

# 烟草野火病菌毒素研究进展\*

吕军鸿 张广民 丁爱云 李雪玲

(山东农业大学植保系 泰安 271018)

关键词: 烟草, 野火病菌, 毒素

中图分类号: S435.66 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654(1999)-05-0358-03

烟草野火病是烟草生产上的主要病害之一,在我国云南等主要烟草栽培地区常年发生,危害十分严重。该病由 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 引起。病菌侵染烟草后,在叶片上产生周围有一很宽黄绿晕圈的圆形褪色斑点<sup>[1]</sup>。Johnson 和 Murwin 首次报道病菌的除细胞滤液接种叶片也能引起野火症状,表明野火病菌产生一种外毒素。二十世纪 50 年代, Woolley 和 Broun 提出浓缩和分析毒素的方法以后,人们开始对野火病菌毒素进行系统的研究。

## 1 毒素的提取

毒素的提取是毒素得以详细研究的第一步,但由于野火病菌毒素极不稳定,很容易异构化成无活性的化合物,这就对提取方法提出了较高的要求。起初, Sindén 用炭吸收、甲醇提取和离子交换柱层析的方法纯化毒素,但产率不高。后来 Stewart 先去除细胞滤液通过 50~100 目的离子交换柱(pH:2.5,洗脱液:1mol/L 吡啶)粗提,再用 200~400 目的离子交换柱(pH:3.1,缓冲液:0.2mol/L 吡啶乙酸,4℃)层析,得到了蓬松的灰白色粉末。这种方法的产率为 85%~95%,毒素生物活性保持在 99% 以上<sup>[2]</sup>。

## 2 毒素的结构

野火病菌毒素的不稳定,极大地阻碍了对其结构的研究。Woolley 等在他们提出的纯化毒素方法的基础上,认为野火病菌毒素的结构为  $\alpha$ -羟丙酰氨- $\beta$ -羟基- $\epsilon$ -氨基庚二酸内酯( $\alpha$ -lactylamino- $\beta$ -hydroxy- $\epsilon$ -aminopimelic acid lactone)(图 1)。

这种结构曾一度被广泛接受和引用。但后来包括 Woolley 在内的一些人否定了这种结构。随着对毒素作用机制的深入研究,对明确毒素的结构又提出了迫切的需要。正是在这种情况下,Stewart 通过提纯毒素后核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)波谱

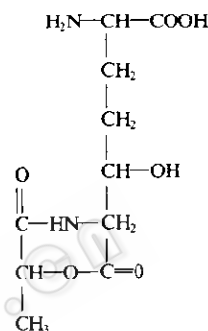


图1 Woolley的野火病菌毒素结构

分析推出了新的结构(图 2),从而较圆满地解释了野火病菌毒素水解释放苏氨酸(Thr)和烟毒因- $\beta$ -内酰胺(tabtoxinine- $\beta$ -lactam, T $\beta$ L)以及毒素异构化的现象(图 3)<sup>[2]</sup>。此外, Taylor 还发现了另一种数量很少的能水解产生色氨酸的毒素(称之为色氨酸烟毒素)(图 4)<sup>[4]</sup>。

