

杨 艺,柯甫志,聂振朋,等. 柑橘间座壳菌全基因组非经典分泌蛋白预测及致病相关性分析[J]. 江苏农业学报, 2026, 42 (7) : 1360-1369.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2026.07.007

柑橘间座壳菌全基因组非经典分泌蛋白预测及致病相关性分析

杨 艺, 柯甫志, 聂振朋, 王罗云, 崔长江, 黄 秀, 蒲占滑, 徐建国, 孙立方
(浙江省农业科学院/浙江省柑橘研究所/国家柑橘品种改良中心浙江分中心, 浙江 台州 318020)

摘要: 由柑橘间座壳菌 (*Diaporthe citri*) 诱导的黑点病是全球柑橘生产面临的重要病害之一, 严重降低了柑橘的外观品质和经济价值。分泌蛋白参与病原菌致病过程, 但目前相关研究多关注经典分泌蛋白, 而对非经典分泌蛋白知之甚少。本研究基于柑橘间座壳菌全基因组序列, 分别利用 TMHMM 2.0、WoLF PSORT、SignalP 5.0、SecretomeP-1.0、dbCAN、eggNOG-mapper 和 PHI-BLAST 等生物信息学工具, 开展非经典分泌蛋白的预测及功能分析, 并利用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应 (qRT-PCR) 对其中 11 个候选基因在柑橘间座壳菌侵染过程中的转录水平进行分析。结果表明, 从柑橘间座壳菌全基因组编码的 15 761 个蛋白质中预测到 302 个候选非经典分泌蛋白, 其中, 11 个为潜在的致病力增强非经典分泌蛋白。qRT-PCR 验证结果表明, 2 个候选基因 (*INS49_010083* 和 *INS49_015019*) 在柑橘间座壳菌侵染感病种质鸡尾葡萄柚果实过程中显著上调表达, 推测它们可能参与柑橘间座壳菌致病过程。本研究结果为开展柑橘间座壳菌致病机制研究及柑橘抗黑点病种质精准培育奠定理论依据。

关键词: 柑橘间座壳菌; 柑橘黑点病; 非经典分泌蛋白; 致病基因

中图分类号: S436.66 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2026)07-1360-10

Genome-wide prediction and pathogenic analysis of non-classical secreted proteins of *Diaporthe citri*

YANG Yi, KE Fuzhi, NIE Zhenpeng, WANG Luoyun, CUI Changjiang, HUANG Xiu, PU Zhanxu, XU Jianguo, SUN Lifang

(Zhejiang Academy of Agricultural Sciences/Citrus Research Institute of Zhejiang Province/Zhejiang Branch of National Citrus Variety Improvement Center, Taizhou 318020, China)

Abstract: Citrus melanose, caused by *Diaporthe citri*, is one of the important diseases affecting citrus cultivation worldwide, which significantly reduces the appearance quality and economic value of citrus. Secretory proteins play crucial roles in the pathogen infection process. However, current research mainly focuses on classical secretory proteins, with limited

attention paid to non-classical secretory proteins. In this study, based on the whole-genome sequence of *D. citri*, non-classical secreted proteins were predicted by using TMHMM 2.0, WoLF PSORT, SignalP 5.0 and SecretomeP-1.0, and their functional annotations were analyzed by using dbCAN, eggNOG-mapper and PHI-BLAST. Moreover, the transcription levels of 11 candidate genes during *D. citri* infection were analyzed by using quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR). The results showed that 302 candidate non-

收稿日期: 2025-08-21

基金项目: 浙江省农业新品种选育重大专项 (2021C02066-1); 浙江省农业重大技术协同推广计划项目 (2024ZDXT04-1); 国家重点研发计划项目 (2024YFD2300804); 国家现代农业 (柑橘) 产业技术体系项目 (CARS-26)

作者简介: 杨 艺 (1995-), 女, 江西南昌人, 博士, 助理研究员, 主要从事柑橘品质分子育种研究。 (E-mail) jiayouziyi@126.com

通讯作者: 孙立方, (E-mail) sun6286855@126.com

classical secretory proteins were predicted from the 15 761 encoded proteins, of which 11 were potential virulence-enhancing proteins. Additionally, two candidate genes (*INS49_010083* and *INS49_015019*) were significantly upregulated during the infection of fruits of the susceptible germplasm Cocktail grapefruit by *Diaporthe citri*, suggesting that they may be involved in the pathogenic process of *D. citri*. These results provide a theoretical basis for elucidating the pathogenic mechanisms of *D. citri* and conducting precision breeding of citrus varieties resistant to citrus melanose.

Key words: *Diaporthe citri*; citrus melanose; non-classical secreted proteins; disease-causing gene

柑橘为芸香科(Rutaceae)柑橘属(*Citrus*)多年生木本植物,是全球栽培面积最大、经济价值极高的特色果树之一。由柑橘间座壳菌(*Diaporthe citri*)感染所致的黑点病(俗称砂皮病)是柑橘生产中危害严重的真菌性病害。该病原菌主要以分生孢子侵染植株幼嫩叶片、新梢及果实,在新梢展叶期易造成叶片受害,于果实成熟期及采后贮藏期侵染果面,严重降低果实商品价值并造成巨大经济损失。生产中几乎所有柑橘主要栽培品种及其近缘种金柑均对柑橘间座壳菌表现感病。因此,解析柑橘间座壳菌的致病机制已成为柑橘抗黑点病种质精准创制与抗病育种亟待解决的关键问题。

