

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (11): 1296 – 1303; 4 November 2014
ISSN 0001 – 6209; CN 11 – 1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.11.007

小麦条锈菌钙调素依赖蛋白激酶基因 *Pscamk* 的功能

秦娟, 黄传明, 何付新, 朱晓果, 张阳, 康振生*, 郭军*

西北农林科技大学植物保护学院, 旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 陕西 杨凌 712100

摘要: 【目的】克隆小麦条锈菌钙调素依赖蛋白激酶基因 *Pscamk*, 并分析其在条锈菌侵染小麦过程中的表达特征及初步功能。【方法】基于本实验室已测序的小麦条锈菌基因组序列, 利用 RT-PCR 方法, 从小麦条锈菌生理小种 CYR32 中克隆 *Pscamk* 基因的 cDNA 序列, 并利用网络数据库和生物信息学工具预测该基因编码蛋白的基本特征和保守结构; 运用 qRT-PCR 技术分析 *Pscamk* 在不同发育及侵染阶段的表达水平, 进一步通过钙调素依赖蛋白激酶 (CaMK) 的免疫抑制剂 KN-93 处理小麦条锈菌夏孢子, 观察其萌发状况。【结果】获得 1 个 1620 bp 的小麦条锈菌 CaMK 基因 *Pscamk*; 序列分析发现, *Pscamk* 编码蛋白包含 CaMK 蛋白的保守结构域, 并与小麦杆锈菌该类蛋白序列相似性最高。qRT-PCR 分析表明, *Pscamk* 在条锈菌侵染初期过程中的芽管发育、初生菌丝侵染及吸器形成时期呈显著上调表达, 且在条锈菌接种 6 h 时表达量最高, 为对照夏孢子的 20.74 倍。在专一性免疫抑制剂 KN-93 处理后, 随着 KN-93 施加浓度的增加, 条锈菌夏孢子萌发率逐渐降低, 当浓度为 $1.4 \mu\text{mol/L}$ 时夏孢子萌发率为 8.02%, 仅为对照的 12%。【讨论】推测 *Pscamk* 基因参与了小麦条锈菌夏孢子萌发、芽管发育以及初期侵染结构的形成。本研究为进一步探索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, 钙调素依赖蛋白激酶, 免疫抑制剂 KN-93, 荧光定量 RT-PCR

中图分类号: Q936 **文章编号:** 0001-6209 (2014) 11-1296-08

病原菌成功识别并侵染寄主的过程受到细胞间多个信号转导途径的调控, 如环腺苷酸 (cAMP) 途径^[1]、细胞分裂素原激活的蛋白激酶 (MAPK) 途径^[2] 和 Ca^{2+} 信号途径^[3] 等。其中钙信号不仅调节病原菌生长形态发育, 还直接决定病原菌入侵结构的形成与毒性, 如菌丝顶端生长、菌丝分枝、孢子的形成、侵染结构的分化等^[4]。 Ca^{2+} 信号途径中,

Ca^{2+} 作为第二信使依赖其浓度变化将刺激信号经钙离子受体蛋白-钙调素 (calmodulin, CaM) 及下游钙调素依赖蛋白激酶 (calcium-dependent protein kinase, CaMK) 向下传递, 进而激活与代谢相关的关键酶类或转录因子, 最终实现对细胞行为的调控。钙调素依赖的蛋白激酶 (CaMK) 是一类丝氨酸/苏氨酸激酶, 该类激酶 N-末端具有催化结构域, C-末

基金项目: 国家“973 项目”——国家重点基础研究发展计划 (2013CB127700); 国家自然科学基金项目 (31371889, 31171795); 高等学校学科创新引智计划资助项目 (B07049); 教育部新世纪优秀人才支持计划 (NCET-12-0471); 西北农林科技大学基本科研业务费优青项目 (YQ2013001)

* 通信作者。郭军, Tel: +86-29-87081317, E-mail: guojunwgq@nwsuaf.edu.cn; 康振生, Tel: +86-29-87080061, E-mail: kangzs@nwsuaf.edu.cn

作者简介: 秦娟 (1987-), 女, 甘肃武威人, 硕士生研究, 主要从事小麦条锈菌致病机理研究。E-mail: qin1365829@163.com

收稿日期: 2014-01-22; **修回日期:** 2014-04-07

端具有自主调节结构域,而在调节结构域中则包含 1 个自主抑制域和 1 个 Ca^{2+} /CaM 结合结构域^[5-7]。CaMK 蛋白已在哺乳动物细胞中得到广泛研究^[8],但在真菌中该类激酶的研究报道仍然较少。

小麦条锈病是由条形柄锈菌 (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, *Pst*) 引起的一种真菌性病害,其分布范围广,流行频率高,爆发性强,可造成小麦的产量损失达 10% 到 70%^[9]。对于小麦抗条锈病以及条锈菌在与小麦互作过程中的侵染机理的研究仍是植物抗病性及其利用领域中的研究热点,而对条锈菌侵染寄主过程中钙信号网络相关基因进行研究则有着重要意义。

