

分类号

密级

湖南农业大学

博士学位论文

苎麻疫霉、辣椒疫霉毒素的生物化学
与分子遗传学研究

Biochemistry and Molecular Genetics of Toxin from
Phytophthora boehmeriae and *Phytophthora capsici*

研 究 生: 谢丙炎

指导教师: 李宗道 教 授

罗 宽 教 授

专 业: 作物栽培学与耕作学

研究方向: 植物病理学

中国·长沙

一九九八年六月

分类号

密级

湖南农业大学

博士学位论文

苎麻疫霉、辣椒疫霉毒素的生物化学
与分子遗传学研究

Biochemistry and Molecular Genetics of Toxin from
Phytophthora boehmeriae and *Phytophthora capsici*

研究生: 谢丙炎

指导教师: 李宗道 教授

罗 宽 教 授

专 业: 作物栽培学与耕作学

研究方向: 植物病理学

中国·长沙

一九九八年六月

目录

中文摘要

英文摘要

引言

第一篇 疫霉菌 Elicitin 激发蛋白研究进展(综述)-----9

1 引言-----9

2 Elicitin 的发现-----9

3 Elicitin 的结构与性质-----10

3.1 Elicitin 的理化性质-----10

3.2 Elicitin 的氨基酸序列-----12

3.3 Elicitin 的高级结构-----15

4 Elicitin 诱导抗病作用及其机理-----17

4.1 Elicitin 的诱导抗病作用-----17

4.2 Elicitin 介导植物抗病信号作用机理-----18

5 Elicitin 在疫霉菌中可能的生物学意义-----20

6 疫霉菌基因组中 Elicitin 基因结构-----21

7 Elicitin 基因在抗病基因工程的应用前景-----24

第二篇 苎麻疫霉素激发蛋白-----25

第 1 章 苎麻疫霉素激发蛋白的纯化及其特性-----25

1 材料与方法-----26

2 结果分析-----28

2.1 毒素激发蛋白的纯化-----28

2.2 毒素激发蛋白的部分特性-----32

3 讨论-----35

第 2 章 苎麻疫霉激发蛋白基因断裂现象初探-----39

1 材料与方法-----40

2 结果分析-----44

2.1 特异 PCR 扩增产物	44
2.2 特异扩增 DNA 的克隆及其筛选	44
2.3 阳性克隆的酶切鉴定	46
2.4 特异扩增 DNA 片段序列结构	46
3 讨论	47
 第三篇 辣椒疫霉致病毒素	48
第 1 章 辣椒疫霉致病毒素的纯化及其特性研究	48
1 材料与方法	49
2 结果分析	51
2.1 培养条件对 <i>P. capsici</i> 生长和产毒的影响	51
2.2 毒素的纯化	54
2.3 毒素的部分性质	56
2.4 毒素 S1 的生物活性	57
3 讨论	58
第 2 章 辣椒疫霉产毒缺陷突变体的筛选及其特性研究	60
1 材料与方法	61
2 结果分析	64
2.1 产毒缺陷和抗药性突变菌株的诱变与筛选	64
2.2 产毒缺陷和抗药性突变菌株的自交纯合	64
2.3 产毒与产毒缺陷突变菌的致病性比较	67
3 讨论	67
第 3 章 辣椒疫霉产毒遗传及其共分离遗传标记的研究	69
1 材料与方法	69
2 结果分析	72
2.1 产毒与产毒缺陷菌株间的游动孢子融合及杂种鉴定	72
2.2 F1 代杂种单卵孢子菌株的获得与鉴定	75
2.3 F2 代群体产毒分离方式	75
2.4 产毒共分离遗传标记	76

3 讨论-----	78
第4章 辣椒疫霉产毒相关DNA区段的克隆及其序列分析----	79
1 材料与方法-----	80
2 结果分析-----	82
2.1 产毒相关DNA片段的克隆与筛选-----	82
2.2 阳性克隆的酶切鉴定-----	82
2.3 产毒相关DNA片段的序列分析-----	83
2.4 产毒相关DNA片段种特异性证明-----	83
3 讨论-----	85

参考文献

致谢

作者简介

苎麻疫霉、辣椒疫霉毒素的生物化学

与分子遗传学研究

中文摘要

苎麻疫霉 (*Phytophthora boehmeriae* Saw.) 和辣椒疫霉 (*Phytophthora capsici* Leon.) 是两种重要的植物病原卵菌, 分别代表疫霉中同宗交配 (Homothallic matings) 和异宗交配 (Heterothallic matings) 两种有性生殖类型。因此, 研究其致病毒素的生物化学、遗传学和分子生物学机理, 对于认识毒素在疫霉致病过程中的作用具有普遍性意义。

研究表明, 苎麻疫霉的培养滤液可引起烟和辣椒叶片产生过敏坏死斑, 以及苎麻植株萎蔫症状。培养滤液经 85% 硫酸铵沉淀, 其沉淀组分包含全部毒性物质。通过 CM32 柱层析分离得到 CI 和 CII 两种活性成分, 其中 CI 为寄主毒性组分, 对茄门植株无毒; 而 CII 可诱发甜椒产生过敏性坏死反应 (HR), 对寄主无害。取 CI 经 DE52 和 Sephadex G75 柱层析进一步纯化, 得到一种酸性糖蛋白毒素 BP1, 其分子量为 15kD, 等电点为 3.10。而 CII 通过 DEAE-sepharose F.F. 和 FPLC-superose-12 柱进一步纯化, 获得的活性物质为一小分子酸性 elicitin (BP2), 其分子量为 10.6kD, 等电点为 4.32, 氨基酸组成、残基比例及其 N 末端氨基酸残基序列分析结果表明, BP2 由 15 种氨基酸组成, N 末端 20 个氨基酸残基序列为 Thr-Thr-Cys-Thr-Ala-Thr-Gln-Gln-Thr-Ala-Ala-Tyr-Val-Ala-Leu-Val-Ser Ile Leu-Ser, 均与已报道的 elicitin 氨基酸有广泛的同源性, 进一步证明 BP2 属于 α -elicitin。测定 15 种植物对 BP1 和 BP2 的反应, 发现 BP1 仅能诱发其寄主苎麻和棉花产生严重萎蔫, 而 BP2 则诱导三生烟、普通烟、心叶烟和辣椒产生局部过敏坏死反应, 这表明 BP1 和 BP2 均具有寄主种的专化性, 其中 BP2 还可诱导辣椒产生对疫病的抗性。

根据 Elicitin 第 24-30 和第 56-63 位保守区的氨基酸序列推导的特异引物, 对苎麻疫霉的基因组 DNA 进行特异 PCR 扩增, 并对扩增的特异 DNA 进行克隆和测序, 发现扩增的 DNA 为 570bp, 其中存在三个内含子, 将基因断裂成四个阅读框架即

ORF1、ORF2、ORF3 和 ORF4，其中 ORF1 和 ORF4 包含与引物相同的序列，但其余序列与已报道的 Elicitin 基因无同源性。这种 Elicitin 基因断裂现象属首次发现，表明 Elicitin 基因可能存在多种结构形式。

在辣椒疫霉的培养滤液中，亦发现存在诱发寄主辣椒叶片形成水渍状坏死的毒性物质，其滤液先后经 85% 硫酸铵沉淀、DE52、CM32 和 SephadexG75 柱层析分离，纯化出一种酸性糖蛋白，其分子量为 39.8kD，等电点为 4.10。这种毒素蛋白对 80℃ 以上的高温或蛋白酶敏感，但用 β -D-葡萄糖苷酶处理不影响其毒性，表明蛋白氨基为毒素的活性中心。

采用化学诱变与连续自交纯合的方法，从辣椒疫霉中分离出 1 株带有抗甲霜灵标记的产毒缺陷突变菌株、2 株带有抗甲霜灵或霜霉灵标记的产毒突变菌株，测定其致病性，发现产毒缺陷突变菌株仅为产毒菌株的 50%。通过产毒缺陷突变菌株与产毒突变菌株间的游动孢子融合杂交和直接配对有性交配可实现产毒基因重组，其重组菌株（ZF 或 F1）的产毒缺陷得到部分恢复，表现出双亲的中间表型，并且其致病性也与野生菌株相似。由此直接证明毒素可加剧辣椒疫病的显症过程，是重要的致病因子之一。

产毒遗传分析发现，在辣椒疫霉 F2 代孢子群体中，产毒由不完全显性基因所控制，其表型分离比为 1:2:1 ($\chi^2=2.28, p=0.25$)。同时发现辣椒疫霉对甲霜灵的抗性和 OPW12₁₀₀₀RAPD 标记与产毒共分离。克隆产毒相关 OPW12₁₀₀₀RAPD 标记并测定其 DNA 序列，发现该标记 DNA 为 1316bp。根据序列设计两条由 20 个核苷酸组成的特异引物，对 4 种共寄主辣椒病原真菌 (*Phytophthora capsici*, *P. parasitica*, *Pythium aphanidermatum*, *Colletotrichum capsici*) DNA 进行特异 PCR 扩增反应，证明辣椒疫霉产毒相关 DNA 片段具有种的特异性，并能直接检测病组织、土壤和水中的辣椒疫霉菌苗，从而克服了传统选择性培养基上孢子萌发极低的难题，为开展辣椒疫霉分子生态研究提供了有效的工具。此外，也为毒素基因的克隆奠定了基础。

关键词 辣椒疫霉，辣椒疫霉，毒素，诱抗素发蛋白，产毒分子遗传

Biochemistry and Molecular Genetics of Toxin from *Phytophthora boehmeriae* and *Phytophthora capsici*

ABSTRACT

Phytophthora boehmeriae Saw. and *Phytophthora capsici* Leon. are the most important Phytopathogenic Oomycetes, and they belong to homothallic or heterothallic mating respectively. We can probe into the role of pathogenesis of *Phytophthora* sp. by analyzing biochemical, genetic and molecular characters of their toxin production.

Our results suggested that crude culture filtrate was toxic to tobacco and pepper leaves or ramie plants, and induced a local hypersensitive like necrosis response in tobacco and pepper or a wilt symptom in ramie. Two active component obtained from culture filtrate by precipitation with 85% saturated ammonium sulphate, was subjected to chromatography on carboxymethyl-cellulose (CM32), among them, CI was toxic to host (ramie), but nontoxic to nonhost (bell pepper); However, CII induced a hypersensitive response (HR) in tobacco and bell pepper, but nontoxic to host (ramie). CI was further purified on a diethylaminoethyl-cellulose (DE52) and Sephadex G75 column, respectively. An acidic glycoprotein BP1 (pI 3.1, Mr. 15kD) was obtained. CII was further purified on DEAE-sepharose F.F. and FPLC-superose-12 column, we also obtained another acidic elicitor BP2 (α-class) with a Mr. of 10.6kD and a pI of 4.32. The amino acid composition of BP2 was determined and resembles that of known α-elicitors, which is composed of fifteen kinds of amino acids. N-terminal sequencing of BP2 was determined up to 20th amino acid residue (Thr-Thr-Cys-Thr-Ala-Thr-Gln-Gln-Thr-Ala-Ala-Tyr-Val-Ala-Leu-Val-Ser-Ile-Leu-Ser) and the high homology of these sequences with that of previously sequenced elicitor was further demonstrated that BP2 belonged to α-elicitor class. We discovered that BP1 only induced severe wilt symptom of ramie and cotton but not in 13 nonhost plant species, however BP2 induced

hypersensitive response specifically in 3 *Nicotiana* species and pepper but not in 11 other plant species. Suggesting that both BP1 and BP2 was host-specified toxin of *Phytophthora*, and induced resistance to *Phytophthora capsici* was observed on pepper after pretreatment with BP2.

Based on two conserved regions of the amino acid sequences of α -elicitin(24th to 30th and 56th to 63rd), two degenerate primers for the amplification were designed. Elicitin gene sequence was amplified from genome DNA of *P. boehmeriae* designed specific primers by PCR, and yielded specific amplified product. We purified it and made it clone into pGEN T-Easy Vector. One positive clone of specific amplified product was further characterized by DNA sequencing, suggesting that it contained a copy of the 570 bp fragment, and this fragment was splited into four open reading frames (ORF1, ORF2, ORF3, ORF4) by three introns, among them, ORF1 and ORF4 contained primer's sequences respectively, but others are not homology as compared with previously sequenced elicitor genes. Our results first demonstrated the split phenomenon of elicitor gene, suggesting that multiple forms could occur in the genome of *P. boehmeriae*.

There is toxic composition to pepper in the culture filtrate of *P. capsici*, which can induce water soaking, brown rot lesions of pepper leave, and symptoms are similar to those caused by *P. capsici* in the fields. The purified toxin from culture filtrates by precipitation with 85% saturated ammonium sulphate, was subjected to chromatography on DE52, CM32 and Sephadex G75 column, respectively. The toxin was shown to be a kind of acidic glycoprotein with pI4.1 and Mr.39.8kD, and found to be sensitive to temperature upwards of 80°C and proteinase, and to be stable to β -D-glycosidase, the protein subunit is a center of toxin activities.

A toxin-deficient and metalaxyl-resistant mutant and metalaxyl resistant or cymoxanil resistant mutant were obtained after mutagenesis with N-methyl-N'-nitro-N'-nitrosoguanidine(MNNG) and self-hydrids. The

pathogenesis of toxin-deficient mutant to pepper was detected; the result was shown to decline 50%. Zoospores from a toxin-deficient and a toxin-producing strains of *P. capsici* were fused in the presence of PEG6000. The results suggested that Zoospore-fusing strains (ZF) were shown to be medial toxin production of parents; Otherwise, the mating between a toxin-deficient (A1) and a toxin-producing (A2) mutants were made by placing small blocks of agar contained mycelium of each test mutant 2.5 cm apart on V8 juice agar in petri dish, and toxin-production of F1 progenies were the same pathogenesis as ZF. We could come to the conclusion that toxin was one of the most important pathogenic factors.

The results of genetics analysis suggested that the segregant ratio of toxin production among F2 progenies of *P. capsici* approached a 1:2:1 ($\chi^2=2.28$, $p>0.25$), indicating that toxin production was controlled by an incomplete dominant gene. We found further that toxin production of *P. capsici* was linked to both metalaxyl-resistant and OPW12₁₃₀₆ RAPD markers. We also demonstrated that OPW12₁₃₀₆ RAPD DNA was 1316bp, which was related to toxin production by bulk segregant analysis(BSA)/RAPD. Based on DNA sequence of OPW12₁₃₀₆ RAPD marker, Two degenerate primers were designed. We amplified specifically from genome DNA of four cohost pathogens of pepper (*Phytophthora capsici*, *P. parasitica*, *Pythium aphanidermatum*, *Colletotrichum capsici*) with two designed primers by PCR. The results shown that OPW12₁₃₀₆ RAPD DNA of *P. capsici* was a species-specific marker, and could detect direct *P. capsici* in the disease plants, soil and water. An effective and rapid method was developed not only to study molecular ecology but also to lay solid foundation for cloning toxin gene of *P. capsici*.

Key Words *Phytophthora boehmeriae*, *Phytophthora capsici*, Toxin, Elicitin,
Toxin Molecular Genetics

引言

卵菌 (*Oomycetes*) 是一类双倍体低等真核生物, 包括多种具有重要经济意义的植物、昆虫和动物病原菌, 以及腐生种类 (Judelson, 1996)。从古老的林奈两界系统 (1753 年) 直到 Whittaker (1969) 的五界系统, 卵菌一直被归入真菌。在此 200 多年间, 虽有研究证明, 卵菌的许多特征如其细胞壁的主要成分是纤维素、细胞为双倍体、具有鞭毛的双鞭毛、细胞核 DNA 的 G-C 值高于接合菌、以及羧氨酸生物合成等均表明卵菌是属于与真菌不同的另一个类群 (Bartnick-Garcia 等, 1968; Vogel 等, 1964)。但其系统发育地位未得到最终确立 (Whittaker 和 Marguis, 1978)。Barr (1981) 根据卵菌鞭毛的超微结构首次提出可能起源于双鞭毛的绿藻祖先。近 20 年来研究表明, 卵菌的 Polyol 合成途径 (Pfyffer 等, 1990) 和甾醇代谢 (Warner 等, 1983) 与“高等”真菌不同。特别是通过测定卵菌中几个保守基因的序列, 如钙调素 (Lejohn, 1989)、 β -微管蛋白 (Cameron 等, 1990)、肌动蛋白 (Dudler, 1990; Unkles 等, 1990)、色氨酸生物合基因 TRP1 (Karlovsky 和 Prell, 1990)、热激蛋白 hsp70 (Judelson 和 Michelmore, 1989)、以及 5S rRNA (Walker 和 Doolittle, 1982) 和 17SrRNA (Bhattacharya 和 Druehl, 1988; Forster 等, 1990)、mtDNA 中细胞色素 c 氧化酶基因 (Sachay, 1993) 等, 经分子系统学分析进一步证明卵菌的系统发育地位接近 *Chrysophytes*、*Diatoms* 和 *Heterokont* 等藻类 (Forster 等, 1990; Gunderson 等, 1987), 可见卵菌在生物演化的早期与真菌有明显的分化。故此, 1995 年 12 月出版的“菌物辞典”第 8 版 (Ainsworth & Bisby' Dictionary of The Fungi, Eight Edition, CAB International) 中首次接受了多界菌物系统, 将菌物分别归属于真核生物领 (*Eukaryota Domain*) (与原核生物领域 *Prokaryota*) 的 3 个界即原生动物界 (*Protozoa*)、假菌界 (*Chromista*) 和真菌界 (*Fungi* 或 *Enfungi*)。卵菌属于其中假菌界 (Hawksworth 和 Sutton, 1995)。因此, 在卵菌与寄主的病害系统中, 有许多不同于真菌与寄主的互作机理。

疫霉菌 (*Phytophthora* de Bary) 属于卵菌纲 (*Oomycota*), 是一类重要的植物病原菌, 可侵染粮食作物、果树、森林和多种园艺作物。由于对寄主植物的破坏性强、为害性大, 往往导致农业生产的严重损失, 故疫霉菌所致的病害通称“疫病”。

(*Phytophthora blight*)”。自从 1876 年著名真菌学家 de Bary 以 *P. infestans* 为该属模式种以来, 已被广泛认可的有 60 个左右种和变种 (包括少数海生的疫霉种) (Stamps 等, 1990 等)。其中多数种类的寄生范围极广, 樟疫霉 (*P. cinnamomi*) 是其典型代表, 它可侵染 1000 多种双子叶植物 (Zentmeyer, 1980); 而少数种类仅限于一种或几种植物, 其中大豆疫霉 (*P. sojae*) 是唯一一种仅侵染一种寄主植物的疫霉菌种, 引起大豆 (*Glycine max.*) 的根腐病 (Hansen 和 Maxwell, 1991)。

近 40 多年以来, 关于植物病原致病毒素的研究已取得了突破性进展, 特别是随着分子生物学技术的渗透, 如 DNA 介导转化断裂毒素合成酶基因的结构、毒素合成酶基因的克隆与表达等, 使得不少真菌毒素对寄主的致病作用从分子机理上得到了直接证据 (Desjardins 等 Hohn, 1997; Panaccione 等, 1992; Yoder 等, 1980)。因此, 毒素是植物病原真菌的主要致病因子。

关于疫霉菌致病毒素研究, 最早是 50 年代 Wolf (1953, 1954) 和 Ronnebeck (1956) 分别从 *P. nicotianae* 与 *P. infestans* 的培养滤液中发现存在可引起寄主坏死的物质, 到 80 年代中期, 已证明 8 种疫霉可产生致病毒素物质, 如 *P. cryptogea* (Csinos 和 Hendrix, 1977a, 1977b, 1978)、*P. cactorum* (Plich 和 Ruduicki, 1979)、*P. nicotianae* (Paxton, 1972)、*P. infestans* (Stolle 和 Schober, 1984, 1985a Benhnke, 1977; 1985b; Wolf, 1953, 1954)、*P. megasperma* (Ballio 等, 1972)、*P. citrophthora* (Breiman Adina 和 Barash, 1981)、*P. drechsleri* f. sp. *cajani* (Kannaiyan 等, 1981)、*P. cinnamomi* (Frean, 1982) 等。经纯化发现毒素活性成分为水溶性性多糖 (β -1,3-glucans) (Frean, 1982; Keen 等, 1975; Woodward 等 1980) 或糖蛋白 (Breiman Adina 和 Barash, 1981; 鹿龙等, 1985)。由于 80 年代中期发现非烟草病原的疫霉菌产生的胞外蛋白 (Elicitin) 可诱发烟草产生过敏反应, 并具有抗病信号传导作用 (Huet 等, 1989), 使得研究疫霉毒素的植物病理学家纷纷转向 Elicitin 研究 (详见综述), 在 80 年代中期至 90 年代中期分子生物学飞速发展的 10 年期间, 虽有疫霉毒素的纯化鉴定及其抗菌素突变体筛选的研究报道 (李兴和马剑, 1994; Ansar 等, 1995; Cristinzio 等, 1992; Mezzetti 等, 1994; Rowland 等, 1993; Vilusini 等, 1994), 但研究进展不大。直到近年才在 *P. nicotianae* 中分离出一种新的毒素, 该毒素是由 25 个氨基酸

酸残基组成的多肽，其分子量为 3.3kD，可诱发番茄萎蔫和褪绿，同时还存

在分子量为 3.5-30kD 多种毒素组分(Capasso 等, 1997)。迄今为止，有关疫霉毒素参与致病过程的分子遗传学证据尚未见报道。

近 10 年来，由于分子生物学对疫霉菌研究的广泛渗透，疫霉菌遗传转化、基因克隆与表达调控、以及分子遗传图谱等研究进展很快(Bailey 等, 1991、1993; Judelson, 1993; Judelson 等, 1991; Pieterse 等, 1995; Tyler 等, 1996; Van Lee 等, 1997; Whisson 等, 1994、1995)，为探讨疫霉毒素分子遗传机理奠定了基础。本研究以同宗交配种-苘麻疫霉(*P. boehmeriae*)和异宗交配种-辣椒疫霉(*P. capsici*)为材料，其中苘麻疫霉的寄主范围相对较窄，在自然条件下仅侵染苘麻、棉花、柑桔、构树和枫树等，但人工接种的寄主范围较广(何红等, 1994)；而辣椒疫霉可引起辣椒、番茄、茄子、黄瓜、甜瓜、南瓜、西葫芦、西瓜、豇豆、洋葱、可可、须苞石竹、香石竹、吊钟花、橡胶树、藜叶、胡椒、香黄兰、芦荟属、大波斯菊属和菜豆属等植物根、茎部和叶疫，是一种毁灭性土传植物病原菌(Weber 等, 1932)。通过探讨这两种疫霉毒素的纯化及其特性、产毒遗传方式、以及产毒基因或产毒相关基因的克隆与序列结构特征，以期推动疫霉毒素的研究向分子生物学水平发展，为阐明毒素在病菌对寄主致病作用中的分子机理奠定基础，因此具有重要的理论和实际意义。

第一篇 疫霉菌 ELICITIN 激发蛋白研究进展

(综述)

1 引言

Elicitin 是一种来源于疫霉菌的抗病信号传导蛋白,自从 Bonnet(1985)首次发现以来,一直是植物病理学和分子生物学近 10 年的研究热点之一(Yu,1995)。随着 Elicitin 研究的深入,产 Elicitin 的种类与新的 Elicitin 蛋白不断被发现(Baillieu)等,1995,1996;Hoet 等,1995;Garler 等,1997),同时 Elicitin 的生物活性也逐步被阐明(Templeton, 1994; Perez 等, 1997)。由于 Elicitin 是从诱导烟草(*Nicotiana tabacum*)产生过敏反应(Hypersensitive response,HR)现象中发现的活性蛋白,其生物化学特性主要是以烟草 HR 作为生物活性指标来评价,如以对烟草的毒性高低分为 α 、 β 两类蛋白、作为无毒因子介导烟草产生系统获得抗病性(Systemic acquired resistance, SAR)等(Billard 等, 1988; Ricci 等, 1991; Bonnet 等,1997),但迄今对疫霉菌自身的生物学意义仍不清楚。从其高级结构与真菌 Hydrophobins 相似性推测,可能在其它植物—病原相互作用中参与了致病作用过程(Templeton 等, 1994; Yu, 1995; Grant, 1996)。最新研究表明, Elicitin 可与烟草细胞膜上高亲和特异位点结合后、沿信号传导系统激发细胞核防御基因的表达(Wendehenne 等,1995; Tavernier 等, 1995; Chappell 等, 1997; Viard 等 1994; Keller 等,1996)。因此,近年来 Elicitin 作为植物抗病信号传导和抗病基因工程研究的工具,已受到人们的广泛关注(王均, 1995;Perez 等,1997)。

本文试图通过对 Elicitin 蛋白的结构与功能、Elicitin 基因结构与表达的综合评价,简单介绍近 10 余年来有关 Elicitin 研究的动态和进展。

2 Elicitin 的发现

烟草含有“N”基因,用 TMV 接种可诱导产生过敏性反应(HR),研究表明,HR 是植物与病原菌不亲和反应的典型表现(Ross, 1961a, 1960b; McIntyre 等, 1997)。因此,烟草是目前研究抗病信号传导的模式植物(Bonnet 等,1997)。早在 70 年代末期, Csinos 和 Hendrix(1997a)用非烟草病原疫霉菌接种烟草茎基部时,发现仅

在接种点形成受限制的坏死病斑,同时在植株的上部叶片出现 HR 斑和植株矮化现象,而用 *P. parasitica* var. *nicotianae* 接种烟草茎基部,上部叶片不产生 HR 斑。进一步用非烟草病原疫霉菌的菌丝和培养滤液提取物处理离体烟叶或植株,同样可产生 HR 斑(Csinos 和 Hendrix, 1977b、1978),但未对毒素活性成分进行纯化。直到 80 年代中期,首先由 Bonnet(1985)再次测定烟草对 9 种疫霉菌培养液的反应,发现非寄主疫霉菌的培养液均能诱导烟草产生 HR 斑,并且可为高毒(H.T.)(*P. drechsleri*, *P. cryptogea*, *P. megasperma*, *P. cinnamomi*)和弱毒(W.T.)(如 *P. cactorum*, *P. parasitica*, *P. capsici*, *P. citrophthora*)两种类型。后经纯化鉴定,其活性成份为 10kD,由 98 个氨基酸残基组成的蛋白蛋,根据对烟草毒性的的高低可分为 α (W.D), β (H.T) 两种,并于 1989 年由 Huot 等首次将这种活性蛋白命名为 Elicitin,从此拉开了 Elicitin 研究的序幕。迄今为止,已发现 12 种疫霉 Elicitin (见表 1),最近又发现 *P. megasperma* 等部分疫霉菌还可产生与 Elicitin 功能类的 32kD 糖蛋白(Baillieux 等,1995,1996)。在疫霉菌以外的卵菌中, Huot 等(1995)从 *Pythium vexans* 的培养滤液中,分离纯化出一种 α -elicitin 类似的 Vex2 蛋白和一种分子量为 15kD 的糖蛋白 Vex1。Gayler 等(1997)用 Elicitin 基因探针检测卵菌,也发现其基因组中均存在 Elicitin 基因。因此 Elicitin 基因是研究卵菌分子进化的理想工具(Baillieux 等,1995)。

