

植物病程相关蛋白及其在烟草中的研究进展

张玉 杨爱国 冯全福 蒋彩虹 耿锐梅 罗成刚

(中国农业科学院烟草研究所 中国烟草遗传育种研究(北方)中心, 青岛 266101)

摘要: 植物在受到病原物侵染时, 会产生一系列抗性反应, 病程相关蛋白是其中参与抗病性的重要物质, 能够被病原物诱导产生并在植物体内积累, 对于诱导植物系统抗性, 阻止病原物侵染具有重要作用。对植物病程相关蛋白的性质、诱导因素、分类和功能进行综述, 并概述病程相关蛋白与烟草系统抗性的紧密联系以及烟草病程相关蛋白基因在增强系统抗性中的应用, 为烟草抗病育种和病虫害防治提供了理论。

关键词: 烟草 病程相关蛋白 分类 功能 系统抗性

Plant Pathogenesis-related Proteins and Research Progress in Tobacco

Zhang Yu Yang Aiguo Feng Quanfu Jiang Caihong Geng Ruimei Luo Chenggang

(Tobacco Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, The North Center of Tobacco Genetic and Breeding, Qingdao 266101)

Abstract: Plants would generate a series resistant reaction when infected by pathogens, and pathogenesis-related proteins (PRP) would be induced to resist disease. PRPs can be induced and accumulated in plants, which plays an important part in inducing systemic resistance and preventing pathogen infection. In this article, not only the properties, induce factors, categorization and functions of PRP were overviewed, but also the relation between tobacco PRPs with systemic resistance and the utilization of tobacco PRP genes in enhancing systemic resistance were summarized, which provide rationale for resistance breeding and pest control in tobacco.

Key words: Tobacco Pathogenesis-related proteins Categorization Function System resistance

病程相关蛋白 (pathogenesis-related proteins, P-PRP) 是植物体内的一类蛋白质, 受病原体或其他外界因子的胁迫而诱导表达, 在植物抵御疾病、响应外界压力以及适应不良环境方面发挥着重要作用。1970 年, 美国科学家通过对烟草花叶病毒 (TMV) 表现过敏反应的烟草品种接种 TMV, 发现了 4 种新的蛋白质。首次发现了病程相关蛋白, 以后又相继在其他烟草品种或植物中发现了类似的蛋白质。随着技术的发展和研究的深入, 研究者发现这些来源不同的新蛋白质之间有许多共同的特性。1980 年, 安东纽 (Antoniwi) 把这些新的蛋白质定义为病程相关蛋白, 并提出了命名方法。迄今已发现, 马铃薯、番茄和黄瓜等 20 多种植物受病原物侵染或其他外界

环境刺激都可以产生病程相关蛋白质。

近年来, 植物病程相关蛋白在植物抗病性中的作用逐渐成为研究的热点, 研究者主要从结构、功能、诱导机制及基因利用等方面对其进行了大量研究, 阐明了其在植物抗病性中的作用。研究结果证明, 病程相关蛋白参与了植物的诱导抗病性, 病程相关蛋白的诱导表达使植物产生了系统抗性, 特别是几丁质酶和 1,3- 葡聚糖酶是植物潜在的抗病物质。为了解病程相关蛋白在烟草抗病育种及病虫害防治中的应用前景, 本文就近年来植物病程相关蛋白及其在烟草中的研究进展进行了综述。

1 病程相关蛋白的性质和诱导因素

植物病程相关蛋白稳定性较强, 相对分子质量

收稿日期: 2011-09-13

基金项目: 中国烟草总公司科技重点项目 (110201002002), 国家烟草专卖局烟草遗传育种重点实验室开放基金 (TB201108), 中国农业科学院烟草研究所所长基金 (TR20115)

作者简介: 张玉, 男, 硕士, 研究实习员, 研究方向: 烟草抗病育种; E-mail: zhy160@163.com

较小，一般为 6-43 kD，因此可以较好地 在细胞内和细胞间积累。大部分病程相关蛋白具有抗逆作用，能抵御糖苷酶、蛋白酶、尿素和重金属，并对低 pH 值和高温（60℃）具有较强的耐性。病程相关蛋白在进化上相对保守，来源不同的同类型病程相关蛋白在物理和化学性质、分子结构、氨基酸组成和血清学反应等方面具有较高的相似性^[1]。

