

植物与病原真菌互作的分子生物学及其研究进展

蓝海燕 陈正华

(中国科学院遗传研究所, 北京 100101)

摘要 本文从病原真菌致病基因、无毒基因及产物的互作, 植物抗性基因、防卫基因及产物间的互作, 系统获得抗性, 信号传导系统等方面, 对植物与病原真菌互作的分子生物学及其进展进行了综合论述。

关键词 病原真菌 毒性基因 无毒基因 防卫基因 信号传导

自人类开始种植农作物以来, 真菌病害一直是育种学家及科学工作者关注的焦点。四十年代北美燕麦维多利亚疫病和 1970 年美国玉米小斑病两次人类现代历史上的真菌病害大流行所造成的饥荒和社会动荡, 使研究病原真菌与植物间的关系提高到更重要的地位。

当人类不断改良植物的同时, 病原真菌与植物之间的关系也随之变化。在植物与病原真菌相互作用的漫长过程中, 形成了高度专化和极端复杂的关系, 造就了一种相互选择, 协同进化的格局。随着植物分子病理学及重组 DNA 技术的迅速发展, 日益深化着人们对植物病原菌互作关系的认识。Flor (1947, 1971) 通过对亚麻锈病的研究为此学科奠定了遗传学基础。他的假说认为: 寄主中调节抗病的基因与病原菌中调节致病的基因一一对应。目前在抗病性中有两种模型: 一种是 Flor 提出的基因对基因的特异性, 激发子—受体模式; 而另一种是 Scheffer 等提出的毒素—解毒酶的模式, 这是在病原菌分泌寄主特异的毒素情况下的一种模式。随着近年来的转座子标签法及图谱克隆技术的应用, 在此领域已有很多突破性进展, 下面就这些方面作一综述。

1 病原真菌致病的分子基础

1.1 真菌致病因子及相关基因

致病基因是决定病原菌与寄主建立亲和互作关系, 并进而影响植物正常生理功能的基因。据估计, 一种病菌至少有 100 多个基因与致病有关。通常有几类物质被认为是病原真菌致病因子, 即: 毒素、各种酶(角质酶、纤维素酶等)及其它毒性因子。

1.1.1 寄主选择性真菌毒素及其相关基因

长期以来, 寄主选择性真菌毒素一直作为典型的致病因子, 多为萜类、脂类、糖苷、多糖、肽、蛋白质

及糖蛋白等低分子次生代谢产物。在感病品种中, 具有毒素的受体(receptor), 而抗病品种中则缺乏此受体, 或受体发生了变化导致不能识别毒素。

研究表明, 在产生寄主选择性毒素的旋孢腔菌的三个小种中, 三个不同的单基因 *Tox1*、*Tox2*、*Tox3* 分别控制 HMT-毒素、HC 毒素及 HV 毒素的产生。Janes(1993) 研究认为: *Cochliobolus carorum* 1 号小种产生 HC 毒素需要 HTS-1 和 HTS-2 两种酶, 它们均受 *Tox2* 基因位点控制, 该位点有一个 15.7kb 的基因 (HTS-1) 负责编码多功能肽合成酶^[1]。对 *Alternaria* 属的几种寄主专化性毒素的基因调控进行初步研究的结果表明, 它的产毒菌株间 DNA 同源性达 90 %。

到目前为止, 对毒素基因调控方面的研究较少。原因是产毒单基因控制毒素产生的机理还不清楚。一些假设认为: 某类毒素可能是在 *Tox* 基因的非功能位点存在下积累的、偶尔有植物毒性的中间代谢物。然而从其它许多寄主选择性毒素结构来看, 更有可能是 *Tox* 基因编码多功能酶或基因群^[2]。

1.1.2 病原真菌的角质酶基因及其致病性

在病原菌侵入植物过程中, 植物体表的角质层是病原真菌必须突破的第一层障碍。在过去的二十年时间中, 对角质酶在病原菌入侵中作用的研究证明, 角质酶在决定病原菌致病性方面有重要作用。此方面的研究较多的来自于豌豆真菌 *Fusarium solani* f. sp. *pisi*。1977 年就发现真菌对豌豆的侵染过程中有角质酶参与; 对分生孢子角质酶活性的抑制可减轻其入侵及病情发展; 角质酶缺陷的突变体表现出毒性减弱, 但当加入外源角质酶后, 其致病性可得以恢复。研究表明, 此菌对豌豆的毒性与角质酶表达量成正相关。当用基因降解法破坏角质酶基因表达时, 导致病原真菌对豌豆毒性下降^[4]。但

Stahl 等在 *F. solani f. sp. pisi* 的角质酶基因裂解突变体的研究中,对其作用得出矛盾的结果^[5],显示出在此问题上还没有一种确定的认识。

