



水稻免疫机制研究进展

高明君, 何祖华*

中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 植物分子遗传国家重点实验室, 上海 200032

* 联系人, E-mail: zhhe@sibs.ac.cn

收稿日期: 2013-09-12; 接受日期: 2013-10-22

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2011CB100700)资助项目

doi: 10.1360/052013-311

摘要 植物先天免疫主要由两部分组成: 一类是通过细胞膜上的病原菌分子模式识别受体识别病原微生物表面存在的分子特征激发的免疫反应(PTI); 另一类是专化性的抗病R蛋白识别病原微生物的效应蛋白, 从而激发下游的病原菌小种特异性的防卫反应过程(ETI). 随着水稻抗病信号途径中越来越多的抗病基因以及关键的调控基因被克隆和功能鉴定, 同时多种水稻病原菌效应蛋白的发现, 水稻抗病机理的研究也越来越深入. 本文阐述了水稻的 PTI, ETI 及其下游参与免疫信号转导的关键性组分, 从而形成一个初步的水稻免疫调控网络.

关键词
水稻
抗病性
PTI
ETI

植物在生长发育的过程中常常会遭受各种病原微生物包括细菌、真菌、病毒和线虫等的威胁, 所以植物需要有一套非常精细和复杂的免疫体系来抵抗这些病原微生物的入侵^[1]. 而另一方面病原微生物需要从宿主获取营养才可以存活繁殖, 所以它必须采用多种有效的侵染方式和复杂的致病机制来抑制和克服宿主的免疫体系或者提高植物的感病性, 从而完成侵染和繁殖. 所以植物与病原菌互作形成一个复杂的、动态的、共进化的循环体系^[2]. 在这个共进化过程中, 植物形成了不同层次的防卫机制来抵抗和限制病原菌的入侵, 主要由组成型和诱导型植物防御体系构成.

组成型的防御体系包括植物表面的蜡质、角质、木质素、硅细胞等物理屏障和植物细胞本身存在的抑制病原菌生长的酚类物质、硫化物、皂角苷和抗菌蛋白等化学屏障. 诱导型的植物防卫系统是植物受到病原菌侵染而诱导激活自身防卫机制, 包括一系列生理生化变化和基因表达水平的变化, 又称先天免

疫反应(innate immunity). 植物的先天免疫反应从机制和层次上可以分为两类: 一类是细胞膜表面的模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)识别病原菌表面存在的分子特征 PAMPs (pathogen-associated molecular patterns)所激发的免疫反应(PAMP-triggered immunity, PTI)^[3]; 另一类是植物专化性的抗病蛋白(R蛋白)识别病原菌分泌的效应蛋白(effector)激发的免疫反应(effector-triggered immunity, ETI)^[2]. PTI 是基础抗性(basal defense)的重要组成部分, 而 ETI 可能是形式上更进化的专化性免疫反应. 在植物体内, 它们之间相互影响、相互平衡来共同抵抗病原菌的入侵.

植物先天免疫在模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中的研究已经取得了很大的进展. 然而, 大部分农作物都属于单子叶植物, 单子叶和双子叶植物在进化上的差异导致了两者在免疫机制上可能存在诸多不同. 此外, 作物经过长期的人工驯化选择(domestication), 其免疫的遗传构成及其调控已经与

引用格式: 高明君, 何祖华. 水稻免疫机制研究进展. 中国科学: 生命科学, 2013, 43: 1016-1029

Gao M J, He Z H. Studies on innate immunity in rice. SCIENTIA SINICA Vitae, 2013, 43: 1016-1029, doi: 10.1360/052013-311

野生种出现了很大的差异. 因而拟南芥中取得的研究成果在农作物中的研究与应用有很大的局限性. 水稻是全世界最主要的粮食作物之一, 也已经成为单子叶模式植物. 水稻病害是影响其产量和品质的重要制约因素, 因此如何提高水稻的抗病性成为许多育种工作者追求的目标. 自从 2004 年水稻全基因组测序完成以后, 近年来关于水稻先天免疫反应分子机理的研究取得了很大的进展, 很多抗病基因和关键调控基因已被克隆和功能鉴定. 这些研究有利于全面地了解水稻的抗病调控网络, 也促进了育种家们进行抗病分子辅助育种工作, 培育新的水稻抗病品种.

本文基于植物先天免疫研究已经建立的基本理论和模型, 结合水稻抗病研究取得的成果, 从 PTI, ETI 及其下游参与免疫信号转导的组分成员 3 方面概述水稻先天性免疫机制.

1 水稻 PTI 免疫反应

PAMPs 是病原菌携带的一类保守的分子. 在植物病原菌中已经被证明的 PAMPs 包括: 细菌鞭毛蛋白(flagellin)、翻译延伸因子(EF-Tu)、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、肽聚糖(peptidoglycan)、几丁质(chitin)和麦角固醇(ergosterol)等. 这些 PAMPs 是许多病原菌普遍具有的分子特征, 在进化上比较保守. 因此, 植物识别 PAMPs 并激活 PTI 免疫反应是抵抗病原菌的第一道基础屏障, 是植物基础抗病性的最主要体现, 因而这类抗病反应一般具有广谱、稳定和持久的特点. 目前水稻中已经鉴定的 PRRs 蛋白包括介导对白叶枯病菌抗性的 XA21、介导对稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*)抗性的 CEBiP 以及拟南芥中得到充分研究的 FLS2 在水稻中的同源蛋白 OsFLS2 等少数几个蛋白(表 1). 本文将介绍上述 3 个水稻中 PRRs 蛋白的信号识别及其下游的信号传递途径.

1.1 Ax21-XA21 介导的免疫反应

水稻 *Xa21* 基因来源于非洲长雄野生稻(*Oryza longistaminata*), 是一个相对广谱的抗病基因, 对大部分白叶枯病菌(黄单胞菌 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xoo*)小种都具有抗性. 1995 年, Song 等人^[5]利用图位克隆技术获得了 *Xa21* 基因. XA21 蛋白是由 1025 个氨基酸组成的受体激酶, 其结构可主要分为:

胞外的富含亮氨酸重复(leucine-rich repeats, LRR)、跨膜区(transmembrane, TM)、近膜区(juxtamembrane, JM)和胞内的 non-RD 激酶区. 与活性区域含有保守的精氨酸(arginine, R)的 RD 激酶相比, non-RD 激酶活性区域的精氨酸特定地被半胱氨酸和甘氨酸取代. XA21 胞外的 LRR 结构域识别 *Xoo* 的 PAMP 分子 Ax21^[6], 胞内的蛋白激酶区向下游传递抗病信号. 最近研究发现 XA21 的 JM 结构域可以调节 XA21 的活性^[7,8]. 有趣的是, 将拟南芥油菜素内酯(BR)受体 BRI1 的 LRR-JM 结构域与 XA21 的激酶域合成嵌合受体 NRG1, 转基因水稻细胞可以在 BR 处理后激发防卫反应^[9].

由于水稻 *Xa21* 基因介导的对白叶枯病菌的抗性非常强, 长期以来, 研究人员一直认为 *Xa21* 是经典 R 基因, 介导了水稻对 *Xoo* 的 gene-for-gene 抗性. Ronald 等人^[10]一直尝试在 *Xoo* 中寻找 *Xa21* 基因对应的效应蛋白“Ax21”, 他们构建了 *Xoo* 突变体库, 筛选不能激发 XA21 介导的抗性的突变体菌株, 发现了一系列 *rax* (required for activation of XA21-mediated immunity)基因. 主要可以分为两大类: 一类是编码细菌 Type I 分泌系统组分的 *raxA*, *raxB* 和 *raxC* 基因; 另一类是参与蛋白硫酸盐化的基因 *raxST*, *raxR* 和 *raxP*. 尽管上述 *Xoo* 突变体菌株库遗传筛选发现了一系列重要的控制 Ax21 的活性和分泌的基因, 但是并没有鉴定到 Ax21 本身. 根据已有的研究结果可以推测 Ax21 可能是一个 Type I 分泌系统分泌的硫酸盐化的短肽, 因而 Ronald 等人^[11]转而采用生化的手段分离 Ax21, 通过液相质谱 LC-MS/MS, 从 *Xoo* 菌株 PXO99A² 中成功分离到了由 Ax21 基因编码的 194 个氨基酸的蛋白, 人工合成 Ax21 N 端的 17 个氨基酸的短肽 AxY^S22(其中酪氨酸-22 发生硫酸盐化修饰)完全具有 Ax21 的活性, 并且可以和 XA21 结合. Ax21 不但存在于白叶枯病菌, 而且在所有测序的黄单胞菌属(*Xanthomonas*)中都存在, 其中 AxY^S22 的氨基酸序列 100% 保守. 此外, 它在苛养木杆菌(*Xylella fastidiosa*)以及嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)中也都有发现^[11]. 因此, Ax21 满足了 PAMPs 的定义, 是典型的 PAMP, 而 XA21 属于 PRR 蛋白, 介导了水稻的 PTI 抗性, 这推翻了多年来人们一直认为 *Xa21* 是 R 基因的认识.

