

文章编号: 0412-0914(2001)03-0213-06

棉疫病菌 90 kD 胞外蛋白激发子 生物活性与稳定性研究

张正光, 王源超, 郑小波

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

摘要: 对棉疫病菌(*Phytophthora boehmeriae* Saw.) 90 kD 胞外蛋白激发子的生物活性与稳定性进行了研究。用不同浓度的激发子处理烟叶测定其诱发过敏反应的有效浓度, 结果是所测定的 0.5~100 nmol/L 各浓度均可诱发过敏反应, 但 100 pmol/L 不能诱发过敏反应, 表明该激发子诱导烟草产生过敏反应的最低有效浓度在 100 pmol/L~0.5 nmol/L 之间。该激发子可诱导不同烟草(*Nicotiana tabacum* L.) 品种产生过敏反应, 但不能诱导辣椒(*Capsicum annuum* L.) 和茄子(*Solanum melongena* L.) 等茄科作物及棉花(*Gossypium arboreum* Linn.) 发生过敏反应, 初步表明该激发子诱导植物发生过敏反应具有一定的专化性。以 10 nmol/L 激发子溶液处理烟叶后分别于第 0、24、48 和 72 h 接种烟草疫霉(*Phytophthora nicotianae*), 结果证明该激发子可以诱导烟草产生抗性反应, 其抗性以处理后立即接种烟草疫霉为最强, 接种后 48 h 防效达 68%, 以后随时间的延长逐渐减弱。激发子分别经 pH 值 2~14 的水溶液 25℃ 处理 30 min, 或分别经 4、25、60 和 100℃ 处理 5 min 仍能诱发过敏反应, 但是经蛋白酶 K 处理后不能诱发过敏反应。表明该激发子对酸、碱和温度不敏感, 但对蛋白酶 K 敏感。

关键词: 棉疫病菌; 90 kD 蛋白激发子; 生物活性; 稳定性

中图分类号: S432.2

文献标识码: A

BIOACTIVITY AND STABILITY OF 90 kD EXTRACELLULAR PROTEIN ELICITOR FROM *Phytophthora boehmeriae*

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,
Dept. of Plant Protection, Nanjing Agric. Univ., Nanjing 210095, China)

Abstract: Bioactivity and stability of purified 90 kD extracellular elicitor protein from *Phytophthora boehmeriae* were studied. The elicitor could induce hypersensitive responses (HR) on tobacco leaves at different doses ranging from 0.5 nmol/L to 100 nmol/L but not at 100 pmol/L, which indicated that the minimal efficient dosage of inducing HR on tobacco was between 100 pmol/L and 0.5 nmol/L. The elicitor could also induce HR on other cultivars of *Nicotiana tabacum* but not on other Solanaceae (eggplant and pepper) or on cotton (*Gossypium arboreum*),

收稿日期: 2000-04-18; **修回日期:** 2000-11-19

基金项目: 国家自然科学基金(39970478); 教育部跨世纪优秀人才培养计划基金资助

作者简介: 张正光(1972--), 男, 湖南新邵县人, 南京农业大学植保系博士生, 主要从事真菌遗传与分子生物学及病原菌与植物互作研究。

which suggested that this 90 kD elicitor was host-specific. When the 90 kD elicitor was infiltrated into the tobacco leaves, it could induce the systemic acquired resistance (10%~68%) to *P. nicotianae* that was inoculated on the tobacco stem. The highest level of induced resistance was acquired when tobacco stems were inoculated immediately after its leaves being treated with elicitor at different pH (pH2-pH14) for 30 minutes or at different temperature (4°C, 25°C, 60°C, 100°C) for 5 minutes, the elicitor could maintain its activity of inducing HR. However, the treatment with proteinase K could cause the loss of its ability of inducing HR in tobacco. Results showed that the elicitor was not sensitive to acid, alkali or temperature, but was sensitive to proteinase K.

