

高方园, 杨冬静, 陈晶伟, 等. 甘薯长喙壳菌效应蛋白全基因组预测与转录组分析[J]. 江苏农业学报, 2026, 42(5): 919-928.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2026.05.006

甘薯长喙壳菌效应蛋白全基因组预测与转录组分析

高方园¹, 杨冬静¹, 陈晶伟^{1,2}, 吴永旺³, 张成玲¹, 马居奎^{1,2}, 唐伟^{1,2}, 梁昭¹, 佟聪¹, 高天奇¹, 周小四⁴, 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; 3. 苏州帕诺米克生物医药科技有限公司, 江苏 苏州 215125; 4. 江苏沿海地区农业科学研究所, 江苏 盐城 224002)

摘要: 甘薯黑斑病是由长喙壳菌(*Ceratocystis fimbriata*)引起的一种严重危害甘薯的真菌性病害。该菌会分泌多种效应子以促进对甘薯的侵染, 本研究基于甘薯长喙壳菌全基因组信息, 利用生物信息学软件预测及分析其效应子, 并结合转录组探讨效应子在甘薯长喙壳菌接种不同甘薯品种中的表达模式及其与宿主的免疫反应关系。结果表明, 从甘薯黑斑病病原菌甘薯长喙壳菌全基因组7 266条蛋白质氨基酸序列中共鉴定出292个经典分泌蛋白, 经EffectorP 3.0预测得到93个候选效应子, 其中PHI数据库可注释到92个效应子的功能。利用eggNOG-mapper分析结果显示, 42个效应子具有功能注释, 主要涉及信号转导机制, 糖类转运和代谢, 翻译后蛋白质修饰、蛋白质周转和伴侣蛋白等生理过程。信号肽的特征分析结果表明, 信号肽长度集中在16 aa至21 aa, -3位和-1位氨基酸相对保守, 其切割位点属于典型的AXA型。转录组数据分析结果显示, 接种于徐薯18的甘薯长喙壳菌有57个效应子被激活, 接种于南京92的甘薯长喙壳菌有56个效应子被激活, 两者共同表达54个效应子。值得注意的是, 部分效应子在接种于南京92的甘薯长喙壳菌中表现出显著上调趋势, 提示其可能与抗病机制相关。本研究结果为进一步揭示甘薯长喙壳菌的致病机制及其与宿主植物的相互作用提供了重要的分子基础, 预测的效应子及转录表达模式为深入研究甘薯免疫反应及其生物防治甘薯黑斑病提供了潜在的靶标。

关键词: 甘薯; 长喙壳菌; 效应子; 转录组; 病原菌-宿主互作; 生物信息学预测

中图分类号: S531 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2026)05-0919-10

Genome-wide prediction and transcriptomic analysis for effector proteins in *Ceratocystis fimbriata*, the causal agent of sweetpotato black rot

GAO Fangyuan¹, YANG Dongjing¹, CHEN Jingwei^{1,2}, WU Yongwang³, ZHANG Chengling¹, MA Jukui^{1,2}, TANG Wei^{1,2}, LIANG Zhao¹, TONG Cong¹, GAO Tianqi¹, ZHOU Xiaosi⁴, SUN Houjun^{1,2}

(1. Xuzhou Institute of Agricultural Sciences of the Xuhuai District of Jiangsu Province/Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Sweetpotato of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Xuzhou 221131, China; 2. School of Life Sciences, Jiangsu Normal University, Xuzhou 221131, China; 3. Suzhou Panomix Biomedical Technology Co., Ltd., Suzhou 215125, China; 4. Institute of Agricultural Sciences in the Coastal District of Jiangsu Province, Yancheng 224002, China)

收稿日期: 2025-06-23

基金项目: 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系项目 (CARS-10); 国家自然科学基金项目 (32001599)

作者简介: 高方园 (1995-), 男, 安徽宿州人, 硕士, 助理研究员, 主要从事植物病害研究。 (E-mail) fygao030506@163.com

通讯作者: 周小四, (E-mail) 1614971309@qq.com; 孙厚俊, (E-mail) sunhoujun1980@163.com

Abstract: Sweetpotato black rot, caused by *Ceratocystis fimbriata*, is a destructive fungal disease that severely impacts sweetpotato production. The pathogen secretes multiple effectors to facilitate its infection of sweetpotato. In the study, we conducted a comprehensive genome-wide predic-

tion and characterization of candidate effectors from *Ceratocystis fimbriata*, followed by transcriptomic analysis to elucidate their expression patterns in different sweetpotato cultivars and their potential roles in host-pathogen interactions. A total of 292 classical secreted proteins were identified from 7 266 predicted protein sequences in the *Ceratocystis fimbriata* genome. A total of 93 candidate effectors were predicted by EffectorP 3.0, 92 of which were functionally annotated by the Pathogen-Host Interactions (PHI) database. Functional enrichment using eggNOG-mapper indicated that 42 effectors were associated with critical biological processes, including signal transduction, carbohydrate transport and metabolism, post-translational modifications, protein turnover, and chaperone activity. Signal peptide analysis revealed the length of signal peptide was concentrated between 16 aa to 21 aa, with conserved residues at -3 and -1 positions, and the cleavage site belonged to the typical AXA type. Transcriptome profiling showed that 57 effectors were activated in *Ceratocystis fimbriata* inoculated into Xushu 18, and 56 effectors were activated in *Ceratocystis fimbriata* inoculated into Nanjing 92, with 54 effectors co-expressed in both cultivars. Several effectors exhibited a significant upregulation trend in *Ceratocystis fimbriata* inoculated into Nanjing 92, suggesting that they may be associated with the resistance mechanism. The findings of this study provide an important molecular basis for further elucidating the pathogenic mechanism of *Ceratocystis fimbriata* and its interaction with host plants. The predicted effectors and their transcriptional expression patterns offer potential targets for in-depth research on sweetpotato immune responses and biological control of sweetpotato black rot.