2 Elicitin 的结构和理化性质

2.1 Elicitin 的理化性质

疫霉菌分泌的 Elicitin 是一种由 98 个氨基酸残基组成,分子量为 10kD 的水溶性蛋白(Yu, 1995)。在室温条件下,甲醇、乙醇、丙酮和 acetonitrile 中的溶解度为 60%,在 4℃的丙酮或乙醇中的溶解度为 80%,而在 -20℃仍能溶解 60%的蛋白质(Bouaziz 等,1994a)。根据对烟草毒性高低可分为 α (W.D)、 β (H.T) 两类,其中 α -elicitin 为酸性蛋白,其等电点小于 5.0; β -elicitin 为碱性蛋白,其等电点大于 8.0(见表 2)。来源于 *Pythium vexans* 的两种蛋白(Vex1、Vex2)属于 α -elicitin。除 Vex1 为糖蛋白外,其它特性均与 α -elicitin 相似(Huot 等,1995)。此外,在疫霉菌的培养滤液中,还存在一种与 Elicitin 功能相似的糖蛋白,其分子量为 32kD(Baillieux 等,1995)。

表1 卵菌产Elicitin的种类

Table1 Species of Elicitin-producing Oomycetes

菌种	α - elicitin	β - elicitin	glycoprotein
<i>P. capsici</i>	Capsicein		32kD
<i>P. cactorum</i>	Cactorein		
<i>P. parasitica</i>	Parasiticein		32kD
<i>P. parasitica</i>	Parasiticein		32kD
<i>nicotinae</i>			
<i>P. megasperma</i>	MgM α	MgM β	32kD
<i>P. megasperma</i>	MgM α	MgM β	32kD
<i>megasperma</i>			
<i>P. infestans</i>	Inf		
<i>P. citrophthora</i>	Citro		
<i>P. cryptogea</i>	Cry α	Cry β	32kD
<i>P. drechsleri</i>	Dre α	Dre β	
<i>P. cinnamomi</i>	Cin α	Cin β	32kD
<i>P. sojae</i>	sojaein		
<i>Phythium</i>	Vex2		Vex1
<i>vexans</i>			

表2 疫霉菌 ELICITIN 的理化性质

Stable2 Physical-chemical character of *Phytophthora* Elicitin

Elicitin(菌 种)	分子量(Da)	等电点	第 13 个氨基酸残基	对烟草的毒性
α 型				
Cacto (<i>P. cactorum</i>)	10227	4.0 $\pm$ 0.2	Val	0.75 $\pm$ 0.75
Cap (<i>P. capsici</i>)	10161	3.5 $\pm$ 0.1	Val	1.0 $\pm$ 0.05
Cry α (<i>P. cryptogea</i>)	10239	3.6 $\pm$ 0.1	Val	1.03 $\pm$ 0.05
Citro (<i>P. citrophthora</i>)	10207	3.5 $\pm$ 0.1	Val	1.08 $\pm$ 0.05
MgM α (<i>P. megasperma</i> <i>var megasperma</i>)	10280	3.5 $\pm$ 0.1	Val	1.13 $\pm$ 0.05
Dre α (<i>P. drechsleri</i>)	10322	4.6 $\pm$ 0.1	Val	1.19 $\pm$ 0.05
Cin α (<i>P. cinnamomi</i>)	10181	4.4 $\pm$ 0.1	Val	1.63 $\pm$ 0.05
Vex2 (<i>Pythium vexans</i>)	10396	3.4 $\pm$ 0.1	Val	相当 Cap
Vex1	12693-13260	3.1 $\pm$ 0.1	Val	相当 Cap
β 型				
Dre β (<i>P. drechsleri</i>)	10333	9.6 $\pm$ 0.1	Thr	2.00 $\pm$ 0.05
MgM β (<i>P. megasperma</i> <i>var megasperma</i>)	10375	8.9 $\pm$ 0.2	Lys	1.66 $\pm$ 0.05
Cry β (<i>P. cryptogea</i>)	10329	9.6 $\pm$ 0.2	Lys	2.00 $\pm$ 0.05
Cin β (<i>P. cinnamomi</i>)	10289	9.8 $\pm$ 0.2	Lys	2.03 $\pm$ 0.05

2.2 Elicitin 的氨基酸序列

近 10 年来, 法国的 Huet 与 Ricci 实验室, 应用 Edman 降解测序法对纯化的 12 种 Elicitin 蛋白的氨基酸序列进行了测定(如图 1)。从 Elicitin 氨基酸序列可见, 在一级结构上有广泛的同源性(至少 60%), 其中 6 个半胱氨酸为不变残基, 并分布在第 3、27、51、56、71 和 95 位, 在其中心区富含亲水性氨基酸, 亮氨酸、丙氨酸、丝氨酸和苏氨酸占 Elicitin 氨基酸组成的 50%, 缺乏组氨酸、色氨酸和精氨酸。此外, α -elicitin 的第 13 个氨基酸残基为缬氨酸, 而 β -elicitin

的同一位点为赖氨酸或苏氨酸（见表 2）。O'Donohue 等(1995)应用人工合成 Cryptogein 基因替换氨基酸编码的方法，将 CryⅢ 的第 13 位的赖氨酸替换成缬氨酸，结果对烟草的毒性显著降低，表明第 13 位氨基酸残基是决定毒性的关键位点。

CactoA7 CTSSQQTAAV PALVSILSDZSPNQCSIDSGYSMLTAZSLPTTAQYKLMCASTACNTMIAKI
 Cap A7 CTTTQQTAAY PALVSILSDZSFPNQCITDSGYSMLTAZALPTTAQYKLMCASTACNTMIAKI
 Para T7 CTTTQQTAAY PALVSILSDZSFPNQCSTDSGYSMLTAZSLPTTEQYKLMCASTACNTMIAKI
 MgM α T7 CTSTQQTAAY PTLVSILSDZSFPNQCITDSGYSMLTAZALPTTAQYKLMCASTACNTMIAKI
 Dre α T7 CTSTQQTAAY PTLVSILSDZSFPNQCSTDSGYSMLTAZALPTDAQYKLMCASTACNTMIAKI
 Inf T7 CTTSQQTVAV PALVSILSDZSFPNQCSTDSGYSMLTAZSLPTTEQYKLMCASTACNTMIAKI
 Vex2 TA CTTTQQTAAY PALVSVLSTZNFNQCSTDSGYSMLTAZALPTTEQYKLMCASTACQGMIAKI
 Vex1 TA CTTTQQTAAY PALVSILSDZSFPNQCSTDSGYSMLTAZALPTTEQYKLMCASTACQGMIAKI
 MgM β TA CTTTQQTAAY PTLVSLSEZSFPNQCSTDSGYSMLTAZALPTTAQYKLMCASTACNTMIAKI
 Der β TA CTSTQQTAAY PTLVSILSDZSFPNQCSTDSGYSMLTAALPTTAQYKLMCASTACNTMIAKI
 Cry β TA CTATQQTAAYATLVSLILSDZSFPNQCSTDSGYSMLTAALPTTAQYKLMCASTACNTMIAKI
 Cin β TA CTATQQTAAYATLVSLILSEZSFPNQCSTDSGYSMLTAZALPTNAQYKLMCASTACNTMIAKI

VSLNPPACALTVPTSGLVLNWVSYANGFSATCSL
 VSLNPPACALTVPTSGLVLNWVSYANGFSATCSL
 VTLNPPACALTVPTSGLVLNWVSYANGFSATCSL
 VTLNPPACALTVPTSGLVLNWVSYANGFSATCSL
 VSLNAPACALTVPTSGLVLNWVSYANGFSATCSL
VSLNAPACALTVPTSGLVLNWVSYANGFSATCSL
 IAA NAPACALTVPTSGLVLNWVSYANGFSATCSLSS
 ITLNPPACALTVPTSGLVLNWVSYANGFNATCSL
 VSLNPPACALTVPTSGLVLDVYTYANGFSATCSL
 VSLNPPACALTVPTSGLVLNWVSYANGFSATCSL
 VTLNPPACALTVPTSGLVLDVYTYANGFSATCSL
 VALNPPACALTVPTSGLVLDVYTYANGFSATCSL

图1 卵菌 ELICITIN 氨基酸序列

Fig 1 Primary structure of elicitin from *Oomycetes*

(斜体为环死活性残基、粗体为不变半胱氨酸、下划线为保守区)

2.3 Elicitin 的高级结构

关于 Elicitin 的高级结构, 最早是 Nespoulous 等(1992)报道 4 种 Elicitin(Cryptogein、Cinnamomin、Capsicein 和 Parasiticein)圆二色法(CD)的分析结果。Bouzaziz 等(1994a、1995b)和 Guilloteau 等(1993)进一步采用 NMR 法, 测定了 Capsicein 的结晶结构, 其分子通过三个分子内二硫键(C3-C71、C27-C56 和 C51-C95)相连, 并由占氨基酸残基组成 60% 的 α -螺旋和一个反向平行的 β 折叠片构成分子的高级结构, 其中的 4 个 α -螺旋构成两个方向平行的配对(Q25-Y33 和 T58-T44; M59-N67 和 L98-S86), 而第 5 个 α -螺旋(T5-118)则与 β 折叠片平行(如图 2)。最近 Boissy 等(1996)又测定了 Cryptogein β 的结构, 得到与 Capsicein 相似的结果, 由 6 个 α -螺旋、1 个 β 折叠片和 1 个 Ω 环构成, 其中 11 个活性氨基酸残基中的 6 个分别在 N 末端(2、70、71)与 C' 末端(93、94、96)形成两个聚集区, 其余的分散在分子表面, 构成镶嵌状活性中心。在 Capsicein 中, C' 末端坏死活性位点位于侧面, 而在 β cryptogein 中则位于 Capsicein 相对应位点的对而, 其中所有与坏死有关的关键残基(如 α I 螺旋中的第 13 位、 β 折叠片中的第 70 和 72 位)均定位在分子的一端, 其保守区域(T44-I60)仅起结构作用, 与坏死和防腐反应无关(见图 3)。

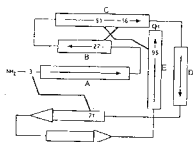


图 2 脉腐疫霉 capsicein 二级结构

Fig2 Secondary structure of capsicein of *Phytophthora capsici*

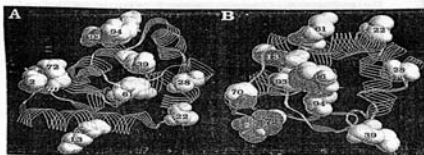


图3 隐地梭毒 *cryB* 的高级结构与活性空间定位

Fig3 Spatial location of the active sites in the CryB

3D structure of *Phytophthora cryptogea*

经高级结构对比发现, Elicitin 是一种与磷脂酶 A2 高级结构相似的信号蛋白(Bouzaia 等, 1994), 如两种蛋白中 N 端 α -螺旋和 β 折叠并列, 并依次与另两个 α -螺旋相连 (Guilloteau 等, 1993)。从磷脂酶 A2 的结晶结构与 Elicitin 的初级二维结构比较也发现, 二者 N 端的 α -螺旋均是形成蛋白质内部裂缝的一部分, 在磷脂酶中, 这个裂缝是其活性中心, 其中水分子与组氨酸通过氢键连接, 但是 Elicitin 无组氨酸, 并且在一级结构上与磷脂酶无同源性, 这表明在 Elicitin 中可能也具有磷脂酶 A2 的功能。因此, 如果具有磷脂酶的活性, 则可能具有新的分解机制(Bouzaia 等, 1994a, 1994b; Guilloteau 等, 1993)。

根据 Elicitin 与磷脂酶 A2 在高结构上的相似性, Yu(1995)提出如下假设:

1) 如果 Elicitin 具有磷脂酶活性, 则 Elicitin 作用植物细胞膜时可释放亚麻酸和溶血磷脂酸, 这些脂分解产物进一步代谢为茉莉酸和肌醇磷酸, 作为潜在的信

号分子可能介导 Elicitin 的下游效应。已有证据表明 Elicitin 可影响细胞膜的功能(电调)。由于在一级结构与磷脂酶无同源性,显然,在二级和三级结构上存在保持其在胞外物理特性或酶活性的共同结构,如磷脂酶 A2 是脂水界面聚积,其 β 一折叠片起吸附作用,并且表现出与酶脱氢活性不同的神经毒性和抗凝血特性。同时像大多数胞外蛋白(包括 Elicitin)一样,磷脂酶 A2 分子内也是由二硫键相连接。

2) 由于 Elicitin 具有寄主专化性,如果 Elicitin 具有磷脂酶的活性,则在与植物细胞的原初互作中,存在某种特有的、影响酶活性的关键植物因子,即为 Elicitin 的酶活性激活所要求的特定底物,存在这些底物的植物可激活或抑制 Elicitin 的酶活性。这些介导 Elicitin 与植物细胞相互作用的植物因子可能改变其创造信号分子的酶活力。如果这种假设成立, Elicitin 作用产生的信号分子随后又与 Elicitin 上怎样结合呢?因此,阐明这些植物因子(底物、共同因子或受体)将是认识 Elicitin 与植物细胞互作机理的关键。

3 Elicitin 的诱导抗病作用及其机理

3.1 Elicitin 的诱抗作用

过敏反应(HR)是 Elicitin 作用于寄主植物的典型反应,但不同植物对 Elicitin 的反应不同, Kanoun 等(1993)测定了代表 20 个种的 61 类植物对 Cryptogein 和 Parasiticein 的反应,其中包括番茄、辣椒、茄子、甘蓝、白菜、萝卜、拟兰芥、黄瓜、莴苣等,结果表明,烟草(除 *Nicotiana sylvestris* 外)、大多数萝卜品种和一个芜菁品系可产生过敏反应,其余测试植物均无反应。Bonnet 等(1996)进一步测定 18 种植物对 Elicitin 的反应,也表明存在寄主专化性。但也有不同的研究结论,发现来源于茄科的疫霉菌所产生的 Elicitin,除烟草外还可诱发番茄、辣椒和马铃薯等产生过敏反应,认为 Elicitin 是非寄主专化毒素(Grant 等, 1996; Huot 等, 1994; Pernollet 等, 1993)。这种研究结论的差异可能与产生 Elicitin 的疫霉菌株来源或寄主植物的敏感性不同有关。

植物 HR 的产生是多数寄主—病原系统不亲和互作的共同特征。Rice 等(1989)最先发现 Cryptogein 和 Capsicein 处理烟草后,可诱导烟草产生对黑胫病(*P. parasitica* var. *nicotianae*)的抗性。Kanoun 等(1993)进一步证明,用 5 μ g Cryptogein 或 Parasiticein 预处理三生烟,三天后挑战接种黑胫病菌(P582 和

P1351), Cryptogein 可诱导烟草对 P582 和 P1351 的抗性, 而 Parasiticein 仅诱导烟草对 P582 产生部分抗性, 用 1 nM Cryptogein 或 Parasiticein 与 *Xanthomonas c. pv armoraciae* XLS10R (10^6 – 10^7 /ml) 共接种 5 个萝卜品种, 其中对 Elicitin 有 HR 的 Early Mino 和 Sg5317, 细菌侵染仅出现局部退绿斑, 而对 Elicitin 无反应的 White Zeicle, Elicitin 对其发病症状无干涉作用, 其余两个品种, 虽然用 100 nM 可诱导坏死反应, 但用 1 nM Elicitin 不能诱导对细菌的抗性, 可见其诱抗作用存在品种专化性。Bonnet 等(1995)除证明 Elicitin 可诱导 10 种烟对黑胥病的抗性外, 还发现可诱导烟草对菌核菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)的抗性, 其效果达 70–90%, 但不能激发番茄、辣椒和 *Pentunia* 对疫病的抗性。也有研究证明, 与 Elicitin 功能类似的 32 kD 糖蛋白可诱发烟草对 TMV 的抗性(Bialleul 等, 1995)。因此, Elicitin 是一种寄主专化性的激发子(Elicitor), 可诱导寄主植物产生对卵菌、真菌、细菌和病毒的系统获得抗性(SAR)。

3.2 Elicitin 介导植物抗病信号传导作用机理

寄主植物对病原菌侵染反应的激活与信号传导途径中的多种生化事件密切相关(Chappell 等, 1997), 在很大程度上可用特异抑制剂阻断特定的生化过程后, 测定与抗病生理相关反应的激活程度, 或测定处理后的瞬时生理反应, 来证明这种相关性(Vogeli 等, 1992; Grosskopf 等, 1990; Mackintosh 等, 1994; Renelt 等, 1993; Felix 等, 1991; Knight 等, 1991)。

Elicitin 是一种能远距离传输的抗病信号传导蛋白, 在经过木质部导管到作用靶细胞过程中并不改变自身的蛋白结构(Nespoulous 等, 1992; Zanetti 等 1992; Devergne 等, 1994), 可见细胞膜上可能存在 Elicitin 激发系统获得抗性的原初作用靶标或受体。有证据表明, 在烟草细胞膜上存在与 Cryptogein 高亲和特异结合位点(Blein 等, 1991; Wendenene 等, 1995)。结合后可对细胞膜的功能产生一系列影响, 首先是改变细胞膜的渗透性, 如烟草细胞外基质的碱化与细胞质的酸化, 即激发胞内 K^+ 外渗, 胞外 H^+ 向细胞内渗, 从而改变细胞的导电性(Blein 等, 1991; Tavernier 等, 1995a)。同时伴随着出现脂氧化酶和蛋白酶抑制因子的激发(Bottin 等, 1994)、膜脂成分的改变和过氧化(Tavernier 等, 1995; Rusterucci 等, 1996)、活性氧自电基(AOS)的瞬时快速产生(Virard 等, 1994)、植保素(甜腺醇)和乙烯的累积(Milat 等, 1991)以及病程相关蛋白(PR)的产生(Bonnet 等, 1995;

Perez 等, 1997; Keller 等, 1996), 等等。其中 AOS 产生仅与过敏性坏死反应有关, 而与植保素合成无关(Rusterucci 等, 1996)。

在高等植物中, 广泛存在钙调素 (Calmodulin), Ca^{2+} 依赖蛋白激酶和 Ca^{2+} 刺激磷酸化酶, 表明细胞内游离 Ca^{2+} 的改变, 可能对细胞的功能产生深远的影响 (Trewavas 和 Gilroy, 1991; Bush, 1993)。提高植物细胞质 Ca^{2+} 浓度, 可影响细胞对多种环境条件、激素和病原菌信号的反应。在一些植物细胞—激发子系统中, 已证明抗病信号传导的激发与胞外 Ca^{2+} 的存在, 以及细胞质游离 Ca^{2+} 的瞬时增加密切相关, 这也许是跨膜信号传导的共同激发因子 (Ebel 和 Cosio, 1994)。 Ca^{2+} 离子通道抑制实验也证明, Ca^{2+} 是激发子引发信号传导的关键因子。此外, 近年来也发现磷酸化/去磷酸化机制, 也与植物防御反应的信号传导过程有关 (Dietrich 等, 1990; Felix 等, 1991, 1994)。在烟草与 Elicitin 系统中, Tavernier 等 (1995) 发现, 用 Cryptogein 处理烟草细胞后, 其 Ca^{2+} 吸收增加。用 Ca^{2+} 离子通道抑制剂 (EGTA 和 La^{3+}) 处理经 Cryptogein 预处理烟草细胞, 可抑制 Cryptogein 激发的胞外基质酸化、AOS 和植保素的产生。此外, Cryptogein 激发的一系列生理反应均能被蛋白激酶抑制剂 Staurosporin 所抑制。用 Cryptogein 处理 ^{32}P 标记的烟草细胞, 30 分钟后电泳检测发现出现 163 和 77kD 的标记多肽, 39 和 29kD 带的标记增强, 最突出的是 53kD 带的标记显著增强, 而 49kD 带的标记下降, 这种磷酸化、去磷酸化机制可被 Staurosporin 所抑制, 表明磷酸化、去磷酸化作用参与了 Elicitin 激发抗病信号传导过程 (Virard, 1994)。

虽然 Elicitin 经细胞内信号传导系统, 介导烟草细胞防御反应的产生, 但仍缺乏整体植株抗病信号传导激发系统获得抗性 (SAR) 基因表达的证据。据最新研究表明, Cryptogein 或 Capsicein 是在转录水平上激发 SAR 基因表达, 表达的基因可分为三组: (a). Cryptogein 处理茎、叶转录水平相同, 但 Capsicein 处理茎比叶的转录水平高 (PR1a、碱性 PR1、PR2 和几丁质酶 III、Str246); (b). Cryptogein 处理后为叶累积的优势 mRNA, 但 Cryptogein 处理茎叶相同 (PR3 和 PR4)。(c). 在叶中几乎是特异 mRNA 的累积 (PR5 和 PRQ) (Keller 等, 1996a)。在激发子诱导系统获得抗性中, 水杨酸可能是一种直接的信号分子, Keller 等 (1996b) 用 Cryptogein 处理转 nahG 基因 (细菌编码水杨酸脱氢酶基因) 烟草, 发现不能诱导烟草黑胥病的抗性, 但表达 nahG 基因的烟草仍产生对 Cryptogein 的过敏反应, 并且激发 Elicitin

的 PR1a、PR2、PR5 和几丁质酶 111 基因表达受到抑制,而激发累积的碱性 PR1、PR3、Str246 和 Str319 未发生变化。从 Elicitin 对转 nahG 烟草还能增强对疫霉菌和产 Elicitin 的黑胥病菌的感病性,但不影响其坏死反应推测,水杨酸可能是介导 Elicitin 诱导烟草产生系统获得抗病性的直接信号分子。特是最近 Chappell 等(1997)从 Cryptogein 处理的烟草悬浮细胞中,发现一种可扩散信号分子,这种可扩散信号分子具有对蛋白酶、角质酶、DNase、RNase 稳定,有机溶剂不能抽提,与 Elicitin 抗体无免疫反应等特性。它可激发作用位点邻近细胞编码 Sesquiterpene 环化酶、酸性与碱性几丁质酶,以及 hsr203 基因(假定 HR 基因)的快速转录积累。这种可扩散信号分子与 Levine 等(1994)发现的可扩散 H_2O_2 信号分子功能相似,但属于不同类物质。因此有待进一步分离鉴定其特性,以阐明其细胞间抗病信号传导作用机理。

4 Elicitin 在疫霉菌中可能的生物学意义

在产 Elicitin 疫霉菌的培养液中,Elicitin 是最丰富的胞外蛋白,但其生物学意义仍不清楚(Terce-Laforgue 等,1992;Grant 等,1996)。来源于烟草上的 *P. parasitica* var. *nicotianae* 菌株在培养液很少产生或不产生 Elicitin。如果 Elicitin 在疫霉菌的生长发育中属于多余的成分,那么在培养液中为什么如此丰富呢?

人们研究发现,由 *Ceratocystis ulmi* 分泌的 Certo-ultmin 毒素与 Elicitin 在氨基酸序列上具有相似性(见图 4),相似区域延伸到整个毒素的氨基酸序列,特别是 Elicitin 的 C 端 60 个氨基酸,其中有二组由 3—5 个相似或相同氨基酸组成聚集区,并且存在两个半胱氨酸。Elicitin 与 Hydrophobin 相比,也具有同源性,Hydrophobin 是一种具有结构作用的真菌分泌蛋白,其中一些种类在致病作用中具有重要的作用,真菌分泌的 Hydrophobins 可增加其细胞的非极性或疏水性,与真菌气生菌丝、孢子体、分生孢子和附着孢等结构的发育有关。在培养液中,Hydrophobin 以单体存在,而细胞壁形成时则聚合成杆状,并在一些丝状真菌的细胞壁中可以见到这种结构。如 Sc3 基因产物,在氧化状态下不利于其聚合,当用氮气发泡培养液提供的气/液界面上,可促进单体聚合形成不溶性 SDS 形式,而聚合体在酸性条件下立即逆转为单体。

根据 Elicitin 与 Hydrophobin 在一级结构、产生、以及在有机溶液中的行为

上的相似性, Templete 等, (1994) 提出 Elicitin 是来源于疫霉菌的 Hydrophobin 的假说。首先, Elicitin 和 Hydrophobin 均为培养液中菌体分泌的丰富胞外蛋白, 并少量存在于菌丝体的细胞壁中, 二者具有相似分子大小, 包含 3 或 4 个二硫键, 在极性溶剂中具有相似的行为。因此, 从二者的相对高度和定位上的相似性可推测 Elicitin 可能具有 Hydrophobin 相似的功能。

迄今为止, 虽然人们不能通过发泡培养浓缩 Elicitin 或在气流条件下使 Elicitin 溶液干燥, 即 Elicitin 不经历与 Hydrophobin 相似的构象转变, 从而导致结构和溶解性上的显著改变, 但有证据表明, Elicitin 基因缺陷可能造成疫霉生长发育受损。经离体测定的多数疫霉菌株的毒性和 Elicitin 的产生能力, 发现离体生长与 Elicitin 产生直接相关(Kamoun 等, 1993), 其中一个 Elicitin 基因缺陷的 *P. parasitica* P3461, 对烟草或番茄均不致病, 在培养中难以产生孢子或孢子。这种特性与缺少 Hydrophobin 的真菌相似, 说明 Elicitin 在疫霉菌的生长发育中具有重要的作用。最近有人应用从 *P. parasitica* 克隆的 Para 基因转化 P3461, 试图从分子水平证明 Elicitin 生物学功能, 但未获得成功的转化体(Kamoun 等, 1993)。

1	61
Certo-ultmin	SDS-FVPE-----TGLLRKQC ----QKHIDGAYLXONPPSWPTSPSQASQAYKGRSANGCYLS
Elicitin	SDSFAQSTUGCYSLTATALPTTAQYKIKWASTAGNTMKNISLAPRCELVPTSLGLVNVSYAN QSTKQSL
20	98

图 4 Elicitin 第 20-98 位与 Certo-ultmin 第 1-61 位氨基酸序列比较
Fig4 comparison of amino acid residue between the 20th to 98th sites
of elicitin and the 1st to 60 th of Certo-ultmin.

