

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Budai Campus

Képesítő fordítás

Szendrei Lilla

Agrár- és természettudományi szakfordító szakirányú továbbképzés

Vidékfejlesztés és Fenntartható Gazdaság Intézet

Idegen Nyelvi Tanszék

Budapest

2024

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Budai Campus

Progress on Molecular Genetics and Manipulation of Rust Fungi

Előrelépés a rozsdagombák molekuláris genetikája és manipulációja terén

Képesítőfordítás

Konzulens: Kissné Békássy Enikő

nyelvtanár

Hallgató: Szendrei Lilla

I8EV4K

Képzés: Agrár- és természettudományi szakfordító szakirányú továbbképzés

Vidékfejlesztés és Fenntartható Gazdaság Intézet

Idegen Nyelvi Tanszék

Budapest

2024

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom a szakfordító képzés oktatóinak, akik munkájukkal hozzásegítettek dolgozatom elkészítéséhez.

Tartalomjegyzék

1. Forrásnyelvi szöveg

Abstract	6
Classical genetic analyses	9
Early molecular genetic efforts to understand rust fungus infection strategies	9
„Omics” break-through technologies to discover the genetic potential of rusts: expressed sequence TAGs (ESTs)	9
Genomes of rust fungi	9
Whole genome sequencing	10
Transcriptomes, genome-wide association, and comparative studies	10
Proteomics	11
Chasing effectors	11
Functional analysis of rust fungus genes	11
Host-induced gene silencing (HIGS) and small RNA signaling	12
Conclusions and impact on crop protection	13
Future challenges	13
Note in proof	14
Acknowledgements	14
2. Célnyelvi szöveg	15
Absztrakt.....	15
Klasszikus genetikai vizsgálatok	20
Korai törekvések a rozsdagombák fertőzési stratégiáinak megértésére molekuláris genetikai eszközökkel.....	22
Áttörő „-omikai” technológiák a rozsdagombák genetikai potenciáljának feltárására: az expresszált részszekvenciák (EST-k).....	22
A rozsdagombák genomjai.....	23
Teljes genomszekvenálás	23
Transzkriptom, genom szintű összefüggések és összehasonlító vizsgálatok.....	25

Proteomika	26
Effektorok keresése.....	27
Rozsdagombák génjeinek funkcionális elemzése.....	29
Gazdaszervezet indukálta géncsendesítés (HIGS) és kis RNS jelátvitel.....	32
Következtetések, mindezek kihatása a növényvédelemre	33
Jövőbeli kihívások	34
Megjegyzéskiegészítés a hitelességhez.....	36
Köszönetnyilvánítás	36
3.Irodalomjegyzék	36
4.Összefoglalás	44
5.Nyilatkozatok	46

Progress on Molecular Genetics and Manipulation of Rust Fungi

Guus Bakkeren^{1,†} and Les J. Szabo²

¹ Agriculture and Agri-Food Canada, Summerland Research & Development Centre, 4200 Hwy 97, Summerland, BC, Canada V0H 1Z0

² U.S. Department of Agriculture-Agriculture Research Service, Cereal Disease Laboratory and University of Minnesota, 1551 Lindig Street, St. Paul, MN 55108, U.S.A.

Accepted for publication 27 November 2019.

ABSTRACT

Among the thousands of rust species described, many are known for their devastating effects on their hosts, which include major agriculture crops and trees. Hence, for over a century, these basidiomycete pathogenic fungi have been researched and experimented with. However, due to their biotrophic nature, they are challenging organisms to work with and, needing their hosts for propagation, represent pathosystems that are not easily experimentally accessible. Indeed, efforts to perform genetics have been few and far apart for the rust fungi, though one study performed in the 1940s was famously instrumental in formulating the gene-for-gene hypothesis describing pathogen–host interactions. By taking full advantage of the molecular genetic tools developed in the 1980s, research on many plant pathogenic microbes thrived, yet similar work on the rusts remained very challenging though not without some successes. However, the genomics era brought real breakthrough research for the biotrophic fungi and with innovative experimentation and the use of heterologous systems, molecular genetic analyses over the last 2 decades have significantly advanced our insight into the function of many rust fungus genes and their role in the interaction with their hosts. This has allowed optimizing efforts for resistance breeding and the design and testing of various novel strategies to reduce the devastating diseases they cause.

Keywords: disease control and pest management, genetics and resistance, mycology

Rust fungi are one of the largest groups of plant pathogenic fungi. They belong to the order Pucciniales (formerly Uredinales) of the phylum Basidiomycota and represent a diverse and complex group of fungi. There are about 7,500 described species, divided into 133 recognized genera (Aime et al. 2014; Cummins and Hiratsuka 2003; Toome-Heller 2016). Rust fungi have diverse and complex life cycles (Cummins and Hiratsuka 2003). For example, *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, causing stem rust of wheat, is a typical macrocyclic rust fungus with five spore stages and requires two unrelated hosts (is said to be heteroecious) to complete its life cycle (Leonard and Szabo 2005). The asexual uredinial stage infects wheat, barley, and several grass species. Sexual reproduction starts with the telial stage on the gramineous host and is completed on the alternate host (*Berberis* spp. and *Mahonia* spp.). Teliospores germinate to produce basidiospores, which infect the alternate host forming pycnia (spermogonia). After transfer of pycniospores to an

opposite mating type, fertilization occurs resulting in the formation of aecia. The aeciospores then infect gramineous hosts, completing the life cycle. Wheat leaf rust, caused by the closely related species *Puccinia triticina*, has a very similar life cycle (Fig. 1) (Bolton et al. 2008). *Melampsora lini*, causing flax rust, is a macrocyclic fungus containing five spore stages, but carrying out its life cycle on a single host (therefore called autoecious) (Lawrence et al. 2007). At the other end of the spectrum are self-fertile microcyclic rust fungi that produce only two spore stages (telia and basidia), lack spermogonia, and infect a single host (for example *Puccinia mesneriana*) (Anikster and Wahl 1985). The order Pucciniales is monophyletic, and life cycle variation has occurred through convergent evolution from macrocyclic ancestors (Aime et al. 2017).

Infection of host tissue involves complex developmental processes involving cross-talk between the rust fungal pathogen and its host. Many distinct morphological changes occur during infection. An urediniospore landing on a host leaf surface, germinates to form a germ tube that develops an appressorium over a stomate, cued by its architecture (mechanosensory thigmotropism). The appressorium develops an infection peg that penetrates into the intercellular space to form a substomatal vesicle, which differentiates subsequently into an infection hypha. A haustorial mother cell is formed when the growing tip of the infection hypha comes into close contact with a mesophyll cell. Direct penetration of the mesophyll cell wall ensues upon which invagination of the plasmalemma allows

[†]Corresponding author: G. Bakkeren; guus.bakkeren@canada.ca

Funding: This work was supported by Agriculture and Agri-Food Canada (G. Bakkeren) and the United States Department of Agriculture (L. J. Szabo).

The author(s) declare no conflict of interest.

© Her Majesty the Queen in Right of Canada, as represented by the Minister of Agriculture and Agri-Food Canada, 2020.

the formation of a specific feeding structure, the haustorium. Without breaching the plant cell membrane, an intricate interface is formed consisting of an extrahaustorial membrane (modified host cell membrane), extrahaustorial matrix (EHM), haustorial wall, and haustorial membrane where exchange of compounds, nutrients and proteins (effectors) take place (for a review, see Voegelé et al. 2009). During the various stages, different specific gene sets are expressed (Cuomo et al. 2017; Hacquard et al. 2010; Link and Voegelé 2008; Lorrain et al. 2018b). Detailed microscopic studies of the infection processes and structural changes occurring in both pathogen and host have been published for many pathosystems since the 1960s (in particular for bean and cereal rust pathogens, e.g., Harder and Chong 1991; Lennox and Rijkenberg 1989; Mendgen 1973). Many rust fungi are capable of employing two mechanisms for entry into host plants. For rust basidiospores, entry is typically through direct penetration of an epidermal cell (of the aecial host), whereas for example in *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, the formation of the

appressorium and penetration of the uredinial host leaf occurs at the stomate (Leonard and Szabo 2005). One known example of a variation exists in *Phakopsora pachyrhizi*, where the appressorium formed from germinating urediniospores directly penetrates through an epidermal cell of the soybean leaf surface (Goellner et al. 2010). In general, it illustrates that in most rust fungi both mechanisms are used, but that they are developmentally regulated.

Rust fungi cause disease across the plant kingdom including important agricultural, horticultural, and forest crops. They are infamous for causing diseases on cereals, with reports of epidemics in ancient Greek and Roman times. Wheat stem rust epidemics have continued, with the latest caused by *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* Ug99 and 'Digalu' strains (Singh et al. 2015). Similarly, wheat leaf rust (*Puccinia triticina*) and wheat stripe rust (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) are worldwide the most common diseases of wheat with losses ranging from 1 to 20% (Bolton et al. 2008; Chen et al. 2014; Savary et al. 2019). Other cereal rusts of major economic

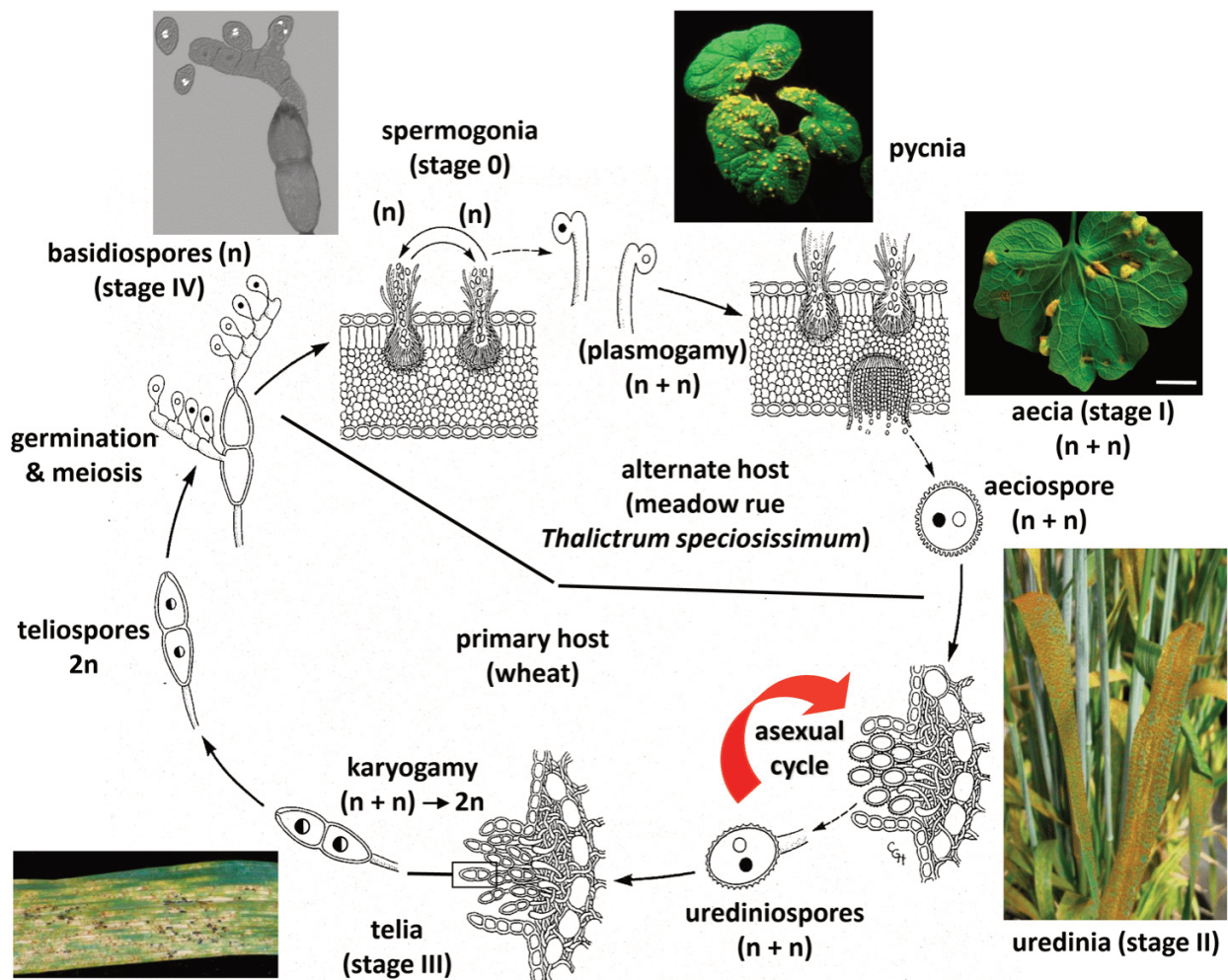


FIGURE 1

Life cycle of the macrocyclic, heteroecious wheat leaf rust pathogen, *Puccinia triticina*. Note that the asexual cycle on wheat can be initiated from either aeciospores or urediniospores; the latter can be wind-dispersed to new wheat hosts in a growing season, which can quickly lead to an epidemic. When conditions become unfavorable, telia from which teliospores mature are formed on senescing wheat. In the early stages of basidiospore development, each basidiospore contains a single nucleus which are the products of the two meiotic divisions (as shown in the line drawing). Subsequently, each of the four nuclei undergo a mitotic division resulting in two haploid nuclei per basidiospore as illustrated by the microscopy image (Anikster 1983). Adapted from Alexopoulos et al. (1996), drawn by C. Gubbins Hahn (John Wiley & Sons, Reproduced by permission). Aecia and basidiospores photographs by T. Eilam, others by J. Kolmer (Reproduced by permission).

importance include *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*, causing oat crown rust (Nazareno et al. 2018), the barley rust *Puccinia hordei* (Park et al. 2015), and the common corn rust, *P. sorghi* (Rochi et al. 2018). *Uromyces* species are notorious on beans (Voegelé 2006), *Phakopsora pachyrhizi* on soybean (Goellner et al. 2010), whereas *Hemileia vastatrix*, causes havoc on coffee (Talhinhas et al. 2017). *M. larici-populina* seriously affects poplar tree plantations (Duplessis et al. 2011), while other trees such as oak and myrtle suffer major losses due to *Cronartium quercuum* f. sp. *fusiforme* and *Austropuccinia psidii*, respectively (Carnegie and Pegg 2018; Sniezko et al. 2014). White pine blister rust (*C. ribicola*) has caused serious epidemics across Asia, Europe, and North America since the

late 1800s and continues to be a major disease of white pines today (Geils et al. 2010). Figure 2 illustrates a few of the common rust diseases.

The obligate biotrophic nature of rust fungi has made studying them on a molecular genetic and biochemical level challenging. While molecular genetic work on many plant pathogens flourished, comparable research on rusts has been hampered by the inability to grow most rust fungi outside of their hosts and related to that, to develop a genetic transformation system. However, the genomics revolution has been particularly beneficial for obligate fungal pathogens, allowing at least structural gene analyses, which coupled with transcriptomic and proteomic work, eased the way for performing molecular genetic studies using related heterologous

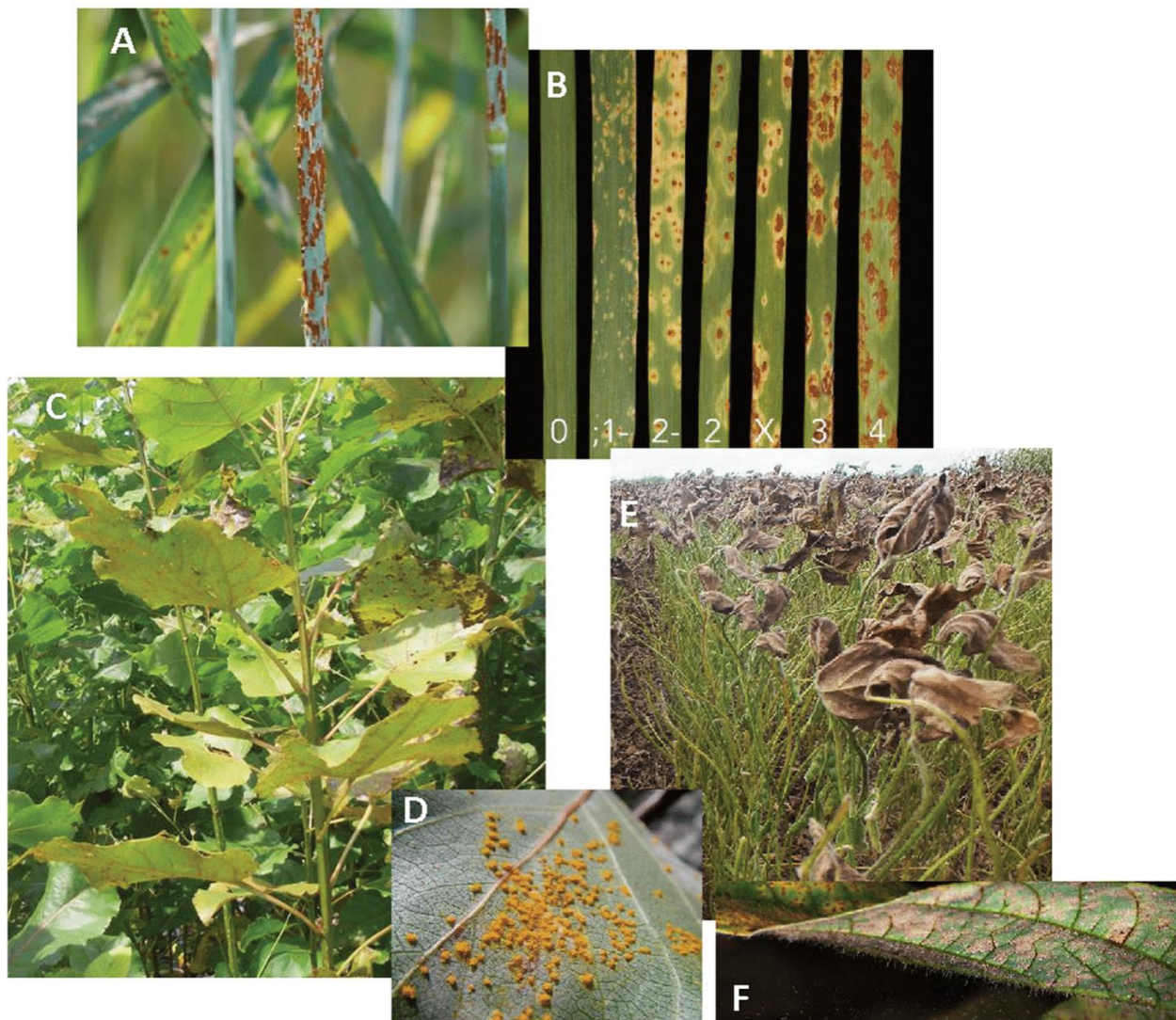


FIGURE 2

A, Stem rust uredinia on wheat, caused by *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. Picture courtesy of U.S. Department of Agriculture-Cereal Disease Laboratory. **B**, Range of infection types (ITs) of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* on standard wheat differential lines. ITs are scored on a scale of 0 to 4, where 0, “;”, 1, 2, and X are resistant and 3 and 4 are susceptible. The mesothetic IT X contains a mixture of 1s and 3s. ITs are characteristic for Sr and AvrSr gene combinations. For example, the combination of Sr5/AvrSr5 produces IT 0; and the combination of Sr24/AvrSr24 produces an IT 2. Photograph by P. Olivera-Firpo (Reproduced by permission). **C**, Poplar leaf rust, a natural infection of *Melampsora larici-populina* on a *Populus trichocarpa* × *Populus deltoides* hybrid, and **D**, close-up of *M. larici-populina* uredinia on wild *Populus nigra*. Photographs by P. Frey (Reproduced by permission). **E**, Asian soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* results in defoliation of susceptible cultivars in a Brazilian field. Photograph by M. Meyer, Embrapa Soybean Database (Reproduced by permission). **F**, Sporulation of *Phakopsora pachyrhizi* on a susceptible soybean leaf. Photograph by A. Neto, Embrapa Soybean Database (Reproduced by permission).

systems. Since the genomics revolution, many laboratories have embarked on rust fungal research. Here, we review some of the historic research, the current state of our ability to genetically manipulate rust fungi or use workarounds to assess rust gene function, and how this impacts rust disease control and agriculture, limiting ourselves to a few well-developed and important pathosystems.

