

DOI: 10.13376/j.cbls/2019087

文章编号: 1004-0374(2019)07-0714-09

胞吐参与植物生物胁迫应答的研究进展

卜 灿^{1,2}, 高 珊², 东仕娇², 赵 蕾^{1*}, 李师鹏^{1,2*}

(1 山东师范大学生命科学学院, 济南 250014; 2 齐鲁师范学院生命科学院能源植物中心, 济南 250200)

摘 要: 高等植物细胞内囊泡运输介导了膜结构之间的物质运输和信号转导, 其中, 胞吐调控了运输囊泡向质膜的转运, 参与了植物细胞壁形成、细胞分泌和环境响应等多种生物学过程。胞吐可以通过重构及强化细胞壁阻止病原体定殖、分泌抗微生物因子抵御病原体的入侵以及调控植物激素载体蛋白和受体蛋白的极性运输等参与抗病应答。遗传学证据表明胞吐是调控植物生物胁迫响应的重要机制。该文综述胞吐参与植物生物胁迫应答分子机制的研究进展, 以期为本领域研究提供参考。

关键词: 胞吐; 植物防御; 病原体; 植物免疫; 植物生物胁迫

中图分类号: Q946.1 **文献标志码:** A

Advances of research on exocytosis involved in plant biotic stress response

BU Can^{1,2}, GAO Shan², DONG Shi-Jiao², ZHAO Lei^{1*}, LI Shi-Peng^{1,2*}

(1 College of Life Science, Shandong Normal University, Jinan 250014, China;

2 Energy Plant Research Center, College of Life Science, Qilu Normal University, Jinan 250200, China)

Abstract: Membrane trafficking in eukaryotic cells mediates the transport of molecules between membrane structures. Exocytosis is the process of cargo delivery from trans-Golgi network (TGN) to plasma membrane, which is involved in a variety of biological processes, such as cell wall formation, cell secretion and environmental responses. Exocytosis mediates plant resistance response to pathogen attack through cell wall remodeling and enhancement, secretion of antimicrobial factors and recycling of plasma membrane localized receptors for anti-pathogen signaling. More and more genetic evidences indicated that exocytosis is an important mechanism regulating the response of plant immunity. Here, we summarizes research progress on the exocytosis in biotic stress responses, providing references for the further research in this field.

Key words: exocytosis; plant defense; pathogen; plant immunity; biotic stress

植物病原菌种类繁多, 对作物产量和质量危害严重, 而化学农药控制作物病害会加重生态环境恶化。因此, 研究植物免疫系统抵御病原菌入侵机理, 培育抗病农作物品种, 对减少化学农药的使用、降低环境污染具有重要意义。胞吐 (exocytosis) 是高尔基后运输囊泡与质膜的融合过程, 介导了胞内物质分泌到细胞外和膜蛋白向质膜的转运^[1]。胞吐是构成真核细胞内膜系统之间物质交流、细胞分泌和细胞壁形成的核心机制, 在植物抗病反应中发挥关键作用^[2]。当植物遭遇生物胁迫时, 相关受体蛋白启动细胞免疫信号通路, 激活胞吐过程强化细胞壁的物理屏障作用、分泌病原菌抑制因子, 抑制病原

菌定殖^[3]。本文综述胞吐参与植物生物胁迫应答的研究进展, 以期对相关研究提供参考。

1 植物细胞胞吐

运输囊泡是由单层膜所包裹的膜性结构, 从几十纳米到数百纳米不等, 细胞内不同膜性结构之间的物质交流主要利用囊泡作为载体, 该过程包括4个环节: 出芽、运输、拴系、融合。拴系过程介

收稿日期: 2019-01-31; 修回日期: 2019-03-26

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31571467);
山东省自然科学基金博士基金项目(ZR2017BC016)

*通信作者: E-mail: lishipeng@qlnu.edu.cn

导了运输囊泡与靶膜在空间上的最初接触, 在时空上调控了下游膜融合事件的发生, 是调控极性胞吐的关键环节^[4]。研究发现, 一些蛋白质复合体参与了胞吐的拴系过程, 称为拴系子 (tethers)。其中, 胞泌复合体 (exocyst) 介导了囊泡与靶膜在物理空间上的直接接触, 是介导胞吐的拴系因子^[5]。越来越多的证据显示, 胞泌复合体的功能受小 GTP 酶蛋白家族成员调控, 并与 SNARE (soluble *N*-ethylmaleimidesensitive factor attachment protein receptors) 发生关联, 调控下游膜融合事件。

1.1 胞泌复合体是介导胞吐的拴系因子

胞泌复合体最初的研究来源于酵母工作, 研究显示复合体由 8 个蛋白质亚基组成, 参与了高尔基后运输囊泡与靶膜的拴系过程。一般认为拴系过程中复合体的 6 个亚基 (SEC5、SEC6、SEC8、SEC10、SEC15 和 EXO84) 与囊泡结合, 另外两个亚基 (EXO70 和 SEC3) 与靶膜结合, 当 8 个亚基组装成复合体时, 导致运输囊泡拴系到目的膜上^[6-7]。2018 年, Mei 和 Guo^[5] 结构解析研究发现, SEC3、SEC5、SEC6 和 SEC8 形成四螺旋束组装成亚复合体 I, SEC10、SEC15、EXO70 和 EXO84 组装成亚复合体 II, 亚复合体 I 和 II 相互作用形成完整的胞泌复合体。复合体的 EXO70 和 SEC3 亚基能与质膜 4,5-二磷酸磷脂酰肌醇 (PIP2) 结合, 可介导分泌囊泡募集到质膜上^[8-9]。由此可见, EXO70 和 SEC3 确定了胞吐位点, 在胞吐过程中发挥关键作用。

目前, 关于植物胞泌复合体的研究主要聚焦于 EXO70 家族。酵母和动物中 EXO70 家族只有一个成员, 而植物 EXO70 家族由多个成员组成, 这种多拷贝现象为植物所特有 (表 1)^[10]。植物 EXO70 为什么会出这种多拷贝现象目前尚未定论, 猜测可能与植物的发育特点有关, 推测不同 EXO70 参与了不同的生物学过程。在高等植物中, 胞吐参与

