

苹果炭疽叶枯病菌与寄主互作分子致病机理研究进展

翟浩, 李晓军, 余贤美, 王海波, 马亚男* (山东省果树研究所, 山东泰安 271000)

摘要 从寄主-病原互作蛋白着手, 阐述了苹果炭疽叶枯病菌的分子致病机理, 为防控药剂研发和管理措施优化提供参考, 同时为该病害防治及抗病品种培育提供新思路。
关键词 苹果炭疽叶枯病; 互作蛋白; 致病机理
中图分类号 S432.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)12-0014-03

Study Progress on Molecular Pathogenesis of *Glomerella* Leaf Spot and Host Interaction
ZHAI Hao, LI Xiao-jun, YU Xian-mei et al (Shandong Institute of Pomology, Tai'an, Shandong 271000)

Abstract From interaction protein of the host-pathogen, the molecular pathogenesis of harmful bacteria was expounded. The study provides important reference information for prevention and control of drug research and optimization of management measures, at the same time provides new way for disease control and breeding of disease-resistant varieties.
Key words *Glomerella* leaf spot; Interaction protein; Pathogenesis

植物真菌病害可造成巨大的产量损失, 且一直威胁全球的食品安全^[1-2]。培育和种植抗病品种是控制植物真菌病害较为有效且环保的方法^[3]。目前, 从分子和遗传学角度对植物病原真菌进行了较为深入的研究, 揭示了大量真菌的分子致病机理^[4-5]。

苹果炭疽叶枯病 (*Glomerella* leaf spot, GLS) 是由刺盘孢属 (*Colletotrichum*) 真菌引起的苹果部分栽培品种的叶部病害, 近年来该病害在我国各苹果产区普遍发生, 可造成苹果树叶大量脱落和果实腐烂, 进而削弱树势, 引起次年果实减产甚至绝产, 严重制约了苹果产业的健康可持续发展^[6]。深入研究苹果炭疽叶枯病菌的分子致病机理, 有助于分析苹果炭疽叶枯病发展迅速、危害严重的原因, 为针对该病害的药剂研发和果园管理措施优化提供参考, 同时为研究其他病原菌与植物的互作机制提供理论依据。

1 苹果炭疽叶枯病研究现状

苹果炭疽叶枯病是我国近年来新发现的一种流行性病害, 主要危害嘎啦和金冠系列苹果品种。Wang 等^[7]对我国苹果炭疽叶枯病的症状和病原进行了首次报道。目前, 该病害逐渐蔓延, 在山东、陕西、辽宁、河南和河北等主要苹果生产省份已普遍发生^[6]。

苹果炭疽叶枯病最初被认为由围小丛壳 (*Glomerella cingulata*, 无性态为胶孢炭疽菌 *C. gloeosporioides*) 引起^[8]。后经研究发现, 尖孢炭疽菌 (*C. acutatum*)^[9] 和喀斯特炭疽菌 (*C. karstii*)^[10] 也可引起苹果炭疽叶枯病。王薇等^[11] 根据新的刺盘孢分类系统^[12], 利用形态学、培养特性、多基因系统发育及致病性等特征, 明确了河南省和陕西省部分苹果产区苹果炭疽叶枯病的病原为果生刺盘孢 (*C. fructicola*) 和隐秘刺盘

孢 (*C. aenigma*) 2 种。通过对山东省苹果主产区苹果炭疽叶枯病病原的形态学研究和多基因系统发育分析, 认为引起该地区苹果炭疽叶枯病的病原为果生刺盘孢 (*C. fructicola*)。

