

余方伟,王神云,张伟,等.芸薹根肿菌蛋白磷酸酶组的鉴定及生物信息学分析[J].江苏农业学报,2020,36(2):318-324.  
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2020.02.010

## 芸薹根肿菌蛋白磷酸酶组的鉴定及生物信息学分析

余方伟, 王神云, 张伟, 王红, 于利, 李建斌

(江苏省农业科学院蔬菜研究所/江苏省高效园艺作物遗传改良重点实验室,江苏 南京 210014)

**摘要:** 由蛋白激酶和蛋白磷酸酶调控的蛋白质可逆磷酸化是一种重要的蛋白质翻译后修饰,它在信号转导、细胞周期、基因转录、代谢调控等过程中起到至关重要的作用。本研究以芸薹根肿菌 e3 菌株的基因组为试验数据来源,采用生物信息学方法对芸薹根肿菌全基因组蛋白磷酸酶进行了鉴定和表达分析。基于隐马尔可夫模型(Hidden markov model,HMM)搜索与 SMART 分析相结合,本研究在芸薹根肿菌基因组中共鉴定出 54 个蛋白磷酸酶基因。编码的 54 个蛋白磷酸酶可以进一步被分成 4 类,包括 10 个磷酸化蛋白磷酸酶(PPP),21 个金属离子依赖型蛋白磷酸酶(PPM),19 个酪氨酸蛋白磷酸酶(PTP),4 个基于天冬氨酸的蛋白磷酸酶(APP)。这 54 个蛋白磷酸酶的相对分子质量为 10 780~125 140,等电点为 4.43~10.45。通过信号肽和跨膜结构域分析发现在这 54 个蛋白磷酸酶中,PBRA\_007461 存在信号肽,PBRA\_003636、PBRA\_004449、PBRA\_004464、PBRA\_005270、PBRA\_006854 和 PBRA\_007201 存在跨膜结构域。转录组分析结果表明这 54 个蛋白磷酸酶基因在不同时期差异表达,值得一提的是在休眠孢子萌发期和休眠孢子成熟期,金属离子依赖型蛋白磷酸酶基因 PBRA\_001085 的表达量最高,说明该磷酸酶在休眠孢子发育中起到重要作用。综上所述,本研究可为芸薹根肿菌蛋白磷酸酶功能研究和根肿病防治靶标选择提供理论基础。

**关键词:** 根肿病;芸薹根肿菌;蛋白磷酸酶

**中图分类号:** Q814

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-4440(2020)02-0318-07

## Identification and bioinformatics analysis of protein-phosphatome in *Plasmodiophora brassicae*

YU Fang-wei, WANG Shen-yun, ZHANG Wei, WANG Hong, YU Li, LI Jian-bin

(Jiangsu Key Laboratory for Horticultural Crop Genetic Improvement/Institute of Vegetable Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** Reversible phosphorylation of proteins, regulated by protein kinases and protein phosphatases is an important post-translational modification, which plays a vital role in signal transduction, cell cycle, gene transcription and metabolic regulation. In this study, bioinformatics tools were used to analyze the protein sequences from *Plasmodiophora brassicae* e3 strain, and the identified protein phosphatase genes were further subjected to expression profiling analysis. Based on

收稿日期:2019-12-11

**基金项目:**江苏省自然科学基金项目(BK20170608);国家自然科学基金项目(31701773);江苏省“333 高层次人才培养工程”项目(BRA2018379);江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(18)2006]

**作者简介:**余方伟(1986-),男,浙江台州人,博士,副研究员,从事甘蓝类作物抗病育种研究。(E-mail)yfw@jaas.ac.cn

**通讯作者:**李建斌,(E-mail)jbli@jaas.ac.cn

the combination of hidden markov model (HMM) search and SMART analysis, a total of 54 protein phosphatase genes were identified in the genome of *P. brassicae*. These 54 protein phosphatases could be further classified into four categories, including 10 phosphoprotein phosphatases (PPP), 21 metal ion-dependent protein phosphatases (PPM), 19 protein tyrosine phosphatases (PTP), four aspartate-based protein phosphatases (APP). The molecu-

lar weights of these 54 protein phosphatases ranged from 10 780 to 125 140, and the isoelectric points ranged from 4.43 to 10.45. The results of signal peptide and transmembrane domain analysis revealed that among 54 candidate protein phosphatases, *PBRA\_007461* had a signal peptide, and there were transmembrane domains in *PBRA\_003636*, *PBRA\_004449*, *PBRA\_004464*, *PBRA\_005270*, *PBRA\_006854* and *PBRA\_007201*. Transcriptome analysis results showed that these 54 protein phosphatases genes were differentially expressed at different stages. Notably, the expression of the metal ion-dependent protein phosphatase gene *PBRA\_001085* was highest during the resting spore germination and the spore maturation period, indicating that it played an important role in resting spore development. In conclusion, this study can provide a theoretical basis for the characterization of protein phosphatases and development of novel strategies against clubroot.

