

CaM 及各亚型基因参与小麦抗叶锈病反应的研究

霍建飞^{1,2} 宋水山^{2,3} 李 星² 杨文香² 刘大群²

(1. 天津市植物保护研究所, 天津 300112; 2. 河北农业大学 植物保护学院植物病理系, 河北省农作物病虫害生物防治工程技术研究中心, 河北 保定 071001; 3. 河北省生物研究所, 河北 石家庄 050051)

摘要: 采用实时荧光定量 PCR 法, 对小麦抗叶锈病近等基因系 TcLr15 接种亲和或非亲和性叶锈菌后, CaM 及其亚型的 mRNA 表达差异进行相对定量分析。结果表明, 小麦接种后 12 h 内 CaM 的 4 个亚型基因表达量与不接种对照相比相差不大。小麦接种非亲和叶锈菌 48、72、96 h 后, CaM SF-1 表达量分别比亲和组合高 24.6%、26.6%、38.8%; 接种 24、48 h 后, CaM SF-4 表达量分别高出亲和组合 26.8% 和 28.0%; 在接种后 24~96 h 这一过程中, CaM SF-2 表达量均低于亲和组合中, 而 CaM SF-3 表达量与亲和组合表达量相差不大。接种非亲和叶锈菌后, 在第 24 h、第 48 h 小麦 CaM 表达量分别高于亲和组合 18.1% 和 47.9%, 而在第 72 h 和第 96 h CaM 表达量又低于亲和组合。上述结果暗示, CaM 可能参与了小麦抗叶锈病反应, 并且具有亚型特异性。小麦中 CaM SF-1 和 CaM SF-4 可能与小麦抗叶锈病相关, CaM SF-2 可能与小麦感叶锈病相关, 而 CaM SF-3 可能不参与小麦抗叶锈病反应。

关键词: 小麦; 叶锈菌; 钙调素; 亚型; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: S432.2⁺3 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2010)04-0175-05

Research on CaM and Its Isoform Genes Involved in the Resistance Response of Wheat to *Puccinia triticina*

HUO Jian-fei^{1,2} SONG Shui-shan^{2,3} LI Xing² YANG Wen-xiang² LIU Da-qun²

(1. The Plant Protection Institute of Tianjin, Tianjin 300112, China; 2. Department of Plant Pathology, College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei, Biological Control Center of Plant Diseases and Plant Pests of Hebei Province, Baoding 071001, China; 3. Biology Institute of Hebei Province, Shijiazhuang 050051, China)

Abstract: CaM is involved in plant resistance response. To study the differential expression of CaM and four isoforms gene in wheat TcLr15 after inoculation with virulent race and avirulent race, relatively quantitative analysis was performed by real-time PCR. The level of CaM and four CaM isoforms gene expression in wheat TcLr15 was tested by real-time Fluorescent Quantitative PCR (real-time PCR) after inoculation with virulent race and avirulent race respectively. No significant difference in the gene expression of CaM and its four isoforms was observed between the detached wheat leaves inoculated with virulent and without until 12 h after inoculation. The gene expression of CaM SF-1 in wheat at 48 h, 72 h and 96 h after inoculation with avirulent race 05-5-127 ③ were increased by 24.6%, 26.6% and 38.8% compared with that of inoculation virulent race 05-22-64 ①. The gene expression of CaM SF-4 at 24 h, 48 h after inoculation with avirulent race 05-5-127 ③ were increased by 26.8% and 28.0% if compared to that of inoculation with virulent race 05-22-64 ①. The gene expression of CaM SF-2 in the incompatible interaction was lower than that of compatible interaction control from 24 h to 96 h after inoculation. No obvious difference in gene expression level of CaM SF-3 between compatible and incompatible interaction was found. The gene expression of CaM in wheat after inoculation with avirulent race 05-5-127 ③ at the 24 h and 48 h were increased by 18.1% and 47.9% if compared to that of inoculation with virulent race 05-22-64 ①, however, the gene expressive quantity of CaM in wheat at 72 h and 96 h after inoculation with avirulent race 05-5-127 ③ was lower than that of inoculation with virulent race 05-22-64 ①. Taken together, these data implied that CaM might be involved in the regulation on wheat resistance against its leaf rust disease. More over, there exist a CaM isoform specificity for the involving in wheat defense against the infection of *Puccinia triticina*. The CaM SF-1 and CaM SF-4 genes may be related to wheat against the infection of *Puccinia triticina*. The CaM SF-2 gene may be related to wheat susceptible to the infection of *Puccinia triticina*. The CaM SF-3

