

植物病原菌产生的降解酶及其作用*

赵 蕾 张天宇**

(山东农业大学植保学院 泰安 271018)

摘 要: 综述了植物病原微生物产生的降解酶的种类、作用方式、在致病中的地位及研究进展, 阐明了细胞壁降解酶的双重作用: 即作为病原物侵染的致病因子及作为植物防卫反应的激发子, 为寄主-病原物分子互作提供一定的参考。

关键词: 植物病原菌, 细胞壁降解酶, 侵染, 激发子

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 01-0089-05

任何病原菌要想侵入植物表面必须克服植物细胞壁的障碍。植物细胞壁主要成分是多糖类物质, 其表面主要是由表皮细胞壁的纤维素或纤维素如角质层所组成, 角质层主要由角质构成, 或多或少地被蜡质层覆盖, 蛋白质和木质素也可在表皮细胞壁中出现。微生物对植物细胞壁的最明显的作用之一是酶的降解, 病原物侵入植物薄壁组织是由于纤维素、果胶质和半纤维素等构成的细胞壁的破坏以及主要由果胶物质构成的中胶层的破坏所致。每一种物质的破坏都是由病原物分泌的一组或多组酶类的作用造成的。

本文仅对植物病原菌产生的细胞壁降解酶及其在植物病害中的作用做一综述。其目的是阐述细胞壁降解酶在侵入中的重要作用以及对植物防卫反应的激发作用, 从而对病原菌细胞壁降解酶的双重作用有一个比较明确的认识。

1 作为病原物侵染的致病因子

众所周知, 降解酶是病原物产生的对寄主的细胞壁组分有降解作用的酶类, 它能使真菌穿入并侵染寄主植物组织, 也可能在真菌生活史中的某一阶段起到营养作用, 这类在病原物的营养摄取和消解植物抗侵染机械屏障中起作用的病原物产生的降解酶种类很多, 除少数外均能分泌到体外, 根据酶作用于植物的部位, 分为角质层降解酶和细胞壁降解酶等, 但通常根据酶作用的底物, 分为角质酶 (cutinase)、果胶酶 (pectinase)、纤维素酶 (cellulase)、半纤维素酶 (hemicellulase)、蛋白酶 (protease) 和其它酶类^[1]。胞外细胞壁降解酶在致病和腐生微生物中广泛存在, 包括真菌、细菌和线虫。已报道的植物病原物产生的细胞壁降解酶见表 1^[2]。许多微生物细胞壁降解酶是胞外酶, 即分泌型的, 能降解胞外酶的可溶性产物的 β -木糖苷酶和 β -葡萄糖苷酶既可以是胞外的也可以是胞内的, 微生物细胞壁降解酶经常受到代谢物阻遏作用和底物诱导作用的调节。

在植物病理学中, 细胞壁降解酶被认为是“基本的亲和因子”, 这意味着它们是病原物穿入或在植物中扩展或从细胞壁聚合物中获取营养所必需的。研究细胞壁降解酶作为致病因子遇到的一个问题是如何确定哪一种酶是最重要的, 值得注意的是, 降解能

* 山东省自然科学基金资助项目 (No. Z 99D02)

** 通讯作者

收稿日期: 2000-11-20, 修回日期: 2001-02-25

表 1 植物病原物产生的细胞壁降解酶

酶的名称	种类
纤维素酶	内- β -1, 4-葡聚糖酶 (羧甲基纤维素酶)
	葡聚糖纤维二糖水解酶
	β -葡萄糖苷酶
果胶酶	内切果胶裂解酶
	外切果胶裂解酶 (外切多聚半乳糖醛酸裂解酶)
	内切多聚半乳糖醛酸酶
	外切多聚半乳糖醛酸酶
	果胶甲基酯酶
半纤维素酶	β -1, 4-木聚糖酶
	β -木糖苷酶
	α -阿拉伯呋喃糖酶
	阿拉伯聚糖酶
	α -葡萄糖苷酶
	β -1, 3-葡聚糖酶 (昆布多糖酶)
	β -1, 3- β -1, 4-葡聚糖酶 (混合键的葡聚糖酶)
	α -半乳糖苷酶
	β -半乳糖苷酶
	β -1, 4-半乳糖苷酶
蛋白酶	类胰蛋白酶
	天冬氨酸蛋白酶
	半胱氨酸蛋白酶
	丝氨酸蛋白酶
	金属蛋白酶
磷脂酶	

