

## 研究报告

## 紫菜腐霉激发子基因家族特征及其在感染过程中的作用

刘聪<sup>1</sup>, 杜国英<sup>1</sup>, 唐磊<sup>1</sup>, 高天<sup>1</sup>, 唐祥海<sup>1</sup>, 莫照兰<sup>1</sup>, 茅云翔<sup>\*2</sup>

1 中国海洋大学海洋生命学院 海洋生物遗传学与育种教育部重点实验室, 山东 青岛 266003

2 海南热带海洋学院水产与生命学院 热带海洋生物资源利用与保护教育部重点实验室, 海南 三亚 572022

刘聪, 杜国英, 唐磊, 高天, 唐祥海, 莫照兰, 茅云翔. 紫菜腐霉激发子基因家族特征及其在感染过程中的作用[J]. 微生物学通报, 2022, 49(1): 139-152

Liu Cong, Du Guoying, Tang Lei, Gao Tian, Tang Xianghai, Mo Zhaolan, Mao Yunxiang. Characteristics of elicitor gene family of *Pythium porphyrae* and its role in infection[J]. Microbiology China, 2022, 49(1): 139-152

**摘要:**【背景】激发子(elicitin)是卵菌(*Oomycetes*)疫霉和腐霉分泌的可诱发宿主产生免疫反应的小分子化合物。【目的】鉴定紫菜腐霉激发子基因家族, 分析其结构特征和在感染宿主过程中可能的作用机制。【方法】运用同源比对法筛查紫菜腐霉 NBRC33253 基因组中激发子基因家族成员, 利用生物信息学工具分析激发子家族的理化性质和系统进化, 并结合转录组数据和 GO 功能注释, 探讨其在感染宿主过程中可能的作用机制。【结果】紫菜腐霉基因组中发现 22 个激发子基因家族成员, 其中, 17 个为胞外分泌蛋白, 4 个定位于质膜, 1 个锚定于高尔基体。紫菜腐霉激发子基因结构简单保守, 含有 1-2 个 CDS 序列, 每个成员基因编码的氨基酸数目介于 114-2 100 aa 之间, 等电点 PI 在 3.61-9.88 之间; 系统进化分析显示, 紫菜腐霉激发子家族成员存在扩张; 表达模式分析说明, 紫菜腐霉激发子在感染宿主后 6 个激发子基因表达量上调, 7 个激发子基因表达量下调, 推测可能具有多个生物学功能, 如 GO 功能注释到纤维素结合激发子凝集素(cellulose binding elicitor lectin, CBEL)和共生体对宿主防御相关程序性细胞死亡的调节过程。【结论】紫菜腐霉激发子基因家族结构保守, 均属于 ELL (elicitor-like)亚类, 可能具有纤维素结合激发子凝集素(CBEL)和加速宿主细胞程序性死亡的功能, 结合纤维素, 附着在宿主表面, 发挥蛋白激酶活性, 触发宿主 MAPK 信号传导通路介导的免疫反应, 促进 HR 细胞死亡。本研究为进一步解析紫菜腐霉的致病机制及紫菜抗病性状的遗传育种提供了理论基础。

**关键词:** 紫菜腐霉; 激发子; 赤腐病; 感染机制

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项基金(202064006); 农业农村部全国农业科研杰出人才及其创新团队项目

Supported by: Fundamental Research Funds for the Central Universities (202064006); Project of National Outstanding Talents and Innovative Teams in Agricultural Research of Ministry of Agriculture and Rural Affairs

\*Corresponding author: E-mail: yxmao@hntou.edu.cn

Received: 2021-05-13; Accepted: 2021-07-02; Published online: 2021-08-26

# Characteristics of elicitin gene family of *Pythium porphyrae* and its role in infection

LIU Cong<sup>1</sup>, DU Guoying<sup>1</sup>, TANG Lei<sup>1</sup>, GAO Tian<sup>1</sup>, TANG Xianghai<sup>1</sup>, MO Zhaolan<sup>1</sup>, MAO Yunxiang<sup>\*2</sup>

<sup>1</sup> Key Laboratory of Marine Genetics and Breeding (Ministry of Education), College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, Shandong, China

<sup>2</sup> Key Laboratory of Utilization and Conservation of Tropical Marine Bioresource (Ministry of Education), College of Fisheries and Life Science, Hainan Tropical Ocean University, Sanya 572022, Hainan, China

**Abstract:** [Background] Elicitin is small molecule compound secreted by the *Oomycetes Phytophthora* and *Pythium* that can induce immune response in the host. [Objective] Identify the elicitin gene family of *Pythium porphyrae* and analyze its structural features and possible mechanisms of action during the infection. [Methods] Screening the genome of *Pythium porphyrae* NBRC33253 for members of elicitin gene family using homologous alignment method. Analysis of the physicochemical properties and phylogeny of elicitin family using bioinformatics tools, combined with transcriptomic data and GO functional annotation to discuss possible mechanism of action during the infection. [Results] Twenty-two elicitin gene family members were identified in the *Pythium porphyrae* genome. 17 elicitin genes were extracellular secretory proteins, four were localized at the plasma membrane and one was anchored to the Golgi apparatus. The elicitin genes are simple and conserved in structure, containing 1–2 CDS sequences, with the number of amino acids ranging from 114 to 2 100 aa and the isoelectric point ranging from 3.61 to 9.88. The phylogenetic analysis revealed an expansion of elicitin family in *Pythium porphyrae* NBRC33253. Expression analysis showed that six elicitin genes was up-regulated and seven elicitin genes down-regulated after infection, indicating *Pythium porphyrae* elicitin gene presumably possessed multiple biological functions. As annotated by GO function to cellulose binding elicitor lectin (CBEL) and modulation by symbiont of host defense-related programmed cell death. [Conclusion] The elicitin gene family of *Pythium porphyrae* is structurally conserved and belongs to the ELL (elicitin-like) subfamily. Due to the annotation, elicitins in NBRC33253 showed several kinds of function, including cellulose binding excitor lectin (CBEL) which could accelerate programmed cell death in host cells by binding cellulose, attaching to the host surface, performing protein kinase activity, triggering host MAPK signaling pathway-mediated immune responses, and promoting HR cell death. This study provides theoretical basis for further elucidation of the pathogenic mechanism of *Pythium porphyrae* and genetic breeding for disease resistance traits in *Pyropia*.

**Keywords:** *Pythium porphyrae*; elicitin; red rot disease; infection mechanisms

紫菜是重要的经济红藻, 在中国、日本、韩国被大规模栽培, 2018 年鲜重产量超过 287 万 t, 产值 28 亿美元<sup>[1-2]</sup>。规模的扩大和养殖的密度升高导致病害频发, 造成严重的经济损失<sup>[3]</sup>,

其中影响最为严重的是赤腐病。赤腐病是由紫菜腐霉(*Pythium porphyrae*)引起的紫菜配子体病害, 1993 年日本暴发大面积的紫菜赤腐病, 减产达 64%<sup>[4]</sup>, 数据表明, 中国、日本、韩国

主要紫菜栽培区平均每年因赤腐病造成10%–30%的产量损失<sup>[5]</sup>。紫菜腐霉属于卵菌纲(Oomycetes)腐霉目(Pythiales)腐霉科(Pythiaceae)腐霉属(Pythium)<sup>[6-7]</sup>, 形态上类似于丝状真菌, 广泛分布于海水环境和海底沉积物中, 生活方式为死体营养型。在环境适宜的条件下, 紫菜腐霉菌丝产生的游动孢子附着在紫菜配子体表面进行定殖, 最终引起细胞坏死<sup>[7-8]</sup>。目前针对紫菜腐霉尚无有效的治疗方法, 一旦发生感染, 病斑会成放射状向周围细胞蔓延, 导致大面积病害的发生。