Key words: sweetpotato; *Ceratocystis fimbriata*; effectors; transcriptome; pathogen-host interaction; bioinformatic prediction

甘薯 (*Ipomoea batatas*) 作为全球重要的块根类作物, 种植范围广泛, 其产量与品质对保障国家粮食安全、促进农业经济发展具有至关重要的作用^[1-2]。然而, 甘薯生产过程中频繁遭受多种病原真菌的侵袭, 其中由长喙壳菌 (*Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted) 引发的黑斑病是危害最严重的真菌病害之一, 对甘薯产量和品质造成严重影响^[3]。据统计, 长喙壳菌每年导致全球甘薯产量损失达 10%~20%, 严重年份损失率可高达 20%~50%^[4], 给甘薯产业带来巨大经济损失。种植抗病品种是预防和控制植物病害最经济、环保的策略^[5-6]。但是, 目前生产上仍缺乏对长喙壳菌具有完全免疫的栽培品种, 抗性育种进展缓慢。当前, 甘薯黑斑病的防治仍以化学农药为主, 但长期过量使用化学农药不仅会诱导病原菌产生抗药性, 还会造成土壤、水体等生态环境遭到破坏, 同时引发农产品农药残留等食品安全问题^[7]。因此, 亟需系统解析甘薯与长喙壳菌的互作分子机制, 阐明甘薯抗黑斑病的遗传基础与病原菌的致病机理, 为培育抗病品种、研发高效环境友好型绿色防治技术提供重要的理论依据。

真菌效应子 (Effectors) 作为病原菌侵染植物宿主过程中关键的分泌蛋白, 能够通过抑制宿主免疫反应来促进病原菌的定殖与扩展^[8-9]。这些效应子通过多种机制与宿主细胞的信号通路、细胞壁降解酶等互作, 破坏宿主的免疫屏障, 使病原菌成功侵染

宿主^[10-12]。当前已有大量研究聚焦植物病原菌分泌蛋白及其效应子的预测与功能解析, 特别是基于基因组序列的生物信息学分析手段为效应子的研究提供了更为精准的预测工具^[13-15]。例如, 王辉灵等^[16]通过对花生果腐病病原菌——新孢镰刀菌 (*Fusarium neostriatum*) 的全基因组序列进行系统的生物信息学分析, 预测获得 161 个潜在效应子; 翟思琪等^[17]对灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea*) 的全基因组数据进行效应子筛选, 鉴定出 109 个候选效应子; 吴佳椰露等^[18]则通过分析茄腐镰孢菌 (*Fusarium solani*) 的全基因组序列, 预测该病原菌中存在 185 个候选效应子, 进一步的烟草瞬时表达试验结果证实, 其中 2 个候选效应子能够抑制由 BCL2 相关 X 蛋白 (BCL2-associated X protein, Bax) 介导的细胞程序性死亡 (programmed cell death, PCD)。

尽管在植物病原菌分泌蛋白及效应子研究方面取得了较大进展, 但对甘薯长喙壳菌分泌蛋白和效应子的研究尚不充分, 尤其是其效应子在甘薯黑斑病发病过程中的具体作用机制尚未明确。因此, 本研究通过结合生物信息学和转录组学, 系统预测并鉴定了甘薯长喙壳菌的效应子, 同时分析效应子在不同甘薯抗性品种中的表达模式。选择感黑斑病的徐薯 18 和抗黑斑病的南京 92 两个甘薯品种, 通过转录组数据比较了甘薯长喙壳菌侵染这两个甘薯品种后的效应子表达变化, 旨在揭示效应子在宿主免

疫反应中的潜在作用。以期为进一步解析甘薯长喙壳菌的分子致病机制提供理论依据,并为抗病育种和病害防治提供新思路。

1 材料与方法

1.1 甘薯长喙壳菌基因组数据来源

甘薯长喙壳菌(*Ceratocystis fimbriata*)全基因组编码的氨基酸序列数据来自 GenBank 数据库(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/genome/GCA_000389695.3/)。该数据集包含 7 266 条氨基酸序列,这些序列涵盖了长喙壳菌所有基因编码信息,并为后续的效应子鉴定和分析提供了重要的基础数据。

1.2 甘薯长喙壳菌全基因组编码蛋白质氨基酸 N-端信号肽预测

为了筛选具备分泌功能的蛋白质,本研究使用 SignalP 5.0 工具(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0>)对甘薯长喙壳菌的 7 266 条蛋白质氨基酸序列进行 N-端信号肽预测。通过设置“生物类群”为“真核生物域”,仅保留具有信号肽序列的蛋白质,并剔除不具备 N-端信号肽的序列。

1.3 GPI 锚定位点预测

含有 N-端信号肽的蛋白质氨基酸序列进一步通过 PredGPI 软件(<http://gpcr.biocomp.unibo.it/predgpi/pred.htm>)进行 GPI 锚定位点分析。根据预测结果,排除具有 GPI 锚定位点的蛋白质,以便进一步筛选出具有胞外分泌功能的蛋白质。

1.4 分泌蛋白亚细胞定位预测

为了进一步确认分泌蛋白的亚细胞定位,本研究使用 WoLF PSORT 工具(<https://wolfsort.hgc.jp/>)对筛选出的具有 N-端信号肽且不包含 GPI 锚定位点的蛋白质进行亚细胞定位预测。该工具通过评估蛋白质氨基酸序列的特征,帮助识别可能分泌到胞外的蛋白质,从而筛选出潜在的效应子。

1.5 跨膜结构域预测

对所有筛选出的分泌蛋白(即含有 N-端信号肽且不具备 GPI 锚定位点的蛋白质)进行跨膜结构域预测。使用 TMHMM-2.0 工具(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>)通过分析蛋白质氨基酸序列的跨膜特征,帮助识别并剔除具有跨膜结构域的蛋白质。最终筛选出的蛋白质为

胞外分泌蛋白,不含有跨膜结构域,从而为效应子预测提供可靠的数据集。

1.6 甘薯长喙壳菌效应子的预测分析

筛选出的分泌蛋白进一步通过 EffectorP 3.0 工具(<http://effectorp.csiro.au/>)进行效应子预测。为进一步探讨这些效应子的功能,本研究使用 eggNOG-mapper 工具(<http://eggnog-mapper.embl.de/>)对筛选出的效应子进行功能注释和预测。该工具通过与公共蛋白质数据库比对,提供了有关这些效应子功能的深度信息,有助于了解其在甘薯长喙壳菌致病过程中的潜在角色。

1.7 甘薯长喙壳菌候选效应子信号肽特征分析

为了进一步分析甘薯长喙壳菌效应子可能的信号肽特征,使用 SignalP 6.0 工具对效应子信号肽的位置进行精准确定。此外,统计信号肽的长度以及信号肽切割位点氨基酸的频率,以探索其结构特点。这一分析有助于深入了解这些效应子在宿主植物中的识别机制和功能发挥。

