

非寄主植物烟草中与大豆疫霉菌激发素 互作蛋白质的筛选

高保利^{1,2}, 孙果忠², 马 青¹, 朱振东², 王晓鸣²

(1 西北农林科技大学 植物保护学院 陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西 杨凌 712100;

2 中国农业科学院 作物科学研究所/国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程, 北京 100081)

【摘 要】【目的】采用酵母双杂交技术, 从非寄主植物烟草中筛选与大豆疫霉菌类激发素 PSE7 和激发素 SO-JB 互作的蛋白。【方法】以 PGBKT7-PSE7 和 PGBKT7-SOJB 为诱饵质粒筛选烟草 cDNA 文库, 得到的阳性克隆经测序后, 在 NCBI 上进行 Blast 分析。【结果】PSE7 和 SOJB 在烟草中存在几个相似的结合蛋白, 表明二者具有共享的生物学功能; SOJB 能与肽酶和泛素结合蛋白(与蛋白质降解有密切关系)互作, 而 PSE7 没有筛选到类似蛋白; SOJB 和 PSE7 均能与跨膜运输蛋白结合, PSE7 与水通道蛋白结合, SOJB 与铜离子转运蛋白结合, 表明二者在胞质内均存在作用靶标。【结论】PSE7 和 SOJB 最终分别从烟草中筛选出 9 和 13 个阳性互作蛋白。

【关键词】大豆疫霉菌; 激发素; 酵母双杂交系统; 烟草; 蛋白质筛选

【中图分类号】S565.103.53

【文献标识码】A

【文章编号】1671-9387(2009)04-0173-06

Screening of proteins interacting with *Phytophthora sojae* elicitors in tobacco using yeast two-hybrid system

GAO Bao-li^{1,2}, SUN Guo-zhong², MA Qing¹, ZHU Zhen-dong², WANG Xiao-ming²

(1 College of Plant Protection, Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Northwest A&F University,

Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 The National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement,

Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: 【Objective】Proteins interacted with *Phytophthora sojae* elicitors were screened from tobacco using yeast two-hybrid system. 【Method】The tobacco cDNA was screened with bait plasmid PGBKT7-PSE7 and PGBKT7-SOJB. Positive yeast clones were selected and sequenced, then analyzed with Blast in NCBI. 【Result】PSE7 and SOJB had the similar binding proteins in tobacco, suggesting that they may share some similar biological functions. The ubiquitin-conjugating protein and peptidase involved in protein degradation were found binding with SOJB but not PSE7. Both SOJB and PSE7 could bind with transmembrane transport protein, SOJB bound with copper transporter protein, and PSE7 bound with water channel protein. The results suggested that the target of SOJB and PSE7 may be located in cytoplasm. 【Conclusion】The results indicated that 11 proteins were interacted with PSE7 and 14 proteins interacted with SOJB.

Key words: *Phytophthora sojae*; elicitor; yeast two-hybrid system; tobacco; protein screen

由大豆疫霉菌(*Phytophthora sojae* Kaufmann et Gerdemann)引起的疫霉根腐病是大豆生产的毁灭性病害, 严重威胁我国大豆生产安全。

* [收稿日期] 2008-05-19

[基金项目] 国家“973 计划”重点基础研究项目(2002CB114); 教育部长江学者和创新团队发展计划项目(200558); 高等学校学科创新引智计划项目(B07049)

[作者简介] 高保利(1983—), 男, 陕西汉中, 在读硕士, 主要从事大豆疫霉菌非寄主抗性研究。E-mail: gaolmj@yahoo.com.cn

[通信作者] 王晓鸣(1957—), 男, 四川都江堰人, 研究员, 主要从事种质资源抗病性鉴定评价及玉米和大豆病害研究。

E-mail: wangxm57@sina.com

灭性病害^[1]。在我国,继沈崇尧等^[2]在东北首次发现 *P. sojae* 以来,又陆续在黄淮海和长江中下游等大豆产区发现了该菌的存在,其对我国大豆生产造成了重大威胁^[3]。种植抗病品种是控制大豆疫霉根腐病最经济和有效的措施,但由于大豆疫霉菌小种具有高度变异性,使得品种的抗性极易丧失^[1]。疫霉菌在侵染植物的过程中,通常会分泌大量的效应因子。依据生物功能,这些效应因子可分为促进病菌侵染的致病因子和触发植物产生防御反应的激发子两大类^[4]。近年来,随着许多非小种特异的病原菌激发子诱导植物抗病性的发现,人们开始从更深层次认识植物本身具有的抗性潜力。非寄主抗性研究有望为解决农作物单基因控制的抗性不持久问题提供新的途径。

