

小麦条锈菌萌发夏孢子 cDNA 文库中 编码分泌蛋白的序列预测

薛晓丹¹, 屈志鹏¹, 王晓杰¹, 张永红¹, 李国田¹, 黄丽丽¹, 康振生^{1,2}

(1 西北农林科技大学 植保学院, 陕西 杨凌 712100; 2 陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] 【目的】植物与病原菌互作过程中, 涉及许多可以与植物受体蛋白相互识别、引发植物防卫反应的病原菌激发子或其他致病因子, 其中多数为分泌蛋白, 深入研究分泌蛋白将有助于明确植物与病原微生物互作的分子机制。【方法】通过 SignalP v3.0、TMHMM v2.0、TargetP v1.1、Protcomp v6.0 4 个软件, 对陕西省农业分子生物学重点实验室构建的小麦条锈菌萌发夏孢子 cDNA 文库中 854 条 EST 序列进行分泌蛋白预测。【结果】得到具有可溶性分泌信号肽的蛋白编码序列 33 条, 占测定序列的 3.86%, 其中最小长度为 196 bp, 最大为 1 096 bp, 分泌信号肽切割位点基本位于 15~42 个氨基酸, 平均为 37 个氨基酸。【结论】预测得到的分泌蛋白编码序列, 可以作为小麦与条锈菌互作过程中的激发子和致病因子备选基因来进一步研究。

[关键词] 小麦条锈菌; 分泌蛋白; 信号肽; 预测软件

[中图分类号] S435.121.4⁺2; Q785

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2009)02-0105-07

Prediction secreted proteins from cDNA library of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*

XUE Xiao-dan¹, QU Zhi-peng¹, WANG Xiao-jie¹, ZHANG Yong-hong¹,
LI Guo-tian¹, HUANG Li-li¹, KANG Zhen-sheng^{1,2}

(1 College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Key Lab of Agricultural Molecular Biology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】There are many pathogen elicitors and pathogenetic factors which can be recognized by plant receptors or trigger HR during the interaction between plant and pathogen, most of which are secreted proteins. It would facilitate clarification of the molecular mechanism by researching on these secreted proteins during the interaction between plant and plant pathogens. 【Method】These secreted proteins were predicted according to the ESTs sequences, which were from cDNA library of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, by a set of prediction algorithms including SignalP, TargetP, TMHMM and Protcomp. 【Result】Finally, 33 ESTs were predicted to be secreted proteins. The minimum length of the sequence was 196 bp, and the maximum was 1 096 bp. 【Conclusion】These predicted sequences encoding secreted proteins could be used as candidate genes of pathogen elicitors and pathogenetic factors during the interaction between wheat and *P. striiformis* f. sp. *tritici*. This result proposed a new approach of identifying pathogen elicitors and pathogenetic factors in the interaction between plant and pathogen and it also established groundwork for understanding the structure and function of pathogen elicitors and pathogenetic factors of

* [收稿日期] 2008-04-11

[基金项目] 国家“973”前期专项(2006CB708208); 国家重点基础研究发展规划项目(2006CB100203); 农业部行业计划项目(2008326001); 教育部长江学者和创新团队发展计划项目(IRT0558); 高等学校学科创新引智计划项目(B07049)

[作者简介] 薛晓丹(1984—), 女, 陕西商洛人, 在读硕士, 主要从事植物分子病理学研究。E-mail: xuexiaodan521@163.com

[通信作者] 康振生(1957—), 男, 四川安岳人, 教授, 博士生导师, 主要从事病原物与寄主植物互作的细胞学和分子生物学研究。E-mail: kangzs@nwsuaf.edu.cn

P. striiformis f. sp. *tritici* as well as unveiling the molecular mechanism during the interaction between wheat and *P. striiformis* f. sp. *tritici*.

