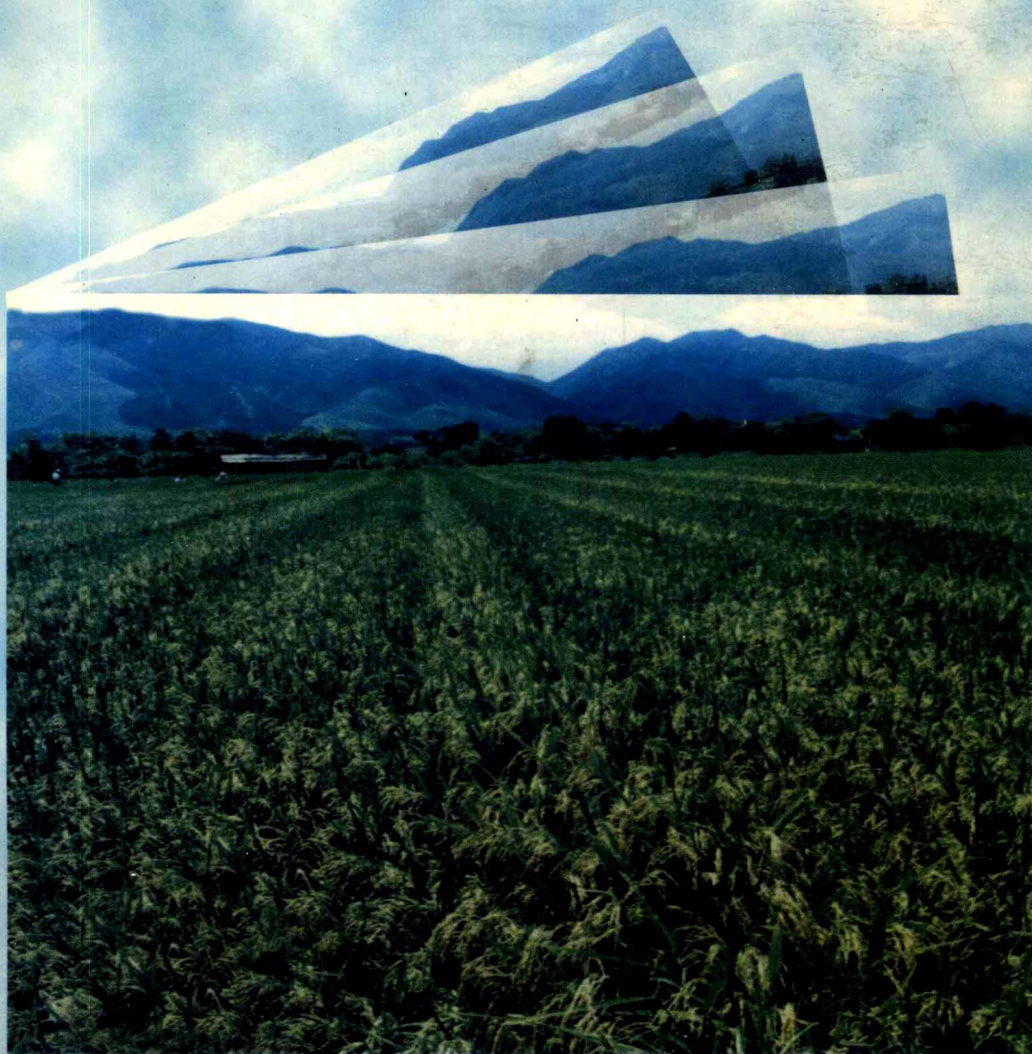


水稻诱导抗病的 生理学与生物化学

曾富华 王海华 饶力群 编著



中国科学技术出版社

水稻诱导抗病的 生理学与生物化学

曾富华 王海华 饶力群 编著

中国科学技术出版社

· 北 京 ·

图书在版编目(CIP)数据

水稻诱导抗病的生理学与生物化学/曾富华,王海华,饶力群编著. —北京:中国科学技术出版社,2001.12

ISBN 7-5046-3226-0

I. 水… II. ①曾…②王…③饶… III. 水稻—诱导抗病—生理学—生物化学 IV. S435.11

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2001)第 094846 号

内 容 简 介

该书系统的研究了水稻白叶枯病和稻瘟病的诱导抗性及其应用,从活性氧及其代谢、膜脂及其代谢、防御酶系统、病程相关蛋白和形态结构等方面探讨了诱导抗病性机制;详细地介绍了诱导抗病性与活性氧及其代谢、与病程相关蛋白、与程序性细胞死亡、与激发子的关系以及诱导抗病性的遗传基础、分子机制、信号转导、基因表达和应用前景等最新研究进展。

该书可供高等院校生物、农业有关专业的师生及农业科技工作者参考。

中国科学技术出版社出版

北京市海淀区中关村南大街 16 号 邮政编码: 100081

电话: 62179148 62173865

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

北京印刷学院实习工厂印刷

*

开本: 787 毫米×1092 毫米 1/16 印张: 15 字数: 384 千字

2001 年 12 月第 1 版 2001 年 12 月第 1 次印刷

印数: 1—500 册 定价: 46.00 元

序 言

粮食是当今人类所面临的重大问题，水稻是世界上分布最广泛的主要的粮食作物之一。稻白叶枯病和稻瘟病是水稻的主要病害，每年都造成巨大损失，极大地制约了水稻产量的提高。由于化学防治容易引起环境污染、生态平衡失调及抗药性等一系列问题，因此，培育高产、优质、多抗新品种和进行生物防治是农业可持续发展和解决人类所面临的粮食危机的惟一出路。