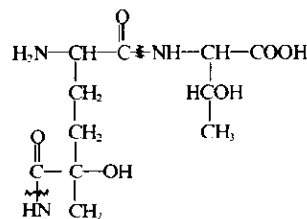


图2 Stewart的野火病菌毒素结构

波浪线标出水解时断裂的键,左边为T $\beta$ L,右边为Thr

\* 山东省烟草专卖局资助项目

Supported by Shandong Provincial Tobacco Monopoly Administration

收稿日期: 1998-09-07, 修回日期: 1998-12-27

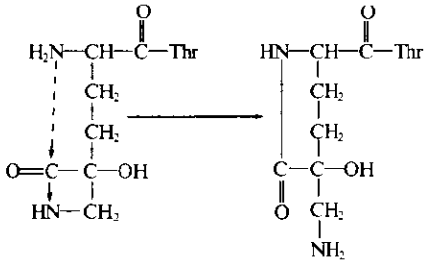


图 3 野火病菌毒素的异构化现象

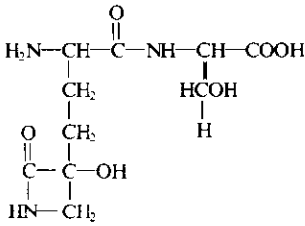


图 4 色氨酸烟毒素的结构

### 3 毒素的生物合成

毒素的生物合成是病原物引起致病性的特征步骤。同位素掺入实验表明野火病菌毒素生物合成与野火病菌赖氨酸生物合成途径相关联。Unkefer 用特异  $^{14}\text{C}$  标记的葡萄糖和  $^{13}\text{C}$  NMR 波谱鉴定野火病菌毒素的生物前体,发现  $\text{T}\beta\text{L}$  是由一个 4C 片段、一个 2C 片段和一个 C 结合而成的。4C 片段来自天冬氨酸,2C 片段来自丙酮酸, $\text{T}\beta\text{L}$  的 6C 骨架来自天冬氨酸和丙酮酸的结合。于是推测野火病菌毒素合成途径的最初几步反应或许与赖氨酸生物合成途径的最初几步相类似<sup>[4]</sup>。Roth 等通过  $[2, 3-^{13}\text{C}_2]$  丙酮酸生物合成后供给 *P. syringae* pv. *tabaci* 培养,得出结论:丙酮酸的  $\text{C}_{(2)}$  和  $\text{C}_{(3)}$  作为一个整体单元结合到野火病菌毒素的  $\beta$ -内酰胺部分,且野火病菌毒素的生物合成很可能在 L, L-二氨基庚二酸 (DAP) 形成之前便从赖氨酸合成途径中分支出来的<sup>[5]</sup>。Engst 等用诱变 *P. syringae* pv. *tabaci* PTBR 2.024 获得的突变体 PTBR7.000 分析了野火病菌毒素的合成和致病性间的基因与表型的关系,并命名了 PTBR2.024 基因库中可以互补 PTBR7.000 的 TOXPAT 表型的 *tabA* 基因。经过进一步的研究,Engst 和 Shaw 推断野火病菌毒素生物合成途径中 *tabA* 基因的产物所识别的底物是赖氨酸生物合成途径中某化合物的类似物,进而证明 *tabA* 基因参与野火病菌毒素的

生物合成,其表达对致病是必需的<sup>[1,6]</sup>。最近, Liu 和 Shaw 从 PTBR2.024 中克隆到了编码 L-2, 3, 4, 5- 四氢吡啶二羧酸的 *dapB* 基因,业以证实赖氨酸和烟毒素的合成都需要 *dapB* 基因,并且发现 L-2, 3, 4, 5- 四氢吡啶二羧酸是两者生物合成的共同中间体<sup>[7]</sup>,这就从遗传学和基因水平为 Unkefer 关于烟毒素合成部分沿着精氨酸合成途径的推测提供了证据。Liu 等克隆并命名的另一个在  $\text{T}\beta\text{L}$  合成中起作用的基因是 *tabB*。 *tabB* 基因的可能产物尽管与其它细菌编码 L-2, 3, 4, 5- 四氢吡啶二羧酸琥珀酰辅酶 A 琥珀酰转移酶 (THDPA-ST) (DAP 和精氨酸合成途径中的一种酶) 的 *dapD* 基因产物具有明显的序列同源性,但是 DAP 的合成并不需要 *tabB*, *tabB* 编码产物也不具有 THDPA-ST 活性。结果说明, PTBR2.024 的 DAP 合成需要乙酰化中间体而不是 THDPA-ST<sup>[8]</sup>。Kinscherfer 等从 *Pseudomonas syringae* BR2 克隆了一个与野火病菌毒素合成有关的 PvuII DNA 片段。这个 DNA 片段也能在 *P. syringae* pv. *tabaci*, *P. syringae* pv. *orconafaciens*, *P. syringae* pv. *garcae* 和 *P. syringae* 0152 中检测到<sup>[9]</sup>。不久, Barta 等从 *P. syringae* pv. *coronafaciens* 克隆出一个与野火病菌毒素合成有关的基因,并命名为 *lemA* 基因。而 *lemA* 基因似乎是通过 *tblA* 基因来调节野火病菌毒素合成的。迄今 *tblA* 是唯一的已被克隆的 *lemA* 的调节基因<sup>[10]</sup>。 *tblA* 在毒素合成中的功能还不清楚。

