

西瓜 cDNA 表达文库构建及镰刀菌致病因子 FonSIX6 互作蛋白的筛选和鉴定

牛晓伟¹, 唐宁安^{2,*}, 范敏^{1,**}

(¹浙江省农业科学院蔬菜研究所, 杭州 310021; ²浙江师范大学, 浙江金华 321004)

摘要: 尖孢镰刀菌在与寄主的相互作用中分泌几个特定的富含半胱氨酸的小分子量蛋白 (15.8 ~ 29.9 kD) 进入木质部中启动致病力, 被称为 SIX (Secreted in xylem) 蛋白。其中, SIX6 蛋白是一个致病因子。西瓜专化型尖孢镰刀菌 Fon (*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*) 是引起西瓜枯萎病的病原真菌。为了解与 FonSIX6 存在相互作用的西瓜蛋白及其信号传导途径, 克隆了 FonSIX6 基因, 将 FonSIX6 的编码区与酵母 GAL4 的 DNA 结合功能区融合, 构建成酵母诱饵蛋白表达载体 pGBKT7-SIX6, 进而转化到酵母菌株 Y2H Gold 中, 经检测证实不具有毒性和自激活功能, 可以用于酵母双杂交研究。同时, 以国际上公认的抗枯萎病材料 PI296341-FR 构建酵母表达文库。采用酵母双杂交的方法, 筛选到 14 个相互作用靶蛋白。分析筛选到的蛋白主要参与寄主的能量代谢、光合作用和基因表达调控, 推测 FonSIX6 作用的靶位点主要是破坏寄主能量系统并影响光合作用, 而寄主对其响应的方式是调控抗病基因的表达。

关键词: 西瓜; 枯萎病; 效应蛋白; 酵母双杂交

中图分类号: S 651

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2012) 10-1958-09

Construction of cDNA Expression Library of Watermelon and Screening and Identification of Interaction Partner of FonSIX6, a Virulence Factor from *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*

NIU Xiao-wei¹, TANG Ning-an^{2,*}, and FAN Min^{1,**}

(¹Institute of Vegetables, Academy of Zhejiang Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China; ²Zhejiang Normal University, Jinhua, Zhejiang 321004, China)

Abstract: The fungal pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* (Fon) that causes *Fusarium wilt* in watermelon is a soilborne fungus. During interactions between *F. oxysporum* and host plant, the fungus secretes several effector proteins into the plant xylem to promote virulence. These effectors are small cysteine-rich proteins and are called SIX (Secreted in Xylem) proteins. Among them, the SIX6 was proved to be a virulence factor. To understand function and signaling pathway of FonSIX6 in watermelon, *FonSIX6* was cloned from Fon. To construct the bait vector pGBKT7-SIX6 for yeast two-hybrid, the

收稿日期: 2012-04-18; **修回日期:** 2012-10-08

基金项目: 浙江省农业科学院科研启动项目; 浙江省农业科学院创新能力提升工程项目 (2011R23Y01E01, 2012R23Y01E04); 国家自然科学基金项目 (31272188)

* 并列第一作者

** 通信作者 Author for correspondence (E-mail: fanminfm@sina.com)

致谢: 感谢国家蔬菜工程技术中心惠赠西瓜专化型生理小种。

encoding region of *FonSIX6* was fused to the GAL4 DNA-binding domain in yeast expression vector pGBKT7. Then bait vector was transformed into Y2H gold strain. Transcriptional activation and toxicity test showed that the bait could be used in yeast two hybrid screens. PI296341-FR, a watermelon line that was resistant to all Fon races was used to construct the cDNA expression library in yeast cells. By yeast two hybrid screens, 14 interacting proteins were identified that interact with *FonSIX6*. These proteins involved in various pathways such as energy metabolism, photosynthesis and regulation of gene expression. According to our results, *FonSIX6* may target the host energy and photosynthesis system to promote virulence, while host regulated resistant gene expression response to *FonSIX6*.

Key words: watermelon; fusarium wilt; effector protein; yeast two hybrid

西瓜枯萎病 (*Fusarium wilt of watermelon*) 是西瓜生产中最主要病害之一, 严重时可以引起绝产。引起该病的病原菌是西瓜专化型尖孢镰刀菌, 该菌存在 3 个生理小种 0、1、2。中国以生理小种 1 引发的枯萎病占主导地位 (邹小花 等, 2011)。

