

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(2):174-181; 4 February 2010
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

小麦条锈菌 *PsCdc2* 基因的克隆及在条锈菌侵染小麦后的转录表达分析

代西维, 郭军, 陈玥颖, 段迎辉, 夏宁, 魏国荣, 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】克隆小麦条锈菌细胞分裂基因 *PsCdc2*, 分析该基因在条锈菌接种小麦后不同时间点的表达特征。【方法】利用 PCR 和 RT-PCR 技术克隆 *PsCdc2* 的 cDNA 序列和基因组序列, 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, 对该蛋白进行系统发育分析, 构建进化树; 运用实时荧光定量 RT-PCR 技术, 以 *PsCdc2* 在夏孢子时期的表达情况为对照, 分析该基因在亲和及非亲和和互作中不同时间点的表达特征。【结果】*PsCdc2* 基因组序列长 2279 bp, 由 11 个外显子和 10 个内含子构成, 开放阅读框为 885 bp, 编码 294 个氨基酸, 分子量为 33.14 kDa, 等电点为 6.26。编码蛋白含两个保守的激酶特征位点, 一个跨膜螺旋区域。*PsCdc2* 基因编码蛋白与小麦秆锈菌、新型隐球菌、玉米瘤黑粉菌等多种真菌的 Cdc2 高度相似, 其中与小麦秆锈菌的 Cdc2 亲缘关系最近, 序列相似性达 73.1%。实时荧光定量 RT-PCR 结果表明, 在亲和组合中, 该基因在条锈菌接种小麦的前期上调表达, 其中接种后 12 h 时表达量最高, 约为夏孢子中表达量的 1.62 倍, 接种后 24-268 h, 基因表达基本呈下调趋势, 其中 96 h 基因表达量最低, 仅为夏孢子时期的 0.07 倍。在非亲和组合中, 该基因表达基本呈下调趋势, 在接种后各个时间点的表达量均低于在夏孢子中的表达量, 其中接种后 12 h 时表达量最高, 但仅为夏孢子中表达量的 0.34 倍; 接种后 96 h 表达量最低, 为夏孢子中表达量的 0.02 倍。【结论】*PsCdc2* 可能通过调控条锈菌的细胞周期循环参与了侵染前期初生菌丝生长和吸器母细胞的形成, 与条锈菌的致病性相关。本文首次报道了小麦条锈菌的 Cdc2 基因, 为进一步揭示条锈菌细胞周期调控的本质及研究开发靶向 Cdc2 的新型农药, 以及实现对小麦条锈病的新型药剂防治提供了理论基础。

关键词: 细胞周期蛋白依赖性激酶; 细胞分裂基因 2; 进化树; 实时定量 PCR

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 02-0174-08

由小麦条锈菌 (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, *Pst*) 引起的小麦条锈病是小麦生产上的一种重要病害, 其大流行年份常常引起小麦的减产甚至绝收。对小麦条锈菌侵染小麦早期事件的研究特别是在分子水平上了解条锈菌的侵染机制将为小麦条锈病的防治奠定理论基础。

Cdc2 (cell division cycle 2) 是由细胞分裂周期基因 2 编码的相对分子量为 34 kDa 的蛋白质, 它只有和细胞周期蛋白结合才具有激酶的活性, 因此又被称为细胞周期蛋白依赖性激酶 1 (cyclin-dependent kinase 1, CDK1)^[1-2]。CDK 与 cyclin 的结合激活其激酶活性, 在此二元复合物中, CDK 为

基金项目: 国家“973”项目 (2006CB100203); 教育部科学技术研究重点项目 (107104); 现代农业产业技术体系建设专项资金; 高等学校学科创新引智计划资助项目 (B07049); 农业部行业计划项目; 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: 代西维 (1986-), 女, 陕西蓝田人, 硕士研究生, 主要从事分子植物病理学研究。E-mail: daixiwei_222cn@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-09-22; **修回日期:** 2009-11-03

