Elicitins 与植物的抗病性

梁元存[1] 刘爱新[1] 董汉松[2]

（山东农业大学植物保护学院 泰安 271018）[1] （南京农业大学植物保护学院 南京 210095）[2]

摘要： Elicitins 是一类分子量约为 10 kD 的小分子蛋白激发子，由 *Phytophthora* 和 *Pythium* 两个属的植物病原卵菌胞外分泌产生，在烟草上引起过敏性反应（hypersensitive response，HR）和系统获得抗病性（systemic acquired resistance，SAR）。文中从 Elicitins 结构与功能、生物学意义、基因表达调控，Elicitins 在植物上诱发的信号传导和转 Elicitins 基因的抗病基因工程 5 个方面概述了 Elicitins 的研究进展。

关键词： Elicitins，抗病性

中图分类号： Q93 **文献标识码：** A **文章编号：** 0253-2654（2004）02-0134-04

ELICITINS AND DISEASE RESISTANCE IN PLANTS

LIANG Yuan-Cun[1] LIU Ai-Xin[1] DONG Han-Song[2]

（*College of Plant Protection*，*Shandong Agricultural University*，*Taian* 271018）[1]

（*College of Plant Protection*，*Nanjing Agricultural University*，*Nanjing* 210095）[2]

Abstract: Most species of the genus *Phytophthora* and *Pythium* produce extracellular protein elicitors called elicitins with around 10 kD molecular weight. These elicitins have a high degree of homology and induce hypersensitive response (HR) and induce systemic acquired resistance (SAR) against various pathogens in tobacco plants, and display acidic or basic characteristics. The basic elicitins are more efficient than the acidic elicitins in causing necrosis. Elicitins, signal proteins, were used to study signal transduction pathways in plants, and used to promote plant disease resistance by gene engineering or directly spraying.

Key words: Elicitins, Disease resistance

Elicitins 是疫霉属（*Phytophthora*）和腐霉属（*Pythium*）两个属的植物病原卵菌产生的、在烟草上引起过敏反应（hypersensitive response，HR）和系统获得抗病性（systemic acquired resistance，SAR）的一类胞外蛋白质的总称。Elicitins 氨基酸序列高度相似和保守，蛋白质前体含 19 或 20 个氨基酸的信号肽，成熟蛋白质一般含 98 个氨基酸，分子量一般为 10 kD，少数 Elicitins 略有不同。Elicitins 有 α（酸性）和 β（碱性）2 种类型。已证实 *Phytophthora* 属的 37 个种、*Pythium* 属的 2 个种共产生 40 种 Elicitins；多数卵菌产生的 elicitins 只有 α 或 β 一种类型，但致病疫霉（*Phytophthora infestans*）等 7 种卵菌分别产生 α 与 β 两种类型的 Elicitins。近年来，对 Elicitins 的研究在以下 5 个方面取得了重要进展。

1 Elicitins 氨基酸组成、三维结构及与生物功能的关系

Elicitins 的生物功能与其氨基酸组成、三维结构密切相关。除了致病疫霉产生的两种 Elicitins（infestin1 and 2/INF1 and 2）α 与 β 型诱导 HR 的能力相同，其他所有 β 型 Elic-

收稿日期： 2003-07-01，**修回日期：** 2003-10-20

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

itins 的生物活性都高于 α 型。从 Elicitins 氨基酸序列看，Elicitins 在一级结构上有很高的同源性。通过比较 2 种 α 型 Elicitins（capsicein 和 parasiticein）与 2 种 β 型 Elicitins（cryptogein 和 cinnamomin）的结构发现，α 型第 13 位的氨基酸是缬氨酸，β 型在此位上是赖氨酸。O'Donohue 等[1]应用人工合成 *cryptogein* 基因替换氨基酸编码的方法，将 *cryptogein* 第 13 位的赖氨酸替换成缬氨酸，发现重组蛋白对烟草的坏死活性显著降低。因此，诱导 HR 的决定因素是 13 位的赖氨酸。

