

植物病原真菌分泌蛋白质组学研究进展

李云锋^{1,2} 聂燕芳³ 王振中^{1,2*}

(1. 华南农业大学 农学院 广东 广州 510642)

(2. 华南农业大学 广东省微生物信号与作物病害重点实验室 广东 广州 510642)

(3. 华南农业大学 材料与能源学院 广东 广州 510642)

摘要:分泌蛋白质组是指在特定时间和特定条件下,由组织或细胞等分泌的全部蛋白质。在病原真菌与植物的相互作用过程中,病原真菌会分泌大量的蛋白质和代谢产物,在病原真菌对植物的侵入、定殖和扩展等致病过程中起着重要作用。本文主要介绍了分泌蛋白质在植物病原真菌致病性中的作用、重要植物病原真菌分泌蛋白质组的研究进展、及植物病原真菌分泌蛋白质组的生物信息学预测分析等,对于全面了解植物病原真菌的致病机理具有重要意义。

关键词:植物病原真菌,分泌蛋白,分泌蛋白质组学,致病性

Research progress on secretomics of phytopathogenic fungi

LI Yun-Feng^{1,2} NIE Yan-Fang³ WANG Zhen-Zhong^{1,2*}

(1. College of Agriculture Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China)

(2. Guangdong Province Key Laboratory of Microbial Signals and Disease Control, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China)

(3. College of Materials and Energy, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China)

Abstract: The secretome is a group of proteins secreted by cells and/or tissues at a given time and under a given condition. Most phytopathogenic fungi can secrete many proteins and metabolites during the plant-fungi interaction, and the secreted proteins and metabolites play important roles at different infection stages of fungal penetration, colonization, and lesion formation. In this review, we summarized recent advances in biological functions of secreted proteins in fungal pathogenicity, the secretome of important plant pathogenic fungi, and bioinformatics prediction of fungal secretomes, which will help to understand the mechanisms involved in fungal pathogenesis.

Keywords: Phytopathogenic fungi, Secreted proteins, Secretomics, Pathogenicity

分泌蛋白(Secreted proteins)是指在细胞内合成后分泌到细胞外起作用的蛋白质;作为一类非常重要的生物活性分子,其在细胞信号转导、细胞凋亡、生物体的发育及防御等许多生理及病理过程中扮

演着重要角色^[1]。大多数分泌蛋白质由内质网/高尔基体途径(ER/Golgi pathway)分泌至胞外(常规途径),也有少数真核细胞蛋白由于缺少常规的信号肽、或缺少依赖内质网/高尔基体的翻译后修饰等,

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30971887); 广东省普通高校青年创新人才项目(粤教科函[2015] 3号)

*通讯作者: Tel: 86-80-85281469; ✉: zwang@scau.edu.cn

收稿日期: 2014-08-11; 接受日期: 2014-09-17; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-09-18

而通过非常规蛋白质的分泌途径(Unconventional secretory pathways, 又称为不依赖内质网/高尔基体的蛋白分泌途径)进行分泌^[2]。据报道, 真菌所分泌的蛋白质约占基因组编码总蛋白质的 10%以上^[3]。如稻瘟菌(*Magnaporthe oryzae*)的分泌蛋白质(2 470 个)约占总蛋白质(11 069 个)的 22.3%, 粗糙脉孢霉(*Neurospora crassa*)的分泌蛋白质(1 666 个)约占总蛋白质(9 842 个)的 16.9%^[4]。按照功能, 真菌分泌蛋白主要分为两类。其中, 一类为具有酶功能的分泌蛋白, 主要包括: (1) 参与植物细胞壁修饰和降解的相关酶类(Plant cell wall modifying/degrading enzymes), 如细胞壁降解酶(Cell wall degrading enzymes, CWDEs)、角质酶、脂酶、漆酶、氯过氧化物酶(Chloroperoxidase)等; (2) 参与植物细胞其他组分降解和利用的相关酶类, 主要有蛋白水解酶类(如金属蛋白酶类、天冬氨酰蛋白酶、羧肽酶、氨肽酶、肽酶等)、胞外核酸酶和植酸酶(Phytases)等; (3) 参与真菌细胞壁修饰的酶类, 如胞外几丁质和葡聚糖修饰酶类(Chitin and glucan modifying enzymes)等; (4) 代谢相关酶类, 如葡萄糖氧化酶、激酶、乙醛脱氢酶、脱氨酶和酰胺转移酶等。另一类为不具有酶功能的分泌蛋白, 主要包括胁迫相关蛋白、Allergen、富含丝氨酸的分泌蛋白等。

