

马尾松钙调素基因的克隆及响应松材 线虫感染的表达特征

徐亮^{1,2}, 刘振宇^{3*}, 吕全², 梁军², 张星耀^{2*}

(1. 北京林业大学林学院, 北京 100083; 2. 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 北京 100091;
3. 山东农业大学植物保护学院, 山东 泰安 271018)

摘要: 松材线虫病是由松材线虫 (*Bursaphelenchus xylophilus*) 感染引起的严重病害, 引起重大的经济和生态损失。钙调素 (CaM) 是真核生物中 Ca^{2+} 主要传导蛋白, 本研究采用 RT-PCR 方法, 首次从马尾松中克隆获得 *CaM*, 命名为 *pmCaM*, 并检测了其响应松材线虫感染的表达特征。序列分析表明: *pmCaM* 完整的开放阅读框核苷酸序列为 450 bp, 编码 149 个氨基酸的蛋白质; 该蛋白含有 4 个 EF-hand 结构域, 具有钙调素的典型特征, 与其它植物的 CaM 蛋白均有较高同源性。实时荧光定量 PCR 分析显示: 接种松材线虫后 30 ~ 180 min 时间段, 马尾松苗根、茎、叶器官中的 *pmCaM* 均下调表达, 但不同器官间显著下调表达的时间点存在差异; 同时, 不同器官 *pmCaM* 表达量变化均存在特异的随时间发展的波动特征, 其中发现, 根茎 *pmCaM* 在松材线虫接种 45 min 时均处于表达量高峰。本研究结果显示 *pmCaM* 表达响应了松材线虫感染, 揭示 *pmCaM* 可能参与了调控松材线虫-马尾松互作早期的钙信号响应。

关键词: 松材线虫病; 马尾松; 松材线虫; *pmCaM*; 克隆表达

中图分类号: S791.248

文献标识码: A

Cloning and Expression Characteristics of *Pinus massoniana pmCaM* Response to *Bursaphelenchus xylophilus* Infection

XU Liang^{1,2}, LIU Zhen-yu³, LU Quan², LIANG Jun², ZHANG Xing-yao²

(1. College of Forestry, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 2. Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; 3. College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, Shandong, China)

Abstract: Pine wilt disease (PWD) caused by the pine wood nematode (PWN), *Bursaphelenchus xylophilus*, is believed to be the most destructive disease of pine species, causing significant economic and ecological losses around the world. Calmodulin (CaM) is a major calcium-binding messenger protein expressed in all eukaryotic cells. A cDNA sequence of *CaM* was cloned from Masson pine (*P. massoniana*) by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) methods, and named as *pmCaM*. And the *pmCaM* expression characteristics response to pine wood nematode infection was checked by real-time fluorescent quantitative PCR. The sequence analysis showed that the *pmCaM* consisted of an opening reading frame of 450 bp, encoded a protein of 149 aa containing four EF-hand domains and having the typical features of calmodulin. The comparison analysis showed that *pmCaM* shared high homology with CaMs from other plants. Real-time PCR analysis showed that 30 ~ 180 min post-PWD inoculation, *pmCaM* genes in root, stem and leaf of pine seedling were all down-regulated expression, but the times for significantly

收稿日期: 2013-08-10

基金项目: 国家林业局公益性行业专项(200904061、201204501)

作者简介: 徐亮, 男, 在读博士。主要研究方向: 森林病理学。电话: 15210508538, E-mail: xuliang19824@163.com

* 通讯作者: 张星耀, 博士, 研究员。主要研究方向: 森林病理学。E-mail: zhangxingyao@126.com; 刘振宇, 博士, 教授。Email: cosmos-liuchina@gmail.com

down-regulated expression of *pmCaM* were difference among different organs; specific fluctuate characteristics of *pmCaM* expression amount along with time development were appeared in root, stem and leaf, and the *pmCaM* expression amount peaked in root and stem 45 min post-PWD inoculation. This study showed that the expression of *pmCaM* was response to PWD infection, and inferred that the *pmCaM* in pine may play an important role in the regulation of calcium signal response early interaction between pine wood nematode with Masson pine.