近年来, 国内外对于苹果炭疽叶枯病的研究集中于病原群体结构、病原侵染机制、病害发生规律和药剂防治等。符丹丹等^[13] 利用优化后的 ISSR-PCR 反应体系对苹果炭疽叶枯病菌遗传多样性进行分析。任斌等^[14] 利用光学显微镜和扫描电镜对围小丛壳 (*G. cingulata*) 在嘎啦苹果叶片上的侵染过程进行了研究, 认为该菌发育和侵染过程中的一些特点可能是造成病害暴发的原因。王冰等^[15-16] 检测了 6 种药剂对围小丛壳的内吸治疗效果和 8 种药剂的保护效果, 并测试了温度、湿度和光照对该菌产生分生孢子和子囊孢子的影响。王海艳等^[17] 和张俊祥等^[18] 建立并优化了农杆菌介导的围小丛壳的遗传转化体系, 吴建圆等^[19] 利用农杆菌介导的转化技术将 *npt II* (新霉素磷酸转移酶基因) 基因盒整合到围小丛壳基因组中, 韩小路等^[20] 建立了聚乙二醇介导的果生刺盘孢 (*C. fructicola*) 原生质体的转化体系。

目前, 从分子角度对苹果炭疽叶枯病菌与寄主互作机制的研究相对较少。Perfect 等^[21] 认为刺盘孢属 (*Colletotrichum*) 真菌是研究植物病原真菌与寄主互作非常理想的模式菌之一。Sygmund 等^[22-23] 对围小丛壳的一个依赖于 FAD 的葡萄糖脱氢酶基因进行了真核和原核表达, 该酶被认为可以抑制植物漆酶、酚氧化酶和过氧化氢酶的活性, 在侵染植物过程中可能起促进作用。Seman 等^[24] 利用毕赤酵母对围小丛壳的角质酶基因进行了高效表达。Wang 等^[25-26] 研究认为, 茉莉酸、脱落酸和一些芳香挥发物的协同作用在葡萄果实抵御围小丛壳的侵染过程中发挥着重要作用。Velho 等^[27] 研究发现果生刺盘孢可以通过抑制植物的氧化防卫反应来达到在苹果叶片上成功定殖和侵染的目的。虽然这些研究均为苹果炭疽叶枯病菌的研究奠定了一定基础, 但对于苹果炭疽叶枯病菌-苹果叶片这个病害系统, 病原表达在互作过程中发挥关键作用的蛋白质分子尚未做出明确判断和功能验证。因此, 从互作蛋白着手, 探讨苹果炭疽叶枯病的分子致病机理, 从根本上解析该病害发展迅速、危害严重的

基金项目 山东省自然科学基金项目 (ZR2017BC066); 山东省农业科学院农业科技创新工程项目 (CXGC2016A07); 现代农业产业技术体系建设专项资金国家现代苹果产业技术体系项目 (CARS-28)。
作者简介 翟浩 (1985—), 男, 山东阳谷人, 助理研究员, 硕士, 从事果树植保研究。* 通讯作者, 助理研究员, 博士, 从事果树植保研究。
收稿日期 2018-01-19; 修回日期 2018-01-24

原因是十分必要的。

2 植物的先天免疫系统与互作蛋白

植物的先天免疫反应包含 2 个层面^[28],其中第 1 个层面是由病原相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 触发的免疫反应 (PAMPs triggered immunity, PTI)。PTI 通过植物跨膜的模式识别受体 (pattern-recognition receptors, PRRs) 来实现, PRRs 可以识别保守的病原相关分子模式, 激活寄主植物的第一层免疫反应来抵御入侵微生物的定殖^[3, 29-30]。植物的 PRRs 感知 PAMPs, 会快速启动与 PTI 相关的一系列反应, 包括丝裂原活化蛋白的级联、防卫反应相关基因的响应和细胞死亡等^[5, 31-32]。植物先天免疫系统的第 2 个层面是以高度多样化的抗性蛋白 (R 蛋白) 为基础, 这些 R 蛋白可以识别各种病原效应蛋白 (effector), 激活植物的免疫反应, 即蛋白触发的免疫反应 (effector-triggered immunity, ETI)^[33-34]。ETI 大多在细胞内进行, 往往十分迅速和强烈, 常会伴随着植物的过敏性坏死反应 (hypersensitive reaction, HR)^[3]。不同种类炭疽菌的体外基因敲出和回补课题的开展促进了对这类模式病原物的研究和利用^[21], 目前已对可侵染模式植物拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 和十字花科蔬菜的菜炭疽菌 (*C. higginsianum*)^[35-37] 和可侵染本氏烟 (*Nicotiana benthamiana*) 和烟草 (*N. tabacum*) 以及西瓜炭疽菌 (*C. orbiculare*)^[38] 进行了深入研究。然而, 对重要经济作物炭疽病菌的 PAMPs 和效应蛋白的研究, 还远滞后于对这些真菌的次生代谢分析等生物化学方面, 到目前为止仅少数几种效应蛋白得到验证^[39-42]。

