

水稻 NBS-LRR 类抗稻瘟病蛋白 Pik-h 的互作蛋白筛选

王加峰, 刘浩, 王慧, 陈志强

(华南农业大学国家植物航天育种工程技术研究中心, 广州 510642)

摘要: 【目的】利用酵母双杂交系统, 以组成抗稻瘟病基因 *Pik-h* 的 2 个紧密连锁且功能独立的 *Pikh-1* 和 *Pikh-2* 蛋白为诱饵, 在水稻叶片中筛选与之互作的蛋白, 以便深入研究抗病基因 *Pik-h* 介导的抗病反应途径。【方法】以含抗稻瘟病基因 *Pik-h* 的近等基因系 IRBL8 为材料, 取稻瘟病菌 (*Magnaporthe oryzae*) GD0193 接种 12 和 24 h 后的水稻叶片, 等量混合后提取总 RNA, 按照酵母双杂交试剂盒 (Make Your Own “Mate&Plate” Library System) 的要求构建水稻叶片靶标 cDNA 文库。利用快速重组克隆的方法构建 pGBKT7-Pikh1 和 pGBKT7-Pikh2 诱饵载体, 并分别将它们转化至酵母菌株 Y2H Gold, 提取细胞总蛋白后利用 Western blot 检测 Pikh1 和 Pikh2 的表达情况, 并对这 2 个诱饵载体自激活和毒性分析后进行酵母双杂交筛选。提取 SD/-Ade/-Leu/-Trp/-His/X- α -Gal 筛选平板培养基上呈蓝色的酵母单克隆的质粒, 将其分别与对应的诱饵载体共转化酵母菌株 Y2H Gold, 涂布于筛选平板培养基上进行互作的重复验证, 将通过重复验证的质粒测序分析所得的序列比对水稻基因组数据库以确定目的基因, 并对这些基因进行 gene ontology (GO) 注释分析以确定其分子功能、生物过程及细胞组成。【结果】靶标 cDNA 文库的库容量约为 2.2×10^6 , 插入片段长度均大于 400 bp, 表明水稻 cDNA 文库质量高。诱饵载体 pGBKT7-Pikh1 和 pGBKT7-Pikh2 均能在酵母细胞中正确表达出对应的 Pikh1 及 Pikh2 蛋白, 无自激活活性而且对酵母无毒性作用, 符合文库筛选的要求。利用含有诱饵载体的酵母菌株 Y2H Gold 与靶标文库菌株 Y187 结合 (Mating) 的方式筛选, 获得 13 个与 *Pikh-1* 相互作用的蛋白、5 个与 *Pikh-2* 相互作用的蛋白, 其中有 2 个与 *Pikh-1* 及 *Pikh-2* 同时存在相互作用。这些蛋白包括 4 个在逆境响应或激素信号转导过程中起到重要作用的 (辅) 转录因子、3 个信号蛋白、4 个参与光合作用的叶绿体蛋白、1 个含有 U-BOX 结构域的蛋白及 4 个未知功能蛋白。【结论】成功构建了适宜于研究抗病基因 (R 基因) 介导反应途径的酵母双杂交 cDNA 文库, 筛选出 *Pik-h* 的互作蛋白, 为进一步研究 *Pik-h* 或其他抗稻瘟病基因介导的抗病机制打下了基础。

关键词: 水稻; 稻瘟病菌; 酵母双杂交; 互作蛋白; *Pik-h*; 筛选

Screening of Putative Proteins That are Interacted with NBS-LRR Protein *Pik-h* by the Yeast Two-Hybrid System

WANG Jia-feng, LIU Hao, WANG Hui, CHEN Zhi-qiang

(National Engineering Research Center of Plant Space Breeding, South China Agricultural University, Guangzhou 510642)

Abstract: 【Objective】 To further investigate the signaling pathways activated directly by the resistance proteins *Pikh-1* and *Pikh-2* from the resistance gene *Pik-h*, yeast two-hybrid assay was performed to screen a rice leaf cDNA library using *Pikh-1* and *Pikh-2* as bait, respectively. 【Method】 All rice leaves of IRBL8 (*Pik-h* NIL) from the time points (12 and 24 h after inoculation with GD0193) were harvested for total RNA preparation. The rice leaf cDNA library was further constructed with the Make Your Own Mate&Plate Library System kit (Clontech). Bait plasmids pGBKT7-Pikh1 and pGBKT7-Pikh2 were constructed using the rapid homologous recombination method. The expression of the two proteins in the Y2H Gold strain was further detected with Western blot and the self-activation and cytotoxicity were also tested. Proteins interacting with the baits *Pikh1* and *Pikh2* were screened on

收稿日期: 2015-09-14; 接受日期: 2015-10-27

基金项目: 国家自然科学基金 (31401722)、教育部高等学校博士学科点专项科研基金 (20124404120007)

联系方式: 王加峰, E-mail: bcjfwang@gmail.com. 通信作者陈志强, E-mail: chenlin@scau.edu.cn

SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -Gal plates from the rice leaf cDNA library with the mating strategy. Then the plasmids were prepared from the blue interacting clones and retransformed back into Y2H Gold strain with the corresponding bait. The plasmids that passed the reconfirmation were sequenced and the DNA sequences were further used to blast rice genome annotation project database. The functions of the interaction proteins were further analyzed with gene ontology (GO) annotation. **【Result】** The rice leaf cDNA library contained 2.2×10^6 independent clones. The sizes of most inserts were above 400 bp in the cDNA library. Bait plasmids (pGBKT7-Pikh1 and pGBKT7-Pikh2) expressed the corresponding proteins (BD-Pikh-1 and BD-Pikh-2) well and showed no self-activation and cytotoxicity, and suited to this screen. Thirteen candidate interacting proteins of pGBKT7-Pikh1 and five candidate interacting proteins of pGBKT7-Pikh2 were verified. Function annotation showed that four putative proteins were transcription factors involved in stress response and hormone signaling pathways, three were signaling proteins, four were involved in photosynthesis, one U-BOX containing protein was involved in ubiquitin mediated proteolysis, and four were unknown function proteins. **【Conclusion】** A high quality cDNA library was constructed and 16 proteins interacting with *Pik-h* proteins were identified, and these results provided good clues for elucidating the *Pik-h*- or other R-gene-mediated disease-resistant mechanisms in rice.

