

文章编号: 0412-0914(2002)04-0338-09

## 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

张正光, 王源超, 郑小波\*

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

**摘要:** 就棉疫病菌(*Phytophthora boehmeriae* Saw.) 培养滤液中提纯获得的 90 kD 胞外蛋白激发子诱发烟草系统获得抗性进行了研究。以 10 nmol/L 激发子溶液注射处理 Samsun NN 烟草叶片 24 h 后, 在处理叶片及其上、下各 2 片叶片接种 TMV, 结果是处理叶及其上、下各 2 片叶片上的枯斑数显著少于对照, 诱抗防效达 40.9%~53.1%; 接种 TMV 7 d 后处理叶片的枯斑平均直径为 1.23 mm, 显著小于对照叶片上的枯斑直径 2.97 mm, 但是处理叶片的上、下叶片上的枯斑平均直径与对照没有显著差别。以 10 nmol/L 激发子溶液注射处理 Samsun NN 烟草叶片分别立即接种或于 1、2、4、7、15 d 接种 TMV, 结果证明该激发子诱导烟草对 TMV 的抗性以处理后第 1 d 至第 4 d 接种为较好, 防效达 30.2%~50.4%; 处理后立即接种和第 7 d 接种 TMV 诱抗防效仅 4% 左右, 处理叶片上的枯斑数与对照没有显著差别, 表明较强的诱导抗性可持续时间 < 7 d。用不同浓度激发子处理烟叶, 所测定的 0.5~100 nmol/L 各浓度均可显著地诱发烟草对 TMV 产生获得抗性, 诱导抗性效果为 34.9%~58.2%, 诱导抗性效果随浓度的降低呈下降趋势。以 10 nmol/L 激发子溶液注射处理 W38 烟草叶片, 2 d 后分别注射接种烟草野火病菌(*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*) 菌液或喷雾接种烟草赤星病菌(*Alternaria alternata*) 分生孢子, 结果是, 注射接种烟草野火病菌 5 d 后处理叶片及其上、下叶片上的野火病病斑均显著小于对照; 处理叶片上的赤星病病斑数及病斑面积明显小于对照, 表明该激发子可诱导烟草对野火病和赤星病产生抗性。上述结果表明, 90 kD 蛋白激发子诱导烟草产生的获得抗性是一种典型的系统获得抗性, 该系统获得抗性对病原菌具广谱抗性。

**关键词:** 棉疫病菌; 90 kD 蛋白激发子; 烟草; 系统获得抗性

**中图分类号:** S432.2 **文献标识码:** A

### SYSTEMIC ACQUIRED RESISTANCE INDUCED BY A NEW KIND OF 90 kD EXTRACELLULAR ELICITOR PROTEIN

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:** Systemic acquired resistance to TMV, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* and *Alternaria alternata* in tobacco elicited by 90 kD extracellular elicitor protein, a hypersensitive

**收稿日期:** 2001-08-22; **修回日期:** 2001-12-27

**基金项目:** 国家自然科学基金(39800006); 教育部跨世纪优秀人才培养计划基金; 教育部科学技术研究重点项目(01098)

\* 联系人, Tel: (025)4395325; E-mail: xzheng@mail.njau.edu.cn

**作者简介:** 张正光(1972—), 男, 湖南新邵县人, 南京农业大学植保学院博士生, 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。

responses (HR) elicitor on tobacco leaves purified from the culture filtrate of *Phytophthora boehmeriae* was studied. Inoculation of TMV at 24 h after infiltration of tobacco leaves (cv. Samsun harboring N gene) with the elicitor at dosage of 10 nmol/L, resulted in fewer and smaller visible necrotic lesions on treated leaves than that on buffer-infiltrated ones. Fewer lesions were also observed on the 1st and 2nd upper or lower leaves of the elicitor-treated leaf on the same plant when TMV was inoculated, but the average diameter of necrotic lesion did not significantly differ from that of the control leaves. The reduction rates in lesion number were about 40.9%—53.1% and the induced resistance lasted for about seven days. All the dosages ranging from 0.5 to 100 nmol/L tested could trigger the resistance significantly and the resistance level (34.9%—58.2%) was positively correlated with the dosages used. Whereas, the elicitor only provided low level of induced resistance to TMV (4%) when the treated leaves were inoculated immediately or at seven day after elicitor applied. Similar induced resistance by elicitor protein against *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* and *A. alternata* was also found in this study. When inoculation with *P. syringae* pv. *tabaci* or *A. alternata* performed on tobacco plants (cv. W38) at 48 h after elicitor treatment, smaller or fewer lesions which significantly differed from the control were observed on treated leaves and their upper and lower non-elicitor-treated leaves. Results showed that the induced resistance of tobacco by 90 kD extracellular elicitor protein from *P. boehmeriae* was typically a systemic acquired resistance (SAR) characterized by systemicity, durability and a broad-spectrum, which indicated the 90 kD protein elicitor is a kind of natural specific trigger for SAR. Results also indicated an endogenous mobile signaling mechanism be elicited and functioned between treated leaves and their upper or lower non-elicitor-treated ones, where it induced strong responses without HR.