Elicitins 的空间结构符合它们的生物功能，生物活性依赖于其天然的空间构象，二硫键的破坏能使其完全失去生物活性。Elicitins 中 6 个保守的半胱氨酸形成 3 对二硫键，使 Elicitins 成球状。核磁共振和晶体结构的解析表明，Elicitins 具有一种特殊的折叠方式，有 6 个 α-螺旋，一个反平行的 β-折叠和一个 Ω-环，而且此蛋白还具有一个疏水性口袋状的构象[2]。两条链的 C 端形成一个功能单元（motif），具有磷酸脂酶的结构特征（半胱氨酸配对形成三个二硫桥）。在这个结构中，决定 HR 诱导能力的第 13 位氨基酸暴露在外，可能在对相应受体识别中起作用。

2　Elicitins 编码基因的结构和表达调控

α 和 β 型 Elicitins 在 13 位上的氨基酸存在差异，但其同源性相当高。利用 elicitins 蛋白质两端序列设计兼并引物进行 PCR 扩增及 PCR 同源扩增（homolog and PCR-based cloning）的方法，现已经克隆到编码 Elicitins 的基因。不同种的 Elicitins 基因有很高的同源性，可以相互杂交和同源扩增。对 *Phytophthora* 的一些种研究表明，Elicitins 在基因组中存在多拷贝，由多基因家族编码[3]。

对 Elicitins 基因在卵菌内表达调控的研究相当有限。寄生疫霉（*P. parasitica*）的弱致病力菌株产生 parasiticein，而强菌株不产生或少产生 parasiticein，但含有 *parA*1 DNA 序列，寄生疫霉 Elicitin 的产生受转录水平的调控[3]。因此，Elicitins 被认为起着一种无毒因子（avirulence factor）的作用。最近的研究[4]表明，*parA*1 在烟草与 *P. parasitica* 的互作中起负调控作用。

3　Elicitins 与植物的特异性及其产生的生物学意义

Elicitins 作为一种特异性激发子起作用。Kamoun 等用 cryptogein 和 parasiticein 处理烟草、番茄、莴苣、甘蓝、黄瓜、茄子、辣椒和拟南芥等 61 种植物，结果发现两种 Elicitins 在烟草、萝卜和芜菁植物上产生 HR，而在其它植物上则不能[5]。致病疫霉的 β 态 infestin1（INF1）被认为在该卵菌与马铃薯的互作中作为无毒因子起作用，因为 INF1 通过基因沉默而失去功能后，缺乏 INF1 的菌株就变为致病菌株。相反的结果是，大豆疫霉 sojein2（α 型）的产生量、引起 HR 的能力与小种分化没有关系，因此被认为不是决定小种专化的因子。

α 和 β 型 Elicitins 生物功能的差异与两者在植物体内移动和分布无关。分别用放射性标记的 α 和 β 型 Elicitins 注射烟草，发现 2 种 Elicitins 在烟草导管系统中都能运转，并且两者的运转和积累没有明显的分子差异，说明它们的活性差异并非取决于两者在植物体内的移动和分布[6]。

在 Elicitins 生物学意义方面的研究表明，Elicitins 具有甾醇运载蛋白活性，可从植物细胞膜上获得甾醇供其生长和繁殖需要[7]。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

4 Elicitins 诱导 HR 和抗病性的信号机制

激发子诱导产生的 SAR 和 HR 包括信号识别、信号传导和防卫基因表达几个环节。

4.1 识别 Elicitins 与植物的识别特性与其空间结构有关。对 Elicitins 线性和三维结构的研究都表明，它们具有识别脂类化合物的特征。这一特征还体现在 Elicitins 在卵菌中结合并转移甾醇的功能[7]。另外的证据是辣椒疫霉产生的两种磷酸脂酶氨基酸序列（到第 39 位）与 Elicitins（如 capsicein）高度同源，表明它们是类似于 Elicitins 的磷酸脂酶（elicitin-like phospholipases）；这两种磷酸脂酶都有很强的酶活性。虽然 capsicein 不显示磷酸脂酶活性，但其圆二色性（circular dichroism）表明它具有与带负电的磷脂结合的能力。因此，elicitins 可能与植物细胞膜上的脂类化合物相识别[8]。