目前,已从好几种真菌中克隆到角质酶基因,来自于 *F. solani f. sp. pisi* 的报道最多。此基因的研究内容包括:重组角质酶基因的三维结构确定,基因调控分析,由转化介导的基因裂解分析^[5],及由转化介导的基因组增大的分析等方面的内容。

1.1.3 决定寄主范围的病原真菌抑制子(suppressor)

在植物与病原真菌长期互作并不断进化过程中,真菌产生出一种逃避寄主的识别或干扰寄主的防卫体系的机制。其一种策略是产生抑制子(suppressor)。它的作用可能是直接干扰激发子与受体的结合,或者是信号传导、基因激活及对来自植物的防卫因子活性的抑制等。目前已公认,寄主选择性毒素与寄主选择或非选择性的“抑制子”一起决定着真菌对寄主的致病性。

抑制子存在的证据来自于:当植物被毒性真菌小种侵染后,寄主对于非毒性的小种也变得很敏感。这说明,当病原菌感染植物后,寄主除了产生系统获得抗性,还可能向相反方向发展。到目前为止,只有少数几种植物的病原真菌抑制子得到研究。其中对豌豆病原真菌 *Mycosphaerella pinodes* 的研究较详细。从 *M. pinodes* 的萌发液中纯化出两种在结构上相似的糖肽——抑制素 A 和 B。用它们处理 *M. pinodes* 的寄主后,这些植物种对非病原真菌 *A. alternata* 变得高度敏感;而 *A. alternata* 被抑制素处理后,它所感染的寄主范围与 *M. pinodes* 很相似,这说明,抑制素 A 和 B 可能是决定 *M. pinodes* 对寄主种的特异性的关键因子^[3]。

更深入的细胞化学研究揭示出抑制子的作用机理。用抑制子处理豌豆叶片的观察结果显示:其质膜上的 ATPase 活性被抑制;而另一个实验则得出:豌豆抑制素 B 对非寄主的 ATPase 活性也产生抑制作用。这可能说明,抑制子的作用不仅仅是与激发子竞争受体,更有可能是影响其信号传导途径从而不能启动防御反应体系。

有关真菌病原菌抑制子的基因调控研究还较少,但对真菌致病毒素方面的研究发现一些病原真菌毒素具有双重作用,一方面可以致毒,另一方面又可充当激发子的功能,只是所需浓度不同^[2]。因此对于抑制子的属性、来源、与激发子的关系以及基因调控等方面,是否与毒素有相似之处,我们可从这一

角度进行研究,以对植物与病原菌互作的机制有一个新的认识。

1.1.4 某些病原真菌的毒性基因

在豌豆枯萎病菌(*Fusarium solani f. sp. pisi*)中存在致病力不同的菌株。其毒力强弱同细胞色素 p450 单加氧酶的活性呈正相关。致病菌可降解寄主体内的一种植保素(Pisatin),从而使寄主感病。Weltring 等(1989)^[6]通过建立强毒株系的基因文库,获得了毒性基因 *Pda*。用其转化无毒菌株可恢复侵染力。

Leong(1989)^[7]和 Kronstad 等(1989)^[8]对玉米黑粉病菌的致病基因 *B₁* 和 *B₂* 进行了分离和克隆。已知玉米黑粉病菌担孢子不具侵染性,只有融合生成双核菌丝才能侵染寄主。而 B 基因对双核菌丝的产生及二倍体厚垣孢子发育有重要作用,因此被认为是致病的主要基因。

1.2 病原真菌激发子与无毒基因及其产物

病原菌与植物互作初期常会产生激发子引发寄主防卫反应系统,激发子多属于寡多糖、多糖、多肽、蛋白和糖蛋白一类小分子化合物。其中某些化合物可以从真菌入侵的芽管结构中释放出来。普通激发子通常是由一种病原菌所有小种产生的,能激发一种植物所有基因型产生防卫反应。如寡聚 N-乙酰葡糖胺和寡聚半乳糖醛酸等对多种植物均具有活性。此类激发子通常也是真菌细胞的结构成份。小种专化性激发子也即无毒基因产物,它仅能激发那些含有相应抗性基因的植物品种的防卫反应体系,从而产生抗性反应。

1.2.1 病原真菌无毒基因(Avr)及产物

目前,已有 50 多个 *Avr* 基因被克隆,多数是从细菌中分离得到的,真菌中只有少数几个种克隆到无毒基因,这包括:半知菌中的蕃茄叶霉菌(*Cladosporium fulvum*)及大麦叶 Scald 病菌(*Rhynchosporium secalis*);最近用图谱克隆法从子囊菌中的 *M. grisea* 中也克隆到了无毒基因。表 1 概括了目前已克隆的真菌无毒基因及其产物特性。

