

## 辣椒疫霉 *RxLR19781* 效应分子原核表达纯化 及晶体生长条件的研选

方海珍<sup>1</sup>,赵立<sup>1</sup>,朱春原<sup>2\*</sup>

1. 山东农业大学植物保护学院, 山东 泰安 271018

2. 山东农业大学生命科学学院, 山东 泰安 271018

**摘要:** 辣椒疫霉 (*Phytophthora capsici*) 侵染寄主细胞常分泌 RxLR 效应蛋白分子, 效应蛋白对寄主细胞具干扰或破坏作用。为了深入开展辣椒疫霉 RxLR 效应蛋白分子功能特性机制的研究, 本文利用 PCR 技术分离鉴定了辣椒疫霉效应分子 *RxLR19781*, 以质粒 pET28a(+) 为表达载体、大肠杆菌 Rosetta (DE3) 为宿主, 利用 IPTG 诱导 *RxLR19781* 蛋白表达, 通过亲和层析、离子交换层析及分子筛层析纯化获得高纯度蛋白, 借助坐滴法培养优化获得 *RxLR19781* 蛋白晶体, X 射线衍射获得 2.76Å 的蛋白晶体数据, 以便解析 *RxLR19781* 蛋白三级结构, 有助立足 *RxLR19781* 蛋白三级结构探索效应分子 *RxLR19781* 功能机制特性, 为构建新型病害防控策略和培育持久抗病辣椒品种提供理论研究。

**关键词:** 辣椒疫霉菌; RxLR; 原核表达; 纯化; 晶体生长

**中图分类号:** S436.418.1+2

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-2324(2016)06-0801-06

## Study on the Expression, Purification and Crystal Growth of *RxLR19781* from *Phytophthora capsici*

FANG Hai-zhen<sup>1</sup>, ZHAO Li<sup>1</sup>, ZHU Chun-yuan<sup>2\*</sup>

1. College of Plant Protection/Shandong Agricultural University, Taian 271018, China

2. College of Life Sciences/Shandong Agricultural University, Taian 271018, China

**Abstract:** *Phytophthora capsici* secrete large amounts of RxLR effectors to interfere with host plant cell physiology. However, their functions and molecular mechanisms in the interactions of oomycetes with host plants remain obscure. To understand the roles of these RxLR effectors in the interactions between *P. capsici* and its host plants, the gene *RxLR19781* was cloned into pET-28a and expressed with IPTG in Rosetta (DE3). The target protein was purified through using a three-steps purification strategy including nicked affinity, Ion exchange chromatography (IEC) and size exclusion chromatography (SEC). The high purify protein and well-diffracted crystals were obtained, which laid a foundation for the analysis of the structure. The crystals were obtained by sitting drop method and we obtained 2.76Å diffraction data using X-ray. Elucidation of the structure of oomycete and fungal effector proteins and their roles in disease development will offer novel opportunities to understand how the pathogens manipulate host cells to establish a parasitic relationship and how to develop durable disease control measures.

**Keywords:** *Phytophthora capsici*; RxLR; expression; purification; crystal growth

植物病原卵菌主要包括疫霉菌、霜霉菌及腐霉菌, 其中疫霉菌有 80 多种, 多数为重要植物病原菌, 侵染寄主植物引起疫霉病发生与危害, 常给农业、林业和自然生态造成毁灭性破坏<sup>[1]</sup>。早期研究发现, 致病疫霉 (*Phytophthora infestans*)<sup>[2]</sup> 和大豆疫霉 (*Phytophthora sojae*)<sup>[3]</sup> 为毁灭性病菌, 常引起马铃薯晚疫病或大豆疫病爆发与流行, 严重影响了马铃薯和大豆的产量与效益。近 10 余年研究发现, 辣椒疫霉菌 (*Phytophthora capsici*) 也是一种重要的植物病原卵菌, 能侵染茄科 (辣椒、番茄)、葫芦科 (黄瓜、南瓜) 及豆类等多种农作物, 引起多种农作物疫霉病的发生与危害, 其中辣椒疫霉病频繁爆发与流行常给全世界辣椒生产造成巨大的经济损失<sup>[4]</sup>。此外, 辣椒疫霉菌可侵染模式植物拟南芥和本氏烟, 由此使辣椒疫霉菌成为研究卵菌与寄主互作的重要模式菌<sup>[5]</sup>。因此, 以辣椒疫霉菌为材料, 充分利用生物学、分子遗传学和蛋白结构生物学技术, 深入开展辣椒疫霉菌致病流行机制研究, 为研制作物疫病农业防治技术、化学防治技术和培育抗疫病作物新品种提供理论依据。