1989年, Riccio等发现在隐地疫霉(*Phytophthora cryptogea*)和辣椒疫霉(*P. capsici*)的培养基滤液中有丰富的分泌蛋白, 分子量约10 kDa, 该蛋白可以诱导烟草细胞的超敏反应(hypersensitive response, HR)<sup>[9]</sup>, 将这种分泌蛋白称为激发子。研究表明, 激发子是卵菌疫霉属(*Phytophthora*)和腐霉属(*Pythium*)物种分泌的结构保守的胞外蛋白<sup>[10]</sup>, 分为 elicitin (ELI)和 elicitin-like (ELL)两大亚类共17个分支, 即4个ELI和13个ELL<sup>[11]</sup>。从结构上看, ELI家族成员都有一个保守结构域, 其特征是由6个半胱氨酸残基形成3个不同的二硫键; 与ELI相比, ELL亚类成员具有较短或较长的激发子结构域, 在蛋白序列上更加多样化, 6个半胱氨酸残基的间距也和ELI亚类有差异<sup>[12]</sup>, ELL亚类在C末端具有疏水结构域, 该区域是糖基化磷脂酰肌醇锚定位点的一部分, 表明ELL亚类激发子可锚定在细胞膜上<sup>[11]</sup>。从功能上看, ELL和ELI亚类具有相似的生物学功能<sup>[13]</sup>, ELL亚类具备病原相关分子模式(pathogen-associated molecular pattern, PAMP)的特征, 可以被宿主的模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)所识别, 引起植物宿主的病原相关分子模式激发的免疫(PAMP-triggered immunity, PTI)反应<sup>[14]</sup>, 如寡

雄腐霉(*Pythium oligandrum*) ELL亚类激发子OLi-D1和OLi-D2可以触发烟草HR反应, 诱导番茄对灰霉病的抗性, 通过与番茄细胞膜LeATL6蛋白互作激活宿主的水杨酸、茉莉酸和乙烯介导的基础防御通路, 增强对病原的抗性<sup>[14-16]</sup>。激发子的表达特征具有阶段性, ELL亚类中的*parl3*基因只在游动孢子和萌发的胞囊中表达, 大豆疫霉(*P. sojae*)中的*sol3a*基因在游动孢子中显著表达, *sol2a*和*sol2b*基因在感染大豆后表达<sup>[11]</sup>, 致病疫霉(*P. infestans*)激发子INL4A由性发育过程中特异性表达的基因编码, 其功能与类固醇交配激素有关<sup>[17]</sup>。

紫菜腐霉激发子相关研究还未见报道, 因此, 本文利用多种生物信息学分析手段, 对紫菜腐霉体内的激发子基因家族进行预测和分析, 结合转录组数据, 探讨在感染宿主的过程中紫菜腐霉激发子基因的差异表达情况, 挖掘关键的致病基因, 以期为进一步研究紫菜腐霉激发子的生物学功能奠定理论基础, 也为紫菜的遗传育种、培育抗病品系提供指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 紫菜腐霉菌株及基因组信息

紫菜腐霉菌株的GenBank登录号为NBRC33253, 相关信息见日本技术评价研究所生物资源中心(<https://www.nite.go.jp/nbrc/>, NBRC), 目前保存于中国海洋大学藻类遗传与育种研究室。该菌株已由本实验室完成全基因组序列测定<sup>[18]</sup>。

### 1.2 激发子基因家族成员鉴定

从Pfam数据库(<http://pfam.xfam.org/>)中下载激发子基因家族保守结构域的隐马尔科夫模型文件, 获取号码PF00964。利用HMMER软件<sup>[19]</sup> (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/>)对紫菜腐霉NBRC33253的基因组进行搜索, 设定阈

值为  $E\text{-value}=10^{-5}$ , 然后提取搜索结果中候选基因家族成员的基因 ID, 并使用 TBtools (<https://github.com/CJ-Chen/TBtools>) 软件从紫菜腐霉 NBRC33253 基因组中提取候选基因的蛋白序列。将候选基因的蛋白序列与 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>) 保守结构域数据库进行比对, 去掉未能比对上激发子保守结构域的候选基因, 得到含有激发子保守结构域的基因。

### 1.3 家族成员理化性质预测和亚细胞定位分析

运用 ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>) 对紫菜腐霉激发子基因家族成员进行蛋白理化性质的预测<sup>[20]</sup>。

采用 Softberry 网站(<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>)对紫菜腐霉激发子基因家族蛋白进行亚细胞定位分析<sup>[21]</sup>。

### 1.4 激发子基因结构和 motif 分析

紫菜腐霉激发子基因的内含子和外显子模式图使用 GSDS 2.0 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) 网站在线绘制, 使用 ClustalW<sup>[22]</sup>对激发子基因进行多序列比对, 将比对结果结合基因结构分布图合并绘制。

使用 MAKER<sup>[23]</sup>注释软件对基因组进行结构预测, 获得内含子和外显子的基本信息。

使用 MEME (<http://meme-suite.org/>)网站分析紫菜腐霉激发子基因家族的保守基序, motif 阈值设置为 5。运用 TBtools 软件将查询结果进行可视化处理, 并获得保守 motif 的 logo 图。

### 1.5 激发子基因家族的系统进化树构建

通过 NCBI 网站查找, 获得文献报道的典型的 ELI 和 ELL 亚类的蛋白序列(表 1)<sup>[9,11]</sup>, 并将其和预测出的紫菜腐霉激发子候选蛋白序列用 ClustalW 2.0 进行多重序列比对, 参数设

表 1 典型 ELI 和 ELL 亚类成员的蛋白序列

Table 1 Protein sequences of typical ELI and ELL subclasses members

| 物种                                    | 名称                                | 获取号           |
|---------------------------------------|-----------------------------------|---------------|
| Species                               | Name                              | Accession No. |
| 终极腐霉<br><i>Pythium ultimum</i>        | PYU-A                             | PYU1T008432   |
|                                       | PYU-B                             | PYU1T008434   |
|                                       | PYU-C                             | PYU1T008435   |
| 钟器腐霉<br><i>Pythium vexans</i>         | VEX1                              | AAB34416      |
|                                       | VEX2                              | AAB34417      |
|                                       | 寡雄腐霉<br><i>Pythium oligandrum</i> | POD-1b        |
|                                       | POD-1                             | AB217820      |
|                                       | POD-1a                            | KJ125071      |
|                                       | POS-1                             | AB474241      |
|                                       | POD-2                             | AB217821      |
|                                       | OLI-D2                            | AB474243      |
|                                       | OLI-D1                            | AB474242      |
|                                       | OLI-S1                            | AB474244      |
|                                       | 大豆疫霉<br><i>Phytophthora sojae</i> | SOL10         |
|                                       | SOL5                              | ABB56002      |
|                                       | SOL7                              | DQ229279      |
|                                       | SOJ3D                             | DQ229243      |
|                                       | SOJ1E                             | DQ229236      |
| 致病疫霉<br><i>Phytophthora infestans</i> | INL1                              | ABB55931      |
|                                       | INL3a                             | ABB55936      |
|                                       | INL2                              | ABB55935      |
|                                       | INL6                              | ABB55941      |
|                                       | INL8                              | ABB55942      |
|                                       | INL11A                            | ABB55932      |
|                                       | INF2A                             | AF004951      |
|                                       | INF6                              | AF419843      |
|                                       | INF5                              | AF419842      |
| 栎树猝死病菌<br><i>Phytophthora ramorum</i> | RAM1A                             | DQ229218      |
|                                       | RAL4                              | ABB55965      |
|                                       | RAL9                              | ABB55972      |
|                                       | RAL12                             | ABB55949      |
|                                       | RAL13A                            | ABB55950      |

置为其默认值: gap opening penalty 为 10.0, gap extension penalty 为 0.2。利用 MEGA 7.0 软件<sup>[24]</sup>, 采用邻近(neighbor-joining, NJ)法构建激发子的蛋白序列进化树, 默认参数: test of phylogeny 为 NONE, substitution model 为 p-distance,

gap/missing data 为 complete deletion, 构建所得到的进化树用 EvolView 在线工具(<https://evolgenius.info/evolview-v2/#mytrees/>)进行进一步美化。

