

## 落叶松-杨栅锈菌 *MlpNHA1*-like 基因的克隆及序列分析

刘亦菲, 杨冰, 周显臻, 李嘉雯, 于丹\*

(西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨陵 712100)

**摘要:**落叶松-杨栅锈菌引起的杨树叶锈病是杨树的一种重要病害。通过系统发育分析和序列相似性比对确定落叶松-杨栅锈菌标准菌株基因 ID 45128 为酿酒酵母 *NHA1* 直系同源基因以及基因 ID 116278 为 *NHA1* 相关基因, 分别命名为 *MlpNHA1* 和 *MlpNHA1*-like。以夏孢子 cDNA 为模板, 运用 RT-PCR 技术, 同源克隆获得中国菌株 *MlpNHA1*-like 基因的 ORF 片段, 即 *MlpNHA1*-like (wh03), 长度为 1 545 bp, 编码 514 个氨基酸。结果表明, 生物信息学预测分析显示 *MlpNHA1*-like (wh03) 蛋白具有与酿酒酵母 *NHA1* 蛋白相同的保守结构域 c\_cpa1, 且同样具有系列疏水跨膜结构, 亚细胞定位预测结果表明目的蛋白分布在质膜区域。通过克隆落叶松-杨栅锈菌中国菌株 *MlpNHA1*-like 基因并开展序列分析, 为解析该锈菌 MlpHOG1 蛋白介导通路在病原菌侵染致病及响应外界胁迫中的作用提供帮助。

**关键词:**落叶松-杨栅锈菌; *NHA1* 基因; 同源克隆; 序列分析

**中图分类号:** S763.11

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1001-7461(2022)05-0129-06

### Cloning and Sequence Analysis of *NHA1*-like Gene from *Melampsora larici-populina*

LIU Yi-fei, YANG Bing, ZHOU Xian-zhen, LI Jia-wen, YU Dan\*

(College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China)

**Abstract:** The poplar leaf rust caused by *Melampsora larici-populina* (*Mlp*) is an important disease of poplar. Phylogenetic and BLAST analyses revealed that ID 45128 was the lineal homogeneous gene of *NHA1* from *Saccharomyces cerevisiae*, and ID 116278 was the relative gene of *NHA1*, which were named as *MlpNHA1* and *MlpNHA1*-like, respectively. The gene *MlpNHA1*-like (wh03) was cloned from the u-rediospore cDNA of *Mlp* Chinese strain using the homology-based RT-PCR approach, with a 1 545 bp ORF encoding 514 amino acid residues. Protein sequence analysis showed that the deduced *MlpNHA1*-like (wh03) protein has a conserved c\_cpa1 domain and several hydrophobic transmembrane domains as well as the *NHA1* protein. The subcellular localization prediction indicated that the deduced *MlpNHA1*-like (wh03) protein was localized at the plasma membrane. This study is helpful to understand the roles of MlpHOG1-mediated signaling pathway during pathogenesis and responses to environmental stresses in *M. larici-populina*.

**Key words:** *Melampsora larici-populina*; *NHA1* gene; homology cloning; sequence analysis

酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) *NHA1* 蛋白是酵母质膜反转运蛋白亚家族成员之一, 这类反转运蛋白属于  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交换蛋白大家族<sup>[1]</sup>。*NHA1* 至少对 4 种碱金属阳离子具有广泛的底物

特异性, 在细胞内具备多种功能, 包括对渗透胁迫的即时响应<sup>[2-3]</sup>。酿酒酵母 *NHA1* 蛋白由 985 个氨基酸组成, 包含高度疏水的 N 端跨膜结构域和亲水的 C 端结构域。响应外界高渗透压途径关键调控因子

收稿日期: 2021-08-21 修回日期: 2021-09-09

基金项目: 国家自然科学基金 (31870630)。

第一作者: 刘亦菲。研究方向: 林木病害病原菌致病机理。E-mail: ayezoe9709@126.com

\* 通信作者: 于丹, 博士, 副教授。研究方向: 林木病害病原菌致病机理。E-mail: yudan@nwsuaf.edu.cn

丝裂原活化蛋白激酶 HOG1 能够与 NHA1 的 C 端区域(431~985)互作,并且这种互作不受到是否被外源 NaCl 处理影响,同时 HOG1 能够在体外有效地磷酸化 NHA1 C 端区域。更重要的是,NHA1 在 T765 和 T876 2 个位点被 HOG1 磷酸化对外源渗透压胁迫的即时响应至关重要,可以帮助分离的蛋白与染色体上靶标位点再次快速结合<sup>[3]</sup>。

