

向日葵柄锈菌效应子 P2 的定位及功能研究

金佳鹏, 连小雨, 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:由向日葵柄锈菌(*Puccinia helianthi* Schw.)引起的向日葵锈病严重威胁着向日葵的安全生产。效应子是一类病原菌侵染过程中分泌的蛋白,促进病原菌侵染或触发寄主免疫。为明确向日葵锈菌效应子 P2 在锈菌侵染过程中发挥的作用,对该基因序列进行了生物信息学分析;以向日葵锈菌夏孢子 cDNA 为模板,克隆了 P2 基因的编码序列,利用 qRT-PCR 技术分析了该基因在侵染过程中的表达特性;采用农杆菌瞬时表达系统在烟草上验证了 P2 的毒性功能,并在烟草上瞬时表达对其进行了亚细胞定位。研究结果表明,P2 编码 58 个氨基酸,N 端含 24 氨基酸的信号肽,无核定位信号及跨膜结构域,并在向日葵锈菌侵染早期上调表达。在本氏烟中瞬时表达 P2 可以抑制 BAX 诱导的细胞坏死,亚细胞定位结果表明 P2 定位在细胞膜及细胞核。

关键词:向日葵锈病;效应子;qRT-PCR;细胞程序性死亡;亚细胞定位

中图分类号:S435.655 文献标识码:A 文章编号:1007-9084(2023)01-0124-07



OSID

Localization and function of effector P2 of *Puccinia helianthi* Schw

JIN Jia-peng, LIAN Xiao-yu, LU Yan, JING Lan*

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

Abstract: Sunflower rust, caused by *Puccinia helianthi*, often threatens sunflower production. Effectors are proteins secreted during pathogen infection, which promote pathogen invasion or trigger host immunity. In order to clarify the role of P2 effector in rust infection process, P2 gene was analyzed by bioinformatics. cDNA of *P. helianthi* urediospores was used as template to clone P2 gene. Its expression characteristics during the infection were analyzed by qRT-PCR. Then function of P2 was verified in *Nicotiana benthamiana* by *Agrobacterium* transient expression system, and subcellular localization of P2 was performed by transient expression in *N. benthamiana*. Results showed that P2 encoded 58 amino acids (aa) with 24 aa signal peptide at N-terminal, without nuclear localization signal and transmembrane domain. P2 expression was up-regulated during early stage of *P. helianthi* infection. Transient expression of P2 in *N. benthamiana* inhibited BAX-induced cell death. Subcellular localization showed that P2 was localized in cell membrane and nucleus.

Key words: sunflower rust; effector; qRT-PCR; programmed cell death (PCD); subcellular localization

向日葵是世界上最重要的油料作物之一,在世界范围内广泛种植^[1]。2019 年全球的播种面积和总产量分别达到 2736.9 万公顷和 5607.3 万吨^[2]。随着向日葵种植面积的扩大,向日葵锈病发生区域也随之扩大,危害程度和爆发频率增加,给向日葵生产带来了严重损失^[3]。引起向日葵锈病的病原菌是向日葵柄锈菌(*Puccinia helianthin* Schw.),该真菌是具有夏孢子、冬孢子、担孢子、性孢子和锈孢子 5

种孢子形态的单主寄生菌^[4]。向日葵锈菌危害植株后,生长所需的营养和水分大量消耗,生长发育受到严重抑制,果实瘦小,含油量明显降低,严重影响向日葵的经济价值^[5]。

病原菌与植物在长期的进化过程中,二者相互适应、相互选择,进化出了一系列的侵染与防御机制,形成一种动态平衡。植物在与病原菌长期协同进化过程中,产生了相应的防卫机制抵御病

收稿日期:2022-01-14

基金项目:国家自然科学基金(32160642);内蒙古自然科学基金(2020MS03046)

作者简介:金佳鹏(1996-),男,硕士研究生,主要从事植物免疫学研究,E-mail: 2655820291@qq.com

* 通讯作者:景岚(1971-),女,教授,博士,主要从事植物免疫学研究,E-mail: jinglan71@126.com

原菌的侵染,即病原相关分子模式诱导的抗病反应机制 PTI(PAMPs triggered immunity)和病原菌效应子(effector)诱导的抗病机制 ETI(effector triggered immunity)^[6]。效应子是病原菌分泌的,可以干扰寄主抗病性和细胞的结构,从而促进病原菌侵染或触发寄主免疫的一类蛋白分子^[7]。效应子会随着病原菌的侵染进入寄主细胞内发挥功能:促进病原菌入侵宿主组织以获得养分进而传播和繁殖^[8];调控寄主的生理生化过程、抑制寄主的基础免疫反应,诱导寄主感病或抗病;作为病原菌发挥毒性功能所必需的物质;被寄主受体所识别,在一定的条件下激活寄主自身防御系统以阻碍病原菌对寄主的侵染^[9],在植物与病原菌的互作中发挥关键作用^[10]。