对 *Avr4* 和 *Avr9* 基因产物的分析表明:被加工后的产物分别由 105(*Avr4*)和 28(*Avr9*)个氨基酸组成。*Avr9* 基因产物与含有 *Cir9* 基因的植物细胞膜具有高亲和力位点。它们都是富含半胱氨酸的蛋白。利用遗传互补及基因裂解方法对这些基因产物在致病过程中的作用进行分析,结果显示 *Avr4* 和 *Avr9* 基因对控制病原真菌的非致病性是充分而必要的^[9-11]。

表 1 - 1 已克隆的真菌无毒基因及产物 (Wolfgang Knogge, 1996)

真菌种	无毒基因	基因产物 ^a	活性	内在作用	专化水平	毒性恢复
<i>C. fulvum</i>	Avr4	135 (105)	激发子	未知	品种	点突变
<i>C. fulvum</i>	Avr9	63 (28)	激发子	未知	品种	缺失
<i>R. secalis</i>	nip1	82 (60)	激发子	Toxin	品种	缺失, 点突变
<i>M. grisea</i>	AVR2- YAMO	223	蛋白酶	未知	品种	缺失, 点突变
<i>M. grisea</i>	PWL1	147	未知	未知	种	缺失 ?
<i>M. grisea</i>	PWL2	145	未知	未知	种	缺失, 点突变

a: 表示前体蛋白氨基酸数及成熟蛋白氨基酸数 (括号内)

与 *Avr4* 相比, *Avr9* 基因存在真菌小种局限性, 它仅存在于那些对含有 *Cf-9* 基因的蕃茄表现无毒性的 *C. fulvum* 小种中。而其它小种缺乏此基因, 但 *Avr4* 基因在 *C. fulvum* 的所有小种中都存在^[10], 并在所有小种中均得以转录^[12], 不同的是, 在毒性小种中, *Avr4* 基因上由于单个核苷酸发生变化从而影响到其半胱氨酸残基; 或者是发生了转码突变。突变的 *Avr4* 蛋白或者是不分泌, 或者分泌后不能稳定存在^[12]。

在大麦中, 根据大麦对 *R. secalis* 的小种抗性基因 *Rrs1* 的核苷酸序列克隆到了相对应的两种类型的无毒基因 *nip1*。它们的产物为 60 个氨基酸, 也是富含半胱氨酸的蛋白。它们编码的蛋白有三个氨基酸不同, 但都具有激发子的活性。大多数毒性小种缺乏 *nip1* 基因。某些毒性小种带有此基因, 但其基因产物不具激发子活性, 分析表明其发生了氨基酸组分变化^[11]。

前两种无毒基因是先鉴定产物后分离基因, 而来自于子囊菌 *M. grisea* 中的品种一种专一性无毒基因是通过图谱克隆法获得的。此基因位于真菌染色体的近端部。它阻止真菌对 Yashiro-mohi 水稻品种的侵染。此基因编码一 223 个氨基酸的蛋白。此蛋白序列中有一小段氨基酸与中性 Zn^{2+} 蛋白酶的活性中心序列有同源性。此基因产物与 *Avr4*, *Avr9*, *nip1* 不同之处在于, 后者做为配体起作用, 而前者的产物可能是一种酶, 它作用于寄主或真菌的某种前体分子后, 释放出有活性的激发子。

从 *M. grisea* 中克隆的另外两种无毒基因 *PWL1* 或 *2* 可控制植物在种的水平上的抗病性。其作用方式与品种专化性无毒基因相似。*PWL* 基因编码一种富含甘氨酸的亲水蛋白, 并带有推测的分泌信号肽序列。与 *PWL* 基因具同源性的产物在许多真菌株系中都已检测到, 但它们的存在与真菌的毒性并无相关性。这表明, 可能此基因家族中并非所有成员都作为无毒基因起作用。从感染 Finter

millet 的病原真菌中分离到 *PWL3* 及感染 Weeping lovegrass 的病原真菌中分离的 *PWL4*, 用这两种基因转化 *M. grisea* 毒性菌株并不能阻止它对 Weeping lovegrass 的感染。对这两个基因的表达调控分析表明: 无活性的 *PWL4* 产物似乎是由于基因不适当的表达所引起。因为当它换用 *PWL1* 或 *PWL2* (均为无毒基因) 的启动子时就变成具有活性的产物; 而 *PWL3* 在同样处理时仍无活性。表明此基因产物本身就不具活性^[13]。*PWL* 基因也可通过缺失或点突变使病原真菌获得致病性^[14]。