Key words: *Phytophthora boehmeriae*; elicitor; bioactivity; stability

植物与病原菌非亲和互作常引起植物发生一系列复杂的生化反应,最终导致植物对某些病原菌产生抗性,即获得抗性(acquired resistance),这种抗性表现为局部的即离处理点很近的部位或远距离的系统抗性^[1]。由于一些激发子能模拟非亲和互作中病原菌与植物的相互作用,诱导植物产生防卫反应,因此开展病原菌激发子的研究对认识植物与病原菌非亲和互作的分子机理具有重要意义。

疫霉菌产生的已知激发子可以分为寡糖、糖蛋白和蛋白 3 大类。大雄疫霉(*P. megasperma*)的细胞壁中存在 2 类激发子,一种是带分枝的 β -葡聚糖(β -glucan)^[2],能诱导大豆子叶中植保素积累;另一种是分子量为 42 kD 的糖蛋白^[3,4],对欧芹细胞具激发子活性。除上述 2 类激发子外,疫霉菌还可以分泌一类称为 elicitin 的蛋白激发子^[5,6],分子量约为 10 kD,可引起茄科和部分十字花科植物的过敏性坏死反应。不少学者证明 elicitin 是一种专化性的激发子,可诱导植物产生对卵菌、真菌、细菌和病毒的系统获得抗性(SAR)。Kamoun 等^[7]最近证明了对 elicitin 的识别决定了烟草对马铃薯晚疫病病菌(*P. infestans*)的非寄主抗性。

最近,王源超从棉疫病病菌 *Phytophthora boehmeriae* 培养滤液中首次纯化出一种分子量为 90 kD 的蛋白质,该蛋白具有激发子功能,可诱导烟草产生过敏反应。本文对该蛋白激发子的生物活性、诱导植物过敏反应的专化性与诱导烟草对黑胫病的抗性及其稳定性进行研究,旨在进一步了解该激发子的基本特性。

1 材料与方法

1.1 供试棉疫病病菌 90 kD 胞外蛋白激发子的提纯

90 kD 蛋白激发子从棉疫病病菌 *P. boehmeriae* 培养滤液中提纯。参照 Kamoun 等的方法^[5]获得无菌滤液,往滤液中按每 100 ml 加 70 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 置 4°C 沉淀过夜,12 000 g 4°C 离心 20 min,得沉淀,沉淀溶于 10 mmol/L Tris, Cl (pH7.4) 中,即为 *P. boehmeriae* 的胞外粗蛋白液。粗蛋白液经 30 kD mili-Q (Bio-RAD) 收集分子量大于 30 kD 的蛋白溶液。溶液再过 sepharose PHEHP 柱 (Bio-RAD) 洗脱,洗脱液过离子交换柱 30Q (Bio-RAD) 收集洗脱液,洗脱液再过 sepharose PHEHP 柱 (Bio-RAD) 洗脱收集活性峰即为所纯化的蛋白,SDS-PAGE 电泳测定分子量为 90 kD (蛋白纯化具体方法及基因克隆另文发表)。提纯蛋白激发子母液 (1 000 nmol/L) 保存于低温冰箱中 (-30°C)。

1.2 90 kD 蛋白激发子的生物活性

1.2.1 供试植物 包括烟草(*Nicotiana tabacum* L.)品种 TOY、W38、三生烟和普通烟,辣椒(*Capsicum annuum* L.)品种湘研 1 号,茄子(*Solanum melongena* L.)品种 89064(湖南农科院提供)和棉花(*Gossypium arboreum* Linn.)品种中棉 12。上述供试植物的种子经 1% 赤霉素溶液 28℃ 温汤浸种后置生长箱内(28℃)催芽露白,播入盛有灭菌蛭石的塑料箱内,置温室内培育(25~28℃,14 h 光照与 10 h 黑暗交替)。待小苗长至 3 叶期移栽入底部打孔的塑料杯内,用 Hoagland 完全营养液^[8]每周喷施 2 次,每天早晚浇水,待苗长至 5~6 叶时,供试验用。

