

# 疫霉蛋白激发子 PB90 对病原菌 生长与致病力的影响

张正光, 王源超, 郑小波\*

(南京农业大学植保学院 农业部病虫监测与治理重点开放实验室, 南京 210095)

**摘要:** 激发子 PB90 是由棉疫病菌分泌的可诱发非寄主植物系统获得抗病性的一类新型蛋白激发子。本文就该激发子在棉疫病菌生长发育及致病过程中的作用进行了研究。采用胶体金标记发现该激发子主要分布在棉疫病菌的细胞壁上, 该激发子可以分泌到细胞外; 在离体条件下, PB90 的多克隆抗体并不抑制棉疫病菌游动孢子的萌发和孢子萌发后形成菌落的能力, 而且抗体包埋的游动孢子仍能激发非寄主植物烟草的过敏性坏死反应; 但是, 抗体的包埋处理可以使棉疫病菌的游动孢子丧失对棉花的致病力。结果表明, 特异性存在于细胞壁上的疫霉蛋白激发子 PB90 是棉疫病菌的一种重要的毒性因子, 在病菌对棉花的致病过程中具有重要作用; 此外本研究结果还提示 PB90 并不是惟一能诱导非寄主烟草过敏性反应的棉疫病菌激发子, 除了 PB90 之外, 棉疫病菌还能产生其它的激发子诱导烟草的过敏性坏死反应。

**关键词:** 蛋白激发子 PB90; 棉疫病菌; 棉花; 亲和互作

**Effect of the protein elicitor PB90 from *Phytophthora boehmeriae* on growth and virulence of the pathogen itself** ZHANG Zheng-guang, WANG Yuan-chao, ZHENG Xiao-bo (The Key Lab of Monitoring and Management of Plant Diseases and Insects of Chinese Ministry of Agriculture, College of Plant Protection, Nanjing Agric. Univ., Nanjing 210095, China)

**Abstract:** The role of the protein elicitor PB90 in compatible interaction between *P. boehmeriae* and cotton was studied. The elicitor was previously shown to be an efficient elicitor of the hypersensitive reaction and an AVR factor conditioning nonhost resistance in *Nicotiana tabacum*. The treatment of *P. boehmeriae* zoospore with antiserum raised against the elicitor PB90 resulted in the loss of virulence activity on host cotton, indicating that the elicitor could contribute to virulence of *P. boehmeriae* on cotton (Fig. 4). However, the hypersensitive reaction was also observed in nonhost tobacco leaf infiltrated with zoospore treated by different doses of antiserum (Fig. 2). The antiserum did not inhibit zoospore germination and creation of effective single zoospore isolates *in vitro* (Table 1 & Fig. 3). The antiserum allowed localization of PB90 by immunogold-labeling on the cell wall of the mycelium and encysting zoospores when the fungus was grown *in vitro* (Fig. 2). The results provide strong evidence that PB90 has dual functions with promoting virulence on host cotton and functioning as avirulence factor by eliciting hypersensitive reaction and resistance in nonhost tobacco.

**Key words:** protein elicitor PB90; *Phytophthora boehmeriae*; cotton; compatible interaction

中图分类号: S432.1

文献标识码: A

文章编号: 0412-0914(2005)02-0168-06

激发子是病原菌产生的一类重要信号分子, 在植物与病原菌的非亲和互作中, 激发子通过与植物

收稿日期: 2004-08-10; 修回日期: 2004-11-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30270865); 教育部科学技术研究重点项目(01098); 教育部留学回国人员基金项目

通讯作者: 郑小波, 教授, 主要从事植物病原真菌学研究; E-mail: xbzhang@njau.edu.cn

第一作者: 张正光(1972-), 男, 湖南邵阳人, 讲师, 博士, 主要从事植物和病原菌互作研究。

细胞膜或其它细胞组分中的受体分子结合,诱导植物在病原侵染点或及其附近组织发生过敏性细胞坏死反应,并通过 SA 和  $H_2O_2$  等信号分子的传导使整株植物产生系统获得抗病性<sup>[1]</sup>。在过去 20 年,关于激发子诱导植物系统获得抗病性的分子机制已经进行了大量的研究,但是最近几年,不少研究者发现许多激发子可能同时具有双重功能,在病原菌对其寄主植物的致病过程中可以行使毒性因子的作用,参与了病原菌的致病过程,但是这方面的研究还非常少<sup>[2]</sup>。而这方面的研究对全面认识激发子这一类特殊病原分子的生物学意义具有重要价值,也可以为了解病原菌的致病机理提供新的线索,为植物病害的控制提供理论指导<sup>[2,3]</sup>。