催化亚基, cyclin 为调节亚基, 该复合物通过磷酸集团的转移作用于其他蛋白, 调节 DNA 复制的启动和终止, 染色体的凝集、运动和松懈, 核膜、核仁的崩解和重新形成, 核纤层的降解和重新聚合, 纺锤体的形成和消失等分子事件, 从而驱动细胞周期^[1]。它们可根据作用的时期不同分为 G1、G1/S、S 期 CDK, 及 M 期 CDK^[1]。Cdc2 属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族, 是最早发现的 CDKs 家族成员之一^[1]。真菌细胞周期调控的研究始于 Hartwell 等制备了一系列酿酒酵母 *cdc* 基因的突变体^[3]。之后, 人们广泛的研究了粟酒裂殖酵母的细胞周期调控机制。这些研究主要集中在对涉及细胞周期调控的信号途径识别^[4]。粟酒裂殖酵母及其同源真菌的细胞周期调控是由 Cdc 分子, 特别是 Cdc2 调控的, Cdc2 与不同的细胞周期蛋白相结合, 对 G1 期到 S 期和 G2 期到 M 期的转变起重要的作用^[5]。此外, 对白色念珠菌 *Cdc2* 基因的研究表明, 该基因是白色念珠菌的菌丝发展和毒力作用必需的基因^[6]。在玉米瘤黑粉菌中, 克隆了 CDK 催化亚基基因 *Cdk1*, 同时获得了两个编码 CDK1 调节亚基-B 型细胞周期蛋白 Clb1 和 Clb2 的基因^[7]。研究表明, *Clb1* 在细胞周期中有重要作用, 是 G1 期到 S 期和 G2 期到 M 期转变必需的基因; *Clb2* 是 G2/M 期转变特异的基因, 适量的 Clb2 细胞周期蛋白对病菌的成功入侵至关重要, 低水平或高水平 Clb2 表达的突变体菌株在该病菌入侵的不同阶段均被削弱; 进一步证明了细胞周期, 形态形成和致病力之间密切相关^[7]。Castillo-Lluva 等^[8]研究了 *Cdk5* 基因, 发现该基因的突变体不能形成维持玉米瘤黑粉菌侵染结构所必须的两极化生长, 表明该基因是维持毒力必须的基因。但是关于该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 *Cdc2* 基因, 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, 并利用荧光定量 PCR 的方法检测了该基因在夏孢子以及小麦与条锈菌亲和组合和非亲和组合中接种后不同时间点的表达特征。初步推断该基因可能参与了小麦条锈菌侵染小麦过程中细胞周期蛋白激酶 1 的合成, 并通过调节条锈菌的细胞周期促进条锈菌对小麦的侵染。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌种及小麦品种: 供试小麦品种为“水

源 11”和“铭贤 169”, 小麦条锈菌为 CYR23 和 CYR32 生理小种。其中“水源 11”与 CYR23 构成非亲和组合, “铭贤 169”与 CYR32 构成亲和组合。小麦播种在直径 10 cm 塑料盆中, 在温室中培养, 温度为 15℃, 光照 16 h。待其第一叶充分展开进行接种, 方法参照康振生的报道^[9]。分别于接种后的 6、12、18、24、36、48、72、96、168、216、268 h 剪取接种叶片, 于 -80℃ 保存备用。

1.1.2 主要试剂和仪器: 试剂: BIOZOL 试剂 (杭州博日公司产品); pGEM[®]-T easy 载体、M-MLV Reverse Transcriptase (Promega 公司); Oligo (dT) 18 (上海生工); Taq DNA polymerase (Fermentas 公司); DNA 凝胶回收试剂盒 (U-gene 公司); 质粒微量抽提试剂盒 (U-gene 公司); dNTP、IPTG、X-gal、DNase I、EcoR I、Premix Ex Taq[™] 均为 TaKaRa 公司产品; 测序用引物 M13⁺ 和 M13⁻ (上海生工, China)。仪器: PTC-200 型 PCR 仪; Eppendorf Centrifuge 5810R 型台式低温高速离心机; Eppendorf Centrifuge 5415D 型台式常温高速离心机; HIRAYAMA HV-50 型全自动高压灭菌锅; Milli-Q 型超纯水仪; DYY-6C 型电泳仪; BIO IMAGING System Gene GENIUS 凝胶成像系统; Eppendorf 核酸蛋白检测仪; ABI PRISM 3130XL Genetic analyzer 测序仪 (ABI 公司生产)。

1.2 小麦条锈菌基因组 DNA, 总 RNA 的提取与 cDNA 合成

小麦条锈菌基因组 DNA 的提取方法参照 Chen 等^[10]。采用 Biozol 试剂提取条锈菌夏孢子以及接种后不同时间小麦叶片的总 RNA。第一链 cDNA 的合成按照 Invitrogen 公司的 M-MLV reverse transcriptase 试剂盒操作说明进行, 反转录引物采用 oligo d(T) 18。

1.3 *PsCdc2* 的 cDNA 序列与基因组序列的克隆

从小麦条锈菌全长 cDNA 文库^[10]中筛选得到一个与其它真菌 *Cdc2* 基因相似的 EST 序列 contig34, 文库中记录片段大小为 563 bp, 由 rust_F_12n20 和 rust_F_20P17 两个 EST 序列拼接而成。从所保存的基因文库中找到两个菌株进行质粒提取, 酶切鉴定插入片段大小及质粒测序。利用 Premier 5.0 软件在 rust_F_12n20 已知序列两端设计引物一对引物 P1F (5'-GGTAGG AATATTAATTATAAGTATCTAA-3'), P1R (5'-CTG AAA AAG GTA TTT ATT TATTATT-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, 50℃ 30 s, 72℃ 2 min) 45 个循环; 72℃ 10 min; 4℃ 保温。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。获得的序列去载体, 用 DNASTar 软件完成拼接获得基因 *PsCdc2* 的 cDNA 全长。以条锈菌的基因组 DNA 为模板, 同样的方法克隆基因组序列, 经测序、去载体、拼接获得基因 *PsCdc2* 的基因组全长。