研究结果表明,分泌蛋白在病原菌与寄主植物互作过程中发挥重要作用^[1-2]。根据分泌途径的差异,可将分泌蛋白分为两类,一类为非经典分泌蛋白,其N端无信号肽,通过其他非经典途径进行分泌;另一类为经典分泌蛋白,其N端有信号肽,无跨膜结构域,胞外分泌,无GPI锚定位,通过信号肽引导合成的多肽进入细胞内部,利用内质网、高尔基体途径进行分泌。目前,人们已对经典分泌蛋白的致病机制开展了大量研究,如抑制寄主免疫信号通路^[3-4]、干扰寄主生理生化过程^[5-6]、影响寄主靶标蛋白的亚细胞定位^[7-9]、调控寄主基因转录过程^[10]、靶向寄主免疫相关分子^[11]等,而对非经典分泌蛋白的研究相对较少。邢启凯等^[12]对可可毛色二孢菌(*Lasiodiplodia theobromae*)开展了非经典分泌蛋白预测,并利用实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(qRT-PCR)鉴定到10个潜在致病性非经典分泌蛋白。王春庆^[13]对黄龙病菌分泌蛋白开展了经典分泌蛋白和非经典分泌蛋白预测,筛选出2个基因作为黄龙病害检测靶点。沈盼^[14]研究发现,黄龙病菌非经典分泌蛋白SECP11和SECP12可抑制BAX蛋白和INF1蛋白诱导的烟草过敏性坏死。Ridout等^[15]研究发现,白粉病菌(*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*)非经典分泌蛋白Avrk1和Avra10可激活大

麦防御反应。棉花大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)非经典分泌蛋白VdAcb1可通过调控病原菌对果胶的利用影响其致病性,而VdTrx1蛋白则通过参与活性氧清除及硫同化过程调节其毒力^[16-17]。稻曲病菌(*Ustilaginoidea virens*)非经典分泌蛋白UvChi2通过与水稻自噬相关蛋白OsATG8b竞争性结合自噬受体蛋白OsATI1,从而干扰水稻免疫反应^[18]。番茄大丽轮枝菌非经典分泌蛋白VdIsc1^[19]、大豆疫霉(*Phytophthora sojae*)非经典分泌蛋白PsIsc1^[19]、橡胶树白粉菌(*Erysiphe quercicola*)非经典分泌蛋白EqCmu和EqPDT^[20]通过影响植物体内水杨酸(SA)合成,进而干扰植物免疫反应。上述研究结果表明,非经典分泌蛋白可能参与植物与病原菌互作过程。

在柑橘间座壳菌分泌蛋白相关研究中,Gai等^[21]利用SignalP 5.0对柑橘间座壳菌的基因组数据进行经典分泌蛋白分析,并开展病原菌与寄主互作相关基因和碳水化合物活性酶预测。刘翔宇^[22]对柑橘间座壳菌NFHF-8-4菌株进行基因组测序,并从14个候选经典效应蛋白中鉴定到1个致病蛋白DcNLP5。该蛋白可通过与DcNLP2和DcNLP4竞争性结合柑橘靶标蛋白CeRLP23,抑制柑橘对病原菌NLP蛋白的识别,进而介导致病。综上,非经典分泌蛋白在病原菌致病过程中发挥重要作用,但其在柑橘与柑橘间座壳菌互作中的功能尚未见报道。基于此,本研究利用TMHMM 2.0、WoLF PSORT、SignalP 5.0和Secretomp 1.0f等软件对柑橘间座壳菌进行非经典分泌蛋白的预测及其致病性分析,并利用qRT-PCR对候选基因在柑橘间座壳菌感染过程中的转录水平进行分析,挖掘潜在的致病基因。本研究旨在为开展柑橘间座壳菌致病机制研究及柑橘抗黑点病种质的精准培育提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 序列下载

从GenBank数据库中下载柑橘间座壳菌NF-

HF-8-4 菌株的全基因组数据。

1.2 非经典分泌蛋白的预测

利用 TMHMM 2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)^[23]、WoLF PSORT (<https://wolfpsort.hgc.jp/>)^[24]、SignalP 5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/>)^[25]和 SecretomeP-1.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SecretomeP-1.0/>)^[26]在线软件进行非经典分泌蛋白预测。

1.3 候选效应蛋白功能预测

利用 dbCAN 在线软件对候选效应蛋白中的碳水化合物活性酶 (CAZymes) 进行预测和功能注释^[27];利用 eggNOG-mapper 在线软件对候选效应蛋白进行 eggNOG-mapper 数据库注释^[28-29];利用基于 PHI-base 数据库的 PHI-BLAST 在线工具对候选效应蛋白进行同源比对与功能注释^[30]。

1.4 非经典分泌蛋白基因表达模式分析

基于柑橘间座壳菌 NFHF-8-4 菌株的全基因组数据,对材料与方法 1.3 中筛选到的毒力增强候选

基因进行定量 PCR 引物设计(表 1)。以柑橘间座壳菌侵染黑点病感病种质鸡尾葡萄柚果实后,分别取侵染 0 h、24 h、48 h、72 h、96 h 的样品,提取其 cDNA 作为反应模板^[22],应用 TB Green® Premix Ex Taq II (货号:RR820A,日本宝生物工程株式会社产品)和 CFX96 Real-Time PCR 仪(美国伯乐生命医学产品有限公司产品)进行实时荧光定量反应,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析柑橘间座壳菌编码非经典分泌蛋白基因的相对表达量。反应体系及具体操作步骤参考说明书进行。

1.5 非经典分泌蛋白的生物信息学分析

通过 NCBI Conserved Domains 工具对非经典分泌蛋白的保守结构域进行分析鉴定;在 NCBI 数据库中采用 BlastP 程序进行同源序列比对,获取不同物种中与目标蛋白同源性较高的序列;借助 MEGA 软件,采用邻接法、1 000 次 bootstrap 重复验证,构建系统进化树;通过 Uniprot 数据库对非经典分泌蛋白进行 GO 功能注释,明确其生物学功能。

表 1 柑橘间座壳菌 NFHF-8-4 菌株毒力增强候选基因 qRT-PCR 引物

Table 1 Primers for quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) of virulence-enhancing candidate genes from *Diaporthe citri* strain NFHF-8-4

