植物病原菌效应子的研究进展

杨晓倩^{1,2,3}, 张立春^{1,2,3}, 李奕文^{1,2,3}, 王延伟^{1,2,3*}

1. 北京林业大学林木分子设计育种高精尖创新中心, 北京 100083;

2. 北京林业大学, 林木育种国家工程实验室, 北京 100083;

3. 北京林业大学生物科学与技术学院, 林木花卉遗传育种教育部重点实验室, 北京 100083

* 联系人, E-mail: ywwang@bjfu.edu.cn

收稿日期: 2019-06-11; 接受日期: 2019-11-22; 网络版发表日期: 2020-02-13

国家自然科学基金(批准号: 31670671, 31470668)资助

摘要 病原菌为了成功侵入并在寄主植物中繁殖, 会分泌效应子作为入侵武器. 不同病原菌的效应子具有一定的共性和异性. 开展植物病原菌效应子的系统鉴定, 深入揭示效应子对病原菌侵入和在植物发病中的作用以及解析效应子与植物抗病基因的互作, 可为研究病原菌的致病机制及其与植物的互作提供重要的研究线索, 在植物病理和抗病遗传育种研究中也具有重要理论价值和实践意义. 近年来, 随着测序技术的不断发展, 基因组学和转录组学在植物抗病研究中的应用也日益广泛, 其研究结果可为鉴定病原物致病基因、植物抗病基因、阐明病原菌与植物互作的分子机制提供重要信息. 本文根据近年来植物包括树木中病原物效应子的研究进展, 对效应子的特点、鉴定方法、功能及宿主抗病机理等进行了综述和比较, 重点阐述了效应子的鉴定、致病功能及与植物抗病基因的分子互作和调控, 并对效应子在植物抗病中的应用及其研究前景进行了展望.

关键词 病原菌, 寄主, 效应子, 致病性, 互作

病原菌在侵染植物的过程中会分泌有助于其侵染的一系列分子, 即效应子, 其在植物与病原菌的互作过程中起重要作用. 效应子能否对宿主进行有效的操控是病原菌能否成功定殖的关键^[1]. 大部分效应子属于分泌蛋白^[2], 它们的具体分子特征如下: 无糖基磷脂酰肌醇的锚定位点, 无跨膜结构域, 没有将蛋白输送到线粒体或其他胞内细胞器的预测定位信号, 含有N-端信号肽, 富含半胱氨酸, 氨基酸残基大约为50~300个, 序列高度特异^[1,3,4]. 植物病原物效应子可以被递送到质外体、植物质膜外或

宿主细胞内^[5]. 病原菌以效应子作为武器攻击宿主, 使病害大面积暴发, 进而对农业生产造成重大损害. 对效应子功能与作用机制的深入研究, 了解病原体致病因素及寄主抗病机理, 将有助于病害的防控, 降低和避免因病害造成的经济损失. 迄今为止, 效应子已成为解析病原菌侵染宿主细胞重要生物过程的有力工具^[6]. 本文主要针对卵菌、真菌和细菌效应子进行了综述, 介绍了效应子的功能、鉴定方法及相关研究的最新进展, 并对未来的相关研究进行了评述.

引用格式: 杨晓倩, 张立春, 李奕文, 等. 植物病原菌效应子的研究进展. 中国科学: 生命科学, 2020, 50: 227–236

Yang X Q, Zhang L C, Li Y W, et al. Recent developments of plant pathogen effectors (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2020, 50: 227–236, doi: 10.1360/SSV-2019-0193

1 效应子的分子病理机制

1.1 效应子的作用模式

植物病原菌与寄主间的互作机制存在一些假说: 病原菌无毒基因(avirulence gene, *Avr*)和植物抗病基因(resistance gene, *R*)之间存在“基因对基因”假说^[7], 即 *Avr*与*R*基因间存在直接或者间接作用。大部分*R*蛋白可通过辅助蛋白与病原物*Avr*形成复合物从而发生间接的相互作用, 进而引发过敏性坏死反应, 目前有“陷阱”模式、“保卫”模式和“诱饵”假说来解释这种相互作用^[8,9]。2017年, Ma等人^[10]在大豆疫霉(*Phytophthora sojae*)中发现了新的“诱饵”模式, 疫霉菌分泌效应子PsXEG1的同源蛋白PsXLP1, 其以“诱饵”方式与效应子PsXEG1协同促进疫霉菌的侵染。

植物与病原菌间的竞争进化被归纳为经典的“之字模型”(the zigzag model)^[11]。植物受病原菌侵染时, 触发两种免疫系统: 广谱性免疫反应(PAMP-triggered immunity, PTI)和效应子触发的免疫反应(effector-triggered immunity, ETI)(图1)。植物细胞的模式识别受体(pattern-recognition receptors, PRRs)对病原物的相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)或宿主损伤相关分子模式(damage associated molecular patterns, DAMPs)进行识别, 进而触发PTI^[11,12]。病原菌为了抑制植物的PTI, 产生效应子促进病菌的感染, 而寄主植物则进化出能被效应子激活的免疫受体R蛋白(disease resistance protein), 从而引起超敏反应(hyper-sensitive reaction, HR)来抑制病原菌的生长, 此时植物被触发的免疫称为ETI^[1,13]。PTI和ETI可共同限制微生物的进入、病原菌的繁殖或杀死致病原^[14]。而病原菌会再次通过突变或者进化出新的效应子以及删除基因组中的无毒基因或降低无毒基因的转录水平等方式逃避抗病蛋白或抗病基因的识别, 抑制植物的免疫^[15]。上述模型和假说在一定程度上揭示了寄主植物与病原菌间相互作用的分子机制。