疫霉 90 kD 蛋白激发子 PB90 是本研究室最近从棉疫病菌 (*Phytophthora boehmeriae*) 中纯化的一种新型的疫霉蛋白激发子,可诱发非寄主烟草和小白菜的过敏反应,并产生对多种卵菌、真菌、细菌和病毒病的系统获得抗性<sup>[4,5]</sup>,目前已经证明了该激发子可以诱导植物防卫反应中苯丙氨酸转氨酶活性的提高和 PR 基因的表达<sup>[6]</sup>,且  $H_2O_2$  参与了该激发子诱发烟草的 HR 和 SAR<sup>[7]</sup>,而 SA 与该激发子诱发的过敏反应无关,但参与其诱发的系统获得抗性(另文发表)。该激发子在棉疫病菌与棉花的亲和合作中的作用仍不清楚。本文在对该激发子进行细胞化学定位的基础上,进一步对抗体包埋处理过的棉疫病菌游动孢子与棉花互作进行研究,旨在了解该激发子在亲和互作中的作用,为进一步澄清 PB90 对棉疫病菌的生物学意义提供试验证据,为最终揭示植物与卵菌亲和与非亲和相互作用的分子机制提供线索。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试棉疫病菌激发子 PB90 抗血清的准备

棉疫病菌菌株 JX9 分泌的激发子 PB90 及其抗血清由本实验室提供。

### 1.2 供试植物

烟草 (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc) 和棉花 (*Gossypium arboreum* L.) 品种中棉 12, 参照张正光等<sup>[8]</sup>的方法种植,用 Hoagland 完全营养液每周喷施 2 次,每天早晚浇水,待烟苗长至 3 片完全伸展的叶片和棉苗子叶展开时,供试验用。

### 1.3 激发子 PB90 的组织化学定位

将纯化的 PB90 蛋白分 3 次注射兔子,每次 20  $\mu\text{g}$ , 间隔 10 d, 在第三次注射 2 个星期后,收集抗血清,抗体效价为 1 000 倍,用于对 PB90 进行免疫细胞化学定位。胶体金探针的制备以及免疫电镜标记方法参照 Wang 等<sup>[5]</sup>的方法。

### 1.4 供试菌株游动孢子的产生

参照郑小波<sup>[8]</sup>的方法。供试菌株 JX9 在 LBA 平板上生长 3 d 后,从菌落边缘切取 10 块左右的 10 mm × 10 mm × 2 mm 大小的菌丝块,移植于 10% V8 培养液中,25℃ 黑暗下静置培养 2 ~ 3 d,倒去培养液,换上灭菌水,以后每隔 12 h 换 1 次灭菌水直至大量孢子囊形成。

将盛有大量孢子囊的培养皿放入 4℃ 冰箱中,15 min 后取出,置 25℃ 下 30 min,可见大量游动孢子释放,调节游动孢子至  $10^5$  个 · mL<sup>-1</sup>。

### 1.5 游动孢子与植物互作测定

取 20  $\mu\text{L}$  游动孢子液与 0.2  $\mu\text{L}$  激发子 PB90 的抗血清混合,在室温下静置 10 min,参照张正光等<sup>[9]</sup>的方法用去针头的注射器分别注射烟叶和棉花子叶。以未经抗体处理的游动孢子液和抗血清作为对照。每次处理 5 株植物,每株植物分别处理 2 个点,每点注射 20  $\mu\text{L}$ 。试验重复 3 次。注射后 3 d 观察结果。