## 1.6 紫菜腐霉感染宿主后激发子基因表达模式分析

结合实验室已发表的转录组数据<sup>[25-26]</sup>, 分析感染宿主前后紫菜腐霉激发子的表达量变化, 并绘制表达热图(<https://www.omicshare.com/>), 探讨激发子家族基因表达模式。

## 1.7 激发子功能分析

使用 Blast2GO<sup>[27]</sup>对紫菜腐霉激发子基因

进行 gene ontology (GO)功能分析, 推测激发子可能具有的生物学功能。

## 2 结果与分析

### 2.1 紫菜腐霉激发子基因家族成员鉴定和分析

从紫菜腐霉 NBRC33253 基因组中检索出 27 个激发子候选基因家族成员, 提取候选成员的蛋白序列与 NCBI 的 CDD 保守结构域数据库进行比对, 去掉未比对上激发子结构域的序列, 最终获得 22 个激发子基因家族成员(表 2)。

表 2 紫菜腐霉激发子基因家族成员基本信息

Table 2 Basic information on members of the elicitin gene family from *Pythium porphyrae*

| 基因 ID<br>Gene ID | GenBank<br>登录号<br>GenBank<br>accession No. | 亚细胞定位<br>Subcellular localization | CDS 长度<br>CDS length<br>(bp) | 氨基酸数量<br>Amino acid<br>number (aa) | 相对分子质量<br>Molecular mass<br>(Da) | 等电点<br>Isoelectric<br>point | 总平均亲水性<br>Grand average<br>of<br>hydropathicity |
|------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------------------|
| pp02529.t1       | MZ636512                                   | 胞外 Extracellular                  | 6 333                        | 2 110                              | 220 295.09                       | 4.35                        | 0.005                                           |
| pp00086.t1       | MZ636492                                   | 胞外 Extracellular                  | 351                          | 116                                | 12 678.79                        | 5.28                        | 0.155                                           |
| pp00087.t1       | MZ636493                                   | 胞外 Extracellular                  | 351                          | 116                                | 12 678.79                        | 5.28                        | 0.155                                           |
| pp07382.t1       | MZ636511                                   | 胞外 Extracellular                  | 345                          | 114                                | 11 975.90                        | 3.79                        | 0.500                                           |
| pp09397.t1       | MZ636498                                   | 胞外 Extracellular                  | 621                          | 206                                | 20 491.57                        | 8.89                        | -0.075                                          |
| pp05081.t1       | MZ636509                                   | 胞外 Extracellular                  | 711                          | 236                                | 23 019.22                        | 3.84                        | 0.088                                           |
| pp09587.t1       | MZ636500                                   | 胞外 Extracellular                  | 585                          | 194                                | 19 239.98                        | 3.71                        | 0.447                                           |
| pp09588.t1       | MZ636501                                   | 胞外 Extracellular                  | 579                          | 192                                | 18 780.09                        | 3.61                        | 0.454                                           |
| pp10243.t1       | MZ636503                                   | 胞外 Extracellular                  | 462                          | 153                                | 16 471.16                        | 6.27                        | 0.086                                           |
| pp09398.t1       | MZ636499                                   | 胞外 Extracellular                  | 648                          | 215                                | 22 225.75                        | 9.88                        | -0.136                                          |
| pp04888.t1       | MZ636507                                   | 质膜 Plasma membrane                | 1 695                        | 564                                | 59 730.17                        | 4.9                         | -0.049                                          |
| pp13079.t1       | MZ636496                                   | 胞外 Extracellular                  | 1 599                        | 532                                | 56 747.67                        | 7.55                        | -0.325                                          |
| pp10317.t1       | MZ636504                                   | 胞外 Extracellular                  | 660                          | 219                                | 21 723.40                        | 4.5                         | 0.129                                           |
| pp10318.t1       | MZ636505                                   | 胞外 Extracellular                  | 660                          | 219                                | 21 723.40                        | 4.5                         | 0.129                                           |
| pp00795.t1       | MZ636506                                   | 胞外 Extracellular                  | 627                          | 208                                | 20 027.45                        | 3.97                        | 0.287                                           |
| pp02853.t1       | MZ636513                                   | 胞外 Extracellular                  | 525                          | 174                                | 18 179.69                        | 4.64                        | 0.251                                           |
| pp09722.t1       | MZ636502                                   | 胞外 Extracellular                  | 444                          | 147                                | 14 686.81                        | 4.27                        | 0.218                                           |
| pp05114.t1       | MZ636495                                   | 质膜 Plasma membrane                | 1 719                        | 572                                | 62 188.88                        | 5.71                        | -0.005                                          |
| pp04889.t1       | MZ636508                                   | 高尔基体 Golgi                        | 894                          | 297                                | 31 816.69                        | 4.78                        | -0.111                                          |
| pp07637.t1       | MZ636497                                   | 质膜 Plasma membrane                | 828                          | 275                                | 29 489.76                        | 4.06                        | -0.071                                          |
| pp06440.t1       | MZ636510                                   | 胞外 Extracellular                  | 549                          | 182                                | 18 720.22                        | 4.93                        | 0.011                                           |
| pp05107.t1       | MZ636494                                   | 质膜 Plasma membrane                | 1 161                        | 386                                | 41 562.05                        | 8.81                        | -0.327                                          |

将预测的激发子基因家族成员的蛋白序列分别上传至 ExPASy、Softberry 在线分析网站, 预测紫菜腐霉激发子基因家族成员的蛋白理化性质和亚细胞定位。结果表明, 22 个激发子的氨基酸数目为 114–2 100 aa, 跨度较大, Pp02529.t1 蛋白的氨基酸数目最多, 包含多个保守结构域, 除激发子相关的保守结构域外, 该蛋白还有 CBM\_1 (PF00734) 和 PAN\_4 (PF14295) 等结构域, 其中 carbohydrate-binding module (CBM\_1)<sup>[28]</sup>是在碳水化合物活性酶(carbohydrate-active enzymes, CAZy)中发现的蛋白结构域, 可以识别结晶和无定形形式的纤维素, 因此推测激发子 Pp02529.t1 可能参与紫菜腐霉对宿主细胞壁的识别、信号传导, 分泌多种碳水化合物活性酶, 辅助其他病原相关分子发挥功能。

预测的激发子基因家族成员的等电点(isoelectric point, PI)为 3.61–9.88。根据计算的综合打分, 获得激发子亚细胞定位的位置, 结果表明 17 个激发子都属于胞外分泌蛋白,

Pp04888.t1、Pp05114.t1、Pp07637.t1、Pp05107.t1 定位于质膜, 而 Pp04889.t1 则定位于高尔基体, 经典的激发子被认为是分泌到胞外空间的, 亚细胞定位预测结果表明, 一些激发子蛋白也可能锚定在卵菌的质膜和细胞器上<sup>[29]</sup>。22 个激发子中有 14 个疏水蛋白, 其余的 8 个为亲水蛋白, 分子质量在 11.98–220.30 kDa 之间, 除了 Pp02529.t1 分子质量较大外, 剩余 21 个激发子蛋白的分子质量都在 11.98–62.19 kDa 之间。

## 2.2 激发子基因家族基因结构和保守基序

为了更好地了解紫菜腐霉激发子家族基因结构和进化关系, 利用筛选出来的 22 个激发子家族成员的蛋白序列构建了系统发育树, 并将进化树文件上传至 GSDBS 在线网站, 整合包括编码区(coding sequence, CDS)、非翻译区(untranslated region, UTR)及内含子(intron)在内的所有信息绘制紫菜腐霉激发子家族基因结构示意图。由图 1 可知, 紫菜腐霉激发子基因结构较为简单, 只有 *pp04888.t1* 和 *pp06440.t1*

