

# 条锈菌诱导的小麦 EF 手钙离子绑定蛋白基因 *TaCab1* 的功能初步分析

冯浩, 黄雪玲, 王晓敏, 李华一, 康振生\*

(西北农林科技大学旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 植物保护学院, 杨凌 712100)

**摘要:**根据小麦 EF 手钙离子绑定蛋白 (*TaCab1*) 基因序列, 利用 WMD3 软件设计特异的人工 miRNA (amiRNA), 构建 VIGS 沉默载体。利用 amiRNA-VIGS 体系, 对小麦的 *TaCab1* 基因的功能进行了初步分析。利用 Northern blot 和实时定量 PCR 技术分别检测了 amiRNA 的积累及 *TaCab1* 的沉默效率, 并利用显微观察技术统计条锈菌感染小麦后的组织学差异。结果表明, amiRNA 可以得到有效的积累, 其靶标基因 *TaCab1* 可以得到有效的沉默。从表型上看, 小麦叶片上条锈菌夏孢子的产孢量也在一定程度上有所降低。组织学观察发现当 *TaCab1* 被沉默后, 寄主细胞的坏死面积在感染后期明显增大, 条锈菌的菌丝分枝数也明显增多, 但菌丝长度明显变短。

**关键词:**小麦; EF 手钙离子绑定蛋白; amiRNA; VIGS; 功能

**Preliminary analysis on the role of an EF-hand binding protein gene *TaCab1* in wheat leaves challenged with *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*** FENG Hao, HUANG Xue-ling, WANG Xiao-min, LI Hua-yi, KANG Zhen-sheng (State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas and College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

**Abstract:** Role of a calcium binding EF-hand protein gene *TaCab1* in the response of wheat to fungal infection was studied using a specific artificial miRNA (amiRNA). Corresponding amiRNA-VIGS vectors were constructed by the over-lap PCR method. Accumulation of amiRNA in leaves transformed with the amiRNA-VIGS vectors was detected by northern blot and the efficiency of the amiRNA in silencing the target *TaCab1* was evaluated by quantitative real-time PCR. Histological changes in wheat leaves challenged with stripe rust pathogen were analyzed by microscopic observation. It was shown that accumulation of amiRNA reduced the expression of *TaCab1* effectively in the transduced leaves. Along with some changes in histological characteristics, leaves expressing the amiRNA suppressed fungal sporulation but increased leaf necrosis. The growth of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* was changed, showing an increase in hyphal branches and a decrease in hyphal lengths.

**Keywords:** wheat; EF-hand binding protein; amiRNA; VIGS; function

中图分类号: S432.41

文献标识码: A

文章编号: 0412-0914(2013)05-0486-09

在植物的生长过程当中, 细胞之间存在着高效的信号传导途径, 用来感知、传递和应答多种内部和外部信号<sup>[1]</sup>。钙离子作为一种普遍存在的具有多种用途的信号因子, 在钙信号转导途径中起关键作用, 并参与植物激素及多种生物和非生物胁迫信

号的调节<sup>[2~4]</sup>。

在钙信号转导途径当中, 存在多种蛋白之间的协同互作。钙离子结合蛋白被认为是钙离子信号的受体, 能够检测细胞间和细胞质基质中钙离子浓度的变化<sup>[5~6]</sup>。大多数钙离子结合蛋白属于 EF

收稿日期: 2012-09-30; 修回日期: 2013-05-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(31071651); 国家 973 资助项目(2013CB127700); 高等学校学科创新引智计划项目(B07049)

通讯作者: 康振生, 教授, 主要从事小麦与条锈菌的互作研究; E-mail: kangzs@nwsuaf.edu.cn

第一作者: 冯浩, 男, 河北秦皇岛人, 博士研究生, 主要从事小麦与条锈菌的互作研究; E-mail: xiaosong04005@163.com。

手蛋白。EF 手蛋白具有一个螺旋-环-螺旋的基本模块结构,而这一 EF 手模块作为分子装置能够识别和传递特殊的钙离子信号。它通过由 12 或者 14 个氨基酸形成的环来结合钙离子<sup>[7]</sup>,进而改变模块构造与下游蛋白进行互作<sup>[8-10]</sup>,完成钙信号的传导。

目前,研究已经证明钙离子结合蛋白可以参与植物的防卫、衰老机制以及对多种环境逆境的应答反应。例如:将痢疾变形虫 EF 手钙离子结合蛋白基因转入番茄中,提高了植物的生长能力和对高盐胁迫的忍耐力<sup>[11]</sup>;水稻中 EFA27 基因编码的 EF 手模块,在营养组织中能够被脱落酸和渗透压诱导<sup>[12]</sup>。关于这种蛋白在植物对病原菌的抗性作用,几年来也有相关的报道。Jakobek 等<sup>[13]</sup>报道钙离子结合蛋白产物可能是导致过敏性坏死途径的重要因子。Beßer 等<sup>[14]</sup>的研究表明,当大麦用 SA 处理后,与对照相比 BCI-4 基因出现差异性表达,系统性提高了大麦抵抗白粉病菌的能力,增强了寄主的抗病性。Alejandro 等<sup>[15]</sup>发现菜豆 (*Phaseolus vulgaris*) 的 EF 手钙离子结合蛋白基因在炭疽菌 (*Colletotrichum lindemuthianum*) 侵染及温度胁迫等非生物胁迫下能够被显著诱导,认为此基因在植物对病菌和环境胁迫的反应中是综合信号的交汇点。然而,此类基因是否与寄主对病原菌的感病性有一定的关系,目前还未见报道。