为了研究 XA21 介导的免疫信号反应调控网络, Ronald 等人^[12]采用酵母双杂以及免疫共沉淀等方法,

分离鉴定了一系列与 XA21 互作的蛋白, 包括 XB3, XB10, XB15, XB24 以及 OsBiP3 等, 通过进一步的体内互作验证以及转基因表型功能分析, 逐渐形成了 XA21 介导的 PTI 作用模型: XA21 在 ER 中合成, BiP3 和 SDF2 等 ER 伴侣参与了 XA21 的合成, XA21 通过 ER 质量监控(ER quality control, ER QC)检测后转运到质膜上^[13]. XB24 是一个 ATPase 蛋白, 它和 XA21 的 JM 结构域互作, 通过它的 ATPase 活性, 促进了 XA21 的自磷酸化, 使 XA21 处于一个失活的状态. 当有 Ax21 结合到 XA21 的 LRR 结构域后, 会诱导 XA21 和 XB24 发生解离, 激活 XA21 的 non-RD 激酶活性, 向下游传递抗病信号^[8]. XB3 是 E3 泛素连接酶蛋白, 它的功能可能是降解 XA21 信号途径中的负调因子, 从而正调控了 XA21 介导的抗性^[14]. 下游反应的关键调控因子可能还包括 MAPK 级联反应的成员, MAPK5 负调控了水稻对白叶枯病菌的抗性, 而 MAPK12 正调控了水稻对白叶枯病菌的抗性^[15]. 在细胞核里面, WRKY 转录因子 OsWRKY62 和 OsWRKY76 通过抑制病程相关基因 *PR1* 和 *PR10* 的表达, 从而负调控了 XA21 介导的对白叶枯病的抗病性^[16]. 持续地激活免疫反应对于植物体是有害的, 所以 XA21 介导的免疫反应也需要严格的负调控. XB15 编码一个蛋白磷酸酶 2C, XA21 可以招募 XB15 到近膜结构域, 使 XA21 去磷酸化, 从而关闭 XA21 介导的免疫反应^[17]. 最新研究结果表明, 在有 Ax21 存在时, XA21 蛋白可以发生断裂, 释放出胞内激酶区, 进入细胞核. 双分子荧光互补实验(BiFC)显示 XA21 的胞内激酶区可以和转录因子 OsWRKY62 (XB10)在细胞核内互作. 为了研究 XA21 胞内激酶区的入核对于 XA21 介导的免疫反应是否有意义, Park 等人^[18]在 XA21 的 C 端接了一个出核信号(NES), 结果发现与对照 Ubi-XA21-GFP 植株相比, Ubi-XA21-GFP-NES 转基因植株的抗病性显著削弱, 这说明 XA21 胞内激酶区的入核对于 XA21 介导的抗病性是必须的. 纵观整个过程, XA21 的磷酸化状态对于 XA21 的活性是非常关键的. 尽管通过酵母双杂和免疫共沉淀方法鉴定了很多 XA21 信号通路的成员, 但是依然有很多问题没有解决. 比如 XA21 作为受体激酶, 它的激活伴随着很多蛋白的磷酸化和去磷酸化过程, 有哪些蛋白参与了 XA21 的激活? 它的直接底物又是什么? 为了更有效地寻找参与 XA21 激活的成员, 一个可行的方法是磷酸化蛋白组学(phosphoproteomic)结合质

谱分析, 找到 Ax21 处理前后磷酸化水平有差异的蛋白, 进一步在这些候选蛋白里面鉴定出 XA21 的直接底物.

1.2 Chitin-CEBiP 介导的免疫反应

几丁质(chitin)是真菌细胞壁的重要成分, 它可以激发动植物的免疫反应. 在水稻中, 几丁质被相应的模式识别受体(PRR)识别, 引起包括 ROS 产生、PR 基因表达以及植保素合成等防卫反应. 为了研究几丁质信号识别及其传递的分子机制, 在水稻悬浮细胞中, 通过亲和纯化鉴定得到了细胞膜结合的几丁质结合蛋白(chitin elicitor binding protein, CEBiP), 它是由 328 个氨基酸及糖链组成的糖蛋白, 包括两个 LysM 结构域, C 端预测有短的跨膜结构域, 但是缺乏胞内激酶区^[19]. 在水稻悬浮细胞中, 降低 CEBiP 的表达量会抑制活性氧的产生, 对几丁质的反应显著降低, 这说明 CEBiP 在几丁质的识别和信号传递中发挥着重要的作用^[19]. 几丁质受体激酶 1(chitin elicitor receptor kinase 1, CERK1/LysM-RLK1)是拟南芥几丁质信号途径中的关键成分^[20,21]. 水稻是否需要 CERK1 和 CEBiP 共同作用以及这两个蛋白如何协同作用向下游传递几丁质介导的免疫反应信号? 有研究表明, 降低水稻 OsCERK1 的表达量会抑制几丁质诱导的防卫基因的表达, 这说明, OsCERK1 对于水稻中几丁质的信号传递是必须的^[22]. 酵母双杂实验显示 CERK1 和 CEBiP 会形成同源或异源二聚体, 免疫共沉淀实验也证明, 在几丁质处理的水稻悬浮细胞中, CEBiP 和 CERK1 存在于同一个受体复合体中. 这些结果表明, 当配体被识别以后, CEBiP 和 CERK1 会发生互作^[22]. 在水稻悬浮细胞中, 几丁质的识别会引起下游的一系列防卫反应, 包括 MAPKs 的激活、ROS 的产生、PR 基因的表达、植保素的合成和磷脂酸(phosphatidic acid, PA)的累积等^[23].

近年有研究发现, Hop/Sti-Hsp90 伴侣复合体对于水稻几丁质的受体 CERK1 的成熟和转运是必须的^[24]. CERK1 和 Hop/Sti-Hsp90 伴侣复合体在 ER 中互作, CERK1 从 ER 到质膜的转运是依赖于 Hop/Sti1 和 Hsp90. Hop/Sti-Hsp90 伴侣还可以和 OsRac1 共同存在于质膜表面的“defensome”复合体, 它们对于几丁质介导的免疫反应是必须的. 这些结果表明, Hop/Sti-Hsp90 伴侣复合体在 PRRs 的成熟和转运过程中发挥着重要的作用, 而且它可能介导了 PRRs 和

抗病蛋白复合体“defensome”中的其他信号组分比如小 G 蛋白 OsRac1 的联系^[24]. CERK1 属于 RD 激酶, 在缺失 CEBiP 的情况下 CERK1 不能单独介导免疫反应, 这表明, CERK1 是几丁质免疫信号传递过程中的协同调节子“co-regulator”. CEBiP 与 LRR 受体蛋白 XA21D 类似, 由于本身缺乏跨膜和激酶结构域, 因而需要一个 co-regulator 协同发挥功能^[6]. 与 BRI1-XA21 的嵌合受体类似^[9], 表达 CEBiP 胞外结构域和 XA21 的 JM 和激酶结构域的嵌合体基因的转基因植株, 在用几丁质处理后, 会有细胞死亡和活性氧的产生, 对稻瘟病菌的抗性增强^[25]. 这表明, 可以将 PRRs 受体不同功能的结构域应用于新基因创造, 操纵植物的免疫信号途径.

1.3 flagellin-OsFLS2 介导的免疫反应

鞭毛蛋白(flagellin)是细菌鞭毛的主要成分, 它可以激发动植物的免疫反应^[26]. 在拟南芥中, 来源于细菌鞭毛蛋白 N 端保守的 22 个氨基酸短肽 flg22 可以激发 FLS2 介导的免疫反应^[27]. 为了研究水稻中 flg22 诱导的免疫反应信号, Che 等人^[28-30]克隆了水稻的同源基因 *OsFLS2*, 在拟南芥中异源表达 *OsFLS2* 可以介导 flg22 的信号. 在正常的水稻悬浮细胞中, flg22 处理可以诱导弱的防卫反应; 而在过表达 *OsFLS2* 的水稻悬浮细胞中, 鞭毛蛋白或 flg22 处理可以激发更强烈的免疫应答, 产生包括 H₂O₂ 累积、细胞死亡和 *PR* 基因表达等防卫反应. 这些反应也是拟南芥 FLS2 介导的细菌鞭毛蛋白识别的主要特征^[31]. 上述结果表明, 水稻中 *OsFLS2* 介导的细菌鞭毛蛋白的识别以及下游信号传递途径和拟南芥是类似的.