植物和病原菌的长期相互作用形成了复杂的攻击和防卫机制, 涉及到植物的基础免疫和病原菌的效应蛋白。植物防御反应首先通过模式识别受体 PPRs (pattern recognition receptors) 对微生物或病原相关的分子模式 MAMPs 或 PAMPs (microbial- or pathogen-associated molecular patterns) 识别, 称为 PAMP 激发的免疫性 PTI (PAMP-triggered immunity), 抑制病原菌的进一步侵染。但这种识别会被病原菌的效应蛋白所抑制, 称为效应蛋白激发的感病性 ETS (effector-triggered susceptibility), 进而植物抗病蛋白识别效应蛋白被激活产生免疫反应, 称为效应蛋白激发的免疫性 ETI (effector-triggered immunity) (Jones & Dangl, 2006)。其中, 效应蛋白是一类病原菌蛋白或者是改变寄主细胞结构和功能的小分子。

效应蛋白功能分为两类, 一类是有助于病原菌侵染, 又称为致病因子或毒素; 另一类激发植物的防卫反应, 又称为无毒因子或激发子 (Hogenhout et al., 2009)。番茄专化型尖孢镰刀菌 *Fol* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) 侵染番茄时分泌几个特定的、富含半胱氨酸的小分子量蛋白 (15.8~29.9 kD) 进入木质部中启动致病力 (Houterman et al., 2007)。已经证实存在这些蛋白中存在 3 个效应蛋白 Avr1、Avr2 和 Avr3。其中, Avr2 和 Avr3 是致病因子, 而 Avr1 是无毒因子 (Rep et al., 2004, 2005; Houterman et al., 2008, 2009)。最近报道了另一个致病因子 SIX6 能够增加致病力 (Takken & Rep, 2010)。该基因存在于所有的 *Fol* 专化型、个别 *Fon*、*Fop* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*) 以及 *Fov* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*) 专化型中, *FovSIX6* 基因推测编码 214 个氨基酸, 而其余的生理小种专化型编码 215 个氨基酸。尽管不同生理小种 SIX6 蛋白之间存在氨基酸上的差异 (*FovSIX6* 与 *FolSIX6* 蛋白质第 62~110 之间存在 30 个氨基酸的差异), 但所有的 SIX6 蛋白都存在 8 个保守的半胱氨酸残基, 其中一个位于信号肽中。该基因以单拷贝的形式存在于具有致病力的尖孢镰刀菌中。通过对已知的 SIX6 分析推测, 保守的半胱氨酸参与二硫键的形成, 差异的氨基酸涉及到致病因子功能 (Chakrabarti et al., 2010)。

酵母双杂交技术已经被证实研究植物—病原物相互作用中有着重要的作用。例如: 番茄 Pto 激酶与 *P. syringae* 的 AvrPto 和 AvrPtoB 效应蛋白存在直接的相互作用是用酵母双杂交方法得到证实的 (Tang et al., 1996), Pto 与 AvrPto 相互作用后可以激发植物的抗病性; 水稻稻瘟病蛋白 Pi-ta 的亮氨酸富含结构域 LRD (Leucine-rich domain) 与 Avr-Pita₁₇₆ 存在相互作用 (Jia et al., 2000)。因此, 本研究从 *Fon* 中克隆了 *SIX6* 基因, 为进一步了解与 *FonSIX6* 存在相互作用的西瓜蛋白及其信号传导途径; 构建了该基因的酵母诱饵表达载体并证实可以用于酵母双杂交研究; 同时, 以国际上公

认的抗枯萎病材料 PI296341-FR 构建酵母表达文库。采用酵母双杂交的方法,筛选到 14 个相互作用的靶蛋白。通过对靶蛋白的分析,以期明确 *FonSIX6* 的作用靶点以及寄主的抗病反应,为西瓜的抗病机制提供线索。

1 材料与方法

1.1 试验材料

西瓜专化型尖孢镰刀菌生理小种由国家蔬菜改良中心惠赠。

构建西瓜 cDNA 文库所用的 PI296341-FR 是国际上公认的抗西瓜专化型尖孢镰刀菌 3 个生理小种的西瓜材料。

1.2 试验方法

1.2.1 镰刀菌的培养及 DNA 提取

菌丝先接种于 PSA (potato sucrose agar, 含马铃薯提取液 potato extract $200\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, sucrose $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, agar $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) 固体培养基中 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 暗培养一周,然后用手术刀将菌丝生成形成的平面切成 0.5 cm^2 的小方块,接种于 PS (potato sucrose agar, 含马铃薯提取液 potato extract $200\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, sucrose $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) 液体培养基振荡培养 5 d。用纱布收集菌丝后置 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。菌丝加液氮研磨,采用 CTAB 提取 DNA, RNA 的分离采用 RNAiso (TaKaRa) 试剂盒。

