



Topic Insights

作物的抗病性工程——以胼胝质乳突作为潜在研究对象

Geoffrey B. Fincher

School of Agriculture, The University of Adelaide, Glen Osmond, SA 5066, Australia

1. 引言

谷类作物在为全球人类社会提供大部分日常所需的碳水化合物时，面临着被潜在致病真菌不断攻击的问题。真菌可以以多种方式穿透植物的外层，但是植物通常也会抵抗感染。然而，在某些情况下，真菌会突破植物的防线从而引发感染。重要的农作物品种被病原体攻陷后，农作物产量会下降或农作物被完全破坏，这可能会给国家和国际社会带来毁灭性的社会、环境和财产损失。在植物和致病真菌共同进化的过程中，植物已经进化出了一系列抵抗真菌感染的防御机制，而真菌也发展了新的策略来入侵、感染植物或者攻克植物现有的抗病机制。这场不断争夺“霸权”的斗争一直持续到今天，全球作物改良项目的一个关键和持续的目标是为植物提供一种（至少是暂时的）胜过真菌的优势。

因此，植物在自然界中的生存能力实际上与其调用策略的能力有着密不可分的关系，这些策略包括通过增强植物细胞壁从而在物理上阻挡真菌的入侵、产生降解入侵真菌细胞壁的水解酶，以及合成一系列抗菌分子[1,2]（吕培等及华学文等，本期）。胼胝质乳突的沉积可以阻止或抑制真菌感染。病程相关（PR）蛋白可以由植物响应微生物的攻击而产生，它包括降解几丁质的酶以及降解真菌细胞壁上的(1,3)-葡聚糖和(1,3;1,6)- β -葡聚糖的酶[3,4]。多年来，这些水解酶的过度表达已被成功用于增强作物品种的抗性[5,6]。此外，由这些酶从真菌细胞壁多糖[包括N-乙酰基壳寡糖和(1,3)- β -寡糖

苷]中分解所得的寡糖产物，可以刺激植物的二次反应，从而进一步增强作物抗性[7-9]。

本文主要阐述了植物来源的胼胝质乳突在植物-病原体相互作用中的作用、相关多糖的作用，以及参与多糖生物合成与降解过程的酶的作用。乳突的主要成分基本上是无支链的多糖(1,3)- β -葡聚糖，其通常被称为胼胝质。除了作为乳突的一个组成部分，胼胝质在植物的正常生长和发育过程中还发挥着一系列重要功能。胼胝质在细胞板形成过程中，在花粉管、花粉母细胞和胞间连丝通道等部位被发现[10]。胼胝质不是成熟细胞壁的一个组成部分，但它存在于专门的细胞壁以及质膜与细胞壁之间的周质间隙中[11]。在真菌中，有支链的(1,3;1,6)- β -葡聚糖是细胞壁的组成部分，实际上，它代表了细胞壁的核心[12]。人们对胼胝质乳突在植物-病原体相互作用中发挥的作用的日益深入了解能够为增强小麦、水稻、大麦、玉米、高粱等重要农作物抗病性工程提供一系列新的策略和遗传靶点。

2. 胼胝质的生物合成

尽管难以获得强有力的证据，但人们已经接受类葡聚糖合酶（GSL）基因会介导植物中胼胝质生物合成这一观点。植物的GSL基因与酵母的FKSI基因同源，后者负责酿酒酵母中(1,3)- β -葡聚糖的合成[13]。然而，属于糖基转移酶GT48组的植物GSL蛋白不包含(D,D,D,QxxRW)尿苷二磷酸葡萄糖（UDP-Glc）结合基序，该

结合基序在糖基转移酶GT2家族的其他葡聚糖合酶中很常见 (<http://www.cazy.org/>) [14], 尽管该葡聚糖合酶中也存在其他之前未知的UDP-Glc结合基序。或者, 某种相关蛋白也许可以进行UDP-Glc结合[15]。Li等[16]提供了将大麦的*HvGSL1*基因与(1,3)- β -葡聚糖合成联系起来的生化证据。研究人员在非变性凝胶中分离出一种部分纯化的(1,3)- β -葡聚糖合酶制剂, 并发现其中有一种分子质量超过250 kDa的蛋白质可合成(1,3)- β -葡聚糖[16]。类似地, 通过产物包埋技术从多花黑麦草 (*Lolium multiflorum*) 提取物中富集的部分纯化的(1,3)- β -葡聚糖合酶能够合成分子质量较高的(1,3)- β -葡聚糖[17]。GSL酶也可能是较大的胼胝质合酶复合物 (CSC) 的一部分, 该复合物含有许多辅助蛋白和酶[18]。

