

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2012.00606

## 普通菜豆镰孢菌枯萎病抗病相关基因 *PvCaM1* 的克隆及表达

薛仁凤 朱振东 王晓鸣 王兰芬 武小菲 王述民\*

中国农业科学院作物科学研究所 / 农作物基因资源与基因改良国家重大科学工程, 北京 100081

**摘 要:** 钙调素蛋白(calmodulin, CaM)作为植物细胞内介导多种功能的  $\text{Ca}^{2+}$  结合蛋白, 在调节植物的生长发育和抗病性方面具有重要作用。利用普通菜豆(*Phaseolus vulgaris* L.)表达序列标签(EST)克隆了含有编码普通菜豆 *CaM* 基因的 cDNA 序列。序列分析表明, cDNA 片段长 713 bp, 命名为 *PvCaM1*, 具有一个 453 bp 的开放阅读框(ORF), GenBank 登录号为 JN418801, 该基因编码 150 个氨基酸, 预测蛋白质分子质量为 17.16 kD。蛋白质结构分析表明, *PvCaM1* 蛋白含有 4 个  $\text{Ca}^{2+}$  结合结构域(EF-hand)。同源分析结果显示, *PvCaM1* 基因与百脉根、西瓜的 *CaM* 基因亲缘关系最近, 分别达到 77%和 76%。荧光定量 PCR 分析表明, *PvCaM1* 基因受尖镰孢菌菜豆专化型 FOP-DM01 菌株诱导表达, 接种病原菌 96 h, 抗病品种 260205 根中 *PvCaM1* 基因的表达量达到最高, 而感病品种 BRB-130 达到最低, 260205 叶中 *PvCaM1* 基因的表达量均高于 BRB-130, 而且叶中的表达量高于根和茎中的表达量。*PvCaM1* 基因表达量也受外源植物激素脱落酸、茉莉酸甲酯和乙烯利诱导上调, 在根、茎、叶中均有不同程度的表达。本研究表明, *PvCaM1* 基因可能通过脱落酸、茉莉酸和乙烯等信号途径参与菜豆对 FOP-DM01 菌株的防御反应, 推测菜豆 *PvCaM1* 基因与镰孢菌枯萎病的抗病性有一定关联。

**关键词:** 普通菜豆; 镰孢菌枯萎病; *PvCaM1* 基因; 基因表达分析

## Cloning and Expression Analysis of Fusarium Wilt Resistance-Related Gene *PvCaM1* in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.)

XUE Ren-Feng, ZHU Zhen-Dong, WANG Xiao-Ming, WANG Lan-Fen, WU Xiao-Fei, and WANG Shu-Min\*

Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences / National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement, Beijing 100081 China

**Abstract:** Calmodulin (CaM) is a multifunctional  $\text{Ca}^{2+}$ -binding protein in plant cells. It plays important roles in regulating the growth, development and disease resistance in plants. A full-length cDNA sequence coding for CaM in common bean was cloned based on expressed sequence tags from common bean. Sequence analysis showed that the isolated fragment was 713 bp, it contained an open reading frame (ORF) of 453 bp encoding 150 amino acids with a theoretical molecular weight of 17.16 kD, designated *PvCaM1* (GenBank accession number JN418801). Online ScanProsite tool analysis showed that *PvCaM1* had four  $\text{Ca}^{2+}$ -binding domains with the function of combining with free  $\text{Ca}^{2+}$ . Homology analysis indicated that *PvCaM1* gene was similar to *CaM* genes in other plant species including *Lotus japonicus* (CAB63264.3), watermelon (BAI52955.1), Populus (ADC80735.1) and castor bean (XP\_002533357.1). Phylogenetic analysis based on the amino acids sequence of *PvCaM1* with other nine species showed that the protein encoded by this gene had the closest relationship with the CaM in *Lotus japonicus* and watermelon, the homology were 77% and 76%, respectively. Real time-PCR analysis indicated that the expression level of *PvCaM1* in the interactions between the resistant cultivars and *Fusarium* wilt pathogen FOP-DM01 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*) increased significantly and reached the peak at 96 h, however, the susceptible one touched the bottom under the same conditions. The expression level of *PvCaM1* in 260205 leaves was higher than that in BRB-130 at all different time points. *PvCaM1* expressed differently in the leaves, stems and roots, the expression level in leaves was higher than that in roots and stems. Transcriptional level of *PvCaM1* was up-regulated by exogenous abscisic acid, methyl jasmonate and ethephon, but not increased significantly by

本研究由国家现代农业产业技术体系建设项目(CARS-09)资助。

\* 通讯作者(Corresponding author): 王述民, E-mail: smwang@mail.caas.net.cn, Tel: 010-82108567

第一作者联系方式: E-mail: xuerf@yahoo.cn, Tel: 010-82109609

Received(收稿日期): 2011-09-22; Accepted(接受日期): 2011-12-19; Published online(网络出版日期): 2012-02-13.

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20120213.1108.020.html>

salicylic acid and 3-indoleacetic acid. These results suggested that *PvCaM1* is probably involved in the abscisic acid, jasmonic acid and ethylene-regulated resistant response pathways, but not closely related to the salicylic acid and 3-indoleacetic acid pathway. The study indicated that the function of *PvCaM1* should be closely related to the resistant response pathways against *Fusarium* wilt pathogen FOP-DM01 with involvement of abscisic acid, jasmonic acid and ethylene in common bean.

