

陈晶伟, 马居奎, 高方园, 等. 甘薯茎线虫基因组分泌蛋白中效应因子的预测和分析[J]. 江苏农业学报, 2026, 42(5): 909-918.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2026.05.005

甘薯茎线虫基因组分泌蛋白中效应因子的预测和分析

陈晶伟^{1,2}, 马居奎^{1,2}, 高方园¹, 唐伟^{1,2}, 杨冬静¹, 张成玲¹, 梁昭¹, 韩永华², 孙厚俊^{1,2}

(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. 江苏师范大学生命科学学院, 江苏 徐州 221131)

摘要: 甘薯茎线虫(*Ditylenchus destructor*)是甘薯生产中的一种重要的迁移性内寄生病原线虫, 效应因子在其侵染过程中发挥着重要作用。本研究基于甘薯茎线虫全基因组信息, 综合应用 SignalP 5.0、Deep TMHMM 和 WoLF PSORT 等生物信息学工具, 对该线虫分泌的效应因子进行预测与分析。结果表明, 从甘薯茎线虫全基因组 21 283 个蛋白质氨基酸序列中共筛选到 1 788 个胞外分泌蛋白, 利用 EggNOG-mapper 进行分析, 有 371 个分泌蛋白可以注释到具体功能。对分泌蛋白进行碳水化合物活性酶类(CAZymes)分析, 结果发现 40 个蛋白质属于 CAZymes, 其中有 13 个糖苷水解酶, 17 个多糖裂解酶, 合计占比达 75.0%。最终, 通过对上述蛋白质的半胱氨酸数量和多个串联重复序列等进行分析, 共获得 32 个候选效应因子, 其中 19 个为假定蛋白, 其余为 c 型凝集素结构域蛋白、含锌指双结构域蛋白和果聚糖蔗糖酶等。利用实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(qRT-PCR)随机挑选 10 个潜在效应蛋白编码基因, 检测其在甘薯茎线虫侵染过程中的表达模式, 其中 8 个基因的相对表达量总体上调。本研究结果为揭示甘薯茎线虫的致病分子机制提供了重要线索, 同时为后续寄主抗性基因的筛选以及针对性防治药剂的开发提供了理论依据。

关键词: 甘薯茎线虫; 分泌蛋白; 效应因子; 基因功能分析

中图分类号: S435.31; S531 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2026)05-0909-10

Prediction and analysis of effectors in secreted proteins of the *Ditylenchus destructor* genome

CHEN Jingwei^{1,2}, MA Jukui^{1,2}, GAO Fangyuan¹, TANG Wei^{1,2}, YANG Dongjing¹, ZHANG Chengling¹, LIANG Zhao¹, HAN Yonghua², SUN Houjun^{1,2}

(1. Xuzhou Institute of Agricultural Sciences of the Xuhuai District of Jiangsu Province/Key Laboratory of Sweetpotato Biology and Genetic Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Xuzhou 221131, China; 2. School of Life Sciences, Jiangsu Normal University, Xuzhou 221131, China)

Abstract: *Ditylenchus destructor* is an important migratory endoparasitic nematode in sweet potato production, and effectors play a crucial role in its infection process. Based on the whole-genome information of *Ditylenchus destructor*, this

study integrated bioinformatics tools such as SignalP 5.0, Deep TMHMM, and WoLF PSORT to predict and analyze effectors in the secreted proteins of this nematode. The results showed that from a total of 21 283 protein amino acid sequences in the *Ditylenchus destructor* genome, 1 788 secreted proteins were screened. Using EggNOG-mapper for functional annotation, 371 secreted proteins were assigned to specific functions. Carbohydrate-active enzyme

收稿日期: 2025-04-23

基金项目: 国家重点研发计划专项资助项目(2024YFD1401200、2024YFD1401205-04); 国家现代农业产业技术体系项目(CARS-10); 徐州市重点研发计划(现代农业)项目(KC22087)

作者简介: 陈晶伟(1993-), 男, 陕西汉中, 硕士, 助理研究员, 研究方向为植物病原线虫学。(E-mail) ibcjw0825@126.com

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

(CAZymes) analysis of the secreted proteins identified 40 proteins belonging to CAZymes, including 13 glycoside hydrolases and 17 polysaccharide lyases, accounting for 75.0% of the CAZymes. Finally, through analysis of cysteine number and multiple tandem repeat sequences in the above proteins, a total of 32 candidate effectors were obtained, of which 19 were hypothetical proteins, and the remaining included c-type lectin domain proteins, zinc finger double domain proteins, and levansucrase. Using quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR), ten potential effector genes were randomly selected to examine their expression patterns during *Ditylenchus destructor* infection, and eight of them showed upregulated relative expression levels. The results of this study provide important clues for revealing the molecular mechanisms of *Ditylenchus destructor* pathogenicity and offer a theoretical basis for the subsequent screening of host resistance genes and the development of targeted control agents.

Key words: *Ditylenchus destructor*; secreted protein; effector; gene function analysis

甘薯茎线虫(*Ditylenchus destructor*)侵染甘薯后可导致薯块出现糠心和糠皮的状况,严重影响甘薯的产量和商品性^[1]。甘薯茎线虫食性广泛,可取食植物与土壤中的真菌,在农事操作中容易被传播扩散^[2]。目前甘薯茎线虫的防治主要依靠化学农药,但由于其抗药性强,所以农药的用药量较大,导致环境污染问题日益突出。

深入研究甘薯茎线虫的致病机制将为线虫防控新策略的突破提供理论依据。不同的病原线虫以多样化的侵染策略寄生于宿主,但在侵染过程中线虫都会分泌效应因子,通过抑制植物防御反应或改变植物生理机能从而完成寄生过程^[3-4]。效应因子或效应蛋白广义上是指能够特异性地与靶标蛋白结合,进而改变宿主细胞结构和功能的一类小分子蛋白质^[5-6]。虽然病原微生物的效应因子彼此间没有显著的序列相似性,但有研究发现它们均可通过经典的分泌途径分泌,即通过内质网-高尔基体-质膜侵入寄主^[7-9]。