Key words: rice (*Oryza sativa*); *Magnaporthe oryzae*; yeast two-hybrid; interacting protein; *Pik-h*; screening

0 引言

【研究意义】植物抗病反应是一系列基因、信号途径及多基因产物被激活的复杂过程。一般而言,抗病基因是识别无毒基因后激活了下游的防御反应。基于酵母双杂交技术研究抗稻瘟病基因 *Pik-h* 激活的抗病反应途径有利于阐明抗病基因的抗性机理,揭示病害的发生机制,为培育持久、广谱、高抗稻瘟病的水稻 (*Oryza sativa*) 新品种奠定理论基础。**【前人研究进展】**水稻是世界上重要的粮食作物之一,是全球约 50% 人口的主要食物来源^[1-2]。由稻瘟病菌 (*Magnaporthe oryzae*) 感染引起的稻瘟病,是水稻生产上的重要限制因素^[3],它具有传播速度快、发生范围广、危害严重等特点。流行年份导致水稻减产 10%—20%,严重时达 40%—50%,局部田块甚至颗粒无收,严重威胁着水稻的生产^[4]。聚合多个主效抗病基因培育水稻新品种是目前防治稻瘟病最为经济有效的手段^[5],但由于对水稻抗病基因的具体作用机制缺乏了解及稻瘟病菌生理小种的多样、易变等原因,通过简单聚合几个抗病基因培育的品种,抗病效果不明显或在田间推广后会很快失去抗性,导致稻瘟病重新暴发。目前克隆的抗病基因绝大多数编码 NBS-LRR 结构蛋白^[6]。水稻中除 *Pid2* 与 *pi-21* 外,其他已经克隆的 20 多个抗稻瘟病基因也都编码 NB-LRR 类抗病蛋白^[3],这些抗病蛋白在抗病反应发生过程中可能参与相同或相似的信号传导途径以激活下游的防御反应。已有很多研究利用基因芯片、基因表达序列分析等技术分析了植物与病原物互作过程中激活的抗病信号传导途径^[7-8],但由于这些技术主要是基于 mRNA 水平的变化,不能真实地反映蛋白水平的变化。蛋白质是

生理功能的执行者和生命现象的直接体现者,其功能的发挥也不是孤立的,是在纵横交错的网络中通过与其他分子相互作用完成的。利用酵母双杂交系统研究蛋白质间相互作用的网络是较为常用的策略,在植物与病原物互作研究中也起着重要作用^[9-12],如在水稻-稻瘟病菌互作过程中发现的几对直接互作的无毒蛋白与抗病蛋白 (*Avr-Pita* 与 *Pita*、*Avr-Pik* 与 *Pik*、*Avr-Pib* 与 *Pib* 等) 是利用该技术确认的^[13-15]。有研究小组也曾利用该技术以番茄 *Pto* 抗性蛋白为核心勾勒出了 *Pto* 抗病信号传导途径的线条^[16],但目前尚未见到对水稻某一特定抗稻瘟病基因直接激活信号传导途径研究的报道。**【本研究切入点】**利用酵母双杂交技术鉴定水稻中直接与抗病蛋白 *Pik-h* 互作的蛋白,有望揭示抗病蛋白 *Pik-h* 直接参与的抗病信号途径。*Pik-h* 抗病基因被 Xu 等^[17]首先报道,它与 *Pi1*、*Pik-m*、*Pik-p* 等同为 *Pik* 位点上的复等位基因^[18-21],包含 2 个伴侣基因 *Pikh-1* 与 *Pikh-2*。已有的研究发现,*Pikh-1* 变化较大,而 *Pikh-2* 较为保守;*Pikh-1* 与稻瘟病菌的识别有关,而 *Pikh-2* 可能与下游抗病反应有关^[22-23]。**【拟解决的关键问题】**分别以 *Pikh-1* 与 *Pikh-2* 为诱饵蛋白,从水稻叶片的 cDNA 文库中筛选互作蛋白以揭示双基因抗性基因 *Pik-h* 参与的抗病反应途径,为下一步的多抗病基因聚合培育广谱持久高抗的水稻新品种提供理论依据。

1 材料与方法

试验于 2014 年在华南农业大学国家植物航天育种工程技术研究中心完成。

1.1 试验材料

抗稻瘟病基因 (*Pik-h*) 近等基因系 IRBL8 由菲律

宾国际水稻所提供。稻瘟病菌株 GD0193 由广东省农业科学院植物保护研究所提供, 该菌致病谱较广^[24], 因为含有无毒基因 *Avr-Pikh* 而不能侵染 IRBL8^[25]。酵母双杂交载体 pGADT7、pGADT7-T、pGBKT7、pGBKT7-Lam、pGBKT7-P53 及酵母菌株 Y2H Gold 由香港科技大学梁纯教授实验室提供。酵母双杂交文库构建所需载体 pGADT7-Rec 及酵母菌株 Y187 均购自 Clontech 公司。

1.2 酵母双杂交 cDNA 文库的构建及质量评价

取 3—4 叶期水稻, 接种稻瘟病菌 GD0193, 将接种 12、24 h 后的叶片等量混合提取总 RNA, 参照 Clontech 公司酵母双杂交试剂盒 (Make Your Own "Mate&Plate" Library System) 的要求进行靶标 cDNA 文库的构建。具体方法: 首先对提取的叶片总 RNA 进行 mRNA 分离纯化后进行反转录, 先后进行 cDNA 第一链及 ds cDNA 的扩增、纯化; 将所得的 ds cDNA 与线性化 pGADT7-Rec 载体利用 PEG/LiAC 法共转化酵母菌株 Y187, 然后将菌液分别涂布在 120 块直径 150 mm SD/-Leu 平板培养基上; 30℃ 条件下倒置培养 3—4 d 直至菌落出现; 用含终浓度为 20% 甘油的 YPDA 液体培养基将阳性克隆从平板培养基洗脱, 按 1 mL/管 ($>2 \times 10^7$ cells) 分装于 1.5 mL 离心管, -80℃ 保存备用; 同时取共转化后的菌液按 1/10、1/100 和 1/1 000 稀释, 分别涂 100 μ L 稀释液至 SD/-Leu 平板培养基上, 对生长的单菌落计数进行库容量计算, 并随机挑取 24 个单菌落用 pGADT7-Rec 的通用引物

