

# 水稻纹枯病菌多聚半乳糖醛酸酶基因 *RsPG5* 的克隆与功能分析

蒋冬阳<sup>1,2</sup>, 陈夕军<sup>\*1</sup>, 石童<sup>1</sup>, 陈宸<sup>1</sup>, 左示敏<sup>2</sup>

1 扬州大学植物保护学院, 江苏 扬州 225009

2 扬州大学 江苏省作物遗传生理重点实验室 教育部功能基因组学重点实验室, 江苏 扬州 225009

蒋冬阳, 陈夕军, 石童, 陈宸, 左示敏. 水稻纹枯病菌多聚半乳糖醛酸酶基因 *RsPG5* 的克隆与功能分析[J]. 微生物学通报, 2023, 50(8): 3440-3453.

JIANG Dongyang, CHEN Xijun, SHI Tong, CHEN Chen, ZUO Shimin. Cloning and function analysis of polygalacturonase gene *RsPG5* in *Rhizoctonia solani*, the pathogen of rice sheath blight[J]. Microbiology China, 2023, 50(8): 3440-3453.

**摘要:**【背景】纹枯病是水稻最重要的病害之一, 目前对其病菌致病机制的研究还较少。【目的】鉴定更多水稻纹枯病菌致病基因, 为纹枯病的防治提供理论依据。【方法】采用 3'-RACE 方法获得 *RsPG5* 基因全长, 并使用 ExPASy 等在线软件对其编码产物的结构及生物学特性进行分析, 测定其编码产物的致病功能。【结果】*RsPG5* 具有 7 个外显子和 6 个内含子, 编码区全长 1 263 bp, 可编码 420 个氨基酸。编码产物为糖苷水解酶 GH28 家族成员, 具有真菌多聚半乳糖醛酸酶特有的保守序列 NTD、DD、GHG 和 RF(I)K, 并且有一个含 15 个氨基酸的信号肽; 二级结构由  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠和随机卷曲螺旋构成, 并且可形成 4 个二硫键; 三级结构为由  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠和随机卷曲螺旋按右手螺旋规则形成的具有裂隙区的特定空间结构, 裂隙区可能负责着其酶活功能。生物学性质预测表明, *RsPG5* 为稳定、易溶于水的外泌性蛋白, 主要定位于细胞壁、液泡和线粒体。*RsPG5* 具有明显的多聚半乳糖醛酸酶活性, 可分解果胶, 破坏水稻叶鞘细胞; 针刺接种分蘖末期水稻叶鞘, 72 h 后可形成明显的褐色坏死斑; 将纹枯病菌接种至水稻叶鞘, 在病菌致病过程中 *RsPG5* 可上调表达。【结论】*RsPG5* 是一个典型的多聚半乳糖醛酸酶蛋白, 为水稻纹枯病菌的重要致病因子。  
**关键词:** 功能分析; 多聚半乳糖醛酸酶基因 *RsPG5*; 纹枯病菌; 水稻

资助项目: 江苏省碳达峰碳中和科技创新项目(BE2022425)

This work was supported by the Research and Development Foundation of Jiangsu Province (BE2022425).

\*Corresponding author. E-mail: xjchen@yzu.edu.cn

Received: 2022-11-24; Accepted: 2023-01-05; Published online: 2023-03-13

# Cloning and function analysis of polygalacturonase gene *RsPG5* in *Rhizoctonia solani*, the pathogen of rice sheath blight

JIANG Dongyang<sup>1,2</sup>, CHEN Xijun<sup>\*1</sup>, SHI Tong<sup>1</sup>, CHEN Chen<sup>1</sup>, ZUO Shimin<sup>2</sup>

1 College of Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

2 Jiangsu Key Laboratory of Crop Genetics and Physiology, Key Laboratory of Plant Functional Genomics of the Ministry of Education, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

**Abstract:** [Background] Sheath blight, caused by *Rhizoctonia solani*, is one of the major devastated rice diseases in the world, while little is known about the pathogenic mechanism of the pathogen. [Objective] To identify more virulence genes from *R. solani* and provide a theoretical basis for the control of sheath blight. [Methods] The full-length sequence of *RsPG5* was obtained by 3'-RACE, and the structure and biological properties of the deduced protein were predicted by ExPASy online. The pathogenic function of *RsPG5* was then determined. [Results] *RsPG5* harbored seven exons and six introns, with the coding region of 1 263 bp, which encoded 420 amino acid residues. *RsPG5*, one member of the glucoside hydrolase family 28, contained a signal peptide of 15 residues and NTD, DD, GHG and RF(I)K domains conserved in the polygalacturonases from fungi. The secondary structure of the deduced protein contained 4 disulfide bonds,  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -sheet, and random coil, which arranged according to right-handed helix and formed a cleft that was responsible for the enzyme activity. *RsPG5* was a stable, water-soluble, exocrine protein localized in cell wall, vacuole, and mitochondria. The eukaryotic expression products of *RsPG5* had the polygalacturonase activity to hydrolyze pectin and destroy the sheath cells of rice. Distinct brown necrotic spots appeared 72 h after the expression products were inoculated in the rice sheathes by a needle. The expression level of *RsPG5* was up-regulated in the infection course of *R. solani*. [Conclusion] *RsPG5* is a typical polygalacturonase and a major pathogenic factor of *R. solani*.

**Keywords:** function analysis; polygalacturonase gene *RsPG5*; *Rhizoctonia solani*; rice

水稻是重要的粮食作物, 全世界有近三分之二的人口以稻米为食。在水稻生长发育过程中, 多种病虫害的侵袭导致其产量和品质严重下降, 我国每年仅由立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)引起的纹枯病就可造成水稻减产超 5 亿 kg<sup>[1-2]</sup>。由于水稻纹枯病菌具有很强的腐生性且目前还未能建立其完善的遗传转化体系, 因此, 对该病菌的致病机制研究进展缓慢, 针对其致病因子进行病害防控也仍处于探索阶段<sup>[3-5]</sup>。

果胶和纤维素是构成植物细胞壁骨架的基

本物质, 也是病原物侵入寄主的首道屏障。有研究表明, 水稻纹枯病菌在致病过程中可分泌多种胞壁降解酶, 破坏寄主细胞及亚显微结构, 使其细胞壁受损、电解质外渗, 甚至死亡、崩解<sup>[6-10]</sup>。传统观点认为, 单子叶植物特别是禾本科植物细胞壁的主要成分为纤维素, 果胶酶在病菌致病过程中可能并不起主要作用<sup>[11]</sup>。但作为病菌侵入寄主作物时产生的第一个胞壁降解酶, 多聚半乳糖醛酸酶(polygalacturonase, PG)对病菌致病是有重要作用的<sup>[12]</sup>。Oeser 等<sup>[11]</sup>研

究发现, 单子叶植物黑麦的致病菌 *Claviceps purpurea* 缺失 2 个 *PG* 基因后, 几乎对黑麦完全丧失致病性。本实验室前期研究结果也表明, 水稻纹枯病菌的 *PG* 基因 *RsPG1-RsPG4* 在病菌致病过程中均能上调表达, 并且表达产物均具有酶活性, 用 *RsPG1-RsPG4* 蛋白处理后可使水稻叶鞘出现明显的坏死斑<sup>[9-10]</sup>。