Key words: Pine wilt disease; *Pinus massoniana*; *Bursaphelenchus xylophilus*; *pmCaM*; cloning; expressin

松材线虫病是由松材线虫 (*Bursaphelenchus xylophilus*) 侵染引起的松树树种的最具破坏性的病害, 在全球范围内造成了严重的经济、生态损失。松材线虫病在日本每年造成 1 000 000 m³ 松树死亡^[1], 在韩国截至到 2005 年大约 7 811 ha 的松树遭到毁灭^[2], 在中国造成的经济损失达到 4 亿美元^[3]。

松材线虫病是复杂的病害系统, 其致病机理一直存在争议^[4]。钙调素 (calmodulin, CaM) 响应病原物侵染并引起植物的抗感病反应, 是病原物致病机理研究中的重要内容。越来越多数据直接或间接地揭示了 CaM 响应病原侵染, 可启动植物防卫反应^[5-10]。研究发现, 松材线虫侵染早期, 松树质外体钙库内流和胞内钙库释放导致胞质内游离钙离子浓度升高, 薄壁细胞中游离 Ca²⁺ 浓度变化随松材线虫病病程的发展具有“低-高-低-高”的特征, 进而诱导基因表达^[11]。Ca²⁺ 作为胞内重要的第二信使, 在植物防御反应信号转导中具有重要作用^[12]。Ca²⁺ 的主要传感蛋白之一为 CaM, 存在于所有真核生物中。CaM 结合 Ca²⁺ 后可发生构象变化, 并与下游蛋白质相互作用, 而调节细胞的活动^[13]。

马尾松 (*Pinus massoniana* Lamb.) 是中国主要松树树种之一, 分布广泛, 并且大多数马尾松是以纯林的形式存在; 过去的 30 年里, 松材线虫病迅速蔓延, 马尾松树种因对松材线虫病高度敏感而遭到严重破坏^[3], 因此, 研究马尾松松材线虫病的致病机理, 对于防控该病害具有重要意义。马尾松是否具有 CaM, 马尾松 CaM 是否响应松材线虫侵染, 目前尚未见报道。本研究从马尾松中克隆了 *CaM*, 并采用实时荧光定量 PCR 技术检测其在松材线虫侵染早期的表达特征, 以期揭示马尾松 *CaM* 对松材线虫的响应特征。本研究有利于对 CaM 是否参与调控松材线虫侵染早期的钙信号传递的探索, 并对揭示松材线虫病早期发病机制具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

健康半年生马尾松苗栽培于多菌灵消毒的营养

土(草炭:珍珠岩:蛭石 = 6:1:2, V/V/V) 中, 置 28℃ 恒温箱内, 光照 16 h · d⁻¹, 光照强度 20 000 lx, 相对湿度 80%, 适应生长 1 个月后, 用于松材线虫的接种。

接种松材线虫虫株 BXY61 为强致病力, 张星耀实验室保存虫株。虫株首先接种于长满灰葡萄孢的 PDA 培养基中, 25℃ 培养 7 d 备用。

1.2 接种与取材

线虫接种, 将前端剪切成斜面的 10 μL 枪头插进健康的半年生马尾松苗顶梢; 向插好的枪头注入 10 μL 的松材线虫虫株 BXY61 悬浮液, 含线虫 2 000 条。将接种后的松苗置于人工气候培养箱(温度为 28℃, 光照 16 h · d⁻¹, 光照强度 20 000 lx, 相对湿度 80%) 培养; 每 1.5 h 向接种枪头补加 10 μL 无菌水保湿, 共补加 2 次。

分别在松材线虫接种后 30 min、45 min、60 min、90 min 和 180 min 进行马尾松苗根、茎和叶部位取样, 以相同时间点取材的无菌水接种样品做对照。将获得的样品迅速置液氮中, -80℃ 保存备用。

1.3 马尾松 CaM 的克隆

取健康马尾松植株的茎干组织, 采用 RNeasy plant mini kit (QIAGEN) 提取总 RNA; 采用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳以及 GeneQuant (GeneQuant II, Pharmacia Biotech) 分光光度计检测提取的 RNA 完整性和质量; 按照 Super SMARTTM PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech) 操作说明书合成第一链 cDNA。