了植物的生长和发育过程^[1]。已有研究表明, 胞泌复合体参与了植物细胞顶端生长, 如花粉管和根毛的生长, 拟南芥 *EXO70A1* 突变导致柱头毛和根毛变短^[11-12]; *EXO70C1* 突变导致花粉管生长出现迟缓^[13]; 玉米 *RTH* (*SEC3* 同源的基因) 突变植株根毛不能正常伸长^[14]; 2017 年, Liu 等^[15] 研究表明, EXO70 家族成员 (表 2) 在植物免疫过程中发挥重要作用。

1.2 SNARE介导了膜融合过程

早在 20 世纪 80 年代, SNARE 就被证实介导了运输囊泡和靶膜的融合事件, 导致运载货物整合到质膜或分泌到细胞外^[16]。根据蛋白质螺旋束的中心位置氨基酸的不同, SNARE 可分为位于靶膜上的 Q-SNARE 和位于囊泡膜上的 R-SNARE。酵母中含有 5 种 R-SNAREs (Snc1p、Snc2p、Nyv1p、Sec22p 和 Ykt6p), 而哺乳动物细胞中至少含有 10 种 (包括 VAMPs1、2、3、4、5、7、8, Sec22b, ykt6 和 tomosyn)^[17]。SNAREs 通过其功能域形成复合体, 从而介导两膜发生融合, 该过程需要 synaptobrevins (R-SNARE)、SNAP (Q-SNARE) 和 syntaxins (Q-SNARE) 等核心蛋白的协同作用共同完成^[18-19]。Synaptobrevins 是一类相对分子质量为 19 kD 的小分子蛋白质, 参与 Ca^{2+} 依赖的囊泡融合过程^[20]。SNAP 是广泛表达于原核和真核生物中的 Q-SNARE, SNAP-25 的两个蛋白质螺旋结构 (Qb-SNARE 和 Qc-SNARE 结构域) 是 SNARE 核心复合体的组成部分, 在钙触发的胞吐作用中发挥重要作用^[21]。Murray 和 Tamm^[22] 研究发现, 敲除小鼠 SNAP-25 基因导致钙触发的胞吐作用严重受损, 表明 SNAP-25 在神经分泌过程中的重要性。Syntaxins 是镶嵌于靶膜的跨膜蛋白, 包括 C 端跨膜结构域、H3 结构域以及 N 端调控结构域 (Habc), 其中 H3 结构域与 SNAP-25 和 synaptobrevin 互作形成 SNARE 复合体的核心结构单元^[23]。目前,

表1 植物基因组中编码胞泌复合体各亚基的基因数目

基因名称/植物名称	SEC3	SEC5	SEC6	SEC8	SEC10	SEC15	EXO70	EXO84
拟南芥(<i>A. thaliana</i>)	2	2	1	1	2	2	23	3
烟草(<i>N. benthamiana</i>)	4	4	2	2	2	4	44	6
马铃薯(<i>S. tuberosum</i>)	2	2	1	1	1	2	21	3
番茄(<i>S. lycopersicum</i>)	2	2	1	1	1	2	22	3
水稻(<i>O. sativa</i>)	2	1	1	1	1	4	47	3
杨树(<i>P. trichocarpa</i>)	2	2	1	1	1	2	23	3
高粱(<i>S. bicolor</i>)	2	1	1	1	1	3	31	3
卷柏(<i>S. moellendorffii</i>)	2	1	2	2	2	1	8	2
小立碗藓(<i>P. patens</i>)	3	3	1	3	3	2	13	7

关于植物 SNARE 的研究处于起始阶段, 初步研究发现, 植物中的 SNARE 参与植物细胞板形成、离子通道的调控、植物生长发育、植物抗病及向性反应等多种过程^[24]。但是对其作用机制, 特别是在植物抗病反应中的调控机理知之甚少。

1.3 小GTPase家族是胞吐调控蛋白

在酵母、植物、人类等真核生物中, 人们将小 G 蛋白分为 Ras、Rho、Rab、Ran 和 Arf 共 5 个亚家族, 它们参与多种不同的生物学过程, 包括基因表达、细胞骨架重构、囊泡运输以及对病原菌的免疫应答等^[25]。目前, 对植物抗病方面的研究主要集中在 Rho 和 Rab 亚家族。

在植物中, Rho 亚家族是细胞信号转导途径中的关键调节因子, 参与了植物的生长发育和逆境胁迫应答。诸多证据表明, Rho 在植物抗病反应中也发挥作用^[26]。植物 Rho GTPase 又被命名为 Rop 家族, 被划分为两大类: 第 I 类蛋白质在 C 端具有保守的 CaaL (a 为脂肪族氨基酸) 基座; 第 II 类蛋白质的氨基酸缺失这个基座, 但保留了用于膜定位的半胱氨酸^[27]。除此之外, Rab 蛋白家族是小 G 蛋白超级家族中最大的一个家族, 广泛分布于从酵母到人类的真核生物中 (人类有 60 个 Rabs, 秀丽隐杆线虫有 29 个, 果蝇中有 26 个, 酵母中有 11 个, 水稻中有 52 个, 拟南芥中有 57 个)^[28]。细胞膜、内膜和运输小泡膜结合的 Rab 蛋白调节 SNAREs 复合体的形成。Rabs 还有许多效应蛋白 (拴系因子), 参与调控了运输囊泡在靶膜的拴系过程。高等植物中存在植物特有的 Rab 蛋白, 与调节植物生长发育和环境胁迫反应有关^[26]。

综上所述, 胞吐参与了多种生物学过程, 其中植物环境胁迫应答这方面的研究越来越引起学界的关注。

2 胞吐参与植物抗病响应

自然界生物在遭受逆境时均可做出胁迫响应, 与动物相比, 营固着生活的植物在进化过程中形成特有的结构和发育特点, 包括具有保护和机械支撑作用的细胞壁结构等。越来越多的证据揭示, 植物细胞壁在防卫方面发挥重要功能。细胞壁是一个高度动态的结构, 随着植物的生长和外界环境的变化而不断改变。细胞壁是防御病菌的第一道屏障, 细胞在受到病原菌入侵时, 细胞骨架会重新组装, 分泌机制被活化, 在病原菌侵入位点沉积胼胝质, 积累酚类化合物, 合成木质素聚合物等, 从而增加细

