

# 植物病原真菌抑制几丁质触发植物免疫反应的策略

许铭<sup>#</sup>, 徐婧<sup>#</sup>, 刘慧泉<sup>\*</sup>

(西北农林科技大学植物保护学院, 杨凌 712100)

**摘要:** 几丁质是真菌细胞壁的重要成分, 其晶体结构使真菌细胞壁具有一定的强度和硬度, 对植物病原真菌侵染结构和侵染菌丝的形成具有重要作用。在植物与真菌互作过程中, 植物分泌的几丁质酶可以降解真菌的几丁质产生几丁质寡糖, 几丁质寡糖作为一种病原相关分子模式(PAMP), 能够被植物细胞膜上的几丁质受体识别进而触发植物免疫反应。植物病原真菌为了成功侵染植物进化出了多种策略抑制几丁质触发的植物免疫反应, 具体而言, 植物病原真菌分泌大量的效应蛋白、多糖或几丁质脱乙酰化酶、几丁质酶、蛋白酶等效应子抑制植物的免疫反应。这些效应子被分泌到植物细胞质外体或细胞内部破坏植物免疫系统, 促进病原真菌在植物细胞中获取营养物质以供其定殖和生长发育。本文综述了植物识别几丁质的分子机制以及植物病原真菌抑制几丁质触发植物免疫反应的主要策略, 并对今后的研究前景进行了展望。

**关键词:** 几丁质; 植物免疫; 效应蛋白; 几丁质脱乙酰化酶; 几丁质酶

## Strategies of plant pathogenic fungi to inhibit chitin-triggered plant immune responses

XU Ming<sup>#</sup>, XU Jing<sup>#</sup>, LIU Huiquan<sup>\*</sup> (College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

**Abstract:** Chitin is an important component of fungal cell wall. It imparts strength and rigidity to fungal cell wall due to its crystalline nature. Chitin plays an important role in infection-related morphogenesis of phytopathogenic fungi, such as the infection structure and the infection hyphae. During the interaction between plants and plant pathogenic fungi, chitinases secreted by plants can degrade chitin to chitin oligomers. As a pathogen-associated molecular pattern (PAMP), chitin oligomer can be recognized by the membrane-located chitin receptors to stimulate plant immune responses. To successfully infect plants, plant pathogenic fungi have evolved a variety of strategies to inhibit the chitin-triggered plant immunity responses. Specifically, plant pathogenic fungi secrete many proteins such as effector proteins, polysaccharides or chitin deacetylases, chitinases and proteases to inhibit the plant defense responses. These proteins are secreted into the apoplast or inside the cell to destroy the plant immune system, which promotes the nutrient acquisition, colonization, growth, and development of the pathogenic fungi. This review summarizes the molecular mechanism of chitin recognition in plants and the main strategies to inhibit chitin-triggered plant immune responses of plant pathogenic fungi. We also discuss future research trends in this field.

**Keywords:** chitin; plant immunity; effector protein; chitin deacetylase; chitinase

收稿日期: 2023-02-12; 修回日期: 2023-04-07; 网络首发时间: 2023-08-10

网络首发地址: <https://link.cnki.net/urlid/11.2184.Q.20230810.1214.001>

基金项目: 中国博士后科学基金第15批特别资助(2022T150537)

通信作者: 刘慧泉, 博士, 教授, 主要从事植物病原真菌功能基因组学研究; E-mail: liuhuiquan@nwsuaf.edu.cn

第一作者: 许铭, 博士, 副教授, 主要从事植物病原真菌与寄主互作机制研究; E-mail: xuming@nwafu.edu.cn;

徐婧, 硕士研究生, 研究方向为植物病理学; E-mail: xujing\_@nwafu.edu.cn。

中图分类号: S432.1

文献标识码: A

文章编号: 0412-0914(2024)01-0015-11

## 0 引言

在自然界中,植物长期遭受病原真菌的侵袭,由真菌引起的病害占全部植物病害的 80% 以上。在植物与病原菌的长期协同进化过程中,植物逐渐进化出复杂的免疫系统抵御病原菌的入侵。植物免疫系统主要包含两个层次:病原相关分子模式触发的免疫(pattern-triggered immunity, PTI)和效应蛋白触发的免疫(effector-triggered immunity, ETI)。第一层是植物通过细胞膜上的模式识别受体(pattern recognition receptors, PRR)识别保守的病原相关分子模式(pathogen-associated molecular pattern, PAMP)而触发的基础免疫反应。第二层是植物通过细胞质内的免疫受体(NB-LRR 蛋白)直接或间接识别胞质内效应蛋白以激发抗性反应,这一过程被称为效应蛋白触发的免疫<sup>[1-2]</sup>。在病原真菌侵染植物的过程中,PTI 作为第一道基础免疫防线,参与植物广谱抗病过程<sup>[1]</sup>。几丁质是植物病原真菌中广泛存在的 PAMP,其能够被植物细胞膜上的几丁质受体识别,进而触发植物免疫反应<sup>[3]</sup>。植物病原真菌为了成功侵染植物,通过分泌效应子阻止几丁质受体识别几丁质寡糖、干扰免疫信号转导,而抑制 PTI 的激活。目前,已经发现植物病原真菌可以通过多种途径抑制几丁质触发的植物免疫反应,如阻断植物几丁质酶对几丁质的降解、与几丁质受体竞争性结合几丁质寡糖、使几丁质或几丁质寡糖脱乙酰化、抑制免疫信号的转导过程。大多数病原真菌利用质外体效应蛋白通过阻断植物几丁质受体对几丁质寡糖的识别,能够逃避第一层基础免疫,为病原真菌在植物中的侵染定殖创造有利条件。由于植物真菌病害防治长期以化学药剂防治为主,近年来,菌株抗药性、农药残留、环境污染等问题日益突出<sup>[4-5]</sup>。因此,研究几丁质触发植物免疫的分子机制及病原真菌抑制几丁质触发植物免疫的策略不仅有利于全面解析病原真菌与植物的互作机理,而且为创制广谱持久抗病材料提供理论基础,进而促进高效绿色经济的综合病害防控策略的集成。本文综述了植物识别几丁质的机制以及病原真菌抑制几丁质触发免疫反应的策略,对近些年在该领域取得的研究成果进行总结。