收稿日期: 2010-06-03

基金项目: 国家“973”前期项目 (2005CCA01600)

作者简介: 霍建飞 (1981-), 男, 河北承德人, 研究实习员, 硕士, 主要从事分子植物病理学及蔬菜病害研究。

通讯作者: 宋水山 (1963-), 男, 河北隆尧人, 研究员, 博士, 主要从事微生物分子生物技术研究。

刘大群 (1958-), 男, 河北石家庄人, 教授, 博士, 主要从事分子植物病理学研究。

gene may be not related to wheat against the infection of *puccinia triticina*.

Key words: Wheat; *Puccinia triticina*; CaM; Isforms; Real-time PCR

钙调素(Calmodulin ,CaM) 是植物细胞内 Ca^{2+} 信号的主要受体,参与许多生命活动的调节。植物中存在许多 *CaM* 基因,组成一个 *CaM* 大家族,不同的基因编码不同的 *CaM* 亚型。研究表明,CaM 参与植物的抗病反应,且不同的 *CaM* 亚型可能调控不同的抗病途径。但是,对于 Ca^{2+} •CaM 信号系统如何参与小麦抗叶锈病反应,国内外尚未见相关报道。

本试验应用实时荧光定量 PCR 技术进行相对定量分析,得到小麦抗叶锈病近等基因系 TcLr15 接种亲和及非亲和性叶锈菌后,CaM 及 4 个亚型基因在转录水平上的差异,从分子水平上探测 CaM 是否参与小麦抗叶锈病反应、是否具有亚型特异性,探讨小麦抗叶锈基因表达调控的分子机制,为更进一步研究 CaM 如何参与小麦抗叶锈病反应奠定基础,同时也为研究参与小麦抗叶锈病的信号分子提供思路。

1 材料和方法

1.1 材料

供试小麦为小麦抗叶锈病近等基因系 TcLr15。叶锈菌种为 TcLr15 亲和性叶锈菌 05-22-64①(侵染型为“4”)和 TcLr15 非亲和性叶锈菌 05-5-127③(侵染型为“”)。以上材料均由河北农业大学小麦锈病研究中心提供。

1.2 接种

小麦种子经 0.1% KMnO_4 消毒后,蒸馏水浸种

12 h,将种子排列于铺有滤纸的培养皿中,25℃催芽 24 h。将发芽整齐的种子播于直径 10 cm 的小塑料盆中,在人工气候箱中培育幼苗,光照时间 16 h/d,黑暗时间 8 h/d,温度为 18℃/22℃(黑暗/光照)。当麦苗一叶一心时,接种亲和性叶锈菌 05-22-64①或非亲和性叶锈菌 05-5-127③,以不接种叶锈菌为对照。接种后继续放在人工气候箱中培养。

1.3 小麦叶片 RNA 的提取、分离纯化及 cDNA 的合成

接种后 0、12、24、48、72、96 h 分别剪取叶片,采用 RNA 提取试剂提取小麦叶片的 RNA。试验采用 20 μL 的 RT-PCR 反应体系,其中包括 2 μg 总 RNA、2 μL 的 Oligo(dt)₂₅,加入 DEPC 水补足至 11 μL ,在 70℃下加热 5 min,然后迅速放在冰上冷却,短暂离心,之后加入 4 μL M-MLV 5 × Reaction Buffer,2 μL dNTP mix,0.5 μL RNasin inhibitor (40 U/ μL)、1 μL M-MLV Reverse Transcriptase,用无酶的水补足至 20 μL ,将其温和混匀,42℃ 孵育 1 h,70℃ 加热 10 min,使酶失活。反转录得到的 cDNA 用于实时荧光定量 PCR 分析。

1.4 反转录产物的实时定量 PCR 扩增

参照荧光实时定量 PCR SYBR Green I 法的引物设计要求,根据 Gen Bank 中 *GAPDH*、*CaM*、*CaM-1*、*CaM-2*、*CaM-3*、*CaM-4* 基因的序列,用软件 Primer 3.0 设计引物,引物序列见表 1。