胞壁强度, 防止病原菌进一步入侵^[29]。最新研究发现, 参与细胞壁形成的胞吐参与了植物免疫反应, 但其中抗病因子 (表 2) 的作用机理有待深入研究。

植物的生长发育受到多种外界胁迫因素的影响, 如盐渍、干旱、低温、病虫害等, 其中病原微生物对植物危害巨大。为应对植物病害, 植物进化出多层免疫系统抵御病原菌攻击, 包括胞外免疫受体识别病原菌相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 激活的基础性抗性 (PAMPs-triggered immunity, PTI) 和胞内免疫受体识别病原菌效应蛋白 (effector proteins) 激活抗性 (effectors-triggered immunity, ETI)。植物的模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRRs) 是一类膜蛋白, 可以识别病原菌相关分子模型 (pathogen/microbe-associated molecular patterns, PAMPs/MAMPs) 启动 PTI 免疫反应^[30-31]。病原微生物为了成功侵染植物会分泌效应子攻击植物的 PRRs, 干扰宿主的抗病反应, 从而有利于自身的侵染和定殖。此时, 植物为了抵御病原菌的侵染会启动第二层免疫反应 - 效应子引发的 ETI 免疫反应^[31-33]。介导植物 ETI 反应的抗病蛋白作为胞内受体可以识别病原菌特异的效应子, 这类蛋白质都具有核苷酸结合域和富含亮氨酸重复域 (nucleotide-binding leucine-rich repeat, NLR)^[34]。目前, 虽然缺乏充足的实验证据, 但根据相关研究表明 PRRs 向质膜上转运是通过胞吐实现的; 另外, 已有报道发现胞吐相关蛋白参与调节胞内抗病蛋白水平 (见下文), 说明胞吐参与了植物 PTI 和 ETI 免疫反应。

2.1 胞吐相关蛋白参与植物抗病

2.1.1 胞泌复合体参与植物免疫

基于模式植物拟南芥的研究, 植物胞泌复合体在植物免疫过程中的作用被逐步认识。研究发现, 胞泌复合体的 EXO70B1 亚基能与植物防御相关蛋白 RIN4 (RPM1-INTERACTING4) (表 2) 互作, RIN4 参与胼胝质沉积, 并可被丁香假单胞菌分泌的蛋白酶 AvrRpt2 降解, AvrRpt2 处理能抑制 RIN4 和 EXO70B1 向膜迁移^[35-37], 推测细菌通过分泌 AvrRpt2 降解 RIN4 抑制 EXO70B1 介导的囊泡运输途径, 从而有利于细菌的入侵。2018 年, Du 等^[38]的研究发现, 茄科植物胞泌复合体亚基在防御致病疫霉、丁香假单胞菌以及灰霉菌入侵中发挥作用, 他们发现胞泌复合体介导胼胝质在病原菌入侵部位沉积, 抑制病原菌的定殖。拟南芥 *exo70b1* 突变株水杨酸水平提高、细胞程序化死亡现象增强; 同时, 拟南芥

EXO70B1 又是细胞自噬过程所必需的, 其涉及细胞组分的降解和循环过程, 参与植物防御应答过程中的信号转导^[39-40]。

免疫系统的激活诱导一系列的防御反应, 如胞质中钙离子浓度的增加、活性氧 (ROS) 的积累、胼胝质沉积、抗病相关基因表达以及内源激素的变化^[41-42]。胞质钙浓度升高是 PTI 免疫应答中最早的防御反应之一, 钙依赖性蛋白激酶 (calcium-dependent protein kinases, CDPKs; 拟南芥中的 CPKs) 是感知胞内钙浓度变化并通过蛋白质磷酸化传递钙信号以诱导下游信号转导反应的钙传感蛋白^[43-45]。在 ETI 模式中, Liu 等^[15] 研究发现胞吞、胞吐在植物抗性中具有重要作用, 其中胞泌复合体蛋白 EXO70B1 与 NLR 抗性蛋白 TIR-NBS2 (TN2) (表 2) 相互作用, EXO70B1 突变后表现出对白粉病抗性增强, 在 EXO70B1 突变体中 TN2 一般在第五周之后会高度表达, 而 TN2 过量表达则会导致引起类似白粉菌诱导的细胞程序化死亡; 除此之外, CPK5 与 TN2 也互作, 并且 EXO70B1-3 单突变体和 CPK5-2 EXO70B1-3 双突均导致 H₂O₂ 积累, 抗病基因表达上调, SA 积累增加等表型, 而 CPK5-2 单突抑制了这种表型, 表明 CPK5 是 *exo70B1-3* 突变体中防御反应激活所必需的。另据报道, 拟南芥 EXO70B2 和 EXO70H1 基因突变对丁香假单胞菌的敏感性增强^[46-47], 并发现拟南芥 PUB22 通过 26S 蛋白酶体介导 EXO70B2 的泛素化和降解, 这种机制会抑制 PAMP 诱导的信号转导^[47-48]。

致病疫霉编码多个分泌效应蛋白的基因, 包括 RXLR 效应子和 CRINKLERS (CRNs)。RXLR 效应子具有双重活性, 不仅能够抑制植物防御反应^[49-51], 而且还能够激活植物防御反应^[29,50]。酵母双杂交发现胞泌复合体亚基 SEC5 与 RXLR 效应子 AVR1 互作, 参与抗病相关蛋白 PR-1 的分泌和胼胝质的沉积, 当 AVR1 由致病疫霉分泌到宿主细胞中时, 它抑制了胞质中的 SEC5 在质膜的募集, 导致 PR-1 和胼胝质的分泌降低; 而 SEC5 沉默导致宿主细胞对致病疫霉的敏感性增强^[52]。上述结果表明, 胞泌复合体介导的囊泡运输是一种重要的基础防御过程。

2.1.2 SNARE参与植物免疫

SNAREs 是介导膜融合的关键蛋白质, 也参与了植物免疫反应。最早发现的参与植物防御的 PENETRATION1 (PEN1/SYP121) (表 2) 是动物 syntaxin 同源蛋白, 与 SNAP-25 协同作用抵御白粉病侵害^[53]。植物通过在入侵部位形成细胞壁的乳头状突起抵御白粉病真菌入侵, 该突起包含细胞外膜成

