

# 稻瘟病菌侵入机理

林福呈 李德葆

(浙江农业大学生物技术研究所 杭州 310029)

稻瘟病广泛分布于水稻栽培的国家和地区, 几乎每年都可以调查到该病发生, 给生产造成严重损失。研究稻瘟病菌与水稻之间相互作用, 特别是近年来开展稻瘟病菌致病分子生物学研究成了一个热点。

## 1 病害循环

(1) 病菌分生孢子尖端的粘胶和孢子发芽使得孢子粘着在寄主表面; (2) 芽管分化成特别侵染器, 叫附着胞, 它可以很紧密地粘着在寄主角质上; (3) 附着胞产生侵染栓穿透角质和表皮细胞壁; (4) 病菌继而在细胞中生长, 侵染邻近表皮细胞并能深入叶肉细胞; (5) 5至7d后, 分生孢梗分化, 新的分生孢子形成并从病斑中释放出来; (6) 这些新形成的分生孢子可重新侵染寄主。

## 2 诱导附着胞形成信号系统及其基因表达调节

分生孢子发芽后受到稻叶表面影响, 特别是疏水表面的刺激, 在基因产物的调节下极易诱发附着胞形成。休眠分生孢子贮存 mRNA<sup>[1]</sup>, 在发芽信号(包括光、温、水份等)刺激下, 解除了休眠状态使得贮存 mRNA 得到翻译, 诱发芽管产生, 同时形成新的 mRNA 产物。侵染信号(包括发芽分生孢子基物表面的疏水性等微环境因子)又能进一步刺激发芽分生孢子形成附着胞, 抑制营养生长, 同时在这个过程中积

累侵入寄主细胞的各种各样的酶类。营养生长信号(包括基物表面的亲水性等)可以抑制发芽分生孢子形成附着胞, 侵染栓, 并能促进芽管进一步生长形成大量的菌丝体。

### 2.1 ECM 蛋白作为最初信号感受器

稻瘟病菌分生孢子降落到叶表后需要接受外界刺激的信号受体, Underwood 等<sup>[2]</sup>把注意力集中在 ECM 蛋白上。ECM 是指与细胞基质有关的蛋白。最初人们发现它们存在于哺乳动物的细胞中, 在细胞与基物粘着、细胞分化和信号传递过程中起关键作用。有两种 ECM 蛋白是粘性的糖蛋白, 它们是 vitronectin 和 fibronectin, 通过与膜结合的膜旋转蛋白(integrins)与细胞骨架相连接。Underwood 等报道, 在体外, Vitronectin 在各种化学和物理因素, 包括与基物相结合的疏水表面刺激下, 可以发生构型改变。Dean 等提出假说, 稻瘟病菌也可能存在上述类似的蛋白, 在疏水表面刺激作用下同样发生构型改变, 引发附着胞形成。他利用哺乳动物细胞的 Vitronectin 和 fibronectin 制成多克隆抗体, 从稻瘟病菌菌丝体和分生孢子表面检测到与 vitronectin 相似的 95KDa 蛋白和与 fibronectin 相似的 65KDa 蛋白。从上述多克隆抗体提取到的 IgG 可以阻断分生孢子与