引物名称	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
NCS1	CACGAATAGGACCTTCCTCAG	CGGTAAATGGAACAGGGAAGTA
NCS2	CAGAGCAACACAGGCTCTT	AGGCGTTGGACAACCTCTTTAT
NCS3	AAATCCGTGCTCGTCTTCAG	TCGGGACTTTCAGCGTATTG
NCS4	CCTGTGAGCATCGCTAATGT	GTGCTGTTGTAGGCGTTCATA
NCS5	CCAGACAGGGAGAACTCAAC	ATCTTATTCGACGCGGGATG
NCS6	TGATCTCTGGCTCATGTTG	CTATGTCGTATAGGGAGCTGAAG
NCS7	CTCTCGTTGGGCTTGATACC	CCACGAACCAGACTTGACTT
NCS8	CTGGGCTTCTGCTGTCTG	GGCAATGTCGTCTGTCG
NCS9	GACGTTGAGACACAGGTCAAG	CGCTCCTGTTTGTTCAGATGTA
NCS10	CATCATGCCATCAGCAGTAATC	ACGGCATGAACCTCATATCC
NCS11	GCGGAGTTCTATGGCTCTAATG	CGGCAAAGTGTCGTATTCT
DeActin	GGGATTGCCGTGTGCTACCTTACT	CGCGCTGCCAAAAGATGTGA

2 结果与分析

2.1 柑橘间座壳菌非经典分泌蛋白预测结果

本研究在柑橘间座壳菌 NFHF-8-4 菌株基因组中共鉴定到 15 761 个基因。从表 2 可知,在 15 761 个基因编码的蛋白质中 79.468% 的蛋白质氨基酸

序列无跨膜结构域。从图 1 可见,其主要定位于细胞核(29.73%)、细胞质(28.26%)、线粒体(19.59%)和胞外(14.48%)等 4 个区域。结合跨膜结构域与亚细胞定位分析,共筛选获得 1 814 个无跨膜结构域的胞外分泌蛋白候选,进一步对其进行 N-端信号肽预测,其中 501 个蛋白质氨基酸序列无信

号肽,1 313个序列具有信号肽。针对无信号肽蛋白质氨基酸序列进行预测分析,结果(图2)显示,302个为非经典分泌蛋白,序列长度为62 aa至1 046 aa。其中,氨基酸序列长度在301 aa至400 aa的蛋

白质最多,占比23.51%,氨基酸序列长度在101 aa至200 aa的蛋白质次之,占比为18.21%。上述结果表明,柑橘间座壳菌非经典分泌蛋白以小型蛋白质为主。

表 2 柑橘间座壳菌蛋白质氨基酸序列跨膜结构域分析

Table 2 Transmembrane domain analysis of *Diaporthe citri* proteins

蛋白质中跨膜 结构域数量	蛋白质数量 (个)	占比 (%)	蛋白质中跨膜 结构域数量	蛋白质数量 (个)	占比 (%)
0	12 525	79.468	12	186	1.180
1	1 146	7.271	13	48	0.305
2	300	1.903	14	39	0.247
3	195	1.237	15	7	0.044
4	215	1.364	16	2	0.013
5	165	1.047	17	3	0.019
6	194	1.231	18	2	0.013
7	205	1.301	20	2	0.013
8	120	0.761	23	1	0.006
9	96	0.609	26	1	0.006
10	176	1.117	42	1	0.006
11	132	0.838			

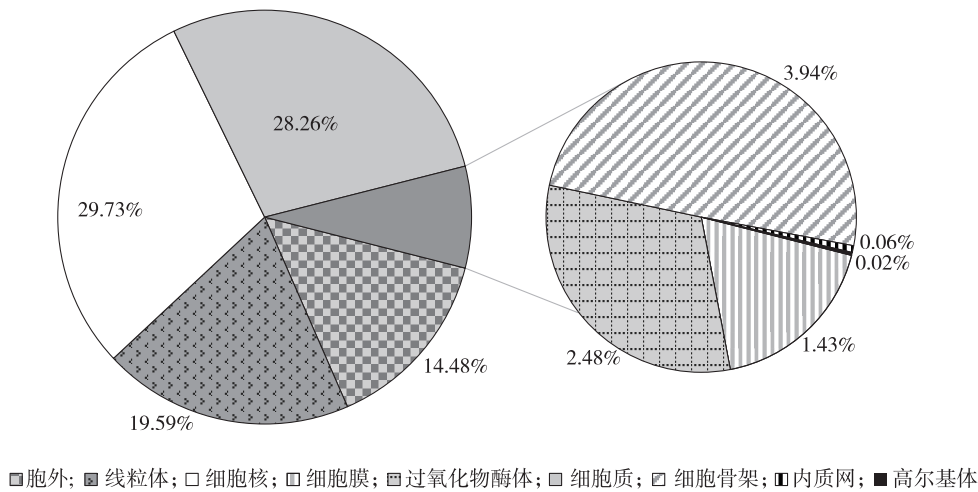


图 1 柑橘间座壳菌蛋白氨基酸序列亚细胞定位

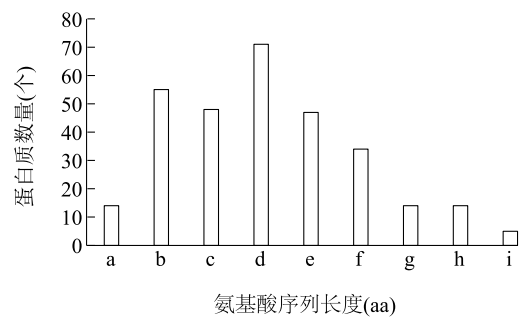
Fig.1 Subcellular localization of *Diaporthe citri* proteins based on amino acid sequence analysis

2.2 非经典分泌蛋白在植物细胞中的定位

从图3可见,302个候选非经典分泌蛋白中,44.70%定位于植物细胞质外体,蛋白质氨基酸序列长度以小于300 aa为主(占比达36.30%);55.30%候选蛋白定位于植物非质外体,蛋白质氨基酸序列长度以小于300 aa的为主(占比达39.52%),其次为301 aa至400 aa(占比为26.95%)。