5 Elicitin 的基因结构

Elicitin 基因广泛存在于疫霉菌和少数腐霉菌(Pythium) 基因组中(Lacourt 和 Duncan, 1997; Gayler 等, 1997), 也许是卵菌基因组中的一个保守基因, 在研究卵菌系统发育中具有重要的意义(Huet 等, 1995)。Elicitin 基因的表达受复杂的遗传机制所控制, 人们曾用对烟草致病但不产 Parasiticein 的 Ppn(*P. parasitica* var *nicotianae*) 与对烟草不致病但产 Parasiticein 的 Ppp(*P. parasitica* var

parasitica) 杂交, 其杂交后代 (F1) 均存在 Parasiticein 基因结构, 但 Parasiticein 的表达受到抑制 (Trentin, 1991)。Kamoun 等 (1994) 也做过类似的分析, 发现 21 个 F1 代单卵孢子菌株中, 仅 4 个菌株产生 Parasiticein。

在氨基酸序列上, Elicitin 存在高度的保守性, 因此采用 PCR 特异扩增是直接克隆 Elicitin 基因有效途径。应用这种克隆策略, Kamoun 等 (1993) 首次从 *P. parasitica* 基因组中克隆出 Elicitin 基因 ParA1, 该基因为由 354bp 组成的单 ORF, 编码由 118 个氨基酸组成的 Parasiticein 蛋白原, 经去掉 N 端 20 个氨基酸组成信号肽后, 成为由 98 个氨基酸组成的活性 Parasiticein, 根据克隆基因 ParA1 推导的蛋白序列与纯化的 Parasiticein 有 99% 的同源性。将 ParA1 基因转化 *E. coli* 后, 可表达出具有生物活性的 GSF-ParA1 融合蛋白。Southern blot 杂交发现, 在 *P. parasitica*、*P. capsici*、*P. citrophthora*、*P. cryptogea*、*P. drechsleri*、*P. megasperma* 和 *P. alnivora* 等 8 种疫霉属的基因组中存在多个 (至少 2-10 个) 编码 Elicitin 基因。Panabieres 等 (1995) 在克隆 cryptogein 基因也发现, *P. cryptogea* 基因组中存在四个 Elicitin 基因 (X24、B14、B20、B26), 其中 X24 编码碱性 Cry β , B14 编码酸性 Cry α , 其余两个 (B20、B26) 编码的 Elicitin 蛋白是迄今尚未发现的酸性蛋白, 在 *P. sojae* 基因组中, 也发现存在两个编码 Sojein 的拷贝。因此, Elicitin 基因在疫霉属基因组中是以小基因家族存在, 已克隆 Elicitin 基因序列见图 5。

Pos-1ATGAGGTTCCGCGCTCTGTTTGGCCCTACGGTGGCCGCTCTGGTGGCTCCACCTCGCGCCACGGTGCACCAACGACGCAAACTGG

TCATGATGATTCGGCTGTGTGTGTTGTAAGCTTCTTGGCTCTGGTGGTCTGACCTTGGTGAACCTGAAACAGCTGTGTAGAGAGCGGT

5a1281GAGCTTCGGGCTCTGTTGAGGCGCAACGTCGGGGGCTGGTCGGCTTCAGCTTGGACCAAGTGCACCTTCGTCAGCAAGATGG

ES4 ATGAACTTCAAGGCTCTGTTCTGCTGGCTGGGGGGGCTTGTGTGATCTTTCACAGGCGCTGTCTGACCGGCAAGGACAGGAGT

B54 ATGAATTTCGGGCTTTTGTGCACCGCAGCGGCTGTGCTTGCACTCCAGCACTGACCAACACCAGCAGCG

GGGATGCTGGTGGCTGGTAAAGCATCTCTGGGACAGCTGGTTCACAGCAAGCTGGACGGACTCTGGCTGACCTCAATGCTGACGGCCACCTGGCTT
AGGTAATGTTGGGCTGGTAAAGCATCTCTGGGACAGCTGGTTCACAGCAAGCTGGACGGACTCTGGCTGACCTCAATGCTGACGGCCACCTGGCTT
GGGATGCTGGTGGCTGGTAAAGCATCTCTGGGACAGCTGGTTCACAGCAAGCTGGACGGACTCTGGCTGACCTCAATGCTGACGGCCACCTGGCTT
GGGATGCTGGTGGCTGGTAAAGCATCTCTGGGACAGCTGGTTCACAGCAAGCTGGACGGACTCTGGCTGACCTCAATGCTGACGGCCACCTGGCTT

[illegible]

(TTT)AGG-CCCTGTACCAATGGTGTCATTACTAACCAGAACCCTTTTCCTCAGCTGCCTCATTA

UETGAGGZGZTAACTAGGAGGCTGGTACTGAAAGCTGTAAGCTGTAAGGAGAGAGGCTTTTCTGTAAGCTGTAAGCTGTA

WISCONSIN STATE UNIVERSITY SYSTEM LIBRARY

Accession numbers The sequences have been deposited in GenBank under accession number FJ607981.

[Downloaded from www.jco.org by guest on July 10, 2015](#)

图5 疫霉属 ELICITIN 基因序列比较

Fig5 Comparision of elicitin gene sequence of *Phytophthora* sp

近年来,用 cDNA 克隆分析表明,在侵染马铃薯过程中,*P. infestans*INFI 基因的表达属于下游调控(Kanoun 等,1997),O'Donohue 等(1995)根据 Cry B 基因序列人工合成 Cry B 基因,转化 *E. coli* DH5 α 后,也发现转化菌株可表达具有生活性的 Cry B 蛋白,进一步采用定向位点突变,用 Val 替换第 13 位的 Lys,其转化表达产物对烟草的毒性降低与 Cry α 相等,由此直接证明第 13 位的氨基酸残基是决定其毒性的关键位点。

6 Elicitin 基因在抗性基因工程中的应用前景

由于植物防御反应是由一系列防御基因表达产物的协同作用,用高效表达的一或两个防御基因的方法难以提高植物对多种真菌和细菌病害的抗性,最近证明一些自发产生类似过敏反应,具有抗多种病原菌侵害的特性(Dietrich 等,1994),这种自发突变植物是因为抗病信号传导蛋白突变的结果,因此,在研究 Elicitin 等抗病信号传导蛋白的基础上,通过持久地表达原来的或经过改造的信号蛋白基因,可诱导完整的抗病反应,明显地提高植物对多种病原的抗病性。由此可见,转抗病信号蛋白基因是提高植物抗病性的有效途径。

综上所述,Elicitin 是一种具有寄主专化性的抗病信号传导蛋白,可诱导烟草和少数十字花科植物产生系统获得抗病性,并有 4 种疫霉的 Elicitin 基因被克隆测序,经转化 *E. coli* 或毕氏酵母菌(*Pichia pastoris*)后可高效表达 Elicitin 蛋白(O'Donohue 等,1995、1996)。特别是最近 Tepfer 等(1998)成功地获得了转 β -cryptogein 基因烟草植物,自交两代(T1、T2)均能表达 β -cryptogein,并产生对黑胫病的抗性。由于 Elicitin 存在寄主专化性,在抗病基因工程中的应用仍受到限制。在烟草细胞膜上存在 Elicitin 高效特异结合位点,可以推导烟草细胞膜上可能存在 Elicitin 受体蛋白。克隆受体蛋白基因,构建包括 Elicitin 与受体蛋白基因双价载体,其中,受体蛋白基因受寄主启动组成表达,而 Elicitin 受特定病原菌侵染启动表达。当病原菌侵染时,Elicitin 基因能快速诱导表达,即可提高植物的抗病性,又对植物无不利影响。可以预见,转 Elicitin 基因工程研究将成为抗病基因工程的新的热点领域。

第二篇 苎麻疫霉毒素激发蛋白

第1章 苎麻疫霉毒素激发蛋白的纯化及其特性

摘要: 苎麻疫霉(*Phytophthora boehmeriae*)在 Plich's 培养滤液中可分泌诱发苎麻植株萎蔫、以及烟草和辣椒叶片产生过敏性坏死反应的活性物质。用 8.5% 硫酸铵沉淀后,其沉淀组份包含全部活性物质。通过 CM32 柱层析分离得到 C I 和 C II 两种活性成份,其中 C I 为寄主毒性组分,对非寄主植物无毒;而 C II 则可诱发非寄主甜椒产生过敏性坏死反应(HR),但对寄主无害。取 C I 经 D E 32 和 Sephadex G 75 柱层析进一步纯化,得到一种酸性糖蛋白毒素 B P 1,其分子量为 15 kD,等电点为 3.10。而 C II 通过 D E A E -Sepharose F、F 和 F P L C Superose 1-2 柱进一步纯化获得的活性物质为一小分子酸性激发蛋白 B P 2,其分子量为 10.6 kD,等电点为 4.32,含 15 种氨基酸,其残基比例与已报道的 α -elicitin 相似;N-末端 20 个氨基酸序列为 Thr-Thr-Cys-Thr-Ala-Thr-Glu-Glu-Thr-Ala-Ala-Tyr-Val-Ala-Leu-Val-Ser-Ile-Leu-Ser,与已报道的 Elicitin 有广泛的同源性。测定 15 种植物对 B P 1 和 B P 2 的反应,发现仅能诱发其寄主苎麻和棉花产生严重萎蔫,而 B P 2 则诱发三生烟、普通烟、心叶烟草和辣椒叶片产生过敏性反应。这表明 B P 1 和 B P 2 均具有寄主种的专化性,其中 B P 2 还可诱导辣椒产生对疫病的部分抗性,效果为 30—40%。

关键词: 苎麻 苎麻疫霉 毒素 辣椒疫病 Elicitin 诱导抗性

自从 Bonnet(1985)首次从疫霉菌(*Phytophthora spp.*)的培养滤液中发现 Elicitin 以来,经过法国的 Bonnet 和 Ricci, Huot, 以及美国的 Kamoun 等三个实验室近十余年的研究,已证明除 *Phytophthora parasitica* var. *nicotinae* 外,疫霉菌中许多种和一种腐霉(*Pythium vexans*)可分泌这种由 98 个氨基酸组成的 10kD 小分子毒素激发蛋

白(Huet 和 Pernollet 1993; Pernollet 等, 1993; Ricci 等, 1989; Yu, 1995; Huet 等, 1995), 其结构上具有广泛同源性, 并能诱导烟属种及少数十字花科植物产生过敏反应(Hypersensitive response, HR), PR 蛋白的积累、植保素甜椒醇的产生, 以及烟草对 *P. parasitica* var. *nicotinae*、*Sclerotinia sclerotiorum* 和 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 的抗性(Huet 和 Pernollet 1993; Pernollet 等, 1993; Kamoun 等, 1993; Yu, 1995; Bonnet 等, 1997)。Elicitin 包括两大类, 其中一种为酸性蛋白(α -elicitin), 另一种为碱性蛋白(β -elicitin)。最新研究表明, 少数疫霉菌和一种葡萄菌 *P. vexans* 还存在与 Elicitin 功能相似的 32kD 或 15kD 糖蛋白(Baillet 等, 1995、1996; Huet 等, 1995)。由于它们具有抗病信号传递的功能(Nespoulous 等, 1992), 因而引起国内外学者的日益重视(Perez 等, 1997; Yu, 1995; 王均, 1995)。

在自然条件下, 苘麻疫霉(*Phytophthora boehmeriae* Saw.)寄主范围很窄, 仅侵害棉花、苘麻、柑桔以及构树等植物(何继等, 1994)。因此, 这种病原菌是研究抗病信号传递蛋白的理想材料, 但国内外迄今尚无有关研究报道。为此, 作者对苘麻疫霉激发蛋白的纯化与特性进行了深入的分析探讨。

材料与方法

1 供试菌株

苘麻疫霉菌和辣椒疫霉(*P. capsici* Leon.)由中国农业大学植病系提供, 菌株保存在彩马豆琼脂斜面培养基上(18℃), 供试验用。

2 供试品种

湘常 3 号由湖南农人苘麻所提供, 辣椒(鄂门甜椒、伏地尖、湘研 1 号)、番茄、茄子、黄瓜、西瓜、大白菜、小白菜、萝卜、甘蓝由湖南省园艺研究所提供, 三生烟、普通烟、心叶烟由湖南省作物研究所提供。

3 菌株培养

菌株移接于 C-V8A(20% V8 汁、0.3% CaCO₃、1.5% 琼脂)平板上, 于 24℃ 培

养 7 天后,沿菌落边缘打出直径为 8mm 菌块,接入装 100ml Plich's 培养液(100ml 培养液含 KH_2PO_4 0.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.0g, 天门冬酰胺 1.0g, VB₁₂ 0.01g, 酵母浸膏 5g, 葡萄糖 25g)的 250ml 三角瓶,每瓶接 10 块,置于 24℃ 下振荡培养 15 天,培养液经定性滤纸过滤除去菌丝体后,取滤液经 0.22 μm 细菌滤膜真空抽滤,所得到的滤液为无菌培养液。

4 毒素激发蛋白的纯化

参照 Billard 等(1988)的方法,在 5l 的培养滤液中加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至饱和线达 80% (0℃),沉淀过夜,经 11000r/min 离心 10 分钟,沉淀溶于去离子水,并于 4℃ 下对去离子水透析 24 小时后,取提取的粗毒素(80-100mg),加到经 10mM 醋酸钾缓冲液(pH5.0)平衡的 CM-52 柱(30×2.8cm I.D.),柱先后用含 0、0.5mol/l 的同样缓冲液进行洗脱,洗脱速度 20ml/小时,6ml/管,用紫外分光光度计测定 280nm 的光吸收,取对苯酚致毒的 Cl 经透析脱盐后冻干,溶于 1ml 去离子水,上经 10mM Tris-HCl 缓冲液先平衡的 DE52 柱,先后用含 0、0.25、1.0M 的同样缓冲液以上达相同的条件进行洗脱,分离获得的活性峰上 Sephadex G75 柱(100×1.8cm I.D.),用去离子水进行洗脱分离,收集活性组分冻干即得纯毒素 BP1,由诱导三生烟产生过敏反应,的 Cl 上经 PBS 缓冲液(0.02mol/l, pH7.0)平衡的 DEAE-Sephacrose F.F.(Pharmacia 公司产品)层析柱(2.0×60cm),先用 2 倍体积平衡缓冲液淋洗至 A280 最低,然后进行 0~1mol/l NaCl 线性梯度洗脱,5min/min,4ml/tube,测试后收集活性组分,将以上多次过柱所得活性组分合并后透析脱盐,冻干,取适量冻干粉溶于 PBS 缓冲液(0.02mol/l, pH7.0)后,上 FPLC superose-12 柱(HR10/30, Pharmacia),用 0.02mol/l pH7.0 PBS(含 0.15mol/l NaCl)进行洗脱,收集活性组分透析后冻干得纯 BP2 毒素激发蛋白。

5 分子量测定

采用 SDS-PAGE 测定毒素的分子量,其凝胶浓度为 12.5%,Laemmli 缓冲系统(Laemmli,1970) 低分子量标准蛋白为 Sigma 产品(Mr:94、67、43、30、20、16、9、14.4、10.7、8.1、6.2),固定液为甲醇:冰醋酸:水=3:1:6,用考马斯亮 R250 进行染色。

6 等电点测定

聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳 (IEF)，用含 0.7%两性电解质 (Bio生化所，pH3.5-10.0) 的 7%凝胶，在 24℃ 下聚焦 2 小时。切段法测定 pI 梯度。

7 蛋白质含量测定

以牛血清蛋白作标准，采用考马斯亮蓝色法 (Bradford, 1976) 测定纯毒素源发蛋白中的蛋白质含量。用酚-硫酸比色法 (杜克夷, 1989) 测定糖的含量。

8 氨基酸组成及 N-末端部分序列分析

样品经 5.7mol/L 盐酸水解 24 小时后，水解物用自动氨基酸分析仪分析其全组成。部分序分析在 Applied Biosystem 470A 型气相蛋白序列仪中进行，从 N 端依次降解的氨基酸衍生物—苯胺噻唑酮(PTH)用 Applied Biosystem 120 型 PTH 分析仪分析。

9 毒素源发蛋白的生物活性测定

在 25℃ 光照培养箱中，用 2-3 叶期的切根辣椒、甜椒和三生椒苗进行毒素源发蛋白液浸处理 48 小时，记载叶片过敏坏死反应 (0=无坏死斑；1=一片子叶显坏死斑；2=二片子叶显坏死斑；3=一片真叶显坏死斑；4=两片真叶显坏死斑；5=全株性坏死)。同时，分别设蒸馏水、未接菌的培养液、层析洗脱液为对照，三次重复。

10 毒素源发蛋白诱导辣椒抗疫病效果测定

在温室盆钵中播种辣(甜)椒，待苗长至 6 片真叶时，向每株苗的根际灌 10 μg/ml 的毒素源发蛋白溶液 10ml，以水为对照。每个品种诱导处理 100 株苗，于 25℃ 诱导处理 24 小时后，采用灌根法接种辣椒疫病病菌，接种体浓度为 10^5 个游动孢子/ml，每株 10ml。接种 7 天后调查发病严重度 (分级：0=无症；1=幼苗基部根茎稍有变黑，但植株健康不萎蔫；2=幼苗基部根茎明显变黑，植株开始萎蔫，但不落叶；3=基部根茎变黑达 2cm，植株明显萎蔫，下部叶开始脱落；4=植株大量落叶或全株萎蔫；5=全株枯死)。利用发病严重度降低计算诱抗效果。

结果分析

1 毒素源发蛋白的纯化

P. boechneriae 的培养液经 85%饱和 (NH₄)₂SO₄ 沉淀，透析去盐后，含全部活

性的蛋白液上经 10mM 醋酸钠缓冲液 (pH5.0) 平衡过的 CM52 层析柱 (30×2.8cm)，先后用同样缓冲液和含 0.5MNaCl 的同样缓冲液进行梯度洗脱，洗脱液分成两个活性峰 (如图 1)，其中 C1 对苎麻具有致萎作用，但不诱发甜椒产生过敏反应；而 CII 仅对甜椒产生过敏性坏死反应，苎麻无反应。结果见图版 1、2。取 C1 上 SephadexG25 层析柱脱盐，收集活性峰，经冻干后溶于去离子水，上经 10mM 磷酸钾缓冲液 (pH7.0) 平衡过的 DE52 层析柱 (30×2.8cm)，先后用含 0、0.25、1.0 mol/l NaCl 的相同缓冲液进行梯度洗脱，分成 D1、D11、D111 3 个峰 (图 3)，经蛋白酶水解，D11 诱发能诱发苎麻萎焉 (图版 3)。最后，将透析浓缩的 D11 上 Sephadex G75 柱，用去离子水连续洗成分成 2 个峰 (图 3)。其中 S1 为致萎活性峰，如图版 4 所示，并将此毒素命名为 BP1 蛋白。而诱发甜椒产生过敏反应的 CII 经过 DEAE-sepharose F.F. 对层析，形成两个主峰 (图 4)。用切根甜椒苗鉴定过敏反应，结果表明 D2 为强活性峰 (图版 5)。将多次过柱所收集的活性组分，脱盐后冻干，取适量干粉用缓冲液溶解后上 FPLC-seperose-12 柱 (图 5)，测试后发现 S1 可诱导切根甜椒苗产生过敏性反应 (见图版 6)。用 FPLC-seperose-12 柱进一步分离纯化的激发蛋白液，充分对去离子水透析后冻干即为 BP2 蛋白。

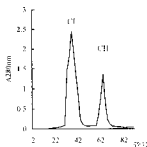


图 1 苎麻疫霉毒素 CM52 柱层析分离

Fig1 Chromatogram of *P. hachsteriae* toxin on CM52 column

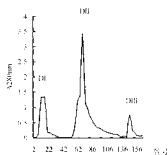


图2 产麻梭菌毒素(C1)DE52 柱层析

Fig.2 Chromatogram of *P. bochmeriae*(C1) on DE52 column

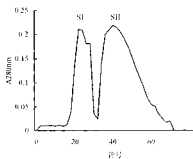


图3 产麻梭菌毒素(B1)Sephadex G75 柱层析分离

Fig.3 Chromatogram of *P. bochmeriae* toxin on Sephadex G75

Column

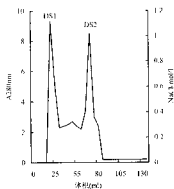


图4 苜蓿疫毒激发蛋白 (C2) 在 DEAE-Sepharose E 的分离

Fig4 DEAE Sepharose column chromatography of C1

P. boehmeriae

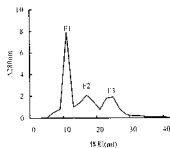


图5 苜蓿疫毒激发蛋白 (DS2) 在 FPLC superose-12 (HR10/30) 上的分离和纯化

Fig 5 Separation and purification of DS2 from *P. boehmeriae* by FPLC
superose 12 column (HR10/30)

2 毒素诱发蛋白的部分特性

2.1 寄主专化性

用 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的毒素诱发蛋白溶液 (BP1 或 BP2) 处理 12 种植物的切根苗, 于 25°C 下保持 24 小时后, 测定叶片出现过敏性坏死反应。结果表明这种诱发蛋白 BP2 具有诱导寄主上表达抗病性的功能 (见表 1)。

2.2 分子量测定, SDS-PAGE 测定的毒素诱发蛋白分子量 BP2 为 10.6kD, BP1 为 15.2。

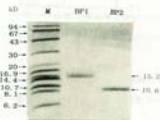


图 3 纯化的芭麻疫霉毒素诱发蛋白 SDS-PAGE 上的分子量测定

Fig 3 Molecular weight identification of purified elicitor of *P. boehmeriae* by SDS-PAGE

2.3 等电点测定, 对诱发蛋白进行 IEF 鉴定, 以 pH 值及其与阳极的距离作图。两种毒素诱发蛋白在未切成段上显色的位置由图求得 pI : BP2 为 4.32, BP1 为 3.1, 均为酸蛋白。

2.4 氨基酸组成及 N-末端部分序列分析, 测定结果表明, 毒素诱发蛋白 BP2 含 15 种氨基酸, 其残基比例与已报道的 α -elicitor 相似 (表 2); N-末端 20 个氨基酸序

列为 Thr-Thr-Cys-Thr-Ala-Ileu-Gln-Gln-Thr-Ala-Ala-Tyr-Val-Ala-Leu-Val-Ser-Ile-Leu-Ser, 与已报道的 Elicitin 有广泛的同源性。BP1 未作测定。

2.5 毒素激发蛋白 (BP2) 处理对辣椒疫病的诱抗效果

用 3 个辣(甜)椒品种品门甜椒、湘研 1 号和伏地辣椒同时测定激发蛋白处理的诱抗效果, 发现芒果疫毒激发蛋白 BP2 均能诱导辣(甜)椒对疫病的抗性(表 3)。

表 1 芒果疫毒激发蛋白诱导过敏性反应的寄主专化性测定

Stable1 Host-specificity of hypersensitive response induced by BP1 and BP2 from *P.*

bachumeriae

寄主	来源	对 BP1 的反应	对 BP2 的反应
Hosts	Source	Response to BP1	Response to BP2
棉花(湘棉 2 号)	市售	+++	-
苎麻(湘苎 3 号)	湖南农人苎麻所	+++	-
三生烟	湖南省作物研究所	-	++
普通烟	湖南省作物研究所	-	++
心叶烟	湖南省作物研究所	-	++
番茄(早丰)	西安市蔬菜研究所	-	-
茄子(湘早茄)	湖南省园艺研究所	-	-
茄门甜椒	湖南省园艺研究所	-	+
伏地尖辣椒	湖南省园艺研究所	-	+
黄瓜(津研四号)	天津市黄瓜研究所	-	-
西瓜(湘杂 6 号)	湖南省园艺研究所	-	-
大白菜(中白 5 号)	中国农科院蔬菜花卉所	-	-
小白菜(上海青)	市售	-	-
萝卜	市售	-	-
甘蓝(京丰 1 号)	中国农科院蔬菜花卉所	-	-

表2 大麻烷萜素 BP2 激发蛋白的氨基酸组成分析

Table 2 Amino acid analysis of *P. bocheveriae* elicited in(BP2)

氨基酸	实验残基数	理论残基数
Amino acid	Experimental residue number	Theoretic residue number
Phe	3.04	3
Leu	9.95	10
Ile	2.97	3
Met	2.93	3
Val	4.87	5
Ser	14.06	14
Pro	4.01	4
Thr	17.08	17
Ala	10.32	10
Tyr	4.03	4
His	0	0
Lys	3.08	3
Asx(Asp+Asn)	8.05	8
Glx(Glu+Gln)	4.87	5
Cys	5.78	6
Trp	0	0
Arg	0	0
Gly	2.89	3
合计		98

表 3 苾麻疫菌激发蛋白 BP2 诱导辣(甜)椒对疫病的抗性

Table 3 Resistance to *Phytophthora* blight of pepper induced by *P. boehmeriae* elicitor

品种 Varieties	处理 Treatments	发病严重度(%) Severity of disease	效果(%) Effects(%)
茄门甜椒	BP2(10 μ g/ml)	42.3	43.5
	H ₂ O	67.4	
伏地尖辣椒	BP2(10 μ g/ml)	32.3	36.2
	H ₂ O	50.6	
湘研 1 号辣椒	BP2(10 μ g/ml)	33.2	40.4
	H ₂ O	55.7	
湘研 5 号辣椒	BP2(10 μ g/ml)	32.9	29.5
	H ₂ O	46.8	

讨论

近年来研究表明,疫霉菌(*Phytophthora* spp.)胞外中的毒素激发蛋白(Elicitor)存在多种形式(Le Berre 等, 1994; Yu, 1995; Baillieux 等, 1995, 1996)。一种是 β -elicitor, 其等电点大于 5.0, N 端第 13 个氨基酸残为 Val, 可诱导烟产生系统性过敏反应, 包括从 *P. cryptogea*, *P. cinnamomi*, *P. drechsleri*, *P. megasperma* var. *megasperma*, *P. sojae* 分离得到的碱性蛋白, 如 Cryptogein, Cinnamoin, Dre- β , MgM- β 和 Soj- β 。另一种是 α -elicitor, 包括 *P. capsici*, *P. parasitica*, *P. infestans*, *P. cactorum*, *P. drechsleri*, *P. megasperma* var. *megasperma*, *P. sojae* 的培养液中所分泌的酸性蛋白, 如 Capsicin, Parasiticein, Inf-, Cacto-, MgM- α , Dre- α , Soj- α 。这类毒素激发蛋白的分子量均为 10kD, 并在结构上有着广泛的同源性, 均能诱发烟产生过敏性坏死反应(Yu, 1995)。本研究表明, *P. boehmeriae* 分泌的毒素激发蛋白 BP2 是一种分子量 10.6kD, 等电点为 4.32 的酸性蛋白, N 末端第 13 个氨基酸残基为 Val, 对烟草的毒性和氨基酸组成及其残基比例均与国外报道的 α -elicitor 类似, 因此 BP2 是一种 α -elicitor。Kounoun 等(1993)和 Bonnet 等(1996)在分析寄主植物对 Cryptocin