In this review, we are using the term “effectors” as defined by Kamoun (2006). In this broad definition, effectors are molecules that manipulate host cell structures and functions as to facilitate infection of and survival and proliferation in the host. Effectors are a subset of the more general pathogenicity gene products that are used by the fungus to cause disease. Pathogen genes producing products that trigger *R* gene-mediated defense response (effector-triggered immunity) will be referred to as avirulence (*Avr*) genes. Based on current research, it is likely that most *Avr* genes will encode effectors, but this definition does not preclude the possibility of an avirulence factor not being an effector. The term “virulence” has become muddled in the literature, ranging from a broad description often overlapping with general “pathogenicity,” to a narrow use specific to allelic shifts in *Avr* genes, from alleles detected by *R* genes (avirulence) to alleles that evade detection (virulence). To further muddy the waters, “virulence” has been used to describe the quantitative differences (aggressiveness) in disease caused by isolates of the pathogen, independent of known *R* genes. Recent reviews have highlighted the “inextricable ambiguity” in the use of these terms in the plant pathology literature (Lannou 2012; Pariaud et al. 2009). To avoid confusion, in this review, “pathogenicity” will be used for a broad description of gene products of rust fungi that provide the ability to cause any level of disease and “virulence” will be reserved for the specific qualitative phenotype due to different alleles of *Avr* genes.

CLASSICAL GENETIC ANALYSES

Ever since the recognition that genetic factors determine the outcome of interactions between rust fungi and their hosts (“compatible,” causing disease; or “incompatible,” resulting from various levels of resistance), efforts to perform genetics on these fungi through sexual crosses has been attempted. Given the complex life cycle and their obligate nature, this has been challenging and only a limited number of genetic studies in a few species have been done. Nevertheless, making defined crosses is a powerful way to understand the genetics behind host–pathogen interactions and identify gene function and hence contributes to the genetic manipulation of rust fungi. Given the well-defined phenotypes observed with host differentials, these studies have typically focused on the genetics of *Avr* genes. The pioneering work of Flor in the 1940s (see review Flor 1971) showed that host resistance is mediated by the interaction of a dominant host resistance gene (*R*) and a corresponding dominant pathogen gene (*Avr*) and led to the “gene-for-gene” hypothesis. This work was further developed to define a complement of *R* and *Avr* genes, as well as revealing inhibitor genes in the pathogen that suppressed specific *Avr* genes (Lawrence et al. 1981). Extensive genetic studies have also been carried out in the *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*– and *Puccinia triticina*–wheat systems, demonstrating that host resistance follows a gene-for-gene model (Loegering and Powers 1962; Samborski and Dyck 1968; Statler 1979, 2000; Williams et al. 1966). Indeed, such genetic work in cereals since the 1950s, and more recently in other crops, has laid the foundation for rust resistance gene discovery and is essential for breeding programs to control rust diseases (Long and Kolmer 1989; McCallum et al. 2016) (Fig. 2B). More recently, genetic studies combined with molecular techniques resulted in markers found linked to *Avr* genes in *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* (Zambino et al. 2000), *Cronartium*

quercuum f. sp. *fusiforme* (Kubisiak et al. 2011), and *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* (Wang et al. 2018). Recently, the availability of thousands of single nucleotide polymorphism (SNP) markers derived from genome sequencing has allowed the development of dense genetic maps and anchoring of reference genome assemblies for *M. lini* (Anderson et al. 2016) and *M. larici-populina* (Pernaci et al. 2014). Among other scorable phenotypes are color mutants that were shown in *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* to have a genetic basis (Green 1964). Intriguingly, several studies illustrate the possible occurrence of parasexual recombination or somatic exchange of genetic material (hybridization) during host infection in *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, *Puccinia triticina*, and *Phakopsora pachyrhizi* (Vittal et al. 2012; Wang and McCallum 2009; Watson and Luig 1958). However, no thorough analysis of the genetic implications has been performed. This mechanism has been implicated in many studies to have contributed to the changes in virulence observed in populations, especially in nonsexual populations, i.e., where the alternate host is not present such as for *Puccinia triticina* in North America. See Note Added In Proofs.

EARLY MOLECULAR GENETIC EFFORTS TO UNDERSTAND RUST FUNGUS INFECTION STRATEGIES

The 1980s saw a revolution in the study of plant pathogens and the interactions with their hosts when new molecular tools were employed. This, however, remained a challenge for the obligate biotrophic rusts and mildews. Only a few laboratories embarked on efforts to apply the new techniques to unravel rust fungus gene functions. Early attempts included the use of differential screening approaches on cDNAs from bean and cereal rust fungi (Bhairi et al. 1989; Deising et al. 1995; Liu et al. 1993; Thara et al. 2003; Xuei et al. 1993). Innovative, technically challenging experimentation resulted in the construction of haustoria-specific cDNA libraries from the bean rust fungus, *Uromyces fabae*, revealing sets of fungal genes expressed specifically in planta (Hahn and Mendgen 1997), which combined with exquisite microscopic analyses, led to significant insight into the role of haustoria as metabolic sinks and how their metabolism may establish biotrophy (Link et al. 2005; Struck et al. 1998, 2002, 2004; Voegelé et al. 2001). This included the first demonstration of a fungal protein, RTP1p, a cysteine proteinase inhibitor, expressed in haustoria, that was transferred to the host nucleus (Kemen et al. 2005; Pretsch et al. 2013).

“-OMICS” BREAK-THROUGH TECHNOLOGIES TO DISCOVER THE GENETIC POTENTIAL OF RUSTS: EXPRESSED SEQUENCE TAGs (ESTs)

Though cosmid and cDNA library construction and gene cloning from rust fungi had become feasible, this still represented a candidate gene approach and other techniques were needed to obtain more comprehensive gene inventories. As rust genomes are much larger than other fungal genomes, the generation of EST databases seemed a logical progression to obtain a better insight into the gene complements of rust fungi and were generated for several species (Catanzariti et al. 2006; Fernandez et al. 2012; Hu et al. 2007b; Link and Voegelé 2008; Yin et al. 2009). These gene catalogs gave a good first look at the gene complements in various rust fungi and allowed comparative work with related (model) fungi to identify candidate pathogenicity genes for further functional studies (Xu et al. 2011).

GENOMES OF RUST FUNGI

As early as 1902, using light microscopy, estimates of the haploid chromosome numbers in various rust fungi were made, varying

from $n = 2$ to 8 (Holden and Harper 1902; McGinnis 1956). Starting in the late 1970s, these numbers for fungi were re-examined using three dimensional reconstructions of meiotic chromosomes. This showed that the earlier studies provided underestimates and that for the rust fungi *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* and *M. lini*, haploid chromosome numbers were more likely $n = 18$ (Boehm and Bushnell 1992; Boehm et al. 1992) and preliminary estimates for *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* and *Puccinia triticina* were $n = 16$ to 18 (see review Leonard and Szabo 2005). In conjunction, genome sizes were estimated using reassociation kinetics, showing that *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* may contain a 67-Mb genome (Backlund and Szabo 1993), while measurements of relative DNA fluorescence provided estimates for a variety of rust fungi (Eilam et al. 1994). It became clear that rust genomes were much larger than other fungal genomes, were highly variable, had larger numbers of haploid chromosomes, and contained a high amount of repetitive DNA and/or transposable elements (TEs), all of which explained why the many molecular genetic approaches proved so challenging.

WHOLE GENOME SEQUENCING

With next-generation sequencing technologies developing fast, sequencing of the genomes of rust fungi became affordable, even though more recent assessments indicate them to be in the range of 80 to 300 Mbp, with upper limits as high as 2 Gbp and hence significantly larger than those of many other fungal species (Aime et al. 2017; Tavares et al. 2014). The first genomes to be sequenced were those of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* and *M. larici-populina* (Duplessis et al. 2011), soon followed by several others (reviewed in Aime et al. 2017; Bakkeren et al. 2016; Duplessis et al. 2014). “Third-generation” or “long-read” sequencing (on PacBio, Nanopore, 10x Genomics, and Hi-C platforms) and new assembly software are rapidly improving the previously rather fragmented published rust genome assemblies, such as the new near-complete, haplophased genomes of *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* (Miller et al. 2018) and *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* (Schwessinger et al. 2018). For *M. larici-populina*, this has led to a revised genome size of ~110 Mbp (from 101 Mbp) with its scaffolds anchored onto 18 linkage groups, thanks to a genetic map obtained from a selfing of the reference genome isolate (S. Duplessis, *personal communication*; JGI website https://mycocosm.jgi.doe.gov/Mellp2_3/Mellp2_3.info.html). An *M. lini* v2 genome assembly estimated to be ~500 Mbp, including both haplotypes and anchored to the genetic map of 26 linkage groups (Anderson et al. 2016), will be published soon (P. Dodds, *personal communication*), as will be a *Puccinia triticina* v3 genome (J. Fellers and G. Bakkeren, *unpublished data*). The estimated 1.2 Gbp genome of the myrtle rust fungus, *Austropuccinia psidii*, was recently sequenced using the Chromium 10x technology (McTaggart et al. 2018), and sequencing of three isolate genomes of the soybean rust fungus, *Phakopsora pachyrhizi*, estimated at 1 Gbp, has been completed (JGI; S. Duplessis, P. van Esse, and R. Voegelé, *personal communication*).

Rust fungal genomes proved to be significantly larger than many of the currently sequenced genomes from oomycetes and other fungi, except other known biotrophs such as the powdery mildew fungi. These genome expansions seem to be caused by repeats and TEs which among various genera can range from 30% to 74+% of the genome; the high variation is in part due to the sequencing technology and assembly software used (Aime et al. 2017). But even among closely related species such as *Puccinia triticina* and *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, though a certain synteny was preserved, the dynamic nature of the genomes due to repeats and TEs was illustrated (Cuomo et al. 2017; Fellers et al. 2013). A more accurate picture of TE content and distribution will be obtained with the advent of long-read sequencing technologies allowing complete

genome assemblies (Miller et al. 2018; Schwessinger et al. 2018). Depending on the software and parameters used for predictions, gene numbers vary among the currently sequenced rust fungi, from 14,880 to 27,578, with an average of 18K for most (Aime et al. 2017). What is striking among these genomes is the large number of genes without any annotated function. For example, comparing orthologs among the three wheat rusts, *Puccinia triticina*, *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, and *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* produced 5,443, 4,901, and 8,955 species-specific genes, respectively, whereas overall less than half of the genes in each rust fungus was conserved among other basidiomycetes (Cuomo et al. 2017). This suggests that extensive mutation/evolution has occurred. This could be a result of the strict biotrophic niches they inhabit, including the need for the heteroecious species to be able to infect two very different hosts, and the dikaryotic nature of the genomes. Other major findings have been gene losses in pathways for nitrate and sulfate assimilation, the presence of expanded gene families coding for transporters of various substrates, fewer plant cell wall-degrading enzymes, and larger predicted secretomes as a percentage of the whole proteome, when comparing to nonbiotrophs; these are likely all hallmarks of adaptive mechanisms to obligate biotrophy (Aime et al. 2017; Duplessis et al. 2011; Lo Presti et al. 2015). It is tempting to speculate that the dynamic nature of the TEs plays an important role in such adaptations, including overcoming resistance mechanisms (Barsoum et al. 2019).

Understandably, the main focus has been on generating genomic resources for rust fungi affecting agriculture and forestry crops, but with the enormous variability in the order Pucciniales, much could be learned from comparative genomics. To this end, the Joint Genome Institute, with support of 12 research groups worldwide, has embarked on generating reference genomes from 50 rust fungal species of diverse origins belonging to different family-level lineages comprising this order (Aime et al. 2017), including many of economic importance (<https://jgi.doe.gov/csp-2018-duplessis-reference-genomes-50-rust-fungi/>). Comparisons are expected to answer questions concerning taxonomy, host range, specificity and selection, pathogenicity, diversification, and genome expansion and will likely have direct bearing on the development of novel strategies for crop protection.

TRANSCRIPTOMES, GENOME-WIDE ASSOCIATION, AND COMPARATIVE STUDIES

The low cost of sequencing and the availability of genome sequences also allowed the generation of comprehensive transcriptomes representing various rust fungus developmental stages, including different infection stages, and their comparisons. It goes beyond the scope of this review to list the dozens of studies here, except to say that they have quickly supplanted all the EST work. These comparative studies have provided essential insight into genetic programs involved in spore germination and host infection strategies (reviewed in Lorrain et al. 2019).

Since genome sequences from many isolates are now available for several species, variants in genes/proteins can be associated with phenotypes to find candidate genes for functional verification. A small-scale genome-wide association study approach to link changes at the transcript level to changes in virulence profiles on defined wheat cultivars, resulted in the identification of 15 *Puccinia triticina* candidate secreted effectors potentially recognized by eleven different leaf rust resistance (*Lr*) genes (Bruce et al. 2014). A larger scale phenotype-genotype association analysis resulted in the identification of a small subset of candidate effectors potentially interacting with *Lr20* (Wu et al. 2017). A similar comparative analysis in an *M. larici-populina* population revealed candidate effectors widely present and under selection pressure as the most likely candidates for screening (Persoons et al. 2014). Large

genomic resources can also be compared to assess the genetic potential of rust fungi indirectly, especially when transcriptomes from interactive stages, that is transcriptomes from both the pathogen and host are compared. In one study on the infection of wheat by *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, this led to the description of gene coexpression networks and the identification of candidate effectors potentially involved in the interaction (Rutter et al. 2017). All these computational approaches are identifying candidate genes from rust fungi involved in the interaction with their hosts and provide leads for functional analyses and potential targets for disease control.

PROTEOMICS

EST inventories opened the door to extensive proteomics work, such as for bean rusts (Cooper et al. 2007, 2016; Luster et al. 2010; Stone et al. 2012) and *Puccinia triticina* (Song et al. 2011). More comprehensive proteomes were identified using whole genome sequences. An innovative technique used purified *Puccinia triticina* haustoria to generate a monoclonal antibody in mice that was subsequently used to isolate to near homogeneity by immunoprecipitation, haustoria from *Puccinia triticina*-infected wheat leaves. These antibody-purified *Puccinia triticina* haustoria revealed a content of 1,192 identified proteins, among which 140 candidate secreted effector proteins (CSEPs) (Rampitsch et al. 2015). When relative protein amounts among those 140 CSEPs is compared with the normalized transcript levels of the corresponding genes in wheat leaves 6 days after infection with *Puccinia triticina*, discrepancies between correlations of up to 2 orders of magnitude are observed for certain genes (G. Bakkeren, unpublished data). Similar observations were made in wheat infected with *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* (Figure 7 in Zhang et al. 2019). This shows that protein levels often do not correlate well with transcript levels (Gygi et al. 1999), and that quantitative proteomic analyses are needed in conjunction with transcriptomes. Indeed, when establishing “secretomes” using proteomic analyses, sometimes more than 50% do not conform to predicted signal peptide-containing canonical ER-Golgi secreted proteins in the sequenced genomes, indicating the existence of alternative pathways and mechanisms and a potential larger “secretome” than currently predicted (Agrawal et al. 2010). In addition, protein fragments have been mapped to positions on the *Puccinia triticina* genome where no genes are predicted (C. Rampitsch, personal communication), even though transcripts are often found, such as for a mating pheromone (Cuomo et al. 2017). It is anticipated that the various “omics” datasets and future gene calling algorithms and machine learning approaches will provide better annotations. Proteomics is also valuable in that posttranslational modifications such as phosphorylation, shown to be responsible for major changes in activity levels, can be revealed (Rampitsch and Bykova 2012).

CHASING EFFECTORS

In the 1990s, various biochemical attempts were made to isolate *Avr* gene products from rust fungi by isolating race-specific elicitors of the hypersensitive response (HR; necrosis) in cultivars having specific *R* genes. Intercellular (apoplast) washing fluid was analyzed but no corresponding genes were identified (reviewed in Staples 2000). This approach is being revisited in various pathosystems using more sensitive proteomic analyses.

Small secreted proteins were identified in *M. lini* after differential screening of cDNAs from an infected host and represented *Avr* genes conditioning resistance on flax with corresponding *R* genes *L5*, *L6*, or *L7* (Dodds et al. 2004). These *Avr* genes were shown to be expressed in haustoria and the corresponding AVR proteins delivered to and active within the host cell. This work finally

proved the molecular basis of the gene-for-gene hypothesis as proposed by Flor in 1947 (reviewed in Flor 1971) in the original model flax-flax rust pathosystem and was a first for rust fungi. Since haustoria are thought to be central hubs of the biotrophic interaction with crucial metabolite exchange and effector secretion, their isolation has helped to identify suites of effectors using ESTs and transcriptomic data (Catanzariti et al. 2006; Hahn and Mendgen 1997; Thara et al. 2003), and proteomics (Cooper et al. 2016; Rampitsch et al. 2015). Moreover, with the extensive genomic resources available, machine-learning algorithms tuned to rust fungal genes have been developed to generate lists of potential effectors, including their predicted localization (de Carvalho et al. 2017; Petre et al. 2014; Saunders et al. 2012; Sperschneider et al. 2017, 2018a, b). The rust fungal AVR effectors cloned to date are recognized by *R* gene products in the host cytoplasm (Anderson et al. 2016; Catanzariti et al. 2006; Chen et al. 2017; Dodds et al. 2004; Salcedo et al. 2017), but for *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, two AVR effectors are found localized to the urediniospore surface and interacting at the barley leaf surface with the *RPG1* resistance protein to trigger an HR (Nirmala et al. 2011). Apart from the requirement for the presence of a classical N-terminal signal peptide sequence as a criterion for effector selection, length exclusion above 300 amino acids is often used. Indeed, most effectors studied are small secreted proteins including many proven AVRs; however, PgtAVRSr35 is 578 amino acids long (Salcedo et al. 2017). With the availability of large genomic resources, we need to keep an open mind when attempting to identify candidate effectors.

Effector suites have been associated with virulence potential. The importance of understanding and detecting potential virulence shifts in populations has been recognized since the early 1900s with extensive annual field surveys of cereal rusts, collection of isolates and subsequent phenotyping on differential cultivars (*R* gene inventory) to identify races (*Avr* gene repertoire). This is crucial for the management of rust diseases and has been the bed rock of resistance breeding in cereals for over 70 years and has been emulated for other economically important pathosystems. Indeed, extensive studies on the population genetics of rust fungi at regional and more recently global scales have been and are being done. Within the context of this review, we highlight the advances in DNA sequencing and bioinformatics that have allowed population studies and characterization of regional and global lineages based on neutral SNPs in thousands of loci. With an increasing number of isolates sequenced, extensive SNP databases are becoming available for a few rust fungal species, allowing the development of rapid and cost-effective SNP-based tools for genotyping, including arrays able to detect thousands of loci, or analysis of transcripts or a set of discriminating fungal genome regions from infected leaf samples, even in portable devices (Hu et al. 2019; Hubbard et al. 2015) for monitoring the global spread of new harmful lineages such as *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* Ug99 or high temperature-adapted, more virulent *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* lineages (Bueno-Sancho et al. 2017; Newcomb et al. 2016; Olivera et al. 2015; Radhakrishnan et al. 2019). These are now invaluable resources for the association of (virulence) phenotypes to (effector suite) genotypes to inform rust disease management.

FUNCTIONAL ANALYSIS OF RUST FUNGUS GENES

For rust fungi, publicly available genomic resources are increasing fast, yet proper genetic manipulation and direct means of functional gene analysis in the rust fungi themselves, though important, is still very challenging. Over the years there have been several efforts to develop genetic transformation technology. Using the beta-glucuronidase (GUS) or green or red fluorescent protein (GFP, DsRed) genes as a reporter under control of various

promoters, particle bombardment of urediniospores resulted in transient transformation of *Uromyces* spp. (Bhairi and Staples 1992; Djulic et al. 2011), *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* (Fehser and Moerschbacher 2011; Schillberg et al. 2000), and *Puccinia triticina* (Webb et al. 2006). However, detection of these low frequency events would be more efficient if selectable markers were available. Although there are reports employing hygromycin, and fungicides such as benomyl and carboxin (Djulic et al. 2011; Wirsal et al. 2004), none have yet resulted in effective selection in planta. For the biotrophic rust fungi, selection was achieved in *M. lini* while it was growing in flax, using *Agrobacterium tumefaciens* to introduce an *AvrL567* gene silencing construct that resulted in stable transformants (Lawrence et al. 2010). The silencing of this *Avr* gene no longer prevented the fungus from growing in flax lines having the recognizing *R* gene and hence allowed only transformed rust fungi to sporulate. This provided a tight selection. However, the use of a combination of genes involved in fungus–plant interaction as a transformation selection system may not be ideal to study the function of other genes involved in (early) fungal–host interactions. It seems that it is just a matter of time before the right conditions and combinations of genes are found to achieve reproducible transformation. For example, CRISPR technology may be used to mutate interaction-inhibitory factors or dominant *Avr* genes as selectable markers.