近年来, 基于若干植物抗病基因及其病菌无毒基因定位与克隆推动了寄主植物-病原菌识别机理

**收稿日期:** 2016-05-11

**修回日期:** 2016-08-20

**基金项目:** 国家自然科学基金青年基金(31500121);山东省优秀中青年科学家科研奖励基金(BS2015SW009)

**作者简介:** 方海珍(1992-),女,在读硕士研究生,研究方向:植物病原真菌学和真菌资源利用. E-mail:934955400@qq.com

**\*通讯作者:** Author for correspondence. E-mail:zhuchunyuan@sdau.edu.cn

的认识与理解<sup>[6]</sup>。随着对植物病原菌无毒基因作用机制的深入研究发现, 无毒基因编码的蛋白质易被寄主植物相应的抗病基因识别, 表现无毒性能, 但当寄主植物缺乏相应抗病基因, 使其不被寄主植物予以识别, 表现为毒性性能。

研究发现, 疫霉菌基因组含大量的 RxLRs 和 CRNs 效应分子, RxLRs 和 CRNs 是植物病原卵菌含有的两类胞内效应因子<sup>[7-9]</sup>。目前, 已分离鉴定的植物病原卵菌无毒基因多数归于 RxLR 效应蛋白家族, 这类蛋白家族成员数量繁多、氨基酸序列变化多样<sup>[6]</sup>。RxLR 效应因子 N-端多为保守的 RxLR 基序, 该基序负责将效应蛋白转运于宿主细胞<sup>[10,11]</sup>, RxLR 基序两侧的 30~60 个氨基酸具明显的保守性, 而 C-端区域氨基酸变异性较大, 后来的研究发现该区域具一定的 W、Y、L 保守域<sup>[12]</sup>。随着更多的植物病原菌全基因组测序, 将会有越来越多的效应因子被预测与鉴定。近年来, 植物病原菌效应蛋白三级结构解析及其蛋白结构功能生物学研究已成为分子植物病理学研究的热点科学问题, 解析具重要功能特性的效应蛋白分子三级结构, 利于探明效应分子对寄主细胞破坏作用或产生免疫防卫反应的分子机制, 为病害防控或抗病育种提供理论依据。

近来, 除开展有关植物病原菌效应蛋白结构解析其调控寄主细胞生理变化及其致病分子机制的信息积累外, 还解析了 7 个卵菌 RxLR 效应分子结构, 分别是 AVR3a4、PexRD2、AVR3a11、PexRD54、ATR1、ATR13 和 Avh5<sup>[13-18]</sup>, 有关植物病原卵菌效应蛋白分子结构生物学研究信息积累较少。

辣椒疫霉菌全基因组测序分析发现, 辣椒疫霉菌中含 350 余个候选 RxLR 效应分子<sup>[19]</sup>, 然而以辣椒疫霉菌 RxLR 效应分子为研究对象, 立足基因遗传操作技术和蛋白结构生物学技术, 开展 RxLR 效应分子对于辣椒疫霉菌与寄主互作中发挥调控作用的研究积累甚少。本研究从辣椒疫霉 SD33 菌株中克隆鉴定了 1 个辣椒疫霉效应分子 *RxLR19781*, 基于生物信息学比对分析, 正确预测了 *RxLR19781* 结构特征, 然后立足基因蛋白表达纯化技术, 获得了高纯度蛋白, 借助坐滴法优化培养获得 *RxLR19781* 蛋白晶体, 经 X-ray 衍射收集了一套 2.76 Å 的数据, 为后续解析该效应分子三维结构及其揭示其致病分子机理奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和载体