## 1 几丁质触发的植物免疫反应

植物病原真菌与植物之间的互作处于一种动态过程,这是二者经过长期协同进化形成的结果<sup>[6]</sup>。几丁质是植物病原真菌细胞壁中高度保守的重要组成成分,也是典型的 PAMP 分子之一。几丁质是 N-乙酰氨基葡萄糖通过  $\beta$ -1,4 糖苷键连接形成的多糖,广泛存在于真菌和甲壳类动物中,但不存在于植物中<sup>[7-8]</sup>。因此,植物中的几丁质酶基因在生物进化过程中被保留下来,当病原真菌侵袭植物时,植物几丁质酶将真菌细胞壁中的几丁质直接降解为几丁质寡糖,进而触发植物免疫反应(包括活性氧爆发、胼胝质积累、防卫相关基因的表达等),保护植物免受病原真菌的侵染<sup>[9-10]</sup>。

## 2 植物对几丁质的感知

在植物与病原真菌互作过程中,来源于病原真菌的 PAMP、效应子和位于植物细胞膜上的识别受体发挥着重要作用<sup>[11-12]</sup>。几丁质作为病原真菌中广泛存在的 PAMP,能够被植物细胞膜上的 PRR 识别,通过结合形成同源、异源二聚体或异源多聚体,以受体复合体的形式启动免疫信号的传递,进而激活植物下游免疫反应<sup>[3, 13-14]</sup>。水稻几丁质激发子结合蛋白(*Oryza sativa* chitin elicitor binding protein, OsCEBiP)是最早被鉴定出来的几丁质受体,OsCEBiP 属于含 LysM 结构域的一类受体蛋白(Receptor-like protein, RLP),*OsCEBiP* 沉默后的植株中,几丁质诱导的活性氧爆发被严重抑制,表明 OsCEBiP 参与感知几丁质以及将免疫信号传递到胞内的过程<sup>[3]</sup>。OsCEBiP 是几丁质寡糖的高亲和力和受体,在水稻中还存在另外两个类受体蛋白 OsLYP4 和 OsLYP6,它们对几丁质寡糖的亲合力低于 OsCEBiP<sup>[15]</sup>。由于 OsCEBiP、OsLYP4、OsLYP6 不具有激酶结构域(kinase domain, KD),因此需要与其他具有激酶结构域的活性蛋白共同作用才能将信号传递到胞内<sup>[16]</sup>。经研究发现,水稻中存在一种几丁质激发子受体激酶(chitin elicitor receptor kinase, CERK) OsCERK1,其具有胞内激酶结构域,能够自身形成同源二聚体或与 OsCEBiP 形成异源二聚体<sup>[17]</sup>。在没有几丁质诱导

的情况下,OsCEBiP 自身或与 OsLYP4 形成低聚体,几丁质诱导能够促进 OsCEBiP 的同源二聚化以及 OsCEBiP 与 OsCERK1 的异源二聚化,最终导致 OsCERK1 形成同源二聚体,进而通过磷酸化激活水稻中的免疫反应<sup>[16-17]</sup>。

随后,拟南芥中的几丁质激发子受体激酶 AtCERK1 很快被鉴定出来<sup>[18-19]</sup>。AtCERK1 被敲除后,几丁质触发的免疫反应几乎完全消失,包括活性氧爆发、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)级联反应启动和免疫相关基因的表达被严重抑制,说明 AtCERK1 在几丁质信号转导过程中起着关键作用。AtCERK1 属于 LysM 类的受体激酶,胞外含有 3 个 LysM 结构域,与 OsCEBiP 不同的是,AtCERK1 具有一个胞内激酶结构域<sup>[18]</sup>。经研究发现,AtCERK1 通过 1 个 LysM 结构域与几丁质寡糖末端的 3 个 N-乙酰氨基葡萄糖结合,进而诱导 AtCERK1 形成同源二聚体,激活胞内激酶结构域将免疫信号传递到胞内触发免疫反应<sup>[15]</sup>。进一步研究发现,AtLYK5 是几丁质寡糖的高亲和力受体,几丁质能够诱导 AtLYK5 与 AtCERK1 的异源二聚化和 AtCERK1 的同源二聚化。值得注意的是,几丁质诱导 AtLYK5 与 AtCERK1 的异源二聚化强于 AtCERK1 的同源二聚化,因为 AtCERK1 的同源二聚化需要 AtLYK5 参与,所以 AtCERK1 的同源二聚化可能是由 AtLYK5 与 AtCERK1 的异源二聚化驱动形成的<sup>[15, 20-21]</sup>。除此之外,AtLYK4 是参与几丁质信号通路的第三个受体激酶,它可以与 AtLYK5 和 AtCERK1 相互作用,同时对几丁质具有一定的亲和力,这表明 AtLYK4 可能是一个次要的几丁质受体或者发挥支架作用以稳定几丁质受体复合物<sup>[20, 22]</sup>。

总的来说,植物细胞膜上的几丁质受体需要感知几丁质激发子,被几丁质诱导后形成受体复合物,将几丁质激发的免疫信号传递到细胞内启动一系列免疫反应,以抵御病原真菌的攻击。在此过程中,CERK1 是不可或缺的关键蛋白,与其他受体蛋白或受体激酶相互结合为不同形式的受体复合物,通过胞内激酶结构域将信号传递到植物细胞内。植物对几丁质识别的分子机制在水稻和拟南芥中的研究已较为明确,这为在其他植物上的研究奠定良好的基础。

### 3 植物病原真菌抑制几丁质触发免疫反应的策略

在病原真菌侵染植物的过程中,植物通过 PRR 识别 PAMP 启动 PTI 免疫反应,阻止了非适应性病原真菌的入侵<sup>[23]</sup>。几丁质聚合度和乙酰化程度在诱导植物 PTI 免疫反应方面发挥关键作用,研究表明,只有聚合度大于 6 的几丁质寡糖才可以触发植物 PTI 免疫反应,而且,随着几丁质乙酰化程度越高,触发 PTI 免疫反应的能力越强<sup>[24]</sup>。病原真菌通过分泌不同功能的效应子干扰或逃避植物对几丁质寡糖的识别,从而抑制 PTI 免疫反应,帮助病原真菌成功侵染植物(表 1)。具体策略如下:

#### 3.1 植物病原真菌蛋白酶直接降解植物几丁质酶

在病原真菌侵染植物的过程中,植物细胞分泌几丁质酶水解病原真菌细胞壁的几丁质,产生几丁质寡糖作为 PAMP 诱导植物免疫反应。另一方面,植物病原真菌的胞外蛋白酶破坏植物几丁质酶的活性。尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)可以分泌金属蛋白酶 FoMep1 和丝氨酸蛋白酶 FoSep1 降解番茄几丁质酶阻止几丁质寡糖的产生,FoMep1 和 FoSep1 双敲除突变体对番茄几丁质酶 SlChi1 和 SlChi13 的抑制能力降低,使病原菌的致病力下降<sup>[25]</sup>。玉蜀黍黑粉菌(*Ustilago maydis*)分泌的金属蛋白酶 UmFly1 通过降解植物几丁质酶以促进病原菌的侵染,增强了病原真菌抑制植物免疫的能力<sup>[26]</sup>。大丽轮枝菌(*Verticillium dahlia*)分泌蛋白酶 VdSSEP1 水解棉花几丁质酶 Chi28,从而抑制植物免疫<sup>[27]</sup>。这些植物病原真菌蛋白酶通过降解寄主几丁质酶,减少病菌与寄主互作过程中几丁质寡糖的产生,进而削弱几丁质寡糖激发的植物免疫。

#### 3.2 植物病原真菌阻止植物几丁质酶降解几丁质

植物几丁质酶降解几丁质产生的几丁质寡糖可以触发植物免疫,植物病原真菌通过分泌效应蛋白竞争性结合几丁质进而保护病菌细胞壁阻止几丁质的降解并抑制几丁质触发的植物免疫。番茄叶霉病菌(*Cladosporium fulvum*)分泌的效应蛋白 Avr4 可以与病菌细胞壁中的几丁质结合,阻止寄主几丁质酶对几丁质的降解,以此达到保护病原真菌细胞壁和抑制几丁质触发植物免疫的目的<sup>[28-29]</sup>。禾生球腔菌(*Mycosphaerella graminicola*)

Table 1 Strategies of plant pathogenic fungi to suppress chitin triggered plant immune responses

Type	Species	Protein	Function
Plant pathogenic fungi prote-ases directly degrade plant chitinase <sup>a</sup>	<i>Fusarium oxysporum</i> <sup>[25]</sup>	FoMep1 ,FoSep1	Degrading tomato chitinase prevents the production of chitin oligomers
	<i>Ustilago maydis</i> <sup>[26]</sup>	UmFly1	Degrading maize chitinase ZmChi
	<i>Verticillium dahlia</i> <sup>[27]</sup>	VdSSEP1	Degrading cotton chitinase Chi28
Plant pathogenic fungi effec-tor protein prevent chitinase from degrading chitin <sup>b</sup>	<i>Cladosporium fulvum</i> <sup>[28-29]</sup>	Avr4	Binds to chitin and protects fungal cell walls
	<i>Mycosphaerella graminicola</i> <sup>[30]</sup>	Mg1LysM ,Mg3LysM	Binds to chitin and protects fungal cell walls, Mg3LysM inhibits chitin-triggered plant immune responses
	<i>Magnaporthe oryzae</i> <sup>[31]</sup>	α-1,3-glucan	Mounting on the surface of infectious hyphae to shield off plant chitinases
	<i>Parastagonospora nodorum</i> <sup>[32]</sup>	SnTox1	Binding to chitin and protects fungal cell walls
	<i>V. dahlia</i> <sup>[33]</sup>	VdCP1	Binding to chitin and protects fungal cell walls
	<i>V. nonalfalfae</i> <sup>[34]</sup>	VnaChtBP	Binding to chitin and protects fungal cell walls
	<i>Ma. oryzae</i> <sup>[35]</sup>	MoChi1	Binding to chitin and protects fungal cell walls
	<i>Cl. fulvum</i> <sup>[36]</sup>	Ecp6	Binding to chitin oligomers prevents chitin receptors from recognizing chitin oligomers
Plant pathogenic fungi effec-tor protein prevent chitin receptors from recognizing chitin oligomers <sup>c</sup>	<i>Ma. oryzae</i> <sup>[37]</sup>	Slp1	Binding to chitin oligomers
	<i>Colletotrichum higginsianum</i> <sup>[38]</sup>	ChELP1 ,ChELP2	Binding to chitin or chitin oligomers
	<i>Moniliophthora perniciosa</i> <sup>[39]</sup>	MpChi	Binding to chitin oligomers
	<i>Rhizoctonia solani</i> <sup>[40]</sup>	RsLysM	Binding to chitin oligomers
	<i>V. nonalfalfae</i> <sup>[34]</sup>	VnaChtBP	Competing with the chitin receptor CEBiP to bind chitin oligomers
	<i>Ma. oryzae</i> <sup>[41]</sup>	MoAa91	Competing with the OsCEBiP to bind chitin oligomers
	<i>Ustilaginoidea virens</i> <sup>[42]</sup>	UvCBP1	Competing with the OsCEBiP to bind chitin oligomers

( Continued Table 1 )

