

油茶果生炭疽菌效应子 CfCFEM19 与靶蛋白的互作验证及功能研究

吴晶, 王盈, 潘燕梅, 陈星州, 刘君昂, 周国英

(1.中南林业科技大学; 2.经济林培育与保护教育部重点实验室; 3.南方人工林病虫害防控国家林业和草原局重点实验室; 4.森林有害生物防治湖南省重点实验室 长沙 410004)

摘 要:【目的】为探究果生炭疽菌 (*Colletotrichum fructicola*) 中包含 CFEM 结构域效应子的致病机理及其油茶互作蛋白的研究。【方法】基于前期生物信息学分析筛选出含 CFEM 结构域的效应子 CfCFEM19, 通过酵母分泌表达和烟草瞬时表达系统, 对其生物学功能进行探究。利用酵母双杂交文库筛选 *C.fructicola* 效应子 CfCFEM19 在油茶中的互作蛋白, 同时通过点对点验证和双分子荧光互补实验等实验进一步验证它们的互作关系。进行荧光定量 PCR 来检测互作蛋白在 *C.fructicola* 侵染油茶不同时期的相对表达量; 通过烟草瞬时表达对靶蛋白的功能进行研究。【结果】1) CfCFEM19 信号肽功能鉴定及亚细胞定位。通过缺陷型 YTK12 酵母的实验发现, CfCFEM19 为分泌蛋白, 同时在烟草中瞬时表达发现, 其全长序列定位于本氏烟草细胞的细胞膜上, 而去掉信号肽序列的 CfCFEM19 显示出与全长序列不同的亚细胞定位。2) CfCFEM19 的功能分析。在本氏烟草瞬时表达中发现效应子 CfCFEM19 全长和去信号肽序列均不能引起本氏烟草的坏死。CfCFEM19 和 BAX 或 INF1 共注射本氏烟草结果显示, CfCFEM19 能同时抑制 BAX 或 INF1 导致的烟草叶片 PCD。同时, 在本氏烟叶片中瞬时表达 CfCFEM19 全长后接种辣椒疫霉, CfCFEM19 能减弱本氏烟草的抗病性, 促进辣椒疫霉的侵染。3) 互作蛋白的验证与功能分析。通过油茶酵母 cDNA 文库筛选, 我们鉴定到一个能与 CfCFEM19 互作的油茶靶标蛋白 P8, 通过酵母双杂交(Y2H)和双分子荧光互补(BIFC)等验证了 CfCFEM19 和 P8 的互作关系, 并对 P8 进行亚细胞定位分析, 发现其位于细胞膜上, BIFC 结果显示 CfCFEM19 与 P8 互作共定位在细胞膜, 推测互作蛋白就在细胞膜上发挥抗逆作用。互作蛋白对植物抗性影响实验结果显示 P8 区域的病斑相对于对照组区域的病斑更小, 说明 P8 能增强本氏烟草的抗病性, 抑制炭疽菌侵染。同时, 通过荧光定量 PCR 检测, 结果显示, P8 的相对表达量随着侵染时间的增加而明显上升, P8 相对表达量在侵染后期上调, 与其影响病原菌致病性结果一致, 推测植物产生大量几丁质酶来对抗病原菌的入侵。【结论】综上, 本研究发现效应子 CfCFEM19 能影响植物的免疫反应, 同时, 油茶中的几丁质酶能够提高植物抗病性, 正向调节植物免疫反应。

关键词: 油茶炭疽病; 互作蛋白; 酵母双杂交; 相对表达量; 效应子