PAMPs 能在植物组织表面、植物细胞间隙或植物细胞内起作用^[43-44], 通过与寄主细胞的靶蛋白结合, 刺激植物快速产生 Ca^{2+} 、NO 和 H_2O_2 等早期免疫防御反应信号分子^[45], 这些信号分子通过复杂的信号网络进行逐级传递放大, 产生乙烯、水杨酸、吲哚乙酸、茉莉酸、植保素和病程相关蛋白等, 最终使植物获得系统抗病性^[46]。PAMPs 与植物靶蛋白的结合在诱导植物抗病信号转导途径中发挥着重要作用, 是揭示激发子诱导植物抗病分子机制的关键环节。研究发现, 植物病原真菌的一个内切纤维素酶, 具有 PAMPs 功能, 可以诱导植物的防卫反应 (植物细胞过敏性坏死反应、植物防卫反应基因表达、活性氧产生、培养基碱化、钙离子积累、乙烯合成等), 并其激活活性与催化活性不相关^[32]。具有激发子功能的真菌木聚糖酶、果胶酶和内切纤维素酶等被称为 PAMPs 分子^[5, 47-49]。PAMPs 涉及各种结构的分子, 并在病原种属间保守。较为典型的 PAMPs 有细菌中的鞭毛蛋白、延伸因子 EF-Tu、肽聚糖和脂多糖等, 真菌中有细胞壁多聚糖和几丁质等, 卵菌中有葡聚糖^[50-52]。一般认为 PAMPs 在微生物适应与生存过程中发挥重要作用^[53]。

效应蛋白方面, 目前研究证实可以利用病原效应蛋白作为分子探针, 筛选鉴定寄主的感病基因 (S 基因)^[54]。感病基因编码蛋白被病原真菌识别, 引起病原菌扩散并最终导致植物组织病害。如果使植物感病基因失活, 则可以降低病原菌的致病能力, 诱导寄主产生持久的抗病性^[55]。近 10 年来, 多

项研究也证实了这一点, 以植物感病基因对病原真菌效应蛋白的识别为基础产生的免疫反应, 可以抵御多种病原菌的侵染^[54]。

包括苹果炭疽叶枯病菌在内的植物病原真菌都会在侵染寄主过程中表达分泌互作蛋白, 尤其是 PAMPa 和效应蛋白。期望通过对苹果炭疽叶枯病菌-苹果叶片这个病害系统中互作蛋白的筛选与功能验证, 寻找保守的 PAMPs 和效应蛋白分子, 分析和讨论苹果炭疽叶枯病菌的分子致病机理。

3 展望

我国是世界苹果生产大国, 种植面积和产量均居世界前列。近年来, 苹果炭疽叶枯病在全国各苹果产区大范围暴发, 严重影响了果实的产量和品质, 制约了苹果产业的健康可持续发展。目前对苹果炭疽叶枯病菌分子致病机理和苹果抗病机理的研究尚不充分。以苹果炭疽叶枯病菌为研究对象, 从病原-寄主互作蛋白着手, 阐述该病菌的分子致病机理, 可以为防控药剂研发和管理措施优化提供参考, 为该病害防治及抗病品种培育提供新思路。

