

基因表达分析稻瘟菌 7 个 Rho GTP 酶的关系

郑武, 陈继圣, 郑士琴, 刘文德, 陈晓, 周洁, 鲁国东, 王宗华

(福建农林大学生物农药与化学生物学教育部重点实验室, 福建农林大学功能基因组学研究中心, 福州 350002)

摘要: 【目的】Rho GTP 酶是 Ras 超家族小 G 蛋白最主要成员。不同生物均含多种 Rho GTP 酶, 相互之间存在密切关系, 并共同参与调控多个信号转导途径。稻瘟菌基因组中存在 7 个 Rho GTP 酶, 分析它们相互关系意义甚大。【方法】通过 RT-PCR 分析了 *MgCdc42* 不同状态下以及 *MgRho3* 插入失活状态下其它 Rho GTP 酶基因的表达变化。【结果】结果表明 *MgCdc42* 可能处于 *MgRho1*、*MgRho2* 和 *MgRhoX* 上游, 对这些蛋白起正调控作用, 对 *MgRac1* 和 *MgRho4* 起着负调控作用; *MgRho3* 对 *MgRho1* 和 *MgCdc42* 的表达起正调控, 对 *MgRac1* 和 *MgRho4* 的表达则起负调控作用; *MgRho3* 与 *MgCdc42* 间关系复杂。【结论】稻瘟菌 Rho GTP 酶信号途径复杂, 不同 Rho GTP 酶间存在相互调控关系, 这将有助于进一步了解稻瘟菌等丝状真菌 Rho GTP 酶之间的相互关系。

关键词: 稻瘟菌; RhoGTP 酶; 调控机制

Relationship Among Seven Rho GTPases in *Magnaporthe grisea* Revealed by Gene Expression Analysis

ZHENG Wu, CHEN Ji-sheng, ZHENG Shi-qin, LIU Wen-de, CHEN Xiao, ZHOU Jie,

LU Guo-dong, WANG Zong-hua

(The Ministry of Education Key Laboratory of Bio-Pesticide and Chemistry Biology, Functional Genomics Center,
Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002)

Abstract: 【Objective】The Rho GTPases are major members of the Ras superfamily proteins. It is well known that there are several Rho GTPases interacting with each other and regulating several signal transduction pathways in eukaryotes. Genome analysis showed that there are seven putative Rho GTPases in *Magnaporthe grisea*, and it is essential to study the relationship among these Rho GTPases. 【Method】RT-PCR was used to analyze expression patterns of genes encoding these Rho GTPases in different *MgCdc42* and *MgRho3* mutants. 【Result】It was found that *MgCdc42* positively controlled expression *MgRho1*, *MgRho2* and *MgRhoX* and negatively regulated expression *MgRac1* and *MgRho4*; however *MgRho3* positively regulated expressions *MgRho1* and *MgRho2*, but negatively controlled expression *MgRho4* and *MgRac1*. The relationship between *MgRho3* and *MgCdc42* was complicated. 【Conclusion】There exists sophisticated Rho GTPase signal pathways in the fungus, and they may regulate each other between these Rho GTPases. The result will facilitate understanding the functional relationship of different GTPases in *M. grisea* and other filamentous fungi.

Key words: *Magnaporthe grisea*; Rho GTPase; Gene regulation

0 引言

【本研究的重要意义】真核生物中普遍存在大量

Ras 超家族小 G 蛋白。Rho GTP 酶是 Ras 超家族小 G 蛋白的最主要成员之一。迄今已发现的 Rho GTP 酶有 Rho、Rac、Cdc42 等 3 个亚家族近百种蛋白^[1~3], 这些

收稿日期: 2006-03-05; 接受日期: 2006-07-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(30070030, 30470066); 福建省高等学校科技项目(JA03052)

