



研究报告

尖孢镰孢菌果胶裂解酶基因家族鉴定及侵染表达模式分析

李培谦 冯宝珍*

运城学院生命科学系 山西 运城 044000

摘要:【背景】番茄枯萎病是番茄生产中常见的土传真菌病害。【目的】为鉴定番茄枯萎病基因组果胶裂解酶基因家族,明确该基因家族在侵染过程表达模式。【方法】采用生物信息学方法鉴定了番茄枯萎病尖孢镰孢菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*)基因组内 PEL 基因家族,并分析了基因结构、染色体定位及三级结构,同时利用荧光定量 PCR 分析了 *FoPEL*1–16 基因在接种番茄根系的表达情况。

【结果】番茄尖孢镰孢菌基因组内 PEL 基因家族成员有 16 个。氨基酸序列长度在 163–548 个氨基酸,信号肽长度在 16–21 个氨基酸。染色体定位分析表明 16 个基因在染色体上分布不均,分别定位在 7 条染色体上。根据基因结构和保守基序分析结果 16 个基因可分为 4 类。进化分析表明该基因家族成员可聚成 4 支。三级结构预测结果显示同一家族存在相似结构域。荧光定量 PCR 分析结果表明 *FoPEL* 基因在侵染过程表达水平明显上升。【结论】番茄尖孢镰孢菌基因组内果胶裂解酶以基因家族形式存在,其基因结构存在差异暗示了其功能多样性;*FoPEL* 基因在侵染过程表达明显增强,说明其参与病原菌的致病性。本研究为解析尖孢镰孢菌致病基因功能分析及寄主病原互作提供了重要理论基础。

关键词: 枯萎病, 果胶裂解酶, 基因组, 基因家族

Characterization of pectate lyase gene family in *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* genome and expression mode during inoculation

LI Peiqian FENG Baozhen*

Department of Life Sciences, Yuncheng University, Yuncheng, Shanxi 044000, China

Abstract: [Background] Tomato fusarium wilt is a common soil born fungal disease in tomato production. [Objective] To identify pectate lyase gene family members in *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* genome and to clarify the expression mode after inoculation. [Methods] PEL family was identified, and the distribution, physical and chemical properties, gene structure, and tertiary structure prediction of PELs in *F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici* genome were performed by bioinformatics. Expression mode of *FoPEL*1–16 in inoculated tomato roots were analyzed by RT-qPCR. [Results] There were 16 *FoPEL*s in *F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici* genome. The amino acid sequences were 163–548 aa in length with 16–21 aa signal peptides. The *FoPEL* genes were unevenly distributed on 7 chromosomes.

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31501665); Key Research and Development Program of Shanxi Province (201903D211001-1); Science and Technology Innovation Project of Higher Education Institutions in Shanxi Province (2019L0849, 2019L0851)

*Corresponding author: Tel: 86-359-2610040; E-mail: fengbaozhen@126.com

Received: 15-10-2020; Accepted: 29-11-2020; Published online: 26-02-2021

基金项目: 国家自然科学基金(31501665); 山西省重点研发计划项目(201903D211001-1); 山西省教育厅科技创新项目(2019L0849, 2019L0851)

*通信作者: Tel: 0359-2610040; E-mail: fengbaozhen@126.com

收稿日期: 2020-10-15; 接受日期: 2020-11-29; 网络首发日期: 2021-02-26

16 FoPELs were divided into four groups according to gene structure and conserved motifs. Evolutionary analysis showed that FoPELs clustered in four clades. Similar domain structure presented in the same family according to tertiary structure prediction. RT-qPCR analysis showed that FoPEL expression levels significantly increased during inoculation. **[Conclusion]** The pectate lyase existed in the form of gene family in *F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici* genome, and the difference of gene structure indicated their function diversity. The expression levels of FoPEL were significantly increased during infection, which indicated that FoPEL was involved in the pathogenicity. The study provided a theoretical basis for pathogenic gene function and plant-pathogen interaction of *F. oxysporum*.

Keywords: fusarium wilt, pectate lyase, genome, gene family

植物在生长发育过程中会受到多种病原菌的侵扰,而细胞壁是防御病原菌的第一道屏障。病原菌则能够分泌大量的细胞壁降解酶(Cell Wall Degrading Enzymes, CWDEs)来破坏寄主细胞壁,实现成功定殖^[1]。CWDEs 种类很多,包括果胶酶、木聚糖酶、糖苷水解酶等。果胶酶包括果胶裂解酶(Pectate Lyase, PEL)、多聚半乳糖醛酸酶(Polygalacturonase, PG)、果胶酯酶(Pectinesterase, PE)^[2]。3 种酶协同作用降解果胶,PEL 也能直接作用于植物细胞壁果胶^[3],因而备受关注。

PEL 仅存于微生物中,而且多以基因家族的形式广泛存在。目前已对多种植物病原菌的果胶裂解酶基因功能进行了分析,如 *Glomerella cingulata*^[4]、*Colletotrichum gloeosporioides*^[5-6]、*C. lindemuthianum*^[7]、*C. coccodes*^[8]、*Verticillium dahliae*^[9]、*Phytophthora capsici*^[10]及 *Botrytis cinerea*^[11]等。在侵染过程中,PEL 作为病原菌的毒力因子发挥重要作用。例如 *C. gloeosporioides* 中,敲除 *CcpelB* 基因后,病菌对番茄毒力降低^[8]; *C. coccodes* 中敲除 *CcpelA* 后对鳄梨果实的敏感性降低^[8]。棉花枯萎病 *V. dahliae* 中 PEL 家族有 13 个成员, *VdPEL1* 既能够诱导棉花和烟草的免疫应答,又与菌体毒力有关^[9]。研究人员已发现 *P. capsici* 基因组果胶裂解酶基因家族 22 个基因,均与菌体致病性有关^[10]。但是尚缺乏对镰孢菌枯萎病果胶裂解酶基因研究的报道。