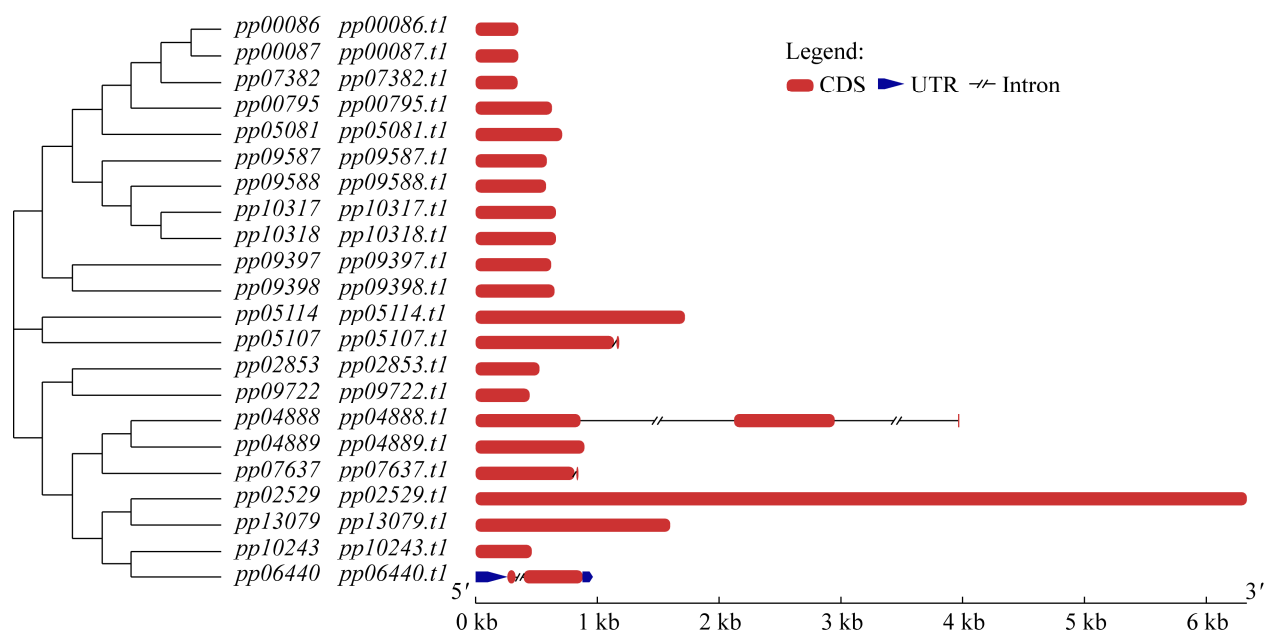


图 1 紫菜腐霉激发子基因家族基因结构

Figure 1 Structure of elicitin gene family of *Pythium porphyrae*.

有 2 个编码区, 其他激发子只有一个编码区, 而且只有 *pp06440.tl* 存在非翻译区, *pp04888.tl* 内含子数量最多, 其他预测的激发子家族成员未注释到非编码区, 表明紫菜腐霉激发子基因家族简单。从进化上来看, 激发子基因家族序列比较保守, 在进化树中距离较近的基因家族成员的结构也有一定的相似性。

对 22 个紫菜腐霉激发子家族成员的 motif 进行分析(图 2), 显示所有激发子中均存在 motif 1 和 motif 2 两个保守的基序, *pp04888.tl* 无 motif 3 结构, 但是含有 motif 5 结构。motif 4 仅在 *pp002529.tl* 和 *pp13079.tl* 中存在。除 *pp04888.tl*、*pp05114.tl* 和 *pp07637.tl* 外, motif 1、motif 2 和 motif 3 在 19 个激发子中都存在。

### 2.3 紫菜腐霉激发子基因家族系统演化

激发子基因家族主要存在于疫霉属和腐霉属物种中, 目前关于该基因家族的研究集中于侵染高等陆生植物的疫霉属物种<sup>[9,30]</sup>, 腐霉属中报道的 ELI 亚类激发子仅有 VEX1 和 VEX2 2 个。本研究中, 从 NCBI 网站获得典型的 ELI 和 ELL 亚类蛋白序列<sup>[9,31]</sup>(表 1)。将其作为 ELI 和 ELL 亚类的参考进行多序列比对, 并构建系统进化树, 对紫菜腐霉激发子家族成员进行分类(图 3)。

聚类分析可以看出, ELI 亚类的 8 个蛋白序列聚为一个分支, 并全部来自疫霉属物种。紫菜腐霉激发子所选家族成员均与 ELL 亚类的典型代表蛋白序列聚为一支。这与吴育人的研究结果类似, 即在终极腐霉中也未能预测到 ELI 亚类的存在, 全部为 ELL 亚类<sup>[32]</sup>。紫菜腐霉激发子 Pp07382.tl 与 ELL 亚类蛋白序列 SOL7 聚类, Pp02529.tl 和 Pp13079.tl 与 INL6 有较近的亲缘关系, 有共同的祖先和来源方式, 剩余的紫菜腐霉激发子均与 ELL 亚类聚为一个大的分支且与 ELI 亚类疏远, 推测这些 ELL 亚类

的激发子可能具有不同于 ELI 亚类的功能和表达模式。

### 2.4 感染前后紫菜腐霉激发子基因表达模式

为进一步了解紫菜腐霉激发子的功能, 开展了感染前后紫菜腐霉转录组测序分析, 探究激发子在紫菜腐霉感染宿主过程中的作用。转录组数据中, *pp10317.tl* 和 *pp10318.tl* 在感染宿主前后未检测到基因表达, 所以绘制了紫菜腐霉 20 个激发子基因家族成员的表达热图(图 4)。结果显示, 感染宿主过程中不同激发子基因的表达模式存在差异。*pp00795.tl*、*pp13079.tl*、*pp06440.tl*、*pp09588.tl*、*pp09722.tl* 等基因表达在感染宿主后表现出不同程度的下调, *pp00795.tl* 基因下调达 23.1 倍。*pp07382.tl* 等基因表达量出现显著上调(独立样本 *t* 检验,  $P<0.01$ ), *pp05107.tl*、*pp02853.tl*、*pp04889.tl* 基因表达量上调倍数分别为 1.78、1.26 和 1.76 倍, 幅度较小。*pp00086.tl*、*pp09397.tl*、*pp09398.tl* 和 *pp04888.tl* 等基因在感染前后表达量无显著的变化。不同激发子基因家族成员表达模式的差异表明紫菜腐霉激发子对宿主的影响可能存在多种作用方式和机制。

### 2.5 紫菜腐霉激发子功能分析

紫菜腐霉激发子基因 GO 功能预测结果表明(表 3), *pp13079.tl* 和 *pp02529.tl* 注释为纤维素结合激发子凝集素 CBEL, 具备结合纤维素的能力, 参与纤维素的感知和细胞壁沉积, 而 *pp13079.tl* 和 *pp02529.tl* 除了激发子结构域外, 还具有 CBM\_1、APPLE\_Factor\_XI\_like 和 PAN\_4 等结构域, 均与纤维素结合相关, 推测其参与调控的方式是介导蛋白质-碳水化合物相互作用, 使紫菜腐霉激发子蛋白和紫菜细胞壁结合, 引发胞内免疫响应。*pp07637.tl*、*pp05081.tl* 和 *pp09588.tl* 等 9 个基因都参与宿