1.4 *PsCdc2* 编码蛋白的序列分析

利用 ProtParam 程序 (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) 预测氨基酸的一级结构; 利用 TMpred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) 预测多肽跨膜区域; 利用 psort (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form.html>) 预测亚细胞定位; 利用 prosite 程序 (<http://www.expasy.ch/prosite/>) 和 InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/>) 预测蛋白质功能域。利用 DNAMAN、MEGA 4 软件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 实时荧光定量 RT-PCR 分析

根据 *PsCdc2* 基因的 cDNA 序列, 利用 Premier 5.0 软件设计定量 PCR 上下游引物(上游引物为: 5'-GGGATGGTGATGGAATGG-3'; 下游引物为 5'-CAATACTTCAGGGGCACGA-3')。选用小麦条锈菌延伸因子基因作为内参(上游引物为 5'-TTCGCCGTCCGTGATATGAGACAA-3'; 下游引物为 5'-ATGCGTATCATGGTGGTGGACTGA-3')。应用 ABI PRISM 7500 实时定量 PCR 仪, 以各个取样点的 cDNA 为模板, 进行 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。采用 Delta Delta Ct 法分析实验数据, 确定基因的相对表达量^[11]。每个取样点设 3 个反应重复, 在同一个批次完成目标基因和内参基因的 PCR 反应。

2 结果和分析

2.1 *PsCdc2* 基因组序列与 cDNA 序列的克隆

对 rust_F_12n20 和 rust_F_20P17 质粒测序发现两条序列均有 polyA 结构, rust_F_12n20 插入片段 1398 bp, rust_F_20P17 插入片段为 1370 bp,

DNASTar 比对发现两者除 3 个位点碱基不同及 rust_F_20P17 的序列在 polyA 结构前少一段 28 bp 的序列。在 NCBI 上利用 ORF Finder 软件, 发现两条序列均有一个 885 bp, 编码 295 aa 的完整 ORF 区, 两者仅有两个氨基酸序列的差异。分析 2 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 P1F, P1R 为引物进行 PCR 扩增, 后克隆测序, 并与原始序列拼接, 获得 1395 bp 的 cDNA 序列。利用条锈菌的基因组 DNA 为模板, 以 P1F, P1R 为引物, 同样的方法克隆基因, 获得 2279 bp 的基因组序列, 由 11 个外显子和 10 个内含子组成。该基因的 cDNA 序列包含 885 bp 的开放阅读框, 编码 294 个氨基酸。编码蛋白有 PSTAIRE 保守序列(45 ~ 51 位氨基酸)。所编码蛋白与小麦秆锈菌 (*Puccinia graminis*)、新型隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*)、玉米瘤黑粉菌 (*Ustilago maydis*)、粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*) 的 *Cdc2* 基因相似性最高, 相似性分别为 73.1%、72.4%、70.4%、68.7%, 拟命名为 *PsCdc2* (GenBank 登录号: GQ911579)。

2.2 *PsCdc2* 编码蛋白的序列分析

利用 ProtParam 预测 *PsCdc2* 所编码氨基酸的一级结构, 结果显示该序列含有 294 个氨基酸, 分子量为 33.14 kDa, 等电点为 6.26。

用 Prosite 软件对 *PsCdc2* 编码蛋白结构位点预测, 该蛋白质中含两个保守的激酶特征位点, 分别为位于 10-33 个氨基酸之间的的蛋白质激酶 ATP 结合区, 和一个位于 124-136 个氨基酸之间的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶激活位点。用 InterProScan 对其结构域分析发现, *PsCdc2* 所编码的蛋白具有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶保守结构域, 且两个激酶特征位点均位于该激酶的催化核心处。这些结果说明 *PsCdc2* 所编码的蛋白为丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族的成员之一。由 TMpred 程序预测表明, *PsCdc2* 所编码的蛋白在 180-199 个氨基酸残基间存在一个由内到外的跨膜螺旋区域。另外, 经 Psort 预测显示, *PsCdc2* 所编码的蛋白定位于细胞质的可能性为 45%; 定位于微体的可能性 43.2%; 定位于线粒体基质和溶酶体的可能性均为 10%。

利用 DNAMAN 软件将预测的 *Cdc2* 蛋白与 BlastX 比对到的同源 *Cdc2* 基因序列进行比对(图 1), 结果显示该蛋白氨基酸序列非常保守, 编码蛋白从 N 端到 C 端分别具有甘氨酸富集区、激酶插入位点、催化位点、激活区及 CDK 插入区多个保守序