力细胞壁多聚物在先天的抗方面有很大的不同。例如,与果胶和木聚糖相比,纤维素和木质素降解的速度要慢一些。另外,不同降解酶的重要性可能相同,只是在侵染的不同阶段表现不同。一些酶能够模仿病害的症状特点,形成了这一研究领域的巨大推动力。有时,某些酶的出现和特性与病害症状、组织敏感性和相对致病性之间有很好的相关性,这些研究有利于利用 DNA 介导的转化系统来构建一种或多种细胞壁降解酶的特异性突变体,一旦一种结构基因编码的酶被克隆,那么就很容易测定突变体致病性的变化。目前已对一些细胞壁降解酶开展了这一工作,特别是细菌的果胶酶^[2]。

1.1 果胶酶 果胶物质是构成中胶层的主要成分,是由半乳糖醛酸分子链组成的多糖,根据果胶酶对果胶分子中半乳糖醛酸的作用部位,分为两类:(1)果胶甲基酯酶,(2)果胶水解酶和果胶裂解酶。

果胶甲基酯酶(简称 PME)的作用是从果胶质中除去甲基基团以产生果胶酸,可以分解果胶链上的小分枝,对果胶链的

长度无影响。果胶水解酶是通过加入一个水分子使 α -1, 4 糖苷键断裂,释放出单体的半乳糖醛酸,果胶甲基半乳糖醛酸酶 (PMG) 和多聚半乳糖醛酸酶 (PG) 是两种分别以果胶质和果胶酸为基质的水解酶。果胶裂解酶 (简称 PL) 又叫转移消除酶,是通过除去一个水分子使 α -1, 4 糖苷键断裂,释放出含不饱和双键的产物。果胶质甲基转移消除酶 (简称 PMTE) 和多聚半乳糖醛酸转移消除酶 (简称 PGTE) 是分别以果胶质和果胶酸为基质的两种裂解酶。水解酶的作用不需要 Ca^{2+} , 最适 pH 为 4~6.5; 裂解酶的作用需要 Ca^{2+} , 最适 pH 为 8^[1]。

与其他细胞壁降解酶相比,许多病原物的果胶酶得到了较为深入的研究,最初对果胶酶的理解是能够引起植物组织的离析作用,例如软腐病的症状特点,近年来又证实了果胶酶和果胶碎片能够诱导植物的许多生理反应。对果胶酶研究得最为深入的是细菌菊欧文氏杆菌 (*Erwinia chrysanthemi*), 结论是有些果胶酶,包括 PME,至少在某些情况下是细菌引起病害的重要致病因子。

以紫外线或化学诱变剂得到的果胶酶缺陷突变体的几项研究得到的相同结论是,果胶酶对丝状真菌的致病性作用很小 (*Fusarium*, *Verticillium*) 或全无 (*Sclerotinia*, *Alternaria*), 虽然不排除这些在遗传上尚未鉴定的突变体携带有另外的变异能以某种方式补偿果胶酶的丧失,或具有在植物中诱导表达的另外的果胶酶的基因,但研究结果

一致认为果胶酶在真菌致病中并非十分重要。

1.2 角质酶 角质是角质层的主要成分,角质层的上部混有蜡质,而下部在连接表皮细胞外壁的区域中则角质与果胶和纤维素相混,角质是由直链的 C_{16} 和 C_{18} 羟基脂肪酸衍生出来的一种难溶性多脂。在病原菌侵入植物的过程中,植物体表的角质层是病原真菌必须突破的第一层障碍。