研究表明, *P. syringae* 大多数菌株的野火病菌毒素合成基因位于染色体上,也有一些病原菌株的质粒上携带一些参与毒素生物合成的基因<sup>[6]</sup>。

### 4 毒素的作用方式

野火病菌毒素有烟毒素 (tabtoxin)、(2-丝氨酸)烟毒素 [2-(ser) tabtoxin] 和烟毒因- $\beta$ -内酰胺 ( $\text{T}\beta\text{L}$ ) 3 种形式。其中, (2-丝氨酸)烟毒素只在很少的一些菌系中产生,它和烟毒素都可水解成具有生物活性的  $\text{T}\beta\text{L}$ ,同时前者释放出丝氨酸,后者释放出苏氨酸。在碱性条件下,这 3 种毒素会异构成更稳定的且对寄主无毒的  $\delta$ -lactam 形式 (有人称之为异烟毒素)。野火病菌最终产生何种形式的毒素由病菌菌株和/或受侵烟叶细胞间隙环境决定。Levi 从野火病菌的质粒中分离出了具广泛最适 pH 值的氨肽酶,其活性受 EDTA 抑制,但这种抑制作用能被  $\text{Zn}^{2+}$  或其他二价正离子恢复<sup>[11]</sup>。  $\text{Zn}^{2+}$  是氨肽酶活动所必须的,在有足够的  $\text{Zn}^{2+}$  可利用的情况下,氨肽酶

可水解烟毒素产生 T $\beta$ L。Durbin 却发现,从 Woolley's 培养基分离的 17 个能产烟毒素的分离物中,有 14 个分离物在培养基上补充其内没有氨肽酶活性的烟叶细胞间隙液后,只产生 T $\beta$ L 而不再产生烟毒素;而另外 3 个分离物接种烟叶,产生的仍为烟毒素<sup>[12]</sup>。可见烟毒素水解释放生物活性形式 T $\beta$ L 是一个复杂的过程,可能与菌体和寄主相互作用及菌体的自我保护有关。

野火病菌毒素是非专一性的,除烟草外,对多种植物、动物、细菌、藻类等均具毒性。Braun 认为这种毒素是一种抗代谢物,它与蛋氨酸硫脲(methionine sulfoxide, MSO)的作用一样,能干扰植物细胞的蛋氨酸代谢途径,引起叶片的褪绿。Sinden 认为抑制谷氨酰胺合成酶(Glutamine synthetase, GS)才是烟毒素可能的作用方式,且这种作用是不可逆的,酶的活性不能被透析、丙酮沉淀和细胞溶菌产物的粗提物所恢复。GS 的被抑制导致了谷氨酰胺的缺少和氨的积累。引起氨积累的毒素的最小剂量为 85ng/cm<sup>2</sup> 叶片,这也是引起褪绿的最小量,大于 1.35  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> 叶片烟毒素剂量引起叶片坏死。Turner 还发现组织褪绿的出现并不早于 GS 活性的诱导和氨的积累。当把叶片放在能减弱光合作用的含 1% CO<sub>2</sub> 的空气中时,能抑制毒素引起的症状的扩展和氨的积累。这表明褪绿症状并不是由于抑制了氮代谢而是由于中断光合作用氮循环的结果。有人用足以抑制谷氨酰胺合成和光合作用浓度的烟草野火病菌毒素处理烟草和天冬草(*Asparagus sprengeri*)的离体细胞,发现 1,5-二磷酸羧化酶活性无变化。光合作用的减弱与胞间氨的增加相联系,而氨的增加与谷氨酰胺合成酶的抑制同时发生,说明谷氨酰胺合成酶受抑制的用野火毒素处理后所发生的生理生化变化。

