

植物病原物致病基因及无毒基因的研究进展

刘 宁¹ 胡景辉¹ 金保伟²

(1. 河北省农林科学院 农业信息与经济研究所 河北 石家庄 050051; 2. 河北博嘉农业有限公司 河北 石家庄 050081)

摘要: 致病基因是在病原物侵染植物的过程中决定与植物建立寄生关系和破坏植物正常生理功能的基因,致病基因调控了对植物趋性、吸附、侵入、定殖、扩展、破坏寄主、和显症等一系列病理学过程。无毒基因编码的直接或间接产物与抗病基因编码的直接或间接产物相互识别诱导植物过敏性坏死反应和其它的寄主抗性反应。对致病基因及无毒基因的深入研究,有利于病原物与寄主相互作用的研究,从而为制定更为有效的病害防治措施提供有力的依据。本研究就致病基因和无毒基因的特点及表达调控方面的研究进行了综述。

关键词: 无毒基因; 致病基因; 病原物

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2013)增刊-0050-04

Progress on Pathogenicity Genes and Avirulence Genes of Plant Pathology

LIU Ning¹ ,HU Jing-hui¹ ,JIN Bao-wei²

(1. Institute of Agricultural Information and Economy ,Heibei Academy of Agriculture and Forestry Sciences , Shijiazhuang 050051 ,China; 2. Hebei Bojia Agriculture Limited Company ,Shijiazhuang 050081 ,China)

Abstract: Plant pathogenic genes in the process of pathogen determine the infection of the pathogenic genes with a parasitic plant and plant damage normal physiological function ,the regulation of plant taxis ,adsorption ,invasion ,colonization ,expansion ,destruction of the host ,realistic models of pathology and significant process. Recognition of products encoded directly or indirectly by avirulence genes with products encoded directly or indirectly by resistance gene induced hypersensitive reactions and other necrosis host resistance response ,Further study on the pathogenic gene and avirulence gene facilitates the study of pathogen host interaction ,so as to provide evidence for effective disease control measures. Avirulence genes ,pathogenicity genes and gene expression and regulation characteristics of the study were reviewed in this study.

Key words: Avirulence genes; Pathogenicity genes; Pathogens

随着人们生活水平提高,人们更加注重饮食的营养和品质,因此,对农作物及其产品的质量要求也越来越高,生产绿色无毒、无害的农作物产品是人们一致追求的目标。培育抗病品种可以减少防治病害施用农药对植物产品造成的污染和危害,基因工程育种是目前比较先进的育种手段,这一方法不但能够从分子水平上进一步研究植物与病原菌相互作用的机制,而且还可以通过基因工程这一现代生物技术直接、快速和高效地培育抗病作物品种。而基因工程育种,首先就要了解致病基因和无毒基因,从而系统透彻地了解病原物与寄主相互作用的机制。

1 致病基因和无毒基因

致病基因(Pathogenicity genes)是植物病原物中和植物致病性相关的基因。在侵染植物过程中致病基因决定了与植物建立寄生关系和破坏植物正常生理功能的过程,调控了对植物趋性、吸附、侵入、定殖、扩展、破坏寄主、和显现症状等病理学过程^[1]。

无毒基因(Avirulence genes)是病原物中决定对带有相应抗病基因的寄主植物特异的不亲和无毒基因。无毒基因不仅决定了对寄主植物不同品种的无毒性,也决定了对不同植物或非寄主植物的无毒