由 *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* 引起的条锈病,是世界上世界范围内传播最广泛的严重病害。在病害流行年份,小麦的产量受到极大的影响甚至是颗粒无收。有研究证明培育和合理利用抗性品种是控制小麦条锈病最安全、最高效、最经济、最有效的方法<sup>[16]</sup>。了解小麦和条锈病的互作关系,对通过基因的合理利用来提高品种抗性是很关键的。在前期的实验基础上,我们从小麦品种水源 11 中克隆得到了一个钙离子结合 EF 蛋白基因 *TaCab1*<sup>[17]</sup>。研究发现,该蛋白同时定位在细胞质与质膜外围。在小麦与条锈菌的亲亲和反应中,*TaCab1* 显著上调,同时其表达趋势受到不同非生物胁迫的诱导,尤其是被不同浓度的  $\text{CaCl}_2$  处理之后,该基因的表达量发生显著变化。在此基础上,我们推断 *TaCab1* 通过钙离子信号转到途径参与了小麦与条锈菌的互作,尤其是在亲和反应中起着非常重要的作用。

为了阐明钙离子结合 EF 手蛋白在小麦与条锈菌互作中的作用,本实验通过设计特异的人工 miRNA,利用 amiRNA-VIGS 体系对 *TaCab1* 进行功能初步分析。该研究为植物与病原菌互作中钙离子通道的研究奠定了一定基础,也为进一步利用感病相关基因来优化小麦的遗传品质提供了信息。

## 1 材料与方法

### 1.1 引物设计与载体构建

使用 Primer Premier 5.0 软件在含有小麦 *miR159a* 前体序列的两侧设计特异引物,上下游引物分别含有 *Pac I* 和 *Not I* 限制性酶切位点。利用水源 11 基因组 DNA 作为模板进行 PCR 扩增。回收得到的片段连接到 T-simple 载体进行测序。利用人工 miRNA (amiRNA) 设计平台 (WMD3, <http://wmd3.weigelworld.org>),设计合适的 amiRNA (*amiCab*, *amiPDS*),利用 over-lap PCR 技术,将 amiRNA 构建到克隆得到的片段上,取代原来的成熟 miRNA。利用限制性内切酶,将改造好的片段切下来,连接到大麦花叶病毒 (BSMV) 的  $\gamma$  组件上,构建成  $\gamma$ -*amiCab* 及  $\gamma$ -*amiPDS*。构件载体所需引物见表 1。

### 1.2 病毒 RNA 的体外转录

按照试剂盒 (mMessage mMachine T7 in vitro transcription kit, Ambion, Austin, TX) 说明书,对 BSMV 3 个组件 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ),  $\gamma$ -*amiCab* 及 1 个参照基因  $\gamma$ -*amiPDS* 分别进行体外转录,转录产物稀释 3 倍,备用。

### 1.3 植物材料与接种

供试小麦 (*Triticum aestivum*) 品种水源 11 和小麦条锈菌 (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) 小种 (CYR23、CYR31) 均由西北农林科技大学植物病理研究所提供。水源 11 与 CYR23 构成非亲和反应,与 CYR31 构成亲和反应。将萌发春化两周后的小麦移栽到温室,温室条件控制在  $16 \pm 2^\circ\text{C}$ ,每天光照 16 h。待幼苗生长 3 周后进行病毒接种,接种方法参考 Wang 等<sup>[18]</sup>的方法。对照接种 FES 缓冲液。接种完毕后,在  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  条件下黑暗高湿度培养 48 h 之后恢复每天 16 h 光照,  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  条件下高湿度培养。接种 BSMV-*amiPDS* 的植株,接种

Table 1 Primer list for VIGS vectors construction

Gene name	Primer sequence (5'-3')
<i>tae-159a-A</i>	CCTTAATTAAGTTCTTGGTTTCCGCTTGTG
<i>tae-159a-B</i>	ATAAGAATGCGGCCGCTGGACCTTGGAGCATTTTCA
<i>PDS-I</i>	CGCTGTAATCGGTTTAGAGCAGTCACCATCTTGATCTACTGTCAAG
<i>PDS-II</i>	AGATGTAATCGGTTTAGAGCAGTCACCAGCGGTCAGCGAGGGATC
<i>PDS-III</i>	AGAGGCAGACTGCTCAAAAGCGATTATAAGGGTCTACCGGAAG
<i>PDS-IV</i>	CCCTTCAGACTGCTCAAAAGCGATTATCCTCTAAACCGAATCC
<i>Cab-I</i>	GCTGACGGGAAGGTTTCTACTATAACATCTTGATCTACTGTCAAG
<i>Cab-II</i>	GATGTATAGTAGAGAACCTTCCCGTCAGCGGTCAGCGAGGGATC
<i>Cab-III</i>	GAGGTATAGTAGAAAACCTTCTCGT AAGGGTCTACCGGAAG
<i>Cab-IV</i>	CCTTACGAGAAGGTTTTCTACTATAACCTCTAAACCGAATCC