T $\beta$ L 对 GS 的抑制受到许多因素的影响。①与底物水平有关。Michaelis 试验证实 Mg-ATP、铵是 T $\beta$ L 抑制 GS 所必需的。谷氨酸和低量的氨( $\angle$ 2mmol)能减缓抑制的速率,但高水平的氨(5, 20, 50mmol)却加速抑制<sup>[13]</sup>。②与 pH 有关, pH 从 6.5 增到 7.5 时,抑制作用更加迅速<sup>[13]</sup>。③与 GS 的腺苷酰化作用有关。GS 腺苷酰化作用需要起始,并且在 Zn<sup>2+</sup> 激活条件下烟毒素释放丝氨酸是腺苷酰化作用起始的一个因子。在腺苷酰化酶影响因子 Amp, Ala, Gly, His, Ser 存在时,腺苷酰化的 GS 可保护其不受 T $\beta$ L 的抑制。因而在细胞体内烟毒素合成起始后的 GS 腺苷酰化和腺苷酰化酶影响因

子的存在,会影响 T $\beta$ L 对 GS 的作用,这可能是野火病菌暂时自我保护的机制之一<sup>[9, 14]</sup>。

另据报道,野火病菌毒素还抑制烟草的 1,5-二磷酸核酮糖脱羧酶,干扰 RNA 代谢和/或某些代谢物通过膜等。可见,毒素对寄主的作用方式是多种多样的,但有实验证实,它只是一种毒性因子,绝不是致病所必需的。

人们在研究毒素致病机理的同时,也在积极探索其利用的途径。已先后成功地利用烟草野火病菌毒素或其结构类似物作选择剂筛选出抗病植株;运用基因操作技术将从该病菌中克隆到的抗烟毒素基因导入烟草获得了耐野火病菌转基因植株<sup>[15]</sup>。可以想象,随着毒素化学和分子生物学的研究深入,毒素的应用前景将会更加广阔。

## 参 考 文 献

- [1] 赵卫东, 刘进元. 生物工程进展, 1997, 17(2): 44~47.
- [2] Steward W W. Nature, 1971, 229: 174~178.
- [3] Taylor P D, Schnoes H K, Durbin R D. Biochim Biophys Acta, 1972, 286: 107.
- [4] Unkefer C J, London R E, Dubin R D *et al.* J Biol Chem, 1987, 262: 4944~4999.
- [5] Roth P, Hadener A, Tamm C. Helv Chem Acta, 1990, 73: 476~482.
- [6] Engst K, Shaw P D. Mol Plant Microbe Interact, 1992, 5: 322~329.
- [7] Liu L X, Shaw P D. J Bacteriol, 1997, 179(2): 507~513.
- [8] Liu L X, Shaw P D. J Bacteriol, 1997, 179(18): 5922~5927.
- [9] Kinscherf T G, Coleman R H, Barte T M *et al.* J Bacteriol, 1991, 173: 4124~4132.
- [10] Barta T M, Kinscherf T G, Willis D K. J Bacteriol, 1992, 174: 3021~3029.
- [11] Durbin R D, Uchytíl T F. Physiol Plant Pathol, 1984, 24: 25~31.
- [12] Levi C, Durbin R D. Physiol Mol Plant Pathol, 1986, 28: 345~352.
- [13] Langston-unkefer P J, Macy P A, Durbin R D. Plant Physiol, 1984, 76: 71~74.
- [14] Knight T J, Durbin R D, Langston-unkefer P J. J Bacteriol, 1986, 166: 224~229.
- [15] Ye Zhaohui, Yu Lihua, Zhao Nanming *et al.* Tsinghua Science and Technology, 1997, 2(1): 460~462.