目前,许多新的研究方法被应用于效应子的鉴定和功能验证,其中较为常见的研究方法包括:寄主诱导的基因沉默(host-induced gene silencing, HIGS)技术;寄主植株中稳定表达方法;农杆菌渗透法和酵母系统异源表达法等^[11-14]。其中,农杆菌介导 Avr 蛋白的瞬时表达法可以直接、快速地初步鉴定效应子的功能,被作为植物转化时最常用的方法。有研究报道,小鼠促细胞凋亡蛋白 BAX(BCL2 类癌基因的伴随蛋白, BCL2-associated X)可以在植物中引起细胞坏死,与病原菌诱导植物过敏性坏死反应类似^[15]。Avr1b^[16]是大豆疫霉(*Phytophthora sojae*)中被克隆的第一个无毒基因,可以抑制 BAX 引起的细胞坏死,在研究效应子功能中发挥重要作用。李重阳等^[17]通过农杆菌渗透法注射烟草发现,与稻曲病菌(*Ustilaginoidea oryzae*)Six1 类蛋白具有同源性的效应子 UvSix1-1,既可抑制 BAX、XEG1 和 INF1 引起的烟草局部坏死,又可促进病原菌的侵染,且具有分泌功能。王力坤等^[18]通过此方法发现小麦条锈菌(*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*)效应子基因 *Pst30* 存在潜在的毒性功能,可以抑制寄主植物的 ETI 和 PTI,参与调控寄主的基础免疫反应,以促进自身侵染寄主植物。

深入了解向日葵柄锈菌效应子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。本研究前期预测的向日葵锈菌候选效应子中,选取了一个符合锈菌效应子特征较多的蛋白 P2,通过克隆该基因,构建瞬时表达载体注射烟草,观察其是否可以引起或抑制烟草叶片细胞坏死,并研究该蛋白的亚细胞定位和表达特征,完成效应子 P2 功能的初步验证。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料与菌株 向日葵食葵品种黑大片、烟草品种为本氏烟(*Nicotiana benthamiana*),向日葵柄锈菌,均由内蒙古农业大学植物病理实验室提供。

1.1.2 载体及试剂 载体 pGR107,抗性为卡那霉素(Kan)和利福平(Rif),提供自西北农林科技大学。载体 part-CAM-eGFP,抗性为链霉素(Str);RNA-prep Pure 总 RNA 提取试剂盒,琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒,质粒小提试剂盒,2×Taq PCR Master Mix、Kan、Rif、氨苄霉素(Amp)、壮观霉素(Stp)、链霉素(Str)等购自北京天根生化科技有限公司;GoScript™ Reverse Transcription System 反转录试剂盒购自普洛麦格(北京)生物技术有限公司;限制性核酸内切酶购自赛默飞世尔科技有限公司;ToPo pBoLn-TA Easy 克隆试剂盒购自北京博凌科为生物技术有限公司;DH5α 感受态细胞购自宝生物工程(大连)有限公司;农杆菌 GV3101 购自上海唯地生物技术有限公司(AC1001);NovoRec® PCR 一步定向克隆试剂盒购自近岸蛋白质科技有限公司;ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒,诺唯赞生物科技有限公司;引物于华大基因科技股份有限公司合成。

1.1.3 培养基 LB 培养基:胰蛋白胨 10 g,酵母提取物 5 g,NaCl 10 g,用去离子水定容至 1000 mL,固体培养基加入 1.5% 的琼脂。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析 利用 ORF Finder 程序(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)获取效应子 P2 的开放阅读框。使用 SignalP4.1 Server 在线软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>)进行效应蛋白 N-端信号肽区域的预测,分析其所在位点。使用 ApoplastP 在线软件(<http://apoplastp.csiro.au>)预测蛋白为非原质体效应子或原质体效应子。NL-Stradamus(<http://www.moseslab.csb.utoronto.ca/NL-Stradamus/>)预测核定位信号。TMHMM S2.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)预测跨膜结构域。