对基因组已经测序的几个物种所进行的预测表明,疫霉菌中所含的激发子数量可能有数百个^[5],对这些激发子功能的解析,将会大大提高人们对疫霉菌致病机制的认识。从系统进化角度分析,激发素(Elicitin)是典型的 B 类群激发子^[6],它只存在于疫霉属(*Phytophthora*)及与之亲缘关系接近的少数腐霉菌(*Pythium*)中,可以诱导非寄主烟草产生过敏性坏死和系统获得抗性反应^[7-8]。激发素也是目前已知的疫霉菌中对寄主无诱导抗性作用,而对非寄主烟草有诱导抗性作用的激发子,它可能具有决定非寄主抗性的无毒基因的功能^[9],可以解释属水平上的非寄主抗性^[10]。此外,还发现激发素的一些其他生物学功能,如诱导细胞坏死和作为甾醇载体蛋白与甾醇(如麦角固醇)结合等^[11]。基因组和表达序列标签(EST)序列的测定,加速了对激发素基因家族的鉴定,截止 2006 年 9 月,GenBank 中已经公布的激发素和类激发素序列已达 171 条(www.ncbi.nlm.nih.gov/)。对类激发素的功能研究也逐步引起人们的重视,研究表明,这些分子可能调节疫霉菌与烟草的互作,如马铃薯晚疫病菌(*Phytophthora infestans*)的 INF2A 和 INF2B 在诱导不同烟草品种叶片坏死反应的强度、特异性和一致性上存在很大差异,这种差异可能与马铃薯晚疫病菌(*P. infestans*)在不同烟草上的反应有密切关系^[12]。

在非寄主烟草中寻找激发素和类激发素的结合蛋白,是阐明激发素作用机理的关键环节。目前在烟草中已经找到了一些与激发素具有高亲和性的蛋白质和脂类分子^[13],但尚不清楚这些分子是否参与了激发素诱导的坏死和抗性反应。酵母双杂交是目前研究蛋白与蛋白互作的主要方法之一。在植物抗

病反应过程中,无论是最初的信号识别还是其后的信号传递,都离不开蛋白与蛋白之间的相互作用。因此,酵母双杂交技术日益成为研究植物与病原菌互作的重要工具^[14]。本试验基于对大豆疫霉菌激发素基因家族的克隆及其表达产物在烟草叶片上的反应研究结果,类激发素 PSE7 不能引起烟草叶片明显坏死,而激发素 SOJB 可以引起烟草叶片坏死,于是采用酵母双杂交技术,在烟草中筛选与激发素 SOJB 和类激发素 PSE7 互作的蛋白,以期为深入研究非寄主烟草对大豆疫霉菌的抗性机理提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

含有大豆疫霉菌类激发素基因 PSE7 (CF848768)和激发素基因 SOJB (AY183409)的入门质粒由本实验室构建,普通烟草(*Nicotiana tabacum* L.)K326 由中国农业科学院作物资源抗病虫鉴定及检疫实验室保存。RNA 提取试剂 Trizol 与高保真的 *Taq* 酶购自 TaKaRa 公司,酵母双杂交构建试剂盒 Matchmaker™ Library Construction & Screening Kits 购自 Clontech 公司,PCR 产物纯化与质粒提取试剂盒购自 Tiangen 公司。