**Key words:** *Phytophthora boehmeriae*; 90 kD protein elicitor; tobacco; systemic acquired resistance

许多研究已证明植物体内存在一系列潜在的与抗病性有关的基因,在一定的条件下某些基因可以被诱导表达,从而使植物产生系统获得抗性(systemic acquired resistance, SAR)<sup>[1]</sup>;这一机制的利用可以达到既控制病害又减轻因防病大量施用杀菌剂而导致环境污染的目的。因此,近些年来该领域的研究已成为国内外植物病理学研究的前沿和热点。病原菌产生的激发子可诱导植物启动防卫系统从而产生获得抗性<sup>[2]</sup>。目前,美国 Eden 生物公司利用 *Erwinia* 细菌中的 *hrp* 基因的产物 harpin 激发子诱导植物获得抗病性的作用,成功地将 harpin 应用于农业生产中来防治多种植物病害。

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。其中一类称为 elicitin 的蛋白激发子,分子量约为 10 kD,可引起茄科和部分十字花科植物的过敏反应,同时可诱导植物产生对卵菌、真菌、细菌和病毒的 SAR。Kamoun 等<sup>[3]</sup>证明对 elicitin 的识别决定了烟草对马铃薯晚疫病菌(*Phytophthora infestans*)的非寄主抗性。

最近张正光等<sup>[4]</sup>报道从棉疫病菌 *P. boehmeriae* 的培养滤液中纯化一种新型的胞外蛋白激发子,分子量为 90 kD,可诱导非寄主植物烟草产生过敏反应,且可诱导烟草对黑胫病产生抗性。本文对该激发子诱导烟草对 TMV、烟草野火病菌(*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*)和烟草赤

星病菌(*Alternaria alternata*)的抗性进行研究,旨在了解该激发子能否诱发烟草的 SAR 以及所诱导的获得抗性的抗性谱,以期编码 90 kD 蛋白激发子基因的利用提供试验基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试棉疫病菌 90 kD 胞外蛋白激发子的提纯

90 kD 胞外蛋白激发子从棉疫病菌 *P. boehmeriae* 培养滤液中提纯。该蛋白激发子的提纯参照张正光等<sup>[4]</sup>的方法。提纯的蛋白激发子母液(1 000 nmol/L)保存于低温冰箱中(-70℃)。

### 1.2 供试烟草

包括烟草(*Nicotiana tabacum* L.)品种三生烟(cv. Samsun NN)和 W38。供试烟草的种子经 70%乙醇处理 60 s 后转入 0.525%的次氯酸钠溶液中浸泡 15 min,用灭菌水清洗种子 2 次。洗涤后的种子移入 MS 培养基<sup>[5]</sup>平板上,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 片真叶期移入底部扎孔内盛有灭菌蛭石的塑料杯内,用 Hoagland 完全营养液每周喷施 2 次,每天早晚浇水,待苗长至 7 片完全伸展的叶片时,供试验用。

### 1.3 90 kD 蛋白激发子处理烟草

参照张正光等<sup>[4]</sup>的方法。注射处理三生烟时,在处理叶片(第 4 片叶)基部主脉两侧各注射一个点,每点各注射 10  $\mu$ l,浸润斑直径约 7 mm;处理 W38 烟草时,在处理叶片中部或基部主脉两侧各注射一个点,每点各注射 15  $\mu$ l,浸润斑直径约 10 mm。