随着基因组学和生物信息学的快速发展,近年来多种病原线虫、真菌和卵菌的效应因子已通过生物信息学预测的方法被预测分析,如罗梅等^[8]在球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)基因组蛋白质中筛选到 940 个分泌蛋白以及 18 个潜在效应因子。韩长志^[9]从樟疫霉(*Phytophthora cinnamomi*)的全基因组序列中预测到 3 439 个分泌蛋白,明确樟疫霉中存在 160 个潜在效应因子。扈丽丽等^[10]通过对最短尾短体线虫(*Pratylenchus brachyurus*)进行转录组测序分析,获得了 72 516 个非冗余基因,并进一步筛选出 1 641 个经典分泌途径的蛋白质,其中包含 51 个与植物寄生线虫具有同源性的效应因子。

分泌蛋白作为关键致病因子已被证实在线虫侵染过程中具有重要作用,然而针对甘薯茎线虫分泌

蛋白的研究较少。目前,在美国国家生物技术信息中心(NCBI)数据库中已公布 4 个可参考基因组,为预测效应因子提供了数据支撑。本研究拟利用 SignalP 5.0、PredGPI、WoLF PSORT、Deep TMHMM 等生物信息学软件,对甘薯茎线虫分泌蛋白中潜在效应因子进行预测和分析,以期为进一步研究甘薯茎线虫侵染机制和效应因子功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 甘薯茎线虫基因组编码蛋白质数据

从 GenBank 数据库(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/43946_genome_assembly_id=1819949)下载获取甘薯茎线虫全基因组编码蛋白质氨基酸序列,共计 21 283 个蛋白质氨基酸序列。

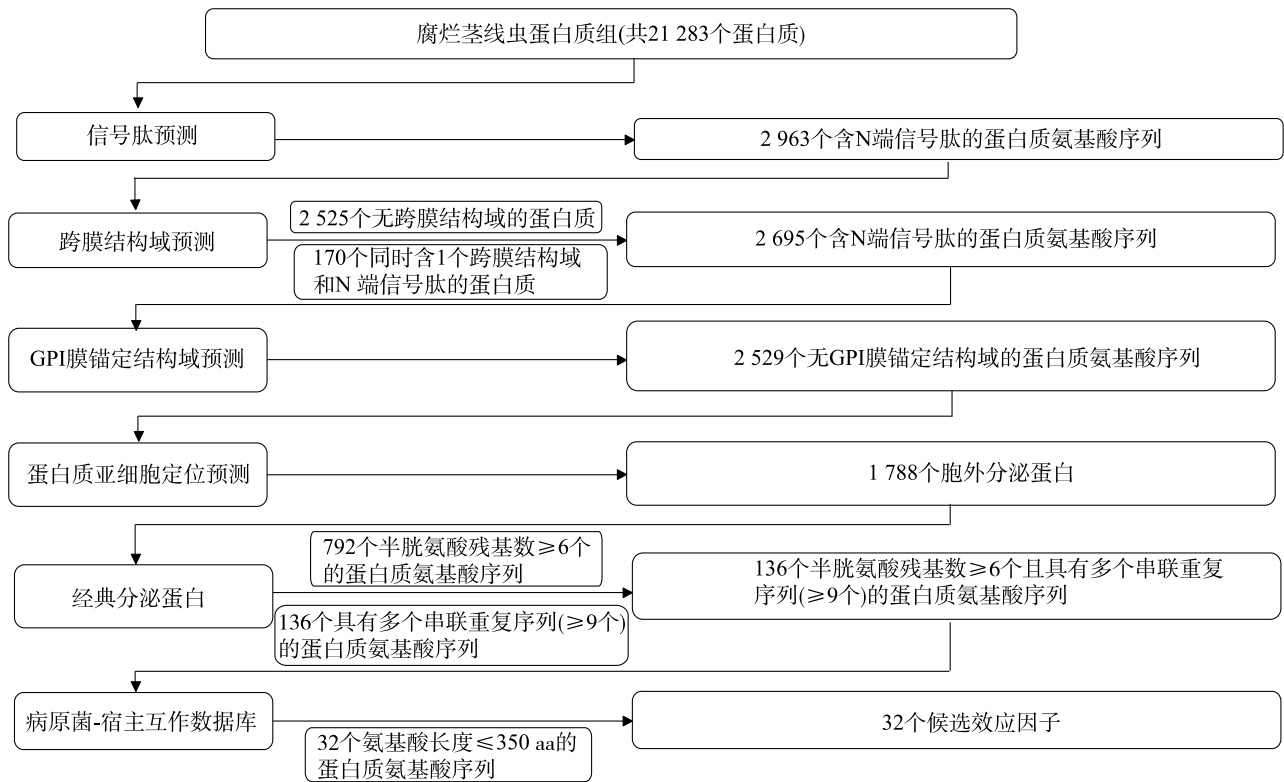
1.2 甘薯茎线虫分泌蛋白中效应因子的预测与分析

甘薯茎线虫候选效应因子预测流程见图 1。

1.2.1 N 端信号肽与跨膜结构预测 本研究利用 SignalP 5.0(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php/SignalP-5.0>)对甘薯茎线虫中 21 283 个基因组蛋白质氨基酸序列进行 N 端信号肽预测^[11]。通过 Deep TMHMM(<https://dtu.biolib.com/DeepTMHMM>)对具有 N 端信号肽的蛋白质氨基酸序列进行分析^[12],筛选出不含跨膜结构域或仅有 1 个跨膜结构域且在信号肽序列中的蛋白质氨基酸序列。

1.2.2 糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚定位点分析 利用 PredGPI(<http://gpcr2.biocomp.unibo.it/predgpi/>)对上述蛋白质氨基酸序列进行 GPI 锚定位点的分析^[13],剔除含有 GPI 锚定位点的蛋白质。

1.2.3 亚细胞定位分析及分泌组蛋白质分析 对含有 N 端信号肽并且不含有 GPI 锚定位点的蛋白质氨基酸序列通过 WoLF PSORT(<https://wolfsort.hgc.jp/>)进行亚细胞定位分析^[14],筛选定位在胞外



GPI:糖基磷脂酰肌醇。

图1 甘薯茎线虫效应因子预测流程图

Fig.1 Flowchart of effector prediction in *Ditylenchus destructor*

的蛋白质。统计分析胞外蛋白质氨基酸序列的长度。利用 EggNOG-mapper (<http://eggnog-mapper.embl.de/>)对胞外分泌蛋白质进行功能分析^[15]。利用碳水化合物活性酶类自动注释服务器 dbCAN2 (<https://ccb.unl.edu/dbCAN2/>)对筛选到的甘薯茎线虫胞外分泌蛋白质的碳水化合物活性酶类(CAZymes)进行功能注释^[16]。