2 水稻 ETI 免疫反应

由于植物普遍存在 PTI 基础免疫反应, 病原微生物

为了克服这种抗病性, 进而进化产生多种无毒蛋白/效应蛋白(effector), 以干扰或阻断宿主植物的 PTI; 随后植物也进化产生了可以专化识别病原菌分泌的效应蛋白的抗病 R 蛋白. 由 R 蛋白识别病原菌分泌的效应蛋白所激发的免疫反应即为 ETI, 它是植物专化抗病性的主要形式.

2.1 水稻抗病 R 蛋白

抗病 R 蛋白依据它们的蛋白质结构可以分成 5 种类型: 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(Ser/Thr protein kinase, STK)、细胞内受体蛋白(coiled-coil / Toll or interleukin-1 receptor-like nucleotide-binding site-leucine-rich repeat, CC/TIR-NBS-LRR)、仅含胞外 LRR 结构域的跨膜受体(leucine-rich repeat transmembrane, LRR-TM)、受体类激酶(LRR-TM-STK)和其余不属于上述结构的 R 蛋白. R 蛋白有两个基本的功能: (i) 识别病原菌效应蛋白或其胞内靶标; (ii) 激发下游信号, 诱导防卫基因表达. 很多研究团队一直致力于水稻 R 基因的分离. 目前水稻中克隆的 R 基因主要包括: 介导对白叶枯病抗性的 *XA1*^[35], *XA27*^[36], *xa5*^[37,38], *xa13* (*Os8N3* 或 *OsSWEET11*)^[39,40], *Os11N3* (*OsSWEET14*)^[40,41], *xa25*^[42]; 介导对稻瘟病抗性的 *Pita*^[43,44], *Pib*^[45], *Piz-t*^[46], *Pikm*^[47], *Pit*^[48,49], *Pid3*^[50], *Pi2*^[46], *Pi5*^[51], *Pi9*^[52], *Pi36*^[53], *Pi37*^[54], *Pb1*^[55]和 *Pia*^[56]等(表 2).

在这些 R 蛋白中, NBS-LRR 抗病蛋白占绝大多数. 水稻基因组中预测大约有 500 个 NBS-LRR 蛋白的编码基因^[57], 它们都是潜在的抗病蛋白, 但是目前得到研究的只有几个. 在水稻 NBS-LRR 蛋白中, 很多都和稻瘟病的抗性相关. *Pib* 基因是第一个被克隆的抗稻瘟病基因, 编码由 1251 个氨基酸组成的位于细胞质的 NBS-LRR 类抗病蛋白, 在亲和与非亲和反应中 *Pib* 基因都表达, 还受到外界环境因素的诱导表达^[45]; *Pita* 基因编码一个由 928 个氨基酸组成的 NBS-

表 1 水稻模式识别受体 PRRs 及其相应的 PAMPs^[4]

蛋白名称	蛋白家族	病原菌携带的分子特征	病原菌	参考文献
XA21	LRR RLK, non-RD 激酶	硫酸盐化 Ax21	白叶枯病菌	[5,11]
CEBiP	LysM	几丁质	稻瘟病菌	[19]
OsFLS2	LRR RLK, non-RD 激酶	鞭毛蛋白	未鉴定	[30]
XA3/XA26 ^{a)}	LRR RLK, non-RD 激酶	未鉴定	白叶枯病菌	[32,33]
Pi-D2 ^{a)}	SD-2b RLK, non-RD 激酶	未鉴定	稻瘟病菌	[34]

a) 表示依据该蛋白存在的 non-RD 基序推测为 PRRs 蛋白

表 2 水稻抗病 R 蛋白及其相应的病原菌无毒蛋白^[4]

蛋白名称	蛋白家族	病原菌无毒蛋白	病原菌	参考文献
XA1	NBS-LRR	未鉴定	白叶枯病菌	[35]
XA27	两个 α -螺旋结构域蛋白	AvrXA27(TAL 效应蛋白)	白叶枯病菌	[36]
xa5 ^{a)}	TFIIA 转录因子	可能为 TAL 效应蛋白	白叶枯病菌	[37,38]
xa13(Os8N3,OsSWEET11) ^{a)}	MtN3 同源蛋白	pthXo1(TAL 效应蛋白)	白叶枯病菌	[39,40]
Os11N3(OsSWEET14) ^{a)}	MtN3 同源蛋白	AvrXA7(TAL 效应蛋白)	白叶枯病菌	[40,41]
xa25 ^{a)}	MtN3 家族蛋白	可能为 TAL 效应蛋白	白叶枯病菌	[42]
Pita	NBS-LRR	AvrPita1	稻瘟病菌	[43,44]
Pib	NBS-LRR	未鉴定	稻瘟病菌	[45]
Piz-t	NBS-LRR	AvrPiz-t	稻瘟病菌	[46]
Pikm	NBS-LRR	AvrPikm	稻瘟病菌	[47]
Pit	NBS-LRR	未鉴定	稻瘟病菌	[48,49]
Pid3	NBS-LRR	未鉴定	稻瘟病菌	[50]
Pi2	NBS-LRR	未鉴定	稻瘟病菌	[46]
Pi5	NBS-LRR	未鉴定	稻瘟病菌	[51]
Pi9	NBS-LRR	未鉴定	稻瘟病菌	[52]
Pi36	NBS-LRR	未鉴定	稻瘟病菌	[53]
Pi37	NBS-LRR	未鉴定	稻瘟病菌	[54]
Pb1	NBS-LRR	未鉴定	稻瘟病菌	[55]
Pia	NBS-LRR	AvrPia	稻瘟病菌	[56]

a) 表示该基因为隐性抗病位点

LRD (leucine-rich domain, LRD)类胞质受体蛋白. *Pita* 在抗感植株中都组成型表达, 感病品种中的 *Pita* 蛋白与抗病品种中的 *Pita* 蛋白仅存在一个氨基酸的差异, 即 918 位丝氨酸被替换为甘氨酸^[43]. 在水稻细胞中瞬时表达稻瘟病菌的无毒基因 *AvrPita* 可以激活 *Pita* 依赖的抗病反应, 诱导细胞死亡. 酵母双杂以及体外结合实验证明 *Pita* 的 LRD 结构域可以特异地结合效应蛋白 *AvrPita*, 但是 *AvrPita* 不能与感病的 *Pita* 蛋白结合诱导抗病反应, 表明 *AvrPita* 与 *Pita* 直接互作的特异性. 这也是第一个证明 R 蛋白与 Avr 蛋白直接互作的例子^[44]. 因为抗病基因 *Pib*, *Pita*, *Pi36* 和 *Pi37* 的抗谱较窄, 所以在目前的抗病育种中利用价值不大. *Pi2*, *Pi9* 和 *Piz-t* 是已经被克隆的具有广谱抗瘟性的基因, 它们位于水稻第六号染色体上一个 NBS-LRR 类抗病基因簇中, 这个基因簇的不同位点可以控制对不同小种稻瘟病菌的抗性, 因而在以后的广谱抗稻瘟病育种中具有非常重要的意义

除了上述 NBS-LRR 蛋白, 还有一些不含 NBS-LRR 结构域的水稻 R 蛋白可以介导水稻对白叶枯病的 ETI 抗性. 这些蛋白包括 XA27^[36], xa5^[37,38], xa13 (Os8N3 或 OsSWEET11)^[39,40] 和 Os11N3 (OsSWEET14)^[40,41]. 抗病品种和感病品种中的 *Xa27* 基因都编码相同的蛋白, 但是抗感品种的启动子区

域有所差异, 当携带 *avrXa27* 的白叶枯病菌感染时, 只有抗病位点的 *Xa27* 基因能够表达, 并且 *Xa27* 基因的表达只发生在侵染部位的周围. 随后的研究表明, *AvrXa27* 可以直接结合到 *Xa27* 的启动子上诱导 *Xa27* 的转录. 异位表达 *Xa27* 可以产生对其它亲和小种(不携带 *avrXa27*)的抗病性^[36]. 而 *Os8N3* 和 *Os11N3* 是两个具有同源性的感病基因, 他们编码糖转运蛋白^[41]. 效应蛋白如果能激活这类基因的表达, 水稻就表现为感病, 而这类基因如果发生突变水稻就表现为抗病. 由效应蛋白调控 R 基因或者感病基因的表达, 这是 R 蛋白抗病机制的新发现.

2.2 水稻病原菌无毒蛋白

近年来, 在模式植物拟南芥中关于效应蛋白抑制宿主免疫反应的研究取得了很大进展, 以丁香假单胞菌为代表的 type III 分泌系统分泌的效应蛋白可以攻击植物的 PTI 免疫信号通路中的各种关键环节. 比如 *AvrPto*, *AvrPtoB* 和 *AvrPphB* 直接攻击位于细胞表面的 PRR 受体或受体复合体中的其他成员; *HopF2* 和 *HopAI1* 分别攻击 MAPKK 和 MAPK; *HopF2* 和另外 3 个效应蛋白 *AvrRpt2*, *AvrRpm1* 以及 *AvrB* 作用于植物的 RIN4 蛋白, 干扰胞内免疫受体 R 蛋白的功能. 此外, 效应蛋白还可以影响囊泡运输、抑制转录

后翻译以及作用于质体抑制 SA 的产生等^[58]. 一项最新的研究发现黄单胞菌属的 type III 效应蛋白 AvrAC 可以作用于免疫受体复合物中的胞内激酶 BIK1 和 RIPK. AvrAC 是尿苷酰转移酶, 它可以将 5'-单磷酸尿苷转移到 BIK1 和 RIPK 活性区的磷酸化位点, 抑制激酶的激活, 阻断下游信号通路^[59].