1.2 效应子的转运

细菌共有 I~VI型6类分泌系统^[16]。其中, III型效应子能从病原菌的细胞质进入宿主植物细胞, 该分泌系统对病原细菌的侵染起重要作用^[17]。已有研究从黄单胞菌(*Xanthomonas campestris*)、丁香假单胞菌(*Pseudomonadaceae syringae*)和青枯雷尔氏菌(*Ralsto-*

图1 植物免疫系统(修改自参考文献[11])。植物细胞的PRRs识别PAMPs, 触发植物第一层免疫反应PTI。病原菌产生效应子抑制PTI, 植物R蛋白(如NB-LRR类)被效应子激活, 产生第二层免疫反应ETI

Figure 1 Immune system in plants (modified from Ref. [11]). The PRRs of plant cells recognize PAMPs, causing PTI. Pathogen produces effectors to inhibit PTI, and the NB-LRR protein is activated by the effector to produce a second layer of immune ETI

nia solanacearum)等菌中鉴别出大量III型效应子, 对其他效应子的研究具有较高的参考价值^[14]。

卵菌胞内的效应子, 如RXLR(R: 精氨酸; X: 任意氨基酸; L: 亮氨酸)和CRN(crinkling and necrosis protein)两类效应子, 均具有信号肽序列, 且信号肽下游有与转运相关的特定氨基酸基序。RXLR家族效应子的RXLR结构域可介导效应子转运到植物细胞^[18], 而CNR家族的效应子N端信号肽下游的保守XLFLAK结构域对转运到宿主细胞的过程起重要作用。

病原真菌的信号肽有助于效应子蛋白的分泌, 在侵染阶段可特异性表达^[19]。稻瘟菌的效应子可通过活体营养表面复合体(biotrophic interfacial complex, BIC)转运而进入寄主细胞^[20]。

2 效应子的鉴定

2.1 效应子的鉴定方法

生物信息学分析和转录分析是目前效应子鉴定的主要方法。生物信息学分析可预测蛋白质氨基酸序列的信号肽和亚细胞定位, 转录分析可鉴定效应子的表达时期。迄今为止, 迅速发展的高通量测序技术为在病原菌中鉴定效应子提供了有力的手段。罗梅等人^[21]

利用SignalP, TMHMM, TargetP和Protcomp等生物信息学软件分析了球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)中10364个蛋白序列, 共预测到940个分泌蛋白, 其中18个为候选效应子. 虽然组学数据为效应子的鉴定提供了诸多便利, 但应用生物信息学方法鉴定缺乏典型信号肽序列的非典型分泌效应子则非常困难, 而应用高灵敏蛋白质谱技术来鉴定此类效应子是目前常用的方法. 在此基础上积累一大批效应子后, 应用生物信息学分析方法对效应子典型序列特征进行高效鉴定, 可以加速人们对效应子功能及其致病机制的认识.

2.2 病原物效应子的类型

目前对植物真菌效应子的研究主要集于模式真菌和全基因组已测序的真菌, 如番茄叶霉菌(*Cladosporium fulvum*)、稻瘟菌(*Magnaporthe oryzae*)、油菜黑胫菌(*Leptosphaeria maculans*)等. 部分病原真菌效应子无毒基因(*Avr*)已被克隆. 如番茄叶霉菌的无毒基因*Avr4E*, *Avr9*和*Ecp6*等; 稻瘟菌的无毒基因*AvrPia*, *AvrPii*和*PWL2*等. 在有些真菌中发现了其独有的CFEM (common in several fungal extracellular membrane)蛋白, CFEM蛋白在寄主植物中可引起致病性. 自从在粗球孢子菌(*Coccidioides immitis*)中首次发现CFEM蛋白以来, 新的CFEM蛋白也不断从不同的真菌中得以鉴定, 包括稻瘟病菌(*M. oryzae*)、烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)、白假丝酵母(*Candida albicans*)和尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)等^[22]. 井忠英等人对禾谷炭疽菌中的CFEM蛋白进行检测发现, 22个CFEM分泌蛋白可能是禾谷炭疽菌致病相关的效应子^[19].

卵菌胞内效应子主要包括RXLR和CRN两大类, 胞外效应子包括细胞壁降解酶(cell wall-degrading enzymes, CWDE)、酶抑制子(enzyme inhibitors)、坏死和乙烯诱导蛋白1(necrosis and ethylene-inducing peptide 1, NEP1)家族等. 目前在卵菌中鉴定到的无毒蛋白几乎全部为RXLR类效应子^[23]. 最近, 几个辣椒疫霉(*Phytophthora capsici*)RXLR型效应子的晶体结构和毒性功能等得到初步分析, 例如RXLR型效应子PcAvh2能抑制6种效应子激发的植物免疫反应, 是辣椒疫霉的重要侵染致病因子^[24-27]. 此外, 还有一些其他类型的效应子, 例如在大豆疫霉中鉴定到了非典型效应子Isc1^[28], 由于缺乏信号肽, 表现出非常规分泌的特征. 在致病疫霉菌中鉴定到了分泌型效应蛋白SNE1, 它能

抑制在坏死营养生长阶段的疫霉菌分泌的诱导细胞死亡的效应子的活动, 以及一系列由Avr-R蛋白相互作用介导的程序性细胞死亡^[29].

大多数植物病原细菌属于革兰氏阴性细菌, 主要为假单胞菌属(*Pseudomonas*)、农杆菌属(*Agrobacterium*)、黄单胞菌属(*Xanthomonas*)和欧文氏菌属(*Erwinia*)等. 目前研究比较清楚的细菌III型效应子主要有AvrBs3家族、YopJ/AvrRxv家族、XopD和XopN等. 在AvrBs3家族中鉴定出的第一个无毒基因*avrBs3*来自于辣椒斑点病菌(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Xcv*)^[30]. AvrBs3家族中的基因不完全是无毒基因, 也存在致病基因(pathogenicity, Pth), 因此该家族统称AvrBs3/PthA家族. XopD(xanthomonas outer protein D)是一类来自于黄单胞杆菌(*Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*, *Xcv*)的III型效应子, 其通过在番茄感病后期延迟叶片的枯萎和坏死来促进病原菌的生长和繁殖. XopN(xanthomonas outer protein N)是一类来自于黄单胞杆菌的毒性因子, 其通过细菌III型分泌系统注入到寄主细胞中. 当植物遭受病菌感染时, XopN能抑制PAMP介导的免疫反应^[31].