拟南芥基因组中有12个*GSL*基因, *GSL*基因沉默或*GSL*突变体功能丧失会导致不同组织中(1,3)- β -葡聚糖含量降低或完全消失[19,20]。*GSL*基因的大小差异很大, 最长可达20 kb。这些基因的结构可以被分成两组: 一组高度碎片化, 可能包含多达40个内含子; 另一组则具有0~2个内含子, 长度明显更短[19]。*GSL*基因编码分子质量超过200 kDa的蛋白质。这些蛋白质位于质膜中, 长期处于休眠状态, 直到被机械应力或入侵的微生物激活。

3. 胼胝质和真菌发病机制

当植物受到微生物入侵时, 一种常见、快速的早期反应是胼胝质塞或板在接近入侵点的地方沉积[21]。这些胼胝质沉积物被称为乳突, 这些乳突经苯胺蓝荧光染料的作用会产生明亮的荧光[22], 这使人们普遍认为乳突的主要碳水化合物组分是(1,3)- β -葡聚糖。由图1可见胼胝质乳突在真菌入侵点附近的沉积[19]。考虑到苯胺蓝荧光染料染色的相对强度与简便性, 其可被用于单株系抗性的高通量成像 (Makhija等, 本期)。

人们一般假定胼胝质乳突在物理上会阻挡或阻碍潜在在微生物病原体入侵, 但是有些证据与该假定矛盾。因此, 当大麦的*HvGSL6*基因被双链RNA干扰 (dsRNAi) 沉默时, 植物体内积累的胼胝质含量较低, 而且植物更容易受到白粉菌的感染[23]。在此情况下, 我们可以得出结论, 胼胝质在大麦对该真菌病原菌的抗性方面具有积极的作用。与之相反, 拟南芥中与大麦*HvGSL6*基因同源的一个功能缺失型胼胝质合酶*atgsl5*突变体在乳突中没有胼胝质, 但这与预期的真菌结构促进感染无关。

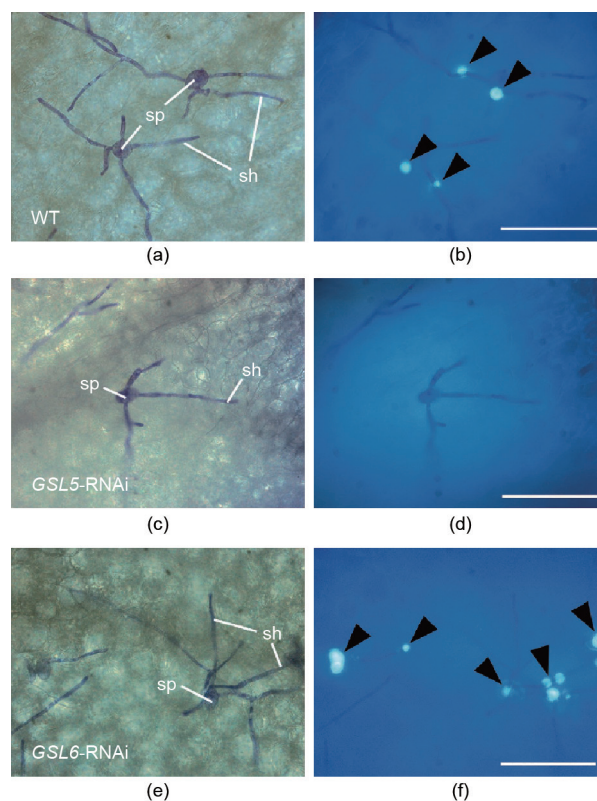


图1. 胼胝质乳突沉积。感染白粉菌 (*Blumeria graminis*) 两天后的拟南芥幼叶 (WT)。野生株系中可见真菌孢子 (sp) 和次生菌丝 (sh) (a), 用苯胺蓝荧光染料染色的野生叶片显示胼胝质乳突的强烈荧光 (b)。在双链RNA干扰 (dsRNAi) 下敲除拟南芥的*AtGSL5*基因, 真菌孢子和菌丝仍然可见 (c), 但没有胼胝质沉积 (d)。在用dsRNAi敲除一个密切相关但不同的基因 (*AtGSL6*) 的株系中, 可见正常的孢子和菌丝 (e) 以及正常的胼胝质乳突 (f) (比例尺为100 μ m)。经 The American Society of Plant Biologists 许可, 转载自参考文献[19], ©2003。