本研究在已测序小麦条锈菌基因组库的基础上,克隆得到小麦条锈菌 CaMK 基因 *Pscamk*,通过分析该基因编码蛋白的结构特征,检测其在不同发育及侵染阶段的表达水平,进一步利用 CaMK 蛋白的专一性免疫抑制剂 KN-93^[10-11] 处理,初步推断其功能,为进一步深入对真菌中 CaMK 作用机制的研究及为条锈菌的防治提供一定的理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 小麦材料和病原菌: 供试品种为“铭贤 169”,小麦条锈菌为 CYR32 生理小种。将小麦播种后,16℃ 温室培养,待第一叶完全展开后利用康振生报道方法接种条锈菌^[12],并在 0、6、12、24、36、48、72、120 和 168 h 剪取叶片迅速置于液氮中,−80℃ 冻存待用。

1.1.2 主要试剂和仪器: KN-93 (Sigma, USA)、*Taq* DNA polymerase (TaKaRa)、dNTP (Fermentas)、E. Z. N. A. TM Plasmid Mini KitI (Omega)、Trizol RNA 提取液 (TioFluxTM)、RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas)、RNase inhibitor (Fermentas)、及其它实验室常规化学药品和试剂。PTC-200 PCR 仪 (Bio-Rad)、Eppendorf Centrifuge 5810R 台式低温高速离心机、ABI PRISM 7500 实时定量 PCR 仪、光学显微镜 (OLYMPUS CX21) 等。

1.2 条锈菌 RNA 的提取与 cDNA 的合成

用 Trizol 试剂提取条锈菌不同侵染时间点的总

RNA。按照 M-MLV reverse transcriptase 试剂盒操作说明进行第一链 cDNA 的合成。反转录引物采用 Oligo d(T)₁₈。

1.3 条锈菌 *Pscamk* 的扩增

在本实验室小麦条锈菌基因组库中通过本地 BLAST 筛选到与其它真菌相似度较高的序列,库中记录片段大小为 1620 bp,利用软件 Primer preimer 5.0 在序列两端设计扩增引物 (表 1)。以小麦条锈菌夏孢子 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 程序: 95℃ 4 min;95℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 2 min,30 个循环。

表 1. 基因克隆及 qRT-PCR 引物
Table1. The primers of gene cloning and qRT-PCR

Primer	Sequence (5' →3')
Pscamk-S	ATGAGCAGTCAGCATAATATCCAA
Pscamk-AS	CTATGGATTTTCTTTTCATTTGTTG
Q-Pscamk-R-S	AGAACGAAGGACAGCAGC
Q-Pscamk-R-AS	GGAGGACTTTCATTAACGG
PsEF-R-S	TTCCGCCGTCCGTGATATGAGACAA
PsEF-R-AS	ATGCGTATCATGGTGCTGGAGTGA

1.4 条锈菌 *Pscamk* 序列分析

利用 NCBI 的 BLAST 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行序列相似性搜索,利用 (http://web.expasy.org/compute_pi/) 预测氨基酸分子量大小及等电点, (http://www.ch.embnet.org/cgi-bin/TMPRED_form_parser) 及 Expasy 网站的蛋白分析工具包 ProtScale 程序 (氨基酸分值选用参数 Hphob. / Kyte & Doolittle) 在线分析蛋白的疏水区域,使用 DNAMAN 和 MEGA 5.1 软件以邻接法 (Neighbor-Joining method) 进行目的蛋白与其同源蛋白的多重序列比对及进化树分析。

1.5 qRT-PCR 分析

根据已克隆到的 *Pscamk* 基因 cDNA 序列,利用 Primer preimer 5.0 软件设计特异的定量 PCR 引物 (表 1)。选用小麦条锈菌的延伸因子 *PsEF* 作为内参,利用 ABI PRISM 7500 SDS 系统,分别以各处理取样点的 cDNA 为模板进行实时定量 PCR 扩增。反应程序为:95℃ 1 min;95℃ 10 s,60℃ 20 s,72℃ 40 s,40 个循环。反应结束后制作溶解曲线和荧光值变化曲线。每个反应做 3 个生物学重复。

1.6 KN-93 处理小麦条锈菌夏孢子

将 CaMK 的专一性免疫抑制剂 KN-93 配制成 1mmol/L 母液,用灭菌处理的水溶液稀释至 0.6、0.8、1.0、1.2 和 1.4 μ mol/L 浓度各 10mL 分别倒入直径 90mm 的培养皿中,并设置灭菌水溶液对照。称取新鲜夏孢子 0.6mg 轻轻抖落到盘中的水面上^[13],使分布均匀,在 9℃ 恒温培养箱中,黑暗培养 10 h,在光学显微镜下观察夏孢子的萌发情况。每个处理在显微镜下随机选取 30 个视野观察孢子萌发情况,统计镜检总孢子数和萌发的孢子数,并计算其萌发率(萌发率 = 萌发孢子数/总孢子数 \times 100%)。为进一步验证 KN-93 对 CaMK 的抑制作用,分别取处理 4、6、8、10 h 的样品,置于 -80℃ 超低温冰箱,冻存待用。