相比拟南芥中病原菌效应蛋白研究所取得的进展, 水稻抗病 R 蛋白所识别对应的效应蛋白的研究还比较少. 如表 2 中所列, 水稻 NBS-LRR 蛋白所识别的效应蛋白中, 有 4 个来自稻瘟病真菌, 它们分别是 AvrPita^[43], AvrPiz-t^[60], Avr-Pik/km/kp 和 AvrPia^[61]. 这 4 个效应蛋白都是具有特异结构和功能的小蛋白, 能够被相应的 NBS-LRR 蛋白所识别. AvrPita 是一个含有锌-金属蛋白酶结构域的蛋白^[43]; AvrPiz-t 是一个由 108 个氨基酸组成含 LxAR 结构域([LI]xAR[SE][DSE])的蛋白^[60]; AvrPik/km/kp 和 AvrPia 都是未知功能蛋白^[61]. 上述结果表明, 稻瘟病真菌分泌的效应蛋白都是新的功能未知蛋白, 在其他真菌中几乎没有同源蛋白. 这从另一方面也可以看出病原菌为了克服宿主的防卫反应, 不断地进化, 合成分泌新的效应蛋白, 抑制植物的抗病反应^[62].

Xanthomonas 携带一大类称为 TAL(transcription activator-like)的效应蛋白, 通过特异地结合到宿主的 DNA, 激活转录特定的基因, 从而激活或抑制防卫反应^[63]. 水稻白叶枯病抗病蛋白 XA27, xa13(Os8N3 或 OsSWEET11)和 Os11N3(OsSWEET14)相对应的效应蛋白 AvrXA27, pthXo1 和 AvrXA7 都属于 TAL 转录因子家族^[36,39,40], xa5 对应的效应蛋白也预测可能是 TAL 转录因子^[64]. 白叶枯病菌 PXO99^A 分泌的 TAL 效应蛋白 pthXo1 可以直接结合到水稻 OsSWEET11 的启动子上, OsSWEET11 编码糖转运蛋白, 进而促进糖分从细胞质运输到维管束中, 使细菌得以生存. 当 pthXo1 发生突变或者 OsSWEET11 缺失,

OsSWEET11 不能被诱导表达, 限制了糖分转运, 从而抑制细菌在维管束的生长, 这也是水稻白叶枯病隐性抗病基因 xa13 的抗病机理; xa13 介导的抗性可以被 PXO99^A 分泌的另一个 TAL 效应蛋白 AvrXa7 打破, AvrXa7 可以激活另一个糖分转运蛋白 OsSWEET14 的表达, 使病原菌存活, 产生感病反应^[41].

2.3 水稻 R 蛋白识别病原菌 Avr 蛋白的分子机制

植物 R 蛋白通过识别病原菌无毒蛋白而诱导植物产生 ETI 免疫激发. 目前, 植物抗病蛋白与病原菌分泌的无毒蛋白的识别主要分为“直接识别”和“间接识别”: (i) “直接识别”模型(direct): 即抗病 R 蛋白可以通过直接与病原菌无毒蛋白的相互作用而识别病原菌, 即“受体-配体模型”(receptor-ligand); (ii) “间接识别”模型主要有“警戒/诱捕”模型(guard/decoy): R 蛋白通过监视宿主内无毒蛋白对靶标蛋白(guardee)或其类似蛋白的修饰而间接地识别病原菌. 此外, 还有“诱饵”模型(bait): 无毒蛋白与诱饵蛋白互作, 引起抗病 R 蛋白识别无毒蛋白^[65], 也属于“间接识别”模型.

如前所述, 在水稻中酵母双杂和体外实验证明, 稻瘟病抗病 R 蛋白 Pita 可以结合稻瘟病菌分泌的 AvrPita, 它们的互作符合直接识别模型^[43]. 尽管如此, 水稻中绝大部分 NBS-LRR 蛋白和相应的效应蛋白的识别机制还是不清楚的. 值得注意的是, 上述 3 种模型是基于植物中已经发现的例子而提出, 事实上, 抗病 R 蛋白和效应蛋白的互作远不局限于此. 最近的研究发现黄单胞菌(*Xanthomonas*)分泌的 TAL 效应蛋白通过特异地结合到相应 R 基因的启动子区域, 激活转录表达蛋白, 从而产生抗病或感病性^[36,41]. 更令人振奋的是, 这种 TAL 效应蛋白特异地识别 DNA 序列是有着特定的密码, 不但可以依据效应蛋白的氨基酸序列预测它的宿主靶基因, 而且可以利用这

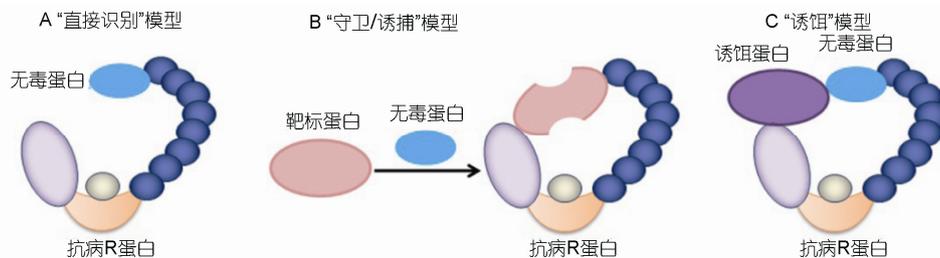


图1 植物 R 蛋白与病原菌无毒蛋白的识别模型^[65]

种密码人工合成蛋白, 操纵目的基因的表达^[63,66]. 依据该理论发明的 TALEN (transcription activator-like effector nucleases) 系统, 可以有效地对生物基因组进行编辑与加工^[67]. 这项新的基因编辑技术将会是生物技术的一场革命.

3 水稻免疫反应中的重要信号转导组分

3.1 OsRac1 GTPase 复合物

Rac GTPase 家族属于小 G 蛋白的 Rac 超家族, 这个超家族的成员都有 GTPase 的活性, 可以激活蛋白激酶活性. 在植物中, Rac GTPases 参与了很多重要的生命活动, 包括细胞极性生长、细胞的分化以及胁迫反应^[68]. 水稻含有 7 个编码 Rac GTPases 的基因^[69]. OsRac1 是一个 21 kD 的小 G 蛋白, 具有 GTPase 活性, 可以参与到 PAMPs 如几丁质和鞘磷脂介导的免疫反应^[70]. 运用亲和纯化结合质谱鉴定的方法分析 OsRac1 的复合物, 鉴定出水稻 RACK1 (Receptor for Activated C-Kinase 1), 它可以与结合 GTP 形式的 OsRac1 互作, 正调控活性氧的产生和对稻瘟病的抗性. 此外, 研究还发现 RACK1 可以和细胞质内的 RAR1, SGT1, HSP90 以及 HSP70 等抗病复合物成员互作, 协同发挥作用, 向下游传递 OsRac1 参与介导的免疫信号^[71,72]. OsRac1 还可以直接和 NBS-LRR 蛋白 Pit 互作, 参与 Pit 介导的对稻瘟病的免疫反应^[49]. OsRac1 可以激活 MAPK6 介导的激酶级联反应, 产生包括细胞死亡、活性氧迸发、PR 基因表达和植保素合成等免疫反应^[73].

3.2 OsNPR1/NH1 介导的系统抗病功能

近年来有很多参与水稻抗病的关键调控基因被报道. 其中最值得关注的是水稻 *OsNPR1/NH1*. 在拟南芥和烟草中, *NPR1* 基因都被证明为 SA 抗病信号途径中的关键调控因子. Chern 等人^[74]将拟南芥的 *AtNPR1* 基因在水稻中过量表达, 发现可以明显地提高转基因水稻对白叶枯病和纹枯病的抗性. 他们还用酵母双杂筛选到了拟南芥 *AtNPR1* 在水稻中互作的 4 个 TGA 家族的转录因子, 其中 rTGA2.1 可以与水稻 PR 基因 *RCH10* 的启动子区域的受 SA 诱导的顺式作用元件互作. *AtNPR1* 的水稻同源基因 *OsNPR1/NH1* 可以互补拟南芥 *npr1* 突变体的表型, 将水稻的 *OsNPR1/NH1* 过量表达可以产生自发细胞

死亡和株高降低的表型, 并且提高了水稻对白叶枯病的抗病性; 反之, 用 RNAi 技术将 *OsNPR1* 基因沉默后, 转基因植株对白叶枯病菌更为感病^[75,76]. 这些结果表明, 单子叶植物水稻中存在着类似于双子叶植物拟南芥中 NPR1 依赖的 SA 抗病反应信号途径.