除酿酒酵母 *NHA1* 基因外,在其他真菌中也克隆到 4 个同源基因,分别为裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*) *SOD2* 基因、鲁氏酵母(*Zygosaccharomyces rouxii*) *ZSOD2* 和 *ZSOD22* 基因及白色念珠菌(*Candida albicans*) *CNH1* 基因<sup>[4-7]</sup>。然而在植物病原真菌中 *NHA1* 基因功能的研究报道甚少。专性寄生真菌落叶松—杨栅锈菌侵染杨树叶片引起杨树叶锈病,该病害影响杨树生长,造成重大经济损失<sup>[8-10]</sup>。前期研究已成功克隆落叶松—杨栅锈菌中国菌株 *MlpHOG1* 基因,并借助小麦赤霉菌体系异源互补试验推断 *MlpHOG1* 基因在该锈菌侵染菌丝生长和响应环境胁迫方面具有一定的作用<sup>[11]</sup>。本研究通过系统发育分析和序列相似性比对确定落叶松—杨栅锈菌标准菌株 *NHA1* 候选基因,进而同源克隆获得中国菌株 *MlpNHA1*-like 基因的 ORF 片段,并对目的蛋白的基本理化性质、保

守结构域、跨膜结构、二级结构、亚细胞定位等方面进行预测分析,为后续明确目的蛋白功能及其与 *MlpHOG1* 蛋白的互作关系提供帮助。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料和试剂

1.1.1 试验材料 落叶松—杨栅锈菌中国菌株 wh03 为单孢菌系,由西北农林科技大学林学院森林病理学实验室提供。使用太白杨(*Populus purdomii*)在温室进行菌株人工扩繁,根据曹支敏等<sup>[12]</sup>的方法进行菌株的活化及保存。

1.1.2 主要试剂 引物序列合成和大肠杆菌阳性转化子测序由北京奥科鼎盛生物科技有限公司(杨凌分部)完成。总 RNA 提取试剂盒购自 QIAGEN 公司,反转录试剂盒和 *Taq* 酶购自 Thermo Scientific 公司, *TransStart FastPfu* 酶购自全式金公司, pMD19-T 载体购自 TAKARA 公司。

### 1.2 试验方法

1.2.1 候选基因系统发育分析 以酿酒酵母 *NHA1*(YLR138W)的蛋白序列为查询序列,在供试真菌的全基因组数据库中以  $1e^{-5}$  为阈值进行比对分析,获得每个供试物种与酿酒酵母 *NHA1* 相关的候选基因的蛋白序列(表1)。将所有蛋白序列用软

表 1 参与 *NHA1* 系统进化分析的物种及比对结果

Table 1 Species used in phylogenetic analysis of *NHA1* and results of comparison