1.2.2 P2 基因的克隆 通过已有的 P2 基因序列,设计特异性引物 P2-F、P2-R(表 1),由华大基因公司合成。以向日葵锈菌夏孢子 cDNA 为模板扩增目的基因,PCR 反应程序为:95℃ 预变性,5 min;94℃ 变性,30 s;61℃ 退火,30 s;72℃ 延伸,1 min,35 个循

环;72℃延伸 10 min,4℃保存。使用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,并用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收目的条带,将其连接到克隆载体 ToPo pBoLn-TA 上,转化到大肠杆菌 DH5 α 进行鉴定和测序。

1.2.3 P2 表达特征分析 将向日葵锈菌夏孢子均匀涂抹在向日葵感病品种黑大片的第一对真叶上,分别于 6 h、12 h、24 h、48 h、72 h 取样,锡箔纸包裹后置于液氮速冻,-80℃贮存备用。将感病叶片发病后抖落的新鲜锈菌夏孢子同样处理后存于-80℃保存,备用。

采集的叶片及夏孢子按照植物总 RNA 提取试剂盒操作步骤进行 RNA 提取,分析总 RNA 的完整性,并使用 GoScriptTM Reverse Transcription System 反转录试剂盒按照操作步骤合成第一链 cDNA。根据向日葵效应子 P2 的 ORF 区序列,使用 Primer 5.0 软件,设计特异性引物 qPCR-P2-F、qPCR-P2-R,内参基因为向日葵锈菌泛素连接酶(ubiquitin-conjugating enzyme, UBC),引物为 UBC-F、UBC-R(表 1)。以 cDNA 为模板进行荧光定量 PCR 分析,操作步骤参考 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒说明书。每个反应 3 次重复,依据得到的 Ct 值,参照相对定量的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算不同处理、不同时间点样品目标基因对内参的相对表达量。用 Excel 2019 软件整理数据表,绘制柱形图。

1.2.4 P2 抑制 BAX 诱导的细胞程序性死亡 以 1.2.2 获得的 P2 克隆质粒为模板,经酶切后连接至 pGR107 载体,分别获得带信号肽的重组载体 pGR107-P2 及去信号肽的重组载体 pGR107-P2^{ASP},后转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,扩增验证。用相同的办法转化 pGR107-GFP、pGR107-BAX、pGR107-Avr1b 质粒。将质粒转化至农杆菌感受态细胞 GV3101,后注射烟草,参考赵聪聪等研究方法^[19]。24 h 后,注射转化有 pGR107-BAX 的农杆菌

菌液,5 d 后陆续观察细胞坏死情况,并将注射后的叶片摘下放入 75% 的酒精中,煮沸脱色处理至叶片呈半透明,拍照记录。脱色后叶片绿色部位为细胞坏死区域,健康区域呈半透明状。

1.2.5 P2 的亚细胞定位 为构建 part-CAM-eGFP 瞬时表达载体,以 part-CAM-eGFP-P2-F、part-CAM-eGFP-P2-R(表 1)为引物,1.2.2 中含有 P2 基因的菌液为模板进行 PCR 扩增,回收目的片段并用 *Xho* I 和 *Eco*R I 双酶切处理后,将目的 DNA 片段和 part-CAM-eGFP 载体以一定的摩尔比加入,加入同源重组酶,混匀后在 37℃保温 30 min。将获得的 part-CAM-P2-GFP 融合表达载体质粒转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,在 LB 固体培养基(Str)上涂板,倒置于 37℃恒温培养箱中 12 h。挑单克隆菌落进行 PCR 及测序验证,将测序正确的质粒和空载体质粒分别转化至农杆菌感受态细胞 GV3101 中培养。烟草的注射方法同 1.2.4,以 part-CAM-eGFP 空载体作为阴性对照,2 d 后在共聚焦显微镜观察亚细胞定位,拍照记录。

2 结果与分析

2.1 P2 的序列分析

通过生物信息学分析,P2 为原质体效应子,ORF 区全长 177 bp,编码 58 个氨基酸(附表 1,见首页 OSID 码);SignalP4.1 Server 在线软件预测结果表明,P2 的 N 端氨基酸序列 1~24 aa 为信号肽;利用 TMHMM S2.0 在线软件预测,未发现核定位信号;利用 NLStradamus 在线软件预测,未发现跨膜结构域。