根据 GenBank 中松科植物的 *CaM* 序列设计克隆引物 *CaM* 1: 5'-ATAGATTTCGCTTTGCCCGTTTC-3'; *CaM* 2: 5'-GGCATCCTCCGAATGTCCTTATT-3'。以马尾松茎干 RNA 反转录成的 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增, PCR 程序为 94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 52℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min。将回收的 PCR 产物克隆至 pDM18-T 载体 (TaKaRa, Japan), 送北京华大基因进行测序, 获得含有完整开放阅读框的 cDNA 序列。

1.4 CaM 序列分析

利用 NCBI 中 Blast 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://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>),蛋白质疏水结构预测工具(<http://us.expasy.org/tools/protscale.html>)等在线软件对基因进行序列分析。利用 MEGA 5.0 软件进行马尾松 CaM 与 43 个其他植物来源 CaM 的氨基酸序列同源性比对。

1.5 马尾松 CaM 时空表达特征分析

分别在松材线虫接种后 30 min、45 min、60 min、90 min 和 180 min 的马尾松苗根、茎和叶部位取样,以相同时间点无菌水接种的松苗根、茎、叶为对照。样品 RNA 提取方法见上。根据克隆获得的马尾松 CaM 的 cDNA 序列设计实时荧光定量 PCR 引物(*pmCaM* F: 5'-GACGAAGAAGTTGATGAGATGA-3'; *pmCaM* R: 5'-TCCTCCGATTGTCCTTATTGAT-3');以 18S rRNA 作为内参,设计引物(F: 5'-CG-GCTACCACATCCAAGGAA-3'; R: 5'-GCTGGAAT-TACCGCGGCT-3')。采用 SuperReal PreMix (SYBR Green, TaKaRa, Japan) 荧光定量 PCR 试剂和 Applied Biosystems ABI 7500 Real-Time System 实时定量 PCR 仪,以各取样点的 cDNA 为模板进行马尾松 CaM 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,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。在同一个批次完成内参基因和目标基因的 PCR 反应,每个取样点分别设 3 个生物学和 3 个技术学重复。

2 结果与分析

2.1 马尾松 CaM 的克隆

经马尾松茎干总 RNA 反转得到的 cDNA 片段长度为 613 bp,经 ORF finder 分析,该片段具有一个完整的开放阅读框(ORF)。该 ORF 长 450 bp,编码 149 个氨基酸的蛋白质(图 1),命名为 *pmCaM*。该蛋白的预测分子量为 16.83 kD,理论 pI 值为 4.14;蛋白质结构预测结果表明,该蛋白具亲水性,不含跨膜区,无信号肽序列,不属于分泌蛋白。同时发现,该蛋白质含有 4 个 EF-hand 保守结构域,分别在 21

至 32 位、57 至 68 位、94 至 105 位和 130 至 141 位氨基酸,每个 EF-hand 内都有 Ca^{2+} 结合位点,符合 CaM 的序列特征。初步判定克隆获得的基因为马尾松 CaM 基因。

```

1  ATGGCGGAGCAGTTGACCGAGGATCAGATCGCAGAGTTCAAGGAGGCT
1  M A E Q L T E D Q I A E F K E A
49  TTCAGTCTGTTTGACAAAGATGGCGATGGCTGTATTACTACCAAAGAA
17  F S L F D K D G D G C I T T K E E
97  TTGGGTACTGTTATGCGTCTCTAGGACAGAATCCAACGAAGCTGAA
33  L G T V M R S L G Q N P T E A E
145  CTCAGGACATGATCAGTGAAGTTGATGCTGATGGAAATGGGACAATT
49  L Q D M I S E V D A D G N G T I
193  GATTTTCCAGAGTTCCTGAATCTTATGGCTCGAAAGATGAAGGATACT
65  D F P E F L N L M A R K M K D T
241  GACTCAGAGGAAGAGTTGAAAGAGGCCTTCAAGGTTTTGACAAGGAT
81  D S E E E L K E A F K V F D K D
289  CAAATGGTTTCATATCTGCAGCAGAGCTGCGGCATGTGATGACCAAC
97  Q N G F I S A A E L R H V M T N
337  TTGGGAGAAAACTAACTGACGAAGAAGTTGATGAGATGATCCGTGAG
113  L G E K L T D E E V D E M I R E
385  GCTGATGTTGATGGAGATGGTCAAGTCAACTATGAGGAGTTTGTCCAG
129  A D V D G D G Q V N Y E E F V R
433  ATGATGTTGGCAAAATGA
145  M M L A K *