3 效应子的致病功能研究

3.1 植物病原菌重要效应子的功能分析及进展

(1) 效应子调控寄主植物的基因转录. 细菌中存在类似于转录激活子的效应子TAL(transcription activator-like effector), 其可以直接结合寄主基因启动子DNA序列, 进而激活特定寄主基因的转录, 引起致病或者抗病. 第一个TAL效应子(AvrBs3)在辣椒斑点病菌中被发现^[30]. 目前, 已有部分TAL效应子编码的基因及其寄主靶基因被克隆, 但大多数TAL效应子对应的寄主靶基因仍然未知. 迄今为止, 研究比较清楚的效应子是AvrBs3, 其寄主靶基因为*upa20*和*Bs3*等, AvrBs3是黄单胞菌注入植物的一个效应蛋白, 其定位于植物细胞核并引起植物叶肉细胞的肥大, 以利于病原菌侵染和定殖^[32]. *upa20*是细胞大小的主要调节因子, AvrBs3通过其中心重复区域与*upa20*启动子中的保守元件结合, 并通过其活化结构域诱导基因表达^[32]. TAL与植物寄主靶基因相互结合是一种特异性的蛋白质与DNA结合方式. 在TAL效应子的应用中, 可以利用分子密码发掘抗病基因和感病基因^[33], 比如Boch等

人^[34]根据TAL效应子HAX2的序列,推测出其对应的启动子序列,并在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)基因组中找到了MYB家族转录因子PAPI(*At1G56650*),可作为TAL的靶基因。此外,大豆疫霉效应子PsCRN108可以通过直接靶向植物启动子来调节特定植物防御相关基因的转录^[35]。

(2) 效应子与植物体的互作。最新研究表明,有些丝状真菌已经进化产生抑制寄主RNA沉默的效应子。例如小麦茎锈病原菌(*Puccinia graminis* f. sp. *Tritici*, *Pgt*)分泌的PgtSR1效应蛋白通过改变作为防御调节剂的小RNA的丰度来抑制植物中的RNA沉默并阻碍植物防御^[36]。据预测,每个疫霉菌种均可编码数百到上千种效应子,这些效应子在植物宿主体内具有不同的细胞功能^[37]。例如大豆疫霉的RXLR效应子PSR1和PSR2可以抑制植物的基因沉默途径,干扰植物的防卫反应^[38,39]。相应地,植物体通过分泌siRNA(small interfering RNA)跨界沉默病原体中的靶基因使病原体失去毒力。编码Ca²⁺依赖性半胱氨酸蛋白酶(Cl_p-1)和同位素核苷酸C-15羟化酶(HiC-15)的两种基因是棉花黄萎病菌产生毒力的必需基因,在棉花受到病原菌感染时,植物体增加miR166和miR159的表达并将其输出到病原菌菌丝中以进行特异性沉默^[40](图2)。PSR2可以通过抑制宿主产生次级siRNA来提高宿主对病原菌的敏感性,而另一方面植物产生大量的siRNA通过胞外囊泡的传递进入病原菌中,并通过沉默效应子基因减小病原菌毒力^[41](图2)。

(3) 效应子胁迫内质网。例如大豆疫霉效应子PsAvh262结合寄主免疫球蛋白(BiPs)来稳定内质网腔。BiPs是植物对疫霉菌抗性的负调节因子,PsAvh262通过稳定BiPs抑制内质网应激触发的细胞死亡并促进疫霉菌感染^[42]。

(4) 植物病原菌效应子通过主动操纵免疫分泌途径来促进感染。效应子具有此功能的第一个证据来自对丁香假单胞菌III型效应子HopM1的研究,在丁香假单胞菌感染拟南芥期间,HopM1与宿主ADP核糖基化因子鸟嘌呤核苷酸交换因子AtMIN7相互作用。AtMIN7在PTI和ETI过程中均发挥重要作用,HopM1以蛋白酶体依赖性方式诱导AtMIN7降解,进而促进病原菌感染^[43,44]。

(5) 效应子引起ETI免疫调节模式。在病原菌效应子的作用下,miRNA会靶向R基因来对植物免疫进行

调节。在杨树中过表达miR472a会增强对杨树烂皮病菌的抗性,增加对胶孢炭疽菌的敏感性^[45]。苹果在叶斑病原菌的侵染下会产生ETI防御反应,Md-miRLn11通过靶向NBS-LRR类蛋白基因调控自身免疫^[46]。番茄miR482b通过与NBS-LRR基因互作调节其抗性^[47]。马铃薯中过表达miR482e通过靶向NBS-LRR基因增强了对黄萎病(*verticillium dahliae*)的敏感性^[48]。

(6) 植物细胞的程序化死亡在植物免疫中扮演重要角色,效应子通过操纵植物细胞死亡来达到感染的目的。在植物与病原体相互作用中,NLR和PRR识别病原体通常会导致HR^[49],进而通过程序化死亡将病原体限制在少数感染细胞中,HR受到抑制会促进病原菌的感染,这是引起植物发病的主要原因之一。大多数丁香假单胞菌III型效应子能够抑制ETI相关的HR反应,其中一种新发现的III型效应子HopS2具有极强的HR抑制活性^[50]。