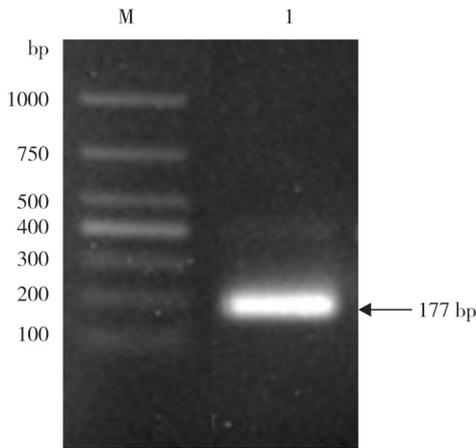
2.2 效应子 P2 的克隆分析

以向日葵锈菌总 RNA 为模板,逆转录后进行 PCR 扩增目的基因,得到 P2 的条带,大小为 177 bp(图 1)。将该基因连接至克隆载体 ToPo pBoLn-TA,连接成功后将含有目的基因菌液进行 PCR 鉴定和

表 1 所用引物序列

Table 1 Primer sequence used in the experiment

引物 Primer	序列 Sequence (5'-3')
UBC-F	GTGGTGACCAAAGACTGAGACA
UBC-R	CGACAGTCAGCCAACTACC
qPCR-P2-F	TGCCACGTTGAGAATGACTC
qPCR-P2-R	TGCTTCCCAGCATAACCTTT
P2-F	CGGGGTACCATGATCATTTGGCTTTGATCTGTTGG
P2-R	CCGTCGACTTAAAATGCTTCCCAGCATAACCTT
part-CAM-eGFP-P2-F	TTGGAGAGGACAGCTCGAGATGATCATTGGCTTTGATCT
part-CAM-eGFP-P2-R	CCCTTGCTCACCATGAATTCAAATGCTTCCCAGCATAAC



注:M:DL 1000;1:P2基因片段
Note: M: DL 1000; 1: P2 segment

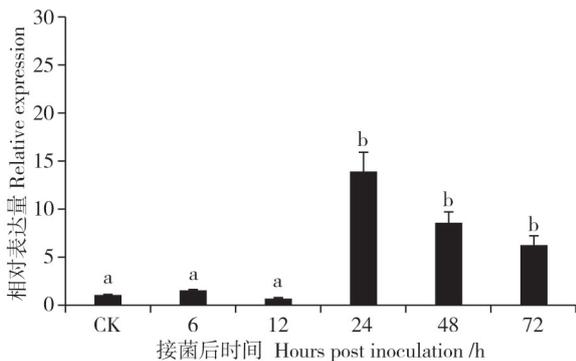
图1 P2基因PCR扩增

Fig. 1 PCR amplification of P2 gene

测序分析,测序结果通过DNAMAN 8.0与原序列比对,结果显示,其与P2的原序列相似性为100%。

2.3 P2在向日葵锈菌侵染向日葵过程中表达特性分析

通过qRT-PCR对P2的表达量进行分析,结果显示(图2),与该基因在夏孢子中的表达量相比,P2在侵染后的24~72 h表达量均有不同程度的上调,在24 h时达到表达高峰,约为夏孢子阶段表达量的13.8倍,随后该基因的表达量逐渐下调,48 h、72 h表达量分别为夏孢子的8.4和6.2倍。



注:CK:向日葵夏孢子。图中不同小写字母表示P2在不同取样时间与向日葵夏孢子中的表达在0.05水平上差异显著

Note: CK: Urediospore of *P. helianthi*. Different lowercase letters in the figure indicated that P2 expression was significantly different at 0.05 level between different sampling time and urediospore of *P. helianthi*

图2 P2在锈菌侵染向日葵过程中的表达特征

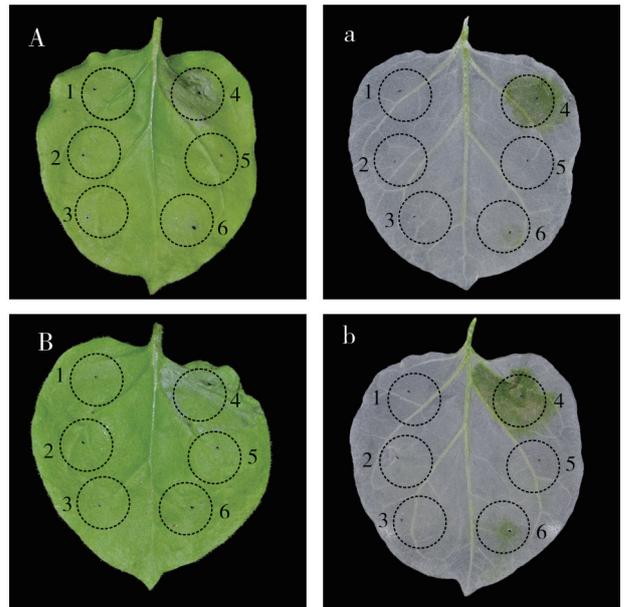
Fig. 2 Expression pattern of P2 during rust infection

