

唐 伟,张成玲,马居奎,等. 基于基因组预测和分析甘薯间座壳菌(*Diaporthe batatas*)分泌蛋白中效应因子[J].江苏农业学报, 2023, 39(3): 665-673.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2023.03.006

基于基因组预测和分析甘薯间座壳菌(*Diaporthe batatas*)分泌蛋白中效应因子

唐 伟¹, 张成玲¹, 马居奎¹, 杨冬静¹, 陈晶伟¹, 高方园¹, 谢逸萍¹, 王 芳², 孙厚俊¹

(1.江苏徐淮地区徐州农业科学研究所/农业农村部甘薯生物学与遗传育种重点实验室,江苏 徐州 221131; 2.宁波市农业科学研究院,浙江 宁波 315100)

摘要: 甘薯间座壳菌(*Diaporthe batatas*)是引起甘薯基腐病的病原菌之一,近年来在中国东南沿海发生较为普遍。由于效应因子在致病过程中发挥着重要作用,本研究采用 SignalP 5.0、GPI-SOM、WoLF PSORT、TMHMM-2.0 和 EffectorP 3.0 等生物信息学软件,对甘薯间座壳菌效应因子进行预测和分析。结果表明,从 *D. batatas* 全基因组编码的13 864个蛋白质中筛选到 359 个候选效应因子,其中 248 个为质外体效应因子,68 个为胞内效应因子,43 个既可能是质外体效应因子又可能是胞内效应因子。在信号肽分析中,所有候选效应因子信号肽长度为14~37 个氨基酸,在信号肽切割位点-3位到+2 位出现频率最高的氨基酸分别为丙氨酸、丝氨酸、丙氨酸、丙氨酸、脯氨酸。利用 HMMER、DIAMOND 和 eCAMI 3 个软件对 359 个候选效应因子进行碳水化合物活性酶(*CAZyme*)类分析,结果表明,有 89 个蛋白质属于 *CAZyme*,其中糖苷水解酶类最多。eggNOG-mapper 分析结果显示,在 359 个候选效应因子中有 227 个具有功能注释,主要涉及碳水化合物转运和代谢、翻译后修饰、蛋白质周转、分子伴侣等生理过程。通过 qRT-PCR 检测 9 个候选效应因子基因在 *D. batatas* 侵染过程中的相对表达水平,发现有 7 个候选效应因子基因在侵染过程中显著上调,有 2 个没有显著变化。这些结果的获得为明确甘薯间座壳菌效应因子的功能,分析甘薯基腐病发病机理,筛选寄主抗性基因及研发特异性靶向农药提供了参考。

关键词: 甘薯间座壳菌; 分泌蛋白; 效应因子; 基因功能分析; 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)

中图分类号: S531 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2023)03-0665-09

Genome-wide prediction and analysis of the effector protein of *Diaporthe batatas*

TANG Wei¹, ZHANG Cheng-ling¹, MA Ju-kui¹, YANG Dong-jing¹, CHEN Jing-wei¹, GAO Fang-yuan¹, XIE Yi-ping¹, WANG Fang², SUN Hou-jun¹

(1.Xuzhou Institute of Agricultural Sciences in Xuhuai Area/Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Sweetpotato of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Xuzhou 221131, China; 2.Ningbo Academy of Agricultural Sciences, Ningbo 315100, China)

Abstract: *Diaporthe batatas* is one of pathogens causing sweet potato foot rot disease, which is common in the south-east coastal areas of China in recent years. As the effectors played an important role in the pathogenesis, SignalP 5.0, GPI-

收稿日期:2022-05-06

基金项目:国家甘薯产业技术体系项目(CARS-10)

作者简介:唐 伟(1989-),男,山东泰安人,硕士,助理研究员,主要从事甘薯病虫害防治研究。(E-mail)tangv0001@ 163.com

通讯作者:孙厚俊, (E-mail)sunhoujun1980@ 163.com

SOM, WoLF PSORT, TMHMM-2.0, EffectorP 3.0 and other bioinformatic softwares were used to predict and analyze the effectors of *D. batatas*. The results showed that a total of 359 candidate effectors were screened from the 13 864 proteins in the whole genome of *D. batatas*. Among

these effectors, 248 effectors were apoplastic effectors, 68 effectors were cytoplasmic effectors and 43 effectors were dual-localized (apoplastic/cytoplasmic). The result of signal peptides analysis showed that the lengths of signal peptides were 14–37 amino acids, and the amino acids with the highest frequency at the position $-3+2$ of signal peptides cleavage site were alanine, serine, alanine, alanine, proline, respectively. The 89 candidate effectors were predicted and analyzed to be the carbohydrate-active enzyme (CAZyme) through the HMMER, DIAMOND and eCAMI softwares, and most of them belonged to glycoside hydrolase (GH). A total of 227 candidate effectors were functionally annotated among the 359 candidate effectors using eggNOG-mapper, mainly involving carbohydrate transport and metabolism, posttranslational modification, protein turnover, chaperones and other physiological and biochemical processes. The relative expression levels of nine effectors were tested by qRT-PCR. The results showed that seven of them significantly increased at different infection stages, while two of them showed no significant change. These results provide a reference for clarifying the function of the effector, analyzing the pathogenesis of sweet potato foot rot disease, screening new resistant gene and developing specific targeted pesticides.