```

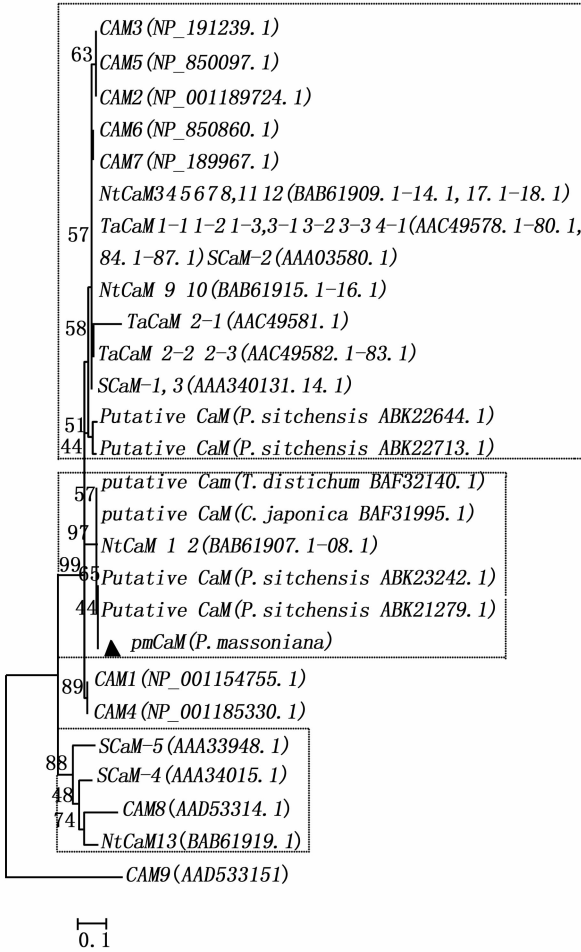
pmCaM 的起始密码子、终止密码子为粗斜体字;阴影部分为 EF-hand 结构域。

图 1 *pmCaM* 的核苷酸序列及其推测的氨基酸序列

2.2 马尾松 *pmCaM* 同源性分析

从 GenBank 数据库中筛选获得落羽松(*Taxodium distichum*)、日本柳杉(*Cryptomeria japonica*)、烟草(*Nicotiana tabacum*) NtCaM、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) CAM、小麦(*Triticum aestivum*) TaCaM 和大豆(*Glycine max*) SCaM 等 43 个不同植物来源的 CaM 氨基酸序列,采用 MEGA 5.0 软件中的邻接法对 *pmCaM* 编码的氨基酸序列与它们进行比较构建系统进化树(见图 2)。结果显示,*pmCaM* 编码的蛋白与这些植物的 CaM 均具有很高的同源性,其中与落羽松(BAF32140.1)、日本柳杉(BAF31995.1)的 CaM 以及已知的烟草 NtCaM 1-2 相似性最高(98% 以上),并处于一个独立分支中。烟草 NtCaM 3-12、拟南芥 CAM 2-3, 5-7、小麦 TaCaM 1-4 以及大豆 SCaM 1-3

处于另一个大分支中,拟南芥 CAM 1、4 处于一个独立小分支中,它们和 *pmCaM* 编码蛋白间的相似性也比较高(93%)。而拟南芥 CAM 8、烟草 NtCaM 13 以及大豆 SCaM 4-5 与 *pmCaM* 编码蛋白间的相似性较远(仅 77%),单独处于一个大分支中;此外,拟南芥 CAM 9 则处于一个与上述所有 CaM 亲缘关系都较远的独立分支上,其中,与 *pmCaM* 编码蛋白的相似性仅有 50%。聚类分析进一步证实了作者获得的 *pmCaM* 为马尾松 *CaM* 基因。