1.2.4 分泌组蛋白质半胱氨酸含量及多个串联重复序列分析 利用 Perl 工具计算上述胞外分泌蛋白的半胱氨酸含量,筛选出半胱氨酸残基数 ≥ 6 的蛋白质氨基酸序列,并对其进一步开展串联重复序列分析。采用 T-Reks 工具(<http://bioinfo.montp.cnrs.fr/r=t-reks/>)进行串联重复序列的预测^[17]。

1.2.5 病原菌-宿主互作数据库分析及候选效应子确定 将 1.2.4 分析获得的蛋白质氨基酸序列与病原菌-宿主互作数据库(PHI)进行比对,筛选出可能具有致病能力的候选蛋白质氨基酸序列^[18],随后对这些序列进行长度过滤,剔除长度超过 350 aa 的蛋白质氨基酸序列。

1.3 甘薯茎线虫候选效应因子实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(qRT-PCR)分析

1.3.1 病原线虫接种和分离 利用浅盘法^[19]分离本实验室在烟薯 25 号薯块中纯化繁殖的腐烂茎线虫不少于 100 000 头,将线虫放置于无菌水中饥饿处理 7 d,隔天更换一次无菌水。7 d 后取 10 000 头线虫置于液氮中,存放于 -80°C 条件下作为对照。然后,分别将 10 000 头线虫放入打好孔的 9 块烟薯 25 号薯块中,用石蜡将孔封住后把接种线虫的薯块置于 28°C 恒温培养箱中保存。在接种后的第 1 d 和第 3 d,将薯块切碎利用浅盘法分离线虫,获得的线虫迅速置于液氮中,然后存放于 -80°C 条件下备用。

1.3.2 引物设计与 RNA 提取 随机选取 10 个候选效应因子,设计 qRT-PCR 的特异性引物(表 1)。所有引物经验证,熔解曲线分析结果表明,引物具有良好的扩增特异性。利用 RNA 提取试剂盒 FreeZol Reagent(Vazyme 公司产品),提取线虫的 RNA,置于 -80°C 条件下备用。

表 1 本研究用于实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应 (qRT-PCR) 的特异性引物

Table 1 Specific primers used for quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) in this study

基因名称	基因编码的蛋白质	引物序列 (5'→3')
<i>Actin</i>	肌动蛋白	F:AGGAACTTGTACGCCAACACC R:ACATTTTGCTGGAAAGGTGGAG
<i>DdX_03382</i>	神经丝介质多肽	F:TCGCGTTCACGTGTTGTAGA R:TGGCTCTTCAGTGGTGGATG
<i>DdX_19123</i>	假定蛋白	F:AGTCAATGCTTCACTCCGGC R:GTGGCATTCCCTGCATACCT
<i>DdX_04528</i>	假定蛋白	F:GGTCTAGCTTCACAAGCACCT R:CCTCAGATGGCAGGGACAAG
<i>DdX_15941</i>	含半胱氨酸分泌蛋白家族结构域蛋白	F:ACGGACACGACCAACTCTTC R:TCGTCACAGACCAACTGCAT
<i>DdX_16961</i>	含钙稳态结构域蛋白的 soce 相关调节因子	F:GGCGTTATTTCTTTGGCGG R:CCGGATGAACTGCTTCCACT
<i>DdX_04848</i>	假定蛋白	F:CGGACAAGTTCCTCATCGT R:CACTGTCAGCTCTTGGACT
<i>DdX_11150</i>	c 型凝集素结构域蛋白	F:TGTGTGTGAGGACGAAACGA R:GGATGCGGAAGGAGTAGTGG
<i>DdX_10276</i>	假定蛋白	F:CITATGGAACGCAGCAACCG R:CGCAATCGACTTTGTGCTGA
<i>DdX_11810</i>	假定蛋白	F:CTGGCCCCACTACTACACCT R:GGCACAACCTCTGGAAACCG
<i>DdX_17481</i>	c 型凝集素结构域蛋白	F:GTTTCGAGCCGGGAACATCT R:GCTCCAGTCTCCGTTCACAT

1.3.3 qRT-PCR 分析 采用反转录试剂盒 (TaKaRa 公司产品) 对 RNA 进行反转录, 按照 ABclonal 2×Universal SYBR Green Fast qPCR Mix 的使用说明进行 qRT-PCR 分析。反应体系为 15.0 μL, 其中 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。反应程序为 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 40 个循环。

2 结果与分析

2.1 N 端信号肽分析

利用 SignalP 5.0 对甘薯茎线虫中 21 283 个基因组蛋白质氨基酸序列进行 N 端信号肽预测。结果表明, 有 2 963 个蛋白质氨基酸序列含有 N 端信号肽序列, 占有蛋白质氨基酸序列的 13.92%。

2.2 跨膜结构预测

通过 Deep TMHMM 分析上述 2 963 个蛋白质跨膜结构, 发现 2 525 个蛋白质不含有跨膜结构

, 286 个蛋白质含有 1 个跨膜结构域, 152 个蛋白质含有 2 个及以上的跨膜结构域。在 286 个仅包含 1 个跨膜结构域的蛋白质中, 有 170 个蛋白质的跨膜结构域与 N 端信号肽区域存在重叠。因此, 包含 2 525 个无跨膜结构域的蛋白质和 170 个跨膜结构域与 N 端信号肽区域重叠的蛋白质, 共 2 695 个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。

2.3 GPI 锚定位点分析

利用 PredGPI 对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 2 695 个蛋白质氨基酸序列进行分析, 结果发现有 166 个蛋白质氨基酸序列含有 GPI 锚定位点, 剩余 2 529 个蛋白质不含有 GPI 锚定位点。

2.4 亚细胞定位

通过 WoLF PSORT 对上述 2 529 个蛋白质氨基酸序列进行亚细胞定位分析, 结果发现有 1 788 个蛋白质被预测分泌至胞外, 其余 741 个蛋白质被

预测定位到质膜、过氧化物酶体、细胞核等其他细胞器中。

2.5 分泌组分析

对1 788个预测定位于胞外的蛋白质进行了氨基酸残基序列特征分析。结果发现氨基酸长度小于300 aa 的序列占比最大,共有1 394条,占比为78.0%;长度在300~599 aa 的序列占比次之,共有303条,占比16.9%;长度超过2 000 aa 的序列占比最低,仅有3条,占比0.2%。