### 1.4 对 TMV 抗性的测定

用纯化的 TMV 悬浮液(浓度为 0.5  $\mu$ g/mL)接种三生烟,接种叶片包括激发子注射处理的叶片及处理叶片的上、下各 2 片叶。接种时,将少量细金刚砂(600 目)撒在待接种的烟草叶面上,用加样器吸取 10  $\mu$ l TMV 悬浮液均匀点滴在叶面上,用手指在叶面上轻轻摩擦接种。接种后的叶片用自来水轻轻冲洗,烟苗置 25℃、黑暗培育 12 h 后放回温室培育。每处理接种 3 株烟草,以未经激发子处理的烟草接种 TMV 作为对照,试验重复 1 次,接种 5 d 后统计枯斑数,计算诱抗效果,诱抗效果=[(对照叶片上枯斑数-处理叶片枯斑数)/对照叶片上枯斑数] $\times$ 100%。

### 1.5 不同浓度的 90 kD 蛋白激发子诱导烟草对 TMV 抗性的测定

与方法 1.4 基本相同。不同的是,分别以浓度为 0.5,1,2,10,20,100 nmol/L 的激发子溶液处理三生烟,处理后 24 h 用 TMV 悬浮液摩擦接种处理叶片。

### 1.6 2 次加强诱导烟草对 TMV 抗性的测定

以 10 nmol/L 激发子溶液注射处理三生烟叶片后的第 4 d 在紧靠处理点附近再次注射等量的蛋白激发子,在第 2 次注射后分别立即接种和于第 1、2、4、8、12、16 d 接种 TMV,以注射 1 次激发子的烟草接种 TMV 作为对照。接种后的烟苗按材料与方 法 1.4 培育,每处理接种 3 株烟草,试验重复 1 次。5 d 后按材料与方 法 1.4 统计枯斑数计算诱抗效果。

### 1.7 对烟草野火病菌抗性的测定

供试烟草野火病菌 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*(本校胡白石博士惠赠)在 LB 培养液中振荡培养(25℃、黑暗)24 h,用灭菌水将菌液浓度调至 10<sup>8</sup> cfu/mL 供接种用。将蛋白激发子按 1.3 的方法注射 W38 烟草的第 3 片真叶的中部。处理后 48 h 用相同的方法注射接种野火病菌,在注射激发子的处理叶片上的接种点约离激发子注射点 3~4 cm,处理叶的上一片叶和下一片叶的接种点在主脉两侧,每叶片接种 2 个点,注射接种的菌液形成的浸润斑直径约 10 mm。注射接种后立即用记号笔划出浸润斑的边界。每处理注射接种 6 株烟草,以未经激发子处理的烟草接

种野火病菌作对照。接种后的烟苗放回温室培育,每天早晚浇水一次,试验重复 1 次,5 d 后测量细菌液浸润斑的扩展大小。

### 1.8 对烟草赤星病菌抗性的测定

供试烟草赤星病菌 *Alternaria alternata* (山东农业大学梁元存博士惠赠)在 PSA<sup>[6]</sup>培养基平板上( $\Phi=60$  mm)培养(25℃、黑暗),长满整个平板后,置黑光灯下(25℃)照射 10 d 诱导产生分生孢子,用灭菌水配制成所需浓度的孢子悬浮液供接种用。将蛋白激发子按 1.3 的方法处理 W38 烟苗的第 3 片真叶,处理后 48 h 用喉头喷雾器喷洒烟草赤星病菌分生孢子悬浮液至叶片正背面均匀完全湿润。每处理喷雾接种 6 株烟草,以未经激发子处理的烟草接种赤星病菌作对照。接种后的烟苗保湿(25℃、黑暗、RH>100%)培育 24 h 后,放回温室培育,每天早晚浇水一次,试验重复 1 次,5 d 后观察记载病斑数和发病面积。

