

病程相关蛋白与植物抗病性关系的研究 及其在草坪草抗病育种中的应用

郭金芳,潘俊松,王琛,赵智燕,何亚丽*

(上海交通大学农业与生物学院,上海 200240)

摘要:植物被各类病原物侵染后,发生一系列的生理生化变化,包括细胞壁变厚,产生植保素以及防御相关蛋白。本研究从病程相关蛋白编码基因的诱导和表达、在植物组织细胞中的分布和运输、生物学功能与抗病性的关系、转基因植物的研究等方面依次进行总结,并对草坪病害的研究进展以及病程相关蛋白在草坪草等植物抗病育种工作中的作用与前景进行了讨论。

关键词:病程相关蛋白;植物抗病性;病害;抗病育种;草坪草

中图分类号:S432.2⁺3;S435.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-5759(2008)06-0156-08

* 植物被各类病原物侵染后,发生一系列的生理生化变化^[1],包括细胞壁变厚,产生植保素(phytoalexin)以及防御相关蛋白(defense-related proteins)。诱导产生的防御相关蛋白在许多接种真菌、卵菌、细菌、病毒以及经昆虫侵害的植物上都曾经被报道过。这些蛋白中的一些类型非常普遍,被划分为病程相关蛋白(pathogenesis-related proteins, PRs)的 17 个属。病程相关蛋白(PRs)最初由 Antoniwi 等^[2]在烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV)侵染的 2 个烟草(*Nicotiana tabacum*)品种 Xanthi-nc 和 Samsun NN 的叶片提取液中发现,当时称之为 b 蛋白,10 年后将其命名为病程相关蛋白。从此,国内外对 PRs 的研究十分活跃。关于 PRs 的定义、命名、分类国内外学者已经有较全面的综述^[3~5],本研究从 PRs 编码基因的诱导和表达、在植物组织细胞中的分布和运输、生物学功能与抗病性的关系、转基因植物的研究等方面依次进行总结,并对 PRs 在草坪草及其他植物抗病育种工作中的作用与前景进行探讨。

1 PRs 编码基因的诱导表达

诱导 PRs 产生或积累的因素主要有以下 4 种,其一,病原因素^[3,6]。包括真菌、细菌、病毒、类病毒、类菌原体、真菌或者细菌的培养滤液及其某种组分(如真菌细胞壁、细胞脂多糖);其二,生理因素^[7~9]。包括开花过程、叶片自然脱落、缺乏营养、质壁分离、愈伤组织产生等;其三,化学因素^[10,11]。包括乙烯(ethylene, ET)等高浓度激素、聚丙烯酸、多聚腺苷酸、2-氯乙烯磷酸、水杨酸(salicylic acid, SA)、乙酰水杨酸、氨基酸衍生物、抗病毒剂 2-硫脲嘧啶等;其四,物理因素^[12,13]。主要是机械损伤、紫外线和热处理等。关于 PRs 基因的化学因素诱导分子,除了上述 SA 及其衍生物和 ET 外,还有茉莉酸(jasmonic acid, JA)。过敏性坏死发生时,不仅 SA 的水平提高,JA 和 ET 的水平也会显著提高。例如,在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中,除 SA 诱导产生 PR-1,PR-2 和 PR-5 外,JA-和 ET-诱导基因,例如编码 PR-3 型碱性几丁质酶、PR-4 型类橡胶蛋白和 PR-12 防御素 PDF1.2 等的基因也被激活。PDF1.2 通常被认为是 JA 和 ET 诱导的防御信号标志。然而,也有研究结果表明,PDF1.2 的诱导非常有限,因为 SA 的累积会抑制 JA 的合成和活动。在烟草中 SA 诱导的 PR-1a 的量会因同时使用 JA 而降低。ET 使植物组织对 SA 的反应敏感,已经证明当用 ET 处理拟南芥后,诱导 PR-1 表达所需的 SA 浓度降低。这 3 个防御调节激素之间交叉作用的性质和作用大小取决于它们在植物体内浓度增加的时间和增加量,而这一交叉作用反过来也受病原菌侵染的影响^[14]。