**Key words:** clubroot; *Plasmodiophora brassicae*; protein phosphatase

由芸薹根肿菌(*Plasmodiophora brassicae* Woronin)引起的根肿病对全世界十字花科作物的生产构成越来越大的威胁<sup>[1-3]</sup>。仅在中国,每年大约有 $3.20 \times 10^6 \sim 4.00 \times 10^6$  hm<sup>2</sup>的十字花科作物受到根肿病的影响,造成20%~30%的产量损失<sup>[3]</sup>。尽管选育抗病品种是控制根肿病最经济有效的方法<sup>[4]</sup>,但新型致病小种的出现也极大地损害了抗病品种的推广应用<sup>[5-7]</sup>。因此,根肿病防治新策略的研究迫在眉睫。

蛋白质可逆磷酸化是生物体内信号传导的主要形式和重要的调控机制<sup>[8-10]</sup>。蛋白质磷酸化过程由蛋白激酶(PKs)控制。现有研究表明,蛋白质可以在9个氨基酸(酪氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、精氨酸、赖氨酸、天冬氨酸、谷氨酸和组氨酸)位点上发生磷酸化<sup>[11]</sup>,但丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸磷酸化在真核细胞中占主导地位并发挥关键调控作用<sup>[12]</sup>。对2 244种人类蛋白质上6 600个磷酸化位点的蛋白质组学分析结果表明,磷酸化丝氨酸(pSer)、磷酸化苏氨酸(pThr)和磷酸化酪氨酸(pTyr)分别占磷酸化氨基酸的86.4%、11.8%和1.8%<sup>[13]</sup>。对禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*) 2 902个磷酸化肽分析发现,pSer、pThr和pTyr分别占磷酸化氨基酸的87.0%、26.0%和2.4%<sup>[14]</sup>。在白色念珠菌中(*Candida albicans*),对2 896个蛋白质的15 906个特异磷酸化位点鉴定分析发现,pSer、pThr和pTyr分别占磷酸化氨基酸的80.01%、18.11%和1.81%<sup>[15]</sup>。在黄曲霉(*Aspergillus flavus*)中,对293个磷酸化蛋白的598个磷酸化位点进行分析发现,pSer、pThr和pTyr分别占磷酸化氨基酸的81.1%、16.4%和2.5%<sup>[16]</sup>。蛋白质去磷酸化过程由蛋白磷酸酶(PP)控制。根据蛋白质底物特异性、结构和催化机制不同,PP可分为2个主要的大家族:蛋白酪氨酸磷酸酶(PTP)和丝氨酸/苏氨酸磷酸酶(PSP)。PTP成员主要催化磷酸酪氨酸的去磷酸化,包括经

典PTP,双特异性磷酸酶(DSP),Cdc25型磷酸酶和低分子量磷酸酶<sup>[17]</sup>。PSP包含3个主要家族:磷酸化蛋白磷酸酶(PPP),金属依赖性蛋白磷酸酶(PPM)和基于天冬氨酸的蛋白磷酸酶(APP)<sup>[18]</sup>。已有的结果表明磷酸酶基因家族成员在不同物种中数目不同,且其生物学功能各异。如在构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)中已鉴定出28个PP,其中8个是正常生长或有丝分裂所必需的<sup>[19]</sup>。反向遗传分析结果表明,禾谷镰刀菌的磷酸酶参与菌丝生长、分生孢子形成、致病和产毒等过程<sup>[20-21]</sup>。

因为PP的功能多样性和重要性,本研究拟采用生物信息学分析方法挖掘鉴定芸薹根肿菌的蛋白磷酸酶,对其理化性质、跨膜结构域、信号肽进行分析,并通过转录组学分析这些磷酸酶在不同阶段的表达变化,为后续芸薹根肿菌磷酸酶的功能研究及根肿病新的防治策略研究提供借鉴。