Type	Species	Protein	Function
Deacetylation of chitin oligomers into chitosan that cannot trigger plant immunity <sup>d</sup>	<i>Podosphaera xanthii</i> <sup>[43]</sup>	PEC1666, PEC1961, PEC2158, PEC5191	Degrading chitin oligomers
	<i>Po. xanthii</i> <sup>[44]</sup>	PxCDA3	Binding to chitin oligomers and inhibits the activation of chitin signaling pathways
	<i>Plasmodiophora brassicae</i> <sup>[45]</sup>	PbChiB2, PbChiB4	Binding to chitin oligomers and inhibits the activation of MPK3 and MPK6 signaling pathways
	<i>V. dahlia</i> <sup>[46]</sup>	VdPDA1	Deacetylation of chitin oligomers into chitosan
	<i>F. oxysporum</i> <sup>[46]</sup>	FovPDA1	Deacetylation of chitin oligomers into chitosan
Inhibits chitin-triggered immune signal transduction <sup>e</sup>	<i>Puccinia striiformis</i> f.sp. <i>tritici</i> <sup>[47]</sup>	Pst_13661	Deacetylation of chitin oligomers into chitosan
	<i>Ustilago maydis</i> <sup>[48]</sup>	CDAs	Deacetylation of chitin oligomers into chitosan
	<i>Colletotrichum orbiculare</i> <sup>[49]</sup>	CoNIS1	CoNIS1 interacts with BAK1 and BIK1, disrupting the interaction between BIK1 and RBOHD and preventing BIK1 phosphorylated RBOHD-mediated ROS bursting
	<i>Ma. oryzae</i> <sup>[49]</sup>	MoNIS1	It interacts with BIK1, inhibits the interaction between BIK1 and RBOHD, and interferes with chitin induced ROS burst
	<i>Ma. oryzae</i> <sup>[50]</sup>	AvrPiz-t	Targeting OsRac1 and interferes with chitin inducing ROS accumulation
	<i>Ustilaginoidea virens</i> <sup>[51]</sup>	SCRE6	It interacts with OsMPK6 and dephosphorylates it to enhance stability and inhibit immunity in rice

a; Fungi secrete protease to degrade plant chitinase and prevent the production of chitin oligomers; b; Fungi secrete chitin-binding proteins or chitinases that prevent plant chitinases from producing chitin oligomers and protect fungal cell walls; c; Fungi secrete effector proteins into exosomes, which bind directly or compete with chitin receptors to bind chitin oligomers; d; Fungi secrete polysaccharide or chitin deacetylase to convert chitin to chitosan to escape plant immune response; e; Fungi secrete effector proteins into plant cells that interfere with chitin signaling.



分泌的效应蛋白 Mg1LysM 和 Mg3LysM 都可以与几丁质结合,保护病原真菌细胞壁不被植物几丁质酶降解,虽然 Mg1LysM 和 Mg3LysM 都能结合几丁质,但是只有 Mg3LysM 能够阻断几丁质触发的植物免疫反应<sup>[30]</sup>。死体营养型病原真菌 (*Parasitagonospora nodorum*) 效应蛋白 SnTox1 具有双重功能,不仅可以诱导细胞死亡以获取营养物质,而且该效应蛋白可以通过结合几丁质保护真菌细胞壁免受几丁质酶的作用,从而阻止几丁质寡糖的释放,进而躲避几丁质触发的植物免疫<sup>[32]</sup>。在大丽轮枝菌 (*V. dahlia*) 中鉴定出一个保守的效应蛋白 VdCP1,此蛋白具有几丁质结合特性,且 *vdcpl* 敲除突变体对几丁质酶处理敏感,说明 VdCP1 可以保护真菌细胞壁不受降解<sup>[33]</sup>。非苜蓿轮枝菌 (*V. nonalfalfae*) 分泌一种与几丁质结合的蛋白 VnaChtBP,能够与几丁质结合保护病原真菌菌丝不被植物几丁质酶降解。除此之外,VnaChtBP 还能消除几丁质诱导的活性氧爆发,表明 VnaChtBP 是几丁质触发植物免疫的抑制因子<sup>[34]</sup>。近几年的研究表明,植物病原真菌可以利用自身分泌的几丁质酶逃避几丁质触发的植物免疫。稻瘟病菌 (*Magnaporthe oryzae*) 的胞外几丁质酶 MoChi1 可以竞争性结合几丁质并抑制几丁质触发的植物免疫<sup>[35]</sup>。此外,植物病原真菌通过对细胞壁进行修饰降低植物对几丁质的降解,例如,稻瘟病菌 (*Ma. oryzae*) 利用  $\alpha$ -1,3-葡聚糖合酶产生植物不可降解的  $\alpha$ -1,3-葡聚糖附着在真菌菌丝表面,阻断植物几丁质酶降解几丁质产生几丁质寡糖,实现逃避几丁质触发的免疫反应<sup>[31]</sup>。

### 3.3 植物病原真菌效应蛋白阻止几丁质受体识别几丁质寡糖

大多数植物病原真菌分泌效应蛋白到质外体中与几丁质寡糖结合,阻止植物几丁质受体识别几丁质寡糖<sup>[52]</sup>。例如,番茄叶霉病菌 (*Cladosporium fulvum*) 分泌具有 3 个 LysM 结构域的效应蛋白 Ecp6,其与几丁质寡糖高度亲和,能够与几丁质受体竞争性结合几丁质寡糖,阻止几丁质受体对几丁质寡糖的识别。虽然 Ecp6 可以与细胞壁上的几丁质结合,但不具有保护病原真菌细胞壁的功能<sup>[36]</sup>。稻瘟病菌 (*Ma. oryzae*) 分泌的 Slp1 和水稻纹枯病菌 (*Rhizoctonia solani*) 分泌的 RsLysM 都能与几丁

质寡糖特异性结合,帮助病原真菌逃避植物免疫反应<sup>[37,40]</sup>。希金斯炭疽菌 (*Colletotrichum higginsianum*) 编码包含 LysM 结构域的效应蛋白 ChELP1 和 ChELP2,对几丁质和几丁质寡糖具有高亲和力,并且这两个效应蛋白都能抑制拟南芥中几丁质触发的 MAPK 通路激活,ChELP1 和 ChELP2 对附着胞穿透拟南芥表皮细胞和病原菌致病力至关重要<sup>[38]</sup>。