* 收稿日期:2007-11-28;改回日期:2008-01-30

基金项目:上海市农委科技兴农重点攻关项目[沪农科攻字(2006)第 4-5 号]和国家科技支撑计划(2006BAD01A19-4-6)资助。

作者简介:郭金芳(1983-),女,山东蒙阴人,在读硕士。E-mail:jinfang06@163.com

* 通讯作者。E-mail: heyali@sjtu.edu.cn

2 PRs 在植物组织细胞中的分布和运输

除了由病原物侵染或者昆虫袭击诱导形成 PRs 之外,许多相同或者相近的蛋白(mRNAs)在健康植物的生长发育调节过程中、在特定的器官中也可以表达^[12,15]。试验结果表明,在同一个器官上,某种 PRs 可以经病原物诱导产生,也可以在植物特定的生长发育阶段不经过病原物的诱导而出现^[3]。例如:在未经侵染的番茄(*Lycopersicon esculentum*)幼叶上,找不到病原物诱导的碱性 PR-2 葡聚糖酶和 PR-3 几丁质酶,但是在其生命活动中可以积累这些蛋白,并且在根部富集。这些和其他的 PRs 也出现于各种植物的花器官中。PR-10 类蛋白分布广泛,存在于各种植物的花粉中。在叶片中,PRs 一般出现于表皮细胞、叶肉细胞和维管束中^[3]。例如:马铃薯(*Solanum tuberosum*)经致病疫霉(*Phytophthora infestans*)侵染时,诱导产生的 PR-1b 蛋白主要在侵染点和表皮层附近聚集。在受侵染的叶片中 PRs 积聚的部位还有气孔的保卫细胞、腺毛、含晶异细胞和维管束^[16]。已经从番茄、花茎甘蓝(*Brassica oleracea* var. *italica*)、葡萄(*Vitis vinifera*)、南瓜(*Cucurbita pepo*)和黄瓜(*Cucumis sativus*)的木质部汁液中分离得到 PRs。其他具有衍生结构的 PRs 在液泡中沉积。PR-10 类的蛋白是唯一一个所有成员都在细胞质内的蛋白家族。Murillo 等^[17]用来自玉米(*Zea mays*)的 PRs (PRms) 蛋白抗体研究确定真菌 *Gibberella fujikuroi* 感染的玉米胚根中的蛋白,研究结果显示 PRms 蛋白定位在分化的初生木质部组分的薄壁细胞之间的连接区域和维管束中心薄壁组织细胞。

许多 PRs 与 N 端信号肽连接后进入内质网空腔,之后分泌到非原质体中。这些蛋白在胞外积累,因此能够较容易地从胞间汁液中提取得到^[3]。Murillo 等^[17]通过对玉米中的 PRs 蛋白进行定位分析验证了胞间连丝能够运输植物蛋白。除此之外,从大麦(*Hordeum vulgare*)叶片的吐水中也曾提取到 PR 型的蛋白,这表明 PRs 向叶脉分泌并促使其在蒸腾流中吸收和运输^[3]。

Murillo 等^[17]通过免疫显微电镜分析结果表明,免疫活性部位与胞间连丝相关。尽管 PRms 的 mRNA 在分化的初生木质部组分的薄壁细胞之间的连接区域和维管束中心薄壁组织细胞中没有被检测到,但 PRms 出现在这些细胞中,因此认为这类细胞中的 PRms 蛋白是输入的,而不是在这些细胞中合成的。而 Breda 等^[18]研究发现,苜蓿(*Medicago sativa*)在受到假单胞杆菌(*Pseudomonas syringae* Pv. Pisi)浸润后叶片中能积累几种 mRNA,其中 1 个命名为 MsPR10-1,编码 1 个与 PR-10 非常相似的多肽。MsPR10-1 的转录子在非亲和性互作时期的叶片边缘中含量特别高,用 Northern 和原位杂交方法测定转录子在侵染区和非侵染区积累的结果表明,MsPR10-1 在靠近和远离侵染点的维管束中都有表达,为系统表达类型。

3 PRs 的生物功能

PR-1,PR-2,PR-3 和 PR-4 类的蛋白和蛋白酶抑制因子,在离区也可被诱导形成^[19],在细胞壁松弛时或者在受到机械损害的组织中抵御细菌和真菌等病原物的侵害。PR-2 类蛋白在烟草和水稻(*Oryza sativa*)的花粉生长发育中起必不可少的作用。除此之外,烟草、番茄和大豆(*Glycine max*)种子中的碱性 PR-2 和 PR-3 类的蛋白在种子萌发和生长过程中也起重要作用,可以保护暴露在外的种子内部组织免受微生物的侵染^[20~22]。胡萝卜(*Daucus carota*)在胚胎形成过程中突破球形期生长阶段需要 PR-3 和 PR-4 型蛋白。从绿豆(*Vigna radiata*)中分离得到的一类 PR-10 蛋白能与细胞分裂素连接,而从黄花唐松草(*Thalictrum flavum*)和贯叶连翘(*Hypericum perforatum*)中分离得到的类似 PR-10 类的蛋白,在植物的次生代谢中起代谢酶的作用^[23]。除此之外,PR-10 类蛋白还被认为具有包括连接芸薹素功能(brassinosteroid binding)在内的作为植物类固醇载体的一般功能(steroid carrier function)^[24]。通常出现在胚性组织中的几丁质酶与作用于阿拉伯半乳聚糖蛋白的酶活性有关。许多在叶片中由病原物诱导形成的蛋白,也是组成型蛋白,出现在果实、种子和块茎等贮存组织中。这些蛋白主要是一些蛋白酶和淀粉酶抑制因子,各种类型的凝集素、防御素、硫蛋白和一些转脂蛋白^[12]。除了抵抗昆虫取食和病原物的侵染,这些蛋白也能贮藏氮素^[25],使植物渡过不良的环境条件。这些发现表明,PRs 在植物的生长发育过程中起一定的作用,同时,通过它们的酶促反应,可能产生信号分子,这些分子在植物的形态发育过程中起内源激发子的作用。这些激发子也可以在激活植物其他类型的防御反应中起作用。