4.2 Elicitins 受体的性质和种类 这与分子识别引导哪些信号通路、不同信号通路是否在分子识别环节上的分支有直接的关系。通过比较两种 α 和两种 β 型 Elicitins 在烟草细胞质膜的结合情况，发现它们对连接位点的亲和性和连接位点的数量都相同，并且它们彼此间对结合位点相互竞争，说明 Elicitins 在质膜上的受体分子相同。另一项实验结果表明，Elicitins 受体可能因 Elicitins 种类和结构而不同。辣椒疫霉产生的两种 elicitin-like phospholipases 氨基酸序列在第 39 位糖基化。无独有偶，橡胶腐霉的 Vex1 与疫霉菌的 Elicitins 高度同源，但其含有糖基化位点，连接上去的糖基相当于 16 个己糖；糖基化与 Vex1 在烟草上诱发坏死的能力呈正相关。根据这些资料，我们推测可以直接转导 Elicitins 刺激信号的 Elicitins 受体的性质及作用方式可能有：①脂蛋白，信号转导后可能引发茉莉酸等脂类信号分子的合成、积累；②与糖结合的蛋白质，性质多样，功能上就有了多种去向；③糖基化可能在 Elicitins β-折叠与脂类物质的识别中起修饰作用。采用^{125}I 标记的 cryptogein 确定了 cryptogein 结合蛋白的性质，其属于 N-糖化蛋白，分子量约为 16.2 kD 和 50 kD。采用氧化的方法破坏结合蛋白中的糖分子导致其丧失与 cryptogein 的结合，据此推测，识别发生在 cryptogein 的赖氨酸和含有氨基的糖分子之间[9]。

4.3 Elicitins 诱导的信号传导反应 从理清 Elicitins 启动的信号通路的脉络看，已有的研究还不足以得出明确的结论。Cryptogein 处理烟草悬浮细胞能迅速地诱导瞬间的活性氧迸发和离子交换，这些早期事件包括 Ca^{2+} 向胞内流入（Ca^{2+} influx）、K^+ 向胞外流出（K^+ efflux）及培养液的碱化和细胞质内的酸化[10]。这些早期反应可被蛋白激酶抑制剂星孢菌素（staurosporine）所抑制，暗示蛋白磷酸化在这些事件的上游发挥作用。EGTA 和 Ca^{2+} 泵的抑制剂 La^{3+} 能抑制 cryptogein 诱导的烟草悬浮细胞的溶液碱化、活性氧的产生以及植保素的合成，说明这些反应需要 Ca^{2+} 的参与[11]。用 Elicitins 处理的 NahG 烟草表明 SAR 的建立和保持需要 SA，经过处理的 NahG 烟草虽能形成枯斑，但不具有对寄生疫霉的抗性，同时说明过敏性枯斑的形成与 SA 无关[12]。这证明了 SA 是 elicitin 产生 SAR 通路的主要调节因子。Elicitins 可以诱导 MAPKs（mitogen-activated protein kinases）类蛋白激酶的表达，而 cryptogein 对 MAPK 的激活不通过 SA 介导。在 Elicitins 处理的烟草悬浮细胞中，活性氧的产生、积累对程序化细胞死亡（programmed cell death，PCD）的发生既不充分也不必要[13]，这与已充分证明的 PCD 发生的信号传导过程相违背。另一项研究表明，Elicitins 诱导的 HR 需要丝氨酸/苏氨酸蛋白酶，这与 PCD 发生的下游机制相符合。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