进行菌落 PCR, 进一步根据 PCR 电泳后的结果分析外源 DNA 片段插入情况。

1.3 诱饵表达载体 (pGBKT7-Pikh1、pGBKT7-Pikh2) 的构建及表达鉴定

分别根据水稻 *Pikh-1*、*Pikh-2* 的 cDNA 全长序列及 pGBKT7 的载体序列, 设计基因特异性引物(表 1)。以水稻近等基因系 IRBL8 的 cDNA 为模板, 分别扩增 *Pikh-1*、*Pikh-2* 的 cDNA 全长。利用 Vazyme 公司 ClonExpress[®] 快速克隆技术将扩增产物分别克隆到诱饵表达载体 pGBKT7 上。利用 PEG/LiAC 介导的酵母转化方法分别将诱饵表达载体 pGBKT7-Pikh1 和 pGBKT7-Pikh2 分别转入酵母菌株 Y2H Gold 中, 涂布于 SD/-Trp 平板培养基, 30℃ 培养 3—5 d, 直至长出单菌落。

为验证诱饵蛋白的表达, 各用 5 mL SD/-Trp 液体培养基分别培养含有 pGBKT7-Pikh1 与 pGBKT7-Pikh2 质粒的酵母菌落, 然后按照酵母细胞总蛋白提取试剂盒相关操作说明提取细胞总蛋白后进行 SDS-PAGE 电泳分离及 Western blot 分析。具体如下: 将提取的细胞总蛋白与 2 \times 上样缓冲液等体积混合后煮沸 5 min 后上样, SDS-PAGE 电泳结束后将 SDS-PAGE 胶湿转于硝酸纤维素膜上, 依次进行以下处理: 5% 脱脂牛奶封闭 1 h、一抗 (鼠单克隆抗体 anti-cMyc) 孵育 2 h 和二抗 (羊抗鼠的辣根过氧化物酶复合物) 孵育 1 h, 最后采用 Pierce 公司的化学发光底物法显色检测杂交信号。

表 1 构建诱饵载体的引物序列

Table 1 The primer sequences used in the construction of bait plasmids

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')
rBD-Pikh1-F	CATATGCCATGGAGGCCGAAATGGAGGCGGCTGCCAT
rBD-Pikh1-R	GTTATGCTAGTTATGCGGCCGCTAGCTAGTAGTTTCTGTTGAATTTCA
rBD-Pikh2-F	CATATGCCATGGAGGCCGAAATGGAGTTGGTGGTAGGTGCTT
rBD-Pikh2-R	GTTATGCTAGTTATGCGGCCGTCATGCAGTGACGATGCCATC

1.4 诱饵表达载体 (pGBKT7-Pikh1、pGBKT7-Pikh2) 的自激活检测和毒性测定

分别将质粒组合 pGBKT7-Pikh1/pGADT7、pGBKT7-Pikh2/pGADT7、pGBKT7-Lam/pGADT7-T 和 pGBKT7-P53/pGADT7-T 共转化酵母菌株 Y2H Gold 中, 然后将转化子克隆涂布在含有 SD/-Leu/-Trp/X- α -Gal 平板培养基上, 30℃ 培养 3—4 d, 观察它们在选择培养基上的生长情况, 确定表达载体是否有

自激活活性。将以上酵母菌分别接种于 50 mL SD/-Trp 液体培养基中, 30℃ 250 r/min 振荡培养 24 h。检测其菌液的 OD₆₀₀, 若 OD₆₀₀ < 0.8, 表明载体对酵母菌株具有细胞毒性; 若 OD₆₀₀ \geq 0.8 则表明质粒对菌体不存在细胞毒性。

1.5 Pikh-1 与 Pikh-2 互作蛋白的筛选、验证与分析

将分别含有 pGBKT7-Pikh1、pGBKT7-Pikh2 的酵母单菌落各自接种于 50 mL SD/-Trp 的液体培养基中,

培养至 $OD_{600}=0.8$, $1\ 000\times g$ 离心 5 min 后收集细胞, 用 4—5 mL SD/-Trp 的液体培养基重悬使细胞浓度 $>1\times 10^8$ cells/mL。将这些菌液分别与 1 mL 文库菌液混合, 并添加 45 mL 的 $2\times$ YPDA 液体培养基在 30°C 摇床进行低速摇菌培养 (30—50 r/min), 20—24 h 后至大多数细胞发生融合形成合子 (三叶草状), $1\ 000\times g$ 离心 10 min 收集细胞, 用 50 mL $0.5\times$ YPDA 液体培养基重悬沉淀后再次离心 ($1\ 000\times g$ 离心 10 min), 弃上清后将菌体重悬于 10 mL $0.5\times$ YPDA 液体培养基中, 取 10 μL 菌液稀释 10 000 倍, 并分别涂布 100 μL 至 SD/-Trp、SD/-Leu、SD/-Leu/-Trp/平板培养基上, 计算结合效率及杂交克隆数。将剩余未稀释菌液涂于 55 块 SD/-Ade/-Leu/-Trp/-His/X- α -Gal 平板筛选培养基上, 30°C 倒置培养 3—5 d。提取平板筛选培养基上呈蓝色互作克隆的质粒, 将其与对应的诱饵载体共转化酵母菌株 Y2H Gold 并涂布在平板筛选培养基上进行重复验证, 对通过重复验证的质粒送上海立菲生物有限公司测序, 将所获得的序列比对水稻基因组数据库 (rice genome annotation project) 进行序列分析。对这