作者简介: 郑武(1977-), 男, 福建福安人, 博士研究生, 研究方向为分子植物病理学。Tel: 0591-83779536; E-mail: zhengwuz@163.com。并列第一作者陈继圣(1981-), 男, 福建福州人, 硕士研究生, 研究方向为生化与分子生物学。Tel: 0591-83779536; E-mail: sishenbb@163.com。通讯作者鲁国东(1967-), 福建上杭人, 教授, Tel: 0591-83790312; E-mail: guodonglu@yahoo.com; 并列通讯作者王宗华(1962-), 男, 福建尤溪人, 研究员, 研究方向为分子植物病理学。E-mail: zonghuaw@163.com

蛋白参与了多个与肌动蛋白骨架相关的信号转导途径。研究发现 Rho GTP 酶在与 GTP 结合时有活性,而与 GDP 结合时失活,起到分子开关的作用^[4],并通过多个调控因子和效应蛋白如 GEFs、GDIs 和 GAPs 等形成 GTP 酶信号网络系统^[5],笔者的研究结果也表明,在稻瘟菌 (*Magnaporthe grisea*) 中 Cdc42 可能存在类似的 GTP 酶信号网络^[6]。近年来,在 *Sacharomyces cerevisiae*^[7,8] Cdc42 研究的基础上,证实了在 *Schizophyllum commune*^[9]、*Suillus bovinus*^[10]、*Penicillium marneffeii*^[11]等真菌中 Cdc42 与细胞骨架维持、细胞分化和生长至密相关;还发现 Cdc42 与 *Claviceps purpurea* 致病性相关^[12]。除了 Cdc42 的研究外,对 *S. bovinus*、*S. cerevisiae*、*Schizosaccharomyces pombe*、*Candida albicans*、*Aspergillus nidulans*、*P. marneffeii*、*Yarrowia lipolytica*、*Colletotrichum trifolii* 等真菌其它 Rho GTP 酶的功能也有较多研究^[10,15-24]。本研究在全基因组水平研究稻瘟菌 Rho GTP 酶之间的表达调控关系,将有助于进一步了解真核生物 Rho GTP 酶之间的功能关系。【前人研究进展】已有研究表明,Rho GTP 酶间存在密切关系。在 *Cryptococcus neoformans* 中,Rac1 在 Ras 蛋白下游起作用,并与 Ste20 共同调控高温状态下的细胞生长以及细胞分化^[25];在 *C. trifolii* 中,CtCdc42 可能作为 Ct-Ras 的下游效应蛋白,起着调控萌发、菌丝生长和致病发育的作用^[26];Mahlert 等^[27]研究表明,在 *Ustilago maydis* 中,Cdc42 能够部分恢复因 Rac1 缺失引起的液泡异常;在 *P. marneffeii* 中,RasA 在 CflA (Cdc42) 的上游起作用,调控着孢子萌发以及菌丝和酵母状细胞的极性生长,而 CflA (Cdc42) 和 CflB (Rac1) 共同调控菌丝细胞的极性^[28];Adamo 等^[29]也发现了 *S. cerevisiae* 中 Cdc42 和 Rho3 可能存在功能交迭。【本研究切入点】稻瘟菌是研究丝状真菌生长发育特别是致病机制的重要模式生物。根据基因组数据库 (<http://www.broadmit.edu/annotation/fungi/magnaporthe/index.html>) 推测,稻瘟菌中存在 7 个可能的 Rho GTP 酶,研究明确它们之间的关系很有意义。【拟解决的关键问题】本研究通过基因表达分析的方法进一步研究稻瘟菌 7 个 Rho GTP 酶间的关系,有助于解析 Rho GTP 酶在稻瘟菌中的功能以及 Rho GTP 酶信号网络,为明确 Rho GTP 酶调控真菌生长发育的分子机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