诱导抗病是利用诱导因子诱发植物自身的免疫反应，提高抗病能力，减轻发病程度，从而控制疾病蔓延的防治病害的策略，属生物防治范畴。它具有可操作性强、抗菌谱广、不污染环境、不破坏生态系统、对人畜无害等特点，符合绿色农业和可持续发展的要求。加强诱导抗病的理论研究和应用研究，具有重大的现实意义和广阔的应用前景。

曾富华、饶力群、王海华等同志编著的《水稻诱导抗病的生理学与生物化学》，从生理学和生物化学角度研究了稻白叶枯病和稻瘟病的诱导抗性及其应用，介绍了国内、外诱导抗病性研究的最新进展，特别在诱导抗性与活性氧代谢等方面提出了一些新的观点，是一本内容丰富新颖、研究系统深入的学术著作，目前尚未见到这方面的著作。因此该书的出版将为我国水稻抗病研究的理论与实践起到积极地推动作用。

官春云

2001年12月12日于长沙

前言

稻白叶枯病及稻瘟病是水稻的主要病害之一，严重影响水稻高产栽培。据报道，(Ou, 1985) 稻白叶枯病中等发病地损失产量可达 20% ~ 30%。因此，水稻病害的防治是一个十分重大的课题。人们早在百余年前，就发现植物存在诱导抗病性现象 (Chester, 1933; Miller, 1956)。1909 年，Bernard 用根腐病菌 (*Rhizoctonia repens*) 的弱毒株预接种兰科植物根部，可使鳞茎免遭强毒株的攻击。自 20 世纪 50 年代以后，有关植物诱导抗性的研究发展很快，诱导保护作用在各种植物中被广泛报道。关于诱导抗病性的概念也随着研究的深入而不断发展。人们先后使用了交叉保护、干扰、获得抗性、获得免疫性、诱导抗性等术语。现一般称为诱导抗性 (induced resistance) 或称为获得性抗性 (acquired resistance, AR)。

诱导抗病性是一种试验现象，应该属于生物防治的范畴。它在于利用植物自身的免疫体系，提高抗病能力，减轻发病的程度来控制疾病的蔓延，在较高水平上使植物与病原物处于一个统一体中。诱导抗病具有操作简便、抗菌谱广、作用稳定而持久、不造成环境污染、不破坏生态环境等特点。因此，加强对诱导抗病机制的研究，筛选高效、低毒、广谱、价廉的抗病诱导剂；寻找可以对特定刺激作出反应的 DNA 靶序列，对它施加刺激而开启抗病反应；对植物 Set-3 基因的去阻遏，使它由诱导型表达变成组成型表达，最终实现“基因免疫”等，在抗病研究的理论与实践上均具有重大意义，前景十分广阔。

我们从 1993 年开始从事水稻诱导抗病的研究工作，旨在阐明水稻白叶枯病诱导抗病的生理生化机制及筛选高效、低毒、广谱、价廉的抗病诱导因子。着重研究了水稻白叶枯病的诱导抗性及其应用，从活性氧及其代谢、膜脂及其代谢、防御酶系统、病程相关蛋白和形态结构等方面探讨了诱导抗病性机制。该项研究先后得到湖南省自然科学基金 (1996, 1998)、湖南省教委基金 (1996, 1998)、农业部植物生理生化开放实验室 (中国农业大学) 开放基金 (1994, 1997)、广东省科技攻关课题 (2000) 的资助，完成博士学位论文 1 篇、硕士学位论文 4 篇、博士后研究工作一项。我们在条件和经费有限的情况下，进行了艰苦细致的研究，较好地完成了研究任务，取得了多项重要成果，撰写研究报告 34 篇，其中在《植物病理学报》、《植物生理学报》、《中国农业科学》、《作物学报》、《中国水稻科学》等刊物发表研究论文

22 篇，均相应被《BA》、《CA》、《Review of Plant Pathology》、《Crop Physiology Abstracts》、《Field Crop Abstracts》、《Rice Abstracts》等重要文摘刊物收录，1999 年通过了由彭绍裘（湖南省农科院）、罗宽（湖南农业大学）、张志光（湖南师范大学）、郭绍川（湘潭师范学院）、罗泽民（湖南农业大学）、周朴华（湖南农业大学）等教授组成的鉴定委员会评审，其鉴定意见为：“……从整体上看，此项研究在科学理论上，研究技术上，应用价值上，都处于国内同类研究的领先地位。”

参加该项课题研究的同志先后有：吴岳轩、饶力群、肖用森、卢向阳、王海华、曹赐生、王荣臣、易克、王勇刚、李劲、康健等。由于全体同志的聪明才智和创造性的工作，才得以使研究任务顺利地完成。该专著是在本课题研究报告的基础上形成的，内容分“专论与综述”及“研究报告”两大部分，共收入 30 篇论文，其中包括了贾显禄、郭建荣、王国平等先生及其共同工作者的少量论文，她凝聚了全体研究人员和全体作者的心血和汗水。希望本书的出版能为推动我国水稻诱导抗病的理论研究和应用研究起到积极的作用。

由于我们的水平有限，书中难免存在遗漏和错误，敬希广大读者及同行批评指正。

湛江师范学院为该书提供了出版资助，官春云院士抽出宝贵的时间为本书作序，郭绍川教授对本书的出版提出了宝贵的意见，谨在此一并表示衷心的感谢。

曾富华

湛江师范学院

2001 年 12 月 10 日于湛江

目 录

专论与综述

激发子与植物诱导抗病性	王海华 曾富华 吴志华等 (3)
活性氧代谢与植物—病原物相互作用的关系	曾富华 王海华 (16)
植物抗病性的遗传基础及其分子机制	王海华 曾富华 马生健等 (27)
植物诱导抗病与病程相关蛋白	王勇刚 吴志华 曾富华等 (33)
植物诱导抗病与植物程序性细胞死亡	易 克 吴志华 曾富华 (43)
过氧化氢、水杨酸与植物诱导抗病性	饶力群 官春云 罗泽民 (54)
植物防卫基因表达调控与信号转导	王海华 曾富华 (67)
植物诱导抗病性及其应用前景	王海华 曾富华 康 健 (77)