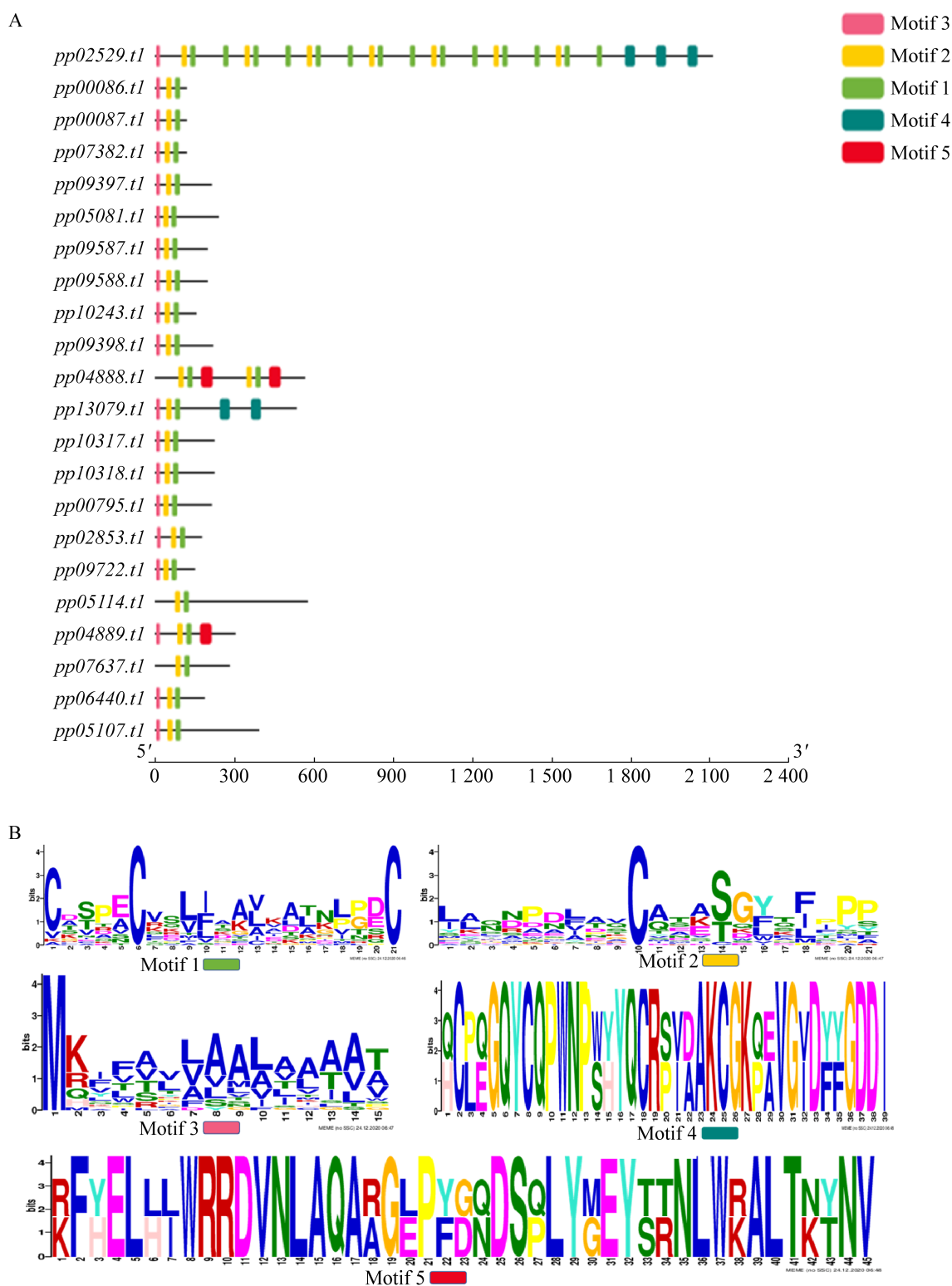


图 2 激发子家族成员 motif 结构(A)和 motif logo 图(B)

Figure 2 Motif structure of elicitin family member (A) and logo diagram of motifs (B).



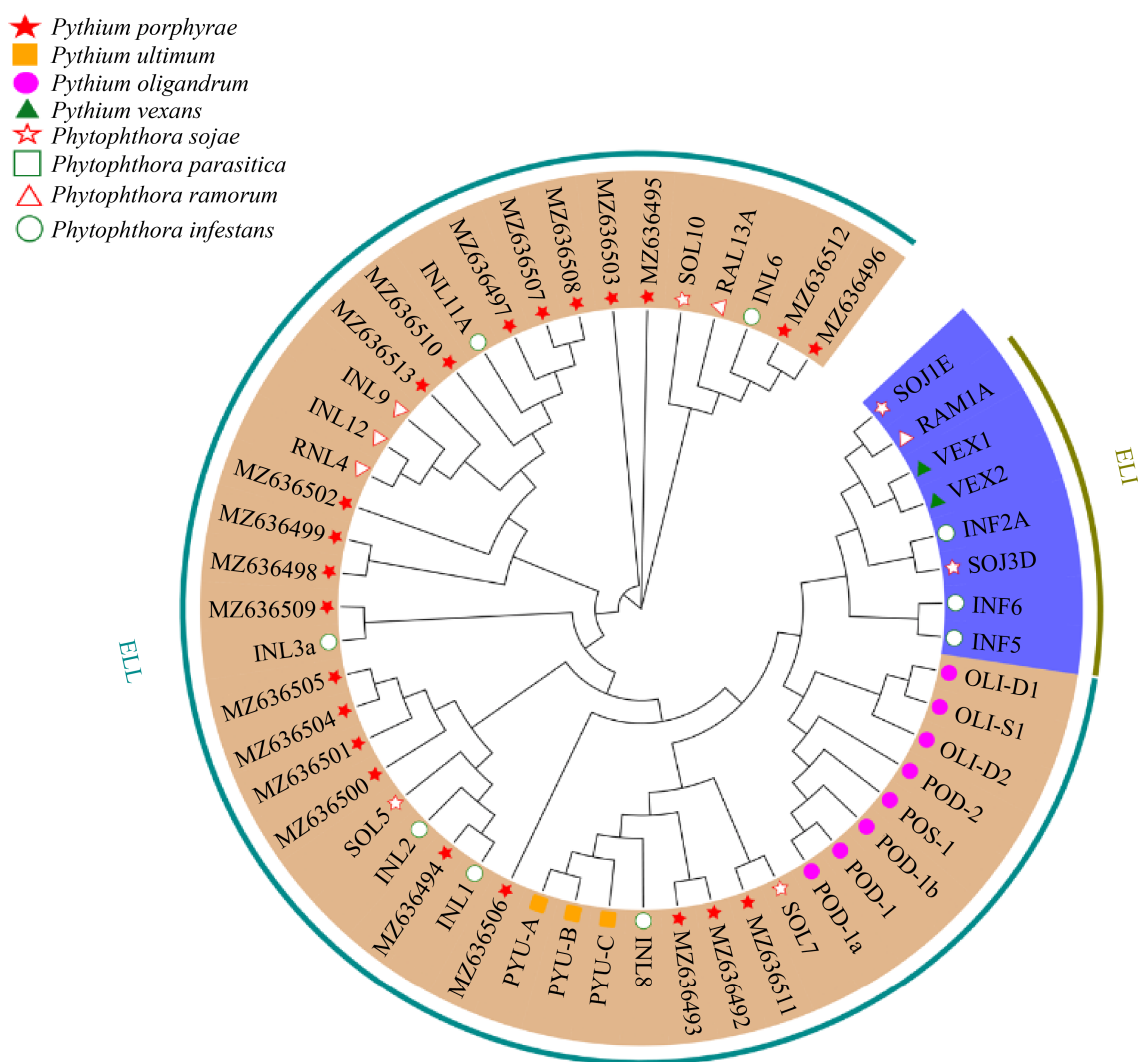


图3 ELI、ELL亚类和紫菜腐霉 elicitin 家族系统进化树

Figure 3 Phylogenetic analysis of ELI, ELL subclass and *Pythium porphyrae* elicitors.