1.2.2 *FonSIX6* 基因克隆

SIX6 基因克隆所用引物参照 Lievens 等 (2009) 报道的引物序列 (*SIX6F*: $5'\text{-CTCTCCTGAACC ATCAACTT-3'}$, *SIX6R*: $5'\text{-CAAGACCAGGTGTAGGCATT-3'}$), 真菌内标为持家基因翻译延伸因子 *EF-1 α* , 参照 O'Donnell 等 (1998) 报道的引物序列 (*EF-1 α F*: $5'\text{-ATGGGTAAGGAAGACAAGAC-3'}$, *EF-1 α R*: $5'\text{-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3'}$)。引物合成由南京金斯瑞公司完成。

1.2.3 *FonSIX6* 基因诱饵载体的构建

将 *FonSIX6* 克隆到 pMD18-T vector (购自 TaKaRa 公司)。根据 SignalP 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 的两种预测方法 SignalP-NN 和 SignalP-HMM 对 *FonSIX6* 编码区氨基酸进行信号肽序列预测:发现前 16 个氨基酸为信号肽。根据 *FonSIX6* 基因 ORF (去除信号肽) 两端序列设计一对引物,分别引入 *Nde* I 和 *Sal* I 酶切位点 ($5'>\text{ctctCATATGGGTCCCCTTGCTCAAACCGAAC}<3'$, $5'>\text{gtgttGTCGACGTGTCATGAATGTATGCATGCC}<3'$), 以测序质粒为模板, PCR 扩增后双酶切,即可将 *FonSIX6* 基因克隆到酵母表达载体 pGBKT7 的 *Nde* I 和 *Sal* I 位点之间,构建成诱饵蛋白表达载体 pGBKT7-SIX6。测序由南京金斯瑞公司完成。

1.2.4 *FonSIX6* 基因诱饵毒性和自激活测试

采用 LiAc 方法 (Clontech 公司试剂盒) 将诱饵载体转化到 Y2H Gold 菌株中,在 SD/-Trp 平板上筛选阳性转化子。挑取一个直径 2~3 mm 的单菌落,接种到 50 mL SD/-Trp/Kan ($20\text{ }\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 液体培养基中, $250\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 16 h,分光光度计测定培养基的 OD_{600} ,其数值应该 ≥ 0.8 ,否则诱饵蛋白阻碍酵母生长,具有毒性。同时,将阳性转化子涂布于 SD/-Trp/X- α -gal、SD/-Trp/-Leu/X- α -gal、SD/-Trp/-Leu/-His/X- α -gal 上,如果诱饵转化的克隆是白色且在后两种培养基上不能生长,则表明没有自激活作用。

1.2.5 西瓜酵母文库构建及筛选

将西瓜专化型尖孢镰刀菌生理小种 1 接种于 PSA 固体培养基, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 暗培养一周,用灭过菌的蒸

馏水清洗固体培养基得到孢子。将孢子稀释为浓度每毫升 1.0×10^6 后接种于西瓜 PI296341-FR 的根部。分别在 0、12、24、48、72 和 96 h 后进行根部取样, 迅速置于液氮 -70°C 保存备用。RNA 的提取采用 RNAiso 试剂盒。

西瓜 cDNA 文库构建和双杂交筛选采用 Clontech 公司的试剂盒 MatchmakerTM Library Construction and Screening Kit, 按说明书进行。

1.2.6 序列的生物信息学分析

利用 NCBI 中 BLAST 程序在蛋白数据库中进行相似性搜索, 获得测序片段的相关功能信息; 利用 DNASTar (version 5.01) 软件完成 ORF、等电点和分子量预测; ClustalX (Ver. 1.81) 软件进行多重序列比对。

2 结果与分析

2.1 *FonSIX6* 基因的克隆

根据 Lievens 等 (2009) 报道的引物序列, 经过 PCR 克隆、测序和序列比对证明克隆到的靶基因和已报道的 *FonSIX6* (NCBI 编号为 ADO60274) 氨基酸序列完全相同且该基因不含有内含子, 其 ORF 长度为 648 bp, 推测编码 215 个氨基酸, 等电点 pI 为 6.71, 分子量为 23.3 kD。氨基酸比对证实与已知功能的 FolSIX6 的同源性为 90.23%, 且信号肽和 8 个半胱氨酸之间保守 (图 1)。

FolSIX6	<u>MKLALIASILAAG</u> CVAGPLAQTE SESADVAHTINYIDIAPEEFEPKANK	50
FonSIX6	-----P-----D	50
FolSIX6	LSSLVSRDTLPVST C PAGQKYDRSV CYKADKIRSFC VANPRSNREKITDT	100
FonSIX6	-----TN-----NT-----S--	100
FolSIX6	P QPREI C VQRNLSNGKSF AKC IPVDLV E WKTSANGN KEGCT TTSVNP	150
FonSIX6	--K-Q-----S-----Y-----V----Q----P-----	150
FolSIX6	GYHHLGTIVYDINKNP IEVDKISYF GEPGNVNEGIGGSTSYFSSDNFQFS	200
FonSIX6	-----V-----L----	200
FolSIX6	KSRYMKSRDMRTFMT	215
FonSIX6	---F---KG-H---	215

图 1 FolSIX6 和 FonSIX6 推测的氨基酸比对

下划线标出的氨基酸为信号肽; 黑体标出的为保守的半胱氨酸残基。

Fig. 1 Alignment of the predicted amino acid sequence of SIX6 from Fol and Fon
The predicted signal peptide is underlined and conserved cysteine residues are in bold.

