

小 G 蛋白 *Rab2* 基因参与小麦抗叶锈病反应的研究

杨静静, 李 星, 李亚宁, 刘大群

(河北农业大学 植物保护学院, 河北省植物病虫害生物防治工程技术研究中心, 河北 保定 071001)

摘要: 为了解叶锈菌侵染小麦后小 G 蛋白 *Rab2* 基因的表达情况, 明确其与抗病性的关系, 从分子水平上探讨小麦的抗叶锈病机制。以普通六倍体小麦近等基因系 TcLr1 和叶锈菌小种 05-22-64①和 05-8-63①为试验材料, 构建小麦亲和与非亲和组合, 利用实时定量 PCR 技术对小麦小 G 蛋白 *Rab2* 基因的表达情况进行检测。结果表明: 在小麦叶锈菌侵染过程中, *Rab2* 基因主要在侵染的前期表达迅速, 随着时间的推移表达量有所下降。非亲和叶锈菌菌株可以诱导小 G 蛋白 *Rab2* 基因表达量的升高, 而亲和叶锈菌菌株抑制小 G 蛋白 *Rab2* 基因的表达。由此表明, 小 G 蛋白可能与寄主和病原物的亲和程度有着直接的关系。

关键词: 小麦叶锈病; 小 G 蛋白; *Rab2* 基因; 实时定量 PCR

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2010)04-0001-05

Involvement of Small GTP-Binding Protein Gene *Rab2* in Resistance Response of Wheat to Its Leaf Rust Disease

YANG Jing-jing, LI Xing, LI Ya-ning, LIU Da-qun

(College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei, Biological Control Center of Plant Diseases and Plant Pests of Hebei Province, Baoding 071001, China)

Abstract: Wheat leaf rust disease caused by wheat leaf rust (*Puccinia triticina*) is one of the most important diseases which have led to heavy losses to the wheat production in the world, and it also is a main factor influencing the wheat production in our country. The application of the disease resistant varieties and increasing host plant resistance are the most promising ways to control this disease, which based on the fully understanding of the resistant mechanisms. In recent years, the regulation channel of small G protein has become a hot issue of research of plant resistant mechanism. The small GTP-binding protein Rab, which consists of about two hundred amino acids, is the largest one of small GTP-binding proteins sub-families and plays an very important role in vesicular transport in eukaryotic cells. The purpose of this study is to understand the expression of the small G protein *Rab2* gene in the wheat infected with wheat leaf rust (*Puccinia triticina*), and definite the relationship between the *Rab2* and the disease resistance, to investigate the resistance mechanism of wheat leaf rust in the molecular level. In this study, the near-isogenic lines of the common hexaploid wheat TcLr1 and leaf rust Race 05-22-64 ① and 05-8-63 ① are used to build the compatible combinations and the incompatible combinations, then RNA were extracted at different time points and the first strand of cDNA were synthesized by reverse transcription in vitro. *Rab2* gene expression were analyzed by real-time fluorescence quantitative PCR. As results, in the process of infection by wheat leaf rust (*puccinia triticina*) *Rab2* gene significantly expressed only in six hours after inoculation and reached the highest expression point at twelve hours after inoculation, and in the following hours *Rab2* gene expression decreased. It means *Rab2* gene is mainly expressed in the early stage of infection, while declines with time prolonged. The incompatible combinations can upregulate the expression of the small GTP-binding protein *Rab2* gene, while the compatible combinations will depress its expression. Therefore, the small G protein should be directly related to the affinity of the host and its pathogen.