**Keywords:** Common bean; *Fusarium* wilt; *PvCaM1* gene; Expression analysis

菜豆镰孢菌枯萎病是由尖镰孢菌菜豆专化型 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*) 引起的危害维管束组织的重要土传病害。在世界范围内大部分菜豆种植地均发现该病原菌, 其中拉丁美洲、非洲和美国西部尤为严重, 造成巨大的经济损失<sup>[1-3]</sup>。实践证明, 选育和合理利用抗病品种是防治普通菜豆病害最安全、经济、有效的方法<sup>[4]</sup>。植物受生物胁迫和环境刺激过程中, 产生一系列防御反应机制。钙离子( $\text{Ca}^{2+}$ )、活性氧(ROS)、水杨酸(SA)、茉莉酸(JA)、乙烯(ET)等均是植物防御反应发生过程中重要信号分子, 是细胞应答外界刺激反应中重要的第二信使。钙调素(calmodulin, 简称 CaM) 是植物细胞内结合  $\text{Ca}^{2+}$  的小分子蛋白质, 不同来源的 CaM 在结构和功能上都具有很高的同源性, 说明 CaM 类蛋白具有决定功能的保守结构域, CaM 在传导生物反应信号过程中首先结合其识别的靶蛋白, 通过改变空间结构而改变生物活性以应答细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的变化, 从而调控生理代谢及基因表达<sup>[5]</sup>, 这些生物反应过程与  $\text{Ca}^{2+}$  介导的信号传导途径存在着功能上的密切联系。植物中存在多种 CaM 亚型(isoform), 它们编码相同或相似的蛋白, 不同亚型 CaM 基因的表达具有器官、组织和细胞特异性<sup>[6]</sup>, 这些蛋白都具有能够与  $\text{Ca}^{2+}$  结合的 EF-手型结构域(EF-hand)<sup>[7]</sup>。目前, 在苹果、藻类、苜蓿、拟南芥、马铃薯、大豆、小麦、玉米、豌豆、蚕豆、粟等植物中都克隆到不同 CaM 基因家族<sup>[6, 8-17]</sup>。Lee 等<sup>[12]</sup>从大豆中分离到 4 个 CaM 亚型; Duval 等<sup>[11]</sup>从豌豆种子中鉴定了 3 个 CaM 亚型, Ling 和 Assmann<sup>[13]</sup>从蚕豆中分离纯化 CaM 蛋白, 并对 CaM 在蚕豆不同组织中的分布情况做了研究, 但目前菜豆中还未见有 CaM 基因的报道。此外, CaM 具有多种生物学功能, 除了参与植物对病原菌的响应, 还参与植物本身的生长发育、对渗透胁迫、盐害、冻害等环境刺激的应答<sup>[18-19]</sup>。因此, 对 CaM 蛋白的深入研究为揭示和理解  $\text{Ca}^{2+}$  介导的植物抗病、抗逆机理奠定理论基础。

我们前期以普通菜豆感病品种 BRB-130 和抗病品种 260205 为材料构建了普通菜豆抗尖镰孢菌菜豆专化型 FOP-DM01 菌株的 cDNA-AFLP 差异表达文库, 从中获得了大量表达序列标签(EST), 经过测序、比对和信息注释, 获得一条与百脉根 CaM 基

因(AJ251808)相似性高达 77% 的 EST 序列。本研究以该 EST 序列为基础, 利用 RT-PCR 和 Race 技术, 克隆获得普通菜豆钙调素基因 cDNA 片段, 命名为 *PvCaM1*, 其开放阅读框长 453 bp (GenBank 登录号为 JN418801), 利用生物信息学方法分析 *PvCaM1* 的核苷酸序列及其编码蛋白质的结构特征, 采用实时荧光定量 PCR 技术揭示其在菜豆与枯萎病菌互作中不同时间点和不同器官中的诱导表达特征, 为明确 *PvCaM1* 在普通菜豆与枯萎病菌互作中的功能奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

普通菜豆(*Phaseolus vulgaris* L.) 品种 BRB-130 和 260205, 对 FOP-DM01 菌株分别表现感病和抗病, 接种病原菌 14 d 后, 前者植株 80% 以上表现出叶片枯萎、褪绿等发病症状, 后者叶片正常或只有轻微坏死症状。尖镰孢菌菜豆专化型 FOP-DM01 菌株 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*) 由本实验室保存。将菜豆种子播种于灭菌的营养土(黏土 蛭石, 1 3, V/V)中, 23~28℃ 温室条件下, 每日补充光照 12 h, 光照强度约  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 培养 7~10 d 的幼苗用于病原菌的接种。病原菌首先接种于含 PDA (potato dextrose agar) 培养基的培养皿(直径 9 cm)中, 25~28℃ 培养 7 d 备用。

### 1.2 接种体繁殖

将玉米粉与蛭石按 1 2 (V/V) 的比例制成混合物, 取 400 mL 混合物于 1 000 mL 三角瓶中, 121℃, 0.2 MPa 条件下 30 min, 灭菌 2 次。向玉米粉混合物中加入 50 mL 灭菌蒸馏水, 混合均匀后接入一皿病原菌, 25~28℃ 条件下培养 7~10 d, 每天摇晃三角瓶使病原菌生长均匀。

### 1.3 接种方法

将接种体与灭菌的营养土按照 1 10 的比例混合, 取 0.01 g 接种混合土悬浮于 1 mL 灭菌水, 用血球计数板计算接种混合土中病原菌的含量, 使接种终浓度达到  $5.0 \times 10^6 \text{ cfu g}^{-1}$ , 取 50  $\mu\text{L}$  悬浮液按 1 10、1 100 比例稀释后涂布于酸性 PDA 培养基(pH 5.0)上, 通过培养基上生长的菌落数目和相应的稀

释倍数计算每克接种土中含有病原菌的量,进一步验证血球计数板计算接种浓度的准确性。将7~10 d的菜豆幼苗移栽至上述接种混合土中,实验条件不变,分别在接种后24、48、72、96和120 h的根部以及24、72和120 h的茎和叶取样,用于检测 *PvCaM1* 基因在不同器官中的表达量,以移栽于未接种病原菌混合土相应时间点的菜豆根、茎、叶为对照。参照 Brendan 等<sup>[20]</sup>和 Leon-Reyes 等<sup>[21]</sup>的方法用  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  吲哚乙酸(IAA)、 $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  脱落酸(ABA)、 $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  茉莉酸甲酯(MeJA)、 $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  水杨酸(SA)、0.01% (W/V) 乙烯利(ETH)浸泡生长7~10 d的菜豆 BRB-130 的根组织2~3 min,将处理后的菜豆幼苗移栽至灭菌营养土中,分别在处理后0、3、6、12、24、48和96 h从根部取样,以分别浸泡于0.001% (W/V) 乙醇溶液和0.015% (V/V) Silwet L77的菜豆根为对照。将剪取的样品迅速置液氮中,  $-80^{\circ}\text{C}$  保存备用。