Since *Avr* genes are typically dominant and the matching *R* genes provide an excellent selection during the needed biotrophic growth, the use of induced/engineered or natural mutations in *Avr* genes has also been exploited successfully. The study transforming *Puccinia triticina* mentioned above (Webb et al. 2006), generated random integration events and used subsequent selection on various *R* gene containing cultivars to assess the feasibility of disrupting a matching *Avr* gene for further cloning and analysis. Though in that study genetic transformation was shown to be stable over several infection cycles in the wheat host, it did not lead to the cloning of an *Avr* gene. The idea of inducing mutations was used in another study where *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* urediniospores were treated with ethylmethane sulfonate, resulting in mutants with altered virulence on a wheat cultivar harboring resistance gene *Sr35*. The genomes of the wild-type avirulent *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* isolate and 15 confirmed virulent mutants were sequenced and compared, leading to a candidate secreted effector gene that was shown to represent *PgtAvrSr35* (Salcedo et al. 2017). Since the rust fungi are dikaryotic, containing two haplotypes for most of their life cycle, relying on mutation analysis to identify (dominant) gene function may only work for genes in a heterozygous state. This concept was exploited in a naturally emerged mutant of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* that had become virulent on a wheat cultivar harboring *Sr50*. Upon genome sequencing, a 2.5 million base pair region was identified where loss of heterozygosity had occurred, which was confirmed to result from a duplication of one haplotype in that region. Again, focusing on small secreted protein genes located in that region, only a few candidates were identified upon comparing alleles in the population, one of which was functionally shown to represent *PgtAvrSr50* (Chen et al. 2017; discussed further below).

In the previous two studies, confirmation of the avirulence function of the effectors was achieved in a heterologous system: coexpressing *Avr* candidates and matching *R* genes, delivered via *Agrobacterium tumefaciens* in *Nicotiana benthamiana*, triggered a visible HR. This heterologous system has been successfully used for effectors from various rust fungi to investigate their localization (using fluorescent chimeras and confocal microscopy) and possible host targets to infer their potential functions (reviewed in Lorrain et al. 2018a). *Arabidopsis thaliana* has also been used for testing *M. larici-populina* effector functions. When several were expressed as transgenes, they promoted susceptibility to several other pathogens (Germain et al. 2018). Indeed, suppression of host

defense responses has been shown to be a general function of many pathogen effectors. On the other hand, only for few rust fungi, a number of effectors were verified to suppress defenses in their natural host after their delivery by various engineered microbes, including various *Pseudomonas* species using their Type III Secretion System (Liu et al. 2016; Qi et al. 2016, 2018; Ramachandran et al. 2017; Zhao et al. 2018). Using such microbes for delivery, having verified they do not elicit strong nonhost responses, effectors from a few rust pathogens have also been tested in their natural hosts to investigate their potential to trigger defense responses (Dodds et al. 2004; Liu et al. 2016; Maia et al. 2016; Upadhyaya et al. 2014). To verify the avirulence function of *PgtAvrSr35*, an *E. coli*-produced protein fraction was infiltrated in wheat leaves to trigger an HR (Salcedo et al. 2017). And the barley stripe mosaic virus (BSMV) was used to indicate *PgtAVRSr50* function in *Sr50* wheat (Chen et al. 2017). Another potential homologous expression system for testing cereal rust fungal genes is the foxtail mosaic virus, recently engineered to express larger proteins (>600 amino acids) in cereals (Bouton et al. 2018). These natural host approaches can likely be used as effector-based screening methods to discover novel resistances in cultivars and (wild) germplasm to assist breeding programs.

Alternative methods to validate rust fungal gene functions have included heterologous expression in other fungal organisms for biochemical studies and to revert clear phenotypes caused by a deletion mutant in a well-described gene. For example, a bean rust *Uromyces fabae* plasma membrane ATPase gene was able to complement a homologous ATPase mutant in *Saccharomyces cerevisiae* and allowed measurements of its enzymatic activity (Struck et al. 1998), and the *Uromyces fabae* invertase *INV1* gene was expressed in the same yeast and *Pichia pastoris* to study its activity associated with the secreted gene product INV1p (Voegele et al. 2006). Similarly, MAPK deletion mutants *kpp2/ubc3* and *kpp6* in the corn smut pathogen *Ustilago maydis* were used to show functional complementation by the homologous *PtMAPK1* gene from the wheat leaf rust fungus (Hu et al. 2007a). In that study, complementation was functional when the *PtMAPK1* gene was expressed from the *Ustilago maydis* *Hsp70* promoter, but also from its endogenous *PtMAPK1* promoter, indicating that *Puccinia triticina* promoter elements were recognized by the *Ustilago* transcription machinery. Complementation of mutations in other fungal organisms such as *Fusarium graminearum*, *Magnaporthe oryzae*, and *Schizosaccharomyces pombe* has since been emulated for various other rust fungus genes (Guo et al. 2011; Jiao et al. 2017; Zhu et al. 2018).

HOST-INDUCED GENE SILENCING (HIGS) AND SMALL RNA SIGNALING

More recently, one of the most successful general, but indirect ways to test functions of rust genes is through gene silencing, using the host for expression and generation of silencing molecules. Originally shown to work for the barley and wheat–*Blumeria* pathosystems (Nowara et al. 2010), HIGS was quickly adapted for rust fungi either using the BSMV for delivery of sense and antisense molecules that could form duplexes (Panwar et al. 2013b; Yin et al. 2011) or using *Agrobacterium tumefaciens* to transiently express hairpin fold-back molecules in the host cells (Panwar et al. 2013a). Though the production of siRNA molecules in wheat could be shown, as well as a major reduction in mRNA levels of the fungal gene targeted, the exact mechanism is currently unknown but likely relies on the uptake of siRNAs by the fungal haustoria. Silencing rust fungus genes involved in establishing disease or affecting host defense, leads to clear measurable phenotypes. Moreover, when targeting rust fungus genes essential for pathogenicity, this approach could complement other rust disease reduction strategies

in agriculture when the silencing constructs are stably integrated in the wheat host (Panwar et al. 2018; Qi et al. 2017). Targeting many of the effectors has not resulted in clear phenotypes, likely because of functional redundancy or cumulative (small) roles in pathogenicity (Yin et al. 2015), though some can be shown to contribute substantially to levels of disease development (Liu et al. 2016; Yin et al. 2019). This should be different when silencing a dominant avirulence gene. It would be interesting to target genes involved in the change of cell wall structure or components known to occur in fungi during infection, likely to prevent recognition of such components to trigger defenses. This was shown using microscopy for *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* and *Uromyces fabae*, where cell wall content was changed from chitin to chitosan (El Gueddari et al. 2002). In the tomato pathogen *Cladosporium fulvum*, the AVR4 effector masks chitin on fungal cell surfaces (Westerink et al. 2002); silencing such genes would expose fungi to the host immune responses, possibly triggering broad defense responses (Oliveira-Garcia and Deising 2013).

As shown in other plant–microbe interactions, the existence of small RNA molecules and their potential role in communication between the pathogen and its host to promote disease or fine-tune defense was also demonstrated for rust pathosystems. Though several studies identify host regulatory RNAs whose expression is affected during rust fungus infections, only a few have investigated rust fungus-specific small RNAs. Targets/genes whose sequence match and are therefore potentially regulated by small RNAs, were predicted in several rust fungi. These included kinases, effector genes and TEs with potential to influence transcription of genes nearby. In addition, matches to genes in the host were found, one of which was experimentally confirmed to be involved in the interaction (Mueth et al. 2015; Sperschneider et al. 2018c; Wang et al. 2017). Interfering with (crucial) regulatory small RNAs opens up new possible strategies for the genetic manipulation and functional analysis of rust fungus genes. When fungal small RNAs that function as general pathogenicity factors are targets for the HIGS technology, it could provide crop protection; targeting multiple small RNAs with different functions at once could be difficult to overcome by the fungus (through mutation).

CONCLUSIONS AND IMPACT ON CROP PROTECTION

Over the last 20 years, research on rust fungi has rapidly expanded due to the advent of new genomic technologies. Genomes of rust fungi have been shown to be much larger and more complex than other fungi, with highly variable haplotypes among dikaryotic genomes and genome sizes ranging from 87 Mb to 2 Gb. Rapid progress is being made on developing complete chromosome assemblies for a few rust fungi. These genomes contain high levels of repetitive elements and large gene families, including very large secretomes thought to be critical for the biotrophic life style of these plant pathogens. For several species, genome data from several isolates, transcriptomes, and proteomes now exist, allowing the generation of comprehensive pan-genomes and comparative analyses. This provides insight into the variability of fungal genomes and population structures including virulence shifts and how these relate to the presence and emergence of effector variants. This will likely provide new insights that will allow more effective deployment of host *R* genes. Moreover, genetic and molecular research on the biotrophic rust fungi, though challenging, is opening avenues for novel crop protection strategies. The first *Avr* genes have been cloned and it has been shown that the effector proteins they encode can directly interact with their cognate *R* gene proteins within the host cell or on the cell surface; there is as of yet, no evidence of indirect interactions with *R*-guarded targets in these rust pathosystems. Progress has been made on functional assays using a wide variety of different approaches, and hence, new AVR effector

inventories can assist in isolating and recognizing *R* genes including in the search for novel, potentially more durable ones among wild germplasm. Among effectors not interacting with *R* genes, some have been shown to be involved in nutrient uptake at the haustorium interface or to suppress plant host immune responses. This latter set of effectors, and other genes crucial for the interaction with the host, have provided candidates for silencing using the HIGS technology to interfere with the ability of the rust fungus to infect and cause disease; this technology may also be successful when choosing fungal small regulatory RNAs and their target genes that contribute to pathogenicity. Unraveling the function of these novel fungal genes may lead to the development of novel classes of fungicides. Lastly, fungal effector targets in the hosts may represent susceptibility genes that could be modified by genome editing to reduce infection and disease.

FUTURE CHALLENGES

Despite the enormous progress on the generation of genomic resources for the rust fungi, there are still no “gold standard,” haplophased and chromosome-based genome assemblies with comprehensive gene annotations, including proper allele identification, and analyses of repeats and the extremely large TE content. This is a prerequisite for further meaningful resequencing of isolates with the understanding that this will result in the generation of pan-genomes for species and *forma speciales* to assess the gene complement and precise allelic variants, with a focus on effectors. For this to be most effective, more detailed worldwide information on virulence profiles (on host cultivars) and population structures (genetic lineages) is needed. Sequencing *Avr* genes in populations could assess the presence of effectors in a heterozygous state, posing a higher risk of overcoming the matching *R* genes through mutation. However, until *Avr* genes, as well as the avirulent and virulent alleles are well defined, genotyping will only be predictive of race phenotypes in populations where recombination (sexual or somatic) does not occur or only occurs infrequently.

A major challenge remains the lack of a suitable and reproducible genetic transformation technology for rust fungi to assess gene functions. Some current approaches employing GUS or GFP look promising but the limited choice of selectable markers during biotrophy is thwarting efforts; gene silencing or editing of certain selectable target genes may overcome this but the current choice of *Avr* genes for selection may compromise testing pathogenicity and other effector genes. A reproducible transformation system would allow for direct gene function testing, which now is mainly done in heterologous systems.

Classical genetic experimentation through defined crosses is still a powerful approach and should be revisited with the genomic resources now available. Much of the effector work has focused on genes encoding small secreted proteins. It is now clear that this is an important class of effectors, but not the only one. Genetic studies will provide one means for identifying these additional classes of *Avr* genes. There is a growing amount of literature showing quantitative differences (aggressiveness) between isolates of rust fungi of the same race phenotype (Pariaud et al. 2009). These studies examine a range of traits including infection efficiency, latent period, and sporulation rate. Defining the genetics behind these traits will provide handles to begin to elucidate the mechanisms responsible. One of the hurdles has been the difficulty of measuring these phenotypes.

Several intriguing questions in rust fungi (and other biotrophs) remain unresolved to date. Haustoria are considered the main bodies where effector secretion and exchange of metabolites and small RNAs occur. This involves a complex, poorly understood interface consisting of a haustorial wall, an EHM, and a modified host membrane; sealed off by a specialized structure, the neckband,

it is considered a modified apoplastic space. However, it is likely that the expanding intercellular hyphal network also contributes to the interactions with host cells. For example, in *Ustilago* species, which grow within hosts both inter- and intracellularly as biotrophs, no haustoria are found and hyphae are therefore thought to perform exchange of nutrients and delivery of effectors (Lanver et al. 2017). Crucial information is lacking on how fungal effectors are delivered, either into the apoplast (EHM) and selectively taken up, or (a subset) delivered directly into the host cytoplasm. What are the functions of the various interfaces? Are these processes active or passive? Also, the developmental regulation of the different stages of the life cycle of the rust fungi are unknown. New genomic technologies such as single cell transcriptomics may identify genes involved in such transitions. The mechanisms involved could provide targets for pathogen control.

NOTE ADDED IN PROOF

Li et al. (2019) recently provided proof of complete nuclear exchange, during somatic hybridization, among dikaryotic strains of *P. graminis* f. sp. *tritici* without apparent chromosomal recombination between nuclei. Apart from providing an explanation for the highly variable haplotypes seen among sequenced rust fungus genomes, it provides a cautionary note for assigning relatedness through phylogenomic analyses based on non-phased SNP data.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Ralf Voegele and Peter Dodds and three anonymous reviewers for critical comments on the manuscript.

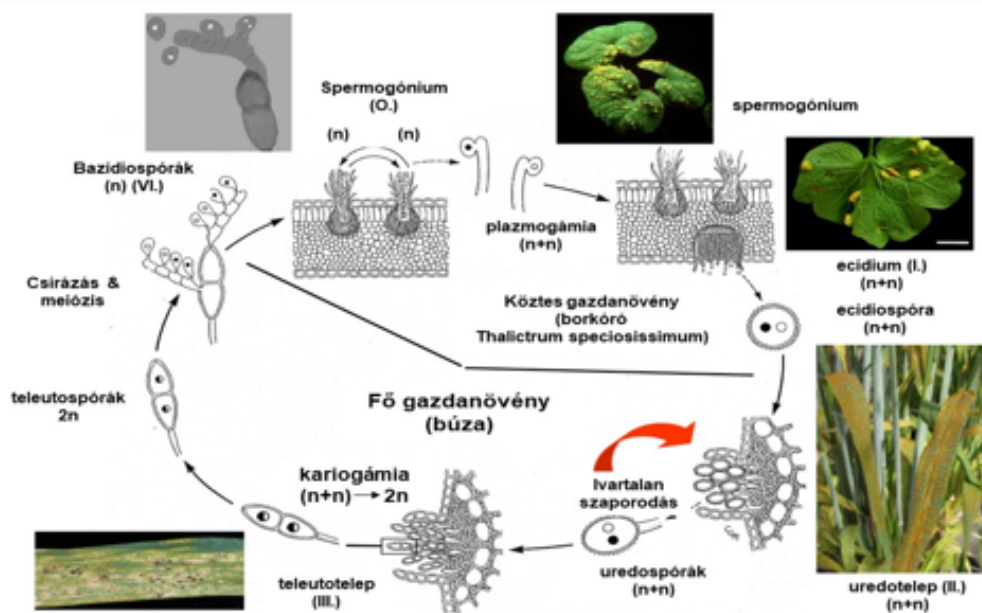
Absztrakt

A több ezer leírt rozsdagomba faj közül sokról köztudott, mennyire káros hatással vannak gazdanövényeikre, köztük fás szárú növényekre vagy akár a főbb növénykultúrákra. Nem véletlen, hogy ezek a bazídiumos gombákhoz tartozó patogén szervezetek már több mint egy évszázada képezik kísérletek és vizsgálatok tárgyát. Biotróf életmódjuk miatt azonban nagy kihívást jelent a velük való munka, hiszen szaporodásukhoz szükség van a gazdaszervezetükre, így a nehezen vizsgálható patogének közé sorolhatóak. Habár egy, az 1940-es években rozsdagombákkal végezett vizsgálat nagy hatással volt a kórokozó és gazdaszervezete között zajló kölcsönhatásokat leíró „gén a génért” hipotézis leírásában, kevés erőfeszítés történt a rozsdagombák genetikai vizsgálatára. Teljes mértékben kihasználva az 1980-as években kifejlesztett molekuláris genetikai eszközöket, a növénypatogén mikroorganizmusokra irányuló kutatások virágkorukat élték, azonban a rozsdagombák ilyen jellegű tanulmányozása továbbra is kihívást jelentett, bár nem volt teljesen eredménytelen. A genomika korszaka ugyanakkor áttörést hozott a biotróf gombák kutatásában, így az elmúlt két évtized molekuláris genetikai elemzései az innovatív vizsgálati módszerek és heterológ rendszerek alkalmazásával jelentősen előmozdították számos rozsdagombagén funkciójának és a gazdaszervezettel való kölcsönhatásban betöltött szerepének megismerését. Ezáltal a rezisztencianemesítésre irányuló erőfeszítések optimalizálása, illetve az általuk okozott súlyos betegségek elleni új védekezési stratégiák tervezése és tesztelése egyaránt lehetővé vált.

Kulcsszavak: növényvédelem, genetika és rezisztencia, mikológia

A fitopatogén gombák egyik legnagyobb csoportját a rozsdagombák alkotják, melyek a *Basidiomycota* törzs *Pucciniales* (korábban *Uridinales*) rendjébe tartoznak. Eddig nagyjából 7500 rozsdagomba fajt írtak le a kutatók, melyeket 133 ismert nemzetségbe sorolnak (Aime et al. 2014; Cummins és Hiratsuka 2003; Toome-Heller 2016). A rozsdagombák változatos és bonyolult életciklussal rendelkeznek (Cummins és Hiratsuka 2003). Példaképpen a búza szárrozsdáját okozó *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* tipikus teljes fejlődésmenetű, tehát öt spóra alakkal rendelkező rozsdagomba, melynek két, egymástól rendszertanilag elkülönülő gazdanövényre van szüksége az életciklusának hiánytalan végbemeneteléséhez (Leonard és Szabo 2005). Az uredo alakja, mely a kórokozó ivartalan fázisához tartozik, a búzát, az árpat és még számos fűféléket képes fertőzni. Az ivartalan fázis a teleuto alakkal fejeződik be még a gabonaféléken, de már a köztes gazdán (*Berberis* spp. és *Mahonia* spp.) kezdődik meg a kórokozó életciklusának ivaros fázisa. A teleutospórák kicsírázva bazídiospórákat hoznak létre, amelyek a köztes gazdaszervezetet fertőzik meg, és azon spermogóniumot képeznek. Amikor két, eltérő párosodási típusú spermácium kapcsolatba kerül, megtörténik a megtermékenyítés, és ennek eredményeképp kialakul az ecídium. Az ecídiospórák a gabonaféléket fertőzik, így ezzel befejeződik a kórokozó életciklusa. A búza levélrozsdáját az előbbi kórokozó közeli rokona a *Puccinia triticina* okozza, mely nagyon hasonló életciklussal rendelkezik (**1. ábra**) (Bolton et al. 2008). A lenrozsdát okozó *Melampsora lini* szintén teljes fejlődésmenetű rozsdagomba, tehát valamennyi spóralakkal és teleptípussal rendelkezik, viszont életciklusa egyetlen gazdaszervezethez kötött, más szóval autoecikus rozsdagomba (Lawrence et al. 2007). A spektrum másik végén a hiányos fejlődésmenetű rozsdagombák állnak, amelyek csak két spóralakkal (teleutospóra és bazídiospóra) és teleptípussal (teleutotelep és bazídium) rendelkeznek, hiányzik a spermogónium és az általa termelt spermácium, illetve egyetlen gazdanövényt fertőznek, ilyen például a *Puccinia mesnieriana* (Anikster és Wahl 1985). A *Pucciniales* rend monofiletikus, a különböző életciklusok a teljes fejlődésmenetű ősekből kiinduló konvergens evolúció révén jöttek létre (Aime et al. 2017).

