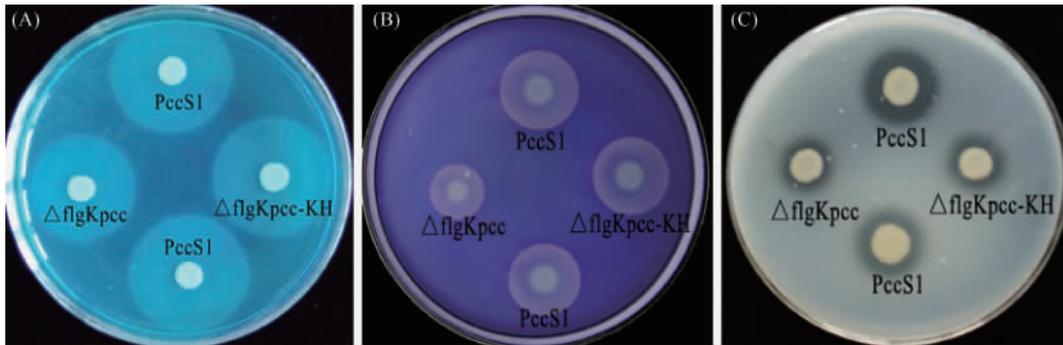


图5 PccS1、 $\Delta flgKpcc$  和  $\Delta flgKpcc$ -KH 的果胶酶(A)、纤维素酶(B)、蛋白酶活力(C)测定

Fig. 5 Enzymatic assay on pectate lyase (A), cellulose (B) and protease activity (C) of PccS1,  $\Delta flgKpcc$  and  $\Delta flgKpcc$ -KH.

发病情况与野生型接近(图6-A)。三者接种大白菜结果与之一致(图6-B)。同时分别记录病斑长度,统计结果如图6-C。表明 *flgK* 基因的缺失导致 PccS1 的致病性丧失。

### 3 讨论

鞭毛是细菌的运动器官,是细菌在长期的进化

中适应环境的结果。对鞭毛的长期研究表明鞭毛影响细菌的运动性、粘附性,甚至在侵入细胞组织等环节中起重要作用<sup>[1-3,17-18]</sup>。本试验对胡萝卜软腐果胶杆菌胡萝卜亚种的鞭毛钩基因 *flgKpcc* 进行缺失突变,同时对突变体的鞭毛合成,运动性及致病性,致病因子等方面进行了测定。

#### 2.4 $\Delta flgKpcc$ 的致病性

将 PccS1、 $\Delta flgKpcc$  和  $\Delta flgKpcc$ -KH 离体接种感病寄主黄花马蹄莲叶片,12 h 后发现  $\Delta flgKpcc$  对马蹄莲的致病力显著降低,而互补菌株  $\Delta flgKpcc$ -KH

析平板进行培养,28℃ 培养 48 h 后进行染色,结果表明:与 PccS1 相比,  $\Delta flgKpcc$  果胶酶活性无明显变化(图5-A),但纤维素酶(图5-B)和蛋白酶(图5-C)活性均有不同程度的减小。酶降解生物圈直径分别从 2.3 cm 和 2.2 cm 降到 1.5 cm 和 1.1 cm。而互补菌株  $\Delta flgKpcc$ -KH 使突变体的酶活性得到恢复。表明 *flgKpcc* 基因缺失影响胡萝卜软腐果胶杆菌部分致病因子的产生。