供试辣椒疫霉 (*P. capsici*) SD33 菌株为材料 (实验室保存); 大肠杆菌菌株 (*Escherichia coli*) Rosetta(DE3) 购买自北京全式金生物技术有限公司; 表达载体 pET-28a(+) 为 Novagen 公司产品。

### 1.2 辣椒疫霉 RxLR 效应分子基因克隆

1.2.1 引物设计 根据 *RxLR19781* 基因去信号肽序列和 pET-28a 特点, 采用 *NcoI* 和 *XhoI* 酶切位点, 设计一对特异性引物 RxLR19781-F: 5'-CATGCCATGGGCCTGTCGACACAAGCTGAC-3'; RxLR19781-R: 5'-ATAAGAATGCGGCCGCGTAAGGAAGTCCTTTCTTGT-3', 另在下游引物酶切位点后面去掉目的基因终止密码子以产生融合 his 标签融合蛋白, 引物由上海铂尚生物有限公司合成。利用 Signal IP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 数据库预测基因信号肽及其结构特征。

1.2.2 *RxLR19781* 基因 PCR 扩增 利用 CTAB 法提取 SD33 菌株总 DNA<sup>[20]</sup>, 以 SD33 总 DNA 为模板, 以 RxLR19781-F 和 RxLR19781-R 为引物扩增 *RxLR19781* 基因开放读码框。PCR 反应体系: 50 μL, 含 10x EasyTaq Buffer 5 μL, dNTP 4 μL, 引物 (10 μmol/L) 各 1 μL, 模板 DNA 2 μL, EasyTaq 酶 0.5 μL, 无菌水 36.5 μL。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 4 min, 按 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 30 s 进行 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min。

### 1.3 表达载体构建及鉴定

将上述 PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳, 用凝胶回收试剂盒回收目的条带, 分别用 *NcoI* 和 *NotI* 双酶切, 回收 PCR 产物和 pET-28a 表达载体, 酶切产物经纯化回收后, 用 Solution I 连接酶连接, 连接产物转化 *E. coli* 菌株 (DH5α), 通过 Kana 抗性筛选和菌液 PCR 鉴定后, 将阳性重组质粒命名为 19781-pET28a, 并送铂尚公司测序, 将测定序列与 JGI 上下游基因组中序列进行比对, 并分析融合基因表达的完整性。

## 1.4 *RxLR19781* 基因原核表达和蛋白纯化

1.4.1 重组质粒在宿主菌中表达 将测序正确的重组质粒 19781-pET28a 转化 Rosetta (DE3) 感受态细胞,挑取单菌落接种于 5 mL 含 Kana 的 LB 培养基中,于 37 °C 条件下 180 r/min 振荡培养 6 h,然后取 1 mL 培养液接种于 5 mL 新鲜的含 Kana 的 LB 培养基中培养 4 h,用终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 诱导表达,持续振荡培养 3 h。将 1 mL 培养液 12000 r/min 离心 1 min,弃掉上清,然后加入 40 μL 的 5x 样品缓冲液混匀,100 °C 加热 5 min 变性,12000 r/min 离心 1 min,取 20 μL 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳检测。

1.4.2 蛋白表达条件优化 在 37 °C 条件下,将含 19781-pET28a 重组质粒的 Rosetta (DE3) 培养至 OD<sub>600</sub> 约为 0.6,分别用终浓度为 0、0.1、0.3、0.5、0.7、0.9 和 1 mmol/L 的 IPTG 诱导目的蛋白表达 3 h 后取样,经 SDS-PAGE 电泳测定重组蛋白表达量,确定最佳表达条件,样品制备方法同 1.4.1。