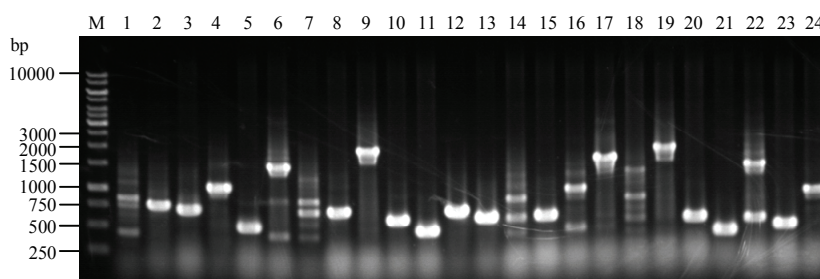
些比对出的候选互作蛋白进行 GO Ontology 注释以了解 Pik-h 互作蛋白在分子功能、细胞组成及生物学过程等方面的分布情况。

2 结果

2.1 酵母双杂交 cDNA 文库的构建

提取水稻叶片总 RNA, 经凝胶电泳检测, 其中 18S RNA 与 28S RNA 2 条带的亮度比接近 1 : 2, 经紫外分光光度计测定, 质量浓度为 $2\ 200\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, OD_{260}/OD_{280} 为 2.0, 说明 RNA 符合下一步 RNA 反转录的质量要求。根据 SD/-Leu 平板培养基上酵母菌落生长的数量推测, 该文库的库容量约为 2.2×10^6 , 符合文库构建要求。

进一步随机挑取 24 个文库质粒, 用引物 (T7F: 5'-TAATACGACTCACTATAGGGCGA-3', 3'AD: 5'-AGATGGTGCACGATGCACAG-3') 进行 PCR 扩增, 凝胶电泳结果表明 (图 1), 插入的 cDNA 片段重复性不高, 且在 400 bp 以上, 可以满足下一步酵母双杂交筛选的需要。



M: 1 kb DNA ladder marker; 1—24: 随机挑选的 24 个克隆 Randomly picked 24 library clones

图 1 PCR 检测 cDNA 文库的插入片段

Fig. 1 PCR identification of inserts in the cDNA library

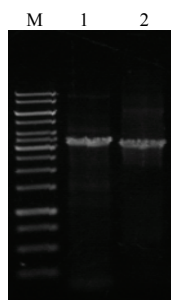
2.2 诱饵载体 pGBKT7-Pikh1 和 pGBKT7-Pikh2 的构建及表达鉴定

构建的重组质粒 pGBKT7-Pikh1、pGBKT7-Pikh2 分别用引物 rBD-Pikh1-F 与 rBD-Pikh1-R、rBD-Pikh2-F 与 rBD-Pikh2-R 进行 PCR 检测 (表 1), 结果表明重组质粒 pGBKT7-Pikh1、pGBKT7-Pikh2 可以分别扩增出大小为 3 429 与 3 066 kb 的片段, 分别与 Pikh-1、Pikh-2 的 CDS 序列大小一致, 进一步测序所得序列与 GenBank 上公布的 Pikh-1 (登录号: AET3654) 及 Pikh-2 (登录号: AET36550) 基因 CDS 序列一致, 表明 Pikh-1 与 Pikh-2 诱饵载体构建成功 (图 2)。分别对含有重

组质粒 pGBKT7-Pikh1、pGBKT7-Pikh2 的酵母细胞总蛋白进行 Western blot 试验, 结果表明蛋白表达产物分别与融合蛋白 BD-Pikh1、BD-Pikh2 的实际大小一致 (图 3), 说明 Pikh1 及 Pikh2 在酵母细胞中能正常表达, 可用于后续筛选。

2.3 诱饵载体 pGBKT7-Pikh1 和 pGBKT7-Pikh2 的自激活及毒性分析

分别将质粒组合 pGBKT7-Pikh1/pGADT7、pGBKT7-Pikh2/pGADT7、pGBKT7-Lam/pGADT7-T 和 pGBKT7-P53/pGADT7-T 共转化酵母菌株 Y2H Gold 中, 然后将转化子克隆涂布于 SD/-Leu/-Trp/X- α -



M: 1 kb DNA ladder marker; 1: pGBKT7-Pikh1; 2: pGBKT7-Pikh2

图 2 pGBKT7-Pikh1 与 pGBKT7-Pikh2 表达载体的 PCR 鉴定
Fig. 2 PCR identification of the expression plasmids pGBKT7-Pikh1 and pGBKT7-Pikh2



1: pGBKT7-Pikh1; 2: pGBKT7-Pikh2

图 3 Western blot 鉴定 Pikh1 及 Pikh2 在酵母细胞中的表达
Fig. 3 Expression of Pikh1 and Pikh2 in yeast cells identified by Western blot

Gal 平板培养基上培养 3—4 d 进行观察。结果表明这 2 个诱饵载体 pGBKT7-Pikh1 和 pGBKT7-Pikh2 与转化的阴性对照 (pGBKT7-Lam/pGADT7-T) 表型一致 (图 4), 菌落都能在 SD/-Leu/-Trp/X- α -Gal 培养基上正常生长, 但不显蓝色, 表明诱饵载体质粒 pGBKT7-Pikh1 和 pGBKT7-Pikh2 在 Y2H Gold 酵母细胞内无自激活活性。进一步检测培养 24 h 的酵母菌液 OD₆₀₀, 发现 OD₆₀₀ 均 > 2.0, 表明 BD-Pikh1、BD-Pikh2 诱饵蛋白的表达对酵母细胞不存在毒性, 因此可以用于酵母双杂交文库的筛选试验。

2.4 Pikh-1、Pikh-2 互作蛋白的筛选及序列分析

将接合 (Mating) 后的 10 μ L 酵母菌液稀释 1/10 000 后涂 100 μ L 至 SD/-Trp 和 SD/-Leu 平板培养基上, 稀释 1/1 000 后涂 100 μ L 至 SD/-Leu/-Trp 平板培养基上, 计算结合效率及杂交克隆数。结果表明在 SD/-

