DOI: 10.3724/SP.J.1006.2021.04156

甘蔗 *ScCRT1* 基因克隆及其应答 SCMV 侵染分子机制的研究

张 海 程光远 杨宗桃 王 彤 刘淑娴 商贺阳 赵 贺
徐景升*

福建农林大学国家甘蔗工程技术研究中心 / 农业农村部福建甘蔗生物学与遗传育种重点实验室 / 教育部作物遗传育种与综合利用重点实验室, 福建福州 350002

摘 要: 钙网蛋白(calreticulin, CRT)在真核生物中广泛表达, 是重要的分子伴侣和钙离子结合蛋白, 参与调控 Ca^{2+} 稳态、钙依赖信号、内质网质量控制、植物生长发育、免疫反应和逆境应答等多种生物学过程。甘蔗(*Saccharum* spp. hybrid)中 CRT 应答甘蔗花叶病毒(*Sugarcane mosaic virus*, SCMV)侵染尚未见报道。本研究从热带种 Badila (*S. officinarum*)中克隆了 1 个 CRT1/CRT2 亚型的 CRT 编码基因, 命名为 *ScCRT1*。该基因开放读码框(open reading frame, ORF)长度为 1281 bp, 编码长度为 426 aa 的蛋白。生物信息学分析表明, *ScCRT1* 具有典型的 CRT 蛋白结构域, 为稳定的亲水性蛋白, 其 N 端有一个信号肽, 具有典型的跨膜结构域, C 端有典型的内质网定位信号; 二级结构多为无规则卷曲; 系统进化树分析表明, 该蛋白是典型的 CRT 蛋白, 在单子叶和双子叶植物中具有明显的分化。亚细胞定位表明 *ScCRT1* 定位于内质网。实时荧光定量 PCR 分析发现, *ScCRT1* 基因在甘蔗各组织中都有表达, 在第 8 节间中的表达量最低, 在心叶中的表达量较高; 该基因在 SCMV 侵染早期表达量上调, 后期下调表达。酵母双杂交(yeast two hybrid, Y2H)和双分子荧光互补(bimolecular fluorescence complementation, BiFC)试验表明, *ScCRT1* 与 SCMV-6K2 蛋白互作。推测 SCMV-6K2 通过与 *ScCRT1* 互作调控钙离子稳态进而便于 SCMV 侵染。

关键词: 甘蔗; 钙网蛋白; SCMV; 6K2

Cloning of sugarcane *ScCRT1* gene and its response to SCMV infection

ZHANG Hai, CHENG Guang-Yuan, YANG Zong-Tao, WANG Tong, LIU Shu-Xian, SHANG He-Yang, ZHAO He, and XU Jing-Sheng*

National Engineering Research Center for Sugarcane / Key Laboratory of Sugarcane Biology and Genetic Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs / Key Laboratory of Ministry of Education for Genetics, Breeding and Multiple Utilization of Crops, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China

Abstract: Calreticulin (CRT) is widely expressed in eukaryotes. As a molecular chaperone and a Ca^{2+} binding protein, CRT is involved in many biological pathways such as the regulation of calcium homeostasis, calcium-dependent signaling, endoplasmic reticulum quality control, plant growth and development, immunity and response to stress. However, the response of CRT of sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid) challenged by *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) has not been reported. In this study, a CRT gene was cloned from the noble cane cultivar Badila (*S. officinarum*) and designed as *ScCRT1*. *ScCRT1* had an open reading frame (ORF) length of 1281 bp and encoded 426 amino acids. Bioinformatics analysis showed that *ScCRT1* was a stable hydrophilic protein and possesses a signal peptide at the N-terminal, a typical transmembrane domain, and a typical endoplasmic reticulum location signal at the C-terminal. The secondary structure of *ScCRT1* was composed of mostly random coils. Phylogenetic tree analysis indicated that *ScCRT1* belonged to the CRT1/CRT2 subtype and was divergent between monocotyledons and dicotyledons. Subcellular location assays showed that *ScCRT1* was mainly located in the endoplasmic reticulum. Real-time quantitative PCR analysis showed that *ScCRT1* gene was extensively expressed in different tissues of sugarcane, with the highest expression in

本研究由国家自然科学基金项目(31971991)和福建农林大学科技创新基金项目(CXZX2018026)资助。

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (31971991) and the Science and Technology Innovation Project of Fujian Agriculture and Forestry University (CXZX2018026).

* 通信作者(Corresponding author): 徐景升, E-mail: xujingsheng@126.com

第一作者联系方式: E-mail: zhanghai940410@163.com

Received (收稿日期): 2020-07-14; Accepted (接受日期): 2020-09-13; Published online (网络出版日期): 2020-09-22.

URL: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20200922.1150.008.html>

leaf roll and the lowest expression in the 8th internode. *ScCRT1* gene was up regulated in the early stage of SCMV infection, but down regulated with time going. *ScCRT1* interacted with the 6K2 from SCMV as confirmed by yeast two hybrid and bimolecular fluorescence complementation assays. Based on these findings, we speculated SCMV interfered the calcium homeostasis by the interaction of 6K2 with *ScCRT1*, thereby facilitating viral infection of sugarcane.

Keywords: sugarcane; SCMV; calreticulin; 6K2

钙网蛋白(calreticulin, CRT)在真核生物中高度保守并广泛表达^[1-4], 主要定位于内质网(endoplasmic reticulum, ER)和胞间连丝(plasmodesmata, PD), CRT是内质网中主要的 Ca^{2+} 结合蛋白, 具有分子伴侣功能^[5-8]。 Ca^{2+} 是细胞内重要的第二信使, 在细胞信号转导中具有重要作用^[5,9]。因此, CRT 参与调控 Ca^{2+} 稳态、信号转导、内质网质控(endoplasmic reticulum quality control, ERQC)、生长发育和免疫应答等多种生物学过程^[2-4,10-12]。CRT 在哺乳动物中的研究较为深入, 该蛋白除了上述基本生物功能外, 还参与了癌症等疾病的发生^[13-14]。植物中 CRT 的研究相对滞后^[15], 研究表明 CRT 广泛应答生物和非生物胁迫, 参与干旱、低温、盐胁迫、真菌、细菌、病毒的侵染等逆境胁迫反应^[2,4,8,16-21]。

甘蔗(*Saccharum* spp. hybrid)是我国和世界上最重要的糖料作物和能源作物^[22-24]。甘蔗花叶病毒(*Sugarcane mosaic virus*, SCMV)属于马铃薯 Y 病毒科(*Potyviridae*) Y 病毒属(*Potyvirus*), 是甘蔗花叶病的主要病原之一, 严重危害甘蔗生产^[25-28]。SCMV 为单链正义 RNA 病毒, 长度约为 10 kb, 编码 2 个多聚蛋白, 经自身编码的蛋白酶裂解后形成 11 个成熟的功能蛋白, 从 N 端至 C 端分别为 P1、HC-Pro、P3、P3N-PIPO、6K1、CI、6K2、VPg、NIa、NIb 和 CP 蛋白^[29-32]。其中, 6K2 蛋白参与病毒的复制、胞内与胞间移动, 在马铃薯 Y 病毒属病毒建立系统性侵染过程中起着至关重要的作用^[33-37]。

本课题组在前期研究中, 以 SCMV 编码的 6K2 蛋白为诱饵, 从甘蔗品种 ROC22 叶片 cDNA 酵母文库中筛选到了具有完整开放读码框(open reading frame, ORF)的 *CRT* 基因, 其长度为 1281 bp。在本研究中, 我们进一步从 Badila 叶片中克隆了该基因, 命名为 *ScCRT1*。本研究利用 RT-qPCR 分析了 *ScCRT1* 基因在甘蔗不同组织中的表达特异性以及应答 SCMV 侵染的表达情况; 利用酵母双杂交(yeast 2 hybrid, Y2H)和双分子互补(bimolecular fluorescence complementation, BiFC)技术验证了 *ScCRT1* 蛋白与 SCMV-6K2 的互作关系; 利用瞬时

表达试验, 研究了 *ScCRT* 的亚细胞定位。本研究为研究 SCMV 侵染甘蔗的分子机制提供了实验证据, 并为甘蔗抗花叶病育种提供了基础数据和实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料及处理方法

SCMV 病毒、甘蔗品种 Badila 组培苗、本氏烟(*Nicotiana benthamiana*)苗由福建农林大学农业农村部福建甘蔗生物学与遗传育种重点实验室提供。2019 年 11 月, 待组培苗长至 15~25 cm、完全展开叶出现 4~5 片时, 摩擦接种 SCMV, 设置 3 个重复, 每个重复 5 株, 对照植株使用磷酸缓冲液(pH 7.0)摩擦接种, 使用 *SCMV-CP* 基因特异引物(表 1)检测接种是否成功。分别在接种后 0 h、4 h、8 h、12 h、18 h、1 d、2 d、3 d、4 d 取样, 研究目的基因应答 SCMV 侵染的表达模式。在隔离网室内随机选取 9 株处于伸长期且长势一致健康的 Badila 植株, 分成 3 组, 每组 3 株。取其白色嫩根、心叶(未展开的叶)、正一叶(甘蔗最高可见肥厚带的第一叶)、正四叶、第四节间、第八节间, 用于研究目的基因的组织表达特性。样品采集后用液氮速冻, 置于-80℃冰箱保存备用。

1.2 总 RNA 提取和 cDNA 合成

使用 TRIzol (Invotrigen, USA)试剂, 按照说明书要求提取样品总 RNA, 用 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量。使用 Nanodrop (Thermo Scientific, USA)测定 RNA 的浓度, 按照 Prime Script RT Reagent Kit 使用说明书, 将 RNA 反转录成 cDNA。

1.3 *ScCRT1* 基因的克隆及生物信息学分析

以筛选酵母文库获得的 *CRT* 基因序列为参考, 通过同源克隆的方法, 在起始密码子和终止密码子附近设计 *ScCRT1* 基因的特异扩增引物(表 1)。以反转录获得的 cDNA 为模板, 使用 PrimeSTAR GXL DNA polymerase (TaKaRa Bio, Japan)高保真酶, 参照 Shinohara 等^[38]的方法克隆 *ScCRT1* 基因, 并送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

表 1 本研究使用的引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')	用途 Strategy
ScCRT1-F	ATGGCGATCCTCGAGAGG	基因克隆
ScCRT1-R	CTAGAGCTCATCATGTTA	Gene cloning
BD-ScCRT1-F	ATTAACAAGGCCATTACGGCCATGGCGATCCTCGAGAGGTC	酵母双杂交诱饵载体构建
BD-ScCRT1-R	AACTGATTGGCCGAGGCGGCCCGAGCTCATCATGTTTAGCATC	Vector generation for Y2H
221-ScCRT1-F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCGATCCTCGAGAGGTC	亚细胞定位
221-ScCRT1-R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGCGAGCTCATCATGTTTAGCAT	Subcellular localization
ScCRT1-qF	CGCCAAGAAGTTAGCAGAGGAGAC	定量 PCR
ScCRT1-qR	CCTTGTCATCGTCCGCATCATCC	Real-time-qPCR
GAPDH-F	CACGGCCACTGGAAGCA	内参基因
GAPDH-R	TCCTCAG GGTTCTCTGATGCC	Reference gene
eEF-1 α -F	TTTCACACTTGAGTGAAGCAGAT	内参基因
eEF-1 α -R	GACTTCCTTACAATCTCATCATAA	Reference gene
SCMV-CP-F	TACAGAGAGACACACAGCTG	SCMV 检测
SCMV-CP-R	ACGCTACACCAGAAGACACT	Detection of SCMV

将测序获得目的基因序列, 利用 NCBI 中的 ORF finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 软件分析开放阅读框, 并获取其氨基酸序列。利用 ProtParam (<http://expasy.org/tools/protparam.html>) 预测蛋白的一级结构、理化性质; 利用 GOR4 (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html)、SignalP 5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 和 TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 分别预测分析其二级结构、信号肽和跨膜特性; 用 Blastp 在线工具查找 ScCRT1 的同源氨基酸序列, 使用 DNAMAN 6.0 软件多重比对同源氨基酸序列, 使用 ClustalX 和 MEGA 7.0 的 ML (maximum likelihood, LG+G) 法构建系统进化树。

1.4 ScCRT1 的 RT-qPCR 表达分析

根据 ScCRT1 基因的 ORF 序列, 设计特异性实时荧光定量 PCR 引物(表 1), 以 GAPDH 基因和 eEF-1 α 基因(表 1)作为内参基因^[39]。按照 SYBR Green PCR Master Mix (Roche)说明书配制定量反应体系, 在荧光定量 PCR 仪上完成定量 PCR 扩增。每个样品设置 3 次技术重复, 以无菌水作对照, 扩增程序为 50 2 min, 95 10 min; 95 15 s, 60 1 min, 40 个循环。反应结束后, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 算法分析获得的数据^[40]。

1.5 ScCRT1 的亚细胞定位

参照 Cheng 等^[29]的方法, 利用 Gateway 方法将 ScCRT1 构建到 pEarlyGate101 载体中, 获得 ScCRT1

亚细胞定位质粒 ScCRT1-YFP 并转入农杆菌 EHA105 中。取健康的本氏烟植株, 参照 Cheng 等^[29]农杆菌侵染方法, 将带有重组质粒的农杆菌注射入健康的本氏烟叶片。48 h 后在激光共聚焦显微镜 (Leica TCS SP5II) 下观察本氏烟叶片表皮细胞中 ScCRT1 蛋白的定位, YFP 的激发光波长为 514 nm, 捕获波长为 530~590 nm。

1.6 Y2H 验证 ScCRT1 与 SCMV-6K2 的互作

参照 Zhang 等^[34]的方法构建 ScCRT1 基因的诱饵载体 pBT3-SET-ScCRT1, 利用 Y2H 技术验证其与 pPR3-N-SCMV-6K2 的互作关系。pTSU2-APP 和 pNubG-Fe65 组合作为阳性对照, pNubG-Fe65 和 pPR3-N 组合作为阴性对照, pBT3-SET-ScCRT1 和 pPR3-N 组合为自激活验证。

1.7 BiFC 验证 ScCRT1 与 SCMV-6K2 的互作

参照 Cheng 等^[29]的方法构建 ScCRT1-YC 载体, 利用 BiFC 技术验证其与 YN-SCMV-6K2 的互作。YFP 的激发光波长为 514 nm, 捕获波长为 530~590 nm; 叶绿素自荧光的激发光波长为 552 nm, 采集波长为 650~680 nm。

2 结果与分析

2.1 ScCRT1 基因的克隆与生物信息学分析

经 PCR 扩增和测序, 本研究从 Badila 中克隆了 1 条 ORF 长度为 1281 bp 的 CRT 基因, 该基因编码 426 个氨基酸。核苷酸序列比对表明, 该 CRT 序列与高粱的 CRT1 (*Sorghum bicolor*, XM_021451918.1)

同源性高达 96.49%, 将该基因命名为 *ScCRT1*, 并提交 GenBank, 登录号为 MT635395。ProtParam 分析表明, *ScCRT1* 的分子量为 48.22 kD, 等电点为 4.43; 不稳定系数为 35.67, 为稳定蛋白; 脂溶指数为 63.29, 总平均亲水性是 -1.023, 可能是亲水性蛋白。GOR4 预测表明, *ScCRT1* 中无规则卷曲占比最高, 达到 60.09%; 其次是延伸链和 α 螺旋, 占比分别为 20.19% 和 19.72%; 无 β -折叠结构。跨膜结构域预测结果表明, *ScCRT1* 具有 1 个跨膜结构域, 其分布在 13~35, 膜向性为 i→o。SignalP 5.0 分析表明,

ScCRT1 蛋白含有信号肽, 且信号肽的剪切位点位于第 31 和 32 号氨基酸之间(图 1), 为分泌蛋白。

2.2 *ScCRT1* 的氨基酸序列同源性分析和系统进化树分析

典型的 CRT 蛋白含有 3 个不同的结构和功能域: 高度保守的球状 N-结构域, 其末端含有一个信号肽序列; P-结构域, 具有高亲和力和低 Ca^{2+} 结合能力; C-结构域表现出低亲和力和高的 Ca^{2+} 结合能力, 其末端包含有 (K/H)DEL 内质网滞留信号^[1-2]。在 *ScCRT1* 氨基酸中发现具有上述典型的 CRT 的 3 个

图 1 甘蔗钙网蛋白(*ScCRT1*)氨基酸序列比对与结构域

Fig. 1 Amino acid sequence alignment and domains of *Saccharum calreticulin* (*ScCRT1*)

高粱: SbCRT1 (XP_021307591.1); 玉米: ZmCRT1 (XP_008670080.1); 谷子: SiCRT1 (XP_004981159.1); 二穗短柄草: BdcRT1 (XP_003563166.1); 水稻: OsCRT1 (XP_015628738.1); 拟南芥: AtCRT1 (NP_176030.1)。黑色背景中的蛋白残基为相同的部分。箭头表示 3 个结构域(N, P 和 C)的起始位置。预测的信号肽、保守的 CRT 家族基序(CRT motif 1: KHEQKLDCCGGYVKLL; CRT motif 2: IMFGPDICG)、3 个重复的残基(A: PXXIXDPXX KKPEXWDD; B: GXWAXXXIXNPXYK, X 为任意氨基酸)^[1]和内质网滞留信号 HDEL 用黑色下划线标记。假定的核靶向序列(PPKKIKDPE)用红色下划线标记。

Sorghum bicolor: SbCRT1 (XP_021307591.1); *Zea mays*: ZmCRT1 (XP_008670080.1); *Setaria italica*: SiCRT1 (XP_004981159.1); *Brachypodium distachyon*: BdcRT1 (XP_003563166.1); *Oryza sativa*: OsCRT1 (XP_015628738.1); *Arabidopsis thaliana*: AtCRT1 (NP_176030.1). Protein residues on the black background in all of these proteins are identical. The arrows indicate the approximate positions of the three domains (N, P and C). The predicted signal peptide, conserved CRT family motifs (CRT motif 1: KHEQKLDCCGGYVKLL; CRT motif 2: IMFGPDICG), triplicate repeats (A: PXXIXDPXX KKPEXWDD; B: GXWAXXXIXNPXYK, X represents arbitrary residue)^[1] and the endoplasmic reticulum retention sequence HDEL was underlined in black. The putative nuclear targeting sequence (PPKKIKDPE) was underlined in red.

结构域组成, 残基 1~31 的疏水信号肽序列, 残基 32~216 的球形 N-结构域, 残基 217~313 的富含脯氨酸 P-结构域, 残基 314~426 的多酸性氨基酸 C-结构域并含有内质网滞留信号 HDEL 基序(图 1)。通过 NCBI 网站的 Blastp 和 Phytozome 网站的 Proteome Blastp 搜索 ScCRT1 同源序列, 结果显示, ScCRT1 蛋白与高粱(XP_021307591.1)、玉米(*Zea mays*, XP_008670080.1)、二穗短柄草(*Brachypodium distachyon*, XP_003563166.1)、谷子(*Setaria italic*, XP_004981159.1)、水稻(*Oryza sativa*, XP_015628738.1)和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, NP_176030.1)的 CRT 蛋白相似度分别为 96%、90%、92%、86%、78%、72%。对甘蔗及其他物种 CRT 蛋白的氨基酸序列同源性分析表明, 在其 N-结构域和 P-结构域氨基酸序列高度保守, 信号肽序列和 C-结构域氨基酸序列因物种的不同表现出明显的差异(图 1)。

使用 ClustalX 和 MEGA 7.0 的 ML (maximum

likelihood, LG+G)法构建系统进化树, 分析 ScCRT1 蛋白与其他物种 CRT 蛋白的进化关系。结果表明, 植物 CRTs 蛋白主要分为 2 种亚型: CRT1/CRT2 亚型和 CRT3 亚型。在拟南芥中 CRT 含有 AtCRT1 (AT1G56340.2)、AtCRT2 (AT1G09210.1)和 AtCRT3 (AT1G08450.1) 3 种蛋白, 包括 2 个蛋白亚型; 其中 AtCRT1 与 AtCRT2 相似性很高, 为 CRT1/CRT2 亚型; AtCRT3 为 CRT3 亚型, 该亚型与 CRT1/CRT2 亚型存在着较大差异^[41-42]。基于进化树分析, 我们克隆的 ScCRT1 蛋白属于 CRT1/CRT2 亚型(图 2)。

单子叶植物甘蔗、高粱、柳枝稷(*Panicum virgatum*)、水稻、谷子、大麦(*Hordeum vulgare*)、二穗短柄草形成群 I; 双子叶植物烟草(*Nicotiana tabacum*)、葡萄(*Vitis vinifera*)、三叶杨(*Populus trichocarpa*)、大豆(*Glycine max*)、苜蓿(*Medicago sativa*)、拟南芥形成群 II (图 2)。在遗传进化上, CRT 蛋白在单子叶植物和双子叶植物之间存在明显的分化。

图 2 ScCRT1 与其他物种 CRT 蛋白的系统进化树分析

Fig. 2 Phylogenetic tree analysis of ScCRT1 protein and CRT proteins from other plant species

2.3 *ScCRT1* 的亚细胞定位

在激光共聚焦显微镜下观察烟草瞬时表达 *ScCRT1*-YFP 融合蛋白的黄色荧光在细胞内的分布(图 3); *ScCRT1*-YFP 融合蛋白的黄色荧光信号为典型的内质网定位信号, 表明其主要定位于内质网。

图 3 *ScCRT1*-YFP 在本氏烟表皮细胞中的定位

Fig. 3 Subcellular localization of *ScCRT1* fused with YFP in the epidermal cells of *N. benthamiana*

A: *ScCRT1*-YFP 荧光信号; B: 明场; C: 合并。标尺为 25 μm 。
A: fluorescent signal of *ScCRT1*-YFP; B: bright field; C: merged pictures. Bar = 25 μm .

2.4 *ScCRT1* 基因的组织特异性表达及应答 SCMV 侵染的表达模式

基于 RT-qPCR 技术, 以根中 *ScCRT1* 基因的表达量为参照基准, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对甘蔗各组织 *ScCRT1* 基因表达量的分析结果(图 4)表明, *ScCRT1* 基因的表达具有明显的组织特异性, 在不同组织中的表达量差异较显著, 其在心叶中的相对表达量最高, 根和正一叶次之, 第八节间中表达量最少。使用 *SCMV-CP* 基因特异引物(表 1)检测 SCMV 接种的甘蔗, 选出扩增出目的片段的样品, 进行 *ScCRT1* 基因应答 SCMV 侵染的 RT-qPCR 试验。结果显示 SCMV

图 4 *ScCRT1* 基因在甘蔗不同组织中的表达模式

Fig. 4 Expression profile of *ScCRT1* in different sugarcane tissues

误差线为每组处理的标准误差($n = 3$)。Root: 根; Leaf roll: 心叶; 1st leaf: 正一叶; 4th leaf: 正四叶; 4th internode: 第四节间; 8th internode: 第八节间。柱上不同的小写字母表示在 $P < 0.05$ 时显著性的差异。

The error bars represent the standard error of each treatment group ($n = 3$). Bars superscripted by different lowercase letters are significantly different at $P < 0.05$.

的侵染对 *ScCRT1* 基因表达的影响显著, 与对照相比, *ScCRT1* 基因在侵染早期显著上调, 在 12 h 时表达量达到最大值, 然后下调表达, 但仍显著高于对照(图 5)。

图 5 *ScCRT1* 基因应答 SCMV 侵染的表达模式

Fig. 5 Expression profile of *ScCRT1* under the infection of SCMV

误差线为每组处理的标准误差($n = 3$)。柱上不同的小写字母表示在 $P < 0.05$ 时显著性的差异。

The error bars represent the standard error of each treatment group ($n = 3$). Bars superscripted by different lowercase letters are significantly different at $P < 0.05$.

2.5 *ScCRT1* 与 SCMV-6K2 的互作验证

Y2H 试验结果显示, pBT3-SET-*ScCRT1* 和 pPR3-N 共转酵母细胞 *NMY51* 和阴性对照在添加了 5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷(X-Gal)的 SD/-Leu/-Trp (DDO)培养基上生长, 但在添加了 X-Gal 的 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade (QDO)培养基上不生长; pBT3-SET-*ScCRT1* 和 pPR3-N-SCMV-6K2 共转的酵母菌株 *NMY51* 和阳性对照在添加了 X-Gal 的 DDO 和 QDO 培养基上可以生长并呈现蓝色(图 6)。表明 pBT3-SET-*ScCRT1* 不具有自激活性; *ScCRT1* 与 SCMV-6K2 蛋白在体外互作。

BiFC 试验结果表明, 共注射的 YN-6K2 和 *ScCRT1*-YC 在本氏烟叶片表皮细胞中产生黄色荧光信号(图 7), 说明 *ScCRT1* 与 SCMV-6K2 互作, 这与 Y2H 试验结果一致, 进一步表明 *ScCRT1* 与 SCMV-6K2 互作。

3 讨论

尽管病毒与寄主相融, 但是病毒侵染仍然会对寄主造成胁迫, 导致寄主在转录组水平对基因表达进行重新编程, 产生大量差异表达基因^[43-46]。本课题组前期研究表明, 甘蔗花叶病另外 1 个主要病原甘蔗条纹花叶病毒(*Sugarcane streak mosaic virus*, SCSMV, *Poacevirus*)侵染甘蔗品种 FN40 导致 *CRT* 基因表达上调^[45]。本研究中, *ScCRT1* 基因在 SCMV 侵染早期表达上调, 随着时间加长逐渐下降, 但仍

图 6 Y2H 检测 ScCRT1 与 SCMV-6K2 的互作

Fig. 6 Protein-protein interactions between ScCRT1 and SCMV-6K2 by Y2H assay

pNubG-Fe65 和 pTSU2-APP 组作为阳性对照, pNubG-Fe65 和 pPR3-N 组作为阴性对照。DDO+X-Gal: 添加了 5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-半乳糖苷的缺少亮氨酸(Leu)和色氨酸(Trp)的酵母合成限定基本培养基; QDO+X-Gal: 添加了 X-Gal 的缺少亮氨酸(Leu)、色氨酸(Trp)、组氨酸(His)和腺嘌呤(Ade)的酵母合成限定基本培养基。

The positive and negative controls are yeast cotransformants with plus pNubG-Fe65 pTSU2-APP and pNubG-Fe65 plus pPR3-N, respectively. DDO+X-Gal: synthetic defined yeast minimal medium lacking Leu and Trp but plus the 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl β-D-Galactopyranoside; QDO+X-Gal: synthetic defined yeast minimal medium lacking Leu, Trp, His, and Ade but plus the X-Gal.

图 7 BiFC 检测 ScCRT1 与 SCMV-6K2 的互作

Fig. 7 Interactions between ScCRT1 and SCMV-6K2 by BiFC assay

ScCRT1 融合于 YFP 的 C 末端, SCMV-6K2 融合于 YFP 的 N 末端, 在本氏烟叶片中瞬时表达, 48 h 后激光共聚焦观察(标尺为 25 μm)。ScCRT1 was fused to the C-terminal half of YFP, while SCMV-6K2 was fused to the N-terminal half of YFP. ScCRT1-YC and YN-SCMV-6K2 were transiently co-expressed in the epidermal cells of *N. benthamiana*. The fluorescent signal was monitored by confocal microscopy at 48 hours post inoculation (Bar = 25 μm).

显著高于对照。该结果与番木瓜 *PaCRT* 基因应答番木瓜环斑花叶病毒(*Papaya ringspot virus*, PRSV, *Potyvirus*)侵染的表达模式相似^[21]。这些研究结果表明, *CRT* 应答病毒侵染的分子机制可能相同, 这也与 *CRT* 蛋白结构保守的特性相符。ScCRT1 主要定位在内质网中(图 3)。定位于内质网的 *CRT* 参与了 Ca^{2+} 稳态调控和内质网质控, 对于 Ca^{2+} 依赖的信号传导和新合成蛋白的正确折叠具有重要作用^[9-10]。病毒侵染会造成内质网胁迫, 影响蛋白的正确折叠^[45,47]。因此我们推测 SCMV 侵染甘蔗也会造成内质网胁迫, 干扰 ScCRT1 作为分子伴侣协助蛋白折叠的功能, 为此寄主上调 *ScCRT1* 表达以应答胁迫。

植物病毒与寄主长期协同进化^[48]且结构简单, 必须与寄主因子互作才能建立系统性侵染^[49]。本研究利用 Y2H 和 BiFC 试验证明了 SCMV-6K2 与 ScCRT 的互作(图 6 和图 7), 互作位于内质网和细胞膜, 并且在细胞膜上出现点状结构。我们推测细胞膜上的互作位点有可能位于胞间连丝, 这种互作可能在侵染早期阻碍 SCMV 胞间移动。马铃薯 Y 病毒的胞间移动是以 6K2 诱导内质网形成的囊泡的形式

进行的^[36-37], SCMV-6K2 与 ScCRT1 互作于胞间连丝, 可能由于 *CRT* 的 Ca^{2+} 调节功能, 导致胞间连丝位置 Ca^{2+} 浓度升高, 激活胼胝质合成酶 *Cals* ^[50], 促进胼胝质合成积累, 进而减小胞间连丝的通透性。在烟草应答烟草花叶病毒(*Tobacco mosaic virus*, TMV, *Tobamovirus*)侵染的研究中, 也有类似研究报道。烟草的 *NtCRT* 与 TMV 的运动蛋白互作, 过表达 *NtCRT* 严重影响 TMV 的胞间移动^[8]。在非生物逆境铝离子胁迫下, 小麦、烟草和苜蓿的 *CRT* 上调表达, 与胼胝质共定位沉积于胞间连丝, 阻碍共质体运输^[51-52]。这些研究结果表明, *CRT* 参与调节胞间连丝的通透性。*Badila* 极易感染 SCMV, 在侵染后期, ScCRT1 的表达量下调, 推测胞间连丝胼胝质积累下降, 通透性增加, 便于 SCMV 胞间移动, 最终建立系统性侵染。

病毒在寄主体内建立系统性侵染是一个动态的生物学过程, 6K2 不但参与病毒的复制和胞间移动, 还参与了自噬调节^[53], 6K2 除了与病毒自身编码蛋白 CI、P3 互作^[36,54-55]互作外, 还与很多寄主编码蛋白互作^[34]。而 *CRT* 可能还与病毒编码的其他蛋白互

作, 比如番木瓜的 PaCRT 与番木瓜环斑病毒 (*Papaya ring spot virus*, PRSV, *Potyvirus*) 的 HC-Pro 交互^[21]。因此, 阐明 ScCRT1 在 SCMV 侵染中的作用还需要进一步深入研究, 如 Ca^{2+} 浓度的变化, 过表达或抑制 *ScCRT1* 的表达对 SCMV 的复制和胞间移动的影响等。

4 结论

从甘蔗叶片中克隆到钙网蛋白基因 *ScCRT1*, GenBank 登录号为 MT635395。*ScCRT1* 的 ORF 长度为 1281 bp, 编码 426 aa。亚细胞定位试验表明, ScCRT1 蛋白定位于内质网; RT-qPCR 分析显示, 该基因在心叶等幼嫩组织中表达量较高; 在 SCMV 侵染条件下, *ScCRT1* 基因的表达呈先上调后下调的表达模式; Y2H 与 BiFC 试验表明, ScCRT1 与 SCMV-6K2 蛋白互作。

References

- [1] Michalak M, Corbett E F, Mesaali N, Nakamura K, Opas M. Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem J*, 1999, 344: 281–292.
- [2] Jia X Y, Xu C Y, Jing R L, Li R Z, Mao X G, Wang J P, Chang X P. Molecular cloning and characterization of wheat calreticulin (*CRT*) gene involved in drought-stressed responses. *J Exp Bot*, 2008, 59: 739–751.
- [3] Qiu Y, Xi J, Du L, Poovaiah B W. The function of calreticulin in plant immunity: new discoveries for an old protein. *Plant Signal Behav*, 2012, 7: 907–910.
- [4] Joshi R, Paul M, Kumar A, Pandey D. Role of calreticulin in biotic and abiotic stress signalling and tolerance mechanisms in plants. *Gene*, 2019, 714: 144004.
- [5] Michalak M, Robert Parker J M, Opas M. Ca^{2+} signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Cell Calcium*, 2002, 32: 269–278.
- [6] Gelebart P, Opas M, Michalak M. Calreticulin, a Ca^{2+} -binding chaperone of the endoplasmic reticulum. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005, 37: 260–266.
- [7] Baluška F, Samaj J, Napier R, Volkmann D. Maize calreticulin localizes preferentially to plasmodesmata in root apex. *Plant J*, 1999, 19: 481–488.
- [8] Chen M H, Tian G W, Gafni Y, Citovsky V. Effects of calreticulin on viral cell-to-cell movement. *Plant Physiol*, 2005, 138: 1866–1876.
- [9] Kudla J, Becker D, Grill E, Hedrich R, Hippler M, Kummer U, Parniske M, Romeis T, Schumacher K. Advances and current challenges in calcium signaling. *New Phytol*, 2018, 218: 414–431.
- [10] Michalak M, Groenendyk J, Szabo E, Gold L I, Opas M. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem J*, 2009, 417: 651–666.
- [11] Garg G, Yadav S, Ruchi, Yadav G. Key roles of calreticulin and calnexin proteins in plant perception under stress conditions: a review. *Adv Life Sci*, 2015, 5: 18–26.
- [12] Krysko D V, Ravichandran K S, Vandenabeele P. Macrophages regulate the clearance of living cells by calreticulin. *Nat Commun*, 2018, 9: 4644.
- [13] Fucikova J, Kasikova L, Truxova I, Laco J, Skapa P, Ryska A, Spisek R. Relevance of the chaperone-like protein calreticulin for the biological behavior and clinical outcome of cancer. *Immunol Lett*, 2018, 193: 25–34.
- [14] Venkateswaran K, Verma A, Bhatt A N, Shrivastava A, Manda K, Raj H G, Prasad A, Len C, Parmar V S, Dwarakanath B S. Emerging roles of calreticulin in cancer: implications for therapy. *Curr Protein Pept Sci*, 2018, 19: 344–357.
- [15] Menegazzi P, Guzzo F, Baldan B, Mariani P, Treves S. Purification of calreticulin-like protein(s) from spinach leaves. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, 190: 1130–1135.
- [16] Li Z J, Onodera H, Ugaki M, Tanaka H, Komatsu S. Characterization of calreticulin as a phosphoprotein interacting with cold-induced protein kinase in rice. *Biol Pharm Bull*, 2003, 26: 256–261.
- [17] Xiang Y, Lu Y H, Song M, Wang Y, Xu W Q, Wu L T, Wang H C, Ma Z Q. Overexpression of a *Triticum aestivum* calreticulin gene (*TaCRT1*) improves salinity tolerance in tobacco. *PLoS One*, 2015, 10: e0140591.
- [18] Pröbsting M, Schenke D, Hossain R, Häder C, Thureau T, Wighardt L, Schuster A, Zhou Z, Ye W Z, Rietz S, Leckband G, Cai D. Loss of function of CRT1a (calreticulin) reduces plant susceptibility to *Verticillium longisporum* in both *Arabidopsis thaliana* and oilseed rape (*Brassica napus*). *Plant Biotechnol J*, 2020. doi:10.1111/pbi.13394.
- [19] Saijo Y, Tintor N, Lu X, Rauf P, Pajeroska-Mukhtar K, Häweler H, Dong X N, Robatzek S, Schulze-Lefert P. Receptor quality control in the endoplasmic reticulum for plant innate immunity. *EMBO J*, 2009, 28: 3439–3449.
- [20] Caplan J L, Zhu X, Mamillapalli P, Marathe R, Anandalakshmi R, Dinesh-Kumar S P. Induced ER chaperones regulate a receptor-like kinase to mediate antiviral innate immune response in plants. *Cell Host Microbe*, 2009, 6: 457–469.
- [21] Shen W T, Yan P, Gao L, Pan X Y, Wu J Y, Zhou P. Helper component-proteinase (HC-Pro) protein of *Papaya ringspot virus* interacts with papaya calreticulin. *Mol Plant Pathol*, 2010, 11: 335–346.
- [22] 翁卓, 黄寒. 中国制糖产业竞争力对比与政策建议——基于对巴西、印度、泰国考察的比较. *甘蔗糖业*, 2015, (4): 65–72. Weng Z, Huang H. Comparative analysis on China's sugar industry competitiveness: based on the comparison of Brazil, India and Thailand Sugar Industry. *Sugar Canesugar*, 2015, (4): 65–72 (in Chinese with English abstract).
- [23] 刘晓雪, 王新超. 2017/18 榨季中国食糖生产形势分析与 2018/19 榨季展望. *农业展望*, 2018, 14(11): 40–46. Liu X X, Wang X C. Domestic sugar production situation in 2017/18 crushing season and its prospect for 2018/19 crushing season. *Outlook Agric*, 2018, 14(11): 40–46 (in Chinese with English abstract).
- [24] 刘燕群, 李玉萍, 梁伟红, 宋启道, 秦小立, 叶露. 国外甘蔗产业发展现状. *世界农业*, 2015, (8): 147–152.

- Liu Y Q, Li Y P, Liang H W, Song Q D, Qin X L, Ye L. Current status and development of the abroad sugarcane industry. *World Agric*, 2015, (8): 147–152 (in Chinese with English abstract).
- [25] 梁姗姗, 罗群, 陈如凯, 高三基. 引起甘蔗花叶病的病原分子生物学进展. *植物保护学报*, 2017, 44: 363–370.
- Liang S S, Luo Q, Chen R K, Gao S J. Advances in researches on molecular biology of viruses causing sugarcane mosaic. *Acta Phytophy Sin*, 2017, 44: 363–370 (in Chinese with English abstract).
- [26] 李文凤, 单红丽, 张荣跃, 王晓燕, 罗志明, 尹炯, 仓晓燕, 李婕, 黄应昆. 我国新育成甘蔗品种(系)对甘蔗线条花叶病毒和高粱花叶病毒的抗性评价. *植物病理学报*, 2018, 48: 389–394.
- Li W F, Shan H L, Zhang R Y, Wang X Y, Luo Z M, Yin J, Cang X Y, Li J, Huang Y K. Screening for resistance to *Sugarcane streak mosaic virus* and *Sorghum mosaic virus* in new elite sugarcane varieties/clones from China. *Acta Phytopathol Sin*, 2018, 48: 389–394 (in Chinese with English abstract).
- [27] 冯小艳, 王文治, 沈林波, 冯翠莲, 张树珍. 甘蔗线条花叶病毒研究进展. *生物技术通报*, 2017, 33(7): 22–28.
- Feng X Y, Wang W Z, Shen L B, Feng C L, Zhang S Z. Research advances on *Sugarcane streak mosaic virus*. *Biotechnol Bull*, 2017, 33(7): 22–28 (in Chinese with English abstract).
- [28] Wu L, Zu X, Wang S, Chen Y. *Sugarcane mosaic virus*-long history but still a threat to industry. *Crop Prot*, 2012, 42: 74–78.
- [29] Cheng G Y, Dong M, Xu Q, Peng L, Yang Z T, Wei T Y, Xu J S. Dissecting the molecular mechanism of the subcellular localization and cell-to-cell movement of the *Sugarcane mosaic virus* P3N-PIPO. *Sci Rep*, 2017, 7: 9868.
- [30] 郑艳茹, 翟玉山, 邓宇晴, 成伟, 程光远, 杨永庆, 徐景升. 甘蔗花叶病毒(SCMV)种群结构分析. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 2016, 45(2): 135–140.
- Zheng Y R, Zhai Y S, Deng Y Q, Cheng W, Cheng G Y, Yang Y Q, Xu J S. The population structure of *Sugarcane mosaic virus* (SCMV). *J Fujian Agric For Univ* (Nat Sci Edn), 2016, 45(2): 135–140 (in Chinese with English abstract).
- [31] 邓宇晴, 杨永庆, 翟玉山, 程光远, 彭磊, 郑艳茹, 林彦铨, 徐景升. 甘蔗花叶病毒福州分离物全基因组克隆及种群分析. *植物病理学报*, 2016, 46: 775–782.
- Deng Y Q, Yang Y Q, Zhai Y S, Cheng G Y, Peng L, Zheng Y R, Lin Y Q, Xu J S. Genome cloning of two *Sugarcane mosaic virus* isolates from Fuzhou and phylogenetic analysis of SCMV. *Acta Phytopathol Sin*, 2016, 46: 775–782 (in Chinese with English abstract).
- [32] Olsper A, Carr J P, Firth A E. Mutational analysis of the *Potyviridae* transcriptional slippage site utilized for expression of the P3N-PIPO and P1N-PISPO proteins. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44: 7618–7629.
- [33] Schaad M C, Jensen P E, Carrington J C. Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum targeted viral protein. *EMBO J*, 199, 16: 4049–4059.
- [34] Zhang H, Cheng G Y, Yang Z T, Wang T, Xu J S. Identification of sugarcane host factors interacting with the 6K2 protein of the *Sugarcane mosaic virus*. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 3867.
- [35] Grangeon R, Jiang J, Wan J, Agbeci M, Zheng H Q, Laliberté J F. 6K2-induced vesicles can move cell to cell during *Turnip mosaic virus* infection. *Front Microbiol*, 2013, 4: 351–360.
- [36] Movahed N, Patarroyo C, Sun J, Vali H, Laliberté J F, Zheng H. Cylindrical inclusion protein of *Turnip mosaic virus* serves as a docking point for the intercellular movement of viral replication vesicles. *Plant Physiol*, 2017, 175: 1732–1744.
- [37] Movahed N, Sun J, Vali H, Laliberté J F, Zheng H. A host ER fusogen is recruited by *Turnip mosaic virus* for maturation of viral replication vesicles. *Plant Physiol*, 2019, 179: 507–518.
- [38] Shinohara S, Fitriana Y, Satoh K, Narumi I, Saito T. Enhanced fungicide resistance in *Isaria fumosorosea* following ionizing radiation-induced mutagenesis. *FEMS Microbiol Lett*, 2013, 349: 54–60.
- [39] Guo J L, Ling H, Wu Q B, Xu L P, Que Y X. The choice of reference genes for assessing gene expression in sugarcane under salinity and drought stresses. *Sci Rep*, 2014, 4: 7042.
- [40] Iskandar H M, Simpson R S, Casu R E, Bonnett G D, Maclean D J, Manners J M. Comparison of reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of gene expression in sugarcane. *Plant Mol Biol Rep*, 2004, 22: 325–337.
- [41] Nelson D, Glaunsinger B, Bohnert H J. Abundant accumulation of the calcium-binding molecular chaperone calreticulin in specific floral tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 1997, 114: 29–37.
- [42] Jia X Y, He L H, Jing R L, Li R Z. Calreticulin: Conserved protein and diverse functions in plants. *Physiol Plant*, 2010, 136: 127–138.
- [43] Whitham S A, Yang C, Goodin M M. Global impact: elucidating plant responses to viral infection. *Mol Plant Microbe Interact*, 2006, 19: 1207–1215.
- [44] Bengvella L, Waikhom S D, Allie F, Rey C. Virus tolerance and recovery from viral induced-symptoms in plants are associated with transcriptome reprogramming. *Plant Mol Biol*, 2015, 89: 243–252.
- [45] Dong M, Cheng G Y, Peng L, Xu Q, Yang Y Q, Xu J S. Transcriptome analysis of sugarcane response to the infection by *Sugarcane streak mosaic virus* (SCSMV). *Trop Plant Biol*, 2017, 10: 45–55.
- [46] Akbar S, Yao W, Yu K, Qin L F, Ruan M H, Powell C A, Chen B S, Zhang M Q. Photosynthetic characterization and expression profiles of sugarcane infected by *Sugarcane mosaic virus* (SCMV). *Photosynth Res*, 2020. doi: 10.1007/s1120-019-00706-w.
- [47] Verchot J. How does the stressed out ER find relief during virus infection. *Curr Opin Virol*, 2016, 17: 74–79.
- [48] Fraile A, García-Arenal F. The coevolution of plants and viruses: resistance and pathogenicity. *Adv Virus Res*, 2010, 76: 1–32.
- [49] Wang A. Dissecting the molecular network of virus-plant interactions: the complex roles of host factors. *Annu Rev Phytopathol*, 2015, 53: 45–66.
- [50] Aidemark M, Andersson C J, Rasmusson A G, Widell S. Regulation of callose synthase activity in situ in alamethicin-permeabilized *Arabidopsis* and tobacco suspension cells. *BMC Plant Biol*, 2009,

- 9: 27.
- [51] Sivaguru M, Fujiwara T, Šamaj J, Baluška F, Yang Z, Osawa H, Maeda T, Mori T, Volkmann D, Matsumoto H. Aluminum-induced 1→3-β-d-glucan inhibits cell-to-cell trafficking of molecules through plasmodesmata. A new mechanism of aluminum toxicity in plants. *Plant Physiol*, 2000, 124: 991–1006.
- [52] Sujkowska-Rybkowska M, Znojek E. Localization of calreticulin and calcium ions in mycorrhizal roots of *Medicago truncatula* in response to aluminum stress. *J Plant Physiol*, 2018, 229: 22–31.
- [53] Li F F, Zhang C W, Tang Z W, Zhang L R, Dai Z J, Lyu S W, Li Y Z, Hou X L, Bernards M, Wang A M. A plant RNA virus activates selective autophagy in a UPR-dependent manner to promote virus infection. *New Phytol*, 2020. doi: 10.1111/nph.16716.
- [54] Wei T Y, Zhang C W, Hong J, Xiong R Y, Kasschau K D, Zhou X P, Carrington J C, Wang A M. Formation of complexes at plasmodesmata for potyvirus intercellular movement is mediated by the viral protein P3N-PIPO. *PLoS Pathog*, 2010, 6: e1000962.
- [55] Chai M, Wu X, Liu J, Fang Y, Luan Y M, Cui X Y, Zhou X P, Wang A M, Cheng X F. P3N-PIPO interacts with P3 via the shared N-terminal domain to recruit viral replication vesicles for cell-to-cell movement. *J Virol*, 2020, 94: e01898-19.