许多真菌和少数细菌产生角质酶,角质酶是一种酯酶,它能破坏分子之间的脂键,释放出单体以及来自不溶性角质多聚体的小分子寡聚体。真菌似乎能不断产生低水平的角质酶,它与角质接触后释放出的单体随后进入的病原物细胞内,引发角质酶基因的进一步表达,促使病原物产生成千倍的角质酶。但葡萄糖的存在会抑制角质酶基因的表达,从而大幅度地减少了角质酶的产生^[3]。

对丝状真菌的角质酶研究得最为透彻,尤其是豌豆病原真菌 *Fusarium solani* f. sp. *pisi*, 植物病原真菌产生的角质酶在芽管的穿透点上和形成附着胞真菌的侵染钉上浓度最高,用特异性的化学抑制或酶的抗体作为角质酶的抑制剂应用于植物表面可以保护免受真菌病原物的侵染。角质酶的缺陷突变体致病性减弱,而当角质酶喷到植物表面时,该突变体又具有了致病性,研究证明,此菌对豌豆的致病性与角质酶表达量成正比相关。而且,如果将另一种真菌的角质酶基因转到只从伤口侵入而不产生角质酶的真菌中,则使这些真菌产生角质酶从而能够直接侵染植物。角质酶还能提高孢子对叶的附着能力,在单胞诱菌 *Uromyces viciae-fabae* 对大豆叶的附着中,活性角质酶的出现使附着力提高了 2 倍(附着孢子数量从 30% 提高到 60%)^[4]。

1.3 纤维素酶 纤维素也是一种多糖,但它是由葡萄糖分子链构成。葡萄糖链相互间以氢键相连,作为细胞壁的骨架物质以微纤丝的形态存在于所有高等植物中。纤维素酶降解的最终产物是葡萄糖分子,至少有 3 种酶参与纤维素的降解。在纤维素降解中首先由内-1, 2- β -D 葡萄糖酶(ED)使完整葡聚糖链中的糖苷键随机裂解,暴露出非还原性末端,再由 1, 4- β -D 葡聚糖纤维二糖水解酶(CBH)水解产生纤维二糖,最后 β -葡萄糖苷酶(β -G)使纤维二糖水解成葡萄糖^[1]。由于天然纤维素结晶状的特性,其降解速度很慢。

植物病理学家们通常认为纤维素酶在致病过程中并不特别重要,因为大面积的纤维素降解传统上只发生在侵染的后期。然而当致病细菌 *Pseudomonas solanacearum* 和 *Xanthomonas campestris* pv *campestris* 的主要的内切葡聚糖酶基因被破坏以后,其致病力则下降^[5]。

1.4 半纤维素酶 半纤维素是多糖聚合体的复杂混合物,其组成和含量随植物组织、植物种类及植物的发展阶段不同而变化。在半纤维素的聚合体中,不仅包含有木素葡萄糖苷,而且还有葡聚甘露糖、阿拉伯半乳糖等。半纤维素将果胶多糖的末端和纤维素纤丝的不同末端连接起来。

半纤维素的酶解要求许多酶参与,植物病原真菌可以产生几种半纤维素酶,根据它们作用于聚合体中所释放出的单体类型,分别被称为木聚糖酶、半乳聚糖酶、葡聚糖酶、阿拉伯聚糖酶、甘露聚糖酶等。

Cooper^[6]等提出应注意病原真菌在单子叶植物和双子叶植物上分泌的细胞壁降解酶的类型与寄主细胞壁多聚物成分之间的关系,在双子叶植物细胞壁结构中起关键作用

的是被归入果胶质范畴的鼠李半乳糖醛酸聚糖,而在杂草和禾本科作物初生壁中占优势的基质多聚物(大约 40%)是阿拉伯木聚糖,而且,单子叶植物细胞壁果胶多糖含量不足双子叶植物初生壁中含量的 10%,有人估计燕麦胚芽鞘中半乳糖醛酸仅占细胞壁的 3%,研究证明,从单子叶植物和双子叶植物上分离的同样的病原菌产生的细胞壁降解酶的类型和数量很不相同,禾本科单子叶植物的病原真菌更倾向于分泌阿拉伯木聚糖酶和葡聚糖酶而不是果胶酶。

