

评述与展望

Review and Progress

植物病原胞外分泌型真菌无毒基因研究进展

汪文娟^{1,2}, 汪聪颖^{1,2}, 苏菁^{1,2}, 陈深¹, 曾列先¹, 朱小源¹

1. 广东省农业科学院植物保护研究所, 广州, 510640

2. 广东省植物保护新技术重点实验室, 广州, 510640

✉ 通讯作者: zhuxy@gdppri.com; ✉ 作者

分子植物育种, 2012年, 第10卷, 第14篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0014

收稿日期: 2012年03月14日

接受日期: 2012年03月27日

发表日期: 2012年04月28日

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

建议最佳引用格式:

引用格式(中文):

汪文娟等, 2012, 植物病原胞外分泌型真菌无毒基因研究进展, 分子植物育种(online) Vol.10 No.14 pp.1104-1114 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0014)

引用格式(英文):

Wang et al., 2012, Recent Progress on Avirulence Genes from Extracellular Fungal Phytopathogens, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding) Vol.10 No.14 pp.1104-1114 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0014)

摘 要 植物真菌性病害是世界范围内影响农作物生产的最主要病害。分子生物学与生物信息学技术的飞速发展, 不仅极大地促进了植物抗病基因的鉴定, 也为病原菌无毒基因的克隆及其功能验证提供了保障。尤其, 番茄叶霉菌、油菜茎基溃疡病菌及稻瘟病菌等胞外分泌型真菌无毒基因的克隆, 有助于阐明病原菌与寄主植物之间的作用机理, 为植物病害的综合防治创造了条件。本文对植物胞外分泌型真菌无毒基因的研究现状进行了概述, 并就无毒基因的克隆策略、无毒基因的结构、功能及其进化方面进行了探讨。

关键词 植物病原菌; 胞外分泌型真菌; 无毒基因; 效应子

Recent Progress on Avirulence Genes from Extracellular Fungal Phytopathogens

Wang Wenjuan^{1,2}, Wang Congying^{1,2}, Su Jing^{1,2}, Chen Shen¹, Zeng Liexian¹, Zhu Xiaoyuan¹

1. The Plant Protection Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640;

2. Guangdong Provincial Key Laboratory of High Technology for Plant Protection, Guangzhou 510640;

✉ Corresponding author: zhuxy@gdppri.com; ✉ Authors

Abstract Plant fungal diseases are the most devastating diseases to the crop production worldwide. With the rapid development of molecular biology and bioinformatics technology, the identification of resistance genes and characterization of avirulence genes have been facilitated greatly and served as a guarantee for avirulence genes cloning and function verification. In particular, the characterization of avirulence genes from extracellular fungi, such as *Cladosporium fulvum*, *Leptosphaeria maculans*, and *Magnaporthe oryzae*, are useful to elucidate the mechanism of interaction between the host and the pathogen, and therefore provides a powerful approach for the integration of prevention and treatment into plant disease. In this review, the recent progress on molecular identification of avirulence genes from extracellular fungi has been summarized. We further discussed the strategy of avirulence genes cloning, the structure of avirulence genes and its function and evolution.

Keywords Phytopathogen; Extracellular fungi; Avirulence gene; Effector

研究背景

植物病原菌无毒基因是一类编码的蛋白能被寄主植物内相应的抗性基因所特异性识别的基因; 也是激发子的重要成员; 其编码特殊的效应子蛋白及小分子物质(Ellis et al., 2009)。无毒基因与寄主 R 基因之间的直接或间接识别引起抗性反应, 即效应子触发性免疫(ETI), 从而引发局部细胞发生过敏性坏

死反应(HR 反应)(Rouxel and Balesdent, 2010)。这一过程将加剧植物与病原菌间的军备竞赛共进化, 即病原菌通过突变或丢失效应子或形成新的能够逃避或抑制 ETI 的效应子。相对植物而言, 则形成新的 R 蛋白以调节新的效应子的识别(de Wit, 2007)。

植物病原真菌, 如丝状病原菌, 能在自然界和农业植物群落中引发一系列的病害症状(Oliva et al.,

2010)。丝状病原菌在寄主植物内寄生,并能引发寄主细胞坏死。病原菌与寄主植物间的互作分为亲和性互作与非亲和性互作(Liu et al., 2010)。根据病原菌的效应子蛋白与寄主植物R蛋白的非亲和性作用的位置,可将植物病原真菌分为2种类型:一种是具有吸器的真菌,如大麦白粉菌与亚麻锈菌等;该类病原菌的效应子蛋白可能先在其吸器中表达,然后被病原菌转运到寄主的细胞质中;据推测其相应的R基因多位于细胞质。另一种是胞外分泌型真菌(extracellular fungi),如番茄叶霉菌、油菜茎基溃疡病菌、稻瘟病菌及大麦云纹病菌等;该类病原菌的无毒基因被分泌到质外体,其相应的R基因多位于细胞质膜上或具有一个跨膜结构域及一个胞间LRR结构(图1)(Hammond-Kosack and Kanyuka, 2007; de Wit et al., 2009)。胞外分泌型病原菌最显著的特征是编码胞外分泌型效应子蛋白。胞外分泌型效应子具有如下特征;第一,该效应子被分泌到寄主植物的质外体或木质部;第二,该效应子蛋白的N-端,有时C-端往往在侵染期间被植物和/或真菌的蛋白酶进一步地加工,形成成熟的蛋白;另外,同

其它在寄主细胞内活跃的效应子一样,胞外分泌型效应子的另一个特征是,携有多个半胱氨酸残基,该半胱氨酸残基可能参与维持蛋白结构稳定的分子内二硫键的形成(Stergiopoulos and de Wit, 2009)。

由植物病原真菌引起的植物病害是农业生产的主要限制因子之一,严重威胁着世界的农作物生产。实践证明,培育和合理利用抗病品种是目前控制此类病害最经济有效和对环境安全的手段。然而,由于频繁出现能克服新导入的R基因的小种,使得培育的抗病品种只具有短期的抗病效应(Zeigler et al., 1994)。随着生物信息学的快速发展以及生物体全基因组测序时代的到来,这必将加速病原菌无毒基因与寄主抗病基因的分离、克隆以及它们之间相互作用分子机制的研究;从而为植物病害的防治提供新的理论与途径。

本文综述了胞外分泌型真菌,包括番茄叶霉菌、油菜茎基溃疡病菌及稻瘟病菌无毒基因研究的最新进展。进一步对植物病原真菌无毒基因的结构、内在(intrinsic)功能与进化机制以及后基因组时代无毒基因克隆策略的变化及其对策进行了探讨。