表 1 目的基因引物序列及 PCR 扩增条件

Tab.1 Primers for target genes and conditions of PCR

目的基因 Target gene	引物序列 Sequences of primers(5'-3')	PCR 产物/bp PCR products
<i>GAPDH</i>	F5'-CTGCCTTGCTCGTCTTGCTAA-3' R5'-CTTGATGGAAGGACCATCAAC-3'	
<i>CaM</i>	F5'-CCGTGTGTTTGACAAGGATCA-3' R5'-CACCATCAACATCAGCCTCAC-3'	131
<i>CaM-1</i>	F5'-ACTGACAGCACTCGGTACTACTGTT-3' R5'-CGAAATTCTCAACATCCCTGAG-3'	83
<i>CaM-2</i>	F5'-ATCCAGGTGCCATTTGTGAG-3' R5'-TTTGGAAACGGAGGGAGTATGA-3'	86
<i>CaM-3</i>	F5'-CCCAAGACAGGAGGAGAATTG-3' R5'-ACATAGCAGGAATTGCGTCGT-3'	131
<i>CaM-4</i>	F5'-TAGTAAGGAATGCGGCTCTCG-3' R5'-TGACACACGGGAGAGAGACAA-3'	133

采用 TaKaRa 公司 SYBR Premix Ex Taq™(Prefect Real Time) 试剂盒,10 μL 反应体系,包括 8.5 μL SYBR Premix Ex Taq™(2 ×)、1.0 μL cDNA 模板、0.25 μL 上游引物、0.25 μL 下游引物。PCR 反应管用离心机轻离心后,放入 PCR 仪中,应用两步法 PCR 扩增程序,扩增标准程序为:95℃ 预变性 5 min,95℃ 10 s,62℃ 20 s,

72℃ 18 s,44 个循环;72℃ 延伸 10 min。

1.5 分析基因表达差异的方法

荧光定量 PCR 技术已被证明是一种有效的对初始模板中目的基因(DNA 和 RNA) 进行定量研究的有力工具^[1,2]。本试验中模板定量采用相对定量方法,即样本中靶基因相对于另一参照样本的量的

变化,试验采用标准曲线法的相对定量。在标准曲线法的相对定量中,由于量的变化是相对于某个参照物的量而言的,因此其标准曲线就比较容易制备,对于所用的标准品只要知道其相对稀释度即可。在整个试验中样本的靶序列的量来自于标准曲线,最终必须除以参照物的量,即参照物是1倍的样本,其它的样本为参照物量的 n 倍。由于持家基因在不同的生长发育阶段,以及不同的环境诱导下能够相对恒定地表达,因此,试验中选用3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)为内参基因。

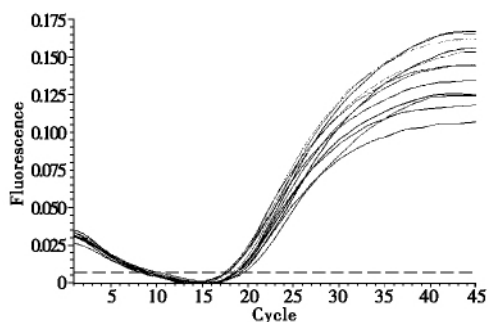


图1 小麦 GAPDH 的标准曲线图

Fig.1 Standard curve of wheat GAPDH

以接种叶锈菌后各时间点样品的反转录 cDNA 为模板,以 GAPDH 的引物和 SYBR 进行荧光定量检测,结果见图2。由于反转录效率及模板量的差异,

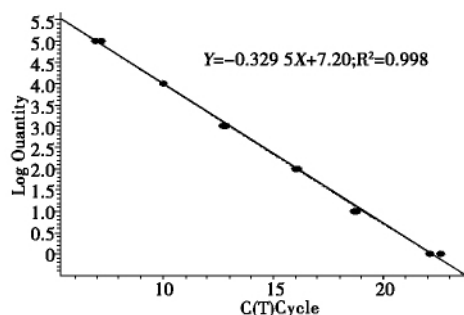
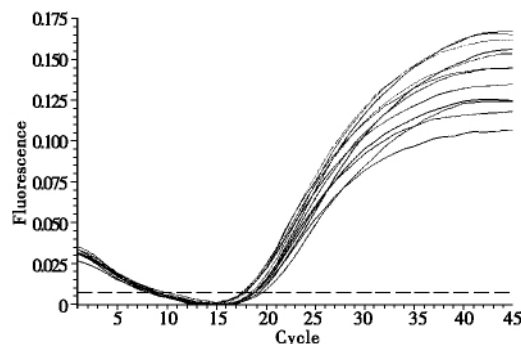