大量研究表明, 分泌蛋白在许多真菌对植物的致病性中起着重要作用。例如, 病原真菌在侵入寄主植物期间可以分泌大量的蛋白质和代谢产物, 来攻击植物细胞壁和降解植物细胞复杂的碳氮化合物, 以阻碍或抑制植物的抗性反应, 从而完成其致病过程^[5-7]。近年来, 随着许多真菌基因组测序的完成, 分泌蛋白在病原真菌与寄主互作中的功能研究越来越受到重视, 尤其是分泌蛋白在其致病过程中的作用成为了研究的热点。分泌蛋白质组学技术的兴起和发展, 让大规模分析分泌蛋白质组成为可能, 也为更全面地了解植物与病原真菌的互作机理等提供了新的思路。本文主要就植物病原真菌的分泌蛋白质组及相关研究进展做一综述。

1 分泌蛋白质在植物病原真菌致病性中的作用

在病原真菌与植物的相互作用过程中, 分泌蛋白被证实实在真菌对植物的侵入、定殖和扩展等致病过程中发挥着重要作用。针对寄主植物复杂的防御机制, 病原真菌已进化出相应的策略来克服寄主的抗性。例如, 针对寄主植物表皮的角质物, 病原真菌能分泌角质酶和脂酶来降解角质层^[8-9]。针对寄主植物细胞壁的复杂成分, 病原真菌能分泌 CWDEs 来分解细胞壁的果胶、纤维素和半纤维素等, 从而完成其侵入过程。对尖孢镰刀菌古巴专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, FOC)的 CWDEs 研究表明, FOC 在寄主体内能够分泌多聚半乳糖醛酸酶、果胶甲基半乳糖醛酸酶、果胶甲基反式消除酶和纤维素酶等; 这些 CWDEs 对不同香蕉品种假茎组织具有降解破坏作用, 表明 CWDEs 是 FOC 的重要致病因子; 但不同小种间所分泌的 CWDEs 种类存在差异, 推测这种差异可能是其导致 FOC 不同小种致病性差异的原因^[7]。

分泌蛋白也被证实参与了病原真菌侵染结构的形成。Skamnioti 等^[10]研究证实对角质酶 2 在稻瘟菌附着胞形成和成熟的过程中的表达量显著上调, 对侵染钉的形成具有重要作用。刘永锋等^[11]结合 SDS-PAGE 和质谱技术对稻瘟病菌孢子萌发过程中的分泌蛋白质进行了鉴定, 并推测这些蛋白质可能在稻瘟病菌的孢子萌发和附着胞形成过程中具有重要功能。

此外, 一些病原真菌的分泌蛋白被证实为效应子蛋白(Effectors), 其既可以加速病害的发展, 又可以诱导植物的抗病性^[12]。例如, 我们从稻瘟菌中分离纯化了一种激发子, 可以诱导水稻对稻瘟菌的抗性; 对其诱导水稻叶片的比较蛋白质组学研究表明, 其可以诱导病程相关蛋白(PR-10a 和 PR-5)、活性氧相关蛋白及信号转导相关蛋白的表达, 并推测这些蛋白质的变化是水稻获得抗病性的主要原因^[13]。植物与病原菌互作的 PTI (PAMP-triggered immunity)-ETI (Effector-triggered immunity)理论也

提出,致病型病原菌通过分泌 Effector 来抑制寄主植物的 PTI 反应,但当 Effector 被寄主抗病基因的 R 蛋白特异性识别后,又可以激活植物的 ETI 反应;这种分子互作方式也被认为是病原真菌与寄主互作机制的核心^[14]。研究同时也发现真菌可以分泌许多小分子量、富含丝氨酸和不含已知酶活性的蛋白质,可以作为植物毒素或激发子在寄主与病原菌互作中起重要作用^[15-16]。

2 重要植物病原真菌分泌蛋白质组学研究进展

由于分泌蛋白质在病原真菌致病性中的重要作用,因此研究病原真菌分泌蛋白质组已成为解析病原真菌致病分子机理的重要目标。分泌蛋白质组(Secretome)是指组织或细胞等分泌的全部蛋白质^[17];分泌蛋白质组学(Secretomics)是指利用蛋白质组学(Proteomics)技术在整体水平上研究细胞分泌蛋白质的组成、表达水平、表达变化及修饰状态,分析分泌蛋白质之间的相互作用与联系,研究分泌蛋白质的调控规律等^[18]。作为蛋白质组学的分支之一,分泌蛋白质组学都是以已有的蛋白质组学研究技术和方法为基础来开展的。近年来,很多学者对一些重要植物病原真菌的分泌蛋白质组进行了研究。