研究报告

活性氧及其清除剂诱导抗病作用与影响膜脂过氧化作用的关系	曾富华 罗泽民 (91)
生物及非生物因子对水稻白叶枯病的诱导抗性及其与活性氧代谢的关系	曾富华 吴岳轩 罗泽民 (97)
镍处理对水稻叶片 H_2O_2 积累和抗病的诱导效应	王海华 曾富华 康 健等 (103)
稻白叶枯病不同毒力株细菌的诱导抗病性与活性氧代谢的关系	曾富华 吴岳轩 罗泽民等 (111)
水稻对白叶枯病的诱导抗性与远离诱导部位活性氧代谢的关系	曾富华 吴岳轩 曹赐生等 (117)
不同处理对水稻病程相关蛋白和过氧化物酶的影响	王勇刚 曾富华 姚志雄等 (122)
不同诱导因子对膜脂过氧化与对超微结构影响的关系	曾富华 吴岳轩 罗泽民 (130)
杂交稻对白叶枯病的诱导抗性与细胞内防御酶系统关系的初步研究	吴岳轩 曾富华 王荣臣 (138)
水稻病程相关蛋白的诱导和检测	王勇刚 曾富华 邓明娇 (144)
水杨酸和 H_2O_2 对水稻培养细胞中 H_2O_2 代谢的影响	饶力群 李 劲 卢向阳等 (152)
稻白叶枯病菌对水稻悬浮细胞 H_2O_2 含量及其代谢酶活性的影响	饶力群 李 劲 官春云等 (158)
不同诱导处理后水稻悬浮细胞的活性氧变化与抗病酶系的关系	易 克 曾富华 徐向丽等 (164)
硝酸镍对水稻抗白叶枯病的诱导作用	王海华 曾富华 曹赐生等 (174)
几种化学因子对水稻抗白叶枯病诱导作用的比较	王海华 曾富华 康 健等 (179)
对氨基苯酚和氯化铜可诱导水稻产生对白叶枯病的抗性	王海华 曾富华 康 健等 (184)
水杨酸对水稻苗未处理叶保护酶活性的影响	王海华 曹赐生 康 健等 (189)
不同抗性水稻品种叶片中活性氧代谢的比较	吴岳轩 曾富华 曹赐生 (195)
稻瘟菌侵染对水稻脂类代谢的影响	饶力群 彭友良 罗泽民 (199)

水稻与稻瘟病菌非亲和互动中超氧阴离子变化动态研究	贾显禄	王振中	(206)
水稻品种抗瘟性诱导研究——非生物诱导物的筛选及诱导方法初探	王国平	罗 宽	(212)
水稻品种抗瘟性诱导效果研究	郭建荣	罗 宽	(217)
水稻品种抗瘟性诱导机制研究	郭建荣	罗 宽	(222)

专论与综述

激发子与植物诱导抗病性

王海华¹ 曾富华² 吴志华^{2,3} 马生健^{2,3} 周朴华³

(1 湘潭师范学院生物系 湘潭 411201; 2 湛江师范学院生物系 湛江 524048;

3 湖南农业大学生物技术系 长沙 410128)

摘要: 激发子是一类诱导植物任何抗病防卫反应的物质。本文就激发子的概念、类型、化学本质、受体及抗病基因产物与激发子信号传导系统作了概括。

关键词: 激发子; 受体; 抗病基因; 信号传导

众所周知,动物免疫反应有被动免疫和主动免疫,前者是预存的,后者是后天获得的。与动物类似,植物的抗性,包括结构屏障和天然的具有抗病功效的化学成分,前者如细胞壁的角质、蜡质、栓质、木质素及特殊的气孔结构;后者如小分子的抗病物质(氧肟酸、氢氰酸、皂角苷和单宁),影响病原物细胞透性的蛋白质和核糖体失活蛋白。另一方面,植物在受到病原物侵染和其他因素刺激下,还可诱导或激活一系列的防御机制(如下所述)。这种受生物的、物理的和化学的因子刺激,改变植物对病原的反应而产生抗性称获得抗性(acquired resistance)或诱导抗病性(induced resistance)。在这里,那些开启植物抗病防卫反应的物质或因子称作激发子。

植物—病原物之间的互作是以两者间的相互识别(recognition)开始的。识别是病原信息在植物细胞表面上发生的特定反应。植物与微生物相互关系的各种类型,如致病、共栖、共生、寄生和抗病,均与识别有关。对病原来说,它们必须与环境中的宿主植物的一定特征的表面相识别,以成功地侵染;而对植物来说,它们必须在进化过程中完善一套识别多种有潜在威胁的病原物和多种多样的抗病防卫体系的机制。因此,相互识别在激发子在植物—病原物互作中具有重要的意义,对它的研究,特别是病原物的激发子与植物中相应受体及其参与的信息交流,一直是分子病理学的热点。近年来,一些激发子在植物细胞表面或亚组分中相应的结合位点和受体的分离、鉴定,植物抗病信号转导的下游信号分子和事件的发现,为我们全面认识植物与病原物之间信息交流和植物抗病分子的机制奠定了基础。阐明植物识别病原激发子的分子机制,对认识植物抗病性,特别是非寄主植物对病原的广谱抗性及其植物诱导抗病性的应用具有重要的意义。

1 激发子的概念及类型

激发子(elicitor)最初用于指那些诱导植物细胞合成和积累植保素(phytoalexin)的分子或其他刺激物^[1]。现在被普遍用于指那些刺激任何防卫反应机制的物质^[4]。植物的防御机制包括过敏反应(hypersensitive reaction, HR)、氧化突变(oxidative burst)、植保素合成、木质素和富羟脯氨酸糖蛋白的合成与细胞壁沉积,胼胝质的形成和病程相关蛋白(pathogenesis-related protein, PRP)的诱导等。

