



叶丽芳,宋水林,张连虎,等.莲腐败病菌多聚半乳糖醛酸酶 *Fcpgl* 基因功能研究[J].江西农业大学学报,2024,46(1):77-85.

YE L F, SONG S L, ZHANG L H, et al. Functional studies on the polygalacturonase gene *Fcpgl* in *Fusarium commune* causing lotus rhizome rot[J]. Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis, 2024, 46(1): 77-85.

莲腐败病菌多聚半乳糖醛酸酶 *Fcpgl* 基因功能研究

叶丽芳, 宋水林, 张连虎, 林桢春, 崔汝强*, 况卫刚*

(江西农业大学 农学院, 江西 南昌 330045)

摘要:【目的】共享镰刀菌(*Fusarium commune*)侵染莲引起的莲腐败病严重影响莲的生产,鉴定莲腐败病菌中多聚半乳糖醛酸酶基因 *Fcpgl*,分析其在生长发育及致病过程中的作用,为进一步研究共享镰刀菌的致病机理及莲腐败病菌的防治提供依据。【方法】利用 BLASTP 在莲腐败病菌全基因组数据中查找 PG 同源蛋白,并使用 ExPASy 等在线软件对 *Fcpgl* 氨基酸序列进行生物信息学分析。通过基因敲除的方法,获得 *Fcpgl* 基因敲除突变体 $\Delta Fcpgl$ 和回补菌株 $\Delta Fcpgl$ -Com。测定野生型菌株 FCN23、突变体 $\Delta Fcpgl$ 和回补菌株 $\Delta Fcpgl$ -Com 的菌落形态、生长速率、产孢量及致病力。【结果】*Fcpgl* 基因编码 388 个氨基酸,分子量为 40.354 ku,分子式为 $C_{1756}H_{2775}N_{489}O_{577}S_{12}$,理论等电点为 6.57,脂溶系数为 79.9。*Fcpgl* 为稳定的、易溶于水的外泌性蛋白,其信号肽剪切位点在第 16~17 个氨基酸,主要定位于胞外基质。*Fcpgl* 蛋白与尖孢镰刀菌的多聚半乳糖醛酸酶蛋白序列具有较高的同源性。与野生型菌株 FCN23 和回补菌株 $\Delta Fcpgl$ -Com 相比, $\Delta Fcpgl$ 突变体的菌落形态、营养生长和产孢量等方面均无明显差异,但突变体 $\Delta Fcpgl$ 的致病力显著减弱。【结论】*Fcpgl* 是典型的多聚半乳糖醛酸酶蛋白,参与对莲腐败病致病力的调控。

关键词: 莲; *Fusarium commune*; 基因敲除; 多聚半乳糖醛酸酶; 表型; 致病力

中图分类号: S436

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

文章编号: 1000-2286(2024)01-0077-09



Functional studies on polygalacturonase gene *Fcpgl* in *Fusarium commune* causing lotus rhizome rot

YE Lifang, SONG Shuilin, ZHANG Lianhu, LIN Yachun,
CUI Ruqiang*, KUANG Weigang*

(College of Agronomy, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: [Objective] Lotus rhizome rot caused by *Fusarium commune* seriously affects the production of lotus in China. The polygalacturonase gene *Fcpgl* in the pathogen of lotus spoilage was identified, and its role in

收稿日期: 2023-09-21 修回日期: 2023-11-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(32260663)

Project supported by the National Natural Science Foundation of China(32260663)

作者简介: 叶丽芳, 硕士生, orcid.org/0009-0001-0201-0072, yelifang66@126.com; *通信作者: 崔汝强, 教授, 博士生导师, 主要从事植物病理学研究, orcid.org/0000-0003-0385-854X, cuiuqiang@jxau.edu.cn; 况卫刚, 副教授, 主要从事植物病理学研究, orcid.org/0000-0002-7617-3085, kwg23@126.com。

growth, development and pathogenicity was analyzed, which provided a basis for further research on the pathogenic mechanism of *F. commune* and the prevention and control of the disease. [Method] BLASTP was used to find *Fcpg1* homologous proteins in the whole genome data of *F. commune* and the amino acid sequence of *Fcpg1* was analyzed using online software ExPASy. The *Fcpg1* knockout mutant $\Delta Fcpg1$ and the complementation strain $\Delta Fcpg1$ -Com were obtained. Colony morphology, growth rate, spore production, and pathogenicity were measured for the wild-type strain FCN23, the mutant $\Delta Fcpg1$, and the complementation strain $\Delta Fcpg1$ -Com. [Result] The *Fcpg1* gene encoded 388 amino acids with a molecular weight of 40.354 ku. The molecular formula was $C_{1756}H_{2775}N_{489}O_{577}S_{12}$, the isoelectric point was 6.57 and an aliphatic index was 79.9. *Fcpg1* was a stable, water-soluble exocytotic protein, mainly localized in the extracellular. Its signal peptide shear site was between amino acids 16–17. The *Fcpg1* protein had high homology to the polygalacturonase protein sequence of *F. oxysporum*. There were no significant differences in colony morphology, vegetative growth, and spore production in the $\Delta Fcpg1$ mutant compared with the wild-type strain FCN23 and the complementation strain $\Delta Fcpg1$ -Com, but the pathogenicity of the mutant $\Delta Fcpg1$ was significantly reduced. [Conclusion] *Fcpg1* is a typical polygalacturonase protein involved in the regulation of the pathogenicity of lotus rhizome rot.