1.8 甘薯长喙壳菌效应子的功能分析

将候选效应子蛋白质氨基酸序列与 PHI (Pathogen-Host Interaction database) 数据库进行比对分析,获取具有致病作用的候选蛋白质氨基酸序列^[18]。

1.9 甘薯长喙壳菌侵染甘薯的接种处理及转录组测序样品的制备

取生长健康、大小一致的甘薯薯块进行甘薯长喙壳菌人工接种。处理组:制备长喙壳菌的分生孢子悬浮液 1 mL 1×10^5 CFU,采用针刺人工接种法分别接种至抗性品种南京 92 和感病品种徐薯 18。于接种后当天、1 d、3 d、7 d 分别取孢子接种区域,置于液氮中冷冻处理,然后于 -80 °C 冰箱中保存。徐薯 18 接种后不同时间的取样样品分别命名为 CKS0、S1、S3、S7,南京 92 接种后不同时间的取样样品分别命名为 CKR0、R1、R3、R7,每个取样时间取样样品设置 3 个相互独立的甘薯薯块作为生物学重复;RNA 提取、质量控制和转录组测序委托广州基迪奥生物科技有限公司完成。

2 结果与分析

2.1 甘薯长喙壳菌蛋白的 N 端信号肽预测结果

利用 SignalP 5.0 对甘薯长喙壳菌全基因组编码的 7 266 条蛋白质氨基酸序列进行 N 端信号肽预测,结果显示,566 个蛋白质含典型 N 端信号肽,占

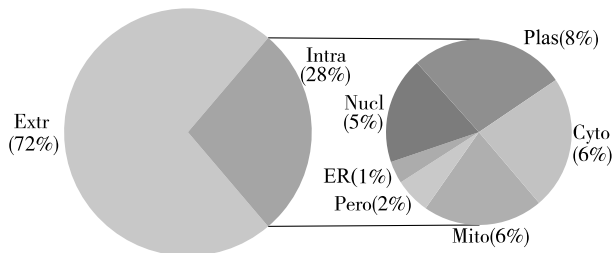
总蛋白质的 7.79%。这类含 N 端信号肽的蛋白质通常介导经典分泌途径 (Classical secretion pathway), 推测其可能作为分泌蛋白分泌至胞外或宿主细胞中, 进而参与对甘薯的侵染过程及致病性调控。

2.2 甘薯长喙壳菌分泌蛋白 GPI 锚定位点预测结果

为筛选典型胞外分泌蛋白 (排除 GPI 锚定的膜相关蛋白), 利用 PredGPI 工具对上述 566 条含 N 端信号肽的蛋白质氨基酸序列进行 GPI 锚定位点预测。结果显示, 98 个蛋白质含有 GPI 锚定位点, 推测其可能通过膜锚定方式参与病原菌与宿主细胞膜的结合或信号传导; 其余 468 个蛋白质未预测到 GPI 锚定位点, 结合其 N 端信号肽特征, 符合典型胞外分泌蛋白的特征。

2.3 甘薯长喙壳菌分泌蛋白的亚细胞定位分析结果

将甘薯长喙壳菌全基因组编码蛋白质氨基酸序列中含有 N-端信号肽, 不含有 GPI 锚定位点的 468 个蛋白质通过 WoLF PSORT 工具进行亚细胞定位分析, 结果 (图 1) 显示, 在上述 468 个蛋白质中预测到 339 个蛋白质 (占比 72%) 分泌至胞外 (Extr), 其余 129 个蛋白质 (占比 28%) 分别转运至线粒体 (Mito)、过氧化物酶体 (Pero)、内质网 (ER)、细胞核 (Nucl)、质膜 (Plas) 以及细胞质 (Cyto), 其中线粒体中有 27 个 (6%), 过氧化物酶体中有 8 个 (2%), 内质网中有 5 个 (1%), 细胞核中有 24 个 (5%), 质膜中有 35 个 (8%), 细胞质中有 30 个 (6%)。这些蛋白质的定位特征为理解其在长喙壳菌侵染甘薯过程中发挥的作用提供了线索。



Extr: 胞外; Intra: 胞内; Mito: 线粒体; Pero: 过氧化物酶体; ER: 内质网; Nucl: 细胞核; Plas: 质膜; Cyto: 细胞质。

图 1 甘薯长喙壳菌分泌蛋白的亚细胞定位

Fig.1 Subcellular localization of secretory proteins in *Ceratocystis fimbriata*

2.4 甘薯长喙壳菌分泌蛋白的跨膜结构域预测结果

对 339 个分泌蛋白的跨膜结构域进行预测, 结果显示, 其中 260 个蛋白质不含跨膜结构域, 67 个

蛋白质包含 1 个跨膜结构域, 12 个蛋白质包含 2 个或更多的跨膜结构域。值得注意的是, 67 个含有 1 个跨膜结构域的蛋白质中有 32 个蛋白质的跨膜结构域与 N 端信号肽区域重叠。基于这一现象, 本研究推测这些跨膜结构域可能是信号肽区域的延伸。因此, 最终筛选出的 292 个蛋白质 (包括 260 个无跨膜结构域和 32 个跨膜区域与 N 端信号肽区域重叠的蛋白质) 具有典型的分泌蛋白特征, 用于后续效应子的预测和功能分析。

2.5 甘薯长喙壳菌分泌蛋白中效应子的预测和功能分析结果

根据效应子的特征: 具有信号肽、无跨膜区域以及富含半胱氨酸等^[19]。本研究对 292 个具有典型分泌蛋白特征的蛋白质氨基酸序列进行分析, 结果 (图 2) 显示, 93 个分泌蛋白被预测为效应子, 其中 36 个为胞内效应子, 36 个为质外体效应子, 分别占效应子数量的 38.71%, 另外 21 个分泌蛋白既可能是质外体效应子, 也可能是胞内效应子, 占分泌蛋白数量的 22.58%。