#### 1.4 总 RNA 的提取与 cDNA 合成

采用 Trizol 试剂(TianGen, China)提取处理和对照各时间点样品的总 RNA,按照 Reverse Transcriptase System 试剂盒(Promega, USA)操作说明书合成第一链 cDNA,反转录引物采用 Oligo d(T)15。

#### 1.5 *PvCaM1* 基因的克隆

从本实验室构建的 cDNA-AFLP 差异表达文库中获得的一条 EST 序列 CBFi59, 片段长 187 bp, 位于 *PvCaM1* 基因开放阅读框(ORF)第 236~422 位,不具有完整的 5'末端和 3'末端序列。以此为模板设计基因特异引物进行 3'cDNA 末端快速扩增(3'-Full RACE Kit, TaKaRa, Japan), 使用 5'-Full RACE Kit (TaKaRa, Japan)克隆 *PvCaM1* 基因的 5'末端 cDNA 序列。基因特异引物 3'-GSP1 (5'-TGAGTCCTGAGT AACGTCTTCG-3')和 3'-GSP2 (5'-ACGTCTTCGAT CAGAACCGC-3')作为上游引物,试剂盒中的 3'RACE Outer Primer 和 3'RACE Inner Primer 作为下游引物。3'-GSP1 用于 3'末端的第一轮 PCR 扩增, 3'-GSP2 用于第二轮 PCR 扩增。将 3'RACE 获得的序列送上海生工生物工程有限公司测序,将得到的序列与原有的 EST 序列拼接。根据拼接序列设计引物 5'-GSP1 (5'-AGTGATGAATGGATTCGGAT-3')和 5'-GSP2 (5'-AACAGAGTAATGAAGGAAGA-3'), 以菜豆根组织所提 RNA 反转录的 cDNA 为模板,进行 5'cDNA 末端的快速扩增,PCR 程序为  $94^{\circ}\text{C}$  3 min;  $94^{\circ}\text{C}$  30 s,  $53^{\circ}\text{C}$  30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  1 min, 30 个循环;  $72^{\circ}\text{C}$  延

伸 10 min。将回收的 PCR 产物克隆至 pDM18-T 载体(TaKaRa, Japan), 送上海生工生物工程有限公司测序,将扩增序列与已知序列拼接,获得含有完整开放阅读框的 cDNA 序列,根据预测的开放阅读框,设计引物 CAM1 (5'-ATGGAGGCGGTGGAGCTGAA-3')和 CAM2 (5'-TTAACCAAGACCAGAGAATC-3'), 采用相同的 PCR 程序获得完整的 *PvCaM1* 基因开放阅读框序列,将回收的 PCR 产物克隆至 pDM18-T 载体,送上海生工生物工程有限公司测序。

#### 1.6 *PvCaM1* 序列分析

利用 NCBI 中 Blastn 程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)、氨基酸序列翻译工具(<http://au.expasy.org/tools/dna.html>)、蛋白质理化参数计算工具(<http://expasy.org/tools/protparam.html>)、蛋白质一级结构分析工具(<http://www.expasy.org/tools/scanprosite/>)、信号肽预测工具 SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)、蛋白质跨膜结构域预测工具(<http://gen-ome.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)、蛋白质疏水结构预测工具(<http://us.expasy.org/tools/protscale.html>)、二级结构预测工具(<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>)、三级结构预测工具([http://swissmodel.expasy.org/workspace/index.php?func=modelling\\_imple1](http://swissmodel.expasy.org/workspace/index.php?func=modelling_imple1))等在线软件对 *PvCaM1* 进行序列分析。根据推测的 *PvCaM1* 氨基酸序列,利用 ClustalX 1.83 和 MEGA4.0 软件分别进行氨基酸序列同源性比对和进化树分析。

#### 1.7 实时荧光定量 PCR 分析基因表达量

根据 *PvCaM1* 的 cDNA 序列设计定量 PCR 引物(F: 5'-ACGTCTTCGATCAGAACCGC-3'; R: 5'-GTC CACTTTCACGATCATCT-3')。以普通菜豆的 *Actin* 基因作为内参,扩增引物(F: 5'-GAAGTTCTCTTC CAACCATCC-3'; R: 5'-TTTCCTTGCTCATTCTGT CCG-3')。用 SuperReal PreMix (SYBR Green, Tian-Gen, China)荧光定量 PCR 试剂和 ABI PRISM7300 实时定量 PCR 仪以各个取样点的 cDNA 为模板进行 *PvCaM1* 基因的 Real-time PCR 分析。反应体系与程序参照试剂说明。反应结束后分析荧光值变化曲线和融解曲线,以 PCR 产物电泳确认扩增产物特异性。采用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法分析数据,确定基因的相对表达量。每个取样点设 3 个重复,在同一个批次完成内参基因和目标基因的 PCR 反应,试验重复 3 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 *PvCaM1* 基因的克隆和序列分析