2.2 诱饵载体构建、转化和自激活验证

2.2.1 诱饵载体 pGBKT7-SIX6 的构建

为了进行下一步的酵母双杂交试验, 将 *FonSIX6* 基因构建到诱饵载体 pGBKT7, 形成诱饵蛋白表达载体 pGBKT7-SIX6。测序后证实载体构建成功。随后将构建好的诱饵成功转化到酵母菌株 Y2H Gold 菌株中。

2.2.2 诱饵自激活和毒性验证

将含有诱饵质粒的酵母 Y2H Gold 菌株分别涂布于 SD/-Trp/X- α -gal、SD/-Trp/-Leu/X- α -gal、

SD/-Trp/-Leu/-His/X- α -gal 上, 结果表明转化后的诱饵只能在 SD/-Trp/X- α -gal 上生长且为白色, 在 SD/-Trp/-Leu/X- α -gal、SD/-Trp/-Leu/-His/X- α -gal 不能生长 (图 2), 说明该诱饵不具有自激活作用。随后在液体培养基 SD/-Trp 中培养进行毒性鉴定, $250 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 30°C 培养 16 h 后 $\text{OD}_{600} > 0.8$, 发现没有毒性。因而可以用于下一步的酵母双杂交研究。

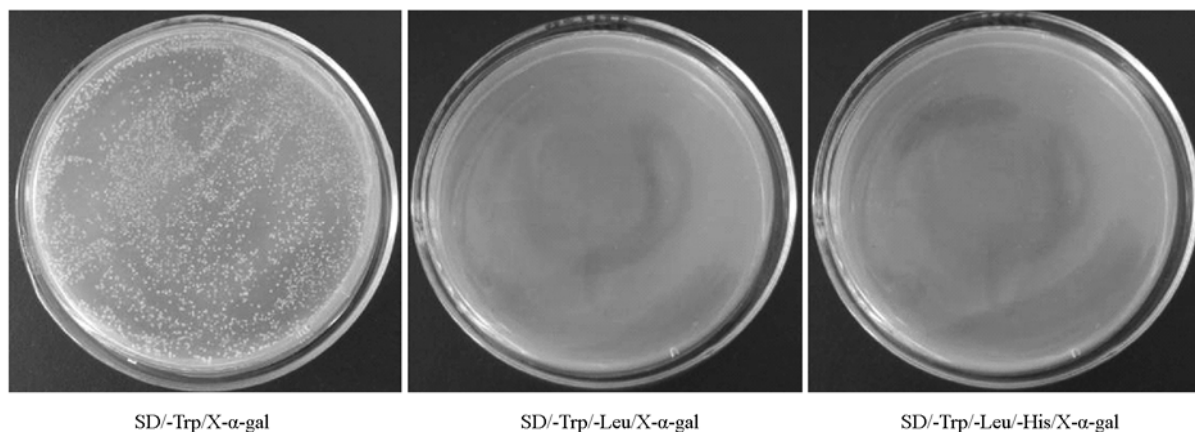


图 2 诱饵蛋白的自激活分析

含有 pGBKT7-SIX6 质粒的 Y2H Gold 酵母细胞可以在 SD/-Trp/X- α -gal 培养基上生长, 不能在 SD/-Trp/-Leu/X- α -gal、SD/-Trp/-Leu/-His/X- α -gal 培养基上生长。

Fig. 2 Autoactivity analysis of bait protein

The Y2H Gold yeast cells (containing pGBKT7-SIX6 plasmid) can grow on SD/-Trp/X- α -gal and do not grow on SD/-Trp/-Leu/X- α -gal and SD/-Trp/-Leu/-His/X- α -gal.