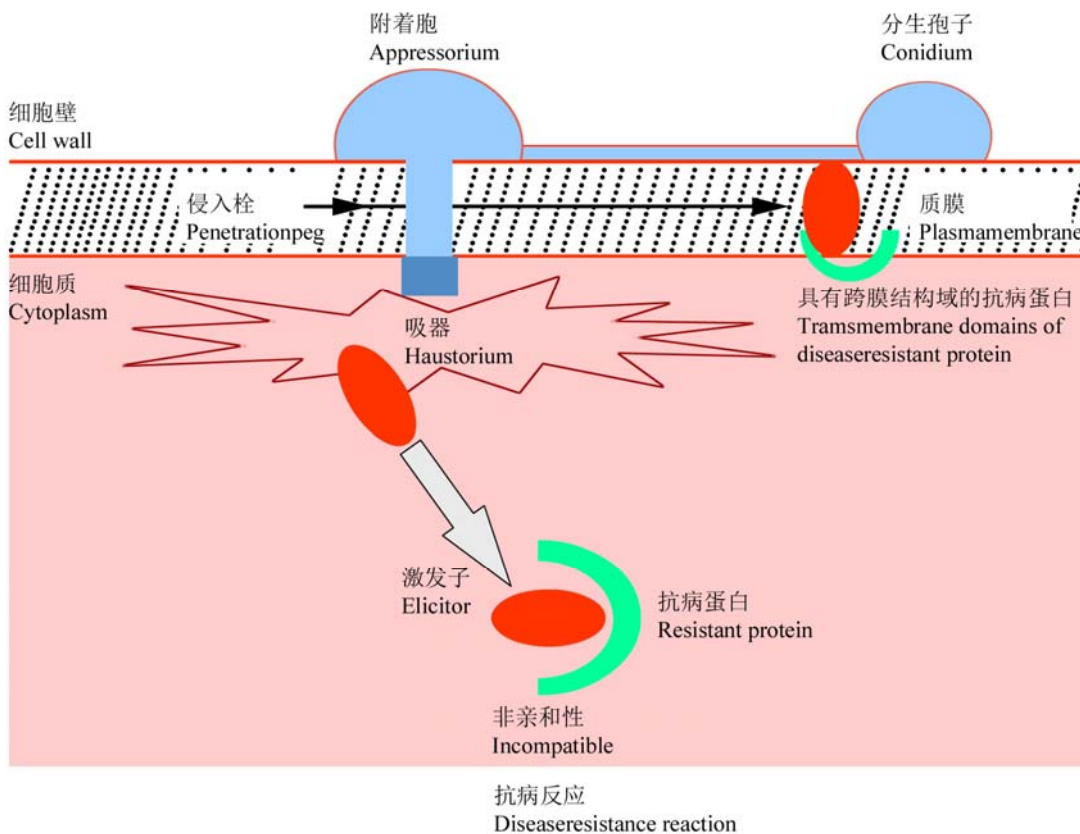


图 1 Avr 蛋白和 R 蛋白在不同寄主—病原物互作过程中的位置

Figure 1 The location of Avr proteins and R proteins in different host-pathogen interaction

1 已克隆的植物病原真菌无毒基因

1.1 叶霉病菌无毒基因

由番茄叶霉菌(*Cladosporium fulvum*)侵染而引起的番茄叶霉病是一种真菌性病害, 该病害是番茄生产的重要病害之一(叶青静等, 2005)。番茄叶霉菌是一种无性繁殖的胞外真菌性病原菌(Thomma et al., 2005)。迄今, 通过反向遗传学(reverse genetics)途径已从番茄中成功分离、克隆了 4 个番茄叶霉菌无毒基因, 即 *Avr2*、*Avr4*、*Avr4E* 和 *Avr9*; 这些无毒基因都编码富半胱氨酸的小分子量的蛋白激发子(Takken et al., 2000)(表 1); 能特异性介导番茄中与之互补的 *Cf* 抗性基因的抗性。此外, 在番茄叶霉菌繁殖过程中, 还分泌 4 种细胞外蛋白(ECP1、ECP2、ECP4 和 ECP5)进入质外体空隙; 这些蛋白在番茄植株中激发特异的过敏反应(De Kock et al., 2005)。另外, 新的细胞外蛋白 ECP6 与 ECP7 也已被鉴定(Bolton et al., 2008)。

Avr2 编码由 78 个氨基酸组成的前体蛋白, 该蛋白经真菌蛋白酶类与植物蛋白酶类加工后形成包含 8 个半胱氨酸残基的成熟蛋白, 它们能够诱导携带抗性基因 *Cf-2* 的番茄品种产生过敏性坏死反应(HR 反应)(Dixon et al., 1996; Luderer et al., 2002b)。Takken 等(2000)基于大多数无毒蛋白在携有相应抗病蛋白的寄主植物中产生 HR 的思路; 采用功能性克隆法分离了无毒基因 *Avr2*。通过构建病原菌的 cDNA 文库, 将 cDNA 组装到 PVX (potato virus X) 二元表达载体上, 并将重组的 PVX 载体接种到番茄中, PVX 介导的无毒基因与含相应抗性基因的植物互作, 在接种部位产生 HR 反应, 从而被诱导出来; 继而可以获得相应无毒基因的克隆。在侵染期间, *Avr2* 至少抑制 4 种与寄主植物防御相关的半胱氨酸蛋白酶的表达(Kruger et al., 2002; Rooney et al., 2005; Shabab et al., 2008)。在抗性蛋白 *Cf-2* 存在的条件下, 无毒蛋白 *Avr2* 行使无毒因子的功能, 且番茄叶霉菌抗性基因 *Cf-2* 介导的抗性受 *Rcr3* 基因的调控。*Avr2* 基因的点突变、删除或转座子插入都能促使 AVR2 蛋白无毒功能的丧失(Luderer et al., 2002b)。近期的研究表明; 番茄叶霉菌菌株的 *Avr2* 等位基因间存在过多的非同义替换, 显示了强烈正向选择迹象。这主要是由于该基因的编码区域被插入或删除了部分碱基, 形成了截短的 *Avr2* 蛋白, 从而引起功能的改变(Stergiopoulos et al., 2007)。

基因分离、克隆可通过 2 种不同的克隆途径

来实现, 即反向遗传学途径和正向遗传学(forward genetics)途径(Takahashi et al., 1994)。在反向遗传学研究中, 基因所影响的表型并不清楚, 但可以通过遗传转化来研究该基因的功能以及所引起的表型变异。无毒基因 *Avr4*、*Avr4E* 和 *Avr9* 都是利用反向遗传学的方法克隆得到。

Avr4 编码 135 个氨基酸的蛋白前体, 该蛋白前体分泌在番茄的质外体空隙中。其 C-和 N-末端经蛋白酶类加工后形成成熟的蛋白(Joosten et al., 1997); 其中包含 8 个对 *Avr4* 蛋白的构象与毒性至关重要的半胱氨酸残基。并且, *Avr4* 蛋白二硫化物结合区域的结构与无脊椎动物几丁质结合区域同源(van den Burg et al., 2003)。van den Burg 等(2006)将 *Avr4* 蛋白结合到几丁质上, 结果发现在病原菌侵染植物期间, *Avr4* 蛋白能够保护叶霉菌的几丁质。van Esse 等(2007)将叶霉菌暴露在几丁质酶中, 或沉默番茄叶霉菌的 *Avr4* 基因时, 发现该真菌对几丁质酶的抑制显著降低, 这进一步地证实了 *Avr4* 基因只有在病原菌侵染寄主期间才表达。并且, 番茄叶霉菌 *Avr4* 基因最自然的变异是该基因编码区发生的单个点突变, 从而引起半胱氨酸残基的替换, 一方面可以逃避抗性基因 *Cf-4* 的识别, 另一方面却保留了几丁质结合活性(van den Burg et al., 2003)。