1.2 诱饵质粒的构建

用 BioXM2.0 软件分析诱饵载体 PGBKT7 的酶切位点,依据编码激发素成熟肽的 DNA 序列设计含有 *EcoR* I (GAATTC)和 *Bam*H I (GGATCC)酶切位点的引物。PSE7 的引物序列为 F:5'-CCG AAT TCG AGG CCT GCA CGG G-3'和 R:5'-CGG GAT CCT TAG CAG GCT CCG CCA GGC ACC-3',SOJB 的为 F:5'-CCG AAT TCA CGG CCT GCA CG-3'和 R:5'-CGG GAT CCT TAG AGC GAC GCG CAC TTG-3'。以含有 PSE7 和 SOJB 的入门质粒为模板,利用高保真的 *Taq* 酶进行 PCR 扩增。扩增产物经 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测,回收目的片段,并用 *EcoR* I、*Bam*H I 双酶切后,与经同样双酶切的诱饵载体 PGBKT7 连接,连接产物转化大肠杆菌 TOP 10。对转化子进行 PCR 鉴定和 DNA 测序,提取质粒,-20℃保存备用。

1.3 诱饵质粒转录特性及毒性的检测

以 PGBKT7 为对照,对于每个转化反应,将制备的诱饵质粒(521 μg/mL)1 μg、变性的线形鲑鱼精 DNA 100 μg,与用 LiAc 方法新制备的酵母感受态细胞 100 μL 混合进行共转化,方法参照试剂盒说明。吸取转化后的细胞,在带有相应营养选择标记

的 SD/-Trp/X- α -Gal 培养基上涂布,30 ℃ 培养 2~5 d 后观察结果。如果转化克隆为白色且在 SD/-His/-Trp 或 SD/-Ade/-Trp 培养基上不生长,表明诱饵蛋白不能单独转录激活报告基因的表达。从 SD/-Trp 取一个 2~3 mm 的克隆,放入 50 mL SD/-Trp/Kan(50 μ g/mL)液体培养基中,30 ℃ 下 250 r/min 振荡培养 16~24 h,测定培养物 OD₆₀₀ 值,若 OD 值明显小于 0.8,则该融合蛋白对酵母细胞有毒性。

1.4 烟草 RNA 的提取及 cDNA 的合成与纯化

对温室生长 6 周的烟草叶片进行总 RNA 提取,方法参考试剂盒说明。变性后的 RNA 用 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测完整性,紫外分光光度计测量纯度和质量浓度。利用 Oligo (dT)引物合成第一链 cDNA,取 2 μ L cDNA 做模板进行 LD-PCR。利用 CHROMA SPINTMTE-400 柱纯化 ds cDNA,取 5 μ L PCR 产物进行 10 g/L TBE 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 酵母双杂交文库的建立和筛选

将 10 μ L 诱饵质粒、20 μ L 烟草 ds cDNA 和 6 μ L 线性化的 pGADT7-Rec 载体(0.5 μ g/ μ L)加入到 800 μ L 的酵母感受态细胞中进行共转化,同时用小量酵母转化方法构建对照体系,方法参照试剂盒说明。将共转化的混合物在 SD/-His/-Leu/-Trp 和 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 培养基上涂布,30 ℃ 暗培养至菌落出现。将生长在 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 培养基上的菌落转移至 SD/-His/-Leu/-Trp+X- α -Gal 培养基上,30 ℃ 暗培养观察其是否变蓝,若菌落变蓝则可视其为阳性克隆。将烟草 cDNA 文库中与 SOJB 互作的菌落编号为 YB,与 PSE7 互作

的编号为 YE。

1.6 挽救文库 cDNA 的插入片段及测序分析

利用 AD 载体上的引物 5' LD Amplimer (5'-CTA TTC GAT GAT GAA GAT ACC CCA CCA AAC CC-3') 和 3' LD Amplimer (5'-GTG AAC TTG CGG GGT TTT TCA GTA TCT ACG ATT-3') 进行菌落 PCR,扩增文库的插入片段。将 PCR 产物带型相似的 AD/library insert 归为一组。10 g/L TAE 电泳后回收条带,用 *Alu* I 内切酶消化 PCR 产物,酶切后的产物在 20 g/L TBE 琼脂糖凝胶上电泳分析带型,将带型相似的归为一类。回收和纯化 PCR 产物,连接 PGM-T 测序载体后转化大肠杆菌,选择白色重组菌落进行 PCR 鉴定,对包含目标片段的菌落进行测序,测序结果在 GenBank 中进行 Blast 比对。