分、胼胝质和 SYP121/PEN1^[54]。拟南芥 AtSYP121/AtPEN1 基因缺失导致植株对大麦白粉病菌和豌豆白粉病菌的敏感性增强^[53], 而敲除突变体 *pen1-1* 与野生型植物比较没有明显的发育表型, 表明其主要参与植物的抗病应答。PEN1 同源基因 SYP122 突变株却没有丧失抗病能力^[55], 表明 AtSYP121/AtPEN1 在植物抵御白粉病菌过程中具有重要作用。2019 年, Cao 等^[56] 的研究结果显示, 水稻过表达 *OsSYP121* 植株对稻瘟病的抗性增强, 而敲除 *OsSYP121* 的突变株表现出易感的表型。OsSYP121 可与 OsSNAP32 (突触体相关蛋白 32 kD) 和 OsVAMP-714/724 (囊泡相关膜蛋白 714/724) 相互作用, OsSYP121 和 OsSNAP32 互作有助于宿主抵抗稻瘟病^[56]。可溶性 N-乙基马来酰亚胺敏感因子 (NSF) 衔接蛋白 SNAP33 (Q-SNARE) 以及囊泡相关膜蛋白 VAMP721/VAMP722 (R-SNARE) 相互作用参与乳突状突起形成^[57], 表明囊泡运输在病原体防御中起着关键作用。*snap33-1* 和 *vamp721-1/vamp722-1* 双突变体的生长受到严重影响, 说明它们也参与了植物生长发育过程的调控^[57]。目前关于 PEN1 在植物免疫方面的研究越来越多, 比如: 丁香假单胞菌效应子 HopZ2 靶向拟南芥 MLO2 以抑制依赖于 PEN1 的抗病因子分泌^[58]。BFA 能够通过阻断胼胝质沉积和质膜蛋白 PEN1 的积累来降低拟南芥的抗性反应, ARF-GTP 交换因子 (ARF-GEF) GNOM (表 2) 对于胼胝质和 GFP-PEN1 在乳头状基质中的积累发挥重要作用^[54]。有新证据显示陆地棉的 Q-SNARE (GhSNAP33) 介导了对黄萎病菌感染的抗性, GhSNAP33 基因沉默诱导真叶中细胞死亡和活性氧积累, 导致对大丽轮枝菌 (*Verticillium dahliae*) 感染性增强; 而过表达 GhSNAP33 的拟南芥表现出对大丽轮枝菌的抗性显著增加, 其抗旱性也有明显的提高, 表明 GhSNAP33 也参与了植物非生物胁迫应答; 过表达 GhSNAP33 转基因植物的叶片显示出胼胝质累积和菌丝体的减少^[59], 推测该基因是通过胼胝质分泌限制菌丝体的生长。

2.1.3 小G蛋白家族参与植物免疫

小 G 蛋白是囊泡运输的重要调控蛋白, 已有证据显示小 G 蛋白能够与免疫反应相关蛋白互作参与植物免疫应答^[60]; 但是, 关于其通过囊泡运输机制参与植物抗病方面的直接证据较少。目前研究主要集中在 Rab 和 Rho 家族, 植物 RAB GTP 酶包括多种 RAB11 同源物 (在拟南芥中称为 RABA)。Asaoka 等^[61] 研究表明, 植物 RABA/RAB11 同源物参与植

表2 参与植物生物胁迫响应的胞吐相关蛋白

基因	蛋白质注释	病原菌	在生物胁迫应答中的功能	参考文献
<i>GhSNAP33</i>	T-SNARE	真菌	<i>GhSNAP33</i> 异位表达增强了酵母细胞对氧化和渗透胁迫的耐受性, <i>GhSNAP33</i> 突变对 <i>V. dahliae</i> 更敏感, <i>GhSNAP33</i> 过表达可提高拟南芥的耐旱性, 并对大丽轮枝菌有显著抗性	[59]
<i>EXO70B1</i>	Exocyst亚基	真菌、细菌	基因突变能够产生细胞程序化死亡现象, 并能够提高植物对白粉病抗性, <i>EXO70B1</i> 功能丧失导致液泡内部自噬体数量减少以及过敏反应	[15]
<i>TIR-NBS2</i>	Exocyst互作蛋白	细菌	直接参与 <i>exo70b1</i> 激活的反应, 降解后降低植物抗病性, 与活性CPK5结合发挥防御反应	[15]
<i>RIN4</i>	Exocyst互作蛋白	细菌	调节植物对病原体相关分子模式(PAMP)和细菌III型效应蛋白(T3E)的免疫应答, 参与胼胝质沉积, 提高植物抗病性, 但可被丁香假单胞菌分泌的蛋白酶AvrRpt2降解失去活性	[37]
<i>PEN1/SYP121</i>	SNARE	真菌、细菌	是乳突状突起和胼胝质沉积所必需的, 能够阻止病原菌定殖, 提高植物抗病性	[54, 56]
<i>GNOM</i>	SNARE	真菌	对乳头状突起中愈伤组织、胼胝质沉积和PEN1蛋白的积累是至关重要, 阻止病原菌入侵	[54]
<i>SPIN6</i>	OsRac1互作蛋白	真菌	敲除导致PCD现象并增加对稻瘟病和细菌性枯萎病的抗性, 是U-box E3连接酶介导的泛素化途径与用于植物免疫的小GTP酶相关防御系统之间的连锁	[67]
<i>SIPRA1A</i>	Rab调节因子	真菌	过表达显著降低了对MAMP / PAMP乙烯诱导木聚糖酶的先天免疫应答, 过表达强烈降低模式识别受体LeEIX2蛋白水平, 能够提高植物抗病性	[64]

物胞吐调控, 在烟草 (*Nicotiana tabacum*) 和拟南芥花粉管和根毛的顶端生长中发挥重要作用。FLAGELLIN SENSING2 (FLS2) 是识别细菌鞭毛蛋白的受体, 其在质膜上的分布受到胞吐和内吞机制的调控^[62], *fls2* 突变体对致病菌高度敏感, RAB11/RABA 调节 FLS2-PRR 的运输, 能介导 PRR 递送至质膜参与免疫反应^[63]。LeEIX2 作为一种 RLP-PRR 能够识别乙烯诱导的木聚糖酶 (EIX), 参与植物对真菌的 MAMP / PAMP 响应, LeEIX2 能够与 Rab 调节因子 SIPRA1A (表 2) 相互作用, 表明 Rab 在植物抵御真菌感染过程中发挥作用^[64]。在水稻和拟南芥研究中发现, OsRAB11 和 AtRABG3b 能促进细胞程序性死亡和提高针对丁香假单胞菌的过敏反应^[65]。Zheng 等^[66]发现, 番茄的 RabE 亚家族成员可与无毒的 *avrPto* 因子相互作用, *avrPto* 因子可破坏 RabE 调控的囊泡运输途径, 从而使植物易感。由此我们可以推测 RAB 蛋白可能通过调控囊泡运输途径参与植物胁迫应答。除此之外, 另有研究表明, Rho 家族 (又命名为 Rop 蛋白) 在植物防卫反应建立过程中也具有重要作用。SPIN6 (表 2) 是一个 Rho GTP 酶激活蛋白 (RhoGAP) 能够激活 U-Box E3 连接酶介导的泛素化途径和小 GTP 酶相关的水