Avr4E 编码富含半胱氨酸的 101 个氨基酸的蛋白, 该蛋白在叶霉菌侵染植物期间, 分泌到质外体中并触发 *Cf-4E* 介导的 HR 反应(Westerink et al., 2004)。很多叶霉菌菌株已经被证明能够逃避 *Cf-4E* 介导的抗性, 这些菌株的 *Avr4E* 基因的编码区都显示 2 个一致的点突变, 该突变的 *Avr4E* 基因形成稳定的具有 2 个氨基酸置换的 *Avr4E* 蛋白, 即 Phe⁶² Leu 与 Met⁷³ Thr (AVR4E^{LT})的变化。Westerink 等(2004)研究表明, *Avr4E* 蛋白第 62 位的单个氨基酸的非同义替换能够调控 *Avr4E* 与其相应抗性基因的识别。目前, *Avr4E* 基因及其编码产物的特征还有待进一步研究。

Avr9 编码 63 个氨基酸的前体蛋白, 经蛋白酶类加工后形成包含 6 个半胱氨酸的成熟蛋白(Westerink et al., 2004)。前人的研究表明, 这些半胱氨酸残基是维持 *Avr9* 的结构稳定及诱导植物细胞的 HR 反应所必不可少的(Stergiopoulos and de Wit, 2009)。*Avr9* 能够诱导带抗性基因 *Cf-9* 的番茄品种产生抗性。Marmeisse 等(1993)基于同源重组的策略, 将番茄叶霉菌的 *Avr9* 基因敲除, 结果并不影响

该病原菌在感病番茄植株上的体外生长或毒性, 该研究表明 *Avr9* 基因并不是番茄叶霉菌全毒力所必需的。事实上, 所有能够逃避 *Cf-9* 抗性基因识别的叶霉菌都是自然缺失 *Avr9* 基因的菌株 (Stergiopoulos et al., 2007)。有趣地, 当在体外限制氮元素的条件下, *Avr9* 的表达被诱导, 表明其蛋白产物与病原菌的氮代谢途径有关 (Thomma et al., 2006)。

编码胞外蛋白的 6 个基因 *Ecp1*、*Ecp2*、*Ecp4*、*Ecp5*、*Ecp6* 与 *Ecp7* 已被克隆。Luderer 等 (2002a) 的研究表明, 所有的番茄叶霉菌在侵染植物期间都大量分泌 *Ecps* 蛋白, 这些蛋白都是富含偶数半胱氨酸残基的蛋白。其中 *Ecp1* 和 *Ecp2* 基因基于反向遗传学法被克隆。当番茄叶霉菌无毒基因 *Avr4* 和 *Avr9* 在寄主植物内被诱导时, 植物体内的 *Ecp1* 和 *Ecp2* 也被强烈地诱导, 表明 *Ecp* 与 *Avr* 共同激活植物抗病相关途径 (Stergiopoulos and de Wit, 2009), 即 *Avr* 与 *Ecp* 在番茄抗叶霉菌过程中起着至关重要的作用。尽管绝大多数的 *Cf-Ecps* 基因已经被遗传定位, 但已被克隆的番茄叶霉菌抗性基因却很少 (Soumpourou et al., 2007)。

阐述已特征化的番茄叶霉菌无毒基因, 有助于了解叶霉菌与番茄植株之间的相互识别机制, 为克隆更多的叶霉菌无毒基因提供了新的思路与途径, 并对番茄广谱抗病基因的鉴定及挖掘具有重要的指导意义。

1.2 油菜茎基溃疡病菌无毒基因

在最近的 40 年期间, 油菜黑胫病是油菜生产上最严重的病害之一 (Rouxel and Balesdent, 2005)。其病原菌为小球腔菌属 *Leptosphaeria* 的复合种, 至少包括两个小种: 油菜茎基溃疡病菌 (*Leptosphaeria maculans*) 和油菜黑胫病菌 (*L. biglobosa*)。油菜茎基溃疡病菌致病力强, 能引起油菜及其他十字花科植物茎基溃疡病的发生, 是油菜产量损失的主要因素 (Fitt et al., 2006), 其引起的产量损失严重时可达 30%-50%。目前, 只有 3 个油菜茎基溃疡病菌无毒基因被克隆; 这 3 个无毒基因是 *AvrLm1*, *AvrLm6* 与 *AvrLm4-7* 都是通过图位克隆的策略得到的 (Gout et al., 2006; Fudal et al., 2007; Parlange et al., 2009) (表 1)。

AvrLm1 被定位在 269 kb 富含 AT 的区域, 该区域是类异染色质区域由 4 个长末端重复 (LTR) 逆转录转座子组成, 包含极少的基因 (Gout et al., 2006)。*AvrLm6* 也被定位在 133 kb 的非编码区域, 且该区

域也主要包含 LTR 逆转录转座子 (Fudal et al., 2007)。与到目前为止已克隆的真菌无毒基因相反, 无毒基因 *AvrLm1* 与 *AvrLm6* 的 GC 含量都较低。且这 2 个无毒基因都是单拷贝的, 分别编码 205 个与 144 个氨基酸的分泌蛋白, 并且这些蛋白既与已报道的蛋白不具有同源性, 也不具有推定的与内在功能相关的特征化结构。迄今, 尽管 *AvrLm1* 与 *AvrLm6* 的无毒性功能已确定, 但其相应的抗性基因 *Rlm1* 与 *Rlm6* 尚未被克隆 (Ricardo et al., 2010)。因此, 这 2 组蛋白的识别及作用机制尚未清楚。另一方面, *AvrLm6* 蛋白含有 6 个半胱氨酸残基, 这些半胱氨酸通过形成分子内二硫键以维持 *AvrLm6* 蛋白在植物体外的稳定性。相反, *AvrLm1* 蛋白只包含一个半胱氨酸残基, 鉴于所有已报道的质外体效应子都是富含半胱氨酸的蛋白 (Kamoun, 2007), 因此 *AvrLm1* 蛋白很可能是被转运到寄主细胞内。

AvrLm4-7 被定位在 238 kb 的遗传区域, 该区域富含 AT, 由多重的 LTR 逆转录转座子组成 (Parlange et al., 2009); 该无毒基因对相应的抗病基因 *Rlm7* 与 *Rlm4* 都具有无毒性功能。*AvrLm4-7* 编码 143 个氨基酸的推定的分泌蛋白前体, 该蛋白前体被蛋白酶类加工后形成包含 8 个半胱氨酸残基的成熟蛋白, 该成熟蛋白与已报道的蛋白没有同源性。*AvrLm4-7* 基因的表达在侵入寄主叶片的初期被上调, 在接种 7 d 后, 其表达量最高。*AvrLm4-7* 基因的缺失及部分截短实验表明, 保持 *AvrLm4-7* 基因的完整性对其无毒性功能至关重要。

综上所述, *AvrLm* 基因大多位于染色体的亚端粒等非特定的染色体区域, 这有利于无毒基因 *AvrLm* 的快速演化以及加速病原菌对寄主的适应性, 这也是该类基因具有遗传不稳定性的主要原因 (Haas et al., 2009)。同时, 上述结果也证明油菜茎基溃疡病菌异常的基因组结构是导致其效应子蛋白结构多样化及快速进化的主要原因 (Rouxel et al., 2011)。