列,表明目标蛋白为典型的 CDK 激酶。为进一步验证 *PsCdc2* 与其它真菌 *Cdc2*, *Cdc28* 的亲缘关系, 及其动物 *Cdc2* 的亲缘关系, 选择了来自小麦秆锈菌 *Puccinia graminis* 的 *PgCdc2*, 序列来源于 (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/puccinia_graminis/)、新型隐球菌 *Cryptococcus neoformans* 的 *CnCdc2* (XP_569525)、玉米瘤黑粉病菌 *Ustilago maydis* 的 *UmCdc2* (AAP94021)、粗糙脉孢霉 *Neurospora crassa* 的 *NcCdc2* (XP_960117)、卡氏肺孢子虫 *Pneumocystis carinii* 的 *PcCdc2* (AAD05577)、葡萄牙棒孢酵母 *Clavispora lusitaniae* 的 *ClCdc28* (EEQ41213)、热带假丝酵母 *Candida tropicalis* 的

CtCdc28 (EER35911)、白色念珠菌 *Candida albicans* 的 *CaCdc28* (XP_713525)、杜氏假丝酵 *Candida dubliniensis* 的 *CdCdc28* (XP_002422133), 用最大似然法 (Maximum Parsimony method) 构建系统进化树 (图2)。在系统进化树上, *Cdc2* 目的蛋白 *PsCdc2* 与 *Cdc2* 类蛋白的亲缘关系明显近于与 *Cdc28* 类蛋白的亲缘关系。在 *Cdc2* 类蛋白中, *PsCdc2* 与小麦秆锈菌 *Puccinia graminis* 相关基因的亲缘关系最近, 与新型隐球菌 *Cryptococcus neoformans* 和玉米瘤黑粉病菌 *Ustilago maydis* 的亲缘关系次之, 与粗糙脉孢霉 *Neurospora crassa* 和卡氏肺孢子虫 *Pneumocystis carinii* 的亲缘关系较远。