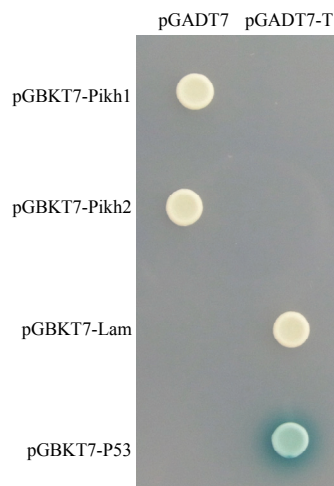


图 4 诱饵质粒 pGBKT7-Pikh1 与 pGBKT7-Pikh2 的自激活检测

Fig. 4 Self-activation analysis of the two bait plasmids of pGBKT7-Pikh1 and pGBKT7-Pikh2

Leu/-Trp 平板培养基上长出 38 个单克隆, 在 SD/-Leu 平板培养基上长出约 103 个菌落, 在 SD/-Trp 平板培养基上长出约 590 个菌落, 因此筛选得到的文库克隆总数为 3×10^7 , 杂交率为 3.7%, 满足酵母双杂交文库筛选的杂交效率 (2%—5%) 的要求, 将剩余未稀释菌液涂于 55 块 SD/-Ade/-Leu/-Trp/-His/X- α -Gal 平板培养基上进行筛选, 共获得 54 个阳性克隆。提取这 54 个互作克隆中的质粒, 将这些质粒再与对应的诱饵载体共转化酵母菌株 Y2H Gold 中, 涂布在 SD/-Ade/-Leu/-Trp/-His/X- α -Gal 平板培养基上进行重复验证, 对通过重复验证的质粒进行 DNA 测序分析, 将所得的 DNA 序列与水稻的基因组数据库进行序列比对, 最终确定了 13 个与 Pikh-1 互作的蛋白、5 个与 Pikh-2 互作的蛋白, 其中有 2 个候选蛋白与 Pikh-1 及 Pikh-2 同时存在相互作用 (表 2)。进一步利用 Uniprot 在线网站, 对这些筛选出的互作蛋白进行 GO 注释 (图 5), 结果表明这些蛋白多具有转录因子活性、催化活性、转运活性等功能。

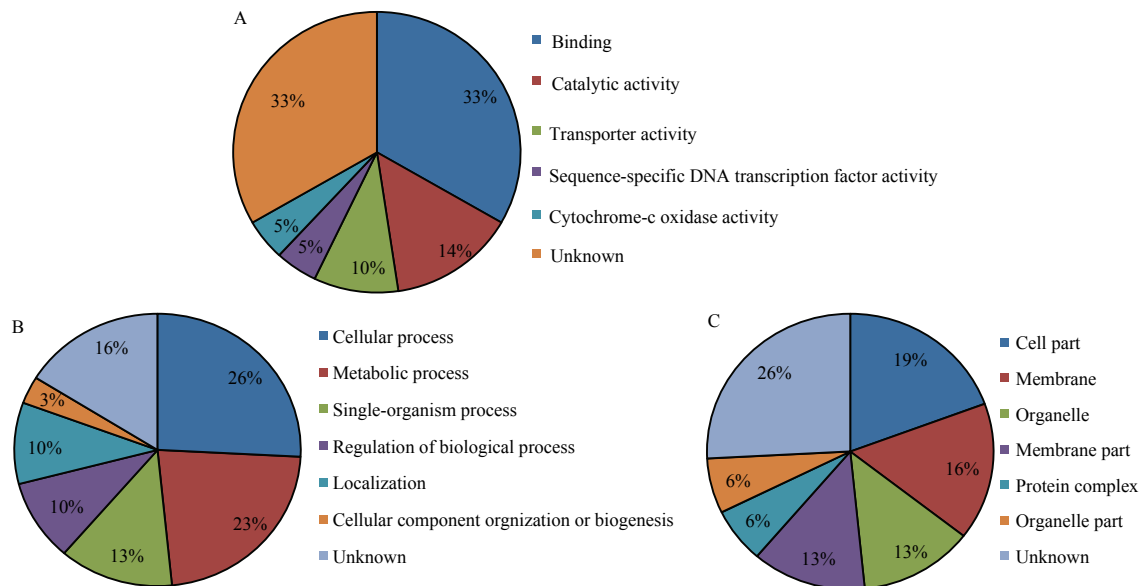
3 讨论

已有 20 多个水稻抗稻瘟病基因被报道, 除 *Pid2* 与 *pi-21* 外, 其他已经克隆的 20 多个抗稻瘟病基因也都编码 NB-LRR 类抗病蛋白^[3], 这些抗病蛋白在抗病反应发生过程中可能参与相同或相似的信号传导途径以激活下游的防御反应, 但目前的多数研究主要集中在

表 2 酵母双杂交系统筛选出分别与 Pikh-1、Pikh-2 互作的蛋白质

Table 2 Putative proteins interacted with Pikh-1 and Pikh-2 respectively in the yeast two-hybrid system

序列名称 Sequence name	基因座名称 Gene locus	比对结果 Blast result	功能分析 Function analysis	诱饵蛋白 Bait
Pikh-1-3	LOC_Os02g06650	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase	假定蛋白 Putative protein	Pikh-1
Pikh-1-4	LOC_Os11g25780.1	PB1 domain containing protein	信号蛋白 Signal protein	Pikh-1
Pikh-1-22	LOC_Os01g51120.1	Vesicle transport v-SNARE protein	假定蛋白 Putative protein	Pikh-1
Pikh-1-36	LOC_Os01g54670.1	Coiled-coil domain-containing protein 25	螺旋结构域蛋白 Helix domain protein	Pikh-1
Pikh-1-45	LOC_Os05g0322900	WRKY45	转录因子 Transcription factors	Pikh-1
Pikh-1-54	LOC_OsI_13305	COX11	细胞色素 C 氧化酶组装 Cytochrome C oxidase assembly	Pikh-1
Pikh-1-60	LOC_Os01g09640.1	Myb transcription factor	转录因子 Transcription factors	Pikh-1
Pikh-1-65	LOC_Os03g60080.1	NAC domain-containing protein 67	转录因子 Transcription factors	Pikh-1
Pikh-1-67	LOC_Os08g44680.1	Photosystem I reaction center subunit II, chloroplast precursor	光合作用 Photosynthesis	Pikh-1
Pikh-1-70	LOC_Os04g37990.1	Transporter family protein	转运蛋白家族蛋白 Transporter protein family	Pikh-1
Pikh-1-79	LOC_Os01g56680.2	Photosystem II reaction center W protein, chloroplast precursor	光合作用 Photosynthesis	Pikh-1
Pikh-1-21&Pikh-2-11	LOC_Os06g28590.1	Bg55	U-BOX 蛋白 U-BOX protein	Pikh-1& Pikh-2
Pikh-1-31&Pikh-2-16	LOC_Os11g07020.1	Fructose-bisphosphate aldolase isozyme	光合色素调控 pigment regulation	Pikh-1& Pikh-2
Pikh-2-4	LOC_Os10g34409.1	Transposon protein, CACTA, En/Spm sub-class	假定转座子 Putative transposon	Pikh-2
Pikh-2-7	LOC_Os01g56680.2	Photosystem II reaction center W protein, chloroplast precursor	光合作用 Photosynthesis	Pikh-2
Pikh-2-19	LOC_Os01g54930.1	One zinc finger protein, putative	转录因子 Transcription factors	Pikh-2