2.3 西瓜酵母文库的构建

用每毫升含有 1×10^6 个孢子的 Fon 生理小种 1 进行接种有 4 片真叶的 PI296341-FR 西瓜根部组织, 提取总 RNA。

将总 RNA 逆转录为第一链 cDNA, 通过长距离 PCR (LD-PCR) 扩增出双链 cDNA (ds cDNA), 电泳结果显示 cDNA 片段主要集中在 750 bp, 可以用于建库 (图 3)。

同时通过 LD-PCR 可在 cDNA 两端引入可与线性载体 pGADT7-Rec 发生同源重组的序列 BD SMART III 和 CDS III, 这样, 用 ds cDNA 及线性载体 pGADT7-Rec 共转化酵母菌株 Y187 后, ds cDNA 即可在酵母细胞内与线性载体 pGADT7-Rec 发生同源重组, 进而形成环状包含 cDNA 的 pGADT7 质粒, 这样便在酵母中构建好 cDNA 表达文库。

2.4 库容量和插入片段检测

通过统计后证实文库容量为 1.6×10^6 。收集的菌液分别稀释 100 倍、1 000 倍、10 000 倍、100 000 倍, 均匀涂抹在 SD/-Leu 培养基的培养皿上, 根据平板中酵母菌落数量推测, 该文库的库滴度约

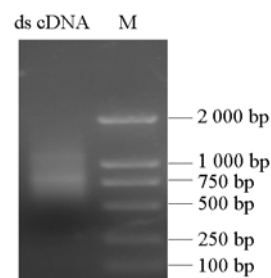


图 3 西瓜根部 ds cDNA 电泳检测

ds cDNA: 双链 cDNA; M: DNA marker DL2000。

Fig. 3 Electrophoresis pattern of ds cDNA

ds cDNA: Double strand DNA;

M: DNA marker DL2000.

为 3.8×10^7 ，转化结果比较理想，满足下一步酵母双杂交的筛选。

随机挑取 150 个生长在上述 SD/-Leu 平板上的菌落，根据 pGADT7-Rec 载体序列设计引物（F：CTATTTCGATGATGAAGATACCCCACCAAACCC，R：GTGAACTTGCGGGGTTTTTCAGTATCTACGATT）进行 PCR 扩增，反应结束后取 10 μL 产物在 1.0%的琼脂糖凝胶上检测：插入片段大部分介于 750 ~ 1 000 bp（图 4）。

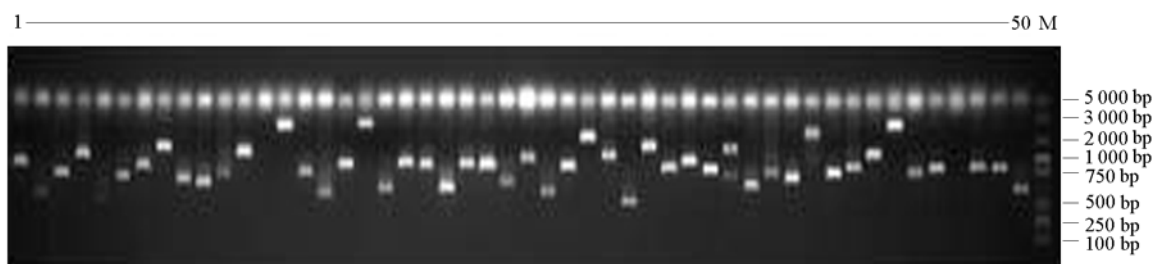


图 4 文库插入片段鉴定
1 ~ 50: 阳性克隆; M: DNA marker。
Fig. 4 Analysis of the inserted fragments in the cDNA library
1 - 50: Positive colonies; M: DNA marker.

2.5 酵母文库的筛选和阳性克隆的验证

采用杂交（图 5）的方法，共筛选到候选克隆 14 个。通过对候选克隆测序，与 GenBank 数据库进行同源性比较和功能预测（表 1）。

表 1 与 FonSIX6 互作的蛋白编码基因
Table 1 Positive clones which interact with FonSIX6

序号 No.	序列长度/bp Sequence length	同源基因 Homologous gene	同源性/% Identity
1	681	NADH 脱氢酶亚基 K ^a NADH dehydrogenase subunit K ^a	99
2	454	核酮糖 1,5 - 二磷酸羧化酶 ^b Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase ^b	99
3	560	锌指蛋白 701 ^c Zinc finger protein 701 ^c	76
4	451	Pol 蛋白 ^c Pol protein ^c	63
5	484	S - 腺苷甲硫氨酸脱羧酶 ^c S-adenosylmethionine decarboxylase ^c	59
6	588	RNase H 家族蛋白 ^d RNase H family protein ^d	58
7	803	PHD 指蛋白 ^c PHD finger protein ^c	56
8	600	病程相关蛋白 5-like Pathogenesis-related protein 5-like	41
9	863	假定蛋白 DMR_17590 Hypothetical protein DMR_17590	40
10	544	假定蛋白 TPHA_0H00200 Hypothetical protein TPHA_0H00200	40
11	402	腺苷钴啉胺酸合成酶 Adenosylcobyrnic acid synthase	38
12	665	免疫球蛋白 I-set 结构域蛋白 Immunoglobulin I-set domain protein	29
13	556	未命名蛋白产物 Unnamed protein product	49
14	896	未命名蛋白产物 Unnamed protein product	40