1.5 蛋白酶 假如植物病原菌产生的细胞壁降解酶是与寄主植物细胞壁相适应的话,那么经常被忽略的一组酶是蛋白酶。在某些植物中,蛋白质含量能占到整个细胞壁的 15%,并同时起到结构和酶促的作用^[7]。

双子叶植物细胞壁中已鉴定的结构蛋白有 5 组,其中伸展蛋白是富含羟脯氨酸的一种糖蛋白(HRGP),只占健康组织细胞壁质量的 0.5%,但在受真菌侵染的细胞壁中则提高到 5%~15%。富含脯氨酸的蛋白质(PRP)、富含甘氨酸的蛋白质(GRP)、含茄碱的外源凝集素及阿拉伯半乳聚糖蛋白质(AGPs)是另外几种结构蛋白或存在于细胞壁中的糖蛋白,其作用还不十分明确,有人认为它们可以对真菌释放的激发分子作出反应,从而在植物防卫反应中起作用。在有些禾本科的单子叶植物中,还发现蛋白质以其他方式存在,如富含苏氨酸羟脯氨酸的糖蛋白(THRGP)和富含组氨酸的糖蛋白(HHRGP)^[8]。由于蛋白质可作为细胞膜成分和植物细胞结构成分,因此寄主蛋白质被病原物分泌的蛋白酶降解可严重影响到寄主细胞的结构和功能。

许多植物病原真菌、细菌产生蛋白酶,包括活体营养菌 *Uromyces viciae-fabae* 和 *Ustilago maydis* 和死体营养菌,如 *Botrytis cinerea*。蛋白酶与致病性之间关系的研究也有一些矛盾的结果,正相关的例子是 *Magnaporthe poae* 侵染肯塔基的早熟禾, *Xanthomonas campestris* 侵染萝卜叶, *Pyrenopeziza brassicae* 侵染甘蓝;相反, *Erwinia chrysanthemi*, *Cochliobolus heterostrophus*, *C. Carbonum* 和 *Cladosporium cucumerinum* 的蛋白酶突变体对其致病性没有影响。最近,有研究表明引起小麦颖枯病的颖壳壳针孢 *Septoria nodorum* 在侵染过程中产生的碱性类胰蛋白酶 SNPI 参与了寄主细胞壁的降解^[8]。

2 作为植物抗病反应的诱导因子

许多以细胞壁降解酶致病的病原菌都能引起寄主植物细胞壁透性的变化,为其在植物组织中定殖创造了条件,但植物病原菌侵染产生的细胞壁降解酶还可诱发植物的防卫反应。

2.1 细胞壁降解酶作为激发子 激发子是病原物产生的能激发寄主植物对其侵染产生抗性的物质。细胞壁降解酶及其产物具有种种其它生物和非生物化合物的激发特性,包括蛋白质、次生代谢物和类脂。用某些酶(包括 PG、PL 和木聚糖酶)处理植物组织和细胞,能引起植物的防卫反应,包括与抗病性有关的蛋白质、乙烯、蛋白酶抑制剂、木质素、活性氧和植保素的合成,蛋白质合成的抑制,促进细胞膜 K^+/H^+ 交换和局部坏死。因此,微生物细胞壁降解酶对植物来说作为警告信号与对于病原物来说作为致病因子同样重要。

在许多情况下,植物似乎并不能直接识别细胞壁降解酶,而是对酶的产物作出反应。微生物酶对大量惰性的多糖作用而产生的寡糖则是一例。其中寡聚半乳糖醛酸作

为激发子研究得较多。寡聚半乳糖醛酸诱导植保素和活性氧的产生,影响烟草外植体的形态建成,并诱导番茄蛋白酶抑制剂的局部合成(而非系统性)。而且,许多研究表明,寡聚半乳糖醛酸的聚合度在 10~15 之间时活性最高。植物同样对其它胞壁降解酶和寡糖有反应。真菌木聚糖酶是小分子蛋白质,可以在木质部传输,作为激发子的木聚糖酶的活性可能会由于变性作用而丧失,但不同的是木聚糖酶是直接作用而不是通过其产物^[9]。