病程相关蛋白的分布情况与等电点及诱发因素有关，主要分布于植物细胞间隙和液泡内。一般来说，分布于细胞间隙中的病程相关蛋白多是等电点小于 7 的酸性蛋白，而等电点大于 7 的碱性病程相关蛋白则多分布于细胞液中。病程相关蛋白的末端序列影响其在细胞内的转移。区别酸性、碱性病程相关蛋白的关键是碱性蛋白的前体不仅具有 N 端信号肽，还有 C 端糖基化的尾部序列，这两个末端序列在成熟蛋白质中都被切除。有研究者认为，N 端信号肽在病程相关蛋白从高尔基体转运到液泡，或穿过细胞质膜分泌到胞间的过程中起着决定性作用，其前体靠近 N 端的信号肽序列负责病程相关蛋白向液泡中的转运，它的缺失可导致转运途径发生错误而分泌到胞间^[2]。

多种因素可以诱导病程相关蛋白质的产生，总体可以分成 4 类：一是生物诱导因子，如植物病原菌^[3]、根结线虫^[4]及昆虫等侵染或危害植物。二是生理性诱导因子^[2]，如烟草的开花过程，番茄和千日红的自然落叶，黄瓜和豇豆细胞发生质壁分离等，均可分离到病程相关蛋白质。三是化学诱导因子^[5,6]，如乙烯和其他高浓度的植物激素、多聚腺苷酸、二氯乙烯膦酸、聚丙烯酸、苯甲酸以及其衍生物均可诱导病程相关蛋白质的合成。四是物理诱导因子^[7]，如机械损伤、紫外线辐射和高温等。

2 病程相关蛋白的分类及功能

最初，根据分子生物学和分子遗传学技术将烟草中的病程相关蛋白分为 5 类（PR-1-PR-5），按照电泳迁移率的大小命名，每组由几个性质相似的成员组成^[8]。PR-1 组蛋白的数量最多，大约占到叶片总蛋白的 1%-2%。PR-5 组，即被称为类甜蛋白（thaumatin-like protein, TLP）的病程相关蛋白，主要是分子量为 24 kD 的蛋白质。在经伤口诱导的马

铃薯、番茄叶片中也发现了类似的病程相关蛋白，这些蛋白可激活某些抵抗丝氨酸肽链内切酶的蛋白质活性。有研究证明，PR-5 组蛋白还具有抵抗真菌侵染以及激活植物防卫反应信号途径的作用^[9]。

截止到 1994 年，已形成目前的按病程相关蛋白的植物来源、电泳迁移率（与分子量大小有关）、血清学关系以及氨基酸序列的同源性为标准的分类体系（表 1）。按此分类体系，烟草和番茄中的 11 个病程相关蛋白家族被分类并命名为 PR-1-PR-11，其中 PR-8 可以在黄瓜中诱导表达^[10]，PR-10 蛋白基因已在小麦、藏红花等植物中得到克隆，并且由于其在植物抗病性中的重要作用，已经成为近年来的研究热点^[11,12]。3 个新的病程相关蛋白家族（PR-12、PR-13 和 PR-14）分别在胡萝卜、拟南芥和大麦中得到鉴定并分离出来^[13]。萌发素蛋白和类萌发素蛋白分别归类为 PR-15 和 PR-16 家族，PR-16 已经从受细菌和病毒侵染的辣椒中分离出来^[14]。

表 1 已经鉴定的病程相关蛋白家族		
家族	代表成员	特性
PR-1	Tobacco PR-1a	未知
PR-2	Tobacco PR-2	β-1, 3- 葡聚糖酶
PR-3	Tobacco P, Q	I, II, IV, V, VI, VII 型几丁质酶
PR-4	Tobacco " R "	I, II 型几丁质酶
PR-5	Tobacco S	类甜蛋白（TLP）
PR-6	Tomato Inhibitor I	蛋白酶抑制因子
PR-7	Tomato P	蛋白内切酶
PR-8	Cucumber chitinase	III 型几丁质酶
PR-9	Tobacco " lignin-forming peroxidase "	过氧化物酶
PR-10	Parsley " PR1 "	类核糖核酸酶
PR-11	Tobacco class V chitinase	I 型几丁质酶
PR-12	Radish Rs-AFP3	防卫素
PR-13	Arabidopsis THI2.1	硫素
PR-14	Barley LTP4	脂质转移蛋白
PR-15	尚不清楚	萌发素
PR-16	Pepper GLPs	类萌发素（GLPs）

早在 1987 年，Legrand 等就检测到烟草病程相关蛋白 PR-3 家族的 4 个成员具有几丁质酶活性，从而证明了病程相关蛋白具有酶活性，他们还发现烟草病程相关蛋白 PR-2 家族的 4 个成员具有 β-1, 3-