## 1 材料与方法

### 1.1 芸薹根肿菌基因组序列

以芸薹根肿菌 e3 菌株的基因组为起始序列,进行后续生物信息学分析,序列下载自公共数据库NCBI([ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/all/GCA/001/049/375/GCA\\_001049375.1\\_pbe3.h15](ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/all/GCA/001/049/375/GCA_001049375.1_pbe3.h15))。

### 1.2 生物信息学分析

从Pfam数据库(<http://pfam.xfam.org/>)中下载pfam文件(表1),利用HMMER 3.0软件<sup>[22]</sup>搜索芸薹根肿菌的蛋白质氨基酸序列。用SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)对获得的氨基酸序列进行结构域分析,剔除不含磷酸酶催化结构域的氨基酸序列,再进一步剔除不完整的氨基酸序列,最后剩下的序列即为候选蛋白磷酸酶氨基酸序列。采用SignalP 4.0<sup>[23]</sup>和TMHMM 2.0<sup>[24]</sup>分别对候选蛋白质的信号肽和跨膜结构域进行分析。

表 1 蛋白磷酸酶鉴定所用的 pfam 文件

Table 1 List of pfam profiles used in this study

Pfam	磷酸酶类型	氨基酸底物
PF00102	酪氨酸磷酸酶	酪氨酸
PF01451	低分子量磷酸酶	酪氨酸
PF00481	蛋白磷酸酶 2c	丝氨酸/苏氨酸
PF00782	双特异性蛋白磷酸酶	酪氨酸/丝氨酸/苏氨酸
PF03162	酪氨酸磷酸酶 2	酪氨酸
PF03031	类 NLI 互作因子磷酸酶	丝氨酸/苏氨酸
PF00581	细胞分裂周期因子 25	苏氨酸/酪氨酸
PF00149	金属离子依赖型磷酸酶	丝氨酸/苏氨酸

### 1.3 表达量分析

芸薹根肿菌的转录组数据源自 Schwelm 等<sup>[25]</sup>的报道:将-20℃保存的分离纯化后的休眠孢子置于4℃解冻48h后,再转移到含有400 ng/ml特美汀的灭菌水中室温孵育24h,以此样品提取RNA进行转录组学分析,获得的数据即为休眠孢子萌发期数据;芸薹根肿菌侵染油菜(*Brassica napus*)栽培种 Westar 35 d后,从油菜病根中分离原生质团,提取原生质团的RNA进行转录组学分析,获得的数据即为原生质团时期数据;从芸薹根肿菌侵染35d后的

白菜(*B.rapa*)栽培种 Granaat 病根中分离休眠孢子,以此休眠孢子提取RNA进行转录组学分析,获得的数据为休眠孢子成熟期数据;白菜栽培种 Granaat、油菜栽培种 Dc119 Giant rape 和结球甘蓝(*B. oleracea* var. *capitata*) Jersey Queen 接种芸薹根肿菌35d后,分别取病根进行表面消毒后提取总RNA进行转录组学分析,以此获得的数据即为不同寄主的数据来源。根据 Trapnell 等<sup>[26]</sup>报道的方法将数据换算成 FPKM(Fragments per kilobase of transcript per million mapped reads)。蛋白磷酸酶基因的表达量换算成  $\text{Log}_2(\text{FPKM}+1)$  值后,利用 R 语言中的 pheatmap 包绘制热图。

## 2 结果与分析

### 2.1 芸薹根肿菌蛋白磷酸酶的鉴定

以 Pfam 文件为种子序列搜索芸薹根肿菌的蛋白质库,再结合 SMART 结构域分析,本研究从芸薹根肿菌基因组中鉴定到了57个蛋白磷酸酶基因,经过序列分析发现,其中3个蛋白磷酸酶基因(*PBRA\_000895*、*PBRA\_000081* 和 *PBRA\_000766*)的序列不完整,剔除以上3个基因后,最终选择剩余的54个蛋白磷酸酶基因(表2)。