番茄枯萎病主要由番茄尖孢镰孢菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*)引起的一种土传病害,侵染植物维管束,造成植物水分运输困难。该

病害属于系统性病害,防治困难,常造成严重损失。本研究首次在基因组水平上对番茄尖孢镰孢菌的果胶裂解酶基因家族进行鉴定,并对侵染过程中基因表达模式进行分析。分析尖孢镰孢菌基因组致病因子,对于解析致病机理、发掘植物抗病品种,以及加强枯萎病的防控都具有重要科学意义。

1 材料与方法

1.1 材料

番茄尖孢镰孢菌株 Focyc-1 由山东省农科院付丽博士惠赠,保存于本实验室。菌株用 PDA 培养基^[10]于 28 °C 温箱培养。

主要试剂和仪器:荧光定量试剂盒 TransStart Green qPCR SuperMix UDG,北京全式金生物技术(TransGen Biotech)有限公司。荧光定量 PCR 仪, Bio-Rad 公司。

1.2 数据库

番茄尖孢镰孢菌(*F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici*) 4287 基因组数据由 NCBI (National Center for Biotechnology Information)下载。

1.3 蛋白序列鉴定

从 NCBI 下载已报道的真菌、细菌的 PEL 基因,其基因登录号为 AAC64368.1、EMR89234、EGY16604、AVI47216 和 WP_116923571。以下载的序列为诱饵,利用 TBLASTn 软件对番茄尖孢镰孢菌基因组内的基因序列进行筛查分析,参数设置为 E-Value Cut-Off<10⁻¹⁵,检测相应的果胶裂解酶基因。

1.4 基因结构分析

利用 DNAMAN 软件中的 Protein 程序分析氨

氨基酸序列的组成及理化性质。利用在线软件 SignalP V5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)^[12] 将获得的基因的氨基酸序列进行信号肽分析。同时利用 NCBI CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>) 软件对蛋白功能域进行了分析。利用 CBS 在线软件 TMHMM 2.0 预测蛋白序列跨膜区。利用 WOLF SPORT 进行亚细胞定位分析。根据基因组 gff 文件确定外显子-内含子位置绘制每个基因结构图。利用 MEME (<http://meme-suite.org/tools/meme>)^[13] 分析氨基酸序列中潜在的保守基序。

1.5 系统进化分析

将得到的蛋白序列用 MEGA X 构建进化树, 所有设置采用其默认值, 采用邻近结合法 (Neighbor-Joining, NJ) 构建距离树。进行 1 000 次 Bootstrap 自举法检验。

1.6 染色体定位

根据下载的基因组 gff 文件和 dna 文件确定基因长度及所在的染色体, 再利用 Mapchart 2.3 绘制图谱^[14]。

1.7 蛋白二级、三级结构预测

蛋白二级结构特性分析利用 ExPaSy 提供的在线 SOPMA 程序预测分析 α -螺旋、 β -折叠和无规则卷曲。利用 ExPaSy 提供的 ProtParam Tool (<http://web.expasy.org>) 进行同源建模分析蛋白序列三级结构特性, 预测蛋白质的空间模型。

1.8 接种取样

菌株接种于 PDA 培养基 28 °C 静置培养 5 d 制备分生孢子悬浮液, 通过血球计数板计数调整浓度为 1×10^7 个/mL。番茄“粉姐”幼苗用 10% MS 培养基于 200 mL 组培瓶中水培, 长至 4–6 叶期用灭菌剪刀剪掉根尖 0.5 cm 左右以造成创伤, 然后取适量孢子悬浮液接到培养瓶中, 使其终浓度为 1×10^6 个/mL。接种后番茄幼苗置于 28 °C、16 h/8 h 光暗交替培养。接种后于 1、3、5、7 和 10 d 分别剪取毛细根 1–2 cm 存于 -80 °C 用于 RNA 制备。以接种无菌水番茄苗作为对照。每个处理接种 10 棵幼苗, 实验重复 3 次。

1.9 FoPEL 基因表达模式分析

使用 RT-qPCR 分析 *FoPEL* 基因在侵染过程中的表达情况。利用软件 Primer Express V3.0 设计引物(表 1), 以番茄 18S rRNA 基因和镰孢菌 β -Tubulin 为内参基因。利用荧光定量 PCR 仪试验。使用 TransStart Green qPCR SuperMix UDG 反应体系。反应条件: 50 °C 2 min, 94 °C 10 min; 94 °C 5 s, 60 °C 30 s, 45 个循环; 绘制溶解曲线。RT-qPCR 结果用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法进行相对定量分析^[15]。