收稿日期: 2013-07-10

作者简介: 刘 宁(1982-),女,河北正定人,硕士,主要从事植物病害生物防治研究。

通讯作者: 金保伟(1982-),男,河北宽城人,学士,主要从事农业技术推广、试验示范与配方筛选工作。

性^[2]。*avrA* 是 Staskawicz 从 *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* 上克隆的第一个无毒基因。之后,在某些 *P. syringae* 和 *Xanthomonas campestris* 的致病变种中也克隆到了无毒基因,许多 *avr* 无毒基因位于质粒 DNA 上。已克隆的无毒基因有些可以编码独特的蛋白质产物,烟草花叶病毒的无毒基因编码的外壳蛋白,可作为激发子物质,被带有相应抗病基因的烟草品种识别,从而产生过敏性坏死反应^[3]。番茄叶霉病菌无毒基因 *avr9* 编码了 63 个氨基酸序列的多肽,这个基因只有在与含有 *cf9* 基因的番茄抗病品种植株互作时才可以被诱导表达,使番茄植株产生过敏性坏死反应^[4]。*hrp* 基因簇决定了革兰氏阴性植物病原细菌可在非寄主植物上激发过敏性坏死反应,在感病寄主上具有致病性^[5]。*hrp* 基因一般成簇存在,基因簇大小为 25 ~ 30 kb,通常由许多个转录单位组成,有 6 ~ 8 个转录单位,并且这些基因簇中的 *hrp* 基因协同调节,相当于一个调控单元,许多植物病原菌 *hrp* 基因簇位于染色体上,*R. solanacearum* 的 *hrp* 基因簇被定位于 2.1 Mb 大质粒中^[6]。丁香假单胞大豆致病变种中的无毒基因 *hrp* 基因簇可编码在非寄主植物上激发过敏性坏死反应的非特异性蛋白质激发子^[7]。

2 植物病原物致病基因和无毒基因的特征

2.1 基因的数量

致病基因是病原物对植物致病过程中所必需的基因,但是病原物体外生长并不一定需要,一个病菌至少有 100 多个致病基因,目前已经有一部分致病基因被鉴定和克隆出来^[1]。严婉荣^[8] 根据 NCBI 上提供的果斑病菌 *hrcN* 基因序列设计引物克隆了瓜类果斑病的致病菌西瓜嗜酸菌 (*Acidovorax citrulli*) 的 *hrcN* 基因,并运用同源重组双交换的方法构建了该基因的突变菌株,推测 *hrcN* 基因只是对细菌的致病力有影响,并不是细菌正常生存所必须的。

2.2 基因的成簇性

致病基因被定位于染色体上或质粒上,大多成簇排列。胞外多糖的生物合成基因,病原物胞外降解酶和泌出基因以及许多细菌的 *hrp* 基因等都是以大基因簇的方式存在。菊欧氏杆菌果胶酶 5 种同工酶基因存在于 2 个基因簇上。甘蓝黑腐病菌中与多糖合成和胞外酶泌出有关的基因成簇排列。根癌土壤杆菌致病基因主要集中在 Ti 质粒的 T 区和 V 区,V 区就有 8 个调节子: *virA*, *virB*, *virC*, *virE*, *virF*, *virG*, *virH* 等。李有志^[9] 发现野油菜黄单胞菌野油菜致病型中连续的 7 kb 区域中含有一个与 EPS 产

生有关的基因簇。

2.3 基因的多效性

致病基因如果发生突变,不仅对病原物的致病性,而且对病原物的生理生化等表型变化具有多效性。许多毒性基因突变体在致病性和寄主性上影响不同。有的部分降低,有的完全丧失致病性;并且对诱导非寄主植物过敏性坏死反应能力也有一定的影响。突变体可以在寄主体内生长和定殖,但不产生任何病症。无毒基因如果发生突变,突变体可以对相应的寄主致病。因为突变体的无毒基因不能被寄主的抗病基因识别,植物不能表达出抗病反应。致病基因突变还可以赋予病原物丰富多样的生化表型,发生连锁性的改变,产生各种多糖、激素、毒素、和胞外酶等致病基因生化因子的性状。有的突变体产生上述致病因子的能力高于或低于野生型菌株。表明致病基因与代谢途径中涉及到的有关基因之间有着复杂的调控或连锁关系^[10]。

