

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (6) :675 - 682; 4 June 2015
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140440

青枯菌三型分泌系统研究进展

张勇, 李牧原, 罗锋

西南大学生物能源与环境修复研究中心, 重庆 400715

摘要:青枯菌(*Ralstonia solanacearum*) 可导致多种重要经济作物毁灭性枯萎(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。注射器状的三型分泌系统(Type III secretion system) 是青枯菌的一个决定性致病因子, 青枯菌利用 T3SS 向寄主细胞中注射大量效应蛋白(Type III effectors) 来抑制寄主的免疫反应, 从而引起寄主感病。本文围绕近年来有关青枯菌 T3SS 遗传特性、表达调控、效应蛋白功能等方面最新进展进行综述, 为全面了解青枯菌致病机理和植物细菌病害的防治提供新思路。

关键词:青枯菌, 三型分泌系统, 效应蛋白

中图分类号: Q933 **文章编号:** 0001-6209(2015)06-0675-08

青枯菌(*Ralstonia solanacearum*) 是一种革兰氏阴性土传植物病原细菌, 是世界上分布最广、危害最严重的十大植物病原细菌之一(青枯菌排第二名)^[1]。青枯菌寄生范围广泛, 可侵染 54 科 450 余种植物, 包括双子叶草本植物(如茄科、豆科等)、双子叶木本植物(如桑树、桉树、木麻黄等)以及单子叶植物(如香蕉、生姜等)^[2]。青枯菌可导致多种重要经济作物(如烟草、番茄、马铃薯、生姜等)毁灭性枯萎(bacterial wilt, 又称青枯病), 造成发病地块高达 95% 的损失, 是许多农作物及经济作物生产上的重要限制因子^[3]。青枯菌通过对寄主植物信号应答, 逃避寄主防卫反应, 运用精密网络对各侵染环节进行全局性调控以产生致病性^[4-5]。和其它革兰氏阴性病原细菌一样, 注射器状的三型分泌系统(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 与寄主细胞互动, 将各种效应蛋白(Type III effectors, T3Es) 注射到寄主细

胞中, 抑制或激活寄主植物的防卫反应, 最终引起寄主植物感病或诱导非寄主植物产生超敏反应(Hypersensitive Response, HR)^[6-7]。本文围绕近年来有关青枯菌 T3SS、T3Es 的组成特性、表达调控、功能研究等方面的最新进展进行概要综述。

1 青枯菌 T3SS 和 T3Es 的组成与遗传特性

1.1 青枯菌 T3SS 的组成与遗传特性

T3SS 广泛存在于病原细菌中(包括植物、动物病原细菌), 是病原细菌与寄主细胞互动、产生致病性的一个决定因子。青枯菌 T3SS 由 *hrp* (hypersensitive response and pathogenicity) 基因簇编码, 该基因簇位于青枯菌的大质粒(mega plasmid)上, 大小约 23 kb, 由 7 个转录单元组成。*hrp* 基因簇包含 20 多个基因, 其编码的 20 多个蛋白组装成注射器状的 T3SS, 如

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)

作者简介:张勇(1977-), 男, 河南济源人, 博士, 副教授, 主要从事青枯菌致病机理研究。Tel: +86-23-68250994; Fax: +86-23-68250109;

E-mail: bioyongzhang@gmail.com

收稿日期: 2014-09-16; 修回日期: 2014-10-17

HrpY、HrpX 和 HrpV 负责 T3SS 分泌通道的组装 (图 1)^[6, 8-9]。目前研究者们已完成了 11 个青枯菌株的全基因组序列测定 (<https://iant.toulouse.inra.fr/bacteria/annotation/cgi/ralso.cgi>), *hrp* 基因簇在这些青枯菌中高度保守, 其 G + C 含量与整个基因组无明显差别, 且其上下游 35 kb 范围内不存在转座元件, 表明青枯菌 *hrp* 基因簇不存在基因水平转移现象, 可

能是祖先基因进化的核心基因组成员。这和青枯菌 T3Es (见 1.2 部分) 及其它一些植物病原细菌 *hrp* 基因簇具有广泛水平迁移现象不同, 如野油菜黄单胞菌 (*Xanthomonas campestris*) *hrp* 基因簇是其祖先在进化过程中通过基因水平转移获得的致病岛 (pathogenicity island)^[10-11]。

