

稻瘟病菌效应蛋白的分泌特征及其在水稻细胞中的转运

吴旻¹ 陈锋² 林福呈¹ 刘小红^{1*}

(¹水稻生物学国家重点实验室, 浙江大学生物技术研究所, 杭州 310058; ²台州海关, 台州 318000)

摘要 许多病原菌能够通过分泌不同的效应蛋白以调控植物的防御以及胞内进程, 从而助其有效入侵植物组织。稻瘟病菌的效应蛋白根据其不同的定位特点, 被分为细胞质效应蛋白与质外体效应蛋白两类。在侵染过程中, 细胞内的侵染菌丝被源于宿主植物的交界面菌丝膜(extrainvasive hyphal membrane, EIHM)包围, 由EIHM与侵染菌丝细胞壁形成的质外体隔间是效应蛋白分泌的“必经通道”。此外, 在稻瘟病菌侵染过程中会形成一个高度局部化的结构——活体营养表面复合体(biotrophic interfacial complex, BIC), 它能够聚集由侵染菌丝分泌的细胞质效应蛋白。该文综述了稻瘟病菌效应蛋白的功能及其迁移过程, 介绍了BIC的两个重要的形成阶段, 阐明了不同效应蛋白的定位特点以及胞间转运的动态过程, 揭示了效应蛋白分泌、转运至水稻细胞质以及在水稻细胞之间移动的分子机制。

关键词 稻瘟病菌; 效应子; 交界面菌丝膜; 活体营养表面复合体

Secretory Characteristics of the *Pyricularia oryzae* Effectors and Their Intercellular Translocation in Rice Cells

Wu Min¹, Chen Feng², Lin Fucheng¹, Liu Xiaohong^{1*}

(¹State Key Laboratory for Rice Biology, Biotechnology Institute, Zhejiang University, Hangzhou, 310058 China;

²Taizhou Customs, Taizhou 318000, China)

Abstract In order to invade the plant effectively, many plant pathogens deliver various effector proteins into host cells to regulate plant defenses and intracellular processes. The effectors of the rice blast fungus are divided into two species according to the different localization features, cytoplasmic effectors and apoplastic effectors. In the infection process, the invasive hyphae (IH) are surrounded by a plant-derived extrainvasive hyphal membrane (EIHM). The apoplastic compartment formed by EIHM and hyphal cell wall become to the necessary channel for effector to deliver. In addition, a highly localized structure, biotrophic interfacial complex (BIC) is formed in the infection process. The cytoplasmic effectors delivered by IH could be accumulated in BIC. In this review, the functions of effectors and their translocation in *Pyricularia oryzae* were illustrated. We introduced two important stages of the formation of BIC and illustrated the location characteristics and dynamic process of different effectors translocation. These reveal the molecular mechanisms of effectors secretion into BIC, translocation into rice cells, and cell-to-cell movement in rice.

Keywords *Pyricularia oryzae*; effector; extrainvasive hyphal membrane; biotrophic interfacial complex

收稿日期: 2018-03-13 接受日期: 2018-04-18

国家农业部项目(批准号: 2016ZX08009003-001)和国家自然科学基金(批准号: 31770154)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0571-88982183, E-mail: xhliu@zju.edu.cn

Received: March 13, 2018 Accepted: April 18, 2018

This work was supported by the Ministry of Agriculture of China (Grant No.2016ZX08009003-001) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31770154)

*Corresponding author. Tel: +86-571-88982183, E-mail: xhliu@zju.edu.cn

网络出版时间: 2019-02-21 15:04:22 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190221.1504.028.html>

水稻是世界上重要的粮食作物之一,由子囊类真菌稻瘟病菌(*Pyricularia oryzae*)引起的稻瘟病(Rice blast)是一种影响水稻生产的全球性病害,每年引起水稻减产为10%~30%,对世界粮食安全造成了严重的威胁。目前,稻瘟病菌已成为一种研究病原菌与植物之间互作的模式生物。

病原菌的入侵会在第一时间被植物自身的先天免疫系统所识别,根据识别病原菌分子模式的不同,植物先天免疫被分为PTI(PAMP-triggered immunity)反应和ETI(effect-triggered immunity)反应^[1](图1)。PTI是寄主植物免疫的第一道防线,当病原菌侵染寄主植物时,病菌表面保守的相关分子模式(PAMPs)被寄主的受体识别,导致病原菌不能成功侵染寄主。PAMPs常常在细胞的质外体中被检测到,目前先后鉴定到的植物PAMPs有细菌鞭毛蛋白(flagellin, flg22)、肽聚糖(peptidoglycan, PGN)、脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)、真菌细胞壁多糖(polysaccharide)、几丁质(chitin)、葡聚糖(glucan)等。随着病原菌和寄主植物的不断斗争和演化,病原菌逐渐获得了通过分泌效应蛋白来打破寄主植物的第一道防线的能力,即为ETS(effect-triggered susceptibility)。效应蛋白是植物病原菌与寄主植物互作过程中产生的致病相关基因的产物,有些效应蛋白在不被植物识别的情况下被呈递到宿主细胞质以促进