表 1 荧光定量 PCR 引物

Table 1 Primers used for RT-qPCR

引物名称 Primers	引物序列 Primers sequence (5'→3')
18sF	GACAGACTGAGAGCTCTTTC
18sR	CGGGGAAACTTACCAGGTCC
tubulinF	AGCTCAACGACAATGCACG A
tubulinR	ATGCGACGTTGAGGAAGC
PEL1F	TAAGACCTCTGGTCGTGCCC
PEL1R	CGAGAAGAGCTTACCAGCG
PEL2F	ACAGCCCTCCCATCAGTCTT
PEL2R	GCTCCTTCATCCTGGCCTGT
PEL3F	TGAGGATCCACTTCTGCTCC
PEL3R	GCGGTGATGATCAATTGCC
PEL4F	AGCCCAACTTGCATTCCCT
PEL4R	CGACGATGCGTTTACAGATC
PEL5F	GTTACTCTCCCTTCTCGCCT
PEL5R	GCGAGTGCTGTTTCGGATAG
PEL6F	GCAAGAAGCCCTGTTGAGACTCC
PEL6R	CTAGAAACAGGGATGGCGG
PEL7F	CCCAAGAAGCTCGGCTCT
PEL7R	CAAGAGGTGCTTCAAGCACC
PEL8F	AGTGAGGCCAGATCACGC
PEL8R	CCTTTGTCAAGCTTGGCAG
PEL9F	CTACCCTCTTTGCCACCTTG
PEL9R	GGTGCCTTAGCAGCTTC
PEL10F	CCCCTTCCCCATTACCAAG
PEL10R	CCGGGCAATAAGTTGAACAC
PEL11F	TGGTGTAACTATCAGCC
PEL11R	AACACCATTTCGACCAACAC
PEL12F	AGCTGTGCTTGGTCATTCTT
PEL12R	AATGGCCAGAGTGGCCG
PEL13F	GCCTCCAGCCTTCTCACACT
PEL13R	CCACTTGGCGTCGAAGAC
PEL14F	ACTGTGCAGTCCGAACTTGT
PEL14R	ATTCTTGGGGATGCGGTG
PEL15F	ATTCGCTACATCTTAGGCCG
PEL15R	ACTCTGAGCAGAAGCCGTAGC
PEL16F	GACTCTCCCCAAGTCTGCTG
PEL16R	CACGTTGGAAAGAGTGGCAC

2 结果与分析

2.1 番茄尖孢镰孢菌 PEL 基因家族鉴定

根据番茄尖孢镰孢菌(*F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici*) 4287 基因组编码蛋白检索出其 PEL 家族蛋白, 去除冗余序列共得到 16 条尖孢镰孢菌 PEL 氨基酸序列命名为 *FoPEL1*–16 (表 2)。*FoPEL1*–16 蛋白序列长度为 163–548 个氨基酸, 预测分子量在 17.19–56.56 kD, PI 在 3.97–9.16 之间。除了 *FoPEL6* 外, 所有序列都具备信号肽, 长度在 15–21 个氨基酸。部分序列(6/16)没有 N-糖基化位点, 其余序列具有 1–5 个 N-糖基化位点(表 2)。

2.2 PEL 基因结构分析

FoPEL1–16 基因结构分析结果如图 1 所示。除 *FoPEL3*、7、15 外, 其余基因都有 1–4 个内含子(图 1)。基因 *FoPEL3*、5、8、9 和 14 具有类似的保守基序; *FoPEL1*、6、15 基因结构类似; 而

FoPEL7、10、12 和 13 具有相似的保守基序(图 2)。

跨膜区预测结果显示 *FoPEL1*–16 蛋白序列均无跨膜区, 而亚细胞定位预测显示除 *FoPEL7* 外均为胞外蛋白(表 2)。

2.3 染色体定位分析

番茄尖孢镰孢菌果胶裂解酶基因不均一地分布在 7 条染色体上(图 3)。其中 Chr2 上最多, 有 4 个 *FoPEL* 基因; Chr4 和 Chr13 最少, 各有 1 个基因; Chr7 和 Chr11 分别有 2 个 *FoPEL* 基因; Chr10 和 Chr12 分别有 3 个 *FoPEL* 基因。结合进化分析及基因结构(图 1, 图 2), 可以推测番茄尖孢镰孢菌果胶裂解酶同源基因间可能存在复制现象。例如 *FoPEL3*、5、8、14 聚于一支, 结构类似, 分布于 4 条染色体上, 它们可能源于片段复制。然而 *FoPEL8* 和 9 结构类似, 位于同一染色体上(Chr10), 可能源于串联复制。

表 2 番茄尖孢镰孢菌果胶裂解酶基因家族分析

Table 2 Analysis of pectate lyase gene family in *F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici*

基因 Genes	GenBank accession No.	氨基酸 Amino acid	分子量 Weight (kD)	信号肽 Signal peptide	等电点 PI	N-糖基化位点 N-glycosylation site	亚细胞定位 Subcellular localization
<i>FoPEL1</i>	XP_018241050.1	377	39.03	17	8.13	1	胞外 Extracellular
<i>FoPEL2</i>	XP_018241108.1	175	18.48	18	8.93	0	胞外 Extracellular
<i>FoPEL3</i>	XP_018241515.1	328	34.35	15	9.16	1	胞外 Extracellular
<i>FoPEL4</i>	XP_018241641.1	413	43.68	17	5.23	4	胞外 Extracellular
<i>FoPEL5</i>	XP_018238484.1	336	36.95	17	6.92	4	胞外 Extracellular
<i>FoPEL6</i>	XP_018240665.1	412	42.17	None	4.48	4	胞外 Extracellular
<i>FoPEL7</i>	XP_018248606.1	254	26.40	17	9.16	0	胞质 Intracytoplasmic
<i>FoPEL8</i>	XP_018253145.1	328	35.11	17	4.62	0	胞外 Extracellular
<i>FoPEL9</i>	XP_018250110.1	324	34.16	17	8.32	2	胞外 Extracellular
<i>FoPEL10</i>	XP_018250111.1	306	33.84	15	4.90	5	胞外 Extracellular
<i>FoPEL11</i>	XP_018257112.1	377	39.18	20	4.63	1	胞外 Extracellular
<i>FoPEL12</i>	XP_018247146.1	373	38.13	17	3.97	0	胞外 Extracellular
<i>FoPEL13</i>	XP_018252237.1	233	24.6	21	8.33	0	胞外 Extracellular
<i>FoPEL14</i>	XP_018252427.1	322	33.65	15	7.72	1	胞外 Extracellular
<i>FoPEL15</i>	XP_018252524.1	548	56.56	18	4.41	1	胞外 Extracellular
<i>FoPEL16</i>	XP_018250790.1	163	17.19	15	8.33	0	胞外 Extracellular

