DOI: 10.3724/SP.J.1006.2010.02091

含 CBS 结构域的小麦 *TaCDCP1* 基因的克隆及其表达分析

王晓敏¹ 冯浩¹ 孙燕飞¹ 刘博¹ 王晓杰¹ 徐亮胜¹ 于秀梅¹
魏国荣¹ 黄丽丽¹ 康振生^{1,2,*}

¹ 西北农林科技大学植物保护学院, 陕西杨凌 712100; ² 西北农林科技大学 / 陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西杨凌 712100

摘要: 利用电子克隆和 RT-PCR 技术, 在本实验室前期构建的非亲和互作的 SSH 文库基础上, 从条锈菌侵染的小麦水原 11 叶片中首次分离出一个含 CBS 结构域蛋白的基因, 暂命名为 *TaCDCP1* (*Triticum aestivum* CBS domain containing protein 1)。 *TaCDCP1* 包含一个完整的 654 bp 的开放阅读框, 编码 217 个氨基酸。推测该基因拟编码的蛋白具有 2 个 CBS 保守结构域, 不含跨膜区且无信号肽, 定位在叶绿体基质内; 经过同源比对, 小麦 *TaCDCP1* 氨基酸序列与大麦、水稻和玉米等的同源序列的相似性较高; 该基因表达量在小麦叶中显著高于在根和茎中; 在小麦与条锈菌的非亲和、亲和组合中, *TaCDCP1* 基因均受到条锈菌诱导, 分别在接种后 18 h 和 96 h 达到表达高峰, 非亲和组合表达量在侵染前期(接种后 18~48 h)高于亲和组合, 而在侵染后期(接种后 96~120 h)低于亲和组合; 外源植物激素脱落酸诱导该基因上调表达, 苄基腺嘌呤, 乙烯, 赤霉素, 茉莉酸甲酯和水杨酸处理后其表达量在不同程度上受到抑制; *TaCDCP1* 在低温和干旱条件下表达量上升, 在机械伤害和高盐处理下表达量无明显差异。表明 *TaCDCP1* 可能通过脱落酸等信号途径参与小麦对条锈菌的防御反应, 同时参与低温和干旱环境下的信号转导途径。这些结果对于明确 CBS 结构域的功能以及 CBS 结构域蛋白尤其是 *TaCDCP1* 在小麦与条锈菌互作中的作用奠定了基础。

关键词: 小麦; 条锈菌; CBS 结构域; 非生物胁迫; 基因表达

Cloning and Expression Analysis of a CBS Domain Containing Protein Gene *TaCDCP1* from Wheat

WANG Xiao-Min¹, FENG Hao¹, SUN Yan-Fei¹, LIU Bo¹, WANG Xiao-Jie¹, XU Liang-Sheng¹, YU Xiu-Mei¹, WEI Guo-Rong¹, HUANG Li-Li¹, and KANG Zhen-Sheng^{1,2,*}

¹ College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling 712100, China; ² Shaanxi Provincial Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture / Northwest A&F University, Yangling 712100, China

Abstract: To elucidate the defense response of wheat (*Triticum aestivum* L.) to *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* (*Pst*), we constructed the incompatible interaction SSH cDNA library of wheat (cv. Suwon 11) leaves infected by *Pst* CYR23. A total of 652 unigenes were identified and 424 genes were annotated. On the basis of previous study, according to cDNA sequence LWSRP2502 (GenBank accession No. EV254338), a full-length sequence of the CBS domain containing protein gene, tentatively designated as *TaCDCP1* (*Triticum aestivum* CBS domain containing protein 1), was isolated and characterized from wheat leaves infected by *Pst* through in silico cloning and reverse transcription PCR (RT-PCR) approaches. The open reading frame of *TaCDCP1* was 654 bp in length and predicted to encode 217 amino acids protein which contained two conserved cystathionine beta-synthase (CBS) domains and was without transmembrane domain or signal peptide sequence. The deduced protein was predicted existing in chloroplast stroma. The amino acid sequence of *TaCDCP1* shares 92%, 72%, and 63% identity with the homologs in barley (*Hordeum vulgare*), rice (*Oryza sativa*) and maize (*Zea mays*), respectively. The *TaCDCP1* gene was highly expressed in leaves than in roots and stems. Challenged by *Pst*, *TaCDCP1* was induced by this fungus in both incompatible and compatible interactions, with the maximal expression at 18 h post inoculation (hpi) and 96 hpi, respectively. Its transcript accumulation was much higher in the incompatible interaction than in the compatible interaction at the early stage of infection (18–48 hpi), but much lower at the late stage (96–120 hpi). The expression of *TaCDCP1* was also up-regulated after treated by phytohormones such as abscisic acid (ABA), and down-regulated by benzyladenine, ethylene, gibberellins, methyl jasmonate and salicylic