参考文献

- [1] PENNISI E. Armed and dangerous [J]. Science, 2010, 327 (5970): 804-805.
- [2] FISHER M C, HENK D A, BRIGGS C J, et al. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health [J]. Nature, 2012, 484 (7393): 186-194.
- [3] DODDS P N, RATHJEN J P. Plant immunity: Towards an integrated view of plant-pathogen interactions [J]. Nature reviews genetics, 2010, 11 (8): 539-548.
- [4] BOLLER T, FELIX G. A renaissance of elicitors: Perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors [J]. Annual review of plant biology, 2009, 60 (1): 379-406.
- [5] BOLLER T, HE S Y. Innate immunity in plants: An arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens [J]. Science, 2009, 324 (5928): 742-744.
- [6] 李保华, 王彩霞, 董向丽. 我国苹果主要病害研究进展与病害防治中的问题 [J]. 植物保护, 2013, 39 (5): 46-54.
- [7] WANG C X, ZHANG Z F, LI B H, et al. First report of *Glomerella* leaf spot of apple caused by *Glomerella cingulata* in China [J]. Plant disease, 2012, 96 (6): 912.
- [8] SUTTON T B, SANHUEZA R M. Necrotic leaf blotch of Golden Delicious-*Glomerella* leaf spot: A resolution of common names [J]. Plant disease, 1998, 82 (3): 267-268.
- [9] GONZÁLEZ E, SUTTON T B. First report of *Glomerella* leaf spot (*Glomerella cingulata*) of apple in the United States [J]. Plant disease, 1999, 83 (11): 1074.
- [10] VELHO A C, STADNIK M J, CASANOVA L, et al. First report of *Colletotrichum karstii* causing glomerella leaf spot on apple in Santa Catarina State, Brazil [J]. Plant disease, 2014, 98 (1): 157.
- [11] 王薇, 符丹丹, 张荣, 等. 苹果炭疽叶枯病原学研究 [J]. 菌物学报, 2015, 34 (1): 13-25.
- [12] CANNON P F, DAMM U, JOHNSTON P R, et al. *Colletotrichum*-current status and future directions [J]. Studies in mycology, 2012, 73 (1): 181-213.
- [13] 符丹丹, 庄杰丽, 张荣, 等. 苹果炭疽病原菌 ISSR-PCR 反应体系的优化及遗传多样性分析 [J]. 植物保护学报, 2013, 40 (3): 231-236.
- [14] 任斌, 高小宁, 韩青梅, 等. 苹果炭疽叶枯病原 *Glomerella cingulata* 及其侵染过程 [J]. 植物保护学报, 2014, 41 (5): 608-614.
- [15] 王冰, 王彩霞, 史祥鹏, 等. 不同杀菌剂对苹果炭疽叶枯病的防治效果 [J]. 植物保护, 2014, 40 (6): 176-180.
- [16] 王冰, 张路, 李保华, 等. 温度、湿度和光照对苹果炭疽叶枯病菌 (*Glomerella cingulata*) 产孢的影响 [J]. 植物病理学报, 2015, 45 (5): 530-540.
- [17] 王海艳, 李保华, 张清明, 等. 农杆菌介导苹果炭疽病菌的遗传转化及