A: 分子功能 Molecular function; B: 生物过程 Biological process; C: 细胞组成 Cellular component

图 5 Gene ontology 注释

Fig. 5 Gene ontology annotation

在抗病基因的鉴定及其与对应无毒基因的互作方面, 对抗瘟病基因介导抗病反应途径了解很少。本研究运用 SMART 技术构建了高质量的水稻叶片靶标 cDNA 文库, 并分别以 *Pikh-1* 及 *Pikh-2* 为诱饵, 筛选到了 13 个与 *Pikh-1*、5 个 *Pikh-2* 互作的重要蛋白, 其中有 2 个蛋白还分别与 *Pikh-1* 及 *Pikh-2* 有相互作用。对筛选到候选蛋白通过进一步的生物信息学分析, 表明这 16 个 *Pik-h* 互作蛋白包括转录因子类、信号转运类、光合作用相关类及一些未知功能蛋白。

转录因子在植物中参与多种生物学过程, 包括植物生长、花发育、种子成熟、衰老、光信号、损伤、病菌防御以及对各种环境胁迫的响应等。*Pikh-1* 与 WRKY、MYB、NAC 等家族的蛋白存在相互作用, 表明稻瘟病抗性基因识别效应因子后, 进入核内与转录因子结合, 通过转录调控作用激活免疫应答, 这也与部分 *Pikh-1* 定位于细胞核的报道一致^[23]。WRKY 类转录因子在抵御生物胁迫和非生物胁迫、种子的生成和萌发、衰老等过程中都发挥了重要的作用, 如 *Pb1* 介导的稻瘟病抗性依赖于其与转录因子 WRKY45 的相互作用^[26]; 大麦抗病蛋白 *MLA10* 与白粉病菌效应因子 *A10* 识别后诱导 *MLA10* 在细胞核内转录因子 WRKY 结合以启动抗病反应^[27]。MYB 类转录因子在植株中的过表达能够显著提高植物的抗病能力, 拟南芥的 *AS1*^[28]、烟草的 *NSPHAN*^[29]和玉米的 *RS2*^[30]等 MYB 类转录因子可在茉莉酸 (JA) 和防卫反应中被激活, 进而增强植物的抗病性。NAC 家族转录因子的基因在植物抗各种类型病原菌反应中可能也起着至关重要的作用。Sun 等^[31]在水稻中发现了 2 个响应稻瘟病菌侵染的 NAC 转录因子 (*ONAC122* 和 *ONAC131*)。Xu 等^[32]在马铃薯中鉴定出一个能够被晚疫病菌显著诱导的转录因子 *StNAC2*。

研究中发现了几个与 *Pik-h* 互作的蛋白为光合作用相关蛋白。de Torres 等最近的研究证实, 光合系统 II 与植物的基础抗性密切相关, 发现 MAMP 可以诱发光合系统 II 产生 ROS, 以抵御病原菌的入侵, 而具体的作用机制目前仍不清楚^[33-34]。*Pikh-1* 与 *Pikh-2* 分别与参与光合作用的蛋白 *LOC_Os08g44680.1*、*LOC_Os01g56680.2* 有相互作用, 而且它们还同时与 *LOC_Os11g07020.1* (fructose-bisphosphate aldolase isozyme) 具有相互作用, 表明抗病基因 *Pik-h* 可能直接通过类似 MAMP 的功能作用于光合系统上以诱发 ROS 的产生, 具体作用机制还需进行深入研究。

抗病反应的发生涉及多种生物信号分子、转运蛋

白及相关酶类的共同作用。近年来, 越来越多的研究表明, 抗病因子质核间的转运在植物先天免疫机制中起着重要的作用^[35]。本研究中发现, *Pikh-1* 与 *LOC_Os11g25780.1* (PB1 domain containing protein)、*LOC_Os04g37990.1* (transporter family protein)、*LOC_Os01g54670.1* (coiled-coil domain-containing protein 25)、COX11 (细胞色素 C 氧化酶组装) 等蛋白具有相互作用, 而且 *bg55* (U-BOX 蛋白) 可与 *Pikh-1* 及 *Pikh-2* 同时具有相互作用, 表明 R 基因介导的抗病反应非常复杂, 除参与稻瘟病菌效应蛋白的识别外, 还可能借助蛋白转运系统 (*LOC_Os04g37990.1*) 传递信号分子、借助 *bg55* (U-BOX 蛋白) 调控 *Pik-h* 与效应蛋白的识别或调控 *Pik-h* 在细胞内的表达水平以避免发生自我免疫甚至死亡的现象、借助抑制 COX11 过氧化物代谢触发了细胞程序性死亡, 使植物产生过敏性坏死反应^[36]。

本研究中鉴定到与 *Pikh-1* 互作的蛋白有 13 个, 而与 *Pikh-2* 互作的蛋白仅有 5 个, 这与 *Pikh-1* 参与稻瘟病菌的识别, *Pikh-2* 参与下游抗病反应激活^[22-23]的结果不一致。推测 *Pikh-1* 除参与识别外, 也可能与下游的一些抗病反应途径的发生有关, 或者与 *Pikh-1* 自身的调控有关, 以防止该抗病蛋白可能在未被病原菌诱导而使细胞产生自我免疫的现象^[37]; 另一方面, *Pikh-2* 的激活途径可能相对简单以利于抗病反应迅速发生以使植物产生抗性。