8、10、12、14、16、18 和 20 d 后分别采样,用于筛选最高沉默效率。接种 BSMV-*amiCab13* d 后,用毛笔将新收集的条锈菌夏孢子 (CYR23、CYR31) 均匀接种到小麦的第 3 片叶子。对照接种无菌水。接种后,在  $16 \pm 2^\circ\text{C}$  条件下 100% 相对湿度黑暗保湿 24 h,之后转移至培养间,培养条件为  $16 \pm 2^\circ\text{C}$ ,每天光照 16 h。接种后 0、24、48 和 120 h 后分别采样,迅速放入液氮中速冻,保存到  $-80^\circ\text{C}$  备用。

#### 1.4 总 RNA 提取

利用 Trizol 试剂盒 (Invitrogen, USA) 提取小麦样品的总 RNA,然后用 DNA 酶 I 处理。通过聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 RNA 的完整性,并利用 Nano-Drop™ 1 000 核酸蛋白检测仪测定 RNA 的浓度。

#### 1.5 Northern blot 杂交

80  $\mu\text{g}$  提取的总 RNA 经过 15% 尿素 PAGE 变性胶电泳后,盐桥法转移到纤维素膜上。利用  $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ -ATP 标记的 *amiCab* DNA 探针 (5'-ACGAGAAGGTTTTCTACTATA-3') 进行杂交, *U6* 作为内参基因 (5'-TGCCTGTCATCCTTGCGCAGGGGCCATGCT-3')。具体步骤参考冯浩等<sup>[19]</sup>的方法。

#### 1.6 cDNA 合成与实时定量 PCR 分析

用 M-MLV 反转录酶 (Promega) 合成 cDNA 第一链。合成的 cDNA 模板稀释 10 倍后用于实时定量 PCR 分析。利用 Primer Premier 5.0 软件,根据 *TaCab1* (GenBank: GU984048) 和 *TaPDS* (Gen-

Bank: FJ517553) 全长 cDNA 序列设计特异引物 (Q-*Cab*-F: 5'-TGGTGTCAATCAAGCCTGGTATGT-3'; Q-*Cab*-R: 5'-ACTCATGGTGCATCTCAACGGACT-3'; Q-*PDS*-F: 5'-TGATGAAATCGCTGCTGACC-3'; Q-*PDS*-R: 5'-CCTGACAAAACCGCACCCCTC-3'), 以小麦延伸因子基因 (GenBank: M90077) 为内参基因设计引物 (Q-*EF*-F: 5'-TG-CATGGAAGTGATTCCGGGTGT-3'; Q-*EF*-R: 5'-GCAAGTGTCACGCATCTGGTC-3')。应用 CFX96™ Real Time System (Bio-Rad) 进行表达分析。反应体系及反应程序参考 Feng 等<sup>[19]</sup>的方法。利用比较 Ct 法对内参基因和目标基因的数据进行分析,以确定目标基因的相对表达量。

#### 1.7 组织学观察及数据分析

接种条锈菌后 24、48 和 120 h 采组织学样品。样品处理方法参考 Wang 等<sup>[20]</sup>的方法。利用奥林巴斯 BX-51 显微镜 (Olympus Corp. Tokyo) 观察透明叶片中的侵染点。每个处理随机选择 50 个侵染点。利用 DP-BSW 软件分析菌丝长度,菌丝分枝数以及坏死面积。利用 SPSS 软件进行统计学分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 最高沉默效率时间点筛选

为了更好地利用 *amiRNA*-VIGS 体系分析植物病原互作中的基因功能,筛选得到最高沉默效率的时间点是非常必要的。我们利用 *PDS* 这一内参基

因进行了筛选。接毒后第 8 天,即能够在第 3 片叶子观察到初始的光漂白现象,16 d 之后基本达到最明显(图 1)。为了更好地分析基因的沉默时间进程,我们利用 qRT-PCR 技术检测了小麦 PDS 基因的相对表达水平(图 2)。从结果可以看到,接毒后的第 8 天,基因已经可以被 *amiPDS* 所沉默,但这个时期的沉默效率还是相对较低,光漂白现象也不明显。接毒后 14 d,沉默效率达到最高值 79%。结合条锈菌本身的生物学特征,接种 6~24 h 是条锈菌侵染小麦的关键时期<sup>[20]</sup>,我们决定在接毒后 13 d 进行条锈菌接种来研究互作过程 *TaCab1* 的作用。

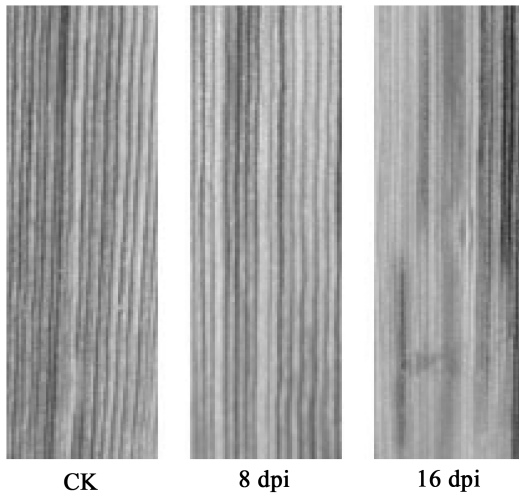


Fig. 1 The photobleaching of leaves as PDS was silenced

CK: leaves inoculated with FES buffer; 8 dpi: 8 days post inoculation of BSMV-PDS; 16 dpi: 16 days post inoculation of BSMV-PDS.