图2 小麦在接种后各时间点样品中 GAPDH 的表达情况

Fig.2 Express of GAPDH at the intervals after inoculation in wheat with *puccinia triticens*

2.2 小麦 CaM SF-1 的标准曲线制作及表达量分析

所作 CaM SF-1 标准曲线相关系数为 $R^2 = 0.991$,斜率为 $-0.281 8$,标准曲线的线性关系和可信度均达到要求。接菌后 0~24 h,亲和组合、非亲和组合与不接菌对照相比 CaM SF-1 表达量变化不大;从 24 h 开始,亲和组合、非亲和组合 CaM SF-1 表达量上升,48 h 达最大值,其中,非亲和组合 CaM SF-1 表达量比对照增加 232.9%,比亲和组合增加 24.6%;之后表达量下降,但仍高于对照和亲和组合(图3)。

2.3 小麦 CaM SF-2 的标准曲线制作及表达量分析

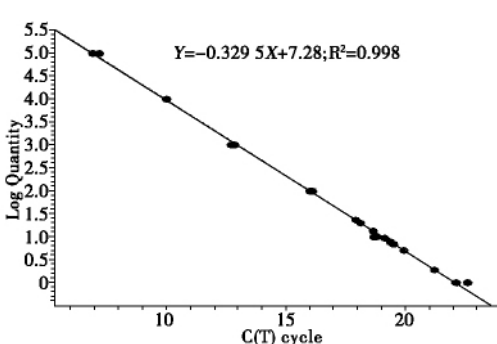
所作 CaM SF-2 标准曲线相关系数为 $R^2 =$

2 结果与分析

2.1 小麦 GAPDH 的标准曲线制作及表达量分析

以小麦的 GAPDH 为内参照,消除反转录效率及模板量的差异。首先制作小麦 GAPDH 的标准曲线,由图1可见,各稀释梯度 PCR 反应很好,重复性很高。相关系数为 $R^2 = 0.998$, $Y = -0.329 5X + 7.28$,说明所制作的标准曲线线性关系良好,斜率为 $-0.329 5$,说明标准曲线的可信度较高。

各时间点样品中 GAPDH 表达丰度并不完全一致,由此可见,用内参照基因对各样品进行标准化处理是非常必要的。



0.994,斜率为 $-0.328 8$,标准曲线的线性关系和可信度均达到要求。接种后 0~12 h,亲和组合、非亲和组合与不接菌对照相比 CaM SF-2 表达量变化不大;从 12 h 开始亲和、非亲和组合 CaM SF-2 表达量上升,到第 48 h 达到峰值,在这一过程中亲和组合 CaM SF-2 表达量上升的幅度最大,在第 48 h 时比对照增加 1018%,比非亲和组合增加 79%;之后表达量下降,但仍高于对照和非亲和组合(图4)。

2.4 小麦 CaM SF-3 的标准曲线制作及表达量分析

CaM SF-3 标准曲线相关系数为 $R^2 = 0.99$,斜率为 $-0.246 4$,标准曲线的线性关系和可信度均达到要求。接菌后 0 h 到 12 h,亲和组合、非亲和组合

及不接菌对照的 *CaM SF-3* 表达量变化趋势相近差异不大;从第 12 h 开始,亲和组合、非亲和组合中 *CaM SF-3* 表达量迅速上升,24 h 达到峰值,分别比对照高出 16.3% 和 19.8%;随后 3 个处理都呈现缓慢降,但亲和组合与非亲和组合下降幅小,在 48 h 仍分别比对照高出 27.3% 和 22.1%;第 48 h 开始亲和组合与非亲和组合的 *CaM SF-3* 表达量急速下降,而对照却开始反弹,至 72 h 时接菌处理的表达量明显低于对照;在第 96 h 时三者的 *CaM SF-3* 表达量相差不大(图 5)。