利用 RT-PCR 和 RACE 技术克隆到一条长为



713 bp 的 cDNA 片段, 并命名为 *PvCaM1*。经 ORF finder 预测, 该片段具有一个完整的开放阅读框。利用 CAM1 和 CAM2 引物扩增得到一个完整的普通菜豆 *CaM* 基因开放阅读框序列。结果显示, 该 cDNA 片段第 208~660 个核苷酸组成 *PvCaM1* 基因的开放阅读框, 长 453 bp, 编码 150 个氨基酸组成的蛋白质(图 1)。

```

-207                                CGCGGATCCACAGCC
-192 TACTGATGATCAGTCGATGGAACTTCATAAAACCTAATAATGGTAAC
-144 AAATCAGAGGCGCTCTCCCTCTCAATTGGAACCATCAGCTTCATCTCCA
-96 CCAAGTTCCGTTATTATTATCAGAAATAGAAATTAATCGATCAGTTAGTT
-48 AGTGAATTAACATAATTGATAGATTAATTCTAAGAGTAGGTAACGATA
1  ATGGAGGCGGTGGAGCTGAAGCGCGTGTTCGAGATGTCGATCGGAAC
   M E A V E L K R V F E M F D R N
49  GGTGATGGCCGAATATCGGTGGAGGAGCTCAGAGATTGGTGAAT
   G D G R I S V E E L R D S L V N
97  ATGGGATAGAGATTCGGGAGAGGAGCTGGCGGATATGATCCAGAGG
   M G I E I P E K E L A D M I Q R
145 ATGACGTCACACGCGCAGCGGTGGGTGGATATGGAGGAGTTGGGGAG
   I D V N G D G C V D M E E F G E
193 CTCTACGAGTCGATAATGAGGAGCGCAGAGGAGGAGGACATGCTG
   L Y E S I M E E R D E E E D M L
241 GAGGCCCTTAACGTCTTCGATCAGAACCGCGACGGCTTCATCTCGGTG
   E A F N V F D Q N R D G F I S V
289 GACGAGCTCCGACCGGTGCTCGCTCCCTGGGCTCCACGAGGGGAGG
   D E L R T V L A S L G L H Q G R
337 AGCCTGGAGGAGTGCCCGAAGATGATCGTGAAAGTGACATTGACGGC
   S L E E C R K M I V K V D I D G
385 GATGGCATGTGTAACATAAGGAATTCAGGCAATGATGAAGAGTGA
   D G M V N Y K E F R Q M M K S G
433 GGATTCTCTGGTCTTGGT7AATCTTCTCATTACTCTGTGA
   G F S G L G
481 TTTGGAATCTCTTAAGAAAATATAACATCCTTCCAATTTTTCATCC
529 GAATCCATTTCATCACTTGAATAAGTTTCTCTTCTAGGATATTGAT
577 TTCTTTGATTCATGATTTTGTGTGAGGTTTTTGTTCATGTTAGGTT
625 TTAATGAACTCTGTTAAATGGTAAATTTTCATATATTTGTATATAA
673 AAAAAAAAAACCTATAGTGAAATCACTAGTGGAGGATCCGCG
  
```

图1 *PvCaM1* 的核苷酸序列及其推测的氨基酸序列

Fig. 1 Analysis of nucleotide and predicted amino acid sequences of *PvCaM1*

粗斜体字示起始密码子、终止密码子; 阴影部分为 EF-hand 结构域; 矩形代表酪蛋白激酶 II 的磷酸化位点; 下画线表示 N 端十四酰基化位点。

Initiation and the stop codons of *PvCaM1* are shown by bold and italic letters. Shadow regions are EF-hand domains. Rectangles indicate Casein kinase II phosphorylation site. N-myristoylation sites are underlined.

## 2.2 *PvCaM1* 编码蛋白质序列的分析

*PvCaM1* 所编码蛋白质的预测分子量为 17.16 kD, 理论 pI 值为 4.27, 含有 4 个 EF-hand 保守结构域, 分别在 14 至 25 位、50 至 61 位、88 至 98 位和 125 至 136 位氨基酸, 每个 EF-hand 内都有  $\text{Ca}^{2+}$  结合位点。蛋白质结构预测结果表明, 该蛋白不含跨膜区, 无明显的疏水结构域, 无信号肽序列, 不属于分泌蛋白。*PvCaM1* 的氨基酸序列与百脉根(CAB-63264.3)、西瓜(BAI52955.1)、胡杨(ADC80735.1)、蓖麻(XP\_002533357.1)等植物的 *CaM* 基因所编码蛋白质的氨基酸序列均具有较高的相似性, 二级结构预测表明 *PvCaM1* 含有 8 个  $\alpha$ -螺旋结构, 其余为

Loop 结构, 不具有  $\beta$ -折叠结构, 三级结构预测结果显示 *PvCaM1* 主要是以  $\alpha$ -螺旋结构为主,  $\alpha$ -螺旋之间以 Loop 相连。系统进化树分析结果表明(图 2), *PvCaM1* 与百脉根的 *CaM* 基因的亲缘关系最近, 达到 77%, 与西瓜次之, 达到 76%。目前在大豆、豌豆等豆类作物中都克隆了不同 *CaM* 基因家族<sup>[11-12]</sup>, 但在普通菜豆中尚无 *CaM* 基因的报道。

## 2.3 *PvCaM1* 基因的诱导表达分析

### 2.3.1 病原菌诱导 *PvCaM1* 基因表达分析

在菜豆与尖镰孢菌菜豆专化型 FOP-DM01 菌株互作的过程中, 接种后 24 h 抗病品种 260205 根中 *PvCaM1* 表达量上调至 1.5 倍, 显著高于感病品种 BRB-130; *PvCaM1* 在 48 和 72 h 表达受到抑制, 在 BRB-130 和 260205 中表达量均下调; BRB-130 在 96 h 表达量达到最低, 而在 260205 中的表达量却迅速升高, 达到对照的 3 倍左右, 之后表达量有所下降, 约为 1.5 倍, 但仍显著高于 BRB-130 中的表达量(图 3-A); 在接种病原菌后的各时间点, *PvCaM1* 在抗病品种 260205 叶中的表达量均高于感病品种 BRB-130, 其中在 96 h 达到最高, 上调约 6.5 倍, 而在 BRB-130 叶中的表达量在各时间点上上调均在 2 倍以下(图 3-B), 结果表明, *PvCaM1* 基因的转录表达受 FOP-DM01 菌株的诱导。