开展较多的是禾谷镰刀菌(*F. graminearum*)分泌蛋白质组的研究。禾谷镰刀菌是小麦、玉米及许多禾谷类作物的重要病原真菌,随着其基因组测序的完成,应用分泌蛋白质组学技术来解析其致病性机理方面的研究日益增多^[19]。以葡萄糖和啤酒花(*Humulus lupulus*)细胞壁作为碳源,Phalip 等^[20]采用一向凝胶电泳(1-D PAGE)、双向电泳(2-DE)并结合质谱技术对禾谷镰刀菌的分泌蛋白质组进行了研究,发现生长在含啤酒花细胞壁的培养基中时,禾谷镰刀菌能分泌更多的蛋白质;并分别鉴定了 23 和 84 个分泌蛋白;大部分蛋白质与糖类代谢相关,主要参与细胞壁多糖的降解。Paper 等^[19]应用高通量的液相色谱-串联质谱技术(LC-MS/MS)对侵染麦

穗和在 13 种合成培养基中生长的禾谷镰刀菌分泌蛋白质组进行了研究,分别鉴定了 120 个和 229 个真菌分泌蛋白;其中有 49 个分泌蛋白质仅在侵染麦穗条件下被发现,推测这些蛋白质在禾谷镰刀菌侵染其小麦的致病过程中发挥着重要作用。为了模仿植物与病原菌互作,以大麦粉和小麦粉作为唯一的营养源来培养禾谷镰刀菌,Yang 等^[16]采用基于 2-DE 的蛋白质组学技术对其分泌蛋白质组进行了研究,鉴定了 69 个分泌蛋白,主要包括细胞壁降解酶、淀粉降解酶等。Rampitsch 等^[21]结合酶解和 LC-MS/MS 技术,开展了禾谷镰刀菌野生型和丧失致病力的敲除突变体($\Delta tri6$ 和 $\Delta tri10$)的比较分泌蛋白质组学研究;发现 $\Delta tri6$ 和 $\Delta tri10$ 间有 29 个分泌蛋白质差异表达,分别为细胞壁降解相关酶类、代谢相关酶类、病程相关蛋白质及功能未知蛋白质等。Ji 等^[22]应用 1-D PAGE 及 LC-MS/MS 技术对侵染小麦的禾谷镰刀菌分泌蛋白进行了分析,鉴定了 87 个分泌蛋白,推测许多分泌蛋白作为毒力因子参与病原菌的致病作用。

稻瘟菌(*M. oryzae*)作为植物病原真菌致病分子机理研究的重要模式生物,有学者先后开展了其分泌蛋白质组的研究。Wang 等^[5]应用 2-DE 和质谱技术对氮饥饿(Nitrogen starvation)下的稻瘟菌分泌蛋白质组进行了研究,发现有 89 个分泌蛋白质差异表达,并鉴定了其中的 85 个,主要为细胞壁水解酶(22.4%)、蛋白和脂类水解酶(24.7%)、活性氧清除相关蛋白质(22.4%)及功能未知蛋白(14.1%)等,并认为这些分泌蛋白是稻瘟菌成功侵染寄主所必需的。Jung 等^[23]采用体外模拟稻瘟菌侵染水稻的环境,对稻瘟菌附着胞形成阶段的分泌蛋白质组进行了研究,结果表明稻瘟菌在玻璃纸(Glass plate)和 PVDF 膜上能形成附着胞,在液体培养基中则不能形成附着胞;不同条件下的稻瘟菌分泌蛋白质组有明显差异,具有互补性;经质谱分析,有 53 个分泌蛋白为新发现的分泌蛋白质;并认为玻璃纸和 PVDF 膜可用于模拟稻瘟菌侵染水稻环境下的分泌蛋白质组研究。