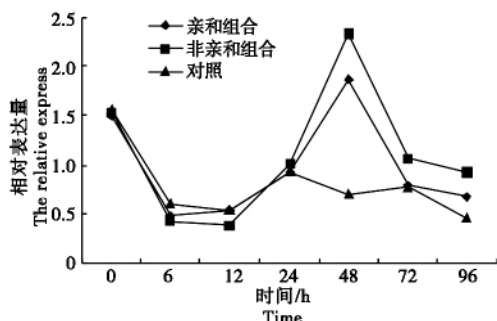


图 3 *CaM SF-1* 表达情况
Fig. 3 Express of *CaM SF-1*

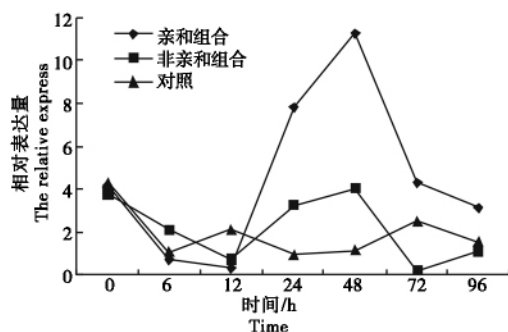


图 4 *CaM SF-2* 表达情况
Fig. 4 Express of *CaM SF-2*

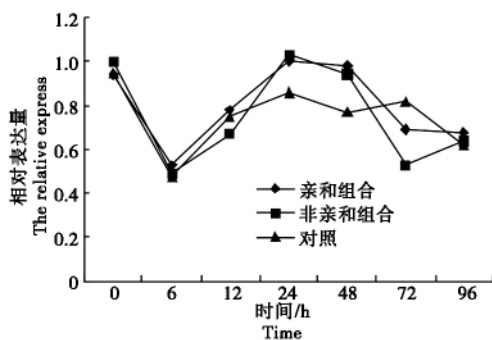


图 5 *CaM SF-3* 表达情况
Fig. 5 Express of *CaM SF-3*

2.5 小麦 *CaM SF-4* 的标准曲线制作及表达量分析

所作 *CaM SF-4* 标准曲线相关系数为 $R^2 = 0.99$,斜率为 -0.2464 ,标准曲线的线性关系和可信度均达到要求。接菌后 12 h 之前,亲和组合、非亲和组合的 *CaM SF-4* 表达量与对照相比差别不大;之后开始 *CaM SF-4* 表达量迅速上升,在第 24 h

时非亲和以及亲和组合表达量达到峰值,其中,非亲和组合的峰值最大,比对照高出 97.8%,比亲和组合高出 26.8%;从 24 h 开始非亲和组合表达量急剧下降,72 h 以后始终低于亲和组合及对照,但亲和组合中 *CaM SF-4* 表达量却高于对照和非亲和组合(图 6)。

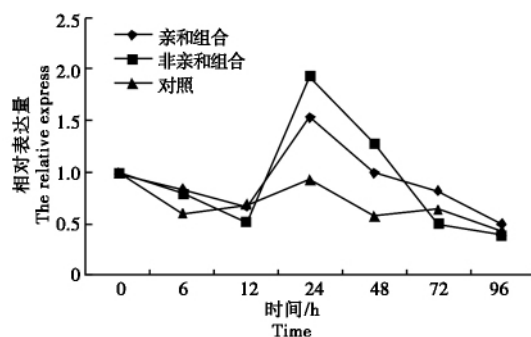


图 6 *CaM SF-4* 表达情况
Fig. 6 Express of *CaM SF-4*

2.6 小麦 *CaM* 的标准曲线制作及表达量分析

所作 *CaM* 标准曲线相关系数为 $R^2 = 0.995$,斜率为 -0.3295 ,标准曲线的线性关系和可信度均达到要求。从 0~6 h 亲和组合、非亲和组合以及对照中 *CaM* 表达量都是下降的,从第 6 h 开始对照中 *CaM* 表达量变化不大,而亲和组合和非亲和组合中 *CaM* 表达量从第 6 h 开始上升到第 24 h 达到峰值,之后表达量下降,在第 24 h 非亲和组合中 *CaM* 表达量比对照高出 89.5%,比亲和组合高出 18.1%;在第 48 h 非亲和组合中 *CaM* 表达量比对照高出 157.1%,比亲和组合高出 47.9%(图 7)。