Key words: *Diaporthe batatas*; secreted protein; effector; gene functional analysis; quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

甘薯间座壳菌 (*Diaporthe batatas*) 属于子囊壳菌纲 (Ascomycota) 间座壳目 (Diaporthales) 间座壳科 (Diaporthaceae), 其无性态为拟茎点霉属 (*Phomopsis*) 真菌^[1], 是近年来在中国东南沿海薯田新发甘薯基腐病的病原菌之一^[2-3], 也可导致甘薯干腐病、甘薯蔓枯病等^[4-5]。甘薯发病后茎基部产生褐色病斑, 然后逐渐扩展, 茎基部腐烂, 导致甘薯茎上部枯萎。甘薯基腐病于 1916 年在美国首次被发现^[6]。而中国于 1998 年在台湾地区首次报道发现该病^[7]。近年来, *D. batatas* 在中国东南沿海及日本、韩国均有报道^[2,8-9], 具有向内陆扩展的趋势, 严重影响中国东南沿海甘薯产业的发展。

不同的病原菌采用不同的方式侵染寄主植物, 但相同的是病原菌会将效应因子传递到寄主中, 通过抑制植物防御反应或改变植物生理机能从而完成病原菌对寄主侵染^[10]。从狭义上讲, 植物病原真菌中的效应因子是病原体分泌到寄主植物细胞外和细胞内的蛋白质^[11]; 从广义上讲则是改变宿主细胞结构和功能并能够促进病原体定殖的蛋白质与小分子^[12]。根据亚细胞定位, 真菌效应因子可分为两大类: 一类是在细胞外空间发挥作用的质外体效应子, 另一类是在宿主细胞内发挥作用的胞内效应子^[13]。

尽管由于病原菌的分化和寄主的选择性, 效应因子彼此之间不具有明显的序列相似性, 但研究发现效应因子可以通过经典的分泌途径即内质网-高尔基体-质膜途径侵入寄主。此类效应因子具有分泌蛋白的典型特征, 即, 具有 N-端信号肽; 不含糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 锚定位点; 亚细胞定位为分泌型; 不含有跨膜结构域^[14-16]。

随着越来越多真菌基因组测序的完成以及生物信息学的飞速发展^[17-18], 利用生物信息学从病原菌基因组中对其编码蛋白质进行分析预测, 筛选出其中的分泌蛋白以及效应因子成为寻找病原菌致病基因的一种快速有效的方法, 对研究真菌致病机制具有重要的指导意义。近年来, 多种病原真菌的效应因子已通过生物信息学的方法被预测分析, 如何艳秋等^[19]分析了尖孢镰刀菌古巴专化型 1 号小种 (Foc1) 基因组及蛋白质, 筛选到 988 个经典分泌蛋白及 378 个候选效应因子; 范春霞等^[20]利用甜瓜粉霉病病原菌粉红单端孢 (*Trichothecium roseum*) 基因组进行了效应因子的分析和预测, 筛选到 154 个候选效应因子。

甘薯间座壳菌作为甘薯新发病原, 其基因组测序已完成, 为预测效应因子提供了数据支撑^[21]。本研究拟利用 SignalP 5.0、GPI-SOM、WoLF PSORT、TM-HMM-2.0 和 EffectorP 3.0 等生物信息学软件, 对 *D. batatas* 分泌蛋白的效应因子进行预测和分析, 并通过 qRT-PCR 检测 9 个候选效应因子在病原菌侵染过程中的表达水平, 以期对甘薯间座壳菌侵染机制的研究和效应因子的功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 *D. batatas* 基因组编码的蛋白质数据

D. batatas 全基因组编码的蛋白质氨基酸序列从 GenBank 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/#!/proteins/104620/1662410%7C-Diaporthe%20batatas/Un/>) 下载获取, 共计 13 864 个蛋白质氨基酸序列。

1.2 *D. batatas* 经典分泌蛋白中效应因子的预测分析

1.2.1 甘薯间座壳菌全基因组蛋白质 N-端信号肽的预测 利用 SignalP 5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0>), 设置参数 Organism group, 选择 Eukarya) 对 *D. batatas* 中 13 864 个基因组蛋白质氨基酸序列进行 N-端信号肽预测^[22]。筛选得到具有 N-端信号肽的蛋白质进行下一步分析。

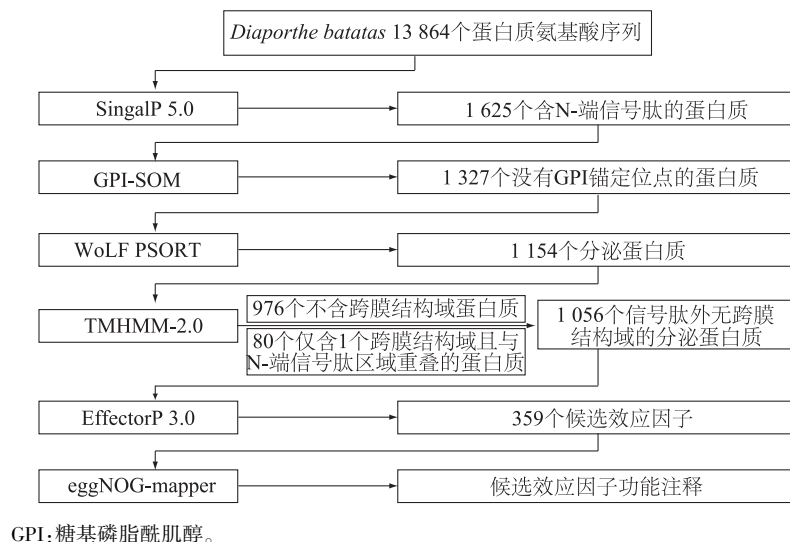
1.2.2 GPI 锚定位点 对筛选获得的含有信号肽的蛋白质, 利用 GPI-SOM (<http://gpi.unibe.ch/>) 进行 GPI 锚定位点的分析^[23], 筛除含有 GPI 锚定位点的蛋白质。

1.2.3 亚细胞定位分析 对含有 N-端信号肽, 不含 GPI 锚定位点的蛋白质通过 WoLF PSORT (<http://wolfpsort.hgc.jp/>), 设置参数 Organism type, 选择 Fungi) 进行亚细胞定位分析^[24], 筛选出分泌到胞外的蛋白质。