物种	物种全基因组数据库	比对获得的候选基因
落叶松—杨栅锈菌( <i>Melampsora larici-populina</i> )	Joint Genomics Institute (JGI) 数据库 (https://mycocosm. jgi. doe. gov/Mellp1/Mellp1. home. html)	ID 45128 ID 116278
松栎柱锈菌( <i>Cronartium quercuum</i> f. sp. <i>fusiforme</i> )	JGI 数据库 (https://mycocosm. jgi. doe. gov/Croqu1/Croqu1. home. html)	ID 659971 ID 651384
小麦秆锈菌( <i>Puccinia graminis</i> f. sp. <i>tritici</i> )	JGI 数据库 (https://mycocosm. jgi. doe. gov/Pucgr2/Pucgr2. home. html)	ID 9798 ID 15199 ID 14309 ID 14303 ID 15192
玉米黑粉菌( <i>Ustilago maydis</i> )	JGI 数据库 (https://mycocosm. jgi. doe. gov/Ustma2_2/Ustma2_2. home. html)	ID 2710 ID 2032 ID 2619
稻瘟菌( <i>Magnaporthe oryzae</i> )	JGI 数据库 (https://mycocosm. jgi. doe. gov/Magor1/Magor1. home. html)	ID 6687 ID 7422 ID 4088
禾谷镰刀菌( <i>Fusarium graminearum</i> )	JGI 数据库 (https://mycocosm. jgi. doe. gov/Fusgr1/Fusgr1. home. html)	ID 3958 ID 9097 ID 12568 ID 8831
裂殖酵母( <i>Schizosaccharomyces pombe</i> )	JGI 数据库 (https://mycocosm. jgi. doe. gov/Schpo1/Schpo1. home. html)	ID 1463 ID 19
白色念珠菌( <i>Candida albicans</i> )	JGI 数据库 (https://mycocosm. jgi. doe. gov/Canalb1/Canalb1. home. html)	ID 2928
卷枝毛霉( <i>Mucor lusitanicus</i> )	JGI 数据库 (https://mycocosm. jgi. doe. gov/Mucci2/Mucci2. home. html)	ID 117736 ID 144908 ID 128923 ID 150860

件 MEGA7.0 对齐,用 gblocks 移除序列中 gaps 较多的区域。最后,用 iqtree 构建最大似然法(Maximum likelihood)树,设置“-m”参数调用 ModelFinder 预测出待分析的氨基酸序列的最佳替代模型,设置“-b 1000”采用 1 000 次重复计算的常规自展检验法(Bootstrap)对分支可靠性进行评估。生成的树文件使用 MEGA7.0 软件查看。

1.2.2 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成 参照 QIAGEN 公司 Rneasy Plant Mini Kit 试剂盒说明书,提取落叶松-杨栅锈菌夏孢子总 RNA,用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop 2000 检测 RNA 的完整性、浓度及纯度。参照 Thermo Scientific Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒说明书合成 cDNA 第一链。

1.2.3 引物设计及目的基因克隆 根据落叶松-杨栅锈菌标准菌株 98AG31 全基因组数据库(v1.0, <https://mycocosm.jgi.doe.gov/Mellp1/Mellp1.home.html>)<sup>[13]</sup> 中 Protein ID 116278 基因序列,利用软件 Primer Premier 5 设计特异性扩增引物。上游引物为 116278-uF1(5'CGAAGAACCAAGAGC-CACAAG3'),下游引物为 116278-uR1(5'GT-GAGCCATTGAGATTGTATG 3')。

PCR 反应总体系为 50  $\mu$ L: 5  $\times$  TransStar FastPfu Buffer 10  $\mu$ L, 2.5 mM dNTPs 4  $\mu$ L, 10  $\mu$ M 上下游引物各 1  $\mu$ L, cDNA 模板 1  $\mu$ L, TransStar FastPfu DNA 聚合酶 1  $\mu$ L, 无菌水 32  $\mu$ L。扩增程序:95  $^{\circ}$ C 预变性 1 min;95  $^{\circ}$ C 变性 20 s, 58  $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 50 s, 35 个循环;72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 16  $^{\circ}$ C 保存。扩增完成后,在 PCR 产物中加入 0.6  $\mu$ L Taq DNA 聚合酶,72  $^{\circ}$ C 延伸 30 min, 16  $^{\circ}$ C 保存。PCR 扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,按照琼脂糖凝胶回收试剂盒说明书,回收目的条带。回收产物连接 pMD19-T 载体骨架,利用热激法将重组子转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,最后将筛选出的阳性转化子送至公司进行测序。