进化树分支处的数字代表 Bootstrap 值(重复抽样次数为 500);直线性标尺代表 10% 序列差异。

图2 *pmCaM* 编码蛋白与 43 个其他植物来源的 *CaM* 的进化树分析

2.3 马尾松 *pmCaM* 表达模式分析

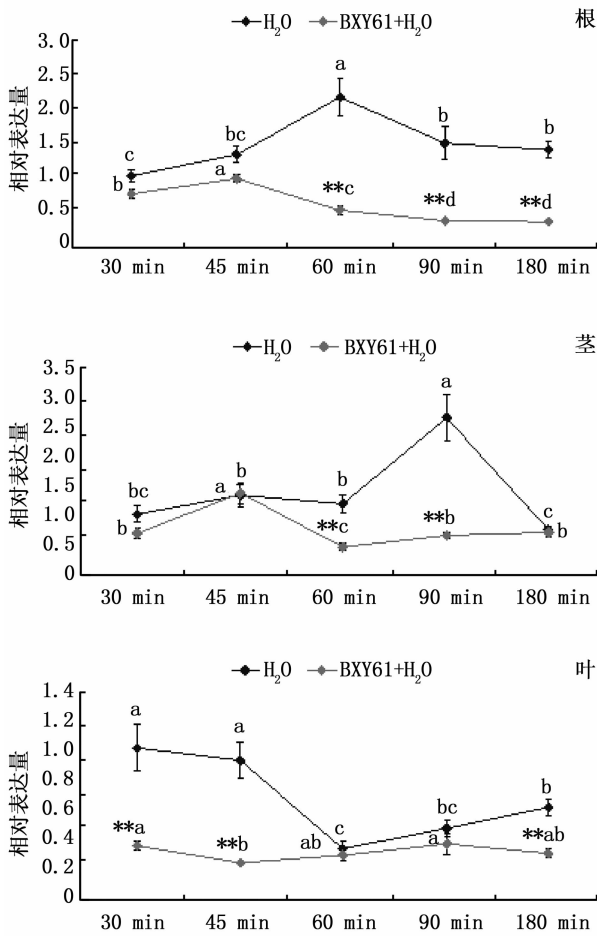
采用扩增 *pmCaM* 的特异引物 *pmCaM* F、*pmCaM* R, 以不同样品 cDNA 为模板, 进行实时荧光定量 PCR, 获得松材线虫接种后的马尾松苗 *pmCaM* 的时空表达特征(图 3 所示)。研究发现, 相对于无菌水接种的对照组, 马尾松苗的 *pmCaM* 表达响应松材线虫侵染, 除茎干 45 min 时相对表达量为 1 外, 根、

茎、叶 *pmCaM* 在接种后 30 ~ 180 min 整个时间段均呈下调表达特征。但不同器官间 *pmCaM* 表达显著下调的时间点存在差异, 松材线虫接种 60 min、90 min、180 min, 马尾松苗根部 *pmCaM* 表达显著下调(相对表达量相差 2 倍以上); 60 min、90 min, 茎干处 *pmCaM* 表达显著下调; 而 30 min、45 min、180 min, 叶部 *pmCaM* 表达显著下调。同时发现, 不同器官中 *pmCaM* 表达均存在特异的时序表达特征, 松材线虫接种、无菌水接种, 马尾松苗根部 *pmCaM* 表达量分别在接种 45 min、60 min 达到高峰; 茎干 *pmCaM* 表达量则分别在接种 45 min、90 min 达到高峰; 叶部 *pmCaM* 表达量在松材线虫接种 30 ~ 180 min 整个过程中变化不大, 趋于恒定, 但在无菌水接种 30 min、45 min 以及 180 min 达到高峰。综上所述, 本研究结果显示了松材线虫接种早期, 马尾松苗根茎叶 *pmCaM* 表达响应了松材线虫侵染, 其表达量变化均存在特异的随时间发展的波动特征; 其中发现, 根茎 *pmCaM* 在松材线虫接种 45 min 均出现表达量高峰。

3 讨论

松材线虫病是造成松树毁灭性的灾害, 但关于松材线虫病的致病机理一直存在争议。从松材线虫-松树互作的角度来研究松材线虫病的致病机理, 具有重要意义。前期研究发现, 松材线虫侵染早期, 马尾松树体内大量防卫相关蛋白基因以及钙相关蛋白基因受诱导表达^[14], 而且在松材线虫侵染早期, 马尾松不同器官均出现胞外 Ca^{2+} 瞬时内流的现象, 并且不同器官间 Ca^{2+} 流特征存在明显差异(数据未显示)。结合前人研究^[11], 推测松树体内的钙可能作为信号参与调控松树早期的防卫反应。