1.2.4 跨膜结构域预测 对上述筛选到的分泌到胞外的蛋白质利用 TMHMM-2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>) 进行分析^[25], 筛选出不含有跨膜结构域或仅有 1 个跨膜结构域且在信号肽序列中的蛋白质。

1.2.5 效应因子预测 对上述筛选出的分泌蛋白利用 EffectorP 3.0 (<http://effectorp.csiro.au/>) 进行分析, 预测出效应因子^[26]。利用 eggNOG-mapper (<http://eggnog-mapper.embl.de/>) 对筛选出的效应因子进行功能分析^[27]。

D. batatas 候选效应因子预测流程见图 1。



GPI:糖基磷脂酰肌醇。

图1 甘薯间座壳菌效应因子预测分析流程图

Fig.1 The workflow chart of prediction and analysis of the effectors of *Diaporthe batatas*

1.2.6 候选效应因子信号肽特征分析 通过 SignalP 5.0 确定候选效应因子信号肽位置, 统计信号肽长度以及信号肽切割位点氨基酸的出现频率。

1.2.7 候选效应因子碳水化合物活性酶类预测和功能注释 利用碳水化合物活性酶类自动注释服务器 dbCAN2 (<https://ccb.unl.edu/dbCAN2/>) 中的 HMMER、DIAMOND 和 eCAMI 3 个软件对筛选出的甘薯间座壳菌候选效应因子中的碳水化合物活性酶 (CAZymes) 类进行预测和功能注释^[28]。

1.3 *D. batatas* 候选效应因子的 qRT-PCR 分析

1.3.1 样品接种 将烟薯 25 的甘薯藤蔓去掉叶片, 用 75% 乙醇进行表面消毒, 用灭菌的刀片在茎

秆上, 切出长度约 1 cm 的条形伤口。将 *D. batatas* 的分生孢子悬液接种至伤口处, 置于 25 ℃ 8 h 光照 16 h 黑暗交替的光照培养箱中保湿培养。在接种 1 d 和 7 d 时分别在接种处进行取样, 样品迅速置于液氮中, 并置于 -80 ℃ 保存备用。

1.3.2 引物设计和 RNA 提取 选取 9 个候选效应因子, 依据其 mRNA 序列设计引物 (表 1)。利用多糖多酚 RNA 提取试剂盒, 提取菌丝和接种样品的 RNA, 置于 -80 ℃ 备用。

1.3.3 qRT-PCR 分析 将提取的 RNA 利用 TaKaRa 反转录试剂盒进行反转录, 反转录的产物全部稀释 5 倍后按照采用 ABclonal 2× Universal SYBR

Green Fast qPCR Mix 使用说明进行 qRT-PCR。反应体系为 2×Universal SYBR Green Fast qPCR Mix 7.5 μl、H₂O 5.9 μl、上下游引物各 0.3 μl、cDNA 1.0 μl,总计 15.0 μl。将反应体系置于荧光定量 PCR 仪中,反应程序为 95 ℃ 10 min;95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min,40 个循环。

表 1 本研究用于 qRT-PCR 的特异性引物
Table 1 Specific primers for qRT-PCR in this study

基因名称	蛋白质注释	引物序列(5'→3')	效应因子类型
<i>actin</i>	肌动蛋白	F:CATGAAGTGTGATGTCGATGTCC R:CAGACGGAGTACTTTTCGCTCG	
<i>Db8160770</i>	泛素 3 结合蛋白	F:GTACAATGCTGGGGACTGTC R:CTGGAAATAGGTGAATGTTGTGTC	质外体效应因子
<i>Db8162037</i>	果胶裂解酶	F:GAGGCTGACGAGAAAACCC R:GATGTTGTTGAAGGTGGACTTG	质外体效应因子
<i>Db8168842</i>	含 NPP1 结构域蛋白	F:CCCCTGATCGAGTACAAGAG R:GCCAAGTTGTTGTTGAAGTTG	质外体效应因子
<i>Db8159084</i>	糖基水解酶家族 11	F:CGACACGTACGACATCTACAAG R:GAGGATCTGGTAGTTATGCGAG	质外体效应因子
<i>Db8160366</i>	类过敏原 1	F:ACATACGATGGACAGGTTGG R:CAGTTTGTGTTTTGCCAGGTAG	胞内效应因子
<i>Db8163505</i>	假定蛋白	F:ACACCACCAACAACAACAGAAC R:CCCTTGAAATACAGATGCCG	胞内效应因子
<i>Db8168932</i>	醛酮还原酶家族	F:GACCGTCATCCCCAAGAG R:CAGATCAGAAAACAGCTTCACAC	胞内效应因子
<i>Db8165499</i>	多糖裂解酶家族 3 蛋白	F:GACTTCGGCAAGCTGTACC R:GGTGATGGTGGAGGAGTCG	质外体/胞内效应因子
<i>Db8168404</i>	类 NPC2 蛋白	F:CTCTCAGATATACCACCATAAATTCC R:TTTTCCGTCAATGCAGGTG	质外体/胞内效应因子

actin 为内参基因。

1.4 数据处理与分析

试验数据采用 2^{-ΔΔC_t}法计算基因的相对表达水平,利用 SPSS 25 进行显著性水平分析。

2 结果与分析

2.1 N-端信号肽分析

利用 SignalP 5.0 对 *D. batatas* 中 13 864 个基因组蛋白质序列进行 N-端信号肽预测,结果表明,有 1 625 个蛋白质序列含有 N-端信号肽序列,占有蛋白质序列的 11.72%。

2.2 GPI 锚定分析

采用 GPI-SOM 软件对含有 N-端信号肽的 1 625 个蛋白质序列进行分析,结果表明,有 298 个蛋白质序列含有 GPI 锚定位点,剩余 1 327 个蛋白质不含有 GPI 锚定位点。