灰霉菌(*Botrytis cinerea*)是一种死体营养型病原真菌,可引起全世界约 200 多种植物的灰霉病。随着灰霉菌 B05.10 和 T4 菌株测序的完成,灰霉菌已成为研究死体营养型病原菌的模式菌^[24]。Li 等^[25]通过比较蛋白质组学技术开展了环境 pH 对灰霉菌分泌蛋白质组的影响,发现在 pH 4.0 和 pH 6.0 的环境中处理后,灰霉菌分泌蛋白质组有明显的差异,并鉴定了其中的 21 个分泌蛋白质;发现在 pH 4.0 时,与蛋白质水解相关的分泌蛋白被诱导,在 pH 6.0 时,大部分细胞壁降解酶表达上调;该结果表明灰霉菌可根据环境 pH 的变化来调节其分泌蛋白的表达。应用 2-DE 和 nUPLC-MS 技术, González-Fernández 等^[26]对灰霉菌 2 个不同菌系的分泌蛋白质组进行了分析,发现不同菌系间有 51 个分泌蛋白质有表达差异,推测内切多聚半乳糖醛酸酶、天冬氨酸蛋白酶和 Cerato-platanin protein 蛋白等作为毒力因子,可参与对寄主的致病性等。Espino 等^[27]建立了一个新的模拟病原菌侵染植物的真菌分泌蛋白的提取方法;其分别以含不同碳源(葡萄糖、羧甲基纤维素、淀粉、果胶、及去除高分子量蛋白的番茄果实提取物)的液体培养基来诱导真菌的分泌蛋白表达,结果发现最能模拟植物环境的番茄果实提取物所获得的分泌蛋白最多,且该方法还避免了寄主蛋白对病原菌分泌蛋白的干扰;利用该方法,分析了灰霉菌接种在含有植物提取物的合成培养基中 16 h 后的分泌蛋白表达情况;应用 LC-MS/MS 技术,鉴定了 105 个蛋白质;其中大部分蛋白质为蛋白酶类和植物细胞壁降解酶类等。

近年来,很多其他重要植物病原真菌的分泌蛋白质组也得到了研究;如核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)^[28]、香蕉黑条叶斑病菌(*Mycosphaerella fijiensis*)^[29]、轮枝镰孢菌(*F. verticilloides*)^[30]、葡萄座腔菌(*Diplodia corticola*)^[31]、可可链孢荚腐病菌(*Moniliophthora roreri*)^[32]和大麦白粉菌(*Blumeria graminis*)^[33]等。对于植物病原真菌分泌蛋白质组学的研究,目前主要关注于不同培养基条件(如不同碳源、不同 pH 环境等)、不同小种(菌系)、基因敲除

突变体与野生型、真菌不同生长阶段的比较分泌蛋白质组学研究,以及体外模拟植物与病原菌互作的分泌蛋白质组学方法的建立等,其主要目的在于建立模拟病原真菌侵染植物时分泌蛋白质组真实表达情况的分析方法,及鉴定更多的真菌分泌蛋白质,挖掘致病相关的分泌蛋白,并开展其基因功能研究,为更好地解析病原真菌与植物的互作机理奠定基础^[34]。

3 植物病原真菌分泌蛋白质组的生物信息学预测分析

随着很多重要植物病原真菌基因组测序的完成,应用生物信息学对其全基因组数据进行分析和研究,为进一步了解其潜在的分泌蛋白所具有的结构及功能提供了可能。常用的分泌蛋白质预测软件主要有:信号肽预测软件 SignalP v4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)、SigCleave (<http://www.sanger.ac.uk/Software/EMBOSS/Apps/>) 和 RPSP (<http://rpsp.bioinfo.pl/RPSP.tar.gz/>);亚细胞定位预测软件 TargetP v1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) 和 WoLF PSORT (<http://psort.hgc.jp/>);跨膜螺旋结构预测软件 TMHMM v2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 和 Phobius (<http://phobius.sbc.su.se/>); GPI 锚定位点预测软件 Big-PI Predictor (http://mendel.imp.ac.at/sat/gpi/gpi_server.html)和 PredGPI (<http://gpcr.biocomp.unibo.it/predgpi/>);非经典的分泌蛋白预测软件 SecretomeP v2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>)等。

目前,已有许多学者开展了病原真菌分泌蛋白质的预测分析。应用 SignalP v3.0、TargetP v1.01、Big-PI Predictor 和 TMHMM v2.0 分析软件,于钦亮等^[35]对小麦赤霉病菌(*F. graminearum*)全基因组 11 640 个蛋白编码基因的 N-端氨基酸序列进行了信号肽分析,预测出 606 个潜在的分泌蛋白编码基因,约占基因组中编码蛋白质基因总数的 5.4%;对这些分泌蛋白进行 MEME 软件分析,有 157 个分