的过敏性坏死反应时发既存在寄主专化性, 仅能诱导多种烟属植物、许多萝卜品种和少数芸苔品种产生过敏性坏死反应, 以及烟草对真菌和细菌病害的系统获得抗病性(systemic acquire resistance, SAR)。本研究结果表明, BP2 可诱导二种烟草和辣椒产生过敏性反应, 而对十字花科植物无效, 并具有诱导抗病性功能。诱导级(甜)椒对疫病的抗病效果为 30-40%。出现这种不同的原因可能与菌株来源或蛋白的结构有关。

糖蛋白毒素或微孢子是疫霉菌另一类重要胞外蛋白, 已发现多种分子量不一的糖蛋白具有对寄主植物致病或诱导非寄主植物产生系统获得抗病性(systemic acquire resistance, SAR)。如从 *P. parasitica* var. *nicotianae* 分离的 46kD 糖蛋白和从 *P. sojae* 分离的 32kD 糖蛋白可诱导烟草产生抗病性(Farmer 和 Helgeson, 1987; Baillyeuil 等, 1995)。从 *P. megasperma* 分离的 42kD 糖蛋白可诱导欧芹产生抗病性(Parker 等, 1991)、以及从 *P. parasitica* var. *nicotianae* 分离的 15kD 糖蛋白具有致病作用(姚龙, 1985)等。作者从苘麻疫霉中分离的另一种蛋白是含有糖基的酸性(pI 3.1)蛋白质毒素 BP1, 其分子量为 15kD。寄主专化性测定结果表明, BP1 仅对寄主苘麻和棉花具有致病作用。关于其结构与其它糖蛋白毒素的关系有待进一步研究证明。

附:

图版 I



图版 II



图版 III



图版 IV



图版 V



图版 VI



第2章 苎麻疫霉激发蛋白基因断裂现象初探

摘要 苎麻疫霉(*Phytophthora boehmeriae*)外分泌具有诱抗作用的 α -elicitin。

根据 α -Elicitin第24-30和第56-63位保守区氨基酸编号的引物,对苎麻疫霉菌基因组DNA进行特异的PCR扩增反应,发现其扩增DNA的片段比预计的大。回收纯化特异扩增DNA,并进行克隆筛选和序列分析,结果表明,特异扩增的Elicitin基因亚克隆DNA为570bp,大于设计的417bp。在特异片段中,存在3个内含子将基因断裂成4个阅读框架即ORF1、ORF2、ORF3、ORF4,其中ORF1和ORF4含有与引物相同的序列,但其它序列与已克隆的Elicitin基因无同源性。因此,苎麻疫霉菌基因组中的Elicitin基因可能存在断裂现象。

关键词 苎麻疫霉, 激发蛋白, Elicitin 基因, 断裂基因

植物与病原菌之间的相互作用包括两种类型:一种是亲和性相互(compatible interaction),即病原菌侵染上植物(感病);另一种为非亲和性相互作用(incompatible interaction)。病原菌接触寄主或非寄主植物时产生过敏性反应(hypersensitive response, HR)。在这两种反应中均涉及到寄主与病原菌之间的分子信号交换,其结果导致植物感病或抗病(Paxton和Groto, 1994)。在信号交换中,由寄主所识别的病原菌信号分子称为激发子(elicitin),迄今从微生物中分离出各种化学结构的激发分子,其中,从疫霉菌中分离的Elicitin蛋白已成为植物与病原菌相互作用分子机理研究的重要工具(Yu, 1995)。在*Phytophthora*属草的分子互作中,前人发现多种疫霉菌分泌一种分子量为10kD,由98个氨基酸残基组成的蛋白(Elicitin),这种蛋白具有信号传导的功能,能诱导刺草产生一系列抗病反应(Yu, 1995; Kamoun等, 1993; Bonnet等, 1997)。根据其氨基酸保守区序列合成引物,已从*P. cryptogea*、*P. parasitica*、*P. infestans*和*P. sojae*中克隆出其elicitin基因,并进行了序列分析,证明Elicitin基因为单阅读框架(ORF),并在基因组中由2-3个拷贝组成小基因家族(Panabieres等, 1995; Kamoun等, 1993,

1997; Rao 和 Tyler, 1996)。

最近作者从苎麻疫霉(*Phytophthora boehemiae*)中分离出两种毒素激发蛋白, 其中 BP2 与 α -Elicitin 的性质相似(谢因炎等, 1998)。用 Panabieres 等(1995)根据 α -Elicitin 第 24-30 和第 56-63 位保守区氨基酸推导的引物进行特异 PCR 扩增反应, 发现其扩增 DNA 片段比设计的大, 这表明苎麻疫霉 Elicitin 的基因可能存在断裂现象。为此, 作者对苎麻疫霉菌基因组中 Elicitin 基因进行了亚克隆及序列分析。

材料与方法

1 菌株与培养条件

苎麻疫霉(*Phytophthora boehemiae*) S585 由中国农业大学植病系提供, 菌株在 Plich 培养液中, 24℃ 下培养 5 天, 取菌丝体供 DNA 提取用。

2 DNA 提取

采用 Murray 和 Thompson(1980)的 CTAB 程序, 取 4-6g 菌丝体用灭菌去离子水洗三次, 于液氮中研磨成粉后, 每 g 加预热的提取缓冲液 (0.7M NaCl, 1%CTAB, 50mM Tris-HCl, 250mM EDTA, 1% β -羟基乙醇, pH8.0) 10ml, 于 65℃ 处理 1 小时, 用等体积的氯仿-正辛醇(24:1)抽提二次, 于 13000g(>15℃)离心 20min, 取上清加等体积的缓冲液 B(1%CTAB, 50mM Tris-HCl, 10mM EDTA, pH8.0), 在室温下至少放置 30min, 待 DNA 充分沉淀后 2000g 离心 5min, 沉淀用提取缓冲液与缓冲液 B (1:1) 混合液和 75%乙醇分别各洗一次, 2000g 冷冻离心 5min, 沉淀真空空气中自然干燥, 最后用适量 TE (10mM Tris-HCl, 1mMEDTA, 2 μ g/ml, pH7.4) 溶解 DNA, -20℃ 保存。

3 Elicitin 基因的 PCR 特异扩增

3.1 特异引物的合成

根据 Panabieres 等 (1995) 发表的两条引物序列, 委托美国 Cybersyn 公司合成。

引物 1: 5' TTC AAC CAA TGA TCT ACE GA>

G T G A

T

引物 2: < ACA TTA TGC TAC TAA TTC TTC TA 5'

3.2 PCR 反应

反应体系 50 μ l 含 50mmol/l KCl, 10mmol/l Tris-HCl (pH8.2), 2.5mmol/l MgCl₂, 200 μ mol/l dNTP, 1mg ml 明胶, 引物 1、2 各为 5-10 μ g/ml, 1.5u Tag DNA 聚合酶, 加入 50 μ l 的 4:蜡油密封。反应过程: 预变性 94°C 2min, 变性 94°C 1min, 复性 25°C 1min, 延伸 72°C 2min, 总延伸 72°C 5min, 共 35 个循环。

3.3 电泳检测

用 1.5TAE 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 若得到所需的特异性片段, 在紫外灯下将含有该片段的胶块切下来, 回收产物。

4 特异扩增片段的纯化

用 Promega 公司提供的 PCR 产物纯化试剂盒 (Wizard), 按试剂盒说明指导纯化回收的特异扩增的 DNA。步骤如下:

1. 切下 PCR 特异扩增片段凝胶条 (300mg) 于 Eppendorf 管中, 加 1ml 树脂, 至 65°C 水浴 5 min 或直至胶完全融化;
2. 准备 Wizard 柱, 取出注射器的塞, 连接注射器和柱子;
3. 吸取树脂/DNA 混和物, 缓慢插入塞子, 将悬浮液推入微柱;
4. 移去注射器, 取出塞子, 重新接上注射器和微柱, 加入 2 ml 80% 异丙醇于注射器中, 洗涤微柱, 插入注射器塞子, 轻轻将异丙醇完全推入微柱;
5. 移去注射器, 将微柱移入 1.5ml Eppendorf 管中, 10000r/min 离心微柱 2min, 干燥树脂;
6. 转移微柱于一个新的 Eppendorf 管中, 加入 50 μ l D.W. 或 TE 缓冲液于微柱中, 静置 1 min 后, 10000r/min 离心 20 s;
7. 移去微柱, DNA 保存在 4°C 或 -20°C;
8. 1-2 μ l 走胶检测回收效果。

5 特异扩增片段的克隆

5.1 特异 PCR 扩增片段的连接

将纯化的特异 PCR 扩增片段, 按美国 Promega 公司提供 pGEM[®]-T Easy Vector System 1 的操作指导, 从 EcoRI 酶切位点连接到载体 pGEM[®]-T Easy Vector 上。

连接体系如下: 20 μ l

T-vector	1 μ l
10x buffer*	2 μ l
T4 ligase	1 μ l
PCR 产物	16 μ l

*10x buffer (T4 DNA 连接酶缓冲液) 成分: 300mmol/l Tris-HCl (pH 7.8), 100mmol/l MgCl₂, 100mmol/l DTT, 10mmol/l ATP.

连接后于 4℃ 冰箱过夜

5.2 特异扩增片段的转化

5.2.1 感受态的制备

以 E. coli DH5 α 为宿主细胞, 采用 CaCl₂ 法制备感受态, 步骤如下:

1. 取单个菌落接种于 4ml LB 液体培养基中, 37℃ 振荡培养 12 小时;
2. 取 20 μ l 菌液接种于 4ml LB 培养液中, 37℃ 振荡培养 2-3 小时 (OD 值在 0.6 左右);
3. 将菌液分装于 1.5ml 的 Eppendorf 管中, 冰浴 10min, 4,000 r/min 冷冻离心 6 分钟, 弃上清, 收集菌体;
4. 每管加入 600 μ l 冰冷的 0.1mol/l CaCl₂, 悬浮菌体, 冰冷 15min;
5. 4000 r/min 冷冻离心 10min, 弃上清;
6. 加 200 μ l 冰冷的 0.1 mol/l CaCl₂, 悬浮细胞备用。

5.2.2 转化连接产物

1. 将 20 μ l 连接产物加入到 100 μ l 感受态细胞悬浮液中, 冰置 30 分钟;
2. 42℃ 水浴热激 90s, 然后冰浴 2min;
3. 加 400 μ l LB 培养液, 37℃ 水浴 30min;
4. 在含氨苄青霉素 (50 μ g/ml) 的 LB 培养基平板上, 涂布 16 μ l IPTG (50mg/ml) 和 16 μ l X-Gal (50mg/ml);
5. 取 20 μ l 菌液涂布于平板上, 风干后, 37℃ 培养 24 小时。

5.2.3 质粒 DNA 的提取

质粒 DNA 采用 Promega 公司提供的 Wizard[®] TM plus Minipreps DNA purification system 进行提取, 步骤如下:

1. 取单个白色菌落及对照的蓝色菌落，分别接种到 3ml LB 培养基中，37℃振荡培养 12 小时；
2. 移入 Eppendorf 管中，10000r/min 冷冻离心 2min，弃上清；
3. 加入 200 μ l 蔗糖悬浮液，悬浮细胞；
4. 加入 200 μ l 细胞裂解液，颠倒混和；
5. 加入 200 μ l 中和溶液，颠倒混和；
6. 10000r/min 离心 5-10min，冰浴 5min；
7. 用 3ml 一次性注射器，取出其塞子，将注射器连接在 Wizard 微柱上；
8. 先加入 1ml 悬浮树脂于注射器中，再将上述混合液加入注射器中，插入塞子，将混合液缓慢推入微柱；
9. 分离注射器和微柱，移去注射器上的塞子，重新连注射器中，插入塞子，将溶液轻轻推入微柱；
10. 移去注射器，将微柱还在接在 1.5ml 的 Eppendorf 管上，10000r/min 离心 2min，干燥树脂；
11. 将微柱连接在 1.5ml 的 Eppendorf 管上，加入 50 μ l D.D.W，静止 1min，10000r/min 离心 20s；
12. 移去微柱，DNA 保存-20℃备用。

5.4 克隆质粒的酶切鉴定

提取的质粒用 EcoR I 进行酶切鉴定：

体系：20 μ l

质粒 DNA	15 μ l
D.D.W	2.5 μ l
10x buffer (H)*	2.5 μ l
EcoR I	0.5 μ l

37℃水浴 5-6 小时，0.8%琼脂糖凝胶电泳检测。鉴定的阳性克隆重新划线培养，保存。*10x buffer (H): 90mmol/l Tris-HCl, 20mmol/l MgCl₂, 150mmol/l NaCl pH7.5。

6 特异扩增 DNA 片段的序列测定

将从酶切鉴定为阳性克隆提取的质粒 DNA, 委托美国 Cybersyn 公司进行 DNA 测序。测序采用双脱氧链终止法, 从 pGEM⁺-T-Easy Vector 质粒 SP6 与 T7 两个引物方向, 在 ABI DNA 测序仪上自动操作酶反应, 电泳和 DNA 带型检测和结果分析, 最后以正反方向的测序结果进行序列校正和拼接。

结果分析

1 特异 PCR 扩增产物

应用 Panabieres 等 (1995) 根据 α -elicitin 第 24-30 和第 56-63 位保守区氨基酸推导的引物进行苎麻 DNA 特异 PCR 扩增反应, 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测结果为两条带, 其中回收的大带 (约 600bp), 用同样的特异引物能被再次扩增, 而小带 (约 400b) 不能被再次扩增, 结果见图 1 所示。但 Panabieres 等 (1995) 对 *P.corymbosa* DNA 特异扩增产物却为 117b, 这表明苎麻基因组中的 α -elicitin 基因可能存在结构断裂现象。

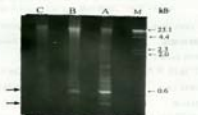


图 1 苎麻疫霉 Elicitin 基因特异 PCR 扩增

Fig1 Amplification of elicitin gene-specific PCR of *Phytophthora bohemior*

(A 为第一次扩增; B 为大带第二次扩增; C 为小带第二次扩增)

2 特异扩增 DNA 的克隆及其筛选

Tag DNA 聚合酶催化的 PCR 反应产物在 3'端被加上一个脱氧嘧啶核苷酸, 它与 pGEM T-Easy vector 质粒 3'端的多聚胸腺嘧啶尾退火连接, 本研究特异扩增的

苎麻疫霉 Ellicitin 基因 600pb 片段，通过 Wizard PCR 产物纯化试剂盒从电泳琼脂糖凝胶中回收纯化后，由 pGEM T-Easy vector 质粒的 EcoRI 酶切位点连接到质粒中，见图 2 所示。连接好的质粒转化感受态 *E. coli* DH5 α 后，在 LB 平板上利用质粒的氨苄青霉素抗性和 α 互补筛选转化克隆。结果表明，多数为转化的白色菌落，其转化率为 10^5 cfu/ml (见图 3)。

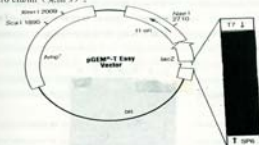


图 2 苎麻疫霉特异 PCR 扩增 DNA 片段连接到 pGEM T-Easy Vector 示意图

Fig2 Outline of pGEM T-Easy Vector linked by specific PCR amplified DNA of

Phytophthora bohemiae



图 3 苎麻疫霉特异扩增 DNA 片段克隆筛选

Fig3 Selection of positive clones of specific amplified DNA of *Phytophthora bohemiae*

(白色菌落为阳性克隆，蓝色菌落为阴性克隆)

3 阳性克隆的酶切鉴定

取筛选到的 *Escherichia coli* 15 个白色菌落 (pXP110) 和 1 个蓝兰菌落, 于 LB 培养液中振荡培养 24 小时后, 用 Wizard 质粒提取试剂盒提取克隆的质粒 DNA, 经 *EcoRI* 或 *PstI* 酶切后电泳检测如图 4 所示。由于 PGEM-T Easy Vector 中, 存在两个 *EcoRI* 酶切位点和一个 *PstI* 酶切位点, 当用 *EcoRI* 酶切为双带 (质粒和目的片段) 或只有质粒带 (目的片段较小, 电泳未检测到); 用 *PstI* 酶切为一大于 *EcoRI* 酶切带时, 该克隆为阳性, 否则为阴性。从图 4 可见, 被鉴定的白色菌落 (pXP110) 为阳性克隆。



图 4 苾麻枯萎病特异扩增 DNA 片段阳性克隆酶切鉴定

Fig4 Identification of putative clones of specific-PCR amplified DNA of *Phytophthora blight* degraded by *EcoRI* and *PstI*

*白色菌落质粒 DNA (110), A 为未酶切, B 为 *EcoRI* 酶切, C 为 *PstI* 酶切;

**蓝色菌落质粒 DNA (110), D 为 *PstI* 酶切, E 为 *EcoRI* 酶切, F 为未酶切。

4 特异扩增 DNA 片段的序列结构

取酶切鉴定为阳性克隆质粒 DNA (pXP110), 通过双脱氧法, 从质粒的 SP6 与 T7 两个引物方向进行正反测序, 经校正拼接的序列见图 5。从拼接的序列编码分析, 扩增的 570bp 特异片段中存在 3 个内含子, 将基因断裂成 4 个阅读框架即 ORF1、ORF2、ORF3、ORF4。其中 ORF1 和 ORF4 含有与引物相同的序列, 但其它序列与已克隆的 *Elicia* 基因无同源性。因未对 BP2 的氨基酸序列进行测定, 本研究得到的特异 DNA 片段所出现的断裂现象只能作为初步证据。而在测定 BP2 蛋白质一

级结构的基础上, 构建芭麻疫霉基因文库, 利用克隆的特异片段作探针, 测出 Elicitin 基因全序列, 才能作最后结论。

5'TTCACCCAGTGTCTCAGGAAATGCGAGAAAGAGCAAGCGTTTCGACTTCAAGACGTCGAGACC
TACAGAAATGGAAGAACTGCAATCTGAGGGGCTGAGCTAGCAAGAAGAACTGGTCATACGGAAGAG
CGAAGACACGCTACGAGTACAAGCTACAGGGAATCTTAAGGTGACGTGAGATGAGATGAGATGAGATGAG
CAAGCAAGTGAGAGTCTCCATACGCTAGTTCGAGTGACGAGATTGAGCTGTTTACCTCAGGGCTTGCTG
GCCCTGACCGGAGGACACACAGAGAGTTTCGACTGGATAGCTGGCTCAGTACAGTGTAGCTGCTGAAGAA
CTGAGANGATATGGGAAATGATGATCACTCGGAAGAGACCTATAGACATCTGTGAAGATTTTGGCGGAGGTATC
AGTCGAGTCTCTGGGAATTTGGGCAATTGTTGGGCACTACTCAAGCTCCAGCAGAGGAACACAGTTGATGCACT
CTGTGATGAAGGACAGGCTGATGAATTTGCTCTGTTGGTGAAGATTGGTGGTGCACACAGATGATCAAGAAGA
T3'

图 5 芭麻疫霉 Elicitin 基因特异扩增 DNA 片段序列的断裂结构

Fig5 Splited structure of specific PCR amplified DNA of elicitin gene of *Phytophthora
bochemiae*

讨论

在卵菌中, Elicitin 是一个广泛存在的保守小基因家族 (Gayler 等, 1997)。前人已克隆的 Elicitin 均为单阅读框架 (Panabieres 等, 1995; Kamoun 等, 1993, 1997; Mao 和 Tyler, 1996), 但作者对芭麻疫霉 Elicitin 基因亚克隆序列分析结果却表明, 基因存在 4 个 ORF 和 3 个 Intron 组成, 这种断裂现象暗示在卵菌基因组中可能存在多种结构形式。近年来, Elicitin 基因已作为卵菌分子系统学和分子生态学研究的工具 (Baillieu 等, 1996; Gayler 等, 1997; Lacoort 和 Duncan 等, 1997), 因此, 芭麻疫霉 Elicitin 基因断裂现象的发现, 可能推动 Elicitin 生物学功能的最终阐明。

第三篇 辣椒疫霉致病毒素

第 1 章 辣椒疫霉致病毒素的纯化及其特性研究

摘要 辣椒疫霉(*Phytophthora capsici* Leonian)在培养液中振荡培养时可分泌毒素。这种毒素能引起辣椒形成水渍状褐腐病,类似病原菌感染后形成的症状。Pfich's 和 V8C 培养液适于 *P.capsici* 的生长和产毒;生长适宜温度和 pH 范围分别为 20-30℃、pH6-7。在 25-30、pH5-8 的条件下培养滤液毒性最强;培养 15 天产毒达到最高值。滤液先后经 85%硫酸铵沉淀、DE52、CM32 和 Sephadex G-75 柱层析将毒素纯化。经鉴定该纯毒素为 39.8kD 酸性糖蛋白,并对 80℃以上高温或蛋白酶敏感,而 β -D-葡萄糖苷酶处理不影响其毒性,蛋白亚基为毒素的活性中心。毒素处理寄主叶片引起细胞性坏死,这一作用与辣椒品种抗病性有关。

关键词 辣椒,辣椒疫霉,糖蛋白毒素

辣椒疫霉病(*Phytophthora capsici* Leonian)是世界性的土传病害,其病原菌除危害辣(甜)椒外,也可侵染番茄、茄子、黄瓜、西瓜、甜瓜、西葫芦、南瓜、可可和澳洲坚果等作物,其急性症状均呈现水渍状褐腐,可能由于病菌分泌有毒代谢产物所致(Ristaino 等,1990),疫霉属许多种可分泌致病毒素(Woodward,1980)。早期研究认为,疫霉菌分泌的一种多糖是主要毒性成分(Breiman 和 Barash1981; Keen, 1975; Woodward,1980);后经精制纯化,证明毒性系多种活性组份,有分子量不一的糖蛋白(李斌和马剑, 1995; Mezzetti 等, 1994; 虎龙等, 1986)和小分子量蛋白或多肽(Pernollet 等, 1993; Yu, 1995; Capasso 等, 1997)。Vilasini 等(1994)报道了从胡椒上分离的 *P.capsici* 菌株,在离体培养可产生毒素物质,但至今尚未见有关辣椒疫霉毒素纯化的报道。为此,我们对辣椒疫霉毒素的产生条件、纯化及其性质进行了探讨。

材料与方法

1 供试菌株

辣椒疫霉病菌单孢株分离自湘研1号辣椒自然病株，经鉴定为 *Phytophthora capsici* 后，保存在利马豆琼脂斜面培养基上（18℃），供产毒培养用。

2 产毒培养条件

菌株移接于 CV8A 平板上，于 24℃ 培养 7 天后，沿菌落边缘打出直径为 8mm 菌块，接入装 100ml 培养液的 250ml 三角瓶，每瓶接 5 块，置于 24℃ 下振荡培养 21 天，培养液经定性滤纸过滤，菌丝体在 60℃ 下烘干 24 小时，称量干重，滤液经细菌滤膜真空抽滤得无菌培养液，供测试用。测试前滤液的 pH 值调至 6.5。

2.1 培养基

菌株接入(1)Plich's 培养液（100ml 培养液含 KH_2PO_4 0.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.0g, 天门冬酰胺 1.0g, VB_1 0.01g, 酵母浸膏 5g, 葡萄糖 25g）；(2)澄洁 V8 汁培养液（V8CB: 1000ul 培养液含 V8 汁 100ml, CaCO_3 3g）；(3)马铃薯葡萄糖培养液(PDB)；(4)辣椒叶煎汁培养液（PFB: 新鲜辣椒叶 200g, 加水煮沸 20 分钟，过滤，滤液加水至 1000ml）。灭菌前 pH 调至 6.5。于 24℃ 下振荡培养 15 天。每处理 3 次重复。

2.2 培养时间

从菌株接种培养 3 天后开始，每天取 3 瓶测试，直至 27 天为止。

2.3 pH

将灭菌培养液的 pH 分别调至 3-10，共 8 处理，接菌后置 24℃ 下振荡培养 15 天，每个处理 3 次重复。

2.4 培养温度

培养物分别置 10、15、20、25、30、35℃ 下振荡培养 15 天，每个处理 3 次重复。

3 毒素的纯化

3.1 粗毒素的制备

在培养滤液中加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 置饱和度达85% (0℃), 沉淀过夜, 经11000r/min离心10分钟, 沉淀溶于去离子水, 并于4℃下对去离子水透析24小时即成。

3.2 纯毒素的制备

参照 Bonnet 等 (1988) 的方法, 在培养滤液中加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 置饱和度达80% (0℃), 沉淀过夜, 经11000r/min离心10分钟, 沉淀溶于去离子水, 并于4℃下对去离子水透析24小时后, 取提取的粗毒素(80-100mg), 上经10mMTris-HCl缓冲液先平衡的DE52柱, 先后用含0、0.25、1.0M的同样缓冲液进行洗脱, 洗脱速度20ml/小时, 6ml/管, 用紫外分光光度计测定280nm的光吸收。取诱发辣椒叶片坏死的活性峰, 经透析脱盐后冻干, 溶于1ml去离子水中, 加到经10mM醋酸钠缓冲液(pH5.0)平衡的CM-52柱(30×2.8cm I.D.), 柱先后用含0、0.5mol/l的同样缓冲液以上述相同的条件进行洗脱。分离获得的活性峰上Sephadex G75柱(100×1.8cm I.D.), 用去离子水进行洗脱分离, 收集活性组分冻干即得纯毒素。

4 毒素部分理化性质测定

4.1 分子量测定

采用 Sephadex G75 分析凝胶渗透柱层析法 (Dubery 等, 1994), 柱体积为 2.5 × 60cm, 用 100nmol 醋酸钠 (内含 100nmol NaCl) 进行洗脱, 洗脱流速控制在 20ml/小时, 每管 3ml, 在 751 可见及紫外分光光度计上测定 280nm 光吸收, 标准分子量蛋白 (MW94、67、43、30、17.5、12.4kD) 购自上海生化所东风生化试剂厂。 V_0 和 V_e 用蓝色葡聚糖 (2 000 000) 和 DNP-丙氨酸 (255) 来确定。

4.2 等电点测定

采用聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳 (IEF), 用含 0.7% 两性电解质 (Pharmacia, pH3.5~10.0) 的 7% 凝胶, 在 24℃ 下聚焦 2 小时。切段法测定 pH 梯度。