试验中利用电子显微镜观察到突变菌株

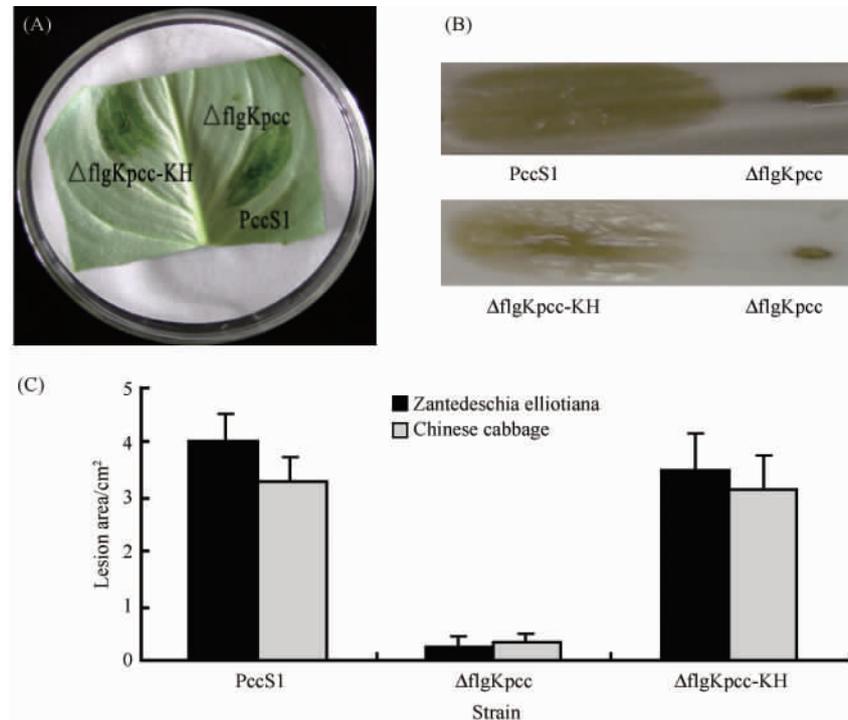


图6 PccS1、 $\Delta flgKpcc$  和  $\Delta flgKpcc-KH$  对黄花马蹄莲 (A) 和大白菜 (B) 的致病力测定

Fig. 6 Pathogenicity assay of PccS1,  $\Delta flgKpcc$  and  $\Delta flgKpcc-KH$  on *Zantedeschia elliptiana* (A) and Chinese cabbage (B).

$\Delta flgKpcc$  的鞭毛完全丧失,同时发现突变菌株  $\Delta flgKpcc$  的游动性、沉降性和生物膜生成能力相对野生型有了明显下降,表明 *flgKpcc* 基因影响胡萝卜软腐果胶杆菌胡萝卜亚种的鞭毛合成,从而影响了 *P. c. c* 的运动性和粘附性,进一步验证了 Macnab 等的结果<sup>[1-3,10]</sup>。

*P. c. c* 主要的致病因子包括果胶酶、纤维素酶、多种蛋白水解酶和碳青霉烯抗生素等<sup>[15]</sup>。其中,纤维素酶主要表现葡聚糖酶活性,首先降解纤维素,然后降解寄主的细胞壁。它在致病过程中虽不是最重要的致病因子,但可以和其他酶协同侵染植物,蛋白酶的功能是提供细菌蛋白生物合成所需的氨基酸或降解寄主中与抗性有关的蛋白质<sup>[16,19]</sup>,所以 *P. c. c* 的致病力测定通常是测定果胶酶、纤维素酶和蛋白酶活力。本试验中,在对  $\Delta flgKpcc$  的致病因子的测定中发现,除了果胶酶活性几乎没有影响外,纤维素酶和蛋白酶活性均受到了一定的下降调节,这与其他致病菌<sup>[2,8-10]</sup>的鞭毛突变体致病因子测定结果有所差距。一直以来,病理学家一般认为鞭毛是通过影响微生物的游动性和粘附性来影响病原菌的致病性,同时对于致病性的研究主要着重于外泌致病蛋白及相关致病基因,而对于鞭毛基因对于致病基因

和致病蛋白的研究还有所缺乏<sup>[16-19]</sup>。然而,Toth等<sup>[20]</sup>发现一株 *Eca* 细胞表型缺陷突变体,不仅外膜蛋白、脂多糖、鞭毛等细胞表型变化,而且纤维素酶也受到了一定的影响,表明鞭毛基因与纤维素酶的分泌有一定的关系。本试验中, $\Delta flgKpcc$  突变体的外泌纤维素酶和果胶酶表达量下降,可能是由于细胞外膜的破坏而导致致病蛋白分泌量的下降。同时,本报道是首次对病原菌 *P. c. c* 上 *flgK* 基因进行定向敲除,结果的差异性将有利于不同病原菌致病因子的研究。