收稿日期: 2010-06-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(30971772); 河北省教育厅基金项目(2009130)

作者简介: 杨静静(1983-), 女, 河北邯郸人, 硕士, 主要从事分子植物病理学研究。

通讯作者: 李亚宁(1974-), 女, 河北石家庄人, 副教授, 博士, 主要从事植物病害生物防治和分子植物病理学研究。

刘大群(1958-), 男, 河北石家庄人, 教授, 博士, 主要从事植物病害生物防治和分子植物病理学研究。

Key words: Wheat leaf rust disease; Small G protein; *Rab2* gene; Real-time quantitative PCR

由小麦叶锈菌(*Puccinia triticina*)引起的小麦叶锈病是影响世界小麦稳产高产的重要病害之一,也是影响我国小麦生产的重要因素。该病害在世界各产麦区均有发生^[1-2],严重时可造成40%的产量损失^[3]。应用抗病品种和提高寄主植物抗病性是控制小麦叶锈病的最佳途径,而其前提是对小麦抗叶锈病反应机制的全面了解。

近年来,小G蛋白的调控途径已经成为人们研究的热点问题。小G蛋白家族包括Ras、Rab、Rho、Arf和Ran亚家族^[4-5],它们参与细胞中许多重要的生理活动,如基因表达、细胞骨架重组、微管形成以及囊泡和核孔运输。其中Rab蛋白是小分子GTP结合蛋白家族中最大的亚家族^[6],该家族的不同成员分布遍及细胞内各类细胞器及运输囊泡,是囊泡运输的分子开关,与其上游调控子和下游特定的效应子相互作用,并与GTP的结合和水解过程相偶联,在囊泡的形成、转运、粘附、锚定、融合等不同阶段发挥作用。目前在植物,如拟南芥中已发现有57种Rab蛋白,又可细分为5个亚家族,命名为At-RAB(A-H)^[7]。Rab蛋白家族中,Rab2除具有上述功能外,还负责调节与种子萌发和花粉管伸长有关的细胞壁的生物合成^[8],并且对花粉管上内质网和高尔基体间的小泡运输及花粉管自身的伸长也起重要的作用^[9]。当植物受外界因子如干旱、盐碱、病害胁迫时,有许多Rab蛋白被诱导表达^[10-12]。在小麦^[13]、玉米^[14]、烟草^[8]、南非的耐旱植物*Sporobolus stapfianus*^[10]中都克隆到了*Rab2*基因。

实时定量PCR(Real-time quantitative PCR)技术是一种对初始模板中的目的基因(DNA和RNA)进行定量研究的有力工具^[15,16],并已成为研究植物基因表达水平变化的一项重要技术。该技术可有效地应用于病原菌感染宿主植物的过程中,研究宿主基因表达的改变,以及抗病植株与感病植株的基因表达差异的研究。Dean等^[17]应用该技术以延长因子基因1(*EF-1a*)作为参照基因,研究了*Colltotrichum destructivum*感染烟草(*Nicotiana benthamiana*)后,宿主植物 β -1,3-葡聚糖酶的表达水平的变化。本研究从小麦与叶锈菌互作的基因表达水平,应用实时定量PCR技术对小麦抗叶锈病过程中小麦小G蛋白*Rab2*基因的表达情况进行检测和分析,探讨其可能的调控机制,对阐明小G蛋白在小麦抗叶锈病反应分子机制中所起的作用具有重要的意义。

1 材料和方法

1.1 植物材料与供试菌种

小麦品种选用小麦抗叶锈近等基因系TcLr1;供试菌种选用小麦叶锈菌的毒性菌株05-22-64①(致病类型为“4”级)和无毒性菌株05-8-63①(致病类型为“;”级),以上材料均由河北农业大学植物保护学院分子植物病理实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 小麦的培养处理及取样 将小麦叶锈菌在小麦感病品种郑州5389上繁殖,收集其新鲜的夏孢子。将小麦近等基因系TcLr1种子播于直径10cm的小花盆,待小麦正常生长7~8d后,采用撒粉法将供试的2个小麦叶锈菌菌种分别接种于小麦叶片上,在小麦上喷水雾,黑暗条件下保湿24h。再将小麦转入20℃光照培养箱中16h/8h/d光照/黑暗/天进行培养。分别于接种叶锈菌之后0,6,12,18,24,48,72,96,120,144h的时间点进行取样;每次剪取2片新鲜叶片并用锡铂纸包好,投入液氮中置于-80℃贮存备用。