3.3 MAP 激酶级联反应

MAPK 级联反应通过改变蛋白的磷酸化水平, 将外界的信号向下游传递. 一个 MAPK 级联反应至少包括 3 个层次的激酶: MAPK, MAPK 激酶 (MAPKK) 和 MAPKK 激酶 (MAPKKK), 已有很多研究报道 MAPKs 参与植物的 PTI 和 ETI^[77]. 水稻中已经鉴定了 17 个 MAPKs, 目前已经发现有 3 个 MAPKs (MAPK5, MAPK6 和 MAPK12) 参与调控了植物的抗病反应^[78]. 转基因研究结果表明, MAPK5 是水稻非生物胁迫的正调控因子, 同时也是水稻抗病反应的负调控因子^[79]; MAPK6 和 OsRac1-OsRAR1-HSP90-OsSTG1 复合物共同参与 NBS-LRR 蛋白 Pit 介导的信号途径, 向下游传递抗病信号^[49,73]. 此外, MAPK6 还参与了几丁质诱导的抑菌蛋白的合成^[23], 这些结果表明, MAPK6 正调控了水稻的 PTI 和 ETI; MAPK12 可以被稻瘟病菌的侵染诱导, 同时又正调控水稻对白叶枯病菌 *Xoo* 的抗病性^[15]. 基因组进化分析发现了 8 个新的属于 MAPK 激酶级联反应的基因有可能调控了水稻的生物胁迫响应, 这些基因如何发挥作用以及与 MAPK5, MAPK6 和 MAPK12 介导的激酶级联反应的关系还有待进一步研究^[80].

3.4 转录因子

PTI 和 ETI 会引起大量转录因子表达水平的改变, 这其中包括 WRKY 转录因子家族. 水稻基因组中有超过 100 个 WRKY 转录因子^[81]. 有许多 WRKY 转录因子参与了水稻免疫反应. 其中 WRKY45 正调控水稻对稻瘟病和白叶枯病的抗性, 并且不依赖于水稻的 NH1^[82,83]; WRKY62 和 WRKY76 负调控 XA21 介导的免疫反应^[15,16]; WRKY53 和 WRKY89 在稻瘟病菌侵染时会呈现特异的诱导表达^[84,85]. 我们发现一些 WRKY 转录因子是特定地响应某一种病原菌的侵染, 而另外一些则可以响应多种病原菌的信号, 这表明, 不同病原菌激发的植物抗病信号途径下游存在着交叉.

TGA 转录因子是一类可以结合到 DNA 元件为

TGACG 的转录因子, 已有很多报道显示它在抗病反应中发挥重要的作用. 在拟南芥中, TGA 转录因子有双重作用, 在非诱导的情况下抑制 PR 基因的表达, 但是它对于 NPR1 介导的 SAR 反应又是必需的^[86]. 在水稻中, 沉默 *rTGA2.1* 会在一定程度上增强水稻对 *Xoo* 的抗性^[87].

3.5 PR 基因

植物 PR 基因的激活往往被看作防卫反应途径激活的特征, 例如拟南芥的 *PR1*, *PR2* 和 *PR5* 是 SA 途径的标志基因, 而 *PDF1.2*, *PR3* 和 *PR4* 主要与 JA/ET 途径激活相关. 根据 PR 蛋白的氨基酸序列以及生化功能等, PR 蛋白大概可以分为 17 类: PR1-PR17^[88]. 某些 PR 蛋白是一些酶类如几丁质酶和葡聚糖酶, 它们可以直接降解病原真菌的细胞壁, 抑制其生长. 植物中也存在着与动物中类似的一类叫防卫素 (defensin) 的小分子抗菌肽类, 富含半胱氨酸, 在受病原菌感染后累积并有直接的抗菌作用. 在水稻中, 近年来也陆续克隆了很多 PR 基因, 比如属于 *PR1* 家族的 *PR1a* 和 *PR1b*, PR2 葡聚糖酶家族的 *Gns*, PR3 几丁质酶家族的 *RC24*, *RCH10* 和 *Rcht2*, PR4 家族的 *OsPR4*, PR5 的甜菜素 (thaumatin) 类似蛋白家族的 *Pir2*, PR8III 型几丁质酶家族的 *PR8*, PR9 过氧化物酶家族的 *POX8.1* 和 *POX22.3*, PR10 核糖核酸酶家族的 *JIOsPR10*. 这些 PR 基因被报道受细菌和真菌感染诱导^[89-92]. 其中体外表达的 *OsPR4* 蛋白具有抗真菌的活性, 它可以抑制腐生型真菌纹枯病菌 (*Rhizoctonia solani*) 的菌丝生长^[93]. 这些研究还表明, PR 蛋白的产生有一些是病原菌特异的, 有一些则不是.

3.6 防卫激素在水稻免疫反应中的功能

水杨酸 (salicylic acid, SA)、茉莉酸 (jasmonic acid, JA) 和乙烯 (ethylene, ET) 在拟南芥抵抗病原菌信号途径中起了重要的作用, 一般认为 SA 与植物的营养型致病菌的抗性相关, 而 JA 和 ET 参与了植物对腐生型致病菌的抗性. 近年来, 植物激素参与水稻抗病的功能研究越来越多, 并且初步形成了一个抗病调控网络^[94]. 本课题组的研究结果表明, 水稻白叶枯病抗性基因 *Xa21* 的功能是部分依赖于 SA 信号途径, 但是不依赖于 *OsCOI1* 参与的 JA 信号途径和 *OsENI2* 参与的 ET 信号途径. 而抗稻瘟病基因 *Pigm* 控制的抗病性则都不依赖于 SA, JA 以及 ET 信号途径 (图 2)^[95].

许多植物的抗病突变体也显示了形态上或发育上的变化, 反应出抗病性与发育过程是相互影响的. 植物的抗病性主要受 3 种激素 (水杨酸、茉莉酸和乙烯) 的调控, 而发育则受到其他一些传统生长激素 (生长素、赤霉素、细胞分裂素和油菜素内酯等) 的调控. 这些激素之间的相互作用和动态平衡会影响到抗病性与生长发育. 我们最新的研究结果发现在水稻中通过 RNA 干扰的方法下调茉莉酸信号途径, 可以使水稻快速生长, 株高和粒长明显增加, 遗传分析实验证明, 这些变化是由于激发了赤霉素信号途径. 进一步研究发现茉莉酸可以使赤霉素信号的关键抑制子 DELLA 蛋白 SLR1 累积, 植株矮化; 而在茉莉酸途径减弱时, SLR1 蛋白快速降解, 植株生长加快. 并且在模式植物拟南芥中也发现了类似的结果, 说明在双子叶和单子叶植物中抗病与发育的交互作用调控机制是保守的^[96].

4 结论与展望

水稻模式识别受体 PRRs 和抗病 R 蛋白是水稻抗病反应的重要组成部分. 模式识别受体 PRRs 识别病原菌携带的保守的分子特征 PAMPs, 而抗病 R 蛋白识别病原菌分泌的效应蛋白 effector. 由 PRRs 和 R 蛋白介导的免疫反应信号通过 MAPK 级联反应以及转录因子向下游传递, 激活 PR 基因的表达、增强细胞壁的厚度和累积抑菌的次生代谢物, 最终导致免疫反应.

Non-RD 激酶是参与动植物免疫反应早期事件的特征性激酶. 很多参与植物免疫反应的受体激酶属于 non-RD 激酶或者需要与 non-RD 激酶协同作用^[97]. 这些包括拟南芥的 PRRs 比如 FLS2 和 EFR^[27,98] 以及水稻的 XA21 和 XA26^[5,32,33], 它们都是 non-RD 激酶. 此外还有参与拟南芥免疫反应的蛋白 BAK1, 虽然它属于 RD 激酶, 但是需要与 non-RD 激酶 FLS2 共同作用, 向下游传递免疫反应的信号^[99]. 植物基因组分析揭示细胞表面存在一个很大的 non-RD 受体激酶家族, 其中拟南芥有 35 个, 水稻有 328 个, 差不多是拟南芥中的 10 倍. 这个结果表明, 与拟南芥相比, 水稻可能有更大的潜力去识别病原菌携带的分子特征^[97]. 目前水稻中研究清楚的 PRRs 蛋白还很少, 很多未知的成员还有待发现.