4 PRs 与植物抗病性的关系

PRs 首先在被 TMV 侵染的烟草叶片中检测到,它与过敏性反应(hypersensitive response, HR)相关。在以

后的研究中,PRs 对植物抗性表达的影响,与植物诱导抗性的关系,尤其是它与 HR 以及系统性获得抗性(systematic acquired resistance, SAR)的关系,以及对病原物的作用等引起人们的关注。

Ross^[26]首先提出植物获得性系统抗性(SAR),即在同一植物上未感染部位出现的抗性,这种抗性在植物受到再次侵染时,不仅对与初次感染相同的病原物表现出抗性,而且往往对其他类型的病原物也起作用。例如,经 TMV 感染后诱导的烟草系统抗性,不仅对 TMV 本身有作用,而且对其他的病原物如烟草枯斑病毒(*Tobacco necrosis necrovirus*, TNV)、真菌(如烟草黑胫病 *Phytophthora parasitica*)和细菌(如烟草野火病菌 *Pseudomonas tabaci*)也有抵抗作用。同样地,由病原物如 TNV、*Thielaviopsis basicola*(烟草根腐霉)和 *Pseudomonas syringae*(烟草野火病菌)诱发烟草植物产生局部感染后,也能诱发烟草对 TMV 的抗性。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,烟草对这些病原物的共同反应都是产生 PRs,并且在具有获得性系统抗性的未感染的叶片上也出现这些蛋白,这说明 PRs 和植物的 SAR 之间有紧密的联系^[4]。另有研究表明,病程相关蛋白与 SA 诱导的植物防卫反应联系密切,植物内源 SA 的积累对 PRs、寄主植物 SAR 和 HR 的诱导起重要的作用^[6]。Chen 等^[27]和 Takahashi 等^[28]发现,烟草内源 SA 含量的上升与烟草抵抗 TMV 侵染、编码 PR-1 这样的防卫相关基因的诱导表达相关联。

1915 年,正式把过敏反应(HR)这一名词引入植物病理学文献中,指出 HR 是植物受病原菌侵染后在不同器官上形成的小范围坏死,因而对活体营养和死体营养的寄生物产生有效的抑制作用^[29]。Munch-Garthoff^[30]研究发现,具有 *Sr5* 基因的 Pre-*Sr5* 品种对小麦秆锈菌(*Puccinia graminia* f. sp. *tritici*, Pgt)表现为高抗(0 级感染型),这与互作早期第一个吸器形成,穿透细胞,引起细胞过敏性反应密切相关。相反,具有 *Sr24* 基因的 Pre-*Sr24* 呈现中抗(2~3 级感染型),不会直接引起细胞死亡。2 个抗性不同的品种在人工接种 24~48 h 后都表现为 β -1,3-葡聚糖酶活性迅速上升。聚丙烯酰胺凝胶电泳分析结果也表明,2 个品种都出现一个主要分子量为 30 kDa 的胞外 β -1,3-葡聚糖酶同功酶。另 2 个次要的同功酶(32 和 23 kDa)仅在接种后期抗性较弱的品种 Pre-*Sr24* 中检测到。在抗性强的品种中编码 β -1,3-葡聚糖酶(Glu)和几丁质酶(Chi)的 mRNA 的积累快于这 2 种酶的活性增强和新同功酶的出现。在病原菌通过气孔侵染到叶片和引起典型过敏性反应发生前约 16 h 就能检测到 β -1,3-葡聚糖酶和几丁质酶的积累,这表明植物识别防卫基因激活信号的时间早于病原物和寄主细胞发生紧密接触的时间。Czermic 等^[31]研究发现,在烟草与细菌性青枯病菌(*Pseudomonas solanacearum*)的非亲和性互作中,有 2 个基因被激活,一个叫 *hsr*(过敏反应相关)基因,在过敏反应中被优先激活,另一个叫 *str*(敏感相关)基因,在亲和性和非亲和性互作中都强烈表达。对 2 个 *hsr*(*hsr515* 和 *hsr201*)cDNA 的复制以及表达的研究表明,*hsr515* 编码一个 P450 单氧酶,与鳄梨(*Persea americana*)成熟相关基因 CYP71A1 非常相似(在氨基酸水平上有 40.6% 的同源),而 *hsr201* 与番茄成熟时表达的一个基因 *PTom36* 有 58.6% 的同源性。*Hsr* 基因产物似乎具有多种功能且作用特点相当保守。在被无毒性的青枯病菌(*P. solanacearum*)或带有 *hrpZ* 基因的荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)侵染的叶片区域积累相应的 mRNAs。*hrpZ* 基因在植物的正常生长发育过程中可编码一个可以引起坏死反应的多肽,harpin 蛋白,或者不表达。这些研究表明,PR 蛋白的表达与植物过敏反应密切相关。