致病性测定显示 *flgKpcc* 基因的突变显著降低了 *P. c. c* 对感病寄主的致病力,而通过生长速率测定表明,致病力的下降并不是 *P. c. c* 的生长受到抑制导致的。试验中,不仅发现  $\Delta flgKpcc$  的鞭毛缺失、游动性减弱,还发现 *P. c. c* 的毒性因子—生物膜、纤维素酶和果胶酶均受到了不同程度的影响,表明病原菌致病性的降低是 *flgKpcc* 基因缺失突变引起的鞭毛缺失,生物膜生成能力减弱,纤维素酶和果胶酶活性降低等综合作用引起的。此外,本实验还表明细菌鞭毛钩 *flgKpcc* 基因会影响 *P. c. c* 的致病因子的产生分泌。

## 参考文献

- [ 1 ] Macnab RM. The bacterial flagellum: reversible rotary propellor and type III export apparatus. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181: 7149-7153.
- [ 2 ] Pallen MJ, Penn CW, Chaudhuri RR. Bacterial flagellar diversity in the post-genomic era. *Trends in Microbiology*, 2005, 13: 143-149.
- [ 3 ] Köhler S. Basics for Biosystems of the Cell. *Assignment Report*, 2004: 1-2.  
赵廷昌, 孙福在, 阎克峰, 李荣旗, 杨春梅. 马蹄莲细菌性软腐病及其防治. *植物保护 (Plant Protection)*, 2000, 26(1): 46-47.
- [ 4 ] Bell KS, Avrova AO, Holeva MC, Cardle L, Morris W, De Jong W, Toth IK, Waugh R, Bryan GJ, Birch PR. Sample sequencing of a selected region of the genome of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* reveals candidate phytopathogenicity genes and allows comparison with *Escherichia coli*. *Microbiology*, 2002, 148: 1367-1378.
- [ 5 ] Coulthurst SJ, Lilley KS, Salmond GPC. Genetic and proteomic analysis of the role of *luxS* in the enteric phytopathogen, *Erwinia carotovora*. *Molecular Plant Pathology*, 2006, 7(1): 31-45.
- [ 6 ] Dong YH, Wang LH, Xu JL, Zhang HB, Zhang XF, Zhang LH. Quenching quorum-sensing dependent bacterial infection by an *N*-acyl homoserine lactonase. *Nature*, 2001, 411: 813-817.
- [ 7 ] Josenhans C, Suerbaum S. The role of motility as a virulence factor in bacteria. *International Journal of Medical Microbiology*, 2002, 291(8): 605-614.
- [ 8 ] 殷芳群, 赵延存, 刘春晖, 钱国良, 范加勤, 胡白石, 刘凤权. 水稻细菌性条斑病菌中受 DSF 调控的鞭毛基因 *flgD*、*flgE* 的功能分析. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)* 2011 51(7): 891-897.
- [ 9 ] 傅本重, 吴茂森, 陈华民, 何晨阳. 水稻白叶枯病菌鞭毛基体基因 *fliExoo* 缺失突变分析. *植物病理学报 (Acta Phytopathologica Sinica)* 2010 40(1): 33-39.
- [ 10 ] Wakimoto N, Nishi J, Sheikh J, Nataro JP, Sarantuya J, Iwashita M, Manago K, Tokuda K, Yoshinaga M, Kawano Y. Quantitative biofilm assay using an icrotiter plate to screen for enteric aggregate *Escherichia coli*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2004, 71(5): 687-690.
- [ 11 ] Barnard A, Simpson N, Salmond K. Mutations in *rpsL* that confer streptomycin resistance show pleiotropic effects on virulence and the production of a carbapenem antibiotic in *Erwinia carotovora*. *Microbiology*, 2010, 156: 1030-1039.
- [ 12 ] 陈磊. 水稻黄单胞菌双精氨酸运输 (Tat) 系统关键基因的克隆与功能分析. 南京农业大学硕士学位论文, 2009.
- [ 13 ] 谷春艳, 范加勤, 杨雪, 胡白石, 刘凤权, 张永春. 彩色马蹄莲细菌性软腐病菌的鉴定及其群体感应淬灭的研究. *南京农业大学学报 (Journal of Nanjing Agricultural University)* 2009 32(3): 71-77.
- [ 14 ] Mattinen L, Tshuikina M, Mäe A, Pirhonen M. Identification and characterization of *nip*, necrosis-inducing virulence protein of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2004, 17(12): 1366-1375.
- [ 15 ] Perombelon M. Potato diseases caused by soft rot *Erwinias*: an overview of pathogenesis. *Plant Pathol*, 2002, 51: 1-12.
- [ 16 ] Erhardt M, Hirano T, Su Y, Paul K, Mizuno S, Aizawa S, Hughes KT. The role of the *FliK* molecular ruler in hook-length control in *Salmonella enterica*. *Molecular Microbiology*, 2010, 75(5): 1272-1284.
- [ 17 ] Kuo WT, Chin KH, Lo WT, Wang AH, Chou SH. Crystal structure of the c-terminal domain of a flagellar hook-capping protein from *Xanthomonas campestris*. *J. Mol. Biol*, 2008, 381: 189-199.
- [ 18 ] Hirano T, Mizuno S, Aizawa SI, Hughes KT. Mutations in *Flk*, *FlgG*, *FlhA*, and *FlhE* that affect the flagellar type III secretion specificity switch in *Salmonella enterica*. *J. of Bacteriology*, 2009: 3938-3949.
- [ 19 ] Toth IK, Thorpe CJ, Bentley SD, Mulholland V, Hyman LJ, Perombelon MC, Salmond GP. Mutation in a gene required for lipopolysaccharide and enterobacterial common antigen biosynthesis affects virulence in the plant pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 1999, 12: 499-507.