水稻基因组中预测大约有 500 个 NBS-LRR 蛋

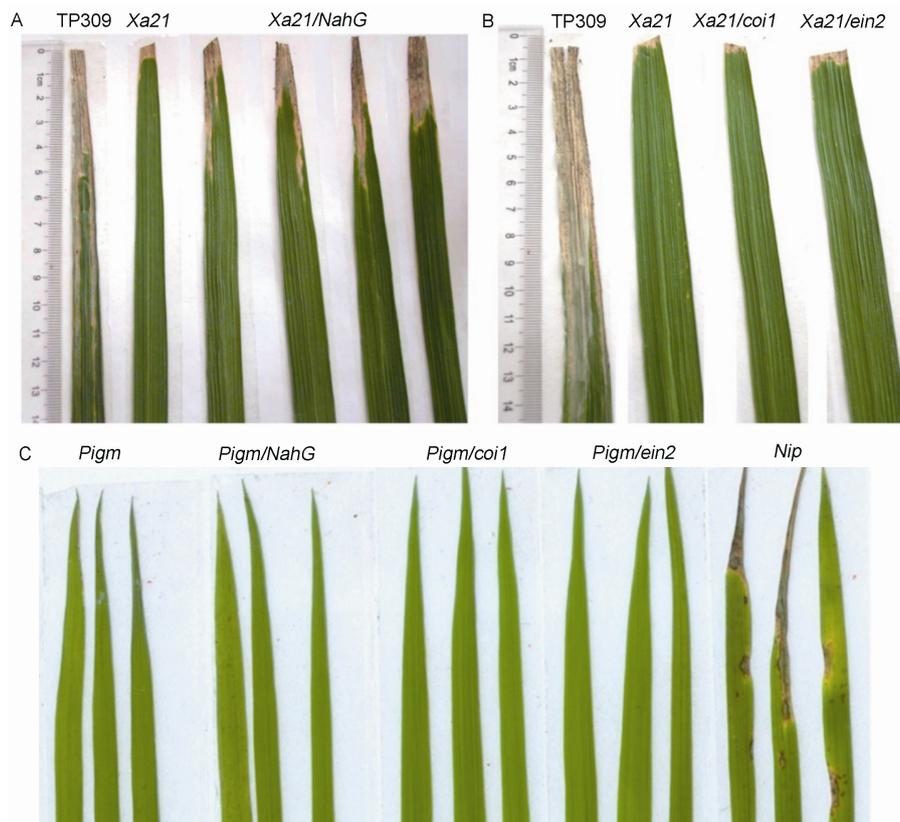


图2 *Xa21* 和 *Pigm* 介导的抗病性与水稻防卫激素信号途径的关系

以 *Xa21* 和 *Pigm* 为父本分别与水杨酸缺失的转基因纯合株系 *NahG*、乙烯信号减弱的转基因纯合株系 *OsEIN2-RNAi* 以及茉莉酸信号缺失的转基因纯合株系 *OsCOI1-RNAi* 杂交, 分析了各自的 F1 和 F2 代, 并且在 F3 代中鉴定纯合基因型并分析其抗病表型. A 和 B: 接种 *Xoo* 小种 PXO99^A 14 天后的病斑; C: 两周大的不同基因型幼苗接种稻瘟病小种 ZB1, 生长 5 天后拍照^[95]

白^[57], 但是这些蛋白是否参与水稻抗病反应以及是否识别病原菌分泌的效应蛋白绝大部分还是未知的. 稻瘟病菌(*M. oryzae*)预测有 739 个分泌蛋白, 只有很少几个被鉴定出来与水稻的 R 蛋白互作^[100]. 此外, 更有意思的是, 水稻中预测的所有 NBS-LRR 蛋白中不存在 TIR-NBS-LRR 类蛋白, 而拟南芥中有很多都属于 TIR-NBS-LRR 类蛋白^[57], 那么这是否暗示抗病 R 蛋白识别效应蛋白的分子机理及其下游的信号传导途径在水稻和拟南芥中存在差别? 这些问题还有待于进一步研究.

在病原菌与宿主的共同进化中植物产生了 PTI 和 ETI 两种先天免疫方式, 它们的下游信号传导途径必然存在重叠交叉, 它们之间的差异以及相互影响都是人们感兴趣的问题. 虽然自水稻全基因组测序完成以来, 水稻先天免疫的研究取得了很大的进展. 但是如前所述, 根据水稻基因组预测的结果, 水稻中

目前功能鉴定的 PRRs 蛋白以及 R 蛋白都还很有限, 它们下游的信号组分发现的也不多, 仍然处于发现的初级阶段. 在本文返回修订稿的同时, Ronald 等人撤回了他们 2009 年发表的揭示 *Ax21* 是一个保守的 PAMP 的 Science 文章, 他们声称无法重复之前的实验结果, 并且发现实验中所用的菌株 PXO99 Δ *ax21* 和 PXO99 Δ *raxSt* 发生了混淆. 当他们重新用正确的 PXO99 Δ *ax21* 做实验时, 该突变菌株依然是一个无毒小种, 不能使 *Xa21* 植株感病. 这个结果表明, *Ax21* 的突变不能消除 PXO99 激发 *XA21* 介导的免疫反应^[101]. 那么 *Ax21* 和 *XA21* 的本质到底是什么又陷入了一个“谜团”, 还有待于进一步的深入研究. 现代栽培水稻已经是过度人工驯化的植物, 本课题组和其他研究团队的研究表明, 其免疫功能的遗传组成与信号途径与模式植物拟南芥存在很大的差异. 因此, 更多的功能发掘参与水稻抗病的 PRRs, R 蛋白以及

关键调控因子, 深入研究它们下游信号途径的重叠与交叉, 最终可以建立起水稻抗病调控网络。

对于水稻免疫性研究的最终目的是希望改良水稻的抗病性, 尤其是广谱抗病基因资源的发掘与功能机制阐明。在中国, 稻瘟病(半营养型寄生)、纹枯病(腐生型寄生)是水稻最重要的毁灭性病害。虽然已经克隆了多个抗瘟性基因, 然而这些基因绝大部分都是小种专业化抗病基因, 尤其缺乏真正经过长期田间实践鉴定的广谱抗病基因, 如何在育种实践上

进行广谱持久抗病育种尚具有不确定性。其次, 是否能发掘水稻纹枯病抗性基因以及探究其抗病机制也是具有重大挑战性的课题, 但是直至目前尚没有纹枯病抗病基因克隆的报道。因此需要发掘新的抗病基因资源, 进行抗纹枯病分子机理与分子育种的研究。此外, 抗病性往往影响发育(产量)性状, 需要研究水稻抗病与发育在激素水平和信号途径之间的交叉, 从分子机制上协调抗病与产量的整体平衡, 为高产稳产的分子育种奠定理论和技术基础。

参考文献

- 1 Baker B, Zambryski P, Staskawicz B, et al. Signaling in plant-microbe interactions. *Science*, 1997, 276: 726–733
- 2 Jones J D, Dangl J L. The plant immune system. *Nature*, 2006, 444: 323–329
- 3 Boller T, Felix G. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol*, 2009, 60: 379–406
- 4 Chen X, Ronald P C. Innate immunity in rice. *Trends Plant Sci*, 2011, 16: 451–459
- 5 Song W Y, Wang G L, Chen L L, et al. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. *Science*, 1995, 270: 1804–1806
- 6 Wang G L, Ruan D L, Song W Y, et al. *Xa21D* encodes a receptor-like molecule with a leucine-rich repeat domain that determines racespecific recognition and is subject to adaptive evolution. *Plant Cell*, 1998, 10: 765–779
- 7 Xu W H, Wang Y S, Liu G Z, et al. The autophosphorylated Ser686, Thr688, and Ser689 residues in the intracellular juxtamembrane domain of *XA21* are implicated in stability control of rice receptor-like kinase. *Plant J*, 2006, 45: 740–751
- 8 Chen X, Chern M, Canlas P E, et al. The rice *XB24* ATPase promotes autophosphorylation of *XA21* and inhibits *XA21*-mediated immunity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 8029–8034
- 9 He Z, Wang Z, Li J, et al. Perception of brassinosteroids by the extracellular domain of the receptor kinase, *BRI1*. *Science*, 2000, 288: 2360–2363
- 10 Lee S W, Han S W, Bartley L E, et al. Unique characteristics of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Avr $Xa21$ and implications for plant innate immunity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 18395–18400
- 11 Lee S W, Han S W, Sririyanum M, et al. A type I-secreted, sulfated peptide triggers *XA21*-mediated innate immunity. *Science*, 2009, 326: 850–853
- 12 Park C J, Han S W, Chen X, et al. Elucidation of *XA21*-mediated innate immunity. *Cell Microbiol*, 2010, 12: 1017–1025
- 13 Park C J, Bart R, Chern M, et al. Overexpression of the endoplasmic reticulum chaperone BiP3 regulates *XA21*-mediated innate immunity in rice. *PLoS ONE*, 2010, 5: e9262
- 14 Wang Y S, Pi L Y, Chen X, et al. Rice *XA21* binding protein 3 is a ubiquitin ligase required for full *Xa21*-mediated disease resistance. *Plant Cell*, 2006, 18: 3635–3646
- 15 Seo Y S, Chern M, Bartley L E, et al. Towards establishment of a rice stress response interactome. *PLoS Genet*, 2011, 7: e1002020
- 16 Peng Y, Bartley L E, Chen X, et al. OsWRKY62 is a negative regulator of basal and *Xa21*-mediated defense against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice. *Mol Plant*, 2008, 1: 446–458
- 17 Park C J, Peng Y, Chen X, et al. Rice *XB15*, a protein phosphatase 2C, negatively regulates cell death and *XA21*-mediated innate immunity. *PLoS Biol*, 2008, 6: e231
- 18 Park C J, Ronald P C. Cleavage and nuclear localization of the rice *XA21* immune receptor. *Nat Commun*, 2012, 3: 920
- 19 Kaku H, Nishizawa Y, Ishii-Minami N, et al. Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 11086–11091
- 20 Miya A, Albert P, Shinya T, et al. CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 19613–19618
- 21 Wan J, Zhang X C, Neece D, et al. A LysM receptor-like kinase plays a critical role in chitin signaling and fungal resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2008, 20: 471–481
- 22 Shimizu T, Nakano T, Takamizawa D, et al. Two LysM receptor molecules, CEBiP and OsCERK1, cooperatively regulate chitin elicitor