CaM 是植物细胞内高度保守的 Ca^{2+} 结合蛋白, 而研究发现 CaM 响应病原物侵染^[5-10]。Heo 等^[15]发现大豆叶斑病杆菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*) 或病原激发子可诱导大豆 *SCaM-4* 和 *SCaM-5* 基因表达, 却不诱导其他 CaM 亚型基因表达; 组成型表达 *SCaM-4* 和 *SCaM-5* 可诱导大豆枯斑自动生成和一系列 SAR 相关基因表达。霍建飞等^[16]发现, 相比亲和组合, 非亲和叶锈菌 (*Puccinia triticina*) 接种小麦, 小麦 *CaM SF-1*、*CaM SF-4* 表达量上调, *CaM SF-2* 表达量下调, *CaM SF-3* 表达量相差不大; 因此提出, *CaM SF-1*、*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



1, *pmCaM* 相对表达量 = 不同样品 *pmCaM* 表达量/无菌水接种 30 min *pmCaM* 表达量; 2, 不同小写字母分别表示无菌水接种、松材线虫接种后, 不同时间点间, *pmCaM* 相对表达量差异显著 ($P < 0.05$); 3, * * 表达同一时间, 无菌水接种、松材线虫接种间, *pmCaM* 相对表达量差异显著 (相对表达量相差 2 倍以上)。

图3 马尾松 *pmCaM* 响应松材线虫 BXY61 侵染在根茎叶中的时序表达特征

关, CaM SF-3 整个过程可能不参与小麦抗叶锈病反应。此外, Yamakawa^[17] 和 Takabatake^[18] 等发现烟草花叶病毒 (tobacco mosaic virus, TMV) 侵染可诱导 *NtCaM 1*、*NtCaM 2* 以及 *NtCaM 13* 表达上调, *NtCaM3-NtCaM12* 未显示响应; *NtCaM 13* 敲除品种对烟草花叶病毒的敏感性轻微增加, 对亲和病原细菌 *Ralstonia solanacearum*、病原真菌 *Rhizoctonia solani*、*Pythium aphanidermatum* 抗性减少。关于马尾松树体内是否存在 CaM, 以及其是否响应松材线虫侵染, 国内外未见报道。本研究首次克隆获得马尾松 *pmCaM*, 该基因编码的蛋白为 149 个氨基酸、亲水性的酸性蛋白质, 具有 4 个直接与 Ca^{2+} 结合的 EF-hand 保守结构域, 符合 CaM 典型特征。同源性分析知, *pm-*

CaM 编码蛋白与已知的松科植物、烟草、拟南芥、大豆以及小麦等的 CaM 具有高同源性, 其中与已知的烟草 NTCaM 1、NTCaM 2 相似性高达 98% 以上, 进一步证实了马尾松体内 CaM 的存在, *pmCaM* 为编码 CaM 的基因。同时, 本研究发现, 相对无菌水接种, 在松材线虫接种后的 30 ~ 180 min, 除茎干 45 min 外, 马尾松根茎叶 *pmCaM* 表达均下调; 而且不同器官间 *pmCaM* 表达显著下调的时间点存在差异, 叶部 *pmCaM* 在接种 30 min、45 min、180 min 显著下调, 根部在 60 min、90 min、180 min 显著下调, 茎部则在 60 min、90 min 显著下调 (图 3 所示); 结果表明马尾松苗 *pmCaM* 表达响应松材线虫侵染, 并且具有器官特异性。