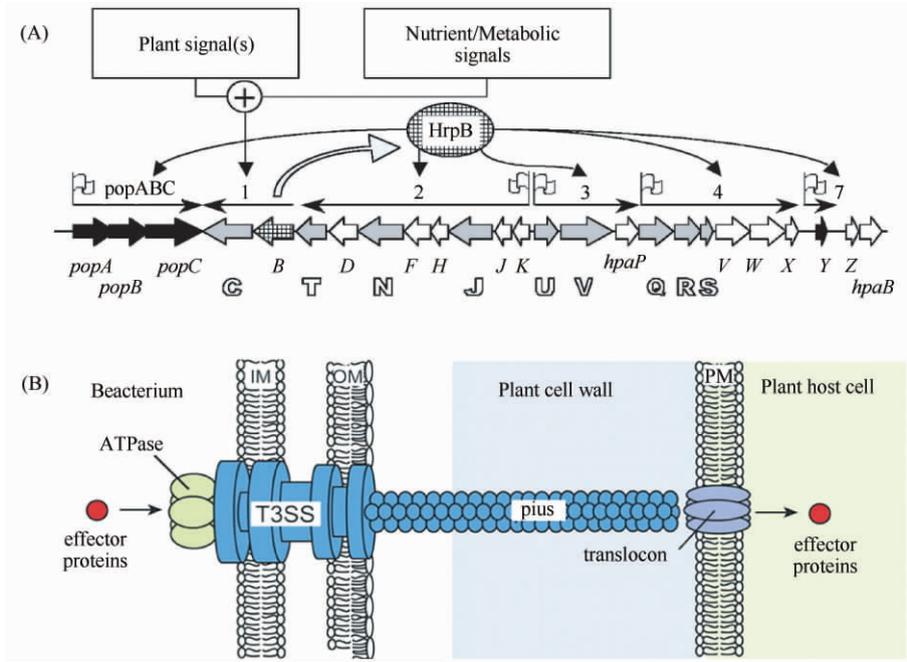


图 1. 青枯菌 *hrp* 基因簇结构和 T3SS 工作示意图

Figure 1. Genetic organization of *hrp* gene cluster and schematic representation of T3SS in *R. solanacearum*. A: Genetic organization of *hrp* gene cluster in *R. solanacearum* according to [8]. Thick arrows symbolize individual genes; single letters refer to *hrp* genes; gray and black arrows represent *hrc* genes; the arrow filled with a grid represents a regulatory HrpB; numbers above thin arrows indicate transcriptional units; flags indicate the *hrp_H* motif in the respective promoter. B: Schematic representation of T3SS from plant pathogenic bacteria according to [9]. IM, Inner membrane; OM, Outer membrane; PM, Plasma membrane.

1.2 青枯菌 T3Es 的组成与遗传特性

青枯菌利用 T3SS 将 T3Es 注射到寄主细胞中以破坏寄主植物防卫反应产生致病性, 青枯菌大多 T3Es 在致病过程中起决定作用, 因此又称为毒性蛋白, 少数 T3Es 可被植物抗性基因产物识别并激发抗性植物产生 HR, 因此又称为无毒蛋白 (Avr)。青枯菌 T3Es 种内遗传分化明显, 存在广泛的基因水平转移^[8-9], 研究者们对于青枯菌 T3Es 的命名也较为混乱, 如同一个 T3E 因菌株不同而拥有多个名称, 因此, 为规范命名, Peeters 等在 2013 年提议将青枯菌 T3Es 统一命名为 Rip (*Ralstonia* injected proteins), 如 Pop/AvrA 等广泛研究的 T3Es 被重新命名为 RipP/RipA^[12]。近年来, 研究者们通过各种方法在

不同青枯菌中鉴定到了大量 T3Es, 如 Mukaiharu 等人利用 Cya 报告系统在青枯菌 RS1000 菌株中鉴定到 72 个可注射到寄主细胞中的 T3Es^[13]; Peeters 等人通过泛基因组学研究现有 11 个青枯菌基因组序列, 发现了 94 个 T3Es: 其中 GM1000 中 71 个、RS1000 中 65 个, 单个青枯菌一般拥有 60 - 75 个 T3Es^[12]。而在其它一些病原细菌中 (包括动物和植物病原细菌), 研究者们迄今只鉴定出 30 - 40 个 T3Es, 青枯菌 T3Es 明显多于其它病原细菌, 这可能是青枯菌拥有更广泛寄主范围的一个主要原因^[6, 12]。其中, RipP、RipA、RipH 和 RipG 等家族蛋白在青枯菌中保守存在, 又称之为核心 T3Es, 占青枯菌所有 T3Es 的 43.6%, 其它 T3Es 则动态分布在

不同青枯菌株间,但迄今,青枯菌最核心的一些 T3Es 仍有待于进一步鉴定^[6,12,14]。青枯菌的一些 T3Es 也可以在其它病原细菌中找到同源蛋白,如青枯菌 T3Es 与丁香假单胞菌有 17 个同源,与黄单胞菌属细菌有 24 个同源,与食酸菌属细菌有 19 个同源,其中 RipB、RipD、RipE、RipP1 和 RipBD 在该几种病原细菌中均可以找到同源蛋白,表明这些 T3Es 在病原细菌进化过程中保守存在^[15]。