- 转化子鉴定[J]. 中国农业科学, 2013, 46(9): 1799–1807.
- [18] 张俊祥, 吴建圆, 冀志蕊, 等. 农杆菌介导的苹果炭疽叶枯病菌遗传转化及插入突变体的筛选[J]. 基因组学与应用生物学, 2014, 33(6): 1261–1267.
 - [19] 吴建圆, 冀志蕊, 李壮, 等. *npt II* 基因真菌表达载体的构建及在苹果炭疽叶枯病菌遗传转化中的应用[J]. 基因组学与应用生物学, 2015, 34(10): 2156–2160.
 - [20] 韩小路, 白静科, 张玮, 等. PEG 介导的苹果果生刺盘孢 *Colletotrichum fructicola* 原生质体转化[J]. 西北农业学报, 2016, 25(3): 442–449.
 - [21] PERFECT S E, HUGHES H B, O'CONNELL R J, et al. *Colletotrichum*: A model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions[J]. Fungal genetics and biology, 1999, 27(2/3): 186–198.
 - [22] SYGMUND C, STAUDIGL P, KLAUSBERGER M, et al. Heterologous overexpression of *Glomerella cingulata* FAD-dependent glucose dehydrogenase in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*[J]. Microbial cell factories, 2011, 10(1): 1–9.
 - [23] SYGMUND C, KLAUSBERGER M, FELICE A K, et al. Reduction of quinones and phenoxy radicals by extracellular glucose dehydrogenase from *Glomerella cingulata* suggests a role in plant pathogenicity[J]. Microbiology, 2011, 157(Pt11): 3203–3212.
 - [24] SEMAN W M, BAKAR S A, BUKHARI N A, et al. High level expression of *Glomerella cingulata* cutinase in dense cultures of *Pichia pastoris* grown under fed-batch conditions[J]. Journal of biotechnology, 2014, 184: 219–228.
 - [25] WANG S S, SAITO T, OHKAWA K. α -Ketol linolenic acid (KODA) application affects endogenous abscisic acid, jasmonic acid and aromatic volatiles in grapes infected by a pathogen (*Glomerella cingulata*) [J]. Journal of plant physiology, 2016, 192: 90–97.
 - [26] WANG S S, TAKAHASHI H, SAITO T, et al. Jasmonate application influences endogenous abscisic acid, jasmonic acid and aroma volatiles in grapes infected by a pathogen (*Glomerella cingulata*) [J]. Scientia horticulturae, 2015, 192: 166–172.
 - [27] VELHO A C, ROCKENBACH M F, MONDINO P, et al. Modulation of oxidative responses by a virulent isolate of *Colletotrichum fructicola* in apple leaves[J]. Fungal biology, 2016, 120(10): 1184–1193.
 - [28] SCHWESSINGER B, RONALD P C. Plant innate immunity: Perception of conserved microbial signatures[J]. Annual review of plant biology, 2012, 63(3): 451–482.
 - [29] JONES J D, DANGL J L. The plant immune system[J]. Nature, 2006, 444(7117): 323–329.
 - [30] ZIPFEL C. Pattern-recognition receptors in plant innate immunity[J]. Current opinion in immunology, 2008, 20(1): 10–16.
 - [31] ALTENBACH D, ROBATZEK S. Pattern recognition receptors: From the cell surface to intracellular dynamics[J]. Molecular plant-microbe interactions, 2007, 20(20): 1031–1039.
 - [32] ZIPFEL C. Early molecular events in PAMP-triggered immunity[J]. Current opinion in plant biology, 2009, 12(4): 414–420.
 - [33] ABRAMOVITCH R B, ANDERSON J C, MARTIN G B, et al. Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity[J]. Nature reviews molecular cell biology, 2006, 7: 601–611.
 - [34] CHISHOLM S T, COAKER G, DAY B, et al. Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response[J]. Cell, 2006, 124(4): 803–814.
 - [35] NARUSAKA Y, NARUSAKA M, PARK P, et al. RCH1, a locus in *Arabidopsis* that confers resistance to the hemibiotrophic fungal pathogen *Colletotrichum higginsianum* [J]. Molecular plant-microbe interactions, 2004, 17: 749–762.
 - [36] NARUSAKA M, SHIRASU K, NOUTOSHI Y, et al. *RRS1* and *RPS4* provide a dual Resistance-gene system against fungal and bacterial pathogens [J]. Plant journal, 2009, 60(2): 218–226.
 - [37] O'CONNELL R, HERBERT C, SREENIVASAPRASAD S, et al. A novel *Arabidopsis-Colletotrichum* pathosystem for the molecular dissection of plant-fungal interactions[J]. Molecular plant-microbe interactions, 2004, 17: 272–282.