### 2.3.2 外源激素诱导 *PvCaM1* 基因表达分析

利用不同外源激素处理 BRB-130 菜豆根, 荧光定量 PCR 分析结果表明(图 4), 乙烯利处理 48 h 前, *PvCaM1* 表达量无明显的变化, 48 h 表达量迅速上升至最大值, 上调约 5 倍, 随后 96 h 急剧下降; 茉莉酸甲酯处理 12 h 使其表达量迅速上升, 达到 4 倍左右, 之后迅速下降, 96 h 再次迅速升高, 达到 5 倍左右; 脱落酸处理仅 3 h, 其表达量就达到最大值, 上调约 6.8 倍, 此后各时间点 *PvCaM1* 的表达量一直维持在较低的水平, 直到 48 h 再次迅速上升, 达到 4.8 倍。水杨酸和吲哚乙酸处理后, 所有时间点的表达量均无显著变化, 表明 *PvCaM1* 基因可能通过茉莉酸、乙烯和脱落酸介导的信号传导途径诱导菜豆的防御反应, 而水杨酸和吲哚乙酸可能并非是 *PvCaM1* 基因参与调节的防御反应中关键的信号分子。

### 2.3.3 *PvCaM1* 基因组织表达分析

采用荧光定量 PCR 技术分析表明, 该基因在根、茎、叶中均有不同程度的表达(图 5), 抗病品种 260205 只是在 72 h 根中的表达量略低于 BRB-130, 其余样品中的表达量均高于感病品种 BRB-130, 其中 *PvCaM1* 基因在叶中表达量最高, 差异也最显著。

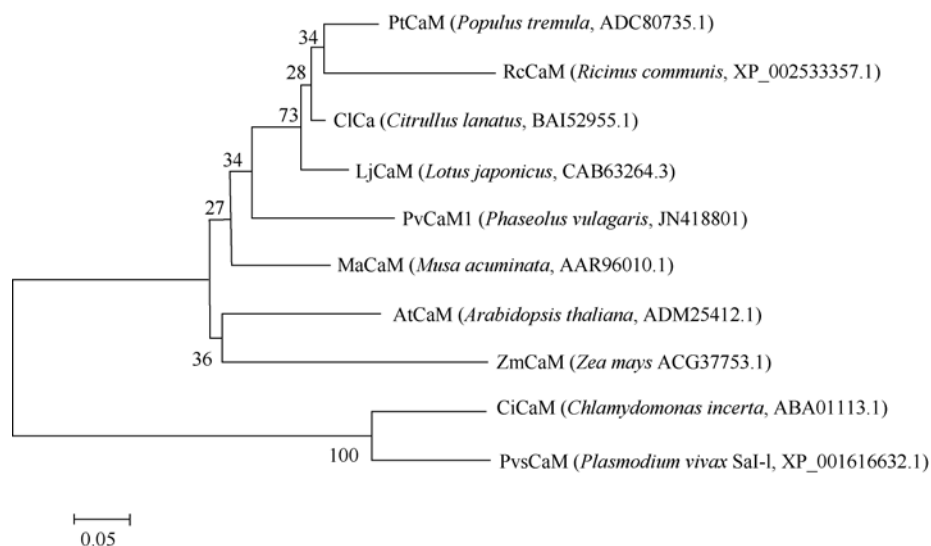


图 2 *PvCaM1* 蛋白质与 9 个其他来源的 *CaM* 的进化关系分析

Fig. 2 Phylogenesis of *PvCaM1* protein and 9 *CaM* from other species

进化树分支处的数字代表 Bootstrap 值(重复抽样次数为 500)。直线标尺代表 5% 序列差异。  
Numbers on branch nodes are bootstrap values (500 resamplings). Bar represents 5% sequence divergence.

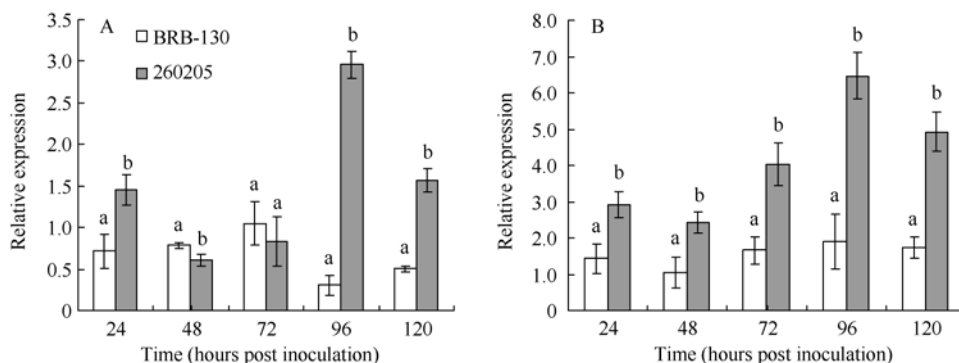


图 3 *PvCaM1* 在菜豆与 FOP-DM01 菌株互作中不同时间点的表达

Fig. 3 Expression level of *PvCaM1* in interaction between beans and FOP-DM01 at different times post inoculation

A: *PvCaM1* 在根中的表达; B: *PvCaM1* 在叶中的表达; 不同字母代表 BRB-130 与 260205 之间的表达水平差异显著 ( $P < 0.05$ ).  
A: expression degree of *PvCaM1* in roots; B: expression degree of *PvCaM1* in leaves; different letters above bars indicate a significant difference of expression ( $P < 0.05$ ) between BRB-130 plants and 260205 plants.