2.4 效应子P2抑制BAX引起的细胞坏死

将农杆菌菌液分别注射烟草叶片1~6部位,24 h后在4、5、6部位注射含BAX的菌液。5 d后进

行观察,eGFP+BAX的部位可以看到坏死,AVR1b可以抑制BAX引起的坏死,效应子P2及去信号肽的P2^{ΔSP}均可抑制BAX诱导的细胞坏死(图3)。表明效应子P2可能具有抑制寄主防御反应的能力。

1. eGFP	4. eGFP+BAX
2. AVR1b	5. AVR1b+BAX
3. P2/P2 ^{ΔSP}	6. P2/P2 ^{ΔSP} +BAX



注:A:含有P2重组载体的农杆菌菌液注射本氏烟叶片5 d后的表型观察;a:A叶片经过脱色处理后的表型观察;B:含有P2^{ΔSP}重组载体的农杆菌菌液注射本氏烟叶片5 d后的表型观察;b:B叶片经过脱色处理后的表型观察

Note: A: Phenotype observation of tobacco leaves 5 d after *A. tumefaciens* containing pGR107-P2 vector infiltration; a: phenotypic observation of A leaves after discoloration; B: phenotype observation of tobacco leaves 5 d after *A. tumefaciens* containing pGR107-P2^{ΔSP} vector infiltration; b: phenotypic observation of B leaves after discoloration

图3 P2抑制BAX诱导的烟草细胞坏死

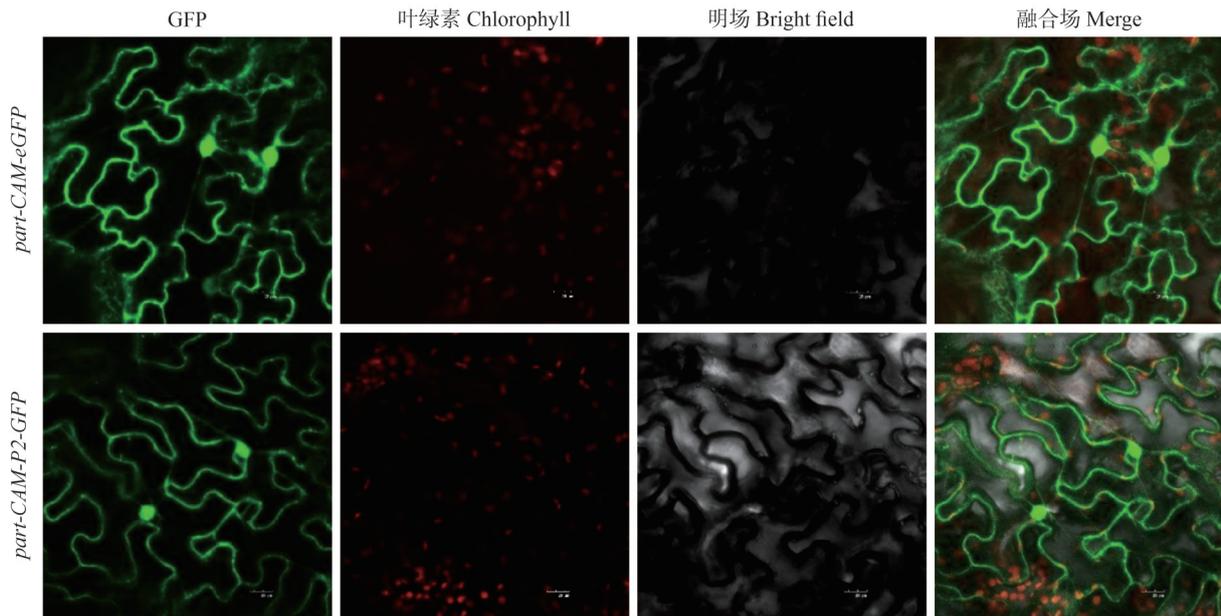
Fig. 3 P2 inhibits BAX-induced cell death in *N. benthamiana*

2.5 P2的亚细胞定位

亚细胞定位结果显示(图4),空载体GFP在本氏烟的细胞质及细胞核中均观察到绿色荧光,P2在细胞核、细胞膜位置绿色荧光清晰可见、均匀分布,表明效应子P2可能定位在细胞核和细胞膜上。