经 EggNOG-mapper 分析,在1 788个分泌蛋白中有371个可以注释到具体功能,其中有316个蛋白质在同源蛋白簇(COG)分类中分属于17个类别,其中S类(功能未知)有114个,O类(翻译后蛋白质修饰、蛋白质周转和伴侣蛋白)有65个,G类(碳水化合物转运与代谢)有42个,T类(信号转导机制)有30个,I类(脂肪转运代谢)有9个,P类(无机离子转运代谢)有8个,W类(胞外结构)有8个,E类(氨基酸转运代谢)有7个,U类(胞内转运、分泌和小泡运输)有6个,C类(能量生成和转换)有5个,Q类(次级代谢物生物合成、转运和代谢)有5个,L类(复制、重组和修复)有4个,M类(细胞壁、细胞膜、被膜的生物合成)有4个,D类(细胞周期控制、细胞分裂和染色体分裂)有3个,F类(核苷酸转运和代谢)有3个,Z类(细胞骨架)有2个,H类(辅酶转运和代谢)有1个。

利用碳水化合物活性酶类自动注释服务器 dbCAN2 中的 HMMER、DIAMOND 和 eCAMI 3 个软件对1 788个分泌蛋白进行功能注释,结果表明,有40个蛋白质属于碳水化合物活性酶类(CAZymes),包括糖苷水解酶、糖基转移酶、多糖裂解酶、碳水化合物酯酶,占有分泌蛋白的2.24%。其中用HMMER预测到34个蛋白质,用DIAMOND预测到17个蛋白质,用eCAMI预测到37个蛋白质,3个软件均预测到的蛋白质有13个(图2)。

在预测到的CAZymes中多糖裂解酶有17个,占42.5%,糖苷水解酶有13个,占32.5%,糖基转移酶有9个,占22.5%,碳水化合物酯酶有1个,占2.5%(表2)。在预测到的13个糖苷水解酶中,包含了糖苷水解酶5、糖苷水解酶30、糖苷水解酶18、糖苷水解酶29、糖苷水解酶37、糖苷水解酶31等家族,可以归到A、D、G、K、R5类(表2)。在多糖裂解酶中,多糖裂解酶3家族酶有17个,

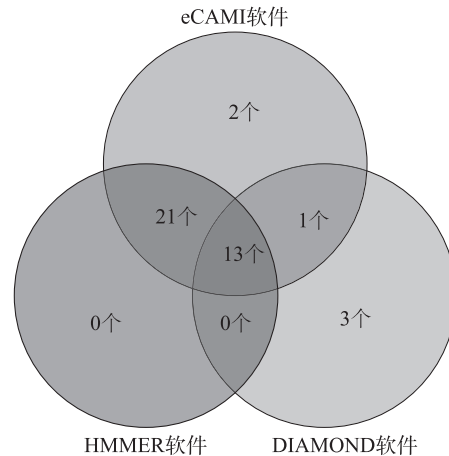


图2 基于HMMER、DIAMOND和eCAMI软件的甘薯茎线虫分泌蛋白中碳水化合物活性酶类(CAZymes)分析结果

Fig.2 Analysis results of carbohydrate-active enzymes (CAZymes) in secreted proteins of *Ditylenchus destructor* based on HMMER, DIAMOND, and eCAMI

主要是果胶裂解酶。糖苷水解酶主要包括涉及植物或真菌细胞壁降解的纤维素降解酶类和几丁质降解酶等。在糖基转移酶中,糖基转移酶1家族酶的数量最多,有3个,主要为尿苷二磷酸(UDP)-葡萄糖醛酸基转移酶。在碳水化合物酯酶中,仅有1个酶属于碳水化合物酯酶2家族,主要涉及纤维素结合域家族II。

2.6 半胱氨酸含量及多个串联重复序列分析

对1 788个定位在胞外的蛋白质氨基酸序列的半胱氨酸含量进行分析,由图3可知,具有高含量半胱氨酸(半胱氨酸残基数量 ≥ 6 个)的序列共792个。然后,采用T-Reks工具对得到的序列进行分析,共获取具有多个串联重复序列(≥ 9 个)的蛋白质136个。

2.7 病原菌-宿主互作数据库分析

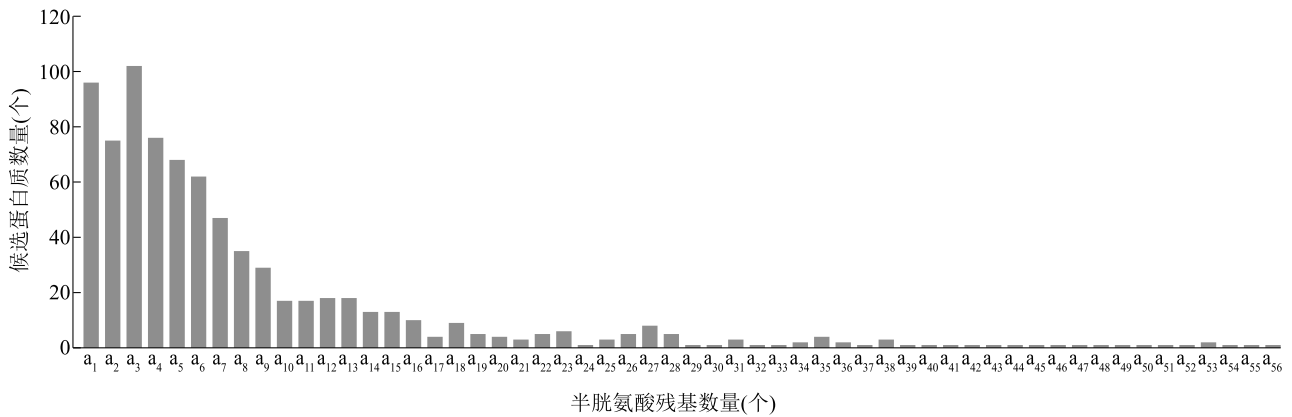
将136个蛋白质氨基酸序列与PHI数据库中的数据进行了比对,有133个蛋白质获得了功能注释。比对结果(表3)表明,9个蛋白质为无毒效应因子,6个蛋白质属于失去致病力的类型,55个蛋白质表现为毒力减弱,43个蛋白质不影响病原菌致病力,另有6个蛋白质与毒力增强相关。综上,共筛选出80个具有候选效应因子潜力的基因,其中包括9个无毒效应因子基因、6个导致致病力缺失的基因、55个毒力减弱相关基因以及10个混合型功能基因。