1. 2. 2 无毒基因在真菌体内的作用

病原真菌显性无毒基因的表达赋予植物抗病性, 这显然与病原菌的致病性相违背。那么它在真菌中存在有何意义? 对其深入研究发现它们在病原菌中有其内在的作用。利用基因缺失及裂解突变对这些无毒基因内在功能的研究显示: *PWL* 基因和 *Avr9* 基因有可能是真菌在野外自然条件下正常生长所必需的^[15]。而 *nip1* 基因产物对许多单、双子叶植物具有寄主非选择毒素活性^[16]。以上的结果使人想到: *nip1* 基因产物的多重功能究竟是否由同一个植物受体介导? 对于此类问题的解答还需进一步实验证明。

2 植物防御系统及抗病基因和防卫基因

植物体防卫体系包括先天存在的抗菌物质及诱导后发生作用的抗病基因和防卫基因, 前者为被动抗病性后者为主动抗病性。在植物被动抗病性中只对少数几类抗菌物质的遗传特性及在植物中的抗病作用进行了研究。在主动抗病性中, 对防卫基因的研究已涉及很多方面, 而抗病基因方面, 因为涉及到植物复杂的基因组结构以及方法学上的问题, 虽已积累了大量的抗病基因表型的遗传信息, 但进展缓慢。随着近年来分子生物学技术的发展, 才使其逐渐变为现实。

2. 1 植物体内先天形成的抗真菌化合物及真菌对

其抵抗机制

这类因子多为植物中的一些次生代谢产物。如酚类、3,4-二羟苯甲酸、酚糖苷、不饱和内酯、硫化物、皂苷、生氰糖苷及硫苷等化合物^[17]。Osborn以皂苷、生氰糖苷及硫苷三类化合物为代表对其抑制真菌的作用进行了论述。在他的进展报告中主要论及的是皂苷类化合物,它是至今为止研究得最为透彻的一类。

皂苷(Saponins)属于糖基化合物,它广泛地分布在植物界。多种类型的皂苷在体外表现出潜在的抗真菌活性,而且即使在健康组织中它的含量也较高。通常在组织受到损伤时被激活,这使人联想到它在植物体内的抗真菌作用。而此作用早已在燕麦中被证实。此类化合物对真菌的毒性主要是由于它与真菌细胞膜上的甾类作用形成孔洞^[18],从而使真菌受到伤害而阻止其侵染。

硫苷(Glucosinolates)是一种含硫糖苷,广泛分布在十字花科植物中,它同样受到组织损伤的诱导。硫苷的水解产物在体外显示出广谱的抗真菌性,包括许多危害芸苔属或非芸苔属病原菌。它的作用机制虽然还不了解,但它在体外的抑真菌活性使人联想到利用此类化合物做为天然的杀真菌剂以防治禾谷类及果实和蔬菜收获后的真菌病害^[19]。

真菌病原菌在与此类植物互作过程中,也产生了抵抗机制,如对于皂苷的毒性,真菌发展了三种方式以自卫,第一种是利用降低侵入位点的pH值使皂苷失活;第二种是利用自身细胞膜上缺乏甾醇的方法使皂苷无法与真菌细胞膜结合;第三种是利用皂苷化合物解毒酶使其失活。

近几年来对植物抗病机制的研究多集中于对植保素生物合成及其它主动反应过程,对这种先天形成的抑菌化合物关注的较少。但这些化合物在植物体内常常作为潜在病原菌的第一道化学障碍而起到不可忽视的作用。因此对于此类物质及其作用机理和基因调控的研究是非常必要的。

2.2 植物抗病基因及其产物

目前已克隆的植物抗病基因主要有两种类型:一种编码的产物作为受体与无毒基因产物特异识别,从而激活防卫反应系统,现已克隆的大部分抗性基因属于此类。抗真菌病基因有番茄 Cf-9 基因抵抗病原菌 *C. fulvum*;亚麻 L6 基因为真菌 *M. Lini* 的抗性基因。最近,对番茄抗叶霉病基因 Cf-2、Cf-4 及 Cf-5 也得到克隆并进行了序列分析。另一种抗病基因的产物并不参与最初的信息传导途径上的

