

小麦条锈菌毒性基因研究进展

卢晨, 卢涛, 尹军良, 马东方*

长江大学农学院, 湿地生态与农业利用教育部工程研究中心, 主要粮食作物产业化湖北省协同创新中心, 湖北 荆州

Email: *madongfang1984@163.com

收稿日期: 2020年8月16日; 录用日期: 2020年9月3日; 发布日期: 2020年9月10日

摘要

小麦条锈病是由条形柄锈菌(*Puccinia striiformis* f.sp. *tritici*)引起的小麦上的重要病害, 流行年份常常会造成小麦产量的减产, 严重的时候会造成绝收, 严重威胁我国的粮食生产。由于小麦条锈菌属于严格专性寄生菌, 在分子水平上对小麦条锈菌基因进行的研究相对较少。本文总结了现已研究发现的条锈菌的毒性基因, 为以后对小麦条锈菌的研究与防治打下理论基础。

关键词

小麦条锈菌, 毒性基因, 致病性, 变异

Research Progress on Virulence Genes of Wheat Stripe Rust

Chen Lu, Tao Lu, Junliang Yin, Dongfang Ma*

Hubei Collaborative Innovation Center for Grain Industry, Engineering Research Center of Wetland Ecology and Agricultural Use, Ministry of Education, College of Agriculture, Yangtze University, Jingzhou Hubei

Email: *madongfang1984@163.com

Received: Aug. 16th, 2020; accepted: Sep. 3rd, 2020; published: Sep. 10th, 2020

Abstract

Wheat stripe rust is a major disease on wheat caused by *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici*. Popular years often result in a reduction in wheat output, and in severe cases, it will cause no harvest, which will seriously threaten my country's grain production. Since the wheat stripe rust belongs

*通讯作者。

to strictly obligate parasites, there are relatively few studies on the wheat stripe rust gene at the molecular level. This article summarizes the virulence genes of *F. oxysporum* that we have now studied, laying a theoretical foundation for the future research and prevention and cure of *T. infestans*.

Keywords

Puccinia striiformis f.sp. *Tritici* (Pst), Toxic Genes, Pathogenicity, Variations

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

小麦作为世界重要粮食作物, 提供了 20% 人类所需的热量, 作为谷类作物中主要的组成部分, 是中国、印度、欧洲和非洲等地主要的食物来源, 发挥着不可或缺的作用[1]。因此, 保护粮食作物免受生物和非生物胁迫的破坏对于世界粮食的安全显得至关重要。

小麦条锈病是由条形柄锈菌(*Puccinia striiformis*)引起的一种世界性广泛流行病害, 对全球小麦造成严重危害[2]。小麦条锈菌主要通过无性阶段的夏孢子(Urediospore)循环侵染, 从而造成小麦生产上的危害[3]。小麦条锈菌主要发病是在小麦叶片上, 也可侵染叶鞘、茎秆及穗部[4]。同时也可以侵染其他禾本科植物如黑麦、大麦和燕麦等。小麦条锈病的流行范围广泛, 在美国的西北部, 中国西北和西南地区, 印度和尼泊尔的主要地区, 澳大利亚、新西兰、埃塞俄比亚、肯尼亚、阿拉伯半岛和西欧等主要的小麦生产国家和地区普遍发生[5] [6]。历史上发生过多次爆发, 给小麦生产史上带来了巨大的损失[6]。

我国是世界上小麦条锈菌危害面积最大且相对独立的地区[7] [8]。当前, 小麦条锈病是威胁中国西北、西南华北和淮北等冬麦区和西北春麦区的最重要的病害之一, 近年来新小种和其他致病类型的出现和发展使小麦条锈菌的流行可能性更高, 潜在威胁更大, 涉及范围更广, 严重威胁小麦高产和稳产[9]。条锈发生区一般可导致小麦损失产量大约在 20%~30%, 严重流行时可达 50% 以上, 有时甚至颗粒无收。曾于 1950、1964、1990 和 2002 年四次大流行, 分别造成 60 亿、30 亿、26 亿和 10 亿公斤的产量损失[3] [9] [10]。因此, 小麦条锈病是严重威胁我国小麦粮食生产的真菌病害。

2. 小麦条锈病的研究

2.1. 小麦条锈菌的生物学特性及生活史

小麦条锈菌属于柄锈菌属(*Puccinia*)归于担子菌亚门(*Basidiomycotina*)中。它属于严格的活体营养型病原菌(*Biotrophs*), 只能于活的寄主植物上通过特异的营养分化器官 - 吸器从活体寄主小麦等的组织中吸收养分, 并产生后代[6]。美国学者 Jin 等通过室内人工接种小麦条锈菌的试验首次发现并证实了小麦条锈菌的转主寄主是小檗[11]。同时, 赵杰等证实了在自然条件下小麦条锈菌可以在小檗上完成其有性世代[12]。这些研究表明小麦条锈菌属于典型的全型锈菌, 条锈菌的无性世代和有性世代分别在小麦和小檗上完成。其生活史中具有夏孢子(Urediospore)、冬孢子(Teliospore)、担孢子(Basidiospore)、性孢子(Pycniospore)和锈孢子(Aeciospore)五种孢子形态。

小麦条锈菌的菌体为菌丝体, 丝状, 有分隔, 在寄主细胞与细胞间蔓延。夏孢子鲜黄色、单胞、球形, 表面有刺; 夏孢子堆黄色, 排列形成行状寄生于小麦叶片的两面、叶鞘等部位。冬孢子褐色, 双胞,

棍棒形,在分隔处稍有缢缩;冬孢子堆灰黑色,排列形成条状在小麦叶片背面或叶鞘上并埋于表皮下[13]。担孢子由冬孢子萌发产生,担孢子着生于担子梗上,完全成熟时,靠水的弹射力着落[14]。性子器埋生于小檗叶片的表皮下,有孔口,成熟后产生大量性孢子和受精丝。锈子器生于性子器相对的叶背面,管状或杯状,成簇聚生;锈孢子桔黄色,球形,表面光滑,在锈子腔内串生。

温度是影响小麦条锈菌生长发育的重要因素之一,其菌丝生长和夏孢子形成的适宜温度为10℃~22℃,夏孢子萌发最低萌发温度为2℃~3℃,最高温度为15℃,最适温度为7℃~12℃ [13]。小麦条锈菌主要在转主寄主小檗上完成其有性阶段,包括性孢子和锈孢子,而夏孢子、冬孢子和担孢子的无性阶段主要在小麦上完成。小麦条锈菌初侵染来源于转主寄主小檗上产生的锈孢子或者是在禾谷类作物越冬越夏的夏孢子,并以夏孢子世代在小麦上完成侵染循环。夏孢子是经气体传播从初侵染来源传播到感病植物上,在麦类作物的一个生长季节中循环侵染,造成小麦条锈病的流行。麦类作物生长后期,小麦条锈菌会产生能够抵抗不良环境能力的冬孢子,冬孢子在杂草上越冬后萌发产生担孢子。担孢子经过气体传播到小檗上,侵染小檗后产生性孢子和锈孢子。至此,小麦条锈菌的全部生活史完成[15]。