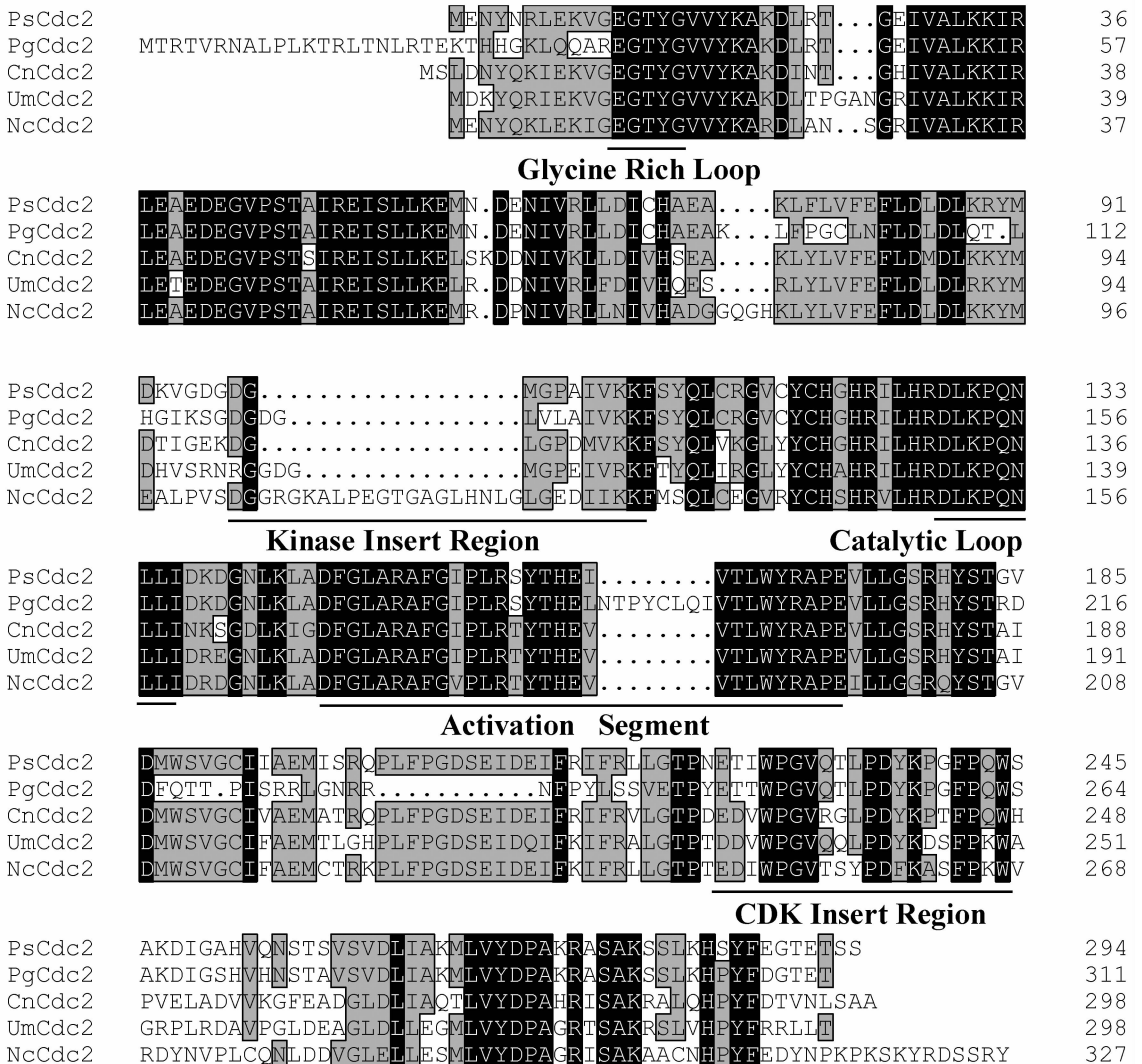


图1 *PsDdc2* 与其同源蛋白的氨基酸序列比对

Fig.1 Protein sequence alignment of *PsCdc2* with other homologous proteins. *Puccinia graminis*, *PgCdc2* (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/puccinia_graminis/); *Cryptococcus neoformans*, *CnCdc2* (Genbank: XP_569525); *Ustilago maydis*, *UmCdc2* (Genbank: AAP94021); *Neurospora crassa*, *NcCdc2* (Genbank: XP_960117).

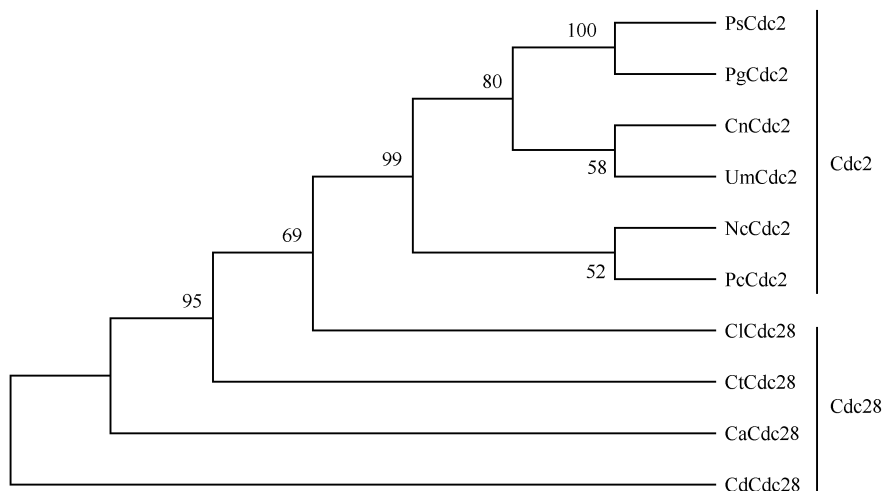


图2 *PsCdc2* 与 *Cdc2* 和 *Cdc28* 蛋白的进化分析

Fig. 2 Phylogenetic tree of *PsCdc2* and other *Cdc2* and *Cdc28* proteins. *Puccinia graminis*, *PgCdc2* (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/puccinia_graminis/); *Cryptococcus neoformans*, *CnCdc2* (Genbank: XP_569525); *Ustilago maydis*, *UmCdc2* (Genbank: AP94021); *Neurospora crassa*, *NcCdc2* (Genbank: XP_960117); *Pneumocystis carinii*, *PcCdc2* (Genbank: AAD05577); *Clavospora lusitanae*, *ClCdc28* (Genbank: EEQ41213); *Candida tropicalis*, *CtCdc28* (Genbank: EER35911); *Candida albicans*, *CaCdc28* (Genbank: XP_713525); *Candida dubliniensis*, *CdCdc28* (Genbank: XP_002422133). Numbers at the nodes indicate bootstrap values.

2.4 *PsCdc2* 基因的表达特征分析

2.4.1 *PsCdc2* 基因在亲和组合中表达特征的分析:用新鲜的条锈菌 CYR32 夏孢子,以及接种后不同时间点的“铭贤 169”小麦叶片为材料,利用实时荧光定量 PCR 分析了 *PsCdc2* 的表达特征(图 3)。结果显示,*PsCdc2* 在夏孢子中以及接种小麦寄主后不同时间点均有表达。与夏孢子时期表达情况相比,在条锈菌接种小麦寄主后的 6-18 h,该基因表达量具有升高的特点,其中侵染寄主 12 h 时表达量最

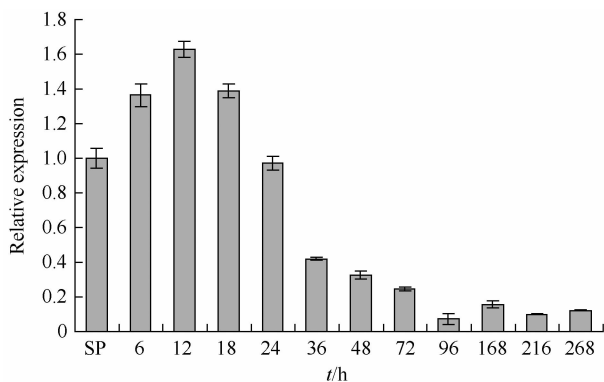


图3 实时定量分析 *PsCdc2* 在亲和组合中接种后不同时间点的表达特征

Fig. 3 Real time PCR analysis of the expression of *PsCdc2* in compatible interaction of wheat and *Pst.*. EF was chosen as the reference gene and the urediospore stage was used as a calibration. SP: urediospore of CYR32.

