

# 大麦与白粉病菌互作中钙调素的细胞化学定位

赵淑芳<sup>1</sup> 胡东维\* 程方民

(浙江大学生物技术研究所, 杭州 310029)

**摘要** 对不同抗病性的大麦近等基因系受白粉病菌侵染诱导后的钙调素(CaM)变化进行了免疫细胞化学研究。结果表明, 钙调素普遍存在于各种不同类型的细胞中, 代谢活跃的细胞中CaM标记密度相对较高; CaM分布于细胞核、细胞壁、叶绿体等细胞器中, 其中细胞核标记密度最高。在健康叶片中, 感病品系 Ingrid 伴胞中 CaM 的标记密度明显高于抗病品系 *mlo-3*, 而其他细胞中 CaM 标记密度没有明显差别。病原菌接种后, 各种细胞的 CaM 标记密度均呈现一定程度的上升, 但 Ingrid 上升幅度相对较大。在叶肉细胞中, *mlo-3* 细胞核中 CaM 增加最明显。并对叶肉细胞和伴胞中 CaM 的变化进行了讨论。

**关键词** 钙调素; 大麦; 大麦白粉病; 相互作用; 免疫定位

大麦 *Mlo* 基因编码一种植物特有的膜蛋白(MLO), 该基因可能对细胞的坏死起负调控作用<sup>[1-3]</sup>。该基因隐性突变(*mlo*)引起功能丧失后, 导致大麦产生对白粉病菌(*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*)的广谱、高效、持久的抗病性<sup>[4]</sup>。

*mlo* 突变的抗病性机制研究表明, 在受到病原菌入侵时, 大麦表皮细胞能够在侵染位点上产生快速而强烈的细胞学局部增厚, 即乳突反应(papilla response), 形成大而坚实乳突结构, 令病原菌入侵无法侵入<sup>[5,6]</sup>。适当的外源钙离子有助于大麦表皮细胞产生强抗性的坚实乳突<sup>[7,8]</sup>。说明钙离子信号通过调控大麦的乳突反应调节对白粉病菌侵染的抗性。最近的研究表明, MLO 蛋白是一种钙调素(calmodulin, CaM)结合蛋白, 二者的相互作用影响到大麦细胞对白粉病菌的抗病性<sup>[9,10]</sup>。

白粉病菌是一种绝对寄生真菌, 只感染大麦的表皮细胞。但研究发现 *Mlo* 基因实际上调控的是表皮细胞下方叶肉细胞的过敏性死亡<sup>[3]</sup>。本实验室的免疫细胞化学研究也发现, MLO 蛋白是一种叶肉细胞特异性表达蛋白。因此, CaM 蛋白如何通过与 MLO 蛋白的相互作用调控植物的抗性已成为 *mlo* 大麦抗病性机制研究的一个重要问题。为此, 本文利用免疫细胞化学方法对病原菌侵染诱导的大麦 *Mlo/mlo* 近等基因系中钙调素的时空变化进行了分析, 为揭示 *mlo* 大麦的广谱抗病性机制提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料与处理方法

本研究采用的两个大麦近等基因系 Ingrid 和 BC Ingrid *mlo-3* 由德国 Max Planck 植物育种研究所 Schulze-Lefert 博士提供。Ingrid 携带野生的 *Mlo* 基因, 对供试病原菌生理小种表现感病; BC Ingrid *mlo-3*(*mlo-3*)为 *Mlo* 基因的一个隐性突变体, 具有 Ingrid 的回交背景, 对所有已知的大麦白粉病菌生理小种均表现高度抗病。

大麦白粉病菌从杭州郊区大麦植株上分离而来, 在大麦品种大青上转接繁殖。由于供试大麦品系为具有广谱抗白粉病基因的近等基因系材料, 故未做进一步的生理小种鉴定。

大麦播种后第 10 天当第 1 片叶充分展平后, 采用病原菌新鲜的分生孢子滚动法进行接种, 密度为 50~100 个/mm<sup>2</sup>; 接种植株首先暗处保湿 12 h; 然后在温度为 19 °C, 光照为 12 h 照明、12 h 黑暗, 相对湿度为 70%~90% 的光照培养箱中进行培养。接种后 12、24、48、96 和 240 h 取样, 用未接种的健康叶片作为对照。

收稿日期: 2003-12-30 接受日期: 2004-06-10

国家自然科学基金资助项目(No.30370727)

<sup>1</sup> 现在工作单位: 山东省食用菌工作站, 济南 250100

\* 通讯作者。 Tel: 0571-86971667, Fax: 0571-86971667, E-mail:

hudw@zju.edu.cn

## 1.2 样品的低温包埋

将样品切成 1 mm × 3 mm 的小块, 在 1% 戊二醛和 2% 甲醛的磷酸缓冲液(100 mM, pH 7.2)中 4 °C 下固定 3 h; 30%、50% 乙醇 4 °C 下脱水各 30 min; 然后用 -20 °C 预冷的 50%、70%、80%、90%、100% 乙醇(3 次)在 -20 °C 下梯度脱水, 每步 60 min; Lowicryl K4M 树脂低温渗透包埋; 然后在 -20 °C 的低温下紫外光照射聚合 72 h, 室温下紫外光照射聚合 48 h; 用钻石刀做超薄切片并收集在镍网上备用。

## 1.3 免疫金标记

直径 10 nm 的胶体金及 Protein A 胶体金探针的制备方法参见文献[11]。CaM 抗血清由河北师范大学孙大业院士和白娟教授惠赠。

标记反应在 28 °C 下采用液滴悬浮法进行。具体步骤为: dd H<sub>2</sub>O 上悬浮 5 min; BL 液滴上悬浮 60 min; 在稀释 250 倍的 CaM 抗血清上标记 120 min; dd H<sub>2</sub>O 上悬浮 5 min; BL 悬浮 60 min; 胶体金探针标记 60 min; dd H<sub>2</sub>O 上漂洗 3 次, 每次 5 min; 晾干; 醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色; JEM-1200cx 透射电镜观察拍照。

标记的特异性对照为: (1)超薄切片不经一抗处理, 封闭后直接用胶体金探针标记; (2)用未包被的胶体金代替胶体金-蛋白 A 探针进行标记。

## 1.4 标记密度的统计分析

胶体金探针标记的密度代表了 CaM 的相对含量。选择各种不同标记位点, 每个位点随机选 10 个 2 μm<sup>2</sup> 的标记面积计算胶体金颗粒数目, 进行密度平均值与标准差分析。

## 2 结果

### 2.1 标记特异性

两种标记特异性对照处理的结果均发现, 胶体金不能标记在超薄切片上, 说明本研究的标记结果是特异性的。

### 2.2 CaM 在健康大麦叶片细胞中的分布

免疫标记发现, 胶体金可以特异性的标记在大麦叶片的各种不同的细胞中。在细胞中的标记位点包括细胞核、叶绿体以及细胞质和细胞壁(图 1); 线粒体和液泡中几乎没有发现胶体金标记位点。说明 CaM 广泛存在于植物细胞除线粒体液泡外的各种细胞器中。

胶体金标记密度的统计结果表明(图 2), 在不

同类型的细胞中, 伴胞细胞中 CaM 标记密度最高, 叶肉细胞次之, 而表皮细胞最少。伴胞中含有大量的细胞质和线粒体, 代谢活跃; 而表皮细胞只有非常稀少的细胞器和细胞质, 代谢相对缓慢。以上结果说明 CaM 的标记密度与细胞的代谢状态有关, 代谢活跃的细胞中 CaM 的含量相对较高。

在各种细胞器中, 细胞核和细胞质中 CaM 含量一般较高, 而叶绿体、线粒体等细胞器中则相对较少。CaM 主要分布在细胞核的异染色质中, 核仁中也有少数标记位点。在各种细胞的细胞壁上, 均有程度不同的 CaM 存在, 但伴胞细胞和表皮细胞的外壁上 CaM 标记密度相对较高。总体来看, 如果某种细胞核的 CaM 标记密度较高, 那么其细胞壁和细胞质中 CaM 的标记密度也相对较高。

在两个不同抗病性的近等基因系中, 不同细胞和细胞器的 CaM 标记密度也有所不同。图 2 是部分位点 CaM 相对标记密度的统计对比。结果说明, Ingrid 伴胞细胞核中的 CaM 标记密度明显高于 *mlo-3*。除此之外, 两个品系不同细胞核细胞器之间没有太大的差别。

### 2.3 病原菌侵染诱导的大麦表皮细胞中 CaM 变化

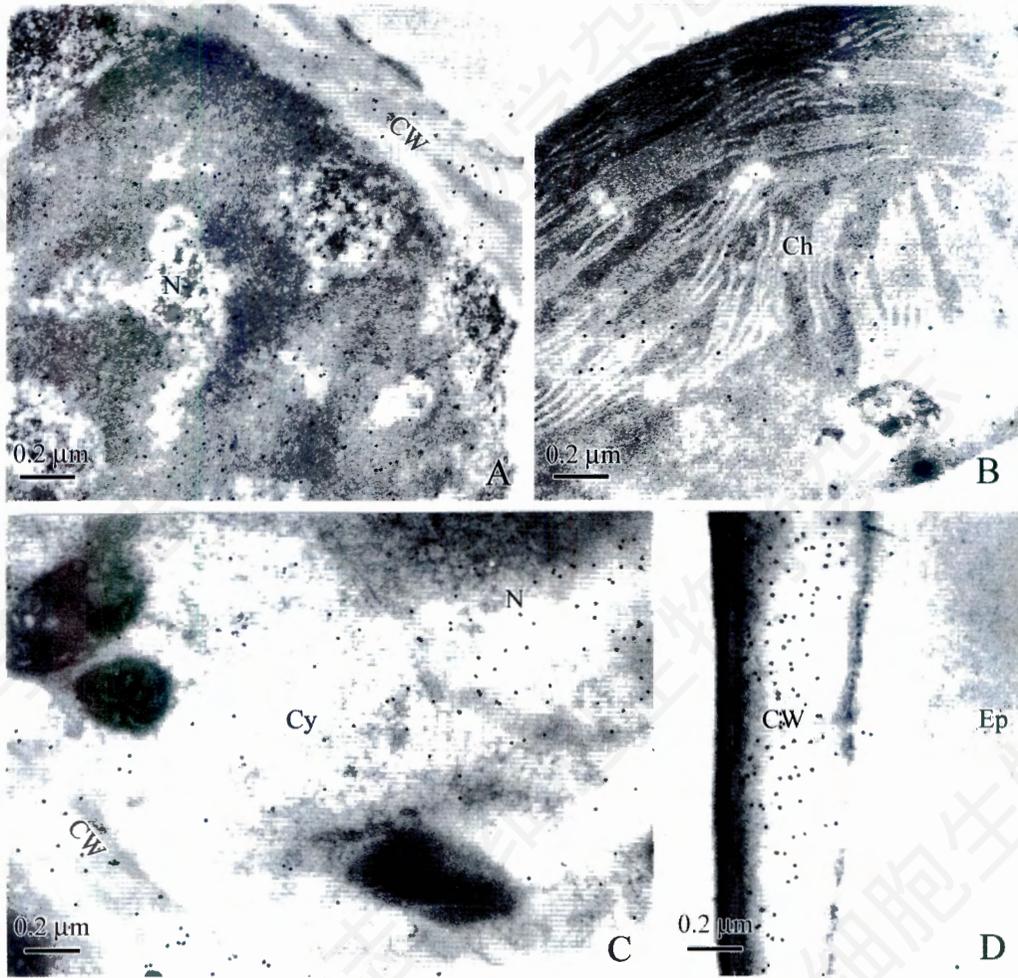
白粉病菌侵染后, CaM 的相对含量总体上呈现一种上升趋势(图 3), 但在不同的抗性品种和不同的细胞中, CaM 的相对含量变化有一定的差别。

在病原菌侵染早期的 12~48 h, Ingrid 表皮细胞细胞核中 CaM 标记密度不论是上升的速度和幅度都相对较大(图 3A), 而 *mlo-3* 表皮细胞核中的 CaM 变化则相对平缓。

白粉病菌只侵染大麦的表皮细胞并在其中产生吸收营养的吸器; 接种后 12~48 h 也是病原菌能否成功侵染的关键时期。Ingrid 表皮细胞中 CaM 较高说明其细胞代谢活跃, 这种代谢变化可能有利于病原菌吸器的发育。随着时间的推移和病原菌的进一步发育, CaM 在表皮细胞壁上积累也逐渐靠向细胞壁内层, 而且正对吸器的部位, 胶体金颗粒数目明显高于其他部位。Ingrid 的表皮细胞核中, CaM 的相对含量基本上保持恒定, 而 *mlo-3* 中呈现一种下降的趋势。说明 *mlo-3* 中 CaM 含量下降可能和衰老是一致的。

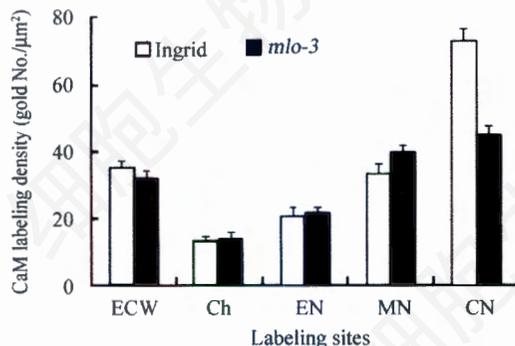
### 2.4 病原菌侵染诱导的大麦伴胞细胞中 CaM 变化

韧皮部是植物进行有机营养运输的主要通道, 伴胞细胞和筛管细胞相伴存在, 对筛管的运输作用至关重要。伴胞细胞中含有体积较大的细胞核和大



**Fig.1** Immunogold localization of CaM in barley cells.

(A) Companion cell, in which CaM was mainly labeled in the heterochromatin in the nucleus (N) and cell wall (CW). (B) Mesophyll cell, in which CaM was detected in chloroplast (Ch). (C) Companion cell, great amount of CaM was deposited in cytoplasm (Cy). (D) Epidermal cell (Ep), CaM accumulated on the cell wall.



**Fig.2** Relative CaM contents of different cells in health barley  
ECW: epidermal cell wall; Ch: chloroplast; EN: nucleus in epidermal cells; MN: nucleus in mesophyll; CN: nucleus in companion cells.

量线粒体(图 1C)。免疫标记的结果表明,病原菌侵染后,伴胞细胞核中 CaM 相对含量也呈现出一种先下降后上升的趋势;随后逐渐上升(图 3B)。在接种后 12 h 和 48 h, Ingrid 中 CaM 下降幅度分别

为接种前的 61% 和 34%; 而 *mlo-3* 中 CaM 下降幅度分别为接种前的 24% 和 71%。但总体来说, Ingrid 伴胞细胞核中 CaM 的标记密度高出 *mlo-3*。

从整个变化趋势来看, Ingrid 中 CaM 相对含量一直高于 *mlo-3*。说明伴胞中相对较高的 CaM 含量对病原菌的成功侵染是必要的。

另外从 CaM 分布位点变化来看,接种的早期 CaM 主要分布在异质染色体中,但随着接种时间的延长尤其到接种 96 h 之后,常染色质中也有了少量的分布。

#### 2.4 病原菌侵染诱导的大麦叶肉细胞的 CaM 变化

对与表皮细胞直接相连的叶肉细胞中的 CaM 变化分析的结果表明,病原菌接种后 12~48 h, 细胞核 CaM 标记密度缓慢减少; 接种后期, *mlo-3* 中 CaM 相对含量快速升高(图 3C), 而且远远高于 Ingrid。

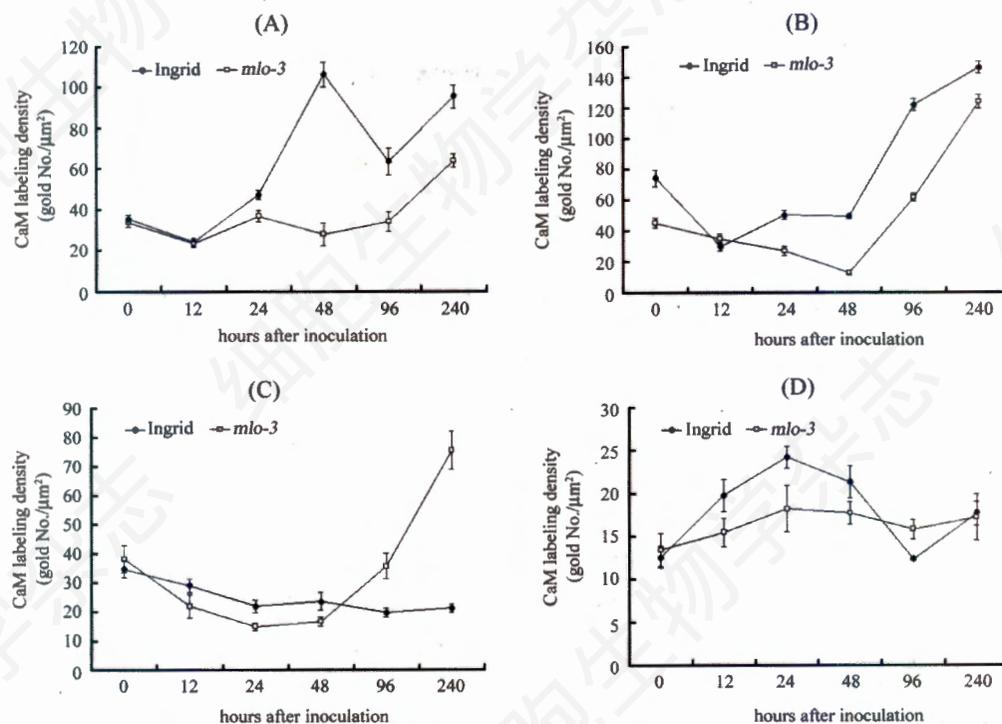


Fig. 3 Change of CaM in barley induced by inoculation of the pathogen

(A) Cell walls of epidermal cells; (B) Nuclei in companion cells; (C) Nuclei of mesophyll; (D) Chloroplasts of mesophyll.

与此相反, Ingrid 中叶绿体的 CaM 相对含量变化较大, 尤其在接种 24 h 前后迅速上升; 而 *mlo-3* 中 CaM 相对含量保持相对稳定(图 3D)。接种后 12 h, Ingrid 中叶绿体的 CaM 标记密度比 *mlo-3* 高出约 27%, 接种后 24 h 高出约 36%。说明病原菌侵染诱导了早期叶绿体 CaM 的增加。

### 3 讨论

钙调素是广泛存在于动植物细胞的传递钙离子信号的受体蛋白, 参与多种细胞代谢过程<sup>[12]</sup>。植物 MLO 蛋白最近被证明是一种钙调素结合蛋白<sup>[9, 10]</sup>。在含有野生型 *Mlo* 基因的大麦表皮细胞中高效表达 CaM 基因, 能够有效提高表皮细胞的感病性; 相反, 抑制该 CaM 基因的表达则提高大麦细胞的抗病性<sup>[10]</sup>。本文原位检测的结果表明, 这种感病性变化至少涉及到植物表皮细胞、伴胞细胞和叶肉细胞的代谢变化。

超微结构研究表明, 病原菌侵染诱导植物感病品种表皮细胞中的细胞器与细胞质大量增加; 叶肉细胞中新叶绿体不断产生, 叶肉细胞衰老减缓<sup>[11, 13, 14]</sup>。说明 CaM 的累积激活了这些细胞的代谢。最近, 我们实验室把 MLO 蛋白也定位在叶绿体上(未发表资料)。说明叶绿体中 CaM 的增加可能与 MLO 蛋白的

互作有关, 可能对抑制和延缓叶绿体的死亡有关。而在抗白粉病的 *mlo* 大麦上, 最先坏死的正是叶肉细胞<sup>[3]</sup>。因此, 可以认为 CaM 可调节这些细胞使其代谢向着有利于病原菌吸器发育的方向变化, 包括可能为病原菌提供充足的营养。

细胞化学方法最大的优势是能够原位的分析生物大分子的空间分布与积累。本文还发现维管束伴胞细胞核中钙调素的含量最高, 而且在病原菌侵染后变化最明显。伴胞细胞在植物组织的有机营养运输中具有重要作用。因此可以认为在受到病原菌侵染后, Ingrid 体内的有机营养可以迅速进行再分配。其结果可能与添加外源性单糖一样<sup>[15]</sup>, 即能够抑制被侵染细胞的坏死, 促进了病原菌的成功侵染和发育。由此可以看出, 多组织多细胞之间的养分的协调与再分配可能是决定植物感病性的重要基础。

感谢浙江大学分析测试中心徐颖、方月鲜老师帮助样品处理和切片。

### 参考文献 (References)

- [1] Büschges R *et al.* *Cell*, 1997, **88**: 695
- [2] Devoto A *et al.* *J Biol Chem*, 1999, **274**: 34993
- [3] Piffanelli P *et al.* *Plant Physiol*, 2002, **129**: 1076
- [4] Jørgensen JH. *Euphytica*, 1977, **26**: 55

- [5] Stolzenburg MC *et al. Physiol Plant Pathol*, 1984, **25**: 337
- [6] Stolzenburg MC *et al. Physiol Plant Pathol*, 1984, **25**: 347
- [7] Bayles CJ *et al. Physiol Mol Plant Pathol*, 1987, **30**: 337
- [8] Gold RE *et al. Physiol Mol Plant Pathol*, 1986, **29**: 115
- [9] Kim MC *et al. J Biol Chem*, 2002, **277**: 19304
- [10] Kim MC *et al. Nature*, 2002, **416**: 447
- [11] 赵淑芳等。植物病理学报, 2003, **33**: 444
- [12] 孙大业等。细胞信号转导, 第3版, 北京: 科学出版社, 2001
- [13] Hippe-Sanwald S *et al. Protoplasma*, 1992, **168**: 27
- [14] 胡东维等。菌物系统, 1997, **16**: 122
- [15] Yamaoka N *et al. Physiol Mol Plant Pathol*, 1993, **42**: 133

## Immuno-gold Localization of Calmodulin Interaction between Barley and Its Powdery Mildew Pathogen, *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*

Shu-Fang Zhao<sup>1</sup>, Dong-Wei Hu\*, Fang-Min Cheng

(*Institute of Biotechnology, Zhejiang University, Hanzhou 310029, China*)

**Abstract** The immuno-gold localization of calmodulin (CaM) in near isogenic line barley, Ingrid (*Mlo*) and BC Ingrid *mlo-3* (*mlo-3*), induced by powdery mildew attack, was examined. CaM was detectable in all leaf cells and abundant CaM was found in the actively metabolic cell, such as companion cells. CaM existed in nuclei, cell wall, and chloroplast, especially in nuclei. In healthy leaves, the density of labeling for CaM in different cells in Ingrid and *mlo-3* were similar except companion cells, in which CaM was much more in Ingrid than in *mlo-3*. The CaM was increased after inoculation with powdery mildew in other cells and organelles except that in the mesophyll nuclei. The changes of CaM in companion cells and mesophyll cells were also discussed.

**Key words** calmodulin; barley; *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*; interaction; immuno-gold localization

Received: December 30, 2003 Accepted: June 10, 2004

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30370727)

<sup>1</sup>Present address: The Workstation for Edible Fungi of Shandong Province, Jinan 250100, China

\*Corresponding author. Tel: 86-571-86971667, Fax: 86-571-86971667, E-mail: hudw@zju.edu.cn