除了含 LysM 结构域的效应蛋白,一些其他类型的效应蛋白也可以竞争结合几丁质寡糖,或将几丁质寡糖降解产生不能触发植物免疫的更小聚合度的几丁质寡糖,从而抑制几丁质受体对几丁质寡糖的结合。非苜蓿轮枝菌 (*V. nonalfalfae*) 分泌的几丁质结合蛋白 VnaChtBP 也具有与几丁质受体竞争结合几丁质寡糖的功能,阻止几丁质受体识别几丁质寡糖<sup>[34]</sup>。可可丛枝病菌 (*Moniliophthora perniciosa*) 进化出一种几丁质酶类效应蛋白 Mp-Chi,该蛋白丧失了几丁质酶活性,但保留了对几丁质寡糖的结合活性,并通过结合游离的几丁质寡糖来阻止几丁质触发的免疫反应<sup>[39]</sup>。瓜类白粉菌 (*Podosphaera xanthii*) 具有一类有几丁质酶活性的效应蛋白 (EWCA),研究表明 PEC1666、PEC1961、PEC2158 和 PEC5191 可以将几丁质寡糖降解产生不能触发植物免疫的更小聚合度的几丁质寡糖,进而达到抑制植物免疫的目的<sup>[43]</sup>。此外,瓜类白粉病菌 (*Po. xanthii*) 编码一个几丁质结合蛋白 PxC-DA3,该蛋白缺少大部分几丁质脱乙酰化酶结构域,但保留了碳水化合物结合模块,能够与几丁质寡糖结合,并阻止几丁质信号通路的激活,抑制几丁质触发的植物免疫反应<sup>[44]</sup>。芸薹根肿菌 (*Plasmodiophora brassicae*) 分泌两个属于 CBM18 家族的效应蛋白 PbChiB2 和 PbChiB4,均含有几丁质结合域,可以与几丁质寡糖结合,抑制 MPK3 和 MPK6 信号通路的激活,进而抑制几丁质触发的植物防御反应<sup>[45]</sup>。此外,稻瘟菌 (*Ma. oryzae*) 分泌的几丁质结合蛋白 MoAa91 和稻曲病菌 (*Ustilagoideae virens*) 分泌的效应蛋白 UvCBP1 都能与水稻几丁质受体 OsCEBiP 竞争结合游离的几丁质寡糖,抑制几丁质触发的水稻免疫反应,包括活性氧迸发、胼胝质沉积和防卫相关基因表达<sup>[41-42]</sup>。

### 3.4 使几丁质寡糖脱乙酰化为不能触发植物免疫的壳聚糖

几丁质或多糖脱乙酰化酶属于碳水化合物酯酶家族 4(CE4)<sup>[53]</sup>。植物病原真菌利用几丁质或多糖脱乙酰化酶修饰和重塑真菌细胞壁,使几丁质寡糖脱乙酰化,帮助病原真菌逃避寄主的防御机制。许多植物病原真菌编码几丁质或多糖脱乙酰化酶,将细胞壁上的几丁质转化为壳聚糖。壳聚糖是几丁质部分或完全脱乙酰化的产物,完全脱乙酰化的壳聚糖在自然界中很少存在,只能通过几丁质脱乙酰化酶或化工方法获得<sup>[54]</sup>。目前发现在接合菌门、子囊菌门和担子菌门的一些真菌能够产生壳聚糖<sup>[55]</sup>。壳寡糖与植物细胞膜上的几丁质受体亲和力较低,并不能作为激发子诱导植物免疫反应<sup>[56]</sup>。近期的研究发现,大丽轮枝菌(*V. dahlia*)分泌一种多糖脱乙酰化酶 VdPDA1,能够将几丁质寡糖脱乙酰化为非配体的壳聚糖,VdPDA1 敲除突变体致病力显著下降。尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)分泌的多糖脱乙酰化酶 FovPDA1 与 VdPDA1 一样,直接将几丁质寡糖去乙酰化为非配体的壳聚糖,以抑制几丁质触发的免疫反应<sup>[46]</sup>。小麦条锈菌(*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*)分泌一种多糖脱乙酰化酶 Pst\_13661,其编码基因在小麦与条锈菌互作的早期阶段高度诱导表达,Pst\_13661 可以抑制几丁质触发的植物免疫并促进小麦条锈菌的侵染,亲和沉淀实验证明 Pst\_13661 可以结合几丁质,揭示 Pst\_13661 可能通过修饰真菌细胞壁的几丁质,抑制几丁质诱导的植物免疫反应<sup>[47]</sup>。近期,RIZZI 等<sup>[48]</sup>系统解析了玉蜀黍黑粉菌(*Ustilago maydis*)几丁质脱乙酰化酶家族的功能,通过对芽殖细胞和侵染菌丝的几丁质和壳聚糖染色观察,发现壳聚糖在病菌侵染过程中发挥重要作用,敲除多个几丁质脱乙酰化酶编码基因的不同突变体的致病力均显著降低。检测发现 *cda2*、3、4、5、6 多基因敲除突变体在玉米叶片表面附着能力降低,附着胞形成减少,侵染率降低;同时发现,与野生型相比,该突变体诱导的胼胝质显著增加,该研究揭示了玉蜀黍黑粉菌几丁质脱乙酰化酶家族基因在致病过程中的重要作用。

### 3.5 抑制几丁质触发的免疫信号转导

植物病原真菌还可以分泌效应子到植物细胞

中,通过破坏植物细胞内几丁质触发的免疫信号转导达到抑制植物免疫反应的目的。来源于瓜类炭疽菌(*Colletotrichum orbiculare*)和稻瘟病菌(*Ma. oryzae*)的两个同源的效应蛋白 CoNIS1 和 MoNIS1 能够抑制几丁质诱导的活性氧(ROS)爆发。CoNIS1 可以与 BAK1 和 BIK1 互作,MoNIS1 也可以与 BIK1 互作,重要的是,CoNIS1 可以完全破坏 BIK1 和 RBOHD 的互作,进而阻止 BIK1 磷酸化 RBOHD 介导的 ROS 迸发<sup>[49]</sup>。稻瘟病菌(*Ma. oryzae*)利用效应蛋白 AvrPiz-t 通过靶向 OsRac1 干扰几丁质诱导的 ROS 积累<sup>[50]</sup>。稻曲病菌(*Ustilago violacea*)分泌富含半胱氨酸的效应子 6 (small cysteine-rich effector 6, SCRE6)<sup>[51]</sup>,SCRE6 是在植物致病真菌中发现的第一个效应磷酸酶。SCRE6 敲除突变体的致病力明显降低,表明 SCRE6 在侵染水稻过程中发挥重要作用。SCRE6 被分泌到水稻细胞中,与水稻中的免疫负调节因子 OsMPK6 相互作用,将其去磷酸化,增强 OsMPK6 的稳定性,从而抑制水稻的免疫反应<sup>[51]</sup>。目前已发现的大多数植物病原真菌抑制几丁质触发的植物免疫反应策略主要是阻断植物几丁质受体对几丁质寡糖的感知与识别(表 1),而病原真菌胞质效应蛋白抑制几丁质触发植物免疫的策略仍需进一步深入研究。