## 2 结果与分析

### 2.1 蛋白激发子诱导三生烟对 TMV 的抗性

2.1.1 对 TMV 的系统获得抗性 将 10 nmol/L 蛋白激发子注射烟草中部叶片 24 h 后,在处理叶及其上、下各 2 张叶片摩擦接种 TMV,5 d 后观察结果是,除激发子处理叶注射点周围 1 cm 枯斑较少外,处理叶的其它部位及其上、下各 2 片叶片上的枯斑分布比较均匀;在处理叶及其上下叶产生的枯斑数在 0.01 水平显著少于对照,在上述叶片的诱导抗性效果为 40.9%~53.0% (图 1),且处理叶片与其上、下叶片上的枯斑数彼此之间差异不显著(图 2)。上述结果证明该激发子可诱导烟草产生一种可往上下移动的信号从处理部位移动到非处理部位并激活其防卫系统,从而诱导后者产生抗性,表明棉疫病菌 90 kD 蛋白激发子诱导的烟草对 TMV 的抗性是一种系统获得抗性。接种 TMV 7 d 后进一步计测激发子处理叶和相应的对照叶片上 40 个 TMV 枯斑直径,结果见图 3,处理叶上的枯斑平均直径为 1.23 mm,经统计显著小于对照叶片上枯斑平均直径 2.97 mm( $P<0.01$ ),病斑平均直径小 58.5%;但处理叶的上、下叶片上的枯斑平均直径为 2.89 mm,与相应的对照叶上的枯斑直径没有显著差别。

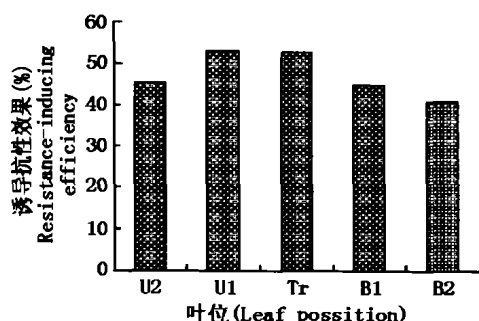


图 1 90 kD 蛋白激发子诱导三生烟对 TMV 的系统抗性

Fig. 1 SAR to TMV induced by 90 kD elicitor protein on Samsun NN tobacco plants

U2: 上 2 叶(the second upper leaf); U1: 上 1 叶(the first upper leaf); Tr: 处理叶(treated leaf); B1: 下 1 叶(the first lower leaf); B2: 下 2 叶(the second lower leaf)。

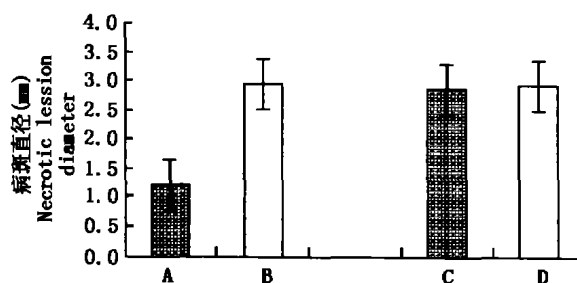


图 3 90 kD 蛋白激发子处理对枯斑大小的影响

Fig. 3 Effects of 90 kD elicitor protein on necrotic lesion diameter

A: 处理叶(treated leaf); B: 对照叶(control buffer-infiltrated leaf); C: 处理叶 A 的上、下叶(upper and lower non-elicitor-treated leaves nearby A); D: 对照叶 B 的上、下叶(upper and lower buffer-infiltrated leaves nearby B)。

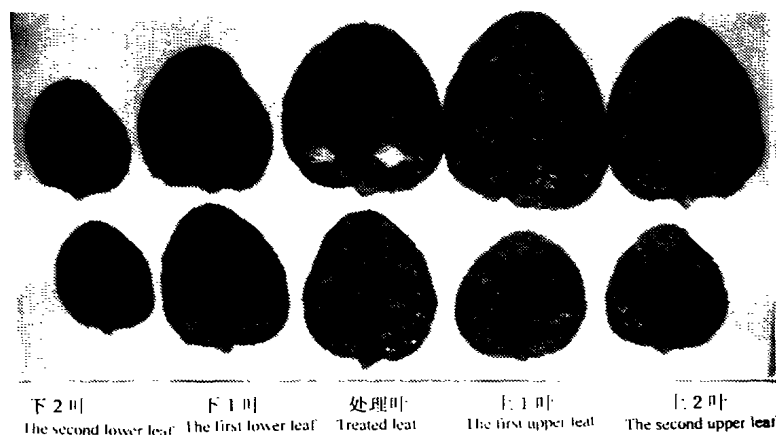


图2 90 kD 蛋白激发子处理三生烟对 TMV 的系统获得抗性

Fig. 2 SAR against TMV on Samsun NN plants induced by 90 kD elicitor protein

上排为激发子处理,下排为对照。同一横行的叶片来自同一植株。

The top row leaves from an elicitor-treated plant and bottom row leaves from non-elicitor-treated plant. Leaves in different row from the same plant.

