

橡胶树红根病病原菌木聚糖酶编码基因 *GpTR1774* 的克隆与表达分析

伏雪^{1,2}, 涂敏^{2*}, 蔡海滨^{1,2}, 张红骥¹, 于德才^{1*}, 曾霞²

1. 云南农业大学植物保护学院, 云南昆明 650201; 2. 中国热带农业科学院橡胶研究所, 海南海口 571101

摘要: 细胞壁降解酶是诸多病原真菌的重要致病因子, 其中木聚糖酶作为最重要的半纤维素酶, 在丝状真菌降解细胞壁侵染寄主的过程中占有重要作用。本研究以橡胶树红根病病原菌 HD3 为材料, 采用 RT-PCR 克隆木聚糖酶编码基因 *GpTR1774* 的基因序列, 对其进行生物信息学分析; 用 HD3 侵染橡胶树热研 73397 组培苗根部, 电镜观测病原菌对根部细胞的侵染和破坏过程, 并利用 qRT-PCR 方法测定不同侵染时间 *GpTR1774* 基因的表达量。结果表明: *GpTR1774* 基因 cDNA 全长为 780 bp, 编码 259 个氨基酸, 其中含量最丰富的氨基酸为丙氨酸 (Ala), 占 15.1%; 预测蛋白分子量为 28.12 kDa, 脂肪系数为 81.93, 等电点为 9.07, 属亲水性蛋白, 共有 15 个磷酸化位点, 无信号和肽跨膜域, 定位于细胞溶质; α -螺旋和无规则卷曲是 *GpTR1774* 蛋白二级结构的主要元件, 分别占氨基酸序列的 38.10% 和 41.31%。系统进化树分析显示, *GpTR1774* 基因与狭长孢灵芝木聚糖酶基因相似度最高, 达 87.5%。qRT-PCR 显示, 木聚糖酶 *GpTR1774* 基因表达量整体趋势为先上升后下降, 侵染 3 d 和 4 d 表达量极显著上升, 4 d 达到最高水平, 约为侵染初始的 16 倍。本研究结果初步表明, 木聚糖酶编码基因 *GpTR1774* 很可能参与橡胶树红根病病原菌的致病过程, 为橡胶树红根病的致病机理解析和绿色防控提供参考。

关键词: 热研 73397; 红根病病原菌; *GpTR1774* 基因; 侵染过程; qRT-PCR

中图分类号: S763.7 文献标识码: A

Cloning and Expression Analysis of Xylanase *GpTR1774* Gene from *Ganoderma pseudoferreum*

FU Xue^{1,2}, TU Min^{2*}, CAI Haibin^{1,2}, ZHANG Hongji¹, YU Decai^{1*}, ZENG Xia²

1. Plant Protection College, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201, China; 2. Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China

Abstract: Cell wall degrading enzymes are important pathogenic factors of many pathogenic fungi, among which xylanase, as the most important hemicellulase, plays an important role in the process of host cell wall degrading by filamentous fungi to achieve host infection. In this study, RT-PCR was used to clone the coding region of xylanase *GpTR1774* gene of *Ganoderma pseudoferreum* strain HD3 and analyze its bioinformatics. The root of *Hevea* tissue cultured seedlings Reyan 73397 were infected with HD3, meanwhile infection and destruction process of root cells were observed by electron microscopy. The gene expression of *GpTR1774* was determined by qRT-PCR. The results showed that the total length of *GpTR1774* cDNA was 780 bp, encoding 259 amino acids, among which the most abundant amino acid was alanine (Ala), accounting for 15.1%. The molecular weight of *GpTR1774* protein was 28.12 kDa, fat coefficient was 81.93, and the isoelectric point was 9.07. It was a hydrophilic protein with 15 phosphorylation sites, no signal and peptide transmembrane domain, and was located in the cell solute. The main components of the secondary structure α -helix and random curling are the main components of the secondary structure of *GpTR1774* protein, accounting for

收稿日期 2023-04-13; 修回日期 2023-04-19

基金项目 海南省重点研发计划项目 (No. ZDYF2021XDNY291); 海南省优秀团队项目 (No. 20210203)。

作者简介 伏雪 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 病原真菌致病机理。*通信作者 (Corresponding author): 于德才 (YU Decai), E-mail: 459025316@qq.com; 涂敏 (TU Min), E-mail: tm_tumin@163.com。

38.10% and 41.31% of the amino acid sequence, respectively. Phylogenetic analysis showed that *GpTR1774* gene had the highest similarity with xylanase gene of *Ganoderma boninense*, reaching 87.5%. qRT-PCR showed that the overall gene expression trend of xylanase *GpTR1774* was firstly increased and then decreased. The expression level of *GpTR1774* increased significantly on the 3rd and 4th day after infection, and reached the highest level on the 4th day, about 16 times of the initial level. The results of this study indicate that the xylanase *GpTR1774* gene was likely to be involved in the pathogenesis of *G. pseudoferreum*, providing reference for the pathogenesis analysis and green prevention and control of *G. pseudoferreum*.