## 2.2 利用 amiRNA-VIGS 体系研究小麦与条锈菌互作过程中 *TaCab1* 的作用

*TaCab1* 是一个我们实验室前期从小麦品种水源 11 中克隆得到的一个基因。在前期的研究中发现,它能够被条锈菌毒性小种 CYR31 显著诱导上调<sup>[17]</sup>。在本实验中,利用 WMD3 软件设计了特异的人工 miRNA,利用 amiRNA-VIGS 体系进行了功能的初步分析。

2.2.1 *TaCab1* 沉默后小麦叶片接种条锈菌后的表型变化 接毒(BSMV- $\gamma$  和 BSMV-*amiRCab*) 10 d 后,可以在小麦的第 3 叶上看到轻微的退黄花斑

(图 3)。接种病毒并没有对小麦的正常生长造成过大的影响。根据沉默效率筛选结果,接毒 13 d 后接种小麦条锈菌 CYR23 和 CYR31。接菌后 14 d 可以看到,接种空病毒(BSMV- $\gamma$ )的植物与空白对照(FES buffer)没有显著差异,均构成了典型的亲和反应,说明接种病毒没有对条锈菌的侵染造成影响。与空病毒对照相比,当 *TaCab1* 沉默后(BSMV-*amiRCab*),接菌 CYR23 的小麦叶片表型无明显差异,均构成了典型的 HR 反应。而在接菌 CYR31 的小麦叶片上,条锈菌产孢量在一定程度上降低。我们推测该基因可能在小麦防御条锈菌侵染的过程中起负作用。

2.2.2 *amiCab* 有效积累验证 为了验证 *TaCab1* 是否被 *amiRCab* 特异性的沉默,根据 *amiRCab* 设计了 DNA 探针进行 Northern blot 杂交验证。从图 4 中可以看到,在接种 BSMV-*amiRCab* 的植株叶片中,*amiRCab* 可以从 159a 的前体上剪切并得到有效的积累。而空白对照中没有得到杂交信号。内参基因 *U6* 表达相对稳定。

2.2.3 *TaCab1* 的沉默效率分析 为了确定小麦 *TaCab1* 是否被有效的沉默,对接种 BSMV- $\gamma$  和 BSMV-*amiRCab* 的小麦植株分别接种条锈菌 CYR23 和 CYR31。我们提取了接菌 24, 48 和 120 h 的小麦植株叶片 RNA 进行反转录,并利用 qRT-PCR 技术检测了 *TaCab1* 的相对表达水平。如图 5 所示,相对于空病毒对照(BSMV- $\gamma$ )相比,在接菌 CYR23 的小麦叶片中,*TaCab1* 的表达分别降低了 66%, 73% 及 70%; 在接菌 CYR31 的叶片中相对表达量分别降低了 69%, 71% 及 65%。

2.2.4 组织学统计分析 为了更好地探究 *TaCab1* 在小麦与条锈菌互作中的作用,我们也观察了当该基因被沉默后小麦具体的组织学变化。在非亲和互作体系中,寄主的细胞坏死面积,条锈菌的分枝数及菌丝长度均未发生显著性变化(数据未显示)。而在亲和互作体系中,接菌后 120 h, *TaCab1* 基因被沉默的小麦叶片被条锈菌侵染后,其侵染点坏死面积显著大于对照( $P < 0.05$ ),条锈菌在寄主内的菌丝分枝数在接菌后 24 和 48 h 均明显大于对照( $P < 0.05$ ),而在接菌后 120 h,条锈菌的菌丝长度明显比对照短( $P < 0.05$ )(表 2,图 6)。这些结果与表型变化基本一致,说明该基因可能是一个感病相关基因。