在大多数病原菌中, *PG* 都是以基因家族的形式存在, 并且寄主范围越广其 *PG* 基因家族越大<sup>[13-14]</sup>。*PG* 的多样性使病菌能灵活调整自身 *PG* 基因的表达, 以适应侵染多种植物的需要<sup>[15]</sup>。同一病菌中, 不同 *PG* 种类或同类型的不同 *PG* 在病菌致病过程中的作用并不相同<sup>[16]</sup>。例如, 对 *Fusarium oxysporum* 的 *endo-PG1* 和 *exo-PG6* 基因分别进行敲除, 突变菌株的 *PG* 活性分别比野生型菌株下降了 82% 和 16%, 但其对番茄植株的致病力却无明显改变; 若将 2 个基因同时进行突变, 当野生菌株处理植株绝大部分死亡时,  $\Delta pg1\Delta pgx6$  处理植株仍有 60% 的存活率<sup>[17]</sup>。用缺失 2 个 *PG* 基因的 *Penicillium digitatum* 接种柑橘, 病菌引起果实的发病率并无差异, 但突变菌株致病的进程变慢, 而且  $\Delta pg2$  突变体接种的病果较野生菌株和  $\Delta pg1$  接种的病果硬且 pH 值高<sup>[18]</sup>。

Chen 等通过对侵染水稻的纹枯病菌转录组进行分析, 共获得释意编码 *PG* 的基因序列 13 条<sup>[9]</sup>。前期我们已克隆其中的 4 个基因, 并对这些基因的功能进行了分析, 发现 *RsPG1*、*RsPG2*、*RsPG3* 和 *RsPG4* 基因在病菌致病过程中均能上调表达, 并且其表达产物均可分解果胶, 将表达产物接种至水稻叶鞘能引起典型的坏死斑<sup>[9-10,19]</sup>。本研究将进一步克隆水稻纹枯病菌中新的 *PG* 基因并解析其功能, 为基于水稻纹枯病菌致病因子的病害防控提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

水稻纹枯病菌 YN-7 由本实验室分离自江苏水稻纹枯病病株<sup>[9]</sup>。徐稻 3 号(XD3)由扬州大学农学院水稻抗病分子遗传与育种研究组提供; 过表达 *OsPGIP1* 基因的转基因徐稻 3 号水稻(XD3TR)由本实验室转化获得<sup>[20]</sup>。

PDB 培养基(g/L): 土豆 200.0, 葡萄糖 20.0; MM 培养基(g/L): YNB 13.4, 生物素 B 0.000 4, 甲醇 5.0 mL, 琼脂粉 20.0; MD 培养基(g/L): YNB 13.4, 生物素 B 0.000 4, 葡萄糖 20.0, 琼脂粉 20.0; BMMY 诱导培养基(g/L): YNB 13.4, 生物素 B 0.000 4,  $K_2HPO_4$  3,  $KH_2PO_4$  11.8, 酵母提取物 10.0, 蛋白胨 20.0, 甲醇 5.0 mL。

限制性核酸内切酶(*EcoR* I、*Not* I、*Sac* I)、pMD19-T 载体、3'-Full RACE Core Set Ver. 2.0 试剂盒、PrimeScript<sup>TM</sup> RT Reagent Kit、SYBR<sup>®</sup> Premix *Ex Taq*<sup>TM</sup> II 试剂盒、毕赤酵母 GS115 感受态细胞, 大连宝生物工程有限公司; AxyPrep DNA Gel Extraction Kit、Promega SV8 总 RNA 提取试剂盒, 爱思进生物技术(杭州)有限公司; 多聚半乳糖醛酸和钨红, 上海源叶生物科技有限公司; DNS 试剂、遗传霉素 G418 和真菌基因组 DNA 提取试剂盒, 北京索莱宝科技有限公司。

电导率仪, 上海仪电科学仪器股份有限公司; 凝胶成像分析系统和实时荧光定量 PCR 仪, 上海伯乐生命医学产品有限公司。

### 1.2 *RsPG5* 基因的克隆

根据转录组数据分析结果, 明确 Unigene18881 为释意编码 *PG* 的部分基因序列, 其包含起始密码子 ATG, 但无终止密码子。设计引物 For (5'-CCACCCACATCTTCTAATCT-3') 和 Rev (5'-CAAGTTCTGATCCCAGTAGTT-3'), 从水稻

纹枯病菌 cDNA 中扩增出该部分片段并测序, 根据测序结果设计扩增目的 DNA 片段的上游特异性引物(5'-ATGTTTGTGCTACGGCTCTT-3'), 其他操作按 3'-Full RACE Core Set Ver. 2.0 试剂盒说明书进行。按真菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书步骤提取水稻纹枯病菌 gDNA, 并从 gDNA 中扩增出 *RsPG5*, 引物为 *RsPG5*-F (5'-ATGTTTGTGCTACGGCTCTTGC-3') 和 *RsPG5*-R (5'-TTATCGGGTATAACCAACCAACTGG-3')。将 gDNA 及 cDNA 扩增产物连接至 pMD19-T 载体, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 阳性转化子经菌落 PCR 验证后送南京擎科生物科技有限公司测序, PCR 反应体系及条件参考文献[9]。

### 1.3 *RsPG5* 的生物信息学分析

使用 ExPASy 网站(<https://web.expasy.org/protparam/>)在线软件分析 *RsPG5* 一级结构的氨基酸序列组成和带正负电荷氨基酸数; 二级结构预测使用网站([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_hnn.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_hnn.html)) 的在线服务<sup>[21]</sup>; 三级结构预测使用 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 和在线软件 Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>)<sup>[22]</sup>, 获得的 PDB 结构模型经 PyMOL V2.3 软件进行分子修饰。*RsPG5* 与水稻多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白 OsPGIPs 的分子对接则由网站(<https://cluspro.bu.edu/login.php?redir=/home.php>) 在线软件 ClusPro Protein-Protein Docking 进行模拟<sup>[23-26]</sup>, 选择结合自由能最低的对接模型进行进一步分析。

使用 ExPASy 网站(<https://web.expasy.org/protparam/>) 在线软件预测 *RsPG5* 蛋白的分子式、分子量、等电点、消光系数、半衰期、脂溶性系数、不稳定系数和亲水性等。信号肽预测使用 SignalP-6.0 软件(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-6.0>)<sup>[27]</sup>, 跨膜结构域

预测使用在线软件 TMHMM-2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>)<sup>[28]</sup>, 亚细胞定位分析使用在线软件 POSRT (<https://psort.hgc.jp/form2.html>), 保守区和功能区预测分别使用 NCBI 网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/>) 的在线软件 CDD 和 CMD, 大肠杆菌中表达的重组蛋白溶解度登陆 Oklahoma 大学网络(<http://www.biotech.ou.edu/>) 进行预测。

### 1.4 *RsPG5* 基因的真核表达

根据 *RsPG5* 基因序列, 设计带有真核表达载体 pPIC9K 多克隆位点限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Not* I 酶切位点的特异引物 PG5-EF (5'-ccg GAATTCATGTTTGTGCTACGGCTCTT-3') 和 PG5-ER (5'-ttGCGGCCGCTTATCGGGTATAACCAACTCT-3'), 以水稻纹枯病菌 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: 含有 Mg<sup>2+</sup> 的 10 $\times$ buffer 2  $\mu$ L, dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 1  $\mu$ L, PG5-EF (10  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L, PG5-ER (10  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 14.5  $\mu$ L, *Taq* 酶(5 U/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L。PCR 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 52  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物经克隆测序验证后, 由 *EcoR* I 和 *Not* I 进行双酶切。将同样酶切的 pPIC9K 与目的片段按 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit 说明书纯化回收后进行连接。

将重组质粒用 *Sac* I 单酶切, 酶切产物电击转化至毕赤酵母 GS115 感受态细胞中, 通过 MM 和 MD 培养基平板分别于 28  $^{\circ}$ C 倒置培养 2-4 d, 筛选后的阳性转化子经上述 PCR 反应体系和条件扩增鉴定后, 使用 0.5-4.0 mg/mL 的 G418 筛选多拷贝整合的转化子。阳性多拷贝转化子转入 100 mL BMMY 诱导培养基, 于 28  $^{\circ}$ C、180 r/min 诱导培养 96 h, 每 24 h 添加 1.0% (体积分数) 的甲醇, 并测定其表达产物酶活性。