识别反应,而是编码一种酶,阻止毒素对寄主的伤害。最具代表性的是玉米对叶斑病真菌 *Cochliobolus carbonum* 的抗性机制。

对第一类抗性基因中 L6 及 Cf9 的抗性机制及基因调控已进行了比较深入的研究。番茄 Cf-9 基因及亚麻 L6 基因编码产物不属于蛋白激酶,但都具有不同数量的富含亮氨酸的重复序列(LRRs)。此重复单位可与病原菌无毒基因产物(配体)结合,并介导蛋白间的互作^[20]。L6 基因编码产物含有与 GTP/ATP 的磷酸结合有关的 P 环。二者比较,L6 基因上具有核苷酸结合位点,并具有一信号肽序列,而 Cf-9 虽有信号肽序列,却没有核苷酸结合位点;它编码的成熟蛋白的氨基端具有一个位置保守的半胱氨酸(与胞外蛋白及类似受体激酶蛋白相似),且含有一个由 37 个氨基酸组成的疏水跨膜域,其侧翼为带电荷的锚定域(胞内、外侧分别带正、负电荷)。最近克隆的番茄 Cf-2、Cf-4 及 Cf-5 基因的序列分析及编码产物分析表明,它们与 Cf9 一样,都具有富含亮氨酸重复序列的区域,只是亮氨酸数目有所不同。比较这四种基因编码的蛋白,显示 C 末端保守性强,而 N 端差异较大。这说明 C 末端可能与共同信号传递有关,而 N 末端则与特异的识别反应有关^[14]。这一类型抗病基因所涉及到的识别反应及信号传导途径与植物抗、感病机理密切相关,因此它的克隆与特性研究是目前热点。

在第二种类型抗病基因中,对玉米叶斑病的抗性基因研究的较多。玉米对 *C. carbonum* 的小种的抗性受两个基因 HM1 和 HM2 的调控,它们分别在 1 号和 2 号染色体上。HM1 使全生育期整株植物表现抗性,为完全显性;HM2 则为半显性,苗期表现感病,随植株成熟抗性逐渐增加。其中 HMT 编码 HC-毒素还原酶,此酶使 HC-毒素分子中的羰基钝化。据研究,此酶广泛存在于许多禾谷类作物中^[20],且不同植物中 HM1 基因序列具有高度保守性。最近从大麦中克隆了该基因,其氨基酸序列与玉米的有 80% 以上同源性。因此此类基因的克隆及其作用机理的研究在生产上具有重要意义,它将为因病原菌毒素致病的各种作物的抗病育种提供一条新的途径。

2.3 植物防卫基因及调控

在植物抗病反应中,防卫基因产物是真正参与抵抗病原物侵染的因素。防卫基因的种类在各种抗性中都是相似的,即在亲和或不亲和性互作中都会诱发防卫基因表达,关键在于防卫基因活化的速

度和水平极不相同。

对防卫反应相关的基因的分离及表达调控方面已有很多报道。主要包括以下几类:与植保素合成有关的基因,如苯丙氨酸裂解酶(PAL)、查尔酮合成酶(CHS)、脂氧合酶(LOX)等基因;与病程相关(PR)基因,如:几丁酶(CHI)、-1,3-葡聚糖酶(CLU)、-淀粉酶、溶菌酶等基因;与结构抗性有关的基因。如:富含羟脯氨酸糖蛋白(HRGP)基因、木质素合成有关酶的基因;还有核糖体失活蛋白(RIP)基因等。对于这些防卫基因表达调控的深入研究揭示出它们的共有规律:(1)大部分防卫基因为多基因家族。同一基因家族中成员之间存在一定的核苷酸序列同源性;(2)同一基因家族中不同成员负责对多种信号作出反应。不同基因家族可接受同一类刺激信号;(3)许多基因序列有功能分区,上游序列的三种顺式元件各司其职:激应性元件(RE)负责接受信号;启动子驱动结构基因表达;增强子加强信号反应和基因表达程序;(4)多数基因表达是诱导性的,而且是在转录水平上的;(5)许多基因上游区含有对基因表达起调控作用的不同长度的反向重复序列;(6)信号刺激与RE对信号的接收之间,一般都要有第二信使的作用^[21]。

目前许多防卫基因已得到克隆并成功地导入植物,转基因植株表现明显抗病性,如在抗真菌病方面,80年代末至90年代初出现了一大批利用几丁酶、葡聚糖酶及核糖体失活蛋白等基因单独或共同转化植物的工作。实验结果说明了此种途径的可行性。真菌中的聚半乳糖醛酸酶能降解植物胞壁,促进病原菌对寄主的侵染。而一些双子叶植物胞壁中存在此类酶的抑制蛋白(PGIP)可抑制该酶活性。PGIP富含胞外亮氨酸重复序列,能特异地与多聚半乳糖醛酸酶结合,并抑制其活性。目前已分离此基因并导入植物中使其高水平表达以提高植物抗真菌病能力。

防卫基因在植物体内快速和大量表达是植物抵抗病原菌侵染的必要条件,导入某一个或几个防卫基因对植物的抗病能力及抗病的广谱性都有较大局限性。近年来对抗性基因及无毒基因的深入研究提出了新的抗病策略,即利用抗病基因(R)与无毒基因(Avr)双组分系统并使其在病原菌诱导启动子控制之下,一旦受病原菌侵染,便会激活防卫系统,许多防卫基因同时表达,从而达到高效、广谱抗病效果。