70-15 (稻瘟菌野生型菌株 WT,由美国普渡大学许金荣博士惠赠); Δ Mgc42-26 (稻瘟菌 *MgCdc42* 插入失活突变体)、CA *Mgc42* (稻瘟菌 *MgCdc42* 正显性激活突变体)、DN *Mgc42* (稻瘟菌 *MgCdc42* 负显性失活突变体)、*Mgc42OE-13* (稻瘟菌 *MgCdc42* 过量表达突变体); Δ Mgrho3-22 (*MgRho3* 插入失活突变体)、*MgRho3OE-12* (稻瘟菌 *MgRho3* 过量表达突变体)。所有稻瘟菌突变体均由本实验室构建。

1.2 菌丝体培养

从淀粉酵母培养基上挑取少许活化的稻瘟菌菌丝块移至液体完全培养基 (酵母粉 6 g·L⁻¹, 水解酪蛋白 6 g·L⁻¹, 蔗糖 10 g·L⁻¹) 中,25℃、130 r/min 振荡培养至球状菌丝团,滤纸片过滤收集菌丝体,液氮研磨成菌粉备用。

1.3 总 RNA 提取及检测

总 RNA 分离纯化采用 SV Total RNA Isolation System (Promega Corporation 产品),具体步骤参照其说明书进行;采用紫外分光光度计 (GeneQuant pro, Amersham Biosciences Inc. 产品) 检测总 RNA 样品的浓度和纯度,并进一步通过变性凝胶电泳检测^[30]。

1.4 引物

根据稻瘟菌 Rho GTP 酶和 β -Tubulin 编码基因的序列,用 DNASTar 程序设计了可以特异扩增相应基因片段的引物,其序列以及在进行 RT-PCR 时所用的退火温度见表 1。引物由北京三博远志生物技术有限公司合成。

1.5 RT-PCR

单链 cDNA 的合成采用 SuperScript First-strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen Corporation 产品),具体方法参照试剂盒说明书,以 3 μ g 总 RNA 作为反转录合成第一链 cDNA 的模板。PCR 反应体系的总体积为 25 μ l,其中含模板 (单链 cDNA) 2 μ l,10 \times PCR 缓冲液 (含 20 mmol·L⁻¹ Mg²⁺) 2.5 μ l,dNTP 0.05 mmol·L⁻¹,引物 0.2 μ mol·L⁻¹,Taq DNA 聚合酶 1U (大连宝生物)。

PCR 热循环条件如下:95℃预变性 2min;94℃变性 30 s,按表 1 根据扩增不同基因片段设计相应的退火温度,并退火 45 s,72℃延伸 1min,重复 30 个循环;最后 72℃延伸 7 min。

取 10 μ l PCR 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,经 EB 染色 20~30 min,然后在紫外透射反射仪 300 nm 紫外光下观察,并摄像。

表 1 用于检测稻瘟菌 7 个 Rho GTP 酶编码基因表达的引物序列及退火温度

Table 1 Primer sequences and the corresponding annealing temperature used in RT-PCR to detect gene expression of Rho GTPases in *M. grisea*

检测基因	引物序列	退火温度
Genes detected	Primer names and sequences	Annealing temperature(°C)
<i>β-Tubulin</i>	TFF:5'-GCT GTC CTC GTC GAT CTC GA-3' TFR:5'-CAG AGC AGG TCA GGT AAC GA-3'	53
<i>MgCdc42</i>	MCF: 5'-CAT CTC GAG CTA TGG TGG TTG CAA CGA TT-3' MCR: 5'-TA CCC GGG TCA AAG GAT CAG GCT CTT-3'	58
<i>MgRac1</i>	MR2F:5'-TAG GTA CCA TTT CCA GAC CAC GCT GA-3' MR2R:5'-TAT AAG CTT CCA TGG CTG CTC ACA GA-3'	62
<i>MgRho1</i>	MR1F:5'-TAG GTA CCA CTC CTC CCA GAT CCT GA-3' MR1R:5'-TAC AAG CTT CGC TCG CCT AGA GGA-3'	62
<i>MgRho2</i>	MR4F:5'-GAA CTC GAG TAC CGT ACA CTA CAT GTA C-3' MR4R:5'-GAT ATC AGG CTT GGA ACC ACG AT-3'	59
<i>MgRho3</i>	MR3F:5'-CCG CTC GAG CTA TGC CCT TAT CGC TT-3' MR3R:5'-CCG CTC GAG CTA CAT GAC GGT GC-3'	65
<i>MgRho4</i>	MR5F:5'-ATG ACC GAG GCA CCG GCC TAC TCG-3' MR5R:5'-TCA CAA GAT ATT GCA CCT CGT CTT C-3'	59
<i>MgRhoX</i>	MR6F:5'-ATG GAT CCA TGG AGG ATG ACC GCC CCA G-3' MR6R:5'-GAC TAG TCT ATG CTG TGC TAG GCC TG-3'	59