### 1.5 表达产物的酶活性测定

表达产物的提取、纯化按文献[9]方法进行,将纯化的蛋白分别使用分光光度计法和溶解圈法测定其酶活性。

分光光度计法:取甲、乙两支试管,分别加入 5 mL 1.0%多聚半乳糖醛酸作底物,在 50 °C水浴中预热 5 min;向甲、乙两支试管中分别加入 4 mL 磷酸-柠檬酸缓冲液,再向甲管中加入 1 mL 酶液,摇匀,50 °C水浴中准确反应 30 min,立即向乙管中加入 1 mL 酶液,沸水浴 5 min,终止反应,取出后流水冷却;分别取甲、乙管中反应液 2 mL 于两支干净试管中,再向两支干净试管中分别加入 2 mL 蒸馏水,5 mL DNS 试剂,混合后沸水浴 5 min,取出后流水冷却。加蒸馏水定容到 25 mL。以标准空白为对照,在 540 nm 处测吸光度。

酶活力  $X=[(A_{甲}-A_{乙})\times Dr]/(K\times t)$

式中: $A_{甲}$ 为酶样吸光度; $A_{乙}$ 为酶空白样的吸光度; $K$ 为标准曲线斜率; $Dr$ 为稀释倍数; $t$ 为反应时间(min)。

溶解圈法:用 0.2 mol/L pH 5.3 的磷酸盐缓冲液配制琼脂糖凝胶溶液,内含 0.5%草酸铵、0.2%叠氮化钠、0.5%果胶和 1%琼脂糖;将配制好的琼脂糖凝胶溶液用微波炉溶化后倒在培养皿里,吹干后用打孔器打孔;将真核表达得到的粗酶液注入孔里,在 37 °C 孵育 17 h;25 °C 条件下用 0.05%的钉红将平板染色 30 min;用蒸馏水反复洗涤,观察结果。

### 1.6 *RsPG5* 对水稻的致病性测定

对组织的浸解作用测定:将 0.02 g 四叶期水稻叶鞘剪成 1–2 mm 小段,转入含有 5 mL 重组蛋白液的离心管中,减压抽气使叶鞘完全浸入液面下。1 h 后去掉酶液,用去离子水洗叶鞘 2 次,然后将其转入新的含有 5 mL 去离子水的离心管中,减压抽气 1 h,使用电导率仪测定叶

鞘浸出液电导率值(electrical conductance, EC)。然后将叶鞘转入新的含 5 mL 去离子水的离心管中,沸水浴 15 min,测定沸腾电导率值(boiling electrical conductance, BEC)。以含有上述所有组分但无重组蛋白的离心管作对照。每处理重复 3 次。

对叶鞘的致病作用:选择分蘖期水稻植株,以针尖刺其倒 2 叶鞘造成伤口,将浸有重组蛋白液的脱脂棉球置于伤口处,用胶带固定。一直以重组蛋白液保持脱脂棉湿润,并将水稻植株置于 28 °C、相对湿度大于 90%的条件下,72 h 后观察叶鞘症状。以清水和煮沸 10 min 的重组蛋白液作对照。每处理重复 3 次。

### 1.7 RT-qPCR 分析

从培养 48 h 的水稻纹枯病菌菌落边缘取直径 5 cm 的菌丝块,接种于含有灭菌牙签的 PDB 培养基中。72 h 后取带菌牙签接种于分蘖末期水稻倒 3 叶鞘,并分别于接种后 0、8、16、24、48 和 72 h 取水稻叶鞘进行 RT-qPCR 检测。用 Promega 公司的 Promega SV8 总 RNA 提取试剂盒提取水稻和纹枯病菌的混合 RNA, cDNA 的反转录按 PrimeScript™ RT Reagent Kit 说明书进行。RT-qPCR 反应按 SYBR® Premix *Ex Taq*™ II 试剂盒说明书进行,引物为 RT-F (5'-GGACGC CCATTAATTTTCGGC-3')和 RT-R (5'-AGGGTCA CATTAGTGCCAGC-3'),以水稻纹枯病菌  $\beta$ -actin 基因为内参基因,引物为 ACT-F (5'-CCGTGAG AAGATGACCCAGA-3')和 ACT-R (5'-GGCGAA ACCCTCGTAGATGG-3')。

### 1.8 数据统计

所有数据统计均使用 DPS V9.50 软件。

## 2 结果与分析

### 2.1 *RsPG5* 基因及其编码产物序列分析

分别从水稻纹枯病菌 gDNA 和 cDNA 中扩

增出 *RsPG5* 基因序列, 经连接 pMD19-T 载体并转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  后送南京擎科生物科技有限公司测序。结果表明, *RsPG5* 基因全长 1 607 bp, 有 7 个外显子和 6 个内含子, 编码区全长 1 263 bp (图 1A、1B)。RsPG5 蛋白 (GenBank 登录号为 ALB05715) 有 420 个氨基酸残基, 含有一个由 15 个氨基酸组成的信号肽(可能性 0.999), 其第 70–332 位氨基酸为糖苷水解酶第 28 家族的特征序列(图 1C); RsPG5 含有所有真核生物多聚半乳糖醛酸酶所特有的保守序列 NTD、DD、GHG 和 RF(I)K, 并于第 227–240 位具有一多聚半乳糖醛酸酶活性位点(图 1D)。从 GenBank 中搜索所有标注“*R. solani* polygalacturonase”或“*Thanatephorus cucumeris* polygalacturonase”的蛋白序列共 98 条构建系统发育树, 分析结果显示, RsPG5 与作者前期获得的 4 个 RsPG (*RsPG1*–*RsPG4*: LB05711–ALB05714) 遗传距离均较远<sup>[9–10,19]</sup>, 是水稻纹枯病菌一个新的多聚半乳糖醛酸酶(图 1E)。与其同聚在一组的 XP043187080 和 ARW26843 均为直接上传至 GenBank 的蛋白序列, 还未见有其相关功能研究。