## 4 总结

在植物与病原真菌互作过程中,病原真菌菌丝的细胞壁暴露于含有大量水解酶的植物物质外体中,植物几丁质酶降解病原菌细胞壁的几丁质释放大量的几丁质寡糖,激活植物免疫反应。自水稻中第一个几丁质受体被克隆出来以后,科学家对植物感知几丁质和几丁质触发植物免疫的分子机制研究已取得了巨大进展。植物病原真菌为了成功侵染植物,通过不同策略抑制几丁质触发的免疫反应,大多数植物病原真菌采取阻断植物对几丁质的识别,进而抑制 PTI 的方式逃避植物免疫。LysM 效应蛋白在番茄叶霉病菌(*Cladosporium fulvum*)、稻瘟病菌(*Ma. oryzae*)等半活体营养型真菌和水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*)等死体营养型真菌的侵染过程中发挥重要作用,但由于部分活体营养型真菌难以完成遗传转化,LysM 效应蛋白在活体营养型植物病原真菌侵染致病中的功能鲜有报道。

含有 LysM 结构域效应蛋白中 LysM 结构域数量存在差异(通常含有 1~6 个 LysM 结构域),这种 LysM 结构域数量的变化是否影响其对几丁质或几丁质寡糖的结合能力和亲和力仍需深入研究。明确 LysM 效应蛋白与几丁质受体竞争性结合几丁质寡糖的分子机理不仅对明确植物病原真菌抑制植物免疫具有重要意义,还可以为改造对几丁质寡糖具有高亲和力的几丁质受体提供理论依据。

在植物病原真菌中通常具有多个几丁质脱乙酰化酶,目前仅在玉蜀黍黑粉菌(*U. maydis*)中系统解析了几丁质脱乙酰化酶的功能,但其他植物病原真菌几丁质脱乙酰化酶家族在侵染致病中的功能及作用机理仍需进一步深入研究。另外,几丁质脱乙酰化酶除了含有几丁质脱乙酰化结构域,有些几丁质脱乙酰化酶还含有几丁质结合结构域,这些不同类型的几丁质脱乙酰化酶的作用模式有何区别还需进一步解析。植物病原真菌利用几丁质脱乙酰化酶对几丁质进行脱乙酰化可以增强病菌的致病能力,在植物与病菌共同进化过程中,植物分泌蛋白酶降解几丁质脱乙酰化酶干扰几丁质脱乙酰化的过程,可以提高植物抵抗病菌侵染的能力。研究表明来源于偃麦草的外泌蛋白酶 TiAP1 与禾本科布氏白粉菌(*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, *Bgt*)几丁质脱乙酰化酶 BgtCDA1 互作,抑制 BgtCDA1 的几丁质脱乙酰化活性,提高了小麦对 *Bgt* 的抗性<sup>[57]</sup>。许多其他植物可能具有类似的机制,这一机制为作物抗病性改良提供了理论依据。

在病原真菌与植物长期的协同进化中,病原真菌进化出了多种利用质外体定位的外泌蛋白抑制几丁质触发植物免疫的策略,从而促进了植物病原真菌成功侵染并定殖寄主。然而,寄主如何抑制这些外泌蛋白的功能,进而提高寄主抗病性尚不明确。筛选这些外泌蛋白的抑制蛋白并明确其作用机理,不仅对深入解析植物质外体免疫具有重要意义,还可以为植物抗病育种提供基因资源。尽管几丁质触发植物免疫的信号识别和转导机制已取得了较大进展,但大部分是利用几丁质或几丁质寡糖处理植物后研究其信号识别和转导机制,而植物病原真菌往往可以抑制几丁质触发的植物免疫。因此,改造植物以提高植物在病原真菌侵染过程中对几丁质的识别能力以及增强植物的免疫信号转导是培育抗病材料的重要途径,在未来培育广谱持久

抗病品种实践中具有重要意义。此外,目前对植物病原真菌胞内效应子抑制几丁质信号传导的机制研究相当有限,由于病原真菌效应子之间存在功能冗余,进一步增加了筛选关键致病胞内效应子的难度,挖掘抑制几丁质触发免疫信号转导的胞内效应子并解析其作用机理有助于深入解析植物病原真菌致病机理。随着植物基因编辑技术的发展,破坏植物病原菌效应子与寄主靶标之间的分子互作为培育广谱抗病作物提供了一条重要途径<sup>[58-59]</sup>,将大幅度加快作物抗病分子育种。

## 参考文献

- [1] JONES J D G, DANGL J L. The plant immune system [J]. *Nature*, 2006, 444(7117): 323-329.
- [2] ANDREA A G, FRÉDÉRIC B, THORSTEN N. Biotechnological concepts for improving plant innate immunity[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2010, 21(2): 204-210.
- [3] KAKU H, NISHIZAWA Y, ISHII-MINAMI N, *et al.* Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(29): 11086-11091.
- [4] CHAVES M A D, REGINATTO P, COSTA B S D, *et al.* Fungicide resistance in *Fusarium graminearum* species complex [J]. *Current Microbiology*, 2022, 79(2): 62.
- [5] TUDI M, DANIEL R H, WANG L, *et al.* Agriculture development, pesticide application and its impact on the environment [J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2021, 18(3): 1112.
- [6] PLAZA V, SILVA-MORENO E, CASTILLO L. Breakpoint: Cell wall and glycoproteins and their crucial role in the phytopathogenic fungi infection [J]. *Current Protein and Peptide Science*, 2020, 21(3): 227-244.
- [7] ISLEM Y, MARGUERITE R. Chitin and chitosan preparation from marine sources, structure, properties and applications [J]. *Marine Drugs*, 2015, 13(3): 1133-1174.