2.2. 小麦条锈菌致病机理的研究

随着小麦条锈菌全基因组测序的完成[15] [16],人们利用异源互补和 HIGS 等技术深入的对小麦条锈菌基因功能及小麦条锈菌的致病分子机制进行了研究。

Guo 等利用异源互补技术,将小麦条锈菌 PsMAPK1 基因互补导入稻瘟菌和赤霉菌的同源基因突变体中,研究表明 PsMAPK1 基因功能具有保守性,能够对小麦条锈菌侵染寄主植物过程进行调节,并在条锈菌菌丝发育过程中起着重要的作用[17]。寄主诱导的病原基因沉默(Host-induced gene silencing, HIGS)技术经常在专性活体营养型病原菌的基因功能研究中被使用[18]。并且由大麦条纹花叶病毒(Barley stripe mosaic virus, BSMV)介导的 HIGS 体系已建立并运用于禾谷类白粉菌和锈菌的基因功能研究中[19] [20] [21]。目前,人们运用 BSMV 介导的 HIGS 技术已鉴定到几个与条锈菌致病相关的保守激酶[22]。VIGS 技术是由大麦条纹花叶病毒(BSMV, Barley stripe mosaic virus)作为载体介导的基因沉默, VIGS 技术开辟了专性寄生菌基因功能研究的新道路[21] [23]。近期,在专性寄生菌白粉及锈菌的功能研究中已成功建立并广泛的应用了 VIGS 体系。Cheng 利用 VIGS 技术鉴定了一个新的蛋白激酶 PsSRPKL,并验证了其对小麦条锈菌的毒力有着重要的作用,并作为重要的致病性因子影响真菌的生长和响应环境胁迫[23]。随后, Liu 等通过 VIGS 系统降低 PsSOD1 的表达降低了小麦条锈病的毒力,明确了其通过清除宿主派生的 ROS 有利于小麦条锈菌侵染的致病机理[24]。然而,虽然当前借助于各种技术对小麦条锈菌进行了探索,但是对于小麦条锈菌毒性基因的研究还有待进一步深入。

3. 小麦条锈菌毒性基因的研究进展

3.1. 植物病原菌效应基因的研究进展

效应蛋白通过抑制植物的防卫反应来增强病原菌的致病性,是病原菌关键的毒性因子。因此,鉴定病原菌得效应基因可深入的研究植物抗病机制以及病原菌如何适应寄主植物。目前,锈菌中只鉴定出了少数锈菌效应基因,主要来自蚕豆、锈菌和亚麻锈菌[25] [26] [27] [28]。成玉林等[29]以抑 PCD 为标准对小麦条锈菌效应基因进行了大规模的的筛选、鉴定和功能分析。在其研究中,沉默 PsKE1 或 PsKE2 能够引起条锈菌在小麦上毒性的明显降低。目前鉴定的大多数病菌效应基因沉默或缺失后不会显著影响其病菌的毒性[30],所以可以认为这两个效应基因是小麦条锈菌的关键效应基因。根据他的研究得出小麦条锈菌效应蛋白 PsKE1 和 PsKE2 的毒性机制。当条锈菌侵染寄主后,利用吸器将这两个效应蛋白分泌并转入到寄主细胞内。进入寄主细胞内后, PsKE1 和 PsKE2 首先在细胞质与 TaTrx-m4 互作,抑制植物细胞的

坏死。之后, PsKE1 和 PsKE2 进入细胞核中并与 PKDM7-1 互作, 调节防卫相关基因表达。与此同时, PsKE1 同时在细胞质和细胞核中与 TaDHN-1 互作, 进行调控 JA 通路。

3.2. 小麦条锈菌 Ras 基因的研究进展

Ras 信号通路在很多生命活动中起着重要的调控作用, 并且小麦条锈菌基因组中含有两个编码 Ras 蛋白的基因 PsRas1 和 PsRas2。成玉林等探究了小麦条锈菌 Ras 基因在病原菌致病性、菌丝发育以及 PCD 中的作用。在一些丝状真菌中这两个 Ras 基因在进化上是属于两个不同的遗传分支, 小麦条锈菌也与之相同[31] [32] [33]。在一些丝状真菌中, ras1 缺失突变体是致死的所以 Ras1 可能是一个必需的基因[31] [33] [34]。Ras2 的缺失突变体能够引起菌丝发育减缓和致病性的降低[31] [32] [35] [36] [37]。但是其实验结果表明小麦条锈菌与其他丝状真菌不太相同, PsRas1 在致病性中仅有较小的作用, 但 PsRas2 在条锈菌的致病性中却起着性对重要作用[29]。另外, MAPKs 被证实参与真菌的 PCD [38]。其研究表明 PsRas1 瞬时表达能够诱导植物 PCD, Ras-MAPK 信号通路很可能参与小麦条锈菌的 PCD。

3.3. 小麦条锈菌 SR 蛋白激酶基因的研究进展

经过长时间的进化, 病原真菌形成了复杂的信号传导机制用来识别和对抗植物的防卫反应[39]。SR 蛋白已被证实与病原真菌的生命活动及致病性有关[40]。SRPKs 是 SR 蛋白的一个重要调节因子, 目前已经证实大部分 SRPKs 是定位于细胞质的, 作用是通过磷酸化来调节 SR 蛋白的核输入[41]。少部分却定位于细胞核来调节 SR 蛋白的核定位[42]。

成玉林等鉴定了一个小麦条锈菌新的激酶基因并命名为 PsSRPKL [29]。该基因在条锈菌侵染小麦后 18 h 高量表达, 而小麦条锈菌的吸器形成的阶段大约在接种后 24 h [43]。试验显示了 PsSRPKL 是定位于细胞核的一种 SRPK。结果表明了 PsSRPKL 很可能是通过调节其靶标 SR 蛋白的核定位来参与调控和影响条锈菌的致病性, 并在不同的环境刺激中进行调控作用[29]。

3.4. 小麦条锈菌 III 型磷脂酰肌醇 4-羟基激酶基因(PsPik1)的功能分析

何付新等将小麦条锈菌中的 PsPik1 基克进行了克隆, 并分析其序列表明属于 III 型磷脂酰肌醇 4-羟基激酶 β 蛋白[44]。对 PsPik1 的表达模式进行荧光定量 PCR 分析。在接种后 6 h, PsPik1 上调表达, 夏孢子萌发并形成芽管在这一时间段。已证实在条锈菌萌发形成芽管的过程中芽管前端钙离子浓度是增加的[45], 并且 PsNCS1 基因此时的表达水平也是较高的[46]。在酵母中, 细胞质内钙离子浓度升高时, 钙离子传感蛋白 Frq1 就会与钙离子相结合, 蛋白构象发生变化即 Pik1 蛋白产生 U 型弯曲, 这种构象变化有利于激活相对应得激酶活性[47]。与此同时 Pik1 与 N 端豆蔻酰化的 Frq1 结合使二聚体 Pik1-Frq 定位到 TGN [47]。因此推测在条锈菌夏孢子萌发形成芽管时, 钙离子浓度升高, 促进了 PsNCS1 的结合并产生构象变化, 使结合了钙离子的 PsNCS1 和 PsPik1 结合并定位于 TGN, 进而调节高尔基体的脂质转运、蛋白分泌等过程[44]。