3 植物与病原菌互作中的系统获得抗性与植物诱导抗性的利用

寄主的系统获得抗性是由局部感染后产生一类信号分子,顺着韧皮部传递到植株其它未侵染部位,从而激活各种防卫反应的机制。目前对于诱导系统获得抗性(SAR)产生的信号分子的研究已成为热点。其中研究较多的是水杨酸(SA)的作用。对病理相关蛋白(PR1a)基因调控元件的分析发现,SA处理与病原物所触发的抗性反应在该基因5端的关键调控序列均位于-643与-689之间。这可能意味着SA与病原诱导的SAR是通过同样的信号传导途径实现的^[22]。虽然SA是否作为最初传递信号分子起作用还不清楚,但已知它的分子作用。研究证明,在CaMV35S启动子的-85到-65之间的序列对SA有高度敏感性,它能使含此序列的GUS基因表达提高10-20倍^[23]。但有关系统获得抗性的信号分子方面还有许多问题尚待深入研究。此方面的进展将对进一步利用这种抗性具有很大推动作用。

植物诱导抗性是指在外界生物或非生物因子的刺激或作用下,使植物能够抵抗原来不能抵抗的病原物的侵染,从而使感病植物表现抗病,抗病植物更加抗病。其实质是由于诱导因子使植物产生了系统获得性抗性,在其后与挑战因子相遇时,预先激活的防卫反应对病原菌的入侵就具备了一定的抵御性。目前根据这一原理,利用各种生物的(病原物及近似种、病原物提取物等)和非生物的(物理的、化学的)诱导因子,以诱导植物抗病性,这已在黄瓜炭疽病,马铃薯晚疫病,菜豆炭疽病,亚麻锈病,大麦白粉病,小麦秆锈病,水稻稻瘟病等病害防御中获得成功^[24,25]。

植物诱导抗性的获得使植物原来处于蛰伏状态的防御机制得到激发而发挥作用,且具有一定的广谱性,不失为一种既安全又经济的方式。它正在被植物生理、病理学及生物化学领域的研究者所重视,有关此方面的研究也逐步深入。如关于诱导抗性的特征、诱因及机理的研究^[26];诱导抗性遗传机制的研究^[21];诱导抗性的基因控制与环境因子的关系的研究等。尽管其研究的时间还较短,虽还不能与成熟的植保技术竞争,但它在某些方面具有独特优势。如在保护那些品质好但较感病的植物品种方面具有其特殊意义。我们相信,它的深入研究将为植物病害的防治开辟一条诱导免疫的新途径。

4 植物与病原真菌互作中的信号传导

植物与病原菌的互作是一个复杂的过程,从接触识别开始至抗病或感病反应结束,其间包含着各种信号的传递过程,此过程是抗病研究中的热点和难点。

植物的抗病反应需要多种防卫反应系统同时作用,而不同的防卫反应之间需要有一些信号进行传递。在抗病基因与无毒基因互作时,已证明一些抗病基因产物为蛋白激酶,它当与无毒基因产物(配体)特异结合后,便与膜上其它类似受体蛋白互作,从而激活磷酸化级联信号传联网络,由此产生抗性反应。另一些受体类似于哺乳动物及果蝇的免疫系统中的某些蛋白的胞质域,它的功能是当有病原菌信号时,便能引起有关的转录因子激活并从胞质移位到细胞核。现已证明:激发子诱导下有反式因子向核转移^[27],从而激活防卫基因的表达。

利用抑制剂证明蛋白激酶和磷脂酶所引起的蛋白磷酸化是信号传递中早期的重要环节。如磷酸酶抑制剂增加蛋白磷酸化的结果,在一些植物中促进了防卫基因的表达及植保素累积^[28]。早期 Ca^{2+} 进入细胞被证明是植物防卫基因表达及活性氧释放的必要条件。

Dangl 等^[29]对 R 基因介导的抗性和非寄主抗性的信号传导途径有一个概括:当激发子与受体识别后的十分钟之内便产生 Ca^{2+} 离子流进入细胞,并产生离子通道,它是后续信号传递所必须的前提条件。而活性氧的骤增紧随其后,因为当抑制活性氧骤增从而防止防卫基因激活的情况下,却不影响离子流的形成。利用其他的激活子——抑制子实验研究发现,在活性氧产生过程中涉及许多的信号分子,如 G 蛋白、激酶、磷酸酶、磷酸脂酶等。利用放线菌酮处理并不抑制 PR-1 基因的转录,说明预先存在的转录因子可以协调早期的抗性反应。由活性氧激活胞质转录因子后,导致防卫基因的激活。由此产生过敏反应(HR),并产生局部和系统的信号,诱导系统抗性的获得。