Keywords: *Hevea brasiliensis* Reyan 73397; *Ganoderma pseudoferreum* (Wakef) v. Over. et Steinm; *GpTR1774*; infection process; qRT-PCR

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.12.011

橡胶树 (*Hevea brasiliensis*) 生产的天然橡胶是重要工业原料和战略物质, 世界范围内共有 8 种根病为害, 其中红根病是我国植胶区发病面积最广、严重度最高的土传病害, 发病严重的林段发病率可达 40%, 给我国橡胶产业带来巨大损失^[1-2]。其病原菌为 *Ganoderma pseudoferreum* (Wakef) v. Over. et Steinm, 属担子菌, 层菌纲, 灵芝属^[3-4], 是一类木腐真菌。木腐真菌主要借助菌丝或菌丝体蔓延, 菌丝端头能分泌半纤维素降解酶类、纤维素降解酶类、木质素降解酶类等, 分解细胞壁组织中的半纤维素、纤维素和木质素等, 使长链大分子断裂, 损害植株组织结构, 削弱寄主生活力^[5-7]。

植物细胞壁是病菌与寄主互作的重要场所, 同时也是病原菌入侵、扩展的第一道防线^[8], 多种植物病原真菌的重要致病因子主要是细胞壁降解酶, 主要通过降解植物细胞壁以便病原菌侵入植物体内^[9]。木聚糖是半纤维素的主要组成成分, 也是自然界中含量及其丰富的多糖, 广泛存在于植物组织的细胞壁中^[10-13]。木聚糖酶是一类可降解木聚糖的酶系, 主要来源有放线菌、细菌和真菌, 它可以随机切断植物细胞壁木聚糖的 β -1,4 主链, 可将木聚糖降解为木糖或低聚木糖^[12, 14-15]。近些年, 对木聚糖酶基因的分子生物学的研究快速展开, 许多真菌木聚糖酶基因被克隆, 而研究最多的是木霉、青霉、黑曲霉和棒曲霉等。KINOSHITA 等^[16]从黑曲霉中克隆得到编码木聚糖酶 B 的基因 *xynNB*, 并在白曲霉中成功表达。AHMED 等^[17]综述了真菌来源木聚糖酶的分子克隆。BAGEWADI 等^[18]从桔青霉 HZN13 菌株中克隆得到 *Xyl-Iib* 基因。周彩霞等^[8]从梳棉状嗜热真菌克隆了 2 种木聚糖酶基因, 分别是 *xyn11A* 和 *xyl43*。XIE 等^[19]从镰刀菌 Q7-31 中克隆得到对水稻细胞壁具有强降解能力的木聚糖酶基因 *Xyn8*。JIANG

等^[20]和杨行等^[21]在土壤中分离鉴定得到 1 株具有高木质纤维素分解能力的嗜热丝状真菌毛壳霉 CQ31, 从中克隆得到对阿拉伯木聚糖具有较高酶活的 GH11 家族木聚糖酶基因 *CsXyn11B*。

随着研究的不断深入, 细胞壁降解酶基因的功能及致病机理被逐渐认识, 但细胞壁降解酶基因在橡胶树红根病病原菌中研究却未见报道, 相关基因的克隆、表达分析等均需进行研究。本研究克隆得到 1 个橡胶树红根病病原菌的木聚糖酶编码基因 *GpTR1774*, 通过分析其生物信息学 and 不同侵染时间基因表达变化, 确定细胞壁降解酶是否为橡胶树红根病病原菌主要的致病生化因子, 为橡胶树红根病的防控和抗红根病育种奠定理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

橡胶树红根病病原菌菌株 HD3 由本课题组分离鉴定和保存, 分离自中国热带农业科学院试验场三队感染红根病的橡胶树病根。接种材料为巴西橡胶树无性系热研 73397 组培苗, 由中国热带农业科学院橡胶研究所组培与转基因育种课题组提供, 苗高 10~13 cm, 根健壮, 具一蓬叶。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取和反转录 参照林仕凯等^[22]的方法将橡胶树红根病病原菌 HD3 接种后的 0、3、4、5、6、7、8、9、10 d 菌丝进行收集, 使用 TIANGEN 多糖多酚植物总 RNA 试剂盒提取总 RNA, 裂解液使用 HL, 利用北京全式金生物技术有限公 司反转录试剂盒获得 cDNA。

1.2.2 木聚糖酶编码基因 *GpTR1774* 基因克隆 通过本实验室建立的橡胶树红根病病原菌转录组数据库, 筛选获得木聚糖酶编码基因序列。采用 Primer Premier 5.0 软件对橡胶树红根病病原菌木

聚糖酶编码 *GpTRI774* 设计相关引物 (表 1), 参照柯萍萍^[23]的方法选用 18S rRNA 为内参基因。以橡胶树红根病原菌的 cDNA 为模板, 利用

PCR 扩增木聚糖酶编码基因 *GpTRI774* 的全长序列, 对 PCR 产物目的条带进行切胶回收, 送往海口楠山基因生物技术有限公司测序。

表 1 本研究引物序列
Tab. 1 Primers sequence in the study

引物名称 Primer name	上游引物 (5'-3') Forward primer (5'-3')	下游引物 (5'-3') Reverse primer (5'-3')
GPTR1774	ATGTCTGCCAGACCTCTTAATTG	TCACCCTTCTCGTGAGCGGGAC
GPTR1774-RT	TCCCGGACTACTCTACAA	CGTGAAGATGAGCGTGCC
18S rRNA	ACGAAGGTTAGGGATCGAAA	CGAGCGACACATAAGATTGAGG