### 1.6 抗血清对游动孢子萌发的影响

以 0.2、0.5 和 1.0  $\mu\text{L}$  的激发子 PB90 的抗血清分别与 100  $\mu\text{L}$  游动孢子液混匀后,置于灭菌的投影胶片上,25℃ 黑暗保湿培养 18 h 后在显微镜下计测孢子萌发率。每处理设 4 个重复。以灭菌水处理诱导孢子作对照。试验重复 1 次。

### 1.7 抗血清对游动孢子成株的影响

以 0.2、0.5 和 1.0  $\mu\text{L}$  的激发子 PB90 的抗血清分别与 100  $\mu\text{L}$  游动孢子液混匀静置 10 min,之后涂布于含青霉素、利福平和五氯硝基苯各 50  $\mu\text{g}$  · mL<sup>-1</sup> 的 0.2% V8 水琼脂培养基平板上,置 25℃ 黑暗培养 18 h,在显微镜下切取带有单个已萌发游动孢子的琼脂块置于选择性培养基(含青霉素、利福平和五氯硝基苯各 50  $\mu\text{g}$  · mL<sup>-1</sup> 的 LBA) 平板上建立单游动孢子群体,每一处理分别切取 100 个

带有单个已萌发游动孢子的琼脂块。在 25℃ 黑暗下培养 2~3 d 后,观察游动孢子的成株率。试验重复 1 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 棉疫病菌蛋白激发子 PB90 的免疫细胞化学定位

将在 V8 汁液体培养基和在 LB 固体培养基上培养的棉疫病菌菌株 JX9 进行 PB90 的胶体金标记,如图 1 所示。在液体培养菌丝体上,蛋白激发子 PB90 特异性地定位于病菌菌丝体的细胞壁上,而在细胞内其它组分中没有激发子的特异性分布;在固体培养基上,除了在菌丝细胞壁上可见大量特异性分布的蛋白激发子外,在菌丝体周围的培养基内也存在部分激发子,这些激发子蛋白可能是菌丝的外泌蛋白。结果表明,PB90 分布在棉疫病菌的细胞壁上。由于细胞壁最先参与病原菌与植物相互作用,而纯化的 PB90 可以单独诱导非寄主烟草的系统获得抗病性,因此在与烟草互作中,PB90 可能被植物作为一种信号分子进行分子识别;但是由于该蛋白存在于胞壁上,而且在病原菌的正常生长中可以分泌到胞外,因此其在棉疫病菌生长发育和致病中的作用就值得深入研究。



Fig. 1 Immunocytolocalization of PB90 in the mycelium of *Phytophthora boehmeriae* grown in vitro

A in liquid culture, note gold particles associated with the fungal cell wall (CW); B in solid medium, gold particles were observed not only in cell wall, but also secreted into the solid medium near the hyphae (30 000 ×). CW: Cell wall.

### 2.2 PB90 蛋白抗体对棉疫病菌游动孢子诱导烟草过敏性反应能力的影响

由于纯化的 PB90 蛋白激发子可以诱导非寄主烟草的过敏性反应和系统获得抗性,为了澄清 PB90 是否是棉疫病菌与烟草的非亲和互作中惟一

的病原菌激发子,将 PB90 蛋白激发子的特异性抗血清处理病菌的游动孢子液,然后注射供试的烟草叶片。结果表明,经抗血清处理过的游动孢子和未处理的游动孢子与激发子 PB90 具有相同作用,在处理 24 h 就能诱导非寄主烟草产生明显的过敏反应(图 2),而抗血清不能诱导过敏反应(图中未显示)。表明该激发子蛋白的抗血清对棉疫病菌游动孢子诱导非寄主的过敏反应没有影响,推测在棉疫病菌与烟草的非亲和互作中,PB90 并非惟一的病原菌激发子。提示可能有多种激发子参与诱导非寄主烟草的过敏性反应。



Fig. 2 Effect of antiserum against protein elicitor PB90 on HR-inducing in tobacco of *P. boehmeriae*