2.4 基因的保守性

从同一种病原物克隆到的致病基因,可能存在其他的致病变种、小种,不同种的病菌、非病原菌,甚至也在动物病原菌中发现了结构上同源的序列,其编码的产物生化特征基本类似,有的致病基因具有致病功能同源性,有的并不是这样。油橄榄假单胞与根癌土壤杆菌中的生长素和细胞分裂素生物合成基因高度同源。丁香假单胞的不同致病变种的 *hrp* 基因也是同源的,甘蓝黑腐病菌与青枯假单胞不同致病变种的 *hrp* 基因之间具有同源性。*hrp* 基因在一些病原细菌中可以相互交换,向其他细菌中导入 *hrp* 基因可以使受体获得诱导寄主植物防卫反应的能力^[1]。从丁香假单胞致病变种中克隆的 *hrp* 基因簇片段,大小为 32 kb,在丁香假单胞烟草致病变种、大肠杆菌和荧光假单胞中表达,可以导致烟草植株的过敏性坏死反应^[11]。虽然无毒基因有不同的专化性,但是很多无毒基因之间却存在着明显的同源性。辣椒斑点病的无毒基因家族中各成员之间基因中心区域都有一个编码 34 个氨基酸多肽的重复序列,并且 *avrB3* 和其他致病变种中的无毒基因高度的同源^[1]。水稻白叶枯病菌的无毒基因 *avr10* 不仅存在与不同小种中,也在其他致病变种,甚至其他属不同菌株中有广泛同源性^[12]。

3 植物病原物致病基因和无毒基因的表达和调控

3.1 致病基因的表达和调控

3.1.1 致病基因的表达 病原物致病基因表达有

的是组成性的,有的是诱导性的。

受环境因素影响较少,在个体各个生长阶段的大多数或几乎全部组织中持续表达或变化很小,这类基因的表达称组成性表达。水稻黄单胞菌的 *avrBS3* 基因在无机培养基、复合培养基,以及在植株体内都是组成性表达^[13]。

许多致病基因常因受到植物成分的诱导而表达,即诱导性表达。大多数病原真菌和细菌的胞外酶基因,如里氏木霉的纤维素酶和木聚糖酶基因是诱导表达^[14]。许多病原细菌的 *hrp* 基因在复合培养基上不表达,而在无机培养基或在植物上生长时表达水平就很高^[15]。植物细胞成分有的起着基因活化的刺激信号的功能,常见的有糖类、酚类和一些未知低分子量的物质。从某些双子叶植物伤口释放出的羟基乙酰丁香酮和乙酰丁香酮等酚类物质,可刺激根癌土壤杆菌 V 区基因的活化和表达^[16],玉米萎蔫病菌基因、丁香假单胞丁香致病变种基因等基因的表达都和植物成分的诱导有关^[2]。

植物成分对致病基因诱导作用的研究方法:基因融合法,将致病基因序列和报导基因融合,指示诱导表达;用植物成分诱导病原物产生的多肽制备抗体,筛选表达性基因文库,或用差异性转录产物反转录成 cDNA 后特异性杂交,鉴别病原物中表达诱导的基因;诱导性启动子探针法,鉴别和分离出受植物诱导的启动子以及启动子多控制的致病基因序列^[1]。

3.1.2 致病基因的调控 致病基因的表达除了受到植物成分影响外,还受到温度、碳源、氮源、酸碱度、渗透压等因素的调控。黄娇芳^[17]研究发现,吩嗪-4-羧酸(PCA)和绿脓菌素(PYO)产物合成差异的原因是 PCA 转化为 PYO 的 1 个修饰基因 *phzM* 具有温度依赖性和菌株特异性表达;调整碳源可以改变次级代谢产物吩嗪类化合物的组成,并且证明初级代谢抑制子直接结合于翻译起始位点附近富含 A 的 CA 基序。番茄叶霉菌(*Fulvia fulva*(Cooke) Ciferri)无毒基因 *Avr9* 被发现在寄主体内以及体外氮源缺乏的条件下均能够被强烈诱导表达^[18]。

植物病原细菌致病基因表达和调控的 1 种主要机制是双组分调控系统。典型的双组分调控系统是由 2 个不同的基因编码的 1 对感受蛋白和调节蛋白而组成。感受蛋白一般为能感受胞外环境刺激信号的跨膜蛋白,经过变构传入胞质。经过感受蛋白 N-端感受到的胞外环境刺激信号,经保守的 C-端与调节蛋白的保守 N-端互作,通过磷酸化过程进行信号的传递,调节蛋白被磷酸化后具有在转录水平上调