泌蛋白具有保守的 RXLX 模体,推测这些基因可作为禾谷镰刀菌致病相关的候选基因。周晓昱等^[36]应用 SignalP v3.0、PSORT、TMHMM-2.0、THUMBUP、big-PI Predictor 和 TargetP v1.01 对已经公布的马铃薯晚疫病菌(*Phytophthora infestans*)全基因组 22 658 个蛋白质氨基酸序列进行了分析,预测出 671 个为潜在的分泌型蛋白,占编码蛋白总数的 3.0%;其中有 45 个分泌蛋白有功能方面的描述,功能涉及细胞代谢、信号转导等方面。韩长志^[37]利用 SignalP、ProtComp、TMHMM、Big-PI Predictor 和 TargetP 软件对禾谷炭疽菌(*Colletotrichum graminicola*)中 120 006 条蛋白质序列进行了分泌蛋白预测分析,发现有 630 个分泌蛋白,预测具有功能的蛋白为 330 个。苏源等^[38]利用 SignalP v3.0、TargetP v1.01、Big-PI Predictor 和 THMM-2.0 等软件分析了稻瘟菌的 12 595 个蛋白序列,预测有 1 134 个分泌蛋白,其中 435 个分泌蛋白具有功能描述。Morais do Amaral 等^[8]应用 TargetP v1.1、SignalP v3.0、TMHMM v2.0、Big-PI 和 ProtComp v8.0 等软件,对小麦禾生球腔菌(*Mycosphaerella graminicola*)的分泌蛋白质组进行了分析,预测出 492 个分泌蛋白,其中 321 个具有功能注释,171 个为功能未知蛋白。陈相永等应用 SignalP v4.1、WoLF PSORT、Phobius 和 TMHMM v2.0 等软件分析了 12 种不同寄生性植物病原真菌的分泌蛋白质组,并对碳水化合物酶类(CAZymes)进行了注释和比较,结果表明非专性寄生真菌编码的分泌蛋白占基因组编码基因的比例较专性寄生真菌的偏高;在 CAZymes 家族中,非专性寄生真菌的糖基水解酶家族和多糖裂解酶家族较专性寄生真菌显著扩增;功能聚类分析发现,非专性寄生真菌参与纤维素、果胶、木聚糖等植物细胞壁组分降解相关的基因较专性寄生真菌明显增多^[39]。利用 SignalP v4.1、TargetP v1.1、Big-PI Predictor、THMM-2.0 和 WoLFPSORT 等软件,我们对尖孢镰刀菌甜瓜专化型(*F. oxysporum* f. sp. melons)的全基因组序列(20 033 个蛋白序列)进行了预测分析,预测约有 2 200 个分泌蛋白。也有

学者先后开展了小麦秆锈病菌(*P. graminis*)^[40]、玉米黑粉菌(*Ustilago maydis*)^[41]、稻瘟菌(*M. oryzae*)^[42-43]和大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)^[44]等的分泌蛋白质预测分析。

目前已建立了真菌分泌蛋白质组的数据库;如 FSD 数据库(<http://fsd.snu.ac.kr>)包含了 273 个真菌种(281 个 Datasets)的分泌蛋白质组(至 2014 年 6 月)^[41];FunSecKB 数据库(<http://proteomics.yzu.edu/secretomes/fungi.php>)包含 118 个真菌种的 478 073 个真菌蛋白序列,23 878 个预测的分泌蛋白^[45]。上述工作的开展,为真菌分泌蛋白质组的研究提供了重要的参考信息。

4 问题与展望

在植物与病原真菌互作中,真菌能利用多种不同的策略来完成其侵染过程,其中分泌致病相关蛋白是很多真菌能够成功侵染寄主的关键。但迄今为止,我们对大部分植物病原真菌分泌蛋白质的组成等仍知之甚少。开展植物病原真菌分泌蛋白质组研究的最大困难在于如何制备病原真菌的分泌蛋白质,即所制备的分泌蛋白质能够真实反映出病原真菌侵染植物条件下的表达情况。目前,真菌分泌蛋白质的制备主要有 2 种方法:(1) 基于植物体外的真菌分泌蛋白质组研究;该方法是当前真菌分泌蛋白质组学研究的最主要方法,但其缺点是难以反映出真菌侵染植物时实际的蛋白质分泌情况;(2) 基于植物体内的真菌分泌蛋白质组研究;该方法的缺点在于难以区分所制备的蛋白质是来源于植物还是来源于病原菌;此外,该方法所制备的蛋白质中,病原真菌的分泌蛋白质只占了受侵染植物组织中总蛋白质的一小部分(分泌蛋白质所占比例更小),导致真菌分泌蛋白的相对丰度过低而难以检测^[46]。因此设计能够模拟病原真菌与植物互作条件下的真菌分泌蛋白质组的研究策略,将成为今后需要重点解决的问题。