表 2 芸薹根肿菌蛋白磷酸酶的鉴定

Table 2 Identification of protein phosphatases in *Plasmodiophora brassicae*

蛋白磷酸酶家族	基因名称	蛋白磷酸酶					
		登录号	氨基酸数	相对分子质量 ( $\times 10^4$ )	等电点	信号肽	跨膜结构域
APP	<i>PBRA_000495</i>	CE094709.1	324	3.770	8.60	无	无
	<i>PBRA_002692</i>	CEP01423.1	524	5.831	6.55	无	无
	<i>PBRA_003042</i>	CEP03282.1	351	4.010	6.24	无	无
	<i>PBRA_007906</i>	CEP00172.1	291	3.247	7.02	无	无
PPM	<i>PBRA_000688</i>	CE097342.1	407	4.459	6.87	无	无
	<i>PBRA_000995</i>	CE097650.1	281	3.016	4.58	无	无
	<i>PBRA_001085</i>	CE099179.1	298	3.273	5.10	无	无
	<i>PBRA_001274</i>	CE099367.1	332	3.563	4.84	无	无
	<i>PBRA_002157</i>	CEP01551.1	344	3.771	5.72	无	无
	<i>PBRA_002428</i>	CEP02163.1	357	3.943	6.15	无	无
	<i>PBRA_003129</i>	CEP03369.1	378	4.083	7.56	无	无
	<i>PBRA_003636</i>	CE094823.1	315	3.507	8.36	无	有
	<i>PBRA_004464</i>	CE095751.1	333	3.570	8.07	无	有
	<i>PBRA_005648</i>	CE097044.1	342	3.665	6.68	无	无
	<i>PBRA_005771</i>	CE097167.1	428	4.712	7.59	无	无

续表2 Continued2

蛋白磷酸酶家族	基因名称	蛋白磷酸酶					
		登录号	氨基酸数	相对分子质量 ( $\times 10^4$ )	等电点	信号肽	跨膜结构域
PPP	PBRA_005777	CEO97173.1	392	4.309	4.73	无	无
	PBRA_006063	CEO97949.1	497	5.380	4.79	无	无
	PBRA_006854	CEO98740.1	399	4.308	6.50	无	有
	PBRA_007271	CEO99538.1	301	3.238	5.87	无	无
	PBRA_007461	CEO99728.1	291	3.150	4.44	有	无
	PBRA_007471	CEO99737.1	265	2.884	6.17	无	无
	PBRA_007636	CEO99902.1	173	1.948	7.13	无	无
	PBRA_007716	CEO99982.1	398	4.596	4.84	无	无
	PBRA_008437	CEP01125.1	414	4.508	4.43	无	无
	PBRA_008821	CEP01878.1	411	4.551	6.51	无	无
	PBRA_000135	CEO94350.1	304	3.508	4.82	无	无
	PBRA_002029	CEP01423.1	305	3.512	5.07	无	无
	PBRA_002095	CEP01489.1	293	3.315	6.18	无	无
	PBRA_003208	CEP03448.1	514	5.762	5.63	无	无
	PBRA_003461	CEP03854.1	322	3.589	5.55	无	无
	PBRA_004449	CEO95736.1	1 111	12.514	9.19	无	有
	PBRA_005535	CEO96931.1	302	3.423	6.60	无	无
	PBRA_005571	CEO96967.1	400	4.359	6.51	无	无
	PBRA_005841	CEO97727.1	616	5.855	4.76	无	无
	PBRA_006030	CEO97916.1	305	3.008	5.38	无	无
PTP	PBRA_000049	CEO94264.1	169	1.867	6.61	无	无
	PBRA_000083	CEO94298.1	243	2.723	9.18	无	无
	PBRA_000278	CEO94493.1	202	2.168	6.52	无	无
	PBRA_001432	CEP00378.1	549	6.161	9.47	无	无
	PBRA_002191	CEP01926.1	325	3.594	8.15	无	无
	PBRA_002218	CEP01953.1	223	2.519	5.33	无	无
	PBRA_002855	CEP02889.1	207	2.327	7.57	无	无
	PBRA_002868	CEP02901.1	167	1.840	10.03	无	无
	PBRA_002948	CEP03189.1	167	1.940	6.26	无	无
	PBRA_003388	CEP03781.1	279	3.149	6.09	无	无
	PBRA_004972	CEO96301.1	294	3.284	7.83	无	无
	PBRA_004997	CEO96326.1	261	2.851	8.82	无	无
	PBRA_005270	CEO96666.1	136	1.430	8.51	无	有
	PBRA_005957	CEO97843.1	186	2.055	9.98	无	无
	PBRA_007201	CEO99087.1	209	2.363	7.07	无	有
	PBRA_007324	CEO99591.1	181	2.044	9.48	无	无
	PBRA_007543	CEO99809.1	170	1.880	7.95	无	无
	PBRA_008356	CEP01044.1	92	1.078	10.16	无	无
	PBRA_009167	CEP02949.1	502	5.463	10.45	无	无