1.3 稻瘟病菌无毒基因

水稻 (*Oryza sativa*) 是全世界最重要的粮食作物之一, 全球大约一半以上的人口以稻米作为主食。由稻瘟病菌 (*Magnaporthe oryzae*) 引起的稻瘟病是世界水稻生产的主要限制因子之一, 严重威胁着世界的粮食安全 (Couch and Kohn, 2002)。实践证明, 合理利用和培育抗病品种是控制此病害最经济有效和对环境安全的手段 (Rouxel and Balesdent, 2010)。

稻瘟病菌(Dean et al., 2005)与水稻(International Rice Genome Sequencing Project, 2005)基因组测序的完成加速了病原菌无毒基因与寄主抗病基因的分离、克隆以及它们之间相互作用等方面的分子机制研究(杨勤忠等, 2009)。从而, 为培育具有持久抗瘟性品种及不同抗病品种的合理布局提供了理论基础。

尽管到目前为止, 大约已经有 40 个稻瘟病菌无毒基因完成了染色体的初步定位, 但已被克隆的

无毒基因却只有 9 个(Liu et al., 2010)。其中, *PWL1* 和 *PWL2* 都是来源于弯叶画眉草, 具有很强的寄主专化性(Kang et al., 1995; Sweigard et al., 1995); 而另外 7 个无毒基因 *AVR1-CO39* (Farman and Leong, 1998)、*AVRPita*(Orbach et al., 2000)、*ACE1*(Böhnert et al., 2004)、*AvrPiz-t* (Li et al., 2009)、*AVRPia*、*AvrPii* 和 *AvrPik/km/kp* 均来源于水稻(Yoshida et al., 2009) (表 1)。

表 1 目前已知克隆的胞外分泌型真菌无毒基因
 Table1 Extracellular fungi avirulence genes known to-date

无毒基因 Avr gene	氨基酸 数目 Nb of AA	半胱氨酸残 基数 Nb of cysteines	信号肽长度 Signal peptide	推定的基因功能 Putative gene function	对应的 R 基因 Corresponding R gene	在植物中的位置 Localization in plants	表达 Expression
番茄叶霉菌 <i>Cladosporium fulvum</i>							
<i>Avr2</i>	78	8	20	编码蛋白酶抑制子, 能够抑制 Rcr3 及其他蛋白酶 Protease inhibitor, Inhibits Rcr3 and other proteases	<i>Cf-2</i>	质外体 Apoplast	植物体内 In planta
<i>Avr4</i>	135	8	18	编码几丁质结合蛋白, 抑制植物几丁质酶活性 Chitin-binding, Protects against chitinases	<i>Cf-4</i>	质外体 Apoplast	植物体内 In planta
<i>Avr4E</i>	121	6	10	未知 Unknown	<i>Hcr9-4E</i>	质外体 Apoplast	植物体内 In planta
<i>Avr9</i>	63	6	23	编码羧肽酶抑制子 Carboxypeptidase inhibitor	<i>Cf-9</i>	质外体 Apoplast	植物体内 In planta
油菜茎基溃疡病菌 <i>Leptosphaeria maculans</i>							
<i>AvrLm1</i>	205	1	22	未知 Unknown	<i>Rlm1</i>	可能在细胞质 Probably in cytoplasm	在植物体内过表达 Over-expression in planta
<i>AvrLm6</i>	144	6	20	未知 Unknown	<i>Rlm6</i>	可能在质外体 Probably in apoplast	植物体内 In planta
<i>AvrLm4-7</i>	143	8	21	未知 Unknown	<i>Rlm4 and Rlm7</i>	可能在质外体 Probably in apoplast	在植物体内强烈地过表达 Strongly overexpressed in planta

续表 1

Continuing table 1

无毒基因 Avr gene	氨基酸 数目 Nb of AA	半胱氨酸残 基数 Nb of cysteines	信号肽长度 Signal peptide	推定的基因功能 Putative gene function	对应的 R 基因 R gene	在植物中的位置 Localization in plants	表达 Expression
稻瘟病菌 <i>Magnaporthe oryzae</i>							
<i>PWL1</i>	147	0	21; 23	编码控制对弯叶画眉草致病性的分泌蛋白 Encoding secreted proteins control the pathogenicity to weeping lovegrass	未知 Unknown	可能在质外体 Probably in apoplast	未知 Unknown
<i>PWL2</i>	145	0	21; 23	编码富含甘氨酸的亲水蛋白 Encoding glycine-rich hydrophilic protein	未知 Unknown	可能在质外体 Probably in apoplast	未知 Unknown
<i>Avr-Pita</i>	224	8	16	编码金属蛋白酶, 能与抗性基因 <i>Pi-ta</i> 直接互动 Encoding metalloprotease, direct interaction with resistance gene <i>Pi-ta</i>	<i>Pi-ta</i>	细胞质 Cytoplasm	植物体内 In planta
<i>AVR1-CO39</i>	未知 Unknown	未知 Unknown	未知 Unknown	未知 Unknown	<i>Pi-CO39(t)</i>	未知 Unknown	未知 Unknown
<i>ACE1</i>	4035	43	未知 Unknown	编码聚酮化合物酶和非核糖体多肽合成酶的复合体 Encoding hybrid polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase	<i>Pi33</i>	真菌附着胞 Fungal appressorium	在附着胞中表达 Expressed in appressorium
<i>AvrPiz-t</i>	108	未知	18	编码分泌蛋白 Encoding secreted protein	<i>Piz-t</i>	未知 Unknown	未知 Unknown
<i>AvrPia</i>	85	2	19	编码分泌蛋白 Encoding secreted protein	<i>Pia</i>	细胞质 Cytoplasm	在植物体内过表达 Over-expression in planta
<i>AvrPii</i>	70	3	19	编码与 C2H2 锌指基序具有相似性的蛋白 Encoding protein that similarity to the C2H2 zinc finger motif	<i>Pii</i>	细胞质 Cytoplasm	在植物体内过表达 Over-expression in planta
<i>Avr-Pik/km/k113 p</i>		3	21	编码分泌蛋白 Encoding secreted protein	<i>Pik, Pik-m and Pik-p</i>	细胞质 Cytoplasm	在植物体内过表达 Over-expression in planta
大麦云纹病菌 <i>Rhynchosporium secalis</i>							
<i>Nip1</i>	82	10	22	编码非特异性毒素蛋白, 诱发植物细胞坏死 Encoding nonspecific toxin, induces plant necrosis	<i>Rrs-1</i>	可能在质外体 Probably in apoplast	体外表达 Expression in vitro

无毒基因 *AVR-Pita* 最初分离自日本菌株 O-137, 其在水稻细胞内直接表达时触发了 *Pita* 介导的抗性。该基因编码中性金属蛋白酶, 全长 223 个氨基酸, N 端具有分泌信号肽及前蛋白序列 (Orbach et al., 2000)。Jia 等(2000)酵母双杂交实验结果表明, 除去前体蛋白及信号肽的 *AVR-Pita* 截短蛋白 *AVR-Pita176* 能与抗性基因 *Pi-ta* 的富亮氨酸结构域(LRD 区域)特异性地互作, 该蛋白可以诱导 *Pi-ta* 依赖的免疫反应。

AVR1-CO39 最先被定位在稻瘟病菌第 1 染色体上 610 kb 的染色体区域, 对水稻品种 CO39 具有无毒性。前人在分析 CO39 致病性菌株 *AVR1-CO39* 基因座的结构时发现, 在稻瘟病菌进化的早期, 该基因座就已经发生了遗传重排, 导致绝大部分菌株对 CO39 有毒(张哲等, 2011; Tosa et al., 2005)。然而, 迄今为止, *AVR1-CO39* 基因功能的详细特征仍然未知(de Wit et al., 2009)。