A: Zoospores treated by antiserum against protein elicitor PB90; B: CK

### 2.3 PB90 蛋白抗体对棉疫病菌游动孢子萌发和游动孢子成株的影响

由于 PB90 定位于病原菌的细胞壁上,因此 PB90 的抗体可以特异性封闭该蛋白。为了分析 PB90 在棉疫病菌正常生长发育中的作用,首先在每 100 μL 游动孢子液分别经 1.0、0.5 和 0.2 μL 的抗血清处理后,测定休眠孢子的萌发率。结果表明,经不同浓度的特异性抗体包埋处理后,游动孢子萌发率并不下降,与对照相比反而略有升高(表 1)。此外经抗血清处理过的游动孢子萌发后,其芽管生长出的菌丝是对照 2 倍以上(图 3)。表明该蛋白激发子的抗血清对棉疫病菌游动孢子的萌发没有抑制作用,抗血清中存在的多种营养成分可能对病原菌游动孢子的萌发和芽管的伸长具有促进作用。

疫霉菌的游动孢子萌发后,只有不断从周围环境中吸收营养,产生的芽管才能不断分枝,最终形

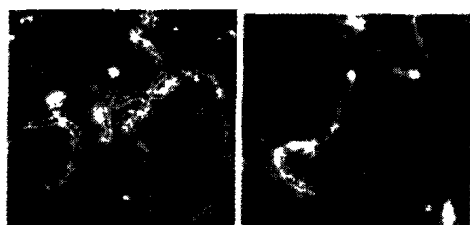


Fig. 3 Effect of antiserum against protein elicitor PB90 on zoospore germination of *P. boehmeriae*

A: Zoospores treated by antiserum against protein elicitor PB90; B: CK

成菌落。为了了解作为一种细胞壁蛋白, PB90 是否在病菌的营养吸收或生长发育过程中具有作用, 本研究进一步用 PB90 蛋白的特异性抗体包埋处理病菌的游动孢子, 测定萌发后游动孢子的成株能力。结果表明病菌的游动孢子经抗血清处理 10 min 后, 超过 80% 的单游动孢子均能形成菌落, 抗血清处理与对照之间没有显著差别(表1)。表明该蛋白激发子的抗血清对游动孢子的成株没有抑制作用。

Table 1 Effects of antiserum against protein elicitor PB90 on zoospore germination creation of effective single zoospore isolates of *P. boehmeriae*

Treatment ( $\mu\text{L}$ antiserum/100 $\mu\text{L}$ zoospore )	Germination rate* (%)	Number of creating effective single
CK	63.4 $\pm$ 3.1 A	84
1.0	73.6 $\pm$ 6.1 B	90
0.5	75.4 $\pm$ 3.4 B	82
0.2	75.0 $\pm$ 4.5 B	86

\* The germination rate followed by the same letter is not significantly different at 0.01 level according to Duncan's new multiple range test.

#### 2.4 抗血清对棉疫病菌致病性的影响

用经激发子 PB90 的抗血清处理过的游动孢子注射供试棉花子叶, 2 d 后观察的结果发现, 经抗血清处理过的游动孢子注射的 30 片棉花子叶中只有 5 片子叶发病(图4)。表明该激发子蛋白的抗血清对棉疫病菌游动孢子诱导非寄主的过敏反

应尽管没有影响, 但是此抗血清对棉疫病菌游动孢子的致病力有影响。提示抗血清可能与游动孢子表面的蛋白激发子 PB90 结合, 从而导致该菌致病力的下降。部分子叶发病可能是因为棉疫病菌还存在其它的毒性因子参与该菌与棉花的亲互作。



Fig. 4 Effect of antiserum against protein elicitor PB90 on virulence in cotton of *P. boehmeriae*

A: Zoospores treated by antiserum against protein elicitor PB90; B: CK

### 3 结论与讨论

本文首次证明了棉疫病菌蛋白激发子 PB90 可能是病原菌分泌的一种重要的病原分子, 尽管该分子在病原菌离体培养条件下生长时并不起决定作用, 但是在棉疫病菌侵染棉花过程中, 该蛋白是一种重要的毒性因子; 此外尽管该纯化的激发子可以独立诱导非寄主烟草的过敏反应, 但是在棉疫病菌与烟草的非亲和互作中可能还存在其它可以诱导烟草过敏性反应的激发子。