主防御相关程序性细胞死亡的调节过程, 这可能与激发子引发宿主程序性死亡有关。

### 3 讨论与结论

紫菜腐霉可以引起紫菜的赤腐病, 对紫菜养殖业造成巨大危害。目前对于紫菜腐霉的研究主要集中在对病原的形态观察、流行病学调查、分子鉴定及病害防治等方面, 对紫菜腐霉致病机制的研究还很匮乏<sup>[3,8,33-36]</sup>。激发子是一类广泛存在于卵菌病原中的保守基因家族,

在生长发育、表达调控、病原感染等方面的途径和机制有待揭示。

#### 3.1 ELL亚类的多样性

ELL亚类激发子蛋白广泛存在于卵菌中。终极腐霉中ELL亚类激发子有36个, 未发现ELI亚类<sup>[32]</sup>; 大豆疫霉中发现ELI亚类的激发子18个, 而ELL亚类激发子数量有39个; 栎树猝死病菌中ELI亚类的激发子17个, 而ELL亚类激发子的数量有31个<sup>[11]</sup>; Jiang等在寄生水霉的基因组中鉴定出ELL亚类激发子

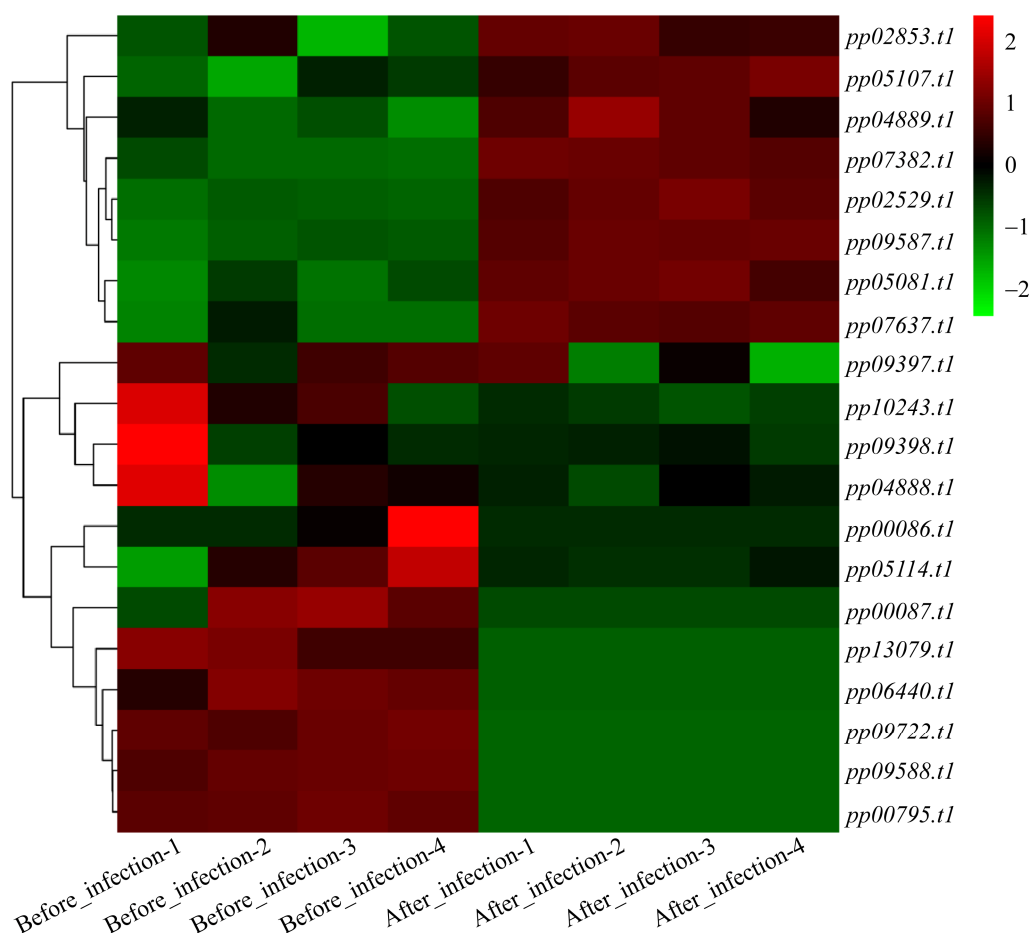


图 4 感染宿主前后紫菜腐霉激发子基因表达热图

Figure 4 Heat map of *Pythium porphyrae* elicitin gene expression before and after infection to *Pyropia yezoensis*.

29 个<sup>[37]</sup>；拟南芥霜霉病病原菌寄生霜霉 (*Hyaloperonospora arabidopsidis*)中发现了 ELL 亚类激发子 14 个，而 ELI 亚类仅有 1 个<sup>[38]</sup>。本研究全面地研究了紫菜腐霉中 elicitin 的分类。与同属腐霉属的终极腐霉类似，在紫菜腐霉中并未发现 ELI 亚类的激发子，预测出的 22 个激发子均属于 ELL 亚类。由此推断，卵菌中 ELL 亚类激发子的丰富性和多样性要大于 ELI 亚类的激发子。

### 3.2 ELL 亚类家族扩张

紫菜腐霉 ELL 亚类的激发子与典型 ELI

和 ELL 亚类激发子重建的系统进化树表明，*pp10243.tl*、*pp05114.tl*、*pp10318.tl*、*pp10317.tl*、*pp09588.tl* 和 *pp09587.tl* 基因单独聚类，出现不同于典型激发子进化的分支，这些激发子可能来源于基因家族的扩张。在寄生霜霉 ELL 亚类激发子中，只有少数基因和典型激发子基因聚类为一支，其余大部分寄生霜霉激发子单独聚类成簇，基因家族扩张明显<sup>[31]</sup>。寡雄腐霉激发子系统演化分析表明，寡雄腐霉 Oli-D1、Oli-D2 和 Oli-S1 等基因均属于 ELL 亚类，单独聚类成簇，也存在基因家族扩张<sup>[12]</sup>。

表 3 激发子基因 GO 功能注释结果

Table 3 The GO functional annotation of elicitor genes

| 基因 ID<br>Gene ID  | GO 名称<br>GO name                                                                           | GO 类别<br>GO category |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| <i>pp13079.t1</i> | Catalytic activity; cellulose binding elicitor lectin (CBEL)                               | MF                   |
| <i>pp02529.t1</i> | Catalytic activity; cellulose binding elicitor lectin (CBEL)                               | MF                   |
| <i>pp07637.t1</i> | Modulation by symbiont of host defense-related programmed cell death                       | BP                   |
| <i>pp07382.t1</i> | Carbohydrate binding; modulation by symbiont of host defense-related programmed cell death | MF; BP               |
| <i>pp09397.t1</i> | Carbohydrate binding                                                                       | MF                   |
| <i>pp05081.t1</i> | Modulation by symbiont of host defense-related programmed cell death                       | BP                   |
| <i>pp09587.t1</i> | Cellular anatomical entity                                                                 | CC                   |
| <i>pp09588.t1</i> | Modulation by symbiont of host defense-related programmed cell death                       | BP                   |
| <i>pp10243.t1</i> | Cellular anatomical entity                                                                 | CC                   |
| <i>pp09398.t1</i> | Modulation by symbiont of host defense-related programmed cell death                       | BP                   |
| <i>pp04888.t1</i> | Modulation by symbiont of host defense-related programmed cell death                       | BP                   |
| <i>pp10317.t1</i> | Modulation by symbiont of host defense-related programmed cell death                       | BP                   |
| <i>pp10318.t1</i> | Modulation by symbiont of host defense-related programmed cell death                       | BP                   |
| <i>pp00795.t1</i> | Modulation by symbiont of host defense-related programmed cell death                       | BP                   |
| <i>pp02853.t1</i> | Transmembrane transporter activity                                                         | MF                   |
| <i>pp05114.t1</i> | Protein kinase activity; phosphorylation                                                   | MF; BP               |
| <i>pp04889.t1</i> | Cellular anatomical entity                                                                 | CC                   |
| <i>pp06440.t1</i> | Modulation by symbiont of host defense-related programmed cell death                       | BP                   |
| <i>pp05107.t1</i> | Kinase activity; hydrolase activity; phosphorylation                                       | MF; BP               |

研究证明, 腐霉 ELL 亚类激发子能够结合和转运固醇及脂质<sup>[39]</sup>, 而脂质参与植物和病原体相互作用的多个阶段, 包括宿主和病原之间的交流、植物防御系统的激活和实施及病原的生命周期<sup>[40]</sup>。半胱氨酸残基之间形成的二硫键结构对激发子结合脂质至关重要, 而 ELL 亚类基因半胱氨酸残基之间的间距也存在差异<sup>[11]</sup>, 推测 ELL 亚类家族的扩张可能更有利于腐霉对脂类物质的获取, 不同激发子空间结构适应不同分子量的脂类。ELL 亚类扩张带来成员的多样性, 也具备多种表达模式, 如激发子在感染宿主后的基因表达水平出现下调, 可能是逃避宿主免疫识别的行为<sup>[41]</sup>。进化上单独聚类为一支的 *pp00795.t1* 和 *pp09722.t1* 基因的表达量, 在感染紫菜后显著下调 ( $P \leq 0.05$ ), *pp10243.t1* 和 *pp05114.t1* 基因的表达量虽变化不显著, 但总体趋势表现为下降, 推测扩张的激发子家族基