注：^a 涉及到光合作用过程的蛋白；^b 涉及到能量代谢过程的蛋白；^c 调控抗病基因表达的蛋白；^d 调控逆转录过程的蛋白。

Note: ^a The protein involve in photosynthesis; ^b The protein involve in energy metabolism; ^c The protein regulate disease resistance gene; ^d The protein regulate reverse transcription.

将测序返还质粒和诱饵质粒共转化到酵母菌株 Y187 菌株中，首轮筛选涂布于 SD/-Trp/-Leu/-His 上，生长 3 ~ 4 d 后在含有 SD/-Ade/-Trp/-Leu/-His/X-α-gal 上划线。候选克隆和相互作用的蛋白能够生长并且变蓝，阴性克隆不能生长（图 6）。结果表明筛选到的都为阳性克隆。

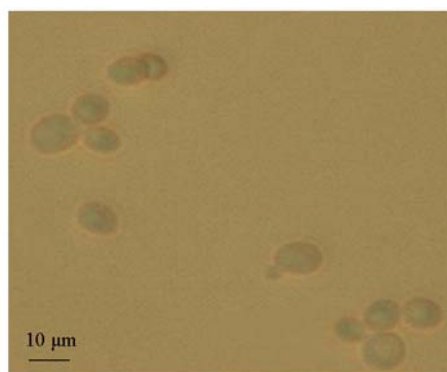


图 5 双杂交结果观察

典型的杂合子为三耳突状，分别代表两个母细胞和一个子细胞。

Fig. 5 Result of the yeast mating

A zygote typically has three-lobed shape, the lobes representing the two haploid (parental) cells and the budding diploid cells.

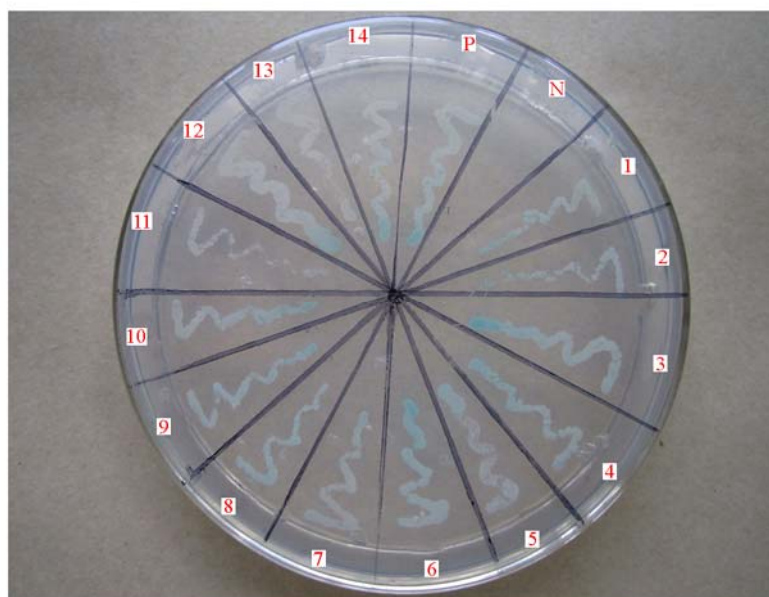


图 6 FonSIX6 相互作用蛋白证实

1 ~ 14: 以 FonSIX6 为诱饵筛选到的阳性克隆; P: 阳性对照 (pGBKT7-53/pGADT7-Rec T interaction);

N: 阴性对照 (pGBKT7-lam/pGADT7-Rec T interaction)。

Fig. 6 Identification of the protein interacted with FonSIX6 in the yeast cells

1 - 14: Interact target protein with Fonsix6 by yeast two-hybrid assay; P: Positive control

(pGBKT7-53/pGADT7-Rec T interaction); N: Negative control

(pGBKT7-lam/pGADT7-Rec T interaction) .