2 结果和分析

2.1 小麦条锈菌 *Pscamk* 基因的克隆及序列分析

利用已知真菌的 *camk* 序列,从本实验室已构建的小麦条锈菌基因组数据库^[14]中筛选出一条候选序列,基于所设计特异引物进行 RT-PCR 扩增,测序后获得与所选取序列相同的片段。经 ORF finder 预测,该序列包含 1620 bp 的完整 ORF 区,并命名为 *Pscamk* (GenBank 登录号 KF989486)。*Pscamk* 编码蛋白包含 539 个氨基酸,分子量为 59.4 kDa,等电点为 10.04。PsCaMK 蛋白经跨膜结构预测,表明其具有 2 个跨膜结构域(第 9-33 和 151-173 位氨基酸)。进一步氨基酸序列分析及比对结果显示(图 1),

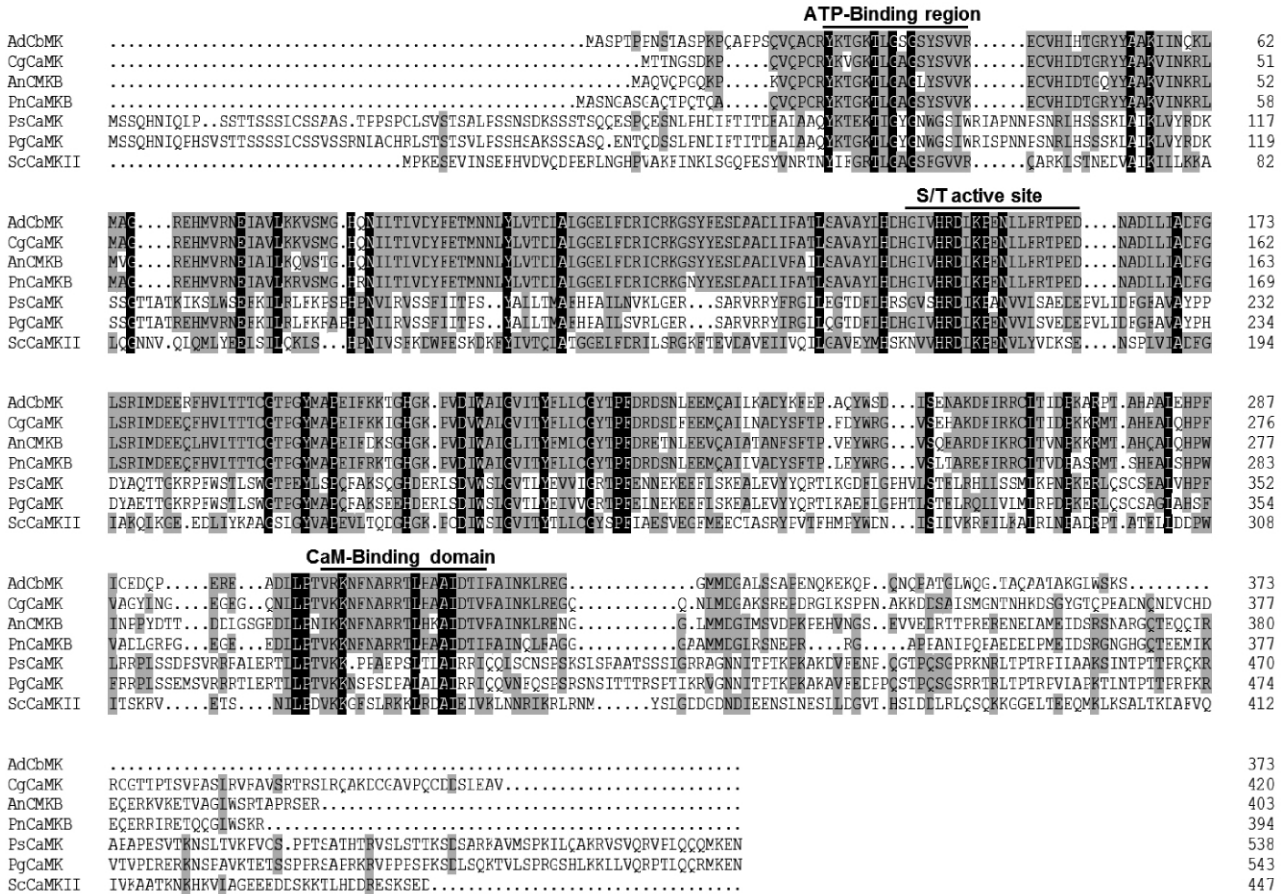


图 1. 小麦条锈菌 PsCaMK 与其他真菌中的 CaMK 氨基酸序列比对

Figure 1. Multiple sequence alignment of PsCaMK and other fungal CaMK proteins. Amino acid residues identical among seven CaMK proteins are shaded in black while residues identical above 3 are shaded in grey. ATP-binding region, S/T active site and CaM-binding domain are indicated.

CgCaMK: *Colletotrichum gloeosporioides* (AAC62515); AnCMKB: *Aspergillus nidulans* (XP_660016); PnCMKB: *Parastago nosporanodorum* (ABD59787); PsCaMK: *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* (KF989486); PgCaMK: *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* (XP_003322483); AdCbMK: *Arthrobotrys dactyloides* (AAG43970); ScCaMKII: *Saccharomyces cerevisiae* (BAA14384).