(7) 效应子靶向激素信号。植物为了保护自身免受病原菌的攻击,会依赖于植物激素精细的调控信号网络来抗病。为了与之对抗,病原体通过效应子的作用来躲避或破坏植物依赖于激素调节的防御^[51]。病原体的生活方式决定了其对植物激素信号干预的类型。活体营养型真菌病原体需要活的宿主细胞来完成它的生命周期,因此它通过抑制促进细胞衰老和死亡的信号传导途径来保持宿主的存活。与此相反,死体营养型真菌通过对宿主激素信号传导途径的控制来使病原体能够杀死细胞并以此作为营养来源。水杨酸(salicylic acid, SA)和茉莉酸(jasmonic acid, JA)在抗病中的作用已被广泛研究,其中水杨酸主要用于对抗活体营养型的病原菌,茉莉酸主要用于抵抗死体营养型的病原菌,且SA信号通路的增强会减弱JA信号通路,因此病原菌对植物激素间串扰的利用十分关键^[52]。例如,丁香假单胞菌的III型效应子AvrB在植物细胞中通过作用于MPK4(mitogen-activated protein kinase 4)、HSP90(heat-shock protein 90)和RIN4(receptor-interacting protein 4)来激活JA信号传导途径^[53]。丁香假单胞菌III型效应子HopZ1a降解JA抑制子(repressors),从而加强JA信号传导途径^[54]。来自茄劳尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)的III型效应子PopS,在番茄根和茎中抑制SA依赖的防御反应。核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)的效应子也被发现具有降解SA的能力。有趣的是,目前没有发现同时抑制SA和JA的病原体效应子。除SA和JA

图 2 效应子与植物的互作(修改自参考文献[40,41]). 植物受到病原菌感染时, 病原菌分泌效应子促进其感染, 植物体内 miRNAs(如 miR472a 和 miR482b 等)参与 R 蛋白与效应子相互作用引起的免疫反应, 如 ROS, HR 和 PCD. 此外, siRNA 通过胞外囊泡进入病原菌细胞内沉默致病基因, 引起跨界基因沉默

Figure 2 Interaction between effectors and plants (modified from Ref. [40,41]). When a plant is infected by a pathogen, the pathogen secretes effectors to promote infection. MiRNAs (such as miR472a, miR482b, etc.) are involved in the interaction with the R protein secreted by plant cells with effectors to cause immune responses such as reactive oxygen species (ROS), hypersensitive reactions (HR), and programmed cell death (PCD). On the other hand, siRNA enters the pathogenic bacterial cells through the extracellular vesicles to silence the disease-causing genes, causes trans-kingdom gene silencing

外, 参与乙烯(ethylene, ET)、油菜素内酯(brassinosteroids, BRs)和脱落酸(abscisic acid, ABA)等与植物抗病和生长发育相关激素信号传导的效应子也被广泛报道[55-57].

(8) 效应子引起活性氧(reactive oxygen species, ROS)的暴发. 在植物中, 超氧自由基($O_2^{\cdot-}$)、羟基自由基($\cdot OH$)和过氧化氢(H_2O_2)等活性氧的产生被认为是植物在对抗生物与非生物胁迫中重要的防御手段[1,58]. 水稻受稻瘟病菌感染时, miR398b 可促进超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性, 从而提高 H_2O_2 浓度, 提高植物抗性[59]. miR398b 靶向 4 个超氧化物歧化酶家族基因, 即铜/锌超氧化物歧化酶 1 基因(CSD1)、铜/锌超氧化物歧化酶 2 基因(CSD2)、铁/锰超氧化物歧化酶同源基因(SODX)和铜/锌超氧化物歧化酶伴侣蛋白基因(CCSD)来调控活性氧进而调控植物的免疫行为[59].

(9) 效应子干扰植物细胞的自噬. 植物可以通过吞噬自身细胞抵抗压力, 选择性的自噬可以特异性地降

解诸如致病微生物之类的有毒物质. 马铃薯疫病病原体致病疫霉的效应子 PexRD54 与马铃薯自噬相关蛋白 ATG8CL 结合, 防止有助于植物防御的自噬受体与 ATG8CL 相互作用, 使植物更容易受到致病疫霉的感染[60].

(10) 效应子靶向和操纵宿主蛋白质. 人们对效应子操纵植物靶标的研究起源于细菌 III 型分泌系统分泌到宿主细胞中效应子, 而关于丝状病原体, 如真菌和卵菌的效应子的靶标了解相对较少. 例如致病疫霉 RXLR 效应子 Pi04314 与 3 种宿主蛋白磷酸酶 1 催化(PP1c)同种型相互作用, 导致它们从核仁重新定位到核质, 以促进疫霉感染的叶片定殖, 并减弱茉莉酸和水杨酸反应基因的诱导[61].

3.2 效应子功能研究进展分析

目前通过微生物基因组测序等技术已鉴定出大量植物病原菌效应子, 不同效应子的致病功能具有一定的差异相关性. 现阶段对真菌和卵菌效应子的靶靶蛋

白作用机制研究较少, 但已知数个细菌效应子破坏宿主免疫的方式与真菌和卵菌中效应子相似^[62]. 不同效应子在寄主植物中作用的方式存在一定的差异性, 深入分析不同效应子的作用机制, 找出共性与异性, 有助于进一步认识其致病原理.

4 基于病原菌效应子的植物抗病研究进展

4.1 模式植物中的抗病研究

植物在抗病过程中, 除产生HR和PCD外, 还会产生系统获得抗性(systemic acquired resistance, SAR), 进而获得对病原菌的持久抗性. 在本模式植物杨树中, 其抗病研究主要集中在病原菌胁迫下相关生理生化活动的分析, 以及对抗病相关基因的鉴定与功能验证. 此外, WRKY转录因子家族成员在抗病过程中具有重要作用, 但迄今在杨树抗病研究中只有少量被验证.