与预期不同的是, 这些植物对通常具有毒性的几种病原菌的抵抗力更强了, 而不是像最初预期的那样变得更容易受到真菌的感染[19]。这一结果归因于胼胝质或胼胝质合酶对水杨酸防御信号路径有负调控作用[24]。如果不存在胼胝质, 那么其对水杨酸路径的抑制作用便也解除了。Jacobs等[19]指出, *AtGSL*基因家族中并非所有成员都参与胼胝质的合成 (图1)。尽管这些例子有助于强调植物抗病机制相互作用的复杂性, 但它们也提高了在农作物保护中使用基于RNA的生物防治手段的可能性 (Bramlett等, 本期)。

4. 乳突中的其他靶向多糖

如上所述, 人们通常认为在植物-病原体相互作用中观察到的乳突含有胼胝质, 而且胼胝质是乳突的主要的多糖成分。然而, 有人认为乳突中可能还含有其他多糖、蛋白质和酚类化合物[25]。Chowdhury等[26]使用

一系列抗体和碳水化合物结合模块证明, 大麦叶片受到白粉菌 *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (*Bgh*) 入侵后形成的乳突中除了含有胼胝质外, 还含有相对大量的纤维素、阿拉伯木聚糖和酚类物质。酚类物质可能是阿魏酸残基与阿拉伯木聚糖共价结合的产物。研究人员进一步表明, 这三种多糖在有效乳突中的浓度高于无效乳突中的浓度。乳突具有层状结构, 其内核由胼胝质和阿拉伯木聚糖组成, 外层含有阿拉伯木聚糖和纤维素(图2)[26]。

阿拉伯木聚糖和纤维素与抗入侵性之间的联系为改善乳突组分和增强抗病性开辟了新的方向。此外, 研究人员已证明, 与异木聚糖生物合成相关的基因确实会影响大麦对白粉菌入侵的抗性[27]。因此, 对于大麦 *GT43* 和 *GT47* 这两个似乎都参与异木聚糖生物合成过程的基因而言, 尽管它们的过表达对抗病性没有明显的影响, 但是它们的瞬时诱导基因沉默会增加植物对病原体入侵的敏感性[27]。

5. 结论

尽管植物-病原体相互作用复杂、植物抵抗病原体入侵方式多样、病原体为突破植物多重防线运用多种策略, 但是随着我们对乳突的组成和精细结构的深入了解, 以及对植物抵抗微生物入侵的反应机制的进一步理解, 我们在控制微生物疾病方面发现了新的靶基因。研究人员可以在传统育种计划和生物技术方法中运用这些基因知识, 以增强重要农作物抵抗病原体入侵的能力。在日益恶化的气候条件下, 如果我们要继续提高农作物的生产力, 为迅速增长的世界人口提供粮食, 那么在植物工程领域取得的成功便至关重要。

References

- [1] Bohlmann H, Clausen S, Behnke S, Giese H, Hiller C, Reimann-Philipp U, et al. Leaf-specific thionins of barley— a novel class of cell wall proteins toxic to plant-pathogenic fungi and possibly involved in the defence mechanism of plants. *EMBO J* 1988;7:1559–65.
- [2] Stintzi A, Heitz T, Prasad V, Wiedemann-Merdinoglu S, Kauffmann S, Geoffroy