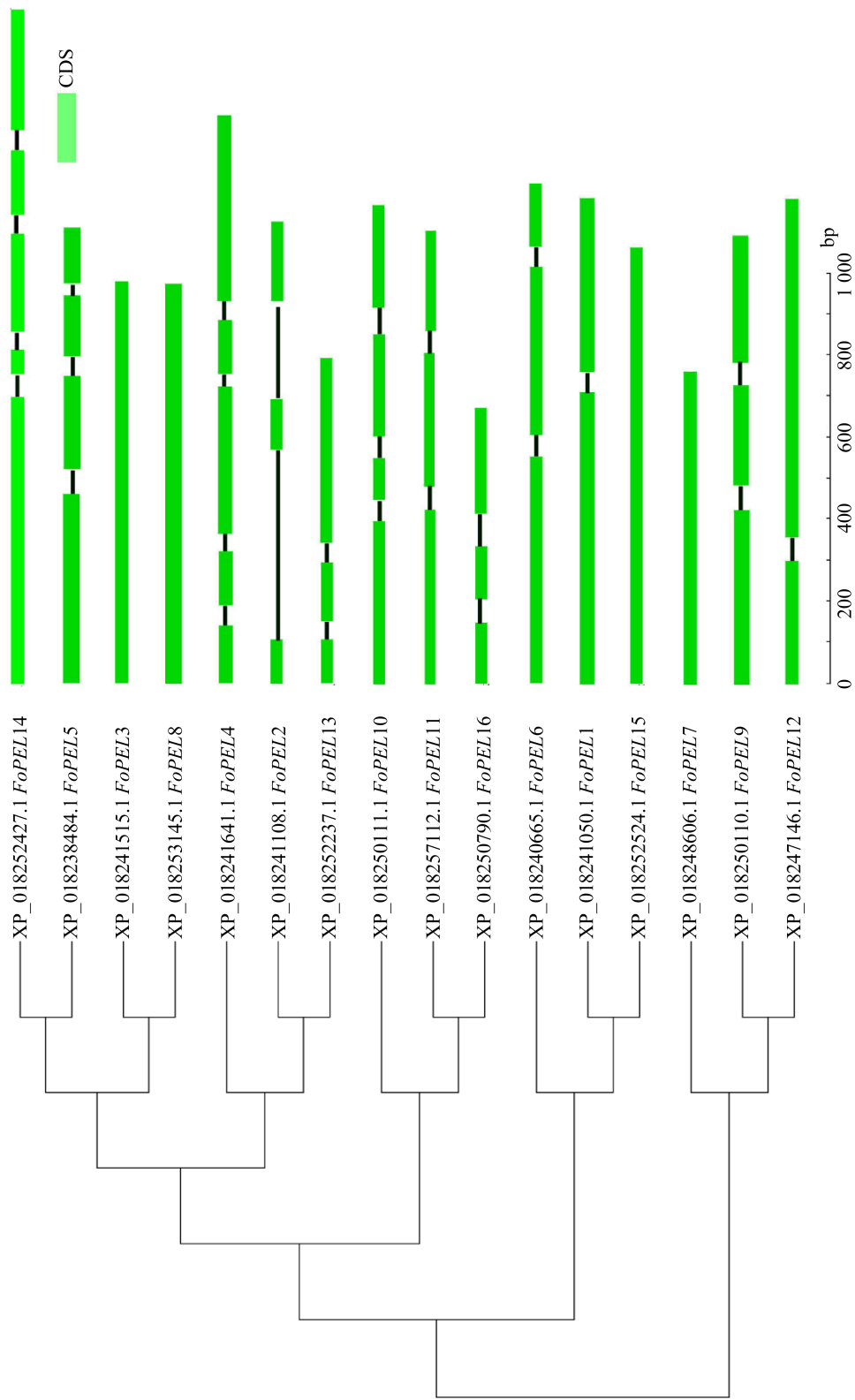


图 1 番茄尖孢镰孢菌 4287 果胶裂解酶基因外显子-内含子结构分析
Figure 1 The exon-intron structure of *FoPEL* genes in *F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici* 4287