## 2.2 芸薹根肿菌蛋白磷酸酶理化特性分析

根据结构域预测分析结果,这 54 个蛋白磷酸酶可以进一步被分成 4 类,包括 10 个磷酸化蛋白磷酸酶,21 个金属离子依赖型蛋白磷酸酶,19 个酪氨酸蛋白磷酸酶,4 个基于天冬氨酸的蛋白磷酸酶(表 2)。如表 2 所示,这 54 个蛋白磷酸酶的氨基酸残基数目为 92~1 111 aa,其中氨基酸残基数目最少的为酪氨酸磷酸酶 *PBRA\_008356*,氨基酸残基数目最多的为磷酸化蛋白磷酸酶 *PBRA\_004449*。这 54 个蛋白磷酸酶的相对分子质量为 10 780 ~ 125 140,其中相对分子质量最低的为酪氨酸磷酸酶 *PBRA\_008356*,相对分子质量最大的为磷酸化蛋白磷酸酶 *PBRA\_004449*。这 54 个蛋白磷酸酶的理论等电点为 4.43~10.45,其中理论等电点最低的为金属离子依赖性磷酸酶 *PBRA\_008437*,理论等电点最高的为酪氨酸蛋白磷酸酶 *PBRA\_009167*。

## 2.3 芸薹根肿菌蛋白磷酸酶信号肽和跨膜结构域的预测分析

对这 54 个蛋白磷酸酶进行信号肽分析发现, *PBRA\_007461* 存在信号肽,且在第 19~20 位氨基酸残基处存在信号肽切割位点,说明该蛋白质是一个潜在外泌蛋白。通过 TMHMM2.0 分析发现, *PBRA\_003636*、*PBRA\_004449*、*PBRA\_004464*、*PBRA\_005270*、*PBRA\_006854* 和 *PBRA\_007201* 存在跨膜结构域( *PBRA\_004449* 有 5 个跨膜结构域,其他均为 1 个),说明这些磷酸酶可能是膜定位。