Key words: *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*; secreted protein; signal peptide; prediction algorithm

小麦条锈病是小麦生产上最重要的真菌病害,选育与合理利用抗病品种是控制小麦条锈病经济、安全、有效的途径。然而,由于小麦条锈菌(*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*)毒性变异,往往引起小麦品种抗条锈性的丧失而导致条锈病流行,造成严重的产量和经济损失。因此,揭示条锈菌的毒性变异与致病机理,对于寻找小麦条锈病防治的新策略,及抗病品种的合理利用具有重要的理论和实际意义。

在植物与病原菌相互作用的过程中,涉及许多信号分子的识别与传导,其中很重要的一部分是能与植物受体蛋白相互识别、引发植物防卫反应的激发子或其他致病因子。已有研究认为,马铃薯晚疫病菌(*Phytophthora infestans*)INFI^[1]、豇豆锈病病菌(*Uromyces vignae*)小种 1 号产生的特异性激发子^[2]为分泌蛋白;许多无毒基因和致病基因编码产物就是分泌蛋白,如亚麻锈菌无毒基因 *AvrL567*^[3]的编码产物就包含信号肽序列^[4];同样,稻瘟菌无毒基因 *Avr Pita* 和 *Pwl2*^[5],同属于 *AvrBs3* 家族的水稻白叶枯病菌的无毒基因 *Avr Xa7*、*Avr Xa5* 和 *Avr Xa10*^[6],大豆疫霉病菌无毒基因 *Avr1b*^[7]等所编码的蛋白也都具有信号肽。大量研究表明,病原菌的激发子与致病相关因子要分泌到胞外,才可以被植物受体蛋白所识别^[2]。在分泌蛋白跨膜及最终转运至膜外,并与植物受体蛋白识别的过程中,信号肽起着极为重要的作用^[4]。这些无毒基因具有信号肽的特性,表明该基因编码产物可能参与植物激发子受体识别或识别后的信息传递^[8]。许多病原菌的细胞壁降解酶类致病因子也多为分泌蛋白,如稻瘟菌的木聚糖酶 XYN22 和 XYN33^[9],以及侵染拟南芥的白粉病菌(*Erysiphe cichoracearum*)果胶裂解酶 *Pmr6*^[10]等;还有其他致病相关基因,如稻瘟菌致病基因 *Gas1* 和 *Gas2*^[11]、疏水性蛋白基因 *Mpg1*^[12]等所编码的产物,也都是分泌蛋白。

发现并分离克隆新基因始终是分子生物学研究的主要任务和目的,小麦条锈菌萌发夏孢子非均一化 cDNA 文库的建立,为发现和研究小麦与条锈菌互作过程中的新基因提供了一种新途径^[13]。通过各种方法对该类序列进行数据挖掘,能够更加有效地利用 cDNA 文库,并为进一步的基因功能分析及

验证提供帮助。

基于分泌蛋白具有氨基末端信号肽的特征,Torto 等^[14]及陈继圣等^[15]分别大规模预测了疫霉菌和稻瘟菌的分泌蛋白。因此,本研究利用生物信息学预测软件,对小麦条锈菌萌发夏孢子 cDNA 文库中的序列进行分析,预测其中可能的分泌蛋白编码序列,获得潜在的、可能编码病原菌激发子或致病因子的相关基因,以期全面掌握条锈菌的激发子和致病因子的结构与功能,以及揭示小麦与条锈菌相互作用的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

西北农林科技大学植保学院植物与病原物互作实验室采用 SMART 技术构建了小麦条锈菌萌发夏孢子的非均一化 cDNA 文库,对 6 000 个随机挑选的克隆从 5' 端测序,获得 4 798 条有效 EST 序列。4 798 条有效 EST 序列经过质量控制和拼接后得到 315 个 contigs 和 803 个 singletons,共 1 118 个一致序列。对 1 118 个一致序列进行功能注释,451 个可以在 NCBI 的 NR 数据库中找到最佳匹配序列,其中明确功能的有 264 个,与已知序列同源但功能未知的有 187 个;其余的 667 个没有注释信息。约 75% 的一致序列在数据库中没有对应的匹配序列或对应匹配序列功能未知。

本研究对小麦条锈菌萌发夏孢子 cDNA 文库中 187 个与已知序列同源但功能未知,以及其余 667 个没有注释信息的序列进行预测分析。

1.2 方法

1.2.1 分泌蛋白的特征 信号肽一般由 15~60 个氨基酸残基组成,包含亲水的 N 区、疏水的 H 区和存在信号肽酶切位点的 C 区等 3 个结构域。信号肽酶切位点是由 -3 和 -1 位上的氨基酸残基决定的。信号肽在引导蛋白质穿膜时,净电荷为正电荷的 N 区首先与带负电荷的膜磷脂层结合,随后 H 区在膜中形成环状结构。当该结构被解开时,成熟蛋白通过信号肽酶酶切在 C 区的位点与信号肽分开并穿过膜。过膜后的成熟蛋白折叠形成自身构型,而留在膜内的信号肽被降解^[16]。因此,通过对蛋白序列中 N 端信号肽的分析,就可初步判断某个蛋白是否