控其他基因的表达的功能。在很多的双组分调控系统中,调节蛋白是 DNA 的结合蛋白,它能够特异性地结合基因启动子上游 DNA 序列,激活基因的转录。双组分调控系统的感受蛋白和调节蛋白在氨基酸序列上具有高度的保守性,感受蛋白 C-端大约 250 个氨基酸具有明显的同源性,N-端虽然不具有同源性,但是大多数都含有多个疏水区域。由 *virA* 和 *virG* 组成的双组分调控系统是根癌土壤杆菌的毒性基因 *virA* 和 *virG* 编码的,其中跨膜蛋白 *virA* 能直接感受从植物伤口释放出的糖类和酚类物质,并将信号传递给调节蛋白 *virG*,调节蛋白 *virG* 活化后可调控其他的 *vir* 基因表达,而 *vir* 基因被激活后,可促进 T-DNA 向寄主植物细胞转移和整合。

3.2 无毒基因的表达和调控

3.2.1 无毒基因的表达和调控 根据体内外无毒基因启动子表达活性的研究可知,无毒基因的表达受环境和自身 2 种因素调节。在体外调节过程中,丁香假单胞菌的无毒基因 *avrD* 在大豆叶片内表达活性可提高 100 倍,这说明无毒基因的表达受到寄主成分的诱导^[2]。无毒基因在和植物互作过程中可否被诱导表达也依赖于病原菌 *hrp* 基因的活性。此外,无毒基因表达还与病原菌获得的营养有关,一些糖类可以诱导缺营养培养时病原菌的无毒基因的表达。*P. s. pv. glycinea* 中的 *avrB* 的表达依赖于一定的碳源,并且只能在基础培养基上表达,而不能在富集培养基上表达。*avrB* 在抗病寄主和感病寄主及非寄主上都能高水平地表达,表明 *avrB* 表达不受特异性植物因子的调节。而在体内 *hrp* 基因活性的增强或者突变影响着无毒基因的表达活性,所以说 *hrp* 基因或者其表达的产物对无毒基因有一定的调控作用。

3.2.2 无毒基因产物的特性 无毒基因直接的或者间接的产物和寄主抗病基因的产物互作可诱发植物系统防卫反应的特异性诱导子。决定病原—寄主特异性非亲和互作的病原因子并不是无毒基因直接的产物。已分离到的无毒基因编码的蛋白大多为亲水性的蛋白。蛋白序列中并没有疏水区,不是跨膜蛋白,不能起到激发子的作用^[19]。可能参与植物识别或者识别后信号传递的蛋白的 N-端有信号肽的特性,如 *avrXca* 编码的蛋白^[20]。基因的产物通过诱导寄主释放低分子量激发子起作用。所以,无毒基因的直接产物首先要和细胞内其他物质作用产生间接物质,接着和寄主抗性基因的产物相互作用,从而诱导寄主植物的过敏性坏死反应。

3.2.3 研究无毒基因的意义 植物抗病基因工程

可以将无毒基因与寄主抗性基因特异性识别诱发的过敏性坏死反应最为有效地运用。把无毒基因与对应的抗性基因组成的基因盒子插入对病原物侵染特异性局部表达的启动子下面, 转化目标植物, 利用病原菌的侵染诱导无毒基因和相应抗性基因的表达, 通过其产物的相互识别而诱发植物过敏性坏死反应, 从而达到控制病害目的。

深入地研究无毒基因不仅能揭示植物抗(感)病的分子机理, 同时也可提供从植物中克隆抗性基因的新方法。可以利用病原细菌的激发子—寄主受体相互识别理论, 使用适宜的特异性的激发子作为探针(经标记的), 分离与之相吸附的植物蛋白, 倘若该蛋白是抗性基因编码, 就可以进一步推导编码该蛋白的抗性基因。

向一个不含对应抗性基因的寄主品种中导入无毒基因, 使该基因表达特异性激发子, 然后将该寄主作受体, 用 cDNA 或 YAC 克隆去转化该受体, 该 cDNA 或 YAC 克隆与对应抗性基因紧密连锁并且用 RFLPs 标记, 转化后的植物如果产生过敏性坏死反应, 就表明导入的 cDNA 或 YAC 克隆中存在此种抗性基因, 通过亚克隆就可以分离出这个基因。