4.3 蛋白质和糖含量测定

以牛血清蛋白作标准, 采用考马斯亮蓝比色法 (Bradford, 1976) 测定纯毒素激发

蛋白中的蛋白质含量。用酚—硫酸比色法（王克夷,1989）测定糖的含量。

4.4 热稳定性试验

纯化的毒素(10 µg/ml)分别置于 40-100℃ 处理 30 分钟，或 120℃ 高温高压处理 20 分钟，以不处理样品作对照，检测其毒素相对活性。

4.5 酶敏感性试验

纯毒素(10 µg/ml)与蛋白酶 K、胰蛋白酶、β-葡萄糖苷酶在最适酶促条件下 37℃ 反应 30 分钟(酶液反应浓度均 10 µg/ml)，以不加酶液处理为对照，分别测定其毒素相对活性。

5 毒素的生物活性测定

5.1 供试品种

供试品种由湖南省园艺研究所提供，慈门甜椒（高感）、湘研 1 号辣椒（感病）、湘研 5 号辣椒（中抗）、SCM334（高抗）。

5.2 叶片注射毒性检测法

取嫩真叶，待制样品经过透析去盐后，用微量注射器沿叶背的叶脉注入 5-10 µl 样品，以蒸馏水、未接菌的培养液、层析洗脱液等为对照，每处理注射 5 片叶，24 小时后测定坏死斑面积。以坏死百分比作毒素的相对活性。

结果分析

1 培养条件对 *P. capsici* 生长和产毒的影响

1.1 培养基：从表 1 看出，不同培养液对 *P. capsici* 生长和产毒的影响很大，其中 Plich's 培养液最适于 *P. capsici* 的生长和产毒，故本研究选用 Plich's 培养液。

表 1 培养基对辣椒疫霉生长和产毒的影响

Table 1 Effects of media on *Phytophthora capsici* growth and toxin production

培养基 Media	菌丝干重 Mycelial dry weight (mg/flask)	茄门甜椒叶坏死率 Necrosis rate of bell pepper leave(%)
Plich's 培养液 Plich's liquid medium	153.7	84.3
V8 汁-CaCO ₃ 培养液 V8 juice-CaCO ₃ broth	137.3	78.5
马铃薯葡萄糖培养液 Potato dextrose broth	96.8	56.4
辣椒叶煎汁培养基 Pepper leaf broth	94.6	54.7

1.2 培养时间: 不同培养时间对 *P. capsici* 的生长和培养滤液毒性的影响见图 1, 图 1 所示, *P. capsici* 的生长在培养的前 15 天随培养时间的延长而加快, 以后菌丝干重不再增加, 在生长增加的同时, 培养滤液的毒性也相应增强, 第 15 天的培养滤液的毒素活性达到最高以后不再增加。

1.3 pH: 从图 2 可见, *P. capsici* 生长高峰出现在 pH6-7, pH5-8 的培养滤液毒性最大。

1.4 培养温度: *P. capsici* 生长适宜的范围为 20-30℃。最适生长温度为 25℃; 培养温度在 25-30℃范围内的培养滤液毒性最强(图 3)。

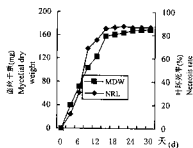


图1 培养时间对 *P. capsici* 生长和产毒的影响

Fig.1 Effects of culture time on *P. capsici* growth and toxin production

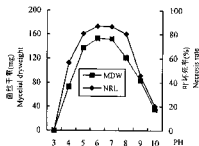


图2 pH 对 *P. capsici* 生长和产毒的影响

Fig.2 Effects of pH on *P. capsici* growth and toxin production

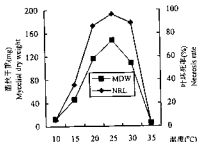


图3 温度对 *P.capsici* 生长和产毒的影响

Fig.3 Effects of temperature on *P.capsici* growth and toxin production

2 毒素的纯化

P. capsici 的培养液经 85% 饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀, 透析去盐后, 含全部活性的蛋白液上经 Tris 缓冲液 (10mmol/L, pH8.0) 平衡过的 DE52 层析柱 (20×1.5cm), 先后用含 0、0.25、1.0 mol/l NaCl 的相同缓冲液进行梯度洗脱, 分成 DI、DII、DIII 3 个峰 (图 4)。经甜椒叶片注射法检测, 仅 DII 为强毒性峰。

经 DE52 柱层析得到的 DII, 透析浓缩后, 上经醋酸-醋酸钠缓冲液 (10mmol/L, pH5.0) 平衡的 CM32 层析柱 (20×1.5cm), 先后用含 0、0.5mol/l NaCl 的相同缓冲液进行梯度洗脱, 结果分成 CI、CII 两个峰 (如图 5), 其中只有 CI 呈现毒性。最后, 将透析浓缩的 CI 上 Sephadex G75 柱, 用去离子水洗脱仅分成 1 个峰 (SI), 如图 6 所示。故将毒素命名为毒素蛋白 SI。

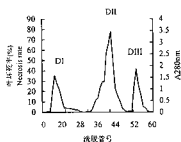


图4 辣椒疫毒素 DE52 柱层析及毒素活性

Fig4 Chromatogram of *P. capsici* toxin on DE52 column and toxin activities

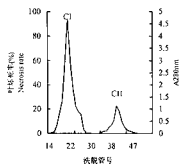


图5 辣椒疫毒素 DII CW32 柱层析及毒素活性

Fig5 Chromatogram of *P. capsici* DII column and toxin activities

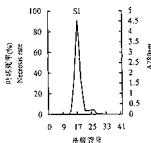


图 6 辣椒疫霉毒素 C1 Sephadex G75 柱层析及毒素活性

Fig. 6 Chromatogram of *P. capsici* CI on Sephadex G75 column and toxin

3 毒素的部分性质

3.1 分子量测定

用分析凝胶渗透柱层析法测定毒素 SI 分子量为 39.8kD，并为单洗脱峰，表明纯毒素为单一蛋白。

3.2 等电点测定：对毒素 SI 进行 IEF 鉴定，以 pH 值及其与阳极的距离作图，再按毒素在未切成段上显色的位置由图求得 pI 为 4.1，偏酸性。

3.3 毒素 SI 中蛋白质和糖的含量：毒素 SI 中，蛋白质和糖的含量分别为 86.3% 和 13.7%。

3.4 毒素 SI 对温度的敏感性：毒素 SI 对温度的敏感性试验表明，在 80℃ 以下处理 30 分钟仍保持原有的毒性，当温度提高至 100℃ 处理 30 分钟，毒素相对活性下降一半（图 7）。将毒素 SI 置 120℃ 高温高压处理 20 分钟后，其毒素活性完全丧失。

3.5 毒素对酶的敏感性：用 3 种酶处理毒素 SI，结果见图 8。经蛋白酶 K 和胰蛋白酶处理后，其毒性相对下降 50%，但 β -D-葡萄糖苷酶处理毒素相对基本不变，这表明蛋白质为毒性组份，多糖对毒性贡献不大。

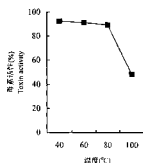


图7 毒素 SI 对温度的敏感性测定

Fig7 Effects of temperature on activities of *P. capsici* toxin SI

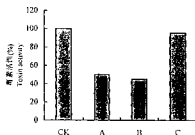


图8 毒素 SI 对酶的敏感性测定

Fig8 Effects of enzyme on activities of *P. capsici* toxin SI

4 毒素 SI 的生物活性

用注射法对非离体的茄门甜椒叶片进行毒素处理, 于 25°C 下保持 24 小时后,

叶片出现与病原菌侵染类似的水渍状褐腐斑, 而对照(去离子水)处理无症状出现。用不同浓度毒素处理不同抗性的辣椒品种, 其对毒素的反应存在明显差异, 并与品种对疫病抗性有关(如表 2)。

表 2 *P. capsici* 毒素 SI 对 4 个辣椒品种的毒性

Table 2 Toxicities of *P. capsici* toxin SI to leave of four capsicum varieties

毒素浓度 Toxin concentration µg/ml	毒素活性 (%) Toxin activities			
	茄门辣椒 (高感) Bell pepper(HS)	湘研 1 号辣椒 (感病) Chile pepper(S)	湘研 5 号辣椒 (中抗) Chile pepper(MR)	SCM334 (高抗) Chile pepper(HR)
1	22.3	5.4	3.2	0
10	80.4	40.2	25.5	3.3
100	96.4	82.9	62.4	15.4
CK(蒸馏水)	0	0	0	0

讨论

辣椒疫病的致病性是由多基因控制的数量性状 (Polach, 1972), 有报道认为角质酶和酯酶与致病作用密切相关 (Mena 等, 1994)。本研究结果表明, *P. capsici* 毒素 SI 是一种糖蛋白, 其分子量和等电点分别为 Mr. 39.8kD 和 pI 4.1, 可诱发与病原菌侵染类似的水渍状褐腐斑, 因此是其致病的重要因子之一, 这与国内外已报道的疫霉菌毒素类似 (Mezzetti 等, 1994; 庞龙等, 1986), 但其分子量不同。经高温或蛋白酶处理时, 因毒素中蛋白亚基变性成分解而丧失活性, 但用 β -D-葡萄糖苷酶降解毒素中的多糖, 其生物活性不变, 这表明蛋白质亚基在毒素的生物活性中占有重要地位。

应用抗病品种是防治辣椒疫病经济而有效的方法。利用叶脉注射法测定毒素的生物活性, 不同抗性的辣椒品种对 *P. capsici* 毒素的反应有一定相关性, 因此,

利用毒素作为鉴定品种（资源）抗性，或作为细胞工程创制抗病新种质选择剂，是开展抗病育种的一条重要途径，但其有效性尚有待探讨。

第2章 辣椒疫霉产毒缺陷突变体筛选及其特性研究

摘要 采用 MNNG 诱变与自交 (S1-S3) 纯合的方法, 从辣椒疫霉游动孢子群体中, 筛选出 1 株带有抗甲霜灵标记的产毒缺陷突变菌株、2 株带有抗甲霜灵或霜霉灵标记的产毒菌株, 测定其致病性, 产毒缺陷菌株和产毒菌株均对茄门周椒致病, 但产毒缺陷菌株的致病力仅为产毒菌株的 50%, 这表明毒素参与了辣椒疫霉的致病显症过程, 是其重要的致病因子之一。此外, 突变菌株的抗药性标记和产毒缺陷表型在游动孢子无性后代和卵孢子有性后代群体中均可稳定遗传, 是进一步探讨遗传机理的理想实验材料。

关键词 辣椒疫霉, 毒素, MNNG 诱变, 产毒缺陷突变菌株, 抗药性, 甲霜灵, 霜霉灵

虽然作者(谢丙炎、朱国仁, 1997)最新研究证明, 辣椒疫霉 (*Phytophthora capsici* Leonia) 分泌的糖蛋白毒素能诱发寄主产生与病原菌侵染类似的水渍状坏死, 但在寄生症状表达中的作用机理目前仍不清楚。近年来, 应用 DNA 转化介导断裂镰刀菌 (*Fusarium spp.*) 编码单端孢霉烯毒素 (Trichothecene) 合成酶基因 (*Tox5*) 和 Enniatin 合酶基因的活性, 证明可显著降低病原对寄主的致病力 (Desjardins 等, 1992, 1996; Hohn 等, 1992; Procter 等, 1995; Harrmann 等, 1996)。Mena 等 (1994) 应用诱变与辣椒根系富集的方法, 从诱变的游动孢子群体中筛选出辣椒疫霉无致病力的突变菌 (NOP), 其角质酶 (Cutinase) 和酯酶 (Esterase) 的活性显著低于致病菌株。辣椒疫霉菌属双倍体菌, 诱变获得的产毒缺陷突变菌株需要通过连续自交进行基因型纯合。应用连续自交, Bhat 等 (1992, 1993) 成功地从大豆疫霉 (*P. sojae*) 的自交卵孢子群体中获得一株对所有大豆品种均无病的菌株 (Universally avirulent strains), 因此, 采用诱变纯化毒素合成酶基因, 给合连续自交纯合获得双倍体卵菌产毒缺陷

突变菌株,是证明疫霉菌毒素致病作用机理的有效途径。为此作者对辣椒疫霉菌毒缺陷突变体的筛选及其特性进行了探讨。

材料与方法

1 供试药剂

化学诱变剂 N-甲基-N'-硝基-亚硝基胍(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, MNNG)为 Sigma 公司产品,用去离子水配成 80 µg/ml 的母液。杀菌剂 95.9% 霜脲氰(Cymoxanil, CYM)原粉由中国农科院植保所武生华先生提供,95.8% 甲霜灵(Metalaxyl, MET)原粉为江苏省南通化工厂产品,原药用量二甲基亚砜(DMSO)或甲醇溶解后加灭菌水稀释配制 10000 µg/ml 的母液。母液在 4℃ 冰箱中保存期一般不超过 1 周。氨苄青霉素(Ampicillin)、

利福平(Rifampin)为 Sigma 产品,50% 五氯硝基苯(Pentachloronitrobenzene,)可湿性粉剂和 50% 苯来特(Benomyl)可湿性粉剂由农业部农药检定所提供,其它试剂为购自化学试剂公司(分析纯)

2 培养基

2.1 橙糖 V8 汁培养液(V8CB): 1000ml 培养液含 V₈汁 100ml、CaCl₂ 3g、

2.2 V8 汁碳酸钙琼脂培养基(V8CA): 100ml V8CB 加 2 克琼脂。

2.3 Plich's 培养液: 100ml 培养液含 KH₂PO₄ 0.5g, MgSO₄·7H₂O 2.0g, 天门冬酰胺 1.0g, VB₁ 0.01g, 酵母浸膏 5g, 葡萄糖 25g。

2.4 水琼脂培养基(WA): 100ml 去离子水加 2 克琼脂。

2.5 含药 V8CA: 将 V8CA 培养基溶化后,冷却至 45℃,用移液枪加入杀菌剂母液,制成规定浓度的含药 V8CA 平板,滤变用含药培养基另加抗生素(氨苄青霉素 250 µg/ml、利福平 10 µg/ml)和杀真菌剂(五氯硝基苯 133 µg/ml、苯来特 10 µg/ml)。

2.6 孢子诱导培养基: 100 ml V8CA 含 β-谷甾醇 2 mg、卵磷脂 50 mg、天冬氨酸 1 mg、

2.7 孢子萌发培养基(S+L): 1 ml 盐溶液 ((NH₄)₂SO₄ 100 mg、MgSO₄·7H₂O 100 mg、CaCl₂·2H₂O 30 mg、ZnSO₄·7H₂O 3 mg、KH₂PO₄ 30 mg、K₂HPO₄ 60 mg / 100 ml 双蒸水), 10 mg 卵磷脂, 2 mg 葡萄糖, 2 g 琼脂, 加双

蒸水至 100 ml 后, 用 1N KOH 调 PH 至 7.0。

3 供试菌株

辣椒疫霉 (*P. capsici*) T568 (A₁), T562 (A₂) 由美国加州大学河边分校植病系提供。PC 65 (A1) 由甘肃省农科院植保研究所吕和平先生提供。每个菌株均纯化成单游动孢子株, 并保藏在 V8CA 斜面上供试验用。

4 菌株培养

菌株移接于 V8CA 平板上, 于 24℃ 培养 7 天后, 沿菌落边缘打出直径为 8mm 菌块, 接入装 100ml V8CB (DNA 提取) 或 Plich's (产毒) 培养液的 250ml 三角瓶, 每瓶接 5 块, 置于 24℃ 下振荡培养 15 天, 培养液经定性滤纸过滤, 滤液经细菌滤膜真空抽滤得无菌培养液, 供毒素活性生测用。测试前滤液的 pH 值调至 6.5。

5 供试品种与育苗

甜自甜椒由中国农科院蔬菜花卉研究所提供, 育苗时将供试品种分别播种在经高压灭菌的蛭石: 草灰为 2:1, 另加 2% 氮磷复合肥的花盆中, 于温室中培养, 待长到 4-6 片真叶供试验用。

6 游动孢子悬浮液的制备

将供试菌株在 V8CA 培养基平板上, 24℃, 暗培养 2 天, 转到连续光照下再培养 4-5 天, 待产生丰富的孢子囊后, 每皿加 10 ml 灭菌水, 于 4℃ 下处理 30 min, 再转到 24℃ 下 30-60 min, 直到游动孢子释放, 悬浮液孢子浓度为 $1-3 \times 10^6$ 个/ml。

7 产毒缺陷突变体的诱变与筛选

取游动孢子悬液于 5ml 离心管中, 9,000g 离心 10min, 弃上清, 用 1ml 灭菌水再悬浮, 加 $1ml 80 \mu g / ml$ MNNG 的母液 (最终浓度为 $40 \mu g / ml$) 诱变处理 10-15 min, 以加灭菌水为对照。诱变处理后, 于 9000g 离心 10min, 弃上清, 用 10ml V8C 液漂洗 3 次; 最后加 15 ml 含药的 V8CA 培养基, 充分摇匀, 摆平, 置 24℃ 黑暗中培养, 长出的菌落挑到含同样药物的 V8CA 上多次 (8-10 次) 继代培养, 弃去生长不正常、角变型和其他不稳定性状的突变株, 选择生长正常、抗性表现稳定的突变株进行产毒素和致病性测定, 以及产毒缺陷突变体自交纯合筛选。

8 产毒缺陷突变体的自交纯合

采用 Ko(1978)的聚碳酸膜 (Polycarbonate membrane) 间隔配对法, 取突变菌株 A1 或 A2 在卵孢子诱导培养基平板上培养 4 天的菌丝块 ($15 \times 10 \times 3$ mm) 于灭菌培养皿 (60 mm) 中, 盖上天菌聚碳酸膜 (0.22 μ m, 90 mm; Nuclepore Cosp.), 再用菌丝面相对贴上同样大小的 A2 或 A1 菌株的菌丝块, 在 24°C、光照中保存 40 天, 转到 15°C、黑暗中保存 60-70 天, 再转入 25°C、黑暗中复苏 2-3 天后诱导萌发。制备的卵孢子悬液直接浮布于 S-L 培养基上, 培养 4-10 天分离获得 S1 代单卵孢株。选择不产毒素并抗杀菌剂的 S1 单卵孢株。用上述同样的方法连续自交直至表型不再分离。

9 卵孢子提取及诱导卵孢子萌发的方法

采用 Ann 和 Ko(1988)方法, 含卵孢子菌丝块在匀浆机中匀浆 1.5 min, 经 76、54、31 μ m 筛网过滤, 用少量蒸馏水洗下 500 目筛网上的滤得物制备卵孢子悬液。卵孢子用 0.25% KMnO_4 处理 20 min, 以打破休眠并杀死菌丝片残余, 经 10 μ m 筛网重新过滤, 用 500 ml 灭菌蒸馏水冲洗后, 用 10 ml 灭菌水重新悬浮卵孢子。卵孢子涂布在 S-L 培养基上, 在 24°C 下, 8 小时黑光灯 + 16 小时日光灯交替连续照射, 培养皿用 Parafilm 膜密封。每个直径 9 cm 的平板上加入卵孢子悬液 100 μ l, 约含卵孢子 50 个, S-L 培养基中加入利福平、氟苄霉素、五氯硝基苯各 50 μ g/ml, 以抑制杂菌生长。

10 毒素的生物活性测定

取嫩真叶, 待测样品经过透析去盐后, 用微量注射器沿叶背的叶脉注入 5-10 μ l 样品, 以蒸馏水和未接菌的 V8 培养液为对照。每处理注射 5 片叶, 24 小时后测定坏死斑面积。以坏死百分比作毒素的相对活性。

11 抗菌性测定

供试突变菌株在 V8CA 平板上, 24°C, 暗培养 3 天, 取 4 mm 菌块, 在含 5 μ g/ml 甲霜灵 (MET) 或 50 μ g/ml 霜霉灵 (CYM) 的 V8CA 培养基平板上, 24°C, 暗培养 3 天, 测定其生长抑制百分率, 每测定菌株重复 3 次。抗性分级: 生长抑制率 >90% 为敏感型, 40-90% 为中抗性, <40% 为抗性型。

12 致病性测定

采用“去头”贴菌丝法块方法测定各突变菌株的致病性, 每个菌株度 10

株,用Parafilm包裹,第7天测量坏死斑大小。根据病斑大小分级:0级为过敏性坏死,1级病斑0.5-3cm,2级病斑3-6cm,3级病斑6-9cm,4级>9cm。

结果与分析

1 产毒缺陷和抗药性突变菌株的诱变与筛选

通过化学诱变剂MNNG的诱变与筛选,从T562和T568的诱变游动孢子中共获得29株个抗甲霜灵的突变菌株,未发现产毒缺陷突变体;而从PC65中获得6个抗霜脲氰突变体,其中有1株丧失产毒素的能力,从PC35中无抗霜脲氰突变产生,结果如表1。

表1 辣椒疫霉产毒缺陷和抗药性突变菌株的MNNG^a诱变结果

Stable Mutagenesis and selection of toxin deficient and fungicide resistance mutants

杀菌剂	菌株	交配型	孢子数 ($\times 10^6$)	突变 菌株 ^b	产孢 菌株 ^c	菌致病菌株 ^d	产毒缺陷 菌株 ^e
甲霜灵	T562	A2	26.3	56	21	21	0
Metalaxy	T568	A1	18.6	30	8	8	0
霜脲氰	PC65	A1	8.3	13	6	6	1
Cymoxani	PC35	A2	6.2	20	0	NT	NT

^a用40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ MNNG诱变处理休止孢子15-20min;

^b分别在含(a.i.)甲霜灵250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、霜脲氰200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的V8CA平板上,24°C培养3周出现的落数;

^c在V8CA平板上,24°C培养10天,产生游动孢子囊的菌株数;

^d接种在茄门甜椒上三天产生坏死斑的菌株数;

^e毒素处理茄门甜椒叶片

NT:未测试。

2 产毒缺陷和抗药性突变菌株的自交纯合

突变菌株经聚碳酸酯膜间接配对比法自交。在 S1 代卵孢子群体中, T562-03 和 T568-07 对甲霜灵的抗性, 以及 PC65-13 对霜脲氰的抗性均出现分离现象, 而其产毒或不产毒均不分离, 继续自交 2 代 (结果见表 2), 从表 2 可见, 有三个菌株的抗性和产毒性状均不再分离, 这表明控制产毒或不产毒, 以及抗性的基因位点已纯合, 获得了携带抗药性标记的产毒或产毒缺陷突变体, 为开展产毒遗传研究奠定了基础。

表 2 辣椒疫霉产毒缺陷和抗药性突变菌株 S1-S3 代产毒与抗药性变异

Stable2 Variation of toxin production, fungicide resistance and pathogenicity over selfed generations(S1-S3) of toxin-deficient and fungicide-resistant mutants of *Phytophthora capsici*

自交世代 Selfed Generation	亲本 Parent	标准菌株 Standard strain	表型 Phenotype					
			MET ⁺	MET ⁻	CYM ⁺	CYM ⁻	TOX ⁺	TOX ⁻
S1	T562-	T568(A1)	9	6	0	15	15	0
	03(A2)							
	T568-	T562(A2)	8	7	0	15	15	0
	07(A1)							
	PC65-	T568(A1)	15	0	9	6	0	15
	13(A1)							
	T562-03-	T568(A1)	38	13	0	51	51	0
	01(A2)							
S2	T562-03-	T568(A1)	65	0	0	65	65	0
	04(A2)							
	T562-03-	T568(A1)	13	4	0	17	17	0
	14(A2)							
	T568-07-	T562(A2)	32	7	0	39	39	0
	02(A1)							
	T568-07-	T562(A2)	23	0	0	23	23	0
	07(A1)							
S3	PC65-13-	T562(A2)	0	86	53	33	0	86
	04(A1)							
	PC65-13-	T562(A2)	0	33	33	0	0	33
	14(A1)							
	T562-03-	T568(A1)	53	0	0	53	53	0
	04							
	24(A2)							
	T568-07-	T562(A2)	57	0	0	57	57	0
S3	07-							
	04(A1)							
S3	PC65-13-	T562(A2)	0	62	62	0	0	62
	14-6(A1)							

3 产毒与产毒缺陷突变菌株的致病性比较

采用“去头”贴加菌块的方法，测定产毒与产毒缺陷菌株对茄门甜椒的致病力，结果如图1。从图1可知，产毒缺陷菌株和产毒菌株均对茄门甜椒致病，但产毒缺陷菌株的致病力比产毒菌株要低三分之一。这表明毒素可能是辣椒疫霉暴发式呈症的主要原因之一。

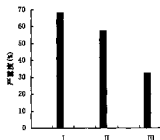


图1 辣椒疫霉产毒与产毒缺陷突变菌株的致病力比较

Fig1 Comparison of virulence to pepper between toxin-producing and toxin-deficient mutants of *Phytophthora capsici*

I:T562-03-0424 (产毒菌株) II:T568-07-07-04 (产毒菌株)
III:PC65-13-14-06(产毒缺陷菌株)

讨论

植物病原菌在侵染寄主的过种中，常常产生寄主专化或非寄主专化性毒素(Desjardins等，1997)。与许多其它次生代谢物一样，毒素并不是其生长和繁殖所必须的活性成分，产毒缺陷型菌株同样能正常生长发育。近年来，研究表明疫霉菌产生的胞外毒素具有寄主种的专化性，但在致病过程中的作用尚无直接证据(Capasso等，1997)。作者前文间接证明毒素是辣椒疫霉的重要致病因子(谢丙炎、朱国仁，1997)，但毒素是否是辣椒疫病暴发式呈症的本质原因，缺乏直接证明。

为确定毒素在植物病原致病过程中的作用，有人采用基因断裂法直接证明，小麦赤霉病菌单端孢霉毒素(Trichothecene)合成酶基因 *Tox5*

突变体对小麦品种的致病力明显降低，表明毒素可以影响所致病害的严重度（Desjardins 等, 1989, 1992; Hohn 等, 1993; Proctor 等, 1995）。本研究通过诱变与自交相结合的方法，从连续自后代群体中筛选出一株产毒缺陷突变菌株，虽然可侵染寄主，但造成的严重度仅为产毒菌的 50%，这表明毒素也参与了辣椒疫霉的致病显症过程。因此，毒素是辣椒疫霉重要的致病因素。尽管 70 年代初期，Polach 和 Webster 已证明辣椒疫霉至少由三个以上基因控制其致病性，但毒素作为致病因子，其遗传机理尚待阐明。本研究获得的带有抗性标记产毒和产毒缺陷菌株，为进一步探讨其遗传机理奠定了基础。