为分泌蛋白。

与植物病原菌互作有关的病原菌分泌蛋白应该具有以下特征^[15]: (1) N 端信号肽; (2) 没有除信号肽外的跨膜结构域; (3) 没有将蛋白输送至线粒体或其他胞内细胞器的预测定位信号; (4) 分泌至胞外。满足以上 4 个标准的可认为是分泌蛋白编码基因。

1.2.2 预测软件 (1) SignalP v3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/>)。SignalP v3.0 是基于神经网络(Neural net-work, NN)和隐马可夫模型(Hidden Markov, HMM)2 种算法预测蛋白质信号肽的软件。前者能够对信号肽的分泌途径以及切割位点进行预测; 后者主要是对该氨基酸序列是否具有信号肽进行分析和预测, 同时也对信号肽切割位点及分布进行预测^[17]。

该软件可以在线提交序列, 直接以 FASTA 格式输入单条或多条氨基酸序列, 同时支持本地上传的以 FASTA 格式存储的文档, 一次最多可以处理 2 000 条序列(少于 200 000 个氨基酸)。根据预测生物类型不同, 选择真核细胞、革兰氏阳性菌或革兰氏阴性菌, 同时预测方法、图表类型、输出格式等均根据不同用户需要而进行选择。每次预测时间与提交的序列数量有关。SignalP v3.0 分析获得预测蛋白的 C、S 和 Y 的最大值, 以及位于 N 端和被预测的剪切位点间 S 曲线的中间值, 用以区分信号肽和非信号肽。信号肽剪切位点位于所预测的含信号肽蛋白之 Y 曲线的最大值处。当预测蛋白的 S 值大

于 0.6 及 HMM 值大于 0.8, 则预测其为分泌蛋白(SP); 当预测蛋白的 S 值小于 0.25 及 HMM 值小于 0.1 时, 则为非分泌蛋白(SP-)。如果预测方式选择 2 种同时进行, 2 种算法的结果均会输出, 一般选择 2 种算法的交集作为预测结果。

(2) TMHMM v2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)。TMHMM v2.0 用于预测蛋白的跨膜结构域。该软件同 SignalP v3.0 均属于 CBS 预测软件库, 所以界面非常相似, 提交方法也一样。输出格式包括 1 个图片和文本列表。图片直观显示预测结果, 如果有明显红色区域, 则表示该区域可能是跨膜结构(图 1); 文本列表中包括预测序列的长度、预测跨膜结构域的个数、跨膜结构内部螺旋所包含氨基酸数、蛋白质序列前 60 个氨基酸中属于跨膜区的氨基酸数。完整的输出文本中还详细列出了每一个跨膜区的起始位置。

分泌蛋白和膜蛋白都含有信号肽序列, 所不同的是分泌蛋白在信号肽之外不再有疏水的跨膜区, 信号肽引导分泌蛋白跨膜穿梭之后, 信号肽酶在相应位点将信号肽切除, 以此完成成熟分泌蛋白的分泌过程; 而膜蛋白在信号肽之外还有 1 个以上的疏水跨膜区, 信号肽在引导膜蛋白跨膜时, 由于疏水跨膜区的存在使膜蛋白停留在细胞膜中^[18]。因此, 对于具有 2 个以上跨膜结构域的蛋白就认为不具分泌信号肽。