2 结果与分析

2.1 不同 *MgCdc42* 状态下 Rho GTP 酶基因表达变化

为探明 *MgCdc42* 与稻瘟菌中其它 Rho GTP 酶基因的关系, 首先通过 RT-PCR 分析稻瘟菌 *MgCdc42* 插入失活突变体($\Delta Mgcdc42-26$)、正显性激活突变体(*CA Mgcdc42*)、负显性失活突变体 (*DN Mgcdc42*) 以及过量表达突变体 (*Mgcdc42OE-13*) 中其它 Rho GTP 酶基因的表达示于图 1。为避免取样误差, 实验时以 *β-Tubulin* 为内标检测稻瘟菌野生型菌株及突变体之初始 RNA 量, 从图 1 看出, 用于分析的菌株总 RNA 量基本一致。

RT-PCR 结果表明, *MgRac1*、*MgRho4* 在稻瘟菌 *MgCdc42* 插入失活或负显性失活突变情况下, 表达量提高, 而在 *MgCdc42* 过量表达或正显性激活时表达量降低。与之相反, *MgRho1*、*MgRho2* 和 *MgRhoX* 在稻瘟菌 *MgCdc42* 插入失活或负显性失活突变情况下, 表达量下降; 而 *MgCdc42* 过量表达或正显性激活突变情况下, 表达量提高。而 *MgRho3* 在 *MgCdc42* 过量表达和正显性激活时表达量提高, 负显性失活时表达显著降低, 但 *MgCdc42* 插入失活未对 *MgRho3* 表达产生任何影响。

2.2 *MgRho3* 插入失活态下稻瘟菌其它 Rho GTP 酶基因表达变化

为进一步明确稻瘟菌中 Rho GTP 酶基因表达调控关系, 分析了 *MgRho3* 插入失活状态 ($\Delta Mgrho3-22$) 下, 其它 Rho GTP 酶之表达情况 (图 2)。试验时同样以 *Beta-Tubulin* 为内标检测稻瘟菌野生型菌株及突

变体之初始 RNA 量。RT-PCR 结果表明, 稻瘟菌 *MgRho3* 的插入失活, 导致了 *MgCdc42* 不表达, *MgRho1* 和 *MgRho2* 表达量显著下降, 而 *MgRho4* 和 *MgRac1* 的表达量提高, 然而 *MgRhoX* 的表达量似乎未曾受到影响 (图 2)。在明确了 *MgRho3* 插入失活引起 *MgCdc42* 表达受抑的基础上, 进一步分析表明 *MgRho3* 过量表达增强了 *MgCdc42* 的表达 (图 3)。

3 讨论

研究结果表明, 稻瘟菌 Rho GTP 酶间在基因表达水平存在着密切的关系。*MgCdc42* 可能处于 *MgRho1*、*MgRho2* 和 *MgRhoX* 上游, 起着正调控这些蛋白的作用; 相反, 对 *MgRac1* 和 *MgRho4* 起负调控作用; 而 *MgCdc42* 与 *MgRho3* 间存在着较为复杂的关系。*MgRho3* 插入失活状态下 Rho GTP 酶表达变化的结果预示着 *MgRho3* 正调控 *MgRho1*、*MgRho2* 和 *MgCdc42* 表达, 负调控 *MgRac1*、*MgRho4* 的表达。然而, 要进一步分析这些 Rho GTP 酶的关系, 可能要通过建立相关的双突变体等分子遗传分析来验证。