本研究由国家自然科学基金重点项目(30930064), 现代农业产业技术体系建设专项资金和高等学校学科创新引智计划资助项目(B07049)资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 康振生, E-mail: kangzs@nwsuaf.edu.cn

第一作者联系方式: E-mail: wangxiaominamy@yahoo.com

Received(收稿日期): 2010-05-24; Accepted(接受日期): 2010-08-03.

acid to a certain degree. And it was obviously up-regulated by various abiotic stresses, such as low temperature and drought. However, mechanical wound and high salinity stress could not induce the expression of *TaCDCP1*. These results suggest that *TaCDCP1* is probably involved in the disease resistance and defense response in wheat to *Pst* through ABA, and also participate in the signal transmission pathways under low temperature, and drought conditions.

Keywords: Wheat; Stripe rust fungus; CBS domain; Abiotic stresses; Gene expression

由条形柄锈菌(*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*)引起的小麦条锈病,是世界范围内分布最为广泛,毁灭性最强的一种小麦叶部病害,该病的大面积爆发常造成小麦产量大幅度下降,甚至绝收^[1-2]。在我国,该病害已有多次全国范围的大流行,给粮食生产造成巨大损失^[3]。国内外研究和生产实践证明,合理利用抗病基因,培育和推广抗病品种是防治小麦条锈病最经济、安全和有效的方法^[2-3]。优良的抗病基因资源是产生突破性抗病育种的物质基础,了解小麦—条锈菌互作的分子机理是培育广谱、高效、稳定抗病品种的必由之路。

CBS 结构域是 Bateman^[4]根据胱硫醚 β 合成酶(cystathionine beta synthase, CBS)命名的。CBS 结构域蛋白(CBS domain containing protein, CDCP)是由一个蛋白进化上保守的超家族所组成的,他们的主要特征是在这些蛋白中通常有2个或4个CBS结构域相连^[5]。目前在动物中发现这个超家族广泛存在于细胞膜或细胞质的一些蛋白中,如5'-AMP-激活的蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)^[6] γ 亚基,肌苷酸脱氢酶(inosine-5'-monophosphate dehydrogenase, IMPDH)^[7], 氯离子通道(chloride channel, CLC)^[8], 胱硫醚 β 合成酶 CBS^[9], 还有一些膜蛋白等。虽然目前对于 CBS 的功能还不清楚,但该结构域点突变的发生会导致人类的遗传疾病^[10]; 由于 CBS 结构域常附着于其他各种蛋白质结构域上,它的突变还经常导致细胞功能的紊乱,因此推测 CBS 可能在蛋白与蛋白的互作关系中起着重要的调控作用^[8]; 在许多蛋白中 CBS 结构域作为细胞能量代谢的传感器,起着维持细胞内的氧化还原的调控作用^[10]。在植物中,对于 CDCP 的研究才刚刚开始。许多拟南芥和水稻中的未知功能的 CDCP 成员与抵御非生物胁迫有关,并且根据不同的基因型有不同的调控,表明这个家族在植物的抵抗生物与非生物胁迫反应中有重要作用^[5]。Wang 等^[11]从水稻中分离出的褐飞虱诱导的抗性蛋白1(brown planthopper-induced resistance protein 1, Brl)基因,它编码的是含有类似 CBS 结构域的蛋白,研究结果显示,该基因参与水稻对褐飞虱的抗性反应及对生物及非生物胁迫的应答。在近等基因系小麦接种叶锈菌后的基因表达研

究中,与水稻中假定的褐飞虱诱导的抗性蛋白1基因同源的 EST Contig 4160 仅出现于感病品种中,且呈上调表达^[12]。但这类基因在小麦中的全长序列尚未见报道,其在小麦与条锈菌互作过程中的表达特征分析就更无从了解。