## 2.2 *RsPG5* 蛋白的空间结构预测

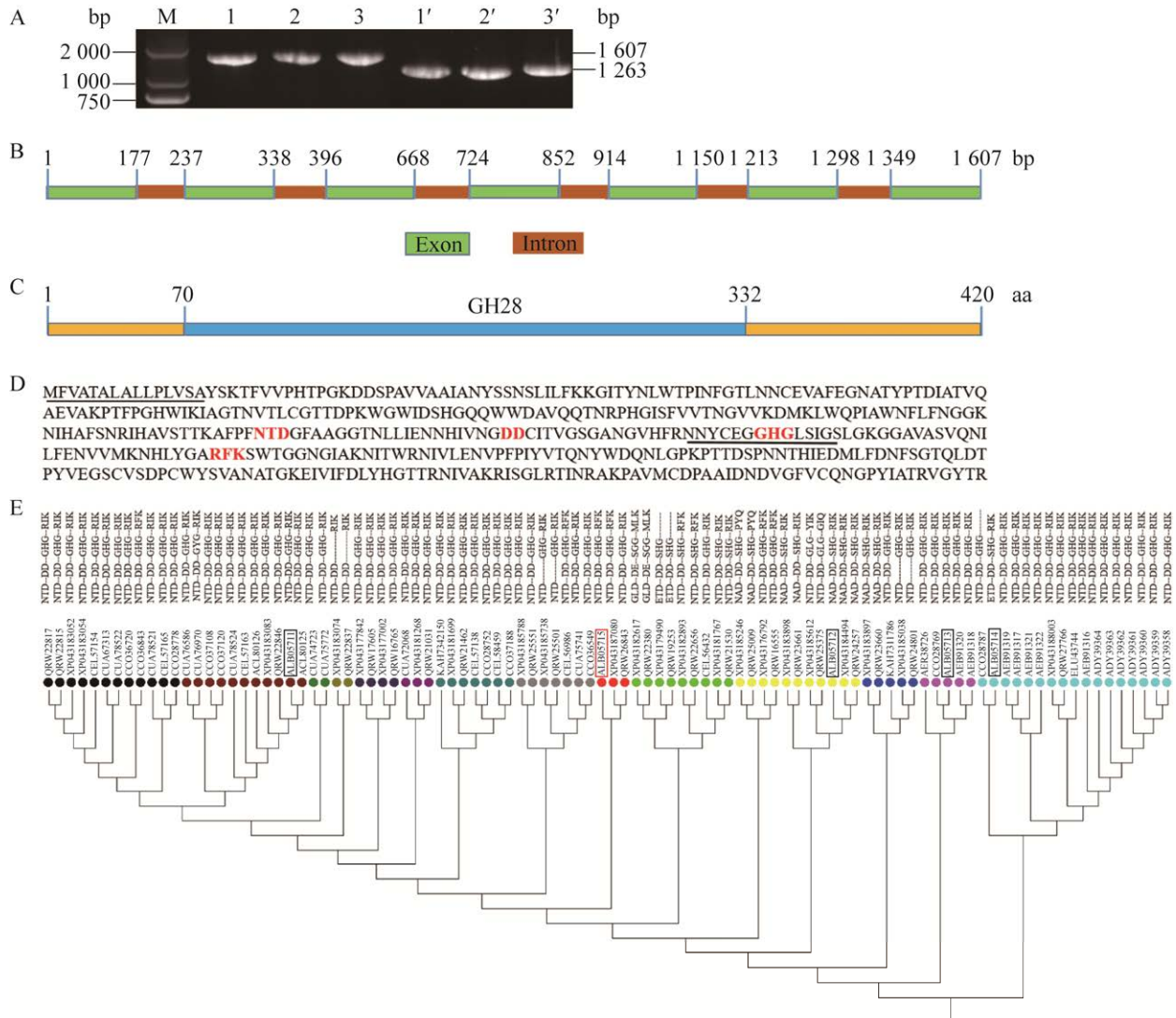
蛋白质一级结构预测表明, RsPG5 蛋白的 420 个氨基酸中包括构成生物蛋白的全部 20 种氨基酸, 含量均为 1.2%–9.5%; 其中带负电荷 (Asp+Glu) 和正电荷 (Arg+Lys) 的氨基酸总数均为 30 个。RsPG5 二级结构主要由  $\alpha$ -螺旋 (22.86%)、 $\beta$ -折叠 (22.38%) 和随机卷曲螺旋 (54.76%) 构成, 其 66–406、110–343、213–348、230–393 共 4 对半胱氨酸残基可形成 4 个二硫键, 使蛋白形成特定的空间结构(图 2A)。利用 SWISS-MODEL 和 Phyre2 网站进行在线建模, 并经 PyMOL Viewer V3.2 软件分析, 两者预测的蛋白三级结构均为由  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠和随机

卷曲螺旋按右手螺旋形成的特定空间结构, 且均形成一个开放的裂隙区, 可能负责其酶活性; 两者预测不同的是 SWISS-MODEL 预测模型的第 134 位苏氨酸 T 和 307 位的亮氨酸 L 以化学键相连, 使 RsPG5 的空间结构更加稳定(图 2B)。

利用在线软件 ClusPro Protein-Protein Docking 对 RsPG5 与水稻中 7 个多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白 OsPGIP 进行分子对接, 根据能量最低的天然态构象可让分子结构最稳定的原则, 选择结合自由能最低的对接分子进行分析, 结果发现, OsPGIP1、OsPGIP2、OsPGIP3、OsFOR1 和 OsPGIP7 均能以其保守的 LRR 区(9–11 个 LxxLxLxx 结构形成的 PGIP 活性区)与 RsPG5 的裂隙区进行对接, 甚至完全覆盖 RsPG5 的酶活性位点; OsPGIP4 和 OsPGIP6 则分别以 N 端或 C 端肽链与 RsPG5 的 C 端进行互作, 但与 RsPG5 的裂隙区不存在互作关系(图 3)。

## 2.3 *RsPG5* 蛋白的生物学特性

使用多网站在线软件对 RsPG5 的生物学特性进行预测, 结果见表 1。ExPASy 在线软件预测 RsPG5 蛋白的分子式为 C<sub>2062</sub>H<sub>3130</sub>N<sub>558</sub>O<sub>600</sub>S<sub>13</sub>, 分子量为 45 753.69, pI 为 7.17, 消光系数为 1.87 左右, 大肠杆菌中半衰期为 10 h 以上, 脂溶系数为 80.55; 不稳定系数为 23.05, 说明该蛋白质性质稳定; 亲水性值为 -0.114, 说明该蛋白易溶于水。将 *RsPG5* 基因于大肠杆菌中进行表达, 表达产物 100% 溶于水。RsPG5 无跨膜螺旋, 为外泌蛋白。亚细胞定位分析结果表明, RsPG5 在细胞中的分布为 66.7% 胞外(包含细胞壁)、22.2% 液泡和 11.1% 线粒体。进一步分析蛋白可供修饰的氨基酸位点, 其存在 17、312、313 共 3 个 O-糖基化位点, 40、76、106、281、328 共 5 个 N-糖基化位点和共 48 个磷酸化位点。



**图 1** *RsPG5* 基因及其编码产物序列分析 A: 从水稻纹枯病菌 gDNA 和 cDNA 中扩增出的 *RsPG5* 基因片段. M: DL2000 DNA Marker; 1-3: gDNA 扩增片段; 1'-3'为 cDNA 扩增片段. B: *RsPG5* 基因序列; 绿色和棕色长矩形框分别表示外显子和内含子. C: *RsPG5* 糖苷水解酶家族保守区; 蓝色长矩形框显示糖苷水解酶第 28 家族特征序列. D: *RsPG5* 多聚半乳糖醛酸酶保守序列; 细下划线和粗下划线分别为信号肽序列和多聚半乳糖醛酸酶活性位点; 红色加粗字母表示多聚半乳糖醛酸酶严格保守序列. E: *RsPG5* 系统进化分析; 红框为 *RsPG5*, 黑框是已经克隆的 4 个 *RsPG* 的编码产物

**Figure 1** Sequence analysis of *RsPG5* and its coding product. A: Amplification products of *RsPG5* from gDNA and cDNA of *Rhizoctonia solani*. M: DL2000 DNA Marker; 1-3: Amplification products from gDNA; 1'-3': Amplification products from cDNA. B: Sequence of *RsPG5* gene; The green and brown rectangular boxes mean the exons and introns respectively. C: Conserved region of the glycoside hydrolase family in *RsPG5*; The blue rectangular box shows the characteristic sequence of glycoside hydrolase family 28. D: Conserved sequences of polygalacturonase in *RsPG5*; The thin and bold underlines mean the signal peptide sequence and active site of polygalacturonase; Bold red letters indicate strictly conserved sequences of polygalacturonases from fungi. E: Systematic evolution analysis of *RsPG5*. Accession numbers in red box and black boxes are *RsPG5* and the other four *RsPGs* from *Rhizoctonia solani*.