1.4.3 目的蛋白的大量表达 将含有重组质粒 19781-pET28a 的宿主菌于 37 °C 下振荡培养 5 h,然后按 1:100 接种至 1 L 含 Kana 的 LB 培养基,37 °C 振荡培养至 OD<sub>600</sub>=0.6~0.8,按上述最佳优化条件表达,冷却至 16 °C,添加 IPTG 至最适浓度,培养 20 h,8000 r/min 离心 5 min 收集菌体用于蛋白纯化。

1.4.4 融合蛋白的纯化 将菌体重悬于 50 mL 裂解缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl pH8.5, 150 mmol/L NaCl) 中,加入 10% 甘油和 0.5% 吐温-20,超声破碎细胞,4 °C 14000 r/min 离心 30 min 后,去除细胞碎片。将上清液转至一个烧杯中挂柱。镍柱预先用 buffer A (20 mmol/L Tris-HCl pH8.5, 150 mmol/L NaCl, 40 mmol/L 咪唑) 平衡,挂完柱后,用 400 mL buffer A 洗杂蛋白,再用 buffer B (20 mmol/L Tris-HCl pH8.5, 150 mmol/L NaCl, 200 mmol/L 咪唑) 洗脱目的蛋白,然后用 10KD 截留量浓缩管,浓缩至 50 mL 以内。离子交换柱预先用 buffer C (20 mmol/L Tris-HCl pH8.5, 150 mmol/L NaCl) 和 buffer D (20 mmol/L Tris-HCl pH8.5, 600 mmol/L NaCl) 平衡,浓缩的蛋白上样,收集主要目标蛋白峰,将收集的蛋白继续浓缩至 1 mL 以内,分子筛预先用 buffer C 平衡,将再次浓缩的蛋白上样,收集主要目标峰蛋白,SDS-PAGE 检测纯度,并将蛋白用液氮保存于 -80 °C 下保存,以备培养晶体使用。

## 1.5 蛋白晶体培养

蛋白晶体生长条件筛选,采用坐滴气象扩散法,初次筛选采用 Hampton Research Crystal Screen I、Crystal Screen II、Salt RxTM1、PEG/Ion Screen TM、PEG/Ion 2 Screen TM、Index TM 和 Natrix TM 蛋白晶体生长试剂盒进行蛋白晶体筛选。采用 48 孔培养板,池液 180 μL,蛋白液和池液以 1:1 比例混合,用胶带密封,置于 16 °C 晶体培养箱,1 周后于显微镜下观察晶体生长情况,挑取已有的目的蛋白晶体,用液氮冻存,进行初步的 X 射线衍射分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 辣椒疫霉 *RxLR19781* 基因克隆及基因序列结构分析

辣椒疫霉 *RxLR19781* 基因序列分析如 (图 1),该基因全长 366 bp,编码 121 个氨基酸,预测分子量为 13.8KD。生物信息学分析表明,该基因氨基酸序列信号肽长度为 20 个氨基酸,其后为保守的 RxLR-dEER 序列。以基因组 DNA 为模板,用引物 RxLR19781-F 和 RxLR19781-R 扩增该基因去信号肽部分编码区序列,电泳检测结果 (图 2),表明扩增产物为 303 bp,与基因组中 *RxLR19781* 基因去信号肽部分大小一致。

### 2.2 *RxLR19781* 蛋白表达

将 PCR 产物回收,用 *Nco* I 和 *Not* I 双酶切并克隆到原核表达载体 pET-28a,阳性克隆命名为 19781-pET28a。以 RxLR19781-F 和 RxLR19781-R 为引物,用含有 19781-pET28a 重组质粒菌落 PCR 扩增约 303 bp 的特异性条带 (图 3),进行测序鉴定。利用 DNAMAN 软件进行序列比对,表明测序结果正确,原核表达载体构建成功。

