

植物病原细菌 *hrp* 基因研究进展

房保海¹ 张广民^{1*} 迟长凤¹ 王 波² 李在臣³

(山东农业大学植保学院 泰安 271018)¹ (山东省莱芜检验检疫局 莱芜 271100)²

(山东省济南市历城区农业局 济南 250100)³

摘要: *hrp* 基因决定植物病原细菌对寄主植物致病性和诱导非寄主及抗病寄主过敏性反应, *hrp* 基因在植物和动物病原细菌中具有同源性, 编码产物具有 HR 的激发子、调节和组成Ⅲ型分泌系统等功能, *hrpM* 是 *P. syringae* 合成 β -(1, 2)-葡聚糖必需的, 除了 Avr 蛋白和 harpins 外致病性或毒性蛋白也可从 Hrp 系统分泌, 表明 *hrp* 基因在病原细菌致病性和寄主范围等方面具有潜在作用。

关键词: 植物病原细菌, *hrp* 基因, 生化功能, 防卫反应

中图分类号: Q753 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 02- 0102-05

植物病原细菌主要为 *Erwinia*、*Pseudomonas*、*Xanthomonas* 和 *Ralstonia* 4 类革兰氏阴性菌, 具有 3 个特征: 能定殖于植物细胞间隙、能杀死植物细胞及具有 *hrp* (HR and pathogenicity) 基因。 *hrp* 基因决定病原菌对寄主致病性和诱导非寄主或抗病寄主 HR (hypersensitive reaction, HR), Lindgren 等 (1986) 首次从 *P. s. pv. phaseolicola* 中克隆到 *hrp* 基因^[2]; 序列分析表明植物病原细菌 *hrp* 基因簇与动物病原 *Yersinia* spp. 毒性蛋白 (Yop) 分泌系统组分具有同源性。 *hrp* 基因具有编码 harpins、Ⅲ型蛋白分泌系统 (Hrp 系统) 组分和调控 *avr* 基因等生化功能, 而且 *hrpM* 是 *P. syringae* 合成 β -(1, 2)-葡聚糖必需的; *hrp* 基因在植物病原细菌定殖和植物防卫反应的诱导等方面具有重要的潜在的作用。

表 1 植物和动物病原细菌 Hrc 蛋白和鞭毛同源蛋白

植物病	<i>Yersinia</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Shigella</i>	Flagellar
原蛋白	蛋白	蛋白	蛋白	蛋白
HrcC	YscC	InvG	MxiD	
HrcJ	YscJ	PrgK	MxiJ	FlhF
HrcN	YscN	SpaL	Spa47	FlhL
HrcQ	YscQ	SpaO	Spa33	FlhN, -Y
HrcR	YscR	SpaP	Spa24	FlhP
HrcS	YscS	SpaQ	Spa9	FlhQ
HrcT	YscT	SpaR	Spa29	FlhR
HrcU	YscU	SpaS	Spa40	FlhB
HrcV	YscV	InvA	MxiA	FlhB

1 *hrp* 基因的组成和调控

1.1 *hrp* 基因和 *hrc* 基因 *hrp* 基因是由 Lindgren 等首次克隆, 用转座子 Tn5 对菜豆晕斑病菌 (*P. s. pv. phaseolicola*) 进行随机插入诱变, 筛选出 6 个突变体, 它们既失去对感病菜豆的致病性, 也不引起非寄主植物和抗病寄主的 HR。现已从除土壤杆菌 (*Agrobacterium*) 外的其它 4 类 G⁻ 植物病原细菌中分离到 *hrp* 突变体, 包括丁香假单胞 (*P. syringae*)、青枯假单胞 (*Ralstonia* (= *Pseudomonas*) *solanacearum*)、甘蓝黑腐黄单胞 (*Xanthomonas campestris*)、梨火疫欧氏杆菌 (*Erwinia amylovora*) 和菊欧氏杆菌 (*E. chrysanthemi*) 等。有些 *hrp* 基因与 *Yersinia* spp. 的毒性蛋白 (Yop) 分泌系统组分具有同源性, 重新命名为 *hrc* (HR and conserved) 基因, 以与 *Yersinia ysc* 同源基因最后一个字母命名,