### 3 讨论

*CaM* 是植物细胞内高度保守的  $\text{Ca}^{2+}$  结合蛋白, 是植物细胞中  $\text{Ca}^{2+}$  介导的信号传导途径中的主要组分, 它通过结合并调控许多下游蛋白的活性或功能来调节细胞的生理功能, 如蛋白激酶,  $\text{Ca}^{2+}$  通道等<sup>[22-23]</sup>。不同的研究者已经从多种植物中分离或克隆出 *CaM* 基因, 植物中的 *CaM* 存在多种亚型, 不同 *CaM* 亚型分别介导不同生物功能的信号传导途径, 从而使得 *CaM* 在生物体复杂多样的代谢途径中发挥重要的作用<sup>[6,8-17]</sup>。为研究普通菜豆镰孢菌枯萎病抗病相关基因, 本研究从普通菜豆中分离出 1 个与菜豆抗病性相关的 *CaM* 基因, 该基因编码的蛋白

质具有 4 个完整  $\text{Ca}^{2+}$  结合域, 相对于已经鉴定或克隆到的不同来源的 *CaM* 基因在核苷酸和氨基酸水平上都有较大的差异, 因此可以确定为一个新的 *CaM* 基因, 定名为 *PvCaM1*。

病原与寄主互作过程中植物 *CaM* 基因都可以被诱导表达。例如大豆细菌性斑点病原菌(*Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*)诱导大豆 *SCaM-4* 和 *SCaM-5* 基因表达<sup>[24]</sup>。烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV)侵染烟草叶片后可引起 *NtCaM1*、*NtCaM2* 和 *NtCaM13* 基因的表达上调, 同时诱导 PR-1 和 PR-3 等防御基因的表达<sup>[25]</sup>。小麦受叶锈病菌侵染过程中, 钙调素 *TaCaM2-3*、*TaCaM 4-1*、*CaMSF-1* 和 *CaMSF-4* 表达量明显上调, 可能

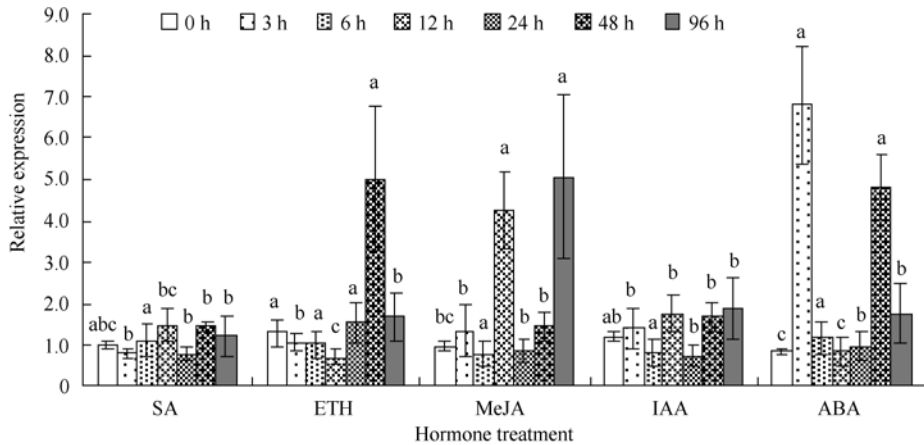


图4 不同外源激素诱导普通菜豆根中 *PvCaM1* 基因表达水平分析

Fig. 4 Expression analysis of *PvCaM1* in roots of common bean induced by different hormones in vitro

SA: 水杨酸; ETH: 乙烯利; MeJA: 茉莉酸甲酯; IAA: 吲哚乙酸; ABA: 脱落酸; 不同字母代表不同激素处理后的表达水平差异显著 ( $P < 0.05$ )。

SA: salicylic acid; ETH: ethephon; MeJA: methyl jasmonate; IAA: 3-indoleacetic acid; ABA: abscisic acid; different letters above bars indicate a significant difference of expression ( $P < 0.05$ ) after treatments by different hormones.

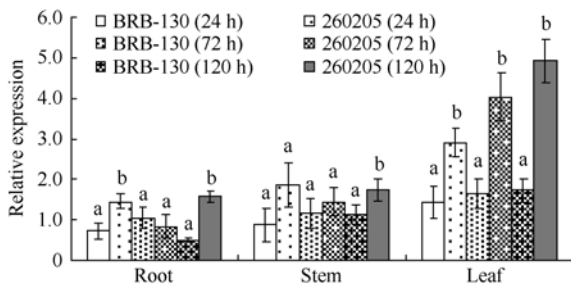


图5 *PvCaM1* 在普通菜豆不同器官中表达水平

Fig. 5 Transcription level of *PvCaM1* in different organs of common bean

不同字母代表 BRB-130 与 260205 之间的表达水平差异显著 ( $P < 0.05$ )。  
Different letters above bars indicate a significant difference of expression ( $P < 0.05$ ) between BRB-130 plants and 260205 plants.

参与了小麦抗叶锈病相关应答途径<sup>[26]</sup>, *TaCaM5* 亚型则是与小麦抗条锈病菌相关的基因<sup>[27]</sup>。玉米在大斑病菌产生的 HT 毒素胁迫下, *CaM* 基因参与了玉米的防卫应答反应<sup>[17]</sup>。Herman 等<sup>[28]</sup>利用绿色荧光蛋白 (green fluorescence protein, GFP) 技术研究了枯萎病菌在甜瓜中的侵染过程, 抗病反应大约在第 3 天被激发, 即病菌侵入根部, 通过皮层, 试图到达木质部时被激发。本研究表明, 病原菌侵染 96 h 后, 诱导寄主产生的抗病反应最强烈, 研究结果与甜瓜相似, 因此推测 *PvCaM1* 参与了细胞内由  $Ca^{2+}$  介导的抗病反应, 细胞内  $Ca^{2+}$  可能是枯萎病抗病途径中很重要的信号分子。植物的系统获得抗性 (systemic acquired reaction, SAR) 是植物体抵抗外界病原物侵染非常重要的抗病机制, 主要通过水杨酸或茉莉酸、乙烯、脱落酸等激素信号分子介导抗病信号在

抗病途径中的传导<sup>[29-32]</sup>。*CaM* 是介导植物细胞内多种信号传导途径的重要分子, 本研究中 *PvCaM1* 对茉莉酸甲酯、乙烯利和脱落酸均有明显的响应, 可能参与了茉莉酸、乙烯和脱落酸介导的抗病相关反应。