3 讨论与结论

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,推动了效应子的预测及其功能的研究^[20,21]。在基因组数据的基础上,人们根据效应子特征和生物信息学分析



注:使用激光共聚焦显微镜观察,GFP信号为绿色,叶绿素自发荧光为红色,标尺为20 μm

Note: GFP signal (green) and chlorophyll autofluorescence (red) were observed under a confocal microscope. Bar= 20 μm

图4 效应子P2在本氏烟中的亚细胞定位

Fig. 4 Subcellular localization of P2 in *N. benthamiana*

软件预测并筛选了大量病原菌效应子,如番茄叶霉病菌效应子 (*Cladosporium fulvum*) Avr9^[22]; 亚麻锈菌 (*Melampsora lini*) 效应子 AvrL567、AvrP123^[23,24]; 小麦叶锈菌效应子 Cluster-19789.84114、Cluster-19789.21637^[25]等。有报道,效应子在病原菌侵染寄主的过程中发挥着重要作用,在侵染早期的过程中效应子会大量表达^[26]。如最早参与小麦条锈菌侵染结构分化过程的基因 *UaINF24* 在条锈菌侵染初期的3~4.5 h内大量表达^[27]; 尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) 效应子 FocM35_1 在侵染早期被高度上调^[28]。本研究中,P2在侵染24~72 h时的表达量被大幅上调,在24 h达到表达高峰,上调了14倍以上,这与向日葵锈菌吸器形成的时间吻合。因此,推测P2是在锈菌侵染早期由吸器分泌的效应子,并在寄主体内大量表达,在锈菌营养吸收阶段发挥重要作用。

对效应子的功能研究发现,部分效应子可引起植物的过敏性坏死反应,部分可以抑制植物细胞程序性死亡^[29,30]。有研究表明,由BAX诱导的植物叶片细胞死亡与病原物诱导的细胞过敏性坏死反应在表型上具有相似性,所以效应子抑制由BAX引起细胞死亡,体现了其在抑制寄主植物防御反应时所表现的毒性功能,被作为研究效应子功能的重要方法^[31]。Yang等^[32]研究发现,小麦条锈菌效应子 Pst18363 可以抑制BAX诱导的细胞坏死,是锈菌中

首个报道可以抑制烟草和小麦细胞坏死的效应子。季森等^[33]利用农杆菌介导的烟草瞬时表达系统发现小麦条锈菌效应子 HASP2 可以抑制由BAX产生的细胞程序性死亡暗示 HASP2 的毒性功能。在对向日葵锈菌P2的功能研究中发现,单独过表达P2不能诱导烟草细胞坏死,但P2可以抑制BAX诱导的烟草细胞坏死,表明P2可能具有干扰寄主防御反应的能力。由于向日葵遗传体系并不成熟,P2在非寄主植物烟草中抑制细胞程序性死亡的过程并不能完全代替效应子在向日葵锈菌侵染向日葵中发挥的作用,本试验的结果还需进一步证实。

在病原菌侵染寄主的过程中,部分效应子被分泌到寄主细胞内发挥作用。目前,多数亚细胞定位试验通过构建融合基因表达载体,采用农杆菌渗透法确定目的基因的作用位点。如Tzelepis等^[34]通过共聚焦显微镜观察发现,立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*) 效应子 RsCRP1 在本氏烟叶片中瞬时表达后,定位于叶绿体和线粒体。宋平等^[35]通过农杆菌渗透法研究效应子亚细胞定位发现,小麦条锈菌效应子 PSTG_23616 在细胞核、细胞质和细胞膜中均有分布。Caillaud等^[36]利用此方法研究了拟南芥霜霉病菌 (*Hyaloperonospora arabidopsidis*) 的49个候选效应子,发现其中有32个效应子定位于植物细胞核。本试验通过农杆菌渗透法在本氏烟中瞬时表达效应子P2,结果显示其在植物细胞膜和细胞核都有绿色

荧光分布,与生物信息学分析预测结果存在偏差。这可能是由于效应子被分泌到寄主细胞内,在不同的功能时期其在植物细胞内的发生位置可能完全不同^[37]。效应子以宿主细胞核为靶标,可能会重新调控植物细胞的转录机制,抑制植物免疫反应;效应子定位在细胞膜上可能是针对宿主细胞的PAMP (pathogen-associated molecular patterns),以抑制宿主PTI防御反应^[36]。本试验间接证明P2能够被分泌到寄主细胞中发挥作用,但对于P2如何进入寄主细胞中发挥作用以及其具体的毒性功能是未来亟需去解决的一个重要科学问题。