1.7 蛋白质互作的再次验证

筛选出的候选蛋白需要进行再次验证,具体方法是:依据测序结果,提取含候选目标片段的 AD 质粒,分别将 AD 质粒、含 PSE7 和 SOJB 的 BD 质粒转化酵母菌株 AH109 与 Y187。对含 AD 质粒的酵母菌 AH109 和含 BD 质粒的酵母菌 Y187 进行杂交,逐个对筛选到的目标蛋白和激发素蛋白互作进行再次验证。

2 结果与分析

2.1 诱饵质粒的构建与评价

利用含 *Eco*R I 和 *Bam*H I 酶切位点的引物,在含有 SOJB 和 PSE7 基因的入门质粒中分别扩增出了与预期相符的 475 和 306 bp 片段(图 1)。

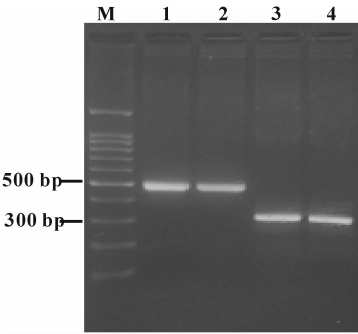


图 1 含激发素基因质粒的 PCR 扩增结果
M, 100 bp Marker; 1, 2, PSE7; 3, 4, SOJB
Fig.1 PCR amplification of elicitor gene SOJB and PSE7 in plasmid

回收的目的片段与 PGBKT7 的连接产物转化大肠杆菌 TOP 10 后,对阳性转化子的 PCR 检测也

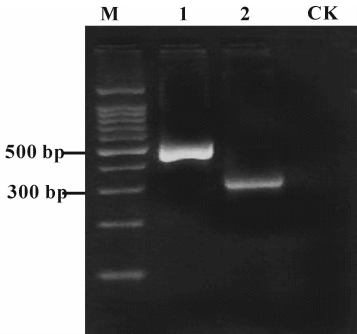


图 2 激发素 PSE7 和 SOJB 阳性转化子的 PCR 检测结果
M, 100 bp Marker; 1, PSE7; 2, SOJB; CK, PGBKT7 vector
Fig.2 PCR identification of elicitor gene PSE7 and SOJB in positive Top 10 transformants

同样扩增出预期片段,而对照无扩增条带(图 2)。诱饵质粒 PGBKT7-PSE7 和 PGBKT7-SOJB 的

DNA 测序结果也与预期一致。将含有诱饵质粒的酵母转化子在 SD/-Trp/X- α -Gal 上培养 5 d 后,出现直径大于 2 mm 的白色菌落,在 SD/-Ade/-Trp/X- α -Gal 和 SD/-His/-Trp/X- α -Gal 上培养 5 d 后未见菌落生长,表明两个诱饵质粒不能单独激活报告基因。含诱饵质粒 PGBKT7-PSE7、PGBKT7-SOJB 和空载体 PGBKT7 的酵母转化子在培养 16 h 后,其 OD₆₀₀ 分别为 1.531,1.529 和 1.633,表明两个诱饵蛋白对酵母菌株 AH 109 无毒性。

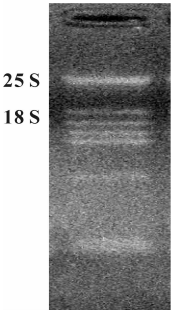


图 3 提取烟草总 RNA 的电泳结果

Fig. 3 Electrophoresis of total RNA from tobacco

2.3 互作蛋白的筛选

SOJB 和 PSE7 最终筛选到的阳性克隆分别为 63 和 184 个。以 AD 载体上的筛选引物筛选文库中的 cDNA 插入片段(图 5),对带型相似的回收片段进行 *Alu* I 内切酶分析(图 6),结果表明,4 组相似片段酶切后,只有 YB11 和 YB15 酶切后带型相同,其余 3 组带型则完全不同。将酶切后带型不同的片段分别回收,克隆测序后去除部分相同结果,最