A gazdanövény szövege a fertőzés során összetett fejlődési folyamaton megy át, amelynek része a rozsdagomba kórokozó és a gazdaszervezete közötti kölcsönös kapcsolat. Számos különböző morfológiai változás következik be a fertőzés folyamán. A gazdaszervezet levelének felületén landoló uredinospóra csírázása során csíratömlőt képez, amely a növényfelület felépítése által vezérelve (mechanoszenzoros tigmotropizmus) egy gázcserenyílás felett appresszóriumot fejleszt. Az appresszóriumból egy penetráló pecek fejlődik ki, amely behatol az intercelluláris térbe, ahol egy gázcserenyílás légudvarában vezikulát képez, amiből később a fertőző hifa alakul ki. Amikora a fertőző hifa növekvő vége közvetlen kapcsolatba kerül a mezofill sejttel kialakul a hausztóriumot képző anyasejt. A hifa közvetlenül hatol be a mezofill sejt sejt falán át, majd a sejt plazmalemmája befűződik, lehetővé téve egy specifikus táplálásra szolgáló struktúra, a hausztorium kialakulását. Egy bonyolult határfelület jön létre a vegyületek, tápanyagok és fehérjék (effektorok) cseréjére a növényi sejtmembrán sérülése nélkül, melyet az extrahausztóriális membrán (a gazdasejt módosult sejtmembránja), extrahausztóriális mátrix (EHM), a hausztorium sejt fala és sejtmembránja alkot (áttekintésért lásd Voegelé et al. 2009). A fertőzés különböző szakaszaiban más és más



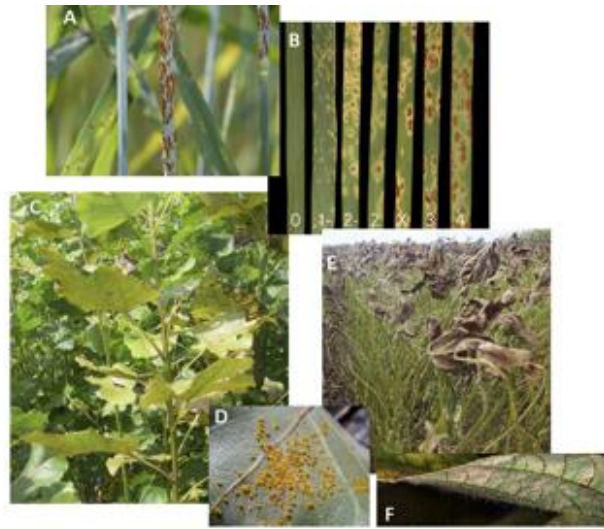
1. ábra A búza levélrozsdáját okozó, teljes fejlődésmentű, autoecikus *Puccinia triticina* életciklusa. Megjegyzés az ábrához: A kórokozó ivartalan szaporodási ciklusa a búzán ecidiospórákból, illetve uredospórákból is kiindulhat, amelyek a vegetáció során a levegőben terjedve új egyedre kerülhetnek, és ez gyorsan járvány kialakulásához vezethet. Amikor a körülmények kedvezőtlené válnak számára, az öregedő búzán teleutotelepeket, bennük pedig teleutospórákat képez a kórokozó. Minden egyes bazidiospóra csupán egy sejtmagot tartalmaz a fejlődésének korai szakaszában, amely a két meiotikus osztódás eredményeképpen keletkezett (ahogy a folyamatábrán is látható). Ezután a négy sejtmag mitózissal osztódik, így két haploid sejtmag keletkezik bazidiospóráként, ahogy a mikroszkópos felvételen is látszik (Anikster 1983). Az ábrákat Alexopoulos és munkatársai (1996) alapján C. Gubbins Hahn rajzolta (John Wiley & Sons, engedélyével sokszorosítva). Ecidium és bazidiospórák fotói: T. Eilam, J. Kolmer (a kép felhasználása engedélyezett).

Ak

specifikus génkészlet fejeződik ki (Cuomo et al. 2017; Hacquard et al. 2010; Link és Voegelé 2008; Lorrain et al. 2018b). A kórokozóban és a gazdaszervezetében egyaránt lejátszódó fertőzési folyamatokról és strukturális változásokról az 1960-as évek óta számos mikroszkópos vizsgálatot publikáltak sok patoszisztémára vonatkozóan (különösen a bab és a gabonarozsda kórokozóiról, pl. Harder és Chong 1991; Lennox és Rijkenberg 1989; Mendgen 1973). Számos rozsdagombafaj képes kétféle mechanizmust alkalmazni a gazdanövénybe jutáshoz. A rozsdagombák bazídiosporái jellemzően az epidermisz egyik sejtjén keresztül jutnak be a köztes gazdanövénybe, míg például a *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* uredinosporái a fő gazdanövény levelének a sztómáján keresztül hatolnak be az appresszorium segítségével (Leonard és Szabo 2005). Egy kivétel, a *Phakopsora pachyrhizi* ismert arról, hogy a csírázó uredinosporáiból képződő appresszoriumok az epidermisz sejtein át hatolnak be a szója levelébe (Goellner et al. 2010). Általánosságban elmondható, hogy a legtöbb rozsdagomba esetében mindkét mechanizmusnak van szerepe, azonban ezek szabályozva vannak a fejlődés során.

A rozsdagombák a növényvilágban okoznak betegségeket, beleértve a fontos mezőgazdasági, kertészeti és erdészeti kultúrákat. Hírhedten felelősek a gabonafélék megbetegedéséért, általuk okozott járványokról már az ókori görögök és rómaiak is beszámoltak. Búza feketerozsda járványok azóta is előfordulnak, ezeket legutóbb a *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* Ug99 és "Digalu" törzsei okozták (Singh et al. 2015). Hasonlóan a búza vörös rozsdája (*Puccinia triticina*) és sárga rozsdája (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) is a búza leggyakoribb betegségei közé tartoznak világszerte, az általuk okozott termésveszteség 1-20% között mozog (Bolton et al. 2008; Chen et al. 2014; Savary et al. 2019). További, meghatározó gazdasági jelentőségű gabonarozsda közé tartozik a zab koronás rozsdáját okozó *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* (Nazareno et al. 2018), az árpa törperozsdája, a *Puccinia hordei* (Park et al. 2015) és a kukoricarozsda, a *P. sorghi* (Rochi et al. 2018). Az *Uromyces* fajok nagy károkat okoznak a babféléken (Voegelé 2006), a *Phakopsora pachyrhizi* kórokozó a szóján (Goellner et al. 2010), míg a *Hemileia vastatrix* a kávéét károsítja (Talhinhas et al. 2017). A *M. larici-populina* súlyosan károsítja a nyárfaültetvényeket (Duplessis et al. 2011), miközben más fákat, mint például a tölgyet a *Cronartium quercuum* f. sp. *fusiforme* vagy a mirtuszt az *Austropuccinia psidii* veszélyezteti (Carnegie és Pegg 2018; Sniezko et al. 2014). Az 1800-as évek vége óta súlyos járványokat okozott a ribizkerozsda (*C. ribicola*) Ázsiában, Európában és Észak-Amerikában, illetve napjainkban is a fehér fenyők jelentős betegségként tarják számon

(Geils et al. 2010). A **2. ábra** néhány gyakori rozsdagombák által okozott betegségeket mutat be.



2. ábra A: *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* uredotelepei búzán. A képet az Egyesült Államok Mezőgazdasági Minisztériumának Gabonabetegségek Laboratóriuma bocsátotta rendelkezésünkre. B: *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* fertőzőési típusainak (IT) tartománya standard búzadifferenciálvonalakon. Az IT-eket 0-tól 4-ig terjedő skálán értékelték, ahol a 0, ";", 1, 2 és X rezisztens, a 3 és 4 pedig fogékony. A mezotetikus IT X az 1-es és 3-as értékek keverékét tartalmazza. Az IT-k a Sr és AvrSr génkombinációkra jellemzőek. Például az Sr5/AvrSr5 kombináció IT 0-t eredményez; az Sr24/AvrSr24 kombináció pedig IT 2-t. A fényképet P. Olivera-Firpo készítette (a kép felhasználása engedélyezett). C: Nyárfa levélrozsdája, a *Melampsora larici-populina* természetes előfordulása egy *Populus trichocarpa* × *Populus deltoides* hibriden, D: *M. larici-populina* uredotelepeinek közeli felvétele vad *Populus nigra* növényen. A fényképet P. Frey készítette (a kép felhasználása engedélyezett). E: z ázsiai szójarozsda a *Phakopsora pachyrhizi*, által okozott lombvesztés a fogékony fajtákon egy brazil szántóföldön. Fényképezte: M. Meyer, Embrapa Soybean Database (a kép felhasználása engedélyezett). F: A *Phakopsora pachyrhizi* spórái egy fogékony szójabab levelén. A Neto felvétele, Embrapa Soybean Database a kép felhasználása engedélyezett).

A rozsdagombák obligát biotróf életmódja megnehezítette a molekuláris genetikai és biokémiai vizsgálatukat. Míg számos növényi kórokozóval kapcsolatos molekuláris genetikai vizsgálatok a virágkorukat élték, a rozsdagombákkal kapcsolatos hasonló kutatásokat hátráltatta, hogy a legtöbb rozsdagombát nem lehet a gazdaszervezetén kívül tenyészteni, és így egy genetikai transzformációs rendszer kifejlesztése sem lehetséges. Azonban a genomika forradalma számos előnnyel járt különösen az obligát gombakórokozók szempontjából, így lehetővé vált minimum a strukturális gének elemzése, ami a transzkriptomikai és proteomikai munkával párosulva megkönnyítette a molekuláris genetikai vizsgálatok elvégzését a hozzájuk kapcsolódó heterológ rendszereken. A genomika forradalma óta számos laboratórium kezdett bele a rozsdagombák kutatásába. Az alábbiakban áttekintünk néhány, már elvégzett kutatást, ismertetjük, jelenleg mennyire tudjuk a rozsdagombákat genetikailag manipulálni, vagy milyen módszereket tudunk alkalmazni a rozsdagomba gének vizsgálatához, illetve bemutatjuk,

mindezek hogyan befolyásolják az ellenük való védekezést és a mezőgazdaságot, magunkat néhány jól kidolgozott és jelentős patoszisztémára korlátozva.

Ebben az összefoglalóban a Kamoun (2006) által meghatározott "effektorok" kifejezést használjuk. E tág meghatározás szerint az effektorok olyan molekulák, amelyek befolyásolják a gazdasejtek szerkezetét és működését, hogy elősegítsék a fertőzést, valamint a gazdaszervezetben való túlélést és szaporodást. Az effektorok az általánosabb, patogenitáshoz kapcsolódó géntermékek egy alcsoportját alkotják, amelyeket a gomba a betegség kialakítására használ. Patogén szervezetek egyes géntermékei beindítják az *R* gén által közvetített védekezési választ (effektor által kiváltott immunitást), az ezeket a géntermékeket termelő géneket avirulencia (*Avr*) géneknek nevezzük. A jelenlegi kutatások alapján valószínű, hogy a legtöbb *Avr* gén effektorokat kódol, de ez az értelmezés nem zárja ki annak a lehetőségét, hogy egy avirulencia faktor ne legyen egyben egy effektor is. A „virulencia” kifejezés a szakirodalomban összemósódott tágabb leírásokkal, mint például az ezzel gyakran átfedésben lévő, de általánosabb leírással, a patogenitástól kezdve egészen az ennél specifikusabb értelmezésig, mint az *Avr* génekben bekövetkező alléltolódásokkal egészen az *R*-gének által felismert alléloktól (avirulencia) a felismerést elkerülő allélokig (virulencia) bezárólag. Hogy mindez még nehezebben legyen érthető a „virulencia” kifejezést szokás használni egy-egy kórokozó izolátumai okozta betegségek kvantitatív különbségeinek (agresszivitásának) leírására, függetlenül az ismert *R*-génektől. Ahogy arra a közelmúltban megjelent összefoglaló jellegű szakcikk rávilágítottak, ezen kifejezések „feloldhatatlanul többértelműek” a növénykórtani szakirodalomban (Lannou 2012; Pariaud et al. 2009). Az összetéveszthetőség elkerülése végett ebben a cikkben a "patogenitás" kifejezést a rozsdagombák azon géntermékeinek tág leírására használjuk, amelyek biztosítják a gombák számára azt a képességet, hogy bármilyen szintű megbetegedést okozzanak, a „virulencia” kifejezést pedig az *Avr* gének különböző alléljai által okozott specifikus kvalitatív fenotípusra alkalmazzuk.

Klasszikus genetikai vizsgálatok

Amióta a kutatók felismerték, hogy a rozsdagombák és gazdanövényeik közötti kölcsönhatások alakulása genetikai tényezők által meghatározott ("kompatibilis", betegséget okozó; vagy "inkompatibilis", eltérő szintű rezisztenciát eredményező), kísérleteket tettek arra, hogy ivaros keresztezéseken keresztül genetikai vizsgálatokat végezzenek ezeken a gombákon. Ez nagy kihívásnak bizonyult, és csak csekély számú vizsgálatot végeztek néhány fajon, tekintettel a rozsdagombák összetett életciklusára és obligát életformájára. Ettől függetlenül a

gazdanövény-kórokozó kölcsönhatások mögött álló genetika megértésének és a génfunkciók azonosításának hatékony módja az előre meghatározott keresztezések elvégzése, ami elősegíti a rozsdagombák genetikai manipulációját. A különböző gazdaszervezeteken megfigyelt, pontosan meghatározott fenotípusok miatt ezek a vizsgálatok jellemzően az *Avr* gének genetikájára összpontosítottak. Flor úttörő munkája az 1940-es években (lásd Flor, 1971) kimutatta, hogy a gazdaszervezet rezisztenciáját egy, a gazdaszervezethez tartozó domináns rezisztenciagén (R) és egy ennek megfelelő, kórokozóhoz tartozó domináns gén (*Avr*) kölcsönhatása közvetíti. Később ez a kutatás vezetett a „gén a génért” hipotézishez. Ezt a munkát továbbfejlesztették az *R* és *Avr* gének komplementerének meghatározására, valamint olyan inhibitor gének feltárására a kórokozóban, amelyek bizonyos *Avr* géneket szuppresszálnak (Lawrence és et al. 1981). A *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*- és *Puccinia triticina*-búza rendszerekben is kiterjedt genetikai vizsgálatokat végeztek, amelyek bizonyították, hogy a gazdaszervezet rezisztenciája a „gén a génért” modell szerint alakul (Loegering és Powers 1962; Samborski és Dyck 1968; Statler 1979, 2000; Williams et al. 1966). Ugyanis az 1950-es évek óta a gabonafélékben, és újabban más kultúrákban végzett hasonló jellegű genetikai vizsgálatok megalapozták a rozsdával szembeni rezisztenciagének felfedezését, melyek elengedhetetlenek a rozsdabetegségek elleni védekezésre irányuló nemesítési programokhoz (Long és Kolmer 1989; McCallum et al. 2016) (**2. ábra, B**). Az utóbbi időben a molekuláris technikákkal kombinált genetikai vizsgálatok eredményeként *Avr* génekhez kapcsolódó markereket találtak *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* (Zambino et al. 2000), a *Cronartium quercuum* f. sp. *fusiforme* (Kubisiak et al. 2011) és a *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* (Wang et al. 2018) rozsdagombák esetében. A közelmúltban a genomszekvenálásból származó több ezer egy pontú nukleotid polimorfizmus (SNP) marker elérhetősége lehetővé tette részletes genetikai térképek kialakítását és referenciagenom összeillesztések rögzítését a *M. lini* (Anderson et al. 2016) és a *M. larici-populina* (Pernaci et al. 2014) fajok esetében. A mérhető fenotípusok közé tartoznak többek között a színmutások, melynél a mutáció alapja genetikai, ahogy azt a *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* esetében kimutatták (Green 1964). Érdekes, hogy számos kutatás kimutatta a paraszexuális rekombinációnak vagy a genetikai anyag szomatikus cseréjének (hibridizáció) a lehetőségét a gazdaszervezet fertőzése során *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, *Puccinia triticina* és *Phakopsora pachyrhizi* fajok esetében (Vittal és et al. 2012; Wang és McCallum 2009; Watson és Luig 1958). A genetikai tényezők alapos elemzésére azonban nem került sor. Ez a mechanizmus hozzájárult a populációkban megfigyelt virulencia-változásokhoz számos tanulmány szerint, különösen az ivartalan

populációkban, azaz ahol nincs jelen a köztes gazda, mint például a *Puccinia triticina* esetében Észak-Amerikában. (Lásd a megjegyzésekben.)

Korai törekvések a rozsdagombák fertőzési stratégiáinak megértésére molekuláris genetikai eszközökkel

Új molekuláris módszerek alkalmazásával forradalmi változások következtek be a növényeket fertőző kórokozók és gazdaszervezetük kölcsönhatásának tanulmányozásában az 1980-as években. Ez azonban elmaradt az obligát biotróf életmódú rozsdák és lisztharmatok esetében. A rozsdagombák génfunkcióinak feltárására csak néhány laboratórium tett erőfeszítéseket az új technológiák alkalmazásával. A kezdeti törekvések közé tartozott a bab és gabonafélék rozsdagombáiból származó cDNS-ek differenciálódásának monitorozása (Bhairi et al. 1989; Deising et al. 1995; Liu et al. 1993; Thara et al. 2003; Xuei et al. 1993). Az innovatív, technikai kihívásokkal teli vizsgálatok eredményeképp a bab rozsdagombájából, az *Uromyces fabae* fajból hausztórium specifikus cDNS könyvtárakat hoztak létre, amiből kimutatták, hogy a gomba egyes génjei csak a növényben fejeződnek ki (Hahn és Mendgen 1997). Ez kifinomult mikroszkópos elemzésekkel kombinálva meghatározó jelentőségű betekintést nyújtott a hausztóriumok metabolikus csatornaként betöltött szerepébe, illetve abba is, hogy anyagcseréjük hogyan alapozhatja meg a biotróf életmódot (Link és et al. 2005; Struck és et al. 1998, 2002, 2004; Voegele és et al. 2001). Ennek keretében mutatták ki először, hogy a hausztóriumokban expresszáldott gombafehérje, az RTP1p, ami egy cisztein-proteináz-inhibitor, átkerül a gazdaszervezet sejtmagjába (Kemen és et al. 2005; Pretsch és et al. 2013).

Áttörő „-omikai” technológiák a rozsdagombák genetikai potenciáljának feltárására: az expresszált részszekvenciák (EST-k)

Bár a kozmid- és cDNS-könyvtárak építése és a rozsdagombák molekuláris klónozása megvalósíthatóvá vált, ez még mindig csak az egyes géneket jelentette, így más technikákra is szükség volt egy átfogóbb nyilvántartás létrehozásához. Mivel a rozsdagombák genomjai sokkal nagyobbak, mint más gombáké, ahhoz, hogy jobb betekintés nyerjünk a génkészletükbe, logikus lépésnek tűnt, hogy EST adatbázisokat hozzanak létre, ami több faj esetében el is készült (Catanzariti et al. 2006; Fernandez et al. 2012; Hu et al. 2007b; Link és Voegele 2008; Yin et al. 2009). Ezek a génjegyzékek első körben jó képet adtak a különböző rozsdagombák génkészletéről, és lehetővé tették a rokon gombákkal (modellekkel) való összehasonlításukat,

azért, hogy patogenitási gének váljanak azonosíthatóvá a további funkcionális vizsgálatokhoz (Xu et al. 2011).

A rozsdagombák genomjai

Korán, már 1902-ben végeztek becsléseket – fénymikroszkópot használva – a különböző rozsdagombák haploid kromoszómaszámáról, amely $n=2$ és 8 között változott (Holden és Harper 1902; McGinnis 1956). Az 1970-es évek végétől kezdődően újra megvizsgálták ezeket az értékeket a meiotikus kromoszómák háromdimenziós rekonstrukcióinak segítségével. Ebből kiderült, hogy a korábbi vizsgálatokban alulbecsülték a haploid kromoszómaszámokat, a *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* és a *M. lini* rozsdagombák esetében ez az érték valószínűbb, hogy $n = 18$ (Boehm és Bushnell 1992; Boehm et al. 1992), a *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* és *Puccinia triticina* esetében pedig az előzetes becslések szerint $n = 16-18$ (lásd Leonard és Szabo 2005 áttekintését). Ezzel összefüggésben, reasszociációs kinetika segítségével megbecsülték a genomok méretét, mely alapján a *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* 67 Mb-os genommal rendelkezhet (Backlund és Szabo 1993), ezzel egy időben a relatív fluoreszcens DNS tartalom mérések pedig számos rozsdagomba faj esetében adtak becsléseket (Eilam és et al. 1994). Nyilvánvalóvá vált, hogy a rozsdagombák genomjai jóval nagyobbak, mint más gombáké, illetve rendkívül változatosak, több haploid kromoszómával rendelkeznek, és nagy mennyiségű repetitív szekvenciákat és/vagy transzpozabilis genetikai elemeket (TE-ket) tartalmaznak. Mindezek magyarázatot adnak arra, hogy a különböző molekuláris genetikai vizsgálatok miért bizonyultak olyan nagy kihívásnak.