抗性植物可以识别无毒蛋白并激发产生 HR 以抵御植物病原细菌的侵染,因此,无毒蛋白的存在一定程度上限制了病原细菌的寄主范围,如青枯菌无毒蛋白 RipA 和 RipP1 的同时缺失可以使原本诱导烟草产生 HR 的青枯菌株 GMI1000 开始对烟草致病,显然 RipA 和 RipP1 在物种水平上限制了 GMI1000 的寄主范围^[16]。RipA、RipG、RipP 家族蛋白是最有代表性的青枯菌无毒蛋白^[16-17], RipP 家族蛋白(RipP1、RipP2 和 RipP3)特异性存在于演化 I 型菌株中,可能是该型菌株通过基因水平转移获得的无毒蛋白^[17]。对于其它一些植物病原细菌的无毒蛋白,研究者们很少在青枯菌中找到同源蛋白,如丁香假单胞菌 *P. syringae*DC3000 的 AvrPtoB、AvrE、HoPE、HopG1、HopAM1、HopAA1 和 HopN1 中只有 HopG1、HopAA1 和 AvrE 可以在青枯菌中找到同源蛋白,这可能是青枯菌拥有更广泛寄主范围的另一个主要原因^[6,12,18]。

2 青枯菌 T3SS 和 T3Es 转录表达的全局性调控

2.1 青枯菌 HrpB 直接控制 T3SS 及众多 T3Es 的转录表达

青枯菌 T3SS 及众多 T3Es 的转录表达受 HrpB 直接控制,HrpB 是 AraC 家族的一个转录调控因子(黄单胞菌属中为 HrpX),位于 *hrp* 基因簇的最下游,其通过对含 *hrp_{II}* 框(TTCG-N16-TTCG,黄单胞菌属中为 PIP (plant inducible promoter, TTCGC-N15-TTCGC) 框)启动子的结合控制整个 *hrp* 基因簇及众多 T3Es 基因的转录表达,决定致病性(图 1-A)^[8,13]。需要强调的是 HrpB 除了直接控制 T3SS 外还直接或间接地控制其它众多基因的表达,如 Occhialini 等采用基因芯片和转录组研究发现青枯菌 HrpB 正向调控 GMI1000 的 143 个基因表达,但

其中只有不到一半属于 T3Es^[19]。此外,上游区域 *hrp_{II}* 框的存在与否并不是 HrpB 是否控制该基因表达的决定因素,如 Cunnac 等研究表明只有 74% (52/70) 的 T3Es 基因上游区域鉴定到了 *hrp_{II}* 框的存在,而 15 个上游区域含有 *hrp_{II}* 框的基因并不受 HrpB 控制,因此,有必要对青枯菌 T3Es 的起始密码子及功能进行全新注释^[6,8,13]。

2.2 青枯菌利用 PhcA 通过 HrpG 和 PrhG 动态调控 T3SS 及 T3Es 的转录表达

T3SS 在众多病原细菌中保守存在,但 T3SS 被调控的途径却各有不同:Alfano 等^[20] 据 *hrp* 基因簇的组成和 T3SS 被调控途径的不同,将众多植物病原细菌归为两类,青枯菌和黄单胞菌同属一类(Group II),其 T3SS 被调控的途径明显有别于另一类植物病原细菌(Group I,主要为 *Pantoeastewartii*、*Pseudomonas syringae* 和 *Erwinia* spp., 详见综述^[21])。尽管青枯菌 HrpB 和黄单胞菌 HrpX 高度相似,同属 AraC 家族转录调控因子,都通过对含 *hrp_{II}* 或 PIP 框启动子的结合控制下游基因表达,但二者参与调控的网络却不尽相同。

青枯菌通过外膜蛋白 PrhA 感知外界宿主植物信号或其它代谢相关等信号并通过 PrhA-PrhIR-PrhJ-HrpG 通路激活 *hrpB* 转录表达,最终启动 T3SS 及 T3Es 基因的转录表达(图 2)^[4,20]。其中属于 OmpR/PhoB 家族二组分反应调节子的 HrpG 是该通路的核心^[22],其通过自身天门冬氨酸残基的磷酸化对外界信号做出应答并激活 *hrpB* 的转录表达^[23]。Plener 和 Zhang 最近都发现 HrpG 的一个高度同源物 PrhG (72% 的氨基酸一致性)也正向调控 *hrpB* 转录表达,二者对 *hrpB* 表达的调控互相独立^[24-25]。Yoshimochi 等研究发现 *hrpG* 的表达受到全局调控因子 PhcA 的间接负向调控^[26],Zhang 等研究发现 *prhG* 的表达受到 PhcA 的正向调控^[24],这使得 HrpG 和 PrhG 共同目标 *hrpB* 的表达受到 PhcA 的正负双向调控^[24]。PhcA 是 LysR 家族的一个转录因子,具有群体效应特性(quorum sensing),其活性被 3-羟基棕榈酸甲基酯(3-hydroxypalmitic acid methyl ester, 3-OH PAME)激活,但需要 3-OH PAME 的浓度达到一定阈值(5 nmol/L)^[27]。当细菌密度较高时,活化的 PhcA 通过对 *prhIR* 启动子的结合抑制 *prhIR* 的转录表达,从而切断 *prhIR* 及其下游 *hrpG*、*hrpB* 及 T3SS 的表达;当细菌浓度低时,3-OH PAME 的浓度低于激活 PhcA