3 讨论

真菌 Fol 与寄主番茄之间相互作用研究的迅速发展为研究西瓜枯萎病和寄主之间的相互作用提供了一个很好的模式。目前，西瓜专化型尖孢镰刀菌存在 3 个生理小种，即：生理小种 0、1、2。生理小种 0 能够侵染不含有任何抗病基因的栽培品种，生理小种 1 是中国和世界上西瓜种植区主要

致病生理小种。生理小种 2 能够侵染除了野生栽培种以外的所有西瓜品种。据报道, 生理小种 0 和 1 被认为是一个小种, 仅存在致病力上的差异, 即造成致病力之间的差异是量而非质上的 (Daniel & Ray, 2007)。

FolSIX6 已经证实是一个致病因子, 通过同源克隆的方法, 克隆了 *FonSIX6* 基因。为了阐明 FonSIX6 在西瓜—尖孢镰刀菌相互中的作用以及寻找与其相互的寄主蛋白, 以 FonSIX6 为诱饵筛选了构建的 PI296341-FR 酵母 cDNA 表达文库, 获得了 14 个存在相互作用的蛋白。通过在 NCBI 数据库中 Blastp 分析表明: 有 6 个蛋白同源性大于 50% (56%~99%)。NADH subunit K 是 NADH 脱氢酶的一个亚基。NADH 通过改变光合系统 I 中的循环电子流活性来调节光合成进而调节叶片的衰老 (Tomas et al., 2009)。这与被镰刀菌侵染后西瓜叶片萎焉表型一致, 推测 FonSIX6 蛋白作为致病因子危害植物的光合作用系统。

Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase 核酮糖 - 1,5 - 二磷酸 (RuBP) 羧化酶是光合作用中固定 CO₂ 的第一个酶, 是催化卡尔文循环中 CO₂ 固定的第一步反应。研究发现, 在植物叶片衰老、受到病原物侵袭及逆境中, RuBP 的含量都呈明显的下降趋势。张月娟等 (2011) 通过酵母双杂交证实 AvrPto、AvrPtoB 与 RuBP 存在相互作用, 抑制了寄主植物的光合作用, 从而提高植物病原菌的生存适合度, 促使其大量繁殖。RNase H 家族蛋白 (RNase H family protein) 主要是在细胞逆转录过程中降解 RNA/DNA 中的 RNA 链, 推测 FonSIX6 蛋白可能通过影响细胞的逆转录过程而使细胞过程不能正常进行。

pol protein 含有 CHROMO superfamily 结构域, 该类型的蛋白主要是调控常染色质和异染色质基因的表达 (Cavalli & Paro, 1998), Leeuwen 等 (2003) 从 BAC 文库中筛到一个抗病基因簇包含该类型的基因, 推测该类型基因可能调控抗病基因的表达。S - 腺苷甲硫氨酸脱羧酶 (S-adenosylmethionine decarboxylase) 主要是多胺合成途径的调节酶。众多研究表明: 病原菌侵染植物后, 植物体内的多胺含量会急剧增加。Yamakawa 等 (1998) 证实烟草抗 TMV 过程中精胺诱导 PR 蛋白的表达。FonSIX6 是否能够诱导 S-adenosylmethionine decarboxylase 表达, 从而增加体内多胺含量的增加有待于进一步研究。锌指蛋白 (zinc finger protein) 是一类具有“手指状”结构域的转录因子, 负责调控基因的表达。锌指蛋白主要通过与核酸的相互作用, 显示出不同的功能, 如促进转录、抑制转录、单链 DNA 结合、RNA 结合或 RNA/DNA 双向结合等 (Laity et al., 2001)。本研究中克隆到的锌指蛋白含有 GVQW 结构域, 该类型的蛋白目前功能未知。PHD 指蛋白 (PHD finger protein) 是一类由约 60 个氨基酸残基组成的具有 C4HC3 保守序列的结构。推测这类锌指可能通过其 loop2 表面与特异的核蛋白相互作用, 从而参与染色体重塑的调控, 已有研究证实 PHD 可以调控病原菌防卫相关基因的表达, 如: parsley PR2 受到病原菌诱导后迅速积累主要是受启动子一处 125 bp 的区域调控, 该调控区域中一个 11 bp 的基序 (motif) 与一个 PHD 蛋白结合, HD-DNA 相互作用调控 *pr2* 基因的表达 (Korfhage et al., 1997)。

从上述靶蛋白的功能推测, FonSIX6 主要作用的靶位点可能主要是植物能量系统和光合作用, 而植物识别后对其响应的方式是调控抗病基因的表达。有关靶蛋白的具体功能有待于进一步研究。

References

- Cavalli G, Paro R. 1998. Chromo-domain proteins: Linking chromatin structure to epigenetic regulation. *Curr Opin Cell Biol*, 10: 354 - 360.
- Chakrabarti A, Rep M, Wang B, Ashton A, Dodds P, Ellis J. 2010. Variation in potential effector genes distinguishing Australian and non-Australian isolates of the cotton wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. *Plant Pathology*, 60 (2): 232 - 243.
- Daniel S E, Ray D R. 2007. Fusarium wilt of watermelon and other cucurbits. *The Plant Health Instructor*, DOI: 10.1094/PHI-I-2007-0122-01.
- Hogenhout S A, van der Hoorn R A, Terauchi R, Kamoun S. 2009. Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. *Mol Plant*