易感、亲和的互作,从而表现出毒性作用。为此,寄主植物免疫进化出了第二道防线——ETI(effect-triggered immunity),通过形成识别效应蛋白的抗性受体而产生的免疫防卫反应。部分效应蛋白编码基因在被植物抗性基因(resistance genes)识别的情况下可激活免疫反应,又被称为无毒基因(AVR)。目前在稻瘟病菌中已有超过80种的稻瘟病R基因被鉴定有该功能,以保持对稻瘟病有持久的防御,许多AVR效应蛋白的基因仍在鉴定当中。

目前,病原真菌效应蛋白的研究也取得了一定的进展,许多包括锈菌在内的病原真菌效应蛋白已经被克隆,但效应蛋白在真核病原菌的研究仍比原核病原菌的要少。目前普遍认为的观点是,病原真菌与细菌一样,通过分泌大量效应蛋白来改变寄主内部免疫机制以达到成功侵染寄主植物的目的。阐明效应蛋白的分泌特征对了解病原菌在寄主植物的定殖特征与互作机理至关重要。本文以稻瘟病菌为模式,综述了稻瘟病菌效应蛋白的分泌系统,阐明稻瘟病菌效应蛋白分泌至BIC、转运至水稻细胞质以及在水稻细胞之间移动的分子机制,揭示效应蛋白的分泌与转运机制。

1 丝状真菌效应蛋白的功能

效应蛋白在病原菌与植物互作系统中扮演着

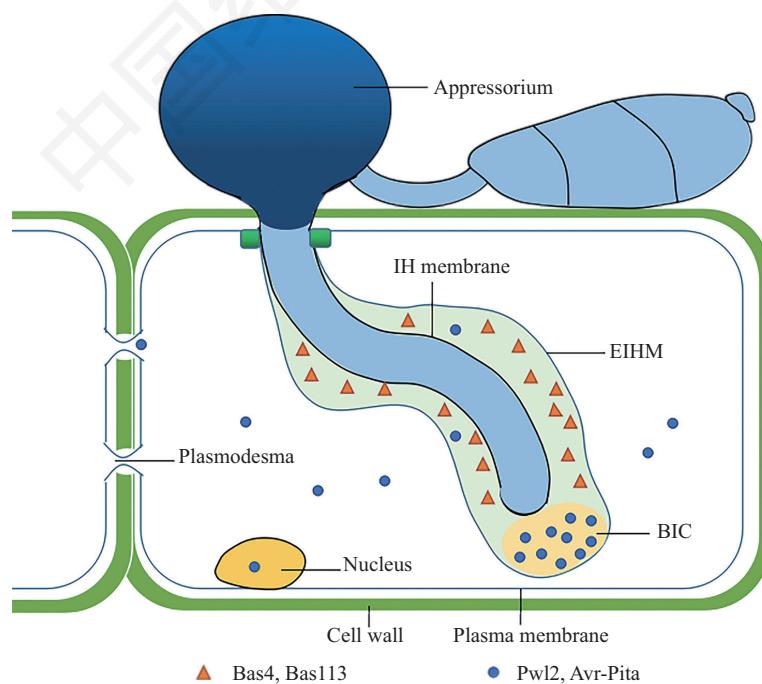


图1 稻瘟病菌侵染菌丝在水稻细胞中分泌效应蛋白图示

Fig.1 The diagrammatic sketch of effectors secreted from invasive hyphae of *P. oryzae* in rice cells

十分重要的角色。一方面, 效应蛋白是植物病原菌成功侵染寄主的关键武器, 大多效应蛋白具有对抗植物PTI的功能; 另一方面, 效应蛋白也是植物免疫系统识别病原菌入侵的靶标。近年来, 对植物病原菌分子植物育种、效应蛋白功能及其作用机制的研究, 极大地促进了人们对植物抗病分子机制的了解。越来越多的证据表明, 侵染菌丝分泌的效应蛋白在稻瘟病菌中成功地进行活体营养侵染或被植物识别等早期阶段有着重要的作用。专性寄生的锈菌利用一种特化的侵染结构——吸器穿透进入植物细胞, 吸器被包埋于变形的植物细胞膜——外吸器膜内, 通过分泌效应蛋白进入寄主细胞引发其生物学功能的改变^[2]。大麦白粉病菌基因AVRa10和AVRk1是两个无毒基因, 是丝状病原真菌分泌的效应蛋白中缺乏分泌信号肽典型基因, 可能需要交替的分泌途径才得以分泌^[3]。实验证明, 当稻瘟病菌缺失了能编码内质网伴侣蛋白分泌的管导热休克蛋白(lumenal heat shock protein)的基因时, 活体营养侵染以及R基因介导的过敏反应会被严重破坏^[4]。此外, 真菌在活体营养侵染时起上游调控的基因被强化, 被用来编码活体营养相关的分泌蛋白(biotrophic-associated secreted protein, Bas), 其中, Bas1在稻瘟病菌中的过表达可以促进真菌的生长、产孢以及致病作用^[5]。

稻瘟病菌侵染水稻是一个复杂的过程, 包括孢子萌发、附着胞形成、侵染栓入侵以及侵染菌丝的扩展等, 稻瘟病菌在侵染过程中通过一定数量、功能多样的效应蛋白, 干扰宿主植物的防御反应。例如调节植物免疫相关基因的转录、抑制植物抗病基因介导的防卫反应、阻断激活植物识别受体的相关信号通路等, 从而保障其顺利侵染植物。效应蛋白AvrPiz-t通过调节宿主钾离子通道, 即与水稻质膜定位的钾离子通道蛋白OsAKT1互作, 同时特异地抑制OsAKT1介导的钾离子外流, 以抑制植物的先天免疫^[6]。效应蛋白作为在稻瘟病菌胞内合成并进一步分泌到胞外发挥功能的蛋白, 是稻瘟病菌与水稻胞间物质、能量交换的最主要的物质之一。