在接种条锈菌后 12、18、24 h 后, PsPik1 基因上调表达。已经证实在条锈菌侵染 12 h 时, 其侵入气孔形成气孔下囊形成菌丝; 侵染 18 h 时, 菌丝蔓延于寄主叶肉细胞间, 接触到叶肉细胞后形成吸器母细胞; 侵染 24 h 时, 吸器母细胞侵入叶肉细胞形成吸器, 吸器可以从寄主细胞吸收营养物质, 自此以后条锈菌就可以利用寄主营养进行寄生生活[4]。在酵母中, 定位于细胞核的 Pik1 基因在转录、mRNA 的加工与输出中起到重要的作用[48]。而定位于 TGN 的 Pik1 基因会参与脂质转运、囊泡运输与蛋白转运等过程[48]。根据酵母已研究出的结论, 以及试验结果可推测出, PsPik1 基因在条锈菌侵染早期对脂质、糖类与蛋白质的产生发挥了关键的作用[44]。在接种条锈菌 7 天至 11 天, PsPik1 的表达水平先上升后又恢复。在这一时间段, 随着菌丝扩展延伸, 条锈菌形成产孢基底菌丝进而使孢子堆产生[4]。Pik1 是在酵母中使

酵母生存必需的激酶[49], 在营养缺乏的时, *Pik1* 与蛋白 *Bmh1p* 和蛋白 *Bmh2p* 结合, 反应结果抑制了有 *Pik1* 参与的脂质运输、蛋白分泌等过程, 当营养恢复时, *Pik1* 也会恢复到原来的状态, 这个过程在营养缺乏时对维持酵母的正常生长起到重要的作用[49]。条锈菌发育全部过程当中, 其夏孢子的生长代谢一直处在比较低的水平。因此认为 *PsPik1* 参与了条锈菌的产孢过程并在维持夏孢子活力方面有着一定作用[44]。何付新等瞬时沉默 *PsPik1* 后, 条锈菌的潜育期显著延长, 产孢量明显下降, 生长发育过程受到严重抑制, 证明了 *PiPik1* 基因很有可能是条锈菌的一个重要的致病基因[44]。

3.5. 小麦条锈菌 *PsCdc2* 基因的转录表达分析

代西维等首次从小麦条锈菌中克隆得到了 *PsCdc2* 基因, 并对其进行了序列分析[50]。多序列比对显示, 这类基因的蛋白质序列十分保守, 其含有 *CDK* 蛋白的多个保守序列[51]。包含激酶结构域中的一段保守序列“*PSTAIRE*”其在真菌中也十分保守[52]。它的氨基酸一级结构检测显示该蛋白分子量与 *Cdc2* 类蛋白相一致[53] [54]。并且进行了进化树分析显示 *PsCdc2* 与小麦秆锈菌 *Cdc2* 蛋白同源性最近。现阶段已经证实磷酸酶和激酶可能是真菌繁殖生长, 信号传导侵入的相关形态的主要调控元件[55]。*Cdc2* 可以磷酸化特定的蛋白, 推进细胞周期的运行, 调控细胞周期[53]。

代西维等对该基因进行了亲和非亲和的互作表达, 从表达的趋势上推断这个基因可以调控条锈菌细胞的周期循环以及影响条锈菌的初生菌丝产生与生长和吸器母细胞的形成, 断定 *PsCdc2* 基因是一个致病相关的基因[50]。

3.6. 小麦条锈菌 *PsNCS1* 基因的克隆及转录表达特征

郭军等首次从小麦条锈菌中克隆得到了 *PsNCS1* 基因[46]。然后对其进行了序列分析, 得到此基因编码的蛋白质序列, 该蛋白质序列十分保守并且含有 *EF-hand* 结构域和 *N* 末端豆蔻酰化, 根据目前已研究出的结果, 该蛋白质序列与已知真菌中的 *NCS-1* 蛋白相一致[56]。运用荧光定量 *RT-PCR* 证实该基因参与了条锈菌夏孢子形成与芽管延伸的阶段。张洪等已研究证明条锈菌侵染前期, 夏孢子与芽管前端的 Ca^{2+} 含量明显上升[45]。这进一步说明了条锈菌夏孢子和芽管中 Ca^{2+} 浓度的升高促进了与 *PsNCS1* 的结合, 进而诱导 *PsNCS1* 基因高量表达。

3.7. 小麦条锈菌钙调素依赖蛋白激酶基因 *PsCamk* 的功能

秦娟等首次从小麦条锈菌中克隆得到了编码蛋白为 *CaMK* 类家族的 *CaMK* 基因[57]。先现已有研究证明 *CaMK* 调控细胞功能是通过作为钙信号途径下游关键的蛋白, 影响经过途径中关键酶与转录因子的表达。相比较 *CaMK* 在动植物中的研究, 在病原真菌中研究的较少, 在哺乳动物中起到重要的作用[58]。现已发现两个编码 *CaMK* 的基因(*cmk1*、*cmk2*)于酿酒酵母中[59], 并对酵母的生长有着关键的作用[60] [61]。另外在栗酒裂殖酵母[62]和构巢曲霉[63] [64]盘长孢状刺盘孢菌(*Colletotrichum gloeosporioides*) [65]中都发现获得了 *CaMK* 基因。

秦娟等通过对 *PsCaMK* 基因进行表达谱分析得出 *PsCamk* 在小麦条锈菌初期孢子萌发和芽管形成的过程中起作用[57], 当用 *KN-93* 处理后, 小麦条锈菌夏孢子萌发明显被抑制, 原因可能为 *KN-93* 抑制了 *CaMK* 和 *CaM* 的结合致使 Ca^{2+} 信号通路的中断[66]。

3.8. 小麦条锈菌果胶酶基因 *PsPL1* 的功能分析

病菌侵染寄主的关键步骤是要穿透宿主细胞壁, 研究表明在病原菌侵染寄主植物时, 会分泌降解植物细胞壁的降解酶类, 主要为果胶酶, 目前为止, 多聚半乳糖醛酸酶和果胶裂解酶研究的较为广泛[67]。大量试验表明, 病原菌可通过果胶水解酶和裂解酶分解寄主植物的细胞壁[68]。已有研究证实, 蔓枯病菌

(*Didymella bryoniae*)以及灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)等在侵染植物时会产生果胶酶分解寄主的组织,使寄主植物腐烂[69] [70]。在 Wattad 等[71]对炭疽菌(*Colletotrichum magna*)和 Ke 等[72]对苹果腐烂菌和的研究中,也证明果胶酶在病菌侵染植物时有着关键性的作用。

李曼等通过 RACE 技术获得了条锈菌果胶酶 PsPL1 基因[73],其编码的蛋白序列与秆锈菌和叶锈菌的果胶酶蛋白高度同源。根据果胶酶在病原菌侵染植物中起到的关键性作用,认为 PsPL1 基因可能是小麦赤霉病的毒性基因之一。

3.9. 小麦条锈菌效应蛋白基因 PSTG_23616 的表达特征分析

宋平等获得了锈菌特异的效应蛋白 PSTG_23616,该基因没有在在锈菌以外的真菌中发现同源基因[74]。RXLR 类效应蛋白和 CRN 类效应蛋白在卵菌效应蛋白中有着关键性的作用[75],宋平等发现 PSTG_23616 基因是定位在胞内的并且可以对 BAX 诱导的坏死反应产生抑制效果,认为 PSTG_23616 是一种胞内效应蛋白。