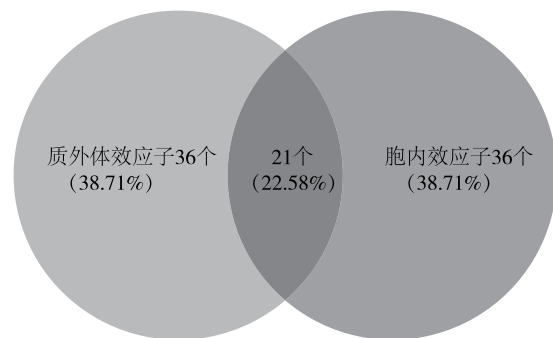
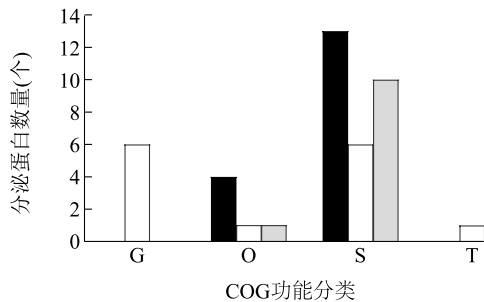


图 2 甘薯长喙壳菌效应子种类和数目

Fig.2 Types and quantities of effectors in *Ceratocystis fimbriata*

将上述 93 个候选效应子氨基酸序列在 eggNOG-mapper 数据库中比对, 结果 (图 3) 显示, 42 个效应子氨基酸序列可以注释到具体功能, 在同源蛋白簇 (COG) 分类中分为信号转导机制 (T) 类, 糖类转运和代谢 (G) 类, 翻译后蛋白质修饰、蛋白质周转和伴侣蛋白 (O) 类以及功能未知 (S) 类 4 类, 其中 1 条氨基酸序列属于信号转导机制类, 6 条氨基酸序列属于糖类转运和代谢类, 6 条氨基酸序列属于 COG-O 翻译后蛋白质修饰、蛋白质周转和伴侣蛋白类, 29 条氨基酸序列属于功能未知类。对 COG 分类的蛋白质氨基酸序列进一步统计分析发现, 1 个

信号转导机制类效应子为质外体(Apoplasmic)效应子;6个糖类转运和代谢类效应子均为质外体效应子,蛋白质周转和伴侣蛋白类有4个为质外体效应子,1个为胞内(Cytoplasmic)效应子,1个为质外体/胞内效应子;功能未知类(S)29条氨基酸序列有6个为质外体效应子,13个为胞内效应子,10个为质外体/胞内效应子。值得注意的是,不同类别的效应子在COG分类中的分布有差异,提示这些效应子在不同的宿主免疫应答过程中可能发挥多样化作用。



□ 质外体效应子; ■ 胞内效应子; ■ 质外体效应子/胞内效应子

G: 糖类转运和代谢; O: 翻译后蛋白质修饰、蛋白质周转和伴侣蛋白; S: 功能未知; T: 信号转导机制; COG: 同源蛋白簇。

图3 93个长喙壳菌候选效应因子功能同源蛋白簇(COG)分类

Fig.3 Clusters of Orthologous Groups (COG) classification of 93 candidate effectors from *Ceratocystis fimbriata*

2.6 甘薯长喙壳菌效应子信号肽特征分析

对93个候选效应子信号肽长度深入分析,结果(图4)显示,其信号肽长度从14 aa到36 aa,主要集中在16 aa至21 aa,其中长度为16 aa的信号肽最多(26个),占候选效应子总数的27.96%;其次是长度为19 aa的信号肽(17个),占候选效应子总数的18.28%。

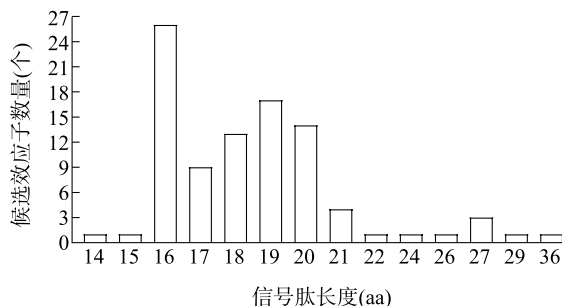


图4 候选效应子信号肽分析

Fig.4 Analysis of signal peptides in candidate effectors

对效应子信号肽切割位点-3位到+2位氨基酸

种类进行统计分析,结果显示,在-3位出现了丙氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、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,占比为48.39%,在-2位出现了丙氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、赖氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、天冬氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、丝氨酸、苏氨酸、缬氨酸和色氨酸等17种氨基酸,其中出现最多的是亮氨酸和甲硫氨酸,占比均为16.13%。在-1位出现了4种氨基酸,分别为丙氨酸、半胱氨酸、甘氨酸和丝氨酸,其中出现最多的是丙氨酸,占比为89.25%;在+1位出现了14种氨基酸,分别为丙氨酸、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、赖氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、苏氨酸、缬氨酸和丝氨酸,其中出现最多的是丙氨酸,占25.81%;在+2位出现了17种氨基酸,分别是丙氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、天冬氨酸、脯氨酸、异亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、精氨酸、丝氨酸、半胱氨酸、缬氨酸、色氨酸、酪氨酸,其中出现最多的是脯氨酸,占38.71%。根据信号肽酶(Spase)的识别类型,可将信号肽分为肽酶I型(SP I型,对应Spase I识别)和肽酶II型(SP II型,对应Spase II识别)两类:SP I型信号肽的核心结构特征是其C端切割位点的-3~-1位(即信号肽切割前的最后3个氨基酸位置)为AXA型;SP II型信号肽为脂蛋白信号肽,其典型结构特征是C端切割位点的-3~-1位为L(A/S)(A/G)。本研究中效应子信号肽切割位点的-3位和-1位氨基酸具有一定的保守性:其中-3~-1位氨基酸组成为AXA型的信号肽占比达44.09%,该类信号肽可被Spase I型信号肽酶特异性识别。这一结果表明,甘薯长喙壳菌效应子的信号肽序列具有一定的保守性,该保守特征可能与其介导分泌、参与宿主植物免疫逃逸的机制密切相关。

2.7 甘薯长喙壳菌效应子的功能注释

本研究对甘薯长喙壳菌中93个候选效应子进行同源序列比对分析,结果(表1)显示,92条氨基酸序列获得了功能注释。其中,27条氨基酸序列的缺失导致甘薯长喙壳菌毒力减弱,占比29.35%;29条氨基酸序列被鉴定为效应子,占比31.52%,18条氨基酸序列对甘薯长喙壳菌致病力无显著影响,3条氨基酸序列导致甘薯长喙壳菌致病力丧失,2条氨基酸序列导致甘薯长喙壳菌致死,1条氨基酸序