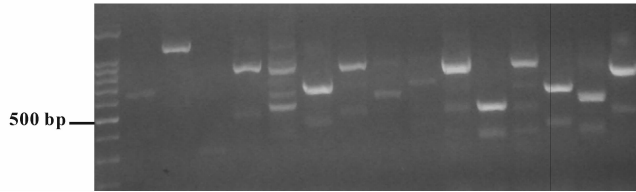


图 5 经 PCR 从双杂交文库中筛选的烟草 cDNA 部分插入片段的电泳结果

Fig. 5 Part of rescue the library cDNA inserts of tobacco by PCR

2.4 序列比对和蛋白功能分析

通过在 NCBI 上进行 Blastx 比对,PSE7 和 SO-

2.2 烟草 RNA 的提取及 ds cDNA 的扩增

紫外分光光度计测定烟草 RNA 的质量浓度为 712 μ g/mL; A_{280} 、 A_{260} 与 A_{230} 的比值接近 1 : 2 : 1,表明样品纯度好。电泳结果(图 3)显示,提取的烟草 RNA 条带完整,25 S 的亮度约为 18 S 的 2 倍。LD-PCR 扩增得到的烟草 ds cDNA 在 10 g/L TBE 琼脂糖凝胶上的电泳结果(图 4)显示,片段大小主要集中在 0.5~5 kb,在 1.0 kb 附近有一条明显的特征带,符合构建文库的要求。

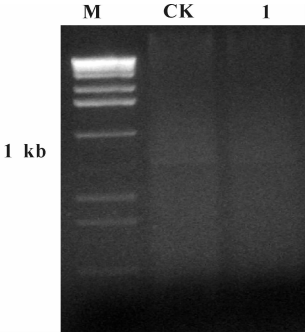


图 4 烟草 ds cDNA 的电泳结果

M, 1 kb DNA ladder;CK, 人胎盘组织;1. 烟草

Fig. 4 Electrophoresis of ds cDNA from tobacco

M, 1 kb DNA ladder;CK, Human placenta;1. Tobacco

终 SOJB 和 PSE7 各得到 16 和 17 个片段。利用含候选蛋白质粒(AD)的 AH109,与含激素 PSE7、SOJB 质粒(BD)的 Y187 酵母杂交的方法,对筛选到的目标蛋白和激素蛋白的互作进行了再次验证,结果表明,含 AD 和 BD 质粒的杂合酵母菌在 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X-a-Gal 培养基上均能长出蓝斑,说明本试验筛选到的候选蛋白是真正可以与激素互作的蛋白。

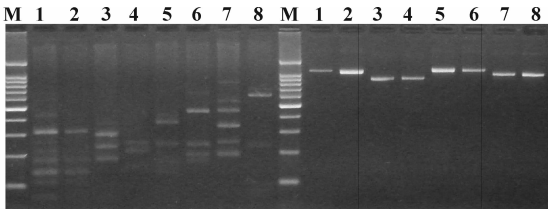


图 6 大小相似的 PCR 产物经 *Alu* I 酶切后的电泳结果
左边 1~8 是酶切后的结果,右边 1~8 是酶切前的结果;M. Marker;
1. YB11;2. YB15;3. YB8;4. YB25;5. YB26;6. YB46;7. YB1;8. YB44

Fig. 6 The disgration patterns of PCR product digested by *Alu* I
Left:1-8 digested by *Alu* I ;Right:1-8 not digested by *Alu* I ;M. Marker;1. YB11;2. YB15;3. YB8;4. YB25;
5. YB26;6. YB46;7. YB1;8. YB44

JB 分别从烟草中筛选出 9 个和 13 个互作的蛋白质(表 1)。根据比对结果可以看出,与激素互作的

蛋白主要是与光合作用、呼吸作用、跨膜运输、信号传导以及基因表达调控相关的蛋白。SOJB 和 PSE7 在烟草中都筛选出与植物光合作用有关的蛋白,如与 PSE7 互作的叶绿素 a-b 结合蛋白,与 SOJB 互作的捕光色素蛋白复合体,表明 SOJB 和 PSE7 可能共享某些生物功能。在烟草中存在与

PSE7、SOJB 互作的与跨膜运输相关的结合蛋白,其中 PSE7 与水通道蛋白结合,SOJB 与铜离子转运蛋白结合。本研究还发现了 2 个与激激素 SOJB 结合的与蛋白质降解有关的蛋白:泛素结合蛋白(ubiquitin-conjugating protein, UBC)和肽酶(peptidase),它们可能与 SOJB 诱导的叶片坏死有关。

