

向日葵柄锈菌效应蛋白的预测及筛选

连小雨, 王妍, 路妍, 景岚*

(内蒙古农业大学园艺与植物保护学院, 内蒙古 呼和浩特, 010011)

摘要:向日葵柄锈菌(*Puccinia helianthi* Schw.)引发向日葵锈病,对生产具有破坏性。为深入了解锈菌效应蛋白,研究病原与寄主的互作机理,在获得向日葵柄锈菌分泌蛋白组的基础上,利用生物信息学软件预测及分析向日葵柄锈菌效应蛋白,采用qRT-PCR检测其中7个候选效应蛋白基因在接种叶片中的相对表达量。结果表明:在供试的900个锈菌的分泌蛋白中预测到候选效应蛋白497个。基因特征分析显示,开放阅读框长度在200~399 bp之间的最多;信号肽长度集中在16~27个氨基酸残基(占92.96%);信号肽氨基酸组成中亮氨酸出现频率最高,其次为丙氨酸、异亮氨酸;信号肽识别位点以Sp I型为主。本研究获得了7个向日葵柄锈菌的效应蛋白,qRT-PCR检测表明柄锈菌接种向日葵叶片后,与纯孢子相比,这7个效应蛋白编码基因均上调表达,说明其参与了锈菌侵染向日葵的过程。

关键词:向日葵柄锈病;生物信息学;效应蛋白;qRT-PCR

中图分类号:S432.2;S435.655 文献标识码:A 文章编号:1007-9084(2021)06-1141-09



OSID

Prediction and screening of effector proteins of *Puccinia helianthi*

LIAN Xiao-Yu, WANG Yan, LU Yan, JING Lan*

(College of Horticulture and Plant Protection, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010011, China)

Abstract: *Puccinia helianthi* Schw. is an important pathogenic fungi for sunflower. To better understand their pathogen-plant interacting, rust-effectors were predicted from secreted proteome of this sunflower rust pathogen. Among 900 secretory proteins, 497 candidate effectors were predicted. Protein characteristics showed that their length of open reading frame was mostly between 200 and 399 bp. Length of signal peptides were mainly (92.96%) between 16 and 27 amino acids. The most frequent amino acid in signal peptides was leucine, followed by alanine and isoleucine. Signal peptide recognition sites were mainly Sp I type. qRT-PCR on 7 candidate effector-encoding genes in inoculated leaves showed that they were up-regulated compared with pure spores (control), indicating their involving in pathogenesis of sunflower rust.

Key words: *Puccinia helianthi* Schw.; bioinformatics; effector; qRT-PCR

向日葵锈病是向日葵生产上最具破坏性的病害之一,病原菌为向日葵柄锈菌(*Puccinia helianthi* Schw.),为一种单主寄生菌。向日葵柄锈菌生活中产生5种不同类型的孢子,即性孢子、锈孢子、夏孢子、冬孢子和担孢子^[1]。向日葵感染锈病后,其叶片蒸腾作用加强,水分大量散失,光合作用效率降低,生长发育受到抑制,籽粒灌浆不足,空壳率增加,果实瘦小,极大降低了向日葵的经济价值^[2]。

在病原菌与寄主植物的互作过程中,真菌分泌的致病相关蛋白是其成功侵染植物的重要武器。植物对病原菌的抵御包括两种模式^[3]:即病原相关分子模式,即PTI(pathogen-associated molecular patterns, PAMP-triggered immunity),植物利用自身的PRR(pattern recognition receptors)对病原菌进行识别,从而触发由病原相关分子模式引起的免疫反应;二是病原菌为了成功侵染植物,会分泌出效应子(effector),效应子被寄主植物识别激发后引起的

收稿日期:2020-09-17

基金项目:国家自然科学基金(31760509);内蒙古自然科学基金(2020MS03046)

作者简介:连小雨(1996-),女,内蒙古乌兰察布市人,硕士研究生,主要从事向日葵病害研究,E-mail: 1948413830@qq.com

*通讯作者:景岚(1971-),女,内蒙古呼和浩特市人,教授,博士,主要从事向日葵病害研究,E-mail: jinglan71@126.com

免疫反应称为 ETI (effector-triggered immunity), 进而阻止病原物的入侵。效应蛋白是病原菌分泌的一类蛋白分子, 可调控寄主植物的生理过程、抑制植物的基础免疫反应, 最终促进病原菌入侵宿主组织以获得养分进行传播和繁殖^[4]; 部分效应蛋白会被植物抗病基因编码的蛋白识别, 激发植物的抗病反应, 在特定的条件激活植物自身防御系统进而阻碍病原菌对植物的侵染^[5]。可见, 效应蛋白在植物与病原菌的互作中发挥关键作用^[6]。

基于效应蛋白在寄主植物与病原菌相互作用过程中的重要性, 许多植物病原菌效应子的预测工作已经开展。目前主要通过基因组学和生物信息学, 对效应蛋白进行筛选及预测, 不断发展的高通量筛选也成为重要的手段^[7]。例如, 何艳秋等^[8]利用一系列生物信息学软件如 SignalP、TMHMM、WoLF-PSORT 等对香蕉枯萎病菌 1 号小种 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1, Foc1) 的 15 438 条蛋白质序列进行预测, 得到 988 个经典分泌蛋白, 筛选后有 378 个符合效应子的特点。范春霞等^[9]对甜瓜粉霉病原菌粉红单端孢 (*Trichothecium roseum*) 的 9760 个蛋白进行分析, 得到 154 个候选效应蛋白, 其中有 64 个获得功能注释。Zhao 等^[10]对小麦叶锈病菌 (*Puccinia triticina*) 转录组数据进行分析, 预测到 464 个分泌蛋白和 79 个效应蛋白。近年来, 有些效应蛋白基因已经从模式真菌和已被全基因组测序的真菌中克隆, 主要包括番茄叶霉病菌 (*Cladosporium fulvum*)^[11]、稻瘟病菌 (*Magnaporthe oryzae*)^[12]、油菜黑胫病菌 (*Leptosphaeria maculans*)^[13]、亚麻锈菌 (*Melampsora lini*) 等^[14]。这些研究成果为深入研究病原菌分泌蛋白或效应蛋白的功能提供了依据。但是, 向日葵柄锈菌的效应蛋白研究还较为匮乏。