 - [38] SHEN S, GOODWIN P H, HSIANG T. Infection of *Nicotiana* species by the anthracnose fungus, *Colletotrichum orbiculare* [J]. European journal of plant pathology, 2001, 107: 767–773.
 - [39] KIM Y K, LIU Z M, LI D, et al. Two novel genes induced by hard-surface contact of *Colletotrichum gloeosporioides* conidia[J]. Journal of bacteriology, 2000, 182: 4688–4695.
 - [40] STEPHENSON S A, HATFIELD J, RUSU A G, et al. CgDN3: An essential pathogenicity gene of *Colletotrichum gloeosporioides* necessary to avert a hypersensitive-like response in the host *Stylosanthes guianensis* [J]. Molecular plant-microbe interactions, 2000, 13: 929–941.
 - [41] KLEEMANN J, RINCON-RIVERA L J, TAKAHARA H, et al. Sequential delivery of host-induced virulence effectors by appressoria and intracellular hyphae of the phytopathogen *Colletotrichum higginsianum* [J]. PLoS Pathogens, 2012, 8(4): 1–15.
 - [42] YOSHINO K, IRIEDA H, SUGIMOTO F, et al. Cell death of *Nicotiana benthamiana* is induced by secreted protein NIS1 of *Colletotrichum orbiculare* and is suppressed by a homologue of CgDN3 [J]. Molecular plant-microbe interactions, 2012, 25: 625–636.
 - [43] HOGENHOUT S A, VAN DER HOORN R A L, TERAUCHI R, et al. Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms[J]. Molecular plant-microbe interactions, 2009, 22(2): 115–122.
 - [44] LIU J L, WANG X J, MITCHELL T, et al. Recent progress and understanding of the molecular mechanisms of the rice-*Magnaporthe oryzae* interaction[J]. Molecular plant pathology, 2010, 11(3): 419–427.
 - [45] GARCIBRUGGER A, LAMOTTE O, VANDELLE E, et al. Early signaling events induced by elicitors of plant defenses[J]. Molecular plant-microbe interactions, 2006, 19(7): 711–724.
 - [46] OLIVA R, WIN J, RAFFAELE S, et al. Recent developments in effector biology of filamentous plant pathogens[J]. Cellular microbiology, 2010, 12(6): 705–715.
 - [47] MA Y N, HAN C, CHEN J Y, et al. Fungal cellulase is an elicitor but its enzymatic activity is not required for its elicitor activity [J]. Molecular plant pathology, 2015, 16(1): 14–26.
 - [48] POSTEL S, KEMMERLING B. Plant systems for recognition of pathogen-associated molecular patterns[J]. Seminars in cell & developmental biology, 2009, 20(9): 1025–1031.
 - [49] ZHANG L H, KARS I, ESSENSTAM B, et al. Fungal endopolygalacturonases are recognized as MAMPs by the *Arabidopsis* receptor-like protein RBPG1 [J]. Plant physiology, 2013, 164: 352–364.
 - [50] FELIX G, DURAN J D, VOLKO S, et al. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin [J]. The plant journal, 1999, 18(3): 265–276.
 - [51] DOW M, NEWMAN M A, ROEPENACK E. The induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides [J]. Annual review of phytopathology, 2000, 38: 241–261.
 - [52] ERBS G, SILIPO A, ASLAM S, et al. Peptidoglycan and muropeptides from pathogens *Agrobacterium* and *Xanthomonas* elicit plant innate immunity: Structure and activity[J]. Chemistry & biology, 2008, 15(5): 438–448.
 - [53] THOMMA B P, NURNBERGER T, JOOSTEN M H. Of PAMPs and effectors: The blurred PTI-ETI dichotomy[J]. Plant cell, 2011, 23(1): 4–15.
 - [54] GAWEHNS F, CORNELISSEN B J C, TAKKEN F L W. The potential of effector-target genes in breeding for plant innate immunity [J]. Microb biotechnol, 2013, 6: 223–229.
 - [55] PAVAN S, JACOBSEN E, VISSER R G F, et al. Loss of susceptibility as a novel breeding strategy for durable and broad-spectrum resistance[J]. Molecular breeding, 2010, 25: 1–12.

(上接第 13 页)

- [29] 郭国良, 刘斌, 帅朗, 等. 烟箱密度检测装置的研发[J]. 机械工程师, 2009(5): 63–64.
- [30] 李斌, 胡启秀, 刘泽, 等. 箱内片烟密度偏差率的无损检测——X-射线检测法[J]. 烟草科技, 2009(7): 6–9, 23.
- [31] 李果, 杜显维, 余敬尧, 等. 箱内片烟密度偏差率在线检测与控制系统[J]. 烟草科技, 2010(6): 32–35.