

植原体致病因子导致枣疯病症状发生的分子机理研究

姚佳, 王梦丽, 冯建灿, 陈鹏, 李继东*

(河南农业大学林学院 郑州 450046)

摘 要: 枣 (*Ziziphus jujuba*) 果实含糖量高, 营养丰富, 加工附加值高, 栽培利用历史悠久, 是我国重要的果树和经济林树种。枣疯病 (Jujube Witches' Broom, JWB) 是由枣疯病植原体 (*Candidatus Phytoplasma ziziphi*) 引起的传染性致死病害, 感病树出现丛枝、小叶、黄化、花器变叶等病症, 果实产量和品质下降, 严重时整株枯死, 严重威胁红枣产业高质量发展。植原体寄生于枣韧皮部组织的筛管细胞内, 通过 Sec 分泌系统向周边细胞分泌致病因子蛋白, 与枣细胞内的靶标蛋白互作, 进而调控枣树体生长发育和防御系统, 导致各种病症的发生。编码致病因子的基因常位于植原体基因组的潜在移动元件 (Potential Mobile Unit, PMU) 上, 其蛋白含有 N 端信号肽等特征序列, 没有跨膜区域, 我们利用 SignalP4.1 软件分析预测信号肽, 用 TMHMM2.0 预测跨膜区域, 从枣疯病植原体基因组 PMU 中鉴定了 8 个潜在的致病因子, 命名为 Zaofeng1-Zaofeng8。将这些基因克隆到 pSAK277 载体上, 分别转化进拟南芥和枣表达, 导致了不同的症状发生。与野生型对照相比, 表达 Zaofeng6 的拟南芥植株和枣组培芽均出现了丛枝、小叶的症状, 在烟草叶片中的瞬时表达证明 Zaofeng6 引起 ETI 反应, 酵母双杂交 (Y2H) 和双分子荧光互补试验表明, Zaofeng6 与枣 ZjTCP7 转录因子互作, 利用 Zaofeng6 片段缺失突变体进行 Y2H 证明, 其通过前两个 α 螺旋与 ZjTCP7 互作。利用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术, 构建 zjtcp7 沉默突变体, 表现出与发病枣组培苗和表达 Zaofeng6 的组培芽相似的丛枝症状, Western-blot 表明转化表达 Zaofeng6 和 zjtcp7 突变体的枣组培芽中 ZjTCP7 蛋白含量下降, qRT-PCR 证明, ZjTCP7 及其下游的 ZjCCD7、ZjCCD8 和 ZjMAX2 等独脚金内酯信号通路基因的表达下调, 表明 Zaofeng6 通过与 ZjTCP7 互作, 调控独脚金内酯信号通路, 导致了丛枝症状的发生。在转化表达 Zaofeng3 的拟南芥和枣组培芽中, 出现了生长迟缓、丛枝的现象, 拟南芥出现花变叶症状。利用 Zaofeng3 片段缺失突变体转化拟南芥, 发现诱导花变叶症状需要其 3 个 α 螺旋同时参与。Y2H 和 BiFC 杂交表明, Zaofeng3 与 ZjMADS19、ZjMADS43、ZjMADS47、ZjMADS77 和 ZjTCP7 等互作。对表达 Zaofeng3 的拟南芥开展转录组分析, 有 11 个 MADS 转录因子表达量上调, 13 个出现下调。qRT-PCR 也表明, 转化表达 Zaofeng3 的枣组培苗里, ZjMADS19, ZjMADS47, ZjMADS77 和 ZjTCP7 的表达下调, ZjMADS48 的表达上调。烟草叶片共浸润瞬时表达试验表明, Zaofeng3 显著降低了 ZjMADS19, ZjMADS47, ZjMADS77 和 ZjTCP7 的蛋白丰度。这些研究表明, Zaofeng3 通过与枣 MADS 转录因子及 ZjTCP7 互作, 导致了丛枝和花变叶症状发生。

关键词: 植原体; 文献计量学; 核心作者; 流行病学