1.2.4 目的基因编码蛋白生物信息学分析 利用 ExPASy 在线工具 ProtParam 分析目的基因编码蛋白的相对分子质量、残基数目与组成、等电点和稳定性等基本理化性质。利用 NCBI 的保守结构域数据库(conserved domain database, CDD)和在线工具 SMART 分析目的基因编码蛋白的保守结构域,并使用 TBtools<sup>[14]</sup> 进行绘制。利用 TMHMM Server 2.0 工具和 ExPASy 在线工具 ProtScale 在线分析目的基因编码蛋白跨膜结构域和氨基酸序列亲水/疏水性。利用 SOPMA 在线工具预测目的基因编码蛋白的二级结构。利用 4 种在线软件 EuK-

mPloc 2.0、WOLF PSORT、CELLO 和 PROTCOMP 预测分析目的蛋白的亚细胞定位区域。

## 2 结果与分析

### 2.1 候选基因的确定

以酿酒酵母 NHA1 蛋白序列为诱饵,在落叶松-杨栅锈菌标准菌株 98AG31 全基因组数据库(v1.0)中进行比对,得到 2 个蛋白序列,Protein ID 分别为 45128 和 116278。进而选取担子菌柄锈菌亚门松栎柱锈菌和小麦秆锈菌、担子菌黑粉菌亚门玉米黑粉菌、子囊菌盘菌亚门稻瘟菌和禾谷镰孢菌、子囊菌外囊菌亚门裂殖酵母、子囊菌酵母亚门白色念珠菌及接合菌卷枝毛霉等多种代表真菌,将比对后获得的所有与 NHA1 相关的蛋白序列进行系统进化树构建,结果显示, ID 45128(v1.0)为 NHA1 在落叶松-杨栅锈菌标准菌株 98AG31 中的直系同源基因(图 1),命名 *MlpNHA1*。ID 116278(v1.0)虽然不是直系同源基因(图 1),但其在酿酒酵母全基因组数据库中序列相似性比对得到唯一蛋白序列即 NHA1(e-value 为  $2e-59$ ),并且其编码蛋白具有与 NHA1 相同的保守结构域(c\_cpa1, e-value 为  $5.92e-97$ ),命名为 *MlpNHA1*-like。

### 2.2 目的基因的克隆

提取落叶松-杨栅锈菌中国菌株 wh03 夏孢子总 RNA 并反转录为 cDNA 作为扩增模板。由于标准菌株 98AG31 中注释的基因 ID 45128 序列不完整,尚未克隆到该基因的 ORF 片段。根据基因 ID 116278 的序列设计特异引物进行同源克隆,PCR 扩增后得到一个特异且浓度较高的条带,大小约为 1.7 kb。切胶回收及 TA 克隆检测后进行测序分析,结果表明成功获得 wh03 菌株基因 ID 116278 的 ORF 片段,长度为 1 545 bp,将该基因命名为 *MlpNHA1*-like (wh03) (GenBank accession number MZ826137)。