锈菌与寄主植物共同进化, 并且表现出高度特异的相互作用^[15]。深入了解向日葵病菌效应蛋白将有助于揭示植物与病原互作的分子机制, 指导向日葵抗病育种。本研究在已获得的向日葵柄锈菌分泌蛋白组基础上, 根据锈菌效应蛋白的特征, 利用生物信息学分析软件 NLStradamus、T-REKS algorithm 及 EffectorP 进行预测, 利用 SignalP4.1 和 LipopP1.0 对候选效应蛋白进行信号肽氨基酸组成及信号肽识别位点的分析。选取了 7 个候选效应蛋白进行实时荧光定量检测, 分析其在叶片中的相对表达量, 以期为进一步开展效应蛋白的功能及病原与寄主互作机理研究奠定基础, 为向日葵锈病防治提供理论依据和途径。

1 材料与方法

1.1 数据来源

基于向日葵柄锈菌转录组测序获得的 35 286 条蛋白序列, 已筛选得到 900 条分泌蛋白^[16]。

1.2 效应蛋白的预测分析

1.2.1 效应蛋白的预测 根据目前已知小麦、杨树等的锈菌效应子的特征, 对向日葵柄锈菌 900 条分泌蛋白进行效应子筛选, 锈菌的效应子应至少具有下述特征之一^[17]: (1) 分子量小且富含半胱氨酸 (small cysteine-rich proteins, SCR; 氨基酸残基数小于等于 150 个且蛋白序列中半胱氨酸含量大于 3%)^[18]; (2) 含有一个效应器基序 (motif)^[19]; (3) 含有一个核定位信号 (nuclear localization signal, NLS); (4) 不含 Pfam 结构域 (除与致病性相关的)^[17]; (5) 含有内部重复序列蛋白 (repeat-containing proteins, RCP 蛋白)^[20]; (6) 可在植物中诱导表达, 早期的表达量为纯孢子的两倍以上。

利用 Excel 进行富含半胱氨酸蛋白、含有其它病原菌中已知的效应器基序蛋白的筛选; 利用 NL-Stradamus (<http://www.moseslab.csb.utoronto.ca/NL-Stradamus/>) 在线软件进行核定位信号的预测^[21]; RCP 蛋白通过 T-REKS algorithm 分析软件进行预测^[22]。

进一步利用 EffectorP1.0 (<http://effectorp.csiro.au/>) 在线软件进行筛选。筛选类别概率阈值设定为 0.5, 效应子预测值均 > 0.5, 结果显示为 non-effector 的为非效应子。预测为效应子的最大可能值为 1.000。

1.2.2 效应蛋白信号肽的预测分析 使用 SignalP4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 在线软件进行效应蛋白 N-端信号肽区域的预测, 分析其所在位点及氨基酸的组成^[23]。利用 LipopP1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/LipopP/>) 对效应蛋白信号肽识别位点进行分析, 根据信号肽酶识别位点的不同, 信号肽分为 Sp I 型和 Sp II 型: Sp I 型为信号肽酶 I 型, Sp II 型为脂蛋白信号肽, TMH 型为 N 端跨膜螺旋, CYT 为细胞质^[24]。

1.3 效应蛋白的 qRT-PCR 分析

选取 7 个符合效应子特征较多的候选效应蛋白, 实时荧光定量检测蛋白编码基因的表达量。感病向日葵品种黑大片长出一对真叶后, 于叶片正反面用棉签均匀涂抹锈菌夏孢子悬浮液 (浓度为 10^5 L 个孢子), 置于 20℃ 下黑暗保湿处理 24 h, 然后室温下正常培养。于接菌后的 3 d、4 d、5 d 分别采集向

日葵叶片(第一对真叶),锡箔纸包裹后置于液氮速冻,存于-80℃冰箱备用^[25]。每个处理组重复3次。将感病叶片发病后抖落的锈菌夏孢子同样处理后存于-80℃冰箱。

采集的叶片及纯孢子按照 RNAprep Pure 植物总 RNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司)操作步骤进行,使用试剂盒 PrimeScript™ RT reagent Kit (TaKaRa 公司)进行 cDNA 逆转录。将 cDNA 反转录产物作为模板进行 qRT-PCR 分析。使用 Primer 5.0 软件设计引物(表 1)。内参基因设定为泛素连接酶(ubiquitin-conjugating enzyme, UBC)基因^[26]。反应体系为:cDNA sample 1 μL、Forward primer 0.8 μL、Reverse primer 0.8 μL、SYBR®GreenI PCR mix 10 μL、Nuclease-Free Water 7.4 μL。反应程序为:95℃ 预变性 30 s;95℃ 5 s,Tm(褪火温度)20 s,72℃ 20 s,40 个循环。利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算基因的相对表达水平^[27]。