表 1 测序得到的序列经 Blastx 的比对结果

编号 Name	登陆号 AC	描述 Description	同源性/% Homology
YE2	gi 115781	叶绿素 a-b 结合蛋白 16,叶绿体前体 Chlorophyll a-b binding protein 16, chloroplast precursor	100
YE3	gi 11465960	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶亚基 J NADH dehydrogenase subunit J	100
YE44	gi 12643758	核酮糖二磷酸羧化酶/加氧活性酶 2 Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase 2	100
YE47	gi 125550503	假定蛋白 OsL_017445 Hypothetical protein OsL_017445	71
YE59	gi 2114046	水通道蛋白 Water channel protein	98
YE86	gi 30013657	氧复合体;光系统 II Oxygen evolving complex 33 ku photosystem II	98
YE90	gi 115805	叶绿素 a-b 结合蛋白 40,叶绿体前体 Chlorophyll a-b binding protein 40, chloroplast precursor	99
YE93	gi 42568932	未知蛋白 Unknown protein	69
YE100	gi 78102516	ATP 酶 α 亚基 ATPase alpha subunit	100
YB1	gi 1167484	转录因子 Transcription factor	59
YB2	gi 30013663	假定的核酮糖二磷酸羧化酶小亚基蛋白 Putative ribulose bisphosphate carboxylase small subunit protein	100
YB8	gi 3036951	集光叶绿素 a-b 结合蛋白 Light harvesting chlorophyll a/b-binding protein	98
YB11	gi 21536494	未知蛋白 Unknown protein	79
YB18	gi 113205289	亮氨酸拉链蛋白 Leucine zipper protein, putative	72
YB21	gi 73696164	中性歧化酶 Neutral invertase	95
YB25	gi 53850085	假定蛋白 Hypothetical protein	79
YB26	gi 18406603	未知蛋白 Unknown protein	66
YB42	gi 1082054	铜离子转运蛋白 Copper transporter protein	52
YB44	gi 40457328	谷氨酰胺合成酶 Glutamine synthetase GS58	100
YB46	gi 42562269	肽酶焦谷酰胺肽酶 Peptidase/ pyroglutamyl-peptidase I	69
YB60	gi 40287568	泛素结合蛋白 Ubiquitin-conjugating protein	97
YB62	gi 113205286	富精氨酸/丝氨酸剪接因子 Arginine/serine-rich splicing factor RSP41, putative	81

3 讨 论

本研究通过酵母双杂交技术,在烟草中筛选出与大豆疫霉菌激激素和类激激素互作的蛋白,这为阐明激激素的作用机理提供了有益信息。

本研究获得了水通道蛋白、铜离子转运蛋白、泛素结合蛋白、亮氨酸拉链蛋白、光合作用相关蛋白等成分,它们可能参与了跨膜运输、蛋白质修饰/加工、基因表达调控、能量代谢和光合作用等生命过程。SOJB 和 PSE7 均能与跨膜运输蛋白结合,其中 PSE7 与水通道蛋白结合,SOJB 与铜离子转运蛋白

结合,表明二者可能通过跨膜通道进入胞内发挥生物功能。Bourque 等^[13]采用 I 标记方法在烟草中找到了隐地疫霉(*Phytophthora cryptogea*)激激素 cryptogein 的结合蛋白,该蛋白位于细胞膜上,属于 Ca²⁺ 通道蛋白,这意味着激激素和类激激素在烟草的细胞内存在着作用靶标。SOJB 在烟草中筛选到了与蛋白质降解有关的 2 个蛋白:泛素结合蛋白和肽酶,它们可能与 SOJB 诱导的叶片坏死有关, Bos 等^[15]和 Kanzaki 等^[16]研究表明, *P. infestans* 的 Avr3a^{K1}激发的由 R3a 介导的烟草过敏性坏死反应和 INF1 诱导的过敏性坏死反应,均需要蛋白质降

解信号分子 SGT1,而 PSE7 没有从烟草中筛选到类似蛋白。PSE7 在烟草中筛选到了脱氢酶,而 SOJB 没有筛选到类似蛋白;因为 PSE7 没有引起烟草叶片坏死,这表明脱氢酶可能与烟草叶片坏死有关,但具体关系有待于进一步研究。SOJB 还能同与基因表达调控有关的蛋白结合,如亮氨酸拉链蛋白和转录因子。本研究中激发素 SOJB 和 PSE7 都筛选到了与植物光合作用有密切关系的蛋白,这说明激发素在与烟草互作时可能会影响其光合作用。