2.1.2 诱导抗性的时续性 将 10 nmol/L 蛋白激发子注射处理后立即或在处理后 1、2、4、7、15 d 在处理叶上接种 TMV。结果是,处理后 1、2、4 d 接种 TMV 产生的枯斑数分别为 90.4、114.6、125.0 个/叶,对照叶片上的 TMV 平均枯斑数为 179.2,经统计显示激发子处理后 1~4 d 内可显著减少枯斑数( $P < 0.01$ ),而处理后立即或处理后 7 d 接种 TMV 产生的枯斑数经统计与对照无明显差异(表 1)。表明该激发子处理后 1 d 到 4 d 内均能显著诱导烟草对 TMV 产生较好的抗性,到第 7 d 时激发子诱导烟草对 TMV 的获得抗性较弱(表 1)。提示该激发子诱导三生烟对 TMV 的抗性具有一定的时续性。

表 1 90 kD 蛋白激发子诱导三生烟对 TMV 抗性的时续性

Table 1 Durability of induced resistance to TMV on Samsun NN tobacco plants by 90 kD elicitor protein at dosage of 10 nmol/L from *Phytophthora boehmeriae*

激发子处理与接种间隔的时间(d) Delay between treatment and inoculation	枯斑数(个)(平均值±标准差) Necrotic lesion number(mean±SD)	诱导抗性(%) Resistance-inducing efficiency
对照(Control)	179.2±10.4	
0	171.7±3.5	4.7
1	90.4±9.0**	50.4
2	114.6±10.3**	36.0
4	125.0±11.5**	30.2
7	172.7±8.5	3.6

\*\*表示激发子处理叶片上的病斑数与对照有显著差异( $P < 0.01$ )。

\*\*Indicated the mean lesion numbers on the elicitor-treated leaves differ significantly from that on control at the 1 percent level.

2.1.3 不同浓度诱导烟草对 TMV 的抗性 分别以浓度为 0.5、1、2、10、20、100 nmol/L 的激发子溶液处理烟草,测定浓度对诱导抗性的影响。结果是,0.5~100 nmol/L 浓度的蛋白激发子均能显著地减少枯斑数,随着浓度的降低诱抗水平下降,且各浓度之间具有一定的差异,其中以浓度为 100 nmol/L 的蛋白激发子处理烟草后接种 TMV 时产生的枯斑最少,诱导产生的抗性水平最高,诱抗效果为 58.2%(表 2)。

表 2 不同浓度激发子诱导三生烟对 TMV 抗性的比较

Table 2 Comparison of induced resistance to TMV by various doses of 90 kD elicitor protein

处理浓度 (nmol/L) Dosage	枯斑数 (平均值±标准差)* Necrotic lesion number (mean±SD)	诱导抗性 (%) Resistance-inducing efficiency
对照 (Control)	189±10.7 A	—
100	79±13.5 B	58.2
20	91±8.5 BC	51.9
10	93±4.3 BC	50.8
2	96±6.0 C	49.2
1	97±6.3 C	48.7
0.5	123±8.3 D	34.9

\* 采用 Duncan's 新复极差法比较差异显著性, 标有相同字母的平均数在 0.01 水平上无显著差异。

\* The mean lesion numbers followed by the same letter are not significantly different at 0.01 level according to Duncan's new multiple range test.

2.1.4 2 次加强诱导烟草对 TMV 的 SAR 水平与持续性的影响 以 10 nmol/L 激发子溶液注射处理烟叶后的第 4 d 在紧靠处理点附近再次注射等量的蛋白激发子, 在第 2 次注射后分别立即接种和于第 1、2、4、8、12、16 d 接种 TMV, 以注射 1 次的烟草接种 TMV 作为对照。结果见图 4, 经 2 次处理的烟草与 1 次处理烟草叶片上 TMV 枯斑数经统计分析没有显著差别, 只是经 2 次注射的烟草其获得抗性的持续性略有延长。