2.3 亚细胞定位分析

采用 WoLF PSORT 对上述 1 327 个蛋白质序列进行亚细胞定位分析,结果表明,有 1 154 个蛋白质被预测分泌至胞外,其余 173 个蛋白质被预测定位

到质膜或其他细胞器中,其中 74 个蛋白质被转运到细胞质膜,28 个蛋白质被转运到过氧化物酶体,28 个蛋白质被转运到线粒体,24 个蛋白质被转运到细胞质,15 个蛋白质被转运到细胞核,4 个蛋白质被转运到内质网。

2.4 跨膜结构预测

对上述 1 154 个蛋白质序列通过 TMHMM-2.0 进行分析,结果发现有 976 个蛋白质不含有跨膜结构域,152 个蛋白质含有 1 个跨膜结构域,26 个蛋白质含有 2 个及以上的跨膜结构域。在 152 个仅含有 1 个跨膜结构域的蛋白质中,有 80 个蛋白质跨膜结构域与 N-端信号肽区域重叠,所以这些蛋白质跨膜结构域可能为前期所预测的信号肽区域。因此,1 056 个蛋白质(包含 976 个无跨膜结构域的蛋白质和 80 个跨膜结构域与 N-端信号肽区域重叠的蛋白质)具有典型分泌蛋白特征,可用于下一步效应因子的分析。

2.5 效应因子预测分析

采用 EffectorP 3.0 对 1 056 个具有典型分泌蛋白

特征的蛋白质序列进行分析,结果表明,有 359 个蛋白质被预测为效应因子,占分泌蛋白总数的 34.00%,其中 68 个蛋白质为胞内效应因子,占所有候选效应因子的 18.94%;248 个蛋白质为质外体效应因子,占所有候选效应因子的 69.08%;43 个蛋白质既可能是质外体效应因子也可能是胞内效应因子,占所有候选效应因子的 11.98%(图 2)。

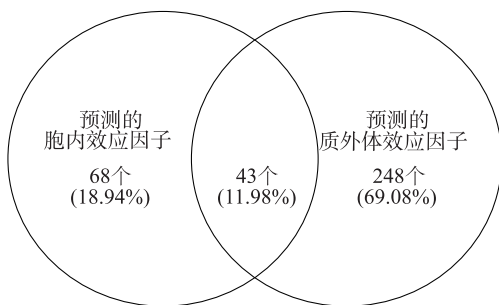


图 2 利用 EffectorP 3.0 预测甘薯间座壳菌效应因子

Fig.2 Effector prediction on secreted proteins of *D. batatas* by EffectorP 3.0

2.6 效应因子信号肽特征分析

对 359 个候选效应因子信号肽长度进行统计,结果表明,其信号肽长度最大为 37 个氨基酸,最小为 14 个氨基酸。信号肽长度主要集中在 16~22 个氨基酸的范围中,其中长度为 18 个氨基酸的信号肽最多(70 个),占候选效应因子总数的 19.50%;其次是长度为 19 个氨基酸的信号肽(68 个),占候选效应因子总数的 18.94%(图 3)。

对效应因子信号肽切割位点-3位到+2 位氨基酸种类进行统计分析,结果表明,在-3位,出现了丙氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、丝氨酸、苏氨酸、缬氨酸 8 种氨基酸,其中出现最多的是丙氨酸,占 54.32%;在-2位出现了除色氨酸外的所有氨基酸,其中出现最多的是丝氨酸,占 17.27%;在-1位出现了丙氨酸、精氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、组氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸 8 种氨基酸,其中出现最多的是丙氨酸,占 80.22%;在+1 位出现了除脯氨酸外的所有氨基酸,其中出现最多的是丙氨酸,占 24.51%;在+2 位所有氨基酸均有出现,其中出现最多的是脯氨酸,占 34.26%。由此可见-3位和-1位氨基酸相对保守,其中氨基酸组成为 AXA 型的占 43.73%,可被 SpaseI 型信号肽酶识别。

2.7 效应因子功能预测

经 eggNOG-mapper 分析,在 359 个候选效应因子

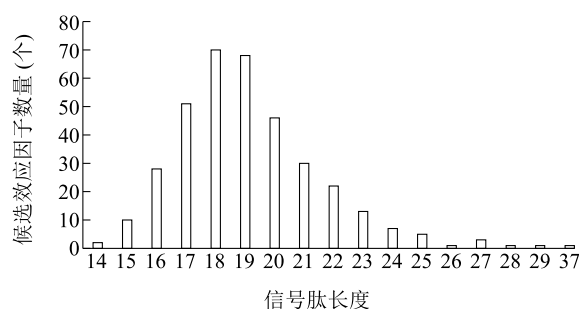
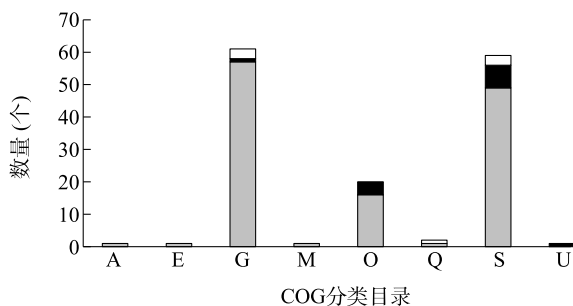


图 3 候选效应因子信号肽长度特征分析

Fig.3 Analysis on the length characteristics of signal peptides of candidate effectors