本研究通过qRT-PCR试验证明了效应子P2在向日葵锈菌侵染向日葵的早期上调表达,说明P2是由向日葵锈菌吸器大量分泌到寄主细胞内的效应子,在向日葵侵染早期发挥作用,符合锈菌效应子的一般特征^[38]。为进一步研究效应子P2的功能,本研究克隆了目标基因,利用农杆菌瞬时表达系统侵染烟草,证明效应子P2可以抑制由BAX诱导的烟草细胞坏死,说明P2在向日葵锈菌的毒性功能中发挥重要作用。此外,亚细胞定位试验结果发现,向日葵锈菌效应子P2定位于细胞膜和细胞核中,表明P2可能在此位置与寄主细胞成分互作,干扰或抑制寄主免疫。此研究结果为进一步深入了解效应子P2与向日葵互作的分子机制提供了基础。

参考文献:

[1] 李荣德,李媛媛,牛庆杰.我国向日葵品种登记状况分析[J].中国油料作物学报,2021,43(3):518-523. DOI:10.19802/j.issn.1007-9084.2020141.

[2] 国际粮农组织官方网站数据库[EB/OL].(2019-06-30) http://faostat.fao.org.

[3] 林晓红,景岚,康振生.向日葵抗锈病基因同源序列的克隆与分析[J].中国油料作物学报,2014,36(4):508-512,523.

[4] 李鑫淳,宋阳,路妍,等.向日葵锈菌弹性金属蛋白酶基因克隆及生物信息学分析[J].华北农学报,2019,34(3):186-193. DOI:10.7668/hbnxb.201751261.

[5] 龚静,路妍,宋阳,等.向日葵锈病抗性相关microRNA的挖掘及其靶基因预测[J].中国油料作物学报,2020,42(4):687-700. DOI:10.19802/j.issn.1007-9084.2020043.

[6] Jones J D G, Dangl J L. The plant immune system[J]. Nature, 2006, 444(7117): 323-329. DOI:10.1038/nature05286.

[7] 张丽勃,余永婷,方献平,等.草莓果生炭疽菌候选效应子基因CfE15对孢子产量的影响[J/OL].分子植

物育种,2021:1-7.(2021-04-16). https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20210416.1021.004.html.

[8] 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.

[9] 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.

[10] 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.

[11] Nowara D, Gay A, Lacomme C, et al. HIGS: host-induced gene silencing in the obligate biotrophic fungal pathogen *Blumeria graminis* [J]. Plant Cell, 2010, 22(9): 3130-3141. DOI:10.1105/tpc.110.077040.

[12] Fabro G, Steinbrenner J, Coates M, et al. Multiple candidate effectors from the oomycete pathogen *Hyaloperonospora arabidopsidis* suppress host plant immunity [J]. PLoS Pathog, 2011, 7(11): e1002348. DOI:10.1371/journal.ppat.1002348.

[13] Chen M J, Zeng H M, Qiu D W, et al. Purification and characterization of a novel hypersensitive response-inducing elicitor from *Magnaporthe oryzae* that triggers defense response in rice [J]. PLoS One, 2012, 7(5): e37654. DOI:10.1371/journal.pone.0037654.

[14] Fields S, Song O K. A novel genetic system to detect protein - protein interactions [J]. Nature, 1989, 340(6230): 245-246. DOI:10.1038/340245a0.

[15] Baek D, Nam J, Koo Y D, et al. Bax-induced cell death of *Arabidopsis* is mediated through reactive oxygen-dependent and-independent processes[J]. Plant Mol Biol, 2004, 56(1): 15-27. DOI:10.1007/s11103-004-3096-4.

[16] Shan W X, Cao M, Leung D, et al. The *Avr1b* locus of *Phytophthora sojae* encodes an elicitor and a regulator required for avirulence on soybean plants carrying resistance gene *Rps1b* [J]. Mol Plant Microbe Interact, 2004, 17(4): 394-403. DOI:10.1094/MPMI.2004.17.4.394.

[17] 李重阳,王毓富,林杨,等.稻曲病菌Six1类效应蛋白UvSix1-1的功能研究[J].植物病理学报,2019,49(1):27-34. DOI:10.13926/j.cnki.apps.000197.