1.2.2 小麦叶片总RNA的提取以及cDNA第一链的合成、检测 使用百泰克生物技术有限公司的TRI-pure Reagent总RNA抽提试剂提取小麦叶片总RNA,然后用小麦总RNA做模板,按照大连宝生物公司的M-MLV Reverse Transcriptas反转录酶的试剂盒说明书进行反转录合成cDNA第一链。然后使用小麦的持家基因*GAPDH*进行PCR扩增以检测cDNA。

1.2.3 小麦*GAPDH*、*Rab2*基因引物扩增以及片段的回收、克隆与测序 用cDNA第一链做模板,进行PCR扩增得到基因的特异性片段,随后再进行回收、克隆和序列测序。

1.2.4 实时定量PCR分析 将反转录所得cDNA第一链各取1 μ L用持家基因*GAPDH*引物进行定量PCR扩增,根据持家基因*GAPDH*在不同cDNA模板量各时间点的CT值,确定cDNA模板量。然后根据在小麦中已克隆到的*Rab2*基因^[13]作为内参的小麦*GAPDH*基因^[18]的序列,利用Primer 5.0软件设计特异实时定量PCR引物。*Rab2*的正向引物: TCCCAT-AGGCGTGCCGTGAG; *Rab2*的反向引物: GCATAGC-CAACTTTGATTCCAT; *GAPDH*的正向引物: CTGC-CTTGCTCCTCTTGCTAA; *GAPDH*的反向引物: CTT-GCTGGAAGGACCATCAAC。应用IQ5 Real-time PCR Detection System实时定量PCR仪,将接种叶锈

病菌后不同时间点的小麦叶片的总 RNA 反转录成 cDNA, 以各样品 cDNA 为模板进行实时定量检测, 每个时间点重复 3 次, 以无菌水代替 cDNA 模板为试验中的阴性对照。为消除各时间点样品量的差异及反转录效率的影响, 以小麦 *GAPDH* 为内参, 进行 PCR 扩增。

PCR 反应体系为: $2.5 \times \text{RealMasterMix}/20 \times \text{SYBR solution}$ $11.25 \mu\text{L}$; 正向引物 $1 \mu\text{L}$; 反向引物 $1 \mu\text{L}$; DNA 模板 $1 \mu\text{L}$; 加超纯水至 $25 \mu\text{L}$ 。

PCR 反应程序为: 95°C 3 min; 95°C 10 s; 60°C 30 s, 168°C 30 s; 40 循环。反应结束后, 分析荧光值变化曲线和溶解曲线。每个反应做 3 次重复, *G* 值取平均值。以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法来计算各个时间点小 G 蛋白 *Rab2* 基因的表达量。

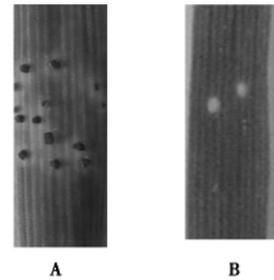
2 结果与分析

2.1 小麦与叶锈菌的不同相互作用

亲和相互作用 TcLr1 与 05-22-64①(侵染型为“4”); 非亲和相互作用 TcLr1 与 05-8-63①(侵染型为“”)如图 1 所示。

2.2 小麦叶片总 RNA 的检测分析

对小麦叶片总 RNA 进行提取, 取 $1 \mu\text{L}$ 总 RNA 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。发现从小麦叶片提取的总 RNA 的 28 S、18 S RNA 条带清晰明亮、无拖带现象, 28 S RNA 与 18 S RNA 的亮度基本相同, 表明提取的 RNA 样品较为完整、无降解。如图 2 所示。