1.2.3 木聚糖酶编码基因 *GpTRI774* 生物信息学及进化分析 使用表 2 中的 7 类软件进行木聚糖酶编码基因 *GpTRI774* 的生物信息学和进化分析。

1.2.4 橡胶树红根病原菌侵染根部观察 参考

涂敏等^[24]的方法, 将红根病原菌接种至橡胶树组培苗根部, 每个处理 3 个重复。分别在接种后的 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 d 观察、拍照。

表 2 橡胶树红根病原菌基因结构在线分析预测软件
Tab. 2 Online analysis and prediction software of rubber tree gene structure

软件 Software	功能 Function	网址 Website address
ORF Finder	蛋白序列预测	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/
ProtParam	蛋白质理化性质预测	https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam
Conserved Domains	保守结构域预测	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi
TMHMM Server v.2.0	跨膜区预测	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/
Signal P-5.0 Server	信号肽预测	http://www.cbs.dtu.dk/services/Signal P/
PSORT Prediction	亚细胞定位预测	http://psort1.hgc.jp/form.html
NetPhos-3.1	磷酸化位点预测	https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetPhos-3.1

1.2.5 木聚糖酶 *GpTRI774* 基因表达分析 刮取侵染 3~10 d 橡胶树组培苗根部菌丝体, 参照 1.2.1 和 1.2.2 的方法, 提取不同侵染时间的红根病原菌的总 RNA, 选用橡胶树红根病原菌 18S rRNA 基因为内参 (表 1)。采用 qRT-PCR 方法检测木聚糖酶编码基因 *GpTRI774* 基因相对表达量, 反应体系和程序参考孙茜茜等^[25]的方法。

1.3 数据处理

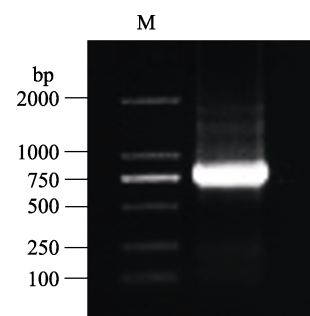
通过 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算木聚糖酶编码基因 *GpTRI774* 相对表达量, 使用 Excel 软件制图。

2 结果与分析

2.1 木聚糖酶编码基因 *GpTRI774* 的克隆分析

测序结果和凝胶电泳显示, PCR 克隆得到木聚糖酶编码基因 *GpTRI774* 序列长度为 780 bp (图 1), 编码 259 个氨基酸 (图 2), 丙氨酸 (Ala) 的含量最丰富, 占氨基酸总数的 15.1%, 木聚糖酶 *GpTRI774* 蛋白分子式 $C_{1259}H_{1956}N_{360}O_{372}S_1$, 推导的氨基酸分子量为 28.12 kDa, 等电点为 9.07, 不稳定系数为 27.73, 脂肪系数为 81.93,

正电荷残基数为 31, 负电荷残基数为 28, 总平均亲水性 -0.2000, 木聚糖酶 *GpTRI774* 蛋白为亲水性蛋白。



M: DL2000 DNA marker.

图 1 木聚糖酶 *GpTRI774* 基因 PCR 扩增产物
Fig. 1 PCR amplification of xylanase *GpTRI774*

2.2 木聚糖酶编码基因 *GpTRI774* 生物信息学分析

2.2.1 信号肽、亚细胞定位、跨膜区及磷酸化位点预测 利用生信软件分析工具预测木聚糖酶 *GpTRI774* 蛋白存在信号肽的概率为 0.0146 (图 3A), 没有跨膜结构域, 位于细胞溶质中 (图 3B)。

```

1      ATGTCGCCAGACCTCTTAATGTGCGGGCATTGGCAACGGGTCCGGCACCGGAGCA
1      M S A R P L L I V A G I G N G S G T G A
61     GCGACTCTCGCCTCTCGCAAGAAGGGTACCACCGTTCGCGCTGTCGGCGCAATGCT
21     A T A R L F A K K G Y R V A L V A R N A
121    GAACATCTCAACGGTTTGGCGGCGAATCAATAAAGAAGGCGGCGAGCGCGCCTTC
41     E H L N R F A G E I N K E G G E A A A F
181    CCGTCCCGACTACTCTCAACGGACGCTCTCCATCTTCGACACCATCTTCGGGCAC
61     P V P D Y S Y N A T L S I F D T I F A H
241    AAGTGGCCACAGAGGGCGCTCGGAGTTCCGCGTGGGGTGTGAACACCGCTCGGGC
81     K W A T E G P S E F R V G V W N T A A G
301    GTGTTCAAAGGCTTCTCGACTGACCGAGGAGGACATCAGAACTCGCTGCAGGTGAAC
101    V F K G F L D V T E E D I T N S L Q V N
361    GTGAACGCGCCTTCGCTTCGCGCCGTCGCTCAAGTTCAGGAGAATCGCCTC
121    V N A A F A F S R R A V L K F R E N A L
421    GAGAGCGGGGAAGCGGGACGCTCATCTCACGGGCGGACGGCTGATCCGCGGC
141    D E R G K R G T L I F T G A T A A I R G
481    AACGTCCTCAGAGCGGTTTCGCGCGGGCAAGTTTGGACCGCGCGCTGAGCCAGAT
161    N V L T S A F A A G K F G T R A L S Q S
541    CTCGCAAGAGTTTCGGAAGAGAATCCACGTCGCGATGCGATCAGCAGGTAGT
181    L A K E F G K E N I H V A H A I I D G S
601    ATCTTACTGGCCAGGACTCGCACGCGCTCTGGGAGGACCGGAGAGTACCAGAAC
201    I F T G Q G L A R R S G E D A E K Y Q N
661    AACCTGCACCCGGTTGGATGCGCGCAGATCGCAAGAGCTACCTCTACCTGGTGGAG
221    N L D T R L D A G S I A K S Y L Y L V E
721    CAAGACCGGTCTCGTGACATGGAGTTGGATCTCCGTCGCGCTCAGGAGAAGTGGTGA
241    Q D R S A W T W E L D L R P A H E K W *