为研究小麦与条锈菌互作的分子机制,本实验室前期以小麦品种水原 11 和小麦条锈菌 CYR23 为材料构建的非亲和互作的 SSH 文库中,获得了大量差异表达的表达序列标签(expression sequence tag, EST),对其进行拼接、比对和聚类,并对聚类得到的基因进行分类和注释^[13]。本研究在此基础上,筛选了一个差异表达的 EST 序列 LWSRP2502,采用电子克隆和 RT-PCR 技术,首次从小麦中克隆得到一个含有 CBS 结构域蛋白的基因,暂命名为 *TaCDCP1* (*Triticum aestivum* CBS domain containing protein 1),并利用生物信息学软件对 *TaCDCP1* 的核苷酸及编码蛋白的结构特征进行分析,通过实时定量 RT-PCR 技术明确其在小麦不同组织器官、生物及非生物胁迫下的基因表达特征,为阐明 *TaCDCP1* 及 CBS 结构域蛋白在抗小麦条锈病和抗逆反应中的功能奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料及处理

小麦(*Triticum aestivum* L.)品种水原 11,小麦条锈菌(*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*)条中 23 号生理小种(CYR23)和条中 31 号生理小种(CYR31),由西北农林科技大学植物病理实验室提供。水原 11 与 CYR23 生理小种呈非亲和反应,而与 CYR31 生理小种呈亲和反应。按康振生等^[14]的方法培育及接种小麦幼苗,以涂抹无菌水的小麦叶片作为对照,并分别在接种后 0、6、12、18、24、48、72、96 和 120 h 剪取叶片。生长 2 周左右的小麦根、茎和叶用于不同组织表达研究。参照 Zhang 等^[15]的方法用 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 脱落酸(ABA)、100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 苄基腺嘌呤(BA)、100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 乙烯(ETH)、100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 赤霉素(GA)、100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 茉莉酸甲酯(MeJA)和 2 mmol L^{-1} 水杨酸(SA)喷施生长 4 周左右的小麦叶片,以喷施 0.1% (V/V)乙醇为对照,分别在处理后 0、2、6、12 和

24 h 取样。高盐处理是将小麦根部浸于 200 mmol L^{-1} NaCl; 低温处理是将幼苗生长于 4°C 条件下; 机械损伤是用灭菌剪刀对叶组织造成伤口; 干旱处理是将小麦根部浸于 20% 聚乙二醇(PEG-4000)。分别在处理后 0、2、6、12 和 24 h 取样, 将剪取的叶片迅速置液氮中, -80°C 保存备用。

1.2 总 RNA 的提取与 cDNA 合成

采用 Trizol 试剂(Invitrogen)分别提取以上各叶片样品的总 RNA, DNA 酶 I 处理后备用。以 Oligo d(T)₁₈ 为反转录引物, 用 M-MLV 反转录酶(Invitrogen)试剂盒合成 cDNA 第一链, 用于基因的克隆及实时荧光定量 PCR。

1.3 *TaCDCP1* 基因的全长 cDNA 克隆

以 LWSRP2502(GenBank 登录号为 EV254338)的 EST 为“种子”序列, 利用下载的小麦 EST 数据库和本实验室的 EST 分析平台, 进行 EST contig 的拼接和校对, 利用 NCBI 站点的 ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)程序进一步筛选。使用 Primer Premier 5.0 软件设计能够有效扩增 *TaCOCPI* 基因开放阅读框(open reading frame, ORF)的 RT-PCR 引物 (FP: 5'-GACCCACGCAACATCCAC-3'; RP: 5'-GCTCTCTAAATGCTCCAG-3'), 以条锈菌诱导的各时间点样品的总 RNA 等量混合后经反转录得到的 cDNA 第一链为模板, 进行 PCR 扩增。PCR 程序为 95°C , 4 min; 95°C , 1 min, 60°C 1 min, 72°C 1 min, 35 个循环; 72°C 延伸 10 min; 4°C 保温。电泳检测 PCR 产物, 回收目的片段, 并将其克隆至 pGEM-Teasy 载体, 采用通用引物 T7 和 SP6 进行测序反应, 并在 ABI3130 遗传分析仪(Applied Biosystems, Foster, CA, USA)上进行双向测序。