随着蛋白质组学技术的快速发展,应用定量蛋白质组学技术精确测量不同生理条件和侵染过程

中植物病原真菌分泌蛋白质组的表达变化成为解析病原真菌致病机理的重要手段。基于 2-DE 的蛋白质组学技术是目前分泌蛋白质组学研究最重要的备选方案,其优点是所需仪器简单,价格相对便宜,且易于鉴定出不同样品间或特定条件下差异表达的分泌蛋白质,但缺点是需要制备较多的分泌蛋白质样品。最近发展的鸟枪法蛋白质组学(Shotgun proteomics)研究策略则不需要 2-DE 分离的过程,并显著提高了分泌蛋白质检测的动力学范围和灵敏度;其中, iTRAQ (Isobaric tags for relative and absolute quantitation)技术作为近年来开发的一种新的蛋白质组学定量研究技术,可同时对 4 种或 8 种不同的样品进行绝对和相对定量研究,并可对 2-DE 难于分析的膜蛋白、疏水性蛋白、以及翻译后修饰的蛋白质进行标记分析;最新发展的串联质谱标签(Tandem mass tag)技术则最多可对 18 个样品进行定量标记^[47-48];由于都具有高通量、重复性好、能够处理复杂样本及同时进行定性、定量分析的优点,因而这些方法将成为今后分泌蛋白质组学研究的主要发展策略,具有较好的发展前景。

真菌分泌蛋白质组学的发展,有力推动了病原真菌致病机理的研究,对于更好地了解植物与病原菌的互作机理具有重要的意义。进一步结合生物信息学、分子遗传学及生物化学等技术,开展重要分泌蛋白质的基因功能研究,将为植物真菌病害的防治等提供好的靶标,并为其提供更多的病害防治选择。

参 考 文 献

- [1] Krause C, Richter S, Knöll C, et al. Plant secretome—from cellular process to biological activity[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2013, 1834(11): 2429-2441
- [2] Prudovsky I, Tarantini F, Landriscina M, et al. Secretion without Golgi[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2008, 103(5): 1327-1343
- [3] Caccia D, Dugo M, Callari M, et al. Bioinformatics tools for secretome analysis[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2013, 1834(11): 2442-2453
- [4] Choi J, Park J, Kim D, et al. Fungal secretome database: integrated platform for annotation of fungal secretomes[J]. *BMC Genomics*, 2010, 11: 105
- [5] Wang Y, Wu J, Park ZY, et al. Comparative secretome investigation of *Magnaporthe oryzae* proteins responsive to nitrogen starvation[J]. *Journal of Proteome Research*, 2011, 10(7): 3136-3148
- [6] Xiao X, Xie J, Cheng J, et al. Novel secretory protein Ss-Caf1 of the plant-pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* is required for host penetration and normal sclerotial development[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2014, 27(1): 40-55
- [7] Dong ZY, Wang Q, Qin SW, et al. Comparison of cell wall degrading enzymes produced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1 and race 4[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2010, 40(5): 463-468 (in Chinese)
董章勇, 王琪, 秦世雯, 等. 香蕉枯萎病菌1号和4号生理小种细胞壁降解酶的比较[J]. *植物病理学报*, 2010, 40(5): 463-468
- [8] Morais do Amaral A, Antoniw J, Rudd JJ, et al. Defining the predicted protein secretome of the fungal wheat leaf pathogen *Mycosphaerella graminicola*[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e49904
- [9] Kolattukudy PE, Rogers LM, Li D, et al. Surface signaling in pathogenesis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, 92(10): 4080-4087
- [10] Skamnioti P, Gurr SJ. *Magnaporthe grisea* cutinase 2 mediates appressorium differentiation and host penetration and is required for full virulence[J]. *Plant Cell*, 2007, 19(8): 2674-2689
- [11] Liu YF, Chen ZY, Yu WY, et al. Primary study on effect of secreted proteins of *Magnaporthe oryzae* during infection[J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2011, 25(4): 452-454 (in Chinese)
刘永锋, 陈志谊, 俞文渊, 等. 稻瘟病菌分泌蛋白质在致病过程中的作用初探[J]. *中国水稻科学*, 2011, 25(4): 452-454
- [12] Valent B, Khang CH. Recent advances in rice blast effector research[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2010, 13(4): 434-441
- [13] Liao M, Li Y, Wang Z. Identification of elicitor-responsive proteins in rice leaves by a proteomic approach[J]. *Proteomics*, 2009, 9(10): 2809-2819
- [14] Liu W, Liu J, Ning Y, et al. Recent progress in understanding PAMP- and effector-triggered immunity against the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*[J]. *Molecular Plant*, 2013, 6: 605-620
- [15] Hacquard SP, Joly DL, Lin YC, et al. A comprehensive analysis of genes encoding small secreted proteins identifies candidate effectors in *Melampsora larici-populina* (poplar leaf rust)[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2012, 25(3): 279-293
- [16] Yang F, Jensen JD, Svensson B, et al. Secretomics identifies *Fusarium graminearum* proteins involved in the interaction with barley and wheat[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2012, 13(5): 445-453
- [17] Tjalsma H, Bolhuis A, Jongbloed JD, et al. Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome[J]. *Microbiol Molecular Biology*, 2000, 64(3): 515-547
- [18] Karagiannis GS, Pavlou MP, Diamandis EP. Cancer secretomics reveal pathophysiological pathways in cancer molecular oncology[J]. *Molecular Oncology*, 2010, 4(6): 496-510
- [19] Paper JM, Scott-Craig JS, Adhikari ND, et al. Comparative proteomics of extracellular proteins *in vitro* and in planta from the pathogenic fungus *Fusarium graminearum*[J]. *Proteomics*, 2007, 7(17): 3171-3183
- [20] Phalip V, Delalande F, Carapito C, et al. Diversity of the exoproteome of *Fusarium graminearum* grown on plant cell wall[J]. *Current Genetics*, 2005, 48: 366-379
- [21] Rampitsch C, Day J, Subramaniam R, et al. Comparative secretome analysis of *Fusarium graminearum* and two of its non-pathogenic mutants upon deoxynivalenol induction *in vitro*[J]. *Proteomics*, 2013, 13(12/13): 1913-1921