```

图 2 木聚糖酶编码 *GpTR1774* 基因 CDS 区核苷酸序列及其编码的氨基酸序列

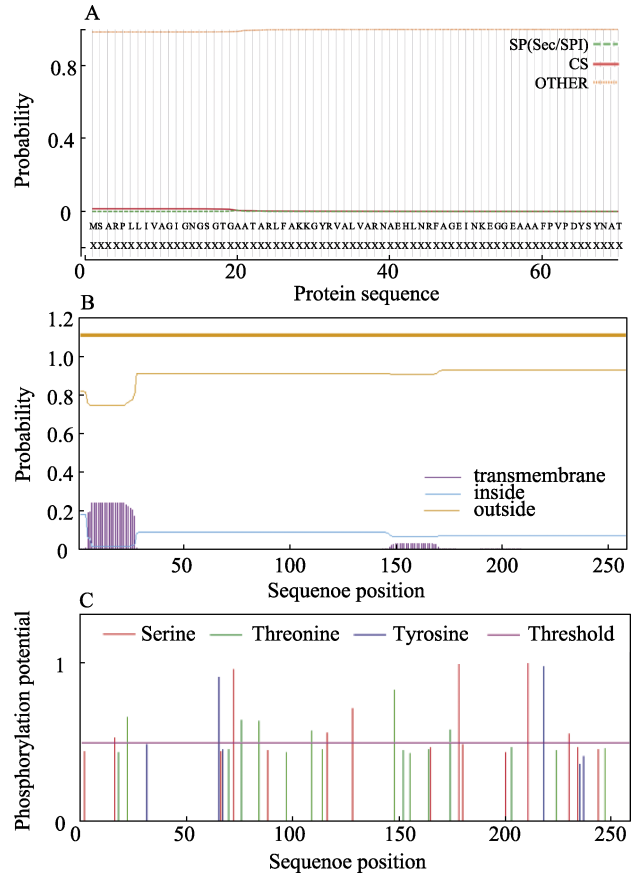
Fig. 2 Nucleotide sequence and amino acid sequence of xylanase *GpTR1774* CDS region

磷酸化位点分析发现木聚糖酶 *GpTR1774* 肽链中可能发生磷酸化, 含有 6 个苏氨酸磷酸化位点, 7 个丝氨酸磷酸化位点和 2 个酪氨酸磷酸化位点 (图 3C)。

2.2.2 木聚糖酶 *GpTR1774* 蛋白保守结构域及二、三级结构预测 生物信息学分析表明木聚糖酶 *GpTR1774* 在 8~259 氨基酸之间存在 1 个 NADB 保守结构域 (图 4A)。在木聚糖酶 *GpTR1774* 蛋白的二级结构中, α -螺旋占 38.10%, β -折叠占 15.44%, β -转角占 4.63%, 无规则卷曲占 41.31% (图 4B)。由此可以看出, 在 *GpTR1774* 蛋白二级结构中, 无规则卷曲和 α -螺旋所占比重较多, β -转角占比较少, α -螺旋和无规则卷曲是木聚糖酶 *GpTR1774* 蛋白二级结构的主要元件。其三级结构与二级结构预测结果相符合 (图 4C)。

2.3 木聚糖酶 *GpTR1774* 蛋白的同源性比对及系统进化分析

通过对木聚糖酶 *GpTR1774* 进行氨基酸序列同源比对, 发现木聚糖酶 *GpTR1774* 氨基酸序列与灵芝属参考序列的蛋白序列 (LR_28215.1) 相似度较高 (图 5)。通过构建的系统发育进化树, 可知橡胶树红根病病原菌木聚糖酶 *GpTR1774* 与引起油棕茎基腐病的狭长孢灵芝木聚糖酶亲缘关系最近, 相似度达 87.5%; 与茄根菌木聚糖酶的亲缘关系最远, 相似度为 11.2% (图 6)。



A: 木聚糖酶 *GpTR1774* 蛋白信号肽预测; B: 木聚糖酶 *GpTR1774* 蛋白跨膜结构域预测; C: 木聚糖酶 *GpTR1774* 蛋白编码磷酸化位点预测。
A: Signal peptide prediction of xylanase *GpTR1774* protein;
B: Transmembrane prediction of xylanase *GpTR1774* protein;
C: Phosphorylation site prediction of xylanase *GpTR1774* protein.