Keywords: lotus; *Fusarium commune*; gene knockout; polygalacturonase; phenotype; pathogenicity

【研究意义】共享镰刀菌(*Fusarium commune*)是一种土传病原真菌,其引起的莲腐败病在我国常年发生,造成植株枯萎死亡,发病严重时可能造成70%的产量损失,严重威胁莲的生产安全^[1-4]。但是,目前对莲腐败病菌的了解不深,缺乏抗病品种和有效的防治策略。解析莲腐败病菌的致病机制,对制定合理有效的综合防治策略具有重要意义。【前人研究进展】多聚半乳糖醛酸酶(polygalacturonase, PG)从病原真菌产生的果胶酶中获得,是降解寄主植物细胞壁结构的主要酶之一,导致植物组织浸解和原生质体死亡,在真菌致病过程起重要作用^[5-7]。Ten等^[8]对灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)的*Bcpg1*基因进行基因敲除,发现*Bcpg1*的缺失导致灰葡萄孢多聚半乳糖醛酸酶含量下降,对番茄和苹果的致病力也显著下降。Jia等^[9]发现随着由辣椒疫霉(*Phytophthora capsici*)引起的辣椒疫病发病程度加重,PG酶活性越高,表明PG参与辣椒疫霉的致病过程。崔佳等^[10]发现新月弯孢(*Curvularia lunata*)*Clpg1*缺失后对玉米的致病性减弱。【本研究切入点】目前,多聚半乳糖醛酸酶*Fcpg1*在莲腐败病菌(*F. commune*)的功能还未见报道。【拟解决的关键问题】基于莲腐败病菌全基因组数据,通过生物信息学对其多聚半乳糖醛酸酶基因*Fcpg1*进行鉴定。利用同源重组原理获得莲腐败病菌*Fcpg1*敲除突变体 $\Delta Fcpg1$ 以及回补菌株 $\Delta Fcpg1$ -Com,明确*Fcpg1*在共享镰刀菌生长发育和致病方面的作用,为进一步解析莲腐败病菌的致病机制和莲腐败病的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株及载体

莲腐败病菌(*Fusarium commune*, FCN23)由本实验室分离自江西广昌莲种植基地,于30%甘油中-80℃保存。供试莲为感病品种太空莲36号。敲除载体为pBS-HYG含潮霉素抗性,回补载体为pKNT-GFP含有遗传霉素抗性,由本实验室改造。

1.1.2 主要试剂及测序

崩溃酶(driselase)、蜗牛酶(snailase)、溶壁酶(lyticase)和真菌DNA提取试剂盒购自索莱宝Solarbio公司。T4连接酶购自Takara公司。限制性内切酶购自Thermo公司。普通Taq酶、高保真酶、DNA无缝克隆酶、氨苄青霉素钠(ampicillin)、G418(遗传霉素)和潮霉素B(hygromycin B)购自翌圣公司。DNA凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自擎科擎科生物技术(湖南)有限公司。试验所用引物合成及PCR产物测序由擎科生物技术(湖南)有限公司完成。

1.1.3 培养基

PDA 培养基:去皮马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,用超纯水定容至 1 L。YPD 液体培养基:酵母提取物 10 g,胰蛋白胨 20 g,葡萄糖 20 g,用超纯水定容至 1 L。

1.2 *Fcpg1* 基因的鉴定及生物信息学分析

莲腐败病菌全基因组数据是课题组利用第三代测序技术测序得到的。基于实验室已测得的莲腐败病菌全基因组数据,对 *F. commune* 全基因组进行 BLASTP 搜索查找同源蛋白。利用 ProtParam 工具(<http://web.expasy.org/protparam>)分析 *Fcpg1* 蛋白的分子量、分子式、理论等电点、脂溶系数和不稳定系数。用 ProtScale 在线工具(<http://web.expasy.org/protscale>)对 *Fcpg1* 的亲疏水性进行分析。TMHMM 蛋白跨膜结构域在线分析工具(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>)^[11]。利用在线软件 SignalP 4.1(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-4.1>)预测信号肽。利用 BLASTP(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)查找其他蛋白的同源序列。使用 MEGA 7.0^[12]以邻接法构建 *Fcpg1* 与其他真菌物种同源物的系统发育树,重复 1 000 次 Bootstrap 检测。