- [22] Ji XL, Yan M, Yang ZD, et al. Shotgun analysis of the secretome of *Fusarium graminearum*[J]. Indian Journal of Microbiology, 2013, 53(4): 400-409
- [23] Jung Y, Jeong S, Kim SH, et al. Secretome analysis of *Magnaporthe oryzae* using *in vitro* systems[J]. Proteomics, 2012, 12(6): 878-900
- [24] Staats M, van Kan JA. Genome update of *Botrytis cinerea* strains B05.10 and T4[J]. Eukaryote Cell, 2012, 11(11): 1413-1414
- [25] Li B, Wang W, Zong Y, et al. Exploring pathogenic mechanisms of *Botrytis cinerea* secretome under different ambient pH based on comparative proteomic analysis[J]. Journal of Proteome Research, 2012, 11(8): 4249-4260
- [26] González-Fernández R, Aloria K, Valero-Galván J, et al. Proteomic analysis of mycelium and secretome of different *Botrytis cinerea* wild-type strains[J]. Journal of Proteomics, 2014, 97: 195-221
- [27] Espino JJ, Gutiérrez-Sánchez G, Brito N, et al. The *Botrytis cinerea* early secretome[J]. Proteomics, 2010, 10(16): 3020-3034
- [28] Guyon K, Balagué C, Roby D, et al. Secretome analysis reveals effector candidates associated with broad host range necrotrophy in the fungal plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. BMC Genomics, 2014, 15: 336
- [29] Chuc-Uc J, Brito-Argáez L, Canto-Canché B, et al. The *in vitro* secretome of *Mycosphaerella fijiensis* induces cell death in banana leaves[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2011, 49(6): 572-578
- [30] Ravalason H, Grisel S, Chevret D, et al. *Fusarium verticillioides* secretome as a source of auxiliary enzymes to enhance sacchaification of wheat straw[J]. Bioresource Technology, 2012, 114: 589-596
- [31] Fernandes I, Alves A, Correia A, et al. Secretome analysis identifies potential virulence factors of *Diplodia corticola*, a fungal pathogen involved in cork oak (*Quercus suber*) decline[J]. Fungal Biology, 2014, 118(5/6): 516-523
- [32] Meinhardt LW, Costa GG, Thomazella DP, et al. Genome and secretome analysis of the hemibiotrophic fungal pathogen, *Monilophthora roreri*, which causes frosty pod rot disease of cacao: mechanisms of the biotrophic and necrotrophic phases[J]. BMC Genomics, 2014, 15: 164
- [33] Godfrey D, Bohlenius H, Pedersen C, et al. Powdery mildew fungal effector candidates share N-terminal Y/F/WxC-motif[J]. BMC Genomics, 2010, 11: 317
- [34] Zhang Z, Qin G, Li B, et al. Knocking out Bcsa1 in *Botrytis cinerea* impacts growth, development, and secretion of extracellular proteins, which decreases virulence[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2014, 27(6): 590-600
- [35] Yu QL, Ma L, Liu L, et al. Primary analysis of host-targeting-motif harbored secreted proteins in genome of *Fusarium graminearum*[J]. Biotechnology Bulletin, 2008, 1: 160-165 (in Chinese)
于钦亮, 马莉, 刘林, 等. 禾谷镰刀菌基因组中含寄主靶向模体分泌蛋白功能的初步分析[J]. 生物技术通报, 2008, 1: 160-165