2 交界面菌丝膜的功能

稻瘟病菌半活体营养的主要特征为, 细胞内的侵染菌丝被源于植物的交界面菌丝膜(extrainvasive hyphal membrane, EIHM)包围, 并在水稻细胞内出现

连续的活体营养的菌丝, 因此EIHM是与稻瘟病菌效应蛋白分泌相关的重要结构。在侵染初期, 真菌最初是呈现细丝状菌丝, 如出现在首次被侵染的细胞中的初级菌丝, 以及在随后入侵的细胞中的丝状侵染菌丝。在亲和互作中, 丝状菌丝逐渐转化为球状侵染菌丝, 而此时, 被侵染的植物细胞仍然保持完整的细胞质膜和良好的质壁分离能力。在质壁分离中, 宿主细胞质膜没有与侵染菌丝分离, 侵染菌丝始终被缩小的植物原生质体包围。关注稻瘟病菌侵染菌丝与宿主细胞质的交界面特性对于了解稻瘟病效应蛋白进入宿主细胞质是极其关键的。近年来, 有两种系列的证据支持侵染菌丝是被明显的质外体隔间密封, 与共质体和大多质外体分离^[7], 这个由EIHM与侵染菌丝膜形成的质外体隔间是效应蛋白分泌后的“必经通道”。其中一个证据为胞吞追踪染色, FM4-64一般是在装载染料的早期阶段作为内吞标记, FM4-64能够着色EIHM和其他植物生物膜, 但在完全亲和侵染位点的侵染菌丝膜除外。这可能由于EIHM形成了一个密封的隔间, 阻止了染料到达侵染菌丝膜上。此外, 利用荧光标记Bas4(一种被猜测为EIHM基质蛋白), 在荧光共聚焦显微镜观察下精确地包在侵染菌丝外围, 没有发现其扩散到细胞质内。在许多侵染位点中, 通常被描述成不均匀的Bas4包围在侵染菌丝外围(图1)。通过对交界面进一步的结构观察, 在侵染菌丝的颈端发现了一种未知的类似“项圈”的结构, 它能够密封宿主与病原菌的细胞膜, 在电子显微镜下呈现出稠密环的形态。

3 活体营养表面复合体的功能

活细胞荧光标记成像是了解植物与活体营养病原菌分泌器官间“战役”的有效手段。通过观察侵染菌丝在水稻细胞中的生长以及被荧光蛋白标记的Avr效应蛋白的定位, 能进一步了解效应蛋白分泌及其在稻瘟病菌中的转运。在亲和互作中, 效应蛋白会分泌并聚集在一个特殊的结构上——活体营养表面复合体(biotrophic interfacial complex, BIC)^[8]。BIC能够在植物亲和反应与过敏防御反应间的重要阶段聚集效应蛋白。BIC的生长能够将丝状侵染菌丝耦合成球状侵染菌丝, 这个过程会直接影响病害的发展。Pwl2和Bas1等细胞质效应蛋白常聚集在BIC上, 或被转运到细胞质中, 通过胞间连丝从侵染的细胞质转移到毗邻的未侵染水稻细胞质^[9](图1)。

这一研究揭示了稻瘟病活体营养侵染的重要细节，并为效应蛋白分泌、转运、胞间移动机制提供了有力支持。

3.1 BIC形成的两个阶段

通过效应子融合蛋白可以了解效应蛋白的分泌与转运，即加强型绿色荧光蛋白(EGFP)或单分子红色荧光蛋白(mRFP)结合在稻瘟病菌效应蛋白的C-端，例如，Avr-Pita 1、Pwl1和Pwl2等^[10]。荧光标记的Avr-Pita 1和Pwl效应蛋白被观察到分泌和集聚在一个特殊的结构，即BIC。每个效应蛋白信号肽序列和Avr-Pita前序列也被发现在BIC中居中聚集。信号肽序列与效应蛋白的分泌以及定位到细胞的特定区间有关，目前大多效应蛋白的氨基端具有信号肽的分泌蛋白，通过真核细胞II型分泌系统转运至病菌胞外。若将Avr-Pita 1、Pwl1和Pwl2中的信号肽去掉，它们的启动子则在侵染菌丝细胞质中产生均匀的绿色荧光。

BIC形成的第一阶段，在早期细胞侵染中，效应蛋白在初级菌丝的生长时聚集在BIC顶端，从而分泌到侵染的宿主细胞。在附着胞侵入后，丝状初级菌丝分泌效应蛋白到膜的顶端。BIC的第二阶段为：当初级菌丝转化成球状菌丝，荧光能在邻近初次形成的侵染菌丝细胞的小体中被观察到。当菌丝转变成假菌丝，菌丝顶端的BIC会被留在一侧，成为首个侵染菌丝细胞的特殊结构^[11]。