表 2 甘薯茎线虫分泌蛋白中碳水化合物活性酶类 (CAZymes) 的类型

Table 2 Types of carbohydrate-active enzymes (CAZymes) in secreted proteins of *Ditylenchus destructor*

酶类别	相关家族族系	家族名称
糖苷水解酶	A	糖苷水解酶 5(1)、糖苷水解酶 30(2)
	D	糖苷水解酶 31(1)
	G	糖苷水解酶 37(1)
	K	糖苷水解酶 18(3)
	R	糖苷水解酶 29(1)
	-	糖苷水解酶 152(1)、糖苷水解酶 19(1)、糖苷水解酶 25(2)
糖基转移酶		糖基转移酶 1(3)、糖基转移酶 14(1)、糖基转移酶 27(1)、糖基转移酶 49(1)、糖基转移酶 61(2)、糖基转移酶 31(1)
多糖裂解酶		多糖裂解酶 3(17)
碳水化合物酯酶		碳水化合物酯酶 2(1)

括号中的数值表示不同家族的酶数量。-表示未被纳入 A、D、G、K、R 族系。



a₁:6;a₂:7;a₃:8;a₄:9;a₅:10;a₆:11;a₇:12;a₈:13;a₉:14;a₁₀:15;a₁₁:16;a₁₂:17;a₁₃:18;a₁₄:19;a₁₅:20;a₁₆:21;a₁₇:22;a₁₈:23;a₁₉:24;a₂₀:25;a₂₁:26;a₂₂:27;a₂₃:28;a₂₄:29;a₂₅:30;a₂₆:31;a₂₇:32;a₂₈:33;a₂₉:34;a₃₀:35;a₃₁:36;a₃₂:37;a₃₃:38;a₃₄:40;a₃₅:41;a₃₆:43;a₃₇:44;a₃₈:45;a₃₉:49;a₄₀:50;a₄₁:51;a₄₂:52;a₄₃:55;a₄₄:61;a₄₅:72;a₄₆:74;a₄₇:75;a₄₈:76;a₄₉:84;a₅₀:85;a₅₁:97;a₅₂:98;a₅₃:100;a₅₄:148;a₅₅:175;a₅₆:185。

图 3 792 个甘薯茎线虫分泌蛋白的半胱氨酸残基数

Fig.3 Number of cysteine residues in 792 secreted proteins of *Ditylenchus destructor*

表 3 基于病原菌-宿主互作数据库的 133 个甘薯茎线虫蛋白质的分类

Table 3 Classification of 133 *Ditylenchus destructor* proteins based on the pathogen-host interaction database

编号	基因缺失后的表型	蛋白质数量 (个)	占比 (%)
1	无毒	9	6.8
2	致死	1	0.8
3	失去致病力	6	4.5
4	毒力减弱	55	41.4
5	混合型	13(10*)	9.8
6	不影响病原菌致病力	43	32.3
7	毒力增强	6	4.5

*表示混合型蛋白质中属于候选效应因子的蛋白质数量。

2.8 候选效应因子的确定

剔除上述 80 个蛋白质中长度超过 350 aa 的蛋白质氨基酸序列后,最终获得 32 个潜在致病效应因子(表 4),其中 19 个为假定蛋白,其余为含锌指双结构域蛋白、c 型凝集素结构域蛋白、果聚糖蔗糖酶和富含半胱氨酸分泌蛋白家族结构域蛋白等。

2.9 候选效应因子的 qRT-PCR 分析

qRT-PCR 分析结果(图 4)表明,在腐烂茎线虫感染甘薯的过程中,随机筛选 10 个腐烂茎线虫候选效应因子基因,以未感染甘薯(感染 0 d)的腐烂茎线虫为对照,感染 3 d 时,除了 *DdX_19123* 和 *DdX_15941* 的相对表达量下降外,其他基因的相对

表 4 甘薯茎线虫候选效应因子

Table 4 Candidate effectors of *Ditylenchus destructor*

基因名称	氨基酸长度(aa)	半胱氨酸数量(个)	蛋白质氨基酸序列注释	匹配的基因	匹配的病原菌	基因功能
<i>DdX_19123</i>	136	8	假定蛋白	<i>CnaI</i>	新型隐球菌	毒力减弱
<i>DdX_17848</i>	138	7	假定蛋白	<i>AiiA</i>	颖壳伯克氏菌	毒力减弱
<i>DdX_12960</i>	148	18	假定蛋白	<i>MlaI</i>	新型隐球菌	毒力减弱
<i>DdX_00702</i>	152	9	假定蛋白	<i>Kgp</i>	牙龈卟啉单胞菌	毒力减弱
<i>DdX_12807</i>	175	7	含锌指双结构域蛋白	<i>ZafA</i>	烟曲霉菌	失去致病力
<i>DdX_17481</i>	192	6	c 型凝集素结构域蛋白	<i>BcBOA6</i>	灰霉病菌	毒力减弱
<i>DdX_08491</i>	193	17	假定蛋白	<i>MoPEX7</i>	稻瘟病菌	失去致病力
<i>DdX_11810</i>	201	8	假定蛋白	<i>KexB</i>	烟曲霉菌	毒力减弱
<i>DdX_16702</i>	202	6	假定蛋白	<i>VabF</i>	鳗弧菌	毒力减弱
<i>DdX_08311</i>	208	10	假定蛋白	<i>Zcf15</i>	白色念珠菌	毒力减弱
<i>DdX_10276</i>	211	7	假定蛋白	<i>Cir1</i>	新型隐球菌	失去致病力
<i>DdX_04528</i>	211	17	假定蛋白	<i>CDC25</i>	希金斯炭疽菌	毒力减弱
<i>DdX_01507</i>	212	12	效应因子结合(EB)模块结构域的蛋白质	<i>PsFPI</i>	大豆疫霉菌	毒力减弱
<i>DdX_04848</i>	214	14	假定蛋白 <i>DdX_04848</i>	<i>NapC</i>	大肠杆菌	毒力减弱
<i>DdX_13815</i>	223	8	假定蛋白 <i>DdX_13815</i>	<i>MIP1</i>	酿酒酵母	毒力减弱
<i>DdX_13523</i>	241	9	假定蛋白 <i>DdX_13523</i>	<i>Msb2</i>	尖孢镰刀菌	毒力减弱
<i>DdX_11150</i>	252	10	c 型凝集素结构域蛋白	<i>XC_0531</i>	野油菜黄单胞菌	毒力减弱
<i>DdX_13145</i>	254	6	假定蛋白	<i>MGG_07015</i>	稻瘟病菌	毒力减弱
<i>DdX_20302</i>	260	15	半凝素-1	<i>Gfd</i>	变异链球菌	毒力减弱
<i>DdX_10855</i>	269	20	类胰蛋白酶抑制剂富含半胱氨酸结构域的蛋白质	<i>BpaC</i>	类鼻疽伯克氏菌	毒力减弱
<i>DdX_11731</i>	273	7	假定蛋白	<i>FvBck1</i>	轮枝镰刀菌	毒力减弱
<i>DdX_00572</i>	277	19	含类地结构域蛋白质	<i>PsFPI</i>	大豆疫霉菌	毒力减弱
<i>DdX_19079</i>	285	14	果聚糖蔗糖酶	<i>CaEAPI</i>	白色念珠菌	毒力减弱
<i>DdX_03382</i>	289	10	神经丝介质多肽	<i>Gfd</i>	变异链球菌	毒力减弱
<i>DdX_15941</i>	303	21	富含半胱氨酸分泌蛋白家族结构域蛋白	<i>Gr-VAPI</i>	马铃薯金线虫	效应因子 (植物无毒性决定簇)
<i>DdX_13449</i>	309	8	26 000 分泌抗原	<i>Jar1</i>	灰葡萄孢菌	毒力减弱
<i>DdX_16961</i>	325	6	含钙稳态结构域蛋白的 <i>soce</i> 相关调节因子	<i>PWLI</i>	稻瘟病菌	效应因子 (植物无毒性决定簇)
<i>DdX_03496</i>	327	10	假定蛋白	<i>PsFPI</i>	大豆疫霉菌	毒力减弱
<i>DdX_14442</i>	334	18	假定蛋白	<i>HK2</i>	伯氏疏螺旋体	毒力减弱
<i>DdX_19508</i>	338	7	含类 Ground 结构域的蛋白质	<i>FTF2</i>	尖孢镰刀菌	毒力减弱
<i>DdX_11819</i>	339	9	假定蛋白	<i>Vps13</i>	稻瘟病菌	毒力减弱
<i>DdX_10263</i>	348	10	假定蛋白	<i>SpoT</i>	丁香假单胞菌	毒力减弱或致死