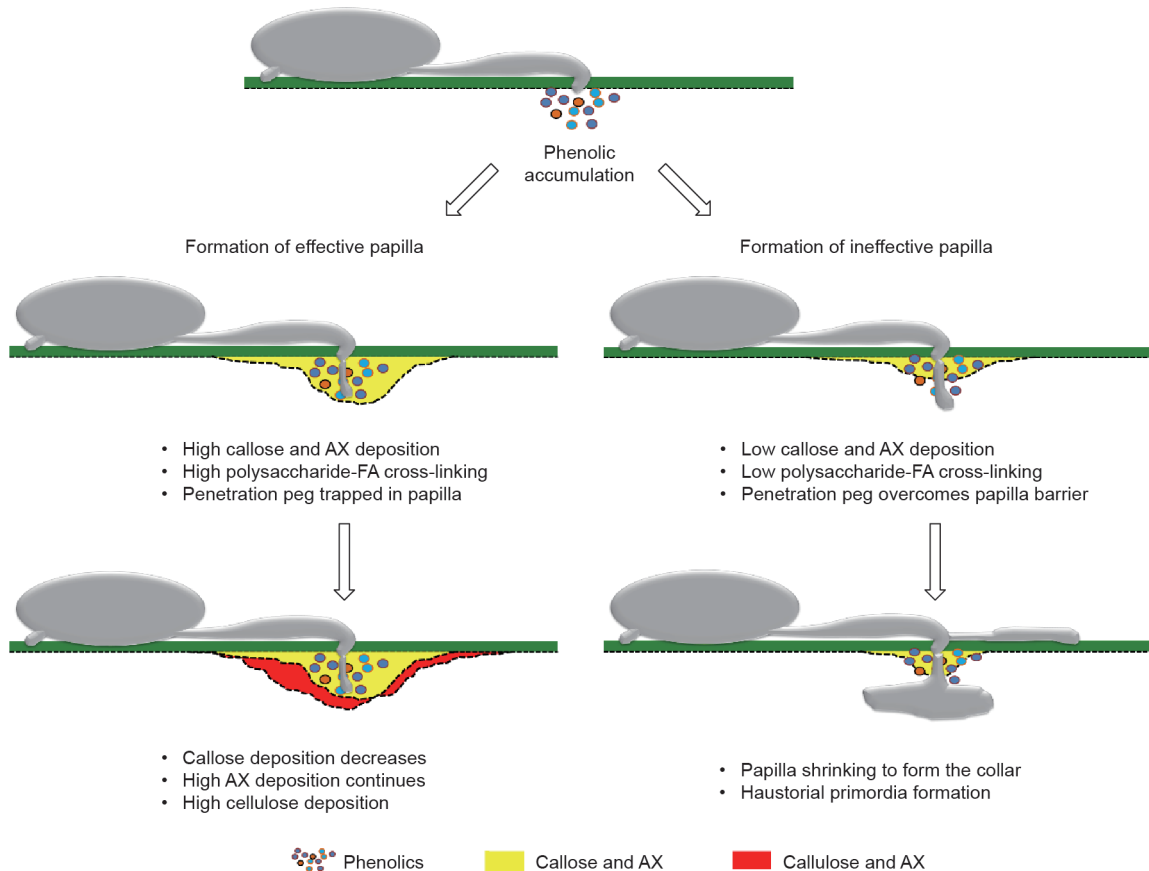


图2. 该模型展示了多糖在有效乳突和无效乳突中的沉积。在大麦叶片-白粉菌相互作用下产生的有效乳突(左侧)中, 胼胝质、阿拉伯木聚糖和纤维素的含量比无效乳突(右侧)中的更高, 并且阻挡了真菌入侵栓。在无效的乳突中, 入侵栓突破了乳突的阻碍。经John Wiley & Sons, Inc. 许可, 转载自参考文献[26], ©2014。