PsCaMK 与其他已知真菌 CaMK 蛋白具有相似的保守结构,即 1 个 ATP 结合区域,1 个丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶结合位点和 1 个 CaM 结合结构域。为进一步确认 PsCaMK 的分类地位以及与其他生物 CaMK 蛋白的进化关系,选择了 21 个来自担子菌门和子囊菌门真菌以及脊索动物门中的 CaMK 进行了蛋白序列对位,并利用 MEGA 5.1 软件,采用邻接法 (neighbor joining method) 构建了系统进化树 (图 2)。结果表明,系统进化树上,PsCaMK 与担子菌门

的小麦秆锈菌 (*Puccinia graminis*)、新型隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*)、链疫孢荚腐病菌 (*Moniliophthora roreri*) 和粉孢革菌 (*Coniophora puteana*) 的 CaMK 蛋白距离最近,构成了一大类群,而属于子囊菌门真菌的 CaMK 则构成了另一类群。来自脊索动物门中的 CaMK 则构成了 1 个类群。进化树分析表明,PsCaMK 与来自担子菌门真菌的 CaMK 亲缘关系最近,与子囊菌门和动物中的 CaMK 蛋白亲缘关系相对较远。

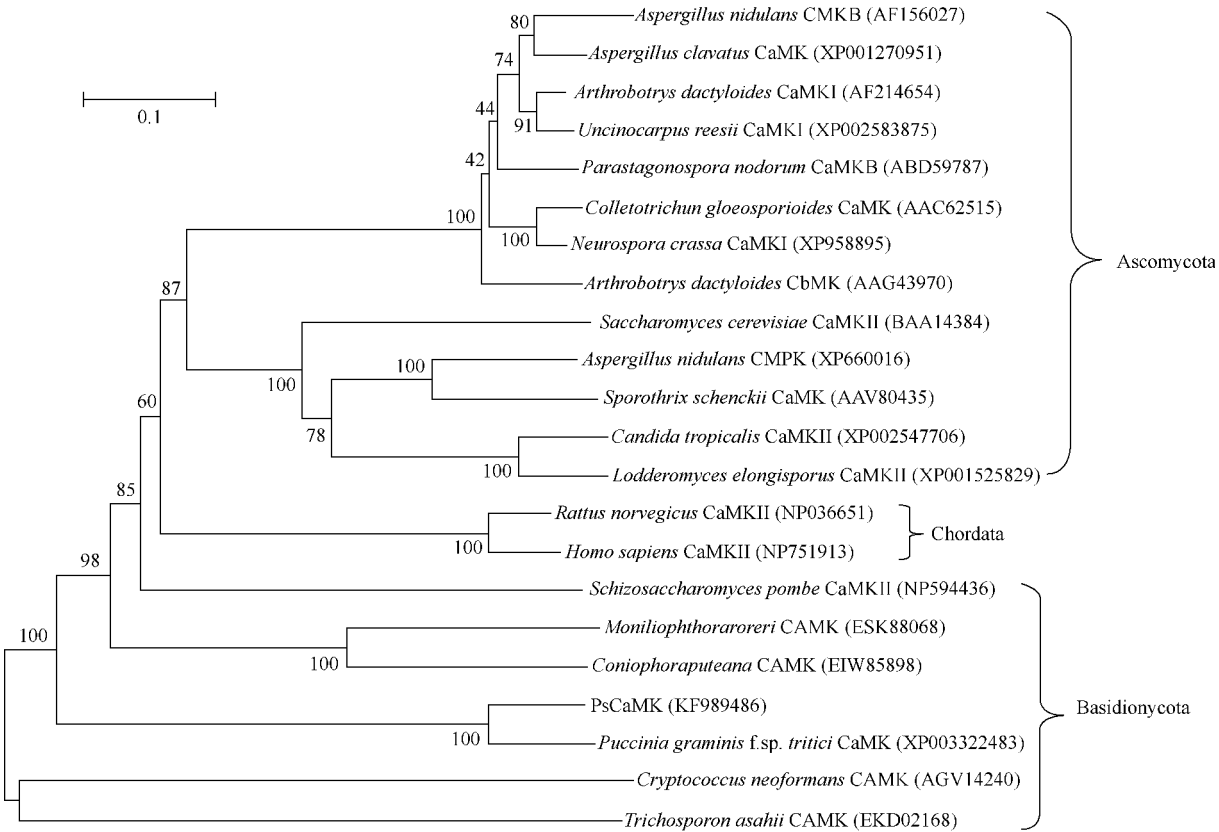


图 2. 小麦条锈菌 PsCaMK 与其它物种中的 CaMK 同源蛋白序列的进化树分析

Figure 2. Phylogenetic tree of PsCaMK and CaMK proteins from other organisms. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. Numbers in square brackets indicate the clone number out of the total clones. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, 10% sequence divergence.