葡聚糖酶的活性。随后 PR-4、PR-8 和 PR-11 也被检测到具有几丁质酶活性, PR-4 还具有几丁质结合蛋白的功能。PR-7、PR-8、PR-9 和 PR-10 分别具有蛋白水解酶、溶菌酶、过氧化物酶和核糖核酸酶活性。PR-6 是蛋白水解酶抑制蛋白。PR-12、PR-13 和 PR-14 分别具有防御素、疏基化合物和脂质转移蛋白的特性, 这些病程相关蛋白以及渗透蛋白、类甜蛋白 (PR-5) 都具有膜透功能。PR-15、PR-16 分别具有萌发素和类萌发素蛋白的特性, 具有多种酶活性和功能^[14, 15]。

大部分病程相关蛋白的共同特性是具有抗真菌活性, 一些病程相关蛋白还具有抗细菌、昆虫、线虫和病毒的活性。病程相关蛋白的水解酶活性、蛋白水解酶抑制剂和膜透功能可以减弱病原菌的毒性。真菌细胞壁主要包含多聚葡萄糖、几丁质和蛋白质。因此, 水解酶 (β -1, 3-葡聚糖酶、几丁质酶和蛋白水解酶) 可以作为分解真菌细胞壁的工具, 同时 PR-8 具有溶菌酶活性, 能够分解革兰氏阳性菌^[16]。2004 年, Park 等^[14]在辣椒中诱导表达了病程相关蛋白 PR-10, 这种病程相关蛋白具有核糖核酸酶的功能, 能够分解入侵病毒的 RNA, 对寄主植物的抗病毒功能较重要。另外, 辣椒 PR-10 还具有抗生素活性, 对于防御卵菌纲真菌效果较明显。PR-6 可能与抗昆虫和抗线虫有关, 因为其蛋白酶抑制剂活性可以使这些寄生物在寄主植物组织内分泌的蛋白失活^[16]。PR-5、PR-12、PR-13 和 PR-14 的细胞膜透性能够使真菌和细菌病原体质壁分离, 阻止其生长和发育。PR-15 和 PR-16 具有细胞壁再塑、防御病原物入侵等多种功能^[15]。

3 病程相关蛋白与烟草系统抗性

植物的系统抗性可能包括多种机制, 但是, 不论真菌、细菌或病毒, 植物对这些病原物的共同反应都是产生病程相关蛋白, 并且在获得系统抗性的未感染的叶片上也出现这些蛋白, 这说明病程相关蛋白和植物的系统获得抗性之间有紧密的联系。近年来, 已在烟草上开展了很多病程相关蛋白与系统抗性关系的研究。

经 TMV 感染后诱导的烟草系统抗性, 不仅增强了烟草对 TMV 本身的抗性, 而且对其他病毒、细

菌或真菌病原物也有抵抗作用。同样, 由病原物如 *Thielaviopsis* (烟草根腐霉)、TNY (烟草枯斑病毒) 等诱发烟草产生局部感染后, 也能诱发烟草对 TMV 的抗性。Palak 等^[17]利用 TMV 对转基因烟草做了侵染试验。结果显示, 病原物侵染产生的遗传学变化可以遗传给后代, 烟草植株受 TMV 侵染后, 两个连续世代的同源重组频率增加。基因组甲基化分析表明, 两个世代的植株均表现出超甲基化基因组。并且, 通过对 5-甲基胞嘧啶抗体的甲基化作用分析, 证明低甲基化和超甲基化共同存在。受 TMV 侵染烟草植株的第一代对 TMV、番茄细菌性斑点病 (*P. syringae* pv. *tomato*) 和烟草疫霉菌 (*Phytophthora nicotianae*) 侵染所产生的症状产生了明显的延缓作用, 同时还发现, 受 TMV 侵染烟草植株的第一代植株受病毒或者细菌侵染后, 能够诱导病程相关蛋白 (PR-1) 基因的大量表达, 并诱导 β -D-1, 3-葡聚糖酶的大量积累。

利用一些化学物质也可产生类似的诱导作用。杜春梅等^[18]用抗病毒剂菌克毒克注射于珊西烟下部叶片, 上部叶片接种 TMV。结果表明, 经过菌克毒克诱导后, 上部未注射叶片对 TMV 侵染的抑制率为 65.5%-82.6%。分别对菌克毒克处理的叶片以及上部未处理叶片细胞间液中的蛋白进行电泳分析, 结果表明, 菌克毒克系统地诱导珊西烟产生了健康植株所没有的 7 种病程相关蛋白。刘陟等^[19]以普通烟草 G28 为材料, 研究了宁南霉素和水杨酸对烟草酸性病程相关蛋白的诱导表达。结果表明, 在宁南霉素和水杨酸诱导下, 烟草叶片中酸性病程相关蛋白能够高效、系统表达。在未接种病原菌条件下, 宁南霉素和水杨酸可以诱导 9 种酸性病程相关蛋白表达。相比而言, 宁南霉素诱导酸性病程相关蛋白的表达水平较高, 持续时间较长。由此说明, 病程相关蛋白的诱导表达增强了烟草的抗病性。