Pwl2能够在菌丝转化之后持续在BIC中积累，随后形成的侵染菌丝细胞中分泌Bas4，但这半胱氨酸富集的蛋白并不能被转运到宿主细胞质中。因此，在无BIC的侵染菌丝中，Bas4的分泌依然与之前一致，但Pwl2则大多在BIC中聚集，少数在这些菌丝细胞中出现。效应蛋白在BIC的聚集形成了亲和性活体营养互作的特征，因为在Avr-Pita1介导的非亲和性互作或在体外形成的类侵染菌丝中并没有发现效应蛋白聚集的BIC结构。

当真菌持续在水稻细胞中生长时，首个侵染的水稻细胞中的初级荧光BIC将固定位于首个转化形成的侵染菌丝细胞的一侧，直至IH充满整个细胞。尽管不利用荧光标记，初级的BIC可以由于其在首个侵染细胞中的特殊尺寸(直径>1微米)和特殊位置(典型的初级菌丝到的弯曲处，初级侵染细胞的边上)被识别，且临近BIC的侵染菌丝细胞常包含大液泡。

在侵染菌丝完全充满首个侵染的表皮细胞时，侵染菌丝在极度拥挤下穿越植物细胞壁，在新的植物细胞中形成丝状侵染菌丝，就像在首个细胞中的初级菌丝一样。利用荧光标记效应蛋白发现，当侵染菌丝移至相邻细胞中时，荧光BIC逐渐在首个侵染细胞中消失。在新的侵染细胞中，荧光标记的效应蛋白能在侵染菌丝顶端的膜盖上被检测到，荧光的膜盖在临近侵染细胞处成为BIC小体。BIC在随后侵染的细胞中比初级BIC中要更小，只能通过荧光标记才能够被识别。这两个阶段的BIC生长过程被推断与成功入侵水稻细胞的菌丝从活体营养丝状菌丝转化为球状侵染菌丝有关。

在BIC中，细胞质的积累是发生在早期宿主细胞侵染时，BIC区域常常与聚集在附着胞侵染位点的下方细胞质连通。活细胞成像说明，宿主胞质丝将初级菌丝膜盖区域与附着胞侵染位点相连，荧光的BIC在移动至侵染菌丝细胞边上时，被动态变化的水稻细胞质围绕。这种细胞质会从BIC区域到附着胞侵染位点的连接出现不久后消失，这种细胞质的动态变化是健康植物细胞的标志，极少数出现在被侵染的宿主细胞中^[12]。

3.2 效应蛋白在BIC中的聚集

尽管效应蛋白大量聚集在BIC中，仍有大多效应蛋白聚集在与BIC相关的菌丝细胞(初级菌丝和初级侵染细胞)外围，少数出现在后来侵染的菌丝细胞中以及BIC相关细胞的周围。部分出现在BIC无关侵染菌丝细胞的液泡中，但极少数出现在侵染菌丝细胞周围。因此，BIC的定位点以及BIC相关细胞的周围是BIC细胞聚集优先的地方。

光脱色荧光恢复技术(fluorescence recovery after photobleaching, FRAP)实验的结果，证实了BIC的聚集是效应蛋白连续分泌所致。Khang等^[13]通过有选择地光脱色了初级菌丝顶端BIC的Pwl2: EGFP荧光，并监测荧光恢复的时间，发现被消除的荧光在2.5个小时内即可完全恢复。在实验过程中，顶端BIC成为侧端BIC，新生的侵染菌丝从BIC相关细胞中长出。在BIC恢复阶段，荧光在这些后来长出的侵染菌丝细胞中不可见。结果表明，当侵染菌丝活跃生长时，荧光效应蛋白持续分泌并呈递到BIC中。荧光效应蛋白在BIC中的聚集是病原菌成功侵染寄主的标志，该过程与一个涉及到了分泌过程中的标志结构exocyst复合物和t-SNAREs有关，exocyst复合体

中SEC5和EXO70的缺失突变体能够导致细胞质效应蛋白分泌受损与致病性缺陷, 但对质外体效应蛋白的分泌毫无影响。T-SNAREs中的SSO1原件的缺失能够影响BIC的形成与发病^[14]。

4 两种效应蛋白的定位特点及其在水稻细胞间转运

效应蛋白从病原菌的侵染菌丝中分泌后, 部分会停留在由EIHM与侵染菌丝膜形成的质外体隔间里, 通过某些间接的信号传导作用于宿主植物细胞; 而有些会进入受体植物的细胞质中直接作用于宿主, 并能通过转运进入诸多还没有侵染菌丝的相邻宿主细胞中。效应蛋白的这一系列作用机制的差异性取决于效应蛋白分泌后定位特点的多样性。

4.1 细胞质效应蛋白——PWL2的细胞质定位区域及其胞间转运

细胞质效应蛋白从侵染菌丝分泌后能够优先积累在BIC中, 并通过一些特殊途径进入植物宿主细胞内。一直以来, 稻瘟病菌Avr蛋白就被认为是胞内效应蛋白, Sweigard等通过图位克隆从稻瘟病菌毒性菌株Guy11中克隆了Pwl2。序列分析表明, Pwl2编码含信号肽且富含谷氨酸的疏水蛋白, 属于细胞质效应蛋白, 由于Pwl2的表达程度比AVR-Pita1高, 因此通常选择关注Pwl2来追踪效应蛋白的转运。Pwl2: mRFP荧光能够经常在没有侵染菌丝的相邻细胞的细胞质以及细胞核中被观察到。相关实验表明, 在接种28 h后, mRFP荧光能够在侵染细胞周围的2~4层的细胞中被观察到^[15]。这可能是由于Pwl2: mRFP蛋白在分泌到水稻细胞质后通过一种水稻细胞间的共质体通道——胞间连丝进入相邻的宿主细胞(图2)。