的阈值, *prhIR*、*hrpG*、*hrpB* 等可以很好表达^[23, 26]; 而 *prhG* 的表达水平随细菌浓度的升高持续升高^[24]。Zhang 等^[24] 研究发现在寄主植物体内或与寄主植物共培养时, 青枯菌 *hrpG* 的表达随细菌浓度的升高而降低, 而 *prhG* 的表达随着细菌浓度的升高持续升高, 表明 PhcA 在宿主植物体内也分别正负调控 *prhG*、*hrpG* 的转录表达。青枯菌可能根据自身浓度变化切换 HrpG 和 PrhG 对 *hrpB* 及 T3SS 基因表达进行动态调控以促进致病过程发生(图 2)^[24]。Jacobs 等通过转录组研究发现青枯菌 T3SS 的表达在宿主植物体内菌体密度较高时并未受到显著抑制, 提出青枯菌 PhcA 在宿主植物体内可能并不抑制 T3SS 转录表达的观点^[28]。Plener 等研究结果表明 PrhG 在宿主植物体内可能并不调控 T3SS 的转录表达^[245], 而 Zhang 等^[24] 发现敲除 *prhG* 基因后, 青枯菌 OE1-1 菌株 *popA* (T3E) 在西红柿体内(叶面细胞间隙和茎部导管内)的表达水平都显著降低, 但这一现象只发生在西红柿

植株体内而并不发生在烟草体内。此外, HrpG 和 PrhG 二者在致病过程的作用也明显不同: HrpG 是青枯菌在宿主体内生长和致病必不可少的, 而 PrhG 与青枯菌宿主体内生长无关, 且 *prhG* 突变体仍表现出较强的致病力; HrpG 调控下游 185 个基因的表达, 但 PrhG 只调控除 *hrpB* 外少数基因的表达; *hrpG* 的表达受到 PrhA-PrhIR-PrhJ 通路正调控但和 PrhKLM 无关, 而 *prhG* 的表达和 PrhA-PrhIR-PrhJ 通路无关但和 PrhKLM 密切相关^[24, 29]。

尽管青枯菌和黄单胞菌同属 Group II, 研究者们并没有在黄单胞菌中发现 PrhA、PrhIR、PrhJ、PrhG、PrhKLM 的同源物, 特别是对于 HrpG 和 PrhG, 在众多病原细菌(包括植物和动物病原细菌)中, 只有青枯菌同时利用 HrpG 和 PrhG 调控 T3SS 的转录表达。青枯菌运用自己独特的全局性调控网络控制 T3SS 及 T3Es 的表达以促进致病过程发生。

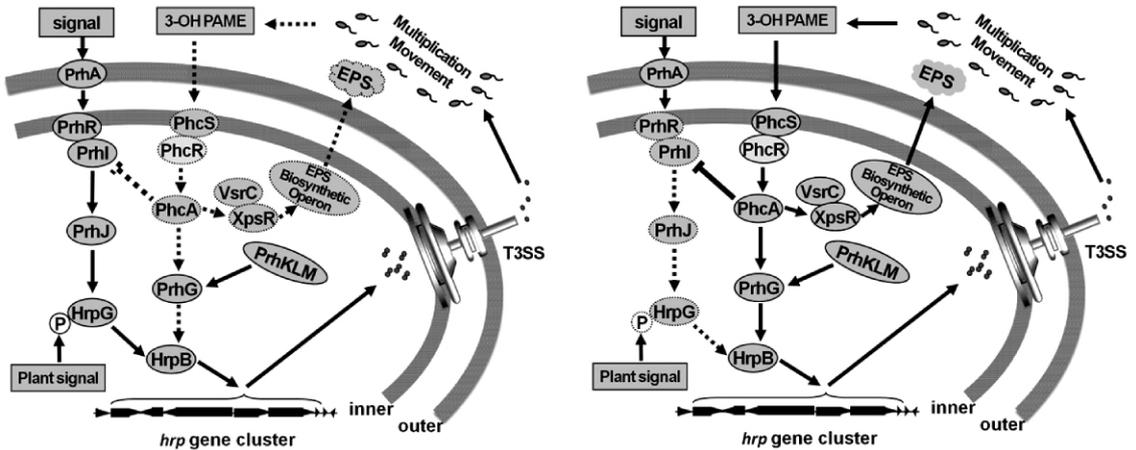


图 2. 青枯菌致病的全局性调控(修改自文献[4])