2.2 *Pscamk* 基因的实时定量 RT-PCR 分析

运用 qRT-PCR 技术分析 *Pscamk* 基因在条锈菌夏孢子、孢子萌发至芽管发育 (接种后 0 - 6 h)、芽管侵入气孔至初生吸器形成 (接种后 12 - 24 h)、次生侵染菌丝大量出现 (接种后 48 h) 及孢子产生等侵染和致病过程不同时段中的表达水平。

结果显示 (图 3), *Pscamk* 在在条锈菌接种小麦后 6、12、18 和 24 h 其表达量均显著高于夏孢子表达量,分别为夏孢子表达量的 20.74、9.24、8.11 和 5.69 倍。其中,条锈菌接种后 6 h 时表达量最高,而在接种 36 h 下降至夏孢子对照的水平,48 h 时表达量又升高为夏孢子表达量的 2.39 倍,在后期

恢复至对照的水平。

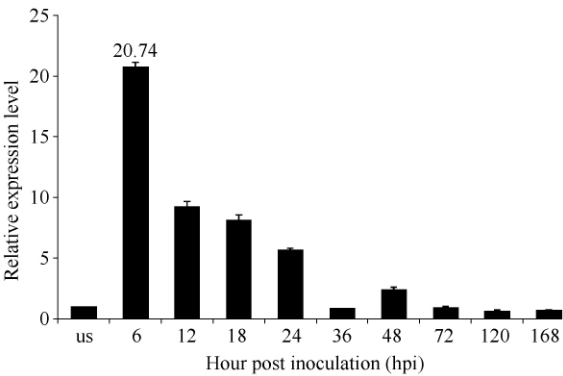


图 3. 不同侵染时期条锈菌的 *Pscamk* 基因表达水平的实时荧光定量 PCR 分析

Figure 3. Real-time RT-PCR analysis of *Pscamk* expression at different infection stages of *Pst.* us: urediospore.

2.3 KN-93 对小麦条锈菌夏孢子萌发的影响

KN-93 是一种专一性 Ca^{2+} /CaM 依赖的 CaMK 竞争抑制剂,其通过与 CaM 结合位点的相互作用,阻止 CaM 与 CaMK 的结合,使得 CaMK 不能自身磷酸化,从而抑制激酶活性^[10-11]。为研究 *Pscamk* 基因与小麦条锈菌夏孢子萌发之间的联系,本研究利用不同浓度的 KN-93 溶液对小麦条锈菌夏孢子进行处理,观察其处理后的夏孢子萌发情况,同时检测 *Pscamk* 基因在处理后的 4、6、8、10 h 的表达量,以无菌水处理的条锈菌夏孢子做对照。利用显微镜观察小麦条锈菌夏孢子的萌发形态并记录数据,统计结果表明(图 4,图 5),随着 KN-93 抑制剂浓度的提高,

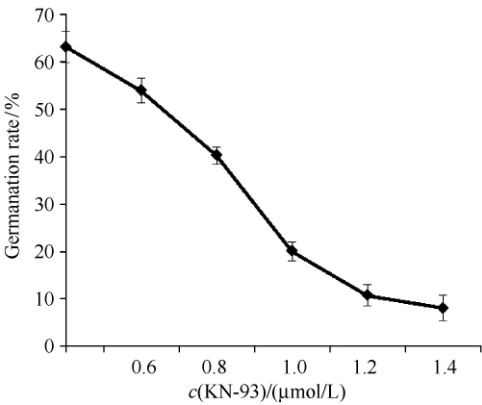


图 4. 不同浓度 KN-93 对条锈菌夏孢子萌发的影响

Figure 4. Effect of different concentrations of KN-93 on the germination of *Pst* urediospores.

条锈菌夏孢子萌发率逐渐降低,当 KN-93 浓度达到 1.4 μmol/L 时,条锈菌夏孢子萌发率仅为 8.02%,为对照的 12%。定量检测结果表明,*Pscamk* 在对照处理 6 h 时表达量为正常夏孢子的 11.33 倍,而用 1.4 μmol/L KN-93 溶液处理 6 h 后 *Pscamk* 表达量明显下降,仅为对照处理的 3.62% (图 6)。以上结果表明 KN-93 能够抑制小麦条锈菌中 CaM 蛋白与 CaMK 蛋白的结合从而抑制小麦条锈菌夏孢子的正常萌发。