- P, et al. Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie* 1993;75(8):687–706.
- [3] Roulin S, Xu P, Brown AHD, Fincher GB. Expression of specific (1→3)- β -glucanase genes in leaves of near-isogenic resistant and susceptible barley lines infected with the leaf scald fungus (*Rhynchosporium secalis*). *Physiol Mol Plant Pathol* 1997;50(4):245–61.
- [4] Kasprzewska A. Plant chitinases— regulation and function. *Cell Mol Biol Lett* 2003;8(3):809–24.
- [5] Moosa A, Farzand A, Sahi ST, Khan SA. Transgenic expression of antifungal pathogenesis-related proteins against phytopathogenic fungi—15 years of success. *Isr J Plant Sci* 2018;65(1–2):38–54.
- [6] Ali S, Ganai BA, Kamili AN, Bhat AA, Mir ZA, Bhat JA, et al. Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. *Microbiol Res* 2018;212–213:29–37.
- [7] Kaku H, Shibuya N, Xu P, Aryan AP, Fincher GB. *N*-acetylchitooligosaccharides elicit expression of a single (1→3)- β -glucanase gene in suspension-cultured cells from barley (*Hordeum vulgare*). *Physiol Plant* 1997;100(1):111–8.
- [8] Vorwerk S, Somerville S, Somerville C. The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends Plant Sci* 2004;9(4):203–9.
- [9] Mérida H, Sopena-Torres S, Bacete L, Garrido-Arandia M, Jordá L, López G, et al. Non-branched β -1,3-glucan oligosaccharides trigger immune responses in *Arabidopsis*. *Plant J* 2017;93(1):34–49.
- [10] Bacic A, Fincher GB, Stone BA, editors. *Chemistry, biochemistry, and biology of (1→3)- β -glucans and related polysaccharides*. Philadelphia: Elsevier; 2009.
- [11] Brownfield L, Doblin M, Fincher GB, Bacic A. Biochemical and molecular properties of biosynthetic enzymes for (1,3)- β -glucans in embryophytes, chlorophytes and rhodophytes. In: Bacic A, Fincher GB, Stone BA, editors. *Chemistry, biochemistry, and biology of (1→3)- β -glucans and related polysaccharides*. Philadelphia: Elsevier; 2009. p. 283–326.
- [12] Latgé JP. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol Microbiol* 2007;66(2):279–90.
- [13] Cui X, Shin H, Song C, Laosinchai W, Amano Y, Brown RM Jr. A putative plant homolog of the yeast β -1,3-glucan synthase subunit FKS1 from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) fibers. *Planta* 2014;213:223–30.
- [14] Lombard V, Golaconda Ramulu H, Druela E, Coutinho PM, Henrissat B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res* 2014;42(D1):D490–5.
- [15] Delmer DP, Solomon M, Read SM. Direct photolabeling with [32 P]UDP-glucose for identification of a subunit of cotton fiber callose synthase. *Plant Physiol* 1991;95(2):556–63.
- [16] Li J, Burton RA, Harvey AJ, Hrmova M, Wardak AZ, Stone BA, et al. Biochemical evidence linking a putative callose synthase gene with (1→3)- β -D-glucan biosynthesis in barley. *Plant Mol Biol* 2003;53(1–2):213–25.
- [17] Bulone V, Fincher GB, Stone BA. In vitro synthesis of a microfibrillar (1→3)- β -glucan by a ryegrass (*Lolium multiflorum*) endosperm (1→3)- β -glucan synthase enriched by product entrapment. *Plant J* 1995;8(2):213–25.
- [18] Verma DPS, Hong Z. Plant callose synthase complexes. *Plant Mol Biol* 2001;47(6):693–701.
- [19] Jacobs AK, Lipka V, Burton RA, Panstruga R, Strizhov N, Schulze-Lefert P, et al. An *Arabidopsis thaliana* callose synthase, *GSL5*, is required for wound and papillary callose formation. *Plant Cell* 2003;15(11):2503–13.
- [20] Töller A, Brownfield L, Neu C, Twell D, Schulze-Lefert P. Dual function of *Arabidopsis* glucan synthase-like genes *GSL8* and *GSL10* in male gametophyte development and plant growth. *Plant J* 2008;54(5):911–23.
- [21] Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY, Hunt MD. Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 1996;8(10):1809–19.
- [22] Stone BA, Evans NA, Bonig I, Clarke AE. The application of Sirofluor, a chemically defined fluorochrome from aniline blue for the histochemical detection of callose. *Protoplasma* 1985;122:191–5.
- [23] Chowdhury J, Schober MS, Shirley NJ, Singh RR, Jacobs AK, Douchkov D, et al. Down-regulation of the glucan synthase-like 6 gene (*HvGsl6*) in barley leads to decreased callose accumulation and increased cell wall penetration by *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. *New Phytol* 2016;212(2):434–43.
- [24] Nishimura MT, Stein M, Hou BH, Vogel JP, Edwards H, Somerville SC. Loss of a callose synthase results in salicylic acid-dependent disease resistance. *Science* 2003;301(5635):969–72.
- [25] Smart MG, Aist JR, Israel HW. Structure and function of wall appositions. 1. General histochemistry of papillae in barley coleoptiles attacked by *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Can J Bot* 1986;64(4):793–801.
- [26] Chowdhury J, Henderson M, Schweizer P, Burton RA, Fincher GB, Little A. Differential accumulation of callose, arabinoxytan and cellulose in nonpenetrated versus penetrated papillae on leaves of barley infected with *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. *New Phytol* 2014;204(3):650–60.
- [27] Chowdhury J, Lück S, Rajaraman J, Douchkov D, Shirley NJ, Schwerdt JG, et al. Altered expression of genes implicated in xylan biosynthesis affects penetration resistance against powdery mildew. *Front Plant Sci* 2017;8:445.