Rho GTP 酶之间, 或 Rho GTP 酶与 Ras 蛋白之间存在相互调控关系已在多种真菌研究中得到证实。Adamo 等^[29]发现了 *S. cerevisiae* 中过量表达 Rho3 可以恢复因 *Cdc42* 突变引起的温敏表型。已有研究表明, 植物病原真菌 *U. maydis* 的 *Cdc42* 与 *Rac1* 之间^[27]、*C. trifolii* 的 *CtCdc42*、*CtRac1* 与 *Ct-Ras*^[24, 26]、*P.marneffeii* 中 *RasA* 与 *CflA* (*Cdc42* 同源蛋白) 以及 *CflA* 与 *CflB* (*Rac* 同源蛋白) 间^[28] 也均存在类似的相互调控关系。

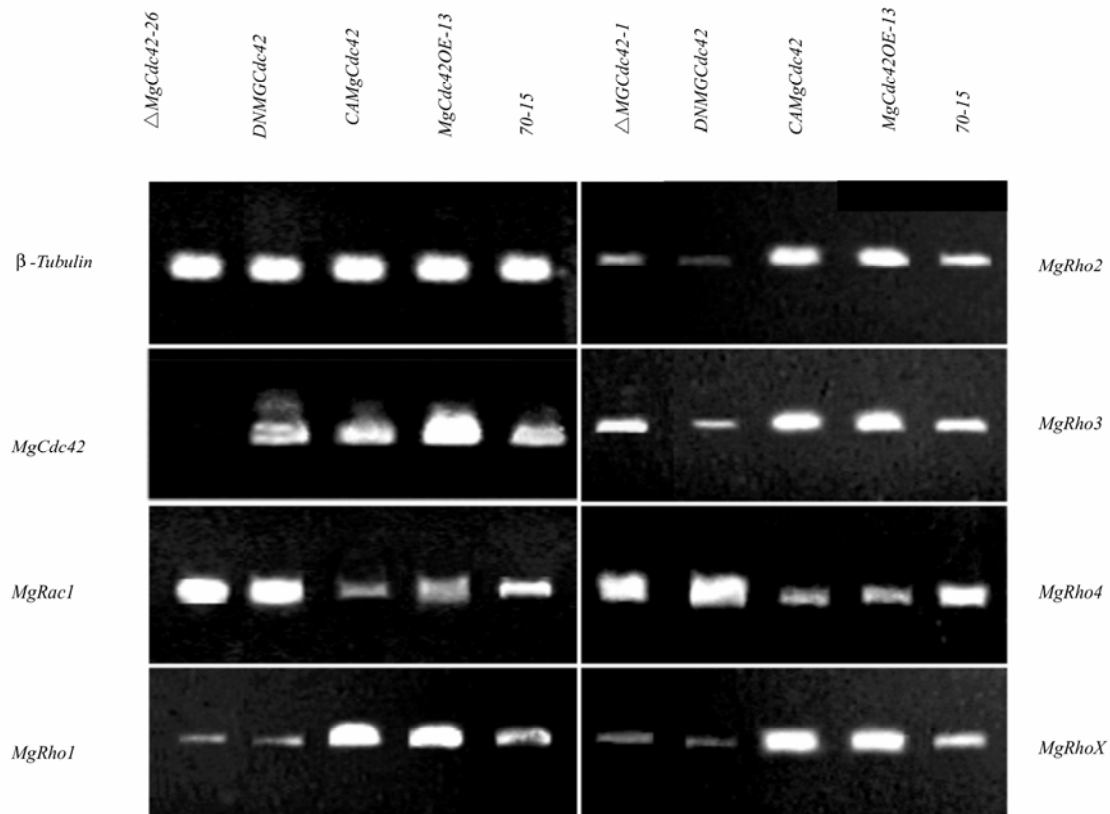


图 1 不同 *MgCdc42* 状态下稻瘟菌 Rho GTP 酶编码基因的表达分析

Fig. 1 The expression pattern of Rho-GTPase encoding-genes in different *MgCdc42* mutants of *M. grisea*