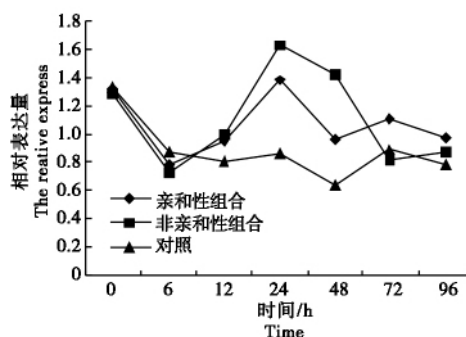


图 7 *CaM SF-4* 表达情况
Fig. 7 Express of *CaM SF-4*

3 讨论

钙调素(Calmodulin, *CaM*) 是一种高度保守的多功能 Ca^{2+} 结合蛋白,在介导 Ca^{2+} 信号转导途径中有重要作用。目前,已经发现 *CaM* 存在于所有已被研究过的真核生物之中。在同一植物中往往存在多种 *CaM* 亚型,各 *CaM* 亚型基因在植物各种组织中的表达存在特异性,并且在不同植物生长发育阶段及不

同的环境刺激条件下,各 CaM 亚型基因的表达也存在差异。Takezawa 等^[3]研究马铃薯 CaM 亚型时,采用 RNA 印迹(Northern blot)技术分析的结果表明,发育过程中不同器官中的 CaM 亚型基因的表达有差异。根尖中 *PCaM1*、*PCaM5*、*PCaM8* 表达最高,其次是芽,再次是根,叶中表达最低。Lee 等^[4]通过对大豆不同组织 RNA 印迹分析表明,*SCaM-1*、*SCaM-2* 表现出相同的表达水平,二者在所检测的组织器官中均有表达;*SCaM-3* 与 *SCaM-1*、*SCaM-2* 具有相似的表达模式,但是在胚轴尖端表达量较低;*SCaM-4* 在下胚轴尖端和伸长区有表达,但表达的量比 *SCaM-1* 低 5 倍,在成熟组织中二者表达相同,表达量均非常低,而在 *SCaM-1* 丰富表达的根中 *SCaM-4* 几乎不表达,这表明 *SCaM-1*、*SCaM-2* 和 *SCaM-3* 基因的转录调控可能相同,*SCaM-4* 则属于完全不同的转录调控。Ito 等^[5]从拟南芥基因文库中分离到 5 个 CaM 基因(*AtCAL1*、*AtCAL2*、*AtCAL3*、*AtCAL5*、*AtCAL6*)和 1 个 CaM 相关蛋白基因(*AtCAL4*),它们对机械刺激(触摸、风、雨)的反应不相同,在机械刺激条件下只有 *AtCAL4*、*AtCAL5* 的表达受诱导,而且这两种基因的表达存在组织特异性。另外,在马铃薯^[3]和花椰菜^[6]等植物中也发现了不同 CaM 亚型基因的组织特异性表达特性。Yang 等^[7,8]从小麦中鉴定了 10 个 CaM 基因,它们编码 4 类 CaM 亚型(*CaM SF1* ~ *CaM SF4*);在小麦发育过程中,不同亚型 CaM 基因的表达具有器官、组织和细胞特异性。最近,Duval 等^[9]从萌发豌豆种子中鉴定了 3 个 CaM 亚型(*PsCaM1* ~ *PsCaM3*),在种子萌发过程中 3 种基因具有不同的表达模式。

由此可见,以前人们研究也只是针对 CaM 不同亚型基因的表达有组织、器官和发育时期的特异性,以及对外界信号刺激反应的特异性等。而对于 CaM 参与植物抗病性具有亚型特异性,国内外还未报道。陈贵华等^[10]通过试验证实 Ca^{2+} ·CaM 系统调控甜菜抗氧化酶活性,降低活性氧含量,提高了甜菜抗丛根病的能力,说明 Ca^{2+} ·CaM 系统与甜菜抗丛根病密切相关。笔者曾从生理生化水平初步证明 Ca^{2+} ·CaM 系统参与小麦抗叶锈病^[11],而本研究又从分子水平上证实 CaM 参与小麦抗叶锈病反应,且具有亚型特异性。