- signaling in rice. *Plant J*, 2010, 64: 204–214
- 23 Kishi-Kaboshi M, Okada K, Kurimoto L, et al. A rice fungal MAMP-responsive MAPK cascade regulates metabolic flow to antimicrobial metabolite synthesis. *Plant J*, 2010, 63: 599–612
- 24 Chen L, Hamada S, Fujiwara M, et al. The Hop/Sti1-Hsp90 chaperone complex facilitates the maturation and transport of a PAMP receptor in rice innate immunity. *Cell Host Microbe*, 2010, 7: 185–196
- 25 Kishimoto K, Kouzai Y, Kaku H, et al. Perception of the chitin oligosaccharides contributes to disease resistance to blast fungus *Magnaporthe oryzae* in rice. *Plant J*, 2010, 64: 343–354
- 26 Ronald P C, Beutler B. Plant and animal sensors of conserved microbial signatures. *Science*, 2010, 330: 1061–1064
- 27 Gomez-Gomez L, and Boller T. FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol Cell*, 2000, 5: 1003–1011
- 28 Che F S, Nakajima Y, Tanaka N, et al. Flagellin from an incompatible strain of *Pseudomonas avenae* induces a resistance response in cultured rice cells. *J Biol Chem*, 2000, 275: 32347–32356
- 29 Tanaka N, Che F S, Watanabe N, et al. Flagellin from an incompatible strain of *Acidovorax avenae* mediates H₂O₂ generation accompanying hypersensitive cell death and expression of *PAL*, *Chl-1*, and *PBZ1*, but not of *Lox* in rice. *Mol Plant Microbe Interact*, 2003, 16: 422–428
- 30 Takai R, Isogai A, Takayama S, et al. Analysis of flagellin perception mediated by flg22 receptor OsFLS2 in rice. *Mol Plant Microbe Interact*, 2008, 21: 1635–1642
- 31 Zipfel C, Robatzek S, Navarro L, et al. Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature*, 2004, 428: 764–767
- 32 Sun X, Cao Y, Yang Z, et al. *Xa26*, a gene conferring resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice, encodes an LRR receptor kinase-like protein. *Plant J*, 2004, 37: 517–527
- 33 Cao Y, Duan L, Li H, et al. Functional analysis of *Xa3/Xa26* family members in rice resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Theor Appl Genet*, 2007, 115: 887–895
- 34 Chen X, Shang J, Chen D, et al. A B-lectin receptor kinase gene conferring rice blast resistance. *Plant J*, 2006, 46: 794–804
- 35 Yoshimura S, Yamanouchi U, Katayose Y, et al. Expression of *Xa1*, a bacterial blight resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 1663–1668
- 36 Gu K, Yang B, Tian D, et al. *R* gene expression induced by a type-III effector triggers disease resistance in rice. *Nature*, 2005, 435: 1122–1125
- 37 Iyer A S, McCouch S R. The rice bacterial blight resistance gene *xa5* encodes a novel form of disease resistance. *Mol Plant Microbe Interact*, 2004, 17: 1348–1354
- 38 Jiang G H, Xia Z H, Zhou Y L, et al. Testifying the rice bacterial blight resistance gene *xa5* by genetic complementation and further analyzing *xa5* (*Xa5*) in comparison with its homolog *TFIIAgamma1*. *Mol Genet Genomics*, 2006, 275: 354–366
- 39 Yang B, Sugio A, White F F. *Os8N3* is a host disease-susceptibility gene for bacterial blight of rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 10503–10508
- 40 Antony G, Zhou J, Huang S, et al. Rice *xa13* recessive resistance to bacterial blight is defeated by induction of the disease susceptibility gene *Os-11N3*. *Plant Cell*, 2010, 22: 3864–3876
- 41 Chen L Q, Hou B H, Lalonde S, et al. Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature*, 2010, 468: 527–532
- 42 Liu Q, Yuan M, Zhou Y, et al. A paralog of the MtN3/saliva family recessively confers race-specific resistance to *Xanthomonas oryzae* in rice. *Plant Cell Environ*, 2011, 34: 1958–1969
- 43 Bryan G T, Wu K S, Farrall L, et al. A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene *Pi-ta*. *Plant Cell*, 2000, 12: 2033–2046
- 44 Jia Y, McAdams S A, Bryan G T, et al. Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J*, 2000, 19: 4004–4014
- 45 Wang Z X, Yano M, Yamanouchi U, et al. The *Pib* gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Plant J*, 1999, 19: 55–64
- 46 Zhou B, Qu S, Liu G, et al. The eight amino-acid differences within three leucine-rich repeats between *Pi2* and *Piz-t* resistance proteins determine the resistance specificity to *Magnaporthe grisea*. *Mol Plant Microbe Interact*, 2006, 19: 1216–1228
- 47 Ashikawa I, Hayashi N, Yamane H, et al. Two adjacent nucleotide-binding site leucine-rich repeat class genes are required to confer *Pikm*-specific rice blast resistance. *Genetics*, 2008, 180: 2267–2276
- 48 Hayashi K, Yoshida H. Refunctionalization of the ancient rice blast disease resistance gene *Pit* by the recruitment of a retrotransposon as