1.2.2 不同植物上的过敏性反应测定 用灭菌的缓冲液(10 mmol/L Tris, Cl, pH7.0)将激发子蛋白稀释成所需蛋白浓度,用去针头的注射器从供试植物叶片背面主脉一侧的两侧脉之间(图 1)将蛋白溶液注射入叶组织内至水渍状斑直径约 1 cm。每处理设 2 个重复。在其相对的一侧注射灭菌的缓冲液作为对照。处理后的植物置温室(25~28℃)培养,48 h 后观察试验结果。若注射部位在 48 h 内变为褐色枯斑,记载为过敏反应。试验重复 2 次。

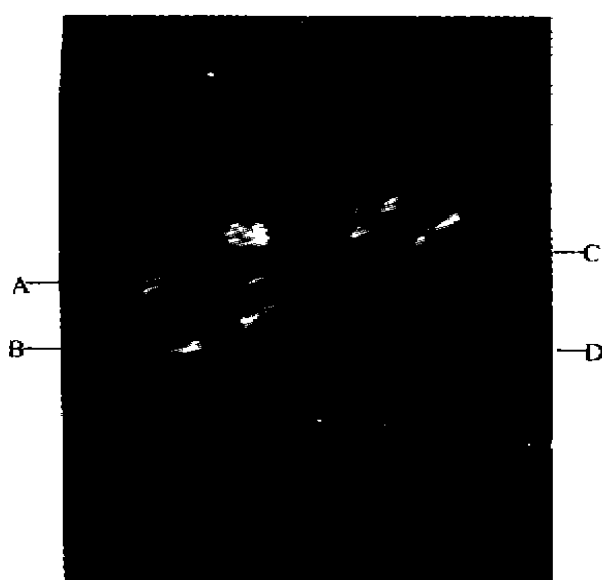


图 1 棉疫病菌 90 kD 蛋白激发子经不同温度和蛋白酶 K 处理后在烟草叶片上诱导产生的过敏反应结果

Fig. 1 Hypersensitive response induced by *Phytophthora boehmeriae* 90 kD protein elicitor after treated with different temperature and proteinase K

A, B 和 C 分别为激发子经 25、60、100℃ 处理, D 为蛋白酶 K 处理。

A, B and C, Elicitor was treated at 25, 60, 100℃, respectively; D, Elicitor was treated by proteinase K.

1.2.3 对烟草疫霉的诱导抗性测定 供试烟草疫霉 *P. nicotianae* 菌株 YC02010 在 LBA 培养基^[9]平板上培养 3 d(25℃、黑暗)供接种烟草(品种 W38)使用。将蛋白激发子按 1.2.2 的方法注射烟苗(70 d 龄)的第 2 片真叶,每叶片基部主脉两侧各注射一个点,每点注射 10 nmol/L 的激发子蛋白溶液 10 μ l。注射后立即接种或在注射后 24、48、72 h 接种烟草疫霉。用灭菌的解剖刀取大小为 5 mm \times 5 mm 菌丝块,贴于用昆虫针刺伤的烟草茎表面,接种部位用脱脂棉蘸灭菌水覆盖,再用锡箔纸覆盖脱脂棉保湿。接种部位位于离处理叶片叶腋上部 20 mm 处。每菌株接种 3 株烟草。以灭菌的缓冲液作对照。接种后的烟苗置温室内培养,24 h 去除锡箔纸和脱脂棉。每天早、晚浇水保湿。试验重复 1 次。接种后 48 h 开始记录病斑长度,以后每天记录 1 次,共记录 5 次,分别计算出诱抗效果。诱抗效果=[(对照病斑长度-处理病斑长度)/对照病斑长度] \times 100%。