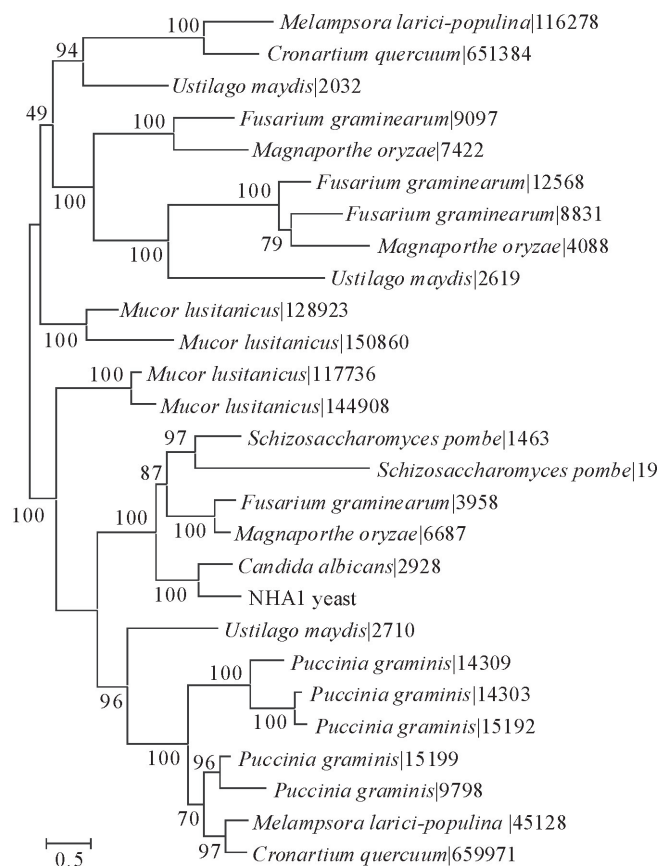
### 2.3 目的基因编码蛋白结构预测分析

利用在线软件 ProtParam 进行蛋白理化性质分析,结果表明 *MlpNHA1*-like (wh03) 基因编码 514 个氨基酸,相对分子量 57.787 ku。在极性氨基酸分析中,负电荷氨基酸残基(Asp+Glu)总数为 46 个,正电荷氨基酸残基(Arg+Lys)总数为 40 个,带负电荷的数目略多于正电荷。*MlpNHA1*-like (wh03) 理论等电点(pI)为 5.81,说明偏酸性。预测的不稳定指数为 36.56,未超过 40,推测属于稳定蛋白。

酿酒酵母 NHA1 蛋白具有高度疏水的 N 端跨膜结构域和亲水的 C 端结构域<sup>[3]</sup>。利用 NCBI 保守结构域数据库(CDD)分析,发现 *MlpNHA1*-like (wh03) 蛋白具有和 NHA1 一致的保守结构域 c\_

cpal(图 2A)。在线软件 SMART 分析结构域显示 MlpNHA1-like (wh03) 蛋白具有 10 个跨膜结构, 与 NHA1 特征一致(图 2B)。进一步借助 TM-HMM Server 2.0 工具对目的蛋白进行跨膜结构预测, 结果同样表明 MlpNHA1-like (wh03) 蛋白包含 10 个跨膜结构, 分别位于第 15~32、37~59、74~

93、106~128、212~234、254~273、308~330、342~364、374~396、409~431 位氨基酸(图 3A)。使用在线软件 ProtScale 分析氨基酸序列亲疏水性, 图形的高峰值(正值)的区域表示疏水的区域, 而负值的“低谷”区域是亲水区域, 分析结果显示预测的疏水区域与跨膜区域基本一致(图 3B)。



注:1)供试物种中与 NHA1 相关的所有蛋白序列一同构建系统进化树;2)物种后的数字代表在 JGI 相应物种数据库中的蛋白序号(Protein ID);3)自展支持率标注于节点。

图 1 NHA1 系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic analysis of NHA1

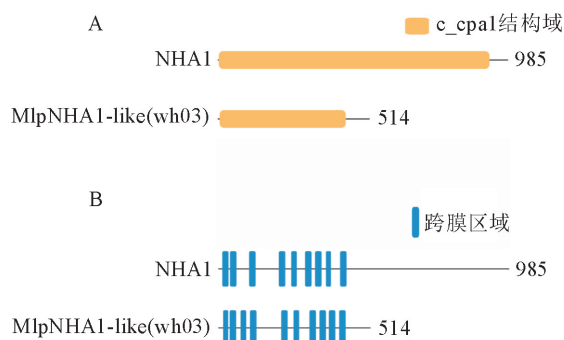


图 2 MlpNHA1-like (wh03) 蛋白保守结构域

Fig. 2 Conserved domains in the MlpNHA1-like (wh03) protein

运用 SOPMA 在线预测目的蛋白二级结构, 显示 MlpNHA1-like (wh03) 蛋白二级结构主要由 4 种形式组成(图 4), 分别为 45.33% 的  $\alpha$ -螺旋(Alpha helix)、3.89% 的  $\beta$ -转角( $\beta$ -turn)、13.42% 的延伸链(Extended strand)和 37.35% 的无规则卷曲(Random

coil), 其中  $\alpha$ -螺旋和无规则卷曲为主要二级结构。

## 2.4 目的基因编码蛋白亚细胞定位预测分析

蛋白亚细胞定位的预测可为后续功能研究提供参考。采用 4 种在线软件 EuK-mPLoc、WOLF PSORT、CELLO 和 PROTCOMP 对 MlpNHA1-like (wh03) 蛋白进行亚细胞定位预测分析。EuK-mPLoc 预测结果显示目的蛋白定位在细胞膜(cell membrane)区域。其余 3 种软件预测结果由计算的数值来反映, 数值越高则预测的准确性越大。WOLF PSORT 软件预测显示数值明显高的 2 个区域为质膜(plas:13)和线粒体(mito:9)。CELLO 预测结果显示质膜区域数值明显高于其他区域(Plasma Membrane:4.943)。同样, PROTCOMP 整体预测结果显示质膜区域数值明显高于其他区域(Plasma Membrane:9.85)。因此, 4 种软件综合预测显示 MlpNHA1-like (wh03) 蛋白定位在质膜区域。