外源抗病基因介导的烟草系统抗性同样与病程相关蛋白紧密相关。Zheng 等^[20]将白杨的抗性基因 *PtDrl01* 转入烟草, 发现转基因烟草植株对 TMV 产生了系统抗性, 同时检测到转基因烟草内病程相关蛋白表达量增强。

4 烟草病程相关蛋白基因在系统抗性中的利用

尽管人们还不清楚许多病程相关蛋白的诱导机制、生物功能,但是已经利用转基因植物进行了很多病程相关蛋白基因增强植株抗病方面的实践,并取得了显著成效。

烟草病程相关蛋白 1a (PR-1a) 的生物化学功能目前还不清楚,但其在病原菌侵染时能够大量表达,PR-1a 的诱导表达和烟草的系统获得性抗性密切相关,这种系统获得性抗性是宿主对真菌、病毒和细菌侵染的防御反应。Danny 等^[21]把编码病程相关蛋白 PR-1a 的基因转化到烟草植株中,使其高效表达,结果显示,PR-1a 的高效表达能够增强转基因植株对烟草霜霉病和黑胫病的抗性。

烟草病程相关蛋白 PR-2 和 PR-3 分别属于 1, 3-葡聚糖酶类和几丁质酶类,具有抗真菌功能,这些基因具有较大的利用前景。蓝海燕等^[22]利用烟草 β -1, 3-葡聚糖酶及菜豆几丁质酶基因构建了组成型表达的双元植物表达载体,利用农杆菌介导法转化烟草,得到了转基因植株,与对照相比,转基因烟草对赤星病的侵染具有较强的抵抗能力。Melchers 等^[23]将来自烟草的编码 1, 3-葡聚糖酶和几丁质酶(分别来自 PR-2 和 PR-3) 的基因转化入番茄,使其同时表达,增强了番茄对真菌病原菌的抗性。试验还表明,任何一个基因单独表达都会使转基因番茄的抗病性减弱。他们还用萝卜做了同样的试验,结果显示包含相同基因的萝卜对大部分主要真菌病害都表现出了较强的抗性。他们还发现了一个重要特点,对一种病原菌表现抗性的转基因番茄中,大部分都能够对其他病原菌表现出较强抗性。Bachmann 等^[24]发现烟草病程相关蛋白 PR-2 和 PR-3 在马铃薯中的过量表达能够增强马铃薯对晚疫病的抗性。Kombrink 等^[25]在几丁质酶和 1, 3-葡聚糖酶共同表达的植物中也得到了同样的抗病效应。

5 展望

植物病程相关蛋白最初是在烟草中发现的,其特性与功能研究不仅为植物的系统抗性研究作出了突出贡献,也为烟草新品种选育、病害防治提供了重要的理论依据。通过对病程相关蛋白的研究,一

是帮助人们寻找对特异病原菌产生抗性的病程相关蛋白;二是通过分析病程相关蛋白的抗病机制,明确抗病功能,开发新型环保农药;三是克隆烟草病程相关蛋白基因,为烟草分子育种提供基因资源,从而获得抗菌谱广、作用持久的优质抗病新品种。

随着科学技术的发展,关于病程相关蛋白特性与功能的研究逐渐增多,但是与植物特定关系的基础研究仍然较少,许多问题仍然不清晰。例如,病程相关蛋白与动物体内免疫蛋白的作用方式是否类似,还有哪些重要因子参与;基因表达涉及到哪些具体的信号传导途径;不同来源的病程相关蛋白基因是否具有共同的能接受特定因子刺激的靶序列(TS),以便通过对靶序列的作用启动病程相关蛋白基因的表达,增强植物对不同病原物的抗性。这些均需要对更多病程相关蛋白的结构、功能进行深入解析,同时对诱导病程相关蛋白产生过程中的受体、信号传导途径和分子靶标进行深入研究,阐明基因表达调控的规律及作用模式。