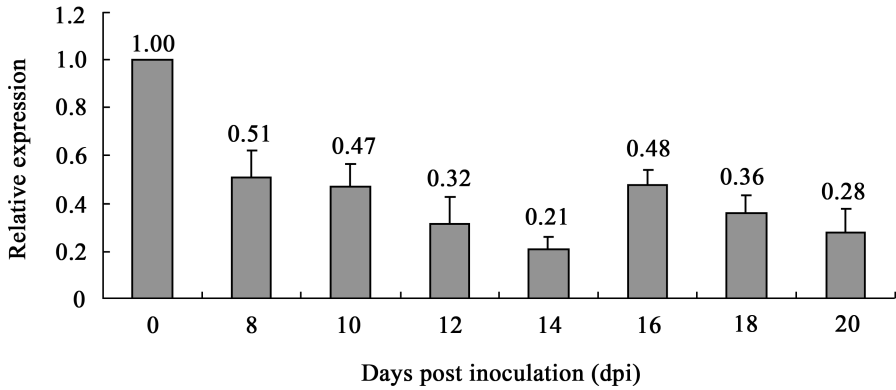


Fig. 2 Time-course analysis of suppression of PDS expression

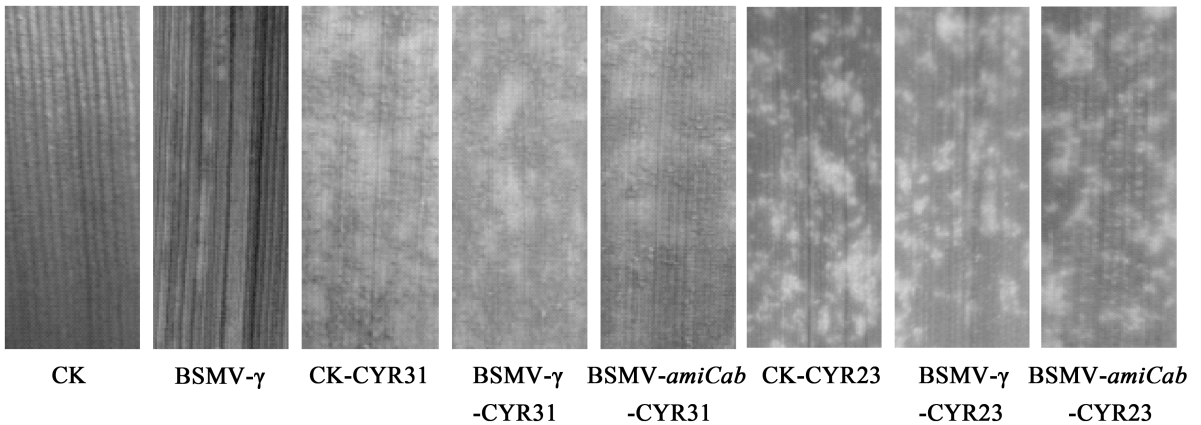


Fig. 3 Phenotype observation of wheat leaves that *TaCab1* were silenced by *amiCab*

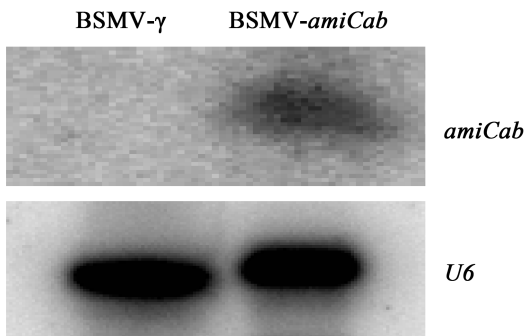


Fig. 4 Validation of *amiCab* in wheat leaves inoculated with BSMV-*amiRCab*

### 3 讨论

植物的生活环境非常复杂,暴露于大量的病原菌当中。而绝大多数病原菌只能侵染一定种类的

植物,我们称之为寄主。植物对于病原菌的抗病反应和感病反应是两个相对的概念,而长时间以来,人们往往都集中在挖掘抗病基因或者防卫基因上。早在1905年,第一个抗条锈病菌的基因就已经被报导<sup>[21]</sup>,直到2002年,Eckardt<sup>[22]</sup>提出一个问题,是不是病原菌需要植物存在某种基因从而使其顺利侵染呢?如果有的话,那么这一类基因被认为是感病基因。通常认为这类基因编码的蛋白是病原菌寄生在植物中所必需的或者是负调控植物防卫反应的。因此,感病基因功能的丧失可以导致植物抗病性的增强。2005年有研究发现,当Mlo基因失去功能后,寄主植物的抗病性得到了特异性的增强<sup>[23]</sup>。在此基础上,de Almeida Engler等<sup>[24]</sup>建议开发利用感病基因作为另外一类遗传育种手段。

在之前的实验当中,我们发现 *TaCab1* 这个基因和小麦对 *Pst* 的易感病程度是有一定联系的。

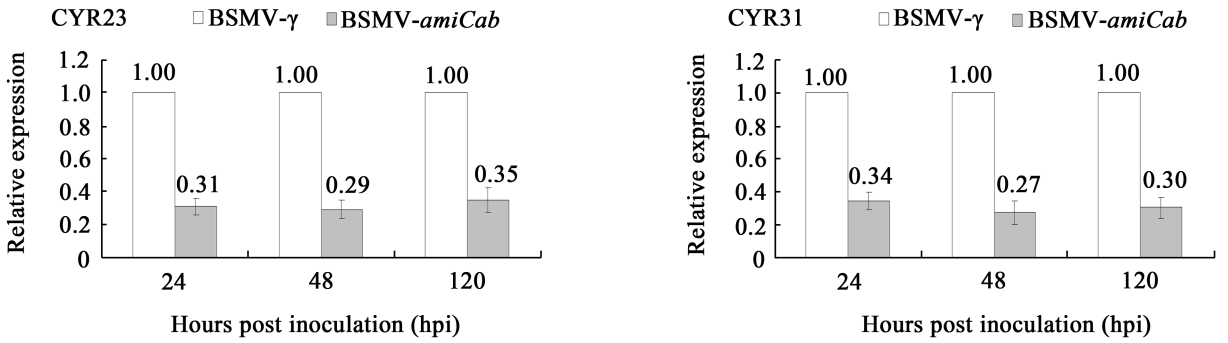


Fig. 5 Relative transcript levels of *TaCab1* in plants inoculated with BSMV-*amiRCab*