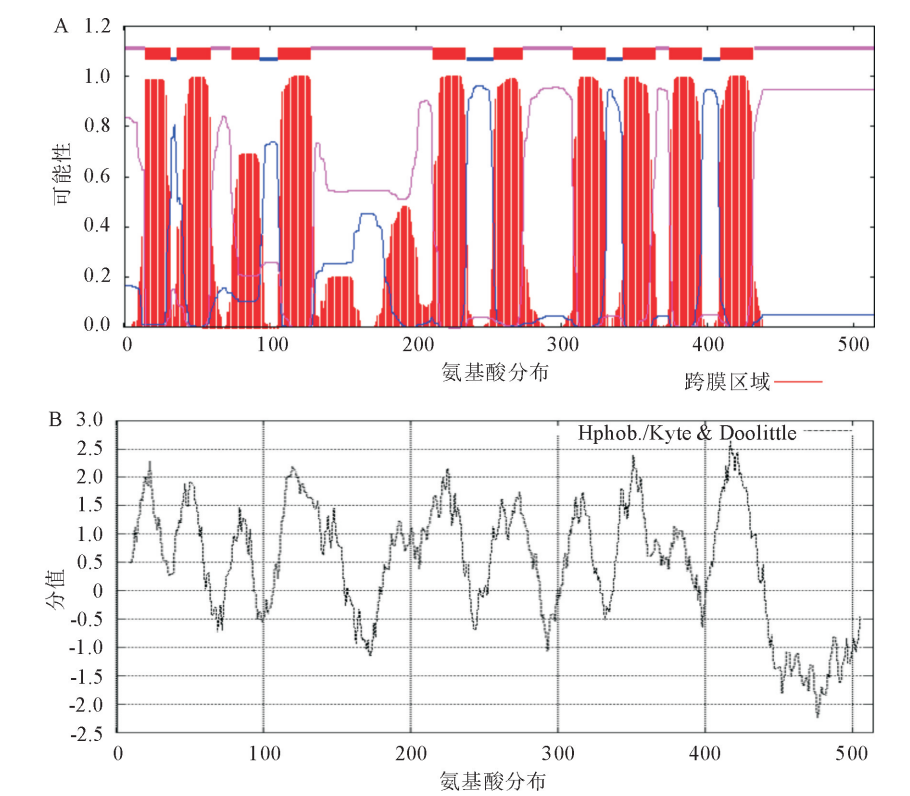


图 3 *MlpNHA1*-like (wh03) 蛋白跨膜结构和亲/疏水性区域

Fig. 3 Transmembrane domains and hydrophobicity or hydrophilicity regions in the *MlpNHA1*-like (wh03) protein

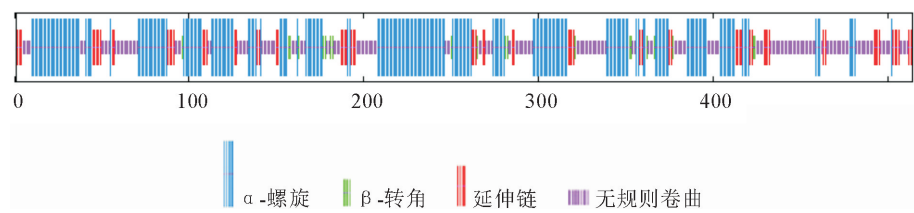


图 4 *MlpNHA1*-like (wh03) 蛋白二级结构组成

Fig. 4 Prediction of secondary structure of the *MlpNHA1*-like (wh03) protein

### 3 结论与讨论

结合系统发育分析、序列相似性比对及同源克隆,获得落叶松-杨栅锈菌中国菌株 *MlpNHA1*-like (wh03) 基因 ORF 片段,并对目的基因编码蛋白进行结构和亚细胞定位预测分析。