- Microbe Interact, 22: 115 – 122.
- Houterman P M, Cornelissen B J, Rep M. 2008. Suppression of plant resistance gene-based immunity by a fungal effector. PLoS Pathog, 4: 1 – 6.
- Houterman P M, Speijer D, Dekker H L, CG D E K, Cornelissen B J, Rep M. 2007. The mixed xylem sap proteome of *Fusarium oxysporum*-infected tomato plants. Mol Plant Pathol, 8: 215 – 221.
- Jia Y, McAdams S A, Bryan G T, Hershey H P, Valent B. 2000. Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. EMBO J, 19: 4004 – 4014.
- Jones J D, Dangl J L. 2006. The plant immune system. Nature, 444: 323 – 329.
- Korfhage U, Trezzini G F, Meier I, Hahlbrock K, Somssich I E. 1994. Plant homeodomain protein involved in transcriptional regulation of a pathogen defense-related gene. Plant Cell, 6: 695 – 708.
- Laity J H, Lee B M, Wright P E. 2001. Zinc finger proteins: New insights into structural and functional diversity. Curr Opin Struct Biol, 11: 39 – 46.
- Leeuwen H, Monfort A, Zhang H, Puigdom`enech P. 2003. Identification and characterisation of a melon genomic region containing a resistance gene cluster from a constructed BAC library. Microcolinearity between *Cucumis melo* and *Arabidopsis thaliana*. Plant Molecular Biology, 51: 703 – 718.
- Lievens B, Houterman P M, Rep M. 2009. Effector gene screening allows unambiguous identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races and discrimination from other *formae speciales*. FEMS Microbiol Lett, 300: 201 – 215.
- O'Donnell K, Kistler H C, Cigelnik E, Ploetz R C. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. Proc Natl Acad Sci USA, 95: 2044 – 2049.
- Rep M, Meijer M, Houterman P M, van der Does H C, Cornelissen B J. 2005. *Fusarium oxysporum* evades I-3-mediated resistance without altering the matching avirulence gene. Mol Plant Microbe Interact, 18: 15 – 23.
- Rep M, van der Does H C, Meijer M, van Wijk R, Houterman P M, Dekker H L, Dekoster C G, Cornelissen B. 2004. A small, cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for I-3-mediated resistance in tomato. Mol Microbiol, 53: 1373 – 1383.
- Takken F, Rep M. 2010. The arms race between tomato and *Fusarium oxysporum*. Mol Plant Pathol, 11: 309 – 314.
- Tang X, Frederick R D, Zhou J, Halterman D A, Jia Y, Martin G B. 1996. Initiation of plant disease resistance by physical Interaction of avrPto and pto kinase. Science, 274: 2060 – 2063.
- Thomas W, Maria K, Sana S. 2009. Loss of all plastid ndh genes in gnetales and conifers: Extent and evolutionary significance for the seed plant phylogeny. Curr Genet, 55: 323 – 337.
- Yamakawa H, Kamada H, Satoh M, Ohashi Y. 1998. Spermine is a salicylate-independent endogenous inducer for both tobacco acidic pathogenesis-related proteins and resistance against tobacco mosaic virus infection. Plant Physiology, 118: 1213 – 1222.
- Zhang Yue-juan, Zhao Ting-chang, Yang Yu-wen. 2011. Screening of the interactive proteins of avirulent proteins AvrPto or AvrPtoB in susceptible tomato cultivar Zhongshushihao by yeast two-hybrid system. Scientia Agricultura Sinica, 44 (23): 4939 – 4944. (in Chinese)
- 张月娟, 赵廷昌, 杨玉文. 2011. 利用酵母双杂交系统筛选感病番茄中蔬四号与无毒蛋白AvrPto、AvrPtoB互作的蛋白. 中国农业科学, 44 (23): 4939 – 4944.
- Zou Xiao-hua, Zhang Hai-ying, Li Sheng, Geng Li-hua, Gong Guo-yi, Ren Yi, Xu Yong. 2011. Inheritance of resistance to race 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* in watermelon wild germplasm PI296341-FR (*Citrullus lanatus* var. *citrioides*). Acta Horticulturae Sinica, 38 (9): 1699 – 1706. (in Chinese)
- 邹小花, 张海英, 李 胜, 耿丽华, 宫国义, 任 毅, 许 勇. 2011. 野生西瓜种质 PI296341-FR 抗枯萎病菌生理小种 2 的遗传规律. 园艺学报, 38 (9): 1699 – 1706.