在接种条锈菌后 6~18 h, PSTG_23616 基因出现上调表达, Bhairi 等从菜豆锈菌中得到了 UaINF24 基因,因为该基因在菜豆锈菌附着胞开始分化的时期内表达,则认定 UaINF24 基因参与病菌的附着胞形成[76] [77]。据此推断 PSTG_23616 基因在条锈菌前期侵染过程起到作用,而效应蛋白的分泌主要场所是吸器[25],推测出 PSTG_23616 基因是在吸器形成阶段分泌发挥作用,并能抑制 BAX 诱导的与 HR 反应类似的 PCD 反应[78]。综上推断出 PSTG_23616 在小麦条锈菌侵染初期起到关键的毒性作用, PSTG_23616 基因为条锈菌的毒性基因之一。

3.10. 小麦条锈菌一个产孢相关基因 PsCon1 的表达特征分析

陈玥颖等首次克隆的得到了与产孢相关的基因 PsCon1 [79],该基因编码的蛋白具有两个保守结构域[80]。con 基因作为一类产孢相关基因,该基因编码的蛋白结构与前人研究得到的结果相一致[80],可推断出 PsCon1 蛋白是小麦条锈菌的一个功能蛋白。

通过实时荧光定量 PCR 显示, PsCon1 基因在接种条锈菌后 6 h 和 24 h 时的表达量相对较高。根据 Wang 等[81]与康振生等[82] [83]关于条锈菌侵染过程的研究,推测出 PsCon1 基因调控影响条锈菌前期吸器和芽管的生成生长,以及对条锈菌生长后期夏孢子的产生起到关键性的作用。综上 PsCon1 基因是与小麦条锈病致病相关的毒性基因。

3.11. 小麦条锈病菌 MAPK 基因的功能以及致病机理研究

在真核生物中 MAPK 级联途径的存在十分广泛且保守性高,朱晓果等首次根据玉米瘤黑粉已研究的成果,在小麦中搜索得到了 7 个 MPAK 级联途径激酶基因,包括 PsUBC2、PsKPP4、PsFUZ7、PsKPP2、PsKPP6 和 PsCRK1、PsPRF1 [84]。

对玉米瘤黑粉的研究中, Kpp2 和 Kpp6 在功能上存在一定的重叠[85] [86] [87],并且已有研究表明 MAPK 信号途径在真菌中的功能也有部分重叠[88] [89] [90]。试验发现除 PsKPP2 外,其余 6 个 MAPK 信号通路相关基因在前期互作过程中的表达量均有所上升,这些结果说明了这 6 个 MAPK 相关基因可能在条锈菌侵染前期的定殖和菌丝蔓延过程中发挥着关键的作用。据此推断出在小麦条锈菌中, PsKPP6 与 PsKPP2 也可能存在着功能冗余,且 PsKPP2 可能在某种条件下诱导表达。

3.11.1. 小麦条锈菌 MAPK 基因 PsAMPK1 的功能分析

大量研究显示,促分裂素原活化蛋白激酶(MPAK)在植物病原菌的侵染过程中具有着关键的作用。郭军等克隆获得了一个小麦条锈菌的 MAPK 基因,命名为 PsAMPK1 [91]。试验证明, PsAMPK1 不仅能部

分恢复小麦赤霉病菌 *map1* 突变体的营养生长和致病性, 同时也能部分恢复稻瘟 *pmk1* 突变体的附着胞形成和病菌侵染。实时定量分析表明 *PsAMPK1* 在病菌侵染初期呈上调表达, 并在吸器形成阶段基因表达量达到最高。所有研究结果表明, 小麦赤霉病菌和稻瘟菌可作为研究小麦条锈菌保守基因的替代体系, 同时 *PsAMPK1* 可能在调节条锈菌的侵染和生长过程中具有重要的作用[91]。

3.11.2. 小麦条锈菌关键激酶基因 *PsKPP4* 及 *PsKPP6* 功能分析

朱晓果等[84]通过生物信息学分析及多序列比对, 发现 *PsKPP4* 含有典型的磷酸化位点, 与其他真菌中的同源物相似度较高。*PsKPP4* 与酵母 *MST11* 和玉米瘤黑粉 *Kpp4* 相似, 含有一个 SAM (sterile alpha motif) 结构域。在玉米瘤黑粉中, *KPP4* 与 *UBC2* 在酵母双杂中的互作中需要通过各自的 SAM 结构域来完成[92]; 在稻瘟菌中, SAM 结构域对于 *MST11* 在附着胞形成和植物感染中的调节功能至关重要[93]因此, SAM 结构域作为蛋白互作的关键位点, 可能在小麦条锈菌 *PsKPP4* 基因调控生长发育过程中也发挥着重要的作用。

MAPK 信号通路中各类激酶的定位情况决定着它们功能能否正常的发挥, 这也是其发挥调节功能的决定条件。前期的研究发现, 在未刺激的细胞中, MAPK 一般存在于细胞质中, 并与不同的蛋白相互锚定[94]。而 MAPK 受到信号刺激后可以转移进入核内, 这个转移的过程需要 MAPK 的磷酸化。结果显示 *PsKPP4* 定位于细胞质中, 可能经过一系列信号传导, 最终磷酸化下游 MAPK, 调控不同生理生化过程。

酵母双杂交实验验证了 *PsKPP4* 可以与上游的 *PsUBC2* 进行互作, 两者可能在调控条锈生长发育过程中共同发挥作用。因此综上所述, MAPK 级联通路中 MAPKKK 蛋白激酶 *PsKPP4* 和 MAPKK 蛋白激酶 *PsUBC2* 在小麦条锈菌的生长发育过程中可能发挥着重要的作用, 为以后病害防治提供了潜在的靶标。

3.11.3. 小麦条锈菌基因 *PsPRF1* 功能分析

朱晓果等[84]通过筛选在小麦条锈中发现了具有 HMG-box 的蛋白 *PsPRF1* 在植物和酵母中过表达可引起植物细胞坏死并且具有降解 DNA 的功能。可能 *PsPRF1* 在小麦条锈菌与植物互作过程中发挥着特异的功能。

ETs 也在植物种有所报道, ETs 可以在植物防御根尖感染的真菌过程中发挥重要作用[95] [96]。不同细胞释放 ETs 的共同特点是可以捕获和杀死大多数微生物, 它们是具有抗菌分子修饰的 DNA 骨架[97] [98]。考虑到 *PsPRF1* 能够诱导植物细胞的坏死且能降解核酸。我们推测: 一方面, *PsPRF1* 可能参与到自身的细胞凋亡过程中去, 另外一方面可能通过降解植物外源 DNA 物质的侵入, 从而限制了植物对病原菌的抑制作用。但具体的机制还需要进一步的探索。

在小麦条锈菌侵染小麦过程中, *PsPRF1* 在夏孢子萌发初期具有较高的转录水平我们推测 *PsPRF1* 可能在前期小麦条锈菌的侵染、定殖过程中发挥着重要的作用。根据原生质体定位实验结果显示, *PsPRF1* 定位于细胞核中, 可能其能够在细胞核里发挥功能。*PsPRF1* 确实参与到小麦条锈菌的致病过程中。沉默 *PsPRF1* 后, 可以降低小麦的产孢, 尤其是前期菌丝的侵染蔓延受到抑制。