- [36] Zhou XG, Hou SM, Chen DW, et al. Genome-wide analysis of the secreted proteins of *Phytophthora infestans*[J]. Hereditas, 2011, 33(7): 785-793 (in Chinese)
周晓罡, 侯思名, 陈铎文, 等. 马铃薯晚疫病菌全基因组分泌蛋白的初步分析[J]. 遗传, 2011, 33(7): 785-793
- [37] Han CZ. Prediction for secreted proteins from *Colletotrichum graminicola* genome[J]. Biotechnology, 2014, 24(2): 36-41 (in Chinese)
韩长志. 全基因组预测禾谷炭疽菌的分泌蛋白[J]. 生物技术, 2014, 24(2): 36-41
- [38] Su Y, Li CY, Zhao ZW, et al. Primary analysis of the secretory proteins in genome scale of *Magnaporthe grisea*[J]. Journal of Yunnan Agricultural University, 2006, 21(3): 271-275, 292 (in Chinese)
苏源, 李成云, 赵之伟, 等. 稻瘟菌基因组规模分泌蛋白的预测分析[J]. 云南农业大学学报, 2006, 21(3): 271-275, 292
- [39] Chen XY, Chen JY, Xiao HL, et al. The comparative analysis of secreted CAZymes in phytopathogenic fungi with different lifestyle[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2014, 44(2): 163-172 (in Chinese)
陈相永, 陈捷胤, 肖红利, 等. 植物病原真菌寄生性与分泌蛋白组 CAZymes 的比较分析[J]. 植物病理学报, 2014, 44(2): 163-172
- [40] Joly DL, Feau N, Tanguay P, et al. Comparative analysis of secreted protein evolution using expressed sequence tags from four poplar leaf rusts (*Melampsora* spp.)[J]. BMC Genomics, 2010, 11: 422
- [41] Mueller O, Kahmann R, Aguilar G, et al. The secretome of the maize pathogen *Ustilago maydis*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2008, 45(S1): S63-S70
- [42] Ye YF, Li CY, Yang J, et al. Computational analysis of signal-peptide-containing small proteins in *Magnaporthe grisea*[J]. Biotechnology Bulletin, 2006(S1): 276-282 (in Chinese)
业艳芬, 李成云, 杨静, 等. 稻瘟菌含信号肽小蛋白的计算机分析[J]. 生物技术通报, 2006(S1): 276-282
- [43] Chen JS, Zheng SQ, Zheng W, et al. Prediction for secreted proteins from *Magnaporthe grisea* genome[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2006, 39(12): 2474-2482 (in Chinese)
陈继圣, 郑士琴, 郑武, 等. 全基因组预测稻瘟菌的分泌蛋白[J]. 中国农业科学, 2006, 39(12): 2474-2482
- [44] Tian L, Chen JY, Chen XY, et al. Prediction and analysis of *Verticillium dahliae* VdLs.17 secretome[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2011, 44(15): 3142-3153 (in Chinese)
田李, 陈捷胤, 陈相永, 等. 大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae* VdLs.17)分泌组预测及分析[J]. 中国农业科学, 2011, 44(15): 3142-3153
- [45] Lum G, Min XJ. FunSecKB: the fungal secretome knowledge base[J]. Database (Oxford), 2011: bar001
- [46] Fernández-Acero FJ, Colby T, Harzen A, et al. 2-DE proteomic approach to the *Botrytis cinerea* secretome induced with different carbon sources and plant-based elicitors[J]. Proteomics, 2010, 10(12): 2270-2280
- [47] Qian XH. Analysis methods of quantitative proteomics[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2013, 31(8): 719-723 (in Chinese)
钱小红. 定量蛋白质组学分析方法[J]. 色谱, 2013, 31(8): 719-723
- [48] Vincent CE, Rensvold JW, Westphall MS, et al. Automated gas-phase purification for accurate, multiplexed quantification on a stand-alone ion-trap mass spectrometer[J]. Analytical Chemistry, 2013, 85(4): 2079-2086