

植物诱导抗病性与诱抗剂研究进展

赵继红¹, 孙淑君², 李建中¹

(1. 中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085; 2 河南农业大学, 郑州 450002)

摘要: 以糖、蛋白和糖蛋白三大类生物源激发子为重要的植物诱抗剂, 本文分析了植物诱抗剂作用于植物后所发生的一系列信号识别与信号传导过程及植物典型的防卫反应, 为植物诱抗剂的研发和植物诱导抗病性分子机理的探讨提供参考。

关键词: 植物免疫学; 植物诱导抗病性; 诱抗剂

中图分类号: S 432.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-1542(2003)04-0007-04

A progress on the study of plant induced resistance and elicitors ZHAO Ji-hong¹, SUN Su-jun², LI Jian-zhong¹ (Research Centre For Eco-Environmental Sciences, CAS, Beijing 100085, China; 2 Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: The article reviewed various elicitors particularly focusing on three kinds of bio-elicitors. A series of actions on plants after the treatment with elicitors were analysed. The typical defence reactions were hypersensitive response pathogenesis-related, phytoalexin synthesis and PR-proteins production.

Key words: phytoimmunology; plant induced resistance; elicitors

植物的诱导抗病性, 又称系统获得抗性(systemic acquired resistance)或植物免疫(plant immunization)^[1], 是植物在一定的诱抗剂刺激下, 对随后的病原菌侵染具有抵抗性的特征。植物诱抗剂又名激发子(elicitor)^[2], 是一类能诱导寄主植物产生防卫反应的特殊化合物的总称。这些物质在很低浓度下(10^{-9} mol/L 或更低)即可被植物识别为信号物质, 诱发植物自身的免疫系统, 最终使植物获得抵御病害的能力。因此, 植物诱抗剂可称得上是植物的“疫苗”, 在植物发病前施用, 以防为主, 使植物更加健康的生

长, 从而杜绝或减少化学农药的使用。可见, 对植物诱导抗病性与诱抗剂的研究具有非常重要的意义。

1 植物诱抗剂(激发子)的分类

植物诱抗剂有生物源和非生物源两类。来源于病原生物、其它微生物和寄主植物或由寄主—病原物互作后产生的能激发植物防卫反应的物质均为生物源激发子; 而一些化学物质(如 HgCl_2 、液 N_2 等)或物理作用(机械损伤等)均为非生物源激发子。其中病原物侵染、化学物质、创伤、从病原生物或其它微生物中提取的激发子又称为外源激发子(exogenous

elicitors)。由植物自身产生的或者当植物受到病原菌攻击时, 寄主—病原物互作后释放的激发子称为内源激发子(endogenous elicitors), 如乙烯、水杨酸、过氧化氢、其它激素以及从病原物或植物细胞壁上酶解产生的激发子。生物源激发子与环境相容性好, 是目前研究的热点, 按其生物化学结构不同主要有以下几类。

1.1 寡糖

寡糖类激发子是人们研究的最早、最为充分的一类激发子。目前已确定的具有激发子活性的寡糖有 4 类。

1.1.1 寡聚葡聚糖(oligoglucan) 第 1 个被发现的葡聚糖激发子是从大雄疫霉大豆专化型(*Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*) 的培养滤液中检测出来^[3], 后来在商用酵母浸出物中也纯化得到。这些激发子被证明是由 3~6 个 3,6 连接的葡萄糖残基组成的, 其组成与许多真菌菌丝细胞壁的重要组分 β -葡聚糖相似。对卵菌(*Phytophthora sojae*) 的菌丝体细胞壁水解后可提取一种分枝(1,3-1,6)-七聚- β -葡萄糖苷, 这是最小的具有激发子活性的寡聚葡萄糖苷^[4]。目前, 国内已用化学方法合成得到寡糖激活剂, 且化学合成寡糖与天然寡糖结构活性完全相同, 从而证实了某些特定结构的寡糖作为病原体的最有效成分, 象“抗原”一样激活植物的自卫系统, 使植物产生植保素这一重要发现。

1.1.2 几丁质寡糖(oligochitin) 几丁质(1,4 连接 β -N-乙酰葡萄糖胺多聚物)是许多真菌细胞壁多糖的主要成分。同时, 也大量存在于昆虫和动物的甲壳中。目前, 我国已有从虾壳、蟹壳提取的寡糖素生物农药上市。同时, 水解真菌细胞壁可得到几丁质寡糖激活剂^[5]。由于几丁质是不可溶多聚物, 因此认为由内源的植物几丁质酶释放的可溶性几丁质片段起激发子作用。结构活性研究表明有生物活性的几丁质寡聚体的最低聚合度为 4。此外, 不同植物不同防卫反应所需的结构大不相同。