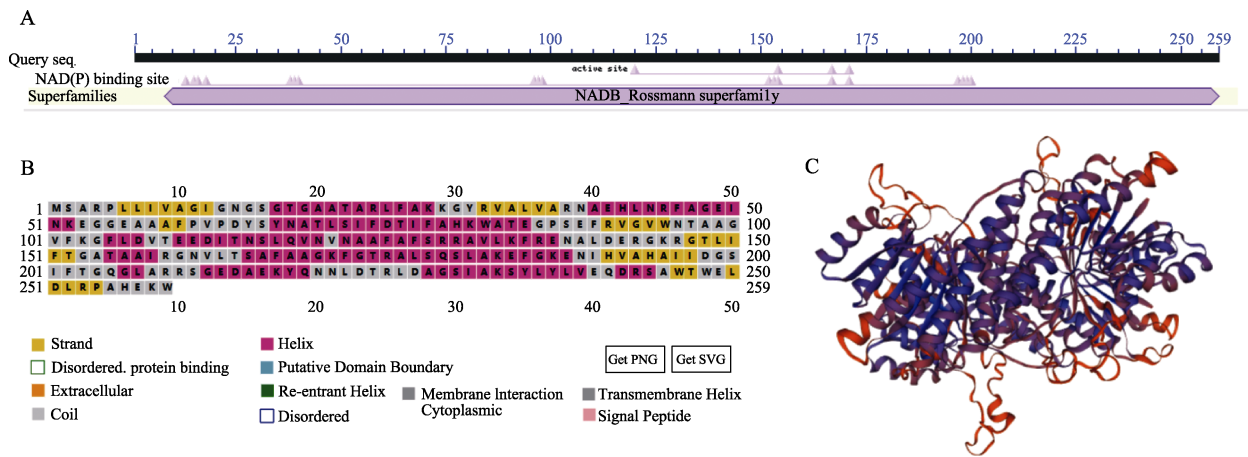
图 3 木聚糖酶 *GpTR1774* 蛋白质的信号肽、跨膜结构域和磷酸化位点预测

Fig. 3 Signal peptide, transmembrane domain and phosphorylation site prediction of xylanase *GpTR1774* protein

2.4 木聚糖酶编码基因 *GpTR1774* 基因表达分析

2.4.1 红根病病原菌侵染橡胶树组培苗根部 将 HD3 菌株接种至橡胶树组培苗根部后, 第 1 天和第 2 天肉眼无法观察到菌丝体在根部的侵染, 至第 3 天可见菌丝体侵染至根表面 (图 7), 随着侵染天数的增加, 菌丝体逐渐迅速向上蔓延至整个根部 (侵染 10 d), 菌丝平均侵染速度为 2.1 mm/d。

2.4.2 橡胶树红根病病原菌木聚糖酶编码基因 *GpTR1774* 基因表达分析 采用 qRT-PCR 分析红根病病原菌侵染橡胶树组培苗材料后木聚糖酶编码基因 *GpTR1774* 相对表达量的变化。结果显示, 木聚糖酶编码基因 *GpTR1774* 表达量整体趋势为先上升后下降, 侵染第 3 天和 4 天表达量极显著上升, 在第 4 天达到最高水平, 为 5.62, 约为侵染初始 (0 d) 表达量的 16 倍 (图 8)。



A: 木聚糖酶 GpTR1774 蛋白保守结构域预测; B: 木聚糖酶 GpTR1774 蛋白二级结构预测;
C: 木聚糖酶 GpTR1774 蛋白三级结构预测。

A: Prediction of Conserved domain of xylanase GpTR1774 protein; B: Secondary structures prediction of xylanase GpTR1774 protein; C: Tertiary structures predicting of xylanase GpTR1774 protein.

图 4 木聚糖酶 GpTR1774 蛋白结构预测分析
Fig. 4 Structural analysis of GpTR1774 protein

GpTR1774	MSARPLLIVAGI	GNCSGTGAATARLFA	27	
LR728215.1	MSARPLLIVAGI	GNCSGTGAATARLFA	27	
LR724418.1	MSARPLLIVAGI	GNCSGTGAATARLFA	27	
Consensus	msarp1livagignsgtgaatarlfa			
GpTR1774	KKGYRVALVARNA	HLNRFAGEINKEGGDAAFFVVP	63	
LR728215.1	KKGYRVALVARNA	HLNRFAGEINKEGGDAAFFVVP	63	
LR724418.1	KKGYRVALVARNA	HLNRFAGEINKEGGDAAFFVVP	56	
Consensus	kkgyrvalvarna hlnrf ge n egge			
GpTR1774	..DYSYNATLSIFDTIFAHKWATEG	PSDFRVG	95	
LR728215.1	..DYSYKSTLSVFDTFIAHKWATEG	PSDFRVG	95	
LR724418.1	..DYSYKSTLSVFDTFIAHKWATEG	PSDFRVG	56	
Consensus	..dysynatlsifdtifahkwateg	psdfrvg		
GpTR1774	NTAAGVFKGFLDVTEEDITNSLQVNV	NAAFASRRVAVLKE	135	
LR728215.1	NAGSGVFKGFLDVTEEDITNSLQVNV	IAAFASRRVILKE	135	
LR724418.1	NTAAGVFKGFLDVTEEDITNSLQVNV	IAAFASRRVAVLKE	56	
Consensus	ntaagvfkfgfldvteeditnslqvnv	naafasrrvavлке		
GpTR1774	RENALDERG	..KRGLIFTGAT	..AAIRGNVLTSA	166
LR728215.1	KENALDERG	..KRGLIFTGAT	..AALRGNVTWISG	166
LR724418.1	RENALDERG	..KRGLIFTGAT	..AAIRGNVLTSA	56
Consensus	renalderg	..krgliftgat	..aairgnvltsa	
GpTR1774	FAAGKFGTRALSQSLAKEFGK	ENIHVAH	..AIIDGSIFT	203
LR728215.1	FAPGKFCVTRALSQSLAKEFGK	ENIHVAH	..SIIDGSIFT	203
LR724418.1	FAAGKFGTRALSQSLAKEFGK	ENIHVAH	..AIIDGSIFT	56
Consensus	faagkfgtralsqslakefgk	enihvah	..aiidgsift	
GpTR1774	QOGLARRSGEDAKEYQNNDL	TRLDAGSIAKSYLYLVEQDR	243	
LR728215.1	QOGLARRSGEDAKEYQNNDL	TRLDANSIAK	233	
LR724418.1	QOGLARRSGEDAKEYQNNDL	TRLDANSIAK	56	
Consensus	qoglarrrsgedakeyqnndltrld	agsiak		
GpTR1774	SA		245	
LR728215.1	..		233	
LR724418.1	..		56	
Consensus	sa			