此外, 在Pwl2: mRFP中, 几乎所有质壁分离的侵染水稻细胞在细胞质中有mRFP荧光, 这种荧光也会出现在相邻的细胞的细胞质中^[16]。在Pwl2: EGFP中, 细胞质中的效应蛋白荧光与BIC相比较为微弱, 为了使其荧光成像更加清晰, 通过在融合蛋白中加入核定位信号序列(nuclear localization signal, NLS), 结合了NLS的Pwl2、AvrPiz-t、Bas1等融合蛋白均能够在侵染宿主细胞的细胞核中显现出明显的荧光, 并在早期侵染阶段清晰可见。细胞核定位的检测结果证实了之前的结论, Pwl2: FP能够进入活水稻细胞的细胞质中。

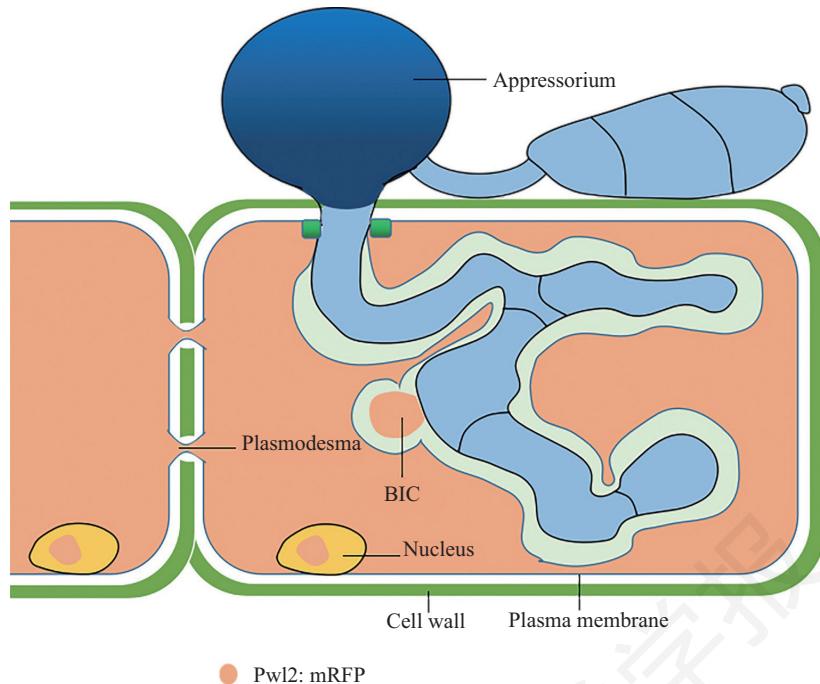
4.2 质外体效应蛋白——Bas4的分泌途径及质外体的定位区域

通过结合使用的药物和基因功能分析发现, 质外体效应蛋白的分泌遵循传统的内质网-高尔基体分泌通路, 这一过程能够被BFA抑制, 同时不依赖于BIC。肌动蛋白和微管是与质外体相应蛋白分泌相关的囊泡运输中必不可少的结构, 此外, 许多与内质网-高尔基体分泌通道相关的基因和翻译后修饰也可能与其分泌相关。Bas4是一种质外体效应蛋白, 常在水稻细胞质外体中被观察到, 一种在水稻细胞壁与皱缩的原生质体之间的空间, 又被称为活体表面营养复合体基质(extrainvasive hyphal membrane matrix, EIHMx)(图3)。当Bas4荧光蛋白结合NLS时, 荧光能在侵染菌丝外围部分观察到, 而不能在水稻的细胞内观察到。只有当侵染失败或EIHM破裂时, 水稻细胞质中才会出现微量的Bas4。该效应蛋白核定位的结果与质壁分离分析的结果一致^[17]。

在大多侵染位点中, Bas4蛋白就像一层薄膜包在初级菌丝的外围, 类似EIHM破裂并溢出的基质蛋白。而Pwl2大多出现在水稻细胞质中, 在质外体中则很少被观察到。位于宿主细胞质外体中, 而不存在于细胞质中是Bas4的主要特征。由于Bas4特殊的定位点, 不少研究人员提出疑问——该现象是否因人工泄露造成, 或是否细胞内的侵染菌丝有一种分散的转运路线将效应蛋白转运至胞外。与Pwl2与Bas1相比, Bas4中含有大量的半胱氨酸, 这是质外体效应蛋白的特有性质^[18]。

5 效应蛋白和信号肽编码序列调控BIC聚集

为了解BIC在效应蛋白转运中所发挥的作用, 基于对能够调控BIC聚集偏好的基序的识别是至关重要的。利用原始的效应蛋白启动子目的是将EGFP定位到BIC上, 信号肽编码序列中整个蛋白编码序列是可变的。例如, 在Bas4启动子中, Bas4信号肽编码的序列与介导在侵染菌丝外围EGFP分泌的整个蛋白编码序列可互换。为进一步测试BIC的聚集偏好对分泌蛋白启动子以及信号肽序列是特异的, Zambryski^[19]的研究在核糖体蛋白P27启动子控制下表达EGFP, 并与角质酶的N-端26氨基酸融合(CUT1)。在侵染过程中, CUT1信号肽介导了几丁质降解酶。与Pwl2: mRFP在BIC中的聚集偏好相反,