ACE1 是利用稻瘟病菌田间菌株 Guy11 与实验室菌株 ML25 杂交群体定位的无毒基因, 可以特异性地诱导携有抗性基因 *Pi33* 的水稻品种 *Irat7* 的过敏性反应(Böhnert et al., 2004)。*ACE1* 编码的蛋白非常大, 编码 4035 个氨基酸, 该编码产物是聚酮化合物与非核糖体多肽合成酶的复合体。*ACE1*-GFP 融合蛋白研究及亚细胞定位的结果均显示, *ACE1* 能在附着胞中特异性表达, 且只在稻瘟病菌感染水稻期间才表达; 该数据也表明无毒基因 *ACE1* 与病原菌感染特性及寄主防御反应相关。

Li 等(2009)通过图位克隆的策略从稻瘟病菌无毒菌株 81278 ZB 15 (MAT-1)分离到了无毒基因 *AvrPiz-t*; 其在水稻细胞内直接表达时触发了 *Piz-t* 介导的抗性。通过序列比对发现菌株 81278 ZB 15 与菌株 Guy11 中的 *AvrPiz-t* 基因的编码区不存在差异; 而 GUY11 中 *AvrPiz-t* 启动子区域存在一个 *Pot3* 转座子的插入导致了目标序列(5'TA3')的复制。该转座子长度为 1 861 bp, 含有 2 个倒置末端重复序列 (ITR)和 1 个 ORF, 其序列与 *AvrPita* 位点的 *Pot3* 转座子 99%相似。除去 *Pot3* 和目标序列后, GUY11 中 *AvrPiz-t* 的启动子序列与 81278 ZB 15 相同。农杆菌介导的烟草瞬时表达实验表明, *AvrPiz-t* 基因能够抑制本生烟叶片中促凋亡蛋白 BAX 诱导的细胞程序性死亡(PCD), 这表明 *AvrPiz-t* 是稻瘟病菌致病性所必需的。

Yoshida 等(2009)通过基因组关联分析及基因

组重测序技术从稻瘟病菌中鉴定到了 3 个新的无毒基因 *AvrPia*、*AvrPii*、*AvrPik/km/kp*, 它们分别编码长度为 85、70 和 113 个氨基酸长度的蛋白, 且这些蛋白的 N 末端都是分泌蛋白区域。作者通过这 3 个 *Avr* 基因在水稻原生质体中的瞬时表达实验, 证明了 *AvrPia*、*AvrPii*、*AvrPik/km/kp* 均能引发含有相对应 *R* 基因水稻原生质体细胞的死亡, 且均不能引发含非对应 *R* 基因水稻原生质体细胞的死亡。然而, 至于这些无毒基因在稻瘟病菌生长发育方面具有什么样的功能, 还有待于进一步地研究。

近年来, 在稻瘟病菌无毒基因的克隆方面虽已取得了一定的进步, 但对应克隆的无毒基因与相应抗性基因仅限于 *AVR-Pita* 与 *Pi-ta*、*AvrPiz-t* 与 *Piz-t* 及 *AvrPik/km/kp* 与 *Pikm*, 无毒基因与对应抗性基因之间互作的情况仍然鲜有报道。因此, 关于已克隆的无毒基因与其相应抗性基因的互作机制的阐明还有待更进一步的研究。同时, 对稻瘟病菌与水稻互作分子机制的研究如何应用于小种动态变化监测、稻瘟病菌群体组成分析、品种合理布局及延长抗性品种使用年限等(张哲等, 2011), 还有待更深入地探讨与发掘。

1.4 其它胞外分泌型真菌无毒基因

目前已克隆的胞外分泌型真菌无毒基因还有大麦云纹病菌 (*Rhynchosporium secalis*) 无毒基因 *Nip1*, 番茄枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*) 无毒基因 *Avr1*、*Six2*、*Six3* 与 *Avr3*。其中 *Nip1* 编码一个低分子量的多肽, 可以高度特异性地诱导大麦等多种禾本科作物发生坏死反应 (Rohe et al., 1995)。*Avr1* 编码小的富半胱氨酸的蛋白 (Rep et al., 2005), 被分泌到植物的木质部; *Avr3* 是番茄枯萎病菌对番茄植株全毒力所必需的, 编码小的富半胱氨酸的蛋白, 在相应的 *R* 基因存在的条件下, 显示无毒因子的功能触发植株的过敏性坏死反应 (Rep et al., 2004)。然而, 已克隆的番茄枯萎病菌无毒基因的功能及其同源性尚未清楚; 因此, 需要更进一步的研究来描述该类无毒基因的结构特征及其功能, 以更好地指导经济作物的安全生产。

2 植物与病原菌进化互作机制

近百万年以来, 植物与相关的病原菌一直协同进化, 自然选择促使病原菌激发及克服植物的防御反应 (Rouxel and Balesdent, 2010)。因此, 寄主与病原菌经历着对抗性的共进化, 基于多样性选择的方

式, 促使两者互作过程中蛋白质的多样性。病原菌基因组中存在2种类型的无毒基因: 一种无毒基因具有品种特异性, 含有与致病相关的高度保守的蛋白; 其中包括番茄叶霉菌的胞外蛋白ECP或Avr4; 另一种无毒基因在寄主植物的选择压下遗传变异快, 具有高度不稳定性, 能快速地逃避相应R基因的识别。然而, 目前已知的无毒基因绝大多数都是品种特异性的, 具有保守性。

植物与病原菌之间的特异互作遵循经典的“基因对基因”说学(Flor, 1971), 只有当病原菌的无毒基因与其相应的抗病基因相遇时才快速触发局部防卫反应, 进而抑制病原菌在侵染位点处的扩散并引发系统抗性(Dangl and Jones, 2001)。培育与种植抗病品种被认为是控制该病最经济、最有效的方法。然而, 由于频繁出现能够克服抗病基因的新的的小种, 使得获得的抗病品种只具有短期效应。对抗病基因选择压的适应性暗示着无毒基因将会更快速地演变以适应R基因的进化。植物抗病基因特异识别的压力促进了相应无毒基因通过等位基因间非同义突变的演化, 在此演化过程中, 无毒基因的适合度代价是通过其无毒功能的丧失, 以逃避相应抗病基因的识别(Yoshida et al., 2009)。

研究表明, 无毒基因可能由于全基因的缺失、移码框突变、非同义点突变、转座子插入等途径, 使得病原菌能够逃避寄主植物的识别而克服抗性(Fudal et al., 2009)。事实上, 尽管无毒基因在病原菌的适应性上具有至关重要的作用, 但抗病基因选择压下无毒基因的进化, 也被推定为影响着R-Avr最佳的互作模式(直接或间接互作)(Rouxel and Balesdent, 2010)。

3 问题与展望

尽管科研工作者已对植物病害及防控策略进行了很精细的研究, 但全球的农作物安全仍然经受着多种病原菌及害虫的危害(Xu et al., 2008)。植物病害的发生严重威胁着世界尤其是发展中国家的粮食安全。近年来, 真菌病原菌比较基因组学的发展, 极大地推进着新的效应子蛋白的鉴定以及这些蛋白毒性功能的预测(Westerink et al., 2004)。然而, 尚未从目前已经分离与鉴定的无毒基因间发现保守性很高或共有的同源序列; 该策略进一步应用具有一定的局限。况且, 很多真菌无毒基因的内在功能尚不清楚, 且效应子蛋白进入寄主细胞的转运模式仍然有待阐明。因此, 在无毒基因与抗性基因的