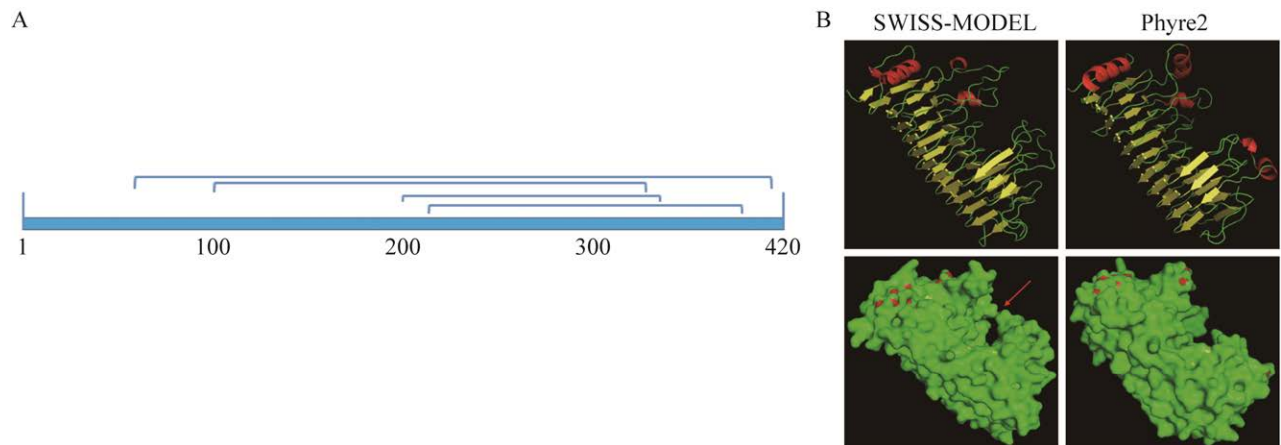


图2 在线软件预测的 *RsPG5* 空间结构 A: 二硫键位置. B: 三级结构卡通图与表面图. 卡通图中红色卷曲表示  $\alpha$ -螺旋, 黄色箭头表示  $\beta$ -折叠, 绿色线条表示随机卷曲螺旋; 表面图中红色箭头表示裂隙区两端氨基酸通过化学键相连的位点

Figure 2 Spatial structure of *RsPG5* predicted by online software. A: Position of disulfide bonds. B: Cartoon and surface figures of tertiary structures. The red curl lines, yellow arrows and green line in the cartoon figures indicate the  $\alpha$ -helixes,  $\beta$ -sheets and random coils respectively. The red arrow in the surface figure indicate the site where the amino acids at the ends of the cleft region are linked by chemical bonds.

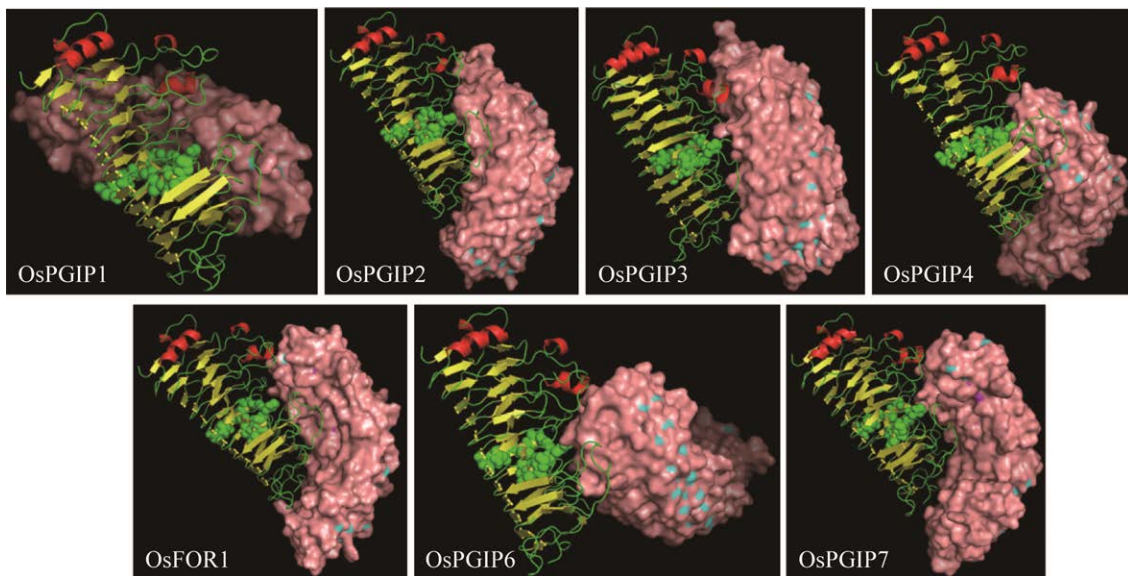


图3 *RsPG5* 与不同 *OsPGIP* 蛋白的分子对接 图中卡通图为 *RsPG5* 分子, 卡通图中的绿色球表示 *RsPG5* 的酶活位点氨基酸; 表面图为各 *OsPGIP* 分子

Figure 3 Molecular docking of *RsPG5* with different *OsPGIP* proteins. The cartoon figures indicate the molecular structure of *RsPG5* and the green balls in the cartoon figures indicate the enzyme active site amino acids of *RsPG5*. The surface figures indicate the molecular structures of *OsPGIPs*.



表 1 RsPG5 预测蛋白的生物学特性

Table 1 Biological characteristics of the predicted RsPG5 protein

特性 Characteristics	数值与指标 Value and index	特性 Characteristics	数值与指标 Value and index
分子式 Molecular formula	C <sub>2062</sub> H <sub>3130</sub> N <sub>558</sub> O <sub>600</sub> S <sub>13</sub>	亲水性值 Hydrophilicity value	-0.114
分子量 Molecular weight	45 753.69	原核表达产物溶解性 Solubility of prokaryotic expression product	100%
等电点 Isoelectric point	7.17	糖基化位点 Glycosylation site	3 个 O-糖基化位点 3 O-glycosylation sites
消光系数 Extinction coefficient	1.877		5 个 N-糖基化位点 5 N-glycosylation sites
	Cys all form cysteine		5 N-glycosylation sites
	1.866	磷酸化位点 Phosphorylation site	21 Ser
	Cys all in reduced state		23 Thr
脂溶系数 Lipolysis coefficient	80.55		4 Tyr
不稳定系数 Instability coefficient	23.05	亚细胞定位 Subcellular localization	66.7% 胞外 Extracellular
半衰期 Half-life	30 h 哺乳动物网织红细胞 Mammalian reticulocytes		22.2% 液泡 Vacuole
	> 20 h 酵母 Yeast		11.1% 线粒体 Mitochondria
	> 10 h 大肠杆菌 <i>E. coli</i>		

#### 2.4 RsPG5 基因真核表达产物酶活性

将选定的多拷贝阳性转化子经甲醇诱导表达后, 每 24 h 取样, 采用分光光度计法测定其多聚半乳糖酶活性, 随着发酵时间的延长, 工程菌产酶量增加, 至第 4 天酶活达最大值, 为 134.43 U/mL; 继续发酵, 酶活有下降趋势, 但直到第 7 天, 酶活仍可达 86.53 U/mL (图 4A)。说明 RsPG5 具有一定的稳定性, 这与前期 RsPG5 生物学特性预测结果一致。利用溶解圈法测定 RsPG5 分解果胶的能力, 可看到明显的溶解圈; 若将 OsPGIP1 蛋白和 RsPG5 一起加入孔中, 可明显抑制其分解果胶的能力(图 4B)。