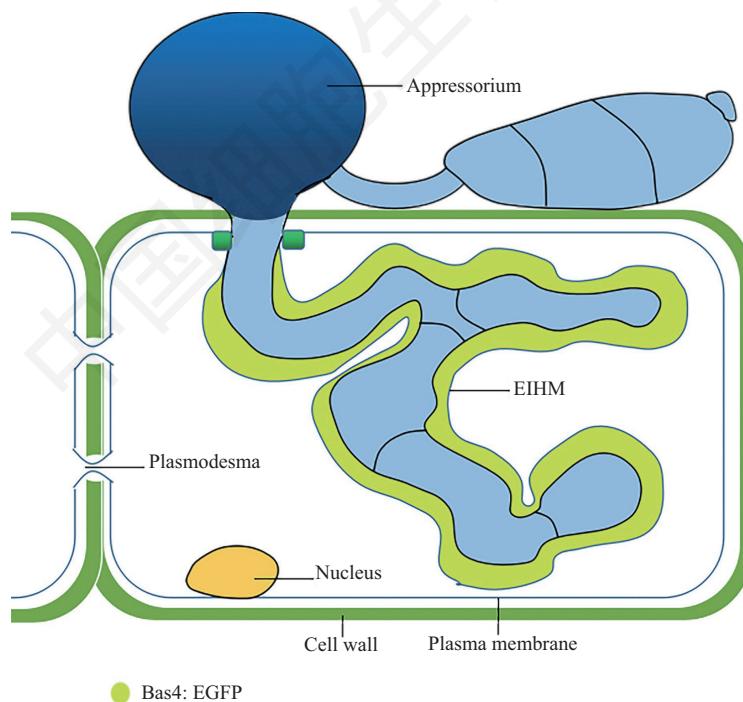


红色荧光蛋白标记的Pwl2能够进入水稻细胞质，并进入相邻的细胞。

Pwl2: mRFP with red fluorescence translocated into rice cells and moved to neighbor cells.

图2 Pwl2的细胞质定位特征

Fig.2 The cytoplasmic characteristics of Pwl2



荧光显微镜下，绿色荧光蛋白标记的Bas4: EGFP被观察到包围在侵染菌丝的外围。

Green fluorescent protein labeled Bas4: EGFP was observed surrounding around the invasive hyphae under fluorescence microscope.

图3 Bas4的质外体定位特征

Fig.3 The apoplastic characteristics of Pwl2

P27: CUT1SP: EGFP基因产物的分泌和定位与Bas4: FP相似，在侵染菌丝周围聚集，极少数在BIC聚集。

此外，Bas4信号肽和核糖体蛋白P27启动子/CUT1信号肽可介导非BIC相关侵染菌丝中少数的

BIC聚集。因此,一种特殊的效应蛋白分泌过程能够解释BIC聚集的偏好是由于BIC相关细胞中加强的效应蛋白基因表达引起的。在稻瘟病中,转运基序的鉴定尤为重要,这些基序通过生物信息学的分析会变成鉴定一些效应蛋白重要资源^[20]。

6 胞间转运与水稻细胞类型和融合荧光效应蛋白的尺寸相关

6.1 水稻细胞的类型与胞间转运相关

在叶脉相关细胞中,当又长又窄的表皮细胞上覆盖的维管鞘组织被侵染时,Pwl2融合蛋白显示出明亮的荧光,只有少数荧光移动至相邻的细胞,它们的荧光被限制于侵染细胞^[21]。因此猜测,Pwl2融合蛋白的荧光在叶脉相关细胞中相比常规表皮细胞中更加明亮,是因为它会聚集在一起而不扩散到相邻的细胞中。此外,有相关研究通过统计这两种细胞中含有核定位的Pwl2: mCherry: NLS和Pwl2: hH1: mCherry在胞间移动的数量验证了该猜想^[22]。在这两种结构中,在92%的侵染位点里,荧光在被侵染的叶脉相关细胞中受到限制,8%的侵染位点中出现胞间移动,但仅能够在相邻细胞中检测到微弱的荧光。而在常规侵染的表皮细胞中,87%~100%有胞间移动现象。显然,Pwl2的荧光融合蛋白到相邻细胞的移动取决于细胞的类型。

6.2 融合荧光的效应蛋白(effector: FP)的尺寸影响胞间转运水平

胞间的移动也取决于融合蛋白的大小。理论上,用更加明亮的tdTomato取代mRFP与Pwl2的C端融合,有利于观察Pwl2侵染细胞的细胞质中的转运。然而,在实际实验中,Pwl2: mRFP(39.3 kDa)能被观察到在细胞间频繁移动,而更大的Pwl2: tdTomato(68.3 kDa)却很少在相邻的未侵染的水稻细胞中被观察到。为证明融合蛋白的尺寸是一个影响因素,有相关实验通过计算宿主荧光的细胞核数量,比较了宿主细胞核定位的Pwl2融合蛋白的移动情况^[23]。较小的Pwl2: mCherry: NLS(44.5 kDa)在全部测试的常规侵染细胞中均出现了胞间移动,在93%的侵染位点中mCherry荧光从侵染细胞向外扩散了多于两层细胞。而较大的Pwl2: hH1: mCherry(66.1 kDa)在常规侵染的表皮细胞中向外的移动则受到了限制,只有在87%的侵染位点中的直接相邻细胞中观察到微弱的荧光,而剩下的13%的侵染位点中未观测到融合