- [8] ELIEH ALI KOMI D, SHARMA L, DELA CRUZ C. Chitin and its effects on inflammatory and immune responses[J]. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 2017, 54(2): 213-223.
- [9] BISHOP J G, DEAN A M, MITCHELL-OLDS T. Rapid evolution in plant chitinases: Molecular targets of selection in plant-pathogen coevolution[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(10): 5322-5327.
- [10] SHIBUYA N, MINAMI E. Oligosaccharide signalling for defence responses in plant[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2001, 59(5): 223-233.
- [11] STEPHEN T C, GITTA C, BRAD D, *et al.* Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response[J]. *Cell*, 2006, 124(4): 803-814.
- [12] JIANG C, HUANG M, XU L. LysM domains and its roles in plant-fungus interactions (in Chinese) [J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2014, 49(2): 221-228.
- [13] SHINYA T, MOTOYAMA N, IKEDA A, *et al.* Functional characterization of CEBiP and CERK1 homologs in *Arabidopsis* and rice reveals the presence of different chitin receptor systems in plants[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2012, 53(10): 1696-1706.
- [14] HAYAFUNE M, BERISIO R, MARCHETTI R, *et al.* Chitin-induced activation of immune signaling by the rice receptor CEBiP relies on a unique sandwich-type dimerization[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(3): E404-E413.
- [15] LIU T, LIU Z, SONG C, *et al.* Chitin-induced dimerization activates a plant immune receptor[J]. *Science*, 2012, 336(6085): 1160-1164.
- [16] AO Y, LI Z, FENG D, *et al.* OsCERK1 and OsRLCK176 play important roles in peptidoglycan and chitin signaling in rice innate immunity[J]. *The Plant Journal*, 2014, 80(6): 1072-1084.
- [17] SHIMIZU T, NAKANO T, TAKAMIZAWA D, *et al.* Two LysM receptor molecules, CEBiP and OsCERK1, cooperatively regulate chitin elicitor signaling in rice [J]. *The Plant Journal*, 2010, 64(2): 204-214.
- [18] MIYA A, ALBERT P, SHINYA T, *et al.* CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(49): 19613-19618.
- [19] WAN J, ZHANG X, NEECE D, *et al.* A LysM receptor-like kinase plays a critical role in chitin signaling and fungal resistance in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 2008, 20(2): 471-481.
- [20] WAN J, TANAKA K, ZHANG X, *et al.* LYK4, a lysin motif receptor-like kinase, is important for chitin signaling and plant innate immunity in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2012, 160(1): 396-406.
- [21] CAO Y, LIANG Y, TANAKA K, *et al.* The kinase LYK5 is a major chitin receptor in *Arabidopsis* and forms a chitin-induced complex with related kinase CERK1[J]. *ELife*, 2014, 3: e03766.
- [22] PETUTSCHNIG E K, JONES A M E, SERAZETDINOVA L, *et al.* The lysin motif receptor-like kinase (LysM-RLK) CERK1 is a major chitin-binding protein in *Arabidopsis thaliana* and subject to chitin-induced phosphorylation[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(37): 28902-28911.
- [23] MALINOVSKY F G, FANGEL J U, WILLATS W G T. The role of the cell wall in plant immunity [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5: 178.
- [24] GUBAEVA E, GUBAEV A, MELCHER R, *et al.* ‘Slipped Sandwich’ model for chitin and chitosan perception in *Arabidopsis* [J]. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 2018, 31(11): 1145-1153.
- [25] JASHNI M K, DOLS I H M, IIDA Y, *et al.* Synergistic action of a metalloprotease and a serine protease from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* cleaves chitin-binding tomato chitinases, reduces their antifungal activity, and enhances fungal virulence [J]. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 2015, 28(9): 996-1008.
- [26] ÖKMEN B, KEMMERICH B, HILBIG D, *et al.* Dual function of a secreted fungicidal metalloprotease in *Ustilago maydis* [J]. *The New Phytologist*, 2018, 220(1): 249-261.
- [27] HAN L, LI Y, WANG F, *et al.* The cotton apoplastic protein CRR1 stabilizes chitinase 28 to facilitate defense against the fungal pathogen *Verticillium dahlia*