植物 *CaM* 基因的表达具有组织和各种发育时期的特异性。*CaM* 广泛地分布于几乎所有已知的真核生物中, 但在不同组织、器官和原生质体中, 或不同的生长期, 含量都不同, 分布也存在差异<sup>[12,15,33-34]</sup>。研究表明, 大豆<sup>[12]</sup>、马铃薯<sup>[15]</sup>和小麦<sup>[33]</sup>发育过程中不同器官 *CaM* 基因的表达有差异。黄花梨 *CaM* 基因在子房和幼果中大量表达, 表达的部位主要集中在果皮、果肉、胚珠、维管束、细胞间隙及胞间层, 可能与果实钙的增加有一定关系<sup>[34]</sup>。本研究表明 *PvCaM1* 在普通菜豆根、茎、叶中均有表达, 表达量在叶部最高, 茎部和根部较低, 抗、感品种间有很明显的差异, 叶部差异最显著, 因此推测在菜豆受 FOP-DM01 菌株侵染的过程中叶部发生的抗病反应可能比根和茎更强烈<sup>[20]</sup>。

本研究结果表明, *PvCaM1* 基因的表达能够被尖镰孢菌菜豆专化型 FOP-DM01 菌株显著诱导, 作为普通菜豆细胞内  $Ca^{2+}$  信号转导的重要信使, *PvCaM1* 基因可能具有十分重要的功能, 关于其在菜豆与病原菌的互作中如何发挥抵抗病原菌侵染的功能, 我们将通过转基因技术和 RNAi 技术进一步验证。

## 4 结论

从普通菜豆中克隆出一个编码钙调素蛋白的基因, 命名为 *PvCaM1*。*PvCaM1* 蛋白是在普通菜豆中

首次报道的植物钙调素蛋白。*PvCaM1* 基因能够被尖镰孢菌菜豆专化型 FOP-DM01 菌株诱导表达, 而且在不同器官中表达量不同, 叶片中的表达量显著高于茎和根中的表达量, 推测 *PvCaM1* 参与调控菜豆抗枯萎病的抗性反应。*PvCaM1* 受枯萎病菌诱导表达, 不依赖水杨酸和吲哚乙酸介导的信号通路, 可能通过茉莉酸、乙烯和脱落酸等信号途径参与了防御反应。

## References

- [1] Buruchara R A, Camacho L. Common bean reaction to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, the cause of severe vascular wilt in Central Africa. *J Phytopathol*, 2000, 148: 39–45
- [2] Pastor C, Abawi G S. Reactions of selected bean germplasm to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Plant Dis*, 1987, 71: 990–993
- [3] Salgado M O, Schwartz H F, Brick M A. Inheritance of resistance to a Colorado race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in common beans. *Plant Dis*, 1995, 79: 279–281
- [4] Miklas P N, Kelly J D, Beebe S E, Blair M W. Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: from classical to MAS breeding. *Euphytica*, 2006, 147: 105–131
- [5] Zielinski R E. Calmodulin and calmodulin-binding proteins in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 1998, 49: 697–725
- [6] Yang T, Segal G, Abbo S, Feldman M, Fromm H. Characterization of the calmodulin gene family in wheat: structure, chromosomal location, and evolutionary aspects. *Mol Gen Genet*, 1996, 252: 684–694
- [7] Snedden W A, Fromm H. Calmodulin, calmodulin-related proteins and plant responses to the environment. *Trends Plant Sci*, 1998, 3: 299–304
- [8] Barnett M J, Long S R. Nucleotide sequence of an alfalfa calmodulin cDNA. *Nucl Acids Res*, 1990, 18: 3395
- [9] Chandra A, Thungapathra M, Upadhyaya K C. Molecular cloning and characterization of a calmodulin gene from *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Biochem Biotachnol*, 1994, 3: 31–35
- [10] Chye M L, Liu C M, Tan C T. A cDNA clone encoding Brassica calmodulin. *Plant Mol Biol*, 1995, 27: 419–423
- [11] Duval F D, Renard M, Jaquinod M, Biou V, Montrichard F, Macherel D. Differential expression and functional analysis of three calmodulin isoforms in germinating pea (*Pisum sativum* L.) seeds. *Plant J*, 2002, 32: 481–493
- [12] Lee S H, Kim J C, Lee M S, Heo W D, Seo H Y, Yoon H W, Hong J C, Lee S Y, Bahk J D, Hwang I. Identification of a novel divergent calmodulin isoform from soybean which has differential ability to activate calmodulin-dependent enzymes. *J Biol Chem*, 1995, 270: 21806–21812
- [13] Ling V, Assmann S M. Cellular distribution of calmodulin and calmodulin-binding proteins in *Vicia faba* L. *Plant Physiol*, 1992, 100: 970–978
- [14] Nath M, Goel A, Taj G, Kumar A. Molecular cloning and comparative in silico analysis of calmodulin genes from cereals and millets for understanding the mechanism of differential calcium accumulation. *J Prot Bioinform*, 2010, 3: 294–301
- [15] Takezawa D, Liu Z H, An G, Poovaiah B W. Calmodulin gene family in potato: developmental and touch-induced expression of the mRNA encoding a novel isoform. *Plant Mol Biol*, 1995, 27: 693–703
- [16] Watillon B, Kettmann R, Boxus P, Burny A. Cloning and characterization of an apple (*Malus domestica* L. Borkh) calmodulin gene. *Plant Sci*, 1992, 82: 201–212
- [17] Wang Y-H(王艳辉), Jia H(贾慧), Si H-L(司贺龙), Ma J-F(马继芳), Hao H-F(郝会芳), Dong J-G(董金皋). Change of calmodulin in corn leaf cell with different resistant genes under stress of HT-toxin from *Exserohilum turcicum*. *J Hebei Agric Univ* (河北农业大学学报), 2007, 30: 4–7 (in Chinese with English abstract)
- [18] Hong Bo S, Li Ye C, Ming A S. Calcium as a versatile plant signal transducer under soil water stress. *Bioessays*, 2008, 30: 634–641
- [19] Zhu J K. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 2002, 53: 247–273
- [20] Kidd B N, Kadoo N Y, Dombrecht B, Tekeo Lu M, Gardiner D M, Thatcher L F, Aitken E A B, Schenk P, Manners J, Kazan K. Auxin signaling and transport promote susceptibility to the root infecting fungal pathogen *Fusarium oxysporum* in *Arabidopsis*. *Mol Plant Microbe Interact*, 2011, 24: 733–748
- [21] Leon-Reyes A, Du Y, Koornneef A, Proietti S, Körbes A P, Memelink J, Pieterse C M J, Ritsema T. Ethylene signaling renders the jasmonate response of *Arabidopsis* insensitive to future suppression by salicylic acid. *Mol Plant Microbe Interact*, 2010, 23(2): 187–197
- [22] Kim M C, Chung W S, Yun D J, Cho M J. Calcium and calmodulin-mediated regulation of gene expression in plants. *Mol Plant*, 2009, 2: 13–21
- [23] Wang Q, Chen B, Liu P, Zheng M, Wang Y, Cui S, Sun D, Fang X, Liu C M, Lucas W J. Calmodulin binds to extracellular sites on the plasma membrane of plant cells and elicits a rise in intracellular calcium concentration. *J Biol Chem*, 2009, 284: 12000–12007
- [24] Heo W D, Lee S H, Kim M C, Kim J C, Chung W S, Chun H J, Lee K J, Park C Y, Park H C, Choi J Y. Involvement of specific calmodulin isoforms in salicylic acid-independent activation of plant disease resistance responses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 766–771
- [25] Yamakawa H, Mitsuhashi I, Ito N, Seo S, Kamada H, Ohashi Y. Transcriptionally and post-transcriptionally regulated response of 13 calmodulin genes to tobacco mosaic virus-induced cell death and wounding in tobacco plant. *Eur J Biochem*, 2001, 268: 3916–3929
- [26] Huo J-F(霍建飞), Song S-S(宋水山), Li X(李星), Yang W-X(杨文香), Liu D-Q(刘大群). Research on CaM and its isoform genes involved in the resistance response of wheat to *Puccinia trititica*. *Acta Agron Boreali-Sin* (华北农学报), 2010, 25(4): 175–179 (in Chinese with English abstract)
- [27] Liu X-Y(刘新颖), Wang X-J(王晓杰), Xue J(薛杰), Xia N(夏宁),