因可能发挥逃避紫菜免疫系统感知及辅助病原进一步感染的作用, 可能暗示着紫菜腐霉与宿主长期互作中出现适应性进化。

### 3.3 激发子基因在感染过程中的作用机制

紫菜腐霉激发子 *pp05114.t1* 和 *pp05107.t1* 具备蛋白质激酶催化结构域(catalytic domain of protein kinases, PKc)、丝氨酸/苏氨酸激酶催化结构域(catalytic domain of the serine/threonine kinase, STKc)和蛋白质酪氨酸激酶催化结构域(catalytic domain of protein tyrosine kinases, PTKc)等, 均与丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)信号传导途径有关。有研究表明, 在紫菜中存在 MAPK 信号传导通路所需的激酶<sup>[42]</sup>, 紫菜腐霉感染紫菜后, MAPK 信号传导通路在紫菜中聚类富集<sup>[25]</sup>, 推测紫菜腐霉激发子引起宿主免疫反应的直接原因是触发了 MAPK 介导的免疫信号传导通路,

激发子具备激酶活性,与细胞膜表面的受体结合将信号传递至胞内,通过磷酸化激活 MAPKKK、MAPKK 和 MAPK,MAPK 调控下游基因的表达,包括茉莉酸(jasmonic acid, JA)、水杨酸(salicylic acid, SA)、WRKY 转录因子和活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)<sup>[43]</sup>,最终导致细胞的免疫响应及 HR 细胞死亡。

激发子 *pp13079.t1* 和 *pp02529.t1* 基因功能注释为纤维素结合激发子凝集素(CBEL),具有纤维素结合功能结合域。研究表明,CBEL 表达被抑制的疫霉菌株其致病性未受到影响,与寄主植物的根接触形成分枝聚集菌丝,说明 CBEL 参与对宿主细胞壁纤维素的感知<sup>[44-45]</sup>,紫菜腐霉激发子基因可能也发挥 CBEL 的功能,通过感知紫菜细胞壁纤维素组分,结合后黏附在细胞壁表面,这一功能可能更有利于紫菜腐霉对宿主的感染。细胞程序性死亡是抵御活体营养性病原的重要机制,活体营养型病原会抑制宿主的程序性死亡,而死体营养型病原则会促进细胞的程序性死亡,并从死亡的细胞中攫取营养物质,满足自身需求<sup>[46-47]</sup>。紫菜腐霉激发子多个基因 GO 功能注释为对宿主防御相关程序性细胞死亡的调节,表明激发子可能参与了调控宿主程序性死亡过程,诱发细胞死亡。

已有研究表明,激发子具备增强植物对病原微生物广谱抗性的可能性,深入研究激发子激发宿主免疫功能的机制,有助于选育出对卵菌病原体具有广谱抗性的作物,为遗传育种开辟新道路<sup>[31,48]</sup>。因此,发掘紫菜腐霉关键病原基因,探索其致病机制,为紫菜赤腐病的防治和抗性优良品系的选育提供新思路。

## REFERENCES

- [1] Wang DM, Yu XZ, Xu KP, Bi GQ, Cao M, Zelzion E, Fu CX, Sun PP, Liu Y, Kong FN, et al. *Pyropia yezoensis* genome reveals diverse mechanisms of carbon acquisition in the intertidal environment[J]. Nature Communications, 2020, 11: 4028
- [2] Fao. Fishery and Aquaculture Statistics. Global aquaculture production 1950-2019 (FishstatJ). In: FAO Fisheries Division [online]. Rome. Updated 2021. www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/en[J]. 2021
- [3] Qiu LP, Mao YX, Tang L, Tang XH, Mo ZL. Characterization of *Pythium chondricola* associated with red rot disease of *Pyropia yezoensis* (Ueda) (Bangiales, Rhodophyta) from Lianyungang, China[J]. Journal of Oceanology and Limnology, 2019, 37(3): 1102-1112
- [4] Park CS, Kakinuma M, Amano H. Detection and quantitative analysis of zoospores of *Pythium porphyrae*, causative organism of red rot disease in *Porphyra*, by competitive PCR[J]. Journal of Applied Phycology, 2001, 13(5): 433-441
- [5] Kim GH, Moon KH, Kim JY, Shim J, Klochkova TA. A revaluation of algal diseases in Korean *Pyropia* (*Porphyra*) sea farms and their economic impact[J]. ALGAE, 2014, 29(4): 249-265
- [6] Lee SJ, Jee BY, Son MH, Lee SR. Infection and cox2 sequence of *Pythium chondricola* (*Oomycetes*) causing red rot disease in *Pyropia yezoensis* (*Rhodophyta*) in Korea[J]. ALGAE, 2017, 32(2): 155-160
- [7] Lee SJ, Hwang MS, Park MA, Baek JM, Ha DS, Lee JE, Lee SR. Molecular identification of the algal pathogen *Pythium chondricola* (*Oomycetes*) from *Pyropia yezoensis* (*Rhodophyta*) using ITS and cox1 markers[J]. ALGAE, 2015, 30(3): 217-222
- [8] Uppalapati SR, Fujita Y. Carbohydrate regulation of attachment, encystment, and appressorium formation by *Pythium porphyrae* (*Oomycota*) zoospores on *Porphyra yezoensis* (*Rhodophyta*)[J]. Journal of Phycology, 2001, 36(2): 359-366
- [9] Ricci P, Bonnet P, Huet JC, Sallantin M, Beauvais-Cante F, Bruneteau M, Billard V, Michel G, Pernollet JC. Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco[J]. European Journal of Biochemistry, 1989, 183(3): 555-563
- [10] Derevnina L, Dagdas YF, De La Concepcion JC, Bialas A, Kellner R, Petre B, Domazakis E, Du J, Wu CH, Lin X, et al. Nine things to know about elicitors[J]. The New Phytologist, 2016, 212(4): 888-895
- [11] Jiang RHY, Tyler BM, Whisson SC, Hardham AR, Govers F. Ancient origin of elicitor gene clusters in