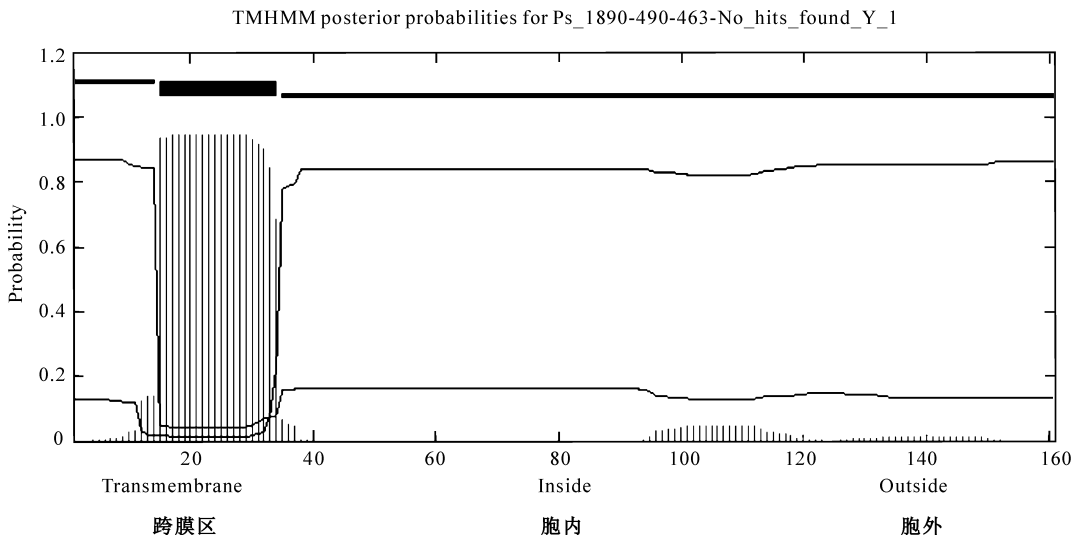


图 1 TMHMM v2.0 软件示例: 只含 1 个跨膜域

Fig. 1 TMHMM v2.0 output example: the number of predicted transmembrane helices=1

(3) TargetP v1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP-1.1/>)。由于在真核细胞中, 分泌

蛋白的分泌目标有可能是胞内细胞器, 而非胞外间质。由于本文希望得到的与植物病原菌互作有关的

分泌蛋白都是分泌至胞外起作用的,因而进一步以 TargetP v1.1 程序对蛋白质序列的分泌途径及分布位置进行预测,以排除非胞外分泌蛋白。

该软件主要通过预测分析植物已知序列 N 末端的前导链中线粒体的靶标肽段(MTP)以及具有分泌途径的信号肽(SP),从而确定该蛋白是否具有信号肽分泌途径。用法与 SignalP v3.0、TMHMM v2.0 一样,都是在线方式以 FASTA 格式输入预测序列,输出结果将蛋白定位归属于线粒体、叶绿体、胞外分泌以及其他亚细胞定位的预测得分以表格形式列出,分值最高的部位即为蛋白分泌目标,如果定位为胞外分泌途径,则能进一步确定该信号序列为穿膜信号肽。

(4) Protcomp v6.0 (<http://softberry.com/berry.phtml/>)。亚细胞定位预测基于如下原理:

Seq name: Ps122-1052-1022-rust_transferred_protein-Y_2, Length=351					
Significant similarity by DBSCAN-P - NONE					
Predicted by Neural Nets - Extracellular (Secreted) with score 2.3					
Integral Prediction of protein location: Extracellular (Secreted) with score 2.3					
Location weights:	LocDB /	PotLocDB /	Neural Nets /	Pentamers /	Integral
Nuclear	0.0 /	0.0 /	0.72 /	0.79 /	1.52
Plasma membrane	0.0 /	0.0 /	1.62 /	0.18 /	1.80
Extracellular	0.0 /	0.0 /	2.25 /	0.09 /	2.34
Cytoplasmic	0.0 /	0.0 /	0.71 /	0.00 /	0.71
Mitochondrial	0.0 /	0.0 /	0.72 /	0.42 /	1.14
Endoplasm. retic.	0.0 /	0.0 /	0.70 /	0.00 /	0.70
Peroxisomal	0.0 /	0.0 /	1.16 /	0.00 /	1.16
Lysosomal	0.0 /	0.0 /	0.26 /	0.00 /	0.26
Golgi	0.0 /	0.0 /	0.40 /	0.00 /	0.40

图 2 Protcomp v6.0 软件示例:胞外分泌型
Fig. 2 Protcomp v6.0 output example;Extracellular(Secreted)

2 结果与分析

2.1 SignalP v3.0 蛋白质信号肽的预测

分析表明,神经网络(NN)算法预测该 EST 库中 854 条序列中具有分泌蛋白信号肽的序列有 55 个,占 6.44%,隐马可夫模型(HMM)算法预测的具有分泌蛋白信号肽的序列为 653 个,占 76.46%。比较 2 种算法的分析结果,前者分析具有信号肽,而后者分析不具有信号肽的蛋白有 8 个,反之则有 606 个。因此,同时满足上述 2 种算法具有分泌信号肽的蛋白有 47 个。