#### 2.5 RsPG5 对水稻的致病作用

RSPG5 对水稻叶鞘有很强的破坏作用, 用表达蛋白处理 4 叶期水稻 XD3 和 XD3TR 的叶鞘,

其细胞膜损伤率分别为 24.87% 和 9.53% (图 5A)。于水稻分蘖末期, 用 RsPG5 基因表达产物针刺接种水稻叶鞘, 72 h 后叶片出现明显的坏死斑, 开始褐色, 后中心枯白色, 边缘褐色; 过表达 OsPGIP1 基因的水稻叶鞘也能出现褐色坏死斑, 但面积只为野生菌株的 40% 左右(图 5B)。说明过表达 OsPGIP1 基因在一定程度上可增强水稻抗 RsPG5 对叶鞘组织细胞的破坏作用, 提高水稻的抗病性。将带有纹枯病菌菌丝的牙签接种至水稻植株, 直至水稻叶鞘出现典型的坏死斑, 测定这一过程中 RsPG5 基因的相对表达量发现, 随着病菌对寄主侵入与建立寄生关系, RsPG5 基因表达有一个上调过程, 并于接种后 48 h 表达水平最高(图 5C)。这一结果说明 RsPG5 基因是病菌致病过程中的一个重要基因。

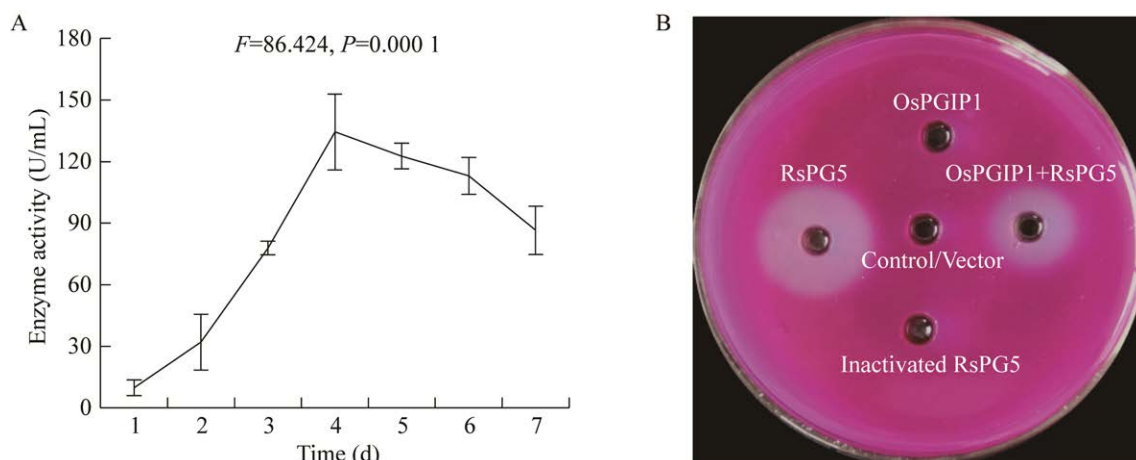


图 4 *RsPG5* 基因真核表达产物的酶活性 A: 3,5-二硝基水杨酸法. B: 溶解圈法

Figure 4 Enzyme activity of the eukaryotic expression products of *RsPG5*. A: Dinitrosalicylate assay. B: Agar diffusion assay.

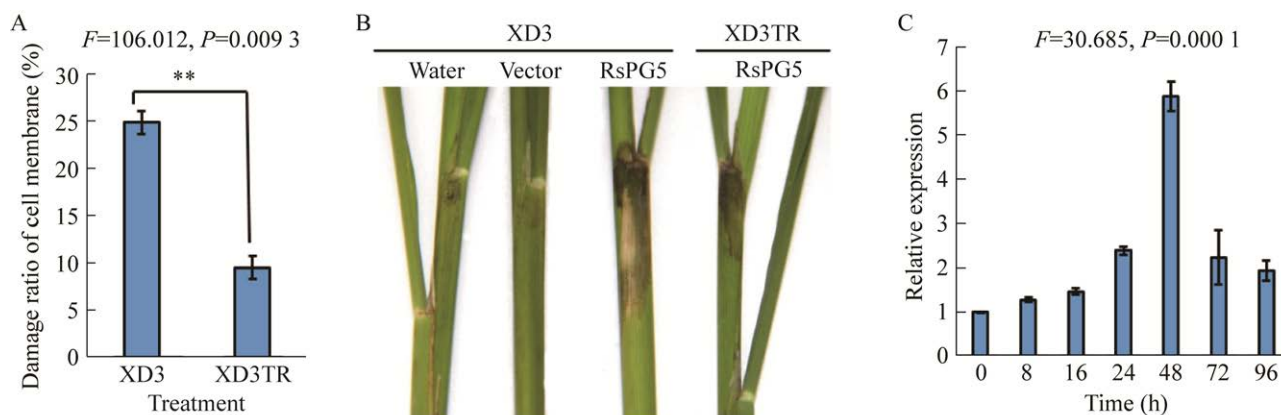


图 5 *RsPG5* 对水稻的致病作用 A: *RsPG5* 对水稻叶鞘细胞的破坏作用. B: *RsPG5* 针刺接种水稻叶鞘 72 h 后症状. C: 水稻纹枯病菌侵染过程中 *RsPG5* 表达水平

Figure 5 Pathogenicity of *RsPG5* on rice. A: Damaging effects of *RsPG5* on rice leaf sheath cells. B: Symptoms of rice leaf sheaths inoculated with *RsPG5* 72 h later. C: Expression levels of *RsPG5* during the infection progress of *Rhizoctonia solani*.

### 3 讨论与结论

1966 年, Ayers 等<sup>[29]</sup>首次明确立枯丝核菌可以产生多聚半乳糖醛酸盐反式消除酶(polygalacturonic acid trans-elimination enzyme, PGTE)和 PG。在立枯丝核菌侵染水稻的过程中, 病菌 PG 可破坏寄主细胞, 且其在病部的活性要显著高于健

部, 病斑从内到外枯白部、褐色部和褪绿部的酶活性依次升高, 说明 PG 不仅有助于病菌的侵入, 还有助于病菌在寄主体内的扩展<sup>[7]</sup>。将立枯丝核菌 *Rspg1* 基因通过 RNAi 干涉, 获得的 10 个转化子 PG 活性均明显下降, 其中 6 个转化子相较野生菌株对水稻的致病力降低<sup>[8]</sup>。我们前期克隆了水稻纹枯病菌中的 4 个 PG 基因

*RsPG1-RsPG4*, 这些基因的表达产物也均有明显的 PG 酶活性, 且在病菌侵染寄主过程中均能上调表达<sup>[9-10]</sup>。为进一步鉴定水稻纹枯病菌中的其他 *RsPG* 基因, 本文通过 3'-RACE 克隆到了一个新的 *RsPG5* 基因, 该基因在病菌致病过程中表达量明显上调, 并且其表达产物对水稻叶鞘组织有明显的浸解作用, 说明 *RsPG5* 也是水稻纹枯病菌一个重要的致病因子。与前期克隆的 4 个 *RsPG* 基因相比, *RsPG5* 的表达水平上调幅度与 *RsPG2*、*RsPG3* 相当, 高于 *RsPG4* 而远低于 *RsPG1*; 同时, 其编码产物酶活性与对寄主细胞的损伤能力与 *RsPG2*、*RsPG3* 和 *RsPG4* 相似, 但远低于 *RsPG1*<sup>[9-10,19]</sup>。

真核生物中, 已经克隆的 PG 基因其编码产物基本均包含 4 个特定的保守序列 NTD、DD、GHG 和 RIK<sup>[30-31]</sup>。我们前期对来自立枯丝核菌的 59 个 PG 进行分析, 发现尽管其保守序列中可能有个别氨基酸被替换, 如 NTD 区可能为 NAD 或 ETD, GHG 可能为 SHG 或 GYG, RIK 可能为 RFK 等, 但其可被清晰地分成两类, 即 *exo-PG* 和 *endo-PG*<sup>[10]</sup>。然而, 进一步收集 GenBank 中所有立枯丝核菌 PG 序列, 系统进化分析表明, 在氨基酸序列上 *exo-PG* 和 *endo-PG* 并无明显的特征性区别, 且其保守位点的氨基酸替换种类更多, 甚至部分 PG 还存在保守区缺失的现象, 如 XP043183074 和 QRW22837 缺失 GHG, QRW25501、CEL56986、XP043185038 和 ARW24801 缺失 DD, XP043179490、QRW19253 和 CCO28787 则缺失 RIK。有研究表明, 单个氨基酸的改变就能使 PG 免被寄主 PGIP 所抑制<sup>[32-33]</sup>。立枯丝核菌 PG 这些保守位点变化甚至缺失是否又会影响其 PG 的酶活性, 进而影响其被寄主 PGIP 识别而影响病菌的致病作用, 目前还未见报道。