第3章 辣椒疫霉产毒遗传及其共分离遗传标记的研究

摘要 通过辣椒疫霉产毒缺陷菌株与产毒菌株间的激动孢子融合杂交和连续配对有性交配,其F₂与F₃杂种苗株的产毒表型均为双亲的中间型,并且其抗性得到了恢复,这直接证明毒素可加剧辣椒疫病的显后过程。在F₂代随机子群体中,产毒表型分离比为1:2:1($\chi^2=2.28, p=0.25$),为不完全显性基因所控制。同时发现辣椒疫霉对甲霜灵的抗性和135B(OPW12),RAPD标记与产毒共分离,但对茄碱素的抗性产毒为自由组合,并由完全显性基因所控制,而对甲霜灵抗性则与前人研究结论相反,为不完全显性基因所控制。

关键词 辣椒疫霉, 毒素, 产毒遗传, 共分离遗传标记, 茄碱素, 甲霜灵, RAPD

近十年来,辣椒疫病遗传研究取得了不少突破性的进展(任华中、姚大林, 1996)。已有大量研究表明,辣椒疫病的抗性受3个基因,至少4个数量性状位点(QTLs)所控制。在QTLs之间存在加性和上位效应(Barnall等, 1991, 1994; Gid Oncogal等, 1991, 1992; Reifschneider等, 1994)。许多分子标记图谱对辣椒疫抗性QTL进行了定位(Lefebvre和Palkov, 1996)。但对辣椒疫菌(*Phytophthora capsici* Lexov)寄主的遗传研究甚少。仅Polach和Webster(1972)报道至少由2个基因的控制辣椒的毒性。虽然有一些研究结果证明存在致病力的变异,但缺乏有生理小种分化的证据(Kim等, 1992)。因此,辣椒与疫病这种多基因互作遗传分子机理尚有待进一步阐明。

辣椒疫霉可向胞外分泌大量对寄主具有毒性作用的物质,经生化产毒缺陷突变体分析,证明分泌的39.8kD的糖蛋白在辣椒疫病的暴发式显性上具有重要的作用(谢丙炎, 朱超群, 1997; 谢丙炎等, 待发表)。在此基础上,作者进一步对其产毒遗传机理及其分离遗传标记进行了探讨。

材料与方 法

1 化学试剂

TagDNA聚合酶、RAN酶、蛋白酶、dNTP、Marker A(PV3-HindIII-EcoRI)为Promega公司产品, 随机引物OPW1-20为美国Operon公司产品, CTAB(Cetyltrimethylammoniu

-bromide), 氨苄青霉素(Ampicillin), 利福平(Rifampin), 为 Sigma 产品。本试剂 95.9% 的脱氧 (Cytosianil(CYN) 总碱) 由美国农科院植保所武中华先生提供。95.8% 甲霜灵(Menah2MET) 原药为江苏苏为时化产品。原药用少量二甲亚砜(DMSO)或甲酰胺溶解后加灭菌水稀释配制成 10000 µg/ml 的母液。母液在 4℃ 冰箱中保存期一般不超过 1 周。50% 百菌清基本 (Penicillium-benomyce) 原药为利和 50% 苯来特(Benomyce) 由潍坊市农业部部长药站提供。其它试剂为烟台化学试剂公司(分装纯)。

3 杂交亲本菌株

用于遗传分析的株型按亲本菌株 *568-07-07-04* (Met'YmT⁺AI⁺)、*T562-03-01-29* (Met'YmT⁺AI⁺)、*13-14-16* (Met'YmT⁺AI⁺) 由化学诱变并自交纯合获得, 每个菌株均地化成单孢子的株, 并保藏在 V8CA 斜面上供试验用。

4 菌株培养

菌株移接于 Y8CA 平板上, 于 24℃ 培养 7 天后, 沿菌落边缘切出直径为 8mm 菌块, 接入装 100ml V8CB⁺ (DNA 提取) 或 Pichia 产酶 + 培养液 (的 250ml 三角瓶, 每瓶接 5 块, 置于 24℃ 下培养 4 天 15 天, 培养液经定性滤纸过滤, 菌丝体用于 DNA 提取, 滤液经细筛过滤在无菌瓶内为菌丝液, 供病毒活性生使用。滤液前滤液的 pH 值调至 6.5

5 供试品种与育苗

品种 1 的数目由山东农业蔬菜花卉研究所提供。育苗时将供试品种均分复播在经灭菌灭菌的蛭石: 珍珠岩为 2:1, 另加 2% 磷酸复合肥的育苗中, 于温室中培养, 待长到 4-6 片真叶供试验用。

6 游动孢子融合杂交

参照 Enok 等 (1995) 的方法, 取 PC65-13-14-16 (AI⁺) 和 T568-07-07-04 (AI⁺) 分别直 V8CA 培养基平板上, 24℃ 培养 2 天, 转到连续光照下再培养 4-5 天, 待产生丰富的孢子囊后, 每皿加 10ml 灭菌水, 于 4℃ 下处理 30 min, 再转到 24℃ 下 30-60 min, 直到游动孢子释放, 基培养液浓度为 1×10^6 个/ml, 每个菌株各取 1ml 孢子液合并于 Eppendorf 管中, 3000r/min 离心 40s, 为排除游动孢子的休止, 立即加 100 µl 内含 30%PEG6000 和 50mM NaCl 的融合液再悬浮, 于 20℃ 放置 20min, 再加 200 µl 的 100mM 的丁梨醇溶液 (内含 5mM CaCl₂ 和 500 µM KCl) 诱导游动孢子的休止和细胞壁形成, 3000r/min 离心 30s 后, 含 200 µl 同样的休止诱导液悬浮, 于 20℃ 培养 2 小时, 最后将休止孢子

与 45℃ 的融合再生培养基（含 10g 胆脂，1g L- 天门冬酰胺，250mg MgSO₄·7H₂O，500mg KH₂PO₄，1mg VB₁，12.5 琼脂糖 V8CB，另加 10mg 配马霉素，600mg 氨基霉素，10mg 利福平抑制杂菌的生长，25℃ 下培养 24 小时）后再滴加 25 μl ml 的甲硝唑和 50 μg/ml 的聚维酮的同样培养基（2mm），25℃ 暗培养 7-10 天后，将再生的菌落移到含药培养基上，选择生长正常的融合菌株进行产酶和抗性鉴定。

7 F1 代单孢子菌株的分离与鉴定

取表型为 MerCym⁺ T⁻ (32) 的 F02-03-04-24 与表型为 MerCym⁺ T⁻ (A1) 的 F015-13-14 在诱导胞子产生的 V8CA（每 100 ml 含 D- 谷氨酸 2mg，卵磷脂 50mg，L- 谷氨酸 1mg）平板上直接配对培养，培养条件为 24℃，光照中保存 40 天，转到 15℃，黑暗中保存 60-70 天，再转入 25℃，黑暗中复苏 2-3 天后，采用 Am 和 Ko（1988）方法，将胞子菌丝块在匀浆机中匀浆（4000r/min）1.5min，经 56、54、31 μm 筛网过滤，用少量蒸馏水洗下 500 目筛网上的滤渣物制备胞子悬液，胞子用 0.3% H₂O₂ 处理 2min 或 0.25% KMnO₄ 处理 20min，以打破休眠并杀死菌丝残余，经 10 μm 筛网重筛滤池，用 500ml 灭菌蒸馏水冲洗后，用 10ml 灭菌水重新悬浮孢子，将孢子涂布在含利福平、苄霉素和五氯甲苯各 50 μg/ml 的 S-L 1 培养基（(NH₄)₂SO₄ 300mg、MgSO₄·7H₂O 100mg、CaCl₂·2H₂O 30mg、ZnSO₄·7H₂O 3mg、KH₂PO₄ 30mg、KH₂PO₄ 60mg/100ml 双蒸水组成的盐溶液，10mg 卵磷脂，2mg 葡萄糖，2g 琼脂，加双蒸水至 100ml 后，用 1N KOH 调 pH 至 7.0）培养基上，在 24℃ 下，8 小时黑光照 + 16 小时白光交替连续照射，培养期间双皿透明按第 3 节方法培养 4 天和 6 天同时进行菌落胞子株分离获得 F1 单胞菌株，并对杂种 F1 代菌株进行抗药性表型、交配型和 RAPD 标记的鉴定。

8 F2 代群体的建立

用选型的 F1 代单胞孢子菌株进行姐妹配位 (Sib-matings) 自交，按上述培养条件建立约 100 个 F2 代胞子群体。

9 DNA 的提取

菌丝总 DNA 提取采用 Murray 和 Thompson (1980) 的 CTAB 方法，提取总 DNA 和 F2 代菌株 R 的 DNA，溶解于适量 TE，-20℃ 保存。

10 RAPD/ISSA 分析

10.1 PCR 反应

反应体积 25 μ l (含 50mmol/L KCl, 10mmol/L Tris-HCl (pH8.2), 2.5mmol/L MgCl₂, 200 μ mol/L dNTP, 1mg/ml 明胶, 引物 5-10 μ g/L, 1.5u Tag DNA 聚合酶), 加入 25 μ l 的有蜡油密封。反应过程: 预变性 94℃ 2min, 变性 94℃ 1min, 复性 25℃ 2min, 延伸 72℃ 2min, 总延伸 72℃ 5min, 共 40 个循环。PCR 反应产物用 0.8% 的 TBE 琼脂糖凝胶电泳分离, 经溴化乙锭染色后, 在紫外透射仪下观察, 拍照。

10.2 集团分离分析 (BSA)

采用 Michelman 等 (1991) 基于 PCR 反应建立的集团分离分析, 以 OPW1-20 为引物, 对采本菌株 (T562-03-04-24, PC65-13-14-16) 模板 DNA, 以及 8 个产毒 F2 代菌株和 8 个不产毒 F2 代菌株组成 DNA 库。筛选产毒分离 RAPD 标记引物, 最后随机选择 16 个 F2 代菌株孢子菌株进行验证。

11 交配型测定

用标准交配型菌株 T562 (A2) 和 T568 (A1) 与 F1 代菌株在 V8CA (内含 20 μ g/ml 谷氨酰胺, 500 μ g/ml 卵磷脂, 10 μ g/ml 天门冬氨酸) 平板直接配种, 光照下 25℃ 培养 15 天, 镜检孢子的产生, 确定其交配型。

1.11 毒素的生物活性测定: 取茄门辣椒嫩真叶, 将测试样品经透透析去盐后, 用微量注射器沿叶背的叶脉注入 5-10 μ l 样品, 以蒸馏水和未接菌的 V8 培养基为对照, 每处理注射 5 片叶, 24 小时后测定坏死斑面积, 以坏死百分比作毒素的相对活性。

12 抗药性测定

供试菌株在 V8CA 平板上, 24℃, 暗培养 3 天, 取 4mm 菌块, 在 25 μ g/ml 甲霜灵 (MD) 或 50 μ g/ml 霜霉威 (CYM) 的 V8CA 培养基平板上, 24℃, 暗培养 3 天, 测定其生长抑制百分率, 每测定菌株重复 3 次。抗性表型分级: 与对照相比, <10% 为敏感型, 10-60% 为中间型, >60% 为抗性型。

结果分析

1 产毒与非产毒菌株间的游动孢子融合及杂种鉴定

游动孢子为少数状态, 在含非致死剂量 Li⁺ 溶液中可以保持其游动状态, 但加入 Ca²⁺ 后游动孢子立即停止并形成完整的细胞壁 (Ereskek 等, 1991; Bhat 和 Schmitthenner, 1993)。

72

根据原生质融合原理,将带有抗甲霜灵标记菌株 T508-07-07-01 与带有新昆源霉素标记菌株 EC-13-14-16 的游动孢子,用 30% 的 DMSO 进行融合杂交后,在含双抗药性的融合再生培养基平板上筛选到三个生长和产孢正常的双抗融合子,其表型为抗甲霜灵与霜霉病(图 1)。以 OPW1-20 为引物进行 RAPD 鉴定,在三个双抗融合子中,OPW6 和 OPW9 的扩增带具有双亲的所有 RAPD 条带(如图 2 所示),这表明两个融合亲本基因组之间出现准性重组。测定融合子的产孢能力,证明游动孢子体细胞杂交可恢复其产孢能力,但对霜霉病的毒性仅为产毒亲本的 50% (见图 3),这表明产毒可能是由不完全显性基因所控制。

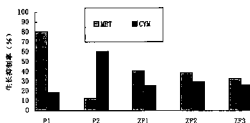


图 1 辣椒疫霉游动孢子融合后代对甲霜灵和霜霉病的反应

Fig1 Response to metalaxyl and cymoxanil of progeny of zoospore-fusing hybrids of *Phytophthora capsici*

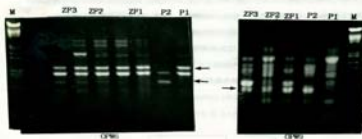


图2 辣椒疫霉游动孢子融合重组的 RAPD 鉴定

Fig2 Verification of three putative zoospore-fusing hybrids of *Phytosphora capsici* using RAPD

(DNA Marker: λ DNA/HindIII+EcoRI; P1 为产毒缺陷亲本, P2 为产毒亲本, ZF1、ZF2、ZF3 为游动孢子融合重组菌株)

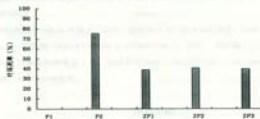


图3 辣椒疫霉游动孢子融合子的产毒表型

Fig3 Toxin-producing phenotypes of zoospore-fusing hybrids of *Phytosphora capsici*

2 F1 代杂种单孢子菌株的获得与鉴定

采用直接配对比法, 从 T562-03-04-24(A2)¹ 与 PC65-13-14-16 (A1) 交配所形成的卵孢子中, 筛选出 4 株具有双抗药性标记的 F1 代杂种菌株 (如图 4)。其中 H1、H4 为 A1, H2 和 H3 为 A2。产毒能力测定结果表明, 4 个 F1 代单孢子菌株对茄门甜椒的毒性仅是产毒亲本的二分之一 (图 5), 这表明 F1 代产毒与钵细胞杂种相似, 为不完全显性基所控制。

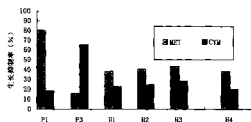


图 4 辣椒疫霉杂种 F1 代对甲霜灵和霜霉威的抗性

Fig4 Resistance to metalaxyl and cymoxanil of F1 hybrids of *Phytophthora capsici*

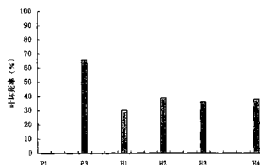


图 5 辣椒疫霉杂种 F1 代菌株的产毒表型

Fig5 Toxin-producing phenotype of F1 hybrids of *Phytophthora capsici*

3 F₂ 代群体产毒分离方式

通过 H1 × H2 姐妹交配, 共获 101 个 F₂ 代单孢孢子菌株, 应用注射法测定其培养滤液对茄白甜椒的毒性, 结果如表 1。从表 2 可知, $\frac{1}{2}$ 产毒亲本组合的 24 株, 与 F₁ 代相同的 58 株, 而不产毒的 20 株, 其分离比符合不完全显性 1: 2: 1 的理论比例 ($\chi^2=2.28$, $P=0.25$)。

表 1 辣椒疫霉 F₂ 群体产毒率的分离方式

Stable Segregative mode of toxin production of F₁ hybrid individuals of *Phytophthora capsici*

表型 Phenotype	假定基因型 Putative phenotype	测定 F ₂ 后代数 NO. of F ₁	理论分离比 Theoretic ratio	χ^2	P
T	<i>TT</i>	24	1	2.28	0.25
T	<i>Tt</i>	58	2		
t	<i>tt</i>	20	1		

4 产毒共分离遗传标记

根据 Michelmore 等 (1991) 的集团分离分析 (BSA) 原理, 从 F₂ 代群体中选 8 株产毒菌株和 8 株不产毒菌株的 DNA, 分别构成产毒 DNA 样品库与不产毒 DNA 样品库, 筛选 OPW120 随机引物中与产毒连锁的 RAPD 标记, 发现用 OPW120 扩增时, 产毒 DNA 样品库比不产毒 DNA 样品库多一条约 1300bp 的 RAPD 带, 并命名为 OPW12_{tox}。进一步用 OPW12 鉴定 15 株随机选择的 F₂ 代菌株的 DNA 样品, 证明 OPW12_{tox} 与 $\frac{1}{2}$ 产毒共分离 (见图 6 和表 2)。

测定 F₂ 代孢子群体对甲霜灵和霜霉病的敏感性, 未发现 *met⁺T* 和 *met⁻T* 两种新的性状组合, *met⁺T* : *met⁻T* : *met⁺t* : *met⁻t* 为 82: 0: 19, 表明对甲霜灵的抗性

与产毒共分离; 而在产毒与对霜霉病抗性的分离比符合自由组合的 9: 3: 3: 1 ($\chi^2=0.6264$, $P=0.25$)。结果见表 3。这表明对霜霉病的抗性不与产毒共分离。

表 2 辣椒疫霉产毒共分离遗传标记

Table 2 Co-segregative genetical markers of toxin production of *Phytophthora capsici*

标记 Marker	表型 Phenotype	测定 F2 代菌株数 NO. of F2	理论分离比 Theoretic ratio	备注 Remarks
RAPD	+T ⁺	9	9	共分离标记
OPW-12 _{cap}	-T ⁻	0	3	
	+T ⁺	0	3	
	-T ⁻	6	1	
CYM ⁺	CYM ⁺ T ⁺	55	9	x ² =0.6264 P=0.25
	CYM ⁺ T ⁻	18	3	
	CYM ⁺ T ⁺	20	3	
	CYM ⁺ T ⁻	8	1	
MET ⁺	MET ⁺ T ⁺	82	9	共分离标记
	MET ⁺ T ⁻	0	3	
	MET ⁺ T ⁺	0	3	
	MET ⁺ T ⁻	19	1	



OPW12

图 6 辣椒疫霉产毒共分离 RAPD 标记的 BSA 分析

Fig6 Detection of a RAPD Marker linked to toxin production in F2 population of *Phytophthora capsici*

(DNA Marker: λ DNA/HindIII+EcoRI; 1 为产毒缺陷亲本 P1, 2 为产毒亲本 P3, 3 为 F1 菌株, 4-19 为 F2 代菌株)

讨论

1 准性生殖是真菌实现基因重组的一种重要形式, 主要发生在自然条件下没有或难以发生有性生殖的半知菌类真菌(Bos 等,1994)。在卵菌中虽然存在, 但发生稀少(Long 和 Keen,1977)。Layton 和 Kuhn(1988)通过原生质融合首次合成大豆疫霉(*P.sojae*)异核体, Lucas 等(1990)在辣椒疫霉中进一步成功地获得体细胞杂种。特别上 Ensek 等(1995)通过游动孢子融合获得 *P.apspori* 与寄主种 *P.parasitica* 种间杂种, 为开展卵菌遗传分析提供了新的途径。本研究结果明, 辣椒疫霉的产毒基因缺陷可以通过与产毒菌株的游动孢子融合得到部分拯救, 表现出双亲的中间表型, 因此产毒可能是受不完全显性基因所控制。而 Adams 和 Hart(1989)将 *Gibberella zeae* 产 *Trichothecene deoxynivalenol*(DON)致病菌株¹与不产 DON 的非致病菌株进行原生质体融合却发现, 融合子仍不产 DON, 但恢复了致病性, 由此可免植物病原真菌系的产生与致病的遗传关系仍有待进一步研究。

2 卵菌是有性与无性繁殖共存的植物病原菌, 主要通过有性交配产生卵孢子而实现基因重组(Boccardo,1981)。本研究通过辣椒疫霉产毒菌株与产毒缺陷菌株之间的有性交配, 所获得的 F₁ 代单卵孢子菌株的产毒能力为居于双亲的中间表型, 其 F₂ 代孢子群体分离比符合不完全显性的 1: 2: 1, 与准性重组表现的结果相符合。

3 抗药性是卵菌的显性遗传标记, 在卵菌的遗传学研究得到了广泛的应用(Bhai 和 Schmitthenner,1993)。应用辣椒疫霉对甲霜灵和霜霉病的抗性标记进行其遗传分析已显示出优越性。辣椒疫霉控制对霜霉病的抗性为完全显性, 并与产毒不存在连锁关系, 对霜霉病的抗性遗传是国内外首次发现; 而对甲霜灵的抗性为不完全显性基因所制, 并与产毒共分离, 对甲霜灵抗性的遗传方式与前人研究的结论相符(Shattock 等, 1988)。

4 近年来, 分子遗传图谱的研究已成为卵菌遗传学研究的热点, 已建立 *P.infestans* 的 AFLP 连锁图谱和 *P.sojae* 与寄主连锁的 RAPD 和 RFLP 综合遗传图谱(Van der Lee 等, 1997; Judelson 等, 1995; Whisson 等, 1994, 1995; Tyler 等, 1995)。Judelson 等(1995)应用 RAPD/BAS 方法成功地找到 *P.infestans* 与交配型共分离的 RAPD 标记。本研究应用同样的方法也找到¹与产毒共分离的 1.3kb OPW12₁₀₀RAPD 标记, 为分析产毒的分子遗传机理找到了新的信息。但由于辣椒疫霉卵孢子连续自交多代后的萌发率较低, 对于建立可靠的作图群体的难度较大, 有待进一步探讨。

第4章 辣椒疫霉产毒相关DNA区段的克隆及其

序列分析

摘要 辣椒疫霉产毒性状具有种的特异性,通过克隆筛选到的产毒其分离 RAPD 标记 OPW12₁₀₀,得到 3 个酶切鉴定为阳性的克隆,序列分析发现 OPW12₁₀₀ DNA 为 1316bp。根据其序列设计两个由 20 个核苷酸组成的特异引物,对 4 种共寄主辣椒病原卵菌和蜜菌(*Phytophthora capsici*, *P. parasitica*, *Pythium aphanidermatum*, *Colletotrichum capsici*) DNA 进行特异 PCR 扩增反应,证明辣椒疫霉产毒相关 DNA 片段具有种的特异性,并能直接检测病组织、土壤和水中的辣椒疫病菌,为开展其分子生态学研究提供了有效的工具,也为毒素合成酶基因的克隆奠定了基础。

关键词 辣椒疫霉,产毒相关DNA区段,种特异DNA,分子生态

辣椒疫霉(*Phytophthora capsici* Leonia)是一个异宗交配卵菌,在同一地块同时存在 A1 和 A2 交配型(Papavizas 等,1981)。由于辣椒疫霉无厚垣孢子,土壤和病残体中的卵孢子是其唯一的越冬菌态,在土壤中存活的卵孢子是下一个季节发病的初侵染来源,在病害发生流行中具有重要作用(Bowers 等,1990; Hord 和 Ristano, 1991)。因此,检测越冬后卵孢子的存活数量,是预测其可能的损失程度和制定综合防治策略的关键因素。传统的方法主要采用选择培养基分离、结合形态和生理特性进行定量检测(Papavizas 等,1981; Larkin 等,1995),但因卵孢子在培养基上的萌发率极低,难以准确估计越冬后卵孢子的侵染势能(Hord 和 Ristano, 1991)。近年来,以 ELISA 为代表的血清学方法引入疫霉菌检测,使在常规实验室能进行快速检测,但仍存在专化性低的问题(Miller 等,1994)。随着分子生物学技术的渗透,使得疫霉菌的快速检测得到了突破性发展。Goodwin 等(1990)首次建立种特异探针检测土壤和寄主植物组织中的 *P. parasitica* 的快速检测方法,但因放射性限制了其应用的实用化。Ersek 等(1994)根据克隆的种异性 DNA 序列合成高度专化的寡核苷酸引物,建立 *P. nicotianae* 和 *P. citrophthora* 的特异 PCR 检测方法,以及根据疫霉基因组 rDNA 中的 ITS1 和 ITS2,以及 elicitin

基因设计专化引物所建立的 PCR 快速检测, 也显示出其应用潜力 (Lee 等, 1992; Lacourt 等, 1997), 使分子生物学技术在疫霉菌快速检测中的应用真正进入实用化阶段, 但迄今为止尚未见辣椒疫霉菌种特异 PCR 检测技术的报道。

近年作者研究表明, 致病毒素是辣椒疫霉菌的种特异性性状 (谢丙炎等, 1997), 通过克隆毒素基因来建立特异性 PCR 检测技术, 是开展辣椒疫霉菌分子生态学研究的有效途径。作者已筛选到与辣椒疫霉菌共分离的 RAPD 标记 OPW12₁₃₀₀ (谢丙炎等, 待发表), 本文进一步对产毒共分离的 RAPD 标记 (OPW12₁₃₀₀) DNA 进行了克隆和序列测定, 并对其种特异性作了初步探讨。

材料与方法

1 菌株与培养条件

辣椒疫菌 T562 (A2)、寄生疫菌 T131 (*P. parasitica*, M) 由美国加州大学河边分校植病系提供, 瓜果腐霉 (*Pythium aphanidermum*) 和辣椒炭疽 (*Colletotrichum capsici*) 由作者从辣椒上分离, 菌株在 P1 或 PB 培养液中, 24℃ 下培养 5 天, 取菌丝体供 DNA 提取用。

2 DNA 提取

菌体和植物 DNA 提取采用 Murray 和 Thompson (1980) 的 CTAB 程序, 土壤 DNA 提取按 Bruce 等 (1992) 方法进行, 水中病菌 DNA 采用 Lacourt 等 (1997) 醋酸纤维膜吸附法进行提取; 提取的 DNA 于 -20℃ 保存。

3 PCR 反应

反应体积 25 μ l: 含 50mmol/l KCl, 10mmol/l Tris-HCl (pH 8.2), 2.5mmol/l MgCl₂, 200 μ mol/l dNTP, 1mg/ml 明胶, 引物 (OPW12) 为 5-10 μ l/ml, 1.5u Tag DNA 聚合酶, 加入 25 μ l 的石蜡油密封。反应过程: 预变性 94℃ 2min, 变性 94℃ 1min, 复性 25℃ 1min, 延伸 72℃ 2min, 总延伸 72℃ 5min, 共 40 个循环。反应后用 1.5TAE 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 在紫外灯下将含有 OPW12₁₃₀₀ 片段的胶块切下来, 回收产物。