1.1.3 真菌源的寡聚脱乙酰几丁质(oligochitosan of fungal origin) 脱乙酰几丁质对豌豆、大麦、番茄等多种植物具有生物活性^[6]。如可诱导番茄对根腐菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *rdicislycopersice*) 和早疫病菌(*Alternaria* spp.) 的抗性。

1.1.4 植物源寡聚半乳糖醛酸(oligochitosan of plant origin) 匀质半乳糖醛酸化合物, 即果胶多糖是组成植物细胞壁的重要成份, 它由 1,4 连接的半乳糖醛酸残基构成, 在病原物攻击植物时, 可释放

寡聚半乳糖醛酸苷作为内源激发子^[7]。因此, 半乳糖醛酸寡糖可通过将果胶酶喷洒在植物上“就地”产生。许多研究表明, 寡聚半乳糖醛酸的聚合度在 10~15 之间时活性最高。

1.2 蛋白类激发子

最近已证明植物防卫反应的激发子可以是肽和蛋白。激发素(elicitin)就是其中的一种^[8]。Elicitin 是由多种疫霉菌分泌的低分子量胞外蛋白, 其分子量约为 10 kDa, 可在多种植物上诱导抗性。

植物病原细菌拥有一类 *hrp* 基因簇, 由它决定可分泌一族蛋白^[9], 此蛋白是非寄主植物的激发子。现已得到的有梨火疫病菌(*Erwinia amylovora*) 产生的过敏素(harpinEa)和丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*) 产生的 harpin_{ps} 等。

1.3 糖蛋白

从大雄疫霉大豆专化型培养滤液中分离出一种 42 kDa 的糖蛋白能激发欧芹细胞和原生质体产生香豆素植保素, 可证明该激发子的活性取决于蛋白部分而不是聚糖部分^[10]。从大豆疫霉病原真菌中既纯化出了大豆植保素生物合成的寡糖类激发子, 又分离出了欧芹植保素积累的糖蛋白激发子。可见, 从同一真菌中提取的不同成分可以被不同植物识别为激发子。

研究表明, 将水杨酸、茉莉酸、茉莉酸甲酯等内源激发子或一些植物激素如脱落酸等作为外源激发子施用于植物, 同样有诱导植物抗逆及抗病能力的作用。如茉莉酸甲酯可提高花生的抗旱性, 诱导花生抗黄曲霉的污染, 诱导烟草幼苗抗炭疽病。

2 植物诱导抗病性机理

植物诱抗剂(激发子)的作用是刺激植物细胞产生防卫机制, 但植物防卫反应首先要接受外源或内源激发子。植物细胞中能识别和接受激发子刺激信号的特殊组分或位点称为受体。激发子与受体进行分子识别, 通过构型变化激活胞内有关酶的活性, 进一步修饰胞内基质后产生激活性和适应性信号分子, 并通过对特殊基因的调节激发防卫反应。分子识别之后的一系列细胞功能的活化称为细胞识别。可见, 植物诱导抗病性是由发生在激发子—受体之间的识别作用诱导的一系列按时序发生的生理过程。

2.1 信号接受

目前已得到糖类、蛋白及糖蛋白激发子的结合位点存在的证据。结合位点是否就是受体还有待于进一步考证。

近年来用 ^3H 和 ^{125}I 标记高活性大雄疫霉的支链 1,3-1,6- β 葡聚糖激发子,证明该激发子能与大豆细胞膜高度结合^[11]。在大豆根、子叶、胚轴和悬浮细胞的膜上都可以检测到 β -葡聚糖激发子的特异性结合。研究表明,对 β -葡聚糖结合位点表现最高亲和性的都是七聚葡萄糖^[12]。在其它豆科植物的原生质膜上也筛选出了 β -葡聚糖结合位点。近期研究证明了具有激发子活性的几丁质片段在番茄和水稻的组织中存在有这些寡聚糖苷的高亲和性结合位点^[13]。

在小麦原生质膜和番茄细胞的微粒体膜中发现有肽聚糖或糖肽的结合位点^[14]。在激发子与受体的结合中,糖部分是关键,去掉寡聚半乳糖部分,结合和激发子活性将同时消失。最近确认在欧芹原子质膜上有一高亲和性寡肽结合位点^[15],进一步实验表明此结合位点是分子量为 91 kDa 的蛋白,作为激发子受体它可以激活多种防卫反应。

2.2 信号传导

植物体内的信号传递系统可以说是寄主植物对病害抗感反应的调节中枢,大多数(并不是全部)防卫反应都需要相关防卫基因的活化。因此,对不同的植物及不同类型的防卫反应有着不同的信号传导途径。即使在同一植物中,不同的激发子可能激活不同的信号传导链,信号传导过程包括原生质膜去极化、离子通道变化、胞外碱基化作用及蛋白磷酸化。