Figure 2. Dynamic regulation of PhcA on *hrp* gene cluster and T3SS in *R. solanacearum* (modified from^[4]). Single arrows and T-junction lines refer to positive or negative regulation respectively; solid lines and dashed lines refer to the presence or absence of gene expression and regulation between genes; P represents the phosphorylation of protein. Left, at low cells density, PhcA is not activated, and then the transcription of *hrp* gene cluster is positively regulated by the PrhA-PrhI/R-PrhJ-HrpG signal cascade; Right, at high cells density, activated PhcA begins to shut down the expression of *prhI/R-prhJ-hrpG*, and PrhG begins to play a major role in activation of the transcription of *hrpB*.

2.3 青枯菌 T3SS 及 T3Es 对外界环境信号的反应

青枯菌 T3SS 及众多 T3Es 基因的转录表达随外界环境不同而变化很大: 其转录表达在丰富培养环境中几乎停止, 贫瘠培养条件可以很好诱导其转录表达, 在寄主植物体内或与寄主植物共培养时, 其转录表达可被诱导到数十倍高的水平^[23, 28, 30]。一直以来, 人们认为这些外界环境信号(包括寄主植

物信号或其它代谢等相关信号)由青枯菌通过其外膜蛋白 PrhA 感知, Yoshimochi 等^[23] 研究发现 *prhA*、*prhIR*、*prhJ*、*hrpG* 在各种环境中的表达特性和 *hrp* 基因簇并不一致, 如 *hrpG* 在丰富培养环境中的表达水平远高于其在贫瘠培养环境中的水平; 此外 PrhA 缺失时, 青枯菌 *hrp* 基因簇的表达仍然随外界环境不同而变化。鉴于二组分反应调节子 HrpG 通过自身

磷酸化对外界信号做出应答并激活下游 *hrpB* 转录表达的特性, Yoshimochi 等认为青枯菌可能通过一些未知受体蛋白而不是 PrhA 识别寄主植物信号或其它代谢等相关信号, 然后通过 HrpG 配对的感应激酶 (sensor kinase) 指导 HrpG 的磷酸化从而激活 T3SS 及众多 T3Es 基因的转录表达^[23] (图 2)。PrhG 和 HrpG 虽然高度同源, 同属 OmpR/PhoB 家族二组分反应调节子, 也都正向调控青枯菌 T3SS 在宿主植物体内的表达, 但 HrpG 推定的磷酸化位点在 PrhG 中并不起明显作用, 这可能是 PrhG 对外界宿主信号反应较弱或由其它一些磷酸化位点负责对外界环境做出反应^[24]。HrpG 是较早被发现并广泛研究的一个核心调节子, 迄今已有 20 多年, 但与 HrpG 配对的感应激酶依然未知, 因此进一步研究青枯菌 HrpG 和 PrhG 调控 T3SS 及 T3Es 基因转录表达的分子机理对于揭示青枯菌对外界宿主信号的识别、传导具有重要意义。

3 青枯菌 T3Es 的功能研究

3.1 提高青枯菌在寄主体内的生长适应性

当前的研究表明青枯菌的一些 T3Es 可以促进青枯菌在寄主植物体内的生长, 但单个 T3E 的敲除并不明显影响青枯菌的致病力和体内增殖能力, 因此通过测定生长曲线及致病力曲线很难准确衡量单个 T3E 对青枯菌致病力的贡献^[31-32]。Macho 等将野生型菌株与单个 T3E 缺失突变菌株等量混合接种寄主植物叶片, 然后比较两种菌株在叶片内的增殖能力来评价该 T3E 的功能, 该方法灵敏可靠, 又称竞争性分析方法, 应用该方法可以定量研究单个 T3E 对青枯菌在植物体内的适应性和繁殖能力的影响^[17], 结果表明包括 RipD、RipP2、RipY、RipAC 等在内的十几个 T3Es 能提高 GMI1000 在茄子叶片内的生长适应性, RipA1、RipA2 和 RipD 提高 MI1000 在番茄体内的生长, RipD 和 RipP2 促进 GMI1000 在大豆体内的生长。但 RipA4 抑制了青枯菌在拟南芥和番茄体内的生长, RipA5 抑制了青枯菌在茄子和拟南芥内的生长, 这可能是不同宿主细胞识别不同 T3Es 的结果^[17, 32]。