稻免疫防卫系统^[67]。RabA4B 通过与 PLANT U-BOX13 (PUB13) 及 PI-4P 互作参与依赖水杨酸诱导的抗病反应^[68]。

2018 年, 王源超领导的科研团队提出了病原菌攻击宿主的全新致病机制“诱饵模式”, 当疫霉菌攻击植物时释放糖基水解酶 XEG1 以破坏植物细胞壁, 植物细胞分泌水解酶抑制子 (glucanase inhibitor protein, GIP1) 抵御攻击, 疫霉菌又进化出 XEG1 的失活突变蛋白 (XEG1-like protein, XLP1), 充当“诱饵”与 GIP1 结合, 从而保护 XEG1 乘虚而入。XEG1 在卵菌、真菌和细菌中都广泛存在, 这一发现为开发能诱导植物广谱抗病性的生物农药提供了重要的理论基础^[69]。在这种致病机制中, 植物细胞胞吐过程怎样被激活; 有哪些胞吐蛋白参与 GIP1 的分泌。这些问题尚需进一步的探索。

由此可见, SNARE、胞泌复合体和小 G 蛋白参与了植物免疫, 但是它们具体如何调控植物对病原菌的入侵做出响应需要进一步研究。

2.2 胞吐介导的内源激素参与植物抗病

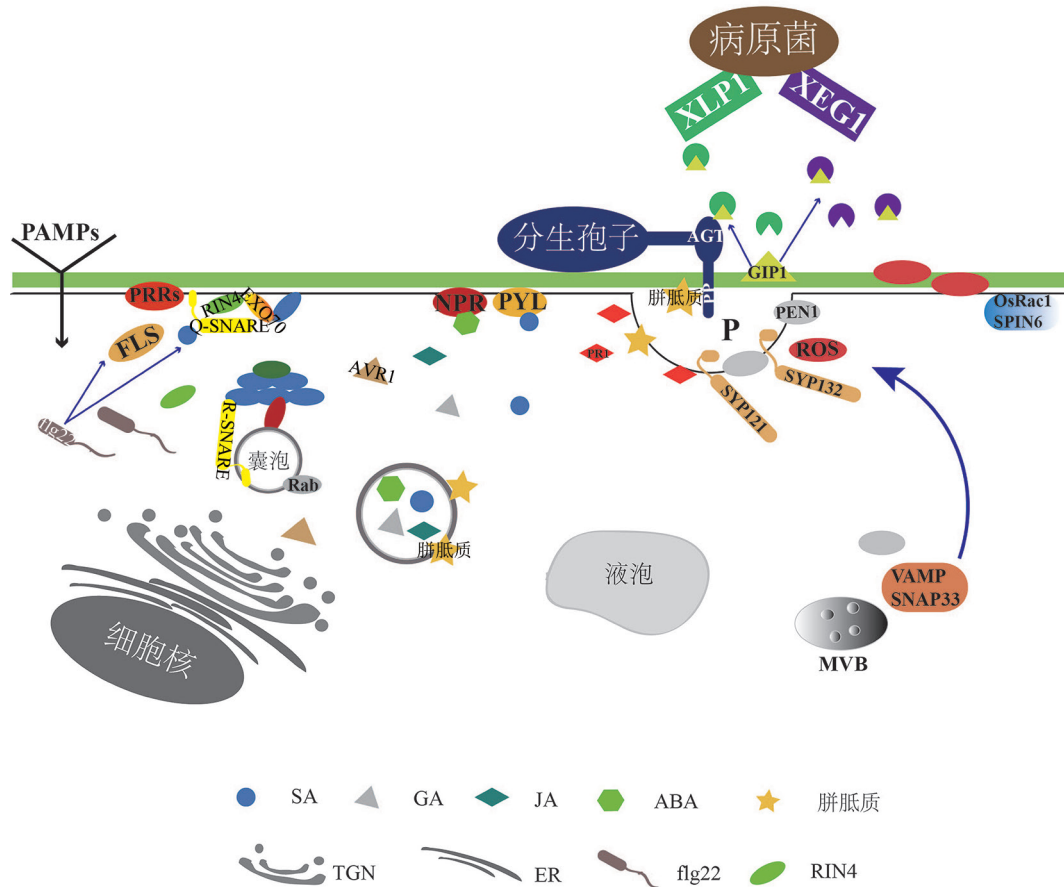
大量证据表明, 植物激素水杨酸 (salicylic acid, SA)、茉莉酸 (jasmonic acid, JA) 和乙烯 (ethylene, ET) 是植物抗病信号转导途径中的重要调控因子^[70]。

此外, 植物激素脱落酸 (abscisic acid, ABA)、生长素 (auxin)、赤霉素 (gibberellin, GA)、细胞分裂素 (cytokinin, CK) 和油菜素内酯 (brassinosteroid, BR) 等也被报道参与调控植物对病原菌的抗性^[71-72]。胞吐是介导膜蛋白向膜转运的主要机制, 有证据显示胞吐参与抗病相关激素的运输和信号转导^[73]。PIN 蛋白是运输生长素的载体蛋白, 极性定位于质膜, 其在质膜的极性定位受到囊泡运输机制的调控^[74]。已有报道, EXO70 家族成员 *EXO70A1* 参与了 PIN1/PIN2 蛋白的极性定位, *EXO70A1* 突变导致膜定位

的 PIN 蛋白滞留胞内^[75]。GNOM 是 ARF GTPases 的调控因子 (ARF-GEFs), 调控 PIN1 蛋白向质膜的转运, GNOM 突变导致一系列的生长素缺陷表型^[75]。对于其他植物内源激素是否也通过胞吐在植物免疫中发挥作用亟待探究。

3 非传统胞泌途径参与植物免疫应答

胞吐是植物细胞传统的分泌途径, 参与多种生物学过程, 近年发现除了传统的分泌途径外, 非传统分泌途径 (unconventional protein secretion, UPS) 也