5 转 elicitins 基因的抗病基因工程

Elicitins 是一类蛋白激发子，具有诱导植物抗病性的功能，人们可通过转 Elicitins 基因以获得广谱抗病的转基因植物。用 35SCaMV 强启动子控制的 cryptogein 基因转化烟草，转基因植株中有 cryptogein 蛋白产生，并且转基因烟草没有不利的表型，杂合体具有对 *P. parasitica* 的抗性[14]。另一研究小组将 cryptogein 基因置于病菌诱导型烟草 *hsr*203*J* 基因启动子之下，并在 cryptogein 基因前添加 *PR*-1*a* 信号肽基因，使得产生的 cryptogein 蛋白能够分泌到细胞间隙。转基因植株一旦接种 *P. parasitica*，迅速诱导防卫基因的表达和 HR 的产生，病菌的生长受到抑制。转基因烟草也获得了对其它许多病原真菌，如 *Thielaviopsis basicola*、*Erysiphe cichoracearum* 和 *Botrytis cinerea* 的抗性[15]。这表明 *Elicitins* 基因转化植物可获得广谱的抗病性。

6 结语

Elicitins 诱导的植物信号反应事件，用目前已知的信号通路还不能串联起来，某些反应有一定特殊性。前人的工作暗示，Elicitins 启动的信号传导可能在信号识别与效应基因的表达调控两个环节上分支。已测定的 Elicitins 诱导的信号反应事件可以发生在不同信号通路中的不同环节上，我们发现进行此项研究的科学家们没有把这些事件放在信号通路的交叉这一思想上加以考察。尽管代表不同信号通路的拟南芥的各种基因易于操作，对已知信号通路调控基因、效应基因已有充分阐释，但 Elicitins 的寄主专化性很强。Bourque 等[9]发现尽管在拟南芥的细胞膜上有 cryptogein 的结合位点，但却不能象烟草一样产生过敏反应，推测在拟南芥上 cryptogein 的结合位点是没有功能的。这使得在解析 Elicitins 引发的信号传导这一问题上，使用的植物材料过于狭窄，所有的事件和材料只能着眼于 Elicitins 在烟草上的反应。这样，对 elicitins 在植物上的反应远没有细菌来源的蛋白激发子 harpin 研究的透彻，对其引发的诱导抗病机制还远未明了，还有大量的问题有待深入研究与探讨。

参 考 文 献

[1] O'Donohue M J, Gousseau H, Huet J C, *et al*. Plant Mol Biol, 1995, **27**: 577 ~ 586.
[2] Boissy G, de La Fortelle E, Kahn R, *et al*. Structure, 1996, **4**: 1429 ~ 1439.
[3] Kamoun S, Klucher K M, Coffey M, *et al*. Mol Plant-Microbe Interact, 1993, **6**: 573 ~ 581.
[4] Colas V, Conrod S, Venard P, *et al*. Mol Plant-Microbe Interact, 2001, **14**: 326 ~ 335.
[5] Kamoun S, Young M, Glascock C B, *et al*. Mol Plant-Microbe Interact, 1993, **6**: 15 ~ 25.
[6] Devergne J C, Bonnet P, Panabieres P, *et al*. Plant Physiol, 1992, **99**: 843 ~ 847.
[7] Vauthrin S, Mikes V, Milat M L, *et al*. Biochim Biophys Acta, 1999, **1419**: 335 ~ 342.
[8] Nespoulous C, Gaudemer O, Huet J C, *et al*. FEBS Lett, 1999, **452**: 400 ~ 406.
[9] Bourque S, Binet M N, Ponchet M, *et al*. J Biol Chem, 1999, **274**: 34699 ~ 34705.
[10] Blein J P, Milat M L, Ricci P. Plant Physiol, 1991, **95**: 486 ~ 491.
[11] Taverniner E, Wendehenne D, Blein J P, *et al*. Plant Physiol, 1995, **109**: 1025 ~ 1031.
[12] Keller H, Bonnet P, Galiana E, *et al*. Mol Plant-Microbe Interact, 1996, **9**: 696 ~ 703.
[13] Dorey S, Kopp M, Geoffroy P, *et al*. Plant Physiol, 1999, **121**: 163 ~ 172.
[14] Tepfer D, Boutteaux C, Vigon C, *et al*. Mol Plant-Microbe Interact, 1998, **11**: 64 ~ 67.
[15] Keller H, Pamboukdjian N, Ponchet M, *et al*. Plant Cell, 1999, **11**: 223 ~ 235.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn