

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(7):962-968; 4 July 2010
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

小麦条锈菌 *PsNCS1* 基因的克隆及转录表达特征

郭军, 张洪, 丁可, 代西维, 陈玥颖, 段迎辉, 黄丽丽, 康振生*

(西北农林科技大学植物保护学院, 陕西省农业分子生物学重点实验室, 杨凌 712100)

摘要:【目的】克隆小麦条锈菌神经钙离子感应蛋白基因 *PsNCS1*, 分析其在病菌不同发育时期的表达水平。【方法】利用文库筛选和 RT-PCR 技术克隆 *PsNCS1* 的 cDNA 序列, 采用生物信息学技术预测分析该基因编码蛋白的保守结构域及基本特性, 构建系统发育树; 运用实时荧光定量 RT-PCR 技术分析 *PsNCS1* 在病菌不同生长发育时期的表达水平。【结果】*PsNCS1* 全长 cDNA 为 1007 bp (GenBank 登录号 GU134621), 开放阅读框为 573 bp, 编码 190 个氨基酸, 分子量为 22.17 kDa, 等电点为 4.96。编码蛋白含有 4 个钙结合蛋白的保守结构域 EF-hand, 并且具有 N 末端豆蔻酰化特征。编码蛋白与担子菌门真菌 NCS 蛋白相似性最高, 其中与小麦秆锈菌的 NCS 亲缘关系最近, 序列相似性达 96%。*PsNCS1* 在夏孢子和芽管时期表达量较高, 均超过其他发育阶段基因表达量的 2 倍。【结论】*PsNCS1* 可能参与了条锈菌夏孢子的形成和芽管的延伸。*PsNCS1* 的克隆与表达分析为进一步研究条锈菌细胞钙信号传导机理和致病机制奠定了基础。

关键词: 小麦条锈菌; 神经钙离子感应蛋白; 基因克隆; 实时定量 RT-PCR

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 07-0962-07

由条锈病菌 (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, *Pst*) 引起的小麦条锈病是我国小麦生产上最重要的病害之一^[1]。在适宜条件下条锈菌夏孢子在小麦叶片表面萌发产生芽管, 经延伸后在小麦气孔上形成附着孢, 附着孢产生入侵栓, 穿过气孔, 进入寄主体内并随即形成气孔下泡囊, 然后依次产生侵染丝、初生吸器和次生菌丝, 最后在小麦组织内形成菌落。在条锈菌侵染小麦的过程中, 病菌的生长发育伴随着细胞内钙离子水平的动态变化。胞质游离钙离子是真核生物钙信号系统调节细胞反应的主要因子, 钙离子通过结合钙结合蛋白将应激信号传递并引起级联反应, 从而使病菌对外界做出反应^[2]。因此, 研究条锈菌钙结合蛋白的特点和功能, 对于揭示

条锈菌细胞钙信号传导机理和致病机制具有重要意义。

神经钙离子感应蛋白 (Neuronal Calcium Sensor, NCS) 为一大类钙离子结合蛋白, 在真核生物中普遍存在^[3]。NCS 蛋白最早在哺乳动物的神经元和神经分泌细胞中发现, 具有调控突触传递和可塑性的作用^[4]。这类蛋白家族一般具有 EF-hand 结构域, 能结合 2-3 个钙离子, 此外, 有些 NCS 蛋白 N 末端具有豆蔻酰化特征^[5]。目前对 NCS 蛋白家族的生物学功能知之较少, 现有研究表明, NCS 蛋白参与生物体内的 mRNA 定位、细胞凋亡和胞内运输^[2]。关于 NCS 蛋白基因在真菌中的作用, 目前只有在 4 个真菌中报道过。1999 年 Hendricks 等^[6]首

基金项目: 公益性行业 (农业) 科技专项 (200903035-2); 国家“973 项目” (2006CB100203); 现代农业产业技术体系建设专项资金资助; 高等学校学科创新引智计划资助项目 (B07049); 教育部科学技术研究重点项目 (107104); 西北农林科技大学青年学术骨干支持计划

* 通信作者。Tel/Fax: +86-29-87080061; E-mail: Kangzs@nwsuaf.edu.cn

作者简介: 郭军 (1974-), 男, 山东诸城人, 副教授, 博士, 主要从事分子植物病理学研究。E-mail: guojunwgq@nwsuaf.edu.cn

收稿日期: 2009-12-26; **修回日期:** 2010-02-08

先研究了酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中的 NCS 蛋白 Frg1p, 发现该蛋白 N 末端具有豆蔻酰化特征, 同时也是钙离子结合的必需蛋白。Saitoh 等^[7] 从稻瘟菌 (*Magnaporthe grisea*) 中克隆获得一个 NCS 蛋白基因 *Mg-NCS-1*, 对该基因无效突变体菌株的表现型进行了研究。研究表明, 该基因无效突变体菌株能够正常生长且与亲本菌株致病性基本无差异, 但是高浓度的钙离子和酸性条件下会抑制突变体菌株的生长。在粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 中, Hamasaki-Katagiri 等^[8] 研究表明 Ncs1p 具有结合钙离子和 N 末端豆蔻酰化特征, 并且具有调节粟酒裂殖酵母的孢子形成和提高钙胁迫耐性的功能。Mota 等^[9] 对烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*) 的 NCSA 研究表明, *ncsA* 对烟曲霉菌丝顶端甾酮的分布以及芽管形成具有重要的作用, 而对烟曲霉的毒性影响不大。然而, 关于该类基因在锈菌中的相关研究, 目前尚未见报道。

本研究克隆到一个小麦条锈菌 NCS 基因 *PsNCS1*, 对该基因编码的蛋白进行了预测分析, 构建了系统进化树, 分析了其亲缘关系和进化属性, 并利用实时荧光定量 RT-PCR 的方法检测了该基因在病菌不同发育时期的表达水平, 这将为进一步研究该基因在小麦条锈菌钙信号途径和致病过程中的作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器: Biozol 试剂购自 BioFlux 公司, M-MLV reverse transcriptase 试剂盒购自 Invitrogen 公司, 逆转录酶和 *Taq* DNA 聚合酶分别购自 TaKaRa 公司和 Fermentas 公司, pGEM-T easy 载体购自 Promega 公司。所用仪器 ABI 3730XL 测序仪和 ABI PRISM 7500 实时定量 PCR 仪均购自 Applied Biosystems 公司。

1.1.2 供试菌种和小麦品种: 供试小麦品种为“铭贤 169”, 小麦条锈菌为 CYR32 生理小种, 均由西北农林科技大学植保学院植物免疫实验室提供。小麦幼苗的培育和条锈菌的接种按照 Kang 的方法进行^[10]。将小麦条锈菌 CYR32 接种到小麦“铭贤 169”上, 分别于接种后 12、24、72、96、168、216、264 h 时取样, 剪取叶片迅速置于液氮中, -80℃ 保存备用。小麦条锈菌夏孢子的萌发和芽管的收集参照

Zhang 等^[11] 的报道。

1.2 条锈菌总 RNA 的提取和 cDNA 合成

采用 Biozol 试剂提取条锈菌夏孢子、萌发夏孢子及不同接种时间的总 RNA。第一链 cDNA 合成按照 M-MLV reverse transcriptase 试剂盒操作说明进行, 逆转录引物采用 oligo d(T)₁₈。

1.3 条锈菌 *PsNCS1* 的 cDNA 序列克隆

在本实验室构建的小麦条锈菌夏孢子萌发 cDNA 文库和小麦条锈菌与小麦亲和互作 cDNA 文库中找到两个与 NCS 蛋白相似度较高的 EST 序列 Ps_5158 (Genbank 登录号 ES322819) 和 WRIS_5545 (Genbank 登录号 GR304801)。从所保存的基因文库中找到两个菌株进行质粒提取, 酶切鉴定后采用 T7 和 SP6 引物进行双向测序。获得的序列去载体, 用 DNASTar 软件完成拼接获得基因 *PsNCS1* 的 cDNA 全长。为验证该基因开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF) 的正确性, 利用 Primer Premier 5.0 软件在序列两端设计一对引物 PF1 (5'-ACAGAACCACAACACTACGAG-3') 和 PR1 (5'-GCAGATAGGAAAACGAATTC-3')。以小麦条锈菌夏孢子 cDNA 为模板, 扩增得到 PCR 产物。PCR 程序为: 95℃ 4 min; 94℃ 30 s, 52℃ 30 s, 72℃ 2 min, 40 个循环; 72℃ 10 min。1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, PCR 产物胶回收后连接至 pGEM-T easy 载体, M13+ 和 M13-引物进行测序。

1.4 序列分析

利用 ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 对序列的开放阅读框进行查找; 一级结构用 ProtParam 程序 (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) 预测; 蛋白质亚细胞定位用 Psort (<http://wolfsort.org/>) 预测; 信号肽预测采用 SignalP 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>); 序列糖基化残基预测采用 NetGlycate 1.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGlycate/>); 氨基酸序列磷酸化位点预测采用 NetPhos 2.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>); 运用 ExPASy 的 ProtScale 程序对氨基酸序列 (<http://www.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>) 进行疏水性分析; 蛋白质结构功能域用 InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/>) 程序进行预测。利用 Mega4.0 和 DNAMAN6.0 等软件进行蛋白的多重序列比对和系

统进化树构建。

1.5 实时荧光定量 RT-PCR 分析

根据 *PsNCS1* 基因的 cDNA 序列, 利用 Premier 5.0 软件设计定量 RT-PCR 引物(上游引物: 5'-AGCAACAGCCAAAGCCAACC-3'; 下游引物 5'-CTCGTAGTGTGTGGTCTGTGCC-3')。选用小麦条锈菌肌动蛋白(Actin)基因作为内参(上游引物: 5'-TTGGATTCTGGAGATGGTGTC-3'; 下游引物: 5'-CTCTTCGGCGGTGGTAGTGA-3')。应用 ABI PRISM 7500 实时定量 PCR 仪, 以夏孢子、萌发夏孢子及各个取样点的 cDNA 为模板, 进行 RT-PCR 扩增。反应体系为 0.5 μL 50 × SYBR Green, 0.1 μL ROX, 1 μL 10 × cDNA, 2.5 μL 10 × Taq buffer, 2.5 mmol/L MgCl₂, 0.16 mmol/L dNTP, 0.2 μmol/L 引物, 补超纯水至总体积 25 μL。反应程序为: 95℃ 1 min; 95℃ 10 s, 60℃ 20 s, 72℃ 40 s, 40 个循环。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。每个反应重复 3 次, Ct 值取平均值。采用 Delta Delta Ct 法分析实验数据, 确定基因的相对表达量^[12]。

2 结果和分析

2.1 *PsNCS1* 基因全长 cDNA 的克隆

对 *Ps_5158* 和 *WRIS_5545* 质粒测序发现两条序列均有 polyA 结构, *Ps_5158* 插入片段 998 bp, *WRIS_5545* 插入片段为 1010 bp。DNASar 比对发现两者在 ORF 区存在 2 个位点碱基差异。在 NCBI 上利用 ORF Finder 软件, 发现两条序列均有一个 573 bp 的完整 ORF 区, 两者仅有两个氨基酸序列的差异。分析两个氨基酸的差异可能为测序不准造成, 因此为了进一步确定 cDNA 序列的准确性, 利用小麦条锈菌夏孢子 cDNA 模板, 以 PF1 和 PR1 为引物进行 PCR 扩增, 后克隆并挑取 10 个质粒测序, 并与原始序列拼接比对, 最终获得 1007 bp 的全长 cDNA 序列(Genbank 登录号 GU134621)。*PsNCS1* 基因的 cDNA 序列包含 573 bp 的开放阅读框, 编码 190 个氨基酸。编码蛋白与小麦秆锈菌(*Puccinia graminis*, GU134621)、双色蜡蘑(*Laccaria bicolor*, XP_001876627)、褐腐菌(*Postia placenta*, XP_002470324)、新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*, XP_774284)、球形马拉色菌(*Malassezia globosa*, XP_001731888)、玉米瘤黑粉菌(*Ustilago maydis*, XP_

756667) 的 NCS 蛋白具有较高的相似度, 分别为 96%、84%、80%、79%、77%、72%。

2.2 *PsNCS1* 编码蛋白的序列分析

PsNCS1 编码蛋白等电点为 4.96, 分子量为 22.17 kDa, 平均疏水性 -0.617, 推测该蛋白呈酸性且稳定。蛋白序列不含信号肽, 无跨膜区, 定位于过氧化物酶体的可能性最大, 为 74.8%。*PsNCS1* 存在 8 个潜在的糖基化位点, 分别在第 3 位、第 7 位、第 25 位、第 53 位、第 100 位、第 130 位、第 163 位、第 174 位; 同时存在 7 个丝氨酸、2 个苏氨酸及 2 个酪氨酸磷酸化位点。通过与其他真菌进行序列分析和比对, 发现 *PsNCS1* 与其他已知 NCS 蛋白一样, 具有 4 个钙结合蛋白的保守结构域 EF-hand, 并且具有 N 末端豆蔻酰化特征(图 1), 表明目标蛋白为典型的钙结合蛋白。为进一步确认 *PsNCS1* 的分类地位以及与其他生物 NCS 蛋白的进化关系, 选择了 25 个来自担子菌门和子囊菌门真菌以及动物中的 NCS 进行了蛋白序列对位, 并利用 MEGA 4.0 软件, 采用邻接法(neighbor joining method, NJ)构建了系统进化树(图 2)。系统进化树上, *PsNCS1* 与担子菌门的小麦秆锈菌(*Puccinia graminis*)、双色蜡蘑(*Laccaria bicolor*)、褐腐菌(*Postia placenta*)、新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)、球形马拉色菌(*Malassezia globosa*)、玉米瘤黑粉菌(*Ustilago maydis*) 的 NCS 蛋白距离最近, 构成了一大分支, 而属于子囊菌门真菌的 NCS 则构成了另一分支, 它们共同构成了真菌 I 类群。来自动物的 NCS 则构成了 II 类群。进化树分析表明, *PsNCS1* 与来自担子菌门真菌的 NCS 亲缘关系最近, 与子囊菌门 NCS 蛋白序列关系次之, 而与动物的 NCS 距离相对较远。

2.3 *PsNCS1* 的实时定量 RT-PCR 分析

实时荧光定量 PCR 分析了 *PsNCS1* 在夏孢子、芽管、初生菌丝形成(12hpi)、吸器形成(24hpi)及次生菌丝形成扩展(72 hpi)和产孢(168hpi, 216 hpi, 264hpi)等致病过程不同阶段的表达水平(图 3)。结果显示, *PsNCS1* 在夏孢子以及侵染寄主后不同时间点均有表达, 其中在夏孢子和芽管时期表达量较高, 均超过其他时期表达量的 2 倍。在侵染小麦 72 h 以前, 同夏孢子时期表达量相比, 该基因表达具有下调的特点, 其中侵染寄主后 72 h 表达量最低, 仅为夏孢子表达量的 0.06 倍, 12 h 和 24 h 时表达量约为夏孢子表达量的 0.17 和 0.13 倍。72 h 后

	N-myristoylation	EF-hand 1	
PsNCS1	MGKACSKLSPDQLLELQKSTYFDKKEIQQWYKGFLLKDCPSGVLDRKQEFARIYKQFFPFGD		60
PgNCS	MGKSQSKLSPDQLLELQKSTYFDKKEIQQWYKGFLLKDCPSGVLDRKQEFARIYKQFFPFGD		60
UmCNS	MGKNQSKLSPDQLLELQKSTYFDKKEIQQWYKGFLLKDCPSGVLDRKQEFARIYKQFFPFGD		59
MgCNS1	MGKSQSKLSPDQLLELQKSTYFDKKEIQQWYKGFLLKDCPSGVLDRKQEFARIYKQFFPFGD		60
AfNCSA	MGKSQSKLSPDQLLELQKSTYFDKKEIQQWYKGFLLKDCPSGVLDRKQEFARIYKQFFPFGD		60
SpNCS1p	MGKSQSKLSPDQLLELQKSTYFDKKEIQQWYKGFLLKDCPSGVLDRKQEFARIYKQFFPFGD		60
ScFrq1p	MGAKTSKLSKDDLTCLKQSTYFDRREIQQWHKGFLLRDCPSGQLAREDFHVKIYKQFFPFGS		60
		EF-hand 2	EF-hand 3
PsNCS1	PGQFADVFVFNVDENKNGTIDHKEFICALSVTSRGLDEKLLKWFQLYDIDGDGYITTYEE		120
PgNCS	PGQFADVFVFNVDENKNGTIDHKEFICALSVTSRGLDEKLLKWFQLYDIDGDGYITTYEE		120
UmCNS	PSTFAEYVFNVDENKNGTIDHKEFICALSVTSRGRLEKLRWAFQLYDIDGDGTTITYDE		119
MgCNS1	PSSFADYVFNVDSDKSGTIDHKEFICALSVTSRGMEDKLDWAFQLYDIDGDGKITSYDE		120
AfNCSA	PSSFANYVFNVDSDNSGMTIDHKEFICALSVTSRGMEDKLDWAFQLYDIDGDGKITSYDE		120
SpNCS1p	PSAFAEYVFNVDADKNGYIDHKEFICALSVTSRGETLNDKLIWAFQLYDLDNNGLLISYDE		120
ScFrq1p	PEDFANHLFTVFDKDNNGFTHFEFFITVLSSTSRGTLEKLSWAFELYLDLNHDGYITTFDE		120
PsNCS1	ML.....QIVRSIYKMTGQMVKLPDEEDTPEKRVDK		151
PgNCS	ML.....QIVRSIYKMTGQMVKLPDEEDTPEKRVDK		151
UmCNS	MLSEYRSSGSTQMHLLQRRLLTCNFDSIRHFAAIVRSIYKMTGQMVKLPDEEDTPEKRVDK		179
MgCNS1	ML.....QIVEAIYKMGVSMVKLPDEEDTPEKRVRK		151
AfNCSA	ML.....AIVEAIYKMGVSMVKLPDEEDTPEKRVRK		151
SpNCS1p	ML.....RIVDAIYKMGVSMVKLPDEEDTPEKRVNK		151
ScFrq1p	ML.....TIVASVYKMGMSMVTLENEDEATPEMRVKK		151
		EF-hand 4	
PsNCS1	IFRMMDHNKDHKSTFDEFKEGSKQDPTIVQALSLYDGLV		190
PgNCS	IFRMMDHNKDHKSTFDEFKEGSKQDPTIVQALSLYDGLV		190
UmCNS	IFRMMDRDKNALSFEEFQEGSKQDPTIVQALSLYDGLV		218
MgCNS1	IFRMMDKDENGSLDMQEFKEGSKRDETTIVSALSLYDGLV		190
AfNCSA	IFRMMDKDENGSLDMEEFKEGSKRDETTIVSALSLYDGLV		190
SpNCS1p	IFNMMDKNDGQLTLEEFCEGSKRDETTIVSALSLYDGLV		190
ScFrq1p	IFKLMKDKNEDGYITLDEFREGSKVDEPSIICALNLYDGLI		190

图1 小麦条锈菌 PsNCS1 与其他真菌 NCS 氨基酸序列比对

Fig. 1 Multiple sequence alignment of PsNCS1 and NCS proteins of other fungi. Amino acid residues identical among seven NCS proteins are shaded in light grey while residues identical above 3 are shaded in black. EF-hand calcium binding domains and N-myristoylation motif are indicated. PsNCS1 (*Puccinia striiformis*, GU134621), PgNCS (*Puccinia graminis*, PGTT_09250), UmCNS (*Ustilago maydis*, XP_756667), MgCNS1 (*Magnaporthe grisea*, XP_363624), AfNCSA (*Aspergillus fumigatus*, XP_751298), SpNCS1p (*Schizosaccharomyces pombe*, NP_592879), ScFrq1p (*Saccharomyces cerevisiae*, AAB64809).

PsNCS1 表达量呈上调趋势,其中 264 h 基因表达量升高至夏孢子时期的 0.27 倍。

3 讨论

本研究首次从条锈菌中分离到一个神经钙离子感应蛋白基因 PsNCS1,多序列比对表明,该基因编码的蛋白质序列非常保守,目标蛋白含有 EF-hand 结构域以及 N 末端豆蔻酰化特征,蛋白分子量为 22.17 kDa,这与已知动物和真菌中 NCS-1 蛋白特点一致^[2]。进化树分析结果表明,虽然该类蛋白具有一致的保守结构域,进化上也比较保守,然而担子菌门和子囊菌门真菌以及动物的 NCS 蛋白在各自进化的过程形成了不同的功能。

小麦条锈菌侵入寄主后,一般 4 h 形成芽管,12 h 形成初生菌丝,24 h 形成初生吸器,48 - 72 h 次生菌丝形成并大量分支在叶肉细胞间扩展,接种后 4 - 5d 扩展菌丝可在小麦叶片中形成肉眼可见的花斑;在侵染后期病原菌形成产孢结构,8 d 开始在小麦叶片表明形成零星孢子堆,10 d 后开始产生大量孢子^[13]。在条锈菌生长发育过程中,不同发育时期伴随着胞质游离 Ca²⁺ 浓度的变化^[14]。实时荧光定量 RT-PCR 结果显示,PsNCS1 在夏孢子、芽管以及侵染寄主后不同时间点均有表达,其中在夏孢子和芽管时期表达量较高。推测该基因参与了条锈菌夏孢子的形成和芽管的延伸。在粟酒裂殖酵母和烟曲霉中,同样也发现 Ncs1p 和 NcsA 分别具有调节

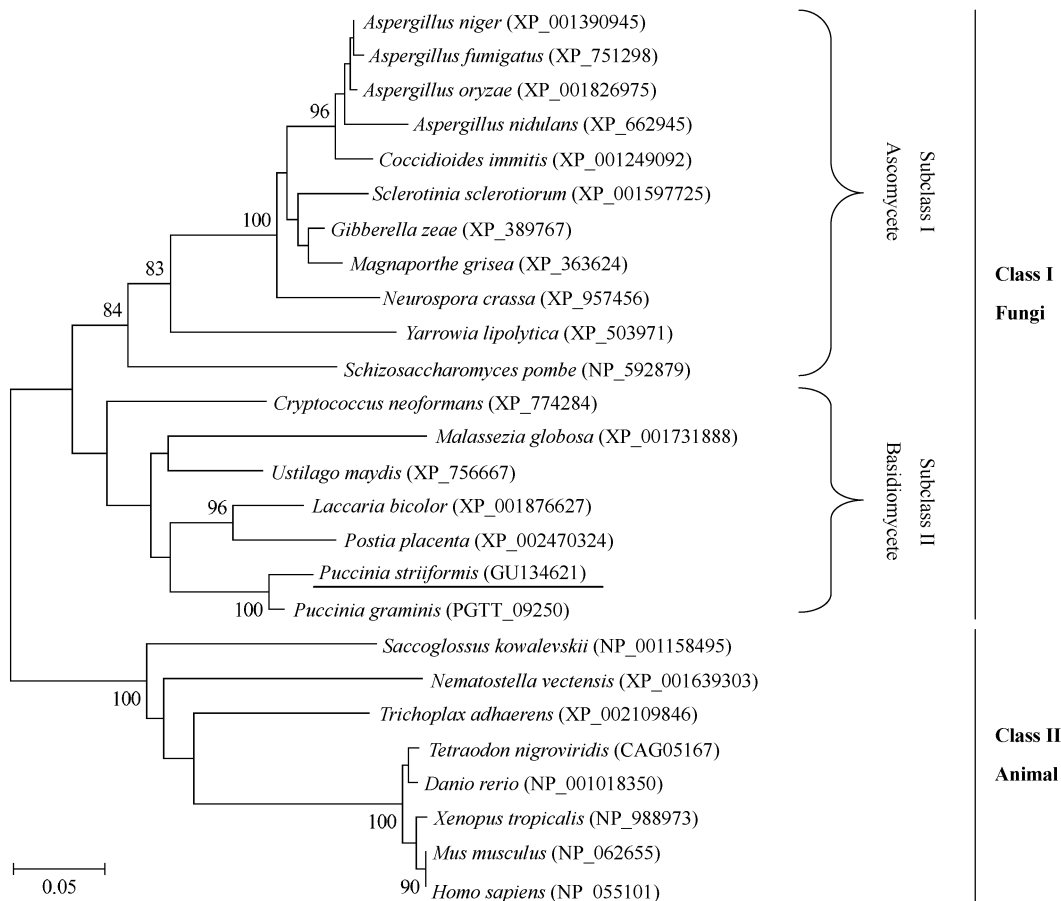


图 2 小麦条锈菌 *Pst* NCS1 与其生物中的 NCS 同源蛋白序列的进化树分析

Fig. 2 Phylogenetic tree comparison of *Pst* NCS1 with NCS proteins in other organisms. Names of organisms and gene accession numbers are shown at the branches. Bootstrap support values above 80% are indicated at the nodes. The scale bar indicates 0.05 amino acid replacements per site. The *Pst* NCS1 is underlined.

