

文章编号: 1004-0374(2001)03-0135-04

植物抗病的分子生物学基础

赵中秋, 郑海雷, 张春光

(厦门大学生命科学学院, 厦门 361005)

摘要: 随着分子生物学的不断发展, 人们已逐步了解植物寄主与病原之间的相互作用及植物抗病的分子机理。植物受病原侵染后出现两种类型的防卫反应: 局部防卫反应(过敏反应)和系统获得性防卫反应。木质素、植保素、活性氧、水杨酸等物质已被证明在植物抗病中起了重要作用。抗病基因和防卫基因的诱导表达构成了防卫反应的遗传基础。本文综述了近年来植物抗病的分子生物学研究进展, 并对其发展和应用前景作了展望。

关键词: 植物抗病; 防卫反应; 抗病基因; 防卫基因

中图分类号: S432.23

文献标识码: A

Molecular and biological basis of plant disease resistance

ZHAO Zhong-Qiu, ZHENG Hai-Lei, ZHANG Chun-Guang

(School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: With the development of the molecular biology, the interaction between plant host and pathogen and the molecular basis of the plant disease resistance have being revealed. There are two types of defense reactions that are induced by the pathogens: local resistance (LR) or hypersensitive response (HR) and systemic acquired resistance (SAR). Substances such as lignin, phytoalexin, active oxygen, salicylic acid are known to play important roles on the plant disease resistance. The genes involved in the resistance and defense and their expression and regulation are the genetic basis for the plant defense mechanism. In this review, the recent molecular achievements towards the plant disease resistance are summarized, the approaches in the future and the possible applications are also prospected.

Key words: disease resistance of plants; defense reaction; resistance gene; defense gene

植物在生长过程中不可避免会经常遇到外界环境的干扰胁迫及来自其他生物的干扰(生物逆境), 包括病原物(真菌、细菌、病毒、类病毒等微生物)、杂草等。其中病害是最经常发生, 也是长期以来农业生产上最困扰的问题。马铃薯晚疫病引起了 19 世纪欧洲大灾荒, 1970 年玉米小斑病造成了美国 10 亿美元以上的损失。据估计, 每年因病害导致的农作物减产达 10% 以上。因此, 研究病原与寄主之间的相互作用关系以及植物的抗病机制, 不仅理论上具有重要意义, 在生产上更具有重大的经济价值。自 Flor 首次提出“基因对基因”假说, 初步从遗传上阐明病原与寄主之间的相互关系以来, 对植物抗

病的研究有了长足的进展。本文着重从分子生物学水平介绍目前植物抗病机理的研究现状和成果。

1 病原致病作用

造成植物病害的病原主要有真菌、细菌、病毒、类病毒等几类。不同种类的病原物对寄主的致病破坏途径不同, 目前已研究发现以下几种破坏方式: 真菌产生破坏寄主细胞的酶类(如角质酶、果胶酶、纤维素酶、磷酸酶、蛋白酶等), 使寄主组织软腐坏死; 利用寄主的蛋白和核酸合成系统作为自身的增

收稿日期: 2000-03-03; 修回日期: 2000-08-09.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39870630)

作者简介: 赵中秋(1975—), 女, 硕士研究生。

殖原料,多数病毒属于此类;分泌破坏寄主细胞膜和正常代谢的毒素;分泌阻塞寄主导管的物质,致使植株因运输被中断而枯萎;把自身的 DNA 片段整合到寄主 DNA 上,迫使寄主合成供自己生长增殖的物质;产生植物激素,破坏寄主原有的激素平衡,导致生长异常。