重组质粒 19781-pET28a 转化大肠杆菌 Rosetta (DE3),通过对不同诱导剂浓度等表达条件优化,结果显示在 16 °C 条件下,经 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导宿主菌于 11 KD 处有大量蛋白表达 (图 4)。

10      20      30      40      50      60

```

1      ATGCGTTTCGCTTTCCTTCTGTTCTGTTGGCTGCAGTTTCCCTCATTGCTTCCGGCGACGCG
1      M R F A F L L F V A A V S L I A S G D A
          70      80      90      100     110     120
61     CTGTCGACACAAGCTGACGCCACAAGCCGCCATTGCGCTCTCACCACCAGACGAACACC
21     L S T Q A D A T S R H L R S H H Q T N T
          130     140     150     160     170     180
121    TACGACGCTGAAGAAGAAGAACGTGGTCTTGACAAATCCATTGTCAAGAGTCTCCCTGAA
41     Y D A E E E E R G L D K S I V K S L P E
          190     200     210     220     230     240
181    CAATTCAAGAACATGTACAAGTACCCTAGCAATATGGAGAATGTTCTCGAGTCATGGCGC
61     Q F K N M Y K Y P S N M E N V L E S W R
          250     260     270     280     290     300
241    ACGGGTCTTCAGTCGGTGGACGACGCTGTACATGAAGTCTCTTGGCATGGACTTC
81     T G L Q S V D D A V M Y M K S L G M D F
          310     320     330     340     350     360
301    GACGCTATCTGCACCTTGTGGACGCGTACCGGAAGCATATTAACAAGAAAGGACTTCTCT
101    D A I S H F V D A Y R K H I N K K G L P
361    TACTAA
121    Y *
    
```

图 1 辣椒疫霉效应分子RxLR19781氨基酸序列

Fig.1 Amino-acid sequence of *Phytophthora capsici* effector RxLR19781

阴影部分为信号肽氨基酸序列, \*为终止密码子。Amino acids within shady indicate the signal peptide, \*is terminal code

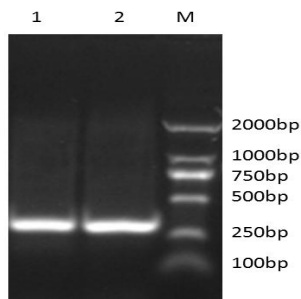


图 2 RxLR19781 基因 PCR 扩增结果

Fig.2 PCR amplification of RxLR19781

M:Marker; 1-2. PCR 产物 M:Marker; 1-2. PCR products of RxLR19781

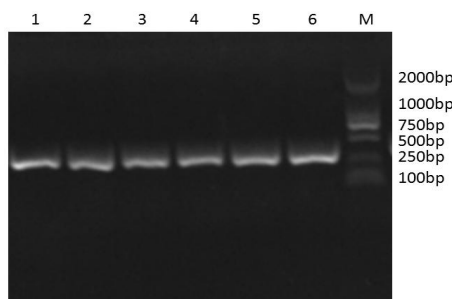


图 3 菌落 PCR 鉴定重组质粒

Fig.3 PCR analysis of recombinant plasmid 19781-pET28a

M:Marker; 1-6.含重组质粒 19781-pET28a 的菌落。M:Marker; 1-6. Positive colonies containing 19781-pET28a

## 2.2 RxLR19781 融合蛋白纯化及 SDS-PAGE 检测

RxLR19781 融合蛋白大量表达后收集菌体, 按方法 1.4.4 进行镍柱亲和层析, 各个阶段分别取样并进行 SDS-PAGE 电泳检测(图 5)。蛋白经层析柱 Q 柱层析后形成 1 个峰(图 6), 经层析柱 Superdex 200 Increase 10/300 GL 层析后形成一个单峰(图 7), 收集单峰蛋白并浓缩至 10 mg/mL, 用于检测和晶体优化生长。离子柱和分子筛层析后, 分部收集的蛋白用 SDS-PAGE 检测, 结果显示蛋白分子量为 13 KD(图 8), 与理论分子量基本一致, 其纯度为 95%。