2.2 TMHMM v2.0 蛋白质跨膜结构域的预测

从 TMHMM v2.0 程序蛋白跨膜结构域分析结果可以看出,该 47 个蛋白中,有 14 个信号肽含有 2 个或多个跨膜域,11 个只含有 1 个跨膜域,22 个信

①不同的细胞器往往具有不同的理化环境,它根据蛋白质的结构及表面理化特征选择性容纳蛋白。
②蛋白质表面直接暴露于细胞器环境中,它由序列折叠过程决定,而后者取决于氨基酸组成。因此,可以通过氨基酸组成进行亚细胞定位预测。

Protcomp v6.0 用于对动物或真菌中的蛋白进行亚细胞定位,它可将蛋白按以下归属进行划分:细胞核、质膜、胞外分泌、细胞质、线粒体、内质网、过氧化物酶体、溶酶体和高尔基体(图 2)。该软件界面同前面 3 个不同,但基本输入方法仍然是 FASTA 格式,其通过神经网络模型算法、积分预测、实时数据库同源比对等方式进行预测,列表输出定位于各个位置的得分,并且给出 3 种方式预测值最高的结果,即可确认该蛋白质的亚细胞定位位点。

号肽则不含跨膜域;其中所预测的 11 个只含 1 个跨膜域的信号肽中,其跨膜域都位于 N 端开始的 40 个氨基酸以内。由于 TMHMM 程序可能无法将信号肽序列和跨膜结构域区分开,因此,所预测的 22 个不含跨膜域的推测蛋白和 11 个含有单个跨膜域的蛋白(共 33 个),都可初步推断为分泌蛋白。

2.3 TargetP v1.1 蛋白质分泌途径的预测

使用 TargetP v1.1 对初步推测为分泌蛋白的序列继续分析发现,该 33 个预测的分泌蛋白均具有分泌途径的信号肽(SP)。

2.4 Protcomp v6.0 蛋白质亚细胞定位的预测

进一步以 Protcomp v6.0 程序分析含信号肽、具有 1 个及以下跨膜结构域、具有分泌途径信号肽的 33 个氨基酸序列。结果表明,共有 14 个信号肽分泌至胞外,8 个转运至细胞质膜,4 个传输至线粒

体,5 个转运至细胞核,2 个定位至内质网。

综合以上 4 种算法软件,对小麦条锈菌萌发夏孢子 cDNA 文库中 187 个与已知序列同源但功能未知,以及其余 667 个没有注释信息的序列进行预测发现,同时满足这 4 种软件、具可溶性分泌信号肽的蛋白编码序列 33 条,占测定序列的 3.86%,其中最小长度为 196 bp,最大为 1 096 bp,分泌信号肽切割位点基本位于 15~42 个氨基酸,平均为 37 个氨基酸(表 1)。这 33 条序列在氨基酸序列比对以及核苷酸序列比对中均无相似性。

表 1 预测的 33 个编码分泌蛋白序列的相关信息

Table 1 Information about 33 predicted sequences encoding secreted protein

文库中序列编号 Number	长度/bp Length	GC 含量/% GC	信号肽剪切位点(AA) Signal cleave site	GenBank 索引号 GenBank number
Ps7	547	44.05	33~34	ES321938
Ps31	1 096	45.34	35~36	ES321962
Ps79	1 072	51.58	31~32	ES322010
Ps212	1 068	48.87	31~32	ES322143
Ps230	719	49.65	21~22	ES322161
Ps267	587	43.78	18~19	ES322198
Ps286	919	45.91	15~16	ES322217
Ps309	730	37.39	22~23	ES322240
Ps_488	434	41.47	22~23	ES322775
Ps_1441	310	34.19	32~33	ES322311
Ps_1890	490	46.73	30~31	ES323041
Ps_1966	220	36.81	21~22	—
Ps_2029	245	40.81	30~31	—
Ps_2287	207	36.23	19~20	—
Ps_2335	247	40.08	30~31	—
Ps_2769	458	49.34	22~23	ES322477
Ps_2803	360	45.27	22~23	ES322482
Ps_2871	695	50.64	26~27	ES322494
Ps_3171	277	37.54	35~36	ES322534
Ps_3498	255	31.76	25~26	ES322569
Ps_3522	239	41.00	30~31	—
Ps_3703	215	35.81	17~18	ES322611
Ps_4205	214	35.51	19~20	—
Ps_4312	397	42.06	34~35	ES322699
Ps_4469	240	38.33	28~29	—
Ps_4643	248	40.32	36~37	ES322755
Ps_4649	196	34.69	26~27	ES322757
Ps_5001	267	40.82	26~27	ES322793
Ps_5190	371	48.78	41~42	ES322828
Ps_5507	277	37.90	28~29	ES322872
Ps_5612	212	35.84	19~20	—
Ps_5877	576	47.91	29~30	ES322934
Ps_5970	216	36.11	19~20	—