1.4 *TaCDCP1* 的序列分析

使用 ExPASy 网站的 Compute pI/MW tool (http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html)计算蛋白质的等电点及分子量; 利用 BLASTP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)和 InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>)分析氨基酸保守结构域; 利用 TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>)预测蛋白质信号肽; 利用 TMPred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)进行氨基酸跨膜预测; PSORT (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form.html>)对氨基酸进行亚细胞定位预测。根据推测的 *TaCDCP1* 氨基酸序列, 利用 DNAMAN 软件分别进行氨基酸序列同源性比对和进化树分析。

1.5 实时定量 PCR 分析

根据 *TaCDCP1* 的 cDNA 序列设计定量 PCR 引物 (F: 5'-GCCAGAAGAGGTAGAGCCAGTG-3'; R: 5'-CGTAGCTGAGGAGGGAGAAG-3')。以小麦的延伸因子 *TEF1* (GenBank 登录号为 M90077.1)作为内参 (FP: 5'-TGGTGTTCATCAAGCCTGGTATGGT-3'; RP: 5'-ACTCATGGTGCATCTCAACGGACT-3')。利用 ABI PRISM 7500 实时定量 PCR 仪以各时间点的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。反应体系含 $0.3 \mu\text{L}$ $50\times$ SYBR Green、 $0.1 \mu\text{L}$ ROX Reference Dye、 $10\times$ cDNA $1 \mu\text{L}$ 、 $10\times$ Taq buffer $2.5 \mu\text{L}$ 、 25 mmol L^{-1} MgCl_2 $2.5 \mu\text{L}$ 、 10 mmol L^{-1} dNTP $0.5 \mu\text{L}$ 、 $5 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$ Taq DNA polymerase $0.2 \mu\text{L}$ 、 $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ 引物 $0.5 \mu\text{L}$, 补水至总体积 $25 \mu\text{L}$ 。PCR 程序为 95°C 1 min; 95°C 10 s, 60°C 20 s, 72°C 40 s, 40 个循环。其后添加融解曲线。反应结束后分析荧光值变化曲线和融解曲线, 以 PCR 产物电泳确认扩增产物特异性。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法分析数据, 确定基因的相对表达量。每个样品设 3 次生物学重复, 每个生物学重复设 3 个技术重复, 在同一个批次完成内参基因和目标基因的 PCR 反应。数据的分析及标准误差均由 3 个生物学重复的结果通过 Duncan 测试而统计得出, 当 $P < 0.05$ 时, 接种后各时间点表达量差异显著。

2 结果与分析

2.1 *TaCDCP1* 的全长 cDNA 克隆和序列分析

LWSRP2502 经电子延伸后, 由原来的 233 bp 延伸至 1 118 bp。经 ORF finder 预测, 该延伸序列含有一个完整的 ORF。依据此 ORF 设计特异引物进行扩增, 得到期望长度的产物(854 bp), 经克隆、测序分析, 其序列同电子克隆的序列完全一致。结果显示, 该基因 ORF 长 654 bp, 编码 217 个氨基酸(图 1)。

Blastn 分析发现, 该基因序列与大麦未被注释功能的 FLbaf96m04 的全长序列和玉米包含 CBS 结构域蛋白的基因全长 cDNA 序列高度相似, 且开放阅读框范围基本一致。因此, 可以确定已克隆到的基因有完整的开放阅读框, 将其命名为 *TaCDCP1*。

2.2 *TaCDCP1* 编码蛋白的序列分析

TaCDCP1 所编码的蛋白, 预测分子量为 23.69 kD, pI 值为 8.30。利用 InterProScan 预测程序对 *TaCDCP1* 所编码蛋白的结构域和功能位点进行分析, 结果显示, 含有 2 个 CBS 保守结构域(图 1), 分别在 99~145 位和 157~212 位氨基酸。以 TMPred 预测该

图 2 *TaCDCP1* 编码蛋白与其他植物同源氨基酸序列比对Fig. 2 Multiple alignments of predicted amino acid sequences of *TaCDCP1* and homologs from other species