Table 2 Histological analysis during the compatible interaction between Suwon 11 and the strip rust fungus CYR31 after silencing *TaCab1*

Treatment	Necrotic area		Hyphal branche		Hyphal length		
	48 hpi	120 hpi	24 hpi	48 hpi	24 hpi	48 hpi	120 hpi
BSMV- $\gamma$	0.04 a	0.09 a	1.65 a	1.92 a	1.12 a	1.44 a	4.73 a
BSMV- <i>amiRCab</i>	0.07 a	0.41 b	2.16 b	2.40 b	1.18 a	1.33 a	2.63 b

Note: The second leaves were pre-infected with recombinant BSMV- $\gamma$  and BSMV-*amiRCab*, and then the fourth leaves were inoculated with *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* race CYR31. Average proportion of necrotic mesophyll cells calculated from 50 infection sites (unit in 1 000  $\mu\text{m}^2$ , measured by DP-BSW software), average number of hyphal branches calculated from 50 infection sites (unit in 100  $\mu\text{m}$ , measured by DP-BSW software), average distance from the base of substomatal vesicle to hyphal tip calculated from 50 infection sites. Analysis of significance was calculated according to the paired sample t-test method with SPSS software (b means  $P < 0.05$ ). hpi, hours post inoculation.

它在亲和反应中受到显著性诱导<sup>[17]</sup>。我们推测 *TaCab1* 可能是一个感病相关基因。为了验证这一假说,我们利用 amiRNA-VIGS 体系,设计特异 amiRNA 对该基因进行沉默。

为了确定靶标基因高效沉默的最佳时间,我们分别分析了小麦 PDS 基因在病毒侵染后不同天数的沉默效率。结果表明,当在小麦第 2 叶接种 BSMV-*amiPDS* 8 天后,在接毒幼苗的第 3 片叶子观察到光漂白表型,到第 16 天光漂白现象达到最明显。通过 qRT-PCR,发现在光漂白出现的 8 d 前靶基因就开始被沉默了,但是最高效的沉默发生在接种后的第 14 天,这和以前传统 BSMV-VIGS 的研究是一致的<sup>[25]</sup>。当 *TaCab1* 被 BSMV-*amiCab* 沉默后,小麦对条锈菌的反应型发生了变化,其叶片上条锈菌夏孢子数目相对减少,这也意味着该基因可能对于小麦对条锈菌的感病反应有一定作用。通过组织学观察发现,小麦的叶肉细胞坏死的区域扩大了,这种增强的 HR 反应可能是抑制菌丝延长

和抑制锈菌生长的原因。另外,菌丝的分支数变多了,但是在细胞间区域菌丝不能生长延伸,所以在锈菌生长的后期,更多的菌丝分支引起了更多的 HR 反应。这些结果表明 *TaCab1* 沉默后小麦对条锈菌的抗性有所增强。曾经有人对 *TaCab1* 的同源基因 *BCI-4* 做过研究,研究发现在受基因对基因调控的非亲和的大麦与白粉互作体系中,*BCI-4* 是不表达的<sup>[14]</sup>。本实验中,当 *TaCab1* 被沉默之后,寄主对小麦条锈病的抗性增强。从组织学分析我们可以得出一致的结果,在条锈菌侵染小麦的中后期,寄主的坏死面积、菌丝的分枝数及菌丝长度均出现显著性差异。这与一个大豆的钙离子绑定蛋白基因 *Hra32* 在亲和和非亲和反应中的作用是一致的<sup>[13]</sup>。

我们前期研究已经发现,*TaCab1* 能够受到外源激素的诱导,尤其被 SA 处理之后,其表达水平受到显著上调诱导。SA 是植物抵抗病原菌侵染过程中的一类非常关键的信号调节因子,植物可以通