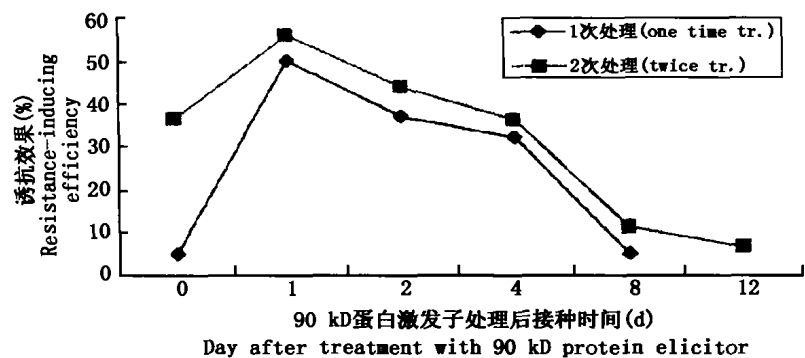


图 4 90 kD 蛋白激发子 2 次诱导三生烟对 TMV 的抗性

Fig. 4 Acquired resistance on Samsun NN tobacco plants to TMV by twice induction of 90 kD elicitor protein

## 2.2 诱导 W38 烟草对 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 的抗性

将 10 nmol/L 激发子注射烟草叶片后 2 d 注射接种 *P. syringae* pv. *tabaci* 细菌悬浮液, 接种 5 d 后检查蛋白激发子处理的烟草叶片及其上、下各 1 叶的发病情况, 结果见表 3、图 5, 经激发子处理的叶片及处理叶片的上、下叶片病斑扩展均小于 5 mm, 而对照的病斑平均扩展大于 20 mm, 统计分析显示激发子处理与对照之间存在极显著差异。表明该激发子可诱导烟草对野火病菌产生系统获得抗性。

## 2.3 诱导 W38 烟草对 *Alternaria alternata* 的抗性

将 10 nmol/L 激发子注射烟草叶片后 2 d 喷雾接种 *A. alternata* 分生孢子, 接种浓度分别为  $3.2 \times 10^5$  个/ml 和  $1 \times 10^4$  个/ml, 并于 5、12 d 后检查处理的烟草叶片及其上、下各 1 叶的发病情况, 结果见图 6, 经激发子处理的叶片病斑数目与大小均显著小于对照叶片 (表 4, 图 6), 且处理叶片的上一片和下一片叶片的病斑数也显著少于对照, 表明该激发子可诱导烟草对 *A. alternata* 产生系统获得抗性。

3 结 论 与 讨 论

本文首次就能引起烟草过敏反应的一种新型的棉疫病菌 90 kD 胞外蛋白激发子诱导烟草对 TMV、野火病菌和赤星病菌的获得抗性进行了研究,结果表明该激发子可诱导烟草对 TMV、烟草野火病菌和烟草赤星病菌产生系统获得抗性,并证明这种诱导抗性至少能保持4 d。

迄今已知疫霉菌可产生寡糖、糖蛋白和蛋白 3 类激发子,其中一类分子量为 10 kD、称为 elicitin 的蛋白激发子可诱导烟草对卵菌、真菌、细菌和病毒的系统获得抗性,本研究证明棉疫病菌 90 kD 胞外蛋白激发子具有与 elicitin 相似的诱抗功能。Devergne 等<sup>[7]</sup>认为隐地疫霉

表 3 90 kD 蛋白激发子诱导烟草对野火病菌的系统获得抗性

Table 3 Systemic acquired resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* on tobacco (cv. W38) leaves triggered by 90 kD protein elicitor

叶位 (Leaf position)	病斑大小 (Lesion size) (mm) *
对照 (Control)	22.3±2.5
处理叶 (Treated leaf)	<1.0
上 1 叶 (First upper leaf)	2.6±1.6
下 1 叶 (First lower leaf)	2.9±1.3

\* 病斑大小指接种的细菌浸润斑伸展大小 (Lesion size indicated extended radii of bacteria in leaves after the infiltration of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*).

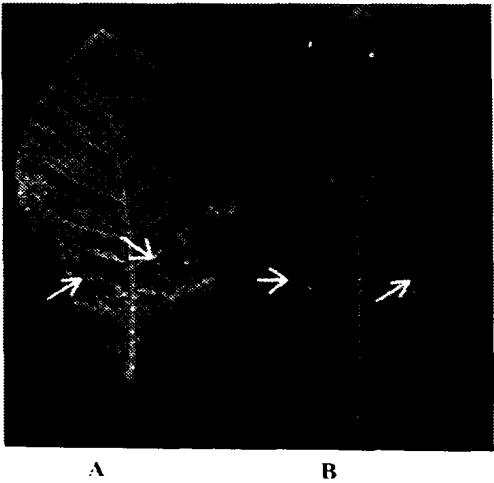


图 5 90 kD 蛋白激发子处理烟草(W38)对野火病菌的诱导抗性

Fig. 5 Acquired resistance against *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* on tobacco leaves (cv. W38) triggered by 90 kD elicitor protein

A 为对照,B 为激发子处理。图中箭头所指的黑线标记部分是接种细菌液的浸润面积。

A: CK, B: Leaf treated by elicitor. Arrows indicated the marker line draw immediately after the infiltration defining the limit of bacterial liquid spread.