* 联系人 中国烟草学会理事

收稿日期: 2002-04-29, 修回日期: 2002-06-14

系统表达时被泌出, 热稳定, 具亲水性, 缺少 N 末端信号肽, 能激发 HR。Harpin 基因一般毗连或接近各自的 *hrp* 基因簇, 而 *hrpZ* 位于 *hrp* 操纵子内。研究表明 harpins 在决定寄主范围方面具潜在作用。

2.2 识别功能 1997 年何胜阳从丁香假单胞中鉴定出 2 个 *hrp* 基因 (*hrpS* 和 *hrpH*) 与细菌性纤毛 (pilus) 形成有关, 后重新命名为 *hrcC*, 可能涉及到细菌的识别, 生物学功能已证明与细菌的致病性生化因子的运输有关。E. Roïne 等 (1997) 发现由 *P. s. pv. tomato hrpA* 编码的蛋白 HrpA 是细菌纤毛的组分, 纤毛与植物细胞膜接触可泌出致病因子^[8]。HrpA 非极性突变菌株即使携有 *avr* 基因, 也不能激发适宜试验植物产生 HR, 因此 Hrp 纤毛可能是运输 Avr 蛋白必需的。

2.3 调节无毒基因表达 *P. s. pv. glycinea* 无毒基因 *avrB* 的表达受 *hrpL* 和 *hrpRS* 两位点调控, HrpR 和 HrpS 与反应调节子 NtrC 类相近, 具有保守的 C 末端 DNA 结合区域, 但与大多数 NtrC 成员不同, 缺少调节调节子活性的 N 末端区域。 *X. c. pv. vasicatoria* 只有当完整功能的 *hrp* 基因存在时在植物组织中才能组成型表达 *avrBs3*。

2.4 植物病原细菌Ⅲ型蛋白分泌系统组分

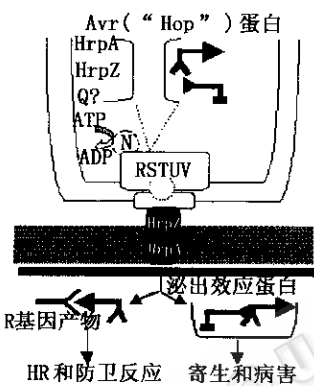


图2 HrpⅢ型泌出系统转运 Avr 蛋白作用的源鞭毛系统 (flagellium-derived system) (表1和图2)。白至植物细胞模式图 (*p. syringae*) 突变分析表明许多 *hrc* 和 *hrp* 基因产物是泌出需要的, 例如仿 James R Alfano, 1997

仿 James R Alfano, 1997 HrcU, -C (HrpH) 和 HrpE 是泌出 HrpZ 必需的, *E. amylovora* HrpN 的泌出依赖于 HrcV (HrpI); *R. solanacearum* 的 PopA1 泌出依赖于 *hrcC* (*hrpA*)、*hrcV* (*hrpD*)、*hrpF*, -W, -K, -X 和至少 2 个其它 *hrp* 转录单元中的基因^[2,5]。

3 hrpM 是 *P. syringae* 合成 β - (1, 2) -葡聚糖必需的

病原细菌多糖被认为在植物侵染过程中起作用, 包括胞外多糖 (EPS)、荚膜多糖、脂多糖 (LPS)、脂寡聚糖 (Lipooligosaccharides) 和 β -(1, 2)-葡聚糖, *P. syringae* β -(1, 2)-葡聚糖可能是细菌在植物胞间隙低渗环境中生长必需的, 同时也是细胞膜重要结构组分和 Hrp 泌出系统组装必需的。研究表明, *P. syringae* hrpM 突变体在培养基中产生 β -(1, 2)-葡聚糖明显改变^[11]。*P. s. pv. syringae* 产生线性 β -(1, 2)-葡聚糖, 与 *E. coli* 源膜寡聚糖 (MDOs, membrane-derived oligosaccharides) 结构相似。hrpM 基因座在 *P. syringae* 致病变种 *phaseolicola*、*tabaci/angulata*、*glycinea*、*lachymans*、*tomato* 和 *coronafaciens* 中保守, 含 ORF1 和 hrpM 2 个 ORF, hrpM ORF 在核酸水平上与 *E. coli* *mdoGH* 操纵子中的 *mdoH* 69% 同源, *mdoH* 编码产物是葡萄糖基转移酶活性 (glucosyl trans-

ferase activity) 必需的; 互补分析表明 *hrpM* 在 *P. syringae* 中功能和 *mdoH* 在 *E. coli* 中的功能一致^[1]。低渗培养基中 *P. s. pv. syringae*β- (1, 2) -葡聚糖和 *E. coli* MDOs 生物合成都增加, 可能是病原细菌控制周质空间渗透势的一种机制。