Teljes genomszekvenálás

A gyorsan fejlődő újgenerációs szekvenálási eljárásokkal megfizethetővé vált a rozsdagombák genomjainak szekvenálása, annak ellenére is, hogy a legújabb becslések szerint genomjaik 80-300 Mbp közötti tartományban vannak, de akár elérhetik a 2 Gbp-t, tehát jelentősen nagyobbak, mint sok más gombafajé (Aime et al. 2017; Tavares et al. 2014). Elsőként a *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* és a *M. larici-populina* genomját szekvenálták (Duplessis et al. 2011), amelyet hamarosan számos más rozsdagombáé követett (áttekintve: Aime et al. 2017; Bakkeren et al. 2016; Duplessis et al. 2014). A „harmadik generációs” vagy „hosszú leolvasású” szekvenálás (a PacBio, NanoPore, 10x Genomics és Hi-C felületeken) és az új összeillesztő szoftverek gyorsan összeillesztik a korábban még fragmentáltan publikált rozsdagenom illesztéseket, mint például a *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* (Miller et al. 2018) és a *Puccinia*

striiformis f. sp. *tritici* (Schwessinger et al. 2018) új, közel teljes, haplofázisos genomjait. *M. larici-populina* esetében ez magából a referencia genom izolátumból nyert genetikai térképnek köszönhetően ~110 Mbp (101 Mbp-ról) átdolgozott genomméretet eredményezett, amelynek szerkezeti elemei 18 kapcsoltsági csoportban vannak rögzítve (S. Duplessis, személyes közlés; JGI honlapja https://mycocosm.jgi.doe.gov/Mellp2_3/Mellp2_3.info.html). Hamarosan közléseknek egy második verziót a *M. lini* genom összeillesztéséről, amelyet ~500 Mbp-ra becsülnek a kutatók és mindkét haplotípust tartalmazza, és amely genetikai térképben rögzülve a 26 kapcsoltsági csoportba rendeződik (P. Dodds személyes közlése alapján), valamint egy harmadik verziót a *Puccinia triticina* genomból (J. Fellers és G. Bakkeren, nem publikált adatok). A mirtusz rozsdagombája, az *Austropuccinia psidii* 1,2 Gbp méretűre becsült genomját nemrég szekvenálták meg a Chromium 10x technológiát használva (McTaggart et al. 2018), és a szója rozsdagombájának, a *Phakopsora pachyrhizi* -nek három izolátumát, nagyjából 1 Gbp-t is megszekvenáltak (JGI; S. Duplessis, P. van Esse és R. Voegelé személyes közlése alapján).

A rozsdagombák genomjai lényegesen nagyobbak bizonyultak, mint sok, az oomikótákhoz és más gombákhoz tartozó jelenleg megszekvenált genomok, ez alól kivételt képez a többi biotrófként ismert gomba, mint például a lisztharmatok. Úgy tűnik, hogy ezeket a megnövekedett genomokat repetitív szekvenciák és TE-k okozzák, melyek száma a különböző nemzetségek között a genom 30%-ától több mint 74%-áig terjedhet; a százalékok közti nagy eltérés pedig részben a szekvenálási technológia és az alkalmazott összeillesztő szoftverek miatt van (Aime et al. 2017). Még a közeli rokonságban álló fajok között is, mint például a *Puccinia triticina* és a *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* kimutatták a genomok repetitívsekvenciák és TE-k miatti dinamikus jellegét, bár bizonyos szintű szinténia konzerválódott (Cuomo et al. 2017; Fellers et al. 2013). A hosszú leolvasású szekvenálási technológiák megjelenésével, melyek lehetővé tették a teljes genom összeillesztéseket is, pontosabb kép alkotható majd a genom TE összetételéről és eloszlásáról (Miller et al. 2018; Schwessinger et al. 2018). A gének száma a jelenleg megszekvenált rozsdagombák körében 14 880 és 27 578 között változó, a legtöbb esetében átlagosan 18.000, attól függően, milyen szoftvert és paramétereket alkalmaztak a becsléshez (Aime et al. 2017). Ami feltűnő ezek között a genomok között, az az annotált, funkció nélküli gének nagy száma. Például a három búzarozsda faj, a *Puccinia triticina*, a *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* és a *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* ortológjainak összehasonlítása 5443, 4901 és 8955 fajspecifikus gént eredményezett, míg összességében az egyes rozsdagombák génjeinek kevesebb mint fele konzerválódott más bazídiumos gombákhoz képest (Cuomo et al. 2017). Ez arra utal, hogy nagy

mértékű mutáció/fejlődés ment végbe. Ennek oka lehet a genomok dikariotikus jellege, valamint az általuk betöltött szigorúan biotróf niche, amibe beletartozik az is, hogy a heterocikus fajoknak képesnek kell lenniük két eltérő gazdaszervezet megfertőzésére. További fontos kutatási eredmények, melyek valószínűleg az obligát biotróf életmódhoz való adaptív mechanizmusok jellemzői: a nitrát- és szulfátasszimiláció útvonalában bekövetkezett génvesztések, a számos szubsztrát transzportereit kódoló kiterjedt géncsaládok jelenléte, a kevesebb növényi sejtfalat lebontó enzim, illetve a teljes proteom százalékában kifejezett nagyobb prediktált szekretom a nem biotrófokhoz képest (Aime et al. 2017; Duplessis et al. 2011; Lo Presti et al. 2015). Kecsegetető a feltételezés, hogy a TE-k dinamikus jellege fontos szerepet játszik az ilyen jellegű adaptációkban, beleértve a rezisztencia mechanizmusok leküzdését is (Barsoum et al. 2019).

Érthető módon, a fő hangsúly a mezőgazdasági és erdészeti kultúrákat érintő rozsdagombák genetikai forrásainak létrehozására irányult, de a Pucciniales rend óriási változatossága miatt az összehasonlító genomikából sokat lehetne tanulni. E célból a Joint Genome Institute világszerte 12 kutatócsoport támogatásával megkezdte 50, különböző eredetű és eltérő családba, de ehhez a rendhez tartozó gazdasági jelentőségű rozsdagomba faj (<https://jgi.doe.gov/csp-2018-duplessis-reference-genomes-50-rust-fungi/>) referencia genomjának létrehozását (Aime és et al. 2017). Az összehasonlítások várhatóan választ adnak számos kérdésre, mind a taxonómiára, a gazdanövénykörre, a specifitásra és szelekcióra, a patogenitásra, a diverzifikációra, mind pedig a genom kiterjedtségére vonatkozóan, és valószínűleg közvetlen hatással lesznek új növényvédelmi stratégiák kidolgozására.

Transzkriptom, genom szintű összefüggések és összehasonlító vizsgálatok

A szekvenálás alacsony költsége és a genomszekvenciák hozzáférhetősége lehetővé tette a különböző rozsdagombák fejlődési szakaszait – beleértve a különböző fertőzési stádiumokat is – reprezentáló átfogó transzkriptomok létrehozását és összehasonlítását is. Túllépné ennek az áttekintésnek a kereteit, hogy itt felsoroljuk a több tucatnyi tanulmányt, azon felül, hogy ezek gyorsan kiszorították az összes EST-munkát. Ezek az összehasonlító vizsgálatok kulcsfontosságú betekintést nyújtottak a genetikai programokba, melyek szerepet játszanak a spóra csírázásában és a gazdaszervezet fertőzési stratégiáiban (áttekintve: Lorrain et al. 2019).

Ma már számos faj izolátumának szekvenciái rendelkezésre állnak, így a gének/fehérjék változatát fenotípusokhoz lehet társítani, hogy funkcionális ellenőrzésre génjelölteket találjunk.

Egy kisléptékű, a teljes genomra épülő asszociációs elemzésen alapuló kutatás a transzkriptum szinten bekövetkező változásokat a virulenciaprofilok változásaival kapcsolta össze meghatározott búzafajtákon, ennek eredményeképp 15 szekretált effektorjelöltet azonosítottak a *Puccinia triticina* faj esetében, amelyeket tizenegy különböző levélrozsda-rezisztenciagén (*Lr*) potenciálisan felismer (Bruce et al. 2014). Egy másik, szélesebb körű fenotípust és genotípust is lefedő asszociációs elemzés eredményeként azonosítottak néhány effektorjelöltet, amelyek potenciálisan kölcsönhatásba lépnek az *Lr20*-szal (Wu et al. 2017). Hasonló összehasonlító elemzés egy *M. larici-populina* populációban széles körben jelenlévő és szelekciós nyomás alatt álló effektor-jelölteket mutatott ki, mint a legvalószínűbb jelölteket további vizsgálatokhoz (Persoons et al. 2014). A rozsdagombák genetikai potenciáljának közvetett értékeléséhez nagy genomikai eszköztárak összehasonlítása is használható, különösen akkor, ha az interaktív stádiumok transzkriptomjait, azaz a kórokozó és a gazdaszervezet transzkriptomjait hasonlítják össze. *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*-vel fertőzött búza vizsgálata génkoexpressziós hálózatok leírásához és a kölcsönhatásban potenciálisan részt vevő effektorjelöltek azonosításához vezetett (Rutter et al. 2017). Ezek a számítógépes megközelítések a rozsdagombák és gazdaszervezetük kölcsönhatásában részt vevő génjelöltek azonosítására szolgálnak, és irányvonalat mutatnak további funkcionális elemzésekhez, illetve a betegség elleni védekezés potenciális célpontjaihoz.

Proteomika

Az EST gyűjtemények révén megnyílt az út a kiterjedt proteomikai munkák előtt, mint a babrozsda (Cooper et al. 2007, 2016; Luster et al. 2010; Stone et al. 2012) vagy a *Puccinia triticina* (Song et al. 2011) esetében. A teljes genomok szekvenciájának felhasználásával kiterjedtebb proteomokat azonosítottak. Egy innovatív technika során tisztított *Puccinia triticina* hausztóriumok felhasználásával monoklonális antitesteket állítottak elő egerekben, amelyet később arra használtak, hogy immunoprecipitációval közel homogén hausztóriumokat izoláljanak *Puccinia triticina* rozsdagombával fertőzött búza levelekből. Az antitesttel tisztított *Puccinia triticina* hausztóriumokból 1192 fehérjét azonosítottak, amelyek között 140 szekretált effektorfehérje-jelölt (CSEP-k) volt (Rampitsch és et al. 2015). 6 nappal a *Puccinia triticina* fertőzés után, a 140 CSEP-k relatív fehérjemennyiségét összehasonlítva a megfelelő gének normalizált transzkriptumszintjeivel a búza leveleiben, bizonyos gének esetében akár 2 nagyságrendnyi eltérés figyelhető meg a korrelációk között (G. Bakkeren, nem publikált adatok). Ez hasonlóképpen megfigyelhető a *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* -vel fertőzött

búzában is (Zhang et al. 2019. 7. ábra). Mindez jól mutatja, hogy a fehérjetartalom gyakran nem függ össze a transzkriptumok tartalmával (Gygi et al. 1999), ahogy azt is, hogy transzkriptumokkal kiegészített kvantitatív proteomikai elemzésekre van szükség. Hiszen, amikor proteomikai elemzésekkel „szekrétumokat” mutatnak ki, néha több mint 50%-ban nem felelnek meg a szekvenált genomokban található, jelzőpeptideket tartalmazó kanonikus ER-Golgi szekretált fehérjéknek, ami alternatív útvonalak és mechanizmusok létezésére és a jelenleg előjelzettnél potenciálisan nagyobb "szekrétumokra" utal (Agrawal et al. 2010). Ezenkívül fehérjefragmentumokat olyan pozíciókban térképeztek fel a *Puccinia triticina* genomjában, ahol nem jeleztek előre géneket (C. Rampitsch személyes közlése alapján), annak ellenére, hogy gyakran találtak transzkriptumokat (pl.: párosodási feromon) (Cuomo et al. 2017). Várhatóan a különböző "omikok" adathalmaza és a jövőbeli génpredikciós algoritmusok, valamint a gépi tanulás alapú módszerek jobb annotációkat fognak biztosítani. A proteomika azért is lényeges, mert kimutathatóak a poszttranszlációs módosítások, mint például a foszforiláció, melyek bizonyítottan felelősek az aktivitásban bekövetkezett jelentős változásokért (Rampitsch és Bykova 2012).

Effektorok keresése

Az 1990-es években, rasszspecifikus elicitorok izolálásával a hiperszenzitív reakció (HR; nekrozis) specifikus *R* génekkel rendelkező fajtákkal különböző biokémiai kísérletet végeztek az *Avr* géntermékek izolálására rozsdagombákból. Az intercelluláris térből (apoplasztból) kimosott folyadékot elemezték, de nem azonosítottak megfelelő géneket (áttekintve: Staples 2000). Ebből a szemszögből, de különböző patoszisztémákban és érzékenyebb proteomikai elemzésekkel most újabb vizsgálatok zajlanak.

M. lini-ben kis szekretált fehérjéket azonosítottak egy fertőzött gazdaszervezetből származó cDNS-ek differenciális szűrése után, ezek a lenben rezisztenciát kondicionáló *Avr* géneket képviseltek a megfelelő *L5*, *L6* vagy *L7 R* génekkel (Dodds és et al. 2004). Kimutatták, hogy ezek az *Avr* gének a hausztóriumokban fejeződnek ki, és a megfelelő AVR fehérjék a gazdasajtba jutva lesznek aktívak. Ez a munka végre bizonyította molekulárisan is a Flor által 1947-ben felállított gén a génért hipotézist (áttekintve Flor 1971-ben) az eredeti modell len-len rozsdá patoszisztémában, elsőként a rozsdagombák esetében. Mivel a kulcsfontosságú metabolitcserével és effektorszekrécióval rendelkező hausztóriumok a biotróf kölcsönhatás központi platformjának tekinthetőek, ezért az EST és transzkriptomikai adatok (Catanzariti et al. 2006; Hahn és Mendgen 1997; Thara et al. 2003), valamint proteomikai adatok (Cooper et

al. 2016; Rampitsch et al. 2015) felhasználásával izolálásuk segített az effektorok együttesének azonosításában. Ráadásul a rozsdagombák génjeire beállított gépi tanulási algoritmusokat fejlesztettek ki az elérhető széleskörű genomikai erőforrások révén a lehetséges effektorok listázására, beleértve azok prediktált lokalizációját is (de Carvalho et al. 2017; Petre et al. 2014; Saunders et al. 2012; Sperschneider et al. 2017, 2018a, b). A gazdaszervezet citoplazmájában található *R* gén termékei ismerik fel az eddig klónozott rozsdagomba AVR effektorokat (Anderson et al. 2016; Catanzariti et al. 2006; Chen et al. 2017; Dodds et al. 2004; Salcedo et al. 2017), de a *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* esetében két AVR effektor található, amelyek az urediniospórák felszínén lokalizálódnak, és az árpa levélfelületén az *RPGI* rezisztenciafehérjével kölcsönhatásba lépve HR-t váltanak ki (Nirmala et al. 2011). Az effektorok kiválasztásának kritériuma klasszikusan az N-terminálison a szignál peptid-szekvencia jelenléte, emellett gyakran alkalmazzák a 300 aminosav feletti hosszszűrés is. Kétségtelenül a legtöbb vizsgált effektor kis szekretált fehérje, köztük számos bizonyítottan AVR; kivételt képez a PgtAVRSr35, amely 578 aminosav hosszú (Salcedo és et al. 2017). Tehát amikor effektorjelöltök azonosítását kíséreljük meg a jelentős genomikai erőforrások rendelkezésével, nem szabad elfogultan gondolkoznunk.

Az effektorok a virulenciával hozhatók összefüggésbe. A populációkban bekövetkező lehetséges virulenciaváltozások megértésének és kimutatásának fontossága az 1900-as évektől ismert, ennek érdekében minden évben kiterjedt szántóföldi felmérés zajlik a rozsdagomba izolátumok gyűjtésére, és az ezt követő fenotipizálására a különböző kultúrákban (*R* génkészlet) a rasszok (*Avr* génkészlet) azonosítására. Mindez nem csak kulcsfontosságú a rozsdabetegségek elleni védekezés szempontjából, de több mint 70 éve a gabonafélék rezisztencianemesítésének alapköve, amelyet más, gazdaságilag jelentős patoszisztémák esetében is alkalmaznak. A rozsdagombák populációgenetikai vizsgálatai regionális és újabban globális léptékben jelenleg is zajlanak. Ezen áttekintés keretében a DNS-szekvenálás és a bioinformatika terén elért eredményeket emeljük ki, amelyek lehetővé tették a populációvizsgálatokat és a regionális és globális származási vonalak jellemzését több ezer lókuszból található semleges SNP-k alapján. A növekvő számú izolátumok szekvenálásával kiterjedt SNP-adatbázisok válnak elérhetővé néhány rozsdagomba fajra, ami lehetővé teszi a gyors és költséghatékony SNP-alapú eszközök kifejlesztését a genotipizáláshoz, beleértve a több ezer lókuszból kimutatására képes molekuláris technikákat, a transzkriptumokból vagy fertőzött levélmintákból származó eltérő genomi régiók elemzését a gombákban akár hordozható eszközökkel (Hu et al. 2019; Hubbard et al. 2015), mindezt új, veszélyes genetikai vonalak globális terjedésének nyomon követésére, mint például

a a *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* Ug99 vagy a magas hőmérsékletre alkalmazkodott, virulensebb *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* rassz (Bueno-Sancho et al. 2017; Newcomb et al. 2016; Olivera et al. 2015; Radhakrishnan et al. 2019). A rozsdabetegségek elleni védekezéssel kapcsolatos tájékozódásban a fenotípusok (virulencia) és genotípusok (effektorok) ilyen típusú társítása ma már felbecsülhetetlen értékű források.

Rozsdagombák génjeinek funkcionális elemzése

A rozsdagombák esetében a nyilvánosan elérhető genomikai források gyorsan bővülnek, ugyanakkor annak ellenére, hogy mennyire fontos lenne, még mindig kihívást jelent a rozsdagombák megfelelő genetikai manipulációja és a funkcionális génelemzése. A genetikai transzformációs technológia kifejlesztésére az évek során számos erőfeszítés történt. A béta-glükuronidáz (GUS), a zöld, illetve vörös fluoreszcens fehérje (GFP, DsRed) géneket különböző promóterek irányításával riporterként használva, az urediniospórák részecskéikkel történő bombázása az *Uromyces* spp. (Bhairi és Staples 1992; Djulic et al. 2011), *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* (Fehser és Moerschbacher 2011; Schillberg et al. 2000) és *Puccinia triticina* (Webb et al. 2006) ideiglenes transzformációját eredményezte. Ha rendelkezésre állnának szelektív markerek, akkor segítségükkel ezeknek a nem gyakori eseményeknek a kimutatása hatékonyabb lenne. Bár beszámoltak már a higromicin és különböző fungicidek, mint a benomil és a karboxin alkalmazásáról (Djulic et al. 2011; Wirsal et al. 2004), azonban egyik sem vezetett még hatékony szelekcióhoz in planta. A biotróf rozsdagombák közül a *M. lini* esetében a szelekciót lenben való növekedése közben valósították meg, *Agrobacterium tumefaciens*-t alkalmazva egy *AvrL567* géncsendesítő konstrukció bejuttatására, amely stabil transzformánsokat eredményezett (Lawrence et al. 2010). Ennek az *Avr* génnek a csendesítése lehetővé tette a gombának, hogy csak az ezt felismerő *R* génnel rendelkező lenvonalakon növekedjen, és így csak a transzformált rozsdagombák sporuláltak. Ez csekély választékot biztosított. Olyan gének kombinációjának használata a transzformációs szelekciós rendszerekben, amelyek a gomba és a növény kölcsönhatásában szerepet játszanak, nem biztos, hogy ideális gomba és gazdanövénye (korai) kölcsönhatásában szerepet játszó egyéb gének működésének tanulmányozására. Úgy tűnik, hogy csak idő kérdése, hogy megtaláljuk a megfelelő feltételeket és génkombinációkat a reprodukálható transzformáció eléréséhez. Például a CRISPR-technológia felhasználható a kölcsönhatást gátló faktorok vagy domináns *Avr* gének, mint szelektálható markerek mutációjának előidézésére. Az *Avr* gének indukált/mesterséges vagy természetes mutációinak felhasználását is sikeresen alkalmazták, mivel az

Avr gének jellemzően dominánsak, és a velük megegyező *R* gének kiváló szelekciót biztosítanak a szükséges biotróf növekedés során. A fent említett, *Puccinia triticina* transzformációját leíró tanulmányban (Webb et al. 2006) véletlenszerű integrációs eseményeket hoztak létre, és az ezt követő szelekciót különböző *R* gént tartalmazó fajtákon alkalmazták, hogy felmérjék a további klónozás és elemzés céljából lehetséges-e a vele egyező *Avr* gén elrontása. Bár az említett vizsgálatban a genetikai transzformáció több fertőzési cikluson keresztül stabilnak bizonyult a kórokozó gazdaszervezetében, a búzában, nem vezetett az *Avr* gén klónozásához. A mutációk előidézésének ötletét egy másik vizsgálatban is felhasználták, ahol a *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* urediniospóráit etil-metán-szulfonáttal kezelték, ezzel megváltozott virulenciájú mutánsokat kaptak egy *Sr35* rezisztenciagént hordozó búzafajtán. A vad típusú avirulens *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* izolátum és 15 igazolt virulens mutáns genomját szekvenálták és összehasonlították, ami egy szekretált effektor génjelölthöz vezetett, amelyről kimutatták, hogy a *PgtAvrSr35*-öt képviseli (Salcedo et al. 2017). Mivel a rozsdagombák dikariotikusak, életciklusuk nagy részében két haplotípust tartalmaznak, a mutációelemzésre támaszkodva a (domináns) génfunkció azonosítása csak heterozigóta állapotban lévő gének esetében lehetséges. Ezt a koncepciót a *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* egy természetes módon kialakult mutánsán használták, amely egy *Sr50*-et hordozó búzafajtán vált virulenssé. A genomszekvenálás során egy 2,5 millió bázispárnyi régiót azonosítottak, ahol heterozigótaság elvesztése következett be, amelyről bebizonyosodott, hogy egy haplotípus duplikációjából származik ebben a régióban. Ismét az ebben a régióban található kis szekretált fehérje génekre összpontosítva, a populációban lévő allélok összehasonlításakor csak néhány jelöltet azonosítottak, amelyek közül az egyikről funkcionálisan kimutatták, hogy a *PgtAvrSr50*-et képviseli (Chen és et al. 2017; lásd alább).