4 结论

成功构建了高质量的水稻叶片酵母双杂交 cDNA 文库, 并筛选得到 16 个与 *Pik-h* 互作的蛋白, 其中 13 个蛋白与 *Pikh-1*、5 个蛋白与 *Pikh-2* 互作, 而且有 2 个候选蛋白与 *Pikh-1*、*Pikh-2* 同时存在相互作用。这些蛋白多数参与逆境响应、激素信号转导过程及光合作用等途径, 推测这些蛋白与水稻 *Pik-h* 识别稻瘟病菌无毒蛋白、介导抗病反应信号转导直至产生抗病性有密切的关系, 这为进一步深入研究水稻-稻瘟病菌互作机制及 *Pik-h* 介导的抗病反应途径打下了基础。

致谢: 香港科技大学梁纯教授为试验提供了酵母双杂交系统所需的菌株及质粒, 在此表示感谢!

References

- [1] Khush G S. What it will take to feed 5.0 billion rice consumers in 2030. *Plant Molecular Biology*, 2005, 59(1): 1-6.

- [2] 刘国权, 孟昭河, 任艳军, 李春光, 刘永巍, 孟巧霞. 水稻抗稻瘟病研究进展与对策. 中国农学通报, 2004, 20(1): 211-214.
Liu G Q, Meng Z H, Ren Y J, Li C G, Liu Y W, Meng Q X. Study advances and countermeasures on blast resistance of rice. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2004, 20(1): 211-214. (in Chinese)
- [3] Liu W D, Liu J L, Ning Y, Ding B, Wang X L, Wang Z L, Wang G L. Recent progress in understanding PAMP- and effector-triggered immunity against the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Plant*, 2013, 6(3): 605-620.
- [4] Pennisi E. Armed and dangerous. *Science*, 2010, 327: 804-805.
- [5] 雷财林, 凌忠专, 王久林, 万建民. 水稻抗病育种研究进展. 生物学通报, 2004, 39(11): 4-6.
Lei C L, Ling Z Z, Wang J L, Wan J M. Study advances in disease resistance rice breeding. *Bulletin of Biology*, 2004, 39(11): 4-6. (in Chinese)
- [6] Joshi R K, Nayak S. Perspectives of genomic diversification and molecular recombination towards *R*-gene evolution in plants. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2013, 19(1): 1-9.
- [7] Soderlund C, Haller K, Pampanwar V, Ebbole D, Farman M, Orbach M J, Wang G L, Wing R, Xu J R, Brown D, Mitchell T, Dean R. MGOS: A resource for studying *Magnaporthe grisea* and *Oryza sativa* interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2006, 19(10): 1055-1061.
- [8] Vergne E, Ballini E, Droc G, Tharreau D, Nottoghem J L, Morel J B. Archipelago: a dedicated resource for exploiting past, present, and future genomic data on disease resistance regulation in rice. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2008, 21(7): 869-878.
- [9] Ma L, Houterman P M, Gawehns F, Cao L, Sillo F, Richter H, Clavijo-Ortiz M J, Schmidt S M, Boeren S, Vervoort J, Cornelissen B J, Rep M, Takken F L. The *AVR2-SIX5* gene pair is required to activate *I-2*-mediated immunity in tomato. *New Phytologist*, 2015, 208: 507-518.
- [10] Ellinger D, Glöckner A, Koch J, Naumann M, Stürtz V, Schütt K, Manisseri C, Somerville S C, Voigt C A. Interaction of the *Arabidopsis* GTPase RabA4c with its effector PMR4 results in complete penetration resistance to powdery mildew. *The Plant Cell*, 2014, 26(7): 3185-3200.
- [11] Cesari S, Thilliez G, Ribot C, Chalvon V, Michel C, Jauneau A, Rivas S, Alaux L, Kanzaki H, Okuyama Y, Morel J B, Fournier E, Tharreau D, Terauchi R, Kroj T. The rice resistance protein pair RGA4/RGA5 recognizes the *Magnaporthe oryzae* effectors AVR-Pia and AVR1-CO39 by direct binding. *The Plant Cell*, 2013, 25(4): 1463-1481.
- [12] Pérez-Sánchez L, González E, Colón-Lorenzo E E, González-Velázquez W, González-Méndez R, Rodríguez-del Valle N. Interaction of the heterotrimeric G protein alpha subunit SSG-1 of *Sporothrix schenckii* with proteins related to stress response and fungal pathogenicity using a yeast two-hybrid assay. *BMC Microbiology*, 2010, 10: 317.
- [13] Jia Y L, MeAdams S A, Bryan G T, Hershey H P, Valent B. Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *The EMBO Journal*, 2000, 19(15): 4004-4014.
- [14] Kanzaki H, Yoshida K, Saitoh H, Fujisaki K, Hirabuchi A, Alaux L, Fournier E, Tharreau D, Terauchi R. Arms race co-evolution of *Magnaporthe oryzae* AVR-Pik and rice *Pik* genes driven by their physical interactions. *The Plant Journal*, 2012, 72(6): 894-907.
- [15] Zhang S L, Wang L, Wu W H, He L Y, Yang X F, Pan Q H. Function and evolution of *Magnaporthe oryzae* avirulence gene *AvrPib* responding to the rice blast resistance gene *Pib*. *Scientific Reports*, 2015, 5: 11642.
- [16] Bogdanove A J, Martin G B. AvrPto-dependent Pto-interacting proteins and AvrPto-interacting proteins in tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(16): 8836-8840.
- [17] Xu X, Hayashi N, Wang C T, Kato H, Fujimura T, Kawasaki S. Efficient authentic fine mapping of the rice blast resistance gene *Pik-h* in the *Pik* cluster, using new *Pik-h*-differentiating isolates. *Molecular Breeding*, 2008, 22(2): 289-299.
- [18] Hua L X, Wu J Z, Chen C X, Wu W H, He X Y, Lin F, Wang L, Ashikawa I, Matsumoto T, Wang L, Pan Q H. The isolation of *Pil*, an allele at the *Pik* locus which confers broad spectrum resistance to rice blast. *Theoretical and Applied Genetics*, 2012, 125(5): 1047-1055.
- [19] Ashikawa I, Hayashi N, Yamane H, Kanamori H, Wu J, Matsumoto T, Ono K, Yano M. Two adjacent nucleotide-binding site-leucine-rich repeat class genes are required to confer *Pik*-specific rice blast resistance. *Genetics*, 2008, 180(4): 2267-2276.
- [20] Yuan B, Zhai C, Wang W J, Zeng X S, Xu X K, Hu H Q, Lin F, Wang L, Pan Q H. The *Pik-p* resistance to *Magnaporthe oryzae* in rice is mediated by a pair of closely linked CC-NBS-LRR genes. *Theoretical and Applied Genetics*, 2011, 122(5): 1017-1028.
- [21] Zhai C, Lin F, Dong Z Q, He X Y, Yuan B, Zeng X, Wang L, Pan Q H. The isolation and characterization of *Pik*, a rice blast resistance gene which emerged after rice domestication. *New Phytologist*, 2011, 189(1): 321-334.
- [22] Wu W H, Wang L, Zhang S, Li Z K, Zhang Y, Lin F, Pan Q H. Stepwise arms race between *AvrPik* and *Pik* alleles in the rice blast pathosystem. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2014, 27(8):