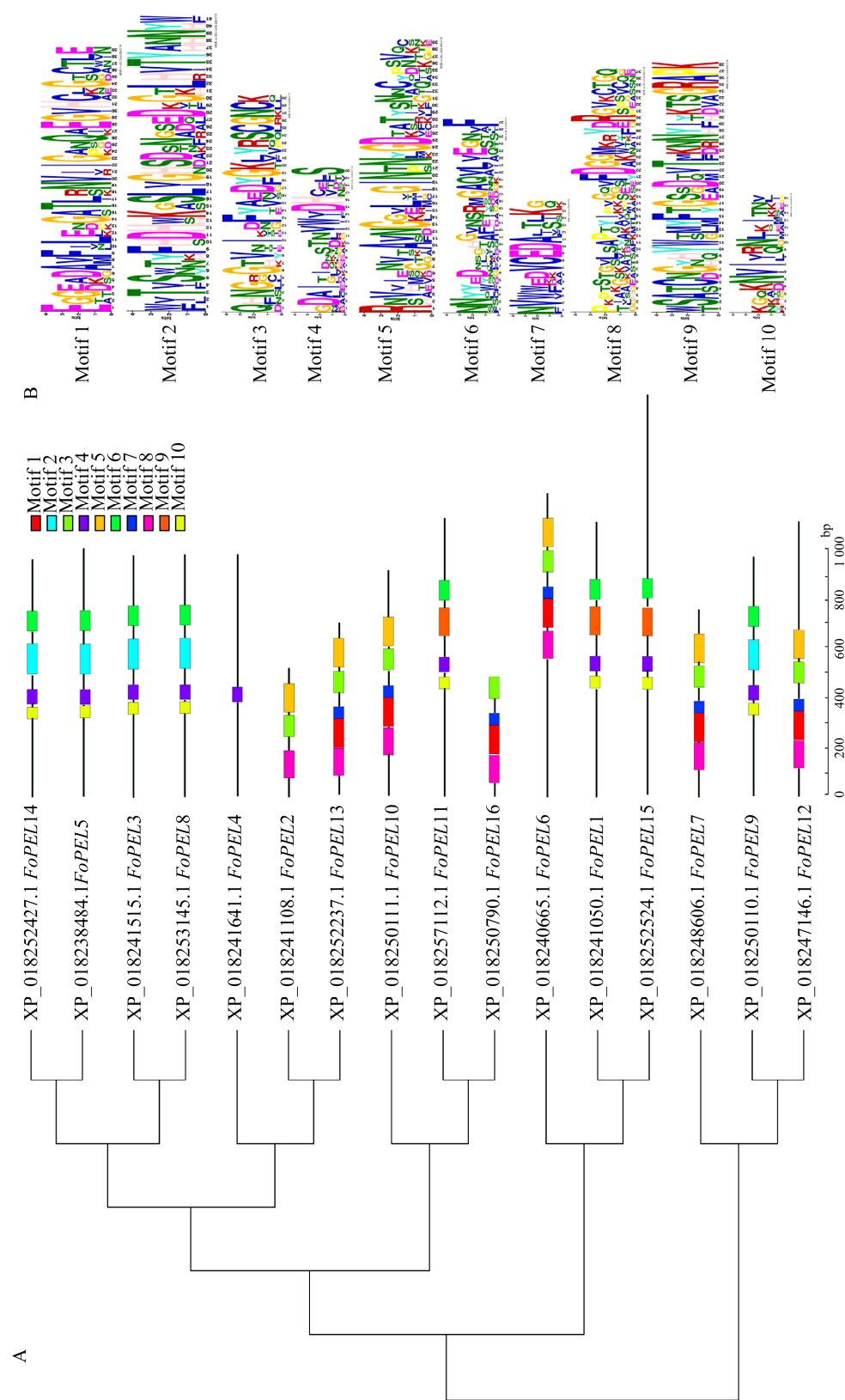


图 2 番茄尖孢镰孢菌4287果胶裂解酶序列保守基序分布
Figure 2 The distribution of conserved motifs in *FoPEL* in *F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici* 4287
注: A: *FoPEL* 蛋白序列的基序分布; B: 10种基序的氨基酸组成
Note: A: The distribution of motif in *FoPEL* protein; B: The amino acid composition of each motif