黑色与灰色分别表示氨基酸序列 100% 及 75% 的相似性; 左侧标注物种拉丁名缩写和蛋白的 GenBank 登录号。Ta: 小麦; Hv: 大麦; Os: 水稻; Zm: 玉米。大麦中同源氨基酸序列对应的核苷酸序列 GeneBank 登录号为 AK251025; BAD21528, 假定的褐飞虱诱导的抗性蛋白 1; AAQ54304, 假定的褐飞虱敏感蛋白 1Hd002A; AAQ54305, 褐飞虱诱导的抗性蛋白 1。

Black and light-gray boxes represent 100% and 75% similarities of amino acid sequences, respectively. Left of the figure shows the species names and the GenBank accession numbers. Ta: *Triticum aestivum*, Hv: *Hordeum vulgare*, Os: *Oryza sativa* and Zm: *Zea mays*. The GenBank accession number of homolog protein's nucleotide sequence in barley is AK251025; BAD21528, putative brown planthopper-induced resistance protein 1; AAQ54304, putative brown planthopper susceptibility protein Hd002A; AAQ54305, brown planthopper-induced resistance protein 1.

状态; ETH 处理后 2 h 表达量下降, 处理后 6 h 达到最高值(仅为对照的 1.5 倍), 随后下降, 最终又恢复初始水平。BA、GA、MeJA 和 SA 处理后 2~12 h 的表达量均受到抑制。以上结果表明, *TaCDCP1* 基因可能通过 ABA 信号途径介导小麦对条锈菌的防御反应。

在低温环境下, *TaCDCP1* 在处理 2~12 h 下调表达, 至 24 h 时骤然激增至对照的 5.5 倍; 在模拟干旱环境中, *TaCDCP1* 在处理 12 h 表达量约为对照

的 2 倍, 其他时间保持与对照同一水平; 机械伤害和高盐处理对 *TaCDCP1* 的表达影响不大, 其表达量持续保持为对照的 1.0~1.5 倍(图 7)。

3 讨论

本研究首次从小麦中克隆到一个含有 CBS 结构域的基因 *TaCDCP1*。虽然该基因序列与大麦 FLbaf96m04 的全长序列和玉米包含 CBS 结构域蛋白的基因全长 cDNA 序列高度相似, 但在 NCBI 中对

这 2 个物种却仅仅只提交了基因全长序列而没有做相应的研究^[16-17], 而该基因预测编码的多肽与水稻已报道的 3 种褐飞虱诱导蛋白 OsBi1、假定的 OsBi1 和假定的褐飞虱敏感蛋白 1 的氨基酸序列相似性较

图 3 *TaCDCP1* 与其他 CDCP 的进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree of *TaCDCP1* and other CDCPs
CDCP 序列的名称以物种拉丁名缩写和蛋白/基因 GenBank 登录号表示。Ta: 小麦; Hv: 大麦; Os: 水稻; Zm: 玉米; Ps: 云杉; Sb: 高粱。大麦中同源氨基酸序列对应的核苷酸序列 GenBank 登录号为 AK251025。

Branches were labeled with the species names and the GenBank accession numbers. Hv: *Hordeum vulgare*, Ta: *Triticum aestivum*, Os: *Oryza sativa*, Zm: *Zea mays*, Ps: *Picea sitchensis* and Sb: *Sorghum bicolor*. The GenBank accession number of homolog protein's nucleotide sequence in barley is AK251025.

图 4 *TaCDCP1* 在小麦根、茎、叶中的表达量

Fig. 4 Transcription expression of *TaCDCP1* in wheat root, stem, and leaf

图 6 小麦 *TaCDCP1* 在不同激素诱导下的表达谱分析

Fig. 6 Real-time PCR analysis of the expression of *TaCDCP1* in wheat in response to ABA, BA, ETH, GAs, MeJA, and SA treatments

ABA: 脱落酸; BA: 苄基腺嘌呤; ETH: 乙烯; GAs: 赤霉素; MeJA: 茉莉酸甲酯; SA: 水杨酸; hpt: 处理后小时数。

ABA: abscisic acid; BA: benzyladenine; ETH: ethylene; GAs: gibberellins; MeJA: methyl jasmonate; SA: salicylic acid; hpt: hours post treatment.