Az előző két vizsgálatban az effektorok avirulencia funkciójának megerősítését heterológ rendszerben végezték: az *Avr*-jelöltek és az egyező *R*-gének együttes kifejezése *Agrobacterium tumefaciens* segítségével *Nicotiana benthamiana*-ban látható HR-t váltott ki. Ezt a heterológ rendszert sikeresen alkalmazták már különböző rozsdagombákból származó effektorok esetében, hogy megállapítsák lokalizációjukat (fluoreszcens kimérák és konfokális mikroszkópia segítségével) és a potenciális gazdanövény célpontokat, így következtetve a lehetséges funkcióikra (áttekintve: Lorrain et al. 2018a). A *M. larici-populina* effektorai funkcióinak vizsgálatára *Arabidopsis thaliana*-t is használták. Amikor több közülük transzgénként fejeződött ki, elősegítették a növény fogékonyságát több más kórokozóval szemben (Germain et al. 2018). A gazdaszervezet védelmi válaszainak elnyomása számos

patogén effektor általános funkciójának bizonyult. Másrészt, csak néhány rozsdagomba esetében igazolták, hogy számos effektor elnyomja a természetes gazdaszervezet védekezését, miután különböző mesterséges mikrobák, köztük különböző *Pseudomonas* fajok III-as típusú szekréción rendszerükkel juttatták be őket (Liu et al. 2016; Qi et al. 2016, 2018; Ramachandran et al. 2017; Zhao et al. 2018). Miután igazolták, hogy ezek a mikrobák csak a gazdanövényből váltanak ki erős választ, felhasználták őket néhány rozsdagomba faj effektorainak tesztelésére a természetes gazdanövényükben, hogy kiderítsék védelmi válaszok kiváltására vonatkozó potenciáljukat (Dodds et al. 2004; Liu et al. 2016; Maia et al. 2016; Upadhy et al. 2014). A *PgtAvrSr35* avirulencia-funkciójának ellenőrzésére *E. coli* által termelt fehérjefrakciót infiltráltak be búzalevelekbe, hogy HR-t váltsanak ki vele (Salcedo és et al. 2017). Az árpa csíkos mozaikvírust (BSMV) pedig a *PgtAVRSr50* funkciójának *Sr50* búzában történő kimutatására használták (Chen et al. 2017). Egy másik lehetséges homológ expressziós rendszer a gabonafélék rozsdagomba génjeinek tesztelésére a róka farkok mozaikvírus, amelyet nemrégiben úgy alakítottak át, hogy nagyobb fehérjét (>600 aminosav) expresszáljon gabonafélékben (Bouton és et al. 2018). Ezek a természetes gazdanövényeken alapuló megközelítések valószínűleg effektor alapú szűrési módszerekként használhatóak új rezisztenciák felkutatására a növénykultúrákban és a (vad) csíraplazmákban, ezzel segítve a nemesítési programokat.

A rozsdagomba génfunkciók validálásának egyik alternatív módszere a heterológ expresszió más gombafajokban biokémiai vizsgálatok elvégzésére, valamint egyértelmű fenotípusok visszaállítása egy pontosan jellemzett gén deléciójával. Például a bab rozsdagombájának, az *Uromyces fabae*-nak plazmamembrán ATPáz génje képes volt kiegészíteni egy homológ ATPáz mutáns *Saccharomyces cerevisiae*-ben, ezzel lehetővé téve az enzimaktivitás mérését (Struck et al. 1998), továbbá az *Uromyces fabae* *INV1* invertáz génjét ugyanebben az élesztőben és *Pichia pastoris*-ban kifejezve vizsgálták az *INV1p* szekretált géntermékkel kapcsolatos aktivitást (Voegele et al. 2006). Ehhez hasonlóan használták a kukoricaüszögben, az *Ustilago maydis*-ben található *kpp2/ubc3* és *kpp6* MAPK pontmutánsokat arra, hogy kimutassák a búza levélrozsdájából származó homológ *PtMAPK1* gén funkcionális komplementációját (Hu et al. 2007a). A vizsgálat során akkor volt működőképes a komplementáció, amikor a *PtMAPK1* gént az *Ustilago maydis* *Hsp70* promóteréről, de az endogén *PtMAPK1* promóteréről is kifejezték, ami azt jelzi, hogy a *Puccinia triticina* promótereit az *Ustilago* transzkripciós gépezete felismerte. Más fajok, mint a *Fusarium graminearum*, *Magnaporthe oryzae* és a

Schizosaccharomyces pombe mutációinak komplementációját azóta számos más rozsdagomba géneire is megismételték (Guo et al. 2011; Jiao et al. 2017; Zhu et al. 2018).

Gazdaszervezet indukálta géncsendesítés (HIGS) és kis RNS jelátvitel

A rozsdagének funkcióinak tesztelésére manapság általános, de közvetett módszer a géncsendesítés, illetve a gazdanövény felhasználásával történő génkifejező és a géncsendesítést előidéző molekulák előállítás. A HIGS eredetileg az árpa, búza - *Blumeria patosizisztémák* esetében bizonyítottan működött (Nowara és et al. 2010), a rozsdagombákhoz gyorsan adaptálták a duplexeket alkotni képes szensz és antiszensz molekulák szállítására árpa csíkos mozaikvírust használva (Panwar és et al. 2013b; Yin és et al. 2011), vagy az *Agrobacterium tumefaciens* segítségével a gazdasejtekben hajtú molekulák átmeneti expresszáására (Panwar és et al. 2013a). Bár kimutatható a siRNS-molekulák termelődése búzában, valamint a célzott gombagén mRNS-szintjének jelentős csökkenése is, azonban a pontos mechanizmus jelenleg nem ismert, de valószínűleg az siRNS-ek hausztóriumok általi felvételén alapszik. Azon rozsdagombagének elnémítása, amelyek a betegség kialakításában vagy a gazdaszervezet védelmének befolyásolásában vesznek részt, egyértelműen mérhető fenotípusokhoz vezetnek. Ráadásul az a fajta megközelítés, amikor a rozsdagomba patogenitásának szempontjából lényeges géneit célozzák meg, kiegészítheti a mezőgazdaságban alkalmazott egyéb stratégiákat a rozsdabetegség csökkentésére, ha a csendesítő konstrukciók stabilan beépülnek a búza gazdaszervezetébe (Panwar és et al. 2018; Qi és et al. 2017). Számos effektor megcélzása nem vezetett egyértelmű fenotípusokhoz, valószínűleg a funkcionális redundancia vagy a patogenításban betöltött kumulatív (kis) szerepük miatt (Yin et al. 2015), bár néhányról kimutatható, hogy jelentősen hozzájárul a betegség kialakulásának szintjéhez (Liu et al. 2016; Yin et al. 2019). Egy domináns avirulencia gén elnémításakor ez máshogy lenne. Érdekes volna olyan géneket megcélolni, amelyek részt vesznek a sejtfal szerkezetének megváltoztatásában, vagy olyan komponenseket célba venni, amelyekről ismert, hogy a gombákban fertőzés során előfordulnak, és valószínűleg megakadályozzák az ilyen komponensek felismerését a védekezés beindítása érdekében. Ezt mikroszkóppal kimatatták a *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* és az *Uromyces fabae* esetében, ahol a sejtfal összetétele kitinről kitozánra változott (El Gueddari és et al. 2002). A paradicsom egyik kórokozójában, a *Cladosporium fulvum* -ban az AVR4 effektor elrejteti a gombasejtek felszínén lévő kitint (Westerink és et al. 2002); az ilyen gének elnémítása kitenné a gombákat a gazdaszervezet immunválaszainak, ami valószínűleg széles körű védekezési válaszokat váltana ki (Oliveira-Garcia és Deising 2013).

Amint azt más növény-mikroba kölcsönhatások esetében is kimutatták, a rozsdagomba patoszisztémák esetében is bizonyították a kis RNS-molekulák létezését és lehetséges szerepüket a kórokozó és a gazdaszervezet közötti kommunikációban a betegség elősegítése vagy a védekezés finomhangolása érdekében. Bár számos tanulmány azonosította azokat a gazdaszervezetben szabályozó RNS-eket, amelyek expresszióját a rozsdagomba-fertőzés befolyásolja, csak néhány tanulmány vizsgálta a rozsdagomba-specifikus kis RNS-eket. Számos rozsdagombában olyan célpontokat/géneket prediktálnak, amelyek szekvenciája megegyezik, és ezért potenciálisan kis RNS-ek által szabályozottak. Ezek között vannak kinázok, effektor gének és TE-k is, amelyek potenciálisan befolyásolhatják a közeli gének transzkripcióját. Emellett találtak egyezéseket a gazdaszervezetben lévő génekkel, amelyek közül az egyikről a kísérleti vizsgálatok megerősítették, hogy részt vesz a kölcsönhatásban (Mueth et al. 2015; Sperschneider et al. 2018c; Wang et al. 2017). A (kulcsfontosságú) regulátor kis RNS-ekbe való beavatkozás új lehetséges stratégiákat nyit a rozsdagomba génjeinek genetikai manipulációjára és funkcionális elemzésére. Ha az általános patogénitási faktorokként funkcionáló, a gombához tartozó kis RNS-ek a HIGS technológia célpontjai, az biztosíthatná a termésvédelmet; több, különböző funkciójú kis RNS egyidejű megcélzása a gomba számára nehezen lenne leküzdhető (mutáció révén).

Következtetések, mindezek kihatása a növényvédelemre

Az elmúlt 20 évben a rozsdagombák kutatása az új genomikai technológiák megjelenésének köszönhetően gyorsan bővült. A rozsdagombák genomjai sokkal nagyobbak és komplexebbnek bizonyultak, mint más gombáké, a dikarióta genomok között igen változatos haplotípusokkal és 87 Mb-tól 2 Gb-ig terjedő genommérettel. Néhány rozsdagomba teljes kromoszóma-összeállításának fejlesztése gyorsan halad. Ezek a genomok nagy mennyiségű ismétlődő elemeket és nagy géncsaládokat tartalmaznak, beleértve a hatalmas szekrétumokat, amelyekről úgy gondolják, hogy kritikusak a rozsdagombák biotróf életmódja szempontjából. Számos faj esetében ma már több izolátum genomadatai, transzkriptomjai és proteomjai állnak rendelkezésre, lehetővé téve ezzel az átfogó pángenomok létrehozását és összehasonlító elemzéseket.

Ez betekintést nyújt a gombák genomjainak és populációs struktúráinak variabilitásába, beleértve a virulencia változásokat, valamint azt, hogy ezek hogyan kapcsolódnak az effektorváltozatok jelenlétéhez és megjelenéséhez. Mindez valószínűleg a gazdaszervezet *R* génjeinek hatékonyabb alkalmazását lehetővé tevő új ismeretekkel fog szolgálni. Továbbá,

annak ellenére, hogy mekkora kihívást jelent a biotróf rozsdagombák genetikai és molekuláris kutatása, új növényvédelmi stratégiák előtt nyitja meg az utat. Az első *Avr* gének klónozásával kimutatták, hogy az általuk kódolt effektorfehérjék közvetlenül kölcsönhatásba léphetnek a gazdasejtben vagy annak felszínén található *R* gén fehérjéivel; bár egyelőre nem bizonyított a rozsdagomba patoszisztémákban a közvetett kölcsönhatásuk az *R* gén célpontjára. Számtalan megközelítésből történt előrelépés a funkcionális vizsgálatok terén és így az új AVR-effektor jegyzékek segíthetnek az *R* gének izolálásában és felismerésében, beleértve az új, potenciálisan tartósabb gének keresését a vad típusú csíraplazmák között. Az *R* génekkel kölcsönhatásba nem lépő effektorok közül néhányról kimutatták, hogy részt vesz a tápanyagfelvételben a hausztórium határfelületén, vagy elnyomja a növényi gazdaszervezet immunválaszait.

HIGS technológiát használva a fentebb említett effektorokon és más, a gazdaszervezettel való kölcsönhatás szempontjából kulcsfontosságú génjelölteken géncsendesítést alkalmaztak, azért, hogy a rozsdagombák fertőző- és megbetegítőképességét befolyásolják; ez a technológia sikeres lehet a rozsdagombák kis regulátor RNS-einek és a patogenitáshoz hozzájáruló célgénjeik kiválasztásakor is. Ezen új gének funkciójának feltárása új fungicidosztályok kifejlesztéséhez vezethet. Végül, de nem utolsó sorban pedig a gomba effektorok célpontjai a gazdanövényben olyan fogékonyságot befolyásoló géneket képviselhetnek, amelyeket genomszerkesztéssel módosítani lehetne a fertőzés és a betegség mértékének csökkentésére.

Jövőbeli kihívások

Annak ellenére, hogy óriási előrelépés történt a rozsdagombák genomikai forrásainak előállítása terén még mindig nincsen „arany szabály” a haplofázisú és kromoszóma alapú genom összeállításokra, átfogó génannotációkkal, beleértve a megfelelő allél-azonosítást, valamint az ismétlődésekre és a rendkívül nagy TE-tartalom elemzésére. Ez előfeltétele az izolátumok további érdemi újraszekvenálásának, hogy ez a fajok és a forma speciales pangenomjainak létrehozását eredményezze a génkomplement és a pontos allélváltozatok felmérése érdekében, különös tekintettel az effektorokra. Ahhoz, hogy ez a lehető leghatékonyabb legyen, világszerte részletesebb információkra van szükség a virulenciaprofilokról (a gazdanövényekről) és a populációk összetételéről (genetikai vonalokról). A populációban jelen lévő *Avr* gének szekvenálása felmérhetné az effektorok heterozigóta állapotban való jelenlétét, amelyek nagyobb kockázatot jelentenek azáltal, hogy mutációval áthidalhatják az egyező *R* géneket. Amíg azonban az *Avr* gének, valamint az avirulens és virulens allélok pontosan

meghatározottak, addig a genotipizálás csak olyan populációkban fogja előrejelzni a faj fenotípusát, ahol a (szexuális vagy szomatikus) rekombináció nem vagy csak ritkán fordul elő.

Továbbra is nagy kihívást jelent, hogy a rozsdagombák esetében nincs megfelelő és reprodukálható genetikai transzformációs technológia a génfunkciók értékelésére. Néhány jelenlegi, GUS-t vagy GFP-t alkalmazó megközelítés ígéretesnek tűnik, de a szelektálható markerek korlátozott választéka a biotróf életmódjuk miatt meghiúsul; bizonyos szelektálható célgének géncsendesítése vagy szerkesztése megoldhatja ezt, de az *Avr* gének jelenlegi szelekciós választéka veszélyeztetheti a patogenitás és más effektor gének vizsgálatát. Egy reprodukálható transzformációs rendszer lehetővé tenné a génfunkció közvetlen vizsgálatát, melyeket jelenleg főként heterológ rendszerekben végeznek.

Még mindig hatékony a klasszikus genetikai vizsgálatokkal meghatározott keresztezések alkalmazása, ám a ma már rendelkezésre álló genomikai forrásokkal újra kellene gondolni. Az effektorokkal kapcsolatos kutatások nagy része a kis szekretált fehérjéket kódoló génekre összpontosul. Világossá vált, hogy ez az effektorok egyik fontos osztálya, azonban nem az egyetlen. Az ilyen *Avr* gének további osztályainak azonosítására nyílik lehetőség a genetikai vizsgálatokkal. Egyre több szakirodalom mutatja ki az azonos fenotípusú rasszhoz tartozó rozsdagomba izolátumok közötti kvantitatív különbségeket (agresszivitás) (Pariaud et al. 2009). Ezek a tanulmányok számos tulajdonságot vizsgáltak, köztük a fertőzés hatékonyságát, a látens periódust és a sporulációs rátát is. Ezen tulajdonságokért felelős genetikai háttér meghatározása olyan támpontokat fog nyújtani, amelyek segítségével megkezdődhet az ezekért felelős mechanizmusok feltárása. Ám ennek egyik akadálya, hogy ezen fenotípusok mérése nehézségekbe ütközik.

Néhány elgondolkodtató kérdés a rozsdagombákkal (és más biotrófokkal) kapcsolatban a mai napig megválaszolatlan. A hausztóriumokat tekintik a fő képletnek, ahol az effektorok kiválasztása, valamint a metabolitok és kis RNS-ek cseréje történik. Ez egy komplex, kevésbé ismert határfelületet foglal magában, amely a hausztórium sejtfalából, az extrahausztóriális mátrixból (EHM) és a gazdasejt módosult membránjából áll, melyet egy speciális struktúra zár le és így mindez egy módosult apoplasztikus térnek tekinthető. Valószínű azonban, hogy a gazdasejtekkel való kölcsönhatásokhoz az intercelluláris hifahálózat is hozzájárul. Például a szintén biotróf *Ustilago* fajoknak, amelyek a gazdaszervezeten belül mind inter-, mind intracellulárisan növekednek, nincsenek hausztóriumai, ezért úgy vélik, hogy a hifák végzik a tápanyagcserét és az effektorok szállítását (Lanver et al. 2017).

Alapvető információk hiányoznak arról, hogy a gombák effektorai hogyan jutnak el, az apoplasztba (EHM-be), ahol a sejt szelektíven veszi fel őket vagy (egy részhalmazuk) közvetlenül a gazdaszervezet citoplazmájába jut. Milyen funkciókat látnak el a különböző határfelületek? Aktívak vagy passzívak ezek a folyamatok? A rozsdagombák különböző életciklusának fejlődési szabályzása szintén ismeretlen. Az új genomikai technológiák, mint például az egysejtes transzkriptomika, azonosíthatják az ilyen fejlődési szakaszok átmenetében részt vevő géneket. Az ebben részt vevő mechanizmusok pedig célpontokat jelenthetnek a kórokozó elleni védekezésben.

Megjegyzéskiegészítés a hitelességhez

Li és munkatársai (2019) a közelmúltban bizonyították a *P. graminis* f. sp. *tritici* dikarióta törzsei közötti teljes nukleáris csere lehetőségét a szomatikus hibridizáció során, a sejtmagok közötti megnyilvánuló kromoszómális rekombináció nélkül. Ez amellet, hogy magyarázatot ad a szekvenált rozsdagombák genomjai között megfigyelhető rendkívül változatos haplotípusokra, óvatosságra int a rokonsági viszonyok nem fázisos SNP-adatokon alapuló filogenomikai elemzéseken keresztül történő hozzárendelésével kapcsolatban.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozunk Ralf Voegelének és Peter Doddsnak, valamint három névtelen bírálónak a kéziratához fűzött kritikai észrevételeikért.