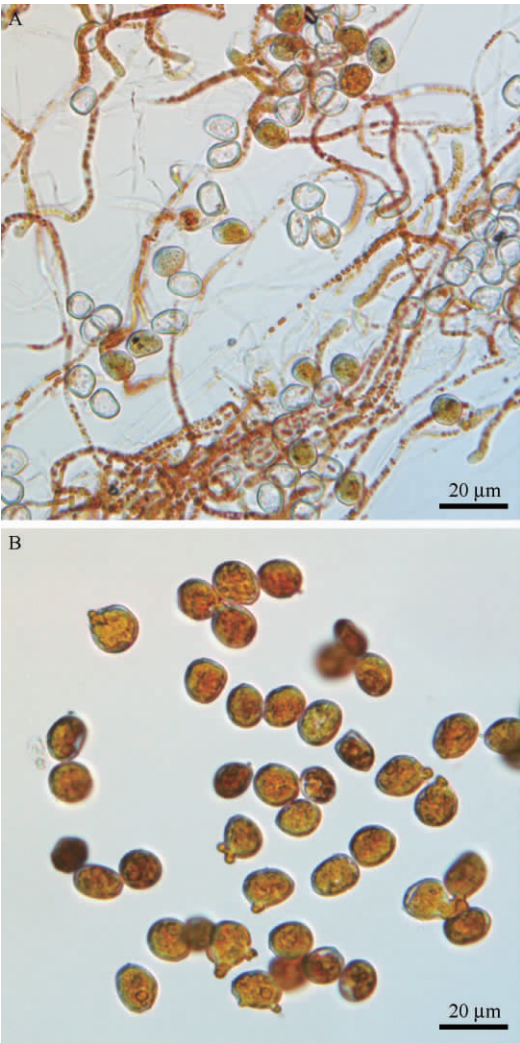


图 5. 小麦条锈菌夏孢子在 KN-93 和对照无菌水中萌发状况

Figure 5. Germination of *Pst* urediospores under KN-93 treatment and distilled water incubation. A: Germination of *Pst* urediospores in distilled water after 10 h incubation at 9°C; B: Germination of *Pst* urediospores with 1.4 μmol/L KN-93 after 10 h incubation at 9°C.

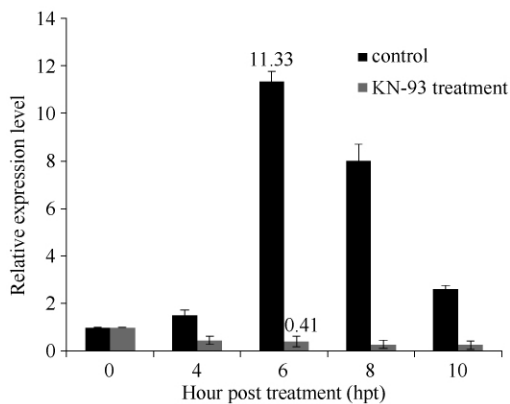


图 6. 在 $1.4\mu\text{mol/L}$ KN-93 处理下条锈菌的 *Pscamk* 基因在不同时间点表达水平实时荧光定量 PCR 分析

Figure 6. Relative expression of *Pscamk* suppressed by KN-93.

3 讨论

本研究首次克隆了小麦条锈菌 *camk* 基因,通过氨基酸序列比对,证明该基因编码蛋白属于 CaMK 类家族,含有 1 个 ATP 结合区域,1 个丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶结合位点和 1 个 CaM 结合结构域。聚类分析结果表明,克隆得到的基因与小麦杆锈菌 *camk* 基因编码蛋白亲缘关系最近。本研究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 CaMK 蛋白在各自进化的过程形成了不同的功能。

CaMK 作为钙信号途径的下游关键蛋白,通过磷酸化和去磷酸化来调节该信号途径中的关键酶和转录因子的表达,从而实现对细胞功能的调控作用。CaMK 在动植物钙信号途径中研究较深,但在病原真菌中的研究并不多见。在哺乳动物中, CaMK 在调节神经元的活动、肌肉的收缩、细胞周期的控制、细胞的分泌、DNA 损伤的修复、碳水化合物代谢、基因的表达等方面有着重要的生物学作用^[3]。在酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中,存在 2 个编码 CaMK 的基因 *cmk1* 与 *cmk2*^[15],缺失 *cmk1* 或 *cmk2* 都不能使酵母致死,但缺失 *cmk2* 能降低孢子的萌发能力^[16-17]。在栗酒裂殖酵母中 (*Schizosaccharomyces pombe*) 编码 CaMKI 的 *cmk1* 基因的 mRNA 表达水平受细胞周期的调控,在 G_1/S

期表达量最高, *cmk1* 过表达之后并不影响细胞的生长和分裂^[18]。在构巢曲霉中,存在 3 个编码 CaMK 的基因,分别为 *CMKA*, *CMKB* 和 *CMK*^[19-20],功能研究表明 *CMKA* 与 *CMKB* 是关键基因,在构巢曲霉细胞 G_1 到 G_2 的转换期是必须的^[21]。在盘长孢状刺盘孢菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 中也获得 1 个 *CgCMK* 基因^[22],研究表明在 KN-93 处理下,抑制了其孢子的萌发和附着胞的形成,阻断了附着胞的黑化,影响黑色素的产生,同时产生了畸形的附着胞,说明 CaMK 在盘长孢状刺盘孢菌芽管伸长、附着胞形成、附着胞黑色素的产生方面具有重要的作用^[23]。