通过构建系统进化树发现,落叶松-杨栅锈菌 ID 45128 与酵母菌 *NHA1* 所在的同一进化枝被外群卷枝毛霉隔开,并且在该进化枝中供试物种候选基因的进化趋势与供试物种进化趋势一致,该枝内所有候选基因包括 ID 45128 均与酵母菌 *NHA1* 基因互为直系同源基因,将 ID 45128 命名为 *MlpNHA1*。ID 116278 基因为旁系同源基因,由于可能与酿酒酵母 *NHA1* 基因有功能保守性,将其命名为 *MlpNHA1*-like。这类 *NHA1*-like 基因仅存在于落叶松-杨栅锈菌、松栎柱锈菌和玉米黑

粉菌这 3 种供试担子菌中,在供试的小麦秆锈菌及子囊菌中均发生了缺失。根据系统发育分析结果可知,在担子菌和子囊菌发生分歧前,*NHA1* 基因与 *NHA1*-like 基因的分歧就已发生,长时间的分歧下两类基因的功能保守程度有待于进一步的研究。

考虑到酿酒酵母 HOG1 与 *NHA1* 互动并将其磷酸化从而应对外界渗透压胁迫<sup>[3]</sup>,因此将 *MlpNHA1* 和 *MlpNHA1*-like 都确定为候选基因。根据标准菌株 98AG31 中目的基因的序列在中国菌株中进行同源克隆,但 *MlpNHA1* 的序列不完整,目前 *MlpNHA1* 基因还未成功克隆,后续将尝试多种克隆方法以期获得 *MlpNHA1* 基因的 ORF 片段。通过 NCBI 中 GEO DataSets 数据库查找标准菌株 98AG31 中 *MlpNHA1*-like 基因 (ID 116278) 的表达情况<sup>[15]</sup>,显示夏孢子及其萌发阶段的表达量均相对较高(结果未展示)。本研究以中国菌株夏孢

子 cDNA 为模板扩增获得较亮条带,与之较为吻合。比较中国菌株 wh03 和来自法国的标准菌株 98AG31 中 *MlpNHA1*-like 基因的核苷酸序列,显示二者长度相同,30 个核苷酸位点存在差异,相似性为 98%,整体较为保守。和之前克隆的 *MlpMKK1/1* 基因相比<sup>[16]</sup>,在不同地域菌株中核苷酸差异位点略有增加。

预测分析显示,目的蛋白 *MlpNHA1*-like (wh03) 具有与酿酒酵母 *NHA1* 蛋白一致的保守结构域 *c\_cpa1*。并且,目的蛋白具有系列跨膜结构且与疏水区域位置基本一致,结合酿酒酵母 *NHA1* 蛋白特征<sup>[17]</sup>,推断较长的跨膜区域为目的蛋白 N 端部分;预测表明其余下游较短部分为亲水区域,推断为目的蛋白 C 端部分。亚细胞定位预测目的蛋白 *MlpNHA1*-like(wh03) 分布在质膜区域,与 Western blot 检测酿酒酵母 *NHA1* 蛋白定位在质膜区域<sup>[18]</sup> 结果一致,同时与预测具有跨膜结构存在也较为吻合。虽然 *MlpNHA1*-like (wh03) 基因不是 *NHA1* 在落叶松—杨栅锈菌中的直系同源基因,但结合序列比对分析和生物信息学预测分析推断二者具有一定共性存在。酿酒酵母 *HOG1* 与 *NHA1* 的 C 端区域互作并将其磷酸化从而即时响应外界渗透压胁迫<sup>[3]</sup>。在落叶松—杨栅锈菌中,*MlpNHA1*-like (wh03) 能否与 *MlpHOG1* 相互作用参与致病过程及包含渗透胁迫在内的各种环境胁迫应答过程,有待后续进一步分析。