2 寄主的防卫系统

寄主有预存和诱导两个防卫系统。预存系统除了细胞壁的一些成分,如角质、蜡质、木质素等外,还包括气孔特殊结构、小分子物质、种子抗真菌蛋白和真菌几丁质结合的凝集素、破坏真菌细胞膜透性的蛋白、核糖体失活蛋白等。诱导防卫系统是由病原物感染诱导形成的防卫系统,一般认为是植物的基本防卫系统,包括局部抗病反应(或过敏反应)和系统抗病反应两种。植株在受到非亲和病原感染后在感染部位会出现局部保护反应,称过敏反应(hypersensitive response, HR),表现为感染部位产生枯斑,细胞出现程序死亡(programmed cell death, PCD),从而导致了病原菌不易获得营养,同时还诱导周围细胞积累抑制病菌侵入的物质,限制其增殖。据研究,有人认为植物细胞的程序坏死与动物相似,也是由于细胞萎缩和 DNA 片段化以及许多特有基因的诱导表达综合作用的结果。但目前对程序化死亡所涉及的生化反应还没有详细研究。

过敏反应发生后还会诱导寄主整个系统获得对病原感染的广谱性抗性,即系统获得性抗性(systemic acquired resistance, SAR)。系统抗性不会出现类似过敏反应的枯斑,但能抗多种病原引起的病害。

3 防卫反应的分子基础

植物在与病原相互作用的长期进化过程中,通过各种代谢途径形成了各种与抵抗病原有关的物质,有些是原来植物体中本身存在的,有些是病原感染后诱导形成的。由于篇幅所限,本文只对几种重要的已被确认的与抗病有关的物质作一介绍。

3.1 木质素(lignin)

病原感染后,会引起寄主细胞壁的变化,主要表现为木质化过程的加强,即木质素含量的增加。木质素含量的增加为阻止病原对寄主的进一步感染提供了有效的保护屏障:(1)木质素加大了病原菌穿透细胞壁的压力;(2)增强了细胞壁抗酶溶的作用,因为病原菌不能分泌分解木质素的酶类;(3)木质素的低分子量酚类前体及多聚作用的产物可以钝化和破坏真菌膜、酶和毒素;(4)限制了真菌酶

和毒素向寄主细胞内的扩散,同时也限制寄主细胞内水分及营养物质向病原扩散,导致病原菌因得不到营养而饿死。病毒侵染也能诱导寄主木质素的增加,当用日本萝卜根感染霜霉病时,发现感染和未感染的萝卜根中的木质素不仅在量上不同,在质上也有差别,未感染的根中木质素含有丁酰香单位,而感染的根中则含有较多的愈创木酰单位^[1]。

木质素作为细胞阻止病原入侵的第一道防护屏障,在植物防卫反应中起着重要作用。

3.2 植保素(phytoalexins, PA)

自 Cruickshank 从豌豆未成熟荚中分离并鉴定出第一种植保素至今,已在 17 种植物中发现并鉴定了 200 多种植保素,并证明它是参与植物防卫反应重要生理活性物质之一。研究较多的是类黄酮植保素和类萜植保素。类黄酮植保素主要存在于豆科植物中,具代表性的有豌豆素、菜豆素、大豆素、苜蓿素等。类萜植保素主要存在于茄科和旋花科,如甘薯酮、辣椒素、利希亭等。

PA 的诱导积累只局限在植株受感染的细胞周围,起化学屏障作用,并不运输到植株的其他部位。而且抗病植株和感病植株积累植保素的速度不同,前者积累速度较快,在感病初期就达到了高峰,产生过敏反应,而后者积累速度较慢,几天后才达到高峰或积累不明显。PA 的诱导因子并不是专一性的,致病和非致病病原都能诱导 PA 的合成。此外,欧阳光察等^[2]研究发现一些非生物因子也能诱导 PA 的形成,还有人发现真菌的培养滤液和菌丝提取液也能诱导 PA 生成。Roby 等^[3]将培养 6~8 日的大豆叶用 *pms* 的诱导物处理,发现叶片中大豆素含量明显增高。

3.3 活性氧(active oxygen)

活性氧的产生是植物抗病的最早期反应之一。Doke^[4]用马铃薯晚疫病菌侵染马铃薯块茎,首先发现在植株病原非亲和反应的早期有活性氧产生。有关活性氧在防卫反应中的作用的研究较多,已证明 O_2^- 和 H_2O_2 具有直接抑菌作用。Wu 等^[5]把葡萄糖氧化酶(氧化葡萄糖的同时产生 H_2O_2)基因导入马铃薯中,获得的转基因植株,在叶片和块茎中 H_2O_2 都有升高,块茎表现出对软腐病的抗性,而叶片表现出对免疫病的抗性,并且过氧化氢酶可取消这种抗性,证明了 H_2O_2 的抗菌物质功能。