列被标注为化学靶标,1 条氨基酸序列表现出使甘薯长喙壳菌毒力增强,此外还有 11 条氨基酸序列为混合型。

表 1 基于 PHI 数据库的 92 个候选效应子的功能注释

Table 1 Functional annotation of the 92 candidate effectors based on the PHI database

编号	类型	候选效应子氨基酸序列数量(个)	占比 (%)
1	毒力因子	27	29.35
2	效应子	29	31.52
3	不影响病原致病力	18	19.57
4	失去致病力	3	3.26
5	致死	2	2.17
6	毒力增强	1	1.08
7	化学靶标	1	1.08
8	混合型(包含失去致病性、毒力减弱、致死)	11	11.96

2.8 甘薯长喙壳菌效应子的转录分析结果

为明确甘薯黑斑病病菌长喙壳菌效应子的表达模式及其与甘薯免疫反应的关联,本研究对甘薯长喙壳菌接种于感病品种徐薯 18 和抗病品种南京 92 当天、1 d、3 d、7 d 进行转录组测序。经质量控制与数据预处理,获得高质量转录组数据,并将测序读段成功比对至长喙壳菌基因组,通过基因组生物信息学分析预测,共得到 93 个候选效应子。将这些效应子映射至转录组数据后,结果(图 5)发现,接种于徐薯 18 中的甘薯长喙壳菌检测到 81 个效应子,接种于南京 92 中的甘薯长喙壳菌检测到 68 个。为排除样品偶然性导致的低表达效应子(即 4 个时间点中至少 2 个时间点 *FPKM* 值为 0,且最高 *FPKM* 值 ≤ 5),进一步筛选后最终确定接种于徐薯 18 的甘薯长喙壳菌有效表达的效应子为 57 个,接种于南京 92 的甘薯长喙壳菌为 56 个。

韦恩图分析结果(图 6)显示,接种于徐薯 18 的甘薯长喙壳菌和接种于南京 92 的甘薯长喙壳菌中共有 54 个共同表达的效应子。接种于徐薯 18 的甘薯长喙壳菌特有的 3 个效应子为 CFIMG_007717RA00001、CFIMG_007925RA00001、CFIMG_008627RA00001,接种于南京 92 的甘薯长喙壳菌特有的 2 个效应子为 CFIMG_004435RAa、CFIMG_008478RA00001。

从图 7 可知,与对照相比,接种于感病品种徐薯 18

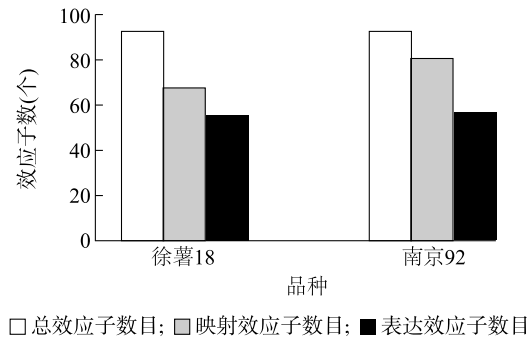


图 5 93 个候选效应子在甘薯长喙壳菌侵染徐薯 18 和南京 92 过程中转录模式下的表达数量

Fig.5 Transcriptional expression quantities of 93 candidate effectors during infection of *Ceratocystis fimbriata* on Xushu 18 and Nanjing 92

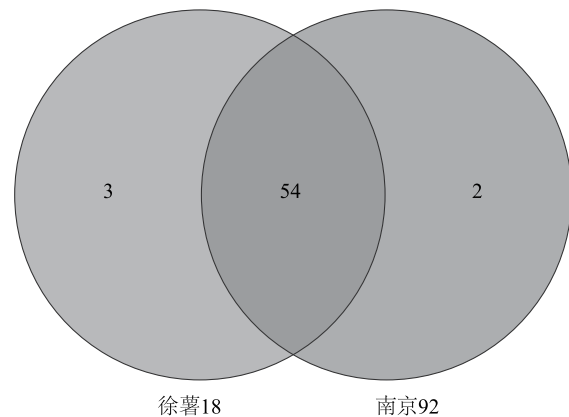


图 6 候选效应子在甘薯长喙壳菌侵染徐薯 18 和南京 92 过程中的表达韦恩图

Fig.6 Venn diagram of candidate effector expression during infection of *Ceratocystis fimbriata* on Xushu 18 and Nanjing 92

的甘薯长喙壳菌在接种后 1 d、3 d 和 7 d 分别有 32 个效应子呈上调表达,3 个效应子呈下调表达,18 个效应子呈现不一致的表达变化模式,而 4 个效应子则呈现前期持平后期上升的表达趋势。相比之下,接种于抗病品种南京 92 的甘薯长喙壳菌在接种后 1 d、3 d 和 7 d 有 40 个效应子上调表达,5 个效应子下调表达,10 个效应子呈现不一致的表达变化模式,且 1 个效应子呈现前期稳定后期上升的表达模式。有趣的是,接种于感病品种徐薯 18 和抗病品种南京 92 甘薯长喙壳菌效应子 CFIMG_004627RA、CFIMG_008380RA00001 和 CFIMG_008109RA00001 在接种后 1 d、3 d、7 d 均表现出显著下调表达的趋势,这可能表明这些效应子在病菌

侵染和致病过程中发挥的作用不显著。另外,接种于感病品种徐薯 18 的甘薯长喙壳菌效应子 CFIMG_008187RA00001、CFIMG_007837RA00001、CFIMG_007714RA00001 和 CFIMG_004605RA 在接种后各个时间点中持续上调表达,表明这些效应子可能参与了病菌的整个致病过程。接种于抗病品种南京 92 的甘薯长喙壳菌效应子 CFIMG_002921RA、CFIMG_006503RAa、CFIMG_007328RA00001、CFIMG_006421RA、CFIMG_007684RA00001、CFIMG_007714RA00001、CFIMG_005843RAa、CFIMG_007880RA00001 和 CFIMG_008294RA00001 在接种后所有时间点表现出持续上调表达趋势,推测其可能与该品种的抗病机制密切相关。