2 结果与分析

2.1 效应蛋白预测分析

在分泌蛋白组数据基础上,根据效应蛋白特征对效应子进行了筛选与预测。利用 Excel 表格对 900 个分泌蛋白中的 SCR 蛋白进行筛选。根据长度小于等于 150 个氨基酸残基,半胱氨酸含量大于 3%,筛选出 298 个蛋白属于 SCR 蛋白。

在分泌蛋白中寻找含有其它已知病原菌效应器基序结构域,其中 192 个含有小麦白粉病菌(*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*)效应器的[Y/F/W]xC 基序结构,其中具有 YxC 结构的有 78 个,具有 FxC 结构的有 96 个,具有 WxC 结构的有 18 个;13 个蛋白含有卵菌 RxLR 结构;20 个含有稻瘟病菌效应器[L/I]xAR 结构,其中具有 LxAR 结构的有 12 个,具有 IxAR 结构的有 8 个;8 个含有亚麻锈菌效应器 G[I/F/Y][A/L/S/T]R 结构(具体为 GYLR、GFLR、GILR、GISR)。这些筛选出来的蛋白含有其它已知的病原菌的效应器基序,推测其具有相似功能,可能为效应蛋白。

运用 NLStradamus (<http://www.moseslab.csb.utoronto.ca/NLStradamus/>)在线软件进行预测,900 个分泌蛋白中具有核定位信号的蛋白有 27 个,符合无 Pfam 功能结构域条件的 632 个,剩余的蛋白中发现 17 个分别含有 PF00188^[28]、PF00314^[29]、PF03330^[30]、PF05730^[31]和 PF10342^[32]结构域,这些结构域已经被证实与病原真菌致病有关,含有这些结构域的蛋白也推定为效应蛋白。因此该过程共筛选到候选效应蛋白 649 个。

通过 T-REKS algorithm 分析软件对含有内部重复序列的分泌蛋白进行筛选,预测到 94 个 RCP 的蛋白。

以上具有一个或一个以上特征的候选效应蛋白共 765 个。接着,再利用 EffectorP1.0 软件对上述

表 1 7 个候选效应蛋白基因及 UBC 引物序列
Table 1 Primer sequences of 7 candidate effector - encoding genes and UBC

基因名称 Gene name	引物(5'-3') Primer (5'-3')	褪火温度 Tm/℃	扩增产物 /bp Amplified product
Cluster32378	F: ACGTAGCCATTGAGTCCTT R: CATTCTTCTGCGGTTTATTGT	62	169
Cluster38252.seq.Contig1	F: GAATGGTCAGGGACTACACT R: AGGTTTAACCGAACTCTTGG	60	238
Cluster39758.seq.Contig1	F: ACTCTTGCTGCTCACTGGA R: GCTCGTTAGGATTGTGGATG	60	162
Cluster40966.seq.Contig1	F: TCTGCTCCACTGTACTTGTC R: TTATGTATGCTCCATCTTCTCA	60	125
Cluster17592	F: CTGAAGAAACAAAGGCAAGAG R: GATACACGAAGCGTCCCAAA	62	120
Cluster36818.seq.Contig1	F: TTGGTGCTTCTCAAACGATCC R: CTCCTCCTTCAAACCCCTCT	60	194
Cluster29163	F: ATATCCCAGGAAGCTTGCCA R: GTGGTGACCAAAGACTGAGACA	63	136
UBC	F: GTGGTGACCAAAGACTGAGACA R: CGACAGTCAGCCAACCTACC	60	119

765条蛋白序列进行更精确的预测,最终获得497个符合标准的候选效应子(附录1,详见首页OSID码),占分泌蛋白总数的55.22%,占编码总蛋白质的1.41%。

2.2 效应蛋白ORF区分析

对上述497条候选效应蛋白序列进行分析,其编码蛋白序列的开放阅读框(ORF)长度最短为102 bp,最大长度为1089 bp, ORF区平均长度为369 bp,多集中在200~399 bp,有225个(45.27%);其次为400~599 bp,共112个(22.54%);小于200 bp的有91个(18.31%),600~899 bp的有67个(13.48%),大于899 bp的有2个(0.40%)(图1)。

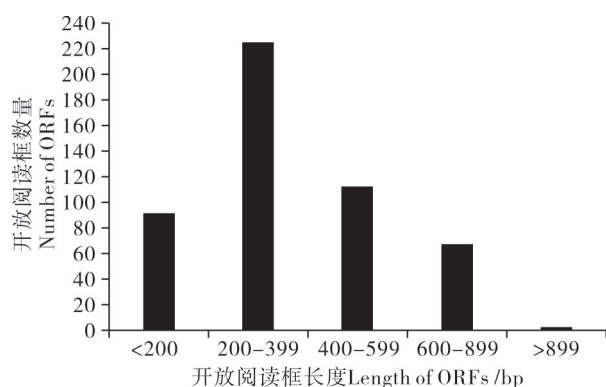


图1 向日葵柄锈菌候选效应蛋白基因开放阅读框的长度分布
Fig. 1 ORF length distribution of candidate effectors in *Puccinia helianthi*

2.3 候选效应蛋白的信号肽特征

对497个候选效应子信号肽氨基酸长度进行分析。结果表明(图2),效应蛋白信号肽长度主要集中在16~27个氨基酸之间,有462个,占总数的92.96%。信号肽长度为19氨基酸残基的个数最多,有63个,占12.68%;20个氨基酸的次之,占11.47%。长度在16个氨基酸以下的9个,占1.81%;长度在27个氨基酸以上的26个,占5.20%。