当植物遭受病原菌侵害时, 体内会发生各种变化, 激活各种反应抵御病原菌的入侵。病原菌的病原体相关分子模式(PAMP)被模式识别受体(PRR)识别, 病原体分泌的效应子被细胞抗性(R)蛋白识别, 然后将防御信号传递给下游。转录激活因子被激活, 导致防御相关基因的上调, 从而产生有效的防御反应。通过不同的小GTP酶和SNARE亚家族的协调, 将防御相关的蛋白质和分子通过不同的途径运送到特定位置发挥作用。PEN1和细胞壁附着的其他组分被分泌到穿透部位以阻止穿透阻力。期间会有SNARE和VAMP的协助。乳突状突起部位会出现胼胝质的沉积和活性氧的积累。此外, 宿主还可通过胞吐作用将如PR1的防御蛋白质运输至病原菌侵染部位, 抵御外界入侵。PAMP: 病原相关分子模式; PRR: 模式识别受体; FLS: 受flg22的诱导; flg22: 细菌鞭毛蛋白激发子, 能被PRR识别; NPR: SA的受体膜蛋白; PYL: ABA的受体膜蛋白; XEG1: 糖基水解酶; XLP1: 失活的糖基水解酶; GIP1: 水解酶抑制子; RIN4: 植物防御调节剂, 可与EXO70B1互作; AVR1: 毒力因子, 当AVR1由致病疫霉分泌并且从吸器转移到宿主细胞中时, 它靶向并稳定细胞质中的SEC5。因此, exocyst复合物失去平衡, 无法调节PR-1和胼胝质的特异性分泌; PR1: 可经病原菌和SA (salicylic acid)大量诱导表达的PR蛋白, 常被作为SAR的分子标记, 响应于病原体入侵, 宿主细胞分泌抗微生物化合物(包括发病相关蛋白PR-1)并在渗透位点沉积胼胝质以阻碍感染; AGT: 附着胞; PP: 渗透栓; P: 乳突; TGN: 高尔基体; MVB: 多泡体; VAMP: 囊泡相关膜蛋白。

图1 植物胞吐参与植物抗病模式图

参与调控植物免疫应答过程, 譬如发现 UPS 在植物对病原体的应激反应中发挥作用^[76]。香港中文大学姜里文课题组利用拟南芥和烟草 BY-2 细胞表达 (X) FP 标记的 EXO70 蛋白同源物, 并结合免疫电镜观察, 发现了一个 EXO70 标记的双层膜包被的细胞器结构并命名为 EXPO (exocyst positive organelles), 进一步研究显示 EXPO 位于非传统分泌途径^[77-78]。目前, 关于 EXPO 的功能是否与植物免疫应答相关还需进一步研究。外泌小泡 (extracellular vesicles, EV) 是细胞释放到细胞外由脂质双层封闭的、含有胞质溶胶的小泡, 有证据表明, EV 在调节植物免疫中起重要作用^[79], 但囊泡拴系相关蛋白、SNAREs 和小 G 蛋白是否参与该过程未有直接证据。

4 总结与展望

近期研究成果使人们对胞吐参与植物免疫有了一定认知, 多种抗病相关蛋白和分子可能通过胞吐调控植物抗病应答 (图 1)。遗传学证据显示多种囊泡拴系相关蛋白、SNAREs 和小 G 蛋白参与植物免疫响应, 但其响应机制仍需深入研究。病原体分泌效应蛋白到宿主细胞中抑制分泌运输途径的多个步骤以阻断防御激活^[80], 其中效应子怎样与胞吐耦联重构囊泡运输机制, 不同类型的分泌囊泡 (TGN/EE、MVB 和 EXPO) 如何在免疫防御中执行不同的功能, 激素信号转导途径在膜运输调节中的作用以及胞吐如何调节激素诱导的抗病反应, 胞吐在植物抗病应答过程中的调控网络成分组成及其功能关系如何, 这些问题的回答尚需进一步的深入研究。

[参 考 文 献]

- [1] Jurgens G, Geldner N. Protein secretion in plants: from the trans-Golgi network to the outer space. *Traffic*, 2002, 3: 605-13
- [2] Gu Y, Zavaliev R, Dong X. Membrane trafficking in plant immunity. *Mol Plant*, 2017, 10: 1026-34
- [3] Yun HS, Kwon C. Vesicle trafficking in plant immunity. *Curr Opin Plant Biol*, 2017, 40: 34
- [4] Whyte JR, Munro S. Vesicle tethering complexes in membrane traffic. *J Cell Sci*, 2002, 115: 2627-37
- [5] Mei K, Guo W. The exocyst complex. *Curr Biol*, 2018, 28: R922-5
- [6] TerBush DR, Maurice T, Roth D, et al. The exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*, 1996, 15: 6483-94
- [7] Guo W, Grant A, Novick P. Exo84p is an exocyst protein essential for secretion. *J Biol Chem*, 1999, 274: 23558-64
- [8] He B, Xi F, Zhang X, et al. Exo70 interacts with phospholipids and mediates the targeting of the exocyst to the plasma membrane. *EMBO J*, 2007, 26: 4053-65
- [9] Zhang X, Orlando K, He B, et al. Membrane association and functional regulation of Sec3 by phospholipids and Cdc42. *J Cell Biol*, 2008, 180: 145-58
- [10] Moore BA, Robinson HH, Xu Z. The crystal structure of mouse Exo70 reveals unique features of the mammalian exocyst. *J Mol Biol*, 2007, 371: 410-21
- [11] Samuel MA, Chong YT, Haasen KE, et al. Cellular pathways regulating responses to compatible and self-incompatible pollen in *Brassica* and *Arabidopsis* stigmas intersect at Exo70A1, a putative component of the exocyst complex. *Plant Cell*, 2009, 21: 2655-71
- [12] Synek L, Schlager N, Elias M, et al. AtEXO70A1, a member of a family of putative exocyst subunits specifically expanded in land plants, is important for polar growth and plant development. *Plant J*, 2006, 48: 54-72
- [13] Li S, van Os GM, Ren S, et al. Expression and functional analyses of EXO70 genes in *Arabidopsis* implicate their roles in regulating cell type-specific exocytosis. *Plant Physiol*, 2010, 154: 1819-30
- [14] Wen TJ, Hochholdinger F, Sauer M, et al. The roothairless1 gene of maize encodes a homolog of sec3, which is involved in polar exocytosis. *Plant Physiol*, 2005, 138: 1637-43
- [15] Liu N, Hake K, Wang W, et al. CALCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASE5 associates with the truncated NLR protein TIR-NBS2 to contribute to exo70B1-mediated immunity. *Plant Cell*, 2017, 29: 746-59
- [16] Hong W. SNAREs and traffic. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1744: 493-17
- [17] Liu W, Parpura V. SNAREs: could they be the answer to an energy landscape riddle in exocytosis? *Sci World J*, 2014, 10: 1258
- [18] Lobingier BT, Merz AJ. Sec1/Munc18 protein Vps33 binds to SNARE domains and the quaternary SNARE complex. *Mol Biol Cell*, 2012, 23: 4611-22
- [19] Cheng KK, Lam KS, Wu D, et al. APPL1 potentiates insulin secretion in pancreatic β cells by enhancing protein kinase Akt-dependent expression of SNARE proteins in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 8919-24
- [20] Kannan A, Aditya K, Veronique C, et al. Sequential analysis of trans-SNARE formation in intracellular membrane fusion. *PLoS Biol*, 2012, 10: e1001243
- [21] Hernandez JM, Stein A, Behrmann E, et al. Membrane fusion intermediates via directional and full assembly of the SNARE complex. *Science*, 2012, 336: 1581-84
- [22] Murray DH, Tamm LK. Molecular mechanism of cholesterol- and polyphosphoinositide-mediated syntaxin clustering. *Biochemistry*, 2011, 50: 9014-22
- [23] Südhof TC, Rizo J. Synaptic vesicle exocytosis. *JAMA*, 1981, 246: 93
- [24] Brunger, Axel T. Structure and function of SNARE and SNARE-interacting proteins. *Q Rev Biophys*, 2006, 38: 1
- [25] Jiang SY, Ramachandran S. Comparative and evolutionary analysis of genes encoding small GTPases and their