在条锈菌侵染小麦的过程中,芽管在 6 h 时大量形成,并有少量气孔下囊出现,12 h 时芽管侵入气孔,有大量气孔下囊产生,并有初生侵染菌丝的形成,24 h 时大量形成吸器,48 h 形成大量次生侵染菌丝,继而产生大量次生吸器母细胞和次生吸器^[24-25]。本研究对 *PsCaMK* 基因做了表达谱分析,结果表明 *Pscamk* 在条锈菌侵染 6 h 时表达量明显上调,从而推断 *Pscamk* 可能参与条锈菌侵染初期孢子萌发和芽管形成。用 KN-93 处理后发现其对小麦条锈菌夏孢子萌发有着显著的抑制作用,其作用机理可能是抑制了 CaMK 和 CaM 结合从而导致 Ca^{2+} 信号通路的中断^[10],不能将调节信号传递下去,从而严重抑制小麦条锈菌夏孢子的萌发。

条锈菌为专性活体营养寄生菌,目前缺乏成熟的转化体系,因此直接研究基因的功能还存在很大困难。关于 *Pscamk* 在条锈菌致病侵染过程尤其是侵染初期中的作用值得进一步研究。目前,我们正在利用寄主诱导的基因沉默 (HIGS) 体系进行该基因的功能分析^[26]。本研究为解析 *Pscamk* 在条锈菌钙信号传导途径和致病过程中的作用奠定了理论基础。

参考文献

- [1] Borges-Walmsley MI, Walmsley AR. cAMP signalling in pathogenic fungi: control of dimorphic switching and pathogenicity. *Trends in Microbiology*, 2000, 8 (3) : 133-141.
- [2] Zhao XH, Mehrabi R, Xu JR. Mitogen-activated protein kinase pathways and fungal pathogenesis. *Eukaryotic Cell*,

- 2007, 6(10): 1701-1714.
- [3] Rose AJ, Kiens B, Richter EA. Ca^{2+} calmodulin-dependent protein kinase expression and signalling in skeletal muscle during exercise. *The Journal of Physiology*, 2006, 574(3): 889-903.
 - [4] Yang YH, Cheng P, Zhi G, Liu Y. Identification of a calcium/calmodulin-dependent protein kinase that phosphorylates the *Neurospora circadian* clock protein FREQUENCY. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(44): 41064-41072.
 - [5] Braun AP, Schulman H. The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. *Annual Review of Physiology*, 1995, 57(1): 417-445.
 - [6] Hook SS, Means AR. Ca^{2+} /CaM-dependent kinases: from activation to function. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2001, 41(1): 471-505.
 - [7] Tamuli R, Kumar R, Deka R. Cellular roles of neuronal calcium sensor-1 and calcium/calmodulin-dependent kinases in fungi. *Journal of Basic Microbiology*, 2011, 51(2): 120-128.
 - [8] Rochlitz H, Voigt A, Lankat-Buttgereit B, Göke B, Heimberg H, Nauck M, Schiemann U, Schatz H, Pfeiffer A. Cloning and quantitative determination of the human Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II (CaMK II) isoforms in human beta cells. *Diabetologia*, 2000, 43(4): 465-473.
 - [9] Chen XM, Moore M, Milus EA, Long DL, Line RF, Marshall D, Jackson L. Wheat stripe rust epidemics and races of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in the United States in 2000. *Plant Disease*, 2002, 86(1): 39-46.
 - [10] Tombes RM, Grant S, Westin EH, Krystal G. G_1 cell cycle arrest and apoptosis are induced in NIH 3T3 cells by KN-93, an inhibitor of CaMK-II (the multifunctional Ca^{2+} /CaM kinase). *Cell Growth & Differentiation*, 1995, 6(9): 1063.
 - [11] Ishida A, Kameshita I, Okuno S, Kitani T, Fujisawa H. A novel highly specific and potent inhibitor of calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1995, 212(3): 806-812.
 - [12] Kang Z, Li Z. Discovery of a normal type new pathogenic strain to lovrin 10. *Journal of Northwestern College of Agriculture*, 1984, 12(4): 18-28. (in Chinese)
康振生, 李振岐. 洛夫林 10 常温致病新菌系的发现. 西北农学院学报, 1984, 12(4): 18-28.
 - [13] Zhang Y, Huang L, Kang Z. Study on germination condition of urediospores of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Mycosystema*, 2006, 25(4): 656-659. (in Chinese)
张永红, 黄丽丽, 康振生. 小麦条锈菌 CY32 夏孢子萌发研究. 菌物学报, 2006, 25(4): 656-659.
 - [14] Zheng WM, Huang LL, Huang JQ, Wang XJ, Chen XM, Zhao J, Guo J, Zhuang H, Qiu CZ, Liu J, Liu HQ, Huang XL, Pei GL, Zhan GM, Tang CL, Cheng YL, Liu MJ, Zhang JS, Zhao ZT, Zhang SJ, Han QM, Han DJ, Zhang HC, Zhao J, Gao XN, Wang JF, Ni PX, Dong W, Yang LF, Yang HM, Xu JR, Zhang GY, Kang ZS. High genome heterozygosity and endemic genetic recombination in the wheat stripe rust fungus. *Nature Communications*, 2013, 4: 2673.
 - [15] Ohya Y, Kawasaki H, Suzuki K, Londesborough J, Anraku Y. Two yeast genes encoding calmodulin-dependent protein kinases. Isolation, sequencing and bacterial expressions of *CMK1* and *CMK2*. *Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266(19): 12784-12794.
 - [16] Melcher ML, Thorner J. Identification and characterization of the *CLK1* gene product, a novel CaM kinase-like protein kinase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(47): 29958-29968.
 - [17] Pausch MH, Kaim D, Kunisawa R, Admon A, Thorner J. Multiple Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase genes in a unicellular eukaryote. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 1991, 10(6): 1511.
 - [18] Hanyu Y, Imai KK, Kawasaki Y, Nakamura T, Nakaseko Y, Nagao K, Kokubu A, Ebe M, Fujisawa A, Hayashi T. *Schizosaccharomyces pombe* cell division cycle under limited glucose requires Ssp1 kinase, the putative CaMKK, and Sds23, a PP2A-related phosphatase inhibitor. *Genes to Cells*, 2009, 14(5): 539-554.
 - [19] Dayton JS, Sumi M, Nanthakumar NN, Means AR. Expression of a constitutively active Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase in *Aspergillus nidulans* spores prevents germination and entry into the cell cycle. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(6): 3223-3230.
 - [20] Joseph JD, Means AR. Identification and characterization of two Ca^{2+} /CaM-dependent protein kinases required for normal nuclear division in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(49): 38230-38238.
 - [21] Tombes RM, Peppers LS. Sea urchin fertilization stimulates CaM kinase-II (multifunctional [type II] Ca^{2+} /CaM kinase) activity and association with p34^{cdc2}.