表达量均在侵染后上调。其中, *DdX_10276* 在线虫侵染甘薯第 1 d 的相对表达量是对照的 21 倍,

DdX_04528 在线虫侵染甘薯第 3 d 的相对表达量是对照的 41 倍。

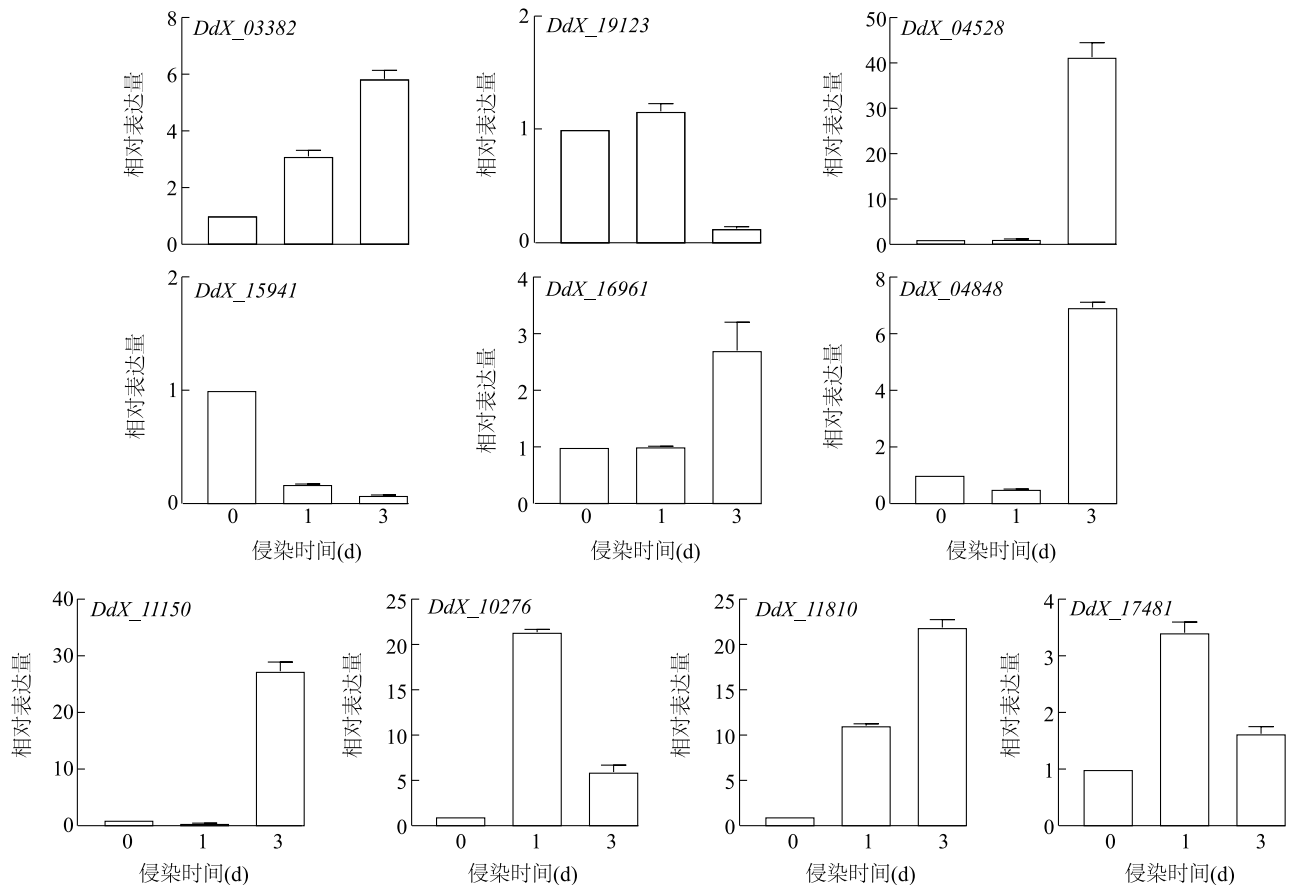


图 4 甘薯茎线虫 10 个候选效应因子基因在不同侵染时间的相对表达量

Fig.4 Relative expression levels of ten candidate effector genes of *Ditylenchus destructor* at different infection stages