1.3 *Fcpg1* 基因敲除突变体和回补菌株的构建

Fcpg1 基因敲除突变体构建:采用真菌 DNA 提取试剂盒提取莲腐败病菌 FCN23 基因组 DNA,用 split-marker 策略^[13]扩增 *Fcpg1* 基因同源重组序列。利用引物对 Pg1F1+Pg1R1 和 Pg1F2+Pg1R2 分别扩增 800 bp 左右的 *Fcpg1* 上游片段和下游片段,利用合适的酶切位点对上下游片段和载体 pBS-HYG 进行酶切,回收产物后用 T4 连接酶将上下游片段连接到 pBS-HYG 的两端,构建 *Fcpg1* 基因敲除载体。以上述产物为模板使用引物对 Pg1F1+HYG/R 和 YG/F+Pg1R2,分别重叠扩增 *Fcpg1* 基因和 *hph* 基因上下游侧翼序列,并用于转化 FCN23 菌株原生质体。然后参照张磊等^[14]的方法,稍作改进,制备莲腐败病菌的原生质体并进行原生质体转化,用含 800 μg/mL 潮霉素的 PDA 平板对转化子进行初步筛选。用 CTAB 法提取转化子 DNA,引物对 Pg1F+Pg1R 扩增 *Fcpg1* 部分 ORF,引物对 HYG/F+HYG/R 扩增潮霉素基因。

回补菌株构建:将携带 G418 抗性基因的质粒 pKNT-GFP 用限制性内切酶 *KpnI* 和 *HindIII* 酶切,以野生型菌株 FCN23 的基因组 DNA 为模板,用引物对 Pg1-CF+Pg1-CR 和高保真酶扩增 *Fcpg1* 基因的上游启动子和全长回补片段,再通过无缝克隆技术将纯化回收后的产物克隆到回补载体 pKNT-GFP。将构建好的载体转入 *Fcpg1* 基因敲除突变体的原生质体中,用含 120 μg/mL G418 的 PDA 平板对转化子进行初步筛选。提取转化子 DNA,利用引物对 Pg1F+Pg1R 扩增 *Fcpg1* 部分 ORF,G418F+G418R 扩增遗传霉素基因。研究所用引物见表 1。

表 1 试验所用引物

Tab.1 Sequences of the primers used in the study

引物 Primer name	序列 Sequence(5'—3')
Pg1F1	CCCTCGAGTAGCGTGACACTATCTCCG
Pg1R1	CCATCGATAAATTCCGTCTCGTCGTTTC
Pg1F2	CGGGATCCTAGGCCGTAAGTGGGAAGGT
Pg1R2	GCTCTAGA CCGGATTGAAATTGGGTAA
YG/F	GATGTAGGAGGGCGTGATATGTCCT
HYG/R	GTATTGACCGATTCCTTGCGGTCCGAA
HYG/F	GACAGCGTCTCCGACCTGA
HYG/R	GCTCCATACAAGCCAACCAC
Pg1F	TCGCTACCGCCGTCTCATC
Pg1R	CTTGCCATTGGGCTTGTCG
Pg1-CF	ACAAAAGCTGGGTACCAATTAAAGCTTCCGCCTGTAAG
Pg1-CR	CCGCCGCCGCCCAAGCTTGCTAGGGCAAGTGTGCTAGGA
G418F	GATGTTTCGCTTGGTGGTCCG
G418R	TGATGCCGCCGTGTTCC

1.4 *Fcpg1* 基因缺失突变体表型观察

菌落形态观察及生长速率测定:将莲腐败病菌野生型菌株 FCN23、*Fcpg1* 敲除突变体($\Delta Fcpg1$)和回补菌株($\Delta Fcpg1$ -Com)分别接种至 PDA 培养基中央,置于 28 ℃ 培养箱中倒置培养,5 d 后测量菌落直径。试验重复 3 次。

产孢量测定:将野生型菌株 FCN23、 $\Delta Fcpg1$ 和 $\Delta Fcpg1$ -Com 接种至 YPD 液体培养基中,25 ℃、180 r/min 的条件下培养 3 d,收集各菌株孢子并配置成 1×10^4 mL⁻¹ 的孢子悬浮液。将 1 mL 各菌株孢子悬浮液接种至 100 mL YPD 液体培养基中,25 ℃、180 r/min 的条件下培养 3 d,收集孢子并用血球计数板镜检分生孢子,计算产孢量。试验重复 3 次。

1.5 致病性检测

将待测菌株接种于 YPD 液体培养基中,在 25 ℃、180 r/min 的条件下培养 3 d,过滤菌丝,收集分生孢子并配置成 1×10^7 mL⁻¹ 的孢子悬浮液备用。取健康太空莲 36 号植株用酒精棉球擦拭并用无菌针头刺伤,将各菌株孢子悬浮液分别接种在莲茎上,28 ℃ 保湿培养 3 d,观察发病情况并测量病变长度。设无菌水为对照,试验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 *Fcpg1* 基因的鉴定及生物信息学分析

在莲腐败病菌全基因组数据库中进行 BLASTP 比对分析,鉴定到同源蛋白,命名为 *Fcpg1*。运用 ProtParam 在线软件对 *Fcpg1* 蛋白进行理化性质分析,结果表明 *Fcpg1* 基因编码 388 个氨基酸,分子量为 40.354 ku,分子式为 C₁₇₅₆H₂₇₇₅N₄₈₉O₅₇₇S₁₂,理论等电点为 6.57,脂溶系数为 79.9,不稳定系数为 26.62,是一种稳定的蛋白。利用 ProtScale 工具分析 *Fcpg1* 基因编码蛋白的亲疏水性,表明该蛋白为亲水性蛋白。利用 TMHMM 蛋白跨膜结构域在线分析工具发现 *Fcpg1* 蛋白不含跨膜结构域,为外泌蛋白。利用 SignalP 4.1 在线工具分析 *Fcpg1* 信号肽,结果显示 *Fcpg1* 蛋白含有信号肽,其剪切位点在第 16~17 个氨基酸(图 1)。亚细胞定位分析结果表明,*Fcpg1* 主要定位在胞外基质。