2.3 非经典分泌蛋白的功能注释

非冗余蛋白氨基酸序列数据库(NR)注释结果表明,302个候选非经典分泌蛋白均为功能未知的假定蛋白。进一步利用eggNOG-mapper软件对候选非经典分泌蛋白进行同源基因簇(COG)功能注释,结果显示,共有201个蛋白质被注释到具体功能(图4)。其中,58个蛋白质属于S类(功能未知),52个蛋白质属



a: 0~100; b: 101~200; c: 201~300; d: 301~400; e: 401~500; f: 501~600; g: 601~700; h: 701~800; i: >800。

图2 柑橘间座壳菌非经典分泌蛋白氨基酸序列长度

Fig.2 Amino acid sequence lengths of non-classical secreted proteins in *Diaporthe citri*

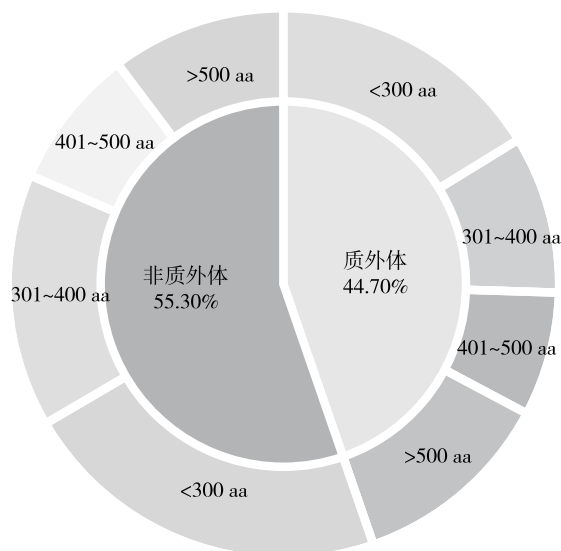


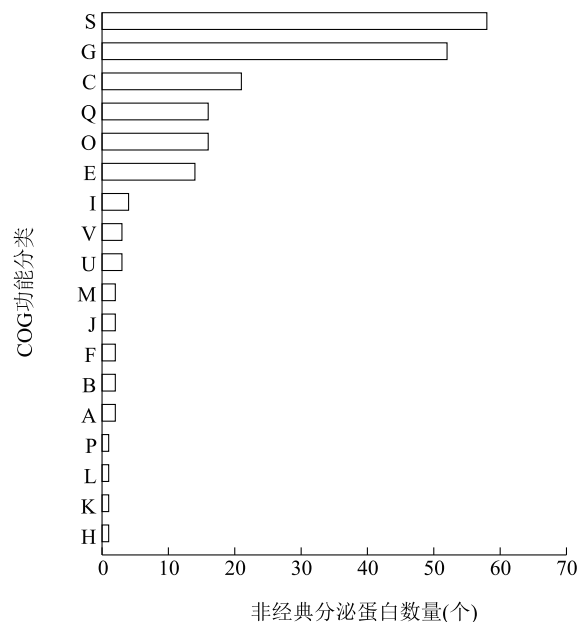
图3 柑橘间座壳菌非经典分泌蛋白在植物细胞中的定位

Fig.3 Localization of non-classical secreted proteins of *Diaporthe citri* in plant cells

于 G 类(碳水化合物转运与代谢),21 个蛋白质属于 C 类(能量生产与转化),14 个蛋白质属于 E 类(氨基酸转运与代谢),4 个蛋白质属于 I 类(脂质转运与代谢),此外,各有 16 个蛋白质属于 O 类(翻译后修饰、蛋白质周转、分子伴侣)和 Q 类(次级代谢产物生物合成、转运与分解),各有 3 个蛋白质属于 U 类(胞内运输、分泌与囊泡转运)和 V 类(防御机制),其他功能分类各有 1~2 个蛋白质。

2.4 非经典分泌蛋白致病功能

利用 CAZymes 软件从 302 个候选非经典分泌蛋白氨基酸序列中注释到 52 个碳水化合物活性酶,



S:功能未知;G:碳水化合物转运与代谢;C:能量产生与转化;Q:次级代谢物生物合成、转运与分解;O:翻译后修饰、蛋白质周转、分子伴侣;E:氨基酸转运与代谢;I:脂质转运与代谢;V:防御机制;U:胞内运输、分泌与囊泡转运;M:细胞壁/膜/包被生物合成;J:翻译、核糖体结构与生物发生;F:核苷酸转运与代谢;B:染色质结构与动态;A:RNA 加工与修饰;P:无机离子转运与代谢;L:复制、重组与修复;K:转录;H:辅酶转运与代谢。

图4 柑橘间座壳菌非经典分泌蛋白同源基因簇(COG)功能注释

Fig.4 Clusters of orthologous groups(COG) functional annotation of non-classical secreted proteins of *Diaporthe citri*

涉及 6 类(表 3),以糖苷水解酶(GH)类和辅助活性酶(AA)类为主,分别有 30 个和 16 个。本研究预测的碳水化合物活性酶中,存在 2 个多结构域蛋白质,分别同时含有 CBM 结构域与 GH 结构域、CBM 结构域与 CE 结构域。

PHI 数据库注释分析结果(表 4)显示,共有 300 个候选非经典分泌蛋白获得功能注释,其中与禾谷镰孢菌(*Fusarium graminearum*)比对到最多,共 55 条,其次为稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*),共 30 条。上述非经典分泌蛋白中,功能以毒力减弱(133 个)和不影响病原致病力(91 个)为主,共鉴定到 11 个蛋白质氨基酸序列为毒力增强类型,分别是 INS49_004152、INS49_006730、INS49_002733、INS49_006363、INS49_007942、INS49_006111、INS49_007653、INS49_002102、INS49_010083、INS49_015019 和 INS49_002531,其功能注释见表 5。

表 3 柑橘间座壳菌非经典分泌蛋白碳水化合物活性酶预测

Table 3 Prediction of carbohydrate-active enzymes in non-classical secreted proteins of *Diaporthe citri*