4 *hrp* 基因参与植物-病原细菌互作

4.1 *hrp-avr* 基因互作 在许多植物-病原细菌互作中, *avr* 基因活性是依赖于具有功能的 *hrp* 系统^[7]。*hrp* 基因突变的 *P. s. pv. glycinea* 不能激发抗性大豆品种产生 HR; *avr* 基因 *avrB*, *-Pto*, *-D*, *-Rpt2*, *-Rpm1* 和 *-E* 在 *P. s. pv. glycinea hrpRS* 或 *hrpL* 突变背景下不能表达^[1], 有趣的是, *P. syringae avr* 基因启动子区域中存在 *hrp/avr box*, 这与它们的转录依赖于 *hrp* 调节系统一致^[1]。

hrp 和 *avr* 基因产物存在潜在的互作。从 triple lacUV₅ 启动子下表达的 *avrB* 和组成型启动子调控下 *hrpL* 的二次拷贝的质粒的 *E. coli* 转合体, 能专化性激发具相应 *Rpg1 R* 基因的大豆和含 *Rpm* 的 *A. thaliana* 的基因型专化的 HR, 在无 *Rpg1* 或 *Rpg1* 的植株中检测不到 HR, 因此功能 Hrp 系统是 *avr* 基因在 *E. coli* 中表达和 *avr-R* 基因介导的植物 HR 所必需的。HR 的诱导也依赖于 HrpZ, HrpZ 可能在一些 *avr* 基因产物向植物细胞运输中起作用, HrpZ 可能起到陪伴分子蛋白功能^[1]。

4.2 *hrp* 基因和植物防卫反应的诱导 Hrp 系统在 harpins 和 PopA1 泌出中起作用, 且潜在参与 Avr 蛋白泌出, *hrp* 基因对 HR 的诱导和植物抗病性具重要影响^[1]。*P. s. pv. syringae* 可诱导黄瓜 SAR (系统获得性抗性), 而 HrpZ 蛋白同样可以诱导 SAR。研究表明 SAR 被 *P. syringae* 诱导依赖于 HR 激发子, 而激发子是通过 Hrp 系统运输的。*hrp* 突变体不能诱导 SAR 或组织坏死, 但 *P. s. pv. tabaci hrp* 突变体能诱导 PAL、CHS、CHI 和 Chitinase 的转录和无 HR 产生的寄主中植保素的增加; *P. s. pv. syringae hrpH* 突变体能诱导黄瓜叶片 POD 和 chitinase 的转录; *P. s. pv. phaseolicola hrpD* 突变体能诱导莴苣叶肉组织细胞超微结构变化, 包括富羟脯的糖蛋白、酚类化合物和愈创葡聚糖沉淀^[12]。

4.3 *hrp* 基因和致病性 植物病原细菌致病和毒性蛋白被认为可由 Hrp 系统泌出^[1,9,13], 除了 harpins 和 *P. s. pv. tomato HrpA* 外, Avr 蛋白代表一类由 Hrp 系统泌出的致病性/毒性蛋白, 一些 *avr* 基因产物可在病程方面起作用, *P. s. pv. maculicola avrR_{pm1}* 失活时, 该菌不能引起病害症状或在亲和性 *A. thaliana* 上生长^[13]。*avrB s3* 基因家族成员 *pthA*, 在 *X. c. pv. citri* 中被鉴定为致病性基因座, 参与柑桔上畸形瘤 (hyporplastic canker) 的产生, *pthA* 基因座的功能依赖于野生型 Hrp 系统^[9]。