图 5 *TaCDCP1* 在非亲和与亲和组合中不同时间点的表达模式
Fig. 5 Transcription pattern of *TaCDCP1* in wheat leaves infected by *Pst* races CYR23 (incompatible reaction) and CYR31 (compatible reaction) at different time-points post inoculation

高, 这为该基因在植物中的研究提供了一定的线索。组织表达模式研究表明, *TaCDCP1* 在叶中表达量远远高于在茎和根中, 这与 *TaCDCP1* 位于叶绿体基质内的亚细胞定位预测的结果一致。但在水稻中, 细胞原位杂交结果表明 *OsBi1* 基因特异地积累于受褐飞虱诱导后茎部的维管束周围的细胞中^[11], 这可能与 CDCP 基因 5'端结构不同有关。表明不同的 CDCP 有不同的组织特异性。

抗病品种中对病原物侵染的防御反应通常发生在植物与病原物互作初期。过敏性反应(hypersensitive response, HR)与植物抗病性有着密切的联系^[18-19]。有些研究认为 HR 本身就是植物的一种基本的抗病防卫反应^[20]。本研究中 *TaCDCP1* 在小麦与条锈菌互作的非亲和组合中, 最大表达量发生在条锈菌侵染早期(接种后 18 h), 而前期研究表明小麦与条锈菌互作的非亲和组合中, 由过敏性反应引起的细胞坏死发生在侵入后(接种后 24 h)^[21-22]。在过敏性坏死发生之前, 条锈菌与寄主之间发生信号交换与基因互作, 引发了一系列反应, 如蛋白磷酸化, Ca^{2+} 浓度变化, 活性氧变化, 水杨酸变化和离子流变化等^[23]。CBS 结构域有维持细胞内氧化还原的调控作用^[10],

图 7 小麦 *TaCDCP1* 在各种环境胁迫下的表达谱分析Fig. 7 Real-time PCR analysis of the expression profile of the *TaCDCP1* gene in wheat leaves treated with low temperature, mechanical wounding, drought and high salinity

hpt: 处理后小时数。hpt: hours post treatment.

推测含有 CBS 结构域的 *TaCDCP1* 有可能在条锈菌侵染前期通过调控氧化还原作用参与小麦对条锈菌的抗病反应。*TaCDCP1* 的表达在非亲和与亲和组合侵染后期(接种后 96 h)被大量诱导,尤其是在亲和组合中,这可能是寄主细胞对于病原菌的次生菌丝在组织中的扩展造成的细胞形态瓦解和营养物质破坏的一种防御反应。抗虫水稻品种 B5 中, *OsBi1* 在受到褐飞虱诱导后 36 hpi 就被检测到有大量的表达,并于接种后 96 h 达到高峰^[11],这与本文的结果相似。

根据含有 CBS 结构域的数目及其他非 CBS 结构域的种类, Hemant 等^[5]对 34 个来自拟南芥的 CDCP 和 59 个来自水稻的 CDCP 进行归类发现,这两种作物中的 CDCP 也是一个庞大的基因家族。其他实验室研究表明,在由携带抗叶锈基因 *Lr10* 近等基因系小麦受叶锈侵染后分别构建的亲和与非亲和组合的 cDNA 文库中,挑选有表达差异的 EST 序列,再经过 RT-PCR 基因表达分析的比较,发现 Contig 4160 仅在亲和库中高度表达,该 EST 与假定的 *OsBi1* 高度相似^[12],这个结果与本实验的研究结果不一致。经过同源比对,假定的 *OsBi1* 与水稻 CDCP 中 *OsCBSX3a* 的氨基酸序列一致,即与其他 *OsCBSX3* 的成员高度同源,既然 *OsCBSX3* 有 5 个不同的蛋白^[5],推测 *TaCDCP1* 在小麦中也可能是一个多基因家族成员之一。由于 Contig 4160 仅为一段小麦的 EST 序列而不是基因序列的全长,很可能与 *TaCDCP1* 不是同一个基因,而是同属于一个家族,由此造成不同组合中表达模式的不同。

SA、JA 和 ET 是植物抵御病原菌侵入的 3 个重要信号调节分子^[24], SA 信号途径主要是抵御活体寄生菌, JA/ET 途径则被认为是主要抵御腐生菌,是两个不同的植物防御反应信号途径^[25]。ABA 途径也广