5 病程相关蛋白基因及其遗传转化

Karen 等^[32]通过研究发现,在花椰菜花叶病毒(*Cauliflower mosaic virus*, CaMV)35s 启动子的控制下,组成型表达一个大豆几丁质酶基因的转基因烟草植株和油菜(*Brassica chinensis* var. *oleifera*)植株,与对照植株或野生型植株相比,在生长发育过程中并未表现出异常,但在接种真菌病原物立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)的土壤中成活能力增强了,同时,病症的发展也被延缓。Sarowar 等^[33]对转化来自辣椒(*Capsicum frutescens*)的一个编码碱性 PR-1 蛋白基因(CABPR1)的烟草植物进行了研究,结果表明这个基因在烟草中的表达,不仅增强了烟草对重金属胁迫的抗性,也增强了其对卵菌病原物烟草黑胫病菌(*Phytophthora nicotianae*)、细菌性病原物茄科雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)和烟草野火病菌(*Pseudomonas syringae* pv. *Tabaci*)的抗性。据研究表明,转化来自水稻的 PR-5 基因,使其在水稻、小麦(*Triticum aestivum*)、烟草和胡萝卜中表达,可以减少立枯丝核菌对水稻、镰刀菌(*Fusarium graminearum*)对小麦、烟草赤星病菌(*A. alternata*)对烟草、胡萝卜各类黑斑病菌(*A.*

alternate)、丝核菌和菌核病(*S. sclerotiorum*)对胡萝卜的侵染。转来自番茄渗透蛋白(osmotin)的柑橘类植物,对柑橘褐腐疫酶病菌(*Phytophthora citrophthora*)的抗性增强。张丽华等^[34]利用烟草碱性 β -1,3-葡聚糖酶基因(*Glu-Ac*)及菜豆(*Phaseolus vulgaris*)碱性几丁质酶基因(*Chi3*)构建了组成型表达的双价植物表达载体 BLGC,利用农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导法转化烟草,并得到了转基因植株。活体接菌试验初步表明,转基因植株与对照相比,对赤星病菌(*Alternaria alternate*)的侵染具有较强的抵抗能力。张志忠等^[35]构建了同时含有番茄几丁质酶基因和 β -1,3-葡聚糖酶基因的双价抗真菌基因植物表达载体,以西瓜(*Citrullus lanatus*)子叶块为外植体,采用农杆菌介导法,将 *Chi3* 和 *Glu-Ac* 同时导入西瓜栽培种“中育一号”,共获得 46 株抗性再生植株。利用尖孢镰刀菌西瓜专化型(*Fusarium oxysporum*)对转基因植株进行离体叶片抗病性检测,表明转基因植株对枯萎病的抗性均有不同程度的增强。

但是,也有一些转化编码 PRs 基因的植物没有取得理想的效果。Bolle 等^[36]把紫茉莉(*Mirabilis jalapa*)和尾穗苋(*Amaranthus caudatus*)的编码种子抗微生物多肽(AMPs)基因转化到烟草中,结果表明,从转基因烟草中提纯的 AMP₂ 在离体条件下的抗真菌活性类似于原蛋白的活性,但所有的转基因烟草植物对灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)和烟草赤星病菌的抗性均没有增强。相似的试验结果也曾其他植物上被报道过。在黄瓜(*Cucumis sativus*)中转入来自大豆、矮牵牛(*Petunia hybrida*)或者烟草的具有抑制立枯丝核菌生长的一个碱性 PR-3 类几丁质酶,它对立枯丝核菌的抗性并没有增强。然而,这并不能表明这些蛋白在活体情况下对这种病原物不具备基本的抗性,或者在活体条件下这个病原物对这些防御不敏感^[3]。在病原物渗入植物组织之前,胞外病程相关蛋白已经与侵入者建立关系,这种关系被认为是植物防御系统的第一道屏障^[3,29]。然而,蛋白的聚集需要时间。因此,一种侵染力较强的病原物,在诱导型 PRs 变得有效之前,可能已经进入到深层组织。结果,这些 PRs 可能更主要的是抵抗接着来的侵染,或者组成由系统获得抗性(SAR)所支持的生物化学抗性的一部分,抵御以后的侵染^[3]。