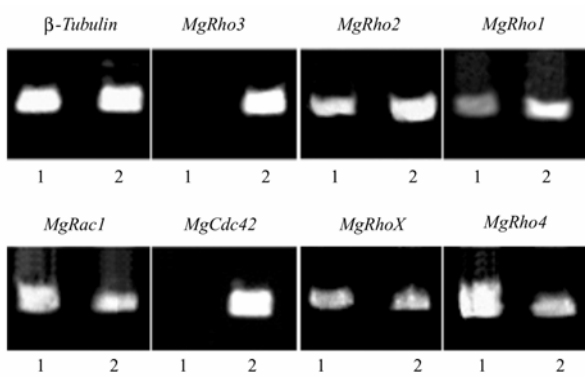


图 2 稻瘟菌 *MgRho3* 插入失活突变体中 Rho GTP 酶的表达分析

Fig. 2 The expression pattern of Rho-GTPase encoding-genes in *MgRho3* deletion mutant of *M. griseae*

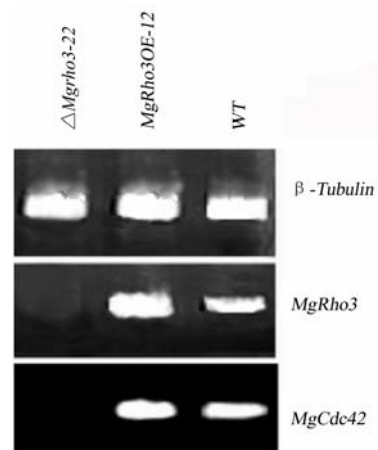


图 3 *MgRho3* 插入失活和过量表达突变体中 *MgCdc42* 的表达分析

Fig. 3 The *MgCdc42* expression pattern in *MgRho3* deletion and overexpression mutants of *M. grisea*

研究发现稻瘟菌 *MgCdc42* 与 *MgRho3* 基因表达之间存在较复杂的调控关系。通过分析推测这两个蛋白可能存在如下相互作用模式 (图 4)。*MgRho3* 正调控 *MgCdc42*, 其插入失活及过量表达导致了 *MgCdc42* 表

达受抑和表达提高。*MgCdc42* 似乎通过两种蛋白调控 *MgRho3*, 达到动态平衡。*MgCdc42* 存在两种结合态:

GTP 结合态和 GDP 结合态, 在不同状态下其互作蛋白各异。蛋白 A 与 GDP 结合态 *MgCdc42* 互作, 蛋白 B 与 GTP 结合态 *MgCdc42* 互作, 蛋白 A 与蛋白 B 协同调控着 *MgRho3*。当 *MgCdc42* 正显性激活突变时, 只与蛋白 B 互作, 抑制 *MgRho3* 的蛋白 A 没有活性或没有表达, 而导致 *MgRho3* 表达增高; 当 *MgCdc42* 负显性突变时, 只与蛋白 A 互作, 激活 *MgRho3* 的蛋白 B 没有活性或没有表达, 因而 *MgRho3* 表达受抑; 当 *MgCdc42* 插入失活后, 蛋白 A 与蛋白 B 均无活性或没有表达, 因而 *MgRho3* 的表达不受影响; 当 *MgCdc42* 过量表达时, 蛋白 B 与蛋白 A 的活性均增强或表达量均增加, 但是蛋白 B 对 *MgRho3* 表达增强作用大于蛋白 A 对 *MgRho3* 表达抑制作用, 导致 *MgRho3* 表达量略有增加。显然, 稻瘟菌 *MgCdc42* 与 *MgRho3* 基因表达调控关系的研究是十分有意义的, 进一步的遗传与生化分析正在开展之中。