对氨基酸在信号肽序列中出现频率进行分析,共10471个氨基酸,其中亮氨酸个数最多,有1950个,占18.62%。天冬氨酸最少,只占0.81%。20种氨基酸出现频率排列由大到小依次为:亮氨酸(18.62%)>丙氨酸(9.82%)>异亮氨酸(9.04%)>丝氨酸(8.88%)>缬氨酸(8.66%)>苯丙氨酸(7.56%)>蛋氨酸(6.49%)>苏氨酸(5.77%)>半胱氨酸(4.03%)>甘氨酸(3.19%)>赖氨酸(2.63%)>天冬酰胺(2.44%)>谷氨酰胺(2.37%)>脯氨酸(2.15%)>精氨酸(2.09%)>组氨酸(1.73%)>酪氨酸(1.67%)>色氨酸(1.02%)>谷氨酸(1.02%)>天冬

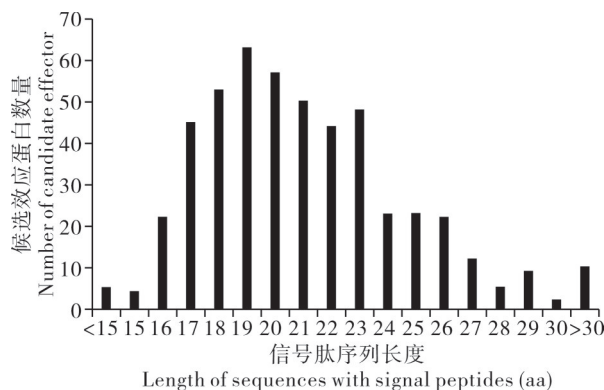
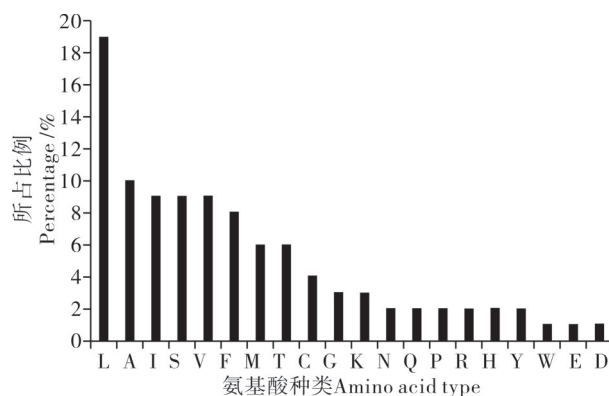


图2 向日葵柄锈菌候选效应蛋白信号肽长度分布
Fig. 2 Length distribution of signal peptides of candidate effectors in *P. helianthi*

氨酸(0.81%)(图3)。其中所占比例最大为非极性氨基酸(A、V、L、P、I、F、W、M),共6636个,占63.38%;其次为极性不带电氨基酸(G、S、T、C、Y、N、Q),占总量28.34%;极性带正电氨基酸(K、R、H)和极性带负电氨基酸(D、E)分别占氨基酸总数的6.45%、1.83%。



注:L:亮氨酸;A:丙氨酸;I:异亮氨酸;S:丝氨酸;V:缬氨酸;F:苯丙氨酸;M:蛋氨酸;T:苏氨酸;C:半胱氨酸;G:甘氨酸;K:赖氨酸;N:天冬酰胺;Q:谷氨酰胺;P:脯氨酸;R:精氨酸;H:组氨酸;Y:酪氨酸;W:色氨酸;E:谷氨酸;D:天冬氨酸

Note: L: leucine; A: alanine; I: isoleucine; S: serine; V: valine; F: phenylalanine; M: methionine; T: threonine; C: cysteine; G: glycine; K: lysine; N: asparagine; Q: glutamine; P: proline; R: arginine; H: histidine; Y: tyrosine; W: tryptophan; E: glutamic acid; D: aspartic acid

图3 向日葵柄锈菌候选效应子信号肽中20种氨基酸的出现频率
Fig. 3 Frequency of 20 amino acids in signal peptides of the candidate effectors in *P. helianthi*

利用LipoP1.0对候选效应蛋白信号肽识别位点进行分析,结果显示,497个候选效应蛋白中具有Sp I型信号肽识别位点的有263个,占52.92%;196个含有CYT型信号肽识别位点,占39.44%,32个含有Sp II型信号肽识别位点以及6个含有TMH型信

号肽识别位点,所占比例分别为6.44%、1.21%,说明向日葵柄锈菌的候选效应蛋白大部分由Sp I型信号肽酶进行识别(图4)。

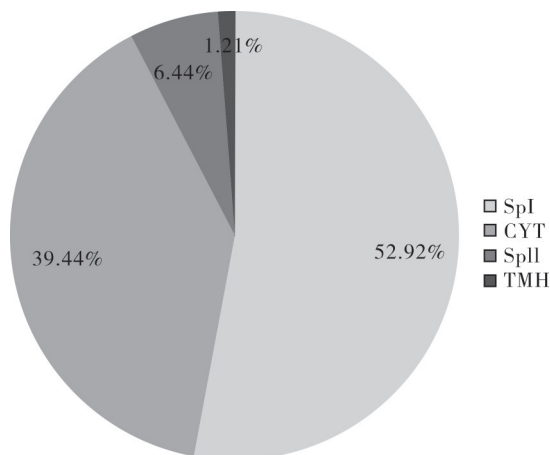


图4 向日葵柄锈菌候选效应蛋白信号肽酶的出现频率
Fig. 4 Frequency of signal peptide of the candidate effectors in *P. helianthi*