6 草坪病害的研究进展

草坪草种类繁多,一般按地理分布与温度的生态适应性将草坪草分为冷季型(cool-season turfgrass)与暖季型(warm-season turfgrass)草坪草。冷季型草坪草中高羊茅(*Festuca arundinacea*)和草地早熟禾(*Poa pratensis*)的周年绿色期相对较长,在长江中下游一定的建植养护管理条件下能够周年常绿。随着我国草坪面积的不断增加,草坪病害也不断加剧,一种草坪疾病的流行,可导致草坪局部或大部分面积的衰败直至死亡,使整个草坪遭到毁灭。因此草坪病害已上升为影响草坪景观的重要因素之一^[37]。

1914 年美国高尔夫球协会主席 Piper 在翦股颖(*Agrostis stolonifera*)上鉴定出立枯丝核菌,Taylor 将其所致病害命名为 Brown patch(褐斑病),这标志着现代草坪病理学的开始。1917 年美国农业部 John 和 Arnold 等曾推广使用波尔多液防治这类病害。草坪草的真菌病害是草坪草上的主要病害,占病害总数的 80% 以上。国内外的学者都报道了不同草坪草上的真菌病害,截至 1994 年,仅我国记录的禾本科草坪草和牧草的病原真菌就有 391 种^[38]。我国的草坪草真菌病害研究尚属起步阶段,与国外的研究水平有很大的差距。陈莉等^[37]对合肥市草坪病害进行了调查研究,结果表明,合肥市草坪病害种类有白粉病、锈病、炭疽病、黑粉病、丝核菌综合症,其中以锈病和丝核菌综合症分布最广,危害最严重。雷玉明和张建文^[39]对甘肃省草本植物上寄生的柱隔孢菌(*Ramularia*)进行了调查研究,对 5 种草本植物柱隔孢菌进行了鉴定,并对其危害情况进行了报道。贾凤娇等^[40]对日本结缕草(*Zoysia japonica*)叶斑病病原进行了鉴定并对其生物学特性进行了研究。在众多的草坪草真菌病害中,褐斑病(*Rhizoctonia solani*)和腐霉枯萎病(*Pythium blight*)是我国夏季草地早熟禾、多年生黑麦草(*Lolium perenne*)和高羊茅上发病最为严重的病害^[41,42]。真菌病害引起各种叶枯、叶斑、腐烂、坏死或植株萎蔫死亡等症状,造成空秃,影响观瞻和造成经济损失。

目前国内针对这几种病害主要采用化学防治并辅之以农业栽培措施调控。张金林等^[43]对防治草坪病害的杀菌剂进行了筛选,为有效选择杀菌剂进行草坪草的病害防治提供了技术参考和依据。近几年,生物防治技术在草坪草病害的防治方面也有一些应用。徐秉良和郁继华^[44]对深绿木霉 *T₂* (*Trichoderma atroviride*)在不同环境条件下对叶部病害病原菌离蠕孢(*Bipolaris sorokiniana*)的抑制作用和抑菌机制进行了研究,为生防制剂应用于

草坪病害的防治提供了依据。后有学者认为,木霉制剂对草坪草镰刀枯萎病(*Fusarium* spp.)和褐斑病的防效仍需进一步的试验来验证^[45]。除此之外,张伟丽等^[46]对防御酶在柱花草接种炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)后的活性反应进行了研究,结果表明,柱花草接种后过氧化物酶(POD),多酚氧化酶(PPO)和 β -1,3-葡聚糖酶活性被诱导的时间及程度与品种的抗病性大小有关。

可以看出,国内关于草坪草病害的研究,多集中在病原物的鉴定以及探索有效药剂进行防治的方面,而要解决常绿草坪病虫害化学防治带来的环境问题,建设人与自然和谐的生态城市,必须将传统的育种方式与转基因技术相结合,开展常绿草坪草的抗病育种研究,提高常绿冷季型草坪草的抗病性以及越冬的能力,以降低用药量。

7 PRs 的研究在草坪草抗病育种中的应用与展望

随着对各类 PRs 更为深入的了解和各类抗性增强的转基因植物体的获得,以草坪草为研究对象开展 PRs 的研究和遗传转化工作也有了少量报道,但与在烟草和蔬菜作物上的研究相比尚属于起步阶段。Guo 等^[47]研究了转化来自拟南芥 *Henych* 的基因(*PR5K*)的草坪草植物匍匐剪股颖(*Agrostis stolonifera*)。PR5K 是一种受体蛋白激酶,它的主功能区与 PR-5 同源。田间接种币斑病菌(*Sclerotinia homoeocarpa*)试验表明,转 PR5K 基因的匍匐剪股颖与未转化的对照相比,其病害出现的时间可以延缓 29~45 d。Fu 等^[48]通过根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导法,将水稻类甜味蛋白基因(*TLPD34*)导入匍匐剪股颖中。田间试验表明,转基因植株体对币斑病的抗性有所增强。Dong 等^[49]采用根癌农杆菌介导法,将 T4 噬菌体溶菌酶导入高羊茅中,得到 13 株转化植株体。把从高羊茅上分离得到的 2 个稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*)生理小种的混合物接种到转化植株上,其中 6 株表现出较高的抗性。在这 6 株中又有 3 株对从高羊茅上分离得到的褐斑病菌也具有较高的抗性。Chai 等^[50]将几丁质酶基因转入匍匐剪股颖中,之后通过实验室和温室接种转化植株体,试验结果表明,40% 的转化株对褐斑病菌的抗性增强。