## 参考文献:

- [1] BRETT C L, DONOWITZ M, RAO R. Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers [J]. *American Journal of Physiology, Cell Physiology*, 2005, 288(2): C223-C239.
- [2] KINCLOVA O, RAMOS J, POTIER S, et al. Functional study of the *Saccharomyces cerevisiae* *Nha1p* C-terminus [J]. *Molecular Microbiology*, 2001, 40(3): 656-668.
- [3] PROFT M, STRUHL K. MAP kinase-mediated stress relief that precedes and regulates the timing of transcriptional induction [J]. *Cell*, 2004, 118(3): 351-361.
- [4] JIA Z P, MCCULLOUGH N, MARTEL R, et al. Gene amplification at a locus encoding a putative Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter confers sodium and lithium tolerance in fission yeast [J]. *The EMBO Journal*, 1992, 11(4): 1631-1640.
- [5] WATANABE Y, MIWA S, TAMAI Y. Characterization of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene closely related to the salt-tolerance of yeast *Zygosaccharomyces rouxii* [J]. *Yeast*, 1995, 11(9): 829-838.
- [6] IWAKI T, HIGASHIDA Y, TSUJI H, et al. Characterization of a second gene (ZSOD22) of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter from salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* and functional expression of ZSOD2 and ZSOD22 in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Yeast*, 1998, 14(13): 1167-1174.
- [7] SOONG T W, YONG T F, RAMANAN N, et al. The *Candida albicans* antiporter gene *CNH1* has a role in Na<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> transport, salt tolerance, and morphogenesis [J]. *Microbiology*, 2000, 146: 1035-1044.
- [8] 张山林. 青杨叶锈病损失量估计研究 [J]. *甘肃林业科技*, 1990 (2): 29-33.  
ZHANG S L. Study on loss estimation of poplar leaf rust caused by *Melampsora larici-populina* [J]. *Forestry Science and Technology of Gansu Province*, 1990(2): 29-33. (in Chinese)
- [9] PINON J, FREY P. Interactions between poplar clone and *Melampsora* populations and their implications for breeding for durable resistance [M]//PEI M H, MCCracken A R. *Rust diseases of willow and poplar*. Switzerland: CAB International, 2005: 139-154.
- [10] HACQUARD S, PETRE B, FREY P, et al. The poplar-poplar rust interaction: insights from genomics and transcriptomics [J]. *The Journal of Pathology*, 2011: 716041.
- [11] YU D, LI R X, YU Z D, et al. Molecular characterization of a Hog1-type MAPK, *MlpHog1*, from *Melampsora larici-populina* [J]. *Phytoparasitica*, 2016, 44: 251-259.
- [12] 曹支敏, 李振岐, 胡景江. 落叶松—杨栅锈菌生理分化研究 [J]. *西北林学院学报*, 1998, 13(1): 53-57.  
CAO Z M, LI Z Q, HU J J. Physiological specialization in *Melampsora larici-populina* Kleb. in the Qinling Mountains [J]. *Journal of Northwest Forestry College*, 1998, 13(1): 53-57. (in Chinese)
- [13] DUPLESSIS S, CUOMO C A, LIN Y C, et al. Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(22): 9166-9171.
- [14] CHEN C J, CHEN H, ZHANG Y, et al. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data [J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [15] DUPLESSIS S, HACQUARD S, DELARUELLE C, et al. *Melampsora larici-populina* transcript profiling during germination and timecourse infection of poplar leaves reveals dynamic expression patterns associated with virulence and biotrophy [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2011, 24: 808-818.
- [16] 李瑞茜, 于丹, 余仲东, 等. 落叶松—杨栅锈菌 *MKK* 基因的克隆与生物信息学分析 [J]. *东北林业大学学报*, 2016, 44(5): 84-87.  
LI R X, YU D, YU Z D, et al. Cloning and bioinformatical analysis of *MKK* gene from *Melampsora larici-populina* [J]. *Journal of Northeast Forestry University*, 2016, 44(5): 84-87. (in Chinese)
- [17] KINCLOVA-ZIMMERMANN O, SYCHROVA H. Functional study of the *Nha1p* C-terminus: involvement in cell response to changes in external osmolarity [J]. *Current Genetics*, 2006, 49(4): 229-236.
- [18] BANUELOS M A, SYCHROVA H, BLEYKASTEN-GROSSHANS C, et al. The *Nha1* antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux [J]. *Microbiology*, 1998, 144(10): 2749-2758.