碳水化合物活性酶类型	家族类型及数量
辅助活性酶(AA)类	AA1(2 个), AA3(7 个), AA7(7 个)
碳水化合物脂酶(CE)类	CE2(1 个), CE16(2 个), CE18(1 个)
碳水化合物结合模块(CBM)类	CBM20(1 个), CBM87(1 个)
糖苷水解酶(GH)类	GH1(1 个), GH3(1 个), GH5_5(3 个), GH5_7(1 个), GH5_16(1 个), GH15(1 个), GH18(1 个), GH20(2 个), GH27(1 个), GH28(1 个), GH39(1 个), GH43_26(1 个), GH43_29(1 个), GH53(1 个), GH65(1 个), GH71(1 个), GH76(1 个), GH78(1 个), GH79(1 个), GH81(1 个), GH92(2 个), GH106(2 个), GH128(1 个), GH131(1 个), GH152(1 个)
糖苷转移酶(GT)类	GT69(1 个)
多糖裂解酶(PL)类	PL42(1 个)

表 4 柑橘间座壳菌非经典分泌蛋白致病功能预测

Table 4 Pathogenicity-related functional annotation of non-classical secreted proteins in *Diaporthe citri*

功能类型	蛋白质数量(个)
毒性增强	11
毒性减弱	133
未受影响的致病性	91
效应物	14
致病性丧失	10
致病	6
功能多样	35

2.5 编码非经典分泌蛋白的基因表达模式

为进一步明确 11 个毒力增强类型的候选基因在柑橘间座壳菌致病过程中的作用,利用 qRT-PCR 对上述基因在柑橘间座壳菌侵染过程的转录表达水平进行分析。结果(图 5)显示, *INS49_002733*、*INS49_006363*、*INS49_007942* 和 *INS49_002102* 在柑橘间座壳菌侵染过程中呈现低水平转录表达。其中, *INS49_002733* 在柑橘间座壳菌侵染期间呈先降后升的表达趋势,96 h 时显著上调表达; *INS49_006363* 在柑橘间座壳菌侵染 0~72 h 转录水平无显著差异,96 h 时显著上调达到峰值; *INS49_007942* 和 *INS49_002102* 在柑橘间座壳菌侵染期间呈现先升后降再小幅回升的表达趋势,24 h 时表达达到峰值。与之不同的是, *INS49_010083* 和 *INS49_015019* 在柑橘间座壳菌侵染过程中持续高表达,且不同侵染时间基因表达水平

差异较大,与 0 h 相比,其转录水平最大差异倍数均出现在 72 h,差异倍数分别为 12.91 倍和 23.17 倍。其余 5 个基因(*INS49_004152*、*INS49_006730*、*INS49_006111*、*INS49_007653* 和 *INS49_002531*)在柑橘间座壳菌侵染过程中均未检测到表达。综上推测, *INS49_010083* 和 *INS49_015019* 可能参与柑橘间座壳菌的致病过程。

2.6 非经典分泌蛋白的生物信息学分析

INS49_010083 基因的开放阅读框为 984 bp,编码 327 个氨基酸,包含 1 个 DHAPS-like 保守结构域(cd00408)(图 6A); *INS49_015019* 基因的开放阅读框为 744 bp,编码 247 个氨基酸,包含 1 个 carb_red_sniffer_like_SDR_c 保守结构域(cd05325)(图 6B)。GO 注释结果显示, *INS49_010083* 可能发挥 4-羟基二苯丙酮合酶活性; *INS49_015019* 可能发挥以 NAD/NADP 为受体,作用于 CH-OH 基团的氧化还原酶活性。系统进化分析结果(图 7)显示, *INS49_010083* 与扁桃间座壳菌(*Diaporthe amygdali*)未知蛋白 N8I77_012632(KAK2597877.1)和普通间座壳菌(*Diaporthe eres*)未知蛋白 LA080_000860(KAI7779478.1)的亲缘关系较近(图 7A),蛋白质同源性分别为 74.42% 和 96.94%。 *INS49_015019* 与普通间座壳菌(*Diaporthe eres*)未知蛋白 SLS63_009478(KAK7721695.1)、未知蛋白 SLS64_007713(KAK7706373.1)以及南非洲间座壳菌(*Diaporthe australafricana*)未知蛋白 Daus18300_012937(KAL1850403.1)的亲缘关系较近(图 7B),蛋白质同源性分别为 88.66%、59.51% 和 80.88%。

表 5 柑橘间座壳菌致病相关基因编码的非经典分泌蛋白的功能注释

Table 5 Functional annotation of non-classical secreted proteins encoded by pathogenicity-related genes in *Diaporthe citri*

基因	编码的非经典分泌蛋白				
	氨基酸序列长度 (aa)	亚细胞定位	碳水化合物活性酶	功能	同源基因簇功能注释
<i>INS49_004152</i>	788	质外体	<i>GH78</i>	毒性增强	S
<i>INS49_006730</i>	154	质外体	—	毒性增强	—
<i>INS49_002733</i>	546	质外体	<i>GH79</i>	毒性增强	G
<i>INS49_006363</i>	519	质外体	<i>GH43_29</i>	毒性增强	G
<i>INS49_007942</i>	163	非质外体	—	毒性增强	—
<i>INS49_006111</i>	290	非质外体	—	毒性增强	Q
<i>INS49_007653</i>	218	非质外体	—	毒性增强	—
<i>INS49_002102</i>	62	非质外体	—	毒性增强	—
<i>INS49_010083</i>	327	非质外体	—	毒性增强	E
<i>INS49_015019</i>	247	非质外体	—	毒性增强	Q
<i>INS49_002531</i>	767	质外体	—	毒性增强	S