A. 毒性菌株; B. 无毒性菌株。
A. Virulent race; B. Avirulent race.

图 1 不同相互作用

Fig. 1 Different types of infection

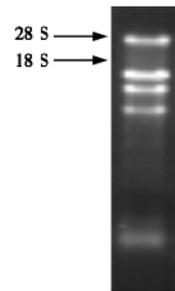


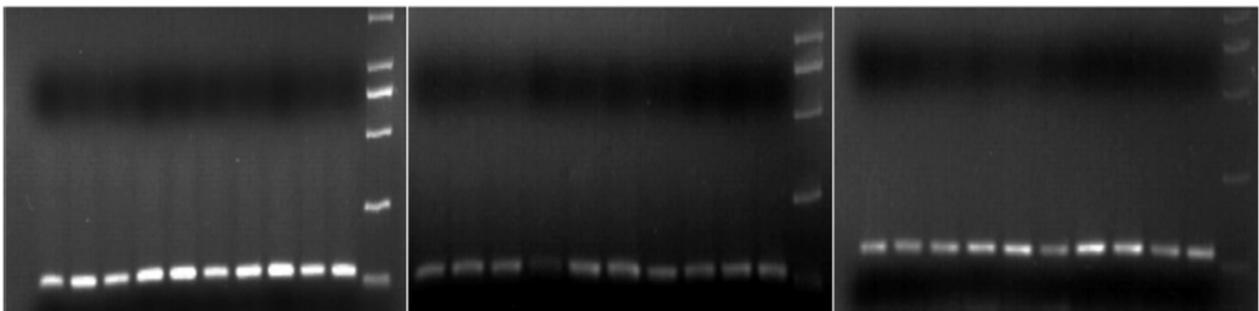
图 2 小麦叶片总 RNA 提取结果

Fig. 2 Electrophoretogram of total RNA extracted from wheat leaves

2.3 反转录产物检测分析

用小麦持家基因 *GAPDH* 来检测反转录产物, 电泳检测结果如图 3。在对照组、非亲和组合及亲和组合各时间点都扩增获得约 118 bp 的 *GAPDH* 目的片段, 转录产物可用于后续试验。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 M 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 M 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 M



1~10. 非亲和组合接种后 0 h, 12, 18, 24, 48, 72, 96, 120, 144 h 的样品; 11~20. 亲和组合接种后 0 h, 12, 18, 24, 48, 72, 96, 120, 144 h 的样品;

21~30. 对照组 0 h, 12, 18, 24, 48, 72, 96, 120, 144 h 的样品。
1. 0 h; 2. 6 h; 3. 12 h; 4. 18 h; 5. 24 h; 6. 48 h; 7. 72 h; 8. 96 h; 9. 120 h; 10. 144 h after inoculation in resistant group; 11. 0 h; 12. 6 h; 13. 12 h; 14. 18 h; 15. 24 h; 16. 48 h; 17. 72 h; 18. 96 h; 19. 120 h; 20. 144 h after inoculation in compatible group; M. Molecular weight Markers (DL2000); 21. 0 h; 22. 6 h; 23. 12 h; 24. 18 h; 25. 24 h; 26. 48 h; 27. 72 h; 28. 96 h; 29. 120 h; 30. 144 h in water treatment group.

图 3 反转录产物检测

Fig. 3 Detection of the first strand cDNA

2.4 小麦小 G 蛋白 *Rab2* 及 *GAPDH* 基因引物扩增片段克隆、测序结果

用小麦小 G 蛋白 *Rab2* 基因引物扩增出 200 bp 的片段。经回收测序, 其序列为: GCATAG CCAACTTTGATTCCATAGGACTCATTAGATACATCA

AAGACACCATCCTGAATTTTCTTGATATTGCTCCAG
CAGTCTTGACAAAGCCCTCCTCGACATTTTGTGCAG
TTTTTGCAGATGCCTCCATAAAGATGAGACCATTCT
CCTTGGCAAAGCTCGCCTTCCTCGAAGCTCACC-
GCACGCCTATGGGA 经 BLAST 比对该片段为小麦小

G 蛋白 *Rab2* 基因的片段,这表明该引物可用作下一步表达量检测的引物。

用小麦 *GAPDH* 基因引物扩增出 118 bp 的片段。经回收测序,其序列为: CTGCCTTGCTCGTCTTGCTAAGGTTATCAATGACAGGTTTGGCATTGTTGAGGGTTTGATGACCACAGTTCATGCCATGACTGCAACCAGAAGACTGTTGATGGTCCTTCCATCAAG 经 BL-AST 比对该片段为小麦 *GAPDH* 基因的片段,这表明该引物可以用作下一步表达量检测的引物。