4 产毒相关 DNA 片段的纯化

用 Promega 公司提供的 PCR 产物纯化试剂盒 (Wizard), 按试剂盒说明指导纯化回

收的 O1W12₁₂₀₀ 的 DNA。提取的 DNA 用 1-2 μ l 走胶检测回收效果后保存在 4℃ 或 20℃。

5 产毒相关 DNA 片段的克隆与筛选

将纯化的 O1W12₁₂₀₀ DNA 片段，按美国 Promega 公司提供 pGEM[®] T Easy Vector System 1 的操作指导，从 EcoR I 酶切位点连接到载体 pGEM[®] T Easy Vector 中。连接产物于 4℃ 冰箱过夜后，转化采用 CaCl₂ 法制备的感受态 E. coli DH 5 α 为宿主细胞，在含氨苄青霉素 (50 μ g/ml) 和涂布 16 μ l IPTG (50mg/ml) 和 16 μ l X Gal (50mg/ml) 的 LB 培养基平板上，取 20 μ l 转化菌液涂布于平板上，风干后，37℃ 培养 24 小时。选择白色菌落供转化质粒提取用。

6 克隆质粒 DNA 的提取与酶切鉴定

取单个白色菌落及对照的蓝色菌落，分别接种到 3ml LB 培养基中，37℃ 振荡培养 12 小时后，采用 Promega 公司提供的 Wizard[®] TM plus Minipreps DNA purification system 进行提取质粒 DNA。提取的 DNA 保存 -20℃ 备用，或取少量提取用 EcoR I 进行酶切鉴定。

体系：20 μ l

质粒 DNA 15 μ l

D. D. W 2.5 μ l

10x buffer (H)* 2 μ l

EcoR I 0.5 μ l

37℃ 水浴 5-6 小时，0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。鉴定的阳性克隆重新划线培养，保存。

*10x buffer (H): 90mmol/l Tris HCl, 20mmol/l MgCl₂, 150mmol/l NaCl, pH7.5。

6 产毒相关 DNA 片段的序列测定

将从酶切鉴定为阳性克隆提取的质粒 DNA，委托美国 Cybersyn 公司进行 DNA 测序。测序采用双脱氧测序方法，从 pGEM[®]-T Easy Vector 质粒 SP6 与 T7 两个引物方向，在 ABI DNA 测序仪上自动操作酶反应，电泳和 DNA 带型检测和结果分析。根据对 O1W12₁₂₀₀ DNA 片段的序列测定结果再设计两个内引物，直至序列被贯通，最后以正反方向和内引物的基序结果进行序列矫正和拼接。

结果分析

1 产毒相关 DNA 片段的克隆与筛选

以 OPW12 引物扩增辣椒疫霉 DNA (见第五章图 6), 用解剖刀切下含有 OPW12_{cap} DNA 的凝胶片段, 用 Promega 公司的 PCR 产物纯化试剂盒 (Wizard) 回收纯化 OPW12_{cap} DNA 以 OPW12 引物再次 PCR 扩增。其产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测结果为一个扩增带, 大小约为 1.3kb, 如图 1。再次纯化后的 DNA 由 pGEM[®]-T Easy Vector 质粒的 EcoRI 酶切位点连接到质粒中。连接好的质粒转化感受态 *E. coli* HB5 后, 在 LB 平板上利用质粒的氨苄青霉素抗性和 α 互补筛选转化克隆。结果表明多数为转化的白色菌落。这表明辣椒疫霉产毒相关区段 (OPW12_{cap} DNA) 成功地实现了转化 (见图 2)。

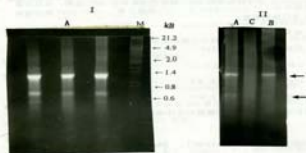


图 1 纯化辣椒疫霉 OPW12_{cap} DNA 片段再次 OPW12 引物 PCR 扩增

Fig1 Agarose gel electrophoresis of second PCR amplification of products obtained from purified OPW12 DNA of *Phytophthora capsici* with OPW12 (DNA Marker: λ DNA/HindIII+EcoRI; I 为纯化 OPW12_{cap} DNA 第一次 PCR 扩增产物 A; II: B 为从 I 中回收纯化的大带 DNA PCR 扩增产物, C 为从 I 中回收纯化的大带 DNA PCR 扩增产物)

2 阳性克隆的酶切鉴定

取筛选到的 *E. coli* B5 4 个白色菌落和 1 个蓝色菌落，于 LB 培养液中振荡培养 24 小时，用 Wizard 质粒提取试剂盒提取克隆的质粒 DNA，经 *EcoRI* 酶切后电泳检测如图 3 所示。从图 3 可知，4 个白色菌落中有 3 个（A、C、D）用 *EcoRI* 酶可见插入 DNA 片段，即为阳性克隆；B 与蓝色菌落 E 相似，为阴性克隆。

3 产毒相关 DNA 片段的序列分析

取酶切鉴定为阳性的 3 个克隆质粒 DNA（C、D），通过双脱氧法，从质粒的 SP6 与 T7 两个引物方向进行正反测序。结果表明 C、D 有插入 DNA 片段，为阳性克隆，但其序列未被测通。根据测定的序列设计两个内引物，5'-GCACCGAAGAACAACCTCCAAC3' 和 5'-GAGCTGGTCTACAGATCGC3'，再次测序后经校正拼接的序列见图 4。从图 4 所示序列可知，克隆的 GPW12₁₀₀ DNA 为 1316bp。

5 产毒相关 DNA 种特异性证明

应用两个测序的内引物，对辣椒疫霉 T962、寄生疫霉 T131、瓜果腐霉和辣椒炭疽菌 DNA 进行特异 PCR 扩增，其扩增产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测发现，仅辣椒疫霉的 DNA 有特异 PCR 扩增带，当用两个测序内引物 PCR 检测辣椒疫病病组织、带菌土壤和水提取的 DNA 样品，发现存在辣椒疫霉的样品 DNA 均有 PCR 扩增带，而健康辣椒植株、灭菌土和水提取的 DNA 均无扩增带（如图 5 所示），这表明根据 GPW12₁₀₀ DNA 序列设计的引物具有种特异性，可应用于土壤、寄主组织和灌溉水中辣椒疫霉的快速检测，在辣椒疫霉流行病学研究中具有重要的应用价值。



图 2 辣椒疫霉 GPW12₁₀₀ DNA 片段克隆筛选

Fig2 Selection of GPW12₁₀₀ DNA clones of *Phytophthora capsici*

（白色菌落为阳性克隆，蓝色菌落为阴性克隆）



图3 辣椒疫霉 GW12_{cap} DNA 片段限制性克隆酶切鉴定

Fig3 Identification of positive GW12_{cap} DNA clones of *Phytophthora capsici* degraded by EcoRI

(DNA Marker: λ DNA/HindIII+EcoRI; A, B, C, D 为白色菌落, E 为蓝色菌落)

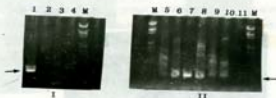


图5 辣椒疫霉 GW12_{cap} DNA 种特异性 PCR 扩增

Fig5 Application of GW12_{cap} DNA species-specific PCR of *Phytophthora capsici*

(DNA Marker: λ DNA/HindIII+EcoRI; I: 1 为 *P. capsici*, 2 为 *P. parasitica*, 3 为 *Pythium aphanidermatum*, 4 为 *Colletotrichum capsici*; II: 5 和 11 为健株,

6 为病株, 7 为病土, 8 为带菌水, 9 为灭菌土, 10 为灭菌水)

0001TTCAACCACTGTTCTACGGACAGAAGAGTTAGCACTCACAGCAAGCACTGTCATTAGGTAGCCAGGGA
 0070GTAACTCCACGCGGAGTACTCAGTCTAGATAAATGATGAGCAAGTCGGTATAGTAGGAGGTGGAATC
 0140GTAGACAGCAGGATATACCGGCGACAGTAGTGGGAGGGTAGATCAAGCTCGGTACTAAGCAGGTTGG
 0210GTAGTAGTAGGGTGAACACTCACTCAGCAGTAGTAGTTGGGTGAAGCAGTCGGAAACGGAAGTGA
 0280CACTTGGCAGCGGGCACTCTCCAGTAGTACGGAAGAACACTCCAACTCCAAAGGAGTTGGTCA
 0350GGCAGCACTTCGGAATAATGGTAGAAGAAATTACATTTGGTTGGGAATGATGGATAGTCTCCAC
 0420GTCAAGTACTCGTCCCAAGTCACTTCGGTCAATACAGAATTCACGGAGGTTTATTGGGAGATTC
 0490AAGCGTCTCTCCCAAGGTACGAATGAGCCAGAAACACAGGTAGATAGTTACACGAGACAGAGAG
 0560GTAGTCACTCGACACAGGGGCTTATGACTGGTCGCGCCAAAGTAGTCGTCTCAGACAGAGTCAATTC
 0630CAAAATCTTCTCCAAGTACCAAGTCGAAGCTTCACTTCTCTCTCCATCTTCTCTCATAGGGTGGC
 0700GGCAAGTCTATAAGGCACGAGGTCTTCACTCTCTCGTCTACTCCAGCTGAGGACAGCTACTAAG
 0770GACACCGAGTTGGTCAAGCAGATCGGCGGCTCATCGCTCGGAGATGACTTCTCTGGGTAGGAACG
 0840CTCAAGAAGAACGCGAGCGGAGATTTGGACGGAGATGCGGAGAGATTATCGGTTAAGCAGAGT
 0910TGTCTGGTCTGTTGCTGGAGCAATTGGCCGAGGCTCTGTTGGACACGCCAGGCAACGAATACAA
 0980GGCGATGGCTTTACAGATCCCATCACTGCTGCTCAAGGCTGCTAGGAGGCTGACGGTCCCAAG
 1050CTTAGCTTCATAAATGGCTTCTGAATACTCAAGATCTTCCGACGTGAAGTGAATTCGGCGCGGTG
 1120ATCTTGGCAAGGGAACACCGCCGCAAGATTCTGTCCTCTAAGTGTGCGAGAGAAGAGAGAA
 1190GAAAAAGTCGCCACGAAGAGCGGCTACCGGAGTCTACTAGCTTGGGTGAGGCAAGTCTTGGC
 1270CCAAAGGGGACAAACCACTCACTCTCTCGTCAACACTGGTTGAA

图4 辣椒疫霉 OPW12₁₋₁₀₀ DNA 全序列

Fig4 Sequence of OPW12₁₋₁₀₀ DNA of *Phytophthora capsici*

讨论

近年来,随着分子生物学技术向植物病理学的渗透,植物+传病原体分子生态学已成为新的前沿领域,国外已有不少研究报道(Bruce等,1992;Picard等,1992;Toranzos等1992)。在疫霉菌中,以种特异性序列为基础所建立的PCR检测技术系统,已被成功地应用于分子生态学研究,Ersek等(1994)从*P. nicotianae*和*P. citrophthora*的DNA中,分别克隆出1300和800bp的NDA片段,根据克隆的

序列设计的引物具有高度种特异性。最新研究证明, Elicitin 基因是广泛分布于卵菌基因组中的一个较保守的 DNA 序列, 根据其氨基酸保守区序列合成的引物, 已从 *P. cryptogea*、*P. parasitica*、*P. infestans* 和 *P. sojae* 中克隆出其 elicitin 基因, 并进行了序列分析, 证明 Elicitin 基因为单阅读框架(ORF), 并在基因组中由 2-3 个拷贝组成小基因家族 (Panabieres 等, 1995; O'Donoghue 等, 1995; Kamorn 等, 1993, 1997; Mao 和 Tyler, 1996)。Lacourt 和 Duncan(1997)根据 *P. parasitica* 的 Elicitin 基因 parA1 设计的 6 条引物, 可以对土壤、寄主组织和水中的 *P. parasitica* var. *nicotianae* 进行定量 PCR 检测。多数植物病原菌产生的致病毒素具有种特异性, 从产毒基因或产毒相关基因序列设计特异引物, 是建立种特异性 PCR 检测技术新的有效途径。本研究克隆的辣椒疫霉产毒相关 DNA 区段 (ORF12_{sp1}), 其大小为 1316bp, 从序列内部设计的两个内引物具有种的特异性, 可用于辣椒疫霉快速 PCR 检测, 从而克服了应用选择性培养基难以检测孢子数量的难题, 为开展分子生态学研究奠定了基础。

此外, 辣椒疫霉产毒相关 DNA 区段的克隆测序, 也将有助于产毒素基因分子连锁图谱的构建或基因克隆, 对于进一步阐明产毒素分子机理具有重要的意义。

参考文献

- 王克夷 1989 糖蛋白中糖含量的测定 樊子贤主编, 蛋白质和酶学研究方法, 第二册, 北京: 科学出版社, 37~39 页。
- 王钧 1995 诱导植物产生过敏反应的病原蛋白 harpin 和 elicitor 植物生理学通讯 31 (6): 451~454。
- 卢圣雄主编 1993 现代分子生物学实验技术 北京: 高等教育出版社。
- 任华中 沈火林 1996 辣椒抗疫病遗传与育种研究进展(综述) 中国农业大学学报 1 (3): 71~76。
- 何红 郑小波 曹以勤 陆家云 1994 苎麻疫毒寄生专化性研究 植物病理学报 24 (2): 129~133。
- 郑小波编著 1997 疫霉菌及其研究技术 北京: 中国农业出版社。
- 李冠, 马剑 1995 新疆甜瓜疫霉毒素的分离及其致病效应 植物生理学通讯 31: 1416~1419。
- 庞龙 黄河 周嘉平 1985 烟草黑茎病毒素的分离纯化与性质的研究 科学通报 18: 1416~1419。
- 谢丙炎 朱国仁 1997 辣椒线粒体病毒 菌物系统 16 (4): 274~280。
- 谢丙炎 朱国仁 罗宽 李宗道 1998 苎麻疫菌诱抗蛋白的纯化及其特性 菌物系统 17 (2): 329~335。
- 谢丙炎 朱国仁 罗宽 李宗道 1997 苎麻疫菌糖蛋白毒素的纯化及其特性研究 中国植物病理学会第二届青年学术年会论文集 北京: 中国农业出版社 216~219 页。
- Adams G C & Hart L P 1989 The role of deoxynivalenol and 15-acetyldeoxynivalenol in pathogenesis of *Gibberella zeae* elucidated through protoplast fusion between toxigenic and nontoxigenic strains. Phytopathology. 79:404~408.
- Ann P J; Ko W H 1988 Induction of oospore germination of *Phytophthora parasitica* Phytopathology 78:335~338.
- Ansar M ;Bajwa R; Alam S S ;Akhtar A S 1995 Production of Phytotoxin from

Phytophthora megasperma var. *sojae* Brechler involved in root/collar rot chickpea. Pakistan J. Phytopathol. 7(2):181-195.

Bailey A M; Mena G L & Herrera-Estrella L 1993 Transformation of four pathogenic *Phytophthora* sp. by microprojectile bombardment on intact mycelia. Curr. Genet. 23:42-46.

Bailey A M; Mena G L & Herrera-Estrella L 1991 Genetic transformation of the plant pathogen *Phytophthora capsici* and *Phytophthora parasitica* Nucleic Res 19:4273-4278.

Baillieul F; Fritig B&Kauffman S 1996 Occurrence among *Phytophthora* species of a glycoprotein eliciting a hypersensitive response in tobacco and its relationships with elicitors. Mol Plant Microbe Interact 9(3):214-216.

Baillieul F; Genetet I; Kopp M; Saiudrenan P; Fritig B&Kauffman S 1995 A new elicitor of the hypersensitive response in tobacco: a fungal glycoprotein elicits cell death, expression of defense genes, production of salicylic acid, and induction of systemic acquired resistance. Plant J 8(4):551-560.

Ballio A, Gianini Luciana, Borelli R, Bottalico A, Graniti A 1972 Production of phytotoxins by *Phytophthora nicotianae* var *parasitica* (Dast.) Waterhouse, 431-432. In R K S Wood et al. "Phytotoxins in Plant Diseases". Acad Press, New York, 530p

Barr D J S 1981 The phylogenetic and taxonomic implications of flagellar rootlet morphology among zoospore fungi. BioSystems 14:359-370.

Bartnicki-Garcia S 1968 Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. Ann Rev Microbiol. 22:87-108.

Bartual R E ; Lacasa A; Marsal J I; Tello J C 1994 Epistasis in the resistance of peppers to *Phytophthora* stem blight (*Phytophthora capsici* L.) and its significance in the prediction of double-cross performances. Euphytica. 72:149-152.

Bartual R E ; Carbonell A; Marsal J I; Tello J C; Campos T 1991 Gene action in

the resistance of peppers (*Capsicum annuum*) to *Phytophthora* stem blight (*Phytophthora capsici* L.). Euphytica 54:195-200.

Bartual R; Carbonell EA; Marsal JE; Tello JC ;Campos T 1991 Gene action in the resistance of pepper (*Capsicum annuum*) to *Phytophthora* stem blight (*Phytophthora capsici* L) Euphytica 54:195-200.

Behnke M 1977 Isolation and partial characterization of phytotoxic substances from culture filtrates of the fungus *Phytophthora infestans* Z Pflanzenphysiol. 85(1):17-27.

Bhat R G & Schmittener A P 1993 Selection and characterization of inhibitor-resistant mutants of *Phytophthora sojae* Exp Mycol. 17:109-121.

Bhat R G; McBlain BA & Schmittener A P 1993 Development of pure line of *Phytophthora sojae* Phytopathology 83:473-477.

Bhat R G; Schmittener A P & McBlain BA 1992 Characterization of universally avirulent strains of *Phytophthora sojae* Can J Bot 70:1175-1185.

Bhattacharya D and Druhl L D 1986 Phylogenetic comparison of the small subunit ribosomal DNA sequence of *Costaria costata* (Phaeophyta) with those of other algae, vascular plants and oomycetes J Phycol. 21:539-543.

Billard V; Bruneteau M; Bonnet P; Ricci P; Pernollet J-C; Huet J-C; Verghe A; Richolrd G & Michel G 1988 Chromatographic purification and characterization of elicitor of necrosis tobacco production by incompatible *Phytophthora* species J Chromatography 44:87-94.

Biossy G; de La Portelle E; Huet JC; Bricogne G; Pernollet JC & Brunie S 1996 Crystal structure of a fungal elicitor secreted by *Phytophthora cryptogea*, a novel class of plant necrotic proteins Structure 4:1429-1439.

Bittin A; Veronesi C; Pontier D; Esquerre-Tugaye M-T; Blein J-P; Rustevacci C; Ricci P 1994 Differential responses of tobacco cells to elicitors from two *Phytophthora* species Physiol Biochem 32(3): 373-378.

Blein J-P; Milat M-L; Ricci P 1991 Responses of culture tobacco cells of cryptogeiin, a productions elicitor from *Phytophthora cryptogea* Plant

Physiol 95:486-491.

Boccas B R 1981 Interspecific crosses between closely related heterothallic *Phytophthora* species. Phytopathology 71:60-65.

Bonnet P; Bourdon E; Poupet M; Blein J-P; Ricci P 1996 Acquired resistance triggered compatible *Phytophthora* by elicitor tobacco and other Plants. Eur J Plant Pathol 102:181-192.

Bonnet P; Lacourt I; Venard P; Ricci P 1994 Diversity in Pathogenically to tobacco and in elicitor production among isolates of *Phytophthora parasitica* J Phytopathol 141:25-37.

Bonnet P 1988 Culture filtrates of three *Phytophthora* spp: purification and biological activity of different fractions. Agronomie 8(4):347-350

Bonnet P; Poupet A; Abad P; Venard P; Cardin L 1986 Occurrence of foliar necrosis, b production and resistance in non-compatible *Phytophthora* tobacco in elicitor interactions. Agronomie 6(9):829-837.

Bonnet P; Poupet A; Bruneteau 1985a Toxicity to tobacco of different fractions from a culture filtrate of *Phytophthora cryptogea* Agronomie 5(3):275-285

Bonnet P 1985b Differential reactions of tobacco to nine species of *Phytophthora*. Agronomie 5(9):801-808

Bos C J 1996 Somatic recombination in: Bos C J (ed) Fungal Genetics: principles and practice. Marcel Dekker Inc New York p73-95.

Bouaziz S; van Heijenoort C; Guittet E; Huët J-C; Pernollet J-C 1994a Resonance assignment, cysteine-pairing elucidation and secondary-Structure determination of capsaicin, an α -elicitor, by three-D NMR. Eur J Biochem 220:427-438.

Bouaziz S; van Heijenoort C; Huët J-C; Pernollet J-C; Guittet E 1994b ¹H and ¹⁵N Resonance assignment and secondary Structure of capsaicin, an α -Elicitor, Determined by three dimensional heteronuclear NMR. Biochemistry 33:8188-8197.

Bowers J H ; Papavizas G C & Johnston S A 1990 Effect of soil temperature and

soil water matrix potential on the survival of *Phytophthora capsici* in natural soil. Plant Dis 74:771-777.

Bradford M M 1976 A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein: dye binding. Anal Biochem 72:248-252.

Breiman Adina, Barash I 1981 Partial characterization of phytotoxic compounds in culture filtrates of *Phytophthora citrophthora*. Phytoathol Z 102:1-9.

Bruce KD; Hiorns W D ;Hoban J C; Osborn A M ;Strille P & Ritchie DA 1992 Amplification of DNA from native population of soil bacteria by using the polymerase chain reaction. Appl Environ Microbiol 58:3413-3416.

Bush DS 1993 Regulation of cytosolic calcium in plants. Plant Physiol 130:71-13.

Cameron L S ;Hutsul J; Thorlacius LA LeJohn N B 1990 Cloning and analysis of β -tubulin gene from a protoctist. J Mol Chem 265:1545-1552.

Capasso, R, Cristinzio, G, Evidente, A, Visca, C & Parente, A 1997 Phytophthorin, a phytotoxic peptide, and its phytotoxic aggregates from *Phytophthora nicotianae*. Phytopathol Medit 36(2):67-73.

Chappell J; Levine A; Tenhaken R; Lusso M; Lamb C 1997 Characterization of a diffusible signal capable of inducing defense gene expression in tobacco. Plant Physiol 113:621-629.

Cristinzio G Capasso R Evidente A 1992 Isolation of a phytotoxin from an isolate of *Phytophthora nicotianae* pathogenic to tomato. Bifesa Delle Piante 15(3):3-11.

Csinos AA; Hendrix JW 1977a Nonparasitic stunting of tobacco plants by *Phytophthora cryogea*. Can J Bot 55:26-29.

Csinos AA; Hendrix JW 1977b Laminar necrosis, growth inhibition, and death of tobacco plants caused by toxic extracts of *Phytophthora cryogea*. Phytopathology 67(4):434-438.

Csinos A&Hendrix JW 1977c Toxin produced by *Phytophthora crytogea* active on excised tobacco leaves. Can J Bot 55(9):1156-1162.

Csinos A&Hendrix JW 1978 *Phytophthora* species produced toxin active on excised tobacco. Soil Biol Biochen 10(1):47-51.

Desjardins A E;Proctor R H; Bai G; McCormick S P Shaner G;Buechley G & Hohn T M 1996 Reduced virulence of Trichothecene-nonproducing mutants of *Gibberella zae* in wheat field tests. Mol Plant-Microbe Interact 9:755-781.

Desjardins A E & Hohn T M 1997 Mycotoxins in plant pathogenesis. Mol Plant Microbe Interact. 10(2):147-152..

Desjardins A E;Hohn T M & McCormick S P 1992 Effect of gene disruption of trichodione synthase on the virulence of *Gibberella pulicaris*. Mol Plant microbe Interact. 5(3):214-222.

Dietrich A;Mayer J E &Hadlbrock 1990 Fungal elicitor triggers rapid transient and specific protein phosphory in parsley cell suspension cultures. J Biol Chem 265:6366-6368.

Devergne JC;Fort MA;Bonnet P;Ricci P;Verhoet C;Delaunay T&Grosclaude J 1994 Immunodetection of elicitors from *Phytophthora* spp using monoclonal antibodies Plant Pathol. 43:886-896.

Devergne J-C;Bonnet P;Panabieres F;Blein J- P&Ricci P 1992 Migration of the fungal Protein crytogein within tobacco plants Plant. Physiol. 99:843-847.

Dubery IA;Meyer D&Bothma C 1994 Purification and characterization of cactorcin, A phytotoxin secreted by *Phytophthora cactorum*. Phytochemistry 15(2):302-312.

Dudler R 1990 The single copy action gene of *Phytophthora megasperma* encodes a protein considerably diverged from any other known actin. Plant Mol Biol 14:415-422.

Ebol F &Cosio E G 1994 Elicitors of plant defence responses. Int Rev Cytol 148:1-36.

Ersek T ; English J T & Schoelz 1996 Creation of species hybrids of

Phytophthora with modified host ranges by zoospore fusion. *Phytopathology* 85:1343-1347.

Ersek T; Shoelz JE & English J T 1994 PCR amplification of species specific DNA Sequences can distinguish among *Phytophthora* species. *Appl Environ Microbiol* 60:2616-2621.

Ersek T; Holker U & Hofer M 1991 Non-lethal immobilization of zoospores of *Phytophthora infestans* by Li⁺. *Mycol Res* 95:970-972.

Felix G; Kegenass M; Spanu P & Boller T 1994 The protein phosphatase inhibitor calyculin A mimics elicitor action in plant cells and induces rapid hyperphosphorylation of specific proteins as revealed by pulse labeling with [³²P] phosphate. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:952-956.

Felix G; Grosskopf DG; Kegenass M & Boller T 1991 Rapid changes of protein phosphorylation are involved in transduction the elicitor signal in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:8831-8834.

Farmer EE and Helgeson J P 1987 An extracellular protein from *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* is associated with stress metabolite accumulation in tobacco calus. *Plant Physiol*, 85:733-740.

Forster H; Coffey MD; Elwood H & Sogin M L 1990 Sequence analysis of the small subunit ribosomal RNAs of three zoospore fungi and implications for fungal evolution. *Mycologia* 82:306-312.

Frean R T 1982 The production of water-soluble beta-glucans by isolates of *Phytophthora cinnamomi* Rand. *Phytophthora News*, 10:16-17.

Gil Ortega R; Palazon Espanol C; Cuartero Zueco L 1991 Genetics of resistance to *Phytophthora capsici* in the pepper line 'SCM334'. *Plant Breed*, 107:50-55.

Gil Ortega R; Palazon Espanol C; Cuartero Zueco L 1992 Genetic relationships among four pepper genotypes resistant to *Phytophthora capsici*. *Plant Breed* 108:118-125.

Goodwin PH; English J T; Nehr D A; Duhiway J M & Kirkpatrick B C 1990 Detection of *Phytophthora parasitica* from soil and host tissue with a species-specific

DNA probe. Phytopathology 80:277-281.

Grant BR;Ebert DG;Gayler KR 1996 Elicitin Proteins in search of role? Australia Plant Pathol 25:148-157.

Grosskopf DG;Felix GB;Boller T 1990 K-252a inhibits the response of tomato cells to fungal elicitors in vivo and their microsomal protein kinase in vitro. FEBS Lett. 275:177-180.