2.4 qRT-PCR分析

选取7个满足效应子条件较多的候选效应蛋白基因(表2),进行实时荧光定量PCR。结果显示,与对照纯孢子相比,接种3 d的叶片,7个基因的相对表达量均呈上调表达,第4 d时,只有cluster17592表达量相对于纯孢子降低,cluster36818的相对表达量在整个过程中均呈上升趋势;cluster17592、cluster29163和cluster40966在第3 d时的表达量达到最高;cluster32378、cluster36818、cluster38252和cluster39758在第5 d时表达量与纯孢子之比达到最高,其中cluster32378上调表达161倍(图5)。上述结果表明,这7个候选效应子在向日葵柄锈菌侵染早期表达量均有上升,可能在致病过程中发挥了重要作用。

3 讨论与结论

病原真菌的效应蛋白大部分为胞外分泌蛋白,被分泌至宿主细胞内或宿主细胞间,与其靶标进行互动,干扰寄主代谢甚至引起宿主细胞的结构或功能发生改变^[33]。高金欣等^[34]从玉米弯孢叶斑病菌(*Curvularia lunata*)全基因组编码的10 372条蛋白质序列中共预测出804个分泌蛋白,占总蛋白的7.8%。小麦条锈菌(*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*)基因组中分泌蛋白共1088个,占4.8%^[35]。Tobias等^[36]对蚕豆锈菌转录组数据进行预测得到599个分泌蛋白。本研究所用数据源自王妍等^[25]从向日葵柄锈菌转录组35 286条蛋白序列中筛选得到的900个分泌蛋白,占2.56%。

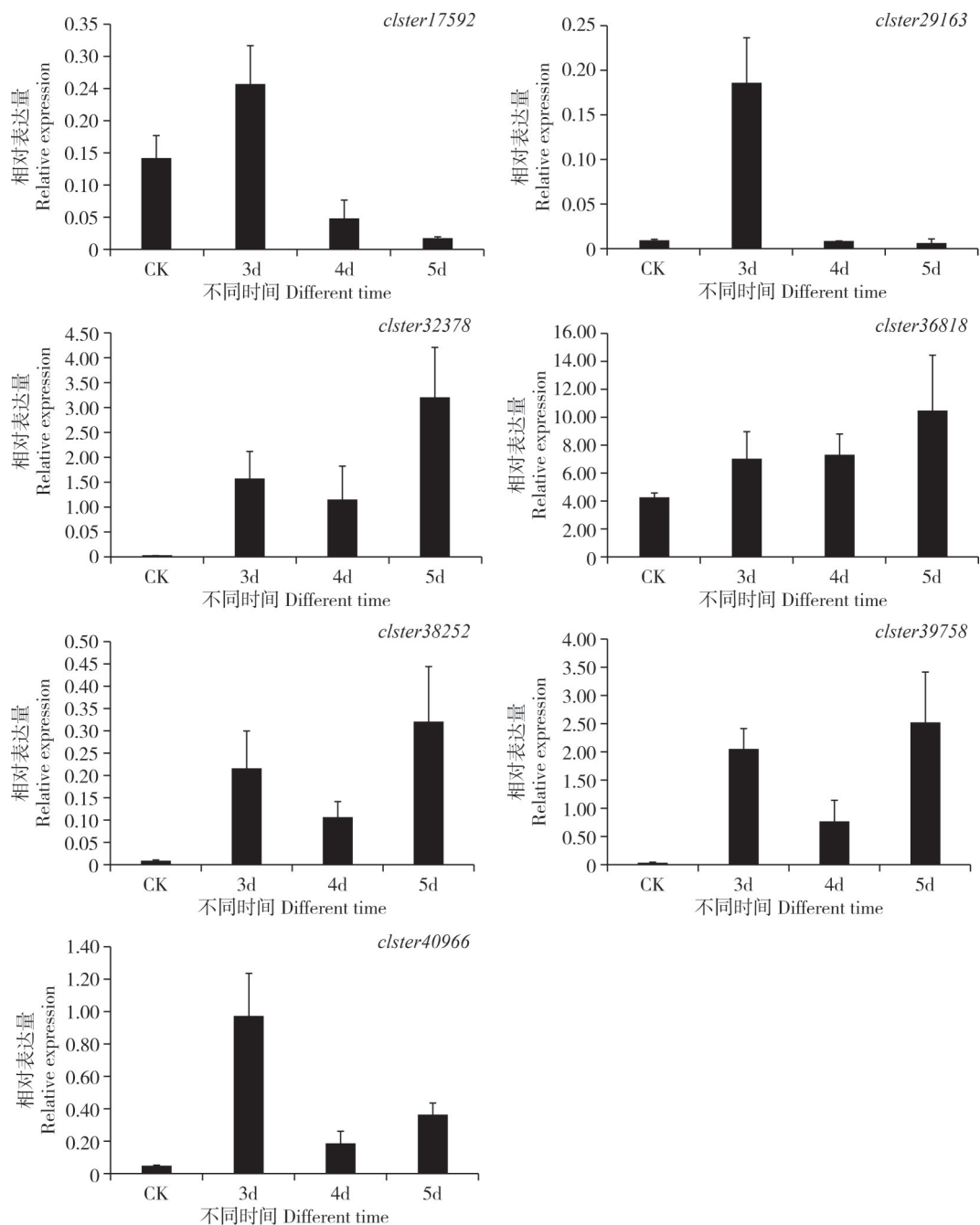
效应蛋白是重要的病程相关蛋白,某些真菌分泌蛋白已被预测为效应子^[37]。随着越来越多病原菌基因组完成测序,应用生物信息学的方法对全基因组数据进行分析,推动了效应蛋白的预测及其功能的研究^[38]。前人利用生物信息学方法已预测并鉴定出多种植物病原菌候选效应蛋白,如亚麻锈菌的1085个分泌蛋白中推定有762个效应蛋白^[35],其中鉴定出的效应蛋白编码基因包括*AvrL567*、*AvrM*、*AvrP4*和*AvrP123*^[32];杨树栅锈菌(*Melampsora larici-populina*)的1898个分泌蛋白中有1184个候选效应蛋白^[39];小麦秆锈菌(*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*)的1386个分泌蛋白中,预测有1106个候选的效应蛋白^[40]。闫丽斌等^[41]对玉米大斑病菌(*Setosphaeria turcica*)Et28A菌株11 698条蛋白序列进行预测,获得60个符合特征的候选效应蛋白,占全基因组蛋白的0.51%。