3.2 激发 HR 或者抑制寄主植物的防御反应

T3E 首次被发现是基于其在抗性植物组织中诱发 HR 的能力 (又称无毒蛋白), 这些无毒蛋白可以

被抗性植物的抗性基因 (resistance gene, 简称 R 基因) 产物识别, 从而诱发 HR 以产生抗病性。目前研究发现青枯菌的几个 T3Es 能分别诱导不同种类植物或同种植物的不同抗性品种产生 HR, 如 RipAA 能够诱发烟草产生 HR, RipP1 能同时诱发烟草和一些苜蓿表型产生 HR, RipAX1 是一种锌蛋白酶, 可诱导茄子产生 HR, 但它们互作的 R 基因大多仍有待于发现^[12, 33-34]。最近研究者们利用农杆菌介导表达系统发现几个效应蛋白 (如青枯菌 BS048 菌株的 BS00326 等) 也可以诱导几种植物产生类似 HR 的反应, 但这几个效应蛋白是否属于 T3Es 的无毒蛋白仍有待于进一步确定^[35-36]。青枯菌的一些 T3Es 可以抑制寄主植物的基础免疫反应 (PAMP-triggered immunity, PTI), 这类抑制寄主免疫反应的 T3Es 属于毒性蛋白。其中 RipG4 和 RipR 已经被证实对具有抑制寄主防御反应的作用: RipG4 抑制了拟南芥胼质体的沉积, RipR 抑制了番茄中水杨酸介导的防卫反应^[12, 35]。

3.3 破坏寄主防卫相关蛋白酶体 (plant proteasome)

植物体内的一些蛋白酶体是植物防御激素如水杨酸、茉莉酸和乙烯等合成必须的, 决定其对植物病原细菌的防卫反应。青枯菌及其它植物病原细菌的一些 T3Es 可以破坏这些蛋白酶体以突破寄主植物的防卫反应^[12, 37]。迄今研究者们已经在青枯菌中鉴定出了 13 个可以破坏这些蛋白酶体的 T3Es, 这些 T3Es 多具有潜在的泛素连接酶活性 (ubiquitin-ligase activity), 其中 RipG 家族蛋白 (以前为 GALA 蛋白) 是研究最为广泛的一类 T3E^[12, 38]。RipG 家族蛋白有八个成员, 普遍具有 F-box 和富含亮氨酸重复序列 (leucine-rich repeat, LRR) 的结构域特征, 其可能在寄主细胞内形成 E3-泛素连接酶体以控制植物蛋白酶体的稳定性^[12, 38-39]。RipG 家族的八个蛋白共同决定青枯菌对寄主植物的致病性, 单一的 RipG 并不明显影响青枯菌对寄主植物的致病力, 目前的实验结果表明他们在功能上并不冗余^[12, 33]。鉴于 F-box 结构域在 RipG7 功能中的重要作用, 而 F-box 是泛素介导蛋白质水解过程中底物识别必须的, 人们推测 RipG 家族蛋白在寄主植物体内可能通过对植物防卫相关蛋白进行特异性识别并使其泛素化, 结果使该蛋白被降解或活性被改变, 最终破坏植物防卫反应^[38-39]。此外 RipV1 等 T3Es 也具有潜在的泛素连接酶功能, 其具体

作用机理还有待于进一步研究^[32-33]。

3.4 类转录激活蛋白功能 (Transcription Activator-Like, TAL)

近年来的一些研究结果表明青枯菌及其它植物病原细菌的一些 T3Es 具有类转录激活蛋白 (TAL) 的功能,因此又称之为 RipTAL^[12,33,40]。Li 和 Lange 等人最近的研究结果证实 RipTAL 可以进入到寄主细胞核,通过其一些重复结构域与寄主目标基因启动子区域 DNA 特异结合,从而激活该基因的表达,最终导致寄主植物感病^[40-41]。需要强调的是青枯菌 RipTAL 的重复结构域具有丰富的多样性,而黄单胞菌属植物病原细菌 TAL 蛋白的重复结构域则相对保守,如变化多局限于重复结构域的第 12 和 13 个氨基酸残基上,这在一定程度上决定了青枯菌和黄单胞菌属病原菌 TAL 效应蛋白工作机制的不同^[33,40]。尽管大量 RipTAL 的目标基因仍有待于进一步鉴定,RipTAL 的工作机制给青枯病抗性植物的选育提供了一个线索:可以把 RipTAL 特异结合的目标 DNA 插入到植物中已知青枯菌抗病基因的上游,利用青枯菌的侵染来激活抗病基因的表达以产生抗病性。