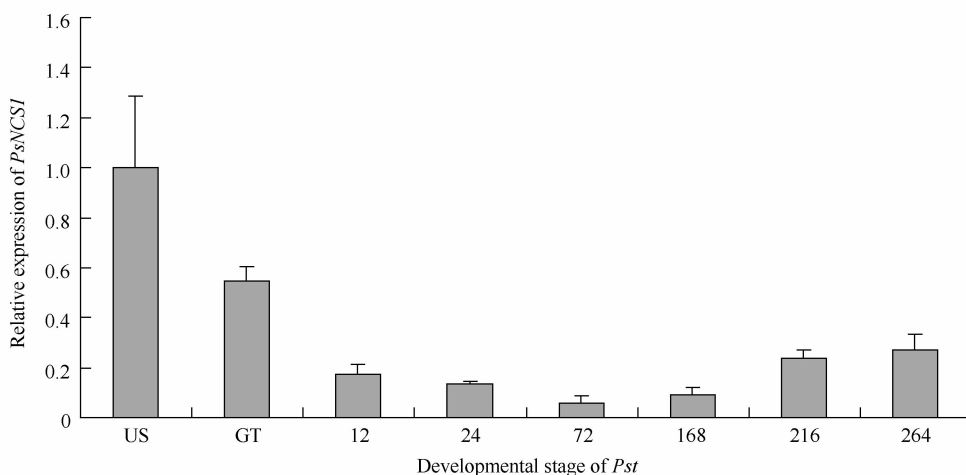


图 3 不同发育时期条锈菌的 *Pst* NCS1 基因表达水平的实时荧光定量 PCR 分析

Fig. 3 Real-time PCR analysis of *Pst* NCS1 expression at different developmental stages of *Pst*. Actin was chosen as the reference gene and US is used as a calibration for relative quantification. US: urediospore; GT: germ tube; hpi: hours post inoculation.

孢子形成以及促进芽管延伸的功能^[8-9]。张洪等^[14]通过对条锈菌胞质游离 Ca^{2+} 染色研究表明,

在入侵前期,条锈菌孢子内及短的芽管前端荧光强,其他区域很弱或观察不到。这进一步说明,在侵染

过程中,条锈菌夏孢子和芽管胞质游离 Ca^{2+} 浓度的升高促进了与 PsNCS1 的结合,从而诱导了 PsNCS1 基因的高量表达。

条锈菌为专性寄生菌,不能人工培养,并缺乏有性世代,难于进行遗传分析。目前小麦条锈菌缺乏稳定成熟的遗传转化体系,直接研究基因的功能还存在较大的困难。关于 PsNCS1 在条锈菌致病过程中特别是孢子形成和芽管延伸中的功能值得进一步的研究。因此,可以借助转化体系完善的模式真菌如属于担子菌亚门的玉米瘤黑粉菌^[15]进行 PsNCS1 的功能验证,已有研究表明小麦叶锈菌 (*Puccinia triticina* f. sp. *tritici*) MAPK 基因能够成功互补玉米瘤黑粉菌 (*Ustilago maydis*) 的同源基因。本研究为解析 PsNCS1 在条锈菌钙信号传导途径和致病过程中的作用奠定了基础。