蛋白的胞间移动。通过比较Pwl2: mRFP(39.3 kDa)、Pwl2: EGFP(40.9 kDa)、Pwl2: mCherry: NLS(44.5 kDa)与Pwl2: hH1: mCherry(66.1 kDa)、Pwl2: tdTomato(68.3 kDa)的荧光区域,证明了只有一定尺寸的融合蛋白才能在宿主细胞间移动。但在测试的蛋白范围内,尺寸对其转运到宿主细胞中无影响。

7 展望

目前,诸多研究已经开始在细胞生物学水平上探索真菌分泌的效应蛋白及其各部分元件,效应蛋白自己成为在生物侵染过程中时间上与空间上的关注点,它甚至能够在真菌生长之前移动并发挥作用。如稻瘟病菌需要花费12个小时移动至初次侵染的细胞中,但移动至相邻的宿主细胞只需要2个小时^[24]。当真菌仍然在第一个侵染水稻细胞中生长时,荧光标记Pwl2和Bas1能够在相邻的四个宿主细胞中被观察到,表明成功侵染的水稻细胞在周边细胞中以及已经对效应蛋白做出应答的周边细胞保留了共质体途径,或许是表达对疾病敏感化的水稻基因^[25]。这说明,侵染菌丝在进入相邻宿主细胞之前,或许在初次侵染细胞中先发送信号通过胞间连丝至相邻细胞,为随后的侵染做准备。近期的研究发现,丝裂原活化蛋白激酶(Pmk1)能够通过调节稻瘟病菌分泌的、抑制植物免疫作用的效应蛋白的表达,来防止胞间连丝中活性氧的产生与胼胝质的沉积,从而抑制稻瘟病菌侵染相邻细胞^[26]。但关于致病菌的这类信号传导的机制以及相关的基因诱导表达有待进一步的研究。

此外,关于半活体营养的致病菌如何介导宿主坏死,以及植物在病症表达时如何抑制从活体侵染阶段转化到死体侵染阶段,这些原因仍然不得而知。稻瘟病菌在侵染早期就已扩散到水稻中,而这一系列活体营养阶段是由一个明显的控制细胞死亡和病变形成的开关所调控。Wang等^[27]发现了一种稻瘟病菌效应蛋白AvrPiz-t能与bZIP-type转录因子APIP5在细胞质中进行互作,使得其死体侵染阶段的转录活动和蛋白的聚集被明显抑制。另外,APIP5在与Pit-z的互作中能促进其稳定表达,从而抑制细胞坏死,这些结论说明,植物中有一种独特的机制在死体侵染阶段抑制效应蛋白介导的细胞坏死。

从实际的病害防控角度出发,筛选与病原菌效应蛋白互作的R基因并将其编入水稻,能为可持续的病害控制提供最好的路线。高通量的效应蛋白生

物组学能够在大量的基因组序列中筛选候选效应蛋白基因，并已经成功鉴定了新的适用于农业生产的AVR-R基因对^[28]。因此，建立高通量研究体系和规模化鉴定稻瘟病菌分泌蛋白功能，对深入了解功能效应蛋白的分子机制及其稻瘟病菌与水稻互作机制有重要意义。确定水稻中蛋白作用的靶标为未来设计稻瘟病防控持久的方案与水稻抗病改良提供新理论策略。

参考文献 (References)