因此, *PsPRF1* 可能在小麦条锈菌侵染定殖的过程中发挥着重要的作用, 推测可能通过降解抑制小麦的一些 DNA 分子, 来保证自身的侵染定殖成功。

3.11.4. 小麦条锈菌重要激酶基因 *PsFUZ7* 的功能分析

在玉米瘤黑粉中, *FUZ7* 是细胞信号传递过程中关键的组分, 并且参与到细胞内的一系列生理生化反应, 包括菌丝交配和致病力。在稻瘟菌中, 与 *FUZ7* 同源的 *Mst7* 参与到附着胞的形成及毒性作用中来。在本研究中, 生物信息学分析及多序列比对结果显示, 条锈菌 *PsFUZ7* 含有典型的磷酸化位点, 且蛋白结构与其他真菌存在较高的相似性。由此, 我们确定条锈菌 MAPKK 相关基因在真菌进化上存在一定程度的保守性。前期实验, 我们发现 *PsFUZ7* 基因在条锈菌与小麦互作的过程中前期表达水平比较高, 从

芽管萌发(6 h)的时期持续上调表达达到条锈菌成功定殖(18~24 h)及扩展(大约 72 h), 推测它可能在小麦条锈菌整个侵染过程中发挥着重要的作用。

前期通过 VIGS 初步筛选功能基因过后, 我们初步确定 PsFUZ7 可能在小麦条锈菌侵染过程中发挥着重要的作用。为了进一步明确其如何发挥作用的, 我们对沉默 PsFUZ7 后的小麦条锈菌进行了细胞组织学观察。根据上述体内和体外实验来看, MAPKK 基因在小麦条锈菌的分化和发育过程中发挥着重要的作用。其中, PsFUZ7 的沉默可能导致小麦条锈菌信号传导受到很大程度的影响, 从而影响了小麦条锈菌的生长发育。

综上, 本章研究中我们克隆并鉴定了一个条锈菌 MAPKK 基因 PsFUZ7, 并证明抑制它的表达可以影响真菌的生长发育。说明它在条锈菌的生长发育和致病过程中发挥着重要作用, 为后期构建小麦持续稳定抗锈病材料提供了候选基因资源。

4. 问题与展望

目前这些毒性基因的作用机制不是非常完善, 一些基因的作用调控通路不是十分明确, 鉴定更多禾谷类锈菌特有的或条锈菌特有的毒性基因, 并明确它们在锈菌致病性中的作用及具体调控通路显得尤为重要。可以通过运用玉米瘤黑粉、稻瘟病、小麦叶锈病已研究完成的毒性基因, 查找条锈相似基因, 进一步进行研究。

麦条锈病综合防控是一项复杂的系统工程, 面临众多待解决的科学问题, 必须依靠全国锈病工作者长期不懈地协同攻关, 结合传统方法与现代技术, 不断优化和完善小麦条锈病综合治理技术体系, 才能实现小麦条锈病的可持续控制。

基金项目

湖北省教育厅科学研究计划重点项目(D20191305)。

参考文献

- [1] Braun, H.J., Atlin, G., Payne, T. and Reynolds, M.P. (2010) Multi-Location Testing as a Tool to Identify Plant Response to Global Climate Change. *European Journal of Neuroscience*, **23**, 1129-1141.
- [2] Chen, C. and Dickman, M.B. (2005) Proline Suppresses Apoptosis in the Fungal Pathogen *Colletotrichum trifolii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 3459-3464. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407960102>
- [3] 李振岐, 曾世迈. 中国小麦条锈病[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.
- [4] Chen, W.Q., Wellings, C., Chen, X.M., Kang, Z.S. and Liu, T.G. (2014) Wheat Stripe (Yellow) Rust Caused by *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Molecular Plant Pathology*, **15**, 433-446. <https://doi.org/10.1111/mpp.12116>
- [5] Wellings, C.R. (2011) Global Status of Stripe Rust: A Review of Historical and Current Threats. *Euphytica*, **179**, 129-141. <https://doi.org/10.1007/s10681-011-0360-y>
- [6] Zhao, J., Wang, M.N., Chen, X.M. and Kang, Z.S. (2016) Role of Alternate Hosts in Epidemiology and Pathogen Variation of Cereal Rusts. *Annual Review of Phytopathology*, **54**, 207-228. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-095851>
- [7] Wan, A.M., Chen, X.M. and He, Z.H. (2007) Wheat Stripe Rust in China. *Australian Journal of Agricultural Research*, **58**, 605-619. <https://doi.org/10.1071/AR06142>
- [8] Xia, X.C., Li, Z.F., Li, G.Q., He, Z.H. and Singh, R.P. (2007) Stripe Rust Resistance in Chinese Bread Wheat Cultivars and Lines. In: Buck, H.T., Nisi, J.E. and Salomón, N., Eds., *Wheat Production in Stressed Environments, Developments in Plant Breeding*, Springer, Dordrecht, 77-82. https://doi.org/10.1007/1-4020-5497-1_9
- [9] Wan, A.M., Zhao, Z.H., Chen, X.M., He, Z.H., Jin, S.L., Jia, Q.Z., Yao, G., Yang, J.X., Wang, B.T. and Li, G.B. (2007) Wheat Stripe Rust Epidemic and Virulence of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in China in 2002. *Plant Disease*, **88**, 896-904. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.8.896>
- [10] 万安民. 小麦条锈病的发生状况和研究现状[J]. 世界农业, 2000(5): 39-40.