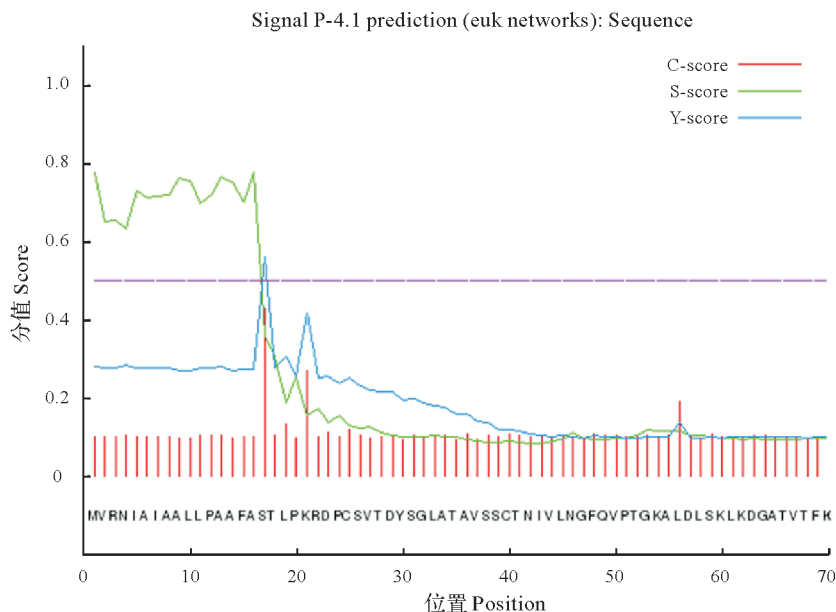


图1 *Fcpg1* 蛋白信号肽预测

Fig.1 Prediction of *Fcpg1* protein signaling peptide

2.2 *Fcpg1* 保守结构域预测及系统发育树构建

系统发育分析莲腐败病菌 *Fcpg1* 氨基酸序列与尖孢镰刀菌番茄转化型 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (登录号: AAC05015.1) 亲缘关系最近(图 2)。

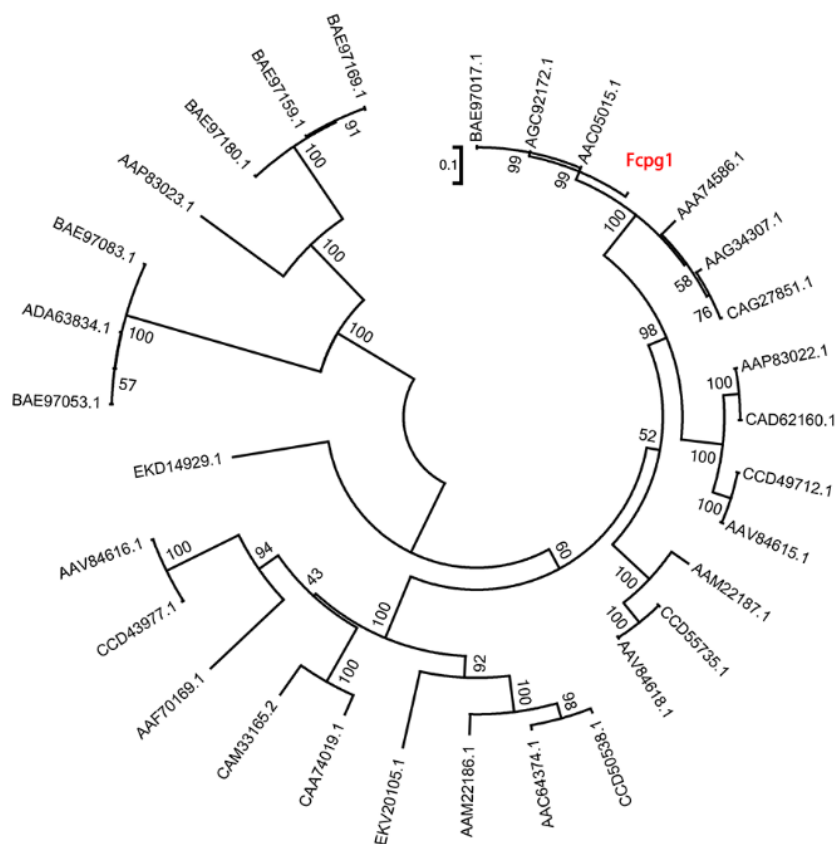


图2 Fcpg1蛋白和其他物种中PG蛋白进化树分析

Fig.2 Phylogenetics tree analysis of PG proteins in *F. commune* and others species