- 1 郑月琴, 林艳, 何燕华, 陈松彪, 王锋. 稻瘟菌效应蛋白研究进展. 分子植物育种(Zheng Yueqin, Lin Yan, He Yanhua, Chen Songbiao, Wang Feng. Recent advances in researches on rice blast effector proteins. Molecular Plant Breeding) 2013; 11(3): 451-9.
- 2 Hahn M, Mendgen K. Signal and nutrient exchange at biotrophic plant-fungus interfaces. Curr Opin Plant Biol 2001; 4: 322-7.
- 3 Ridout CJ, Skamnioti P, Porritt O, Sacristan S, Jones JD, Brown JK. Multiple avirulence paralogues in cereal powdery mildew fungi may contribute to parasite fitness and defeat of plant resistance. Plant Cell 2006; 18: 2402-14.
- 4 Yi M, Chi MH, Khang CH, Park SY, Kang S, Valent B, Lee YH. The ER chaperone LHS1 is involved in asexual development and rice infection by the blast fungus *Magnaporthe oryzae*. Plant Cell 2009; 21(2): 681-95.
- 5 Yang J, Liu L, Wang Y, Wang C, Yan J, Liu Y, et al. Overexpression of BAS1 in rice blast fungus can promote blast fungus growth, sporulation and virulence in planta. Saudi J Biol Sci 2017; 24(8): 1884-93.
- 6 Shi X, Long Y, He F, Zhang C, Wang R, Zhang T, et al. The fungal pathogen *Magnaporthe oryzae* suppresses innate immunity by modulating a host potassium channel. PLoS Pathogens 2018; 14(1): e1006878.
- 7 Hogenhout SA, Van Der HRA, Kamoun TR. Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms, Mol Plant Microbe Interact 2009; 22(2): 115-22.
- 8 Giraldo MC, Dagdas YF, Gupta YK, Mentlak TA, Ana Lilia Martinez-Rocha MY, et al. Two distinct secretion systems facilitate tissue invasion by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. Nature Comm 2013; 4: 156-60.
- 9 Shoji JY, Arioka M, Kitamoto K. Dissecting cellular components of the secretory pathway in filamentous fungi: Insights into their application for protein production. Biotechnol Letters 2008; 30(7): 7-14.
- 10 Giraldo MC, Barbara Valent B. Filamentous plant pathogen effectors in action. Nat Rev Microbiol 2013; 11(11): 800-14.
- 11 Ai HW, Shaner NC, Cheng Z, Tsien RY, Campbell RE. Exploration of new chromophore structures leads to the identification of improved blue fluorescent proteins. Biochemistry 2007; 46(20): 5904-10.
- 12 Catanzariti AM, Dodds PN, Ve T, Kobe B, Ellis JG, Staskawicz BJ. The AvrM effector from flax rust has a structured C-terminal domain and interacts directly with the M resistance protein. Mol Plant-Mic Int 2010; 23(1): 49-57.
- 13 Bhattacharjee S, van Ooj C, Balu B, Adams JH, Haldar K. Maurer's clefts of *Plasmodium falciparum* are secretory organelles that concentrate virulence protein reporters for delivery to the host erythrocyte. Blood 2008; 111: 2418-26.
- 14 Khang CH, Berruyer R, Giraldo MC, Kankanala P, Park SY, Czymmek K, et al. Translocation of *Magnaporthe oryzae* effectors into rice cells and their subsequent cell-to-cell covenement. Plant Cell 2010; 22: 1388-403.
- 15 Giraldo MC, Dagdas YF, Gupta YK, Mentlak TA, Yi M, Saitoh H, et al. Two distinct secretion systems facilitate tissue invasion by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. Nat Commun 2013; 4: 1996.
- 16 de Jonge R, Bolton MD, Thomma BP. How filamentous pathogens co-opt plants: the ins and outs of fungal effectors. Curr Opin Plant Biol 2011; 14(4): 400-6.
- 17 Caillaud MC, Piquerez SJM, Fabro G, Steinbrenner J, Ishaque N, Beynon J, et al. Subcellular localization of the Hpa RxLR effector repertoire identifies a tonoplast-associated protein HaRxL17 that confers enhanced plant susceptibility. Plant J 2012; 69(2): 252-65.
- 18 Liu WD, Liu JL, NingYS, Ding B, Wang XL, Wang ZL, et al. Recent progress in understanding PAMP-and effector-triggered immunity against the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. Mol Plant 2013; 6(3): 605-20.
- 19 Zambrayski P. Cell-to-cell transport of proteins and fluorescent tracers via plasmodesmata during plant development. J Cell Biol 2004; 162(2): 165-8.
- 20 Kamoun S. A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. Annu Rev Phytopathol 2006; 44(10): 41-60.
- 21 Miki S, Matsui K, Kito H, Otsuka K, Ashizawa T, Yasuda N, et al. Molecular cloning and characterization of the AVR-Pia locus from a Japanese field isolate of *Magnaporthe oryzae*. Mol Plant Pathol 2009; 10(3): 361-74.
- 22 Raffaele S, Farrer RA, Cano LM, Studholme DJ, MacLean D, Thines M, et al. Genome evolution following host jumps in the Irish potato famine pathogen lineage. Science 2010; 330(6010): 1540-3.
- 23 Hacquard S, Kracher B, Maekawa T, Vernaldi S, Schulze-Lefert P, Ver Loren van Themaat E. Mosaic genome structure of the barley powdery mildew pathogen and conservation of transcriptional programs in divergent hosts. Proc Nat Acad Sci USA 2013; 110(24): 2219-28.
- 24 Mosquera G, Giraldo MC, Khang CH, Coughlan S, Valent B. Interaction transcriptome analysis identifies *Magnaporthe oryzae* BAS1-4 as biotrophy-associated secreted proteins in rice blast disease. Plant Cell 2009; 21: 1273-90.
- 25 Kankanala P, Czymmek K, Valent B. Roles for ricemembrane dynamics and plasmodesmata during biotrophic invasion by the blast fungus. Plant Cell 2007; 19(2): 706-24.
- 26 Wang RY, Ning YS, Shi XT, He F, Zhang CY, Fan JB, et al. Immunity to rice blast disease by suppression of effector-triggered necrosis. Curr Biol 2016; 26: 2399-11.
- 27 Chen S, Songkumarn P, Venu RC, Gowda M, Bellizzi M, Hu J, et al. Identification and characterization of in expressed secreted effector proteins from that induce cell death in rice. Mol Plant-Mic Int 2003; 26(2): 191-202.
- 28 Vleeshouwers VG, Raffaele S, Vossen JH, Champouret N, Oliva R, Segrelin ME, et al. Understanding and exploiting late blight resistance in the age of effectors. Annu Rev Phytopathol 2011; 49: 507-31.