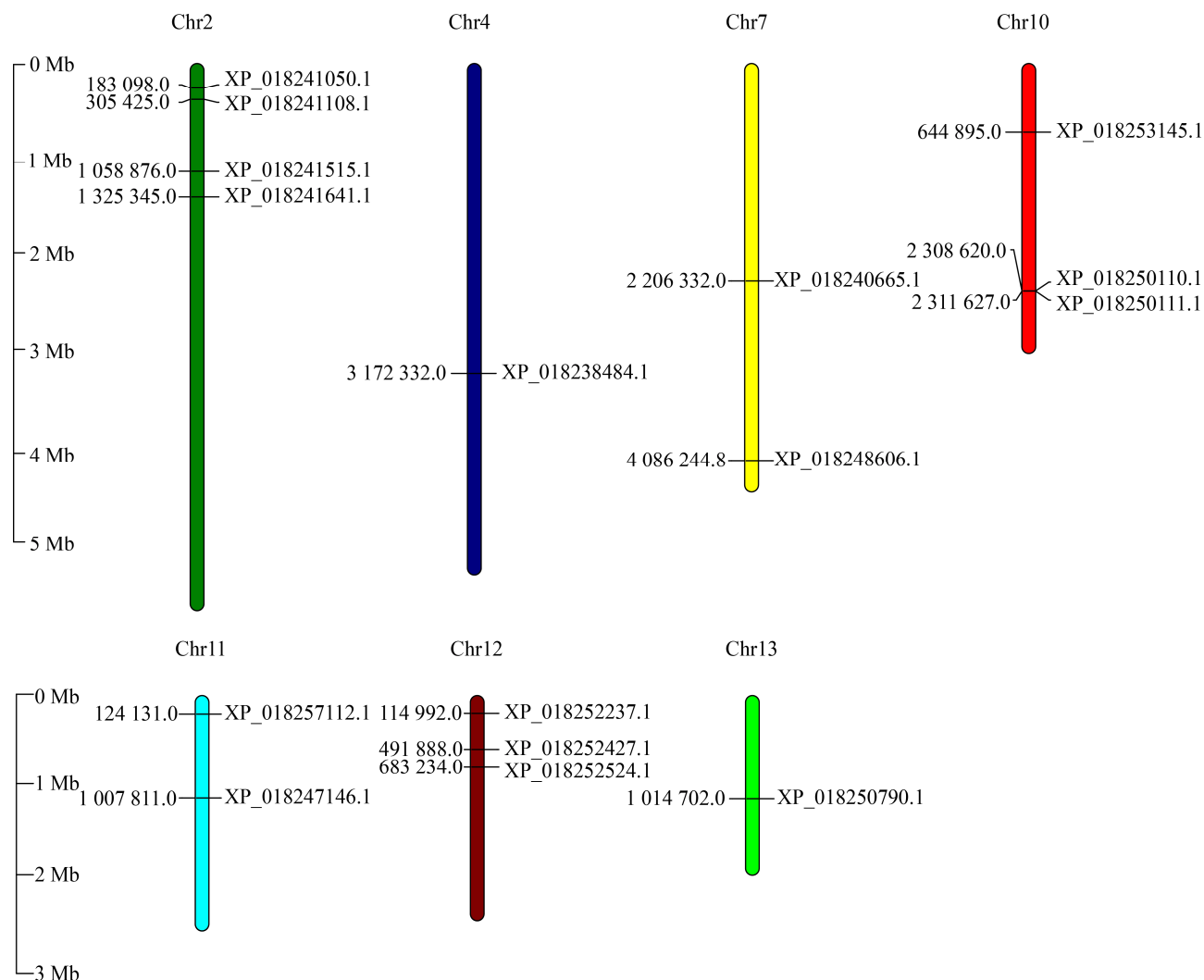


图3 番茄尖孢镰孢菌 4287 果胶裂解酶基因染色体定位

Figure 3 Chromosome mapping of *FoPEL* genes in *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* 4287

注：染色体左侧数字表示基因起始位置，右侧数字为基因 ID

Note: The number on the left side of the chromosome is the starting position, and on the right side is the gene ID

2.4 *FoPEL* 蛋白三级结构分析

利用 ProtParam Tool 对番茄尖孢镰孢菌果胶裂解酶氨基酸进行同源建模,结果显示与同类果胶裂解酶具有相似的三级结构(图 4)。*FoPEL*1-16 的三级结构非常相似,由多个平行的 β -片层形成一个疏水空间结构,主螺旋上伸出大小不等的 Loop 环。此外,*FoPEL*7-14 蛋白序列 N 端和 C 端氨基酸还形成较多无规则卷曲。

2.5 系统进化分析

用 NJ 法对 16 个 *FoPEL* 蛋白序列进行系统进化分析,结果显示,16 个 *FoPEL* 蛋白明显地聚成 4 支(图 1)。其中 *FoPEL*2、3、4、5、8、13、14 聚为一簇;而 *FoPEL*10、11、16 聚为一支;*FoPEL*1、6、15 聚为一支;*FoPEL*7、9 和 12 聚为一支。*FoPEL* 蛋白序列聚类情况与其基因保守基序组成情况相一致。

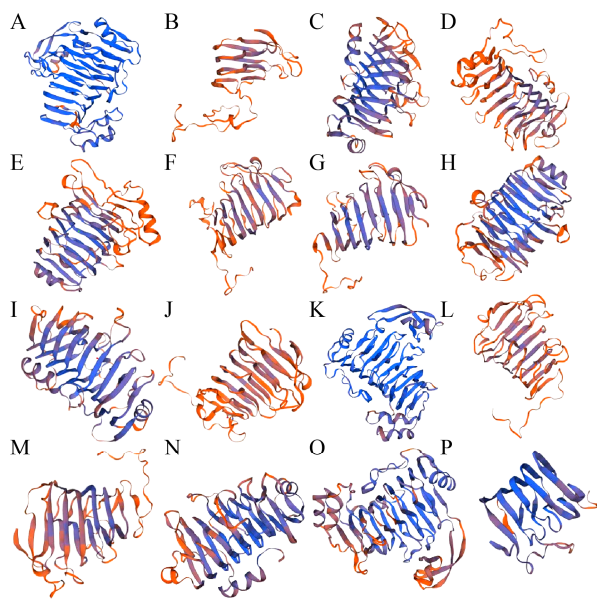


图4 番茄尖孢镰孢菌果胶裂解酶蛋白三级结构预测
Figure 4 Prediction of tertiary structure of pectate lyase protein from *F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici*

2.6 表达模式分析

基因 *FoPEL1*–*16* 在接种后 1–10 d 表达情况如图 5 所示。结果显示, 接种后 1–10 d, 16 个基因表达水平明显升高, 大多数基因在 7 d 表达水平达到峰值, 处理 10 d 时表达量出现下降。其中, *FoPEL14* 在 7 d 的表达量明显超过了其他基因, 而

FoPEL5 的表达量处于同时期的最低水平。*FoPEL9* 和 10 在检测时间内总体水平较其他基因偏低。基因 *FoPEL3* 和 5 表达量在 5 d 最高; *FoPEL13* 在检测时间内表达量持续升高。