A szerző(k) nem nyilatkoznak összeférhetetlenségről.

Finanszírozás: Ezt a munkát az Agrár- és Mezőgazdasági és Élelmiszeripari Kamara Kanada (G. Bakkeren) és az Egyesült Államok Mezőgazdasági Minisztériuma (L. J. Szabo) támogatta.

Irodalomjegyzék

1. Agrawal, G. K., Jwa, N.-S., Lebrun, M.-H., Job, D., and Rakwal, R. 2010. Plant secretome: Unlocking secrets of the secreted proteins. *Proteomics* 10: 799-827.
2. Aime, M. C., McTaggart, A. R., Mondo, S. J., and Duplessis, S. 2017. Phylogenetics and phylogenomics of rust fungi. Pages 267-307 in: *Advances in Genetics*. Vol. 100. J. P. Townsend and Z. Wang, eds. Academic Press, Cambridge, MA.
3. Aime, M. C., Toome, M., and McLaughlin, D. J. 2014. Pucciniomycotina. Pages 271-294 in: *Systematics and Evolution: Part A*. D. J. McLaughlin and J. W. Spatafora, eds. Springer, Berlin, Heidelberg.
4. Alexopoulos, C. J., Mims, C. W., and Blackwell, M. M. 1996. *Introductory Mycology*, 4th ed. John Wiley & Sons, New York.

5. Anderson, C., Khan, M. A., Catanzariti, A.-M., Jack, C. A., Nemri, A., Lawrence, G. J., Upadhyaya, N. M., Hardham, A. R., Ellis, J. G., Dodds, P. N., and Jones, D. A. 2016. Genome analysis and avirulence gene cloning using a high-density RADseq linkage map of the flax rust fungus, *Melampsora lini*. *BMC Genomics* 17:667.
6. Anikster, Y. 1983. Binculeate basidiospores—A general rule in rust fungi. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 81:624-626.
7. Anikster, Y., and Wahl, I. 1985. Basidiospore formation and self-fertility in *Puccinia mesnieriana*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 84:164-167.
8. Backlund, J. E., and Szabo, L. J. 1993. Physical characteristics of the genome of the phytopathogenic fungus *Puccinia graminis*. *Curr. Genet.* 24:89-93.
9. Bakkeren, G., Joly, D. L., and Duplessis, S. 2016. Editorial: Genomics research on non-model plant pathogens: Delivering novel insights into rust fungus biology. *Front. Plant Sci.* 7:216.
- Barsoum, M., Sabelleck, B., Spanu, P. D., and Panstruga, R. 2019. Rumble in the effector jungle: Candidate effector proteins in interactions of plants with powdery mildew and rust fungi. *Crit. Rev. Plant Sci.* 38:255-279.
10. Bhairi, S. M., and Staples, R. C. 1992. Transient expression of the beta-glucuronidase gene introduced into *Uromyces appendiculatus* uredospores by particle bombardment. *Phytopathology* 82:986-989.
11. Bhairi, S. M., Staples, R. C., Freve, P., and Yoder, O. C. 1989. Characterization of an infection structure-specific gene from the rust fungus *Uromyces appendiculatus*. *Gene* 81:237-243.
12. Boehm, E. W. A., and Bushnell, W. R. 1992. An ultrastructural pachytene karyotype for *Melampsora lini*. *Phytopathology* 82:1212-1218.
13. Boehm, E. W. A., Wenstrom, J. C., McLaughlin, D. J., Szabo, L. J., Roelfs, A. P., and Bushnell, W. R. 1992. An ultrastructural pachytene karyotype for *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Can. J. Bot.* 70:401-413.
14. Bolton, M. D., Kolmer, J. A., and Garvin, D. F. 2008. Wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina*. *Mol. Plant Pathol.* 9:563-575.
15. Bouton, C., King, R. C., Chen, H., Azhakanandam, K., Bieri, S., Hammond-Kosack, K. E., and Kanyuka, K. 2018. Foxtail mosaic virus: A viral vector for protein expression in cereals. *Plant Physiol.* 177:1352-1367.
- Bruce, M., Neugebauer, K. A., Joly, D. L., Migeon, P., Cuomo, C. A., Wang, S., Akhunov, E., Bakkeren, G., Kolmer, J. A., and Fellers, J. P. 2014. Using transcription of six *Puccinia triticina* races to identify the effective secretome during infection of wheat. *Front. Plant Sci.* 4:520.
16. Bueno-Sancho, V., Persoons, A., Hubbard, A., Cabrera-Quio, L. E., Lewis, C. M., Corredor-Moreno, P., Bunting, D. C. E., Ali, S., Chng, S., Hodson, D. P., Madariaga Burrows, R., Bryson, R., Thomas, J., Holdgate, S., and Saunders, D. G. O. 2017. Pathogenomic analysis of wheat yellow rust lineages detects seasonal variation and host specificity. *Genome Biol. Evol.* 9:3282-3296.
17. Carnegie, A. J., and Pegg, G. S. 2018. Lessons from the incursion of myrtle rust in Australia. *Annu. Rev. Phytopathol.* 56:457-478.
18. Catanzariti, A. M., Dodds, P. N., Lawrence, G. J., Ayliffe, M. A., and Ellis, J. G. 2006. Haustorially expressed secreted proteins from flax rust are highly enriched for avirulence elicitors. *Plant Cell* 18:243-256.
19. Chen, J., Upadhyaya, N. M., Ortiz, D., Sperschneider, J., Li, F., Bouton, C., Breen, S., Dong, C., Xu, B., Zhang, X., Mago, R., Newell, K., Xia, X., Bernoux, M., Taylor, J. M., Steffenson, B., Jin, Y., Zhang, P., Kanyuka, K., Figueroa, M., Ellis, J. G., Park, R. F., and Dodds, P. N. 2017. Loss of *AvrSr50* by somatic exchange in stem rust leads to virulence for *Sr50* resistance in wheat. *Science* 358:1607-1610.
20. Chen, W., Wellings, C., Chen, X., Kang, Z., and Liu, T. 2014. Wheat stripe (yellow) rust caused by *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Mol. Plant Pathol.* 15:433-446.
21. Cooper, B., Campbell, K. B., Beard, H. S., Garrett, W. M., and Islam, N. 2016. Putative rust fungal effector proteins in infected bean and soybean leaves. *Phytopathology* 106:491-499.
22. Cooper, B., Neelam, A., Campbell, K. B., Lee, J., Liu, G., Garrett, W. M., Scheffler, B., and Tucker, M. L. 2007. Protein accumulation in the germinating *Uromyces appendiculatus* uredospore. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20:857-866.

23. Cummins, G. B., and Hiratsuka, Y. 2003. Illustrated Genera of Rust Fungi. American Phytopathological Society, St. Paul, MN. Cuomo, C. A., Bakkeren, G., Khalil, H. B., Panwar, V., Joly, D., Linning, R., Sakthikumar, S., Song, X., Adiconis, X., Fan, L., Goldberg, J. M., Levin, J. Z., Young, S., Zeng, Q., Anikster, Y., Bruce, M., Wang, M., Yin, C., McCallum, B., Szabo, L. J., Hulbert, S., Chen, X., and Fellers, J. P. 2017. Comparative analysis highlights variable genome content of wheat rusts and divergence of the mating loci. *G3: Genes|Genomes|Genetics* 7:361-376.
24. de Carvalho, M. C. C. G., Costa Nascimento, L., Darben, L. M., Polizel-Podanosqui, A. M., Lopes-Caitar, V. S., Qi, M., Rocha, C. S., Carazzolle, M. F., Kuwahara, M. K., Pereira, G. A. G., Abdelnoor, R. V., Whitham, S. A., and Marcelino-Guimaraes, F. C. 2017. Prediction of the in planta *Phakopsora pachyrhizi* secretome and potential effector families. *Mol. Plant Pathol.* 18:363-377.
25. Deising, H., Rauscher, M., Haug, M., and Heiler, S. 1995. Differentiation and cell wall degrading enzymes in the obligately biotrophic rust fungus *Uromyces viciae-fabae*. *Can. J. Bot.* 73:624-631.
26. Djulic, A., Schmid, A., Lenz, H., Sharma, P., Koch, C., Wirsal, S. G. R., and Voegelé, R. T. 2011. Transient transformation of the obligate biotrophic rust fungus *Uromyces fabae* using biolistics. *Fungal Biol.* 115:633-642.
27. Dodds, P. N., Lawrence, G. J., Catanzariti, A. M., Ayliffe, M. A., and Ellis, J. G. 2004. The *Melampsora lini AvrL567* avirulence genes are expressed in haustoria and their products are recognized inside plant cells. *Plant Cell* 16: 755-768.
28. Duplessis, S., Bakkeren, G., and Hamelin, R. 2014. Advancing knowledge on biology of rust fungi through genomics. Pages 173-209 in: *Advances in Botanical Research*. Vol. 70. M. M. Francis, ed. Academic Press, Cambridge, MA.
29. Duplessis, S., Cuomo, C. A., Lin, Y.-C., Aerts, A., Tisserant, E., Veneault-Fourrey, C., Joly, D. L., Hacquard, S., Amselem, J., Cantarel, L., Chiu, R., Coutinho, P. M., Feu, N., Field, M., Frey, P., Gelhaye, E., Goldberg, J., Grabherr, M. G., Kodira, C. D., Kohler, A., Kus, U., Lindquist, E. A., Lucas, S. M., Mago, R., Mauceli, E., Morin, E., Murat, C., Pangilinan, J. L., Park, R., Pearson, M., Quesneville, H., Rouhier, N., Sakthikumar, S., Salamov, A. A., Schmutz, J., Selles, B., Shapiro, H., Tanguay, P., Tuskan, G. A., Henrissat, B., Van de Peer, Y., Rouze, P., Ellis, J. G., Dodds, P. N., Schein, J. E., Zhong, S., Hamelin, R. C., Grigoriev, I. V., Szabo, L. J., and Martin, F. 2011. Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 9166-9171.
30. Eilam, T., Bushnell, W. R., and Anikster, Y. 1994. Relative nuclear DNA content of rust fungi estimated by flow cytometry of propidium iodide-stained pycniospores. *Phytopathology* 84:728-735
31. El Gueddari, N. E., Rauchhaus, U., Moerschbacher, B. M., and Deising, H. B. 2002. Developmentally regulated conversion of surface-exposed chitin to chitosan in cell walls of plant pathogenic fungi. *New Phytol.* 156:103-112.
32. Fehser, S., and Moerschbacher, B. M. 2011. Expression of green fluorescent protein in the obligately biotrophic fungal plant pathogen *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *J. Plant Dis. Prot.* 117:258-260.
33. Fellers, J., Soltani, B., Bruce, M., Linning, R., Cuomo, C., Szabo, L., and Bakkeren, G. 2013. Conserved loci of leaf and stem rust fungi of wheat share synteny interrupted by lineage-specific influx of repeat elements. *BMC Genomics* 14:60.
34. Fernandez, D., Tisserant, E., Talhinhas, P., Azinheira, H., Vieira, A. N. A., Petitot, A.-S., Loureiro, A., Poulain, J., Da Silva, C., Silva, M. D. O. C., and Duplessis, S. 2012. 454-pyrosequencing of *Coffea arabica* leaves infected by the rust fungus *Hemileia vastatrix* reveals in planta-expressed pathogen-secreted proteins and plant functions in a late compatible plant-rust interaction. *Mol. Plant Pathol.* 13:17-37.
35. Flor, H. H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9:275-296.
36. Geils, B. W., Hummer, K. E., and Hunt, R. S. 2010. White pines, Ribes, and blister rust: A review and synthesis. *For. Pathol.* 40:147-185.
37. Germain, H., Joly, D. L., Mireault, C., Plourde, M. B., Letanneur, C., Stewart, D., Morency, M.-J., Petre, B., Duplessis, S., and Séguin, A. 2018. Infection assays in Arabidopsis reveal candidate effectors from the poplar rust fungus that promote susceptibility to bacteria and oomycete pathogens. *Mol. Plant Pathol.* 19:191-200.
38. Goellner, K., Loehrer, M., Langenbach, C., Conrath, U., Koch, E., and Schaffrath, U. 2010. *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. *Mol. Plant Pathol.* 11:169-177.

41. Green, G. J. 1964. A color mutation, its inheritance, and the inheritance of pathogenicity in *Puccinia graminis*. Pers. Can. J. Bot. 42:1653-1664.
42. Guo, J., Dai, X., Xu, J.-R., Wang, Y., Bai, P., Liu, F., Duan, Y., Zhang, H., Huang, L., and Kang, Z. 2011. Molecular characterization of a Fus3/Kss1 type MAPK from *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, *PsMAPK1*. PLoS One 6:e21895.
43. Gygi, S. P., Rochon, Y., Franza, B. R., and Aebersold, R. 1999. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. Mol. Cell. Biol. 19: 1720-1730.
44. Hacquard, S., Delaruelle, C., Legue', V., Tisserant, E., Kohler, A., Frey, P., Martin, F., and Duplessis, S. 2010. Laser capture microdissection of urenia formed by *Melampsora larici-populina* revealed a transcriptional switch between biotrophy and sporulation. Mol. Plant-Microbe Interact. 23: 1275-1286.
45. Hahn, M., and Mendgen, K. 1997. Characterization of in planta-induced rust genes isolated from a haustorium - specific cDNA library. Mol. Plant- Microbe Interact. 10:427-437.
46. Harder, D. E., and Chong, J. 1991. Rust haustoria. Pages 235-250 in: Electron Microscopy of Plant Pathogens. K. Mendgen and D. E. Lesemann, eds. Springer-Verlag, Berlin.
47. Holden, R. J., and Harper, R. A. 1902. Nuclear divisions and nuclear fusions in *Coleosporium sonchi-arvensis*. Trans. Wis. Acad. Sci. Arts Lett. 14:63-82.
48. Hu, G., Linning, R., McCallum, B., Banks, T., Cloutier, S., Butterfield, Y., Liu, J., Kirkpatrick, R., Stott, J., Yang, G., Smailus, D., Jones, S., Marra, M., Schein, J., and Bakkeren, G. 2007a. Complementation of *Ustilago maydis* MAPK mutants by a wheat leaf rust, *Puccinia triticina* homolog: Potential for functional analyses of rust genes. Mol. Plant Pathol. 8:451-467.
49. Hu, G., Linning, R., McCallum, B., Banks, T., Cloutier, S., Butterfield, Y., Liu, J., Kirkpatrick, R., Stott, J., Yang, G., Smailus, D., Jones, S., Marra, M., Schein, J., and Bakkeren, G. 2007b. Generation of a wheat leaf rust, *Puccinia triticina*, EST database from stage-specific cDNA libraries. Mol. Plant Pathol. 8:451-467.
50. Hu, Y., Green, G. S., Milgate, A., Stone, E. A., Rathjen, J. P., and Schwessinger, B. 2019. Pathogen detection and microbiome analysis of infected wheat using a portable DNA sequencer. Phytobiomes J. 3:92-101.
51. Hubbard, A., Lewis, C. M., Yoshida, K., Ramirez-Gonzalez, R. H., de Vallavieille-Pope, C., Thomas, J., Kamoun, S., Bayles, R., Uauy, C., and Saunders, D. G. O. 2015. Field pathogenomics reveals the emergence of a diverse wheat yellow rust population. Genome Biol. 16:23.
52. Jiao, M., Yu, D., Tan, C., Guo, J., Lan, D., Han, E., Qi, T., Voegelé, R. T., Kang, Z., and Guo, J. 2017. Basidiomycete-specific *PsCaMKL1* encoding a CaMK-like protein kinase is required for full virulence of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. Environ. Microbiol. 19:4177-4189.
53. Kamoun, S. 2006. A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. Annu. Rev. Phytopathol. 44:41-60.
54. Kemen, E., Kemen, A. C., Rafiqi, M., Hempel, U., Mendgen, K., Hahn, M., and Voegelé, R. T. 2005. Identification of a protein from rust fungi transferred from haustoria into infected plant cells. Mol. Plant-Microbe Interact. 18:1130-1139.
55. Kubisiak, T. L., Anderson, C. L., Amerson, H. V., Smith, J. A., Davis, J. M., and Nelson, C. D. 2011. A genomic map enriched for markers linked to *Avr1* in *Cronartium quercuum* f. sp. *fusiforme*. Fungal Genet. Biol. 48: 266-274.
56. Lannou, C. 2012. Variation and selection of quantitative traits in plant pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. 50:319-338.
57. Lanver, D., Tollot, M., Schweizer, G., Lo Presti, L., Reissmann, S., Ma, L.-S., Schuster, M., Tanaka, S., Liang, L., Ludwig, N., and Kahmann, R. 2017. *Ustilago maydis* effectors and their impact on virulence. Nat. Rev. Microbiol. 15:409-421.
58. Lawrence, G. J., Dodds, P. N., and Ellis, J. G. 2007. Rust of flax and linseed caused by *Melampsora lini*. Mol. Plant Pathol. 8:349-364.
59. Lawrence, G. J., Dodds, P. N., and Ellis, J. G. 2010. Transformation of the flax rust fungus, *Melampsora lini*: Selection via silencing of an avirulence gene. Plant J. 61:364-369.
60. Lawrence, G. J., Mayo, G. M. E., and Shepherd, K. W. 1981. Interactions between genes controlling pathogenicity in the flax rust fungus *Melampsora lini*. Phytopathology 71:12-19.