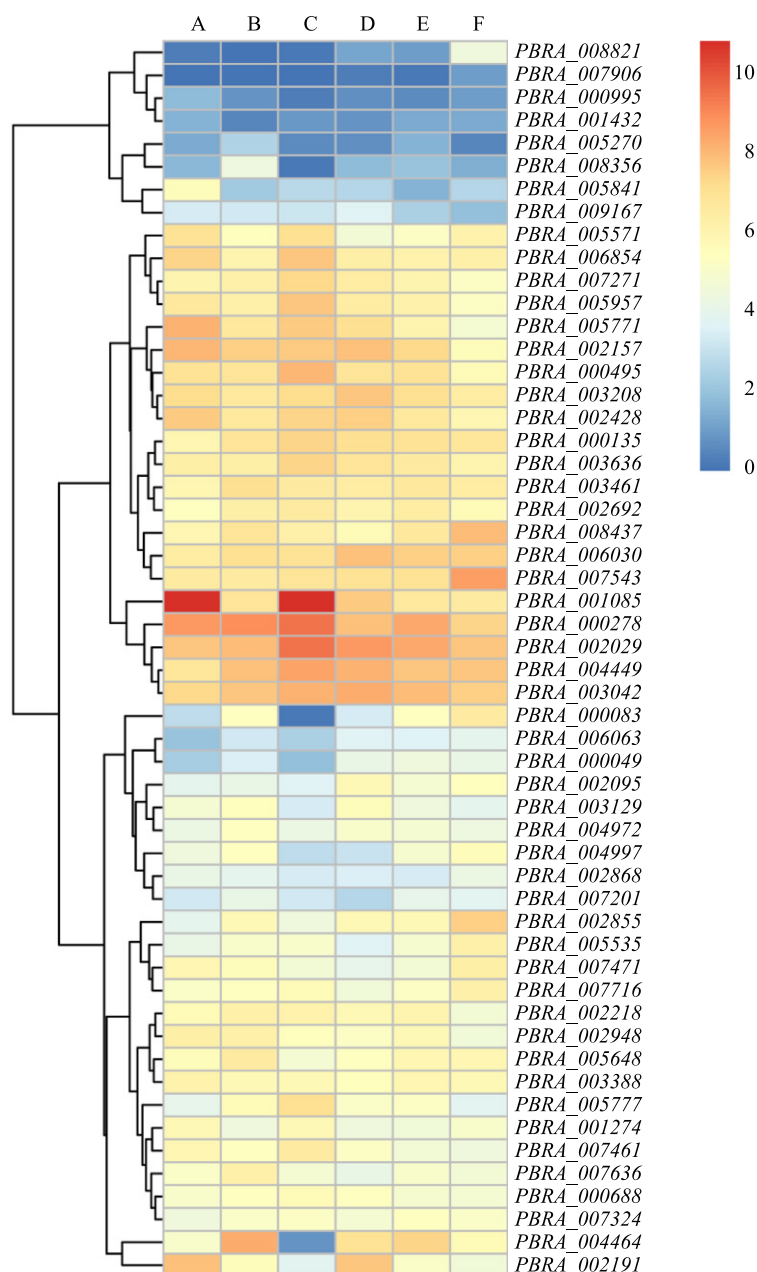
## 2.4 芸薹根肿菌蛋白磷酸酶基因在不同阶段表达动态变化

通过转录组分析对这 54 个蛋白磷酸酶基因在不同时期的表达进行分析。如图 1 所示,有 21 个磷酸酶基因( *PBRA\_005571*、*PBRA\_006854*、*PBRA\_007271*、*PBRA\_005957*、*PBRA\_005771*、*PBRA\_002157*、*PBRA\_000495*、*PBRA\_003208*、*PBRA\_002428*、*PBRA\_000135*、*PBRA\_003636*、*PBRA\_003461*、*PBRA\_002692*、*PBRA\_008437*、*PBRA\_006030*、*PBRA\_007543*、*PBRA\_001085*、*PBRA\_000278*、*PBRA\_002029*、*PBRA\_004449*、*PBRA\_003042*) 在各个阶段的表达量均较高,8 个磷酸酶基因( *PBRA\_008821*、*PBRA\_007906*、*PBRA\_000995*、*PBRA\_001432*、*PBRA\_005270*、*PBRA\_008356*、*PBRA\_005841*、*PBRA\_009167*) 在各个阶段的表达量均较低,其余基因在不同阶段差异表达。在孢

子萌发阶段,表达量最高的磷酸酶基因为 *PBRA\_001085*,在原生质团阶段,表达量最高的磷酸酶基因为 *PBRA\_000278*,在孢子成熟阶段,表达量最高的磷酸酶基因为 *PBRA\_001085*。

## 3 讨论

由芸薹根肿菌导致的根肿病严重威胁十字花科作物的可持续生产,这种病也被称为植物的“癌症”。芸薹根肿菌是细胞内活体营养型病原物,因为其无法在人工合成培养基上生长,缺乏稳定的遗传转化体系,因此常规的反向遗传操作难以在芸薹根肿菌中得到应用。随着高通量测序技术的快速发展,采用生物信息学方法进行芸薹根肿菌基因挖掘和分析已成为现实。本研究通过生物信息学分析方法从芸薹根肿菌基因组中鉴定到 54 个蛋白磷酸酶基因。目前研究表明,人和拟南芥( *Arabidopsis thaliana* )中分别存在 148 和 150 个蛋白磷酸酶基因<sup>[27]</sup>,水稻( *Oryza sativa* )中有 132 个蛋白磷酸酶基因<sup>[28]</sup>,玉米( *Zea mays* )中有 159 个蛋白磷酸酶基因<sup>[29]</sup>,原生生物疟原虫( *Plasmodium falciparum* )中有 67 个蛋白磷酸酶基因<sup>[30]</sup>。芸薹根肿菌在分类上属于原生生物,因此其蛋白磷酸酶基因的数目与同为原生生物的恶性疟原虫较为接近。越来越多的研究表明蛋白磷酸酶在病原物生长和致病等生物进程中起到重要作用。禾谷镰刀菌的磷酸酶在菌丝生长、细胞分裂、分生孢子形成、致病性和外界胁迫响应等过程中发挥重要作用<sup>[20-21]</sup>。核盘菌( *Sclerotinia sclerotiorum* )的钙调磷酸酶在其菌核发育和致病性中起到重要作用<sup>[31]</sup>。弓形虫( *Toxoplasma gondii* )可以分泌蛋白磷酸酶 2c 来操纵宿主细胞<sup>[32]</sup>。在这 54 个蛋白磷酸酶中, *PBRA\_007461* 是一个潜在的外泌蛋白,它也可能通过与弓形虫相类似的机理来发挥效应因子的功能,当然这需要后续更多的试验证据来佐证。蛋白磷酸酶在病原物生长和侵染中扮演着重要的角色,这也为病害的防治提供了潜在的靶标<sup>[33]</sup>。有研究表明,MAPKK 激酶抑制剂 U0126 可以有效降低根肿病的发病程度<sup>[34]</sup>。受此启发,挖掘芸薹根肿菌生长和致病关键蛋白磷酸酶的特异性抑制剂可望为根肿病防治提供新的思路和切入点。