除直接作为抗菌剂外,活性氧在防卫反应中更重要的作用在于作为触发信号诱导被感染部位的过敏反应。由于氧化爆发只在非亲和相互作用中出现,且

为抗病的最早期反应, 人们自然地设想它诱导了过敏性程序死亡, 经过近年来的研究, 这种设想已得到证明。Mussell^[6]发现无论是外源 H_2O_2 或添加的酶和底物产生的 H_2O_2 都能造成植物组织伤害, 而外加的过氧化氢酶则阻止这种组织细胞的死亡。Adam 等^[7]发现核黄素—EDTA 系统产生的 O_2^- 可引起烟草叶片类似过敏反应的死亡。低浓度的 $HgCl_2$ 能诱导活性氧的产生, 也能诱导烟草的过敏反应。Mehdy(1994)、Lams 和 Dixon 等^[8]认为在过敏反应中, 由于氧化跃变造成了 O_2^- 和 H_2O_2 积累, 从而诱导了过敏性细胞程序死亡的发生。但 Glazener 等^[9]最近研究表明, 在 *hrm* 区产生突变的丁香假单胞菌可诱导烟草悬浮细胞活性氧的产生, 却不能在叶片上引发过敏反应。所以有人认为细胞过敏性程序死亡需两个或更多的激发信号, 活性氧是其中一个重要的一个。近来还有研究认为活性氧可作为可扩散信号诱导邻近细胞防卫机制的启动。Chai 等^[10]发现 H_2O_2 或 H_2O_2 的产生体系都能诱导马铃薯块茎切片植保素的积累。目前在菜豆、大豆、番茄、胡萝卜等植物中也发现类似的反应^[11]。

3.4 水杨酸 (salicylic acid, SA)

20 世纪 70 年代, 人们开始认识 SA 在植物抗病中的作用, 到了 90 年代, SA 已成为植物抗病的研究热点之一。SA 广泛存在于植物体中, 它与多种生理调节过程都有关系, 目前普遍认为, SA 在植物抗病反应中起着重要作用。

外源 SA 可提高植物的抗病性。Enyedi 等^[12]用外源 SA 饲喂烟草的研究发现, 渗入的外源 SA 可提高烟草对 MTV 的抗性。Shulaev^[13]通过 O^{18} 标记示踪发现, 烟草上部未经诱导处理的叶片积累的 SA 有 60%~70% 是由下部处理的叶片产生并向上运输的。Malamy 等在被病毒感染烟草叶片中发现水杨酸含量升高了 50 倍。同时, 增加后的 SA 还诱导植物积累病程相关蛋白 (PR) 并产生抗病性。Briggs^[14]用黄瓜幼苗经外源 SA 处理, 发现植株体内几丁质酶活性大大提高。

水杨酸目前被认为是介导植物由局部过敏反应到植物产生系统获得性抗性的信号分子。Gaffney 等^[15]构建的能结构性表达 *naha* 的烟草植株, 能表达大量水杨酸羟化酶, 催化 SA 转化为儿茶酚, 这种转基因植株, 即使受到了病原物诱导接种也不能积累 SA, 上部未处理的叶片不能积累 PR, 也不能产生抗性, 表明 SA 是植物产生系统获得性抗性所必需的。又基于 SA 本身活性及分子量比较小,