无毒基因的研究为过敏反应激发子—受体模型提供了证据也在分子水平上证实了 Flor 的“Gene-for-gene”假说。但是有些问题还需要更加深入的研究: 一个无毒基因和几个抗性基因相对应, 以及一个抗性基因同时和几个无毒基因作用的“复数 gene-for-genes 的现象是否具有普遍性, 有待人们进一步的研究; 因为无毒基因的产物并不直接起激发子的作用, 所以, 无毒基因和抗性基因相互识别的方式以及识别后如何产生过敏反应, 也是今后需要着重解决的问题。

参考文献:

- [1] 何晨阳, 王金生. 试论病原物的致病基因[J]. 植物病理学报, 1994, 24(2): 97-99.
- [2] 赵廷昌, 冯凌云, 何礼远, 等. 植物病原细菌无毒基因研究进展[J]. 国外农学—杂粮作物, 1998, 18(5): 45-48.
- [3] 郑 丽. 烟草花叶病毒外壳蛋白诱导烟草抗病毒作用[D]. 福州: 福建农林大学, 2009.
- [4] 李 淮, 王 莱, 武国凡, 等. 植物抗病性的分子机制和信号传导[J]. 西北师范大学学报: 自然科学版, 2006, 42(2): 113-117.
- [5] Lindgren P B, Peet R C, Panopoulos N J. Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. ‘phaseolicola’ controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity on nonhost

- plants[J]. Journal of Bacteriology, 1986, 168: 512-522.
- [6] SALANOUBAT M, GENIN S, ARTIGUENAVE F, et al. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanaceum* [J]. Nature, 2002, 415(6871): 497-502.
- [7] 张 岩, 武辉军, 周晓辉, 等. 丁香假单胞大豆致病变种 harpin 编码基因的克隆表达与功能研究[J]. 南京农业大学学报, 2013, 36(1): 6-12.
- [8] 严婉荣. 瓜类细菌性果斑病菌基因 *hrcN* 的克隆及功能分析[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- [9] 李有志. 野油菜黄单胞菌野油菜致病型胞外多糖产生有关的一基因簇的鉴定和分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 1999.
- [10] L INDGREN P B. The role of *hrp* genes during plant 2 bacterial interactions [J]. Annual Rev Phytopathol, 1997, 35: 129-152.
- [11] 李江利. 丁香假单胞菌番茄致病变种和烟草致病变种 egfp 标记突变体的构建[D]. 郑州: 河南农业大学, 2011.
- [12] 梁 斌. 水稻白叶枯病菌无毒新基因的功能鉴定以及 Quorum Sensing 相关基因的克隆和表达[D]. 上海: 复旦大学, 2004.
- [13] 李 平, 龙菊英, 张 燕, 等. 水稻黄单胞细菌的无毒基因[J]. 南京农业大学学报, 2004, 3: 119-124.
- [14] 伍 红, 陈秀珍, 董志扬, 等. 碳源对里氏木霉 QM9414 胞外酶基因表达的影响[J]. 西南民族大学学报: 自然科学版, 2011, 37(3): 411-418.
- [15] 肖友伦, 李玉蓉, 刘之洋, 等. 水稻条斑病细菌 *hrp* 基因诱导表达系统的建立[J]. 微生物学报, 2007, 47(3): 396-401.
- [16] 徐东晖, 许实波, 李宝健, 等. 诱导根癌土壤杆菌 vir 区基因表达信号分子的构效研究[J]. 植物学报, 1999, 41(11): 1252-1254.
- [17] 黄娇芳. 温度及碳源分解代谢抑制系统调控 *phzM* 基因表达[D]. 上海: 上海交通大学, 2011.
- [18] van den Ackerveken G F J M, Dunn R M, Cozijnsen A J, et al. Nitrogen limitation induces expression of the avirulence gene *avr9* in the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* [J]. Mol Gen Genet, 1994, 243(3): 277-285.
- [19] De Wit P J G M. Molecular characterization of gene-for-gene systems in plant-fungus interactions and the application of avirulence genes in control of plant pathogen. [J] Ann Rev Phytopathol, 1992, 30: 391-418.
- [20] Parker J E. Interaction of *Xanthomonas campestris* with *Arabidopsis thaliana*: Characterization of a gene from *X. C. pv aphani* that confers avirulence to most *A. thaliana* accessions [J]. Mol Plant-Microbe Interact, 1993, 6: 216-224.