1.3 90 kD 蛋白激发子的稳定性

1.3.1 不同温度对激发子生物活性的影响 将蛋白激发子稀释成 10 nmol/L, 在 4、25、60 和 100℃ 条件下分别处理 5 min, 冷却至室温后分别注射处理烟草品种 W38 叶片。以灭菌的缓冲液和未经处理的蛋白激发子作为对照。

1.3.2 不同 pH 值对激发子生物活性的影响 用 HCl 和 NaOH(均为分析纯)调节灭菌的缓冲液成 pH 值分别为 2、3、4、5……14 等 13 种溶液, 分别取上述各溶液将蛋白激发子稀释至 10 nmol/L, 25℃ 处理 30 min 后分别注射处理烟草品种 W38 叶片。以上述 13 种不同 pH 值的溶液作为对照处理烟叶。

1.3.3 蛋白酶 K 对激发子生物活性的影响 取 1 μl 蛋白激发子与 0.5 μl 蛋白酶 K(20 μg/μl 和 5 μl 灭菌的缓冲液混合, 在 60℃ 下水浴 1 h 后加灭菌的缓冲液定容至 100 μl, 注射烟草品种 W38 叶片。以未经蛋白酶 K 处理的蛋白激发子在 60℃ 水浴 1 h 定容至 100 μl 的溶液作为对照。

2 结果与分析

2.1 90 kD 蛋白激发子诱导过敏反应的有效浓度

用灭菌的缓冲液将蛋白激发子稀释成 100、10、2、1、0.5 nmol/L 和 100 pmol/L 溶液, 分别测定注射烟草品种 TOY 叶片。结果是, 100、10、2、1 和 0.5 nmol/L 等 5 种稀释的激发子溶液在 16~48 h 内均能使烟叶产生褐色的枯斑, 而 100 pmol/L 蛋白溶液和灭菌缓冲液对照均不能诱导烟叶产生过敏性枯斑。表明 90 kD 蛋白激发子诱导供试烟草叶片产生过敏反应的最低浓度处于 100 pmol/L 至 0.5 nmol/L 之间。

2.2 90 kD 蛋白激发子诱导植物产生过敏反应的专化性

将 10 nmol/L 蛋白激发子稀释液分别注射供试的 7 种植物叶片, 48 h 观察。结果是, 蛋白激发子能诱导 4 个供试烟草品种产生过敏反应, 且产生的枯斑大小没有明显的差异, 而在茄科植物的辣椒和茄子及大戟科的中棉 12 的叶片上均不能诱导产生过敏反应。表明该蛋白激发子诱导过敏反应具有一定的专化性。

2.3 蛋白激发子对烟草疫霉的诱导抗性测定

将 10 nmol/L 激发子注射烟草叶片后在基部接种烟草疫霉菌丝块, 各处理均可诱导烟草对烟草疫霉产生一定水平的抗性, 其中以激发子处理后立即接种病菌的处理表现的诱导抗性水平最高, 48 h 的诱抗效果达 68.2%, 激发子注射后延迟接种的处理中, 随着接种时间的推迟诱导水平下降(图 2, 图 3)。

2.4 pH 值、温度和蛋白酶 K 对 90 kD 蛋白激发子生物活性的影响

蛋白激发子经 4、25、60 和 100℃ 处理 5 min 或经 13 种不同 pH 值的缓冲液处理 30 min 后注射烟叶均能诱导烟草叶片发生过敏反应, 且与经处理的激发子没有差异, 而对照均未出现坏死斑。表明该蛋白激发子具有较强的耐热性而且对 pH 值变化的不敏感。