激发子作用于植物组织后,几分钟内即可诱导早期反应包括离子通量变化和寄主细胞的去极化^[16]。离子通道在激发子诱导的原生质膜去极化和激发子信号传导过程中起重要作用,打开离子通道使 Cl^- 排出、 Ca^{2+} 进入反过来驱使 K^+ 排出使膜电位趋极化。有关 Ca^{2+} 在信号传导中作用的假说模型有许多实验结果作支持。在无 Ca^{2+} 介质中,大豆、胡萝卜、欧芹、烟草细胞中的防卫相关基因不能活化或者植保素不能形成。蛋白激酶与蛋白磷酸酶在信号传导过程中更进一步将受体信号转化成细胞专化性反应^[17]。

植物对病原菌侵染或激发子作用后一个快速反应就是活性氧产生,称为氧化爆发^[18]。活性氧有助于细胞壁蛋白的交联,使寄主植物对真菌酶的攻击更有抵抗力。活性氧可能是活化防卫基因的第 2 信使,并且,它们对病原菌也可能有毒性,活性氧的产生是过敏反应 HR 的典型特征。在激发子处理的各种植物细胞中,由活性氧或脂肪氧化酶介导的脂类快速氧化都有发生。

值得注意的是,大多数已知的寡糖和蛋白激发子的移动性有限制,它们不可能涉足长距离信号传导过程。因此,必须有可移动的信号物质如系统素(systemin)、水杨酸、乙烯、脱落酸、茉莉酸等作为系统信号分子^[19],但这些系统信号分子对整体防卫反应的贡献,目前还不清楚。

2.3 典型的植物防卫反应

不论激发子的来源如何,信号接受的机理都依赖于专有的接受子在植物细胞表面的出现,并由此开始激活植物防卫反应的信号过程,典型的植物防卫反应有以下几种。

2.3.1 过敏反应(HR) 过敏反应是植物受病原菌侵染后,细胞组织快速死亡的现象,是植物抗病性的重要标志^[9]。当用诱导菌预接种或激发子处理植物时,植物可产生 HR,从而启动一系列防卫反应,抵抗挑战菌的侵染。

2.3.2 植物保卫素的合成和积累 植物受到病原菌侵染或激发子刺激后所产生或积累的一类低分子量抗菌性次生代谢产物,称为植物保卫素(phytoalexin)^[20]。目前发现的植物保卫素都不是蛋白质,多属于类异黄酮、类萜、呋喃香豆素、聚乙炔、葡萄糖苷类化合物。

2.3.3 PR 蛋白形成 当植物受到病原菌侵染时,抗性反应的激活总伴有一系列特殊蛋白的积累,此类蛋白称为病程相关蛋白(pathogenesis-related proteins, PR)^[21]。目前认为 PR 蛋白,特别是几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶是植物潜在的抗病物质,且具有广谱抗性。

2.3.4 抑制病原物降解酶的蛋白质抑制物的合成

病原物中含有能分解植物细胞壁物质的酶,如角质酶、果胶酶、半纤维素酶、木质素酶等及分解细胞内物质的蛋白酶、淀粉酶、脂质酶等。正是依靠这些酶开路,病原物才能穿透植物细胞壁,杀伤寄主原生质,消解寄主组织从而使植物生病,而经激发子激发后,可诱导植物产生酶抑制物质,如酚类、丹宁、蛋白质等,来抑制病原菌分泌的一系列水解酶,从而延缓或阻止病程发展。如葡萄幼果果皮中的一种丹宁含量较高,可抑制灰霉菌的多聚半乳糖醛酸酶(病原菌降解寄主细胞壁的一种关键酶),使侵染中断。在甘薯组织中发现一种水溶性蛋白质,也可抑制多聚半乳糖醛酸酶^[22]。

2.3.5 细胞壁修饰作用 病原物侵染或激发子诱发可导致植物细胞壁木质化、木栓化、产生酚类物质和钙离子沉积等多种防卫反应^[23]。如木质化作用

是在细胞壁、胞间层和细胞质等不同部位产生和积累木质素类似物,从而抵抗病菌的侵入或使侵入的菌丝只局限在少数的表皮细胞内,阻止侵入菌丝的扩展。现已发现真菌细胞壁成份如几丁质、脱乙酰几丁质等均能诱导木质化作用。

3 结语

植物诱导抗病性及诱抗剂的研究目前仍处于起步阶段,还有许多未知的领域有待人们去揭示,如植物诱导抗病性的分子机理、各类诱抗剂的制备、纯化以及成分结构确定。诱抗剂作用于植物后,信号接受及信号传导过程是如何进行的,对于不同结构的诱抗剂作用于不同的植物其受体也各不相同,受体接受激发子信号后,植物体内通过复杂的生物过程,活化植物的自卫基因表达。但目前在不同病害体系中有关信号传递过程的研究一般只涉及个别事件,个别环节。比较系统深入的研究需要微生物学、植物生理学、分子生物学、化学等学科的努力,从微生物、植物的结构出发、研究激发子受体结构与活性的关系,从而得出激发子及其作用模式的一般规律。