生物源激发子包括直接来源于病原物或其他微生物和植物的激发子,以及由病原物与植物互作时产生的激发子。由病原物或其他微生物产生的激发子称外源激发子;由植物本

身产生的激发子称内源激发子。前者包括真菌的 β -葡聚糖、几丁质糖、糖蛋白或糖肽、脂类物质、肽及其他的细胞壁成分；后者主要是由植物的细胞壁组分中的寡糖物质，如寡聚半乳糖醛酸和木聚糖片段。植物与病原物互作中，由于酶的作用使植物或病原物的细胞壁成分分解或修饰产生寡糖片段，或由病原物的无毒基因产物对病原物的代谢中间物或植物中的代谢中间物进行修饰而产生。病原物可以产生作用于植物细胞壁的水解酶，如果胶降解酶、多聚半乳糖醛酸酶等^[6,7]；被侵染的植物细胞诱导产生一些水解酶，如几丁质酶和 β -1, 3-葡聚酶，对真菌细胞壁成分降解，释放出脱乙酰几丁质及葡聚糖苷片段^[8,9]。丁香假单胞菌致病变种 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) 的无毒基因 *avr D* 编码激发子——丁香脂 (syringolides) 合成过程中所需的一种酶^[10]。丁香脂是一种小分子量的糖脂化合物，它使携带抗病基因 *Rpg4* 的番茄品种产生 HR。

非生物源激发子是指非生物来源的化学物质，如重金属离子、表面活性剂、磷酸盐、草酸盐等多价阴离子和一些人工合成抗代谢物，一些物理因素如机械损伤，UV 也可诱导防卫基因的表达。 CuCl_2 能诱导 *L. albus* cv. *Bac*^[11] 和白羽扇豆^[12] 植物合成四种异类黄酮类物质，可能起植保素的功能。在 cowpea 中用 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 和 UV 三种非生物源激发子以及亲和的和亲和的 *Phytophthora vignae* 均能诱导 cowpea 合成与积累植保素^[13]。非生物激发子的作用被认为是刺激植物细胞壁释放内源生物激发子的结果^[3]。由于种类繁多，上述说法有一定的局限性。

来源于病原物的激发子有普通激发子和小种专化性激发子之分。前者指一种病原菌各株系产生的能激发寄主植物所有基因型、甚至非寄主植物产生抗病防卫反应的物质。后者仅指表达一定无毒基因的病菌小种产生的、只能激发那些带有互补的抗病基因的植物品种产生抗病防卫反应的物质^[3]。普通激发子通常包括寡聚糖、多糖、脂多糖、糖蛋白和蛋白多糖等细胞壁物质，而小种专化性激发子是病原菌无毒基因的直接产物或间接产物。*Cladosporium fulvum* 的无毒基因 *avr D* 编码一个 $3.2 \times 10^3 \text{Da}$ 的肽 *Avr9*^[3]，仅能引起携带 *Cf-9* 基因的番茄品种引起 HR 和产生 PRP。

2 激发子的化学本质

迄今为止，已鉴定了许多来自病原菌和植物的激发子，按化合物的结构性质分为四类：寡糖类、糖肽和糖蛋白、多肽和蛋白质、脂类。

2.1 寡糖类激发子

寡糖是最早发现且研究得最深入的能诱导植保素合成的激发子^[14]。已鉴定并纯化的病原菌和植物寡糖类激发子有葡聚糖片段、几丁质寡聚物 and 脱乙酰几丁质寡聚物、寡聚半乳糖醛酸苷，其中寡聚半乳糖醛酸苷来源于植物。

2.1.1 葡聚糖激发子

Sharp 等^[15] 从大雄疫霉大豆专化型 (*Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*) 细胞壁中分离到带分枝的 β -1, 3- β -1, 6-七聚葡糖苷具有激发大豆产生植保素的活性。其他分支的同分异构体没有激发子活性，经部分酸解的大雄疫霉菌丝壁的寡聚糖苷复合物中聚合度 (DP) ≥ 6 的部分都具有激发子活性，表明激发子的 DP 和结构与活性密切相关。*Colletorichum lindemuthianum* 细胞壁经部分酶解的产物中，DP=5 的 β -葡聚糖激发菜豆产生菜豆素的活性最弱，而 DP=9 (1476Da) 的 β -葡聚糖具有最高的激发子活性^[16]，这些实验事实也说明了上述问题。

2.1.2 几丁质和脱乙酰几丁质

几丁质是除卵菌纲真菌以外其他真菌细胞壁的主要成分，而植物细胞中不含几丁质。

几丁质可诱导小麦叶片^[17]、水稻悬浮细胞^[18]和番茄细胞^[19]产生植保素及木质化。脱乙酰几丁质及其寡糖片段具有阻止病原真菌和病毒从机械损伤侵染叶片，可以诱导豌豆组织产生植保素^[20]。DP 大于 7 的脱乙酰几丁质的衍生物能激发豌豆中豌豆素积累，而类似的几丁质衍生物则无此作用，提示这类聚糖的激发子活性与 DP 和化学结构有一定的关系，但目前所研究的片段在大小、结构及类型上均存在异质性，可能在不同的植物病害体系上也有不同的体现。Perekhod 等^[21]用完整的 24 KD 和 5 KD 不同大小的脱乙酰几丁质处理马铃薯块茎，发现 5 KD 处理的马铃薯表现出对 *P. infestans* 最大的局部抗性，同时这种大小的脱乙酰几丁质还能诱导系统获得性抗性 (systemic acquired resistance, SAR) 和 PRP 表达。一些植物在病原侵染或激发子处理后，诱导一类几丁质酶和脱乙酰几丁质酶，这些都认为是 PRP。一般认为具有激发子活性的寡聚糖，包括寡聚几丁质、脱乙酰几丁质是病原侵染植物后由被诱导的酶水解病原细胞壁物质释放的。