中有 227 个可以注释到具体功能,其中 146 个蛋白质在 COG 分类中分属于 A(RNA 加工和修饰)、E(氨基酸转运和代谢)、G(糖类转运和代谢)、M(细胞壁、质膜、包膜生物建成)、O(翻译后蛋白质修饰、蛋白质周转和伴侣蛋白)、Q(次生代谢物生物合成、运输和分解代谢)、S(功能未知)、U(胞内运输、分泌和囊泡运输) 8 类(图 4),其中 G 类最多,有 61 个蛋白质,包含 57 个质外体效应因子,1 个胞内效应因子和 3 个 2 类效应因子均可的效应因子;其次是 S 类,有 59 个蛋白质,包含 49 个质外体效应因子,7 个胞内效应因子和 3 个 2 类效应因子均可的效应因子;O 类有 20 个蛋白质,包含 16 个质外体效应因子,4 个胞内效应因子;其余类型蛋白质中 A 类、E 类、M 类均包含 1 个为质外体效应因子,Q 类包含 2 个蛋白质,分别是质外体效应因子和 2 类效应因子均可的效应因子,U 类仅有 1 个蛋白质,为胞内效应因子。



■ 质外体效应因子; ■ 胞内效应因子; □ 质外体/胞内效应因子

A:RNA 加工和修饰; E:氨基酸转运和代谢; G:糖类转运和代谢; M:细胞壁、质膜、包膜生物建成; O:翻译后蛋白质修饰、蛋白质周转和伴侣蛋白; Q:次生代谢物生物合成、运输和分解代谢; S:功能未知; U:胞内运输、分泌和囊泡运输。

图 4 候选效应因子功能 COG 分类目录

Fig.4 COG catalog of the candidate effectors of *D. batatas*

利用 HMMER、DIAMOND 和 eCAMI 3 个软件对

359 个候选效应因子进行注释,发现有 89 个蛋白质属于 *CAZyme* 类,分属于糖苷水解酶 (*GH*)、糖基转移酶 (*GT*)、多糖裂解酶 (*PL*)、碳水化合物酯酶 (*CE*)、辅助活性酶 (*AA*) 和碳水化合物结合模块 (*CBM*), 占有候选效应因子的 24.79%。其中 HMMER 预测到 85 个蛋白质, DIAMOND 预测到 39 个蛋白质, eCAMI 预测到 70 个蛋白质, 3 种软件均预测到的蛋白质有 32 个 (图 5)。在预测到的 *CAZyme* 类中 *GH* 有 36 个, 占 40.45%; *AA* 有 21 个, 占 23.60%; *CE* 有 14 个, 占 15.73%; *PL* 有 13 个, 占 14.61%; *GT* 有 1 个, 占 1.12%; *CBM* 有 4 个 (表 2), 占 4.49%。在预测到的 36 个 *GH* 中, 包含了 *GH7*、*GH11*、*GH16*、*GH18*、*GH28* 等家族, 可以归到 *GH-A*、*GH-B*、*GH-C*、*GH-F*、*GH-K*、*GH-N* 6 类 (表 2)。在不同类型酶类中, *AA* 类中 *AA9* 家族最多, 有 15 个, 其主要为裂解多糖或纤维素的单氧酶; *CE* 类中 *CE5* 家族最多, 有 5 个, 其主要是乙酰木聚糖酯酶或角质酶; *GH* 类中 *GH28* 家族最多, 有 10 个, 其存在平行的 β 螺旋结构, 具有多聚半乳糖醛酸酶、鼠李糖半乳糖醛酸水解酶等功能; *PL* 类中 *PL3-2* 家族最多, 有 9 个, 其功能主要为果胶/果胶酸裂解。

表 2 甘薯间座壳菌候选效应因子 *CAZyme* 中不同类型

Table 2 Different types of *CAZyme* in the candidate effectors of *D. batatas*

<i>CAZyme</i> 类分类	3D 结构分类	家族分类
<i>AA</i>		<i>AA8</i> (1)、 <i>AA9</i> (15)、 <i>AA11</i> (1)、 <i>AA13</i> (1)、 <i>AA16</i> (3)
<i>CE</i>		<i>CE1</i> (3)、 <i>CE3</i> (1)、 <i>CE4</i> (1)、 <i>CE5</i> (5)、 <i>CE8</i> (2)、 <i>CE16</i> (2)
<i>GH</i>	<i>A</i>	<i>GH5</i> (1)
	<i>B</i>	<i>GH7</i> (7)、 <i>GH16</i> (4)
	<i>C</i>	<i>GH11</i> (3)
	<i>F</i>	<i>GH43</i> (4)
	<i>K</i>	<i>GH18</i> (2)
	<i>N</i>	<i>GH28</i> (10)
	—	<i>GH45</i> (1)、 <i>GH64</i> (1)、 <i>GH114</i> (1)、 <i>GH134</i> (1)、 <i>GH135</i> (1)
<i>GT</i>		<i>GT15</i> (1)
<i>PL</i>		<i>PL1-2</i> (1)、 <i>PL1-7</i> (3)、 <i>PL3-2</i> (9)
<i>CBM</i>		<i>CBM1</i> (3)、 <i>CBM63</i> (1)

括号内为各家族候选效应因子数量。*AA*: 辅助活性酶; *CE*: 碳水化合物酯酶; *GH*: 糖苷水解酶; *GT*: 糖基转移酶; *PL*: 多糖裂解酶; *CBM*: 碳水化合物结合模块。

2.8 候选效应因子 qRT-PCR 分析

qRT-PCR 结果 (图 7) 显示, 甘薯间座壳菌侵染甘薯 1 d 时, 候选的质外体效应因子基因均上调表

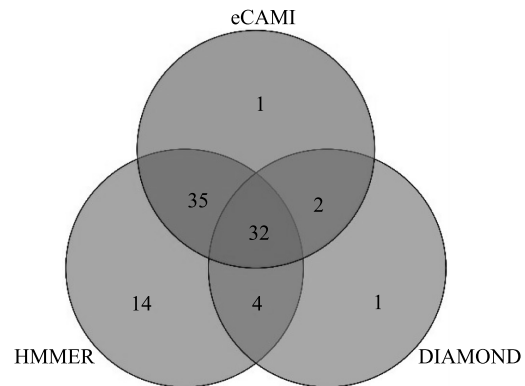
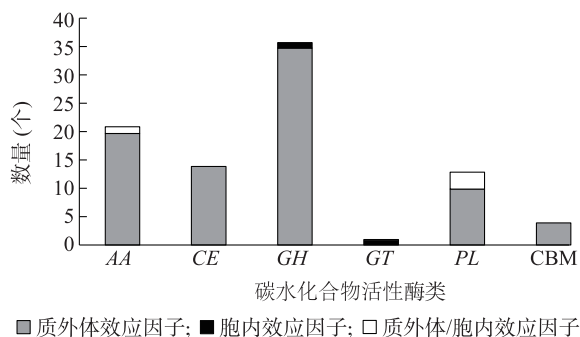