Ca^{2+} 在植物防御反应信号转导中具有重要作用, CaM 作为细胞内主要的 Ca^{2+} 受体蛋白, 在介导 Ca^{2+} 信号传导途径中发挥重要作用^[19, 20]。霍建飞等^[21] 通过用 $CaCl_2$ 和 CaM 拮抗剂 TFP、CPZ 和 W-7 预处理小麦种子后, 接种亲和及非亲和小麦叶锈菌后的结果表明: 小麦叶片接种非亲和性叶锈菌后, TFP、CPZ 和 W-7 浸种处理抑制了 POD、PAL、PPO 和 CAT 活性的上升; 小麦叶片接种亲和性叶锈菌后, $CaCl_2$ 预处理加剧了 POD、PAL、PPO 和 CAT 活性的上升; 间接说明了 CaM 参与调控小麦防御反应中的钙信号传递, Ca^{2+} -CaM 信使系统可能在小麦抗叶锈病过程中起着重要作用。我们前期研究发现, 松材线虫侵染早期, 马尾松苗根茎叶均发生瞬时 Ca^{2+} 内流; 而呈现明显 Ca^{2+} 内流的早晚时间依次为接种后的 7 min (茎) = 7 min (叶) > 15 min (根); Ca^{2+} 内流最大流速分别为 $3\ 700\ pmol \cdot cm^{-2} \cdot s^{-1}$ (根) > $1\ 300\ pmol \cdot cm^{-2} \cdot s^{-1}$ (叶) > $450\ pmol \cdot cm^{-2} \cdot s^{-1}$ (茎); Ca^{2+} 内流持续时间则分别为大于 67 min (茎) > 43 min (叶) > 24 min (根), 同时发现, 马尾松不同器官均出现特异的钙振荡特征 (数据未显示); 结合金钢^[11] 研究发现的松树质外体钙库内流和胞内钙库释放共同导致细胞内游离钙离子浓度升高, 以及伴随松材线虫病病程的发展, 松树细胞中 Ca^{2+} 浓度变化具有“低-高-低-高”的特征; 推测知 Ca^{2+} 参与了松材线虫-马尾松互作早期的信号传递, 而且不同器官间钙信号特征存在差异。本研究中, 松材线虫接种, 马尾松苗根、茎 *pmCaM* 在接种 45 min 均处于表达量高峰, 叶部 *pmCaM* 在 30 ~ 180 min 整个过程恒定不变; 而对照无菌水接种, 马尾松苗根、茎 *pmCaM* 分别在接种 60 min、90 min 处于表达量高峰, 叶部 *pmCaM* 则在接种 30 min、45 min、180 min

处于表达量高峰(图 3 所示);表明松材线虫侵染后,马尾松苗不同器官 *pmCaM* 表达量变化均存在特异的随时间发展的波动特征。其中发现,松材线虫接种 45 min,马尾松苗根茎 *pmCaM* 均处于表达量高峰,*pmCaM* 做为 Ca^{2+} 主要的传导蛋白,可能参与调控根茎中钙信号传递;而叶中 *pmCaM* 表达量在接种后的 30 ~ 180 min 整个过程变化不明显,进一步推测说明马尾松苗不同器官 *pmCaM* 在调控钙信号传递方面存在差异;松树钙/钙调素信号系统在松材线虫病发生发展过程中可能发挥了重要的调控作用。

综上所述,本研究首次证实了马尾松体内 *CaM* 基因的存在;同时发现,马尾松根茎叶 *pmCaM* 表达响应松材线虫的侵染,其表达量变化均存在特异的随时间发展的波动特征;结合作者前期发现的 Ca^{2+} 作为信号物质参与了松材线虫 - 马尾松互作早期的信号传递,推测松材线虫接种后,*pmCaM* 参与调控马尾松体内钙信号传递。下一步工作将证实钙/钙调素信号通路的确存在,找到与 *pmCaM* 编码蛋白互作的下游蛋白(钙调素结合蛋白 CaMBP),并对松材线虫侵染过程中,马尾松体内“ Ca^{2+} -*pmCaM*-CaMBP”复合物的功能进行研究,进而来揭示松材线虫病发生发展过程中,松树体内的钙介导的信号通路的调控机制。

4 结 论

本研究首次从马尾松上克隆获得 *pmCaM*。实时荧光定量 PCR 研究发现,接种松材线虫后,马尾松苗根茎叶 *pmCaM* 均下调表达,但不同器官间 *pmCaM* 显著下调表达的时间点存在差异;而且松材线虫接种后,马尾松苗根茎叶 *pmCaM* 表达量变化均存在特异的随时间发展的波动特征,其中发现,根茎 *pmCaM* 在松材线虫接种 45 min 均出现表达量高峰。总之,本研究结果显示马尾松 *pmCaM* 表达响应了松材线虫侵染,推测松材线虫 - 松树互作早期,*pmCaM* 参与调控马尾松体内的钙信号传递。