2.1.3 寡聚半乳糖醛酸苷

菜豆和大豆组织的沸水抽提液和分离的大豆细胞壁观察到具有激发子活性的物质存在。经鉴定，这些具有激发子活性的分子是 α -1, 4 糖苷键连接的半乳糖醛酸残基的线状寡聚体。来源于大豆细胞壁的聚半乳糖醛酸苷能诱导大豆植保素合成^[4]。用来源于菜豆病原 *Colletotrichum lindemuthianum* 小种的 β -内切聚半乳糖醛酸苷酶处理菜豆细胞壁，释放出寡半乳糖醛酸苷和果胶片段，其中 DP 为 2 和 3 的寡半乳糖醛酸苷能明显提高大豆中羟脯氨酸含量，而分子量较大的果胶片段却起抑制子 (suppressor) 的作用，即抑制羟脯氨酸沉积^[22]。菜豆细胞壁和 *Colletotrichum lindemuthianum* 细胞壁经酶部分水解，得到的寡半乳糖醛酸苷片段诱导菜豆悬浮细胞积累菜豆素的最差 DP 为 7，而菜豆细胞壁的寡聚半乳糖醛酸苷的最佳诱导 DP 为 10 (1968 Da)^[16]。*Lithospermum* 悬浮细胞用 DP 为 12~20 的寡半乳糖醛酸苷处理后，诱导合成一种植保素——shikonin^[23]，但只在老的、成熟的细胞中诱导。提示不同 DP 的寡半乳糖醛酸苷在不同的植物中激发子活性不同。

2.2 肽和蛋白类

植物病原细菌都有 *hrp* (hypersensitive response and pathogenicity) 基因簇，包括 3~13 个基因。它们的突变体既丧失对寄主植物的致病性，也丧失诱发非寄主植物产生 HR 的能力，说明它们与致病性和诱导 HR 有关^[23]。分子遗传学手段为植物病原细菌在非寄主植物中诱导 HR 的研究提供了非常成功的经验。先后从假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、黄单胞菌属 (*Xanthomonas*)、欧文氏菌属 (*Erwinia*) 中发现了三类 *hrp* 基因簇。*Erwinia amylovora* 的 *hrp N* 和 *P. syringae* pv. *syringae* 61 菌株的 *hrpz* 分别编码使烟草产生 HR 的蛋白，分别称 Harpin_{Ea}^[24] 和 Harpin_{ps}^[25]。这两种蛋白均对热稳定，富含甘氨酸，缺少半胱氨酸，只有 22 个氨基酸的同源片段，此片段与功能无关。分子量分别为 44 KD 和 34.7 KD，由 385 和 341 个氨基酸残基组成。从 *E. chrysanthemi* 分离出的称为 Harpin_{Ech}，含 340 个氨基酸。Mukherjee 等^[26]从 *E. carotovora* subsp. *carotovora* 菌株 Ecc 71 中克隆出 *hrpNEcc* DNA，编码区与转录产物大小一致，为 1068 bp，预测它编码一个富含甘氨酸的 36 KD 的蛋白，称 Harpin Ecc，与上述两种 *Erwinia* 属菌株的 Harpin 一样，不具有典型的信号肽序列。从表达 *hrpEcc* 的 *E. coli* 中通过 Western 印迹鉴定的 36 KD 蛋白能诱发烟草 HR。PopA1 含 345 个氨基酸，从 *P. solanacearum* 中分离，能在 *Perunia* 植物上引起类似 HR 的防卫反应^[27]。近来，在革兰氏阳性细胞属中类似 harpin 的蛋白质激发子发现。*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* 为一种革兰氏阳性的马铃薯病原。它引起 *Mirabilis jalapa* 和马铃薯发生局部的细胞坏死，这种坏死具有 HR 的特点。从菌株 CMM623 的无细胞培养液中，分子量为

35~50 KD 的、对热稳定、对蛋白酶敏感的物质表现与 PopA1 类似的引起细胞坏死的活性^[28]。激发素 (elicitin) 是大多数疫霉 (*phytophthora*) 病原分泌的、分子量小于 10 KD、能诱导非寄主植物发生 HR 的胞外蛋白质激发子的总称。目前它从隐地疫霉 (*P. cryptogea*)、恶疫霉 (*P. cactorum*)、寄生疫霉 (*P. parasitica*) 和 *P. drechsleri* 等多种疫霉中发现了各种形式的激发素^[3]。Parasiticein 和 capsicein 为酸性蛋白, 称 α -elicitin^[29], 从 *P. cryptogea* 和 *P. cininamomi* 分离的 cryptogein 和 cinnamomin 为碱性蛋白, 称 β -elicitin^[30]。从已分析的十几种蛋白质看来, elicitin 有广泛的同源性。 α -elicitin 与 β -elicitin 的第 13 位分别为一个疏水性的缬氨酸和一个亲水性的赖氨酸。*P. infestans* 是马铃薯和番茄生育晚期枯死病的病原, 它产生一种激发素-INF1, 引起 *Nicotiana* HR。INF1 是导致 *N. benthamiana* 和 *P. infestans* 细胞坏死的无毒因子^[31]。elicitin 除引发植物 HR 外, 还可引发许多其他的抗病机制。Cryptogein (一个含 98 个氨基酸的真菌分泌蛋白) 处理烟草悬浮细胞导致 Ca^{2+} 流入、质膜去极化、 Cl^- 和 K^+ 流出以及持续的氧化突发^[32]。一种从引起番茄颈根腐病 (crown and root rot) 的 *P. nicotianae* 中的新激发素-elicitin172 酸性蛋白, 它引起烟草发生 HR^[33]。