高,约为夏孢子中的 1.62 倍;6 h 和 18 h 时约为夏孢子的 1.38 倍,24 h 时与夏孢子中的表达量相当,24 h 后 *PsCdc2* 基因的表达量呈下降趋势,其中 96 h 时最低,仅为夏孢子时期的 0.07 倍。

2.2.2 *PsCdc2* 基因在非亲和组合中表达特征的分析:用新鲜的条锈菌 CYR23 夏孢子,以及接种后不同时间点的“水源 11”小麦叶片为材料,利用实时荧光定量 PCR 分析了 *PsCdc2* 的表达特征(图 4)。结

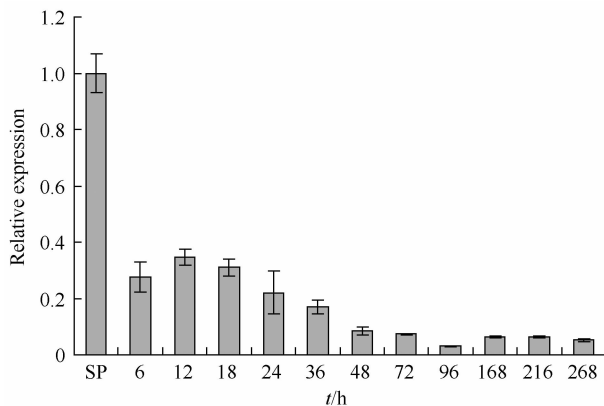


图4 实时定量分析 *PsCdc2* 在非亲和组合中接种后不同时间点的表达特征

Fig. 4 Real time PCR analysis of the expression of *PsCdc2* in incompatible interaction of wheat and *Pst.*. EF was chosen as the reference gene and the urediospore stage was used as a calibration. SP: urediospore of CYR23.

果显示,该基因表达基本呈下调趋势,与夏孢子中该基因的表达情况相比,条锈菌接种小麦后各个时间点的表达水平都很低。接种后最高的表达水平出现在 12 h 时,约为夏孢子中的 0.34 倍;接种 18 h 后表达量呈下降趋势,在接种后 24 h 时表达量约为夏孢子中的 0.22 倍,接种后 96 h 该基因的表达量最低,仅为夏孢子中的 0.02 倍。

3 讨论

本文首次克隆得到了小麦条锈菌 *PsCdc2* 基因,并对该基因进行了序列分析。多序列比对表明,该类基因的蛋白质序列非常保守,目标蛋白含有 CDK 蛋白的多个保守序列^[13],且含有激酶结构域的一段保守序列“PSTAIRE”,该保守序列为已知动物中 CDK 的保守序列,在真菌中也非常保守^[14]。蛋白结构位点预测发现该基因编码的氨基酸含有两个保守的激酶特征位点,分别为蛋白质激酶 ATP 结合区和丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶激活位点。氨基酸一级结构预测显示该蛋白分子量为 33.14 kDa,这与 Cdc2 类蛋白的分子量一致^[2,7]。夏晓峰等^[2]研究表明,来自微生物的 Cdc2 蛋白与来自高等植物的 Cdc2 蛋白具有很近的亲缘关系,该蛋白在各个物种中非常保守。本实验进化树分析结果表明 *PsCdc2* 与小麦秆锈菌 Cdc2 蛋白同源性最近,序列一致性达 73.1%,与新型隐球菌、玉米瘤黑粉菌的 Cdc2 蛋白的同源性也很近,进一步表明该基因编码一个 Cdc2 蛋白,即为 CDK1。

许多真菌基本新陈代谢过程,比如细胞周期循环,转录,交配,均需要蛋白的磷酸化。对丝状真菌中蛋白激酶和磷酸酶的研究还处于开始阶段,但是已经清楚激酶和磷酸酶可能是真菌繁殖和生长,信号传导和侵入相关的形态的重要的调控元件^[15]。Cdc2 可将特定蛋白磷酸化,促进细胞周期运行,又称作细胞周期引擎,其在细胞周期调控中起着非常重要的作用^[2]。玉米瘤黑粉菌中克隆了编码 CDK 催化亚基 Cdk1 和两个调节亚基(B 型细胞周期蛋白 Clb1 和 Clb2)的基因,研究表明适量的 Cdk1/Clb2 复合物对病菌成功入侵寄主至关重要,低水平或高水平的表达导致病菌的入侵被削弱^[7]。在白色念珠菌中,对 Cdc2 基因的研究表明,该基因是白色念珠菌菌丝形成和毒力作用所必需的基因^[6]。在小麦与条锈菌互作过程中,细胞组织学研究表