相对于木本模式植物杨树, 草本模式植物拟南芥的抗病研究则进展较快. 植物与病原菌动态的相互作用促使植物抗病机制的进化, 使植物在病原体感染时能够进行快速有效的防御反应^[63]. 在病原菌胁迫下, 植物需要对转录过程进行调控, 从生长相关的活动转变为防御, 目前, 该过程已得到广泛研究. 然而, 对于免疫诱导过程中发生的翻译变化则知之甚少. 对接触微生物相关分子模式elf18的拟南芥进行整体翻译分析时发现, 在这种模式引发的免疫过程中, 翻译受到严格的调节, 且与转录的相关性甚小^[64]. 表观遗传学修饰可参与拟南芥抵御病原菌入侵的免疫反应(包括效应识别、信号转导和快速防御反应等)^[65]. 基因组DNA甲基化、组蛋白修饰和小RNA调控在拟南芥抗病研究中均取得了一定进展. miR393是在拟南芥中最先被发现的miRNA之一, 它通过负调控生长素(auxin)信号通路在植物PTI中起重要作用^[66]. 在拟南芥中, miR163及其靶标可协同调控抵御丁香假单胞菌的侵染^[67]. 拟南芥体内的NAC转录因子家族成员如ATAF2, ANAC019, ANAC055和ATAF1等对死体营养型病原菌的抗性起负调控作用, 过表达这些转录因子的植株对病原菌的敏感性增强^[68~71]. 此外, 拟南芥也可以通过miRNA靶向转录因子来调控植物体的抗病性, 编码NAC转录因子的NAC4基因通过抑制细胞死亡的负调控因子LURP1, WRKY40和WRKY54促进过敏反应和

细胞程序性死亡, 在这一调控过程中, miR164通过靶向NAC4基因负调控整个免疫过程^[72].

4.2 树木中的抗病研究及进展

相对于草本植物, 树木中抗病研究进展则较为缓慢, 树木诱导抗性在分子水平上的研究还有较大发展空间^[73]. 目前, 分子水平上的研究主要集中在病原菌胁迫下植物体内的表观遗传学修饰. 表观遗传学修饰通过激活/抑制宿主R基因、重要抗病信号途径(SA/JA等)以及调控防御反应相关基因的表达来改变抗病性^[65]. 对病原菌胁迫下miRNA的表达水平进行差异分析, 预测与抗病相关的miRNA及相应靶基因, 可为树木抗病机制的研究和抗病育种奠定基础. 苹果在抵御叶斑病真菌侵染时, Md-miR156ab和Md-miR395靶向参与抵抗真菌病原体防御反应的蛋白质编码基因, Md-miR156ab以转录因子MDWRKyn1为靶点, MDWRKyn1含有一个TIR和一个WRKY结构域; 而Md-miR395靶向另一转录因子MDWRKY26, 它包含两个WRKY结构域, 这些小RNA通过靶向转录因子从而影响苹果对叶斑病的抗性^[74]. 虽然林木miRNA水平上的研究取得一定进展, 但目前多数miRNA尚未获得抗病调控的功能验证.

4.3 存在的问题、比较及前景分析

植物抗病研究存在一定的复杂性, 同种病原菌对不同寄主植物以及同种寄主植物的生长环境、植物的年龄和病原菌感染部位等存在差异时, 植物的抗病因子存在一定的差异相关性. 宿主植物中, 表观遗传修饰在抗病研究中已有初步进展, 但人们所认知的往往只是单个表观遗传修饰的调控功能, 植物免疫过程中多个表观遗传修饰的相互作用机制研究较少. 除了目前研究较多的与抗病相关的小RNA外, 长链非编码RNA(long noncoding RNA, lncRNA)也是抗病研究的重要对象. 植物病原体胁迫下的表达调控往往受多基因控制, 因此, 目前发现的一些与抗病相关的因素往往只是植物抵御胁迫的一部分.

目前, 对于效应子的研究主要集中在作物上, 对树木与病原菌互作中的效应子研究较少. 未来开展树木与病原菌互作时, 可利用在作物致病机制中研究较为深入的效应子, 如TAL效应子与作物寄主靶基因的特异性识别, 并借鉴其研究方法和互作的分

子特征, 进一步研究病原菌效应子与树木互作的共性和异性。

5 效应子理论和应用研究的总体评价及未来研究方向

植物抗病性的分子基础和微生物致病机制一直是研究的热点, 其中效应子在植物与病原菌互作过程中扮演重要角色。细菌、真菌和卵菌病原体将效应子分泌至质外体或植物细胞发挥作用。卵菌效应子有共有基序RXLR, 但真菌中目前尚未发现共有基序。随着基因组学和转录组学的发展, 未来效应子的分析、鉴定、克隆、功能和调控机制等都将进一步发展。充分利用不同效应子的特点和功能, 在抗病育种工作中将有广阔的应用前景。

微生物基因组学研究已鉴定出多种植物病原体的

效应子, 尤其是丝状病原体, 这为进一步探测植物免疫途径提供了坚实基础^[14]。有学者提出“效应子组学”概念, 在现代抗性育种中, 效应子成为抗性基因鉴定、功能解析和抗病分子设计育种的工具, 利用“效应子组学”为经典的抗性育种以及基因改良方法做出贡献^[75], 充分利用效应子辅助育种, 有望开创抗病研究的新局面。未来利用效应子挖掘抗病基因仍然是重点, 效应子入侵植物时, 抗病基因能被其相应的效应子激活, 参与抗病反应。深入鉴定病原菌体内的各种效应子, 基于效应子挖掘相应抗病基因将在抗病育种中发挥重要作用。此外, 病原体胁迫下的植物表观遗传修饰是抗病研究的热点和前沿, 免疫相关基因通过多种机制受到高度调节, 包括影响染色质的表观遗传变化以及基因表达的转录调控等, 深入研究表观遗传修饰与病原菌互作的分子机制, 可为植物抗病性的遗传改良提供重要的信息^[76,77]。