能适于在韧皮部内作长途运输, 目前普遍认为 SA 是植物获得性的信号分子。

4 防卫反应的遗传基础

4.1 抗病基因

抗病基因的直接或间接产物与病原无毒基因的直接或间接产物相互识别, 从而诱导防卫基因的迅速表达。随着基因技术水平的不断提高, 对抗病基因有了越来越深入的了解。目前, 利用转座子标签及图谱定位结合染色体步行法已克隆出了好几种抗病基因。最早发现的是番茄的抗丁香假单胞菌番茄致病变种基因 *pto*, 编码丝氨酸 / 苏氨酸型蛋白激酶。最新研究发现无毒基因 *avrpto* 和 *pto* 可直接进行物理性相互作用, 激发植物的过敏性防卫反应^[16,17]。烟草基因 *N* 决定烟草对 TMV 的抗性^[18], 编码一种胞内特殊蛋白, 其氨基端含有一种同果蝇 Toll 蛋白和哺乳动物白细胞介素 I 受体蛋白的胞内结构域类似的结构域, 因此 *N* 蛋白可能直接作为受体同 TMV 无毒基因产物在胞内作用而诱发寄主的防卫反应。亚麻的抗亚麻锈菌基因 *L*^[19]、拟南芥的抗霜霉菌基因 *RPP5*^[20] 所编码的蛋白均具有与 *N* 相似的结构。番茄的抗叶霉病菌基因 *cf9*、*cf4* 所编码的蛋白与 *N* 蛋白不同^[21], *N*-端有一个富含亮氨酸重复单位区域 (leucine rich repeat, LRR), 其 LRR 区含一个保守的含谷氨酸区域, 认为是胞外 LRR 的特性, 推测可作为跨膜受体同病毒无毒基因 *avr9*、*avr4* 编码的肽直接作用, 诱导突变防卫反应。决定水稻抗白叶枯病的 *Xa21* 基因编码一种独特的跨膜蛋白^[22], 其 *N*-端也有一个 LRR 序列, 而 *C*-端则是一个蛋白激酶结构, 与 *pto* 蛋白相似, 由于动物细胞中配体可与受体激酶的胞外结构域结合, 诱导受体的同型二聚体反应, 激发信号传递, 据此推测, *Xa21* 蛋白在识别病原激发子和随后的信号传递中也有相似的作用。玉米抗圆斑病菌基因 *Hm1* 是 HC 毒素的相对应抗性基因, 编码胞内 NADPH-HC 毒素还原酶, 起降解 HC 毒素作用。

4.2 防卫基因

4.2.1 防卫基因的表达 寄主的防卫基因和抗病基因是两个完全不同的概念。防卫基因产物直接作用于病原菌, 限制病原的增殖, 而抗病基因的产物则是直接或间接识别病原的无毒基因, 将识别信号传至防卫基因, 进而诱导防卫基因的迅速表达。两种基因的作用和先后表达顺序均不同。非亲和病原感染植株后, 其无毒基因产物与寄主相对应的抗病

基因产物发生识别, 会诱导一些新的基因的表达, 这些所表达的基因, 即是防卫基因。实验表明, 用非亲和性病原处理后的植株, mRNA 和蛋白质均明显增加, 这就是防卫基因诱导表达的结果。感病植株也有防卫基因的表达, 但一般情况下, 较抗病植株防卫基因表达的速度慢且强度低。

4.2.2 防卫基因家族和防卫基因功能的多样性
利用差式杂交法, 一些与植保素、木质素合成相关的关键酶基因以及许多病程相关 (pathogenesis related, PR) 蛋白基因已经克隆出来。最近, 通过更灵敏的 mRNA 差式显示法, 一些功能尚未清楚的新的防卫基因的 cDNA 也已被克隆。植物体防卫基因的拷贝数随种类不同而有差别, 有些只有 1~2 个拷贝, 而有些则是多基因家族。烟草 PR 蛋白基因、豆科和马铃薯基因组中, 与类黄酮植保素合成相关基因都是多基因家族。在这些多基因家族中, 往往只有部分防卫基因在防卫反应中表达^[23], 如木质素参与导管构成; 许多 PR 蛋白除在抗病时诱导积累, 在花器官发育和衰老时也有积累; PAL 基因在植保素、木质素、花青素的合成以及抗辐射、创伤愈合、维管束分化等过程中都有活跃表达。这些基因表达的多样性与其启动子能接受多种调节信号有关。