寄主表面接触及附着胞形成。他们进一步把抗体加到已与疏水表面相接触表面分生孢子周围,发现抗体能够有效地抑制分生孢子形成附着胞。

**2.2 cAMP作为附着胞形成第二信使:**细胞外信息在细胞内传导是通过许多小分子物质如环核苷酸,  $\text{Ca}^{2+}$  和磷酸次黄嘌呤核苷酸(phosphoinositide)实现。被传导信号通过蛋白磷酸化 cascade(包括蛋白激酶和磷酸化酶)传递。真菌中, cAMP是重要的调节物<sup>[3-6]</sup>。非附着胞诱发基物表面, 如玻璃基物表面, Dean等加入 cAMP 可以诱发与疏水表面产生同等程度或数量的附着胞, 并且附着胞的形成与 cAMP 剂量有关。一般认为 10mmol/L cAMP 最为有效。这个剂量通常用来研究真菌信号传递, 它比真菌所产生外源 cAMP 剂量高  $10^4$  倍, 因为 cAMP 具有低渗透性和快速转变的特性。附着胞专一地受 cAMP 诱导, 非环化腺苷酸和单丁酰基嘌呤对其形成完全没有效果。8-环溴腺苷酸和单丁酰基环腺苷酸普遍作为 cAMP 有效类似物在真菌和动物中研究信号传递, 也同样具有诱发附着胞形成作用<sup>[7]</sup>。正常情况, 细胞中 cAMP 浓度由腺苷环化酶和磷酸二酯酶紧密调节, 这两个酶决定了 cAMP 合成和分解<sup>[8]</sup>。加入 IBMX(3-isobutyl-5-methyl-xanthine, 3-异丁酰基-甲基-黄嘌呤)抑制磷酸二酯酶活性, 可阻断 cAMP 分解, 可使亲水表面诱发形成与疏水表面相同水平附着胞形成<sup>[9]</sup>。最近从分子水平上研究 cAMP 作用主要靶位基因序列即依赖于 cAMP 蛋白激酶基因序列。Dean等<sup>[1]</sup>研究发现稻瘟病菌的依赖于 cAMP 蛋白激酶功能区与 12 个已发表的依赖于 cAMP 蛋白激酶功能区比较, 氨基酸序列具有相当强保守性和同源性。通过 189bp PCR 产物推测其氨基酸序列, 与酿酒酵母的蛋白激酶功能区比较具有 80% 同源性<sup>[10]</sup>。上述报道从分子水平上验证了稻瘟病菌存在依赖于 cAMP 蛋白激酶, 说明 cAMP 确实是一种第二信使。

**2.3 附着胞形成过程中的基因表达:**有许多方法研究附着胞形成过程中的相关基因, 寻找这类基因两种最有效的办法是克隆差异基因和分离突变子。Lee等<sup>[11]</sup>采用差异基因克隆办法找到了与附着胞形成过程相关的基因, 但研究尚在初步阶段。他们还没有报道这些基因在翻译水平上的行为, 以及基因产物性质在形成附着胞形成过程中所起的生化作用。从没有诱导过的(指附着胞的形成)病菌细胞和诱导过的病菌细胞分别

提取 mRNA, 制成 cDNA 探针, 然后自总 mRNA 合成的 cDNA 文库和基因组 DNA 文库中钓取差异基因。首先粘粒文库构建在 pUI 粘粒载体上, 杂交后获得两个粘粒克隆(28C6 和 29G11)具有非常显著的差异表达, 而另两个粘粒克隆(17G8 和 20D7)则差异不明显。Dean 等分离到 mif23 和 mif29 这两个基因, 这两个基因表达产物只能出现在附着胞阶段。

突变子在筛选基因和研究生长过程遗传背景分析中已起到了巨大作用<sup>[12, 13]</sup>。突变子在稻瘟病菌 DNA 介导的转化研究中特别有价值。Dean 等采用紫外线照射产生 1500 多株突变株进行分析, 发现 16 株营养突变株, 其中 6 株可发芽但不能形成附着胞(即丧失附着胞形成能力的菌株, 简称 ADM)。所有 ADM 菌株颜色与菌落形态与野生型菌株相似, 其发芽率与野生型也相似。采用这些 ADM 菌株进一步证明 cAMP 在形成附着胞中的作用。

### 3 附着胞与黑色素

黑色素存在于附着胞, 没有黑色素就没有正常附着胞, 附着胞就会丧失侵入能力, 病原菌就会丧失致病性。

**3.1 附着胞小孔:**附着胞是病原菌致病过程中所形成的一种侵染机构, 在病菌侵入过程中的地位特别重要。附着胞必须产生足够压力才能机械穿透寄主角质层完成侵入过程, 而黑色素就是产生附着胞压力的前提。但黑色素不是分布在整个附着胞四周, 而是在附着胞与寄主表面接触的一侧非常小的区域内沉积着黑色素, 最后形成附着胞孔。R. J. Howard<sup>[10]</sup>提供了有关附着胞孔精美的电镜照片。附着胞形成的最后阶段, 黑色素分布细胞质膜外侧一层结构紧密的细胞壁层, 除附着胞小孔外, 附着胞四周覆盖着这一层黑色素层。

**3.2 附着胞膨压形成:**附着胞膨压形成必须有二个前提, 一是黑色素层必须作为一层有效的透性屏障, 使细胞质溶液浓度增高; 二是细胞质液能否产生高渗透压取决于附着胞内溶质的性质。黑色素由多聚二羟(polymerized dihydronaphthalene, abbrev, DHN)所组成, 厚度约为 100nm, 紧密地把附着胞小孔与寄主表面接触四周封闭起来。Howard等<sup>[14]</sup>采用 6 种硬度不同的 Mylar (商标名)膜观察附着胞膜对其穿透作用, 指出附着胞至少产生 8.0MPa 才能发挥有效穿透。