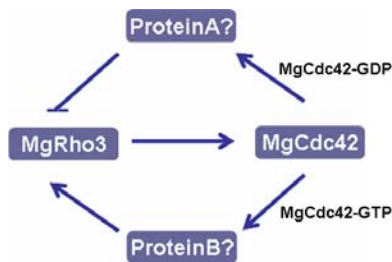


图 4 推测的稻瘟菌 *MgRho3* 与 *MgCdc42* 关系模式

Fig. 4 The putative relationship between *MgRho3* and *MgCdc42*

4 结论

本研究通过基因表达分析明确了稻瘟菌中 7 个 Rho GTP 酶间存在至密的相互关系, 特别是深入分析了 *MgCdc42* 和 *MgRho3* 的关系, 说明 Rho GTP 酶信号途径相当复杂, 有待于进一步研究解析。本研究结果将有助于了解稻瘟菌等丝状真菌 Rho GTP 酶之间的功能及其相互关系。

References

- [1] Wennerberg K, Rossman K L, Der C J. The Ras superfamily at a glance. *Journal of Cell Science*, 2005, 118: 843-846.
- [2] Ridley A J, Hall A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*, 1992, 70: 389-399.
- [3] Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature*, 2002, 420(6916): 629-635.
- [4] Yang Z. Small GTPases versatile signaling switches in plants. *The Plant Cell*, 2002, 14:S375-S388.
- [5] Johnson D I. Cdc42: an essential rho-type GTPase controlling eukaryotic cell polarity. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, 1999, 63:54-105.
- [6] 郑 武, 陈继圣, 郑士琴, 鲁国东, 王宗华. 稻瘟菌 Cdc42 若干推测互作蛋白的结构和表达特点. *中国农业科学*, 2006, 39: 709-714.
Zheng W, Chen J S, Zheng S Q, Lu G D, Wang Z H. The structure and expression of several putative Cdc42 interacting proteins in *Magnaporthe grisea*. *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, 39: 709-714. (in Chinese)
- [7] Nelson W J. Mum, this bud's for you: where do you want it? Roles for Cdc42 in controlling bud site selection in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioessays*, 2003, 25: 833-836.
- [8] Caviston J P, Tcheperegine S E, Bi E. Singularity in budding: a role for the evolutionarily conserved small GTPase Cdc42p. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, 99: 12185-12190.
- [9] Weber M, Salo V, Uuskallio M, Raudaskoski M. Ectopic expression of a constitutively active Cdc42 small GTPase alters the morphology of haploid and dikaryotic hyphae in the filamentous homobasidiomycete *Schizophyllum commune*. *Fungal Genetics and Biology*, 2005, 42: 624-637.
- [10] Gorfer M, Tarkka M T, Hanif M, Pardo A G, Laitinen E, Raudaskoski M. Characterization of small GTPases Cdc42 and Rac and the relationship between Cdc42 and actin cytoskeleton in vegetative and ectomycorrhizal hyphae of *Suillus bovinus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2001, 14:135-144.
- [11] Boyce K J, Hynes M J, Andrianopoulos A. The CDC42 homolog of the dimorphic fungus *Penicillium marneffei* is required for correct cell polarization during growth but not development. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183: 3447-3457.
- [12] Scheffer J, Chen C, Heidrich P, Dickman M B, Tudzynski P. A CDC42 homologue in *Claviceps purpurea* is involved in vegetative differentiation and is essential for pathogenicity. *Eukaryotic Cell*, 2005, 4: 1228-1238.
- [13] Abe M, Qadota H, Hirata A, Ohya Y. Lack of GTP-bound Rho1p in secretory vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology*, 2003, 162(1): 85-97.
- [14] Robinson N G, Guo L, Imai J, Toh-E A, Matsui Y, Tamanoi F. Rho3 of *Saccharomyces cerevisiae*, which regulates the actin cytoskeleton