2.3 *Fcpg1* 基因敲除突变体和回补菌株的筛选和验证

为了分析 *Fcpg1* 在莲腐败病菌 FCN23 中的生物学功能,用 split-marker PCR 策略对 *Fcpg1* 基因进行了敲除(图 3A)。利用潮霉素抗性初步筛选阳性转化子并进行 PCR 检测,如图 3B 所示,能检测到潮霉素基因片段(673 bp)并且无法检测到 *Fcpg1* 基因(538 bp),表明 *Fcpg1* 已成功敲除,最终获得 2 个正确的转化子,分别标记为 *Fcpg1* 缺失突变体 $\Delta Fcpg1-2$ 和 $\Delta Fcpg1-10$ 。突变体 $\Delta Fcpg1-2$ 和 $\Delta Fcpg1-10$ 在表型上无明显差异,故选取突变体 $\Delta Fcpg1-2$ 用于后续试验。

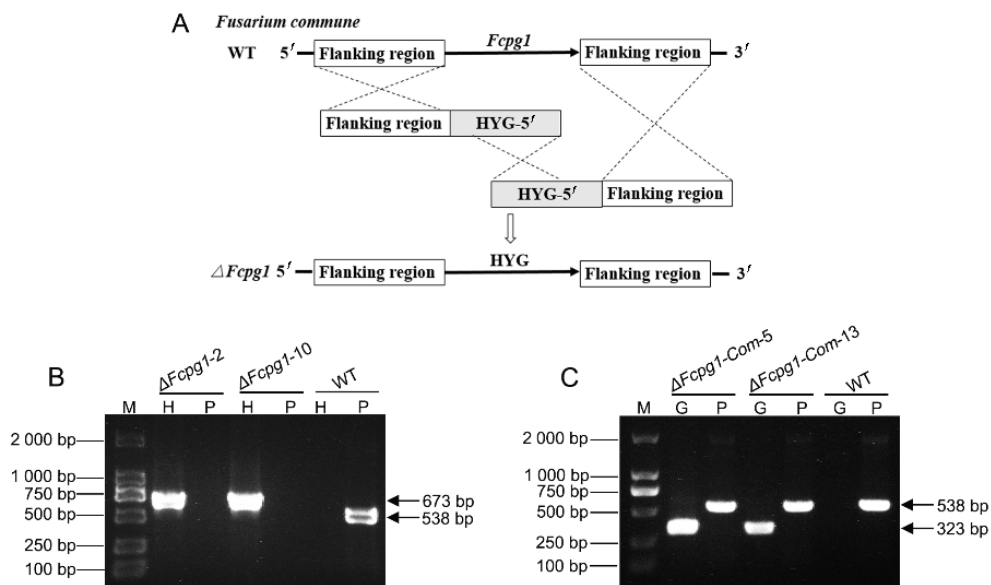
将构建好的 *Fcpg1* 回补质粒转入突变体 $\Delta Fcpg1-2$ 的原生质体中,利用遗传霉素抗性初步筛选阳性转化子并进行 PCR 检测,能检测到遗传霉素基因片段(323 bp)并且能检测到 *Fcpg1* 基因(538 bp),表明 *Fcpg1* 基因回补成功,最终获得 2 个回补菌株,分别标记回补菌株为 $\Delta Fcpg1-Com-3$ 和 $\Delta Fcpg1-Com-13$,且 2 个回补菌株在表型上无明显差异,故选取回补菌株 $\Delta Fcpg1-Com-3$ 用于后续试验。

2.4 生物学特性观察

在同样的培养条件下,用打孔器分别对野生型 FCN23、 $\Delta Fcpg1$ 突变体和 $\Delta Fcpg1-Com$ 回补菌株打孔接种于 PDA 培养基中置于 28 °C 培养箱中黑暗培养。发现 $\Delta Fcpg1$ 突变体和 $\Delta Fcpg1$ 回补菌株的菌落形态和颜色与野生型 FCN23 一致,并且 *Fcpg1* 基因敲除不影响菌落的生长速率(图 4,表 2)。各菌株在 YPD 液体培养基中培养 3 d 后,对分生孢子进行收集并统计,发现 $\Delta Fcpg1$ 突变体的产孢量基本不受敲除基因的影响(图 4,表 2)。

2.5 致病力检测

为了检验 *FcpgI* 在致病性中的作用, 分别将野生型菌株、 $\Delta FcpgI$ 和 $\Delta FcpgI-Com$ 的分生孢子接种于太空莲 36 号, 3 d 后观察发病情况。发现对照组无病害症状出现, $\Delta FcpgI$ 突变体的致病性与野生型菌株相比显著降低, 同时互补菌株恢复了部分致病力(图 5)。