Guilloteau J-P;Nespoulous C;Huet J-C;Beauvais F; Pernollet J-C;Brumie S 1993 Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of h-Cryptogea, a toxic elicitin secreted by the phytopathogenic fungus *Phytophthora cryptogea*. J Mol Biol 229:564-565.

Hansen E M ;Maxwell D P 1991 Species of the *Phytophthora megasperma* complex. Mycologia 83:376-381.

Hawksworth D L ;Sutton B C ;et al 1995 Answorth & Bisby's dictionary of the fungi(8th edition) C A B. International.

Herrmann M;Zocher R;Haese A 1996 Effect of disruption of the emtAin synthetase Gene on the virulence of *Fusarium avenaceum*. Mol Plant-Microbe Interact 9:226-232.

Hohn T M; &Desjardin A E 1992 Isolation and gene disruption of the Tox5 gene Encoding trichodiene synthase in *Gibberella pulicaris*. Mol. Plant-Microbe Interact 5:249-256.

Hord M J & Ristaino J B 1992 Effect of the matrix component of soil water potential on infection of pepper seedlings in soil infested with oospores of *Phytophthora capsici* Phytopathology 82:792-798.

Hord M J & Ristaino J B 1991 Effect of Physical and chemical factors on the germination of oospores of *Phytophthora capsici* in vitro. Phytopathology 81:1541-1546.

Huet J-C;Le Caer J-P;Nespoulous C;Pernollet J-C 1995 The relationships between the toxicity and the primary and secondary structures of elicitinlike protein elicitors secreted by the phytopathogenic fungus *Pythium vexans* ..

Mol Plant-Microbe Interact 8(2):302-310.

Huet J-C;Salle-Tourne M&Pernollet J-C 1994 Amino acid sequence and toxicity of the α -Elicitin secreted with ubiquitin by *Phytophthora infestans*. Mol Plant-Microbe Interact 7(2):302-304.

Huet J-C;Mansion M&Pernollet J-C 1993b Amino acid sequence of the α -Elicitin secreted by *Phytophthora cactorum*. Phytochemistry 34(5): 1261-1264.

Huet J-C&Pernollet J-C 1993a Sequences of acidic and basic elicitin isoforms secreted by *Phytophthora megasperma megasperma*. 33(4):797-805.

Huet J-C;Nespoulous C&Pernollet J-C 1992 Structures of elicitin isoforms by *Phytophthora drehsleri*. Phytochemistry 31(5):1471-1476.

Huet J-C&Pernollet J-C 1989 Amino acid sequence of cinnamoxin, a new member of the elicitin family and its comparison to cryptogein and capsicein. FEBS Lett. 257:302-306.

Judelson H S 1996 Recent advances in the genetics of oomycete plant pathogens. Mol Plant-Microbe Interact. 9(6):443-449.

Judeison H S ; Spielman L J; Shattock R C 1985 Genetic mapping and non mendelian segregation of mating type loci in the oomycete, *Phytophthora infestans*. Genetics 141:503-512.

Judelson H S;Tyler B M; Michelmore R W 1991 Stable transformation of the oomycete pathogen, *Phytophthora infestans*. Mol Plant-Microbe Interact 4:602-697.

Judelson H S 1993a Efficient co-transformation mediated by intermolecular ligation occurring in vivo in the oomycete *Phytophthora infestans*. Mol Gen genet. 239:241-250.

Judelson H S; Dudley R ; Pieterse C M J ;Unkles S E 1993b Expression and antisense inhibition of transgens in *Phytophthora infestans* is modulated by choice of promoter and position effects. Gene 133:63-69.

Judelson H S and Michelmore R W 1989 Structure and expression of a gene

encoding heatshock protein Hsp70 from the Oomycete fungus *Botrytis lactucae*
Gene 79:207-217.

Kamoun S; Van West P; de Jong AJ; de Groot KE; Vleeshouwers VCAA; Govers F 1997
A gene encoding a protein elicitor of *Phytophthora infestans* is down-
regulated during infection of Potato Mol Plant-Microbe Interact
10(1):13-20.

Kamoun S; Young M; Forster H; Coffey MD; Tyler BM 1994 Potential role of elicitor
in interaction between *Phytophthora* species and tobacco
Appl Environ Microbiol 60:1593-1598.

Kamoun S; Young M; Glascoch CB; Tyler BM 1993a Extracellular Protein elicitor
from *Phytophthora*: host specificity and induction of resistance to bacterial
and fungal phytopathogens Mol Plant-Microbe Interact 6(1):15-25.

Kamoun S; Klucher K M; Coffey M. D, Tyler B. M 1993b A gene encoding a host-specific
elicitor protein of *Phytophthora parasitica* Mol Plant
-Microbe Interact 6(5):573-581.

Kannaiyan T N, Raju, Subba Rao B. L 1981 Toxin production by pidenopen blight
fungus (*Phytophthora drechsleri* f. sp. *cajani*) in vitro. *Phytophthora News*
9:24.

Karlovsy P & Prell H H 1991 The TRP1 gene of *Phytophthora parasitica*
encoding indole 3 glycerophosphate synthase-N-(5'-phosphoribosyl)anthra
nilate isomerase : structure and evolutionary distance from homologous
fungal genes. Gene 109:161-165.

Keen, N T, Wang, M G., Bartnicki-Garcia, S & Zentmyer, G A 1975 Phytotoxicity
of mycolaminarins-B-1, 3-glucans from *Phytophthora* spp. *Physiol Plant*
Pathol 7:91-97.

Keller H; Blein J-P; Bonnet P& Ricci P 1996a Physiological and
molecular characteristics of elicitor induced systemic acquired resistance
in tobacco. *Plant-Physiol* 110:365-375.

Keller H; Bonnet P; Galliana E; Pruvot L; Friedrich L; Ryals J & Ricci P 1996b
96

Salicylic acid mediates elicitor-induced systemic acquired resistance but not necrosis in tobacco. Mol Plant-Microbe Interact 9(8):696-703.

Xie ES&Hwang KH 1992 Virulence to Korean pepper cultivators of isolates of *Phytophthora capsici* from difference geographic areas. Plant Dis 76(5):486-489.

Knight MR;Campbell AK;Smith SM&Trewavas AT 1991 Transgenic plant aquorin reports the effects of touch and cold shock and elicitors on cytoplasmic calcium. Nature 352:524-526.

Ko WH 1978 Heterothallic *Phytophthora* evidence for hormonal regulation of sexual reproduction. J Microbiol 107:15-18.

Larkin R P; Ristaino J B &Lea Campbell C 1995 Detection and quantification of *Phytophthora capsici* in soil. Phytopathology 85:1057-1063.

Lacourt I& Duncan JM 1997 specific detection of *Phytophthora nicotianae* using the polymerase chain reaction and primers based on the DNA sequence of its elicitor gene *path1*. Eur J Plant Pathol 103:73-83.

Laemmli U K 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.

Layton AC & Kuhn D N 1988 Heterokaryon formation by protoplast fusion of drug-resistant mutants in *Phytophthora megasperma* f. sp *glycinea*. Exp Mycol 12:180-194.

Le Berre J-Y; Panabieres F; Ponchet M.;Denoroy L;Bonnet P;Marras A&Ricci P 1994 Occurrence of multiple forms of elicitors in *Phytophthora cryptogea*. 32(2):251-258.

Lee S B;White J &Taylor JW 1993 Detection of *Phytophthora* species by oligonucleotide hybridization to amplified ribosomal DNA spacers. Phytopathology 83:177-181.

Lefebvre V & Palloix A 1996 Both epistatic and additive effects of QTLs are involved in polygenic induced resistance to disease : a case study, the interaction pepper- *Phytophthora capsici* Leonian. Theor Appl Genet

93:503-511.

LeJohn HB 1989 Structure and expression of fungal calmodulin gene. *J. Biol. Chem.* 258:13230-13235.

Levine A;Tenhaken R;Dixon RM;Lamb L 1994 H2O2 from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance. *Cell* 79:583-593.

Long M & Keen NT 1977 Evidence for heterokaryosis in *Phytophthora megasperma* var *sojae*. *Phytopathology* 67:670-674.

Lucas J A;Geer C; Odudemans P V & Coffey D 1990 Fungicide sensitivity in hybrids of *Phytophthora capsici* obtained by protoplast fusion. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 36:175-187.

Nespoulous CN;Huet J-C&Pernollet J-C 1992 Structure-function relationships of α and β Elicitins, Signal proteins involved in the Plant-*Phytophthora* interaction. *Planta* 186:551-557.

Mackintosh C;Lyon GD&Mackintosh KW 1994 Protein phosphatase response of soybean cothledons and cell cultures. *Plant J* 5:137-147.

Mao Y&Tyler B 1996 Cloning and sequence analysis of elicitor genes of *Phytophthora sojae*. *Fungal Genetics and Biology* 20:168-172.

Mateos FV;Rickauer M&Esquerre-TugayM-T 1997 Cloning and characterization of cDNA encoding an elicitor of *Phytophthora parasitica* var *nicotianae* that shows cellulose-binding and lectin-like activities. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10(9):1045-1053.

Mcintyre J-L& Dodds JA 1979 Induction of localized and systemic protection against *Phytophthora parasitica* var *nicotianae* by tobacco mosaic virus. *Physiol. Plant. Physiol.* 15:321-330.

Mena G L; Munoz PA; Guzman PA & Bailey A M 1994 Variation in cutinase, esterase, and chromosome patterns in Nop mutants of a transformed pathogenic strain of *Phytophthora capsici*. *Phytopathology* 84:502-508.

Mezzetti B; Capso R; Evidente A;Hammerschlag PA; Zimmerman RH; Cristinzio
98

- G; Rosati P 1994 Interaction of partially purified phytotoxins from *Phytophthora cactorum* on apple cell plasma membrane. J. Phytopathol. 142(3-4):219-226.
- Michelmore R W; Paran I ; Kesseli R W 1991 Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic by using segregating populations Proc Natl Acad Sci USA 88:9828-9832.
- Milat M-L; Ducruet J-M; Ricci P; Marty F & Blein J-P 1991 Physiological and structural change in tobacco leaves treated with Cryptogein a proteinaceous 81:1364-1368.
- Miller S A; Bhat R G & Schmitthenner A F 1994 Detection of *Phytophthora capsici* in pepper and Cucurbit crops in Ohio with two commercial immunoassay Kits Plant Dis 78:1042-1046.
- Mouton-Peronnet F; Bruneteau M; Denoroy L; Boulitedieu P; Ricci P; Bonnet P & Michel G 1995 Elicitin produced by an isolate of *Phytophthora parasitica* pathogenic to tobacco. Phytochemistry 38(1):41-44.
- O'Donohue MJ; Boissy G; Huet JC; Nespoulous C; Brune S & Pernollet JC 1995 Overexpression in *Pichia pastoris* and crystallization of an elicitor protein secreted by the phytopathogenic fungus, *Phytophthora cryptogea* Protein Expression Purif 8:254-261.
- O'Donohue MJ; Goussau H; Huet J-C; Tepfer D; Pernollet J-C 1995 Chemical synthesis, expression and mutagenesis of a gene encoding β -cryptogein an elicitor produced by *Phytophthora cryptogea* Plant Mol. Biol 27:577-586.
- Panabieres F; Warais A; Le Berre J-Y; Penot Z; Pournier D & Ricci P 1995 Characterization of a gene Cluster of *Phytophthora cryptogea* which codes for elicitor proteins, inducing a hypersensitive-like response in tobacco Mol Plant-Microbe Interact 8(6):909-1003.
- Panaccione D G; Scoth-Craig JS; Procard J A & Walton J D 1992 A cyclic peptide synthase gene required for pathogenicity of the fungus *Cochliobolus carbonum*

on maize. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:6599-6594.

Pepavizes G C;Bowers J R &Johnston S A 1981 Selective isolation of *Phytophthora capsici* from soils phytopathology 71:129-133.

Parker J E ;Schulte W;Hahibrock K & Scheel D 1991 An extracellular glycoprotein from *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* elicits phytoalexin synthesis in culture parsley cells and protoplasts. *Mol Plant-Microbe Interact.* 4(1):19-27.

Paxton J D 1972 Toxic production by *Phytophthora megasperma* Drechs. var. *sojae* Hild. , 433. In R K S Wood, A Ballio& A Graniti: "Phytotoxins in Plant Diseases" . Acad Press, New York, 530p.

Perez V;Huet J-C;Nespoulous C&Pernollet J-C 1997 Mapping the elicitin and necrosis sites of a *Phytophthora* eliciting with synthetic peptides and reporter genes controlled by tobacco defense gene promoters *Mol Plant Microbe Interact* 10(6):750-760.

Pernollet J-C;Sallantin M;Salle-Tourne M&Huet J- C 1993 Elicitins isoforms from seven *Phytophthora* species: comparison of their physico chemical properties and toxicity to tobacco and other Plant Pathol 42:53-67.

Pfyffer G E ;Borraschi-Gala C; Weber B; Hoessli L; Opitz C G; Rast D M 1990 A further report on the occurrence of acyclic sugar alcohols in fungi. *Mycol Res* 92:219-222.

Pieterse C M J ; van't Klooster; van den Berg-Velthuis G C M; Govers F 1995 NiaA, the structural nitrate reductase gene of *Phytophthora infestans*: isolation, characterization and expression analysis in *Aspergillus nidulans* *Curr Genet* 27:359-366.

Plich M ,Rudnicki R M 1979 Studies of the toxins of *Phytophthora cactorum* pathogenic to apple trees. I. Isolation, some of the properties and activities of a toxin produced by the fungus cultured in vitro. *Phytopathol. Z.* 94(3):270-278.

Polsch F J & Webster R K 1972 Identification of strains and inheritance of 100

- pathogenicity in *Phytophthora capsici*. *Phytopathology* 82:20-26.
- Proctor R H;Hohn T M; McCormick S P 1995 Reduced virulence of *Gibberella* *rosea* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. *Mol Plant-Microbe Interact* 10:683-691.
- Reifschneider FJB; Boiteux LS; Della Vechia PT;Poulos JM; Kuroda N 1992 Tolerance of adult resistant to *Phytophthora capsici* in pepper haplotype 62.45-49.
- Renelt A;Colling C;Hübner K;Nurnberger T;Parker JE;Sacks WR&Scheel D 1993 Studies on elicitor recognition in plant defense. *J Exp Bot* 41:257-268.
- Ricci P;Trentin F;Bonnet P&Venard P 1992 Differential production of parasitellin, an elicitor of necrosis and resistance in tobacco, by isolates of *Phytophthora parasitica*. *Plant Pathol* 41:298-307.
- Ricci P;Bonnet P;Huet J-C;Sallantin M;Beauvais-Cante F; Bruleteau M;Billard V;Michel G&Pernollet J-C 1989 Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. *Eur J Biochem* 183:555-563.
- Roonebeck W 1956 Ein phytotoxisches princip aus *Phytophthora infestans* de Barv. *Z. Pflkrankh* 63(7):385-389.
- Ross AF 1961a Localized acquired resistance to plant virus infection in hypersensitive hosts. *Virology* 11:329-339.
- Ross AF 1961b Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in Plants. *Virology* 11:340-358.
- Rowland L J; Chartisathian J; Maas J L & Galletta J A 1992 Evidence of a toxin in culture filtrate of *Phytophthora fragariae*. *Act Horticulture* No.336, 115-120; Second international symposium on in vitro culture and horticultural breeding, Baltimore, MD, USA, 28 June-2 July 1992.
- Rusterucci C; Stallact V; Milat M-L; Pugin A; Ricci P & Billein J- 1996 Relationship between active oxygen species, lipid peroxidation, necrosis, and phytoalexin production induced by elicitors in *Nicotiana*.

Plant Physiol. 111:898-891.

Sachay D J ; Hudspeth D S S ; Nadler S A & Hudspeth M E S 1993 Dmcyete mtDNA: *Phytophthora* genes for cytochrome c oxidase use an unmodified genetic code and encode proteins most similar to those of plants. Exp. Mol. Biol. 17:7-23.

Shattock R C 1988 Studies on the inheritance of resistance to metidaxyl in *Phytophthora infestans* Plant Pathol. 37:4-11.

Stamps D J ; Waterhouse G M; Newhook F J & Hall G S 1980 Revised tabular key to the species of *Phytophthora*. Mycological Paper. 162:1-28.

Stolle K&Schober B 1984 Wirkung eines toxischen von *Phytophthora infestans*(Mont.) de Bary auf Kartoffelknollengewebe. Potato Research 27:273-276.

Stolle K&Schober B 1985a Nachweis eines toxischen in Kartoffelknollengewebe nach Inokulation mit *Phytophthora infestans*(Mont.) de Bary. Potato Research 28:193-201.

Stolle K & Schober B 1985b Wirkung eines toxischen von *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary auf Kartoffelblätter. Potato Res. 28:389-402.

Tavernier E; Stallaert V; Blein J-P & Pugin A 1995a Changes in lipid component in tobacco cells treated with cryptogelin in elicitor from *Phytophthora cryptogea*. Plant Sci. 104:117-125.

Tavernier E, Vandehenne D; Blein JP & Pugin A 1995b Involvement of free calcium in action of cryptogelin a proteinaceous elicitor of hypersensitive reaction in tobacco cells. Plant Physiol. 109:1025-1031.

Templeton M; Rikkerink EH & Beevers RE 1994 SanaII, cysteine-rich proteins and recognition in fungal-Plant interactions. Mol. Plant-Microbe Interact. 7(3):320-325.

Tepfer D; Bouteaux C; Vigon C; Aymes S; Perez V; O'Donohue M J; Huot J-C & Pernollet J-C 1998 *Phytophthora* resistance through production of a fungal protein elicitor (β-cryptogelin) in tobacco. Mol. Plant-Microbe Interact. 11(1):61-67.

- Terce-Laforgue T; Huet J-C; Pernollet J-C** 1992 Biosynthesis and secretion of cryptogein a protein elicitor secreted by *Phytophthora cryptogea*. *Plant Physiol* 98:936-941.
- Toranzos G A & Alvarez AJ** 1992 Solid-phase polymerase chain reaction application for direct detection of enteric pathogens in water. *Can J Microbiol* 38:365-369.
- Trentin F** 1991 Analysis of host specialization on tobacco of the pathogenic fungus *Phytophthora parasitica*: study of the involvement of a protein elicitor. *Annales du tabac Section I* 23:5-67.
- Treewas A & Gilroy S** 1991 Signal transduction in plant cells. *Trends Genet* 7:356-361.
- Tyler B M; Foster H and Coffey M D** 1995 Inheritance of avirulence factors and restriction fragment length polymorphism markers in outcrosses of oomycete *Phytophthora sojae*. *Mol Plant-microbe Interact.* 8:515-523.
- Unkles S E; Moon R P; Hawkins A R; Duncan J M; Kinghorn J R** 1991 Actin in the oomycetes fungus *Phytophthora infestans* is the product of several genes. *Gene* 100:105-112.
- Viard MP; Martin F; Pugin A; Ricci P; Blein JP** 1994 Protein phosphorylation is induced in tobacco cells by the elicitor cryptogein. *Plant Physiol* 104:1245-1249.
- Vilassini T N; Abi-Cheeran & Cheeran A** 1994 A medium for in vitro production of toxins by *Phytophthora capsici* from black pepper. *Journal of Tropical Agriculture* 32(2):181-182.
- Vogeli U; Vogell-Long R & Chappell J** 1992 Inhibition of phytoalexin biosynthesis in elicitor-treated tobacco cell suspension cultures by calcium/Calmodulin antagonists. *Plant Physiol* 100:1369-1376.
- Vogel H J** 1965 Lysine biosynthesis and evaluation. P.25-40. In: *Evolving genes and proteins*. Eds. V Bryson and H J Vogel. Academic Press. New York.
- Walker W F and Doolittle W F** 1982 Nucleotide sequences of 5S ribosomal RNA

From four oomycetes and chytrid water molds. Nucleic Acids RES. 10:5717-5721.

Warner S A; Sovocool GW; Dommas A J 1983 Sterols of selected species of oomycetes and Hypochytridiomycetes. Mycologia. 75:728-291.

Weber G F 1932 Blight of peppers in Florida Caused by *Phytophthora capsici* Phytopathology 22:775-780.

Wendenne D; Binet M-N; Blein J-P; Pricci P & Pugin A 1995 Evidence for specific, high-affinity binding sites for a proteinaceous elicitor in tobacco Plasma membrane FENS Lett 374:302-207.

Whisson S C; Drenth A; Maclean D J & Irwin JAG 1994 Evidence for outcrossing in *Phytophthora sojae* and linkage of a DNA marker to the avirulence gene. Curr Genet. 27:77-82.

Whisson S C; Drenth A; Maclean D J & Irwin JAG 1995 *Phytophthora sojae* avirulence genes, RAPD, and RFLP markers used to construct a detailed genetic linkage map. Mol Plant-Microbe Interact. 8:988-995.

van der Lee T; Witte I D; Drenth A; Alfonso C & Govers F 1997 AFLP linkage map of the oomycete *Phytophthora infestans* Fungal and Genetics and Biology 21:278-291.

Whitaker RH & Margulis L 1978 Protist classification and the kingdoms of organisms. BioSystems 10:3-18.

Whittaker R H 1969 New concepts of kingdoms of organisms. Science. 163:150-160.

Wolf F T; Wolf F A 1954 Toxicity as factor in tobacco black shank. J Elisha Mitchell Sci. Soc. 70:244-255.

Wolf F T 1953 Toxin of production in relation to tobacco black shank disease. Phytopathology 43:294.

Woodward J R ,Keane PJ ;Stone BA 1980 Structures and properties of wilt-inducing polysaccharides from *Phytophthora* species. Physiol Plant Pathol. 16:439-454.

Yu LM 1995 Elicitins from *Phytophthora* and basic resistance in tobacco
Proc Natl Acad Sci USA 92:4088-4094.

Zantti A, Beauvais F, Huet J-C & Pernallet J-C 1992 Movement of elicitor
necrosis-inducing proteins secreted by *Phytophthora* spp in tobacco. *Planta*
187:163-170.

Zentmyer G A 1960 *Phytophthora cinnamomi* and the diseases it causes. In
Monograph No 10. American Phytopathological Society: St Paul Minnesota
USA.

致谢

本论文从选题、实验设计到成文始终受到导师李宗道教授和罗宽教授的热情支持和悉心指导。

在我博士学习期间，李宗道先生虽已逾耄耋之年，但他饱满的工作热忱、渊博的学识、严谨的治学态度，以及对科学研究无私奉献的精神，令学生感染至深、受益匪浅，并将时刻激励和鞭策着我；李先生谦逊的为人、高尚的品格、博大的胸怀，也将是我终身仿效的楷模。

自我博士学习伊始，罗宽教授就对我的学习和科研工作给予热情的指导和多方面的帮助；来京工作以后，承蒙朱国仁研究员在学业上的精心栽培，生活上无微不至的关怀，感激之情将永远铭在心头。

中国农科院蔬菜花卉所冯兰香研究员对我的博士论文提出了宝贵的意见，并给予热情的指导。在论文完成过程中，中国农业科学院蔬菜花卉所的方智远院士、屈冬玉博士、剧正理先生、张友军博士；湖南农业大学中心实验室的王增盛教授、植保系黄声仪教授、肖启明教授、高必达教授、廖晓兰副教授、苎麻所郭清泉教授、王春桃教授、郑思乡博士；湖南农科院罗赫荣副研究员等均给予了热情的帮助。

四年来，研究生处的张立老师、陈凌云老师在学习和管理上给予了大量的帮助；研究中承蒙中国农业大学植保系的范军博士、甘肃省农科院植保所吕和平先生、陕西省农科院植保所赵小明先生惠赠实验菌株；中国农科院蔬菜花卉所陆同鑫教师协助照片的冲印和幻灯制作；徐宝云小姐帮助打印部分文稿；此外，也有幸得到我曾经工作和学习过或现工作单位的教师和同事们的大力帮助，他们是姚技强、马凤海、冯东昕、周程爱、刘寿明、向延平、肖晓林、李赛群、黄秋林、易志红、肖伏莲等。

由于忙于学业和工作，无暇顾家，妻子成新跃博士为

女儿的成长付出了辛劳，在她完成博士学业的同时，同样给予我工作上无私的帮助，生活上无微不至的关心；我敬爱的岳母和父亲，对我的学业和家庭倾注了全部心血。亲人的理解和支持成为我完成学业的强大动力。

在我博士论文完成之际，谨向所有关心和帮助我的老师、同事及亲友们表示最诚挚的感谢。

作者简历

姓名 谢丙炎 出生年月 1960年4月1日 籍贯 湖南省湘潭市

主要经历

1978年3月至1981年12月	湖南农学院农学系植保专业毕业	
1982年1月至1985年4月	湖南省湘潭市环保局	助工
1985年5月至1991年7月	湖南省衡阳市蔬菜研究所	助研
1991年8月至1996年4月	湖南省园艺研究所	副研
1996年5月—	中国农科院蔬菜花卉研究所	副研 硕士导师、室副主任
1991年至1992年7月	北京农业大学植保系进修	
1994年8月至1998年7月	湖南农业大学苎麻研究所在职博士	

获奖成果

1991年 湖南省科技进步叁等奖 排名第二
1992年 湖南省科技进步叁等奖 排名第三
1996年 国家发明专利(受理) 排名第一

现承担课题

1. 国家95'攻关“蔬菜和大豆病虫害综合防治技术研究”(96-005-01-12)专题,专题第一主持人。
2. 农业部95重点“辣椒新品种选育”专题,承担抗疫病育种。

在校期间发表论文

1. 谢丙炎 朱国仁 罗宽 李宗道 1997 苎麻疫霉糖蛋白毒素的纯化及其特性研究 中国植物病理学会第二届青年学术年会论文集 北京:中国农业科技出版社 216-219页。
2. 谢丙炎 朱国仁 1997 辣椒疫霉致病毒素 菌物系统 16(4): 274-280。
3. 谢丙炎 朱国仁 罗宽 李宗道 1998 苎麻疫霉诱抗激发蛋白的

纯化与特性 菌物系统 17 (2): 329-335.

4. 谢丙炎 朱国仁 罗宽 李宗道 1998 疫霉 elicitin 激发蛋白研究进展 (综述) 中国植物保护学会青年学术年会论文集 北京: 中国农业科技出版社 待发表.

5. 谢丙炎 朱国仁 罗宽 李宗道 1998 苎麻疫霉 elicitin 基因断裂现象初探 菌物系统 17 (4, 待发表).

6. 张友军 谢丙炎 1998 蔬菜病虫抗药性与抗性治理 (2): 56-68.