表 4 90 kD 蛋白激发子诱导烟草对赤星病菌的系统获得抗性

Table 4 Systemic acquired resistance to *Alternaria alternata* on tobacco (cv. W38) leaves triggered by 90 kD protein elicitor

叶位 (Leaf position)	3.2×10 <sup>5</sup> 个/ml 接种 Inoculation with 3.2×10 <sup>5</sup> spore/ml		1×10 <sup>4</sup> 个/ml 接种 Inoculation with 1×10 <sup>4</sup> spore/ml	
	病斑数 * Lesion number	发病面积 (%) ** Lesion size	病斑数 Lesion number	病斑直径 (mm) * Lesion diameter
对照 (Control)	92.3±7.87 A	>33.3	17.8±2.78 A	8.2±3.41 A
处理叶 (Treated leaf)	30.5±7.34 B	<10	7.5±1.04 B	2.9±1.38 B
上 1 叶 (First upper leaf)	48.0±6.60 B	<10	—	—
下 1 叶 (First lower leaf)	43.7±8.09 C	<10	—	—

\* 注解见表 2(See the footnotes of table 2)。

\*\* 发病面积指病斑占全叶面积的百分数 (Extent of lesion produced by *A. alternata* in percent of the total leaf area)。

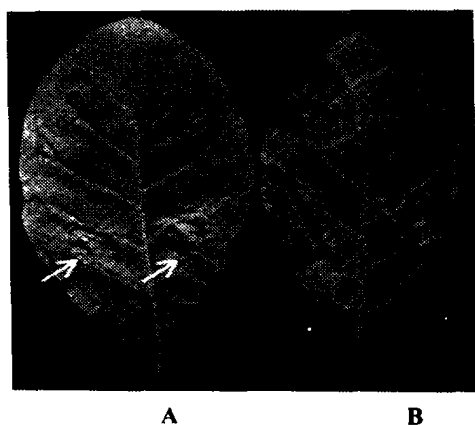


图 6 90 kD 蛋白激发子处理烟草(W38)对赤星病菌的诱导抗性

Fig. 6 Acquired resistance against *Alternaria alternata* on tobacco leaves (cv. W38) triggered by 90 kD elicitor protein

A 为激发子处理,箭头所指的斑为注射激发子引起的过敏性坏死斑;B 为对照。

A: Leaf treated by elicitor, arrows indicated lesions were produced due to hypersensitive response of tobacco leaf induced by the elicitor; B: CK.

(*P. cryptogea*)产生的 elicitin—Cryptogein 可从处理部位通过维管束向上下移动从而使植物产生系统获得抗性。但是 Keller 等<sup>[8]</sup>的实验证明 Cryptogein 在烟草体内不能移动,诱导烟草产生的抗性需要水杨酸(salicylic acid, SA)。Dorey 等<sup>[9]</sup>利用放射性元素标记疫霉菌另一类 32 kD 糖蛋白证明该糖蛋白只局限于注射处理部位,不往非处理部位移动。普遍认为 SA 是植物产生 SAR 的一个关键信号分子<sup>[10]</sup>,但是现已证明 SA 是一种不能移动的信号分子<sup>[9,10]</sup>。Costet 等<sup>[11]</sup>认为 elicitin 可诱导处理部位细胞产生一种未知的系统信号向非处理部位移动从而诱发植物的系统获得抗性,这种信号既不是 SA 也不是  $H_2O_2$ 。本研究中 90 kD 蛋白激发子注射处理烟叶后,处理叶片的上下叶片可被诱导产生对病毒、细菌和真菌的系统获得抗性,诱导这种系统获得抗性产生的系统信号分子还有待进一步研究。