2.5 实时定量 PCR 分析结果

为了探明在叶锈菌侵染小麦的过程中,小 G 蛋白 *Rab2* 基因不同时间点的表达模式,进行了实时定量 PCR 分析,结果如图 4 所示。在叶锈菌侵染小麦的过程中,接种后 6 h 时 *Rab2* 基因已经显著表达,12 h 时表达量达到最高,在以后的时间点 *Rab2* 基因的表达有所降低。由此结果可知小麦 *Rab2* 基因的表达主要在侵染的前期表达升高的迅速。随着时间的推移表达量有所下降。这与郭志爱等^[13]报道的在小麦上进行水分胁迫诱导 *Rab2* 基因后的前期表达情况是一致的。

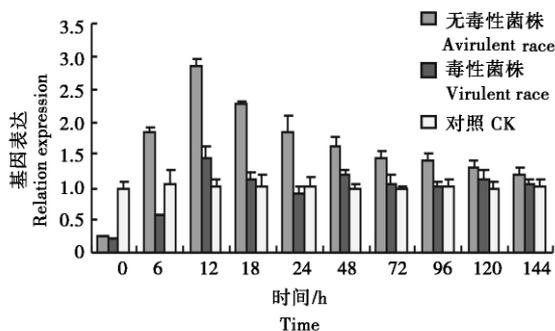


图 4 *Rab2* 基因实时定量 PCR 结果

Fig. 4 Real-time PCR analysis of *Rab2*

3 结论与讨论

实时定量 PCR 技术是在 PCR 反应体系中加入荧光基团,这个荧光基团所发出的信号会随着 PCR 的每一个循环发生变化,利用荧光信号的变化可以实时监测整个 PCR 进程,最后通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方法对未知模板进行定量分析的方法。为了更好的确定一个基因在不同时间点的表达情况,用作参照的管家基因是必需的,根据试验需求谨慎选择适合的管家基因对最终的实验结果会有很大的影响。常用的管家基因是一些与细胞的基本结构和功能有关的基因,如 β -actin、 β -磷酸甘油醛脱氢酶(*GAPDH*)、核糖体 RNA(*rRNA*)、延伸因子(*EF-1a*)等。一个理想的用于实时定量 PCR 基因表达研究的管家基因,必须在不同的生长发育阶段和不同的器官组织中相对恒

定地表达,且要确保不受试验中不同处理的影响。本试验以小麦的 *GAPDH* 基因作为参照的持家基因,在小麦扩增中,发现 *GAPDH* 非常易于扩增、条带清晰,且表达量较高,适合作小麦基因表达的参照基因。

根据实时定量 PCR 的结果,无毒性叶锈菌菌株可以诱导小 G 蛋白 *Rab2* 基因表达量的升高,而高毒性叶锈菌抑制小 G 蛋白 *Rab2* 基因的表达,表明小 G 蛋白与寄主和病原物的亲和程度有直接的关系。从信号转导角度分析,叶锈菌的毒性小种可能是通过产生某种信号来抑制小 G 蛋白基因的表达,从而不能开启抗病机制,最终成功侵入寄主表现感病。无毒性叶锈菌可能通过产生某种信号首先诱导小 G 蛋白的大量表达,从而放大抗病信号,通过传递最终发生抗病反应,使小麦表现为抗病。

另外从小麦与叶锈菌的互作表型来看,接种 6 h 时小麦 *Rab2* 基因已经有显著表达;12 h 时表达量达到最高;在以后的时间点该基因的表达有所降低。而接种后 6 h 小麦叶锈菌侵入气孔,12 h 叶锈菌形成吸器进入到植物细胞内,说明小麦 *Rab2* 基因在叶锈菌与小麦互作的过程中起着重要作用,并且 *Rab2* 基因的表达主要在侵染的前期进行,这与郭志爱等^[13]小麦中已报道的水分胁迫诱导的 *Rab2* 的表达情况一致。