参考文献

- 1 Jones J D G, Dangl J L. The plant immune system. *Nature*, 2006, 444: 323–329
- 2 VAN DE Wouw A P, Howlett B J. Fungal pathogenicity genes in the age of ‘omics’. *Mol Plant Pathol*, 2011, 12: 507–514
- 3 Stergiopoulos I, de Wit P J G M. Fungal effector proteins. *Annu Rev Phytopathol*, 2009, 47: 233–263
- 4 Bolton M D, van Esse H P, Vossen J H, et al. The novel *Cladosporium fulvum* lysin motif effector Ecp6 is a virulence factor with orthologues in other fungal species. *Mol Microbiol*, 2010, 69: 119–136
- 5 Hogenhout S A, Van der Hoorn R A L, Terauchi R, et al. Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. *Mol Plant Microbe Interact*, 2009, 22: 115–122
- 6 Macho A P, Zipfel C. Targeting of plant pattern recognition receptor-triggered immunity by bacterial type-III secretion system effectors. *Curr Opin Microbiol*, 2015, 23: 14–22
- 7 Flor H H. Current status of the gene-for-gene concept. *Annu Rev Phytopathol*, 1971, 9: 275–296
- 8 Van Der Biezen E A, Jones J D G. Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem Sci*, 1998, 23: 454–456
- 9 van der Hoorn R A L, Kamoun S. From guard to decoy: A new model for perception of plant pathogen effectors. *Plant Cell*, 2008, 20: 2009–2017
- 10 Ma Z, Zhu L, Song T, et al. A paralogous decoy protects *Phytophthora sojae* apoplastic effector PsXEG1 from a host inhibitor. *Science*, 2017, 355: 710–714
- 11 Dangl J L, Horvath D M, Staskawicz B J. Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science*, 2013, 341: 746–751
- 12 Ranf S. Sensing of molecular patterns through cell surface immune receptors. *Curr Opin Plant Biol*, 2017, 38: 68–77
- 13 Li X, Kapos P, Zhang Y. NLRs in plants. *Curr Opin Immunol*, 2015, 32: 114–121
- 14 Dou D, Zhou J M. Phytopathogen effectors subverting host immunity: Different foes, similar battleground. *Cell Host Microbe*, 2012, 12: 484–495
- 15 Anderson R G, Deb D, Fedkenheuer K, et al. Recent progress in RXLR effector research. *Mol Plant Microbe Interact*, 2015, 28: 1063–1072
- 16 Henderson I R, Navarro-Garcia F, Nataro J P. The great escape: Structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiol*, 1998, 6: 370–378
- 17 Collmer A, Lindeberg M, Petnicki-Ocwieja T, et al. Genomic mining type III secretion system effectors in *Pseudomonas syringae* yields new picks for all TTSS prospectors. *Trends Microbiol*, 2002, 10: 462–469
- 18 Whisson S C, Boevink P C, Moleleki L, et al. A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. *Nature*, 2007,

- 450: 115–118
- 19 Valent B, Khang C H. Recent advances in rice blast effector research. *Curr Opin Plant Biol*, 2010, 13: 434–441
- 20 Khang C H, Berruyer R, Giraldo M C, et al. Translocation of *Magnaporthe oryzae* effectors into rice cells and their subsequent cell-to-cell movement. *Plant Cell*, 2010, 22: 1388–1403
- 21 Luo M, Dong Z Y, Lin J T. Prediction and analysis of candidate effectors from the genome of *Beauveria bassiana* (in Chinese). *J Nucl Agri Sci*, 2019, 33: 680–686 [罗梅, 董章勇, 林进添. 球孢白僵菌基因组候选效应子的预测与分析. 核农学报, 2019, 33: 680–686]
- 22 Kulkarni R D, Kelkar H S, Dean R A. An eight-cysteine-containing CFEM domain unique to a group of fungal membrane proteins. *Trends Biochem Sci*, 2003, 28: 118–121
- 23 Jiang R H Y, Tyler B M. Mechanisms and evolution of virulence in oomycetes. *Annu Rev Phytopathol*, 2012, 50: 295–318
- 24 Ma L L, Wang Y J, Sun B H, et al. Preliminary exploration for expression, purification and crystallization of RxLR101012 from *Phytophthora capsici* (in Chinese). *J Shandong Agric Univ (Nat Sci Ed)*, 2017, 48: 210–214 [马璐璐, 王玉姣, 孙柏华, 等. 辣椒疫霉效应因子RxLR101012的表达纯化与结晶初探. 山东农业大学学报(自然科学版), 2017, 48: 210–214]
- 25 Xu J, Zhang M X, Ye T Y, et al. Identification and functional analysis of PiAvr3a-like gene of *Phytophthora capsici* (in Chinese). *Acta Pathol Sin*, 2016, 46: 160–168 [许静, 张美祥, 叶廷跃, 等. 辣椒疫霉菌PiAvr3a-like基因的鉴定及功能分析. 植物病理学报, 2016, 46: 160–168]
- 26 Yang N, Zhang L, Ding P, et al. Functional analysis of an effector RxLR121504 in *Phytophthora capsici* (in Chinese). *Mycosystema*, 2017, 36: 1233–1242 [杨楠, 张丽, 丁鹏, 等. 辣椒疫霉效应分子RxLR121504功能特性的研究. 菌物学报, 2017, 36: 1233–1242]
- 27 Chen X R, Zhang Y, Huang S X, et al. Sequence polymorphism, gene transcriptional pattern and function analysis of the RXLR effector PcAvh2 from *Phytophthora capsici* (in Chinese). *Acta Microbiol Sin*, 2018, 58: 2204–2215 [陈孝仁, 张烨, 黄沈鑫, 等. 辣椒疫霉RXLR型效应子PcAvh2的序列多态性、基因转录特征及功能. 微生物学报, 2018, 58: 2204–2215]
- 28 Liu T, Song T, Zhang X, et al. Unconventionally secreted effectors of two filamentous pathogens target plant salicylate biosynthesis. *Nat Commun*, 2014, 5: 4686
- 29 Kelley B S, Lee S J, Damasceno C M B, et al. A secreted effector protein (SNE1) from *Phytophthora infestans* is a broadly acting suppressor of programmed cell death. *Plant J*, 2010, 62: 357–366
- 30 Bonas U, Stall R E, Staskawicz B. Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol Gen Genet*, 1989, 218: 127–136
- 31 Kim J G, Li X, Roden J A, et al. *Xanthomonas* T3S effector XopN suppresses PAMP-triggered immunity and interacts with a tomato atypical receptor-like kinase and TGT1. *Plant Cell*, 2009, 21: 1305–1323
- 32 Kay S, Hahn S, Marois E, et al. A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science*, 2007, 318: 648–651
- 33 Li Y Q, Wang C L, Zhao K J. Molecular recognition code between pathogenic bacterial TAL-effectors and host target genes (in Chinese). *Chin J Biotech*, 2011, 27: 1132–1141 [李岩强, 王春连, 赵开军. 病原菌TAL效应子与宿主靶基因相互识别的分子密码. 生物工程学报, 2011, 27: 1132–1141]
- 34 Boch J, Scholze H, Schornack S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 2009, 326: 1509–1512
- 35 Song T, Ma Z, Shen D, et al. An oomycete CRN effector reprograms expression of plant *HSP* genes by targeting their promoters. *PLoS Pathog*, 2015, 11: e1005348
- 36 Yin C, Ramachandran S R, Zhai Y, et al. A novel fungal effector from *Puccinia graminis* suppressing RNA silencing and plant defense responses. *New Phytol*, 2019, 222: 1561–1572
- 37 Pais M, Win J, Yoshida K, et al. From pathogen genomes to host plant processes: The power of plant parasitic oomycetes. *Genome Biol*, 2013, 14: 211
- 38 Qiao Y, Liu L, Xiong Q, et al. Oomycete pathogens encode RNA silencing suppressors. *Nat Genet*, 2013, 45: 330–333
- 39 Xiong Q, Ye W, Choi D, et al. *Phytophthora* suppressor of RNA silencing 2 is a conserved RxLR effector that promotes infection in soybean and *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact*, 2014, 27: 1379–1389
- 40 Zhang T, Zhao Y L, Zhao J H, et al. Cotton plants export microRNAs to inhibit virulence gene expression in a fungal pathogen. *Nat Plants*, 2016, 2: 16153
- 41 Hou Y, Zhai Y, Feng L, et al. A *Phytophthora* effector suppresses trans-kingdom RNAi to promote disease susceptibility. *Cell Host Microbe*, 2019, 25: 153–165.e5