- activating proteins in eukaryotic genomes. *Physiol Genomics*, 2006, 24: 235-51
- [26] Liu F, Guo J, Bai P, et al. Wheat TaRab7 GTPase is part of the signaling pathway in responses to stripe rust and abiotic stimuli. *PLoS One*, 2012, 7: e37146
- [27] Winge P, Brembu T, Kristensen R, et al. Genetic structure and evolution of RAC-GTPases in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 2000, 156: 1959-71
- [28] Pereira-Leal JB, Seabra MC. Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *J Mol Biol*, 2001, 313: 889-901
- [29] Huckelhoven R. Transport and secretion in plant-microbe interactions. *Curr Opin Plant Biol*, 2007, 10: 573-9
- [30] Monaghan J, Zipfel C. Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Curr Opin Plant Biol*, 2012, 15: 349-57
- [31] Dodds PN, Rathjen JP. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat Rev Genet*, 2010, 11: 539-48
- [32] Jones JD, Dangl JL. The plant immune system. *Nature*, 2006, 444: 323-9
- [33] Shiu SH, Karlowski WM, Pan R, et al. Comparative analysis of the receptor-like kinase family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Cell*, 2004, 16: 1220-34
- [34] Lukasik E, Takken FL. STANDing strong, resistance proteins instigators of plant defence. *Curr Opin Plant Biol*, 2009, 12: 427-36
- [35] Zhao T, Rui L, Li J, et al. A truncated NLR protein, TIR-NBS2, is required for activated defense responses in the *exo70B1* mutant. *PLoS Genet*, 2015, 11: e1004945
- [36] Sabol P, Kulich I, Žárský V. RIN4 recruits the exocyst subunit EXO70B1 to the plasma membrane. *J Exp Bot*, 2017, 68: 3253-65
- [37] Afzal AJ, da Cunha L, Mackey D. Separable fragments and membrane tethering of *Arabidopsis* RIN4 regulate its suppression of PAMP-triggered immunity. *Plant Cell*, 2011, 23: 3798-811
- [38] Du Y, Overdijk EJ, Berg JA, et al. Solanaceous exocyst subunits are involved in immunity to diverse plant pathogens. *J Exp Bot*, 2018, 69: 655-66
- [39] Stegmann M, Anderson RG, Westphal L, et al. The exocyst subunit Exo70B1 is involved in the immune response of *Arabidopsis thaliana* to different pathogens and cell death. *Plant Signal Behav*, 2013, 8: e27421
- [40] Kulich I, Pečenková T, Sekereš J, et al. *Arabidopsis* exocyst subcomplex containing subunit EXO70B1 is involved in autophagy related transport to the vacuole. *Traffic*, 2013, 14: 1155-65
- [41] Chisholm ST, Coaker G, Day B, et al. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 2006, 124: 803-14
- [42] Dangl JL, Horvath DM, Staskawicz BJ. Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science*, 2013, 341: 746-51
- [43] Kudla J, Batistič O, Hashimoto K. Calcium signals: the lead currency of plant information processing. *Plant Cell*, 2010, 22: 541-63
- [44] Reddy AS, Ali GS, Celesnik H, et al. Coping with stresses: Roles of calcium- and calcium/calmodulin-regulated gene expression. *Plant Cell*, 2011, 23: 2010-32
- [45] Dubiella U, Seybold H, Durian G, et al. Calcium-dependent protein kinase/NADPH oxidase activation circuit is required for rapid defense signal propagation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 8744-9
- [46] Pečenková T, Hála M, Kulich I, et al. The role for the exocyst complex subunits Exo70B2 and Exo70H1 in the plant-pathogen interaction. *J Exp Bot*, 2011, 62: 2107-16
- [47] Ostertag M, Stammer J, Douchkov D, et al. The conserved oligomeric Golgi complex is involved in penetration resistance of barley to the barley powdery mildew fungus. *Mol Plant Pathol*, 2013, 14: 230-40
- [48] Stegmann M, Anderson RG, Ichimura K, et al. The ubiquitin ligase PUB22 targets a subunit of the exocyst complex required for PAMP-triggered responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2012, 24: 4703-16
- [49] Bos JI, Kanneganti TD, Young C, et al. The C-terminal half of *Phytophthora infestans* RXLR effector AVR3a is sufficient to trigger R3a-mediated hypersensitivity and suppress INF1-induced cell death in *Nicotiana benthamiana*. *Plant J*, 2006, 48: 165-76
- [50] Hardham AR, Cahill DM. The role of oomycete effectors in plant-pathogen interactions. *Funct Plant Biol*, 2010, 37: 919-25
- [51] Oh SK, Young C, Lee M, et al. In planta expression screens of *Phytophthora infestans* RXLR effectors reveal diverse phenotypes, including activation of the *Solanum bulbocastanum* disease resistance protein Rpi-blb2. *Plant Cell*, 2009, 21: 2928-47
- [52] Du Y, Mpina MH, Birch PR, et al. *Phytophthora infestans* RXLR effector AVR1 interacts with exocyst component Sec5 to manipulate plant immunity. *Plant Physiol*, 2015, 169: 1975-90
- [53] Collins NC, Thordal-Christensen H, Lipka V, et al. SNARE-protein-mediated disease resistance at the plant cell wall. *Nature*, 2003, 425: 973-7
- [54] Nielsen ME, Feechan A, Böhlenius H, et al. *Arabidopsis* ARF-GTP exchange factor, GNOM, mediates transport required for innate immunity and focal accumulation of syntaxin PEN1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 11443-8
- [55] Assaad FF, Qiu JL, Youngs H, et al. The PEN1 syntaxin defines a novel cellular compartment upon fungal attack and is required for the timely assembly of papillae. *Mol Biol Cell*, 2004, 15: 5118-29
- [56] Cao WL, Yu Y, Li MY, et al. OsSYP121 accumulates at fungal penetration sites and mediates host resistance to rice blast. *Plant Physiol*, 2019, 179: 1330-42
- [57] Heese M, Gansel X, Sticher L, et al. Functional characterization of the KNOLLE-interacting t-SNARE AtSNAP33 and its role in plant cytokinesis. *J Cell Biol*, 2001, 155: 239-49
- [58] Lewis JD, Wan J, Ford R, et al. Quantitative interactor screening with next-generation sequencing (QIS-Seq) identifies *Arabidopsis thaliana* MLO2 as a target of the