## Function of *flgK* gene in *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*

Zhongling Yang , Yamin Deng , Shuo Du , Ting Li , Huan Jiang , Fengquan Liu ,  
Jiaqin Fan \*

College of Plant Protection ,Key Laboratory of Integrated Management of Crop Diseases and Pests , Ministry of Education ,  
Nanjing Agricultural University , Nanjing 210095 , China

**Abstract:** [Objective] To investigate functions of *flgKpcc* gene in *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*P. c.*). [Methods] The gene knock-out mutant  $\Delta$ *flgKpcc* and complemented strain  $\Delta$ *flgKpcc*-KH were generated by biparental mating and their phenotypes including cell morphology , motility , pathogenic factors , and pathogenicity were investigated. [Results] Non-flagellum , cell precipitation in the culture and significantly attenuated motility on 0.3% semisolid medium were observed in  $\Delta$ *flgKpcc* compared to *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* S1. In addition , significant decrease in cellulase and protease activity , biofilm formation , and pathogenicity on host plant were found in  $\Delta$ *flgKpcc*. While there were no apparent difference in growth rate *in vitro* ,  $\Delta$ *flgKpcc*-KH , the complementation strain , restored the phenotype of  $\Delta$ *flgKpcc* to the wild type level. [Conclusion] The gen of *flgKpcc* not only influences the cell motility , but also pathogenic factors to lead to the decreased pathogenicity in *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum*.

**Keywords:** *Pectobacterium carotovorum* sub sp. *carotovorum* , flagellum , *flgK* , pathogenic factors

(本文责编:张晓丽)

Supported by the Advantages of disciplines in colleges and universities in Jiangsu Province construction grant program

\* Corresponding author. Tel: +86-25-84396726; Fax: +86-25-84395325; E-mail: fanjq@njau.edu.cn

Received: 28 December 2011/Revised: 26 March 2012

### 《微生物学报》关于署名

经过本刊审查通过后即将发表的稿件,作者在修改时,如果对“作者或单位的署名”进行变更,与最初的投稿不同,本刊要求:作者必须再提供有关证明,否则不能生效!此项规定早已公布在本刊的网页上、并且在本刊的纸质出版物中也多次公布。请作者登陆本刊网页(<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>),在首页内“常见问题”中有显示,点开左侧的“署名”,其中有详细的说明和办理方法。

- (1) 如变单位署名顺序,需要原研究内容所属单位(通常是第一署名单位)的证明信,证明内容:原署名顺序→现署名顺序→盖章。
- (2) 如变更作者署名顺序,需要通讯作者和第一作者同意的签字证明。证明内容:原作者姓名及顺序→修改之后的作者姓名及顺序。
- (3) 将此证明信返回编辑部(邮寄原件或扫描后 E-mail 发来),新的变更即可生效。