图 5 木聚糖酶 GpTR1774 蛋白与其他真菌中木聚糖酶蛋白多序列比对

Fig. 5 Alignment of amino sequence xylanase GpTR1774 and xylanase protein from other fungal species

3 讨论

红根病是我国橡胶树生产中最重要土传病害，而橡胶红根病病原菌致病机理包括病原菌在根部的侵染进程、侵染中的关键基因等报道甚少。

在本实验室前期研究的基础上，通过利用橡胶树组培苗进行试管内无菌接种，可以观察病原菌的侵染进程。孙明明等^[26]研究大豆菌核病菌丝侵染过程，发现接种大豆菌核病的叶片及茎秆在取样过程中需要有一定的发病区域，通过取样观察，选择在接种后 3 d 发病区域内可以满足取样操作。本研究接种后观察发现，接种 3 d 后可肉眼观察到少量菌丝体蔓延至橡胶树根部，透射电镜结果显示 3 d 后根部表皮最外层细胞被破坏，多数表皮细胞中可见菌丝体。直接观察和透射电镜结果可知，第 3 天是红根病病原菌穿透表层细胞壁，侵染橡胶树根部的关键时间点。

真菌细胞壁降解酶基因与真菌的致病性密切相关，本研究从橡胶树红根病病原菌中克隆到一个木聚糖酶编码基因 *GpTR1774*，预测主要定位于细胞溶质中且无跨膜结构域。孙茜茜等^[25]通过 qRT-PCR 检测发现，*GPFT1* 蛋白编码基因分别在橡胶红根病病原菌受己唑醇和青蒿琥酯胁迫处理 0、2、6、12、24、72 h，在处理 6 h 表达量最高，表明 *GPFT1* 蛋白编码基因早期上调显著。孙佳宁等^[27]发现木葡聚糖酶编码基因 *CvXEG1* 在葡萄白腐病病原菌侵染早期大量表达。LU 等^[28]分析了木聚糖酶编码基因 *RcXYN1-RcXYN9* 基因在侵染过程中接种后 18、36、72、96、240 h 的表达，接种稻瘟病菌后，*RcXYN6* 和 *RcXYN7* 的转录水平在 72、96、240 h 时上调，在 240 h 时显著上调。LAI 等^[29]和 GARCÍA 等^[30]从其他真菌病原

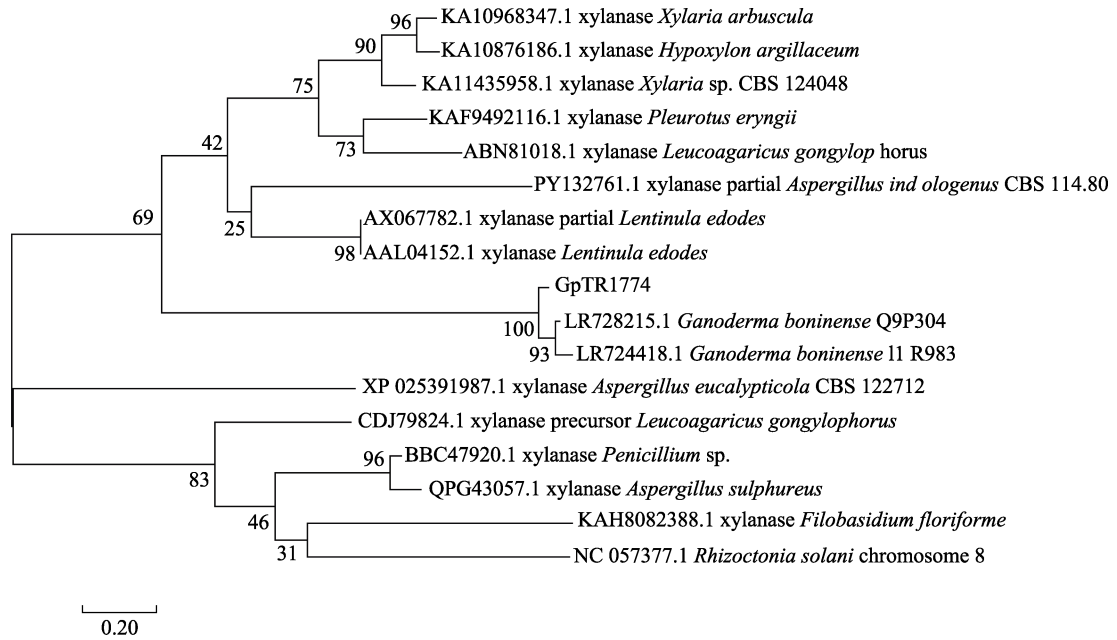


图 6 不同真菌木聚糖酶氨基酸序列的系统进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree on xylanase amino acid sequences of different fungi