分子克隆的基础上, 加强无毒基因与抗性基因互作机制的研究, 将更有利于深入了解植物-病原菌协同进化的分子基础、系统剖析植物抗病途径, 这为开展新的植物病害防治策略提供理论依据。

作者贡献

第一作者汪文娟负责文献的查阅、分析、比较和总结, 并负责论文的写作; 汪聪颖、苏菁在论文的修改过程中起到重大作用; 陈深参与了论文的校对和定稿。本文通讯作者为朱小源。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家自然科学基金项目(31101403)、公益性行业科研专项(201203014)、现代农业产业技术体系建设专项(CARS-01-24, 粤财教[2009]356号); 广东省农业攻关项目(2009B020310010)、广东省农业科学院院长基金等资助。

参考文献

- Böhnert H.U., Fudal I., Diou W., Tharreau D., Notteghem J.L., Lebrun M.H., 2004, A putative polyketide synthase/peptide synthetase from *Magnaporthe grisea* signals pathogen attack to resistant rice, *Plant Cell*, 16(9): 2499-2513 <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.104.022715> PMID: 15319478 PMID: 520948
- Bolton M.D., van Esse H.P., Vossen J.H., de Jonge R., Stergiopoulos I., Stulemeijer I.J.E., van den Berg G.C.M., Borrás-Hidalgo O., Dekker H.L., de Koster C.G., de Wit P.J.G.M., Joosten M.H.A.J., and Thomma B.P.H.J., 2008, The novel *Cladosporium fulvum* lysin motif effector Ecp6 is a virulence factor with orthologues in other fungal species, *Mol. Microbiol.*, 69(1): 119-136 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06270.x> PMID:18452583
- Couch B.C., and Kohn L.M., 2002, A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae*, from *M. grisea*, *Mycologia*, 94(4): 683-693 <http://dx.doi.org/10.2307/3761719> PMID:21156541
- Dangl J.L. and Jones J.D.G., 2001, Plant pathogens and integrated defence responses to infection, *Nature*, 411: 826-833 <http://dx.doi.org/10.1038/35081161> PMID:11459065
- de Kock M.J.D., Brandwagt B.F., Bonnema G., de Wit P.J., and Lindhout P., 2005, The tomato Orion locus comprises a unique class of Hcr9 genes, *Mol. Breed.*, 15: 409-422 <http://dx.doi.org/10.1007/s11032-005-0386-8>
- de Wit P.J., 2007, How plants recognize pathogens and defend themselves, *Cell. Mol. Life Sci.*, 64: 2726-2732
- de Wit P.J., Mehrabi R., van den Burg H.A., and Stergiopoulos I., 2009, Fungal effector proteins: past, present and future, *Mol. Plant Pathol.*, 10(6): 735-747 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00591.x> PMID:19849781
- Dean R.A., Talbot N.J., Ebbole D.J., Farman M.L., Mitchell T.K., Orbach M.J., Thon M., Kulkarni R., Xu J.R., Pan H., Read N.K., Lee Y.H., Carbone I., Brown D., Oh Y.Y., Donofrio N., Jeong J.S., Soanes D.M., Djonovic S.,

- Kolomiets E., Rehmeier C., Li W., Harding M., Kim S., Lebrun M.H., Bohnert H., Coughlan S., Butler J., Calvo S., Ma L.J., Nicol R., Purcell S., Nusbaum C., Galagan J.E., and Birren B.W., 2005, The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*, *Nature*, 434: 980-986 <http://dx.doi.org/10.1038/nature03449> PMID:15846337
- Dixon M.S., Jones D.A., Keddie J.S., Thomas C.M., Harrison K., and Jones J.D.G., 1996, The tomato Cf-2 disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine-rich repeat proteins, *Cell*, 84(3): 451-459 [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81290-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81290-8)
- Ellis J.G., Rafiqi M., Gan P., Chakrabarti A., and Dodds P.N., 2009, Recent progress in discovery and functional analysis of effector proteins of fungal and oomycete plant pathogens, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 12(4): 399-405 <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2009.05.004> PMID:19540152
- Farman M.L., and Leong S.A., 1998, Chromosome walking to the *AVR1-CO39* avirulence gene of *Magnaporthe grisea*: Discrepancy between the physical and genetic maps, *Genetics*, 150(3): 1049-1058 PMID:9799257 PMCid:1460382
- Fitt B.D.L., Brun H., Barbetti M.J., and Rimmer S.R., 2006, World-wide importance of *Phoma* stem canker (*Leptosphaeria maculans* and *L.biglobosa*) on oilseed rape (*Brassica napus*), *European Journal of Plant Pathology*, 114: 3-15 <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-005-2233-5>
- Flor H.H., 1971, Current status of the gene-for-gene concept, *Annual Review of Phytopathology*, 9: 275-296 <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.py.09.090171.001423>
- Fudal I., Ross S., Brun H., Besnard A.L., Ermel M., Kuhn M.L., Balesdent M.H., and Rouxel T., 2009, Repeat-induced point mutation (RIP) as an alternative mechanism of evolution toward virulence in *Leptosphaeria maculans*, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(8): 932-941 <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-22-8-0932> PMID:19589069
- Fudal I., Ross S., Gout L., Blaise F., Kuhn M.L., Eckert M.R., Cattolico L., Bernard-Samain S., Balesdent M.H., and Rouxel T., 2007, Heterochromatin-like regions as ecological niches for avirulence genes in the *Leptosphaeria maculans* genome: map-based cloning of *AvrLm6*, *Mol. Plant Microbe Interact*, 20(4): 459-470 <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-20-4-0459> PMID:17427816
- Gout L., Fudal I., Kuhn M.L., Blaise F., Eckert M., Cattolico L., Balesdent M.H., and Rouxel T., 2006, Lost in the middle of nowhere: the *AvrLm1* avirulence gene of the Dothideomycete *Leptosphaeria maculans*, *Mol. Microbiol.*, 60(1): 67-80 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05076.x> PMID:16556221
- Haas B.J., Kamoun S., Zody M.C., Jiang R.H.Y., Handsaker R.E., and Cano L.M., 2009, Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen, *Phytophthora infestans*, *Nature*, 461: 393-398 <http://dx.doi.org/10.1038/nature8358> PMID:19741609
- Hammond-Kosack K.E., and Kanyuka K., 2007, Resistance genes (R Genes) in plants, In: Wiley J., and Sons (eds.), encyclopedia of life sciences, Chichester, UK, pp.1-21 <http://www.els.net> doi: 10.1002/9780470-01 5902.a0020119
- International Rice Genome Sequencing Project, 2005, The map-based sequence of the rice genome, *Nature*, 436: 793-800 <http://dx.doi.org/10.1038/nature03895> PMID:16100779
- Jia Y.L., McAdams S.A., Bryan G.T., Hershey H.P., and Valent B., 2000, Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance, *The EMBO Journal*, 19: 4004-4014 <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/19.15.4004> PMID:10921881 PMCid:306585
- Joosten M.H., Vogelsang R., Cozijnsen T.J., Verberne M.C., and de Wit P.J., 1997, The biotrophic fungus *Cladosporium fulvum* circumvents Cf-4-mediated resistance by producing unstable AVR4 elicitors, *Plant Cell*, 9(3): 367-379 <http://dx.doi.org/10.2307/3870488> PMID:9090881 PMCid:156924 <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.9.3.367>
- Kamoun S., 2007, Groovy times: filamentous pathogen effectors revealed, *Curr. Opin Plant Biol.*, 10(4): 358-365 <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2007.04.017> PMID:17611143
- Kang S., Sweigard J.A., and Valent B., 1995, The PWL host specificity gene family in the blast fungus *Magnaporthe grisea*, *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 8(6): 939-948 <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-8-0939> PMID:8664503
- Kruger J., Thomas C.M., Golstein C., Dixon M.S., Smoker M., Tang S., Mulder L., and Jones J.D.G., 2002, A tomato cysteine protease required for Cf-2-dependent disease resistance and suppression of autonecrosis, *Science*, 296: 744-747 <http://dx.doi.org/10.1126/science.1069288> PMID:11976458
- Li W., Wang B.H., Wu J., Lu G.D., Hu Y.J., Zhang X., Zhang Z.G., Zhao Q., Feng Q., Zhang H.Y., Wang Z.Y., Wang G.L., Han B., Wang Z.H., and Zhou B., 2009, The *Magnaporthe oryzae* avirulence gene *AvrPiz-t* encodes a predicted secreted protein that triggers the immunity in rice mediated by the blast resistance gene *Piz-t*, *Mol. Plant-Microbe Interact*, 22(4): 411-420 <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-22-4-0411> PMID:19271956
- Liu J.L., Wang X.J., Mitchell T., Hu Y.J., Liu X.L., Dai L.Y., and Wang G.L., 2010, Recent progress and understanding of the molecular mechanisms of the rice-*Magnaporthe oryzae* interaction, *Mol. Plant Pathol.*, 11(3): 419-427 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00607.x> PMID:20447289
- Luderer R., de Kock M.J., Dees R.H., de Wit P.J., and Joosten M.H., 2002a, Functional analysis of cysteine residues of ECP elicitor proteins of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum*, *Mol. Plant Pathol.*, 3(2): 91-95 <http://dx.doi.org/10.1046/j.1464-6722.2001.00095.x> PMID:20569313
- Luderer R., Takken F.L., de Wit P.J., and Joosten M.H., 2002b, *Cladosporium fulvum* overcomes Cf-2-mediated resistance by producing truncated AVR2 elicitor proteins, *Mol. Microbiol.*, 45(3): 875-884 <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03060.x> PMID:12139631
- Marmeisse R., van den Ackerveken G.F.J.M., Goosen T., de Wit