明,小麦条锈菌在接种后 6 h 时有芽管的形成,少量产生气孔下囊;接种后 12 h 初生菌丝生长,个别有吸器母细胞出现;接种后 24 h 和 36 h 吸器逐渐大量形成;48 h 后次生菌丝生长,在亲和组合中与非亲和组合中孢子的生长过程基本相同,只是在亲和组合中的生长量要多于在非亲和组合中的生长量^[16-17]。本研究 *PsCdc2* 基因的实时荧光定量 PCR 结果表明,在亲和组合中,接种后 6-24 h 表达量都较高,其中接种后 12 h 表达量最高,约为夏孢子中表达量的 1.62 倍,24 h 之后表达量呈下降趋势,初步推断该基因在条锈菌侵染小麦的前期高表达,可能参与了侵染前期初生菌丝生长和吸器母细胞的形成。在非亲和组合中,*PsCdc2* 基因在接种后不同时间点的表达量明显低于亲和组合,且接种后的表达量均低于在夏孢子中的表达量,初步推断该基因在小麦与条锈菌互作过程中起到一定的作用。从该基因在亲和和非亲和互作中的表达趋势上来看,推测该基因通过调控条锈菌的细胞周期循环影响初生菌丝的生长和吸器母细胞的形成,是一个致病相关的基因。

细胞循环是一个非常具有意义的研发新型农药的靶目标资源。细胞循环对研发新型农药有重要意义。1939 年发现的一种最早的抗真菌农药灰黄霉素是通过抑制细胞循环起作用的。灰黄霉素通过结合与微管关联的蛋白抑制细胞内微管的集聚,从而破坏有丝分裂纺锤体抑制细胞分裂,其产生的代谢物到 1950s 被用于人类疾病的治疗^[4]。张慧敏等^[18]研究发现抑制周期依赖性蛋白激酶 CDK 的活性对治疗癌症非常有用。目前已经筛选了一些针对 CDKs 的抑制剂来调控细胞周期并用于癌症的治疗,如 CDK2/CDK4^[19-20]。通过对白色念珠菌和玉米瘤黑粉菌的研究表明,Cdc2 基因是菌丝发展和病原菌成功侵染寄主的必需基因^[6-7,21]。Sgarlata 等^[20]提出了细胞周期调控微生物的致病能力的可能性。因此,本研究为下一步研究目标蛋白质的功能及其晶体结构,根据其功能设计有效的小麦条锈菌抑制剂,开发靶向 Cdc2 的新型农药打下了基础。

参考文献

- [1] 兰蕾,赫荣乔. 细胞周期分子机制的成功探索. 生物化学与生物物理进展 (*Progress in Biochemistry and Biophysics*), 2001, 28(6): 773-777.