3 讨论

植物细胞壁是线虫侵染寄主时需要突破的第一道屏障,线虫在侵染过程中会分泌碳水化合物活性酶类(CAZymes),以降解植物细胞壁^[20]。从甘薯茎线虫分泌组蛋白的 CAZymes 预测结果看,多糖裂解酶和糖苷水解酶占比最多,合计达 75.0%。其中,多糖裂解酶中主要为果胶裂解酶(多糖裂解酶 3),糖苷水解酶类中包含纤维素降解酶类(糖苷水解酶 5 和糖苷水解酶 30)、淀粉降解酶类(糖苷水解酶 31)、几丁质降解酶类(糖苷水解酶 18)等,其主要涉及到植物细胞壁、真菌细胞壁以及淀粉的降解等过程^[21-22],这可能与甘薯茎线虫独特的生活习性密切相关。甘薯茎线虫取食寄主并导致植物细胞死亡后,会迁移至土壤中取食真菌以维持存活,待机寻找新寄主^[23]。甘薯和马铃薯作为其主要寄主作物,体内富含淀粉^[24]。通过 EggNOG 数据库对 371 个分泌蛋白进行功能注释,结果显示其中 S 类(功能未

知)占比最高,这与唐伟等^[25]对甘薯间座壳菌(*Diaporthe batatas*)分泌蛋白的预测结果一致。在已注释到具体功能的蛋白质中,G 类(碳水化合物转运与代谢)和 O 类(翻译后蛋白质修饰、蛋白质周转和伴侣蛋白)所占比例最大,表明甘薯茎线虫具备从寄主块茎或根部有效代谢碳水化合物和蛋白质的能力,与其寄生特性相符。

随着病原物与寄主互作机制研究的深入,病原物全基因组序列的不断解析,各类生物信息学软件及数据库的不断完善,利用这些手段分析病原物的侵染机制已经成为较为常用的方法^[26-28]。尽管这些方法在预测病原物效应因子时可能存在一定遗漏,但仍能有效缩小研究范围。近年来,基于效应因子特征建立的筛选与预测方法,已被广泛应用于植物病原物效应因子的识别及其致病机制研究中,然而,由于分析标准的不同,可能会导致结果存在差异^[8]。Zhao 等^[29]分析了小麦叶锈病菌(*Puccinia triticina*)基因组中的 17 976 个蛋白质,筛选到 904 个

含有保守基序的潜在效应因子,并证实了PTTG_08198基因能加速细胞凋亡并促进活性氧的积累。扈丽丽等^[10]利用效应因子的典型特征,从最短尾短体线虫的转录组测序结果中鉴定出72 516个非冗余基因,并从中筛选出了1 641个蛋白质,最终确定了51个候选效应因子。在本研究中,我们在分析甘薯茎线虫分泌蛋白的基础上,考察了这些蛋白质的序列长度、半胱氨酸含量、信号肽长度以及冗余性等,最终筛选到32个候选效应因子。在筛选到的甘薯茎线虫候选效应因子中以假定蛋白为主,这与范春霞等^[30]预测甜瓜粉霉病菌及罗梅等^[8]预测球孢白僵菌的效应因子结果相似。

在qRT-PCR分析结果中,大部分基因的相对表达量在腐烂茎线虫感染后的第1 d和第3 d上调,说明这些基因在协助线虫感染时发挥重要的作用。本研究筛选到了一个腐烂茎线虫的类毒液过敏蛋白(VAP)基因DdX_15941,其含有21个半胱氨酸。VAP已在多种植物寄生线虫中被发现,包括南方根结线虫(*Meloidogyne incognita*)^[31]、松材线虫(*Bursaphelenchus xylophilus*)^[32]和大豆胞囊线虫(*Heterodera glycines*)^[33]。有研究表明,马铃薯金线虫(*Globodera rostochiensis*)中的GrVAP1基因的沉默可影响线虫对马铃薯的致病力^[34]。Chang等^[35]发现沉默腐烂茎线虫中DdVAP2基因后,线虫的致病力和繁殖能力均有一定程度的下降。在本研究中,qRT-PCR分析结果表明,随着感染时间的延长,DdX_15941的相对表达量下调,这可能意味着其主要功能是在感染初期,帮助线虫建立感染关系。

腐烂茎线虫候选效应蛋白基因DdX_11150和DdX_17481的相对表达量在感染后均上调,经EggNOG-mapper分析均被注释为c型凝集素结构域蛋白,半胱氨酸数量分别为10个和6个。Zhao等^[3]发现南方根结线虫中的c型凝集素效应因子MiCTL1a能够抑制植物过氧化氢酶活性,从而帮助线虫建立稳定的寄生关系。Zhuo等^[36]发现拟禾本科根结线虫(*Meloidogyne graminicola*)的c型凝集素效应因子Mg01965在早期感染过程中会抑制寄主植物物质外体中的固有免疫,促进线虫建立寄生关系。在甘薯茎线虫致病机理的研究中,c型凝集素效应因子的功能和植物靶标研究鲜有报道,由于甘薯茎线虫采用的是迁移性的寄生方式,其效应因子的作用机制可能与根结线虫存在较大的差异。

虽然多数预测的效应因子基因的相对表达量在感染过程中上调,但仍有一部分效应因子基因的相对表达量变化不明显,这可能是由于它们在线虫感染的其他阶段发挥作用,亦或并非甘薯茎线虫真正的效应因子。综上所述,本研究方法可以有效筛选甘薯茎线虫的效应因子。然而,需要注意的是有部分效应因子是由囊泡或非囊泡运输等其他途径分泌,例如南方根结线虫中的Mi-ISC-1和MiPDCD6可通过非常规分泌途径在感染寄主植物时发挥作用^[37-38]。目前尚没有适用于预测分析植物寄生线虫的非典型分泌效应因子的生物信息学软件,本研究仅对经典分泌途径的效应因子进行了预测和分析,筛选出的32个候选效应因子可为后续功能验证、甘薯茎线虫病致病机制解析、抗病育种及杀线虫剂靶标研发等工作奠定基础。

参考文献:

- [1] 陈晶伟,马居奎,张成玲,等. 徐淮地区7个甘薯茎线虫群体的形态学及分子生物学鉴定[J]. 江苏农业学报,2021,37(6):1409-1416.
- [2] 周忠,马代夫. 甘薯茎线虫病的研究现状和展望[J]. 杂粮作物,2003,23(5):288-290.
- [3] ZHAO J L, SUN Q H, QUENTIN M, et al. A *Meloidogyne incognita* C-type lectin effector targets plant catalases to promote parasitism[J]. *New Phytologist*,2021,232(5):2124-2137.
- [4] VIEIRA P, SHAO J, VIJAYAPALANI P, et al. A new esophageal gland transcriptome reveals signatures of large scale *de novo* effector birth in the root lesion nematode *Pratylenchus penetrans*[J]. *BMC Genomics*,2020,21(1):738.
- [5] RAMACHANDRAN S R, YIN C T, KUD J, et al. Effectors from wheat rust fungi suppress multiple plant defense responses[J]. *Phytopathology*,2017,107(1):75-83.
- [6] HOGENHOUT S A, VAN DER HOORN R A L, TERAUCHI R, et al. Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*,2009,22(2):115-122.
- [7] MIN X J. Evaluation of computational methods for secreted protein prediction in different eukaryotes[J]. *Journal of Proteomics & Bioinformatics*,2010,3(5):143-147.
- [8] 罗梅,董章勇,林进添,等. 球孢白僵菌基因组候选效应因子的预测与分析[J]. 核农学报,2019,33(4):680-686.
- [9] 韩长志. 全基因组预测樟疫霉的候选效应分子[J]. 南京林业大学学报(自然科学版),2015,39(2):69-74.
- [10] 扈丽丽,林柏荣,王宏洪,等. 最短尾短体线虫转录组及潜在效应蛋白分析[J]. 生物技术通报,2023,39(3):254-266.
- [11] 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.
- [12] BERNHOFER M, ROST B. TMbed: transmembrane proteins predicted through language model embeddings [J]. *BMC Bioinformatics*, 2022, 23(1): 326.
- [13] FANKHAUSER N, MÄSER P. Identification of GPI anchor attachment signals by a Kohonen self-organizing map [J]. *Bioinformatics*, 2005, 21(9): 1846-1852.
- [14] HORTON P, PARK K J, OBAYASHI T, et al. WoLF PSORT: protein localization predictor [J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35: W585-W587.
- [15] 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.
- [16] ZHANG H, YOHE T, HUANG L, et al. dbCAN2: a meta server for automated carbohydrate-active enzyme annotation [J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(W1): W95-W101.
- [17] JORDA J, KAJAVA A V. T-REKS: identification of Tandem Repeats in sequences with a K-meanS based algorithm [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(20): 2632-2638.
- [18] PRIYAM A, WOODCROFT B J, RAI V, et al. Sequenceserver: a modern graphical user interface for custom BLAST databases [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2019, 36(12): 2922-2924.
- [19] 刘维志. 植物病原线虫学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [20] HAEGEMAN A, JOSEPH S, GHEYSEN G. Analysis of the transcriptome of the root lesion nematode *Pratylenchus coffeae* generated by 454 sequencing technology [J]. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2011, 178(1/2): 7-14.
- [21] DANCHIN E G J, ROSSO M N, VIEIRA P, et al. Multiple lateral gene transfers and duplications have promoted plant parasitism ability in nematodes [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107(41): 17651-17656.
- [22] 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(1/2): 29-36.
- [23] MOENS M, PERRY R N. Migratory plant endoparasitic nematodes: a group rich in contrasts and divergence [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2009, 47: 313-332.
- [24] HOOVER R. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2001, 45(3): 253-267.
- [25] 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.
- [26] JONES D A, 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.
- [27] ZHENG J S, PENG D H, CHEN L, et al. The *Ditylenchus destructor* genome provides new insights into the evolution of plant parasitic nematodes [J]. *Proceedings Biological Sciences*, 2016, 283(1835): 20160942.
- [28] KOUTSOVOULOS G D, POULLET M, ELASHRY A, et al. Genome assembly and annotation of *Meloidogyne enterolobii*, an emerging parthenogenetic root-knot nematode [J]. *Scientific Data*, 2020, 7(1): 324.
- [29] ZHAO S Q, SHANG X F, BI W S, et al. Genome-wide identification of effector candidates with conserved motifs from the wheat leaf rust fungus *Puccinia triticina* [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1188.
- [30] 范春霞, 王军节, 赵鲁迺克, 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): 549-558.
- [31] WANG X, LI H M, HU Y J, et al. Molecular cloning and analysis of a new venom allergen-like protein gene from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* [J]. *Experimental Parasitology*, 2007, 117(2): 133-140.
- [32] YAN X, CHENG X Y, WANG Y S, et al. Comparative transcriptomics of two pathogenic pinewood nematodes yields insights into parasitic adaptation to life on pine hosts [J]. *Gene*, 2012, 505(1): 81-90.
- [33] GAO B L, ALLEN R, MAIER T, et al. Molecular characterisation and expression of two venom allergen-like protein genes in *Heterodera glycines* [J]. *International Journal for Parasitology*, 2001, 31(14): 1617-1625.
- [34] LOZANO-TORRES J L, WILBERS R H P, WARMERDAM S, et al. Apoplastic venom allergen-like proteins of cyst nematodes modulate the activation of basal plant innate immunity by cell surface receptors [J]. *PLoS Pathogens*, 2014, 10(12): e1004569.
- [35] CHANG Q, YANG Y W, HONG B, et al. A variant of the venom allergen-like protein, DdVAP2, is required for the migratory endoparasitic plant nematode *Ditylenchus destructor* parasitism of plants [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 14: 1322902.
- [36] ZHUO K, NAALDEN D, NOWAK S, et al. A *Meloidogyne graminicola* C-type lectin, Mg01965, is secreted into the host apoplast to suppress plant defence and promote parasitism [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2019, 20(3): 346-355.
- [37] QIN X, XUE B W, TIAN H Y, et al. An unconventionally secreted effector from the root knot nematode *Meloidogyne incognita*, Mi-ISC-1, promotes parasitism by disrupting salicylic acid biosynthesis in host plants [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2022, 23(4): 516-529.
- [38] KAMARUZZAMAN M, ZHAO L F, ZHANG J N, et al. MiPD-CD6 effector suppresses host PAMP-triggered immunity to facilitate *Meloidogyne incognita* parasitism in tomato [J]. *Plant Pathology*, 2023, 72(1): 195-206.

(责任编辑: 王妮)