59. Lennox, C. L., and Rijkenberg, F. H. J. 1989. Scanning electron microscopy study of infection structure formation of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* in host and nonhost cereal species. *Plant Pathol.* 38:547-556.
60. Leonard, K. J., and Szabo, L. J. 2005. Stem rust of small grains and grasses caused by *Puccinia graminis*. *Mol. Plant Pathol.* 6:99-111.
61. Li, F., Upadhyaya, N. M., Sperschneider, J., Matny, O., Nguyen-Phuc, H., Mago, R., Raley, C., Miller, M. E., Silverstein, A. T., Henningsen, E., Hirsch, C. D., Visser, B., Pretorius, Z. A., Steffenson, B. J., Schwessinger, B., Dodds, P. N., and Figueroa, M. 2019. Emergence of the Ug99 lineage of the wheat stem rust pathogen through somatic hybridisation. *Nat. Comm.* 10:5068.
62. Link, T., Lohaus, G., Heiser, I., Mendgen, K., Hahn, M., and Voegelé, R. T. 2005. Characterization of a novel NADP(+)-dependent D-arabitol dehydrogenase from the plant pathogen *Uromyces fabae*. *Biochem. J.* 389: 289-295.
63. Link, T. I., and Voegelé, R. T. 2008. Secreted proteins of *Uromyces fabae*: Similarities and stage specificity. *Mol. Plant Pathol.* 9:59-66.
64. Liu, C., Pedersen, C., Schultz-Larsen, T., Aguilar, G. B., Madriz-Ordˆana, K., Hovmˆoller, M. S., and Thordal-Christensen, H. 2016. The stripe rust fungal effector PEC6 suppresses pattern-triggered immunity in a host species-independent manner and interacts with adenosine kinases. *New Phytol.* 213: 1556.
65. Liu, Z., Szabo, L. J., and Bushnell, W. R. 1993. Molecular cloning and analysis of abundant and stage-specific mRNAs from *Puccinia graminis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6:84-91.
66. Lo Presti, L., Lanver, D., Schweizer, G., Tanaka, S., Liang, L., Tollot, M., Zuccaro, A., Reissmann, S., and Kahmann, R. 2015. Fungal effectors and plant susceptibility. *Annu. Rev. Plant Biol.* 66:513-545.
67. Loegering, W. Q., and Powers, H. R. 1962. Inheritance of pathogenicity in a cross of physiologic races 111 and 36 of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Phytopathology* 52:547-554.
68. Long, D. L., and Kolmer, J. A. 1989. A North American system of nomenclature for *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*. *Phytopathology* 79:525-529.
- Lorrain, C., Goncalves dos Santos, K. C., Germain, H., Hecker, A., and Duplessis, S. 2019. Advances in understanding obligate biotrophy in rust fungi. *New Phytol.* 222:1190-1206.
69. Lorrain, C., Marchal, C., Hacquard, S., Delaruelle, C., Petrowski, J., Petre, B., Hecker, A., Frey, P., and Duplessis, S. 2018b. The rust fungus *Melampsora larici-populina* expresses a conserved genetic program and distinct sets of secreted protein genes during infection of its two host plants, larch and poplar. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 31:695-706.
70. Lorrain, C., Petre, B., and Duplessis, S. 2018a. Show me the way: Rust effector targets in heterologous plant systems. *Curr. Opin. Microbiol.* 46: 19-25.
71. Luster, D. G., McMahon, M. B., Carter, M. L., Fortis, L. L., and Nunez, A. 2010. Proteomic analysis of germinating urediniospores of *Phakopsora pachyrhizi*, causal agent of Asian soybean rust. *Proteomics* 10:3549-3557.
- Maia, T., Badel, J. L., Marin-Ramirez, G., Rocha, C. M., Fernandes, M. B., da Silva, J. C. F., de Azevedo-Junior, G. M., and Brommonschenkel, S. H. 2016. The *Hemileia vastatrix* effector HvEC-016 suppresses bacterial blight symptoms in coffee genotypes with the *SH1* rust resistance gene. *New Phytol.* 213:1315-1329.
72. McCallum, B. D., Hiebert, C. W., Cloutier, S., Bakkeren, G., Rosa, S. B., Humphreys, D. G., Marais, G. F., McCartney, C. A., Panwar, V., Rampitsch, C., Saville, B. J., and Wang, X. 2016. A review of wheat leaf rust research and the development of resistant cultivars in Canada. *Can. J. Plant Pathol.* 38:1-18.
73. McGinnis, R. C. 1956. Cytological studies of chromosomes of rust fungi. III. The relationship of chromosome number to sexuality in *Puccinia*. *J. Hered.* 47:255-259.
74. McTaggart, A. R., Duong, T. A., Le, V. Q., Shuey, L. S., Smidt, W., Naidoo, S., Wingfield, M. J., and Wingfield, B. D. 2018. Chromium sequencing: The doors open for genomics of obligate plant pathogens. *Biotechniques* 65: 253-257.
75. Mendgen, K. 1973. Electron microscopy of the bean rust, *Uromyces phaseoli*, infection structures. *Phytopathol. Z.* 78:109-120.
76. Miller, M. E., Zhang, Y., Omidvar, V., Sperschneider, J., Schwessinger, B., Raley, C., Palmer, J. M., Garnica, D., Upadhyaya, N., Rathjen, J., Taylor, J. M., Park, R. F., Dodds, P. N., Hirsch, C. D., Kianian, S. F., and Figueroa,

77. M. 2018. *De novo* assembly and phasing of dikaryotic genomes from two isolates of *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*, the causal agent of oat crown rust. *MBio* 9:e01650-e01617.
78. Mueth, N., Ramachandran, S., and Hulbert, S. 2015. Small RNAs from the wheat stripe rust fungus (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*). *BMC Genomics* 16:718.
79. Nazareno, E. S., Li, F., Smith, M., Park, R. F., Kianian, S. F., and Figueroa, M. 2018. *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*: A threat to global oat production. *Mol. Plant Pathol.* 19:1047-1060.
80. Newcomb, M., Olivera, P. D., Rouse, M. N., Szabo, L. J., Johnson, J., Gale, S., Luster, D. G., Wanyera, R., Macharia, G., Bhavani, S., Hodson, D., Patpour, M., Hovmöller, M. S., Fetch, T. G., and Jin, Y. 2016. Kenyan isolates of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* from 2008 to 2014: Virulence to *SrTmp* in the Ug99 race group and implications for breeding programs. *Phytopathology* 106:729-736.
81. Nowara, D., Gay, A., Lacomme, C., Shaw, J., Ridout, C., Douchkov, D., Hensel, G., Kumlehn, J., and Schweizer, P. 2010. HIGS: Host-induced gene silencing in the obligate biotrophic fungal pathogen *Blumeria graminis*. *Plant Cell* 22:3130-3141.
82. Oliveira-Garcia, E., and Deising, H. B. 2013. Infection structure-specific expression of b-1,3-glucan synthase is essential for pathogenicity of *Colletotrichum graminicola* and evasion of b-glucan-triggered immunity in maize. *Plant Cell* 25:2356-2378.
83. Olivera, P., Newcomb, M., Szabo, L. J., Rouse, M., Johnson, J., Gale, S.,
84. Luster, D. G., Hodson, D., Cox, J. A., Burgin, L., Hort, M., Gilligan, C. A., Patpour, M., Justesen, A. F., Hovmöller, M. S., Woldeab, G., Hailu, E., Hundie, B., Tadesse, K., Pumphrey, M., Singh, R. P., and Jin, Y. 2015. Phenotypic and genotypic characterization of race TKTTF of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* that caused a wheat stem rust epidemic in Southern Ethiopia in 2013–14. *Phytopathol.* 105:917-928.
85. Panwar, V., Jordan, M., McCallum, B., and Bakkeren, G. 2018. Host-induced silencing of essential genes in *Puccinia triticina* through transgenic expression of RNAi sequences reduces severity of leaf rust infection in wheat. *Plant Biotechnol. J.* 16:1013-1023.
86. Panwar, V., McCallum, B., and Bakkeren, G. 2013a. Endogenous silencing of *Puccinia triticina* pathogenicity genes through in planta-expressed sequences leads to suppression of rust diseases on wheat. *Plant J.* 73:521-532. Panwar, V., McCallum, B., and Bakkeren, G. 2013b. Host-induced gene silencing of wheat leaf rust fungus *Puccinia triticina* pathogenicity genes mediated by the barley stripe mosaic virus. *Plant Mol. Biol.* 81:595-608. Pariaud, B., Ravigne', V., Halkett, F., Goyeau, H., Carlier, J., and Lannou, C.
88. 2009. Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. *Plant Pathol.* 58:409-424.
89. Park, R. F., Golegaonkar, P. G., Derevnina, L., Sandhu, K. S., Karaoglu, H., Elmansour, H. M., Dracatos, P. M., and Singh, D. 2015. Leaf rust of cultivated barley: Pathology and control. *Annu. Rev. Phytopathol.* 53:565-589. Pernaci, M., De Mita, S., Andrieux, A., Petrowski, J., Halkett, F., Duplessis, S., and Frey, P. 2014. Genome-wide patterns of segregation and linkage disequilibrium: The construction of a linkage genetic map of the poplar rust fungus *Melampsora larici-populina*. *Front. Plant Sci.* 5:454.
91. Persoons, A., Morin, E., Delaruelle, C., Payen, T., Halkett, F., Frey, P., De Mita, S., and Duplessis, S. 2014. Patterns of genomic variation in the poplar rust fungus *Melampsora larici-populina* identify pathogenesis-related factors. *Front. Plant Sci.* 5:450.
92. Petre, B., Joly, D. L., and Duplessis, S. 2014. Effector proteins of rust fungi. *Front. Plant Sci.* 5:416.
93. Pretsch, K., Kemen, A., Kemen, E., Geiger, M., Mendgen, K., and Voegelé, R. 2013. The rust transferred proteins—A new family of effector proteins exhibiting protease inhibitor function. *Mol. Plant Pathol.* 14:96-107. Qi, M., Graczyk, J. P., Seitz, J. M., Lee, Y., Link, T. I., Choi, D., Pedley, K. F.,
94. Voegelé, R. T., Baum, T. J., and Whitham, S. A. 2018. Suppression or activation of immune responses by predicted secreted proteins of the soybean rust pathogen *Phakopsora pachyrhizi*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 31:163-174.

95. Qi, M., Link, T. I., Müller, M., Hirschburger, D., Pudake, R. N., Pedley, K. F., Braun, E., Voegelé, R. T., Baum, T. J., and Whitham, S. A. 2016. A small
96. Fernanda Pergolesi, M., Romina Ingala, L., Romina Cuyeu, A., Turjanski, A., Domingo Kreff, E., and Sacco, F. 2018. Characterization and comparative analysis of the genome of *Puccinia sorghi* Schwein, the causal agent of maize common rust. *Fungal Genet. Biol.* 112:31-39.
97. Rutter, W. B., Salcedo, A., Akhunova, A., He, F., Wang, S., Liang, H., Bowden, R. L., and Akhunov, E. 2017. Divergent and convergent modes of interaction between wheat and *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* isolates revealed by the comparative gene co-expression network and genome analyses. *BMC Genomics* 18:291.
98. Salcedo, A., Rutter, W., Wang, S., Akhunova, A., Bolus, S., Chao, S., Anderson, N., De Soto, M. F., Rouse, M., Szabo, L., Bowden, R. L., Dubcovsky, J., and Akhunov, E. 2017. Variation in the *AvrSr35* gene determines Sr35 resistance against wheat stem rust race Ug99. *Science* 358: 1604-1606.
99. Samborski, D. J., and Dyck, P. L. 1968. Inheritance of virulence in wheat leaf rust on the standard differential wheat varieties. *Can. J. Genet. Cytol.* 10: 24-32.
100. Saunders, D. G., Win, J., Cano, L. M., Szabo, L. J., Kamoun, S., and Raffaele, S. 2012. Using hierarchical clustering of secreted protein families to classify and rank candidate effectors of rust fungi. *PLoS One* 7:e29847.
101. Savary, S., Willocquet, L., Pethybridge, S. J., Esker, P., McRoberts, N., and Nelson, A. 2019. The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nat. Ecol. Evol.* 3:430-439.
102. Schillberg, S., Tiburzy, R., and Fischer, R. 2000. Transient transformation of the rust fungus *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Mol. Gen. Genet.* 262: 911-915.
103. Schwessinger, B., Sperschneider, J., Cuddy, W. S., Garnica, D. P., Miller, M. E., Taylor, J. M., Dodds, P. N., Figueroa, M., Park, R. F., and Rathjen, J. P. 2018. A near-complete haplotype-phased genome of the dikaryotic wheat stripe rust fungus *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* reveals high interhaplotype diversity. *MBio* 9:e02275-17.
104. Singh, R. P., Hodson, D. P., Jin, Y., Lagudah, E. S., Ayliffe, M. A., Bhavani, S., Rouse, M. N., Pretorius, Z. A., Szabo, L. J., Huerta-Espino, J., Basnet, B. R., Lan, C., and Hovmøller, M. S. 2015. Emergence and spread of new races of wheat stem rust fungus: Continued threat to food security and prospects of genetic control. *Phytopathology* 105:872-884.
106. Sniezko, R., Smith, J., Liu, J.-J., and Hamelin, R. 2014. Genetic resistance to fusiform rust in Southern pines and white pine blister rust in white pines—a contrasting tale of two rust pathosystems—current status and future prospects. *Forests* 5:2050-2083.
107. Song, X., Rampitsch, C., Soltani, B., Mauthe, W., Linning, R., Banks, T., McCallum, B., and Bakkeren, G. 2011. Proteome analysis of wheat leaf rust fungus, *Puccinia triticina*, infection structures enriched for haustoria. *Proteomics* 11:944-963.
108. Sperschneider, J., Catanzariti, A.-M., DeBoer, K., Petre, B., Gardiner, D. M., Singh, K. B., Dodds, P. N., and Taylor, J. M. 2017. LOCALIZER: Subcellular localization prediction of both plant and effector proteins in the plant cell. *Sci. Rep.* 7:44598.
109. K. B., Stone, E. A., Wang, M.-B., Dodds, P. N., and Taylor, J. M. 2018c. The stem rust fungus *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* induces waves of small RNAs with opposing profiles during wheat infection. *bioRxiv* 469338.
110. Staples, R. C. 2000. Research on the rust fungi during the twentieth century. *Annu. Rev. Phytopathol.* 38:49-69.
111. Statler, G. D. 1979. Inheritance of pathogenicity of culture 70-1, race 1, of
112. *Puccinia recondita tritici* leaf rust of wheat. *Phytopathology* 69:661-663. Statler, G. D. 2000. Inheritance of virulence of *Puccinia triticina* culture X47,
113. the F1 of the cross 71-112 × 70-1. *Can. J. Plant Pathol.* 22:276-279. Stone, C. L., McMahon, M. B., Fortis, L. L., Nunez, A., Smythers, G. W., Luster,

114. D. G., and Frederick, R. D. 2012. Gene expression and proteomic analysis of the formation of *Phakopsora pachyrhizi* appressoria. *BMC Genomics* 13:269. Struck, C., Ernst, M., and Hahn, M. 2002. Characterization of a developmentally regulated amino acid transporter (AAT1p) of the rust fungus *Uromyces fabae*. *Mol. Plant Pathol.* 3:23-30.
115. Struck, C., Mueller, E., Martin, H., and Lohaus, G. 2004. The *Uromyces fabae* UfAAT3 gene encodes a general amino acid permease that prefers uptake of in planta scarce amino acids. *Mol. Plant Pathol.* 5:183-189.
116. Struck, C., Siebels, C., Rommel, O., Wernitz, M., and Hahn, M. 1998. The plasma membrane H(+)-ATPase from the biotrophic rust fungus *Uromyces fabae*: Molecular characterization of the gene (PMA1) and functional expression of the enzyme in yeast. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11:458-465. Talhinhos, P., Batista, D., Diniz, I., Vieira, A., Silva, D. N., Loureiro, A., Tavares, S., Pereira, A. P., Azinheira, H. G., Guerra-Guimaraes, L., Va'rzea, V., and Silva, M. C. 2017. The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: One and a half centuries around the tropics. *Mol. Plant Pathol.* 18:1039-1051. Tavares, S., Ramos, A. P., Pires, A. S., Azinheira, H. G., Caldeirinha, P., Link, T., Abranches, R., Silva, M. D. C. M. L., Voegelé, R. T., Loureiro, J., and Talhinhos, P. 2014. Genome size analyses of Pucciniales reveal the largest fungal genomes. *Front. Plant Sci.* 5:422.
117. Thara, V. K., Fellers, J. P., and Zhou, J. M. 2003. In planta induced genes of *Puccinia triticina*. *Mol. Plant Pathol.* 4:51-56.
118. Toome-Heller, M. 2016. Latest developments in the research of rust fungi and their allies (Pucciniomycotina). Pages 147-168 in: *Biology of Microfungi*. D.-W. Li, ed. Springer International Publishing, Cham.
119. Upadhyaya, N. M., Mago, R., Staskawicz, B. J., Ayliffe, M. A., Ellis, J. G., and Dodds, P. N. 2014. A bacterial type III secretion assay for delivery of fungal effector proteins into wheat. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 27:255-264.
120. Vittal, R., Yang, H.-C., and Hartman, G. L. 2012. Anastomosis of germ tubes and migration of nuclei in germ tube networks of the soybean rust pathogen, *Phakopsora pachyrhizi*. *Eur. J. Plant Pathol.* 132:163-167.
121. Voegelé, R. T. 2006. *Uromyces fabae*: Development, metabolism, and interactions with its host *Vicia faba*. *FEMS Microbiol. Lett.* 259:165-173.
122. Voegelé, R. T., Hahn, M., and Mendgen, K. 2009. The Uredinales: Cytology, biochemistry, and molecular biology. Pages 69-98 in: *Plant Relationships; The Mycota*. V. H. B. Deising, ed. Springer, Berlin, Heidelberg.
123. Voegelé, R. T., Struck, C., Hahn, M., and Mendgen, K. 2001. The role of haustoria in sugar supply during infection of broad bean by the rust fungus *Uromyces fabae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:8133-8138.
124. Voegelé, R. T., Wirsal, S., Moell, U., Lechner, M., and Mendgen, K. 2006. Cloning and characterization of a novel invertase from the obligate biotroph *Uromyces fabae* and analysis of expression patterns of host and pathogen invertases in the course of infection. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19: 625-634.
125. Wang, B., Sun, Y., Song, N., Zhao, M., Liu, R., Feng, H., Wang, X., and Kang, Z. 2017. *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* microRNA-like RNA 1 (Pst-milR1), an important pathogenicity factor of Pst, impairs wheat resistance to Pst by suppressing the wheat pathogenesis-related 2 gene. *New Phytol.* 215:338-350. Wang, L., Zheng, D., Zuo, S., Chen, X., Zhuang, H., Huang, L., Kang, Z., and Zhao, J. 2018. Inheritance and linkage of virulence genes in Chinese pre-dominant race CYR32 of the wheat stripe rust pathogen *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Front. Plant Sci.* 9:120.
126. J. M. 2018b. Improved prediction of fungal effector proteins from secretomes with EffectorP 2.0. *Mol. Plant Pathol.* 19:2094-2110.
127. Sperschneider, J., Dodds, P. N., Singh, K. B., and Taylor, J. M. 2018a. ApoplastP: Prediction of effectors and plant proteins in the apoplast using machine learning. *New Phytol.* 217:1764-1778

Összefoglalás

Az elmúlt 20 évben a rozsdagombák kutatása terén jelentős előrelépések történtek az új genomikai technológiák alkalmazásával. Mint az elmúlt évek kutatásaiból kiderült, a rozsdagombák genomjai sokkal nagyobbak és összetettebbek, mint más gombáké, változatos haplotípusokkal és genomméretekkel rendelkeznek, nagy mennyiségű ismétlődő elemeket és géncsaládokat tartalmaznak, amelyek fontosak a biotróf életmódjuk szempontjából.

A rozsdagombák genetikai kutatása új információkat nyújt a gombák genomjainak változatosságáról és a virulencia mechanizmusairól. A felfedezések elősegíthetik az *R* gének hatékonyabb alkalmazását a gazdaszervezetek ellen. Emellett az effektorfehérjék és az *R* gének közötti kölcsönhatások vizsgálata segíthet az újabb rezisztencia mechanizmusok feltárásához. Az új funkcionális vizsgálatok és az AVR-effektor jegyzékek elősegíthetik az *R* gének azonosítását és izolálását, valamint új, tartósabb rezisztenciát biztosító gének felfedezését. Ezenkívül a HIGS technológia alkalmazása lehetővé teszi a rozsdagombák fertőző- és megbetegítőképességét befolyásoló gének célzott csendesítését, ami új fungicidosztályok kifejlesztéséhez vezethet.

Végül, az effektorok és a célgének közötti kölcsönhatások vizsgálata lehetőséget kínál a gazdanövényekre gyakorolt hatások mélyebb megértésére és a fogékonyság csökkentésére irányuló genomszerkesztéses stratégiák fejlesztésére. Bár a biotróf rozsdagombák kutatása kihívást jelent, az új technológiák és megközelítések jelentős előrelépést hoztak genetikájuk mélyebb megértéséhez.

Summary

Over the past 20 years, significant advances have been made in rust fungus research using new genomic technologies. Studies in recent years have shown that the genomes of rust fungi are much larger and more complex than those of other fungi, with diverse haplotypes and genome sizes, and contain large amounts of repetitive elements and gene families that are important for their biotrophic lifestyle.

Genetic research on rust fungi provides new insights into the diversity of fungal genomes and mechanisms of virulence. The results may help to improve the use of *R* genes against host organisms. In addition, the study of interactions between effector proteins and *R* genes may provide new mechanisms of resistance. New functional assays and AVR effector annotations may facilitate the identification and isolation of *R* genes and the discovery of new genes that confer more persistent resistance. In addition, the application of HIGS technology will allow targeted silencing of genes affecting the infectivity and pathogenicity of rust fungi, which could lead to the development of new fungicide classes.

Finally, studying the interactions between effectors and target genes provides an opportunity to gain a deeper understanding of the effects on host plants and to develop genome editing strategies to reduce host susceptibility. Although research on biotrophic rust fungi is challenging, new technologies and approaches have led to significant advances in our better understanding of their genetics.

Szerzői nyilatkozat

Alulírott Szendrei Lilla, Agrár és természettudományi szakfordító szakirányú továbbképzés hallgatója, kijelentem, hogy a Progress on Molecular Genetics and Manipulation of Rust Fungi-Előrelépés a rozsdagombák molekuláris genetikája és manipulációja terén című képesítőfordítás a saját munkám eredménye. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, s az irodalomjegyzékben szerepeltettem.

Ha a fenti nyilatkozattal valótlan állítottam, tudomásul veszem, hogy a Záróvizsga-bizottság a záróvizsgából kizár és záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetek.

Budapest, 2024.04.21.



a hallgató aláírása

Konzulensi nyilatkozat

A dolgozat készítőjének konzulense nyilatkozom arról, hogy a Záródolgozatot/Szakdolgozatot/Diplomadolgozatot/Képesítőfordítást áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A Záródolgozatot/Szakdolgozatot/Diplomadolgozatot záróvizsgán történő védelemre javaslom / nem javaslom*.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem*

Kelt: 2024. év április hó 19. nap


Konzulens