所有 PG 均可降解多聚半乳糖醛酸, 但并不

非所有编码 PG 的基因在病菌致病过程中都起重要作用<sup>[34]</sup>。如 *Penicillium digitatum* 中的 *Pdpg2*、*A. niger* 中的 *pgxB* 和 *Geotrichum candidum* 中的 *S31PG1* 等均是真菌全毒性所必需的, 但 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 中的 *pg1* 或 *pgx6* 被单突变后却对病菌的毒性并无影响<sup>[35-37]</sup>。另外, 2 个单突变均不影响病菌致病力的基因被同时突变后, 病菌致病力显著下降, 说明这 2 个基因在病菌的致病过程中呈协同作用<sup>[17]</sup>。此外, 有些基因的功能可以被其他基因补偿。在大丽轮枝菌侵染马铃薯过程中, *ExoPG* 基因表达量显著上调, 且强致病菌中该基因的表达量上调倍数显著大于弱致病菌, 但突变该基因却并不影响病菌的致病力和 PG 酶活性, 这主要是因为包括 *PGA* 基因在内的其他果胶酶基因补偿了该基因的功能<sup>[38]</sup>。目前, 在水稻纹枯病菌中共已克隆到 5 个 PG 基因, 这些基因是否是病菌全毒性所必需或它们之间也存在着功能互补作用, 均还未知。

PGIP 对 PG 的识别具有专化性, 单个氨基酸的改变就能赋予 PGIP 新的识别能力。将菜豆 PvPGIP2 的第 253 位氨基酸由谷氨酰胺突变为赖氨酸时, 其识别病菌 *Fusarium moniliforme* PG 的能力显著下降; 相反地, 将 PvPGIP1 中的第 253 位氨基酸由赖氨酸替换为谷氨酰胺时, 其获得了抑制 *F. moniliforme* PG 的能力<sup>[39]</sup>。同样地, PG 单个氨基酸改变也能影响 PGIP 对它的识别。来自镰刀菌不同种的 FvPG 和 FpPG, 第 274 位氨基酸是其能否被 PvPGIP2 识别的关键, 当 FvPG 第 274 位氨基酸由苏氨酸突变为丙氨酸时, 尽管其酶活性未改变, 但其可被 PvPGIP2 识别; 而 FpPG 第 274 位氨基酸由丙氨酸替换为苏氨酸时, 其可明显逃避 PvPGIP2 的识别<sup>[33]</sup>。已报道的 PG-PGIP 复合体空间构象分析表明, 均是 PGIP 以凹面与 PG 酶活位点形成的裂隙区

的 C-端互作, 且以往的这些突变点也均位于这些功能区域。但在 *RsPG5* 和 *OsPGIP* 互作模型的预测中, *OsPGIP4* 和 *OsPGIP6* 分别以其 N-端或 C-端的氨基酸与 *RsPG5* 的 C-端氨基酸互作, 而不是以其凹面与 *RsPG5* 酶活位点裂隙区的 C-端氨基酸互作, 这是否是 *RsPG5* 与寄主部分 *PGIP* 进行专化性识别而避开其他 *PGIP* 的识别还有待进一步研究。

## REFERENCES

- [1] 刘万才, 刘振东, 黄冲, 陆明红, 刘杰, 杨清坡. 近 10 年农作物主要病虫害发生危害情况的统计和分析[J]. 植物保护, 2016, 42(5): 1-9, 46.  
LIU WC, LIU ZD, HUANG C, LU MH, LIU J, YANG QP. Statistics and analysis of crop yield losses caused by main diseases and insect pests in recent 10 years[J]. Plant Protection, 2016, 42(5): 1-9, 46 (in Chinese).
- [2] ZHENG AP, LIN RM, ZHANG DH, QIN PG, XU LZ, AI P, WANG YR, CHEN Y, LIU Y, SUN ZG, FENG HT, LIANG XX, FU RT, TANG CQ, LI Q, ZHANG J, XIE ZL, DENG QM, LI SC, WANG SQ, et al. The evolution and pathogenic mechanisms of the rice sheath blight pathogen[J]. Nature Communications, 2013, 4: 1424.
- [3] 杨迎青, 杨媚, 兰波, 周而勋, 李湘民. 水稻纹枯病菌致病机理的研究进展[J]. 中国农学通报, 2014, 28: 245-250.  
YANG YQ, YANG M, LAN B, ZHOU EX, LI XM. Research progress in pathogenic mechanisms of rice sheath blight pathogen[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2014, 28: 245-250 (in Chinese).
- [4] LIN RM, HE LY, HE JY, QIN PG, WANG YR, DENG QM, YANG XT, LI SC, WANG SQ, WANG WM, LIU HN, LI P, ZHENG AP. Comprehensive analysis of microRNA-Seq and target mRNAs of rice sheath blight pathogen provides new insights pathogenic regulatory mechanisms[J]. DNA Research, 2016, 23(5): 415-425.
- [5] RAZALI NM, HISHAM SN, KUMAR IS, SHUKLA RN, NADARAJAH K. Comparative genomics: insights on the pathogenicity and lifestyle of *Rhizoctonia solani*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(4): 2183.
- [6] 张红, 陈夕军, 童蕴慧, 纪兆林, 徐敬友. 纹枯病菌胞壁降解酶对水稻组织和细胞的破坏作用[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2005, 26(4): 83-86.  
ZHANG H, CHEN XJ, TONG YH, JI ZL, XU JY. Destruction of rice tissues and cells by cell wall degrading enzymes of *Rhizoctonia solani*[J]. Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science Edition), 2005, 26(4): 83-86 (in Chinese).
- [7] 陈夕军, 张红, 徐敬友, 童蕴慧, 纪兆林. 水稻纹枯病菌胞壁降解酶的产生及致病作用[J]. 江苏农业学报, 2006, 22(1): 24-28.  
CHEN XJ, ZHANG H, XU JY, TONG YH, JI ZL. Cell wall degrading enzymes produced by *Rhizoctonia solani* and their pathogenicity to rice plants[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2006, 22(1): 24-28 (in Chinese).
- [8] YANG YQ, YANG M, LI MH, ZHOU EX. Cloning and functional analysis of an endo-PG-encoding gene *Rrspg1* of *Rhizoctonia solani*, the causal agent of rice sheath blight[J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 2012, 34(3): 436-447.
- [9] CHEN XJ, LI LL, ZHANG Y, ZHANG JY, OUYANG SQ, ZHANG QX, TONG YH, XU JY, ZUO SM. Function analysis of polygalacturonase gene *RsPG2* from *Rhizoctonia solani*, the pathogen of rice sheath blight[J]. European Journal of Plant Pathology, 2017, 149(2): 491-502.
- [10] CHEN XJ, LI LL, HE Z, ZHANG JH, HUANG BL, CHEN ZX, ZUO SM, XU JY. Molecular cloning and functional analysis of two novel polygalacturonase genes in *Rhizoctonia solani*[J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 2018, 40(1): 39-47.
- [11] OESER B, HEIDRICH PM, MLLER U, TUDZYNSKI P, TENBERGE KB. Polygalacturonase is a pathogenicity factor in the *Claviceps purpurea*/rye interaction[J]. Fungal Genetics and Biology, 2002, 36(3): 176-186.
- [12] KALUNKE RM, TUNDO S, BENEDETTI M, CERVONE F, LORENZO GD, D'OIDIO R. An update on polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP), a leucine-rich repeat protein that protects crop plants against pathogens[J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6: 146.
- [13] GENTIS S, GUILLAS I, SEJALON N, ESQUERRE-TUGAYE MT, DUMAS B. Endopolygalacturonase genes from *Colletotrichum lindemuthianum*: cloning of CLPG2 and comparison of its expression to that of CLPG1 during saprophytic and parasitic growth of the fungus[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1998, 10(6): 769-775.