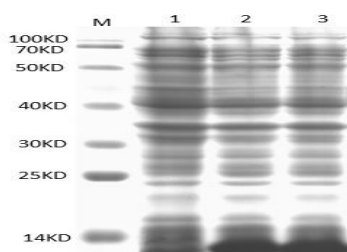


图 4 重组蛋白 19781-His 在 Rosetta (DE3) 中的表达  
Fig.4 SDS-PAGE analysis for the expression of 19781-His in Rosetta (DE3)

M:Marker; 1. 未诱导的 19781-pET28a; 2-3: 诱导的 19781-pET28a。  
M:Marker; 1. 19781-pET28a without IPTG; 2-3. 19781-pET28a with IPTG

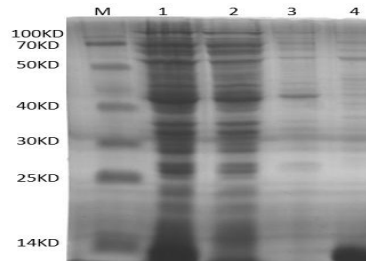


图 5 RxLR19781 蛋白经镍柱纯化后的 SDS-PAGE 电泳  
Fig.5 SDS-PAGE of the purification of the protein RxLR19781 using the Ni-column

M: Marker; 1.菌体裂解液上清; 2.结合镍柱介质后上清液残留;  
3.Buffer A 缓冲液冲洗镍柱后的液体; 4.Buffer B 缓冲液冲洗镍柱洗脱液。M:Marker; 1.Cleared lysate;2.Liquid through sepharose;3.Buffer A through Ni-NTA; 4.Buffer B through Ni-NTA

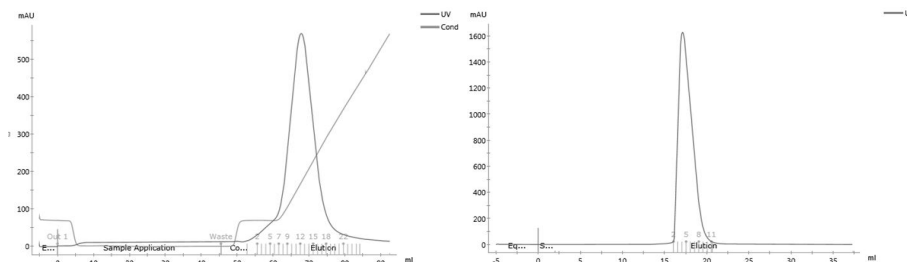
图 6 *RxLR19781* 蛋白离子交换层析纯化图 7 *RxLR19781* 蛋白分子筛层析纯化

Fig.6 Purification of *RxLR19781* protein with Ion exchange chromatography Fig.7 Purification of *RxLR19781* by size exclusion chromatography

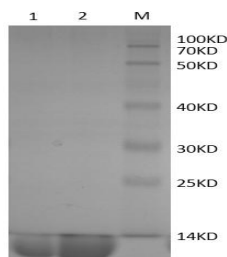
图 8 *RxLR19781* 蛋白经 Q 柱、分子筛纯化后的 SDS-PAGE 电泳

Fig.8 SDS-PAGE of the purification of the protein *RxLR19781* using the Q column and size exclusion chromatography  
M. Marker; 1. 离子柱峰收集浓缩; 2. 分子筛峰收集浓缩。M. Marker; 1. Elution peak of Q column ; 2. Elution peak of Superdex 200 Increase 10/300 GL chromatography

### 2.3 *RxLR19781* 蛋白晶体筛选及衍射数据收集

收集分子筛层析洗脱获得的目的蛋白, 浓缩并进行晶体初筛, 采用坐滴法 16 °C 生长 1 周后, 可观察到晶体生长 (图 9), 晶体生长条件: 0.03 M Citric acid, 0.07 M BIS-TRIS propane/pH 7.6, 20% PEG3350。然后将晶体送上海同步辐射光源进行了 X 衍射及数据收集和初步处理 (图 10)。目前由于还缺乏该蛋白晶体的相位信息, 后续正在试图进行该蛋白的硒代衍生物制备, 以期获得衍射效果好的硒代蛋白晶体, 并有望最终解析其三维结构。