3 讨 论

单纯以试验手段捕获生物中重要蛋白,并进一步深入研究是十分有限的。通过生物信息学的手段,可以高通量地获悉生物中某一类型的重要蛋白,并在此基础上进一步分选以获得感兴趣的蛋白,因此它是一种快速而有效的方法。有关预测蛋白结构和功能的软件已经被证实十分有效。近年来,生物信息学提供了相当数量且可信度较高的网络软件,供用户在互联网上对序列进行相应分析。迄今为

止,SignalP、TargetP、TMHMM、Protcomp 等,已被成功地用于蛋白质序列的分析和预测。Lee 等^[13]首先用 SignalP v2.0 分析了假丝酵母(*Candida albicans*)中 47 个已知分泌蛋白和 47 个已知的非分泌蛋白,预测结果与试验结论一致,并进一步用 SignalP v2.0、TargetP 等程序分析了酵母全基因组所有 6 165 个开放阅读框的编码产物,其中 283 个 ORF 编码分泌蛋白;Torto 等^[14]用 SignalP v2.0 分析了马铃薯晚疫病菌的 2 147 个表达标签序列(EST),结果 261 个 EST 预测为分泌蛋白编码基

因,进一步分析发现,2个是能诱导番茄抗病反应的分泌蛋白 Cm1 和 Cm2。这些结果充分证明,本研究采用的信号肽预测、跨膜螺旋和亚细胞器蛋白定位等数据库预测是高效而精确的。

但是由于这些预测程序是根据大多数分泌蛋白的序列特征来进行预测的,因此其精确度无法达到 100%,存在判断偏差的可能性,会出现一些已经被证明是分泌蛋白的序列,由于其结构上不具有分泌蛋白的典型特征,从而被预测软件剔除掉的现象。因而,在进行信号肽的分析时,首先,应该采用多种策略、利用多个软件对目标序列进行筛选,一般采用 2~4 个软件,以保证预测结果的准确性。其次,由于信号肽特征在不同生物中存在一定差异,利用软件对其进行分析时,一定要注意研究对象的生物类型。最后,由于本实验室采用 SMART 技术构建的小麦条锈菌萌发夏孢子的非均一化 cDNA 文库中均为 EST 序列,它是从已建好的 cDNA 库中随机取出 1 个克隆,从 5'末端或 3'末端对插入的 cDNA 片段进行单向测序,所获得的约 60~500 bp 的一段 cDNA 序列,所以 EST 序列较短,包含信息不完整,并不完全是全长序列,而有些基于全长预测的软件无法对其进行准确预测。所以,单靠软件来预测未知功能基因是否为分泌蛋白的方法是不完全可靠的,还要结合试验加以佐证。

因此在后续研究中,根据预测出分泌蛋白编码序列开展研究时,首先,对序列完整性进行判断,如果是全长序列,则可以设计相应的试验来验证其功能,进行功能基因组学分析;如果该序列不完整,则要通过电子克隆、RACE 等技术获得全长序列,再进行功能分析,以期得到编码小麦条锈菌的激发子和致病因子的相关基因。