迄今已从植物病原病毒、细菌、真菌和卵菌均克隆到无毒基因, 对部分无毒基因的编码产物在病原菌与植物互作中的作用进行研究, 发现无毒基因在互作中具有双重功能, 即在非亲和互作中作为无毒因子激发非亲和寄主的过敏反应和系统抗病性, 在亲和互作中充当毒性因子调控病原菌对植物的致病性<sup>[2]</sup>。avrPto 编码的无毒蛋白 AvrPto 作为无毒因子激发携带抗病基因 *Pto* 的番茄对 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* 的抗病性<sup>[10]</sup>; Chang 等<sup>[11]</sup>发现携带 *avrPto* 的菌株比不携带该基因的菌株对不含 *Pto* 番茄的致病力更强, 认为 AvrPto 在此亲和互作中可能行使毒性因子的功能。植物病原细菌的其它一些无毒基因如 *P. s.* pv. *tomato* 的 *avrE* 和 *avrRpt2*、*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* 的 *avrBs2*、*X. oryzae* pv. *oryzae* 的 *Xa7* 等同样地在相应病原菌菌株的致病性和无毒中具有双重作用<sup>[12]</sup>。在已克隆的植物病原真菌和卵菌

的无毒基因中,番茄叶霉病菌 (*Cladosporium fulvum*) 的无毒蛋白 ECP2 是一个重要的毒性因子,该基因突变的菌株菌丝的生长、分生孢子的产生均不如野生型菌株<sup>[12]</sup>;该无毒蛋白可诱发非寄主植物烟草和含有 *Cf-ECP2* 抗病基因番茄的过敏反应<sup>[13]</sup>。疫霉菌能产生多种激发子,不同激发子在病原菌和植物互作中的作用有差异。马铃薯晚疫病病菌 (*Phytophthora infestans*) 分泌的 10 kD 的 elicitin 充当无毒因子调控烟草对 *P. infestans* 的非寄主抗性<sup>[14]</sup>,而在亲和互作中该激发子作为载体从植物中运输甾醇维持疫霉菌生长发育<sup>[15, 16]</sup>。大豆疫霉 (*Phytophthora sojae*) 的胞壁糖蛋白激发子 Pep-13 不仅能诱发非寄主欧芹的 HR,而且具有谷氨酰胺转氨酶活性<sup>[17]</sup>。*Phytophthora nicotianae* 的胞壁糖蛋白激发子 CEBL 可诱发植物的 HR;该蛋白基因被反义抑制后虽然菌丝的附着能力下降,但这些菌株保持与野生型相同的特性既可诱发非亲和烟草的过敏反应又可侵染亲和的烟草<sup>[18]</sup>。迄今为止尚未发现疫霉菌激发子可以在亲和互作中充当毒性因子。蛋白激发子 PB90 是棉疫病病菌分泌的一种新型的疫霉蛋白激发子,作为无毒因子激发非寄主烟草的过敏反应和系统获得抗性<sup>[4]</sup>。本研究采用免疫胶体金标记法观察到该激发子除了分泌到胞外之外,还有相当部分与疫霉菌胞壁糖蛋白激发子 Pep-13 和 CEBL 一样滞留在细胞壁上(图 1)。该激发子的抗血清对棉疫病病菌游动孢子的萌发及萌发后的成株没有抑制作用(表 1 和图 3),但是经抗血清处理后的游动孢子在棉花子叶上的致病力丧失(图 4)。其原因可能是,休止的游动孢子细胞壁上的激发子蛋白与其抗血清结合使激发子蛋白与棉花中的受体不能正常识别,从而导致棉疫病病菌致病力的丧失。提示蛋白激发子 PB90 在该病原菌和棉花的亲合互作中可能是一个重要的毒性因子。试验中观察到经抗血清处理过的游动孢子仍能诱发非寄主烟草的过敏反应,且偶尔观察到处理过的游动孢子能引起棉花子叶发病,其原因可能是除了蛋白激发子 PB90 作为无毒因子外,还有其它的无毒因子调控棉疫病病菌对棉花的致病性和对非寄主烟草的无毒性。

致谢: 浙江大学生物技术研究所的胡东维博士和植物保护学院植保 92 班的武晓敏同学在试验过程中提供了帮助,谨以感谢!