参考文献

- [1] 代建丽. 植物病程相关蛋白研究进展. 科技探索, 2008 (2): 123-125.
- [2] Aglika E. Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years. Plant Physiology, 2005, 31 (1-2): 105-124.
- [3] Holger S, Cornelia D, Lorant K, et al. Functional assessment of the pathogenesis-related protein PR-1b in barley. Plant Science, 2003, 165 (6): 1275-1280.
- [4] Hamamouch N, Li C, Seo PJ, et al. Expression of Arabidopsis pathogenesis-related genes during nematode infection. Molecular Plant Pathology, 2011, 12 (4): 355-364.
- [5] Datta SK, Muthukrishnan S. Pathogenesis-related proteins in plants [M]. Boca Raton: CRC Press, 1999: 21-47.
- [6] Fujibe T, Watanabe K, Nakajima N, et al. Accumulation of pathogenesis-related proteins in tobacco leaves irradiated with UVB. Journal of Plant Research, 2000, 113 (4): 387-394.
- [7] Slusarenko AJ, Fraser RS, van Loon LC. Mechanisms of Resistance to Plant Disease [M]. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, 2000: 371-478.
- [8] Bol JF, Linthorst HJM, Cornelissen BJC. Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. Annual Review of

- Phytopathology, 1990, 28 :113-138.
- [9] El-Kereamy A, El-Sharkawy I, Ramamoorthy R, et al. Prunus domestica pathogenesis-related protein-5 activates the defense response pathway and enhances the resistance to fungal infection. PLoS One, 2011, 6 (3) :e17973.
- [10] Van Loon LC, Pierpoint WS, Boller T, et al. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. Plant Molecular Biology Reporter, 1994, 12 (3) :245-264.
- [11] 张岗, 李依民, 张毅, 等. 条锈菌诱导的小麦病程相关蛋白 TaPR10 基因的克隆及特征分析. 中国农业科学, 2009, 42 (1) :110-116.
- [12] Gómez-Gómez L, Rubio-Moraga A, Ahrazem O. Molecular cloning and characterisation of a pathogenesis-related protein CsPR10 from Crocus sativus. Plant Biology, 2011, 13 (2) :297-303.
- [13] Van Loon LC, Van Strien EA. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1999, 55 : 85-97.
- [14] Park CJ, Kim KJ, Shin R, et al. Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway. The Plant Journal, 2004, 37 (2) :186-198.
- [15] Park CJ, An J, Shin YC, et al. Molecular characterization of pepper germin-like protein as the novel PR-16 family of pathogenesis-related proteins isolated during the resistance response to viral and bacterial infection. Planta, 2004, 219 (5) :797-806.
- [16] Selitrennikoff CP. Antifungal proteins. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67 (7) :2883-2894.
- [17] Kathiria P, Sidler C, Golubov A, et al. Tobacco mosaic virus infection results in an increase in recombination frequency and resistance to viral, bacterial, and fungal pathogens in the progeny of infected tobacco plants. Plant Physiology, 2010, 153 (4) :1859-1870.
- [18] 杜春梅, 李浩戈, 赵秀香, 等. 菌克毒克防治烟草普通花叶病毒(TMV)及对病程相关蛋白的诱导作用研究. 中国烟草科学, 2000 (3) :4-6.
- [19] 刘陟, 杜林方, 张年辉, 等. 宁南霉素诱导烟草酸性病程相关蛋白的研究. 应用与环境生物学报, 2005, 11 (5) :549-553.
- [20] Zheng HQ, Zhang Q, Li HX, et al. Over-expression of the triploid white poplar PtDrl01 gene in tobacco enhances resistance to tobacco mosaic virus. Plant Biology, 2011, 13 (1) :145-153.
- [21] Alexander D, Goodman RM, Gut-Rella M, et al. Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. Plant Biology, 1993, 90 (15) : 7327-7331.
- [22] 蓝海燕, 田颖川, 王长海, 等. 表达 β -1, 3- 葡聚糖酶及几丁质酶基因的转基因烟草及其抗真菌病研究. 遗传学报, 2000, 27 (1) :70-77.
- [23] Melchers LS, Lageweg W, Stuiver MH. The utility of PR genes to develop disease resistance in transgenic crops [C] . Aussois, France : 5th International Workshop on pathogenesis-related proteins. Signalling pathways and biological activities, 1998 :46.
- [24] Bachmann D, Rezzonico E, Retelska D, et al. Improvement of potato resistance to Phytophthora infestans by overexpressing antifungal hydrolases [C] . Aussois, France :5th International Workshop on pathogenesis-related proteins. Signalling pathways and biological activities, 1998 :57.
- [25] Kombrink E, Ancillo G. The role of chitinases in plant defense and plant development [C] . Spa, Belgium : 6th International Workshop on PR-proteins, 2001 :11.

(责任编辑 狄艳红)