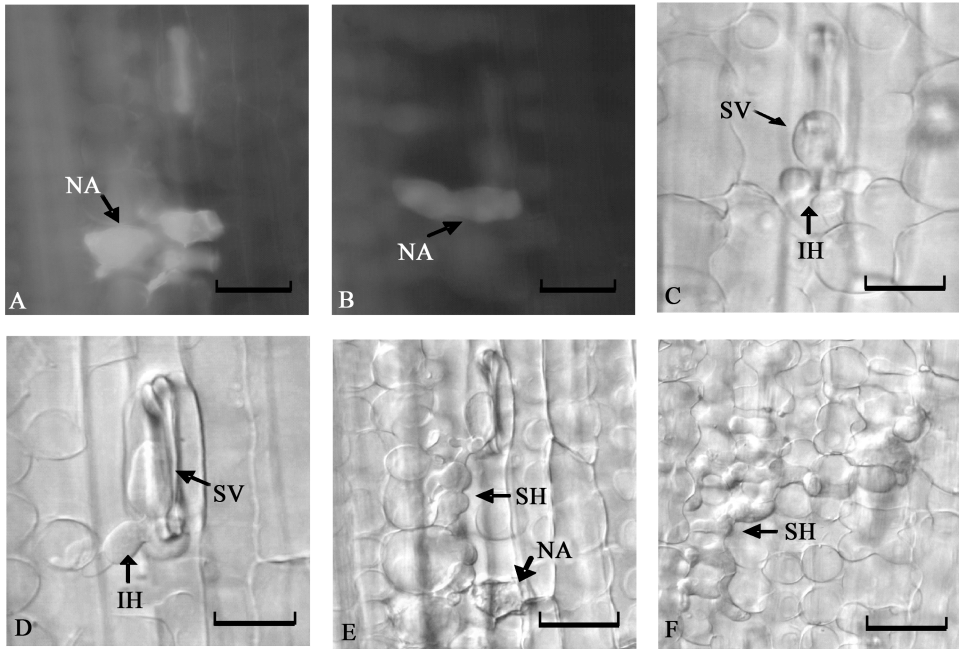


Fig. 6 Histological observation of wheat leaves treated with BSMV and infected with *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* avirulent race CYR31

Observation of necrotic area of host cell (A and B, at 120 hpi), hyphal branches (C and D, at 48 hpi) and hyphal length (E and F, at 120 hpi). IH, infection hypha; NA, necrotic area; SH, secondary hyphae; SV, substomatal vesicle. bar = 20  $\mu\text{m}$ . A, C and E for BSMV-*amiCab*; B, D and F for BSMV- $\gamma$ .

过 SA 信号途径提高对生物和非生物胁迫的抗性<sup>[26]</sup>。前期的报导证明 *TaCab1* 能够在小麦与条锈菌的亲和非亲和互作体系中均被诱导上调,在亲和互作中,该基因的诱导程度远远大于其在非亲和体系,认为 *TaCab1* 是个寄主感病相关基因。与此相似的是, *BAP1* 基因也能够被 SA 诱导,同时,该基因敲除之后增强了植物对细菌和卵菌的抗性,过表达之后提高了植物对卵菌的毒性菌株的感病性<sup>[27]</sup>。可见,SA 信号通路可以通过某些其他信号因子影响一些基因的表达来改变植物对病原菌的抗性。早在 1998 年, Kawano 等<sup>[28]</sup> 报导当烟草被 SA 处理后,细胞内的超氧阴离子水平迅速上升,随后钙离子浓度升高,表明 SA 的信号转到可能通过钙离子信使系统。同时, Kratsch 等<sup>[29]</sup> 发现 SA 能够诱导  $\text{H}_2\text{O}_2$  的积累,  $\text{H}_2\text{O}_2$  为能够作为信使物质,开启膜上钙离子通道,或通过促进胞内钙离子贮体释放钙离子,使细胞内钙离子浓度增大进而诱发蛋白质磷酸化与去磷酸化反应,从而启动一些列抗病相关的生理生化反应。基于此我们推测,

*TaCab1* 可能是通过负调控 SA 诱导的钙离子浓度变化来参与小麦与条锈菌的互作。

总之,我们验证了 *TaCab1* 在小麦与条锈菌互作中的作用,证明了该基因可能是一个感病相关基因,参与菌丝侵入或者寄主抗性途径的识别,但其具体功能还需要通过转基因技术进一步验证。本实验为进一步揭示钙信号转导通路在植物与病原菌互作中的分子机理具有重要意义,同时,为合理利用抗感病基因进行遗传育种奠定了一定基础。

### 参考文献

- [1] Sanders D, Brownlee C, Harper J. Communicating with calcium [J]. *Plant Cell*, 1999, 11: 691 - 706.
- [2] Reddy V, Reddy A. Proteomics of calcium-signaling components in plants [J]. *Phytochemistry*, 2004, 65: 1745 - 1776.
- [3] Knight H. Calcium signaling during abiotic stress in plants [J]. *International Review of Cytology*, 2000, 195: 269 - 324.