4 结 论

已报道的真菌分泌蛋白多数与其致病性关系密切,因此进一步分析分泌蛋白的分泌转运特点及其功能,将有助于加深了解植物病原菌的致病机理。本研究通过生物信息学方法,对小麦条锈菌萌发夏孢子 cDNA 文库中未知功能的序列是否编码分泌蛋白进行了预测,得到 33 条具有可溶性分泌信号肽的蛋白编码序列,预测得到的分泌蛋白编码序列可以作为研究小麦与条锈菌互作过程中的激发子和致病因子的备选基因。在此基础上深入研究分泌蛋白组学,将有助于全面掌握条锈菌的激发子和致病因子的结构与功能,为揭示小麦与条锈菌相互作用的

分子机制奠定基础。

[参考文献]

- [1] Kamoun S, van West P, Vleeshouwers V G, et al. Resistance of *Nicotiana benthamiana* to *Phytophthora infestans* is mediated by the recognition of the elicitor protein INFI [J]. *Plant Cell*, 1998, 10: 1413-1426.
- [2] D'Silva I, Heath M C. Purification and characterization of two novel hypersensitive response-inducing specific elicitors produced by the cowpea rust fungus [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272: 3924-3927.
- [3] Peter N, Gregory J, Ann-Maree, et al. The *melampsora lini* AvrL567 avirulence genes are expressed in *Haustoria* and their products are recognized inside plant cells [J]. *Plant Cell*, 2004, 16: 755-768.
- [4] Ann-Maree C, Peter N D, Gregory J L, et al. *Haustorially expressed secreted proteins from flax rust are highly enriched for avirulence elicitors* [J]. *Plant Cell*, 2006, 18: 243.
- [5] Sweigard J A, Carroll A M, Kang S, et al. Identification, cloning, and characterization of *PWL2*, a gene for host species specificity in the rice blast fungus [J]. *Plant Cell*, 1995, 7: 1221-1233.
- [6] Hopkins C M, White F F, Choi S H, et al. Identification of a family of avirulence genes from *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* [J]. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1992, 5: 451-459.
- [7] Shan W X, Cao M, Leung D, et al. The *Avr1b* locus of *Phytophthora sojae* encodes an elicitor and a regulator required for avirulence on Soybean Plants carrying resistance gene *Rps1b* [J]. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2004, 17(4): 394-403.
- [8] 韩德俊, 曹莉, 陈耀锋, 等. 植物抗病基因与病原菌无毒基因互作的分子基础 [J]. *遗传学报*, 2005, 32(12): 1319-1326.
Han D J, Cao L, Chen Y F, et al. Molecular basic of interaction between disease resistance gene and avirulence gene [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2005, 32(12): 1319-1326. (in Chinese)
- [9] Wu S C, Kaufmann S, Darvill A G, et al. Purification, cloning and characterization of two xylanases from *Magnaporthe grisea*, the rice blast fungus [J]. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1995, 8: 506-514.
- [10] Vogel J P, Raab T K, Schiff C, et al. *PMR6*, a pectate lyase-like gene required for powdery mildew susceptibility in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2002, 14: 2095-2106.
- [11] Xue C, Park G, Choi W, et al. Two novel fungal virulence genes specifically expressed in appressoria of the rice blast fungus [J]. *Plant Cell*, 2002, 14: 2107-2119.
- [12] Kamakura T, Yamaguchi S, Saitoh K, et al. A novel gene, *CBP1*, encoding a putative extracellular chitin-binding protein, may play an important role in the hydrophobic surface sensing of *Magnaporthe grisea* during appressorium differentiation [J]. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2002, 15: 437-444.
- [13] Lee S A, Wormsley S, Kamoun S, et al. An analysis of the *Candida albicans* genome database for soluble secreted proteins using computer-based prediction algorithms [J]. *Yeast*,

2003,20:595-610.

[14] Torto T A,Li S,Styer A,et al. EST mining and functional expression assays identify extra-cellular effector proteins from the plant pathogen *Phytophthora* [J]. *Genome Research*, 2003,13:1675-1685.

[15] 陈继圣,郑士琴,郑 武,等. 全基因组预测稻瘟菌的分泌蛋白 [J]. *中国农业科学*,2006,39(12):2474-2482.

Chen J S,Zheng S Q,Zheng W,et al. Prediction for secreted proteins from *Magnaporthe grisea* genome [J]. *Scientia Agricultura Sinica*,2006,39(12):2474-2482. (in Chinese)

[16] 苏 源,李成云,赵之伟,等. 稻瘟菌基因组规模分泌蛋白的预测分析 [J]. *云南农业大学学报*,2006,21(3):272-275.