参考文献

- [1] 李振岐,曾士迈. 中国小麦锈病. 2002. 北京:中国农业出版社.
- [2] Hilfiker S. Neuronal calcium sensor-1: a multifunctional regulator of secretion. *Biochemical Society Transactions*, 2003, 31: 828-832.
- [3] Burgoyne RD. The neuronal calcium-sensor proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004, 1742: 59-68.
- [4] Sippy T, Cruz-Martin A, Jeromin A, Schweizer FE. Acute changes in short-term plasticity at synapses with elevated levels of neuronal calcium sensor-1. *Nature Neuroscience*, 2003, 6: 1031-1038.
- [5] Burgoyne RD. Neuronal calcium sensor proteins: generating diversity in neuronal Ca^{2+} signalling. *Nature Reviews Neuroscience*, 2007, 8: 182-193.
- [6] Hendricks KB, Wang BQ, Schnieders EA, Thorner J. Yeast homologue of neuronal frequenin is a regulator of phosphatidylinositol-4-OH kinase. *Nature Cell Biology*, 1999, 1: 234-241.
- [7] Saitoh K-I, Arie T, Teraoka T, Yamaguchi I, Kamakura T. Targeted gene disruption of the neuronal calcium sensor 1 homologue in rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2003, 67: 651-653.
- [8] Hamasaki-Katagiri N, Molchanova T, Takeda K, Ames JB. Fission yeast homologue of neuronal calcium sensor-1 (Ncs1p) regulates sporulation and confers calcium tolerance. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 13: 12744-12754.
- [9] Mota Júnior AO, Malavazi I, Soriani FM, Heinekamp T, Jacobsen I, Brakhage AA, Savoldi M, Goldman MH, da Silva Ferreira ME, Goldman GH. Molecular characterization of the *Aspergillus fumigatus* NCS-1 homologue, NcsA. *Molecular Genetics and Genomics*, 2008, 280(6): 483-495.
- [10] 康振生,李振岐. 洛夫林常温致病菌系的发现. 西北农学院学报 (*Journal of Northwest Agricultural College*), 1984, 12(4): 18-28
- [11] Zhang YH, Qu ZP, Zheng WM, Liu B, Wang XJ, Xue XD, Xu LS, Huang LL, Han QM, Zhao J, Kang ZS. Stage-specific gene expression during urediniospore germination in *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *BMC Genomics*, 2008, 9(1): 203.
- [12] Kenneth JL, Thomas DS. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [13] Wang CF, Huang LL, Buchenauer H, Han QM, Zhang HC, Kang ZS. 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*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2007, 71: 230-239.
- [14] 张洪,丁可,裴国亮,郭军,康振生. 小麦条锈菌胞质游离钙离子动态检测方法的建立. 菌物学报 (*Mycosystema*), 2010, 29(1): 64-67.
- [15] Hu GG, Kamp A, Linning R, Naik S, Bakkeren G. Complementation of *Ustilago maydis* MAPK mutants by a wheat leaf rust *Puccinia triticina* homolog: potential for functional analyses of rust genes. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 2007, 20(6): 637-647.

Cloning and transcriptional profiling of *PsNCS1* from *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*

Jun Guo, Hong Zhang, Ke Ding, Xiwei Dai, Yueying Chen, Yinghui Duan, , Lili Huang, Zhensheng Kang*

(College of Plant Protection and Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: [**Objective**] We cloned *PsNCS1* encoding neuronal calcium sensor from *Pst* and analyzed its transcriptional profile. [**Methods**] A full-length cDNA of *PsNCS1* was cloned by using RT-PCR in combination with cDNA library screening, the sequence was analyzed with different bioinformatic tools and the gene expression pattern was characterized via real-time RT-PCR. [**Results**] *PsNCS1* (Genbank accession no. GU134621) encoded 190 amino acids, with a molecular weight of 22.17 KDa and a pI of 4.96. *PsNCS1* contained four conserved EF-hand domains and was N-terminally myristoylated. Phylogenetic analysis indicated that *PsNCS1* was highly similar to the NCS from Basidiomycetes and the highest similarity was with that from *Puccinia graminis* (96%). Real-time RT-PCR analysis indicated the amount of *PsNCS1* transcripts of urediospores and of germinated urediospores were doubled or more comparing with those of fungal bodies at other different developmental stages. [**Conclusion**] *PsNCS1* might be involved in the process of urediospore formation and germ tube elongation. The present results may provide basic data for further analysis of the role of *PsNCS1* in pathogenesis process and calcium signaling.

Keywords: *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*; neuronal calcium sensor; gene cloning; real time RT-PCR

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Industry projects from Ministry of Agriculture of China (200903035-2), the National Basic Research Program of China (2006CB100203), the Special Capital for the Construction of Modern Agriculture Technical System of China, the 111 Project from Ministry of Education of China (No. B07049), Science and Technology Research Key Project, the Ministry of Education of China (107104) and the Program for Excellent Young Scholars in Northwest A&F University

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-29-87080061; E-mail: Kangzs@nwsuaf.edu.cn

Received: 26 December 2009/ Revised: 8 February 2010