病毒的衣壳蛋白 (CP) 和寄主单个显性抗病基因相对应的病原无毒基因产物——无毒蛋白及病原—植物互作产生的一些蛋白质可作为激发素。Aubergine 植物感染 TMV 后表现 HR, 未表达衣壳蛋白的突变体则不能引发 HR。用表达 CP 的马铃薯 X 病毒能够使 Aubergine 植物发生 HR^[34]。外壳蛋白单个氨基酸的突变可改变 TMV 侵染表型发生改变, 可见外壳蛋白基因与无毒基因具有类似的特点。在番茄叶霉病菌和寄主互作系统中已纯化了两种由无毒基因编码专化性激发子, 分别为 28 个氨基酸的 AVR9 肽^[35]和 106 个氨基酸的 AVR4 肽^[36]。这两种多肽只有在病原与寄主互作时才分泌。D' Silva I 等^[37]从一种引起 Cowpea (抗病品种) 发生 HR 的菌 *Uromyces igras* 中鉴定和分离了两种新的蛋白激发素, 分子量为 5.6 KD 和 5.8 KD。这两种特异性激发素是抗性品种的两个抗病基因与病原物的两个无毒基因互作的产物。番茄叶霉病菌 *Avr-4* 中引入点突变, 导致与携有 *Cf-4* 的番茄品种的互作性质发生改变, 这可能正是一些致病的叶霉病菌避开寄主抗病机制的一个关键因素^[36]。说明无毒基因编码的激发子的作用是非常特异的。无毒基因的最初表达产物可能还不是具有激发子功能的成熟蛋白。当带有 *Avr-9* 的叶霉菌侵染 *Cf-9* 番茄时, 感染叶中积累一种 28 个氨基酸的成熟激发子多肽。进一步的分析表明, *Avr-9* 的表达产物中有含 34、33、32 个氨基酸的前体, 推测 *Avr-9* 蛋白质的加工包括信号肽切除和进一步的成熟, 植物的蛋白酶参与了此过程^[38]。

现在发现的蛋白质或多肽激发子还有多聚糖酶、果胶酶, 这些酶作用于植物的细胞壁和细胞间质, 释放出内源的二级激发子, 病原与植物互作时可能有这两类酶的表达。如来源于 *C. ochliobolus victoriae* 的 Victorin 在浓度很低的情况下只诱导带 Pc-2 基因的燕麦发生 HR 和积累植保素^[39]。

2.3 糖肽和糖蛋白

来自真菌细胞壁的糖肽和糖蛋白往往能引起植物产生防卫反应^[40,41]。这类复合物的激发子活性是由糖基部分还是由肽或蛋白质部分赋予, 依种类的不同而异。大雄疫霉 (*P. megaspera*) 菌丝细胞壁及培养液中存在一种分子为 42 KD 的糖蛋白, 具有诱导欧芹细胞瞬时离子流、植保素合成的激发子活性。其活性由多肽部分决定。对经蛋白酶水解产生的非糖基化的 13 氨基酸短肽作活性分析, 证明第 2 位的色氨酸和第 5 位的脯氨酸为活性所必需^[42]。酵母中激发番茄细胞乙烯合成和 PAL 活性的糖肽^[43,44], 其活性亦与化学结构有密切关系, 结构研究表明, 糖基和肽组分均为激发子活性所必需。从糖肽上把肽组分去掉,

导致活性损失,但肽组分在其中不起主要作用,可能它与其结合蛋白质以一种非特异的方式相互作用,或对维持与稳定寡糖苷的构象起作用。含 10~12 个甘露糖残基和一个 α -1,6-糖苷链连接的甘露糖的糖肽,其激发活性最高^[4]。从禾谷锈菌 (*Puccinia graminis*) 细胞壁^[45]以及被侵染的小麦叶片^[46]中均能纯化到一种糖蛋白激发子,通过高碘酸盐氧化后,其激发子活性丧失,说明活性部位在糖基上。Sejalón 等^[47]已从 *P. Parastica* var. *nicotianae* 中纯化了一种定位于细胞壁的糖肽激发子,分子量为 34 KD。用此糖肽处理烟草植株,脂氧合酶活性提高,富羟脯氨酸糖蛋白积累,表现出激发子的特性。现已得到其蛋白质部分的 cDNA 克隆^[48],推测的氨基酸顺序中,富半胱氨酸片段与真菌中的聚糖酶的纤维素结合结构域类似。它并不表现水解酶活性,但具有类似于凝集素的凝集功能,具体的病理学意义值得探讨。从 *P. megaspera* 分离了另一种 32 KD 的糖蛋白,纳克级 (ng) 的量刺入烟草叶片即可引起类似于 HR 的细胞坏死^[49]。

2.4 脂类

目前发现的脂类激发子尚不多。前已述及,携带 *avrD* 丁香假单胞菌与携带互补抗病基因 *Rpg4* 的番茄品种互作时,产生一种叫丁香脂的糖脂物质具有激发子活性。花生四烯酸可诱导 2 天龄 *Pennisetum glaucum* 幼苗的胚芽鞘或根发生 HR^[50]。亚麻酸是通过脂氧合酶途径合成茉莉酸的前体物质,能诱导植物编码蛋白酶抑制剂 II、富含羟脯氨酸或甘氨酸糖蛋白、葡聚糖酶和几丁质酶的基因表达,而这些反应在用真菌激发子或 MJ 处理的植物细胞中亦可观察到^[51]。