4 问题和展望

近年来随着二代测序技术和转录组等技术的发展,研究者们可以从体内 (*in planta*) 互作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,如:一直以来研究者们都认为青枯菌 T3SS 可能只在侵染寄主植物的早期阶段起作用,但 Monteiro 和 Jacobs 等通过转录组研究发现即使在已枯萎了的植物体内,青枯菌 T3SS 及 T3Es 基因仍保持较高的表达水平,表明其在侵染后期阶段可能也起一定作用;Jacobs 等人发现维管束组织内菌体密度较高时,PhcA 可能并不抑制 T3SS 及 T3Es 基因的表达,这和 Zhang 等的研究发现矛盾;Zhang 等通过构建转座子突变体文库筛选到了一批可能影响青枯菌 T3SS 表达的未知因子^[24],Schmidtke 等通过转录组研究发现一些小 RNA 可能和 T3SS 相关^[42],显然青枯菌调控 T3SS 的机制远比科学家想象的复杂和精妙。此外,随着泛基因组学的发展,越来越多的 T3Es 可能被发现,因此,进一步研究青枯菌 T3Es 的功能及其被调控的分子机理将有助于我们全面了解青枯菌侵染寄主植物的分子机理,为青枯病的防治提供新思路。

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] Elphinstone JG. The Current Bacterial Wilt Situation: A Global Overview. //Allen C, Prior P, Hayward AC. Bacterial Wilt Disease *Ralstonia Solanacearum* Species Complex. USA: APS Press, 2005: 9-28.
- [3] Martin C, French ER. Bacterial Wilt of Potato: *Pseudomonas solanacearum*. Lima, Peru: International Potato Center, 1985, Vol:13.
- [4] 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.
- [5] Valls M, Genin S, Boucher C. Integrated regulation of the type III secretion system and other virulence determinants in *Ralstonia solanacearum*. *PLoS Pathogens*, 2006, 2: e82.
- [6] Coll NS, Valls M. Current knowledge on the *Ralstonia solanacearum* type III secretion system. *Microbial Biotechnology*, 2013, 6: 614-620.
- [7] Poueymiro M, Genin S. Secreted proteins from *Ralstonia solanacearum*: a hundred tricks to kill a plant. *Current Opinion in Microbiology*, 2009, 12: 44-52.
- [8] Cunnac S, Boucher C, Genin S. Characterization of the *cis-acting* regulatory element controlling HrpB-mediated activation of the type III secretion system and effector genes in *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186: 2309-2318.
- [9] Büttner D, He SY. Type III Protein Secretion in Plant Pathogenic Bacteria. *Plant Physiology*, 2009, 150 (4): 1656-1664.
- [10] Coupat-Goutaland B, Bernillon D, Guidot A, Prior P, Nesme X, Bertolla F. *Ralstonia solanacearum* virulence increased following large interstrain gene transfers by natural transformation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2011, 24(4): 497-505.
- [11] Xu J, Zheng H J, Liu L, Pan Z C, Prior P, Tang B, Xu J S, Zhang H, Tian Q, Zhang L Q, Feng J. Complete genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* strain Po82. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(16): 4261-4262.
- [12] Peeters N, Carrere 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. DOI: 10.1186/1471-2164-14-859
- [13] 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 (3): 251-262.
- [14] Baltrus DA, Nishimura MT, Romanchuk A, Chang JH, Mukhtar MS, Cherkis K, Roach J, Grant SR, Jones CD, Dangl JL. Dynamic evolution of pathogenicity revealed by sequencing and comparative genomics of 19 *Pseudomonas syringae* isolates. *PLoS Pathogens*, 2011, 7: e1002132.
- [15] Ryan RP, Vorhölter F-J, Potnis N, Jones JB, Van Sluys M-A, Bogdanove AJ, Dow JM. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium plant interactions. *Nature Review of Microbiology*, 2011, 9: 344-355.
- [16] Poueymiro M, Cunnac S, Barberis P, Deslandes L, Peeters N, Cazale-Noel A C, Boucher C, Genin S. Two type III secretion system effectors from *Ralstonia solanacearum* GMI1000 determine host range specificity on tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2009, 22 (5): 538-550.
- [17] Macho AP, Guidot A, Barberis P, Beuzón CR, Genin S. A competitive index assay identifies several *Ralstonia solanacearum* type III effector mutant strains with reduced fitness in host plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2010, 23 (9): 1197-1205.
- [18] Lindeberg M, Cunnac S, Collmer A. *Pseudomonas syringae* type III effector repertoires: last words in endless arguments. *Trends in Microbiology*, 2012, 20: 199-208.
- [19] Occhialini A, Cunnac S, Reymond N, Genin S, Boucher C. Genome-wide analysis of gene expression in *Ralstonia solanacearum* reveals that the *hrpB* gene acts as a regulatory switch controlling multiple virulence pathways. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2005, 18 (4): 938-949.
- [20] Alfano JR, Collmer A. The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: Trafficking harpins, Avr proteins, and death. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179: 5655-5662.
- [21] Mole BM, Baltrus DA, Dangl JL, Grant SR. Global virulence regulation networks in phytopathogenic bacteria. *Trends in Microbiology*, 2007, 15 (8): 363-371.
- [22] Vasse J, Genin S, Frey P, Boucher C, Brito B. The *hrpB* and *hrpG* regulatory genes of *Ralstoniasolanacearum* are required for different stages of the tomato root infection process. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2000, 13 (3): 259-267.
- [23] 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*, 2009b, 75: 196-204.
- [24] 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.
- [25] 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 *Ralstoniasolanacearum*. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192 (4): 1011-1019.
- [26] 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 (10): 3424-3428.
- [27] Flavier AB, Clough SJ, Schell MA, Denny TP. Identification of 3-hydroxypalmitic acid methyl ester as a novel autoregulator controlling virulence in *Ralstonia solanacearum*. *Molecular Microbiology*, 1997, 26: 251-259
- [28] Jacobs JM, Babujee L, Meng F, Milling A, Allen C. The *in planta* transcriptome of *Ralstoniasolanacearum*: conserved physiological and virulence strategies during bacterial wilt of tomato. *mBio*, 2012, 3: e114-e212.
- [29] Zhang Y, Kiba A, hikichi Y, Ohnishi K. *prhKLM* genes of *Ralstonia solanacearum* encode novel activators of *hrpregulon* and are required for pathogenesis in tomato. *FEMS Microbiology Letters*, 2011, 317: 75-82.
- [30] 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.
- [31] Chen L, Shirota M, Zhang Y, Kiba A, Hikichi Y, Ohnishi K. Involvement of HLK effectors in *Ralstonia solanacearum* disease development in tomato. *Journal of General Plant Pathology*, 2014, 80: 79-88.
- [32] Remigi P, Anisimova M, Guidot A, Genin S, Peeters N. Functional diversification of the GALA type III effector family contributes to *Ralstonia solanacearum* adaptation on