蛋白酶 K 处理后激发子不能诱导烟叶发生过敏反应, 而对照处理诱导烟叶产生了过敏反应(图 1)。表明该激发子对蛋白酶 K 敏感。

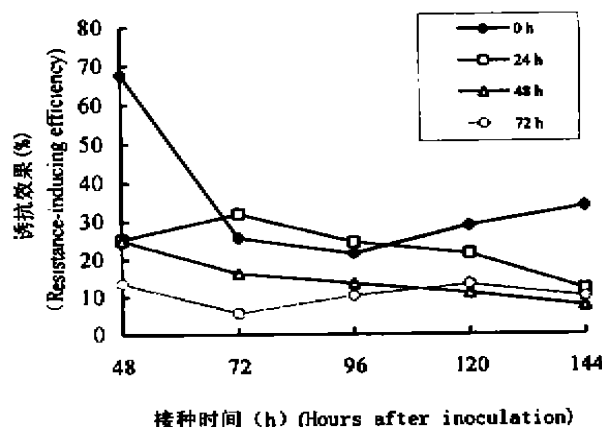


图 2 90 kD 蛋白激发子处理烟草对烟草疫霉的诱抗效果

Fig. 2 Induced resistance to the tobacco pathogen *phytophthora nicotianae* by 90 kD protein elicitor from *P. boehmeriae*

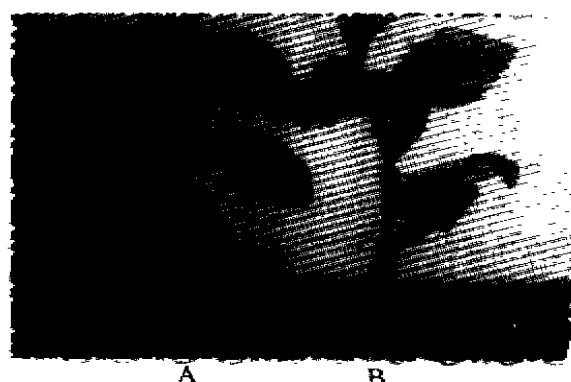


图 3 90 kD 激发子处理烟草 0 时刻接种疫霉菌的诱抗效果

Fig. 3 Induced resistance to the tobacco pathogen *Phytophthora nicotianae* by 90 kD protein elicitor from *P. boehmeriae*

A 和 B 分别为对照和激发子处理。

A and B was treated by buifer and elicitor.

3 结论与讨论

不同激发子诱导烟草产生过敏反应的最低有效浓度有差异,细菌产生的 harpins 的最低剂量是 $0.5 \mu\text{mol/L}$ ^[10],疫霉菌产生的 elicitin (分子量 10 kD 的蛋白)最低剂量是 $10 \sim 50 \text{ nmol/L}$ ^[5]。而本研究中的激发子只需 0.5 nmol/L 就足以诱导烟草产生过敏反应,其诱导过敏反应的最低剂量比 elicitin 低 20~100 倍,比 harpins 低 1 000 倍。提示烟草细胞中可能存在一种特异性的受体来接收 90 kD 激发子产生的信号。

关于疫霉菌蛋白类激发子诱导植物过敏反应的专化性有不少报道。多数研究者认为疫霉菌分泌的 10 kD 的胞外蛋白 elicitin 具有一定程度的专化性。Kamoun 等^[5]测定烟草疫霉(*P. parasitica*)和隐地疫霉(*P. cryptogea*)产生的 elicitin 诱导植物过敏反应时发现,烟草(除 *Nicotiana sylvestris* 外)、许多萝卜品种和一个芜菁品系对 elicitin 有明显反应,而蚕豆、马铃薯、辣椒和番茄等植物对 elicitin 没有反应,认为 elicitin 具有一定的专化性。*P. infestans* 产生的 elicitin 也具有专化性,只能诱导烟草产生过敏反应,对龙葵、马铃薯等茄属没有作用^[11]。Pernollet 等^[12]证明疫霉菌产生的 elicitin 可引起所有茄科植物的坏死反应,认为 elicitin 可能是一类非专化性毒素。本研究中棉疫病菌 90 kD 蛋白激发子在 4 种供试植物上只能诱导模式植物烟草产生过敏反应,而对茄科的辣椒、茄子均不能诱发过敏反应,表明该激发子在诱导过敏反应的专化性上与 *P. infestans* 的 elicitin 相似。