图 5 利用 HMMER、DIAMOND 和 eCAMI 分析甘薯间座壳菌候选效应因子中碳水化合物活性酶 (*CAZyme*)

Fig. 5 Analysis of carbohydrate-active enzyme (*CAZyme*) in candidate effectors of *D. batatas* by HMMER, DIAMOND and eCAMI

在预测到的 *CAZyme* 类中, *AA* 中有 20 个是质外体效应因子, 1 个既可能是质外体效应因子又可能是胞内效应因子; *CE* 和 *CBM* 中均为质外体效应因子; *GH* 中有 35 个是质外体效应因子, 1 个是胞内效应因子; *PL* 中有 10 个是质外体效应因子, 3 个既可能是质外体效应因子又可能是胞内效应因子; *GT* 中仅包含 1 个胞内效应因子 (图 6)。

达, 其中基因 *Db8159084* 表达水平最高, 是侵染 0 d 时的 1.9 倍, 除基因 *Db8160770* 外, 其他基因的表达量与侵染 0 d 相比均差异显著 ($P < 0.05$), 而侵染 7 d

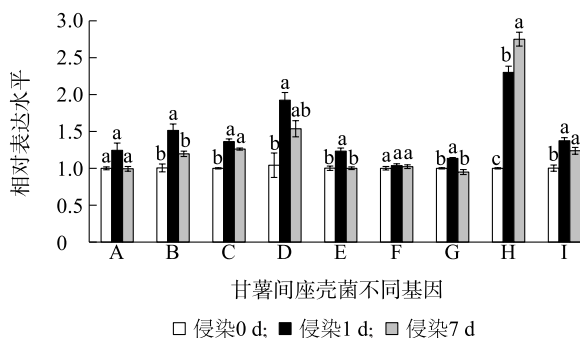


AA、CE、CH、GT、PL、CBM 见表2注。

图6 不同类型候选效应因子 CAZyme 类分析

Fig.6 Analysis of the types of CAZyme and candidate effectors

时这些候选质外体效应因子基因中,除基因 *Db8160770* 的表达量与侵染 0 d 时基本一致外,其余基因仍上调表达但表达量较侵染 1 d 时有所下降,且仅有基因 *Db8168842* 的表达量与侵染 0 d 时相比具有显著性差异。候选的胞内效应因子基因中,基因 *Db8163505* 在侵染 0 d、1 d、7 d 时的表达量无显著差异,基因 *Db8160366* 和 *Db8168932* 的表达量均是在侵染 1 d 时显著上调,侵染 7 d 时基因表达量较侵染 0 d 时差异不大。2 个既可能是质外体效应因子也可能是胞内效应因子的基因在侵染 1 d 时和 7 d 时均显著上调表达,侵染 7 d 时基因 *Db8165499* 的表达量显著高于侵染 1 d 时的表达量;而侵染 7 d 时基因 *Db8168404* 的表达量低于侵染 1 d 时的表达量。



A: *Db8160770*; B: *Db8162037*; C: *Db8168842*; D: *Db8159084*; E: *Db8160366*; F: *Db8163505*; G: *Db8168932*; H: *Db8165499*; I: *Db8168404*。不同小写字母表示同一基因不同侵染时期的表达量之间差异显著 ($P < 0.05$)。

图7 甘薯间座壳菌 9 个候选效应因子在侵染不同时期基因相对表达水平

Fig.7 Relative expression levels of nine candidate effectors genes of *D. batatas* at different infection stages

3 讨论

效应因子是植物病原真菌重要的毒力因子,在病原菌侵染寄主过程中发挥着重要作用,编码效应因子的基因称为 *Avr* 基因,寄主中与之对应的抗性基因称为 *R* 基因。对病原真菌效应因子的预测很大程度上依赖于生物信息学软件^[29]。近年来,病原菌侵染寄主的机制研究不断深入,随着病原真菌全基因组序列的不断测定,以及生物信息学软件、数据库的不断涌现和在线化发展^[30],使通过生物信息学研究病原菌并预测效应因子成为分析病原菌侵染机制较为便易的方法,在植物病原菌致病机制探索上进行了广泛应用,如董章勇等^[31]从茄子枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f.sp. *melongenae*) 16 485 个蛋白质序列中筛选到 29 个候选致病效应因子,Zhao 等^[32]分析了 17 976 个小麦叶锈病菌 (*Puccinia triticina*) 蛋白质,筛选到 904 个具有保守基序的效应因子并鉴定了 *PTTG_08198* 基因具有加速细胞凋亡进程并促进活性氧 (ROS) 积累的作用。

本研究从 13 864 个甘薯间座壳菌基因组蛋白质中预测到 359 个效应因子,占全基因组蛋白质的 2.59%,其中质外体效应因子最多,占预测到的候选效应因子的 69.08%。候选效应因子信号肽识别位点主要为 AXA,属于 SpaseI 型,这与范春霞等^[18]对甜瓜粉霉病菌 (*Trichothecium roseum*) 的研究结果以及连小雨等^[33]对向日葵柄锈菌 (*Puccinia helianthin* Schw) 的研究结果一致。