- [11] Jin, Y., Szabo, L.J. and Carson, M. (2010) Century-Old Mystery of *Puccinia striiformis* Life History Solved with the Identification of *Berberis* as an Alternate Host. *Phytopathology*, **100**, 432-435. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-100-5-0432>
- [12] 赵杰, 张宏昌, 姚娟妮, 黄丽丽, 康振生. 中国小麦条锈菌转主寄主小檗的鉴定[J]. 菌物学报, 2011, 30(6): 895-900.
- [13] 李振岐, 商鸿生. 小麦锈病及其防治[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1989: 1-229.
- [14] 姚娟妮, 张宏昌, 赵杰, 韩青梅, 成玉林, 黄丽丽, 康振生. 小麦条锈菌冬孢子发生的组织学和超微结构研究[J]. 菌物学报, 2012, 31(4): 560-566.
- [15] Zheng, W.M., Huang, L.L., Huang, J.Q., Wang, X.J., Chen, X.M., Zhao, J., Guo, J., Zhuang, H., Qiu, C.Z., Liu, J., et al. (2013) High Genome Heterozygosity and Endemic Genetic Recombination in the Wheat Stripe Rust Fungus. *Nature Communications*, **4**, Article No. 2673. <https://doi.org/10.1038/ncomms3673>
- [16] Saunders, D.G.O., Win, J., Cano, L.M., Szabo, L.J., Kamoun, S. and Raffaele, S. (2012) Using Hierarchical Clustering of Secreted Protein Families to Classify and Rank Candidate Effectors of Rust Fungi. *PLoS ONE*, **7**, e29847.
- [17] Guo, J., Dai, X., Xu, J.R., Wang, Y., Bai, P., Liu, F., Duan, Y., Zhang, H., Huang, L. and Kang, Z. (2011) Molecular Characterization of a Fus3/Kss1 Type MAPK from *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, PsMAPK1. *PLoS ONE*, **6**, e21895.
- [18] 张河山, 胡亚亚, 张娜, 杨文香, 刘大群. 寄主诱导的基因沉默(HIGS)技术研究进展[J]. 农业生物技术学报, 2013, 21(5): 604-611.
- [19] Nowara, D., Gay, A., Lacomme, C., Shaw, J., Ridout, C., Douchkov, D., Hensel, G., Kumlehn, J. and Schweizer, P. (2010) HIGS: Host-Induced Gene Silencing in the Obligate Biotrophic Fungal Pathogen *Blumeria graminis*. *Plant Cell*, **22**, 3130-3141. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.077040>
- [20] Panwar, V., McCallum, B. and Bakkeren, G. (2013) Host-Induced Gene Silencing of Wheat Leaf Rust Fungus *Puccinia triticina* Pathogenicity Genes Mediated by the *Barley stripe mosaic virus*. *Plant Molecular Biology*, **81**, 595-608. <https://doi.org/10.1007/s11103-013-0022-7>
- [21] Yin, C.T., Jurgenson, J.E. and Hulbert, S.H. (2011) Development of a Host-Induced RNAi System in the Wheat Stripe Rust Fungus *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **24**, 554-561. <https://doi.org/10.1094/MPMI-10-10-0229>
- [22] Zhang, H., Guo, J., Voegelé, R.T., Zhang, J.S., Duan, Y.H., Luo, H.Y. and Kang, Z.S. (2012) Functional Characterization of Calcineurin Homologs *PsCNA1/PsCNB1* in *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* Using a Host-Induced RNAi System. *PLoS ONE*, **7**, e49262. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049262>
- [23] Cheng, W., Song, X.S., Li, H.P., Cao, L.H., Sun, K., Qiu, X.L., Xu, Y.B., Yang, P., Huang, T. and Zhang, J.B. (2015) Host-Induced Gene Silencing of an Essential Chitin Synthase Gene Confers Durable Resistance to Fusarium Head Blight and Seedling Blight in Wheat. *Plant Biotechnology Journal*, **13**, 1335-1345. <https://doi.org/10.1111/pbi.12352>
- [24] Liu, J., Guan, T., Zheng, P.J., Chen, L.Y., Yang, Y., Huai, B.Y., Li, D., Chang, Q., Huang, L.L. and Kang, Z.S. (2016) An Extracellular Zn-Only Superoxide Dismutase from *Puccinia striiformis* Confers Enhanced Resistance to Host-Derived Oxidative Stress. *Environmental Microbiology*, **18**, 4118-4135. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13451>
- [25] Catanzariti, A.M., Dodds, P.N., Lawrence, G.J., Ayliffe, M.A. and Ellis, J.G. (2006) Haustorially Expressed Secreted Proteins from Flax Rust Are Highly Enriched for Avirulence Elicitors. *Plant Cell*, **18**, 243-256. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.035980>
- [26] Dodds, P.N., Lawrence, G.J., Catanzariti, A.M., Ayliffe, M.A. and Ellis, J.G. (2004) The *Melampsora lini AvrL567* Avirulence Genes Are Expressed in Haustoria and Their Products Are Recognized Inside Plant Cells. *Plant Cell*, **16**, 755-768. <https://doi.org/10.1105/tpc.020040>
- [27] Duplessis, S., Joly, D.L. and Dodds, P.N. (2011) Rust Effectors. In: Martin, F. and Kamoun, S., Eds., *Effectors in Plant-Microbe Interactions*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 155-193. <https://doi.org/10.1002/9781119949138.ch7>
- [28] Kemen, E., Kemen, A., Ehlers, A., Voegelé, R. and Mendgen, K. (2013) A Novel Structural Effector from Rust Fungi Is Capable of Fibril Formation. *The Plant Journal*, **75**, 767-780. <https://doi.org/10.1111/tpj.12237>
- [29] 成玉林. 小麦条锈菌致病相关基因鉴定及其功能研究[D]: [博士学位论文]. 陕西: 西北农林科技大学, 2015.
- [30] Giraldo, M.C. and Valent, B. (2013) Filamentous Plant Pathogen Effectors in Action. *Nature Reviews Microbiology*, **11**, 800-814. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3119>
- [31] Bluhm, B.H., Zhao, X., Flaherty, J.E., Xu, J.R. and Dunkle, L.D. (2007) *RAS2* Regulates Growth and Pathogenesis in *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **20**, 627-636. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-6-0627>
- [32] Fortwendel, J.R., Panepinto, J.C., Seitz, A.E., Askew, D.S. and Rhodes, J.C. (2004) *Aspergillus fumigatus RasA* and

- RasB* Regulate the Timing and Morphology of Asexual Development. *Fungal Genetics and Biology*, **41**, 129-139. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2003.10.004>
- [33] Xie, X.Q., Guan, Y., Ying, S.H. and Feng, M.G. (2013) Differentiated Functions of Ras1 and Ras2 Proteins in Regulating the Germination, Growth, Conidiation, Multi-Stress Tolerance and Virulence of *Beauveria bassiana*. *Environmental Microbiology*, **15**, 447-462. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02871.x>
- [34] Boyce, K.J., Hynes, M.J. and Andrianopoulos, A. (2005) The Ras and Rho GTPases Genetically Interact to Co-Ordinately Regulate Cell Polarity during Development in *Penicillium marneffei*. *Molecular Microbiology*, **55**, 1487-1501. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04485.x>
- [35] Fortwendel, J.R., Zhao, W., Bhabhra, R., Park, S., Perlin, D.S., Askew, D.S. and Rhodes, J.C. (2005) A Fungus-Specific Ras Homolog Contributes to the Hyphal Growth and Virulence of *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic Cell*, **4**, 1982-1989. <https://doi.org/10.1128/EC.4.12.1982-1989.2005>
- [36] Muller, P., Katzenberger, J.D., Loubradou, G. and Kahmann, R. (2003) Guanyl Nucleotide Exchange Factor Ssq12 and Ras2 Regulate Filamentous Growth in *Ustilago maydis*. *Eukaryotic Cell*, **2**, 609-617. <https://doi.org/10.1128/EC.2.3.609-617.2003>
- [37] Zhang, S.R., Hao, Z.M., Wang, L.H., Shen, S., Cao, Z.Y., Xin, Y.Y., Hou, M.L., Gu, S.Q., Han, J.M. and Dong, J.G. (2012) *StRas2* Regulates Morphogenesis, Conidiation and Appressorium Development in *Setosphaeria turcica*. *Microbiological Research*, **167**, 478-486. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.02.009>
- [38] Sharon, A., Finkelstein, A., Shlezinger, N. and Hatam, I. (2009) Fungal Apoptosis: Function, Genes and Gene Function. *FEMS Microbiology Reviews*, **33**, 833-854. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00180.x>
- [39] Bahn, Y.-S., Xue, C., Idnurm, A., Rutherford, J.C., Heitman, J. and Cardenas, M.E. (2007) Sensing the Environment: Lessons from Fungi. *Nature Reviews Microbiology*, **5**, 57-69. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1578>
- [40] Grützmänn, K., Szafranski, K., Pohl, M., Voigt, K., Petzold, A. and Schuster, S. (2013) Fungal Alternative Splicing Is Associated with Multicellular Complexity and Virulence: A Genome-Wide Multi-Species Study. *DNA Research*, **21**, 27-39. <https://doi.org/10.1093/dnares/dst038>
- [41] Koizumi, J., Okamoto, Y., Onogi, H., Mayeda, A., Krainer, A.R. and Hagiwara, M. (1999) The Subcellular Localization of SF2/ASF Is Regulated by Direct Interaction with SR Protein Kinases (SRPKs). *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 11125-11131. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.16.11125>
- [42] Tang, Z., Tsurumi, A., Alaei, S., Wilson, C., Chiu, C., Oya, J. and Ngo, B. (2007) Dsk1p Kinase Phosphorylates SR Proteins and Regulates Their Cellular Localization in Fission Yeast. *Biochemical Journal*, **405**, 21-30. <https://doi.org/10.1042/BJ20061523>
- [43] Hovmøller, M.S., Sørensen, C.K., Walter, S. and Justesen, A.F. (2011) Diversity of *Puccinia striiformis* on Cereals and Grasses. *Annual Review of Phytopathology*, **49**, 197-217. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095230>
- [44] 何付新, 等. 小麦条锈菌 III 型磷脂酰肌醇 4-羟基激酶基因(PsPik1)的功能分析[J]. 中国农业科学, 2015, 48(16): 3156-3165.
- [45] 张洪, 丁可, 裴国亮, 郭军, 康振生. 小麦条锈菌胞质游离钙离子动态检测方法的建立[J]. 菌物学报, 2010, 29(1): 64-67.
- [46] 郭军, 张洪, 丁可, 代西维, 陈玥颖, 段迎辉, 黄丽丽, 康振生. 小麦条锈菌 PsNCS1 基因的克隆及转录表达特征[J]. 微生物学报, 2010, 50(7): 962-968.
- [47] Lim, S., Strahl, T., Thorner, J. and Ames, J.B. (2011) Structure of a Ca²⁺-Myristoyl Switch Protein That Controls Activation of a Phosphatidylinositol 4-Kinase in Fission Yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, **286**, 12565-12577. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.208868>
- [48] Strahl, T., Hama, H., Dewald, D.B. and Thorner, J. (2005) Yeast Phosphatidylinositol 4-Kinase, PIK1, Has Essential Roles at the Golgi and in the Nucleus. *The Journal of Cell Biology*, **171**, 967-979. <https://doi.org/10.1083/jcb.200504104>
- [49] Garcia-Bustos, J.F., Marini, F., Stevenson, I., Frei, C. and Hall, M.N. (1994) PIK1, an Essential Phosphatidylinositol 4-Kinase Associated with the Yeast Nucleus. *The EMBO Journal*, **13**, 2352-2361. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06519.x>
- [50] 代西维, 郭军, 陈玥颖, 段迎辉, 夏宁, 魏国荣, 黄丽丽, 康振生. 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[J]. 微生物学报, 2010, 50(2): 174-181.
- [51] Holton, S., Merckx, A., Burgess, D., et al. (2003) Structures of *P. falciparum* PFPK5 Test the CDK Regulation Paradigm and Suggest Mechanisms of Small Molecule Inhibition. *Structure*, **11**, 1329-1337. <https://doi.org/10.1016/j.str.2003.09.020>
- [52] Pines, J. and Hunter, T. (1991) Cyclin-Dependent Kinases a New Cell Cycle Motif? *Trends in Cell Biology*, **1**, 117-121. [https://doi.org/10.1016/0962-8924\(91\)90116-Q](https://doi.org/10.1016/0962-8924(91)90116-Q)