## 参考文献

- [1] Hammond-Kosack K E, Jones J D G. Resistance gene-dependent plant defense response [J]. *Plant Cell*, 1996, 8(10): 1773–1791.
- [2] van't Slot K A E, Knogge W. A dual role for microbial pathogen-derived effector proteins in plant disease and resistance [J]. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2002, 21(3): 229–271.
- [3] White F F, Yang B, Johnson L B. Prospects for understanding avirulence gene function [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2000, 3(4): 291–298.
- [4] 张正光, 王源超, 郑小波. 一种新的 90 kD 胞外蛋白激发子诱导烟草系统获得抗性研究[J]. *植物病理学报*, 2002, 32(4): 338–346.
- [5] Wang Y C, Hu D W, Zhang Z G, et al. Purification and immunocytolocalization of a novel elicitor inducing SAR in plants from *Phytophthora boehmeriae* [J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2003, 63(4): 223–232.
- [6] 张正光, 王源超, 郑小波. 棉疫病病菌 90 kD 胞外蛋白激发子诱导烟草过敏反应的研究[J]. *植物病理学报*, 2003, 33(1): 72–76.
- [7] 王源超, 张正光, 李俊, 等.  $H_2O_2$  参与棉疫病病菌 90 kD 蛋白激发子诱导的烟草过敏反应和系统获得抗性[J]. *植物生理与分子生物学学报*, 2003, 29(3): 185–191.
- [8] 郑小波. 疫霉菌及其研究技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997. 85–86.
- [9] 张正光, 王源超, 郑小波. 棉疫病病菌 90 kD 胞外蛋白激发子生物活性与稳定性研究[J]. *植物病理学报*, 2001, 31(3): 213–218.
- [10] van der Biezen E A, Jones J D G. Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept [J]. *Trends in Biochemical Science*, 1998, 23(11): 454–456.
- [11] Chang J H, Rathjen J P, Bernal A J, et al. *avrPto* enhances growth and necrosis caused by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in tomato lines lacking either *Pto* or *Prf* [J]. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 2000, 13(5): 568–571.
- [12] Lauge R, Joosten M H A J, van den Ackerveken G F J M, et al. The in planta-produced extracellular proteins ECP1 and ECP2 of *Cladosporium fulvum* are virulence factors [J]. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 1997, 10(8): 725–734.
- [13] Lauge R, Joosten M H A J, Haanstra J P W, et al. Successful search for a resistance gene in tomato targeted against a virulence factor of a fungal pathogen [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95(15): 9014–

- 9018.
- [14] Kamoun S, van West P, Vleeshouwers V G A A, *et al.* Resistance of *Nicotiana benthamiana* to *Phytophthora infestans* is mediated by the recognition of the elicitor protein INF1 [J]. *Plant Cell*, 1998, 10(9): 1413 – 1425.
- [15] Osman H, Vauthrin S, Mikes V, *et al.* Mediation of elicitor activity on tobacco is assumed by elicitor-sterol complexes [J]. *Mol. Biol. Cell*, 2001, 12(9): 2825 – 2834.
- [16] Osman H, Mikes V, Milat M L, *et al.* Fatty acids bind to the fungal elicitor cryptogin and compete with sterols [J]. *FEBS Lett.*, 2001, 489(1): 55 – 58.
- [17] Brunner F, Rosahl S, Lee J, *et al.* Pep-13, a plant defense-inducing pathogen-associated pattern from *Phytophthora* transglutaminases [J]. *The EMBO Journal*, 2002, 21(64): 6681 – 6688.
- [18] Gaulin E, Jauneau A, Villalba F, *et al.* The CBEL glycoprotein of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* is involved in cell wall deposition and adhesion to cellulosic substrates [J]. *Journal of Cell Science*, 2002, 115(23): 4565 – 4575.

责任编辑:杨晓昱