Howard<sup>[15]</sup>认为这在活有机体细胞中是最高的膨压。黑色素形成有关酶基因研究是一个热点。Chumhey 和 Valent<sup>[16]</sup>采用突变体分离到 ALB1、BSY1 和 BUF1 这三个基因, 它们编码的酶对合成 DHN 黑色素起着关键作用。丧失上述任何一个基因, 就会丧失黑色素形成。

使附着胞丧失穿透能力的高膨压, 病原菌丧失致病性。Bourett 和 Howard<sup>[17]</sup>报道附着胞成熟过程中需消耗大量的糖元。采用核磁共振 NMR<sup>[15]</sup>方法比较分析黑色素缺失的和野生型的附着胞外渗液, 表明大量乙二醇从黑色素缺失的附着胞中参漏出来。这些试验指出, 糖元经代谢分解成未知的糖醇物质, 维持着附着胞的膨压。

#### 4 病菌穿透

穿透开始于附着胞, 对病菌来说这个过程完成得越快越好。欧氏璜<sup>[18]</sup>曾详细描述过空气和土壤温度, 相对湿度, 湿叶表持续时间, 光线强度及其持续时间和黑暗时间, 叶表其它拮抗性生物, 寄主防御反应和其自身贮藏物质消耗都会影响以后穿透质量和以后稻瘟病菌菌丝在寄主细胞中扩展<sup>[15]</sup>。但事实上这个过程所需时间和复杂程度远远超过穿透前任何一阶段。

**4.1 侵染栓形成时间:** Bourett 和 Howard<sup>[17]</sup>试验表明, 侵染栓在玻璃纸上形成所需时间为 24~31h, 随着基物硬度加强, 所需时间也会延长。最硬一种叫 Mylar (有机高分子的聚合物) 基物上, 侵染栓形成所需时间 8d (而发芽分生孢子到附着胞形成完成只需 6h)。附着胞这一段时期似乎处于静止状况, 实际上其内部可能出现激烈生化过程, 使附着胞积累足够膨压强度。

**4.2 侵染栓:** 侵染栓成形于附着胞小孔处。最初附着胞小孔被孔壁覆盖物<sup>[17]</sup>, 即一层新的细胞壁覆盖, 先为一层, 后可清楚观察到二层。侵染栓形成后期病菌细胞壁覆盖层内层与细胞质紧密连接并能与伴胞刀豆球蛋白 A (concanavalin A) 和麦芽凝集素结合, 表明内层含有葡萄糖, 甘露糖残基或几丁质等物质, 而外层对上述两种蛋白没有亲和性, 外层壁物质成分至今还不清楚。

接近新形成侵染栓的尖端出现了许多液泡, 但没有观察到其它细胞器存在。侵染栓中细胞质和其与附着胞相邻的小部分区域构成了细胞器排斥区<sup>[19]</sup>, 该区域部分由肌动蛋白所组成。免疫定位观察, 可以发现大量肌动蛋白纤维出现在紧靠孔壁覆盖物处, 垂直于穿透方向的中轴。在侵染栓中呈放射排列。荧光免疫可

以观察到肌动蛋白在附着胞小孔区出现丝状小体<sup>[10, 20]</sup>。Mims 和 Richardson<sup>[21]</sup>及 Swann 和 Mims<sup>[22]</sup>也在其它形成附着胞真菌的附着胞小孔相同区观察到大量的丝状小体。它们出现在附着胞与基物表面意味着穿过质膜细胞内外物质的高水平交换。

**4.3 穿透机制:** 长期以来学术界对穿透机制解释缺乏实验证据, 争论焦点集中在穿透过程是化学分解 (即酶解起主要作用) 还是机械穿透作用。尽管对这一问题目前已形成较一致的看法, 但穿透机制还没有完全抗清楚, 看来这个过程还是相当复杂的。