S、G、Q、E 见图 4 注,—表示未注释到相关碳水化合物活性酶或同源基因簇功能。

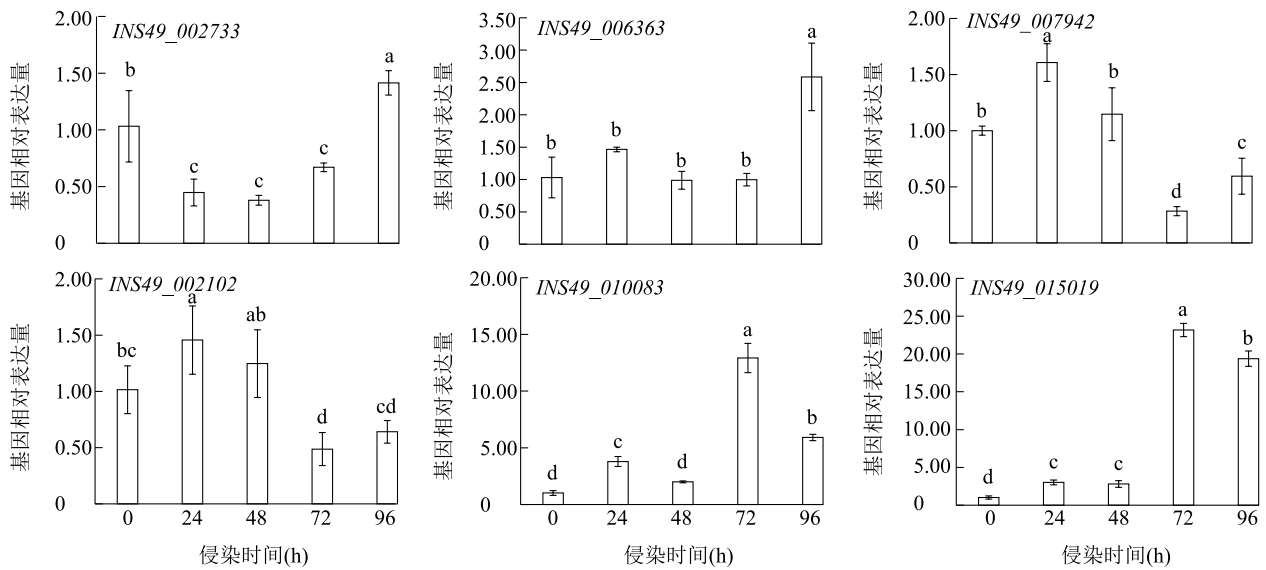


图 5 柑橘间座壳菌侵染过程中基因表达模式
Fig.5 Gene expression patterns during *Diaporthe citri* infection

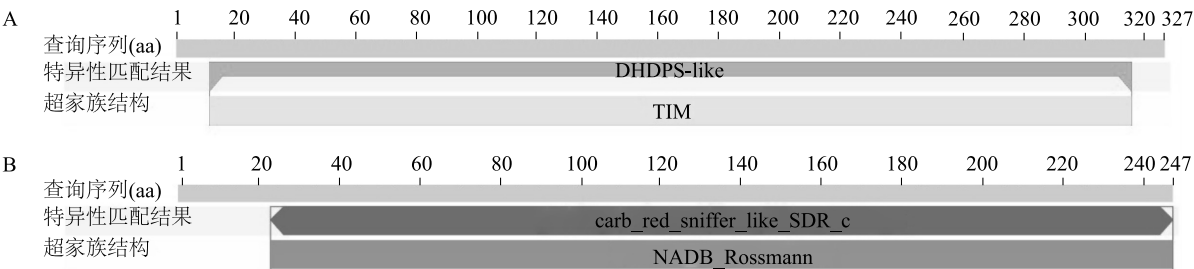
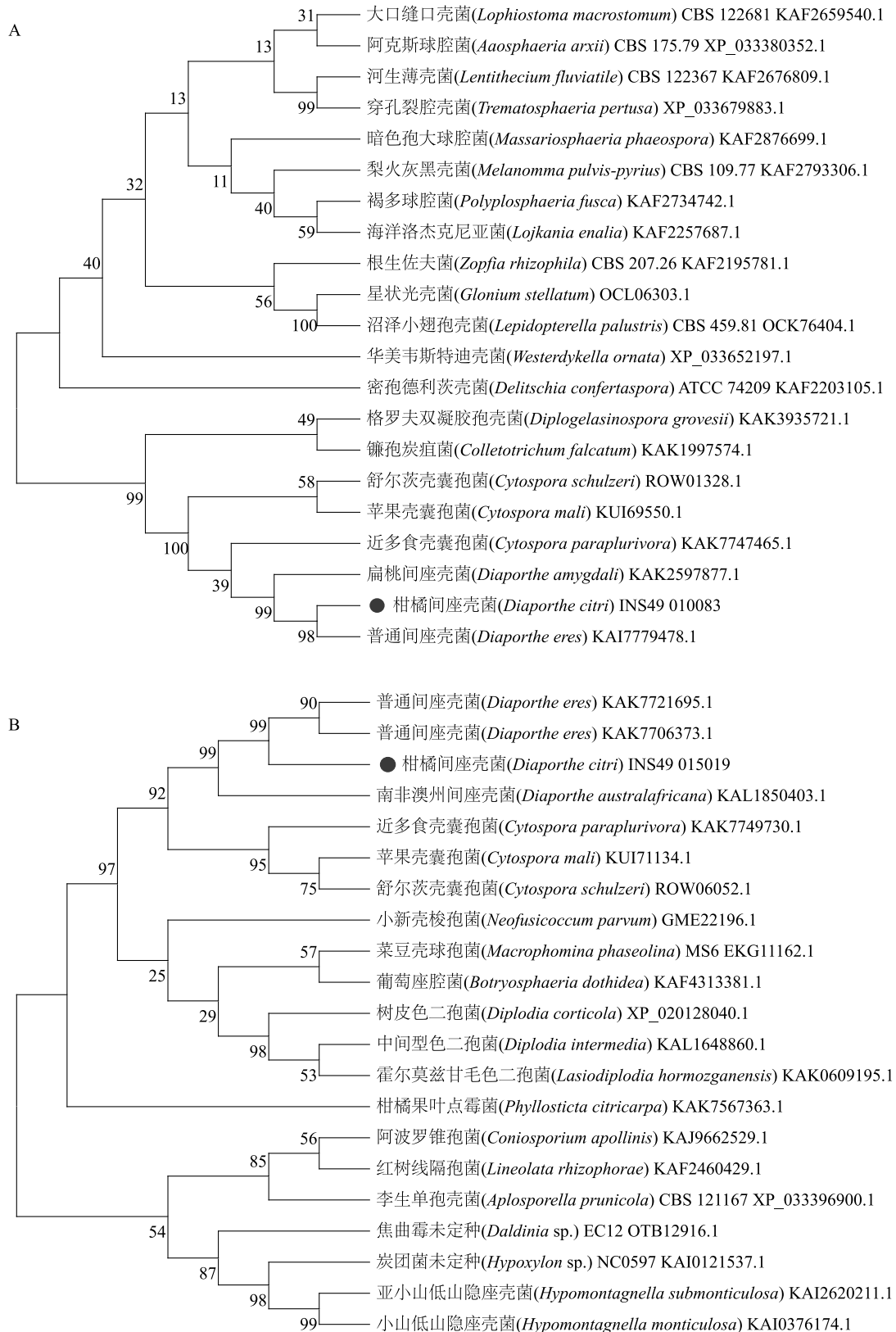