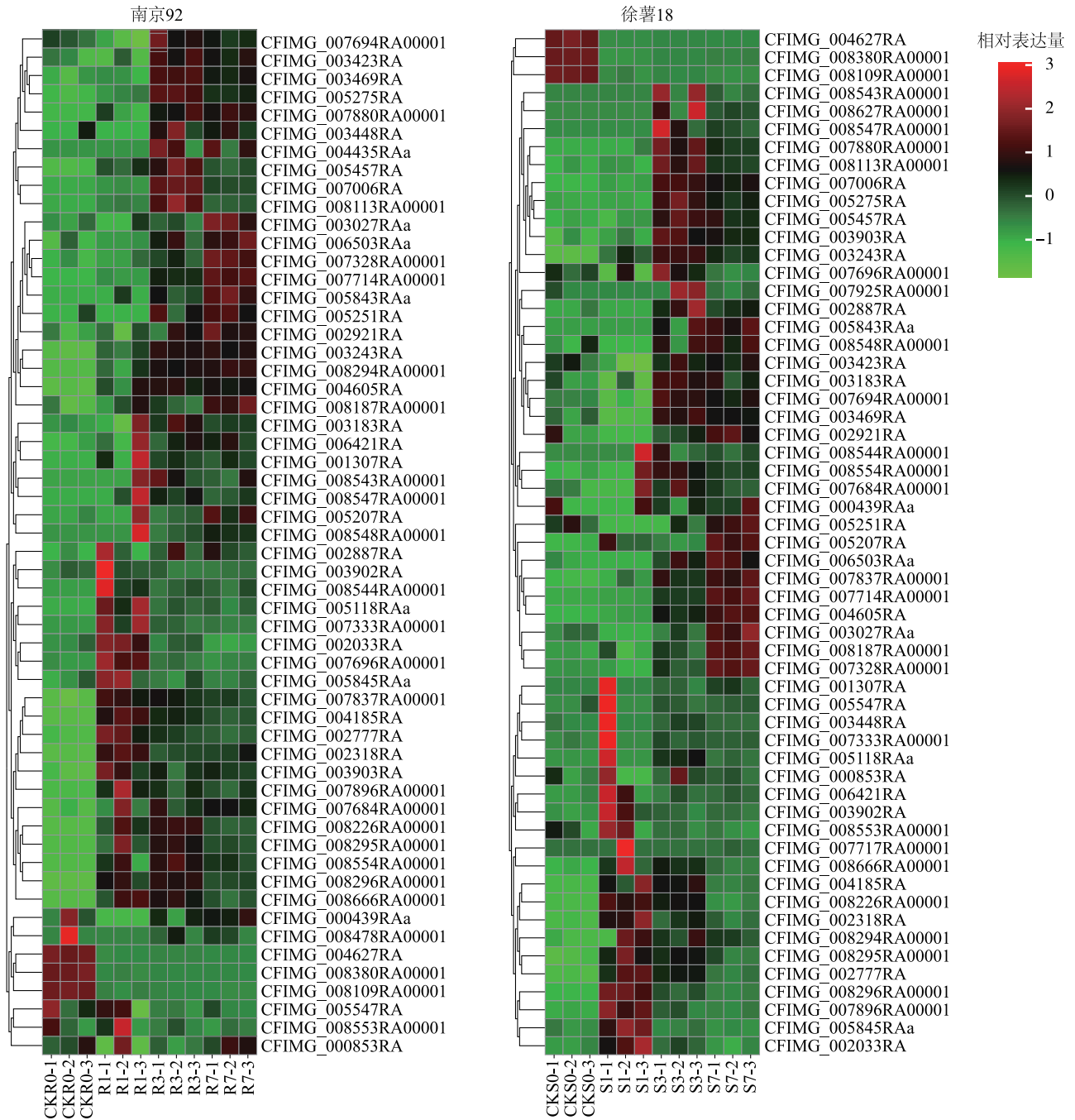
功能注释分析结果显示,部分在侵染过程中被诱导上调表达的效应子可能与甘薯长喙壳菌的致病过程密切相关。甘薯长喙壳菌接种于感病品种徐薯 18,与对照相比,CFIMG_003448RA 在接种后各时间点表达量均上调,该效应子基因编码糖基水解酶家族成员—— β -1,3(4)-内切葡聚糖酶[Endo-1,3(4)- β -glucanase],推测其通过降解植物细胞壁组分(如 β -葡聚糖)促进病原定殖。其他如 CFIMG_008187RA00001 和 CFIMG_002033RA 分别被注释为纤维二糖脱氢酶(Cellobiose dehydrogenase)和 β -葡糖苷酶(Beta-glucosidase),均为典型的胞外水解酶,可能协同参与植物细胞壁多糖降解,破坏宿主屏障结构,增强侵染能力。甘薯长喙壳菌接种于抗病品种南京 92,接种后前期特异高表达的 CFIMG_003902RA 效应子基因编码坏死诱导蛋白(Necrosis-inducing protein, NPP1),可能通过诱导局部组织坏死或细胞程序性死亡影响病原与宿主的互动动态;此外,CFIMG_004605RA 与 CFIMG_002318RA 分别含有溶菌酶样(Lysozyme-like domain, LysM)结构域和类霍乱毒素 B 亚基(Cholera toxin B-like domain, CVNH)结构域,其中 LysM 结构域蛋白可能识别宿主细胞壁中的几丁质片段并抑制病原相关分子模式(Pathogen-associated molecular pattern, PAMP)诱导的免疫反应,而 CVNH 结构域蛋白被认为在某些病原中具有类似糖结合活性,可能参与干扰宿主免疫识别。这些差异表达的效应子的结构与功能特征提示其在调控致病力或触发宿主免疫中的潜在作用。此外,部分差异高表达的候选基因仅被注释为假定蛋白,其具体功能尚不明确。值得注意的是,大多数候选基因在 GO 和 KEGG 数据库中尚无功能富集信