泛参与植物与病原菌互作过程^[26]。*OsBi1* 在受到乙烯诱导后大量表达,但是不受 ABA、JA 和 SA 的诱导^[11]。本研究中, *TaCDCP1* 对外源 ABA 有较快响应(处理后 6 h),而其表达不被 SA、JA、ET 等外源激素所诱导,这暗示 *TaCDCP1* 可能是通过 ABA 信号途径介导对条锈菌的防御反应。但是, *TaCDCP1* 如何参与小麦对条锈菌的防御反应,有待进一步研究。

植物受到多种外界信号刺激,包括干旱、冻害、盐害、渗透胁迫、氧化胁迫、光照、触摸、风、雨、伤害等。*OsBi1* 参与了植物的防御反应^[11]。*TaCDCP1* 对于低温胁迫十分敏感,呈现先下调后急增的表达模式;模拟干旱胁迫也可诱导 *TaCDCP1* 的上调表达;对于伤害和高盐胁迫 *TaCDCP1* 不敏感。这与 *OsBi1* 在干旱条件下大量诱导但对机械伤害无反应的结果一致^[11]。在拟南芥和水稻的根和芽中 CDCP 的所有基因的表达量在受到干旱胁迫后上调表达,部分基因受到低温胁迫后也上调表达^[5]。由此推测, *TaCDCP1* 可能参与植物对低温和干旱胁迫的抵御反应。

TaCDCP1 作为 CDCP 的一员,可能参与小麦与条锈菌的互作过程,对于 CBS 结构域的功能有待进一步研究。

4 结论

从小麦中分离出一个受条锈菌诱导的含 CBS 结构域的基因 *TaCDCP1*, 该基因编码 217 个氨基酸,具有 2 个 CBS 保守结构域。*TaCDCP1* 与大麦中的同源序列相似性最高,与水稻假定的褐飞虱诱导的抗性蛋白 1 的相似性次之。该基因在小麦叶中表达量显著高于其在根和茎中。*TaCDCP1* 受小麦条锈菌诱导表达,非亲和组合表达量在侵染前期(接种后 18~48 h)高于亲和组合,而在侵染后期(接种后

