

抗性马尾松几丁质酶基因筛选及功能研究

杨婷

(南京林业大学 江苏南京 210037)

松材线虫病是由松材线虫侵染引起的一种毁灭性松林病害。随着我国对林业健康发展的重视程度的提高,松材线虫病的研究正快速进展。由于松材线虫病致病机理复杂,这一病害的范围仍在不断扩大,对我国森林生态健康构成了严重的威胁。因此,培育高效抗松材线虫的马尾松新品种已成为广大学者追求的目标。

本研究在对抗性与易感马尾松接种松材线虫后蛋白组和转录组的分析结果表明第四家族的几丁质酶在抗性马尾松中上调高于易感马尾松,很有可能其在马尾松受松材线虫感染早期发生的防御反应中扮演了重要角色。本课题从马尾松对松材线虫的抗性入手,通过生物信息学分析,克隆了3个抗性马尾松的几丁质酶基因,并研究了其抗松材线虫功能和机制。主要研究结果如下:

1. 克隆了 *PmChia4-1*、*PmChia4-4*、*PmChia4-9* 三个基因的 CDS 序列,分别由 827、825、819 个碱基组成,都属于 Glyco-hydro-19 亚家族,为 class IV 类几丁质酶,三个基因分别编码 275、274、272 个氨基酸的蛋白质,分子量分别为 28.10、28.07、28.27 kDa,等电点分别为 8.43、4.83、8.10。预测三个蛋白都具有信号肽、几丁质结合域和催化域。
2. 实时荧光定量分析接种松材线虫 0 h、1 h、6 h、12 h、1 d、2 d、3 d 后抗、感马尾松茎秆中三个基因的表达量,发现三个基因的表达量都随时间先上调后下降,抗性马尾松的 *PmChia4-1* 在各时间点表达量都高于易感马尾松,*PmChia4-4* 和 *PmChia4-9* 除 12 h 外抗性马尾松在其他各时间点表达量都高于易感马尾松。
3. 将三个基因构建于带有 GFP 标签的载体上,将带有 GFP 绿色荧光的重组质粒注射进烟草叶片,激光共聚焦显微镜观察到 *PmChia4-1*、*PmChia4-4*、*PmChia4-9* 蛋白均定位于细胞壁和细胞膜。
4. 构建了真核表达载体 pPICZ α -A-*PmChia4-1*、pPICZ α -A-*PmChia4-4*、pPICZ α -A-*PmChia4-9*,将其转入感受态细胞 KM71H 中并诱导其表达,蛋白电泳得到长约为 28 kDa 的蛋白,三个蛋白皆用 400ul 甲醇连续诱导的第 3 天表达量最佳。
5. 对诱导的蛋白 *PmChia4-1*、*PmChia4-4* 进行纯化,利用 BCA 法检测纯化蛋白的浓度分别为 848.83 μ g/mL、515.50 μ g/mL,酶活性分别为 3.73 U/mL、8.15 U/mL。将蛋白透析后作用于松材线虫虫卵,处理 12 h 后与对照组相比,虫卵孵化率分别降低 13.81%和 13.15%,孵化出的幼虫死亡率分别增加 15.97%和 17.15%,处理 24 h 后与对照组相比,虫卵孵化率分别降低 5.06%和 0.9%,孵化出的幼虫死亡率分别增加 14.11%和 16.75%,与对照组相比,处理组的松材线虫的虫卵卵壳破裂、内含物流出,形态结构发生了明显变化。由此推测纯化后的 *PmChia4-1*、*PmChia4-4* 蛋白能破坏部分虫卵的正常发育,对其孵化有一定的抑制作用。