3 讨论与结论

细胞壁是限制病原微生物侵入植物体的物理防线, 也是病原菌细胞壁降解酶(CWDEs)的攻击目标^[16-18]。植物病原菌能分泌多种 CWDEs, 引起病害的发生发展^[19-21]。果胶裂解酶 PEL 是一类重要的 CWDEs, 对于病原菌侵入定殖都具有重要的意义。PEL 在多种病原菌基因组内以基因家族形式存在^[9-10,22]。本文利用生物信息学方法分析了番茄尖孢镰孢菌内果胶裂解酶基因家族的分布、基因结构特点、染色体定位以及蛋白三级结构; 并利用荧光定量 PCR 对 16 个 *FoPEL* 基因在侵染过程中的表达模式进行了分析。研究发现番茄尖孢镰孢菌基因组中多果胶裂解酶家族存在 16 个成员(*FoPEL1*–*16*), 其氨基酸序列长度在 163–548 个氨基酸。Fu 等发现 *P. capsici* 基因组内果胶裂解酶家族存在 22 个成员^[10]; *V. dahliae* 基因组内有 13 个果胶裂解酶基因^[9], 而 *Clonostachys rosea* 基因组 PEL 基因有 17 个^[22]。当然有些病原菌基因组中果胶裂解酶基因数量较少,

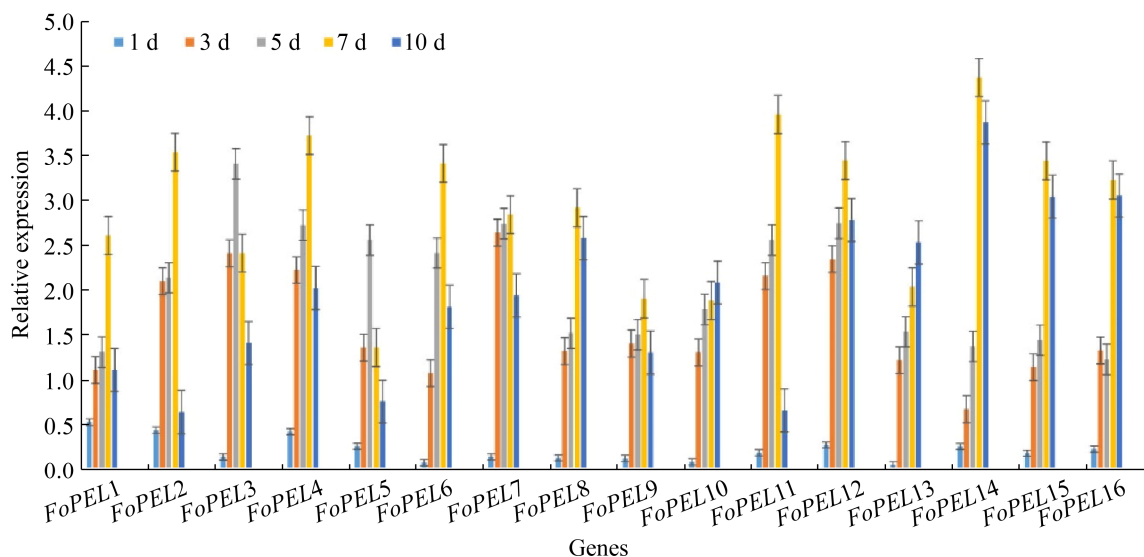


图5 接种番茄根内 *FoPEL1*–*16* 基因表达模式分析

Figure 5 Expression profile of *FoPEL1*–*16* in tomato roots after inoculation

如 *Magnaporthe oryzae* 基因组只有 2 个 PEL 基因, *S. sclerotiorum* 和 *B. cinerea* 基因组中 PEL 基因分别只有 2 和 7 个^[22]。同源基因数量差异悬殊可能与微生物营养方式差异有关,也是长期进化选择的结果。

本研究中根据基因结构及进化分析将 16 个 *FoPEL* 分成 4 组。Atanasova 等^[22]发现 *C. rosea* 基因组的 17 个 PEL 基因可以分为 4 个亚家族。Fu 等也发现 *P. capsici* 基因组内果胶裂解酶家族存在 22 个成员可以分为 2 大类^[10]。这都表明同一个家族基因功能具有多样性,进化过程中同源基因的功能分化。蛋白三级结构预测模型与已报道的 *Aspergillus niger* 果胶裂解酶晶体结构相似,都是右螺旋的 β -片层组成的疏水空间结构^[23-24]。然而 *FoPEL* 三级结构同时存在差异,进一步说明了这些基因可能具有不同功能。

据报道多种病原菌的果胶裂解酶参与致病性和毒力。如:*PelB* 基因缺失会导致 *C. gloeosporioides* 对鳄梨果实毒力的丧失^[6]; *CcpelA* 与 *C. coccodes* 毒力有关^[8]; *VdPEL1* 功能研究证明该基因是重要的致病因子并且参与诱导寄主免疫反应^[9]; 12 个 *PcPEL* 基因在 *P. capsici* 接种的辣椒组织里高水平表达^[10]。本研究发现接种后 1-7 d, 大多数 *FoPEL* 基因表达水平显著升高,第 10 天表达量下降,说明 *FoPEL* 基因参与病原菌的致病过程,其功能还需要进一步的实验验证。

随着基因组学和蛋白组学时代的到来,利用生物信息学对病原菌基因组进行分析,挖掘目的基因,对于在分子和蛋白水平解析这些基因功能具有重要意义。这也为植物病原菌致病机理和抗病机制研究提供了重要的前期基础。