本试验从小麦与叶锈菌互作的基因表达水平对小麦小 G 蛋白 *Rab2* 基因进行了研究,得出以下结论:无毒性叶锈菌株可以诱导小麦小 G 蛋白 *Rab2* 基因表达量的升高,而毒性叶锈菌株抑制小 G 蛋白 *Rab2* 基因的表达,表明小 G 蛋白可能与寄主和病原物的亲和程度有着直接的关系。

参考文献:

- [1] Komer J A. Genetics of resistance to wheat rust [J]. Annual Review of Phytopathology, 1996, 34: 435 - 455.
- [2] Kloppers F J, Pretorius Z A. Effects of combinations amongst genes *Lr13*, *Lr34* and *Lr37* on components of resistance in wheat to leaf rust [J]. Plant Pathology, 1997, 46(5): 737 - 750.
- [3] Knott D R. The wheat rust breeding for resistance [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1989: 191 - 198.
- [4] Bischoff F, Molendijk A, Rajendrakumar C S, et al. GTP-binding proteins in plants [J]. Cell Mol Life Sci, 1999, 55: 233 - 256.
- [5] Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins [J]. Physiol Rev, 2001, 81: 153 - 208.
- [6] 樊俊蝶, 王伟, 梁爱华. Rab 蛋白的结构、功能及进化 [J]. 生命的化学, 2004, 24(1): 31 - 33.

- [7] 柳忠玉,黄亚东,庄楚雄. 参与植物膜泡运输的蛋白质家族及功能研究进展[J]. 细胞生物学杂志,2006,28(3):447-452.
- [8] Moore I,Diefenthal T,Zarsky V,et al. A homolog of the mammalian GTPase Rab2 is present in *Arabidopsis* and is expressed predominantly in pollen grains and seedlings [J]. Proc Natl Acad Sci USA,1997,94(2):762-767.
- [9] Cheung A Y,Chen C Y,Glaven R H,et al. Rab2 GTPase regulates vesicle trafficking between the endoplasmic reticulum and the golgi bodies and is important to pollen tube growth [J]. Plant Cell,2002,14(4):945-962.
- [10] O'Mahony P J,Oliver M. Characterization of a desiccation-responsive small GTP-binding protein (Rab2) from the desiccation-tolerant grass *Sporobolus stapfianus* [J]. Plant Mol Biol,1999,39(4):809-821.
- [11] Mizrahi-Aviv E,Mills D,Benzioni A,et al. Cloning and Molecular characterization of the salt-regulated Jojoba *ScRab* cDNA encoding a small GTP-binding protein [J]. Taylor & Francis Health Sci,2002,13:295-300.
- [12] Mazel A,Leshem Y,Tiwari B S,et al. Induction of salt and osmotic stress tolerance by overexpression of an intracellular vesicle trafficking protein AtRab7 (*AtRabG3e*) [J]. Plant Physiol,2004,134(1):118-128.
- [13] 郭志爱,臧庆伟,景蕊莲,等. 小麦小 G 蛋白的 Rab2 基因 TaRab2 的克隆及其表达分析[J]. 作物学报,2007,33(2):201-207.
- [14] Palme K,Diefenthal T,Vingron M,et al. Molecular cloning and structural analysis of genes from *Zea mays* coding for members of the ras-related *ypt* gene family [J]. Proc Natl Acad Sci USA,1992,89(2):787-791.
- [15] Bustin S A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems [J]. Journal of Molecular Endocrinology,2002,29:23-39.
- [16] Dheda K,Huggett J F,Bustin S A,et al. Validation of house keeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR [J]. Biotechniques,2004,37:112-119.
- [17] Dean J D,Goodwin P H,Hsiang T. Comparison of relative RT-PCR and northern blot analyses to measure expression of β -1,3-glucanase in *Nicotiana benthamiana* infected with *Colltotrichum destructivum* [J]. Plant Molecular Biology Reporter,2002,20:347-356.
- [18] 岳彩凤,康国章,刘超,等. 小麦 *GAPDH* 基因克隆及序列分析[J]. 中国农学通报,2008,24(4):94-98.