[18] 王力坤,樊昕,汤春蕾,等.条锈菌效应子Pst30抑制植物的胍胍质和活性氧积累[J].植物病理学报,2020,50(2):155-163. DOI:10.13926/j.cnki.apps.000315.

[19] 赵聪聪,盛丽梅,许强,等.小麦条锈菌细胞质效应子Hasp8抑制植物基础免疫[J].植物保护学报,2020,47(03):537-545. DOI:10.13802/j.cnki.zwb-

- hxb.2020.2019096.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] Kan J A V, van den Ackerveken G F, de Wit P J. Cloning and characterization of cDNA of avirulence gene *avr9* of the fungal pathogen *Cladosporium fulvum*, causal agent of tomato leaf mold [J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 1991, 4(1): 52–59. DOI:10.1094/mpmi-4-052.
- [23] 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.
- [24] 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*, 2005, 18(1): 243–256. DOI:10.1105/tpc.105.035980.
- [25] 张瑞丰, 崔立平, 范学锋, 等. 小麦叶锈菌与小麦互作中的效应蛋白筛选及功能验证 [C]//中国植物病理学会 2019 年学术年会论文集. 成都, 2019: 221.
- [26] Liu R Q, Chen T T, Yin X, et al. A *Plasmopara viticola* RXLR effector targets a chloroplast protein PsbP to inhibit ROS production in grapevine [J]. *Plant J*, 2021, 106(6): 1557–1570. DOI:10.1111/tpj.15252.
- [27] Bhairi S M, Staples R C, Freve P, et al. Characterization of an infection structure-specific gene from the rust fungus *Uromyces appendiculatus* [J]. *Gene*, 1989, 81(2): 237–243. DOI:10.1016/0378-1119(89)90184-4.
- [28] Zhang X X, Huang H Q, Wu B T, et al. The M35 metalloprotease effector *FoeM35_1* is required for full virulence of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* tropical race 4 [J]. *Pathogens*, 2021, 10(6): 670. DOI:10.3390/pathogens10060670.
- [29] Hossain M M, Pérez-López E, Todd C D, et al. Endomembrane-targeting *Plasmodiophora brassicae* effectors modulate PAMP triggered immune responses in plants [J]. *Front Microbiol*, 2021, 12: 651279. DOI:10.3389/fmicb.2021.651279.
- [30] Manser B, Koller T, Praz C R, et al. Identification of specificity-defining amino acids of the wheat immune receptor Pm2 and powdery mildew effector AvrPm2 [J]. *Plant J*, 2021, 106(4): 993–1007. DOI:10.1111/tpj.15214.
- [31] Feng F, Zhou J M. Plant-bacterial pathogen interactions mediated by type III effectors [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2012, 15(4): 469–476. DOI:10.1016/j.pbi.2012.03.004.
- [32] Yang Q, Huai B Y, Lu Y X, et al. A stripe rust effector Pst18363 targets and stabilises TaNUDX23 that promotes stripe rust disease [J]. *New Phytol*, 2020, 225(2): 880–895. DOI:10.1111/nph.16199.
- [33] 季森, 赵梦鑫, 徐静华, 等. 小麦条锈菌效应蛋白 HASP2 抑制寄主免疫反应 [J]. *植物病理学报*, 2019, 49(3): 326–333. DOI:10.13926/j.cnki.apps.000282.
- [34] Tzelepis G, Dörfors F, Holmquist L, et al. Plant mitochondria and chloroplasts are targeted by the *Rhizoctonia solani* RsCRP1 effector [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 544: 86–90. DOI:10.1016/j.bbrc.2021.01.019.
- [35] 宋平, 谭成龙, 郭嘉, 等. 小麦条锈菌效应蛋白基因 PSTG_23616 的时空表达特征分析 [J]. *西北农业学报*, 2016, 25(9): 1279–1288.
- [36] Caillaud M, Piquerez S J M, Fabro G, et al. Subcellular localization of the *Hpa* RxLR effector repertoire identifies a tonoplast-associated protein HaRxL17 that confers enhanced plant susceptibility [J]. *Plant J*, 2012, 69(2): 252–265. DOI:10.1111/j.1365-3113x.2011.04787.x.
- [37] 杨占武, 杨君, 张艳, 等. 棉花 GbRvd 的亚细胞定位及其超表达烟草抗病性分析 [J]. *中国农业科学*, 2016, 49(21): 4065–4073.
- [38] Duplessis S, Cuomo C A, Lin Y C, et al. Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(22): 9166–9171. DOI:10.1073/pnas.1019315108.

(责任编辑:郭学兰)