- [53] 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[J]. 微生物学杂志, 2008, 28(3): 7-14.
- [54] Arcia-Muse, T., Steinberg, G. and Perez-Martin, J. (2003) Characterization of B-Type Cyclins in the Smut Fungus *Ustilago maydis*: Roles in Morphogenesis and Pathogenicity. *Journal of Cell Science*, **117**, 487-506. <https://doi.org/10.1242/jcs.00877>
- [55] Dickman, M.B. and Yarden, O. (1999) Serine/Threonine Protein Kinases and Phosphatases in Filamentous Fungi. *Fungal Genetics and Biology*, **16**, 99-117. <https://doi.org/10.1006/fgbi.1999.1118>
- [56] Hilfiker, S. (2003) Neuronal Calcium Sensor-1: A Multifunctional Regulator of Secretion. *Biochemical Society Transactions*, **31**, 828-832. <https://doi.org/10.1042/bst0310828>
- [57] 秦娟, 黄传明, 何付新, 朱晓果, 张阳, 康振生. 小麦条锈菌钙调素依赖蛋白激酶基因 Pscamk 的功能[J]. 微生物学报, 2014, 54(11): 1296-1303.
- [58] Rose, A.J., Kiens, B. and Richter, E.A. (2006) Ca²⁺-Calmodulin-Dependent Protein Kinase Expression and Signalling in Skeletal Muscle during Exercise. *The Journal of Physiology*, **574**, 889-903. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.111757>
- [59] Ohya, Y., Kawasaki, H., Suzuki, K., Londesborough, J. and Anraku, Y. (1991) Two Yeast Genes Encoding Calmodulin-Dependent Protein Kinases. Isolation, Sequencing and Bacterial Expressions of CMK1 and CMK2. *Journal of Biological Chemistry*, **266**, 12784-12794.
- [60] Melcher, M.L. and Thorner, J. (1996) Identification and Characterization of the *CLK1* Gene Product, a Novel CaM Kinase-Like Protein Kinase from the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, **271**, 29958-29968. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.47.29958>
- [61] Pausch, M.H., Kaim, D., Kunisawa, R., Admon, A. and Thorner, J. (1991) Multiple Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Genes in a Unicellular Eukaryote. *The European Molecular Biology Organization Journal*, **10**, 1511-1522. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb07671.x>
- [62] Hanyu, Y., Imai, K.K., Kawasaki, Y., Nakamura, T., Nakaseko, Y., Nagao, K., Kokubu, A., Ebe, M., Fujisawa, A. and Hayashi, T. (2009) *Schizosaccharomyces pombe* Cell Division Cycle under Limited Glucose Requires Ssp1 Kinase, the Putative CaMKK, and Sds23, a PP2A-Related Phosphatase Inhibitor. *Genes to Cells*, **14**, 539-554.
- [63] Dayton, J.S., Sumi, M., Nanthakumar, N.N. and Means, A.R. (1997) Expression of a Constitutively Active Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Kinase in *Aspergillus nidulans* Spores Prevents Germination and Entry into the Cell Cycle. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 3223-3230. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.6.3223>
- [64] Joseph, J.D. and Means, A.R. (2000) Identification and Characterization of Two Ca²⁺/Ca M-Dependent Protein Kinases Required for Normal Nuclear Division in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 38230-38238. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006422200>
- [65] Li, L., Satoh, H., Ginsburg, K.S. and Bers, D.M. (1997) The Effect of Ca²⁺-Calmodulin-Dependent Protein Kinase II on Cardiac Excitation-Contraction Coupling in Ferret Ventricular Myocytes. *The Journal of Physiology*, **501**, 17-31.
- [66] Tombes, R.M., Grant, S., Westin, E.H. and Krystal, G.G. (1995) Cell Cycle Arrest and Apoptosis Are Induced in NIH 3T3 Cells by KN-93, an Inhibitor of CaMK-II (The Multifunctional Ca²⁺/CaM Kinase). *Cell Growth & Differentiation*, **6**, 1063-1070.
- [67] Markovic, O. and Janecek, S. (2001) Pectin Degrading Glycoside Hydrolases of Family 28: Sequence-Structural Features, Specificities and Evolution. *Protein Engineering*, **14**, 615-631. <https://doi.org/10.1093/protein/14.9.615>
- [68] Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W., et al. (1995) Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray. *Science*, **270**, 467-470. <https://doi.org/10.1126/science.270.5235.467>
- [69] Reignault, P., Kunz, C., Delage, N., et al. (2000) Host- and Symptom-Specific Pectinase Isozymes Produced by *Botrytis cinerea*. *Mycological Research*, **104**, 421-428.
- [70] Zhang, J., Bruton, B., Miller, M., et al. (1999) Relationship of Developmental Stage of Cantaloupe Fruit to Black Rot Susceptibility and Enzyme Production by *Didymella bryoniae*. *Plant Disease*, **83**, 1025-1032. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.11.1025>
- [71] Wattad, C., Freeman, S., Dinooor, A., et al. (1995) A Nonpathogenic Mutant of *Colletotrichum magna* Is Deficient in Extracellular Secretion of Pectate Lyase. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **8**, 621-626. <https://doi.org/10.1094/MPMI-8-0621>
- [72] Ke, X., Huang, L., Han, Q., et al. (2013) Histological and Cytological Investigations of the Infection and Colonization of Apple Bark by *Valsa mali* var. *mali*. *Australasian Plant Pathology*, **42**, 85-93. <https://doi.org/10.1007/s13313-012-0158-y>
- [73] 李曼, 郑佩晶, 怀宝玉, 李丹, 康振生, 刘杰. 小麦条锈菌果胶酶基因 PsPL1 的克隆与功能分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2016, 44(11): 155-160.