在抗病转基因研究方面,由于病原菌的复杂性和易变性,新的优势小种 2~3 年就会流行,因此成功的关键在于选择广谱高效的抗病基因。随着对植物抗病机理的深入了解,人们发现植物受到病原菌的侵蚀会有一个感知与防御体系,这些基因包括直接参与防御反应的抗菌蛋白如几丁质酶、葡聚糖酶等。如前所述,几丁质酶和葡聚糖酶都属于 PRs,在体外表现出抗菌活性。由于许多真菌细胞壁的主要组分就是几丁质和葡聚糖,所以一般认为在植物细胞中过量表达这类酶会引起菌丝水解,从而延缓菌丝生长和发育速度。转 Chi、Glu 和/或 Chi+Glu 基因水稻表现出了可遗传的抗纹枯病和真菌病害的特性^[51]。而发生在草坪草上的褐斑病也被称为纹枯病,与水稻纹枯病的病原相同,均可被井冈霉素控制。把外源 Chi、Glu 和/或 Chi+Glu 基因转入矮生常绿高羊茅和草地早熟禾新品种系中有望提高现有优质常绿草坪草新品种(系)对常见病害褐斑病等的抗性。转 PRs 基因在其他植物上的成功,特别是将几丁质酶基因与 β -1,3-葡聚糖酶基因转入植物体内,获得抗性增强植株体的成功,为草坪草抗病育种工作奠定了理论与技术基础。此外,PRs 的分离与鉴定,除了有利于加深对草坪草的抗病机理的研究,还有可能提供 PRs 分子标记,用于抗病单株的辅助选择。

8 结论

综上所述,经过众多科学工作者的努力,PRs 的研究及其与植物诱导抗性之间的关系探索,取得了可喜的进展。国外对转病程相关蛋白基因植物的研究开展较早,到目前为止,已在多种植物上进行了系统的研究报道。国内对植物转化 PRs 的研究也十分活跃,特别是对农杆菌介导的几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶基因转化马铃薯、黄瓜和花生(*Arachis hypogaea*)的方法进行了系统的研究。各类转基因植物的成功,使得某些植物在一定胁迫条件下的抗性有所提高。但是,也有研究表明,一些转病程相关蛋白基因的植物,并没有达到使其抗性提高这一目的。因此,就各类病程相关蛋白对靶标病原物的作用机理和如何使目的基因在转基因植物中有效表达的机制展开研究,筛选出广谱高抗的植物群体,对植物抗病育种具有十分重要的作用,需要科学工作者不断的做出努力。同时,现有的报道中,已有在草坪草植物高羊茅、匍匐剪股颖上成功运用转抗性基因技术的范例,为草坪科学工作者利用转基因技术进行草坪草的抗病育种工作打下了基础。

参考文献:

- [1] 许志刚. 普通植物病理学(第二版)[M]. 北京: 农业出版社, 2002. 2-7.
- [2] Antoniw J F, Ritter C E, Pierpoint W S, *et al.* Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV[J]. *Journal of General Virology*, 1980, 47: 79-87.
- [3] Vanloon L C, Rep M, Pieterse C M J. Signification of inducible defense-related proteins in infected plants[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2006, 44: 135-162.
- [4] 刘利华, 林齐英, 谢华安, 等. 病程相关蛋白与植物抗病性研究[J]. *福建农业学报*, 1999, 14(3): 53-58.
- [5] 杜良成, 王钧. 病原相关蛋白及其在植物抗病中的作用[J]. *植物生理学通讯*, 1990, 4: 1-6.
- [6] Vanloon L C. Occurrence and properties of plant pathogenesis-related proteins[J]. *Mechanisms of Resistance to Plant Diseases*, 1999, 29: 1-19.
- [7] Buchanan-Wollaston V, Earl S, Harrison E, *et al.* The molecular analysis of leaf senescence-a genomics approach[J]. *Plant Biotechnology*, 2003, 1: 3-22.
- [8] Davoine C, Le Deunff E, Ledger N, *et al.* Specific and constitutive expression of oxalate oxidase during the ageing of leaf sheaths of ryegrass stubble[J]. *Plant Cell Environment*, 2001, 24: 1033-1043.
- [9] Quirino B F, Noh Y S, Himelblau E, *et al.* Molecular aspects of leaf senescence: Trends[J]. *Plant Science*, 2000, 5: 278-282.
- [10] Pieterse C M J, Van Pelt J A, Ton J, *et al.* Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* requires sensitivity to jasmonate and ethylene but is not accompanied by an increase in their production[J]. *Physiology Molecular Plant Pathology*, 2000, 57: 123-134.
- [11] Seo S, Seto H, Yamakawa H, *et al.* Transient accumulation of jasmonic acid during the synchronized hypersensitive cell death in tobacco mosaic virus-infected tobacco leaves[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2001, 14: 261-264.
- [12] Broekaert W F, Terras F R G, Cammue B P A, *et al.* Induced and preformed antimicrobial proteins[A]. *Mechanisms of Resistance to Plant Diseases*[M]. Kluwer Academic Publishers, 2000. 371-478.
- [13] Takeda S, Sato F, Ida K, *et al.* Characterization of polypeptides that accumulate in cultured *Nicotiana tabacum* cells[J]. *Plant Cell Physiology*, 1990, 31: 215-221.
- [14] Martin D V, Vivian R V O, Remco M P V P, *et al.* Signal signature and transcriptome changes of *Arabidopsis* during pathogen and insect attack[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2005, 18: 923-937.
- [15] Veronese P, Ruiz M T, Coca M A, *et al.* In defense against pathogens: Both plant sentinels and foot soldiers need to know the enemy[J]. *Plant Physiology*, 2003, 131: 1580-1590.
- [16] Hoegen E, Stromberg A, Pihlgren U, *et al.* Primary structure and tissue-specific expression of the pathogenesis-related protein PR-1b in potato[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2002, 3: 329-345.
- [17] Murillo I, Cavallarin L, Segundo B S. The maize pathogenesis-related PRms protein localizes to plasmodesmata in maize radicles[J]. *Plant Cell*, 1997, 9(2): 145-156.
- [18] Breda C, Sallaud C, El Turk J, *et al.* Defense reaction in *Medicago sativa*: A gene encoding a class 10 PR protein is expressed in vascular bundles[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1996, 9(8): 713-719.
- [19] Roberts J, Whitelaw C, Gonzalez C Z, *et al.* Cell separation processes in plants-models, mechanisms and manipulation[J]. *Annals of Botany*, 2000, 86: 223-235.
- [20] Leubner-Metzger G. β -1,3-glucanase gene expression in low-hydrated seeds as a mechanism for dormancy release during tobacco after-ripening[J]. *Plant Journal*, 2005, 41: 133-145.
- [21] Morohashi Y, Matsushima H. Development of β -1,3-glucanase activity in germinated tomato seeds[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2000, 51: 1381-1387.
- [22] Wu C-T, Leubner-Metzger G, Meins F, *et al.* Class I β -1, 3-glucanase and chitinase are expressed in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radicle emergence[J]. *Plant Physiology*, 2001, 126: 1299-1313.
- [23] Samanani N, Liscombe D K, Facchini P J. Molecular cloning and characterization of norcoclaurine synthase, an enzyme cata-