Su Y,Li C Y,Zhao Z W,et al. Primary analysis of the secretory proteins in genome scale of *Magnaporthe grisea* [J]. *Journal of Yun'nan Agricultural University*, 2006, 21(3): 272-275. (in Chinese)

[17] 周晓罡,李成云,赵之伟,等. 粗糙脉孢菌基因组分泌蛋白的初步分析 [J]. *遗传*,2006,28(2):200-207.

Zhou X G,Li C Y,Zhao Z W,et al. Analysis of the secreted proteins encoded by genes in genome of filamental fungus (*Neurospora crassa*) [J]. *Hereditas*, 2006, 28(2): 200-207. (in Chinese)

[18] 王 亮,胡建平. 结核分枝杆菌(H37 Rv)分泌性蛋白的生物信息学预测方法 [J]. *第四军医大学学报*,2006,27(1):86-89.

Wang L,Hu J P. Bioinformatics prediction strategy for *Mycobacterium tuberculosis* (H37 Rv) secreted proteins [J]. *J Fourth Mil Med Univ*,2006,27(1):86-89. (in Chinese)

(上接第 104 页)

[7] 赵哈林,赵学勇,张铜会,等. 北方农牧交错带的地理界定及其生态问题 [J]. *地球科学进展*,2002,17(5):739-747.

Zhao H L,Zhao X Y,Zhang T H,et al. Boundary line on agro-pasture zigzag zone in north China and its problems on eco-environment[J]. *Advance in Earth Science*, 2002, 17(5): 739-747. (in Chinese)

[8] 胡立峰,张海林,陈 阜. 北方农牧交错带农田风蚀成因与防治 [J]. *中国水土保持*,2006(5):9-11.

Hu L F,Zhang H L,Chen F. Causes and precaution and cure of soil erosion in the agro-pasture transitional zone in north China [J]. *Soil and Water Conservation in China*,2006(5):9-11. (in Chinese)

[9] 王宏兴,孙秋来,王 博,等. 对陕北榆林生态修复的思考[J]. *中国水土保持*,2006(10):36-37.

Wang H X,Sun Q L,Wang B,et al. Consideration of environmental rehab of Yulin area in north Shaanxi [J]. *Soil and Water Conservation in China*,2006(10):36-37. (in Chinese)

[10] 李 婧,王绍斌,王 嘉,等. 农牧交错带可持续发展的研究概况 [J]. *安徽农业科学*,2006,34(24):6578-6579.

Li Q,Wang S B,Wang J,et al. Research summary of the sustainable development in farming-pasture production area [J]. *Journal of Anhui Agriculture Sciences*, 2006, 34(24): 6578-6579. (in Chinese)

[11] 贾科利,常庆瑞. 陕北农牧交错带土地荒漠化景观格局动态监测研究 [J]. *水土保持学报*,2007,21(2):188-191.

Jia K L,Chang Q R. Study on desertification landscape patterns dynamic monitor in agriculture and pasturage interlaced zone of northern Shaanxi [J]. *Journal of Soil and Water Conservation*,2007,21(2):188-191. (in Chinese)

[12] 周立华,马永欢,马绍休. 中国北方农牧交错带风水蚀复合区的粮食与退耕还林(草)问题 [J]. *中国沙漠*,2007,27(4):552-557.

Zhou L H,Ma Y H,Ma S X. Food supply and grain for green project in the water-wind erosion compound areas of farming and grazing interlaced zone in northern China [J]. *Journal of Desert Research*,2007,27(4):552-557. (in Chinese)

[13] 任建宏. 陕北长城沿线风沙区土地资源人口承载力分析 [J]. *农业资源与环境科学*,2006,22(9):438-443.

Ren J H. Analysis of soil resources and population bearing capacity of north Shaanxi, windy and sandy region along the Great Wall [J]. *Agricultural Resources & Environment Science*,2006,22(9):438-443. (in Chinese)

[14] 高会军,姜琦刚,霍晓斌. 陕北长城沿线沙质荒漠化遥感研究 [J]. *自然资源学报*,2005,20(3):471-475.

Gao H J,Jiang Q G,Huo X B. Remote sensing research of sandy desertification along the Great Wall in northern Shaanxi [J]. *Journal of Natural Resources*, 2005, 20(3): 471-475. (in Chinese)