- [J]. The Plant Cell, 2019, 31(2): 520-536.
- [28] van DEN BURG H A, HARRISON S J, JOOSTEN M H A J, *et al.* *Cladosporium fulvum* Avr4 protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection [J]. Molecular Plant Microbe Interactions, 2006, 19(12): 1420-1430.
- [29] van ESSE H P, BOLTON M D, STERGIOPOULOS I, *et al.* The chitin-binding *Cladosporium fulvum* effector protein Avr4 is a virulence factor [J]. Molecular Plant Microbe Interactions, 2007, 20(9): 1092-1101.
- [30] MARSHALL R, KOMBRINK A, MOTTERAM J, *et al.* Analysis of two in planta expressed LysM effector homologs from the fungus *Mycosphaerella graminicola* reveals novel functional properties and varying contributions to virulence on wheat [J]. Plant Physiology, 2011, 156(2): 756-769.
- [31] TAKASHI FUJIKAWA A S Y N, EIICHI M, YANO S, *et al.* Surface  $\alpha$ -1,3-glucan facilitates fungal stealth infection by interfering with innate immunity in plants [J]. PLoS Pathogens, 2012, 8(8): e1002882.
- [32] LIU Z, GAO Y, KIM Y M, *et al.* SnTox1, a *Parastagonospora nodorum* necrotrophic effector, is a dual-function protein that facilitates infection while protecting from wheat-produced chitinases [J]. The New Phytologist, 2016, 211(3): 1052-1064.
- [33] YI Z, YUHAN G, YINGBO L, *et al.* The *Verticillium dahliae* SnodProt1-like protein VdCP1 contributes to virulence and triggers the plant immune system [J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 1880.
- [34] VOLK H, MARTON K, FLAJŠMAN M, *et al.* Chitin-binding protein of *Verticillium nonalfalfae* disguises fungus from plant chitinases and suppresses chitin-triggered host immunity [J]. Molecular Plant Microbe Interactions, 2019, 32(10): 1378-1390.
- [35] HAN Y, SONG L, PENG C, *et al.* A *Magnaporthe* chitinase interacts with a rice jacalin-related lectin to promote host colonization [J]. Plant Physiology, 2019, 179(4): 1416-1430.
- [36] RONNIE D J, H. P V E, ANJA K, *et al.* Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants [J]. Science, 2010, 329(5994): 953-955.
- [37] MENTLAK T A, KOMBRINK A, SHINYA T, *et al.* Effector-mediated suppression of chitin-triggered immunity by *magnaporthe oryzae* is necessary for rice blast disease [J]. The Plant Cell, 2012, 24(1): 322-335.
- [38] TAKAHARA H, HACQUARD S, KOMBRINK A, *et al.* *Colletotrichum higginsianum* extracellular LysM proteins play dual roles in appressorial function and suppression of chitin-triggered plant immunity [J]. The New Phytologist, 2016, 211(4): 1323-1337.
- [39] GABRIEL L F, ANDREA S, DANIELA P D T T, *et al.* Suppression of plant immunity by fungal chitinase-like effectors [J]. Current Biology, 2018, 28(18): 3023-3030.
- [40] DöLFORS F, HOLMQUIST L, DIXELIUS C, *et al.* A LysM effector protein from the basidiomycete *Rhizoctonia solani* contributes to virulence through suppression of chitin-triggered immunity [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2019, 294(5): 1211-1218.
- [41] LI Y, LIU X, LIU M, *et al.* *Magnaporthe oryzae* auxiliary activity protein MoAa91 functions as chitin-binding protein to induce appressorium formation on artificial inductive surfaces and suppress plant immunity [J]. mBio, 2020, 11(2): e03304-03319.
- [42] LI G B, FAN J, WU J L, *et al.* The flower-infecting fungus *Ustilagoideia virens* subverts plant immunity by secreting a chitin-binding protein [J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 733245.
- [43] MART N J S, ROMERO D, HIERREZUELO J S, *et al.* Effectors with chitinase activity (EWCAs), a family of conserved, secreted fungal chitinases that suppress chitin-triggered immunity [J]. The Plant Cell, 2021, 33(4): 1319-1340.
- [44] MARTÍNEZCRUZ J M, POLONIO Á, RUIZJIMÉNEZ L, *et al.* Suppression of chitin-triggered immunity by a new fungal chitin-binding effector resulting from alternative splicing of a chitin deacetylase gene [J]. Journal of Fungi, 2022, 8(10): 1022.
- [45] MUIRHEAD K, PÉREZ-LÓPEZ E. *Plasmodiophora brassicae* CBM18 proteins bind chitin and suppress chitin-triggered immunity [J]. PhytoFrontiers, 2022, 2(1): 21-29.

- [46] GAO F, ZHANG B, ZHAO J, *et al.* Deacetylation of chitin oligomers increases virulence in soil-borne fungal pathogens[J]. *Nature Plants*, 2019, 5(11): 1167-1176.
- [47] XU Q, WANG J, ZHAO J, *et al.* A polysaccharide deacetylase from *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* is an important pathogenicity gene that suppresses plant immunity[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18(8): 1830-1842.
- [48] RIZZI Y S, HAPPEL P, LENZ S, *et al.* Chitosan and chitin deacetylase activity are necessary for development and virulence of *Ustilago maydis* [J]. *mBio*, 2021, 12(2): e03419-03420.
- [49] IRIEDA H, INOUE Y, MORI M, *et al.* Conserved fungal effector suppresses PAMP-triggered immunity by targeting plant immune kinases[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(2): 496-505.
- [50] BAI P, PARK C, SHIRSEKAR G, *et al.* Role of lysine residues of the *Magnaporthe oryzae* effector AvrPiz-t in effector-and PAMP-triggered immunity[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2019, 20(4): 599-608.
- [51] ZHENG X, FANG A, QIU S, *et al.* *Ustilaginoidea virens* secretes a family of phosphatases that stabilize the negative immune regulator OsMPK6 and suppress plant immunity[J]. *The Plant Cell*, 2022, 34(8): 3088-3109.
- [52] SANCHEZ-VALLET A, TIAN H, RODRIGUEZ-MORENO L, *et al.* A secreted LysM effector protects fungal hyphae through chitin-dependent homodimer polymerization[J]. *PLoS Pathogens*, 2020, 16(6): e1008652.
- [53] HUGO A, XEVI B, ANTONI P. Substrate recognition and specificity of chitin deacetylases and related family 4 carbohydrate esterases [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(2): 412.
- [54] PUSZTAHELYI T. Chitin and chitin-related compounds in plant-fungal interactions [J]. *Mycology*, 2018, 9(3): 189-201.
- [55] DHILLON G S, KAUR S, BRAR S K, *et al.* Green synthesis approach: extraction of chitosan from fungus mycelia[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2013, 33(4): 379-403.
- [56] FEDERICO L, MARTA S, LUIS V L. Molecular mechanisms of chitosan interactions with fungi and plants[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(2): 332.
- [57] YANG Y, FAN P, LIU J, *et al.* *Thinopyrum intermedium* TiAP1 interacts with a chitin deacetylase from *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* and increases the resistance to *Bgt* in wheat[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2022, 20(3): 454-467.
- [58] OLIVA R, JI C, ATIENZA-GRANDE G, *et al.* Broad-spectrum resistance to bacterial blight in rice using genome editing[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(11): 1344-1350.
- [59] WANG N, TANG C, FAN X, *et al.* Inactivation of a wheat protein kinase gene confers broad-spectrum resistance to rust fungi[J]. *Cell*, 2022, 185(16): 2961-2974.

责任编辑:曾晓葳