- Deng L(邓麟), Cai G-L(蔡高磊), Tang C-L(汤春蕾), Wei G-R(魏国荣), Huang L-L(黄丽丽), Kang Z-S(康振生). Cloning and expression analysis of a novel calmodulin isoform TaCaM5 from wheat. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2010, 36(6): 953–960 (in Chinese with English abstract)
- [28] Herman R, Zvirin Z, Kovalski I, Freeman S, Denisov Y, Zuri G, Katzir N, Perl-Treves R, Pitrat M. Characterization of *Fusarium* race 1, 2 resistance in melon and mapping of a major QTL for this trait near a fruit netting locus. In: Pitrat M ed. The IXth EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Cucurbitaceae. Avignon (France): INRA. Centre de Recherche d'Avignon. Unité Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes, Montfavet, 2008. pp 149–156
- [29] Berrocal-Lobo M, Molina A. *Arabidopsis* defense response against *Fusarium oxysporum*. *Trends Plant Sci*, 2008, 13: 145–150
- [30] Kazan K, Manners J M. Jasmonate signaling: toward an integrated view. *Plant Physiol*, 2008, 146: 1459–1468
- [31] Koornneef A, Pieterse C M J. Cross talk in defense signaling. *Plant Physiol*, 2008, 146: 839–844
- [32] Lorenzo O, Solano R. Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Curr Opin Plant Biol*, 2005, 8: 532–540
- [33] Yang T, Lev-Yadun S, Feldman M, Fromm H. Developmentally regulated organ-, tissue-, and cell-specific expression of calmodulin genes in common wheat. *Plant Mol Biol*, 1998, 37: 109–120
- [34] Yue H-L(岳海林), Deng X-X(邓秀新), Peng S-A(彭抒昂). Expression of calmodulin mRNAs in ovaries and fruitlets of pear. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2008, 41(1): 176–181 (in Chinese with English abstract)

## 科学出版社生物分社新书推介

### 《图解微生物实验指南》

J. P. 哈雷 著

定价: 65 元

出版时间: 2012 年 1 月

书号: 978-7-03-033147-2

本书中的实验均用于说明和演示普通微生物学的基本原理, 涵盖了微生物学学科概论及其分支。本书的特色在于有很多引人入胜的图片和独立的习题, 适合不同大专院校的师生使用。本书分为十一个部分, 分别为显微镜技术、细菌形态和染色、基础实验室培养技术、细菌的生化活性、快速多参数检测系统、未知微生物鉴定、影响微生物生长的环境因子、环境和食品微生物、精选真核微生物概述、微生物遗传学和基因组学、科学调查。每个实验均包括安全注意事项、实验材料、学习目标、原理、实验步骤, 以及提示与警告和复习题, 旨在培养学生的实验操作技能和实验思考技能。本书适用于大专院校生命科学领域微生物学专业的师生参考使用。



获取更多图书信息请您关注: <http://www.lifescience.com.cn/>

欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书

联系人: 科学出版社科学销售中心 周文宇 E-mail: [zhouwenyu@mail.sciencepress.com](mailto:zhouwenyu@mail.sciencepress.com)

联系电话: 010-64022646 010-64017321

网上订购: <http://shop.sciencepress.cn> 卓越网 当当网 京东图书 学士书店

更多精彩图书请登陆网站, 欢迎致电索要书目