植物的过敏反应通常能诱导植物获得抗性。疫霉菌激发子引起过敏反应后的诱抗作用已有不少报道。Ricci 等^[13]最先发现隐地疫霉和辣椒疫霉产生的 10 kD 蛋白激发子(Cryptogein 和 Capsicein)处理烟草后可诱导烟草对黑胫病产生抗性。Kamoun 等^[5]进一步证明,Cryptogein 预

处理烟草后第 3 d 挑战接种烟草疫霉可诱导烟草对烟草疫霉产生抗性。后来一些研究者发现 elicitin 还可诱导烟草对一些真菌、细菌和病毒产生系统获得抗性。本研究的 90 kD 蛋白激发子处理烟草后,表现出对黑胫病具有一定水平的抗性,而且这种抗性具有一定的系统性。表明激发子处理后迅速诱导植物的防卫系统发生反应。有关 90 kD 蛋白激发子是否能诱导烟草对其它病原菌的系统广谱抗性有待进一步研究。

90 kD 蛋白生物活性稳定性的测定结果表明酸、碱不敏感而对蛋白酶 K 敏感,表明酸、碱不能破坏其引起烟草产生过敏反应的活性基团,而蛋白酶 K 却可破坏其活性基团。提示起活性作用的基团可能不是氨基酸上的酸性基团和碱性基团,而是蛋白的多肽部分;同时提示,由于该激发子具有良好的耐热性和对酸、碱不敏感,有利于该激发子的开发和应用。

参 考 文 献

- [1] RYAL J A, NEUENSCHWANDER U H, WILLITS M G, *et al.* Systemic acquired resistance [J]. *Plant Cell*, 1996, 8: 1809-1819.
- [2] UMEMOTO N, KAKITANI M, IWAMATSU A, *et al.* The structure and function of a soybean β -glucan-elicitor binding protein [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94: 1029-1034.
- [3] 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.
- [4] LIGTERINK W, KROJ T, NIEDEN U Z, *et al.* Receptor-mediated activation of a MAP Kinase in pathogen defense of plants [J]. *Science*, 1997, 276: 2054-2057.
- [5] KAMOUN S, YOUNG M, GLASCOCK C B, *et al.* Extracellular protein elicitors from *Phytophthora*: host-specificity and induction of resistance to bacterial and fungal phytopathogens [J]. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 1993, 6: 15-25.
- [6] YU L M. Elicitins from *Phytophthora* and basic resistance in tobacco [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, 92: 4088-4094.
- [7] KAMOUN S, VAN WEST P, VLEESHOUWERS V, *et al.* Resistance of *Nicotiana benthamiana* to *Phytophthora infestans* is mediated by the recognition of the elicitor protein INF1 [J]. *Plant Cell*, 1998, 10: 1413-1425.
- [8] 西北农学院, 华南农业大学. 农业化学研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1980.
- [9] 王源超, 郑小波, 顾沁雪. 苾麻疫霉生长速率、菌落形态和同宗配合能力的遗传研究[J]. 南京农业大学学报, 1994, 17: 38-41.
- [10] BEER S V, WEI Z M, LABY R J, *et al.* Are harpins universal elicitors of the hypersensitive response of phytopathogenic bacteria? [A]. NESTER E W, VERMA D P S. *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions* [M]. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1993. 281-286.
- [11] KAMOUN S, WEST P V, JONG A J, *et al.* A gene encoding a protein elicitor of *Phytophthora infestans* is down-regulated during infection of potato [J]. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 1997, 10: 13-20.
- [12] PERNOLLET J C, SALLANTIN M, SALLE-TOURNE M, *et al.* Elicitin isoforms from seven *Phytophthora* species: comparison of their physico-chemical properties and toxicity to tobacco and other plant species [J]. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 1993, 42: 53-67.
- [13] RICCI P, BONNET P, HUET J 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.