4.2.3 防卫基因的调控 通过植物悬浮细胞系和病原激发系统的研究, 已鉴定出一些诱导防卫基因启动子区的顺式和反式序列^[22]。菜豆 PAL 基因有 2 个拷贝能被激发子激活。它的启动子区除 TATA、CAAT box 和与 SV40 类似的增强子核心序列外, 还有 AT 重复区和丰富区。菜豆 CHS 基因有 8 个拷贝, 其中 CHS₁₅ 5' 端调节区中, TATA box 位于转录起始点上游 -29 处。从 TATA box 到 -173 区为激发子活化区, 从 -173 到 -326 区为激发子处理后的沉默子区, 它与启动子竞争阻遏子, 从而增加了启动子在原生质体瞬间表达的强度。在活化区和

沉默子区中都有与 PAL 相似的保守片段。现在已分离出与沉默子三个分散的 GGTTAA 序列结合的反式因子和与激活区三个重复的 CCTACC 序列结合的经激发子处理后新结合的顺式因子。

5 结束语

随着对植物抗病机理研究的不断深入, 基因工程技术的迅速发展, 植物抗病基因工程也已取得了可喜的成就。各种转基因抗病植株相继建成并应用到农业生产中。利用植物防卫反应基因进行的遗传工程, 可以改良植物的抗病性, 提高植物的抗病能力。这不仅对农业增产、解决世界粮食问题具有特别重要的意义, 还将对环境保护作出重大贡献。植物抗病性的提高, 将大大减少各种化学农药的施用, 从而除去了环境污染的一个重要污染源。

植物抗病机理的研究以及植物基因工程技术的应用不但为农作物品种的改良开辟了一条新的途径, 同时还为防治污染、保护环境、维持生态平衡提供了新的思路, 具有特别重要的研究意义和广阔的应用前景。

[参 考 文 献]

- [1] Staskawicz B J, Ausubel F M, Baker B J, et al. *Science*, 1995; **268**: 661-667.
- [2] 欧阳光察, 薛应龙. 植物生理学通讯, 1988; (3): 9-16.
- [3] Roby D, Toppan A, Esquerre-Tugaye M T. *Plant Physiol*, 1986; **81**: 228-233.
- [4] Doke N. *Physiol Plant Pathol*, 1983; **23**: 345-357.
- [5] Wu G, Shortt B J, Lawrence E B, et al. *Plant Cell*, 1995; **7**: 1357-1368.
- [6] Mussell H. *Phytopathol*, 1973; **63**: 62-70.
- [7] Adam A, Farkas T, Somlyai G, et al. *Physiol Mol Plant Pathol*, 1989; **34**: 13-26.
- [8] Dixon R A, Harrison M J. *Ann Rev Phytopathol*, 1994; **32**: 479-501.
- [9] Glazener G A, Orlandi E W, Baker C J. *Plant Physiol*, 1996; **110**: 759-763.
- [10] Chai H B, Doke N. *Physiol Mol Plant Pathol*, 1987; **30**: 27-37.
- [11]-[23] 略

(上接第 118 页)

[参 考 文 献]

- [1] Blackburn E H, Gall J G. *J Mol Biol*, 1978; **120**: 33-35.
- [2] Flint J, Bates G P, Clark K, et al. *Nat Genet*, 1997; **15**: 252-257.
- [3] Klobutcher L A, Swanton M T, Donini P, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981; **78**: 3015-3019.
- [4] Gravel S, Larrivee M, Labrecque P, et al. *Science*, 1998; **280**: 741-744.
- [5] van Steensel B, Smogorzewka A, de Lange T. *Cell*, 1998; **92**: 401-413.
- [6] Griffith J D, Comeau L, Rosenfield S, et al. *Cell*, 1999; **97**: 503-514.
- [7] Carol W G. *Cell*, 1999; **97**: 419-422.
- [8] Nugent C, Hughes T R, Lue N F, et al. *Science*, 1996; **274**: 249-252.
- [9] Shore D. *Biol Chem*, 1997; **378**: 591-597.
- [10] Marcand S, Gilson E, Shore D, et al. *Science*, 1997; **275**: 986-990.
- [11]-[47] 略