- P.J., and van den Broek H.W.J., 1993, Disruption of the avirulence gene *avr9* in two races of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* causes virulence on tomato genotypes with the complementary resistance gene *Cf9*, *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 6(4): 412-417 <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-6-412>
- Oliva R., Win J., Raffaele S., Boutemy L., Bozkurt T.O., Chaparro-Garcia A., Segretin M.E., Stam R., Schornack S., Cano L.M., van Damme M., Huitema E., Thines E., Banfield M.J., and Kamoun S., 2010, Recent developments in effector biology of filamentous plant pathogens, *Cellular Microbiology*, 12(6): 705-715 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01471.x> PMID:20374248
- Orbach M.J., Farrall L., Sweigard J.A., Chumley F.G., and Valent B., 2000, A telomeric avirulence gene determines efficacy for the rice blast resistance gene *Pi-ta*, *Plant Cell*, 12(11): 2019-2032 <http://dx.doi.org/10.2307/3871102> PMID:11090206 PMCID:152363 <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.12.11.2019>
- Parlange F., Daverdin G., Fudal I., Kuhn M.L., Balesdent M.H., and Blaise F., 2009, *Leptosphaeria maculans* avirulence gene *AvrLm4-7* confers a dual recognition specificity by the *Rlm4* and *Rlm7* resistance genes of oilseed rape, and circumvents *Rlm4*-mediated recognition through a single amino acid change, *Mol. Microbiol.*, 71(4): 851-863 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06547.x> PMID:19170874
- Rep M., Meijer M., Houterman P.M., Van Der Does H.C., and Cornelissen B.J.C., 2005, *Fusarium oxysporum* evades I-3-mediated resistance without altering the matching avirulence gene, *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 18(1): 15-23 <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-18-0015> PMID:15672814
- Rep M., van der Does H.C., Meijer M., van Wijk R., Houterman P.M., Dekker H.L., de Koster C.G., and Cornelissen B.J., 2004, A small, cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for I-3-mediated resistance in tomato, *Mol. Microbiol.*, 53(5): 1373-1383 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04177.x> PMID:15387816
- Ricardo O., Joe W., Sylvain R., Laurence B., Tolga O.B., Angela C.G., Eugenia S.M., Remco S., Sebastian S., Liliana M.C., Mireille V.D., Edgar H., Marco T., Mark J.B., and Sophien K., 2010, Recent developments in effector biology of filamentous plant pathogens, *Cellular Microbiology*, 12(6): 705-715 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01471.x> PMID:20374248
- Rohe M., Gierlich A., Hermann H., Hahn M., Schmidt B., Rosahl S., and Knogge W., 1995, The race-specific elicitor, *NIP1*, from the barley pathogen, *Rhynchosporium secalis*, determines avirulence on host plants of the *Rrs1* resistance genotype, *EMBO J.*, 14(17): 4168-4177 PMID:7556057 PMCID:394499
- Rooney H.C., Van't Klooster J.W., van der Hoorn R.A., Joosten M.H., Jones J.D., and de Wit P.J., 2005, *Cladosporium Avr2* inhibits tomato *Rcr3* protease required for *Cf-2*-dependent disease resistance, *Science*, 308(5729): 1783-1786 <http://dx.doi.org/10.1126/science.1111404> PMID:15845874
- Rouxel T., and Balesdent M.H., 2005, The stem canker (blackleg) fungus, *Leptosphaeria maculans*, enters the genomic era, *Mol. Plant Pathol.*, 6(3): 225-241 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00282.x> PMID:20565653
- Rouxel T., and Balesdent M.H., 2010, Avirulence Genes, In: Wiley J., and Sons(eds.), *Encyclopedia of Life Sciences*, Chichester, UK, pp.1-13 doi: 10.1002/9780470015902.a0021267, <http://dx.doi.org/10.1002/9780470015902.a0021267>
- Rouxel T., Grandaubert J., Hane J.K., Hoede C., van de Wouw A.P., Couloux A., Dominguez V., Anthouard V., Bally P., Bourras S., Cozijnsen A.J., Ciuffetti L.M., Degraeve A., Dilmaghani A., Duret L., Fudal I., Goodwin S.B., Gout L., Glaser N., Linglin J., Kema G.H.J.K., Lapalu N., Lawrence C.B., May K., Meyer M., Ollivier B., Poulain J., Schoch C.L., Simon A., Spatafora J.W., Stachowiak A., Turgeon B.G., Tyler B.M., Vincent D., Weissenbach J., Amsellem J., Quesneville H., Oliver R.P., Wincker P., Balesdent M.H., and Howlett B.J., 2011, Effector diversification within compartments of the *Leptosphaeria maculans* genome affected by repeat-induced point mutations, *Nat. Commun.*, 2: 202 doi: 10.1038/ncomms1189 <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms1189> PMID:21326234 PMCID:3105345
- Shabab M., Shindo T., Gu C., Kaschani F., Pansuriya T., Chintha R., Harzen A., Colby T., Kamoun S., and van der Hooft A.L., 2008, Fungal effector protein AVR2 targets diversifying defense-related Cys proteases of tomato, *Plant Cell*, 20(4): 1169-1183 <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.107.056325> PMID:18451324 PMCID:2390736
- Soumpourou E., Iakovidis M., Chartrain L., Lyall V., and Thomas C.M., 2007, The *Solanum pimpinellifolium Cf-ECP1* and *Cf-ECP4* genes for resistance to *Cladosporium fulvum* are located at the Milky Way locus on the short arm of chromosome 1, *Theor. Appl. Genet.*, 115(8): 1127-1136 <http://dx.doi.org/10.1007/s00122-007-0638-6> PMID:17874062
- Stergiopoulos I., and de Wit P.J., 2009, Fungal effector proteins, *Annu. Rev. Phytopathol.*, 47: 233-263 <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.phyto.112408.132637> PMID:19400631
- Stergiopoulos I., de Kock M.J., Lindhout P., and de Wit P.J., 2007, Allelic variation in the effector genes of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* reveals different modes of adaptive evolution, *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 20(10): 1271-1183 <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-20-10-1271> PMID:17918629
- Sweigard J.A., Carroll A.M., Kang S., Farrall L., Chumley F.G., and Valent B., 1995, Identification, cloning, and characterization of *PWL2*, a gene for host species