3 激发子的受体

植物病原物非亲和性互作引起一系列抗病防卫反应的最初事件是激发子与细胞表面受体的识别。激发子的活性要通过植物细胞上(中)能识别和接受激发子刺激信号的受体或结合部位来实现^[52]。近年来,在植物细胞膜及细胞质基质中发现了可能具有受体作用的激发子结合蛋白质或部位^[53]。研究激发子受体或结合部位的方法是生化分离技术结合同位素 (¹²⁵I 和 ³⁵S) 标记、配体饱和和竞争实验。

3.1 葡聚糖激发子的受体

寡糖激发子结合蛋白质的研究开展得较早而较深入。Schmidt 等^[52]发现大豆细胞膜存在大雄霉菌葡聚糖的高亲和性结合部位, K_m 为 2 nmol/L,与激发子的半最大活性的浓度非常一致。用化学结构类似物所进行的竞争性实验证明激发子的活性与它们在体外对激发子结合部位的竞争能力之间有密切关系。用蛋白酶或高温处理使之失活,表明此结合位点是非共价结合的膜结合蛋白质。用非离子去垢剂 n-dodecanoylsucrose 和两性分子去垢剂 EW3-12 得到结合活性为质膜提取物的 40 %和 60 %的结合蛋白质^[53]。已从大豆细胞中纯化到一种 75 KD 的结合蛋白,可能以二聚体或多聚体的形式存在^[54]。在其他植物的细胞膜上也发现了 β -葡聚糖的结合位点。比较了 6 种 *Fabaceae* 植物细胞膜制备物对来源 *Phytophthora sojae* 细胞壁的 β -1.3-1.6-葡聚糖(平均 DP 为 18)激发子的结合活性,配体饱和试验表明 *Medicago sativa*, *Lupinus albus* 和豌豆质膜结合位点的 K_m 分别为 5.3 nmol/L、3.7 nmol/L、1.8 nmol/L,与大豆的 K_m (1.3 nmol/L) 在一个数量级上,而其余几种则无结合部位或亲和力很小^[55]。同一类植物细胞可能存在同类激发子的结合部位,这为它们在感知病原的机制的进化关系上提供了初步证据。

3.2 糖肽和糖蛋白类激发子的受体

番茄细胞膜上存在对酵母糖肽高亲和性的结合位点^[4]。现已对这种结合位点进行了部

分的纯化和鉴定。用 n-dodecylmaltoside 和 n-dodecanoglucose 两种中性去垢剂处理冰冻 10~12 d 的番茄细胞的质膜悬浮物, 再经阴离子交换层析分离纯化, 得到高亲和性 ($K_m = 1\sim 4$ nmol/L) 的结合部位。进一步的实验表明, 它对酵母糖肽上 N-连接 9 个甘露糖残基有很高的亲和性, 而不与哺乳动物细胞的糖肽中典型的 9 甘露糖残基相互识别, 说明它同时具有很高的选择性。疫霉糖蛋白在欧芹细胞膜上的结合蛋白质为 91 KD 的多肽^[56], 对它的纯化及基因克隆尚在研究中。

3.3 几丁质寡聚物激发子的受体

番茄的细胞和细胞膜中的这类结合部位对几丁质的 DP 有一定的选择性。DP 不小于 4 的几丁质寡聚物具有最高的亲和力, 而对三聚体和二聚体的亲和力却低得多, 分别低 300 倍和 200 倍, 并且生物活性也明显下降^[57]。在体外几丁质寡聚物与其结合位点的结合能力与它们诱导番茄细胞产生植保素的能力密切相关。已从番茄细胞上纯化了 5.3 KD 和 83 KD 的两种结合蛋白质^[57]。从水稻细胞中纯化的一种分子量为 70 KD 的蛋白质是可能的受体蛋白^[4]。

3.4 水杨酸受体

水杨酸被认为是一种新的植物激素, 它参与植物许多生理过程的调节。20 世纪 90 年代以来, 水杨酸在植物抗病中的作用及其机制, 特别是它在 SAR 信号传递途径中的作用及作用位置, 已成为人们关注的焦点。SA 可以作为外源激发子诱导烟草、黄瓜、拟南芥、水稻等 PRP 的表达, 抵御多种病原物的侵染; 同时, 一些植物如烟草受病原物侵染或诱导后, 体内 SA 水平明显升高, 并可从诱导部位转运至其他部位。因此被认为是 SAR 的一种信号分子。

Chen 等^[58]从烟草中分离纯化一种水溶性 SA 结合蛋白(SA-binding protein, SABP), 由 4 个 57 KD 亚单位组成。编码其亚单位的 cDNA 已被克隆, 它与过氧化氢酶基因高度同源。SABP 有过氧化氢酶的活性, 能高效率地将 H_2O_2 转变为 O_2 和 H_2O 。SABP 与 SA 的结合后就失去了这种催化能力, SA 也能抑制一些植物过氧化氢酶的活性, 而且不同的 SA 类似物抑制 SABP 过氧化氢酶活性与 SABP 的结合能力和诱导防卫反应的能力有很好的一致性。因此, Chen 等认为 SA 通过抑制过氧化氢酶活性, 提高 H_2O_2 浓度, H_2O_2 及其他类型的活性氧作为次级信使, 促进防卫基因表达, 使植物表现出 SAR。然而, 有很多实验结果不支持上述观点, 有关 SA 在 SAR 信号传递中的作用及其位置仍有争论。

3.5 植物的抗病基因编码产物是否为无毒基因编码产物的受体

在经典的基因对基因学说中, 寄主植物单个的显性抗病基因与病原物的无毒基因互作决定了两者之间的不亲和性, 即植物表现出抗病。据此可以推测病原的无毒基因编码产物作为配体直接与植抗病基因编码的受体相结合, 从而激活细胞中的信号级联放大途径, 使植物表现出诸多的抗病防卫反应。随着越来越多的植物抗病基因的克隆, 它们功能产物的结构被解析, 这种假说得到了初步验证, 并越来越引起人们的关注。目前大多数分离的抗病基因编码的蛋白质具有与哺乳动物、果蝇和酵母中受体蛋白相似的结构域, 这说明抗病基因作为病原激发子信号的受体是可能的。