P. s. pv. phaseolicola 和 *X. c. pv. vesicatoria* 分别抑制菜豆植保素产生和辣椒瘤状突起形成的抑制子活性依赖于 Hrp 系统^[14]。*X. c. pv. camptostri hrpX* 突变体可引起亲和性十字花科植物维管发生快速褐变, 有人推测相应野生菌株可产生维管 HR 的 *hrp* 依赖性抑制子。因此抑制子代表了经 Hrp 系统泌出的另一类群毒性蛋白。

5 展望

hrp 基因广泛存在于植物病原细菌 *Erwinia*、*Pseudomonas*、*Xanthomonas* 和 *Ralstonia* spp. 中, 参与到 Hrp 系统的组装, 不仅可运输效应蛋白至植物细胞, 导致 HR 或抗病性, 还可运输致病性和毒性蛋白或抑制子活性物质, 引起植物病害。因此, *hrp* 基因在

avr-R 基因介导的抗性表达、致病性和决定寄主范围中起重要作用,但对 Hrp 蛋白导致病害或抗性的机制还不很清楚^[2]。Hrp 蛋白怎样改变寄主的代谢以促进病原细菌在植物细胞间隙的生长? Avr 样 (Avr-like) 蛋白在细菌适应寄主方面有正效作用吗? *hrp* 基因还可能编码酶类物质,如 *hrpM* 是 *P. syringae* 合成 β -(1,2)-葡聚糖必需。现在对于病原细菌是以什么样的机制感受激活 *hrp* 操纵元的环境信号了解甚少,有研究表明 *P. s. pv. phaseolicola* 附属 *hrp* 基因产物可能参与这一过程^[1]。Hrp 系统的发现为研究阻止 Hrp 系统的组装或毒性蛋白运输的新化学药剂和抗体提供了新的线索,可能为定向基因工程等方面提供有用的工具。

参 考 文 献

- [1] Peter B. Lindgren *Ann Rev. Phytopathol*, 1997, **35**: 129 ~ 152.
- [2] James R, Alfano, Alan C. *J Bacteriol*, 1997, **179** (18): 5655 ~ 5662.
- [3] Wei-Z M, Kim-J F, Beer-S V, *et al.* *Mol Plant-Microbe Interact*, 2000, **13**: 11, 1251 ~ 1262
- [4] Wengelnik K, Rossier O, Bonas U J. *Bacteriol*, 1999, **181**: 6828 ~ 6831.
- [5] Suresh G, Sheng Y H. *Plant Disease*, 1996, **80** (6): 604 ~ 610.
- [6] Gail P, Wen L D, Hsiou C H, *et al.* *J Bacteriol*, 1998, **180** (17): 4532 ~ 4537.
- [7] Leach J E, White F F. *Annu Rev Phytopathol*, 1996, **34**: 153 ~ 179.
- [8] Roine E, wei W, Yuan J, *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**: 3459 ~ 3464.
- [9] Collmer A, Badel J L, Charkowski A O, *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 8770 ~ 8777
- [10] 陈功友, 王金生. *植物病理学报*, 2002, **32** (1): 1 ~ 7.
- [11] Romantschuk M, Roine E, Taira S. *European Journal of Plant Pathology*, 2001, **107** (2): 153 ~ 160.
- [12] Bestwick C S, Bennett M H, Mansfield J W. *Plant Physiol*, 1995, **108**: 503 ~ 516.
- [13] Rantakari A, Virtaharju O, Vahamiko S, *et al.* *Mol Plant-Microbe Interact*, 2001, **14**: 8, 962 ~ 968.
- [14] Brown I, Mansfield J, Bonas U M. *Plant-Microbe Interact*, 1995, **6**: 825 ~ 836.

• 论文写作要点 •

参 考 文 献

参考文献是现代科技论文的重要组成部分。被列入的文献必须是作者在论文中直接引用的、最主要的、最新发表在正式出版物上的文献。私人通信、内部讲义、论文集、毕业论文等未正式发表的文章不作为文献引用,必要时可用脚注处理。

本刊的参考文献采用顺序编码制,根据正文中引用的先后顺序排列。文献作者不超过3人时全部列出,多于3人时列3人,后面用“等.”或“*et al.*”,作者姓前名后,名缩写;作者之间用逗号隔开。国外期刊名可以缩写,但必须标准。研究报告一般引用文献10个以内,专论与综述一般不超过15个。