本研究通过酵母双杂交系统,对激发素与烟草互作的蛋白进行了初步探讨,虽然不能代表全部互作蛋白,但从这些信息中可以粗略地了解与激发素互作的蛋白种类。为了更系统、更详尽地了解激发素与烟草互作过程中发生的信号交流,对候选蛋白进行 RNA 干扰,验证其功能的工作正在进行中。

[参考文献]

[1] Schmitthenner A F. Problems and progress in control of *Phytophthora* root rot of soybean [J]. Plant Disease,1985,69:362-368.

[2] 沈崇尧,苏彦纯. 中国大豆疫病的发现及初步研究 [J]. 植物病理学报,1991,21(4):298.

Shen C Y,Su Y C. Discovery and preliminary studies of *Phytophthora megasperma* on soybean in China [J]. Acta Phytopathologica Sinica,1991,21(4):298. (in Chinese)

[3] 朱振东,王化波,王晓鸣,等. 中国大豆疫霉菌分布及毒力多样性研究 [J]. 中国农业科学,2003,36(7):793-799.

Zhu Z D,Wang H B,Wang X M,et al. Distribution and virulence diversity of *Phytophthora sojae* in China [J]. Scientia Agricultura Sinica,2003,36(7):793-799. (in Chinese)

[4] Van't S,Knogge. A dual role for microbial pathogen-derived effector proteins in plant disease and resistance [J]. Critical Reviews in Plant Science,2002,21:229-271.

[5] Kamoun S. A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes [J]. Annual Review of Phytopathol, 2006, 44:41-60.

[6] Jiang R H,Dawe A L,Weide R. Elicitin genes in *Phytophthora infestans* are clustered and interspersed with various transposon-like elements [J]. Molecular Genetics and Genomics,2006,

273(1):20-32.

[7] Kamoun S,Young M,Glascock C B,et al. Extracellular protein elicitors from *Phytophthora*: host-specificity and induction of resistance to bacterial and fungal phytopathogens [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions,1993,6:15-25.

[8] Pernollet J C,Sallantin M,Salle T M. Elicitins isoforms from seven *Phytophthora* species;comparison of their physico-chemical properties and toxicity to tobacco and other plant species [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology,1993,42:53-67.

[9] Nespoulous C,Gaudemer O,Huet J,et al. Characterization of elicitin like phospholipases isolated from *Phytophthora capsici* culture filtrate [J]. FEBS Letters,1999,52:400-406.

[10] Kamoun S. Nonhost resistance to *Phytophthora*: novel prospects for a classical problem [J]. Current Opinion in Plant Biology,2001(4):295-300.

[11] Boissy G,O'Donohue M,Gaudemer O,et al. The 2.1 Å structure of an elicitin-ergosterol complex;a recent addition to the sterol carrier protein family [J]. Protein Science,1999,8:1191-1199.

[12] Huitema E,Vleeshouwers V G A,Cakir C,et al. Differences in intensity and specificity of hypersensitive response induction in *Nicotiana* spp. by INF1,INF2A, and INF2B of *Phytophthora infestans* [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2005,18(3):183-193.

[13] Bourque S,Binet M N,Ponchet M,et al. Characterization of the cryptogein binding sites on plant plasma membranes [J]. Journal of Biological Chemistry,1999,274:34699-34705.

[14] Brachmann R K,Boeke J D. Tag games in yeast;the two-hybrid system and beyond [J]. Current Opinion in Biotechnology,1997,8(5):561-568.

[15] Bos J I B,Kanneganti T D,Young C,et al. The C-terminal half of *Phytophthora infestans* RXLR effector AVR3a is sufficient to trigger R3a-mediated hypersensitivity and suppress INF1-induced cell death in *Nicotiana benthamiana* [J]. The Plant Journal,2006,48(2):165-176.

[16] Kanzaki,Saitoh,Kamoun,et al. Cytosolic HSP90 and HSP70 are essential components of INF1-mediated hypersensitive response and non-host resistance to *Pseudomonas cichorii* in *Nicotiana benthamiana* [J]. Molecular Plant Pathology,2003,4:383-391.