CAZyme 不仅参与真菌自身的生长代谢过程,其中部分酶类还直接参与病原真菌和寄主的互作,如 *GH*、*PL* 和 *CE* 等酶类是已知细胞壁降解酶,参与对细胞壁组分的降解过程^[34]。从 CAZyme 活性分析来看,有 89 个具有活性的候选效应因子,其中在 *AA* 和 *GH* 类型酶类中,最多的分别是 *AA9* 和 *GH28*,这 2 个家族的酶类与细胞壁降解过程相关^[35],并在侵染豆科植物的尖孢镰刀菌 (*F. oxysporum*)^[36]和侵染小麦的黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 中均上调表达^[37],一般而言,*GH28* 等果胶降解家族酶类表达上调可能在发病过程中发挥作用^[36],因此在甘薯间座壳菌中这 2 类酶也可能在侵染过程中具有重要作用。在效应因子类型上看,CAZyme 主要为质外体效应因子,这与部分质外体效应因子降解细胞壁功能作用部位相关,而胞内效应因子仅有 2 个,分别参与糖苷水解和

糖基转移。

本研究中预测获得的效应因子以假定蛋白质为主,这与范春霞等^[20]对甜瓜粉霉菌(*T. roseum*)效应因子的预测结果一致。通过 eggNOG-mapper 有功能注释的候选效应因子有 227 个,可按照 COG 分为 A、E、G、M、O、Q、S、U 8 类,以 G 类最多。质外体效应因子主要为 G 类和 S 类,胞内效应因子主要为 O 类和 S 类。在 S 类中部分候选效应因子被注释为与致死或毒素相关,如诱导坏死蛋白、蓖麻毒素-b 链凝集素、CRISP 家族蛋白质等,尽管这类蛋白质在甘薯间座壳菌侵染寄主过程中的功能并不清楚,但这为下一步挖掘甘薯间座壳菌致病基因并解析其功能提供了参考。

在侵染过程中,所测的大部分候选效应因子基因在侵染过程中上调表达,这与在其他病原菌如甜瓜粉霉菌^[20]、向日葵柄锈菌^[33]中预测的效应因子类似。在不同类型效应因子中,候选质外体效应因子和质外体/胞内效应因子在侵染过程中表达上调且表达水平较高,而胞内效应因子表达上调但表达水平较低。从时间上看,大部分基因在甘薯间座壳菌侵染 1 d 时表达上调水平较高,7 d 时有所下降,说明这些基因在侵染前期发挥重要的作用。Db8165499 基因表达量随时间的推移而升高,经 eggNOG-mapper 分析,Db8165499 被注释为多糖裂解酶家族 3 蛋白,经 CAZyme 分析该蛋白质是一种果胶酸裂解酶,可能在侵染过程降解甘薯细胞壁中发挥作用。qRT-PCR 结果表明,尽管大部分预测的效应因子在侵染过程中有显著上调,但仍有部分预测的效应因子在侵染过程中表达水平变化不大,一种可能是其在病原菌侵染的其他阶段发挥作用,另一种可能是其并非该病原菌的效应因子。

此外,尽管在研究中也发现通过囊泡或非囊泡运输等其他途径分泌的效应因子具有重要作用,如大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)中的 VdIsc1 蛋白和玉蜀黍黑粉菌(*Ustilago maydis*)中的 Cts1 蛋白均通过非常规分泌途径在侵染中发挥作用^[38-39]。然而由于此类效应因子的复杂性和生物信息技术的局限性,此类效应因子目前还未有合适的生物信息学软件进行预测分析,因此本研究仅预测分析了通过内质网-高尔基体-质膜经典分泌途径进行分泌的效应因子。本研究筛选出的候选效应因子,为下一步验证候选效应因子的作用,解析甘薯基腐病致病过

程,指导甘薯抗病育种和农药靶标研发等方面均奠定了基础。

参考文献:

- [1] GOMES R, GLIENKE C, VIDEIRA S, et al. Diaporthe: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi[J]. Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi, 2013, 31(1):1-41.
- [2] 黄立飞,刘伟明,刘也楠,等. 甘薯茎基部腐烂病调查及病原鉴定[J]. 中国农学通报, 2019,35(18):135-141.
- [3] 余继华. 一种重要的甘薯新病害——甘薯基腐病[J]. 植物检疫, 2018,32(6):57-60.
- [4] 谢响辉,王会福,应俊杰,等. 浙江甘薯蔓枯病原菌鉴定[J]. 植物病理学报, 2021,51(3):441-445.
- [5] 刘奕君,吴明琼,廖咏梅. 广西 3 种甘薯薯块真菌性病害的病原鉴定[J]. 广西植保, 2017,30(3):5-9.
- [6] HARTER L L. Foot rot a new disease of the sweet potato[J]. Phytopathology, 1913, 3:243-245.
- [7] 黄巧雯,庄明富,曾显雄,等. 由 *Phomopsis destruens* 引起之甘薯基腐病[J]. 植物病理学会刊, 2012(21):47-52.
- [8] MAEDA A, MINOSHIMA A, KAWANO S, et al. Foot rot disease of sweet potato in Japan caused by *Diaporthe destruens*: first report, pathogenicity and taxonomy[J]. Journal of General Plant Pathology, 2022, 88:33-40.
- [9] LEE Y J, MANNAA M, JEONG J J, et al. First report of dry rot of sweetpotato (*Ipomoea batatas*) caused by *Diaporthe batatas* in Korea[J]. Plant Disease, 2016, 100(8). DOI:10.1094/pdis-02-16-0249-pdn.
- [10] PRESTI L L, LANVER D, SCHWEIZER G, et al. Fungal effectors and plant susceptibility[J]. Annual Review of Plant Biology, 2015, 66(1):513-545.
- [11] TARIQJAVEED M, MATEEN A, WANG S, et al. Versatile effectors of phytopathogenic fungi target host immunity[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2021, 63(11):1856-1873.
- [12] HOGENHOUT S A, VAN DER HOORN R A, TERAUCHI R, et al. Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms[J]. Molecular Plant-microbe Interactions, 2009, 22(2):115-122.
- [13] GIRALDO M C, DAGDAS Y F, GUPTA Y K, et al. Two distinct secretion systems facilitate tissue invasion by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*[J]. Nature Communications, 2013, 4(1):1-12.
- [14] WIT P J G M D, RAHIM M, HARROLD A, et al. Fungal effector proteins: past, present and future[J]. Molecular Plant Pathology, 2009, 10(6):735-747.
- [15] MIN X J. Evaluation of computational methods for secreted protein prediction in different eukaryotes[J]. Journal of Proteomics & Bioinformatics, 2010, 3(5):143-147.
- [16] SPERSCHNEIDER J, WILLIAMS A H, HANE J K, et al. Evaluation of secretion prediction highlights differing approaches needed