REFERENCES

- [1] Klöckner A, Bühl H, Viollier P, Henrichfreise B. Deconstructing the chlamydial cell wall[A]//Häcker G. Biology of *Chlamydia*[M]. Cham: Springer, 2016: 1-33
- [2] Collmer A, Keen NT. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis[J]. Annual Review of Phytopathology, 1986, 24(1): 383-409
- [3] Cardoso PG, Teixeira JA, De Queiroz MV, De Araújo EF. Pectin lyase production by recombinant *Penicillium griseoroseum* strain 105[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2010, 56(10): 831-837
- [4] Templeton MD, Sharrock KR, Bowen JK, Crowhurst RN, Rikkerink EHA. The pectin lyase-encoding gene (*pnl*) family from *Glomerella cingulata*: characterization of *pnlA* and its expression in yeast[J]. Gene, 1994, 142(1): 141-146
- [5] Wei YD, Shih J, Li JR, Goodwin PH. Two pectin lyase genes, *pnl-1* and *pnl-2*, from *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae* differ in a cellulose-binding domain and in their expression during infection of *Malva pusilla*[J]. Microbiology, 2002, 148(Pt 7): 2149-2157
- [6] Yakoby N, Beno-Moualem D, Keen NT, Dinor A, Pines O, Prusky D. *Colletotrichum gloeosporioides pelB* is an important virulence factor in avocado fruit-fungus interaction[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2001, 14(8): 988-995
- [7] Lara-Márquez A, Zavala-Páramo MG, López-Romero E, Calderón-Cortés N, López-Gómez R, Conejo-Saucedo U, Cano-Camacho H. Cloning and characterization of a pectin lyase gene from *Colletotrichum lindemuthianum* and comparative phylogenetic/structural analyses with genes from phytopathogenic and saprophytic/opportunistic microorganisms[J]. BMC Microbiology, 2011, 11(1): 1-15
- [8] Ben-Daniel BH, Bar-Zvi D, Tsror Lahkim L. Pectate lyase affects pathogenicity in natural isolates of *Colletotrichum coccodes* and in *pelA* gene-disrupted and gene-overexpressing mutant lines[J]. Molecular Plant Pathology, 2012, 13(2): 187-197
- [9] Yang YK, Zhang Y, Li BB, Yang XF, Dong YJ, Qiu DW. A *Verticillium dahliae* pectate lyase induces plant immune responses and contributes to virulence[J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 1271
- [10] Fu L, Zhu CY, Ding XM, Yang XY, Morris PF, Tyler BM, Zhang XG. Characterization of cell-death-inducing members of the pectate lyase gene family in *Phytophthora capsici* and their contributions to infection of pepper[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2015, 28(7): 766-775
- [11] Shah P, Gutierrez-Sanchez G, Orlando R, Bergmann C. A proteomic study of pectin-degrading enzymes secreted by *Botrytis cinerea* grown in liquid culture[J]. PROTEOMICS, 2009, 9(11): 3126-3135
- [12] Feng BZ, Li PQ, Cheng JL, Liu J. Bioinformatic analysis of NPP effectors gene family in *Phytophthora capsici* genome[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2014, 42(7): 28-32 (in Chinese)
冯宝珍, 李培谦, 成娟丽, 刘缙. 辣椒疫霉 NPP 效应子基因家族生物信息学分析[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(7): 28-32
- [13] Bailey TL, Elkan C. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers[A]//Proceedings of the 2nd International

- Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology[C]. Menlo Park, CA, USA: AAAI Press, 1994, 2: 28-36
- [14] Lu XH, Liu WQ, Xiang CG, Li XJ, Wang Q, Wang T, Liu ZX, Zhang JL, Gao LH, Zhang WN. Genome-wide characterization of GRAS family and their potential roles in cold tolerance of cucumber (*Cucumis sativus* L.)[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(11): 3857
- [15] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408
- [16] Žárský V, Kulich I, Fendrych M, Pečenková T. Exocyst complexes multiple functions in plant cells secretory pathways[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2013, 16(6): 726-733
- [17] Fujisaki K, Abe Y, Ito A, Saitoh H, Yoshida K, Kanzaki H, Kanzaki E, Utsushi H, Yamashita T, Kamoun S, et al. Rice Exo70 interacts with a fungal effector, AVR-Pii, and is required for AVR-Pii-triggered immunity[J]. The Plant Journal, 2015, 83(5): 875-887
- [18] Cantu D, Vicente AR, Labavitch JM, Bennett AB, Powell ALT. Strangers in the matrix: plant cell walls and pathogen susceptibility[J]. Trends in Plant Science, 2008, 13(11): 610-617
- [19] King BC, Waxman KD, Nenni NV, Walker LP, Bergstrom GC, Gibson DM. Arsenal of plant cell wall degrading enzymes reflects host preference among plant pathogenic fungi[J]. Biotechnology for Biofuels, 2011, 4(1): 1-14
- [20] Glass NL, Schmoll M, Cate JH, Coradetti S. Plant cell wall deconstruction by ascomycete fungi[J]. Annual Review of Microbiology, 2013, 67: 477-498
- [21] Kubicek CP, Starr TL, Glass NL. Plant cell wall-degrading enzymes and their secretion in plant-pathogenic fungi[J]. Annual Review of Phytopathology, 2014, 52: 427-451
- [22] Atanasova L, Dubey M, Grujić M, Gudmundsson M, Lorenz C, Sandgren M, Kubicek CP, Jensen DF, Karlsson M. Evolution and functional characterization of pectate lyase PEL12, a member of a highly expanded *Clonostachys rosea* polysaccharide lyase 1 family[J]. BMC Microbiology, 2018, 18(1): 1-19
- [23] Zeuner B, Thomsen TB, Stringer MA, Krogh KBRM, Meyer AS, Holck J. Comparative characterization of *Aspergillus* pectin lyases by discriminative substrate degradation profiling[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020, 8: 873
- [24] Markovič O, Janeček Š. Pectin degrading glycoside hydrolases of family 28: sequence-structural features, specificities and evolution[J]. Protein Engineering, 2001, 14(9): 615-631