- [2] 夏晓峰, 黄云鹏, 江贤章. 裂殖壶菌 EST 文库 cdc2 基因的筛选与分析. *微生物学杂志 (Journal of microbiology)*, 2008, 28(3): 7-14.
- [3] Hartwell LH, Culotti J, Reid B. Genetic control of the cell-division cycle in Yeast. I. Detection of mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1970, 66(2): 352-359.
- [4] Bordon-Pallier F, Jullian N, Haesslein JL. The cell cycle of pathogenic fungi; target for drugs. *Progress in Cell Cycle Research*, 2003, 5: 81-90.
- [5] Thomas CF, Jr. Anders RA, Gustafson MP, et al. *Pneumocystis carinii* contains a functional cell-division-cycle Cdc2 homologue. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 1998, 18: 297-306.
- [6] Chen JY, Zhou S, Wang Q, et al. Crk1, a novel Cdc2-related protein kinase, is required for hyphal development and virulence in *Candida albicans*. *Molecular and Cellular Biology*, 2000, 23 (20): 8696-8708.
- [7] Garcia-Muse T, Steinberg G, Perez-Martin J. Characterization of B-type cyclins in the smut fungus *Ustilago maydis*: roles in morphogenesis and pathogenicity. *Journal of Cell Science*, 2003, 117(3): 487-506.
- [8] Castillo-Lluva S, Alvarez-Tabares I, Weber Isabella, et al. Sustained cell polarity and virulence in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis* depends on an essential cyclin-dependent kinase from the Cdk5/Pho85 family. *Journal of Cell Science*, 2007, 120: 1584-1595.
- [9] 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 (Journal of Northwest Agriculture College)*, 1984, 12(4): 18-28.
- [10] Chen XM, Line RF, Leung H. Relationship between virulence variation and DNA polymorphism in *Puccinia striiformis*. *Phytopathology*, 1993, 83: 1489-1497.
- [11] Ling P, Wang MN, Chen XM, et al. Construction and characterization of a full-length cDNA library for the wheat stripe rust pathogen (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*). *BMC Genomics*, 2007, 8: 145.
- [12] Kenneth JL, Thomas DS. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [13] Holton S, Merckx A, Burgess D, et al. Structures of *P. falciparum* PfPK5 test the CDK regulation paradigm and suggest mechanisms of small molecule inhibition. *Structure*, 2003, 11: 1329-1337.
- [14] Pines J, Hunter T. Cyclin-dependent kinases: a new cell cycle motif? *Trends in Cell Biology*, 1991, 1: 117-121.
- [15] Dickman MB, Yarden O. Serine/threonine protein kinases and phosphatases in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 1999, 16: 99-117.
- [16] Wang CF, Huang LL, Buchenauer H, et al. 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.
- [17] 康振生, 王瑶, 黄丽丽, 等. 小麦品种对条锈病低反应型抗性的组织学和超微结构研究. *中国农业科学 (Scientia Agricultura Sinica)*, 2003, 36 (9): 1026-1031.
- [18] 张慧敏, 尹静梅, 高大彬, 等. 细胞周期依赖性蛋白激酶 (CDK) 抑制剂 Xylocyline 的合成进展. *大连大学学报 (Journal of Dalian University)*, 2008, 19 (3): 23-27.
- [19] Senderowicz AM. Small-molecule cyclin-dependent kinase modulators. *Oncogene*, 2003, 22 (42): 6609-6620.
- [20] Dai Y, Grant S. Cyclin-dependent kinase inhibitors. *Current Opinion in Pharmacology*, 2003, 23 (4): 362-370.
- [21] Sgarlata C, Perez-Martin J. Inhibitory phosphorylation of a mitotic cyclin-dependent kinase regulates the morphogenesis, cell size and virulence of the smut fungus *Ustilago maydis*. *Journal of Cell Science*, 2005, 118 (16): 3607-3620.

Cloning and transcriptional profiling of a cell division cycle gene *PsCdc2* from stripe rust fungus during incompatible and compatible interaction between wheat and *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*

Xiwei Dai, Jun Guo, Yueying Chen, Yinghui Duan, Ning Xia, Guorong Wei, 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 a cell division cycle *PsCdc2* from *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* (*Pst*) and analyze its expression profile. [Methods] Using PCR and RT-PCR methods, we isolated the cDNA and genomic DNA sequences of *PsCdc2*. We analyzed the amino acid sequence of *PsCdc2* using bioinformatic softwares. In addition, Real time RT-PCR was used to analyze the gene expression pattern of *PsCdc2* at different time points after wheat inoculated. [Results] A 2279 bp DNA sequence of *PsCdc2* was cloned and comprised of 11 exons and 10 introns. The cDNA sequence of *PsCdc2* included a complete 885 bp open reading frame and encoded a putative protein composed of 294 amino acids, with a molecular weight of 33.14 KDa and a pI of 6.26. *PsCdc2* contained two conserved kinase domains and a transmembrane domain. Phylogenetic analysis indicated that *PsCdc2* showed high similarity with *Cdc2* from *Puccinia graminis* (73.1%), *Cryptococcus neoformans* (72.4%) and *Ustilago maydis* (70.4%), respectively. Real time RT-PCR analysis showed that in compatible interaction between *Pst* and wheat, *PsCdc2* was up-regulated at early stage of infection. The maximum induction occurred at 12 hpi, at which transcripts were 1.62 fold over that in urediniospore. From 24 to 268 hpi, the accumulation of transcripts decreased steadily. The minimum accumulation occurred at 96 h, at which transcripts were only 0.07 fold of that in urediniospore. During incompatible interaction between *Pst* and wheat, *PsCdc2* was down-regulated and its accumulation was lower than that in urediniospore. The maximum induction occurred at 12 h, at which transcripts were 0.34 fold of that in urediniospore. The minimum accumulation occurred at 96 h, whose transcript was only 0.02 fold of that in urediniospore. [Conclusion] *PsCdc2* might be involved in primary hyphal growth and haustorium formation during early infection by regulating cell cycle of *Pst*. The present study would be helpful for understanding the essence of cell cycle control and provided basis for new chemical control of *Pst*.

Keywords: cyclin-dependent kinase; cell division cycle gene 2; phylogenetic tree; real time PCR

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Basic Research Program of China (2006CB100203), the Science and Technology Research Key Project of the Ministry of Education of China (107104), the Special Capital for the Construction of Modern Agriculture Technical System of China, the 111 Project from Ministry of Education of China (B07049), the Industry projects from Ministry of Agriculture of China 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: 22 September 2009/Revised: 3 November 2009