用化学农药来对付植物病虫害,多年来已积累了丰富的经验,但生态环境的污染和破坏也使人们付出了沉痛的代价,同时食品中的农药残留又直接危害人们的健康。随着植物诱导抗病性及分子生物学研究的不断深入,运用基因工程手段,将植物中受诱导表达的启动子克隆出来,和抗病有关的基因结合,组成一个表达调控元件,转移到不具有抗病能力的植物中去,转感病植物为抗病植物。这是植物诱导抗病研究的方向。

参考文献:

- [1] John A L Plant immunisation. from myth to SAR[J] Pestic Sci, 1999, (55): 193-196
- [2] Keen N T, Partridge J E, Zaki A Pathogen produced elicitor of a chemical defense mechanism in soybean monogenetically resistant to *Phytophthora megasperma* var *sojae* [J] Phytopathology, 1972, (62): 768
- [3] Sharp J K, Mcneil M, Albersheim P The primary structures of one elicitor active and seven elicitor inactive hexa(β -D-glucopyranosyl)-D-glucitols isolated from the mycelial walls of *Phytophthora megasperma* f sp *glycinea* [J] J Biol Chem, 1984, (259): 11321-11336
- [4] Sharp J K, Valent B, Albersheim P Purification and partial characterization of a β -glucan fragment that elicits phytoalexin accumulation on soybean[J] J Biol Chem, 1984, (259): 11312-11320
- [5] Ebel J, Mithofer A Early events in the elicitation of plant defence [J] Planta, 1998, (206): 335-348.
- [6] Conrath U, Domard A, Kaus H Chitosan-elicited synthesis of callose and coumarin derivatives in parsley cell suspension cultures [J] Plant Cell Rep, 1989, (8): 152-155
- [7] Cote F, Hahn M G Oligosaccharins, structures and signal transduction[J] Plant Mol Biol, 1994, (26): 1375-1411.
- [8] Ricci P, Bonnet P, Huet C, et al Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco[J] Eur J Biochem, 1989, (183): 555-563
- [9] Wei Z M, Laby R J, Zumoff C H, et al Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erynia amylovora* [J] Science, 1992, (257): 85-88
- [10] Parker J E, Schulte W, Hahlbrock K, et al An extracellular glycoprotein from *Phytophthora megasperma* f sp *glycinea* elicits phytoalexin synthesis in cultured parsley cells and protoplasts[J] Mol Plant-Microbe Interact, 1991, (4): 19-27
- [11] Cosio E G, Popperl H, Schmidt W E, et al High-affinity binding of fungal β -glucan fragments to soybean (*Glycine max* L.) microsomal fraction and protoplasts[J] Eur J Biochem, 1988, (175): 309-315
- [12] Yoshikawa M, Sugimoto K A specific binding site on soybean membranes for a phytoalexin elicitor released from fungal cell walls by β -1,3-endoglucanase[J] Plant Cell Physiol, 1993, (34): 1229-1237
- [13] Baurethel K, Felix G, Boller T Specific, high affinity binding of chitin fragments to tomato cells and membranes [J] J Biol Chem, 1994, (269): 17931-17938
- [14] Basse C W, Fath A, Boller T High affinity binding of a glycopeptide elicitor to tomato cells and microsomal membranes and displacement by specific glycan suppressors [J] J Biol Chem, 1993, (268): 14724-14731
- [15] Nummerger T, Nennstiel D, Jabs T, et al High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses[J] Cell, 1994, (78): 449-460
- [16] Ward J M, Pei Z M, Schroeder J Roles of ion channels in initiation of signal transduction in higher plants[J] Plant Cell, 1995, (7): 833-844
- [17] Boller T Chemoperception of microbial signals in plant cells[J] Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Bio, 1995, (46): 189-214
- [18] Lamb C, Dixon The oxidative burst in plant-disease resistance [J] Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Bio, 1997, (48): 251-275
- [19] Dummer J, Shah J, Klessing D F Salicylic acid and disease resistance in plants[J] Trends Plant Sci, 1997, (2): 266-274
- [20] Ebel J, Grisebach H Defense strategies of soybean against the fungus *Phytophthora megasperma* f sp *glycinea*: A molecular analysis[J] Trends Biochem Sci, 1988, (13): 23-27
- [21] 王勇刚, 曾富华, 吴志华, 等 植物诱导抗病性与病程相关蛋白[J] 湖南农业大学学报(自然科学版), 2002, 28(2): 177-181
- [22] 王金生 分子植物病理学[M] 北京 中国农业出版社, 1999
- [23] 李振歧 植物免疫学[M] 北京 中国农业出版社, 1995