- [74] 宋平, 谭成龙, 郭嘉, 戚拓, 刘芑, 郭军. 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.
- [75] Whisson, S.C., Boevink, P.C., Lucy, M., *et al.* (2007) A Trans-Location Signal for Delivery of Oomycete Effector Proteins into Host Plant Cells. *Nature*, **450**, 115-118. <https://doi.org/10.1038/nature06203>
- [76] Bhairi, S.M., Staples, R.C., Freve, P., *et al.* (1989) Characterization of an Infection Structure-Specific Gene from the Rust Fungus *Uromyces appendiculatus*. *Gene*, **81**, 237-243. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(89\)90184-4](https://doi.org/10.1016/0378-1119(89)90184-4)
- [77] Barja, F., Jr., A.C., Staples, R.C., *et al.* (1998) Microinjected Antisense Inf24 Oligonucleotides Inhibit Appressorium Development in *Uromyces*. *Mycological Research*, **102**, 1513-1518. <https://doi.org/10.1017/S0953756298006601>
- [78] Ann-Maree, C., Dodds, P.N., Lawrence, G.J., *et al.* (2006) Haustorially Expressed Secreted Proteins from Flax Rust Are Highly Enriched for Avirulence Elicitors. *Plant Cell*, **18**, 243-256. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.035980>
- [79] 陈玥颖, 郭军, 代西维, 段迎辉, 魏国荣, 黄丽丽, 康振生. 麦条锈菌一个产孢相关基因 PsCon1 的克隆及表达特征分析[J]. 中国农业科学, 2010, 43(6): 1156-1163.
- [80] White, B.T. and Yanofsky, C. (1993) Structural Characterization and Expression Analysis of the *Neurospora* Conidiation Gene *Con-6*. *Developmental Biology*, **160**, 254-264. <https://doi.org/10.1006/dbio.1993.1303>
- [81] Wang, C.F., Huang, L.L., Buchenauer, H., Han, Q.M., Zhang, H.C. and Kang, Z.S. (2007) 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*, **71**, 230-239. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2008.02.006>
- [82] 康振生, 李振岐, J. 庄约兰, R. 罗格林. 小麦条锈菌吸器超微结构和细胞化学的研究[J]. 真菌学报, 1994, 13(1): 52-57.
- [83] 康振生, 王瑶, 黄丽丽, 魏国荣, 赵杰. 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[J]. 中国农业科学, 2003, 36(9): 1026-1031.
- [84] 朱晓果, 黄传明, 秦娟, 何付新, 张阳, 郭军, 康振生. 小麦条锈病菌 MAPK 激酶级联途径介导的致病机理研究[C]//中国植物病理学会. 沈阳图书馆学会年会论文集: 2014 年卷. 沈阳: 沈阳图书馆出版社, 2014: 267-268.
- [85] Mayorga, M.E. and Gold, S.E. (1999) A MAP Kinase Encoded by the *Ubc3* Gene of *Ustilago maydis* Is Required For-filamentous Growth and Full Virulence. *Molecular Microbiology*, **34**, 485-497. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01610.x>
- [86] Müller, P., Weinzierl, G., Brachmann, A., Feldbrügge, M. and Kahmann, R. (2003) Mating and Pathogenic Development of the Smut Fungus *Ustilago maydis* Are Regulated by One Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade. *Eukaryotic Cell*, **2**, 1187-1199. <https://doi.org/10.1128/EC.2.6.1187-1199.2003>
- [87] Brachmann, A., Schirawski, J., Müller, P., and Kahmann, R. (2003) An Unusual MAP Kinase Is Required for Efficient Penetration of the Plant Surface by *Ustilago maydis*. *The EMBO Journal*, **22**, 2199-2210. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg198>
- [88] Doehlemann, B.T., Mendoza-Mendoza, A., *et al.* (2009) *Ustilago Maydis* as a Pathogen. *Annual Review of Phytopathology*, **47**, 423-445. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081923>
- [89] Zhao, X., Mehrabi, R. and Xu, J.R. (2007) Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways and Fungal Pathogenesis. *Eukaryotic Cell*, **6**, 1701-1714. <https://doi.org/10.1128/EC.00216-07>
- [90] Rispaill, N., *et al.* (2009) Comparative Genomics of MAP Kinase and Calcium-Calcineurin Signalling Components in Plant and Human Pathogenic Fungi. *Fungal Genetics and Biology*, **46**, 287-298.
- [91] 郭军, 代西维, 许金荣, 等. 小麦条锈菌 MAPK 基因 PsAMPK1 的功能分析[C]//中国植物病理学会 2011 年学术年会. 2011 年卷. 宜昌: 宜昌图书馆出版社, 2011: 181-189.
- [92] Klosterman, S.J., Martinez-Espinoza, A.D., Andrews, D.L., Seay, J.R. and Gold, S.E. (2008) *Ubc2*, an Ortholog of the Yeast Ste50p Adaptor, Possesses a Basidiomycete-Specific Carboxy Terminal Extension Essential for Pathogenicity Independent of Pheromone Response. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **21**, 110-121. <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-1-0110>
- [93] Zhao, X., Kim, Y., Park, G. and Xu, J.-R. (2005) A Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade Regulating Infection-Related Morphogenesis in *Magnaporthe grisea*. *The Plant Cell*, **17**, 1317-1329. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.029116>
- [94] 潘教文, 李德全. 植物 MAPK 信号转导组分的细胞定位与选择性剪接[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2010, 26(5): 393-400.
- [95] Wen, F., White, G.J., Vanetten, H.D., *et al.* (2009) Extracellular DNA Is Required for Root Tip Resistance to Fungal Infection. *Plant Physiology*, **151**, 820-829. <https://doi.org/10.1104/pp.109.142067>
- [96] Hawes, M.C., Curlango-Rivera, G., Wen, F., *et al.* (2011) Extracellular DNA: The Tip of Root Defenses? *Plant*

Science, **180**, 741-745. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.02.007>

- [97] Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., *et al.* (2004) Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science*, **303**, 1532-1535. <https://doi.org/10.1126/science.1092385>
- [98] Goldmann, O. and Medina, E. (2013) The Expanding World of Extracellular Traps: Not Only Neutrophils but Much More. *Frontiers in Immunology*, **3**, 420. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00420>