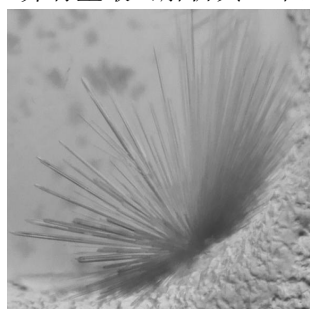
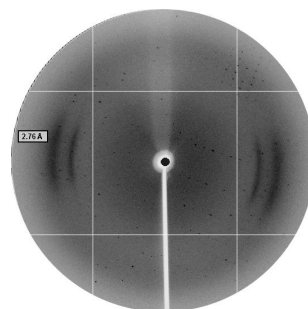
图 9 *RxLR19781* 蛋白晶体图 10 *RxLR19781* 晶体 X 射线衍射图

Fig.9 The crystals of the protein *RxLR19781* Fig.10 X-ray diffraction of the *RxLR19781* crystals

## 3 讨论

本研究选取了辣椒疫霉全基因组 1 个 *RxLR* 效应蛋白分子, 该基因在辣椒疫霉全基因组中序列号为 19781, 由此将其命名为 *RxLR19781*。本研究从参试辣椒疫霉菌 SD33 克隆鉴定了 *RxLR19781* 基因, 然后进行蛋白表达纯化, 获得高纯度蛋白, 晶体优化培养, 获得高质量的晶体, 综合分析本研究实验技术发现, 目的蛋白纯度大于 90% 以上, 适宜进行晶体筛选, 并利于成功获得蛋白晶体。本研究结果对后续开展硒代蛋白晶体培养, 以及 X 射线衍射分析提供了可靠的实验技术准备。在此基础上, 进一步的晶体优化和硒代培养, 有望解析其全长三维结构, 预期利于立足 *RxLR19781* 蛋白三维结构, 深入探讨辣椒疫霉效应分子蛋白与辣椒寄主互作的分子机制, 从而为设计植物抗疫病策略奠定理论基础。

尽管辣椒疫霉常危害茄科、葫芦科等多种作物, 给农业生产造成重大损失, 并且已有若干相关研究积累, 但目前对其致病分子机制了解甚少。普遍认为, 在侵染过程中, 疫霉通过表达一系列的效应分子 (如 CRN、*RxLR* 等) 对寄主防卫机制进行调控, 以成功侵染和定殖<sup>[21]</sup>, 但目前关于这些

效应分子的表达模式、功能和作用机制的研究尚待深入。

近年来卵菌 RxLR 效应蛋白与植物互作机理研究,已逐渐成为分子植物病理学研究热点科学问题,通过解析 RxLR 蛋白三维结构,立足蛋白三维结构特性,深入开展其功能机制研究,预期有望探明辣椒疫霉与植物互作的分子机制。因此,针对性的开展卵菌效应蛋白表达、纯化,获得高纯度蛋白及其晶体培养,获得高较高质量的晶体,为真正意义上解析其三级结构提供重要的技术准备,预期结果对于深入开展效应蛋白结构生物学具有重要的意义。