A:孢子萌发期;B:原生质团阶段;C:孢子成熟期;D:寄主为油菜;E:寄主为甘蓝;F:寄主为白菜。

图1 芸薹根肿菌蛋白磷酸酶基因表达动态变化

Fig.1 Dynamic changes of protein phosphatases gene expression in *Plasmodiophora brassicae*

## 参考文献:

- [1] DIXON G R. The occurrence and economic impact of *Plasmodiophora brassicae* and clubroot disease [J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2009, 28(3): 194-202.
- [2] HWANG S F, STRELKOV S E, FENG J, et al. *Plasmodiophora brassicae*: a review of an emerging pathogen of the Canadian canola (*Brassica napus*) crop [J]. Molecular Plant Pathology, 2012, 13(2): 105-113.
- [3] CHAI A L, XIE X W, SHI Y X, et al. Research status of clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) on cruciferous crops in China [J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 2014, 36(1): 142-153.
- [4] DIEDERICHSEN E, FRAUEN M, LINDERS E G A, et al. Status and perspectives of clubroot resistance breeding in crucifer crops [J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2009, 28(3): 265-281.
- [5] KUGINUKI Y, YOSHIKAWA H, HIRAI M. Variation in virulence of *Plasmodiophora brassicae* in Japan tested with clubroot-resistant cultivars of Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) [J].