- 42 Jing M, Guo B, Li H, et al. A *Phytophthora sojae* effector suppresses endoplasmic reticulum stress-mediated immunity by stabilizing plant binding immunoglobulin proteins. *Nat Commun*, 2016, 7: 11685
- 43 Nomura K, Mecey C, Lee Y N, et al. Effector-triggered immunity blocks pathogen degradation of an immunity-associated vesicle traffic regulator in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 10774–10779
- 44 Navarro L, Dunoyer P, Jay F, et al. A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science*, 2006, 312: 436–439
- 45 Su Y, Li H G, Wang Y, et al. Poplar miR472a targeting *NBS-LRRs* is involved in effective defence against the necrotrophic fungus *Cytospora chrysosperma*. *J Exp Bot*, 2018, 69: 5519–5530
- 46 Ma C, Lu Y, Bai S, et al. Cloning and characterization of miRNAs and their targets, including a novel miRNA-targeted NBS-LRR protein class gene in apple (Golden Delicious). *Mol Plant*, 2014, 7: 218–230
- 47 Jiang N, Meng J, Cui J, et al. Function identification of miR482b, a negative regulator during tomato resistance to *Phytophthora infestans*. *Hortic Res*, 2018, 5: 9
- 48 Yang L, Mu X, Liu C, et al. Overexpression of potato miR482e enhanced plant sensitivity to *Verticillium dahliae* infection. *J Integr Plant Biol*, 2015, 57: 1078–1088
- 49 Coll N S, Eppe P, Dangl J L. Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death Differ*, 2011, 18: 1247–1256
- 50 Guo M, Tian F, Wamboldt Y, et al. The majority of the type III effector inventory of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 can suppress plant immunity. *Mol Plant Microbe Interact*, 2009, 22: 1069–1080
- 51 Kazan K, Lyons R. Intervention of phytohormone pathways by pathogen effectors. *Plant Cell*, 2014, 26: 2285–2309
- 52 Thaler J S, Humphrey P T, Whiteman N K. Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends Plant Sci*, 2012, 17: 260–270
- 53 Cui H, Wang Y, Xue L, et al. *Pseudomonas syringae* effector protein AvrB perturbs *Arabidopsis* hormone signaling by activating MAP kinase 4. *Cell Host Microbe*, 2010, 7: 164–175
- 54 Jiang S, Yao J, Ma K W, et al. Bacterial effector activates jasmonate signaling by directly targeting JAZ transcriptional repressors. *PLoS Pathog*, 2013, 9: e1003715
- 55 Liu Y, Zhang S. Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2004, 16: 3386–3399
- 56 Albrecht C, Boutrot F, Segonzac C, et al. Brassinosteroids inhibit pathogen-associated molecular pattern-triggered immune signaling independent of the receptor kinase BAK1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 303–308
- 57 Goel A K, Lundberg D, Torres M A, et al. The *Pseudomonas syringae* type III effector HopAM1 enhances virulence on water-stressed plants. *Mol Plant Microbe Interact*, 2008, 21: 361–370
- 58 Boller T, He S Y. Innate immunity in plants: An arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science*, 2009, 324: 742–744
- 59 Li Y, Cao X L, Zhu Y, et al. Osa-miR398b boosts H₂O₂ production and rice blast disease-resistance via multiple superoxide dismutases. *New Phytol*, 2019, 222: 1507–1522
- 60 Dagdas Y F, Belhaj K, Maqbool A, et al. An effector of the Irish potato famine pathogen antagonizes a host autophagy cargo receptor. *eLife*, 2016, 5: e10856
- 61 Boevink P C, Wang X, McLellan H, et al. A *Phytophthora infestans* RXLR effector targets plant PP1c isoforms that promote late blight disease. *Nat Commun*, 2016, 7: 10311
- 62 Li J Y. Research progress on toxicity of plant pathogenic bacteria effect factors (in Chinese). *Guide Sci Educ*, 2016, 12: 25–27 [李金玥. 植物病原菌效应因子的毒性功能研究进展. 科教导刊, 2016, 12: 25–27]
- 63 Espinas N A, Saze H, Saijo Y. Epigenetic control of defense signaling and priming in plants. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 1201
- 64 Xu G, Greene G H, Yoo H, et al. Global translational reprogramming is a fundamental layer of immune regulation in plants. *Nature*, 2017, 545: 487–490
- 65 Xu Y H, Li Q Q, Liu L M, et al. Research progress on epigenetic regulation in rice/*Arabidopsis* against attack of pathogenic bacteria (in Chinese). *Biotech Bull*, 2018, 34: 87–95 [徐以华, 黎起秦, 刘连盟, 等. 水稻/拟南芥防御病原细菌入侵的表现遗传调控研究进展. 生物技术通报, 2018, 34: 87–95]
- 66 Yan S F, Li A L, Mao L. Research progress on the roles of RNA-directed DNA methylation pathway in plant defense (in Chinese). *Sci Agric Sin*,