参 考 文 献:

[1] Forestry Agency. Annual report on trends of forest and forestry-fiscal year 2003 [R]; The ministry of agriculture, forestry and fisheries of Japan; Tokyo, Japan, 2004

[2] Shin H, Lee H, Woo K S, *et al.* Identification of genes upregulated by pine wood nematode inoculation in Japanese red pine [J]. *Tree Physiol*, 2009, 29: 411 - 421

[3] Yang B J, Pan H Y, Tang J, *et al.* Pine wood nematode disease [M]. Beijing: Chinese Forestry Press, 2003: 6 - 143

[4] 张星耀, 骆有庆. 中国森林重大生物灾害 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2003

[5] 王艳辉, 贾 慧, 司贺龙, 等. 不同基因型玉米受 HT-毒素胁迫后细胞内 CaM 的动态变化 [J]. 河北农业大学学报, 2007, 30: 4 - 7

[6] Yang T, Poovaiah B W. Hydrogen peroxide homeostasis: Activation of plant catalase by calcium/calmodulin [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 4097 - 4102

[7] Harding S A, Oh S, Roberts D M. Transgenic tobacco expressing a foreign calmodulin gene shows an enhanced production of active oxygen species [J]. *EMBO J*, 1997, 16: 1137 - 1144

[8] Kim M C, Lee S H, Kim J K, *et al.* Mlo, a modulator of plant defense and cell death, is a novel calmodulin-binding protein [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 19304 - 19314

[9] Kim M C, Panstruga R, Ellio C, *et al.* Calmodulin interacts with MLo protein to regulate defense against mildew in barley [J]. *Nature*, 2002, 416: 447 - 451

[10] Kang C H, Jung W Y, Kang Y H, *et al.* AtBAG6, a novel calmodulin-binding protein, induces programmed cell death in yeast and plants [J]. *Cell Death Differ*. 2006, 13: 84 - 95

[11] 金 钢. 黑松与松材线虫互作过程中细胞程序性死亡的研究 [D]. 南京: 南京林业大学, 2007

[12] Tavernier E, Wendehenne D, Blein J - P, *et al.* Involvement of free calcium in action of cryptogin, a proteinaceous elicitor of hypersensitive reaction in tobacco cells [J]. *Plant Physiol*, 1995, 109: 1025 - 1031

[13] Zielinski R E. Calmodulin and calmodulin-binding proteins in plants [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1998, 49: 697 - 725

[14] Xu L, Liu Z Y, Zhang K, *et al.* Characterization of the *Pinus massoniana* transcriptional response to *Bursaphelenchus xylophilus* infection using suppression subtractive hybridization [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14: 11356 - 11375

[15] Heo W D, Lee S H, Kim M C, *et al.* Involvement of specific calmodulin isoforms in salicylic acid-independent activation of plant disease resistance responses [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 766 - 771

[16] 霍建飞, 宋水山, 李 星, 等. CaM 及各亚型基因参与小麦抗叶锈病反应的研究 [J]. 华北农学报, 2010, 25(4): 175 - 179

[17] Yamakawa H, Mitsuhashi I, Ito N, *et al.* Transcriptionally and post-transcriptionally regulated response of 13 calmodulin genes to tobacco mosaic virus-induced cell death and wounding in tobacco plant [J]. *Eur J Biochem*, 2001, 268: 3916 - 3929

[18] Takabatake R, Karita E, Seo S, *et al.* Pathogen-induced calmodulin isoforms in basal resistance against bacterial and fungal pathogens in tobacco [J]. *Plant Cell Physiol*, 2007, 48(3): 414 - 423

[19] Lee S H, Johnson J D, Walsh M P, *et al.* Differential regulation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent enzymes by plant calmodulin isoforms and free Ca^{2+} concentration [J]. *Biochem J*, 2000, 350: 299 - 306

[20] Nath M, Goel A, Taj G, *et al.* Molecular cloning and comparative in silico analysis of calmodulin genes from cereals and millets for understanding the mechanism of differential calcium accumulation [J]. *J Proteomics Bioinform*, 2010, 3: 294 - 301

[21] 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: 234 - 239