息,表明甘薯长喙壳菌可能拥有一批结构完整但功能未明的潜在致病相关基因,亟待通过功能验证与互作研究进一步阐明其生物学作用。

3 讨论

在与病原菌长期互作博弈过程中,为了应对病原菌的攻击,植物进化出了至少 2 条防御系统^[20]。第一道防线是基于病原体相关分子模式(PAMP)的识别,由 PAMP 因子识别受体(PRR)激活 PAMP 触发的免疫(PAMP-triggered immunity, PTI),阻止病原菌在宿主内的进一步定殖^[21];第二道防线是基于宿主 R 蛋白对效应子的特异性识别,继而启动效应子的触发免疫(Effector-triggered immunity, ETI),产生快速且增强的防御反应^[22]。近年来,随着对病原菌-寄主互作机制的持续深入探索,以及病原菌全基因组序列的测序完成和生物信息学方法的完善,基于计算预测的效应子筛选已成为解析病原菌-宿主互作的高效途径^[23-25]。在此基础上,越来越多的研究者利用生物信息学工具,对多种病原菌的分泌蛋白进行了系统的预测与功能分析,为深入理解病原菌的致病机制提供了重要线索。例如,曹言勇等^[26]对玉米茎腐病致病菌九州镰孢菌进行分泌蛋白的预测,共发现 264 个效应蛋白。范春霞等^[27]在甜瓜粉霉病病原菌粉红单端孢(*Trichothecium roseum*)中预测到 154 个候选效应子;何艳秋等^[28]在尖孢镰刀菌古巴专化型 1 号小种(*Fusarium oxysporum* f. *cubenserace1.Foc1*)中鉴定到 378 个候选效应子,并通过 qRT-PCR 证实了 7 个候选效应子侵染期的表达模式。

本研究综合应用多种生物信息学工具,对甘薯黑斑病病原菌甘薯长喙壳菌全基因组 7 266 条蛋白质氨基酸序列进行了系统筛选,最终鉴定出 292 条经典分泌蛋白,经 EffectorP 3.0 预测得到 93 个候选效应子。eggNOG 功能分类结果表明,其中 S 类(功能未知)最多,这与王辉灵等^[16]对花生果腐病病原菌分泌蛋白的研究结果相似,其余的候选效应子主要分布于糖类转运和代谢、信号转导、蛋白质翻译后修饰等类别,暗示甘薯长喙壳菌可通过多条途径协同干扰宿主免疫。通过信号肽特征分析,结果发现 93 个候选效应子的信号肽切割位点-3 到-1 位氨基酸频率较高,氨基酸组成为 AXA 型,主要被 Spase I 型信号肽酶识别。预测结果与臧睿等^[29]预测葡



CKS0-1、CKS0-2、CKS0-3:徐薯 18 接种甘薯长喙壳菌当天的 3 个重复;S1-1、S1-2、S1-3:徐薯 18 接种甘薯长喙壳菌 1 d 的 3 个重复;S3-1、S3-2、S3-3:徐薯 18 接种甘薯长喙壳菌 3 d 的 3 个重复;S7-1、S7-2、S7-3:徐薯 18 接种甘薯长喙壳菌 7 d 的 3 个重复;CKR0-1、CKR0-2、CKR0-3:南京 92 接种甘薯长喙壳菌当天的 3 个重复;R1-1、R1-2、R1-3:南京 92 接种甘薯长喙壳菌 1 d 的 3 个重复;R3-1、R3-2、R3-3:南京 92 接种甘薯长喙壳菌 3 d 的 3 个重复;R7-1、R7-2、R7-3:南京 92 接种甘薯长喙壳菌 7 d 的 3 个重复。

图 7 候选效应在甘薯长喙壳菌接种徐薯 18 和南京 92 后不同时间点的表达变化

Fig.7 Expression dynamics of candidate effectors at different time points after inoculation of *Ceratocystis fimbriata* on Xushu 18 and Nanjing 92

萄座腔菌 (*Botryosphaeria dothidea*)、范梦佳等^[30] 预测甘薯茎腐病病菌 (*Dickeya dadantii*) 及唐伟等^[31]

预测球甘薯间座壳菌 (*Diaporthe batatas*) 的效应子结果一致。PHI 数据库同源比对结果显示,超过1/3

的候选效应蛋白与已知毒力减弱的基因同源,表明这些效应蛋白在病原菌毒力形成中可能具有关键调节作用;此外,部分候选效应蛋白与毒力丧失或增强密切相关,进一步凸显了这些效应子在调控病原菌毒力过程中的潜在重要性。这一结果与吴佳椰露等^[18]分析茄腐镰孢菌(*Fusarium solani*)效应子的研究结果相似。

本研究通过转录组分析,系统比较了感病品种徐薯 18 和抗病品种南京 92 在甘薯长喙壳菌侵染下候选效应子的表达模式。与刘思珍等^[32]关于不同品种辣椒抗病性的比较研究结果类似,本研究系统揭示了甘薯黑斑病菌甘薯长喙壳菌效应子在不同宿主背景下的表达动态及潜在功能分化,反映出病原真菌通过精细调控特定效应子实现对寄主免疫的适应与调节。其中,接种于徐薯 18 的甘薯长喙壳菌特异高表达的效应子 CFIMG_003448RA 被注释为 β -1,3(4)-内切葡聚糖酶,CFIMG_008187RA00001 和 CFIMG_002033RA 分别被注释为纤维二糖脱氢酶与 β -葡糖苷酶,均可能通过细胞壁多糖的降解破坏宿主结构屏障,增强初期侵染能力。相较之下,接种于南京 92 的甘薯长喙壳菌特异高表达的 CFIMG_003902RA 被注释为坏死诱导蛋白(NPP1),可能诱导宿主细胞程序性死亡,但也有可能被宿主识别为典型 ETI 激活因子。此外,CFIMG_004605RA 和 CFIMG_002318RA 分别含有典型的 LysM 结构域和 CVNH 结构域,前者已在多种植物病原真菌中被证实能结合几丁质、屏蔽 PAMP 信号、抑制 PTI 反应^[33-34],后者则可能通过特异性识别碳水化合物残基干扰宿主免疫识别过程,类似稻瘟病菌中 MGG_03307 蛋白在附着胞阶段的功能^[35]。该类结构域蛋白的表达特异性提示其可能为重要的宿主-病原菌互作界面调控因子。此外,还有一些表达显著但功能未知的效应子(如 CFIMG_003243RA、CFIMG_007714RA00001)目前尚无明确结构域注释,但在病原侵染关键阶段表达活跃,提示其可能具有尚未解析的致病功能,需通过后续的结构预测与靶点互作试验进一步明确其生物学作用。

4 结论

本研究基于甘薯长喙壳菌全基因组水平的生物信息学预测,系统筛选出 93 个候选效应子,并结合对接种于不同甘薯品种的甘薯长喙壳菌在接种后多个时间点转录组数据的表达分析,揭示了关键效应

子在不同宿主背景下的表达差异及其与细胞壁降解、免疫逃逸、细胞死亡等致病机制的潜在关联。这一“预测-验证”结合的策略不仅能够深化对甘薯长喙壳菌致病机制的理解,也为甘薯抗病性研究与靶向抗性育种提供了重要的理论基础和基因资源。