- specificity in the rice blast fungus, *Plant Cell*, 7(8): 1221-1233 <http://dx.doi.org/10.2307/3870097> PMID:7549480
PMCID:160946 <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.7.8.1221> PMID:7549480
- Takahashi J.S., Pinto L.H., and Vitaterna M.H., 1994, Forward and reverse genetic approaches to behavior in the mouse, *Science*, 264: 1724-1733 <http://dx.doi.org/10.1126/science.8209253> PMID:8209253
- Takken F.L., Luderer R., Gabriels S.H., Westerink N., Lu R., de Wit P.J., and Joosten M.H., 2000, A functional cloning strategy, based on a binary PVX-expression vector, to isolate HR-inducing cDNAs of plant pathogens, *Plant J.*, 24(2): 275-283 <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00866.x> PMID:11069701
- Thomma B.P., Bolton M.D., Clergeot P.H., and de Wit P.J., 2006, Nitrogen controls in planta expression of *Cladosporium fulvum* Avr9 but no other effector genes, *Mol. Plant Pathol.*, 7: 125-130 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1364-3703.2006.00320.x> PMID:20507433
- Thomma B.P., van Esse H.P., Crous P.W., and de Wit P.J., 2005, *Cladosporium fulvum* (syn. *Passalora fulva*), a highly specialized plant pathogen as a model for functional studies on plant pathogenic Mycosphaerellaceae, *Mol. Plant Pathol.*, 6(4): 379-393 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00292.x> PMID:20565665
- Tosa Y., Osue J., Eto Y., Oh H.S., Nakayashiki H., Mayama S., and Leong S.A., 2005, Evolution of an avirulence gene, AVR1-CO39, concomitant with the evolution and differentiation of *Magnaporthe oryzae*, *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 18(11): 1148-1160 <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-18-1148> PMID:16353550
- van den Burg H.A., Harrison S.J., Joosten M.H., Vervoort J., and de Wit P.J., 2006, *Cladosporium fulvum* Avr4 protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection, *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 19(12): 1420-1430 <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-19-1420> PMID:17153926
- van den Burg H.A., Westerink N., Francoijs K.J., Roth R., Woestenenk E., Boeren S., de Wit P.J., Joosten M.H., and Vervoort J., 2003, Natural disulfide bond-disrupted mutants of AVR4 of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* are sensitive to proteolysis, circumvent Cf-4-mediated resistance, but retain their chitin binding ability, *J. Biol. Chem.*, 278(30): 27340-27346 <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M212196200> PMID:12736265
- Van Esse H.P., Bolton M.D., Stergiopoulos I., de Wit P.J., and Thomma B.P., 2007, The chitin-binding *Cladosporium fulvum* effector protein Avr4 is a virulence factor, *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 20(9): 1092-1101 <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-20-9-1092> PMID:17849712
- Westerink N., Brandwagt B.F., de Wit P.J., and Joosten M.H., 2004, *Cladosporium fulvum* circumvents the second functional resistance gene homologue at the Cf-4 locus (Hcr9-4E) by secretion of a stable avr4E isoform, *Mol. Microbiol.*, 54: 533-545 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04288.x> PMID:15469522
- Xu X., Hayashi N., Wang C.T., Kato H., Fujimura T., and Kawasaki S., 2008, Efficient authentic fine mapping of the rice blast resistance gene *Pik-h* in the *Pik* cluster, using new *Pik-h*-differentiating isolates, *Mol. Breed.*, 22(2): 289-299 <http://dx.doi.org/10.1007/s11032-008-9175-5>
- Yang Q.Z., Lin F., Feng S.J., Wang L., and Pan Q.H., 2009, Recent progress on molecular mapping and cloning of blast resistance genes in rice (*Oryza sativa* L.), *Zhongguo Nongye Kexue (Scientia Agricultura Sinica)*, 42(5): 1601-1615 (杨勤忠, 林菲, 冯淑杰, 王玲, 潘庆华, 2009, 水稻稻瘟病抗性基因的分子定位及克隆研究进展, *中国农业科学*, 42(5): 1601-1615)
- Ye Q.J., Yang Y.J., Wang R.Q., Ruan M.Y., Zhou G.Z., Yao Z.P., and Li Z.Y., 2005, Avirulence genes in *Cladosporium fulvum*, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 13(1): 1-13 (叶青静, 杨悦俭, 王荣青, 阮美颖, 周国治, 姚祝平, 李治邈, 2005, 番茄叶霉菌无毒基因的研究进展, *分子植物育种*, 13(1): 1-13)
- Yoshida K., Saitoh H., Fujisawa S., Kanzaki H., Matsumura H., Yoshida K., Tosa Y., Chuma I., Takano Y., Win J., Kamoun S., and Terauchi R., 2009, Association genetics reveals three novel avirulence genes from the rice blast fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*, *Plant Cell*, 21(5): 1573-1591 <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.109.066324> PMID:19454732
PMCID:2700537
- Zeigler R.S., Tohme J., Nelson R., Levy M., and Correa F., 1994, Linking blast population analysis to resistance breeding; a proposed strategy for durable resistance. In: Zeigler R.S., Leong S., Teng P.S.(eds), *Rice Blast Disease*, CAB International, Wallingford, pp.267-292
- Zhang Z., Jiang H., Wang Y.L., and Sun G.C., 2011, Progress on avirulence genes of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*, *Yichuan Xuebao (Hereditas)*, 33(6): 591-600 (张哲, 姜华, 王艳丽, 孙国昌, 2011, 稻瘟菌无毒基因研究进展, *遗传学报*, 33(6): 591-600)