在动物中, 富含亮氨酸重复结构(leucine-rich repeats, LRR)介导蛋白质与蛋白质的相互作用和与配体结合, 因此抗病基因编码的蛋白质中, 这种 LRR 结构可能是与相应的病原信号的识别有关。大多数分离的抗病基因产物都具有 LRR、胞内 NBS (nucleotide binding site) 或丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶结构域^[59]。番茄中的一组基因 *Cf-9*、*Cf-4* 和 *Cf-2* 分别赋予携带 *Avr-9*、*Avr-4* 和 *Avr-2* 的 *C. fulvum* 的抗性, 其胞外 LRR 结构域的疏水表面可能有利

于与其他蛋白质或配体相互识别。*Cf*-4 蛋白和 *Cf*-2 蛋白质胞外 LRR 结构中的 C₂ 结构域突出于 C₁、C₃ 结构域形成突环也有利于与参与信号传递的其他蛋白相互作用。同时 *Cf* 蛋白质 LRR 的数目和平均长度不同,在识别上有很大的差异,为与不同的配体相互识别提供了结构上的多样性。但所有的 LRR 均参与像 *Avr*-9 这样小肽的结合是不太可能的,除非与 *Avr*-9 的多聚体结合,或者 *Cf* 蛋白质和一个较大的植物蛋白质结合, *Avr* 肽结合于两者之上^[59]。这种假设有待证明。

决定水稻对白叶枯病抗性的 *Xa*-21 基因编码一种既有胞外 LRR 序列又有胞内的丝氨酸/苏氨酸活性的蛋白激酶结构域的跨膜蛋白^[60],与拟南芥中受体样丝氨酸/苏氨酸蛋白质激酶 RLK5 高度同源^[61]。在动物中具有蛋白质激酶活性的受体与激素结合后,诱导受体的同型二聚体反应,胞内结构域中的一些位点自身磷酸化,引起信号传递的级联反应,因此 *Xa*-21 蛋白质为抗病基因编码受体与病原信号配体识别引起下游信号传递事件的假设提供了强有力的证据。但由于 *Xa*-21 相对的无毒基因尚未克隆, *Xa*-21 蛋白质是否真正作为受体尚待证明^[62]。

有些抗病基因编码胞质蛋白质,其 LRR 结构是否与病原信号特异识别有关尚不清楚。显然 LRR 结构是有重要功能的,在 RPS2 和 RPM1 的 LRR 上引入一个氨基酸突变,对携带相应无毒基因的病原的抗性就丧失^[63, 64]。

Pto 基因是第一个克隆出来的抗病基因^[65],对携有 *AvrPto* 的 *P. syringae* pv. *tomato* 菌株表现抗性。*Pto* 编码一种含 321 个氨基酸的胞质蛋白质,不具有 LRR 和 NBS 结构域,具有丝氨酸/苏氨酸蛋白质酶活性。因此,看来它具有信号传递功能,而不具有明显的受体识别能力。*Prf* 是另一种从番茄中克隆出的基因,编码产物中具有 LRR 和 NBS 结构,与 RPS2、RPM1 属于同一类抗性基因^[59]。*Pto* 和 *Prf* 蛋白质可能属于同一信号途径,*Pto* 途径依赖于 *Prf* 蛋白质的 LRR 结构,很可能 *Prf* 介导识别,作用于上游,而 *Pto* 作用于下游与蛋白质磷酸有关^[66]。用酵母双杂交系统表明 *AvrPto* 和 *Pto* 蛋白质有相互的物理作用^[67, 68]。*Pto* 自身磷酸化对这种相互作用是必需的。*N* 基因决定烟草对 MTMV 的抗性,编码含 NBS 和 LRR 的胞内蛋白质,其 N 端与果蝇 Toll 蛋白质和人白细胞介素 1 受体 (TL-1R) 蛋白质胞内结构域类似^[69]。在果蝇和人, Toll 蛋白质和 IL-1R 分别与相应的配体或激素结合,引起依赖于蛋白质磷酸化的转录因子释放,并进入核内。因此 N 蛋白质很可能与 TMV 的无毒基因产物一复制酶直接作用^[59]。

Cf-9 蛋白质与 *Avr*-9 肽直接作用,导致寄主植物产生防卫反应,用放射性标记的 *Avr*-9 表明无论是携有 *Cf*-9 的抗性植株,还是未携有此基因的敏感植株,其叶片的质膜上均有特异性的、可逆的、可饱和的 *Avr*-9 肽的结合位点,而非茄科植物中的这种位点未能鉴定到^[70]。Kooman 等^[71]证明,几种突变的 *Avr*-9 肽和化学合成的 *Avr*-9 肽与质膜结合部位的结合能力与它们的诱发细胞坏死的活性相关。丁香脂是丁香假单胞菌无毒基因 *AvrFD* 的编码产物作用产生的一种糖脂激发子,从大豆叶片细胞抽提的可溶部分中鉴定有结合部位,而质膜部分则没有。丁香脂与其结合的 K_m 为 8.7 nmol/L,用蛋白酶或热处理,活性大大降低,竞争结合试验也证明具有受体的特征^[72]。

4 激发子与信号传递

前已所述,许多抗病基因所推测的编码产物中含 NBS 和 LRR,这些基因中的亮氨酸拉链 (leucine zipper) 和 TIR 类似结构域很有可能参与抗病信号传递。计算机蛋白质数据库的检索表明这些亮氨酸拉链区与动物中的肌球蛋白和副肌球蛋白的螺旋-螺旋区有很