- Pseudomonas syringae* type III effector HopZ2. BMC Genomics, 2012, 13: 8
- [59] Wang P, Sun Y, Pei Y, et al. GhSNAP33, a t-SNARE protein from *Gossypium hirsutum*, mediates resistance to *Verticillium dahliae* infection and tolerance to drought stress. Front Plant Sci, 2018, 9: 896
- [60] Schultheiss H, Dechert C, Kogel KH, et al. A small GTP-binding host protein is required for entry of powdery mildew fungus into epidermal cells of barley. Plant Physiol, 2002, 128: 1447-54
- [61] Asaoka R, Uemura T, Ito J, et al. *Arabidopsis* RABA1 GTPases are involved in transport between the trans-Golgi network and the plasma membrane, and are required for salinity stress tolerance. Plant J, 2013, 73: 240-9
- [62] Ben Khaled S, Postma J, Robatzek S. A moving view: subcellular trafficking processes in pattern recognition receptor-triggered plant immunity. Annu Rev Phytopathol, 2015, 53: 379-402
- [63] Choi SW, Tamaki T, Ebine K, et al. RABA members act in distinct steps of subcellular trafficking of the FLAGELLIN SENSING2 receptor. Plant Cell, 2013, 25: 1174-87
- [64] Pizarro L, Leibman-Markus M, Schuster S, et al. Tomato prenylated RAB acceptor protein 1 modulates trafficking and degradation of the pattern recognition receptor LeEIX2, affecting the innate immune response. Front Plant Sci, 2018, 9: 257
- [65] Kwon SI, Cho HJ, Kim SR, et al. The Rab GTPase RabG3b positively regulates autophagy and immunity-associated hypersensitive cell death in *Arabidopsis*. Plant Physiol, 2013, 161: 1722-36
- [66] Zheng H, Camacho L, Wee E, et al. A Rab-E GTPase mutant acts downstream of the Rab-D subclass in biosynthetic membrane traffic to the plasma membrane in tobacco leaf epidermis. Plant Cell, 2005, 17: 2020-36
- [67] Liu J, Park CH, He F, et al. The RhoGAP SPIN6 associates with SPL11 and OsRac1 and negatively regulates programmed cell death and innate immunity in rice. PLoS Pathog, 2015, 11: e1004629
- [68] Antignani V, Klocko A L, Bak G, et al. Recruitment of PLANT U-BOX13 and the PI4K β 1/ β 2 phosphatidylinositol-4 kinases by the small GTPase RabA4B plays important roles during salicylic acid-mediated plant defense signaling in *Arabidopsis*. Plant Cell, 2015, 27: 243-61
- [69] Wang Y. A new paradigm in plant-pathogen interactions: pathogen evolved a paralogous decoy to shield the virulence factor from host inhibition. J Nanjing Agric Univ, 2018, 41: 1-2
- [70] Pieterse CM, Leon-Reyes A, Van der Ent S, et al. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. Nat Chem Biol, 2009, 5: 308-16
- [71] Spoel SH, Dong X. Making sense of hormone crosstalk during plant immune responses. Cell Host Microbe, 2008, 3: 348-51
- [72] Anderson JP, Badruzaufari E, Schenk PM, et al. Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. Plant Cell, 2004, 16: 3460-79
- [73] Santner A, Calderon-Villalobos LI, Estelle M. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. Nat Chem Biol, 2009, 5: 301-7
- [74] Tejos R, Rodriguez-Furlan C, Adamowski M, et al. PATELLINS are regulators of auxin-mediated PIN1 relocation and plant development in *Arabidopsis thaliana*. J Cell Sci, 2018, 131: pii: jcs204198
- [75] Drdová E J, Synek L, Pečenková T, et al. The exocyst complex contributes to PIN auxin efflux carrier recycling and polar auxin transport in *Arabidopsis*. Plant J, 2013, 73: 709-19
- [76] Ding Y, Wang J, Wang J, et al. Unconventional protein secretion. Trends Plant Sci, 2012, 17: 606-15
- [77] Ding Y, Wang J, Chun Lai JH, et al. Exo70E2 is essential for exocyst subunit recruitment and EXPO formation in both plants and animals. Mol Biol Cell, 2014, 25: 412-26
- [78] Wang J, Ding Y, Wang J, et al. EXPO, an exocyst-positive organelle distinct from multivesicular endosomes and autophagosomes, mediates cytosol to cell wall exocytosis in *Arabidopsis* and tobacco cells. Plant Cell, 2010, 22: 4009-30
- [79] Rybak K, Robatzek S. Functions of extracellular vesicles in immunity and virulence. Plant Physiol, 2019, 179: 1236-47
- [80] Robatzek S. Vesicle trafficking in plant immune responses. Cell Microbiol, 2007, 9: 1-8