在本试验中,小麦接菌后在前 12 h 内,CaM 的 4 个亚型基因表达量与不接菌对照相比相差不大。接菌后在 48、72、96 h 时,非亲和组合的 *CaM SF-1* 表达量高于亲和组合。接菌后 24、48 h 时,非亲和组

合 *CaM SF-4* 表达量高于亲和组合,而在 72 ~ 96 h 又低于亲和组合。可以看出,*CaM SF-1* 与 *CaM SF-4* 可能与小麦抗叶锈病相关。小麦接菌后 24 ~ 96 h 这一过程中,亲和组合 *CaM SF-2* 表达量都高于非亲和组合表达量,说明 *CaM SF-2* 可能与小麦感叶锈病相关。小麦接菌后 24 ~ 96 h,亲和组合 *CaM SF-3* 表达量与非亲和组合表达量相差不大,说明 *CaM SF-3* 可能与小麦抗叶锈病无关。小麦接菌后在第 24 h 和第 48 h 时,非亲和组合 *CaM* 表达量高于亲和组合,而在此之后又低于亲和组合,这说明 CaM 在参与小麦抗叶锈病过程中,第 24 h 和第 48 h 是小麦表现抗病性的关键时间点。CaM 不同亚型基因在转录水平上的差异表明,不同 CaM 亚型的启动子中可能存在不同的顺式调控元件,并且不同的 CaM 亚型介导各自特异的信号转导途径。

参考文献:

- [1] Bustin S A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems [J]. *J Mol Endocrinol* 2002 29: 23 - 39.
- [2] Dheda K, Huggett J F, Bustin S A, et al. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR [J]. *Biotechniques* 2004 37: 112 - 119.
- [3] Takezawa D, Liu Z H, An G, et al. Calmodulin gene family in potato: developmental and touch-induced expression of mRNA encoding a novel isoform [J]. *Plant Mol Biol*, 1995 27: 693 - 703.
- [4] Lee S H, Kim J C, Lee M S, et al. Identification of a novel divergent calmodulin isoform from soybean which has differential ability to activate calmodulin-dependent enzymes [J]. *J Biol Chem*, 1995 270(37): 21806 - 21812.
- [5] Ito T, Hirano M, Akama K, et al. Touch inducible genes for calmodulin and a calmodulin-related protein are located in tandem on a chromosome of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell Physiol*, 1995 36: 1369 - 1373.
- [6] Szymanski D B, Liao B, Zielinski R E. Calmodulin isoforms differentially enhance the binding of cauliflower nuclear proteins and recombinant TGA3 to a region derived from the *Arabidopsis CaM-3* promoter [J]. *Plant Cell*, 1996 8: 1069 - 1077.
- [7] Yang T, Segal G, Abbo S, et al. Characterization of the calmodulin gene family in wheat: structure, chromosomal location, and evolutionary aspects [J]. *Mol Gen Genet*, 1996 252: 684 - 694.
- [8] Yang T, Lev-Yadun S, Feldman M, et al. Developmentally regulated organ-, tissue-, and cell-specific expression of calmodulin genes in common wheat [J]. *Plant Mol Biol*, 1998 37: 109 - 120.
- [9] Duval F D, Renard M, Jaquinod M, et al. Differential expression and functional analysis of three calmodulin isoforms in germinating pea (*Pisum sativum* L.) seeds [J]. *Plant J* 2002 32: 484 - 493.
- [10] 陈贵华, 张少英, 李国龙, 等. Ca^{2+} ·CaM 系统与甜菜抗丛根病生理特性的关系 [J]. *华北农学报*, 2009, 24(5): 184 - 187.
- [11] 霍建飞, 宋水山, 李星, 等. Ca^{2+} ·CaM 信使系统参与小麦抗叶锈病反应的初步研究 [J]. *华北农学报*, 2008 23(增刊): 234 - 239.