- [4] Bush D. Calcium regulation in plant cells and its role in signaling [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 1995, 46: 95–122.
- [5] Furuyama T, Dzelzkalns V. A novel calcium-binding protein is expressed in Brassica pistils and anthers late in flower development [J]. *Plant Molecular Biology*, 1999, 39: 729–737.
- [6] Ayasekaran K, Kim K, Vivekanandan M, *et al.* Novel calcium-binding GTPase (AtCBG) involved in ABA-mediated salt stress signaling in Arabidopsis [J]. *Plant Cell Report*, 2006, 25: 1255–1262.
- [7] Moncrief N, Kretsinger R, Goodman M. Evolution of EF-hand calcium-modulated proteins. I. Relationships based on amino acid sequences [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1990, 30: 522–562.
- [8] Kim J, Kim H. Functional analysis of a calcium-binding transcription factor involved in plant salt stress signaling [J]. *FEBS Letter*, 2006, 580: 5251–5256.
- [9] Capozzi F, Casadei F, Luchinat C. EF-hand protein dynamics and evolution of calcium signal transduction: an NMR view [J]. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2006, 11: 949–962.
- [10] Boonburapong B, Buaboocha T. Genome-wide identification and analyses of the rice calmodulin and related potential calcium sensor proteins [J]. *BMC Plant Biology*, 2007, 7: 4.
- [11] Pandey G, Reddy V, Reddy M, *et al.* Transgenic tobacco expressing *Entamoeba histolytica* calcium binding protein exhibits enhanced growth and tolerance to salt stress [J]. *Plant Science*, 2002, 162: 41–47.
- [12] Frandsen G, Müller-Uri F, Nielsen M, *et al.* Novel plant  $Ca^{2+}$ -binding protein expressed in response to abscisic acid and osmotic stress [J]. *Journal of Biology Chemistry*, 1996, 271: 343–348.
- [13] Jakobek J, Smith-Becker J, Lindgren P. A bean cDNA expressed during a hypersensitive reaction encodes a putative calcium-binding protein [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1999, 12: 712–719.
- [14] Beßer K, Jarosch B, Langen G, *et al.* Expression analysis of genes induced in barley after chemical activation reveals distinct disease resistance pathways [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2001, 1: 277–286.
- [15] Alejandro A, Melina D, Raul R, *et al.* A *Phaseolus vulgaris* EF-hand calcium-binding domain is induced early in the defense response against *Colletotrichum lindemuthianum* and by abiotic stress; Sequences shared between interacting partners [J]. *Physiology and Molecular Plant Pathology*, 2008, 72: 111–121.
- [16] Chen X. Epidemiology and control of stripe rust [*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*] on wheat [J]. *Canada Journal of Plant Pathology*, 2005, 27: 314–337.
- [17] Feng H, Wang X M, Sun Y F, *et al.* Cloning and characterization of a calcium binding EF-hand protein gene *TaCab1* from wheat and its expression in response to *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* and abiotic stresses [J]. *Molecular Biology Report*, 2011, 38: 3857–3866.
- [18] Wang X D, Wang X J, Feng H, *et al.* *TaMCA4*, a Novel Wheat Metacaspase Gene Functions in Programmed Cell Death Induced by the Fungal Pathogen *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2012, 25: 755–764.
- [19] Feng H, Zhang Q, Li H Y, *et al.* vsRNAs derived from the miRNA-generating sites of pri-tae-miR159a based on the BSMV system play positive roles in the wheat response to *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* through the regulation of *tae-Myb3* expression [J]. *Plant physiology and biochemistry*, DOI: 10.1016/j.plaphy.2013.04.008.
- [20] Wang C F, Huang L L, Buchenauer H, *et al.* Histochemical studies on the accumulation of reactive oxygen species ( $O_2^-$  and  $H_2O_2$ ) in the incompatible and compatible interaction of wheat : *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Physiology and Molecular Plant Pathology*, 2007, 71: 230–239.
- [21] Singh D P, Singh A. Disease and insect resistance in Plant [M]. USA: Science Publishers, 2005, 104.
- [22] Eckardt N A. Plant disease susceptibility genes [J]. *Plant Cell*, 2002, 14: 1983–1986.
- [23] Feechan A, Jermakow A M, Torregrosa L, *et al.* Identification of grapevine MLO gene candidates involved in susceptibility to powdery mildew [J].



- tional Plant Biology, 2008, 35: 1255 - 1266.
- [24] de Almeida Engler J, Favery B, Engler G, *et al.* Loss of susceptibility as an alternative for nematode resistance [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2005, 16: 112 - 117.
- [25] Scofield S R, Huang L, Brandt A S, *et al.* Development of a Virus-Induced Gene-Silencing System for Hexaploid Wheat and Its Use in Functional Analysis of the Lr21-Mediated Leaf Rust Resistance Pathway [J]. Plant Physiology, 2005, 138: 2165 - 2173.
- [26] Du L, Ali G, Simons K, *et al.* Ca<sup>2+</sup>/calmodulin regulates salicylic-acid-mediated plant immunity [J]. Nature, 2009, 457: 1154 - 1158.
- [27] Yang H, Li Y, Hua J. The C2 domain protein BAPI negatively regulates defense responses in Arabidopsis. Plant Journal, 2006, 48: 238 - 48.
- [28] Kawano T, Sahashi N, Takahashi K, *et al.* Salicylic acid induces extracellular superoxide generation followed by an increase in cytosolic calcium in tobacco suspension culture: the earliest events in salicylic acid signal transduction [J]. Plant Cell, 1998, 39: 721 - 730.
- [29] Kratsch H A, Wise R. The ultrastructure of chilling stress [J]. Plant Cell Environment, 2000, 23: 337 - 350.

责任编辑:张宗英

## 欢迎订阅《植物病理学报》

《植物病理学报》是中国植物病理学会主办的全国性学术刊物,“中国科技核心期刊”。主要刊登植物病理学各分支未经发表的专题评述、研究论文和研究简报等,以反映中国植物病理学的研究水平和发展方向,推动学术交流,促进研究成果的推广和应用。

本刊现已被英国农业与生物技术文摘(CAB)、联合国粮农组织 AGRIS 等收录。据《中国科技期刊引证报告》(2012 年版)统计结果,《植物病理学报》影响因子 0.836。荣获首届《中国学术期刊检索与评价数据规范》(CAJ-CD)执行优秀期刊奖和 2012 中国国际影响力优秀学术期刊奖。

本刊为双月刊,每期定价 30 元,全年 6 期共 180 元。

邮发代号:82-214。欢迎投稿,欢迎订阅。

编辑部地址:北京市海淀区圆明园西路 2 号 中国农业大学植保楼 406 室

邮编:100193

电话:(010) 6273 2364

E-mail:zwblxb@cau.edu.cn。