Howard 等<sup>[15]</sup>报道了他们的实验结果并结合以往实验证据 (即附着胞膨压存在) 指出穿透过程主要是机械作用。他们采用不能通过生物代谢的化学合成聚合物 Mylar 膜作病菌离体试验, 附着胞能够依靠其自身内源能量形成侵染栓, 穿透 Mylar 膜, 证明酶在这一过程中不起主要作用。然而有许多学者认为角质酶在病菌侵入寄主这一过程起着主要作用, 如 Kolattukudy<sup>[23]</sup>综述了植物病原真菌如镰刀菌和炭疽菌等对角质分解作用。水稻表面角质层也是阻碍病原菌侵入的屏障, Sweigard 等<sup>[24]</sup>在稻瘟病菌中分离到单拷贝的角质酶基因 CUT1。尽管 CUT1 基因产物在 cut<sup>-</sup>突变株中不能表达, 但 cut<sup>-</sup>突变株还能侵入寄主细胞, 不影响其侵染栓形成, 换言之, 这似乎与 CUT1 产物 (一种角质酶) 无关。进一步分析表明 cut<sup>-</sup>突变株尽管丧失了绝大部分产生角质酶能力, 即与正常野生型菌株比较角质酶活性明显减弱, 但它毕竟还能在标准角质酶活性测定中检测到弱角质酶活性。这项研究支持了 Howard 等人提出的机械作用重要性结论, 同时也指出稻瘟病菌存在其它酶或几种分解性质相同的酶。

综上所述, 稻瘟病菌侵入主要是机械作用, 但酶或其它作用也可能辅助或加速这一进程的进程。病菌在寄主表面上的穿透时间不到 2d, 而在 Mylar 表面需 8d 以上时间, 而二者硬度相仿, 由此概括, 酶解活动在这一过程中可能起到一定作用<sup>[14]</sup>, 寄主表面的形态也可能有关。至于寄主表面分泌的化学物质是否与病菌分泌的化学物质在叶表互相促进加速穿透进程还有待研究。

#### 参 考 文 献

[1] Dean R A, Lee Y H, Mitchell T K, Whitehead D

- S. Rice blast disease, Eds R S Zeigler, S A Leong and P S Teng, CAB International, Wallingford, UK, 1995, 23~34.
- [2] Underwood P A, Steele J G, Dalton B A. Science, 1993,
- [3] Deverotrs P N. Advances in Cyclic Nucleotide Research, 1983, 15:55~97.
- [4] Van Hasstert, P J M. Advances in Second Messenger and phosphoprotein Research, 1991, 23:185~226.
- [5] Pereyra E, Zaremberg V, Moreno, S. Experimental Mycology, 1992, 16:93~101.
- [6] Thevelein J M. Antonie van Leeuwenhoek, 1992, 62: 109~130.
- [7] Kay R R. Development, 1989, 105:753~759.
- [8] Kincaid R J. Advances in Second Messenger and phosphoprotein Research, Eds P Greengard, G A Robison Raven Press, New York, 1991, 165~183.
- [9] Lee Y H, Dean R A. Plant cell, 1993, 5:693~700.
- [10] Howard R J. Science, 1981 48:89~103.
- [11] Lee Y H, Dean R A. FEMS Letters, 1993, 115: 71~76.
- [12] Leung H, Shi Z. Rice blast disease, Eds R S Zeigler, S A Leong and P S Teng. CAB International, Wallingford, UK, 1995, 35~50.
- [13] Shaw C H. Journal of General Microbiology, 1991, 137:1939~1053.
- [14] Howard R J. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of American, 1991, 99: 11281~11284.
- [15] Howard R J. Rice blast disease, Eds R S Zeigler, S A Leong and P S Teng. CAB International, Wallingford, UK, 1995, 3~22.
- [16] Chumley F G, Valent B. Molecular Plant-Microbe Interaction, 1990, 3:135~143.
- [17] Bourett T M, Howard R J. Canadian Journal of Botany, 1990, 68:329~342.
- [18] Ou S H. Rice Diseases, 2nd eds, Commonwealth Mycological Institute, New, UK, 1985.
- [19] Bourett M, Howard R J. Protoplasma, 168:20~26.
- [20] Bourett J M, Howard R J. Protoplasma, 1991, 163: 199~202.
- [21] Mims C W, Richardson E A. Protoplasma, 1989, 148:111~119.
- [22] Swann E C, Mims C W. Canadian Journal of Botany, 1991, 69:1655~1665.
- [23] Kolattukudy P E. Annu Rev Phytopathol, 1985, 23: 223~50.
- [24] Sweigard J A. Mol Gen Genet, 1992, 232:174~182.