- for oomycete and fungal effectors[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6. DOI:10.3389/fpls.2015.01168.
- [17] 刘爱平,吴 洁,王玉婷,等. 基于宏基因组测序的四川麸醋醋醅微生物组和风味形成相关基因分析[J]. *江苏农业学报*, 2022, 38(3):806-812.
- [18] 于淑婷,万 群,余向阳,等. 邻苯二甲酸酯降解真菌的筛选及其降解特性和土壤修复作用[J]. *江苏农业学报*, 2021, 37(3):660-666.
- [19] 何艳秋,颜 瑞,蒙 姑,等. 香蕉枯萎病菌1号小种分泌蛋白与效应子的预测与分析[J]. *植物病理学报*, 2020, 50(2):129-140.
- [20] 范春霞,王军节,赵鲁邁克,等. 甜瓜粉霉病菌效应蛋白编码基因的预测与分析[J]. *植物病理学报*, 2020, 50(5):549-560.
- [21] YANG Y L, YAO X, ZHANG X X, et al. Draft genome sequence of *Diaporthe batatas* causing dry rot disease in sweetpotato[J]. *Plant Disease*, 2022, 106(2):737-740.
- [22] ALMAGRO ARMENTEROS J J, TSIRIGOS K D, SØNDERBY C K, et al. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(4):420-423.
- [23] FANKHAUSER N, MÄSER P. Identification of GPI anchor attachment signals by a Kohonen self-organizing map[J]. *Bioinformatics*, 2005, 21(9):1846-1852.
- [24] HORTON P, PARK K J, OBAYASHI T, et al. WoLF PSORT: protein localization predictor[J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(S2):585-587.
- [25] KROGH A, LARSSON B, 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.
- [26] SPERSCHNEIDER J, DODDS P. EffectorP 3.0: prediction of apoplastic and cytoplasmic effectors in fungi and oomycetes[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2022, 35(2):146-156.
- [27] HUERTA-CEPAS J, FORSLUND K, COELHO L P, et al. Fast genome-wide functional annotation through orthology assignment by eggNOG-mapper[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2017, 34(8):2115-2122.
- [28] ZHANG H, YOHE T, HUANG L, et al. dbCAN2: a meta server for automated carbohydrate-active enzyme annotation[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(1). DOI:10.1093/nar/gky418.
- [29] SONAH H, DESHMUKH R K, BÉLANGER R R. Computational prediction of effector proteins in fungi: opportunities and challenges[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7. DOI:10.3389/fpls.2016.00126.
- [30] JONES D A B, BERTAZZONI S, TURO C J, et al. Bioinformatic prediction of plant-pathogenicity effector proteins of fungi[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2018, 46:43-49.
- [31] 董章勇,陈欣瑜,舒永馨,等. 茄子枯萎病菌致病效应因子的预测分析[J]. *西南农业学报*, 2019, 32(6):1285-1289.
- [32] ZHAO S, SHANG X, BI W, et al. Genome-wide identification of effector candidates with conserved motifs from the wheat leaf rust fungus *Puccinia tritricina*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01188.
- [33] 连小雨,王 妍,路 妍,等. 向日葵柄锈菌效应蛋白的预测及筛选[J]. *中国油料作物学报*, 2021, 43(6):1141-1149.
- [34] KUBICEK C P, STARR T L, GLASS N L. Plant cell wall-degrading enzymes and their secretion in plant-pathogenic fungi[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2014, 52:427-451.
- [35] SPROCKETT D D, PIONTKIVSKA H, BLACKWOOD C B. Evolutionary analysis of glycosyl hydrolase family 28 (GH28) suggests lineage-specific expansions in necrotrophic fungal pathogens[J]. *Gene*, 2011, 479(1):29-36.
- [36] ROY A, JAYAPRAKASH A, RAJESWARY T R, et al. Genome-wide annotation, comparison and functional genomics of carbohydrate-active enzymes in legumes infecting *Fusarium oxysporum* formae speciales[J]. *Mycology*, 2020, 11(1):56-70.
- [37] DALY P, VAN MUNSTER J M, BLYTHE M J, et al. Expression of *Aspergillus niger* CAZymes is determined by compositional changes in wheat straw generated by hydrothermal or ionic liquid pretreatments[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10. DOI:10.1186/s13068-017-0700-9.
- [38] LIU T, SONG T, ZHANG X, et al. Unconventionally secreted effectors of two filamentous pathogens target plant salicylate biosynthesis[J]. *Nature Communications*, 2014, 5(1):1-10.
- [39] TERFRÜCHTE M, REINDL M, JANKOWSKI S, et al. Applying unconventional secretion in *Ustilago maydis* for the export of functional nanobodies[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(5). DOI:10.3390/ijms18050937.

(责任编辑:陈海霞)