- Development, Growth & Differentiation*, 1995, 37 (5): 589-596.
- [22] Li L, Satoh H, Ginsburg KS, Bers DM. The effect of Ca^{2+} calmodulin-dependent protein kinase II on cardiac excitation-contraction coupling in ferret ventricular myocytes. *The Journal of Physiology*, 1997, 501 (1): 17-31.
- [23] Flaishman M, Hwang CS, Kolattukudy P. Involvement of protein phosphorylation in the induction of appressorium formation in *Colletotrichum gloeosporioides* by its host surface wax and ethylene. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1995, 47 (2): 103-117.
- [24] 康振生. 植物病原真菌的超微结构. 北京: 中国科学技术出版, 1996.
- [25] Kang Z, Li Z, Chong J, Rohringer R. Ultrastructure and cytochemistry of urediospores of wheat stripe rust. *Acta Mycologica Sinica*, 1994, 13 (1): 52-57. (in Chinese). 康振生, 李振岐, 庄约兰 J, 罗格林 R. 小麦条锈菌吸器超微结构和细胞化学的研究. 真菌学报, 1994, 13 (1): 52-57.
- [26] Yin CT, Jurgenson JE, Hulbert SH. Development of a host-induced RNAi system in the wheat stripe rust fungus *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2011, 24 (5): 554-561.

Function of a calcium-dependent protein kinase gene *Pscamk* in *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*

Juan Qin, Chuanming Huang, Fuxin He, Xiaoguo Zhu, Yang Zhang, Zhensheng Kang^{*}, Jun Guo^{*}

State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas and College of Plant Protection, Northwest A & F University, Yangling 712100, Shaanxi Province, China

Abstract: [Objective] To clone calcium-dependent protein kinase gene (*camk*) from *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* (*Pst*) and analyze its function. [Methods] The cDNA full-length of *Pscamk* was isolated by using reverse transcriptional-PCR (RT-PCR), and gene expression profile at different morphological stages was analyzed *via* quantitative real-time-PCR (qRT-PCR). *Pst* urediospores were treated with CaMK suppressor KN-93 and germination rate was investigated. [Results] A gene cDNA full-length with 1 620 bp was obtained and designated as *Pscamk*. qRT-PCR analysis showed *Pscamk* expression was highly induced in the early stages of *Pst* infection and reached the maximum at 6 h post inoculation (hpi) as 20.74-fold as that in the control (0 hpi). With increasing of the concentration of CaMK suppressor KN-93, germination rate of *Pst* urediospores was gradually decreased. The germination rate was reduced to 8.02%, only 12% of the control, under 1.4 $\mu\text{mol/L}$ KN-93 treatment at 10 h after incubation at 9 °C. [Conclusion] *Pscamk* might play a role in germination and germ tube elongation of *Pst* urediospores. This study provides a basis for exploring pathogenesis of calcium signaling pathway during *Pst* infection.

Keywords: stripe rust, calcium-dependent protein kinase, CaMK suppressor KN-93, qRT-PCR

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Key Project of China National Programs for Fundamental Research and Development (2013CB127700), by the National Natural Science Foundation of China (31371889, 31171795), by the 111 Project from the Ministry of Education of China (B07049), by the Program for New Century Excellent Talents in University (NCET-12-0471) and by the Fundamental Research Funds for the Central Universities of China (YQ2013001)

^{*} Corresponding author. Jun Guo, Tel: +86-29-87081317, E-mail: guojunwgq@nwsuaf.edu.cn; Zhensheng Kang, Tel: +86-29-87080061, E-mail: kangzs@nwsuaf.edu.cn

Received: 22 January 2014 / Revised: 7 April 2014