2.2 细胞壁降解酶的植物抑制因子 病原物在体外合成和分泌的酶并不意味着致病过程中也产生,植物本身的诸多因子,如抑制剂、糖、pH、诱导物等均会对酶的表达进行调节。其中酶的内源抑制剂的存在与植物的防卫机制有关。许多植物(包括单子叶植物)产生蛋白酶抑制剂,这些蛋白酶抑制剂对病原真菌影响的例子^[10],说明它们是植物克服病原菌蛋白酶以保护植物自身的一种需要。而且,在 *Septoria nodorum* 与大麦之间不亲和相互作用时蛋白酶抑制剂的诱导更加证实了这一假设^[11]。在许多植物中发现的 PGIPs(抑制多聚半乳糖醛酸酶 PG 的蛋白质)即是一例。在缺少 PGIP 的情况下,PG 能很快将果胶降解为半乳糖醛酸的单体和寡聚物。由于这些单体和寡聚物太小,因而不能作为激发子。然而,在有 PGIP 存在的情况下,抑制了 PG 的活性,从而使 PG 的作用延迟,水解产物的长度得以提高,这些较长的水解产物(10~15 单体组成的寡聚体)能诱导寄主的防卫反应,并通过减缓菌物病原的生长速度,使寄主其它的防卫系统得以有效表达,且比没有 PGIP 存在持续的时间长。

在细胞壁降解酶植物抑制物的作用研究中,值得注意的是表 1 所列的所有的酶植物本身也产生,有些酶如 PG 和纤维素酶还与某些特殊发育过程有关,如果实的成熟和脱落。因而在研究病原菌在植物中产生的细胞壁降解酶的同时,要考虑到植物本身酶的存在。

3 结束语

自然选择可能有利于植物对主要致病小种产生防卫反应的进化。如果一种病原物产生能够被植物识别的酶但并不是病原物所必需的,它就能通过逐渐进化到不生产这种酶的方式避免引发植物的防卫反应,植物能够对微生物细胞壁降解酶产生防卫反应这一事实间接说明了细胞壁降解酶是植物病原物重要的致病因子。

对植物病原物细胞壁降解酶的研究应考虑到两个方面的因素,一是注意寄主植物细胞壁本身的结构对病原物产生的细胞壁降解酶的影响,二是了解病原物产生的细胞壁降解酶在致病与引发植物产生防卫反应中的作用,为寄主——病原物分子互作提供依据。

参考文献

- [1] 王金生. 分子植物病理学. 北京: 中国农业出版社, 1998, 33~36.
- [2] Walton J D. Plant Physiol, 1994, 104: 1113~1118.
- [3] Kolattukudy P E. Annu Rev Phytopathol, 1985, 23: 233~250.
- [4] Deising H, Nicholson R L, Haug M, et al. Plant Cell, 1992, 4: 1101~1111.
- [5] Gough C L, Dow J M, Barber C E, et al. Mol Plant Microbe Interact, 1988, 1: 275~281.
- [6] Cooper R. M, Longman D, Campbell A, et al. Physiol Mol Plant Pathol, 1988, 32: 33~47.
- [7] Showalter A M. Plant Cell, 1993, 5: 9~23.
- [8] Carlile A J. Mol Plant Microbe Interact, 2000, 13: 538~550.
- [9] Sharon A, Fuchs Y, Anderson J D. Plant Physiol, 1993, 102: 1325~1329.
- [10] Lorito M, Broadway R M, Hayes C K, et al. Mol Plant Microbe Interact, 1994, 7: 525~527.
- [11] Stevens C, Titarenko E, Hargreaves J A, et al. Plant Mol Biol, 1996, 31: 741~749.