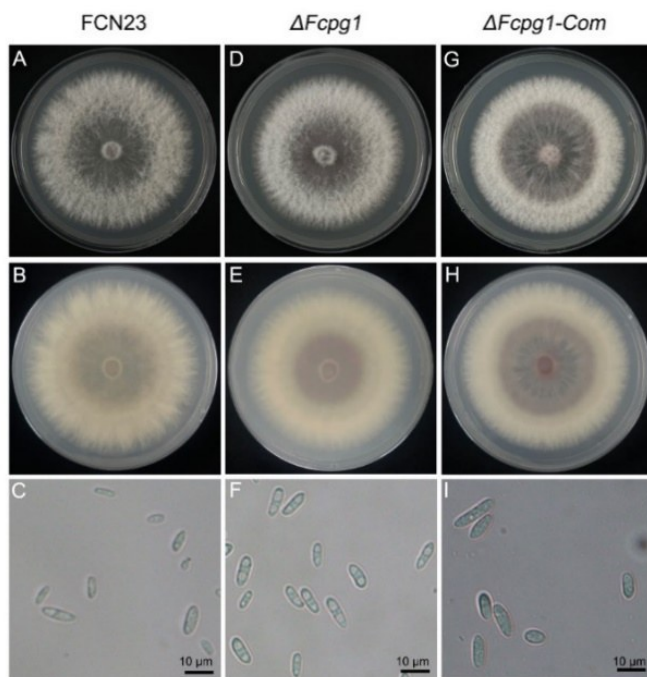


A: *Fcpg1* 基因敲除策略示意图; B: *Fcpg1* 基因缺失突变体 PCR 检测; C: *Fcpg1* 基因回补菌株 PCR 检测; M: DL 2 000 marker; H: 引物 HYG/F+HYG/R 扩增的潮霉素抗性基因片段; P: 引物 Pg1F+Pg1R 扩增的 *Fcpg1* 基因部分 ORF 片段; G: 引物 G418F+G418R 扩增的遗传霉素抗性基因片段。

A: Schematic representation of *Fcpg1* deletion strategy; B: PCR products for the *Fcpg1* gene replacement construct. C: PCR products for *Fcpg1* gene complementation strains; M: DL 2000 marker; H: Amplified fragments of the hygromycin resistance gene by primers HYG/F+HYG/R; P: Partial ORF fragment of *Fcpg1* gene amplified by primers Pg1F+Pg1R; G: Amplified fragments of the geneticin resistance gene by primers G418F+G418R.

图 3 莲腐败病菌 *Fcpg1* 基因敲除与验证

Fig.3 *Fcpg1* gene knockout and Validation in *Fusarium commune*



A、D、G 分别为野生型 FCN23、 $\Delta Fcpg1$ 突变体和 $\Delta Fcpg1$ -Com 回补菌株的菌落正面; B、E、F 分别为各菌株的菌落反面; C、F、I 分别为各菌株的分生孢子。

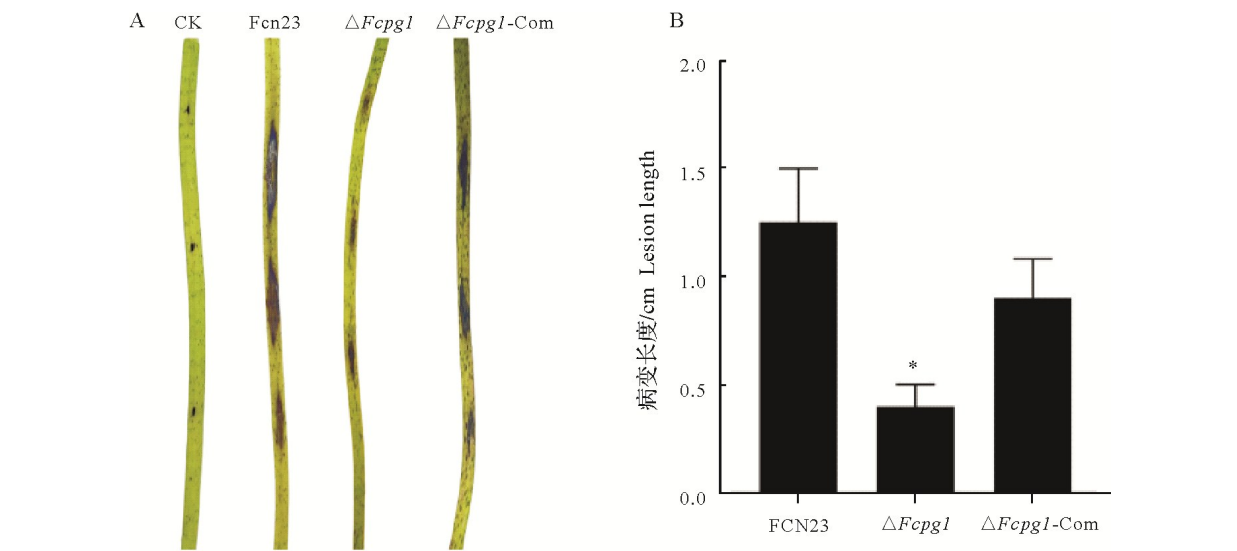
A, D, and G are colony fronts of wild-type FCN23, $\Delta Fcpg1$ mutant, and $\Delta Fcpg1$ -Com complemented strains, respectively; B, E, and F are colony reverses of each strain, respectively; and C, F, and I are conidia of each strain, respectively.