- and exocytosis, is a GTPase which interacts with Myo2 and Exo70. *Molecular and Cellular Biology*, 1999, 19: 3580-3587.
- [15] Nakano K, Arai R, Mabuchi I. The small GTP-binding protein Rho1 is a multifunctional protein that regulates actin localization, cell polarity, and septum formation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Cells*, 1997, 2: 679-694.
- [16] Calonge T M, Nakano K, Arellano M, Arai R, Katayama S, Toda T, Mabuchi I, Perez P. *Schizosaccharomyces pombe* rho2p GTPase regulates cell wall alpha-glucan biosynthesis through the protein kinase pck2p. *Molecular Biology of the Cell*, 2000, 11: 4393-4401.
- [17] Nakano K, Imai J, Arai R, Toh-E A, Matsui Y, Mabuchi I. The small GTPase Rho3 and the diaphanous/formin For3 function in polarized cell growth in fission yeast. *Journal of Cell Science*, 2002, 115: 4629-4639.
- [18] Nakano K, Mutoh T, Arai R, Mabuchi I. The small GTPase Rho4 is involved in controlling cell morphology and septation in fission yeast. *Genes Cells*, 2003, 8: 357-370.
- [19] Schmitz H P, Huppert S, Lorberg A, Heinisch J J. Rho5p downregulates the yeast cell integrity pathway. *Journal of Cell Science*, 2002, 115: 3139-3148.
- [20] Smith S E, Csank C, Reyes G, Ghannoum M A, Berlin V. *Candida albicans* RHO1 is required for cell viability *in vitro* and *in vivo*. *FEMS Yeast Research*, 2002, 2(2): 103-111.
- [21] Guest G M, Lin X, Momany M. *Aspergillus nidulans* RhoA is involved in polar growth, branching, and cell wall synthesis. *Fungal Genetics and Biology*, 2004, 41(1): 13-22.
- [22] Hurtado C A, Beckerich J M, Gaillardin C, Rachubinski R A. A rac homolog is required for induction of hyphal growth in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *The Journal of Bacteriology*, 2000, 182: 2376-2386.
- [23] Boyce K J, Hynes M J, Andrianopoulos A. Control of morphogenesis and actin localization by the *Penicillium marneffeii* RAC homolog. *Journal of Cell Science*, 2003, 116: 1249-1260.
- [24] Chen C, Dickman M B. Dominant active Rac and dominant negative Rac revert the dominant active Ras phenotype in *Colletotrichum trifolii* by distinct signalling pathways. *Molecular Microbiology*, 2004, 51: 1493-1507.
- [25] Vallim M A, Nichols C B, Fernandes L, Cramer K L, Alspaugh J A. A Rac homolog functions downstream of Ras1 to control hyphal differentiation and high-temperature growth in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*, 2005, 4: 1066-1078.
- [26] Chen C, Ha Y S, Min J Y, Memmott S D, Dickman M B. Cdc42 is required for proper growth and development in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. *Eukaryot Cell*, 2006, 5(1):155-166.
- [27] Mahler M, Leveleki L, Hlubek A, Sandrock B, Bolker M. Rac1 and Cdc42 regulate hyphal growth and cytokinesis in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Molecular Microbiology*, 2006, 59: 567-578.
- [28] Boyce K J, Hynes M J, Andrianopoulos A. The Ras and Rho GTPases genetically interact to co-ordinately regulate cell polarity during development in *Penicillium marneffeii*. *Molecular Microbiology*, 2005, 55: 1487-501.
- [29] Adamo J E, Moskow J J, Gladfelter A S, Viterbo D, Lew D J, Brennwald P J. Yeast Cdc42 functions at a late step in exocytosis, specifically during polarized growth of the emerging bud. *The Journal of Cell Biology*, 2001, 155: 581-592.
- [30] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D. W. 分子克隆实验指南(第三版). 北京: 科技出版社, 2002: 540-544.
- Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd edition)*. Beijing: Science Press, 2002: 540-544. (in Chinese)