- a promoter. *Plant J*, 2009, 57: 413–425
- 49 Kawano Y, Akamatsu A, Hayashi K, et al. Activation of a Rac GTPase by the NLR family disease resistance protein Pit plays a critical role in rice innate immunity. *Cell Host Microbe*, 2010, 7: 362–375
- 50 Shang J, Tao Y, Chen X, et al. Identification of a new rice blast resistance gene, *Pid3*, by genomewide comparison of paired nucleotide-binding site–leucine-rich repeat genes and their pseudogene alleles between the two sequenced rice genomes. *Genetics*, 2009, 182: 1303–1311
- 51 Lee S K, Song M Y, Seo Y S, et al. Rice *Pi5*-mediated resistance to *Magnaporthe oryzae* requires the presence of two coiled-coil nucleotide-binding leucine-rich repeat genes. *Genetics*, 2009, 181: 1627–1638
- 52 Qu S, Liu G, Zhou B, et al. The broad-spectrum blast resistance gene *Pi9* encodes a nucleotide-binding site-leucine-rich repeat protein and is a member of a multigene family in rice. *Genetics*, 2006, 172: 1901–1914
- 53 Liu X, Lin F, Wang L, et al. The in silico map-based cloning of *Pi36*, a rice coiled-coil nucleotide-binding site leucine-rich repeat gene that confers race-specific resistance to the blast fungus. *Genetics*, 2007, 176: 2541–2549
- 54 Lin F, Chen S, Que Z, et al. The blast resistance gene *Pi37* encodes a nucleotide binding site leucine-rich repeat protein and is a member of a resistance gene cluster on rice chromosome 1. *Genetics*, 2007, 177: 1871–1880
- 55 Hayashi N, Inoue H, Kato T, et al. Durable panicle blast-resistance gene *Pb1* encodes an atypical CC-NBS-LRR protein and was generated by acquiring a promoter through local genome duplication. *Plant J*, 2010, 64: 498–510
- 56 Okuyama Y, Kanzaki H, Abe A, et al. A multifaceted genomics approach allows the isolation of the rice *Pia*-blast resistance gene consisting of two adjacent NBS-LRR protein genes. *Plant J*, 2011, 66: 467–479
- 57 Monosi B, Wisser R J, Pennill L, et al. Full-genome analysis of resistance gene homologues in rice. *Theor Appl Genet*, 2004, 109: 1434–1447
- 58 Block A, Alfano J. Plant targets for *Pseudomonas syringae* type III effectors: virulence targets or guarded decoys? *Curr Opin Microbiol*, 2011, 14: 39–46
- 59 Feng F, Yang F, Rong W, et al. A *Xanthomonas* uridine 5'-monophosphate transferase inhibits plant immune kinases. *Nature*, 2012, 485: 114–118
- 60 Li W, Wang B, Wu J, et al. The *Magnaporthe oryzae* avirulence gene *AvrPiz-t* encodes a predicted secreted protein that triggers the immunity in rice mediated by the blast resistance gene *Piz-t*. *Mol Plant Microbe Interact*, 2009, 22: 411–420
- 61 Yoshida K, Saitoh H, Fujisawa S, et al. Association genetics reveals three novel avirulence genes from the rice blast fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*. *Plant Cell*, 2009, 21: 1573–1591
- 62 Stergiopoulos I, de Wit P J. Fungal effector proteins. *Annu Rev Phytopathol*, 2009, 47: 233–263
- 63 Moscou M J, Bogdanove A J. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, 2009, 326: 1501
- 64 Sugio A, Yang B, Zhu T, et al. Two type III effector genes of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* control the induction of the host genes *OsTFIIAγ1* and *OsTFX1* during bacterial blight of rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 10720–10725
- 65 Dodds P N, Rathjen J P. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat Rev Genet*, 2010, 11: 539–548
- 66 Boch J, Scholze H, Schornack S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 2009, 326: 1509–1512
- 67 Bedell V M, Wang Y, Campbell J M, et al. *In vivo* genome editing using a high-efficiency TALEN system. *Nature*, 2012, 491: 114–118
- 68 Yang Z, Fu Y. ROP/RAC GTPase signaling. *Curr Opin Plant Biol*, 2007, 10: 490–494
- 69 Miki D, Itoh R, Shimamoto K. RNA silencing of single and multiple members in a gene family of rice. *Plant Physiol*, 2005, 138: 1903–1913
- 70 Ono E, Wong H L, Kawasaki T, et al. Essential role of the small GTPase Rac in disease resistance of rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 759–764
- 71 Nakashima A, Chen L, Thao N P, et al. RACK1 functions in rice innate immunity by interacting with the Rac1 immune complex. *Plant Cell*, 2008, 20: 2265–2279
- 72 Wang Y, Gao M, Li Q, et al. OsRAR1 and OsSGT1 physically interact and function in rice basal disease resistance. *Mol Plant Microbe Interact*, 2008, 21: 294–303
- 73 Lieberherr D, Thao N P, Nakashima A, et al. A sphingolipid elicitor-inducible mitogenactivated protein kinase is regulated by the small GTPase OsRac1 and heterotrimeric G-protein in rice. *Plant Physiol*, 2005, 138: 1644–1652
- 74 Chern M S, Fitzgerald H A, Yadav R C, et al. Evidence for a disease-resistance pathway in rice similar to the NPR1-mediated signaling pathway in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2001, 27: 101–113
- 75 Chern M, Fitzgerald H A, Canlas P E, et al. Overexpression of a rice NPR1 homolog leads to constitutive activation of defense response and hypersensitivity to light. *Mol Plant Microbe Interact*, 2005, 18: 511–520

- 76 Yuan Y X, Zhong S H, Li Q, et al. Functional analysis of rice *NPR1*-like genes reveals that *OsNPR1/NHI* is the rice orthologue conferring disease resistance with enhanced herbivore susceptibility. *Plant Biotechnology Journal*, 2007, 5: 313–324
- 77 Pitzschke A, Schikora A, Hirt H. MAPK cascade signalling networks in plant defence. *Curr Opin Plant Biol*, 2009, 12: 421–426
- 78 Reyna N S, Yang Y. Molecular analysis of the rice MAP kinase gene family in relation to *Magnaporthe grisea* infection. *Mol Plant Microbe Interact*, 2006, 19: 530–540
- 79 Xiong L, Yang Y. Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen-activated protein kinase. *Plant Cell*, 2003, 15: 745–759
- 80 Jung K H, Cao P, Seo Y S, et al. The rice kinase phylogenomics database: a guide for systematic analysis of the rice kinase super-family. *Trends Plant Sci*, 2010, 15: 595–599
- 81 Wu K L, Guo Z J, Wang H H, et al. The WRKY family of transcription factors in rice and Arabidopsis and their origins. *DNA Res*, 2005, 12: 9–26
- 82 Shimono M, Sugano S, Nakayama A, et al. Rice WRKY45 plays a crucial role in benzothiadiazole- inducible blast resistance. *Plant Cell*, 2007, 19: 2064–2076
- 83 Shimono M, Koga H, Akagi A, et al. Rice WRKY45 plays important roles in fungal and bacterial disease resistance. *Mol Plant Pathol*, 2012, 13: 83–94
- 84 Pandey S P, Somssich I E. The role of WRKY transcription factors in plant immunity. *Plant Physiol*, 2009, 150: 1648–1655
- 85 Wang H, Hao J, Chen X, et al. Overexpression of rice WRKY89 enhances ultraviolet B tolerance and disease resistance in rice plants. *Plant Mol Biol*, 2007, 65: 799–815
- 86 Zhang Y, Tessaro M J, Lassner M, et al. Knockout analysis of Arabidopsis transcription factors TGA2, TGA5, and TGA6 reveals their redundant and essential roles in systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 2003, 15: 2647–2653
- 87 Fitzgerald H A, Canlas P E, Chern M S, et al. Alteration of TGA factor activity in rice results in enhanced tolerance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Plant J*, 2005, 43: 335–347
- 88 van Loon L C, Rep M, Pieterse C M. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol*, 2006, 44: 135–162
- 89 Mitsuhashi I, Iwai T, Seo S, et al. Characteristic expression of twelve rice *PR1* family genes in response to pathogen infection, wounding, and defense-related signal compounds. *Mol Genet Genomics*, 2008, 279: 415–427
- 90 Kim S T, Yu S, Kang Y H, et al. The rice pathogen-related protein 10 (JIOsPR10) is induced by abiotic and biotic stresses and exhibits ribonuclease activity. *Plant Cell Rep*, 2008, 27: 593–603
- 91 Park C H, Kim S, Park J Y, et al. Molecular characterization of a pathogenesis-related protein 8 gene encoding a class III chitinase in rice. *Mol Cells*, 2004, 17: 144–150
- 92 Wang N, Xiao B, Xiong L. Identification of a cluster of *PR4*-like genes involved in stress responses in rice. *J Plant Physiol*, 2011, 168: 2212–2224
- 93 Zhu T, Song F, Zheng Z. Molecular characterization of the rice pathogenesis-related protein, OsPR-4b, and its antifungal activity against *Rhizoctonia solani*. *J Phytopathol*, 2006, 154: 378–384
- 94 Yang D, Yang Y, He Z. Roles of plant hormones and their interplay in rice immunity. *Mol Plant*, 2013, 6: 675–85
- 95 Yang D L. The phytohormonal signaling pathways in rice immune responses and jasmonate signaling pathway represses gibberellin signaling pathway. Dissertation for Doctoral Degree. Chinese Academy of Sciences, 2009, D2009–118
- 96 Yang D, Yao J, Mei C S, et al. Plant hormone jasmonate prioritizes defense over growth by interfering with gibberellin signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: e1192
- 97 Dardick C, Ronald P. Plant and animal pathogen recognition receptors signal through non-RD kinases. *PLoS Pathog*, 2006, 2: e2
- 98 Zipfel C, Kunze G, Chinchilla D, et al. Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell*, 2006, 125: 749–760
- 99 Chinchilla D, Zipfel C, Robatzek S, et al. A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature*, 2007, 448: 497–500
- 100 Dean R A, Talbot N J, Ebbole D J, et al. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature*, 2005, 434: 980–986
- 101 Lee S W, Han S W, Sririyanyum M, et al. Retraction: A type I-secreted, sulfated peptide triggers XA21-mediated innate immunity. *Science*, 2013, 342: 191

Studies on Innate Immunity in Rice

GAO MingJun, HE ZuHua

Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China

Plants have developed a precisely regulated innate immune machinery to defend themselves against potential microbial attack, through two innate immune systems: the first layer of immunity is activated on detection of conserved pathogen-associated molecular patterns (PAMP) by cell surface pattern-recognition receptors, resulting in PAMP-triggered immunity (PTI); the second layer of immunity is dependent on recognition of pathogen-secreted effectors by host specific disease resistance (R) gene-encoding proteins, leading to race-specific effector-triggered immunity (ETI). With increasing information of isolation of R genes, key defense regulators and pathogen effectors, mechanisms involved in rice immunity have been largely revealed. This review focuses on PTI, ETI and respective downstream signals and key components, which have been revealed recently, and provides an emerging vision of the immunity network in rice.

rice, immunity, PTI, ETI

doi: 10.1360/052013-311