图 4 莲腐败病菌 $\Delta Fcpg1$ 突变体的菌落形态和孢子形态

Fig.4 Colony morphology and conidiation morphology of the $\Delta Fcpg1$ mutant of *F. commune*

表 2 莲腐败病菌 $\Delta Fcpg1$ 突变体的生长速率及产孢量测定
Tab.2 Growth rate and sporulation of $\Delta Fcpg1$ mutant of *Fusarium commune*

菌株 Strain	生长速率/(cm·d ⁻¹) Growth rate	产孢量/(×10 ⁷ ·mL ⁻¹) Sporulation
WT	1.46±0.01	5.03±0.20
$\Delta Fcpg1$	1.47±0.01	5.91±1.29
$\Delta Fcpg1$ -Com	1.47±0.01	6.64±0.97



A:野生型菌株和 $\Delta Fcpg1$ 侵染太空莲36号3 d后的发病症状,无菌水作为对照;B:太空莲36号的病变长度(*, $P<0.05$)。
A: Morbidity symptoms of wild-type and $\Delta Fcpg1$ strains after 3 days of infestation of Taikong lotus 36, with sterile water as a control; B: The lesion length of the Taikong lotus 36 (*, $P<0.05$).

图 5 $\Delta Fcpg1$ 的致病力检测
Fig.5 Pathogenicity assay for $\Delta Fcpg1$

3 结论与讨论

植物细胞壁是抵御病原真菌入侵的潜在屏障,也是病原物分泌胞外酶的底物,病原真菌能分泌一系列细胞壁水解酶降解细胞壁,以达到入侵植物的作用^[15]。多聚半乳糖醛酸酶(PG)是一种在真菌中广泛存在的细胞壁水解酶,其通过降解寄主植物细胞壁中多聚半乳糖醛酸区域,引起原生质体死亡,在病菌侵染寄主植物引起致病过程中发挥重要作用^[16-18]。目前,国内关于病原真菌多聚半乳糖醛酸酶基因的功能研究尚少,莲腐败病菌 *Fcpg1* 在菌落形态、营养生长及致病力的作用及机制尚不清楚。

本研究以莲腐败病菌多聚半乳糖醛酸酶基因 *Fcpg1* 为研究对象,通过基因敲除和基因回补的方法,初步探究了莲腐败病菌中 *Fcpg1* 的功能。生物信息学分析发现,*Fcpg1* 是典型的多聚半乳糖醛酸酶蛋白,*Fcpg1* 与尖孢镰刀菌亲缘关系最近。表型分析结果显示莲腐败病菌 PG 基因缺失不影响其菌落形态和生长速率,这与在玉米弯孢叶斑病菌新月弯孢(*Curvularia lunata*)和苹果树腐烂病菌黑腐皮壳属菌(*Valsa mali*)的情况基本一致^[10-19]。莲腐败病菌 *Fcpg1* 的缺失不影响分生孢子的产量,这与崔佳等^[10]发现新月弯孢 *Clpg1* 缺失突变体产孢量较野生型菌株相比显著下降的结果不一致。通过致病性试验结果显示,相较野生型 FCN23 和回补菌株 $\Delta Fcpg1$ -Com,突变体 $\Delta Fcpg1$ 的致病力显著下降,与之相同的是灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)缺失 *Bcpg1* 后,在番茄和苹果上的致病力下降^[8],麦角菌(*Claviceps purpurea*)*Cpg1* 缺失后在黑麦上的致病力显著下降^[20],白地霉(*Geotrichum candidum*)*pg1* 也被证实是柑橘酸腐病重要的致病因子^[21]。但甜瓜专化型尖孢镰刀菌 *pg1* 基因缺失突变体对甜瓜的致病性与野生型菌株并无差异^[22],说明

*pgl*在不同真菌中的作用可能已产生分化。

已有报道称PG有助于病原菌的侵入,寄主植物发病程度越高,PG酶活性也越高,并且*pgl*基因的缺失或RNAi干扰均导致PG酶活性下降^[23-24],说明PG在寄主植物致病方面发挥了一定作用。今后的研究中可以从该基因敲除是否影响莲腐败病菌PG酶活性的角度,解释*Fcpgl*基因对莲致病力减弱的调控机制,进而为莲腐败病防治提供理论依据。

参考文献 References:

- [1] 胡长志,孙晓棠,谢克强,等.白莲腐败病原菌的分离鉴定[J].长江蔬菜,2013(18):92-94.
HU C Z, SUN X T, XIE K Q, et al. Isolation and identification of pathogens causing rhizome rot of lotus [J]. Journal of Changjiang vegetables, 2013(18):92-94.
- [2] KUANG W G, ZHANG L H, YE L F, et al. Genome and transcriptome sequencing analysis of *Fusarium commune* provides insights into the pathogenic mechanisms of the lotus rhizome rot [J]. Microbiology spectrum, 2022, 10(4): e17522.
- [3] DENG S, MA X, CHEN Y F, et al. LAMP assay for distinguishing *Fusarium oxysporum* and *Fusarium commune* in lotus (*Nelumbo nucifera*) rhizomes [J]. Plant disease, 2022, 106(1): 231-246.
- [4] SKOVGAARD K, ROSENDAHL S, O'DONNELL K, et al. *Fusarium commune* is a new species identified by morphological and molecular phylogenetic data [J]. Mycologia, 2003, 95(4): 630-636.
- [5] BASHI Z D, RIMMER S R, KHACHATOURIANS G G, et al. Factors governing the regulation of *Sclerotinia sclerotiorum* cutinase A and polygalacturonase 1 during different stages of infection [J]. Canadian journal of microbiology, 2012, 58(5): 605-616.
- [6] FONTANA R C, SALVADOR S, SILVEIRA M M D. Influence of pectin and glucose on growth and polygalacturonase production by *Aspergillus niger* in solid-state cultivation [J]. Journal of industrial microbiology & biotechnology, 2005, 32(8): 371-377.
- [7] COOPER R M, WOOD R K S. Regulation of synthesis of cell wall degrading enzymes by *Veticillium albo-atrum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* [J]. Physiological plant pathology, 1975, 5(2): 135-156.
- [8] TEN H A, MULDER W, VISSER J, et al. The endopolygalacturonase gene *Bcpg1* is required for full virulence of *Botrytis cinerea* [J]. Molecular plant-microbe interactions, 1998, 11(10): 1009-1016.
- [9] JIA Y J, FENG B Z, SUN W X, et al. Polygalacturonase, pectate lyase and pectin methylesterase activity in pathogenic strains of *Phytophthora capsici* incubated under different conditions [J]. Journal of phytopathology, 2009, 157(10): 585-591.
- [10] 崔佳,赵丰舟,刘震,等.玉米弯孢叶斑病菌多聚半乳糖醛酸酶 *Clpg1* 基因功能验证 [J]. 植物保护, 2019, 45(6): 163-169.
CUI J, ZHAO F Z, LIU Z, et al. Functional verification of polygalacturonase *Clpg1* gene in *Curvularia lunata* causing maize Curvularia leaf spot [J]. Plant protection, 2019, 45(6): 163-169.
- [11] MOLLER S, CRONING M D, APWEILER R. Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions [J]. Bioinformatics, 2001, 17(7): 646-653.
- [12] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets [J]. Molecular biology and evolution, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [13] CATLETT N L, LEE B N, YODER O C, et al. Split-Marker recombination for efficient targeted deletion of fungal genes [J]. Fungal genetics newsletter, 2003, 50: 9-11.
- [14] 张磊,郭燕,王云月,等.香蕉枯萎病菌 TR4 原生质体转化和基因敲除体系构建 [J]. 植物病理学报, 2018, 48(1): 137-140.
ZHANG L, GUO Y, WANG Y Y, et al. Construction of PEG-mediated genetic transformation and gene knockout system in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* TR4 [J]. Acta phytopathologica Sinica, 2018, 48(1): 137-140.
- [15] JAROSZUK-SCISEL, KUREK. Hydrolysis of fungal and plant cell walls by enzymatic complexes from cultures of *Fusarium*

- isolates with different aggressiveness to rye (*Secale cereale*) [J]. Archives of microbiology, 2012, 194(8): 653-665.
- [16] CARNEIRO J S, BASTIDE P Y D L, CHABOT M, et al. Suppression of polygalacturonase gene expression in the phytopathogenic fungus *Ophiostoma novo-ulmi* by RNA interference [J]. Fungal genetics & biology, 2010, 47(5): 399-405.
- [17] MASSA C, DEGRASSI G, DEVESCOVI G, et al. Isolation, heterologous expression and characterization of an endo-polygalacturonase produced by the phytopathogen *Burkholderia cepacia* [J]. Protein expression & purification, 2007, 54(2): 300-308.
- [18] 张小秋, 宋修鹏, 陈冠州, 等. 植物病原菌多聚半乳糖醛酸酶的研究简述 [J]. 广西糖业, 2020(4): 49-53.
- ZHANG X Q, SONG X P, CHEN G Z, et al. Introduction to the research of polygalacturonase in phytopathogen [J]. Guangxi sugar industry, 2020(4): 49-53.
- [19] 许春景, 吴玉星, 戴青青, 等. 苹果树腐烂病菌多聚半乳糖醛酸酶基因 *Vmpg7* 和 *Vmpg8* 的功能 [J]. 中国农业科学, 2016, 49(8): 1489-1498.
- XU C J, WU Y X, DAI Q Q, et al. Function of polygalacturonase genes *Vmpg7* and *Vmpg8* of *Valsa mali* [J]. Scientia agricultura Sinica, 2016, 49(8): 1489-1498.
- [20] OESER B, HEIDRICH P M, MÜLLER U, et al. Polygalacturonase is a pathogenicity factor in the *Claviceps purpurea*/rye interaction [J]. Fungal genetics & biology, 2002, 36(3): 176-186.
- [21] 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.
- [22] DI P A, GARCÍA-MACEIRA F I, HUERTAS-GONZÁLEZ M D, et al. Endopolygalacturonase PG1 in different formae speciales of *Fusarium oxysporum* [J]. Applied and environmental microbiology, 1998, 64(5): 1967-1971.
- [23] YANG Y Q, YANG M, LI M H, et al. Cloning and functional analysis of an endo-PG-encoding gene *Rrspgl* of *Rhizoctonia solani*, the causal agent of rice sheath blight [J]. Canadian journal of plant pathology, 2012, 34(3): 436-447.
- [24] 陈夕军, 张红, 徐敬友, 等. 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 X J, ZHANG H, XU J Y, et al. Cell wall degrading enzymes produced by *RhizRhizoctonia solani* and their pathogenicity to rice plants [J]. Jiangsu journal of agricultural sciences, 2006, 22(1): 24-28.