- Phytophthora* genomes[J]. Molecular Biology and Evolution, 2006, 23(2): 338-351
- [12] Masunaka A, Sekiguchi H, Takahashi H, Takenaka S. Distribution and expression of elicitor-like protein genes of the biocontrol agent *Pythium oligandrum*[J]. Journal of Phytopathology, 2009, 158(6): 417-426
- [13] Misner I, Blouin N, Leonard G, Richards TA, Lane CE. The secreted proteins of *Achlya hypogyna* and *Thraustotheca clavata* identify the ancestral *Oomycete* secretome and reveal gene acquisitions by horizontal gene transfer[J]. Genome Biology and Evolution, 2015, 7(1): 120-135
- [14] Takenaka S, Nakamura Y, Kono T, Sekiguchi H, Masunaka A, Takahashi H. Novel elicitor-like proteins isolated from the cell wall of the biocontrol agent *Pythium oligandrum* induce defence-related genes in sugar beet[J]. Molecular Plant Pathology, 2006, 7(5): 325-339
- [15] Ouyang ZG, Li XH, Huang L, Hong YB, Zhang YF, Zhang HJ, Li DY, Song FM. Elicitor-like proteins Oli-D1 and Oli-D2 from *Pythium oligandrum* trigger hypersensitive response in *Nicotiana benthamiana* and induce resistance against *Botrytis cinerea* in tomato[J]. Molecular Plant Pathology, 2015, 16(3): 238-250
- [16] Hase S, Takahashi S, Takenaka S, Nakaho K, Arie T, Seo S, Ohashi Y, Takahashi H. Involvement of jasmonic acid signalling in bacterial wilt disease resistance induced by biocontrol agent *Pythium oligandrum* in tomato[J]. Plant Pathology, 2008, 57(5): 870-876
- [17] Fabritius AL, Cvitanich C, Judelson HS. Stage-specific gene expression during sexual development in *Phytophthora infestans*[J]. Molecular Microbiology, 2002, 45(4): 1057-1066
- [18] 邹丹丹. 紫菜腐霉(*Pythium porphyrae*)全基因组测序及条斑紫菜赤腐病防治技术研究[D]. 青岛: 中国海洋大学博士学位论文, 2016
- Zou DD. Complete genome sequencing of *Pythium porphyrae* and control techniques of the red rot disease in *Pyropia yezoensis*[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Ocean University of China. 2016 (in Chinese)
- [19] Finn RD, Clements J, Eddy SR. HMMER web server: interactive sequence similarity searching[J]. Nucleic Acids Research, 2011, 39(suppl\_2): W29-W37
- [20] Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, Baratin D, Csardi G, De Castro E, Duvaud S, Flegel V, Fortier A, Gasteiger E, et al. ExPASy: SIB bioinformatics resource portal[J]. Nucleic Acids Research, 2012, 40(W1): W597-W603
- [21] Queiroz CBD, Santana MF. Prediction of the secretomes of endophytic and nonendophytic fungi reveals similarities in host plant infection and colonization strategies[J]. Mycologia, 2020, 112(3): 491-503
- [22] Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX[J]. Current Protocols in Bioinformatics, 2002, Chapter 2: Unit 2.3
- [23] Cantarel BL, Korf I, Robb SMC, Parra G, Ross E, Moore B, Holt C, Sanchez Alvarado A, Yandell M. MAKER: an easy-to-use annotation pipeline designed for emerging model organism genomes[J]. Genome Research, 2007, 18(1): 188-196
- [24] Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. Molecular Biology and Evolution, 2018, 35(6): 1547-1549
- [25] 唐磊. 条斑紫菜先天免疫系统及抗赤腐病机制[D]. 青岛: 中国海洋大学博士学位论文, 2020
- Tang L. Innate immunity system and red rot disease resistant mechanism in *Pyropia yezoensis*[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Ocean University of China. 2020 (in Chinese)
- [26] Tang L, Qiu LP, Liu C, Du GY, Mo ZL, Tang XH, Mao YX. Transcriptomic insights into innate immunity responding to red rot disease in red alga *Pyropia yezoensis*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(23): 5970
- [27] Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Talón M, Robles M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research[J]. Bioinformatics, 2005, 21(18): 3674-3676
- [28] Naveed ZA, Wei XY, Chen JJ, Mubeen H, Ali GS. The PTI to ETI continuum in *Phytophthora*-plant interactions[J]. Frontiers in Plant Science, 2020, 11: 593905
- [29] Qutob D, Huitema E, Gijzen M, Kamoun S. Variation in structure and activity among elicitors from *Phytophthora sojae*[J]. Molecular Plant Pathology, 2003, 4(2): 119-124
- [30] Cooke DEL, Cano LM, Raffaele S, Bain RA, Cooke LR, Etherington GJ, Deahl KL, Farrer RA, Gilroy EM, Goss EM, et al. Genome analyses of an aggressive and invasive lineage of the Irish potato famine pathogen[J]. PLoS Pathogens, 2012, 8(10): e1002940
- [31] Janků M, Činčalová L, Luhová L, Lochman J, Petrivalský M. Biological effects of *Oomycetes* elicitors[J]. Plant Protection Science, 2019, 56(1): 1-8
- [32] 吴育人. 辣椒疫霉转录组及效应分子的生物信息学研究

- 究[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2014
- Wu YR. Bioinformatics study of the transcriptome and effector in *Phytophthora capsici*[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2014 (in Chinese)
- [33] Ward GM, Faisan JP Jr, Cottier-Cook EJ, Gachon C, Hurtado AQ, Lim PE, Matoju I, Msuya FE, Bass D, Brodie J. A review of reported seaweed diseases and pests in aquaculture in Asia[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2020, 51(4): 815-828
- [34] Dumilag RV. Detection of *Pythium porphyrae* infecting Philippine *Pyropia acanthophora* based on morphology and nuclear rRNA internal transcribed spacer sequences[J]. Journal of General Plant Pathology, 2019, 85(1): 72-78
- [35] Diehl N, Kim GH, Zuccarello GC. A pathogen of New Zealand *Pyropia plicata* (Bangiales, Rhodophyta), *Pythium porphyrae* (Oomycota)[J]. ALGAE, 2017, 32(1): 29-39
- [36] Zou DD, Tang XH, Qiu LP, Mao YX. Defensive physiological characters of *Pyropia yezoensis* resistant lines to the red rot disease[J]. Journal of Oceanology and Limnology, 2020, 38(2): 509-516
- [37] Jiang RHY, De Bruijn I, Haas BJ, Belmonte R, Löbach L, Christie J, Van Den Ackerveken G, Bottin A, Bulone V, Díaz-Moreno SM, et al. Distinctive expansion of potential virulence genes in the genome of the Oomycete fish pathogen *Saprolegnia parasitica*[J]. PLoS Genetics, 2013, 9(6): e1003272
- [38] Baxter L, Tripathy S, Ishaque N, Boot N, Cabral A, Kemen E, Thines M, Ah-Fong A, Anderson R, Badejoko W, et al. Signatures of adaptation to obligate biotrophy in the *Hyaloperonospora arabidopsidis* genome[J]. Science, 2010, 330(6010): 1549-1551
- [39] Ponchet M, Panabières F, Milat ML, Mikes V, Montillet JL, Suty L, Triantaphylides C, Tirilly Y, Blein JP. Are elicitors cryptograms in plant-Oomycete communications?[J]. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 1999, 56(11/12): 1020-1047
- [40] Shah J, Chaturvedi R. Lipid signals in plant-pathogen interactions[EB/OL]. Annual Plant Reviews, 2009, 34: 292-333
- [41] Colas V, Conrod S, Venard P, Keller H, Ricci P, Panabières F. Elicitor genes expressed *in vitro* by certain tobacco isolates of *Phytophthora parasitica* are down regulated during compatible interactions[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions®, 2001, 14(3): 326-335
- [42] Li C, Kong FN, Sun PP, Bi GQ, Li N, Mao YX, Sun MJ. Genome-wide identification and expression pattern analysis under abiotic stress of mitogen-activated protein kinase genes in *Pyropia yezoensis*[J]. Journal of Applied Phycology, 2018, 30(4): 2561-2572
- [43] Adachi H, Nakano T, Miyagawa N, Ishihama N, Yoshioka M, Katou YR, Yaeno T, Shirasu K, Yoshioka H. WRKY transcription factors phosphorylated by MAPK regulate a plant immune NADPH oxidase in *Nicotiana benthamiana*[J]. The Plant Cell, 2015, 27(9): 2645-2663
- [44] Gaulin E, Jauneau A, Villalba F, Rickauer M, Esquerré-Tugayé MT, Bottin A. The CBEL glycoprotein of *Phytophthora parasitica*-*nicotianae* involved in cell wall deposition and adhesion to cellulosic substrates[J]. Journal of Cell Science, 2002, 115(23): 4565-4575
- [45] Perrine-Walker F. *Phytophthora palmivora*-cocoa interaction[J]. Journal of Fungi, 2020, 6(3): 167
- [46] Chibucos MC, Collmer CW, Torto-Alalibo T, Gwinn-Giglio M, Lindeberg M, Li DH, Tyler BM. Programmed cell death in host-symbiont associations, viewed through the gene ontology[J]. BMC Microbiology, 2009, 9(1): 1-10
- [47] Wang Y, Tyler BM, Wang YC. Defense and counterdefense during plant-pathogenic Oomycete infection[J]. Annual Review of Microbiology, 2019, 73(1): 667-696
- [48] Du J, Verzaux E, Chaparro-Garcia A, Bijsterbosch G, Paul Keizer LC, Zhou J, Liebrand TWH, Xie CH, Govers F, Robatzek S, et al. Elicitor recognition confers enhanced resistance to *Phytophthora infestans* in potato[J]. Nature Plants, 2015, 1: 15034