最近 Hammond 和 Kosack 等^[12]利用 *C. fulvum* 纯化的 *Avr* 编码的多肽激发子与蕃茄 R 基因介导的互作反应试图建立起信号传导途径的顺序,结果表明,每一种不同的 R-*Avr* 互作体系中其信号系统都有所差异,但基本的框架正如上所述。但有一个关键的发现是:在 *Avr9* 与 *Cf-9* 的产物互作中,至少有半数的植物细胞死亡被很高的相对湿度所抑

制,然而抗真菌性仍然保持。这说明,细胞过敏性坏死不一定是植物产生抗病性的必要条件。

5 结束语

植物与病原菌互作是一个十分复杂的过程,其中包含着形态、生理、生化、分子生物等变化过程。目前由于研究手段的不断进步,对互作的分子基础的研究已有很大进展,但更深入的更艰难的问题还有待我们去探讨。植物与病原真菌的互作较之细菌而言又增添了许多困难。但已取得的研究结果及来自实践的需要定会促使此方面的研究不断深入,而研究手段的突破将极大地促进此方面的研究,从而迈向更高境界。

参考文献

- [1] Johes MJ, Dunkle LD. Phytopathology, 1993. 83.
- [2] 黄金皋. 植物病原毒素研究进展(第一卷), 1997. 北京: 中国科学技术出版社. p8 - 15.
- [3] Oku H, Shiraishi T, Ouchi S. Naturwissenschaften. 1980. 67: 310.
- [4] Rogers LM, Flaishman MA, Kolattukudy PE. Plant Cell. 1994. 6:935 - 945.
- [5] Stahl DJ, Theuerkauf A, Heitefuss R. Mol. Plaht Microbe Interact. 1994. 7:713 - 725.
- [6] Weltring KM, et al. Gene, 1989, 68:335 - 344
- [7] Leong SA. Annu. Rev. Phytopathol. ,1989, 27:463 - 481
- [8] Kronstad JW, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989, 86:978 - 982
- [9] Van den Ackerveken GFJM, Van Kan JAL and De Wit PJ GM. Plant J. 1992. 2:359 - 366.
- [10] Joosten MHAI, Cozijnsen AJ, and De Wit PJ GM. Nature. 1994. 367:384 - 387.
- [11] Rohe M, Gierlich A, Hermann H, et al. EMBO J. 1995. 14:4168 - 4177.
- [12] Hammond-kosack KE, Jones JDG. Plant Cell. 1996. 8:1773 - 1791.
- [13] Kang S, Sweigard JA, Valent B. Mol. Plant-Microbe Interact. 1995. 8:939 - 948.
- [14] Sweigard JA, Carroll AM, Kang S, et al. Plant Cell. 1995. 7: 1221 - 1233.
- [15] De Wit PJ GM. In Advances in Botanical Research, 1995. Vol. 21 J. H. Andrews and I. C. Tommerup, eds (London: Academic Press), PP, 147 - 185.
- [16] Wolfgang knogge. The Plant Cell, 1996. 8:1711 - 1722.
- [17] Price KR, et al. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 1987. 26:27 - 133.
- [18] Mari M, et al. Ann. Appl. Biol. 1993. 123:155 - 164.
- [19] Mackintosh C, et al. Plant J. 1994. 5:137.
- [20] Kobe B, et al. Trends in Biochem. Sci. 1994. 19:415 - 421.
- [21] 董汉松. 植物病理学报, 1996, 26(4):289 - 293.
- [22] 李德红等. 植物生理学通讯, 1995, 31(2):144 - 149.

- [23] Kuc J ,et al. Phytopathology ,1977. 67 :533 - 536.
 [24] 王军. 华南农业大学学报,1994 ,15(4) :121 - 126.
 [25] 李洪连等. 河南农业大学学报,1994 ,28(3) :219 - 223.
 [26] Anne E. Osbourn. The Plant Cell ,1996. 8 :1821 - 1831.
 [27] Raz W ,et al. Plant Cell ,1993. 5 :523.
 [28] Mehdy MC ,et al. Plant Physiol. ,1994. 105 :467.
 [29] Dangel JL ,Dietrich RA ,Richberg MH. The Plant Cell ,1996. 8 :1793 - 1807

Advances in Molecular Biology of Plant ——Pathogenic Fungus Interaction

Lan Haiyan Chen Zhenghua

(Institute of Genetics ,The Chinese Academy of Sciences ,Beijing 100101)

Abstract In this paper ,we summarized the advances in molecular biology of plant-pathogenic fungus interaction from following aspects :interaction between pathogenic genes ,avirulence genes and its products of fungi , and resistant genes ,defensive genes and its products of plants ;signal transduction system ;systematic acquired resistance ,etc.