- different plant hosts. *New Phytologist*, 2011, 192: 976-987.
- [33] 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.
- [34] 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.
- [35] Pel MJ, Pieterse CM. Microbial recognition and evasion of host immunity. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64: 1237-1248. 28.
- [36] Wroblewski T, Caldwell KS, Piskurewicz U, Cavanaugh KA, Xu H, Kozik A, Ochoa O, McHale LK, Lahre K, Jelenska J, Castillo JA, Blumenthal D, Vinatzer BA, Greenberg JT, Michelmore RW. Comparative large-scale analysis of interactions between several crop species and the effector repertoires from multiple pathovars of *Pseudomonas* and *Ralstonia*. *Plant Physiology*, 2009 150 (4) : 1733-1749.
- [37] Dudler R. Manipulation of host proteasomes as a virulence mechanism of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 2013, 51: 521-542.
- [38] Rohde JR, Breikreutz A, Chenal A, Sansonetti PJ, Parsot C. Type III secretion effectors of the IpaH family are E3 ubiquitin ligases. *Cell Host Microbe*, 2007, 1: 77-83.
- [39] Angot A, Peeters N, Lechner E, Vaillau F, Baud C, Gentzmittel L, Sartorel E, Genschik P, Boucher C, Genin S. *Ralstonia solanacearum* requires F-box-like domain-containing type III effectors to promote disease on several host plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2006, 103: 14620-14625.
- [40] Li L, Atef A, Piatek A, Ali Z, Piatek M, Aouida M, Sharakuu A, Mahjoub A, Wang G, Knan S, Fedoroff NV, Zhu JK, Mahfouz MM. Characterization and DNA-binding specificities of *Ralstonia* TAL-like effectors. *Molecular Plant*, 2013, 6 (4) : 1318-1330.
- [41] de Lange O, Schreiber T, Schandry N, Radeck J, Braun KH, Koszinowski J, Heuer H, Strauß A and Lahaye T. Breaking the DNA-binding code of *Ralstonia solanacearum* TAL effectors provides new possibilities to generate plant resistance genes against bacterial wilt disease. *New Phytologist*, 2013, 199: 773-786.
- [42] 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.

Advances in studies of the type III secretion system in *Ralstonia solanacearum*—A review

Yong Zhang^{*}, Muyuan Li, Feng Luo

Research Center of Bioenergy and Bioremediation, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: Bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* is one of the most devastating plant diseases worldwide. The syringe-like type III secretion system (T3SS) plays a crucial role in its pathogenicity. *R. solanacearum* uses the T3SS to inject effector proteins (Type III effectors) into the cytoplasm of host cells, causing diseases in susceptible plants or triggering the hypersensitive response in resistant plants. In this article we review recent advances in studies of *R. solanacearum* T3SS and highlight their unique features.

Keywords: *Ralstonia solanacearum*, Type III secretion system, Type III effectors

(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)

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

Received: 16 September 2014 / Revised: 17 October 2014