目前,有关向日葵柄锈菌的效应蛋白还未曾报道。本研究预测向日葵柄锈菌的900个分泌蛋白,最终得到479个候选效应蛋白。研究中发现192条

表2 7个候选效应蛋白的特征
Table 2 Characteristics of 7 candidate effectors

基因名称 Gene name	无结构域 No domain	SCR 半胱氨酸含量 Cysteine(>3%)	含 RCP RCP	基序 Motif	可能性 Probability
Cluster32378	√	9.9%	—	YxC FxC WxC	1.000
Cluster38252.seq.Contig1	√	12.07%	√	WxC	1.000
Cluster39758.seq.Contig1	√	8.13%	—	YxC FxC	1.000
Cluster40966.seq.Contig1	√	5.93%	—	YxC FxC	0.983
Cluster17592	√	7.97%	—	FxC WxC	1.000
Cluster36818.seq.Contig1	√	—	—	YxC FxC	0.994
Cluster29163	√	8.77%	—	LxAR YxC	1.000

注:Probability表示EffectorP软件预测效应蛋白的可能性阈值;√表示具有该特征;—表示无此特征
Note: Probability means the class probability threshold for the EffectorP classifier; √ means having this characteristic; — indicates no such feature



注: CK表示向日葵柄锈菌纯孢子

Note: CK represents the pure spores of *P. helianthi*

图5 7个候选效应蛋白编码基因不同时期相对表达量

Fig. 5 Relative expression levels of 7 candidate effector-encoding genes at different infection stages

蛋白序列具有[Y/F/W]XC效应蛋白基序。这一保守基序存在于许多植物病原真菌中,包括大麦白粉菌(*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*)^[42]和杨树栅锈菌^[39],这些候选效应蛋白编码基因可能与其它真菌中功能相似的基因具有同源性,所以推测其为致病或毒力相关因子,可进一步验证其功能。

由于缺乏统一的序列特征,真菌效应蛋白的预测标准相对广泛, EffectorP 在线软件是根据蛋白长

度、半胱氨酸含量、蛋白分子量等预测真菌效应蛋白的综合性软件,从分泌蛋白中筛选预测效应蛋白,准确度高达80%以上^[43]。EffectorP 多被用于准确地筛选效应蛋白,如齐悦等^[44]利用了 EffectorP 等4个软件从3个小麦叶锈病菌单胞菌系08-5-9-2(KHTT)、13-5-28-1(JHKT)和13-5-72-1(THSN)的转录组数据中最终筛选得到357个候选效应蛋白。本研究共筛选预测到497个候选效应蛋白,所

占比例为总蛋白的1.41%。真菌效应蛋白的信号肽序列长度多分布在15~28个氨基酸残基之间^[45], 本研究中效应蛋白的信号肽多为16~29个氨基酸, 有部分信号肽长度大于30个氨基酸。497个候选效应蛋白预测得到的信号肽识别位点主要为Sp I型, 与范春霞等^[9]的结果一致。

本研究在分泌蛋白数据基础上, 根据效应蛋白的特征, 使用相应的生物信息学软件预测出候选效应蛋白, 但有部分具有效应蛋白功能的蛋白可能由于不符合效应蛋白特征而被遗漏。例如, 部分效应蛋白具有Pfam功能结构域, 但已被证实为致病相关蛋白, 如番茄叶霉病菌效应蛋白Ecp6^[46]。有些效应蛋白半胱氨酸量较少或蛋白分子量较大, 如油菜黑胫病菌的效应蛋白AvrLm1只具有一个半胱氨酸^[47], 亚麻锈菌的效应蛋白AvrM分子量较大^[48]。所以, 通过分析真菌效应子基因与寄主植物互作后表达水平的变化, 是验证候选效应蛋白是否真正参与致病过程的一种重要手段^[49]。本研究对7个候选效应蛋白编码基因进行了实时荧光定量分析, 结果发现7个候选效应蛋白均在侵染寄主植物后呈现不同程度的表达水平上调, 进一步证明了本文预测得到的候选效应蛋白的可靠性。但各个基因的最高表达量所在时间点不一致, 它们可能在侵染寄主的不同时间发挥着作用。因此, 进一步验证候选效应蛋白的功能将成为后续必不可少的工作。

参考文献:

- [1] Putt E D, Sackston W E. Studies on sunflower rust: I. Some sources of rust resistance [J]. Can J Plant Sci, 1957, 37(1): 43-54. DOI: 10.4141/cjps57-005.
- [2] 路妍, 刘洋, 宋阳, 等. 向日葵NBS-LRR抗病基因家族全基因组分析[J]. 中国油料作物学报, 2020, 42(3): 441-452. DOI: 10.19802/j.issn.1007-9084.2019243.
- [3] Jones J D G, Dangl J L. The plant immune system [J]. Nature, 2006, 444(7117): 323-329. DOI: 10.1038/nature05286.
- [4] 戚拓. 条锈菌重要致病因子PstGSRE1和PstCPK1致病机理研究及利用HIGS技术创制小麦持久抗条锈病材料[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018.
- [5] 严霞, 牛晓磊, 陶均. 病原菌诱发的植物先天免疫研究进展[J]. 分子植物育种, 2018, 16(3): 821-831. DOI: 10.13271/j.mpb.016.000821.
- [6] Jones D A, Bertazzoni S, Turo C J, et al. Bioinformatic prediction of plant-pathogenicity effector proteins of fungi [J]. Curr Opin Microbiol, 2018, 46: 43-49. DOI: 10.1016/j.mib.2018.01.017.
- [7] Prasad P, Savadi S, Bhardwaj S C, et al. Rust pathogen effectors: perspectives in resistance breeding [J]. Planta, 2019, 250(1): 1-22. DOI: 10.1007/s00425-019-03167-6.
- [8] 何艳秋, 颜瑞, 蒙姑, 等. 香蕉枯萎病菌1号小种分泌蛋白与效应子的预测与分析[J]. 植物病理学报, 2020, 50(2): 129-140. DOI: 10.13926/j.cnki.ap-ps.000458.
- [9] 范春霞, 王军节, 赵鲁迺克, 等. 甜瓜粉霉病菌效应蛋白编码基因的预测与分析[J]. 植物病理学报, 2020, 8(3): 1-14. DOI: 10.13926/j.cnki.apps.000465.
- [10] Zhao S, Shang X, Bi W, et al. Genome-wide identification of effector candidates with conserved motifs from the wheat leaf rust fungus *Puccinia triticina* [J]. Front Microbiol, 2020, 11: 1188. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01188.
- [11] Stergiopoulos I, de Wit P J G M. Fungal effector proteins [J]. Annu Rev Phytopathol, 2009, 47(1): 233-263. DOI: 10.1146/annurev.phyto.112408.132637.
- [12] Azizi P, Rafii M Y, Abdullah S N A, et al. Toward understanding of rice innate immunity against *Magnaporthe oryzae* [J]. Crit Rev Biotechnol, 2016, 36(1): 165-174. DOI: 10.3109/07388551.2014.946883.
- [13] Ghanbarnia K, Fudal I, Larkan N J, et al. Rapid identification of the *Leptosphaeria maculans* avirulence gene *AvrLm2* using an intraspecific comparative genomics approach [J]. Mol Plant Pathol, 2015, 16(7): 699-709. DOI: 10.1111/mpp.12228.
- [14] 陈琦光, 舒灿伟, 杨媚, 等. 植物病原真菌效应分子的研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(11): 3105-3114. DOI: 10.13417/j.gab.035.003105.
- [15] Aime M C, McTaggart A R, Mondo S J, et al. Phylogenetics and phylogenomics of rust fungi [M]//Fungal Phylogenetics and Phylogenomics. Amsterdam: Elsevier, 2017: 267-307. DOI: 10.1016/bs.adgen.2017.09.011.
- [16] Jing L, Guo D D, Hu W J, et al. The prediction of a pathogenesis-related secretome of *Puccinia helianthi* through high-throughput transcriptome analysis [J]. BMC Bioinform, 2017, 18(1): 1-13. DOI: 10.1186/s12859-017-1577-0.
- [17] Saunders D G O, Win J, Cano L M, et al. Using hierarchical clustering of secreted protein families to classify and rank candidate effectors of rust fungi [J]. PLoS One, 2012, 7(1): e29847. DOI: 10.1371/journal.pone.0029847.
- [18] Sperschneider J, Williams A H, Hane J K, et al. Evaluation of secretion prediction highlights differing approaches needed for oomycete and fungal effectors [J]. Front Plant Sci, 2015, 6: 1168. DOI: 10.3389/fpls.2015.01168.