- 759-769.
- [23] Zhai C, Zhang Y, Yao N, Lin F, Liu Z, Dong Z Q, Wang L, Pan Q H. Function and interaction of the coupled genes responsible for *Pik-h* encoded rice blast resistance. *PLoS One*, 2014, 9(6): e98067.
- [24] 杨祁云, 伍尚忠, 朱小源, 张少红, 刘斌. 广东稻瘟病菌的遗传宗谱与致病性的关系. 植物保护学报, 2000, 27(4): 289-294.
- Yang Q Y, Wu S Z, Zhu X Y, Zhang S H, Liu B. Preliminary study of the relationship between genetic lineage and pathogenicity of *Magnaporthe grisea*. *Acta Phytopylacica Sinica*, 2000, 27(4): 289-294. (in Chinese)
- [25] 孙大元. 广谱抗源 H4 抗稻瘟病的分子机制研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2011.
- Sun D Y. Mechanism of the broad spectrum resistance to *Magnaporthe oryzae* in an indica rice H4[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2011. (in Chinese)
- [26] Inoue H, Hayashi N, Matsushita A, Liu X, Nakayama A, Sugano S, Jiang C J, Takatsuji H. Blast resistance of CC-NB-LRR protein Pb1 is mediated by WRKY45 through protein-protein interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(23): 9577-9582.
- [27] Shen Q H, Saijo Y, Mauch S, Biskup C, Bieri S, Keller B, Seki H, Ulker B, Somssich I E, Schulze-Lefert P. Nuclear activity of MLA immune receptors links isolate-specific and basal disease-resistance responses. *Science*, 2007, 315 (5815): 1098-1103.
- [28] Byrne M E, Barley R, Curtis M, Arroyo J M, Dunham M, Hudson A, Martienssen R A. *Asymmetric leaves1* mediates leaf patterning and stem cell function in *Arabidopsis*. *Nature*, 2000, 408(6815): 967-971.
- [29] McHale N A, Koning R E. *PHANTASTICA* regulates development of the adaxial mesophyll in *Nicotiana* leaves. *The Plant Cell*, 2004, 16(5): 1251-1262.
- [30] Timmermans M C, Hudson A, Becraft P W, Nelson T. ROUGH SHEATH2: a Myb protein that represses *knox* homeobox genes in maize lateral organ primordia. *Science*, 1999, 284(5411): 151-153.
- [31] Sun L J, Zhang H J, Li D Y, Huang L, Hong Y B, Ding X S, Nelson R S, Zhou X P, Song F M. Functions of rice NAC transcriptional factors, ONAC122 and ONAC131, in defense responses against *Magnaporthe grisea*. *Plant Molecular Biology*, 2013, 81(1/2): 41-56.
- [32] Xu Q F, He Q, Li S, Tian Z D. Molecular characterization of *StNAC2* in potato and its overexpression confers drought and salt tolerance. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2014, 36(7): 1841-1851.
- [33] de Torres Zabala M, Littlejohn G, Jayaraman S, Studholme D, Bailey T, Lawson T, Tillich M, Licht D, Bölter B, Delfino L, Truman W, Mansfield J, Smirnov N, Grant M. Chloroplasts play a central role in plant defence and are targeted by pathogen effectors. *Nature Plants*, 2015, 1: Article number 15074.
- [34] Schneider A, Steinberger I, Strissel H, Kunz H H, Manavski N, Meurer J, Burkhard G, Jarzombski S, Schünemann D, Geimer S, Flügge U I, Leister D. The *Arabidopsis* Tellurite resistance C protein together with ALB3 is involved in photosystem II protein synthesis. *The Plant Journal*, 2014, 78(2): 344-356.
- [35] Deslandes L, Rivas S. The plant cell nucleus: a true arena for the fight between plants and pathogens. *Plant Signaling & Behavior*, 2011, 6(1): 42-48.
- [36] Luo D, Xu H, Liu Z, Guo J, Li H, Chen L, Fang C, Zhang Q, Bai M, Yao N, Wu H, Wu H, Ji C, Zheng H, Chen Y, Ye S, Li X, Zhao X, Li R, Liu Y G. A detrimental mitochondrial-nuclear interaction causes cytoplasmic male sterility in rice. *Nature Genetics*, 2013, 45(5): 573-577.
- [37] Zhou F, Mosher S, Tian M, Sassi G, Parker J, Klessig D F. The *Arabidopsis* gain-of-function mutant *ssi4* requires *RAR1* and *SGT1b* differentially for defense activation and morphological alterations. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2008, 21(1): 40-49.

(责任编辑 岳梅)