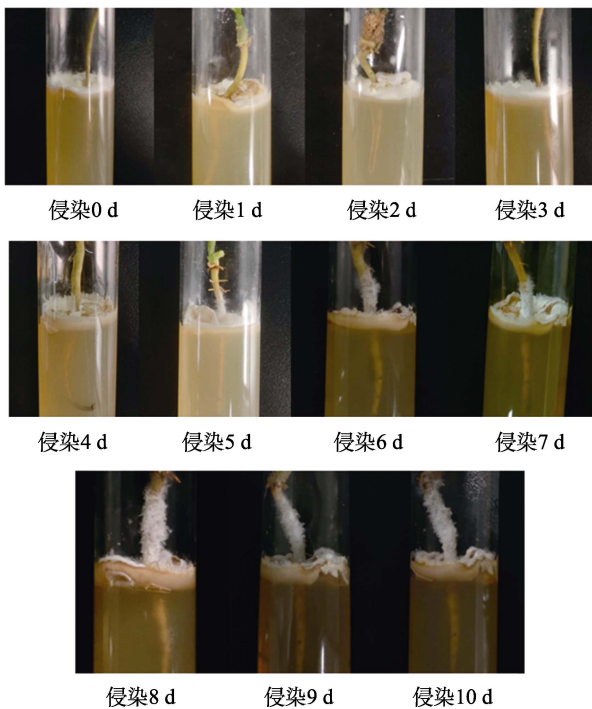
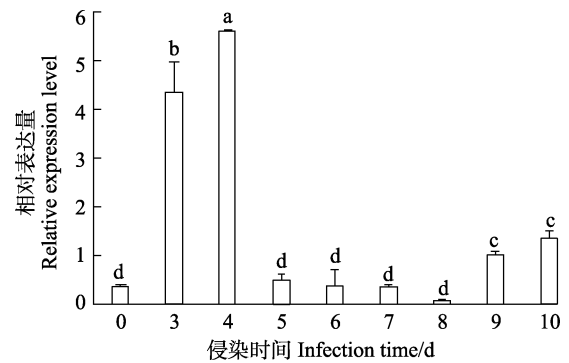


图 7 红根病病原菌感染橡胶树根部试管图

Fig. 7 Tube images of *G. pseudoferreum* infecting roots of *H. brasiliensis*

体中也观察到一些木聚糖酶基因的早期表达。本研究发现木聚糖酶编码基因 *GpTRI774* 在橡胶树红根病病原菌中表达，但表达量存在一定差异，早期大量表达，随着侵染时间的增加，该基因表达水平先上升后下降，在侵染第 3 天和第 4 天基因表达量剧增，可以推测在第 3 天和第 4 天，红



不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

图 8 橡胶树红根病病原菌木聚糖酶 *GpTRI774* 基因在不同侵染时间的表达模式分析

Fig. 8 Expression pattern analysis of xylanase *GpTRI774* gene from *G. pseudoferreum* under different infection time

根病病原菌分泌较多木聚糖酶，促进了根部细胞壁中半纤维素的降解。在后续研究中，可通过构建木聚糖酶 *GpTRI774* 基因的基因敲除突变体，进一步研究木聚糖酶 *GpTRI774* 基因在橡胶树红根病病原菌致病过程中的功能，为橡胶树红根病病原菌的致病机理解析奠定基础。

参考文献

[1] 张贺, 蒲金基, 张欣, 谢艺贤, 漆艳香. 橡胶树红根病病原菌生物学培养特性[J]. 热带作物学报, 2008, 29(5): 632-635.