图 6 非经典分泌蛋白保守结构域
Fig.6 Conserved domains of non-classical secreted proteins



A:INS49_010083 蛋白系统发育分析;B:INS49_015019 蛋白系统发育分析。

图 7 非经典分泌蛋白系统发育分析

Fig.7 Phylogenetic analysis of non-classical secreted proteins

3 讨论

分泌蛋白在病原菌侵染、繁殖和抑制寄主植物的免疫反应过程中发挥重要作用^[31-32]。近年来,随着高通量测序技术的快速发展和生物信息学技术的不断创新,利用基因组学数据预测和鉴定病原菌的分泌蛋白及致病因子已成为病原菌-植物互作研究的重要内容。本研究基于柑橘间座壳菌 NFHF-8-4 菌株全基因组数据,鉴定到 302 个候选非经典分泌蛋白,均为未知功能蛋白质,占全基因组预测蛋白质总数的 1.92%,这一数据与可可毛色二孢菌非经典分泌蛋白占比相似(1.84%)^[12],但远低于橡胶树白粉菌非经典分泌蛋白占比(29.64%~35.10%)^[20]和菜豆根瘤菌非经典分泌蛋白占比(9.99%)^[33]。

基于柑橘间座壳菌全基因组数据,Gai 等^[21]利用 SignalP 5.0 工具对其进行了含信号肽分泌蛋白的筛选,刘翔宇^[22]利用 EffectorP 3.0 工具对分泌蛋白进行了预测分析,然而,由于缺乏跨膜结构域、GPI 锚定位点、亚细胞定位等序列特征分析,柑橘间座壳菌经典或非经典分泌蛋白的信息相对模糊。本研究利用 TMHMM 2.0、WoLF PSORT、SignalP 5.0 等生物信息学工具共筛选到 302 个非经典分泌蛋白。其分泌部位以非质外体为主,说明柑橘间座壳菌大部分非经典分泌蛋白可能通过某种途径进入柑橘细胞内发挥作用。

病原菌通过分泌细胞壁降解酶及致病效应蛋白促进自身侵染。本研究中,对柑橘间座壳菌 302 个非经典分泌蛋白进行 COG 功能注释,发现除未知功能(S)分类外,以 G 类(碳水化合物转运与代谢)中的非经典分泌蛋白数量最多(25.87%),主要涉及单宁酶、纤维素酶、碳水化合物活性酶(糖基水解酶、糖苷水解酶)等,可能参与植物细胞壁组分的降解、病原菌侵入及定殖过程^[34]。已有研究结果表明,碳水化合物活性酶参与碳水化合物的合成、降解及识别过程,其中,糖苷水解酶、多糖裂解酶、碳水化合物酯酶等酶类在植物细胞壁的降解过程发挥重要作用^[35]。本研究从柑橘间座壳菌非经典分泌蛋白中共鉴定到 52 个碳水化合物活性酶,以糖苷水解酶(30 个)和辅助活性酶(16 个)两大类为主。碳水化合物活性酶的多样性可能有助于增加柑橘间座壳菌的寄主适应性,促进其在柑橘属植物上的定殖。进一步利用 PHI 数据库对柑橘间座壳菌非经典分泌

蛋白进行致病效应蛋白预测,从中筛选到 11 个毒力增强型蛋白,其中,编码 INS49_010083 和 INS49_015019 蛋白的基因在柑橘间座壳菌侵染鸡尾葡萄柚果实过程中持续高表达,可能与柑橘间座壳菌致病性相关。后续研究可围绕基因 *INS49_010083* 和 *INS49_015019* 在柑橘间座壳菌侵染过程中的具体分子机制展开,并进一步挖掘其在柑橘中的互作靶标蛋白,为柑橘抗黑点病分子育种提供理论依据与研究基础。

4 结论

本研究基于柑橘间座壳菌 NFHF-8-4 菌株全基因组信息,利用生物信息学技术开展了非经典分泌蛋白预测及致病相关性分析,明确了非经典分泌蛋白特征、分布、碳水化合物活性酶组成及功能,并通过 qRT-PCR 对候选基因的表达模式进行了分析,筛选到 2 个可能与柑橘间座壳菌致病相关的非经典分泌蛋白。本研究结果为进一步解析柑橘间座壳菌非经典分泌蛋白功能提供了重要参考,也为柑橘间座壳菌致病机理研究及柑橘抗黑点病种质精准培育奠定理论基础。

参考文献:

- [1] Nimchuk Z, Eulgem T, Holt Iii B F, et al. Recognition and response in the plant immune system[J]. Annual Review of Genetics, 2003, 37: 579-609.
- [2] Rodriguez-Moreno L, Ebert M K, Bolton M D, et al. Tools of the crook- infection strategies of fungal plant pathogens[J]. The Plant Journal, 2018, 93(4): 664-674.
- [3] Djamei A, Schipper K, Rabe F, et al. Metabolic priming by a secreted fungal effector[J]. Nature, 2011, 478(7369): 395-398.
- [4] Liu C Y, Han L B, Wen Y H, et al. The *Magnaporthe oryzae* effector MoBys1 suppresses rice immunity by targeting *OsCAD2* to manipulate host jasmonate and lignin metabolism[J]. New Phytologist, 2025, 246(1): 280-297.
- [5] Wang H, Gao X, Kong Y X, et al. *Puccinia striiformis* effector PNPI suppresses *TaIAA14* expression to inhibit host cell death response[J]. Molecular Plant Pathology, 2025, 26(2): 70063.
- [6] Fu M Y, Zhou Y Y, Zhang X, et al. A pathogen effector HaRxL10 hijacks the circadian clock component CHE to perturb both plant development and immunity[J]. Nature Communications, 2025, 16: 1538.
- [7] Mclellan H, Boevink P C, Armstrong M R, et al. An RxLR effector from *Phytophthora infestans* prevents re-localisation of two plant NAC transcription factors from the endoplasmic reticulum to the

- nucleus[J]. *PLoS Pathogens*, 2013, 9(10):1003670.
- [8] Lyu X L, Shen C C, Fu Y P, et al. A small secreted virulence-related protein is essential for the necrotrophic interactions of *Sclerotinia sclerotiorum* with its host plants[J]. *PLoS Pathogens*, 2016, 12(2):1005435.
- [9] Qi T, Guo J, Liu P, et al. Stripe rust effector PstGSRE1 disrupts nuclear localization of ROS-promoting transcription factor TaLOL2 to defeat ROS-induced defense in wheat[J]. *Molecular Plant*, 2019, 12(12):1624-1638.
- [10] Ahmed M B, Dos Santos K C G, Sanchez I B, et al. A rust fungal effector binds plant DNA and modulates transcription[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8:14718.
- [11] Yang G G, Tang L G, Gong Y D, et al. A cerato-platanin protein SsCP1 targets plant PR1 and contributes to virulence of *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. *New Phytologist*, 2018, 217(2):739-755.
- [12] 邢启凯,王欣芳,彭军波,等. 可可毛色二孢菌全基因组非经典分泌蛋白的预测及致病相关性分析[J]. *植物病理学报*, 2024, 54(1):102-115.
- [13] 王春庆. 柑橘黄龙病菌分泌蛋白鉴定分析和检测技术开发[D]. 赣州:赣南师范大学, 2020.
- [14] 沈 盼. 柑橘黄龙病菌效应蛋白 SECP6 和 SECP8 功能研究[D]. 重庆:西南大学, 2023.
- [15] Ridout C J, Skamnioti P, Porritt O, et al. Multiple avirulence paralogues in cereal powdery mildew fungi may contribute to parasite fitness and defeat of plant resistance[J]. *The Plant Cell*, 2006, 18(9):2402-2414.
- [16] 孙维霞. 大丽轮枝菌胞外蛋白 VdAcb1 的非经典分泌特性及致病功能研究[D]. 曲阜:曲阜师范大学, 2021.
- [17] 庄 靖. 大丽轮枝菌硫氧还蛋白 VdTrx1 的非经典分泌特性和致病功能研究[D]. 曲阜:曲阜师范大学, 2023.
- [18] 秦 勤. 稻曲菌分泌蛋白 UvChi2 功能研究[D]. 武汉:华中农业大学, 2023.
- [19] Liu T L, Song T Q, Zhang X, et al. Unconventionally secreted effectors of two filamentous pathogens target plant salicylate biosynthesis[J]. *Nature Communications*, 2014, 5:4686.
- [20] 何其光. 橡胶树白粉菌两个非经典分泌型效应蛋白 EqCmu 和 EqPDT 功能分析[D]. 海口:海南大学, 2020.
- [21] Gai Y P, Xiong T, Xiao X E, et al. The genome sequence of the *Citrus* melanose pathogen *Diaporthe citri* and two *Citrus*-related *Diaporthe* species[J]. *Phytopathology*, 2021, 111(5):779-783.
- [22] 刘翔宇. 柑橘黑点病菌效应蛋白功能研究及黑点病绿色防控技术研发[D]. 武汉:华中农业大学, 2023.
- [23] Chen Y J, Yu P, Luo J C, et al. Secreted protein prediction system combining CJ-SPHMM, TMHMM, and PSORT[J]. *Mammalian Genome*, 2003, 14(12):859-865.
- [24] Horton P, Park K J, Obayashi T, et al. WoLF PSORT: protein localization predictor[J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35:585-587.
- [25] 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.
- [26] Bendtsen J D, Kiemer L, Fausbøll A, et al. Non-classical protein secretion in bacteria[J]. *BMC Microbiology*, 2005, 5(1):58.
- [27] Zheng J F, Ge Q W, Yan Y C, et al. dbCAN3: automated carbohydrate-active enzyme and substrate annotation[J]. *Nucleic Acids Research*, 2023, 51(1):115-121.
- [28] Cantalapiedra C P, Hernández-Plaza A, Letunic I, et al. eggNOG-mapper v2: functional annotation, orthology assignments, and domain prediction at the metagenomic scale[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, 38(12):5825-5829.
- [29] 李明瑾,霍建飞,韩长志,等. 辣椒炭疽病原菌中分泌蛋白的预测及特性分析[J]. *江苏农业学报*, 2025, 41(1):41-50.
- [30] Urban M, Cuzick A, Seager J, et al. PHI-base in 2022: a multi-species phenotype database for Pathogen-Host Interactions[J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(1):837-847.
- [31] 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.
- [32] 苏月贵,唐照磊,杜 青,等. 玉米穗腐病致病南方镰孢菌菌株 JX18-4 效应蛋白的预测及分析[J]. *江苏农业科学*, 2024, 52(23):124-128.
- [33] 张 武,潘 伟,马金田,等. 菜豆根瘤菌 *CFN42* 全基因组非经典分泌蛋白的预测与分析[J]. *大理学院学报*, 2015, 14(6):45-48.
- [34] Kim K T, Jeon J, Choi J, et al. Kingdom-wide analysis of fungal small secreted proteins (SSPs) reveals their potential role in host association[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7:186.
- [35] 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.

(责任编辑:黄克玲)