- lyzing the first committed step in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis[J]. *Plant Journal*, 2004, 40(2): 302-313.
- [24] Markovic H Z, Degano M, Lamba D, *et al.* Crystal structure of a hypoallergenic isoform of the major birch pollen allergen Bet v1 and its likely biological function as a plant steroid carrier[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2003, 325(1): 123-133.
- [25] Peumans W J, Proost P, Swennen R L, *et al.* The abundant class III chitinase homolog in young developing banana fruits behaves as a transient vegetative storage protein and most probably serves as an important supply of amino acids for the synthesis of ripening-associated proteins[J]. *Plant Physiology*, 2002, 130: 1063-1072.
- [26] Ross A F. *Viruses of Plants*[M]. Amsterdam: North-Holland Publishing Company, 1966. 127.
- [27] Chen Z, Malamy J, Henning J, *et al.* Induction, modification, and transduction of the salicylic acid signal in plant defense responses[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, 92(10): 4134-4137.
- [28] Takahashi H, Chen Z, Du H, *et al.* Development of necrosis and activation of disease resistance in transgenic tobacco plants with severely reduced catalase levels[J]. *Plant Journal*, 1997, 11(5): 993-1005.
- [29] 王金生. 分子植物病理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999. 59-62.
- [30] Munch-Garhoff S, Neuhaus J M, Boller T, *et al.* Expression of beta-1, 3-glucanase and chitinase in healthy, stemrust-affected and elicitor treated nearisogenic wheat lines showing Sr52 or Sr24 specified race specific rust resistance[J]. *Planta*, 1997, 20(2): 235-244.
- [31] Czermic P, Huang H C, Marco Y. Characterization of *hsr201* and *hsr515*, by phytopathogenic bacteria[J]. *Plant Molecular Biology*, 1996, 31(2): 255-265.
- [32] Karen B, Ilan C, Mark H, *et al.* Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*[J]. *Science*, 1991, 254: 1194-1197.
- [33] Sarowar S, Kim Y J, Kim E N, *et al.* Overexpression of a pepper basic pathogenesis-related protein 1 gene in tobacco plants enhances resistance to heavy metal and pathogen stresses[J]. *Plant Cell Reports*, 2005, 24(4): 216-224.
- [34] 张丽华, 蓝海燕, 田颖川, 等. 表达 β -1, 3-葡聚糖酶及几丁质酶基因的转基因烟草及抗真菌病的研究[J]. *遗传学报*, 2000, 27(1): 70-77.
- [35] 张志忠, 吴菁华, 吕柳新, 等. 转番茄几丁质酶基因西瓜植株的获得及其抗病性研究[J]. *西北植物学报*, 2005, 25(10): 1943-1946.
- [36] Bolle M F, Osborn R W, Goderis I J, *et al.* Antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* and *Amaranthus caudatus*: Expression, processing, localization and biological activity in transgenic tobacco[J]. *Plant Molecular Biology*, 1993, 31(5): 993-1008.
- [37] 陈莉, 胡杰苗, 丁克坚, 等. 合肥市草坪主要病害种类调查及病原鉴定[J]. *草业科学*, 2006, 23(5): 100-103.
- [38] 何秋, 刘建秀. 草坪草真菌病害的研究进展[J]. *草业科学*, 2006, 23(4): 95-104.
- [39] 雷玉明, 张健文. 甘肃省草本植物上柱隔孢菌鉴定及新纪录病害[J]. *草业科学*, 2007, 24(2): 52-57.
- [40] 贾凤娇, 王义勋, 尹少华, 等. 日本结缕草叶斑病病原鉴定及其生物学特性研究[J]. *草业科学*, 2007, 24(2): 81-85.
- [41] 马忠华, 徐传祥. 上海地区冷季型草坪主要病害鉴定及防治策略[J]. *复旦学报(自然科学版)*, 1999, 38(5): 553-556.
- [42] 李崴, 李秀文, 栗振华, 等. 天津草坪病害诊断技术研究初报[J]. *天津农林科技*, 2003, (4): 12-14.
- [43] 张金林, 庞民好, 刘颖超, 等. 不同杀菌剂对草坪草病原菌毒力的作用测定[J]. *草业学报*, 2006, 15(1): 58-61.
- [44] 徐秉良, 郁继华. 深绿木霉菌株 T2 对草坪草叶枯病菌的拮抗作用及机制[J]. *草业学报*, 2006, 15(4): 71-75.
- [45] 姚彦坡, 王稚玲, 吕国忠. 木霉对草坪上 2 种重要土传病害生防效果的研究[J]. *草业科学*, 2007, 24(8): 96-99.
- [46] 张伟丽, 郭振飞, 何华玄. 柱花草接种炭疽菌后防御酶活性反应的品种间差异[J]. *草业学报*, 2007, 16(3): 29-37.
- [47] Guo Z, Bonos S, Meyer W A, *et al.* Transgenic creeping bentgrass with delayed dollar spot symptoms[J]. *Molecular Breeding*, 2003, 11: 95-101.
- [48] Fu D L, Tisserat N A, Xiao Y M, *et al.* Overexpression of rice TLDP34 enhances dollar-spot resistance in transgenic bentgrass[J]. *Plant Science*, 2005, 168(3): 671-680.
- [49] Dong S F, Shew H D, Tredway L P, *et al.* Expression of the bacteriophage T4 lysozyme gene in tall fescue confers resistance to gray leaf spot and brown patch Diseases[J]. *Transgenic Research*, 2008, 17: 47-57.

- [50] Chai B, Maqbool S B, Hajela R K, *et al.* Cloning of a chitinase-like cDNA (*hs2*), its transfer to creeping bentgrass (*Agrostis palustris* Huds.) and development of brown patch (*Rhizoctonia solani*) disease resistant transgenic lines[J]. Plant Science, 2002, 163: 183-193.
- [51] 许明辉, 李成云, 李进斌, 等. 转溶菌酶基因水稻稻瘟病抗谱分析[J]. 中国农业科学, 2003, 36(4): 387-392.

**Research on relationships of pathogenesis-related proteins with plant disease resistance
and their application in turfgrass disease-resistance breeding**

GUO Jin-fang, PAN Jun-song, WANG Chen, ZHAO Zhi-yan, HE Ya-li

(School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: When plants are infected by any kinds of pathogen, they cause a series of physiological and biochemical changes, including the reinforcement of cell walls, the production of phytoalexins, and the synthesis of defense-related proteins. Studies of pathogenesis-related proteins (PRs) in induction and expression of encoding genes, their localization and transportation in plant tissues and cells, relationships between their biological functions and plant disease resistance, and research on transgenic plants are reviewed here. Studies on diseases in turfgrass and the prospect for application of PRs to disease-resistance breeding of turfgrasses as well as other plants are also discussed in this paper.

Key words: pathogenesis-related proteins; plant disease resistance; diseases; disease-resistant breeding; turf-grass