96~120 h)低于亲和组合。*TaCDCP1* 可能通过脱落酸信号途径参与小麦对条锈菌的防御反应,同时参与低温和干旱环境下的防御反应。

References

- [1] Chen X M, Line R F. Inheritance of stripe rust (yellow rust) resistance in the wheat cultivar Carstens V. *Euphytica*, 1993, 71: 107–113
- [2] Chen X M. Epidemiology and control of stripe rust (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) on wheat. *Can J Plant Pathol*, 2005, 27: 314–337
- [3] Li Z-Q(李振岐), Zeng S-M(曾士迈). Stripe Rust in China (中国小麦锈病). Beijing: China Agriculture Press, 2002. pp 2–3 (in Chinese)
- [4] Bateman A. The structure of a domain common to archaeobacteria and the homocystinuria disease protein. *Trends Biochem Sci*, 1997, 22: 12–13
- [5] Hemant R K, Anil K S, Sudhir K S, Sneha L S P, Ashwani P. Genome wide expression analysis of CBS domain containing proteins in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh and *Oryza sativa* L. reveals their developmental and stress regulation. *BMC Genomics*, 2009, 10: 200
- [6] Woods A, Cheung P C F, Smith F C, Davison M D, Scott J, Beri R K, Carling D. Characterization of AMP-activated protein kinase and subunits. *J Biol Chem*, 1996, 271: 10282–10290
- [7] Sintchak M D, Fleming M A, Futer O, Raybuck S A, Chambers S P, Caron P R, Murcko M A, Wilson K P. Structure and mechanism of inosine monophosphate dehydrogenase in complex with the immunosuppressant mycophenolic acid. *Cell*, 1996, 85: 921–930
- [8] Schmidt-Rose T, Jentsch T J. Reconstitution of functional voltage-gated chloride channels from complementary fragments of CLC-1. *J Biol Chem*, 1997, 272: 20515–20521
- [9] Shan X Y, Kruger W D. Correction of disease-causing CBS mutations in yeast. *Nat Genet*, 1998, 19: 91–93
- [10] Ignoul S, Eggermont J. CBS domains: structure, function, and pathology in human proteins. *Am J Physiol-Cell Physiol*, 2005, 289: 1369–1378
- [11] Wang X L, Ren X, Zhu L L, He G C. *OsBi1*, a rice gene, encodes a novel protein with a CBS-like domain and its expression is induced in responses to herbivore feeding. *Plant Sci*, 2004, 166: 1581–1588
- [12] Manickavelu A, Kawaura K, Oishi K, Shin I T, Kohara Y, Yahiaoui N, Keller B, Suzuki A, Yano K, Ogihara Y. Comparative gene expression analysis of susceptible and resistant near-isogenic lines in common wheat infected by *Puccinia triticina*. *DNA Res*, 2010, DOI: 10.1093/dnares/dsq009
- [13] Yu X-M(于秀梅). Construction of SSH cDNA Library of Wheat Leaves Induced by *Puccinia striiformis* and Its ESTs Analysis. PhD Dissertation of Northwest A&F University, 2006. pp 62–66 (in Chinese with English abstract)
- [14] Kang Z-S(康振生), Li Z-Q(李振岐). Discovery of pathogenic isolates of stripe rust on cultivar Lovrin 10 at normal temperature. *J Northwest Agric Coll* (西北农林科技大学学报), 1984, 12(4): 18–28 (in Chinese with English abstract)
- [15] Zhang H B, Zhang D B, Chen J, Yang Y H, Huang Z J, Huang D F, Wang X C, Huang R F. Tomato stress-responsive factor TSRF1 interacts with ethylene responsive element GCC box and regulates pathogen resistance to *Ralstonia solanacearum*. *Plant Mol Biol*, 2004, 55: 825–834
- [16] Sato K, Shin I T, Seki M, Shinozaki K, Yoshida H, Takeda K, Yamazaki Y, Conte M, Kohara Y. Development of 5006 full-length cDNAs in barley: a tool for accessing cereal genomics resources. *DNA Res*, 2009, 16: 81–89
- [17] Alexandrov N N, Brover V V, Freidin S, Troukhan M E, Tatari-nova T V, Zhang H, Swaller T J, Lu Y P, Bouck J, Flavell R B. Insights into corn genes derived from large-scale cDNA sequencing. *Plant Mol Biol*, 2009, 69: 179–194
- [18] Yu X M, Yu X D, Qu Z P, Huang X J, Guo J, Han Q M, Zhao J, Huang L, Kang Z S. Cloning of a putative hypersensitive induced reaction gene from wheat infected by stripe rust fungus. *Gene*, 2008, 407: 193–198
- [19] Yu G X, Braun E, Wise R P. *Rds* and *Rih* mediate hypersensitive cell death independent of gene-for-gene resistance to the oat crown rust pathogen *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*. *Mol Plant Microbe Interact*, 2001, 14: 1376–1383
- [20] Han J-D(韩建东), Cao Y-Y(曹远银), Yao P(姚平). Hypersensitive response and activity dynamics of defense enzymes induced by elicitor(s) from wheat-stem rust interaction system. *Acta Agric Boreali-Sin* (华北农学报), 2009, 24(1): 79–82 (in Chinese with English abstract)
- [21] Wang C F, Huang L L, Buchenauer H, Han Q M, Zhang H C, Kang Z S. 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*. *Physiol Mol Plant Pathol*, 2007, 71: 230–239
- [22] Kang Z S, Huang L L, Buchenauer H. Ultrastructural changes and localization of lignin and callose in compatible and incompatible interactions between wheat and *Puccinia striiformis*. *J Plant Dis Protect*, 2002, 109: 25–37
- [23] Zhu Q, Dröge-Laser W, Dixon R A, Lamb C. Transcriptional activation of plant defense genes. *Curr Opin Genet Dev*, 1996, 6: 624–630
- [24] Glazebrook J. Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*. *Curr Opin Plant Biol*, 1999, 2: 280–286
- [25] Glazebrook J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol*, 2005, 43: 205–227
- [26] Koornneef A, Pieterse C M J. Crosstalk in defense signaling. *Plant Physiol*, 2008, 146: 839–844