- [14] SCHACHT T, UNGER C, PICH A, WYDRA K. Endo- and exopolygalacturonases of *Ralstonia solanacearum* are inhibited by polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) activity in tomato stem extracts[J]. *Plant Physiology Biochemistry*, 2011, 49(4): 377-387.
- [15] D'OVIDIO R, MATTEI B, ROBERTI S, BELLINCAMPI D. Polygalacturoases, polygalacturonase-inhibiting proteins and pectic oligomers in plant-pathogen interactions[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004, 1696(2): 237-244.
- [16] TEN HAVE A. The *Botrytis cinerea* endopolygalacturonase gene family[D]. Wageningen: Doctoral Dissertation of Wageningen University, 2000.
- [17] RUIZ GB, PIETRO AD, RONCERO MIG. Combined action of the major secreted exo- and endopolygalacturonases is required for full virulence of *Fusarium oxysporum*[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2016, 17(3): 339-353.
- [18] VILANOVA L, LOPEZ-PEREZ M, BALLESTER AR, TEIXIDO N, USALL J, LARA I, VINAS I, TORRES R, CANDELAS LG. Differential contribution of the two major polygalacturonases from *Penicillium digitatum* to virulence towards citrus fruit[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2018, 282(3): 16-23.
- [19] 陈夕军, 王友德, 张家豪, 左示敏, 童蕴慧, 潘学彪, 徐敬友. 水稻纹枯病菌 *Rspg1* 基因的克隆、表达及其编码产物生物信息学分析[J]. *微生物学报*, 2014, 54(4): 391-397.
- CHEN XJ, WANG YD, ZHANG JH, ZUO SM, TONG YH, PAN XB, XU JY. Cloning, prokaryotic expression and bioinformatics of *Rspg1* gene of *Rhizoctonia solani*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54(4): 391-397 (in Chinese).
- [20] CHEN XJ, CHEN Y, ZHANG LN, XU B, CHEN ZX, TONG YH, ZUO SM, XU JY. Overexpression of *OsPGIP1* enhances rice resistance to sheath blight[J]. *Plant Disease*, 2016, 100(2): 388-395.
- [21] COMBET C, BLANCHET C, GEURJON C, DELÉAGE G. NPS@: network protein sequence analysis[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2000, 25(3): 147-150.
- [22] KELLEY LA, MEZULIS S, YATES CM, WASS MN, STERNBERG MJE. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis[J]. *Nature Protocols*, 2015, 10(6): 845-858.
- [23] DESTA IT, PORTER KA, XIA B, KOZAKOV D, VAJDA S. Performance and its limits in rigid body protein-protein docking[J]. *Structure*, 2020, 28(9): 1071-1081.
- [24] VAJDA S, YUEH C, BEGLOV D, BOHNUUD T, MOTTARELLA SE, XIA B, HALL DR, KOZAKOV D. New additions to the ClusPro server motivated by CAPRI[J]. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2017, 85(3): 435-444.
- [25] KOZAKOV D, HALL DR, XIA B, PORTER KA, PADHORNY D, YUEH C, BEGLOV D, VAJDA S. The ClusPro web server for protein-protein docking[J]. *Nature Protocols*, 2017, 12(2): 255-278.
- [26] KOZAKOV D, BEGLOV D, BOHNUUD T, MOTTARELLA SE, XIA B, HALL DR, VAJDA S. How good is automated protein docking?[J]. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2013, 81(12): 2159-2166.
- [27] TEUFEL F, ARMENTEROS JJA, JOHANSEN AR, GISLASON MH, PIHL SI, TSIRIGOS KD, WINTHER O, BRUNAK S, HEIJNE GV, NIELSEN H. SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models[J]. *Nature Biotechnology*, 2022, 40(7): 1023-1025.
- [28] MOLLER S, CRONING MDR, APWEILER R. Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions[J]. *Bioinformatics*, 2001, 17(7): 646-653.
- [29] AYERS WA, PAPAVIDAS GC, LUMSDEN R. Polygalacturonate trans-eliminase and polygalacturonase production by *Rhizoctonia solani*[J]. *Phytopathology*, 1966, 59: 925-930.
- [30] MARKOVIC O, JANECEK S. Pectin degrading glycoside hydrolases of family 28: sequence-structural features, specificities and evolution[J]. *Protein Engineering*, 2001, 14(9): 615-631.
- [31] PARK KC, KWON SJ, KIM PH, BUREAU T, KIM NS. Gene structure dynamics and divergence of the polygalacturonase gene family of plants and fungus[J]. *Genome*, 2008, 51(1): 30-40.
- [32] RAIOLA A, CASTIGLIONI C, NESLER A, ELMAGHRABY I, FAVARON F. Identification of amino acid residues of *Fusarium verticillioides* endo-polygalacturonase required to escape the inhibition by host plant PGIP[J]. *Journal of Plant Pathology*, 2009, 91(S4): 83.
- [33] BENEDETTI M, ANDREANI F, LEGGIO C, GALANTINI L, MATTEO AD, PAVEL NV, LORENZO GD, CERVONE F, FEDERICI L, SICILIA F. A single amino-acid substitution allows endo-

- polygalacturonase of *Fusarium verticillioides* to acquire recognition by PGIP2 from *Phaseolus vulgaris*[J]. PLoS One, 2013, 8(11): e80610.
- [34] NAKAMURA M, IWAI H. Functions and mechanisms: polygalacturonases from plant pathogenic fungi as pathogenicity and virulence factors[J]. Journal of General Plant Pathology, 2019, 85(4): 243-250.
- [35] ZHANG TY, SUN XP, XU Q, CANDELAS GL, LI HY. The pH signaling transcription factor PacC is required for full virulence in *Penicillium digitatum*[J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2016, 97(20): 9087-9098.
- [36] LIU CQ, HU KD, LI TT, YANG Y, YANG F, LI YH, LIU HP, CHEN XY, ZHANG H. Polygalacturonase gene *pgxB* in *Aspergillus niger* is a virulence factor in apple fruit[J]. PLoS One, 2017, 12: e0173277.
- [37] NAKAMURA M, IWAI H, ARAI K. Polygalacturonase S31PG1 from *Geotrichum candidum* citrus race S31 expressed in *Schizosaccharomyces pombe* versus S31PG2 regarding soft rot on lemon fruit[J]. Journal of General Plant Pathology, 2003, 69(5): 283-291.
- [38] ZHOU XH, SAYARI M, DAAYF F. Role of exopolygalacturonase-related genes in potato-*Verticillium dahlia* interaction[J]. Pathogens, 2021, 10(6): 642.
- [39] LECKIE F, MATTEI B, CAPODICASA C, HEMMINGS A, NUSS L, ARACRI B, LORENZO-G D, CERVONE F. The specificity of polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP): a single amino acid substitution in the solvent-exposed  $\beta$ -strand/ $\beta$ -turn region of the leucine-rich repeats (LRRs) confers a new recognition capability[J]. The EMBO Journal, 1999, 18(9): 2352-2363.