(接第 25 页)

- [6] Florian M. et al. ,Biologicals ,1990 ,18 :156 - 164
 [7] 陈峰等 ,生物工程进展 ,1998 ,18(1) :31 - 35
 [8] Conradt H. et al. ,J. Biochem. ,1989 ,246(29) :17368 - 17373
 [9] Rotondaro U. et al. ,Mol. Biotechnology ,1997 ,7 :231 - 240
 [10] 陈坚等 ,高技术通讯 ,1997 ,6 :5 - 8
 [11] Anim. Cell. Technol. : Vaccines Genet. Med. , 1996 (Pub. 1997) ,14th :669 - 674
 [12] Chang H. et al. ,Gene ,1997 ,199 :293 - 301
 [13] 李凤知等 ,军事医学科学院院刊 ,1993 ,17(2) :89 - 92
 [14] Anim. Cell. Technol. :Basic Appl. Aspects ,Proc. Annu. Meet. Jpn. Assoc. Cell Technol. ,1995 (Pub 1996) ,8th :323 - 327
 [15] 戴燕等 ,生物化学与生物物理进展 ,1998 ,25(3) :254 - 258
 [16] Gu ,Xuejun et al. ,Biotechnol. Bioeng. ,1997 ,56(4) :353 - 360
 [17] Munzert ,Eberhard et al. ,Biotechnol. Bioeng. 1997 ,56(4) :441 - 448
 [18] Keen ,Michael J. et al. ,Cytotechnology ,1995 ,17(3) :153 - 163
 [19] Sunderji ,R. et al. ,Biotechnol. Bioeng. ,1997 ,55(1) :136 - 147
 [20] Cockett M. I. et al. ,Bio/ Technology ,1990 ,8 :662 - 667.
 [21] Gross G et al. ,J. Biotechnol. ,1995 ,41 :91 - 110
 [22] Christianc et al. ,Biologicals ,1994 ,22 :85 - 94
 [23] 刘文军等 ,病毒学报 ,1997 ,13(2) :164 - 168
 [24] 陈峰等 ,生物工程进展 ,1998 ,18(1) :31 - 35
 [25] Andre Lieber et al. ,Eur. J. Biochem. ,1993 ,217 :387 - 394
 [26] Mizushimas et al. ,Nucleic Acids. Res. ,1990 ,18(17) :5322
 [27] 陈度胜等 ,军事医学科学院院刊 ,1992 ,16(2) :96
 [28] 陈度胜等 ,生物工程学报 ,1993 ,9(3) :204 - 209
 [29] Petitoler D. et al. ,J. Biotechnol. ,1995 ,40 :169 - 178
 [30] Kozak M. J. Mol. Biol. 1987 ,196 :947 - 950
 [31] Murphy C. I. ,Protein Expr. Purif. ,1993 ,4 :349 - 357
 [32] Haas J. et al. ,Nucleic Acids. Res. ,1996 ,14 :3075 - 3087
 [33] Southard J. N. et al. ,Endocrinology ,1995 ,136 :2913 - 2921
 [34] Chen C. Y. A. et al. ,Trends Biochem. Sci. ,1995 ,20 :465 - 270
 [35] 太光平等 ,科学 ,1998 ,9 :60 - 63
 [36] Trudy H. et al. ,Plasmid ,1997 ,37 :155 - 158
 [37] Kirschhoff S. et al. ,Trends Genet ,1995 ,11 :219 - 229
 [38] Chireux M. et al. ,Anal. Biochem. ,1994 ,219 :147 - 153
 [39] Bronstein I. et al. ,Anal. Biochem. ,1994 ,219 :169 - 181
 [40] Chalfie M. et al. ,Science ,1994 ,263 :802 - 805
 [41] Kelbems R. K. ,Curr Opinion Biotechnol. ,1991 ,2 :723
 [42] Bebbington C. R. Patent WO 89/01036 ,1989
 [43] 刘文军等 ,高技术通讯 ,1997 ,2 :44 - 49
 [44] Bebbington C. R. et al. ,Bio/ Technology ,1992 ,10 :169 - 175
 [45] 沈孝 ,生物科学信息 ,1991 ,3(4) :17 - 19

The Recent Progress in the Upstream Studies on the Culture with CHO Cell

Shen Yehua Geng Xingdu

(Institute of Modern Separation Science ,Northwest University and the Key laboratory of Modern Separation Science of Shaanxi Province ,Xian 710069)

Abstract Chinese Hamster Ovary (CHO) cell is presently the chief expression system for the producing recombinant glycosylated protein. In this review paper mainly focus on the review of ,the recent progress problems ,int he future about this expression system for producing therapeutic proteins produced in biotechnology.

Key words CHO cell ,genetic engineered drug ,expression system.