本研究中棉疫病分泌的 90 kD 蛋白激发子并不只诱发烟草对 *P. nicotianae* 产生抗性<sup>[4]</sup>,还可诱发烟草产生广谱抗性,即对病毒、细菌和真菌产生抗性。这种诱导产生的广谱抗性与疫霉菌产生的 elicitin 和 32 kD 糖蛋白激发子相似,但是接种 TMV 所形成的枯斑大小不同。32 kD 糖蛋白激发子在非过敏反应剂量条件下注射烟草时,处理叶上除注射点外,其它部位枯斑直径与对照没有明显差异<sup>[11]</sup>;而用过敏反应剂量处理烟草时,处理叶上、下叶片的枯斑直径小于对照植株<sup>[12]</sup>。本研究用 90 kD 蛋白激发子过敏反应剂量处理烟草时,处理叶片上的 TMV 枯斑直径显著小于对照,而非处理叶片上的枯斑平均直径与对照无显著差异(图 3)。有报道外源 SA 诱导烟草对病毒的抗性是由于 SA 可干扰烟草体内病毒的复制和抑制病毒从侵染点向四周的系统运输,从而导致形成的枯斑小<sup>[13,14]</sup>。本研究中激发子处理叶上形成的枯斑显著小于对照是不是与其叶片中积累了较高水平的 SA 有关还有待进一步证明。

植株被诱导产生的 SAR 一般可维持 1 周至几个月,疫霉菌 32 kD 糖蛋白激发子<sup>[14]</sup>和 10 kD 的 elicitin<sup>[2]</sup>诱发烟草的 SAR 可维持 2 周。本研究的 90 kD 激发子诱发的 SAR 持久性只有 1 周左右,且到该激发子处理后第 7 d 对 TMV 的诱导抗性只有 4%(表 1),表明该激发子诱发的 SAR 持久性较疫霉菌产生的其它已知激发子短一些。

有关棉疫病 90 kD 蛋白激发子诱导烟草 SAR 的分子机理有待进一步研究。



## 参 考 文 献

- [1] LAMB C J, LAWTON M A, DRON M, *et al.* Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack[J]. *Cell*, 1988, 56: 863-867.
- [2] BONNET P, BOURDON E, PONCHET M, *et al.* Acquired resistance triggered by elicitors in tobacco and other plants [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 1996, 102: 181-192.
- [3] KAMOUN S, WEST P V, JONG A J, *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.
- [4] 张正光,王源超,郑小波. 棉疫病菌 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.
- [5] MURASHIGE T, SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures[J]. *Physiol. Plant*, 1962, 15: 473-497.
- [6] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998. 46.
- [7] DEVERGNE J C, BONNET P, PANABIERES F, *et al.* Migration of the fungal protein cryptogein within tobacco plants [J]. *Plant Physiology*, 1992, 99: 843-847.
- [8] KELLER H, BLEIN J P, BONNET P, *et al.* Responses of tobacco to elicitors, protein from *Phytophthora* spp. eliciting acquired resistance [A]. DANIELS M. *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*. v. 3 [C]. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994. 327-332.
- [9] DOREY S, BAILLIEUL F, PIERREL M A, *et al.* Spatial and temporal induction of cell death, defense genes, and accumulation of salicylic acid in tobacco leaves reacting hypersensitively to a fungal glycoprotein elicitor[J]. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 1997, 10: 646-655.
- [10] MARTINEZ C, BACCOU J C, BRESSON E, *et al.* Salicylic acid mediated by the oxidative burst is a key molecule in local and systemic responses of cotton challenged by an avirulent race of *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* [J]. *Plant Physiology*, 2000, 122: 757-766.
- [11] COSTET L, CORDELIER S, DOREY S, *et al.* Relationship between localized acquired resistance (LAR) and the hypersensitive response (HR): HR is necessary for LAR to occur and salicylic acid is not sufficient to trigger LAR[J]. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 1999, 12: 655-662.
- [12] BAILLIEUL F, GENETET I, KOPP M, *et al.* A new elicitor of the hypersensitive response in tobacco: a fungal glycoprotein elicits cell death, expression of defence genes, production of salicylic acid, and induction of systemic acquired resistance[J]. *Plant J.*, 1995, 8: 551-560.
- [13] CHIVASA S, MURPHY A M, NAYLOR M, *et al.* Salicylic acid interferes with tobacco mosaic virus replication via a novel salicylhydroxamic acid-sensitive mechanism[J]. *Plant Cell*, 1997, 9: 547-557.
- [14] NAYLOR M, MURPHY A M, BERRY J O, *et al.* Salicylic acid can induce resistance to plant virus movement[J]. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 1998, 11: 860-868.