参考文献:

- [1] EL SHEIKHA A F, RAY R C. Potential impacts of bioprocessing of sweet potato: review[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2017, 57(3): 455-471.
- [2] AKOETEY W, BRITAIN M M, MORAWICKI R O. Potential use of byproducts from cultivation and processing of sweet potatoes[J]. *Ciência Rural*, 2017, 47(5): 20160610.
- [3] SUN Y, LI M Q, WANG Y S, et al. *Ceratocystis fimbriata* employs a unique infection strategy targeting peltate glandular trichomes of sweetpotato (*Ipomoea batatas*) plants[J]. *Phytopathology*, 2020, 110(12): 1923-1933.
- [4] LIU M, MENG Q C, WANG S, et al. Research progress on post-harvest sweet potato spoilage fungi *Ceratocystis fimbriata* and control measures[J]. *Food Bioscience*, 2023, 53: 102627.
- [5] VAN ESSE H P, REUBER T L, VAN DER DOES D. Genetic modification to improve disease resistance in crops[J]. *The New Phytologist*, 2020, 225(1): 70-86.
- [6] BIGINI V, CAMERLENGO F, BOTTICELLA E, et al. Biotechnological resources to increase disease-resistance by improving plant immunity: a sustainable approach to save cereal crop production[J]. *Plants*, 2021, 10(6): 1146.
- [7] ZHANG Y, LI T J, XU M J, et al. Antifungal effect of volatile organic compounds produced by *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* SPS-41 on oxidative stress and mitochondrial dysfunction of *Ceratocystis fimbriata*[J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2021, 173: 104777.
- [8] 杨晓倩,张立春,李奕文,等. 植物病原菌效应子的研究进展[J]. *中国科学:生命科学*, 2020, 50(2): 227-236.
- [9] 张美祥,杨超,刘俊. 植物病原菌效应子[J]. *科学通报*, 2023, 68(36): 4895-4917.
- [10] KAMOUN S. A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2006, 44: 41-60.
- [11] GASSMANN W, BHATTACHARIEE S. Effector-triggered immunity signaling: from gene-for-gene pathways to protein-protein interaction networks[J]. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 2012, 25(7): 862-868.
- [12] 郑向,段左平,张杰,等. 大豆疫霉菌效应子研究进展[J]. *生物技术通报*, 2022, 38(11): 10-20.
- [13] PRASAD P, SAVADI S, BHARDWAJ S C, et al. Rust pathogen effectors: perspectives in resistance breeding[J]. *Planta*, 2019, 250(1): 1-22.

- [14] SPERSCHNEIDER J, DODDS P N, GARDINER D M, et al. Advances and challenges in computational prediction of effectors from plant pathogenic fungi [J]. PLoS Pathogens, 2015, 11 (5): 1004806.
- [15] 许 停, 刘太国, 高 利, 等. 小麦矮腥黑粉菌 *g9890* 基因编码效应蛋白的生物信息学分析及亚细胞定位[J]. 植物保护学报, 2023, 50(4): 866-872.
- [16] 王辉灵, 韩会玲, 王晓晗, 等. 基于全基因组预测和分析花生果腐病原菌分泌蛋白[J]. 四川农业大学学报, 2024, 42(1): 11-18, 38.
- [17] 翟思琪, 牛树启, 付 媛, 等. 灰葡萄孢全基因组效应因子的预测与分析[J]. 河北农业大学学报, 2024, 47(3): 78-84.
- [18] 吴佳椰露, 傅艺炜, 包崇来, 等. 茄腐镰孢菌分泌蛋白与效应子的预测分析[J]. 植物病理学报, 2025, 55(1): 32-46.
- [19] 张丽勃, 段 可, 邹小花, 等. 草莓胶孢炭疽菌 CFEM 候选效应子的生物信息学鉴定及其侵染过程中的转录分析[J]. 植物保护, 2017, 43(5): 43-51.
- [20] LIU Y, ZHANG Y M, TANG Y, et al. The evolution of plant NLR immune receptors and downstream signal components[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2023, 73: 102363.
- [21] BOLLER T, HE S Y. Innate immunity in plants; an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens[J]. Science, 2009, 324(5928): 742-744.
- [22] HAEGEMAN A, MANTELIN S, JONES J T, et al. Functional roles of effectors of plant-parasitic nematodes[J]. Gene, 2012, 492(1): 19-31.
- [23] ZHANG Y, ZHANG K, FANG A F, et al. Specific adaptation of *Ustilaginoidea virens* in occupying host florets revealed by comparative and functional genomics[J]. Nature Communications, 2014, 5: 3849.
- [24] 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: 126.
- [25] 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.
- [26] 曹言勇, 张立立, 李慧敏, 等. 玉米茎腐病致病菌全基因组分泌蛋白预测与分析[J]. 玉米科学, 2024, 32(4): 110-118.
- [27] 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): 549-560.
- [28] 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.
- [29] 臧 睿, 宋璐璐, 尹新明, 等. 葡萄座腔菌 (*Botryosphaeria dothidea*) 全基因组分泌蛋白的预测及功能分析[J]. 植物病理学报, 2021, 51(4): 559-571.
- [30] 范梦佳, 丁夏威, 汤法江, 等. 甘薯茎腐病菌 (*Dickeya dadantii*) 效应子的预测及比较分析[J]. 江苏农业科学, 2025, 53(6): 76-82.
- [31] 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.
- [32] 刘思珍, 欧阳超, 满益龙, 等. 辣椒胶孢炭疽菌 CFEM 效应因子鉴定及转录组分析[J]. 南京农业大学学报, 2021, 44(6): 1074-1082.
- [33] GONG X D, HAN D, ZHANG L, et al. Comprehensive analysis of the LysM protein family and functional characterization of the key LysM effector StLysM1, which modulates plant immunity in *Setosphaeria turcica* [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2025, 24(5): 1860-1874.
- [34] KOMBRINK A, THOMMA B P H J. LysM effectors: secreted proteins supporting fungal life [J]. PLoS Pathogens, 2013, 9(12): 1003769.
- [35] KOHARUDIN L M I, VISCOMI A R, MONTANINI B, et al. Structure-function analysis of a CVNH-LysM lectin expressed during plant infection by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* [J]. Structure, 2011, 19(5): 662-674.

(责任编辑:黄克玲)