### 参考文献

- [1] Dou DL, Kale SD, Wang XL, *et al.* Conserved C-Terminal Motifs Required for Avirulence and Suppression of Cell Death by *Phytophthora sojae* effector Avr1b[J]. *Plant Cell*, 2008,20:1118-1133
- [2] Ristaino JB, Groves CT, Parra GR. PCR amplification of the Irish potato famine pathogen from historic specimens[J]. *Nature*, 2001,411(6838):695-697
- [3] Tyler BM. Genetics and genomics of the oomycete host interface [J]. *Trends in Genetics*, 2001,17(11):611-614
- [4] Lamour KH, Stam R, Jupe J, *et al.* The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*[J]. *Molecular plant Pathology*, 2012,13(4):329-337
- [5] Wang Y, Bouwmeester K, Van de Mortel JE, *et al.* A novel *Arabidopsis*-oomycete pathosystem: differential interactions with *Phytophthora capsici* reveal a role for camalexin, indole glucosinolates and salicylic acid in defence[J]. *Plant Cell and Environment*, 2013,36(6):1192-1203
- [6] 顾 彪.植物病原卵菌和真菌效应蛋白转运机制研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2012
- [7] Tyler BM, Tripathy S, Zhang XM, *et al.* *Phytophthora* genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis [J]. *Science*, 2006,313:1261-1266
- [8] Haas BJ, Kamoun S, Zody MC, *et al.* Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans* [J]. *Nature*, 2009,461:393-398
- [9] Lamour KH, Mudge J, Gobena D, *et al.* Genome sequencing and mapping reveal loss of heterozygosity as a mechanism for rapid adaptation in the vegetable pathogen *Phytophthora capsici*[J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 2012,25:1350-1360
- [10] Dou DL, Kale SD, Wang X, *et al.* RXLR-mediated entry of *Phytophthora sojae* effector Avr1b into soybean cells does not require pathogen-encoded machinery[J]. *Plant Cell*, 2008,20:1930-1947
- [11] Whisson SC, Boevink PC, Moleleki L, *et al.* A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells[J]. *Nature*, 2007,450:115-118
- [12] Win J, Morgan W, Bos J, *et al.* Adaptive evolution has targeted the C terminal domain of the RxLR effectors of plant pathogenic Oomycetes[J]. *Plant Cell*, 2007(19):2349-2369
- [13] Boutemy LS, King SR, Win J, *et al.* Structures of *Phytophthora* RXLR Effector Proteins: a conserved but adaptable fold underpins functional diversity[J]. *J Biol Chem* 2011,286:35834-35842
- [14] Yaeno T, Li H, Chaparro-Garcia A, *et al.* Phosphatidylinositol monophosphate-binding interface in the oomycete RXLR effector AVR3a is required for its stability in host cells to modulate plant immunity[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011,108:14682-14687
- [15] Maqbool A, Hughes RK, Dagdas YF, *et al.* Abbas Maqbool Structural Basis of Host Autophagy-related Protein 8 (ATG8) Binding by the Irish Potato Famine Pathogen Effector Protein PexRD54[J]. *J Biol Chem*, 2016,291(38):20270-20282
- [16] Chou S, Krasileva KV, Holton JM, *et al.* *Hyaloperonospora arabidopsidis* ATR1 effector is a repeat protein with distributed recognition surfaces[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011,108:13323-13328
- [17] Leonelli L, Pelton J, Schoeffler A, *et al.* Structural elucidation and functional characterization of the *Hyaloperonospora arabidopsidis* effector protein ATR13[J]. *PLoS Pathog*, 2011,7:e1002428
- [18] Sun FR, Kale SD, Azurmendi HF, *et al.* Structural basis for interactions of the *Phytophthora sojae* RxLR effector Avh5 with phosphatidylinositol 3-phosphate and for host cell entry [J]. *Mol. Plant-Microbe Interact*, 2013,26(3):330-344
- [19] Lamour KH, Mudge J, Gobena D, *et al.* Genome sequencing and mapping reveal loss of heterozygosity as a mechanism for rapid adaptation in the vegetable pathogen *Phytophthora capsici* [J]. *Mol. Plant-Microbe Interact*, 2012,25:1350-1360
- [20] Feng BZ, Li PQ. Molecular characterization and functional analysis of Nep1-like protein-encoding gene from *Phytophthora capsici*[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2013,12(2):1468-1478
- [21] Kamoun S. A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2006,44:41-60