- [19] Hacquard S, Joly D L, Lin Y C, et al. A comprehensive analysis of genes encoding small secreted proteins identifies candidate effectors in *Melampsora larici-Populina* (poplar leaf rust) [J]. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2012, 25 (3) : 279-293. DOI: 10.1094/mpmi-09-11-0238.
- [20] Jorda J, Kajava A V. T-REKS: identification of tandem repeats in sequences with a K-meanS based algorithm [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25 (20) : 2632-2638. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp482.
- [21] Nguyen Ba A N, Pogoutse A, Provart N, et al. NLStradamus: a simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction [J]. *BMC Bioinformatics*, 2009, 10: 202. DOI:10.1186/1471-2105-10-202.
- [22] 董章勇, 陈欣瑜, 舒永馨, 等. 茄子枯萎病菌致病效应因子的预测分析 [J]. *西南农业学报*, 2019, 32(6): 1285-1289. DOI:10.16213/j.cnki.scjas.2019.6.013.
- [23] Petersen T N, Brunak S, von Heijne G, et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions [J]. *Nat Methods*, 2011, 8(10): 785-786. DOI: 10.1038/nmeth.1701.
- [24] Juncker A S, Willenbrock H, von Heijne G, et al. Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria [J]. *Protein Sci*, 2003, 12 (8) : 1652-1662. DOI:10.1110/ps.0303703.
- [25] 王妍. 基于向日葵锈菌转录组数据的SNP位点挖掘及效应因子的筛选 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2018.
- [26] Song Y, Wang Y, Guo D D, et al. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR normalization in the plant pathogen *Puccinia helianthi* Schw [J]. *BMC Plant Biol*, 2019, 19: 20. DOI: 10.1186/s12870-019-1629-x.
- [27] Schmittgen T D, Livak K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C (T) method [J]. *Nat Protoc*, 2008, 3(6): 1101-1108. DOI: 10.1038/nprot.2008.73.
- [28] Milne T J, Abbenante G, Tyndall J D, et al. Isolation and characterization of a cone snail protease with homology to CRISP proteins of the pathogenesis-related protein superfamily [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(33): 31105-31110. DOI:10.1074/jbc.m304843200.
- [29] Liu J J, Sturrock R, Ekramoddoullah A K M. The superfamily of thaumatin-like proteins: its origin, evolution, and expression towards biological function [J]. *Plant Cell Rep*, 2010, 29 (5) : 419-436. DOI: 10.1007/s00299-010-0826-8.
- [30] de Oliveira A L, Gallo M, Pazzagli L, et al. The structure of the elicitor Cerato-platanin (CP), the first member of the CP fungal protein family, reveals a double $\psi\beta$ -barrel fold and carbohydrate binding [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286 (20) : 17560-17568. DOI: 10.1074/jbc.m111.223644.
- [31] Kulkarni R D, Kelkar H S, Dean R A. An eight-cysteine-containing CFEM domain unique to a group of fungal membrane proteins [J]. *Trends Biochem Sci*, 2003, 28 (3) : 118-121. DOI: 10.1016/s0968-0004 (03) 00025-2.
- [32] Catanzariti A M, Dodds P N, Lawrence G J, et al. Haustorially expressed secreted proteins from flax rust are highly enriched for avirulence elicitors [J]. *Plant Cell*, 2006, 18(1): 243-256. DOI:10.1105/tpc.105.035980.
- [33] Win J, Chaparro-Garcia A, Belhaj K, et al. Effector biology of plant-associated organisms: concepts and perspectives [J]. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2012, 77: 235-247. DOI:10.1101/sqb.2012.77.015933.
- [34] 高金欣, 高士刚, 李雅乾, 等. 玉米弯孢叶斑病菌全基因组分泌蛋白的预测与分析 [J]. *植物保护学报*, 2015, 42 (6) : 869-876. DOI: 10.13802/j.cnki.zwb-hxb.2015.06.002.
- [35] Nemri A, Saunders D G O, Anderson C, et al. The genome sequence and effector complement of the flax rust pathogen *Melampsora lini* [J]. *Front Plant Sci*, 2014, 5: 98. DOI:10.3389/fpls.2014.00098.
- [36] Tobias L, Christian S, Ralf V T. Early insights into the genome sequence of *Uromyces fabae* [J]. *Front Plant Sci*, 2014, 5: 587. DOI: 10.3389/fpls.2014.00587.
- [37] Valent B, Khang C H. Recent advances in rice blast effector research [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2010, 13(4): 434-441. DOI:10.1016/j.pbi.2010.04.012.
- [38] 李云锋, 聂燕芳, 王振中. 植物病原真菌分泌蛋白质组学研究进展 [J]. *微生物学通报*, 2015, 42 (6) : 1101-1107. DOI:10.13344/j.microbiol.china.140608.
- [39] Duplessis S, Cuomo C A, Lin Y C, et al. Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi [J]. *PNAS*, 2011, 108 (22) : 9166-9171. DOI: 10.1073/pnas.1019315108.
- [40] Duplessis S, Spanu P D, Schirawski J. Biotrophic fungi (powdery mildews, rusts, and Smuts) [M]//*The Ecological Genomics of Fungi*. Hoboken, N J: John Wiley & Sons, Inc, 2013: 149-168. DOI:10.1002/9781118735893.ch7.
- [41] 闫丽斌, 肖淑芹, 薛春生. 玉米大斑病菌全基因组候选效应分子的预测和分析 [J]. *沈阳农业大学学报*, 2017, 48 (1) : 15-20. DOI: 10.3969/j.issn.1000-1700.2017.01.003.
- [42] Godfrey D, Böhlenius H, Pedersen C, et al. Powdery mildew fungal effector candidates share N-terminal Y/F/W₄C-motif [J]. *BMC Genom*, 2010, 11(1): 317. DOI: 10.1186/1471-2164-11-317.

- [43] Sperschneider J, Gardiner D M, Dodds P N, et al. EffectorP: predicting fungal effector proteins from secretomes using machine learning[J]. *New Phytol*, 2016, 210(2): 743–761. DOI:10.1111/nph.13794.
- [44] 齐悦, 张悦, 李建嫒, 等. 利用本氏烟筛选小麦叶锈菌效应蛋白[J]. *农业生物技术学报*, 2020, 28(1): 150–159. DOI:10.3969/j.issn.1674–7968.2020.01.015.
- [45] 韩长志. 全基因组预测希金斯炭疽菌的候选效应分子[J]. *生物技术*, 2015, 25(6): 546–551. DOI:10.16519/j.cnki.1004–311x.2015.06.0108.
- [46] de Jonge R, van Esse H P, Kombrink A, et al. Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants [J]. *Science*, 2010, 329(5994): 953–955. DOI:10.1126/science.1190859.
- [47] Gout L, Fudal I, Kuhn M L, et al. Lost in the middle of nowhere: the *AvrLm1* avirulence gene of the dothideomycete *Leptosphaeria maculans* [J]. *Mol Microbiol*, 2006, 60(1): 67–80. DOI:10.1111/j.1365–2958.2006.05076.x.
- [48] Benjamin P, Sophien K. How do filamentous pathogens deliver effector proteins into plant cells ?[J]. *PLoS Biology*, 2014, 12(2): 1001801. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001801.
- [49] Sperschneider J, Dodds P N, Gardiner D M, et al. Advances and challenges in computational prediction of effectors from plant pathogenic fungi [J]. *PLoS Pathog*, 2015, 11(5): e1004806. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004806.

(责任编辑:郭学兰)