- European Journal of Plant Pathology, 1999, 105(4): 327-332.
- [6] STRELKOV S E, HWANG S F, MANOLII V P, et al. Emergence of new virulence phenotypes of *Plasmiodiophora brassicae* on canola (*Brassica napus*) in Alberta, Canada [J]. European Journal of Plant Pathology, 2016, 145(3): 517-529.
  - [7] JIANG J, FREDUA-AGYEMAN R, STRELKOV S E, et al. Suppression of canola (*Brassica napus*) resistance by virulent isolates of *Plasmiodiophora brassicae* (clubroot) during primary infection [J]. Plant Disease, 2020, 104(2): 430-437.
  - [8] SACCO F, PERFETTO L, CASTAGNOLI L, et al. The human phosphatase interactome: an intricate family portrait [J]. FEBS Letters, 2012, 586(17): 2732-2739.
  - [9] COHEN P. The regulation of protein function by multisite phosphorylation-a 25 year update [J]. Trends in Biochemical Sciences, 2000, 25(12): 596-601.
  - [10] ARDITO F, GIULIANI M, PERRONE D, et al. The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy [J]. International Journal of Molecular Medicine, 2017, 40(2): 271-280.
  - [11] MOORHEAD G B G, DE WEVER V, TEMPLETON G, et al. Evolution of protein phosphatases in plants and animals [J]. Biochemical Journal, 2008, 417(2): 401-409.
  - [12] MANNING G, PLOWMAN G D, HUNTER T, et al. Evolution of protein kinase signaling from yeast to man [J]. Trends in Biochemical Sciences, 2002, 27(10): 514-520.
  - [13] OLSEN J V, BLAGOEV B, GNAD F, et al. Global, *in vivo*, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks [J]. Cell, 2006, 127(3): 635-648.
  - [14] RAMPITSCH C, TINKER N A, SUBRAMANIAM R, et al. Phosphoproteome profile of *Fusarium graminearum* grown *in vitro* under nonlimiting conditions [J]. Proteomics, 2012, 12(7): 1002-1005.
  - [15] WILLGER S D, LIU Z, OLARTE R A, et al. Analysis of the *Candida albicans* phosphoproteome [J]. Eukaryotic Cell, 2015, 14(5): 474-485.
  - [16] REN S, YANG M, LI Y, et al. Global phosphoproteomic analysis reveals the involvement of phosphorylation in aflatoxins biosynthesis in the pathogenic fungus *Aspergillus flavus* [J]. Scientific Reports, 2016, 6: 34078.
  - [17] ALONSO A, PULIDO R. The extended human PTPome: a growing tyrosine phosphatase family [J]. The FEBS Journal, 2016, 283(8): 1404-1429.
  - [18] SHI Y. Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure [J]. Cell, 2009, 139(3): 468-484.
  - [19] SON S, OSMANI S A. Analysis of all protein phosphatase genes in *Aspergillus nidulans* identifies a new mitotic regulator, fcp1 [J]. Eukaryotic Cell, 2009, 8(4): 573-585.
  - [20] YU F, GU Q, YUN Y, et al. The TOR signaling pathway regulates vegetative development and virulence in *Fusarium graminearum* [J]. New Phytologist, 2014, 203(1): 219-232.
  - [21] YUN Y, LIU Z, YIN Y, et al. Functional analysis of the *Fusarium graminearum* phosphatome [J]. New Phytologist, 2015, 207(1): 119-134.
  - [22] FINN R D, CLEMENTS J, EDDY S R. HMMER web server: interactive sequence similarity searching [J]. Nucleic Acids Research, 2011, 39(S2): 29-37.
  - [23] PETERSEN T N, BRUNAK S, VON HEIJNE G, et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions [J]. Nature Methods, 2011, 8(10): 785-786.
  - [24] KROGH A, LARSSON B È, VON HEIJNE G, et al. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes [J]. Journal of Molecular Biology, 2001, 305(3): 567-580.
  - [25] SCHWELM A, FOGELQVIST J, KNAUST A, et al. The *Plasmiodiophora brassicae* genome reveals insights in its life cycle and ancestry of chitin synthases [J]. Scientific Reports, 2015, 5: 11153.
  - [26] TRAPNELL C, WILLIAMS B A, PERTEA G, et al. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation [J]. Nature Biotechnology, 2010, 28(5): 511-515.
  - [27] KERK D, TEMPLETON G, MOORHEAD G B G. Evolutionary radiation pattern of novel protein phosphatases revealed by analysis of protein data from the completely sequenced genomes of humans, green algae, and higher plants [J]. Plant Physiology, 2008, 146(2): 351-367.
  - [28] SINGH A, GIRI J, KAPOOR S, et al. Protein phosphatase complement in rice: genome-wide identification and transcriptional analysis under abiotic stress conditions and reproductive development [J]. BMC Genomics, 2010, 11(1): 435.
  - [29] WEI K, PAN S. Maize protein phosphatase gene family: identification and molecular characterization [J]. BMC Genomics, 2014, 15(1): 773.
  - [30] PANDEY R, MOHMMED A, PIERROT C, et al. Genome wide *in silico* analysis of *Plasmodium falciparum* phosphatome [J]. BMC Genomics, 2014, 15(1): 1024.
  - [31] HAREL A, BERCOVICH S, YARDEN O. Calcineurin is required for sclerotial development and pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* in an oxalic acid-independent manner [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2006, 19(6): 682-693.
  - [32] GILBERT L A, RAVINDRAN S, TURETZKY J M, et al. *Toxoplasma gondii* targets a protein phosphatase 2C to the nuclei of infected host cells [J]. Eukaryotic Cell, 2007, 6(1): 73-83.
  - [33] CAMPBELL C O, SANTIAGO D N, GUIDA W C, et al. *In silico* characterization of an atypical MAPK phosphatase of *Plasmodium falciparum* as a suitable target for drug discovery [J]. Chemical Biology & Drug Design, 2014, 84(2): 158-168.
  - [34] CHEN T, BI K, ZHAO Y, et al. MAPKK inhibitor U0126 inhibits *Plasmiodiophora brassicae* development [J]. Phytopathology, 2018, 108(6): 711-720.

(责任编辑:陈海霞)