- 2015, 48: 16–22 [耿帅锋, 李爱丽, 毛龙. RNA介导的DNA甲基化路径在植物抗病中的研究进展. 中国农业科学, 2015, 48: 16–22]
- 67 Chow H T, Ng D W K. Regulation of miR163 and its targets in defense against *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis thaliana*. *Sci Rep*, 2017, 7: 46433
- 68 Wang X, Basnayake B M V S, Zhang H, et al. The *Arabidopsis* ATAF1, a NAC transcription factor, is a negative regulator of defense responses against necrotrophic fungal and bacterial pathogens. *Mol Plant Microbe Interact*, 2009, 22: 1227–1238
- 69 Wu Y, Deng Z, Lai J, et al. Dual function of *Arabidopsis* ATAF1 in abiotic and biotic stress responses. *Cell Res*, 2009, 19: 1279–1290
- 70 Delessert C, Kazan K, Wilson I W, et al. The transcription factor ATAF2 represses the expression of pathogenesis-related genes in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2005, 43: 745–757
- 71 Bu Q, Jiang H, Li C B, et al. Role of the *Arabidopsis thaliana* NAC transcription factors ANAC019 and ANAC055 in regulating jasmonic acid-signaled defense responses. *Cell Res*, 2008, 18: 756–767
- 72 Lee M H, Jeon H S, Kim H G, et al. An *Arabidopsis* NAC transcription factor NAC4 promotes pathogen-induced cell death under negative regulation by microRNA164. *New Phytol*, 2017, 214: 343–360
- 73 Li Z, Pan X H, Wei S J. Overview of plant induced resistance and its mechanism (in Chinese). *Biol Disast Sci*, 2019, 42: 1–6 [李张, 潘晓华, 魏赛金. 植物诱导抗病及机制的研究进展. 生物灾害科学, 2019, 42: 1–6]
- 74 Zhang Q, Li Y, Zhang Y, et al. Md-miR156ab and Md-miR395 target WRKY transcription factors to influence apple resistance to leaf spot disease. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 526
- 75 Vleeshouwers V G A A, Oliver R P. Effectors as tools in disease resistance breeding against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic plant pathogens. *Mol Plant Microbe Interact*, 2015, 2015: 17–27
- 76 Bailey-Serres J, Ma W. An immunity boost combats crop disease. *Nature*, 2017, 545: 420–421
- 77 Li B, Meng X, Shan L, et al. Transcriptional regulation of pattern-triggered immunity in plants. *Cell Host Microbe*, 2016, 19: 641–650

Recent developments of plant pathogen effectors

YANG XiaoQian^{1,2,3}, ZHANG LiChun^{1,2,3}, LI YiWen^{1,2,3} & WANG YanWei^{1,2,3}

¹ Beijing Advanced Innovation Center for Tree Breeding by Molecular Design, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;

² National Engineering Laboratory for Tree Breeding, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;

³ Key Laboratory of Genetics and Breeding in Forest Trees and Ornamental Plants of Ministry of Education, College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

In order to successfully invade and propagate in host plants, pathogens secrete effectors as invasive weapons. There are some differences and similarities among effectors of different pathogens. The systematic identification of plant pathogen effectors and the deep knowledge of the molecular interaction between the effectors and disease resistance genes, could provide practical significance in plant pathology and disease resistance breeding research. With the continuous development of sequencing technology, plant genomics and transcriptomics are increasingly utilized in plant disease resistance research. These sequencing results can be used to identify candidate pathogenic genes as well as plant disease resistance genes, and that would provide important information to understand the interaction between pathogens and plants. In this review, the function and characterization of effectors were reviewed and compared as well as the identification methods, pathogenic functions and disease resistance of plants were highlighted based on the research progress of pathogen effectors in plants in recent years. The application of effector in plant disease resistance and its research prospects are further prospected.

pathogen, host, effector, pathogenicity, interaction

doi: [10.1360/SSV-2019-0193](https://doi.org/10.1360/SSV-2019-0193)