- ZHANG H, PU J J, ZHANG X, XIE Y X, QI Y X. Biological characteristics of the pathogenic fungus of red root disease of hevea rubber tree[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2008, 29(5): 632-635. (in Chinese)
- [2] 张运强, 张辉强, 邓晓东. 橡胶树红根病原菌的鉴定[J]. 热带作物学报, 1997(1): 16-23.
ZHANG Y Q, ZHANG H Q, DENG X D. Identification of pathogenic fungi of rubber red root disease[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 1997(1): 16-23. (in Chinese)
- [3] NANDRIS D, NICOLE M, GEIGER J P. Root rot diseases[J]. Plant Disease, 1987, 71(4): 298-306.
- [4] 丁婧钰. 橡胶树与相思树病原灵芝种类鉴定及生物学特性研究[D]. 海口: 海南大学, 2018.
DING J Y. Type identification of pathogenic ganoderma and biological characteristics of the rubber tree and *Acacia* spp.[D]. Haikou: Hainan University, 2018. (in Chinese)
- [5] WAN C, LI Y. Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass[J]. Biotechnology Advances, 2012, 30(6): 1447-1457.
- [6] RABEMANOLONTSOA H, SAKA S. Various pretreatments of lignocellulosics[J]. Bioresource Technology, 2016, 199: 83-91.
- [7] CHEN H, LIU J, CHANG X, CHANG X, CHEN D, XUE Y, LIU P, LIN H, HAN S. A review on the pretreatment of lignocellulose for high-value chemicals[J]. Fuel Processing Technology, 2017, 160: 196-206.
- [8] 周彩霞, 赵治巧, 唐宇佳, 金伟琼, 肖义蓉, 王寅生, 李蕴哲, 唐自钟, 陈惠. 产木聚糖嗜热真菌鉴定、酶基因克隆及生物信息学分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2021, 40(1): 197-203.
ZHOU C X, ZHAO Z Q, TANG Y J, JIN W Q, XIAO Y R, WANG Y S, LI Y Z, TANG Z Z, CHEN H. Identification of xylanase-producing thermophilic fungi, cloning of enzyme gene and bioinformatics analysis[J]. Genomics and Applied Biology, 2021, 40(1): 197-203. (in Chinese)
- [9] 王鹏程, 郝海婷, 王兰, 凌新慧. 枣黑斑病菌细胞壁降解酶活性测定及致病性分析[J]. 果树学报, 2019, 36(7): 903-910.
WANG P C, HAO H T, WANG L, LING X H. Analysis of cell wall degrading enzymes from black spot pathogen and its pathogenicity[J]. Journal of Fruit Science, 2019, 36(7): 903-910. (in Chinese)
- [10] 杨毅. 产黄青霉半纤维素酶促进木质纤维素降解的机制研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2019.
YANG Y. Mechanism of enhancing lignocellulose hydrolysis by hemicellulases from *Penicillium chrysogenum*[D]. Beijing: China Agricultural University, 2019. (in Chinese)
- [11] LIMAYEM A, RICKE S C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: current perspectives, potential issues and future prospects[J]. Progress in Energy and Combustion Science, 2012, 38(4): 449-467.
- [12] 高雅君, 丁长河. 木聚糖酶在食品工业中的应用研究进展[J]. 粮食与食品工业, 2017, 24(2): 32-36.
GAO Y J, DING C H. Research progress on the application of xylanase in food industry[J]. Cereal and Food Industry, 2017, 24(2): 32-36. (in Chinese)
- [13] BEG Q, KAPOOR M, MAHAJAN L, HOONDAL G S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001, 56: 326-338.
- [14] 谢占玲. 植物细胞壁降解真菌及酶的研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2011.
XIE Z L. The study on plant cell wall degrading fungi and their enzyme[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2011. (in Chinese)
- [15] COLLINS T, GERDAY C, FELLER G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases[J]. FEMS microbiology reviews, 2005, 29(1): 3-23.
- [16] KINOSHITA K, TAKANO M, KOSEKI T, IWANO K. Cloning of the *xynNB* gene encoding xylanase B from *Aspergillus niger* and its expression in *Aspergillus kawachii*[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1995, 79(5): 422-428.
- [17] AHMED S, RIAZ S, JAMIL A. Molecular cloning of fungal xylanases: an overview[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 84: 19-35.
- [18] BAGEWADI Z K, MULLA S I, NINNEKAR H Z. Purification, characterization, gene cloning and expression of *GH-10* xylanase (*Penicillium citrinum* isolate HZN13)[J]. 3 Biotech, 2016, 6(2): 1-9.
- [19] XIE Z L, GAO H Y, ZHANG Q, LIU Y. Cloning of a novel xylanase gene from a newly isolated *Fusarium* sp. Q7-31 and its expression in *Escherichia coli*[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2012, 43: 405-417.
- [20] JIANG Z, CONG Q, YAN Q, KUMAR N, DU X. Characterisation of a thermostable xylanase from *Chaetomium* sp. and its application in Chinese steamed bread[J]. Food Chemistry, 2010, 120(2): 457-462.
- [21] 杨行, 马俊文, 李延啸, 江正强, 刘学强, 闫巧娟. 毛壳霉木聚糖酶 B(*CsXyn11B*)的分泌表达及其在面包中的应用[J]. 食品工业科技, 2023, 44(4): 108-113.
YANG X, MA J W, LI Y X, JIANG Z Q, LIU X Q, YAN Q J. Secretion and expression of mucor xylanase B (*CsXyn11B*) and its application in bread[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(4): 108-113. (in Chinese)
- [22] 林仕凯, 涂敏, 鲁红学, 王晓芳, 蔡海滨, 胡彦师, 孙爱花, 程汉. 巴西橡胶树红根病原菌液体培养条件优化研究[J].

- 热带农业科学, 2014, 34(10): 71-74.
- LIN S K, TU M, LU H X, WANG X F, CAI H B, HU Y S, SUN A H, CHENG H. Optimization of *ganoderma pseudoferreum* liquid culture condition[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2014, 34(10): 71-74. (in Chinese)
- [23] 柯萍萍. 松杉灵芝漆酶基因的克隆及其 qRT-PCR 分析[D]. 福州: 福建农林大学, 2012.
- KE P P. Cloning and qRT-PCR analysis of a laccase gene from *Ganoderma tsugae*[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2012. (in Chinese)
- [24] 涂敏, 蔡海滨, 胡彦师, 程汉, 孙爱花, 黄华孙. 一种橡胶树红根病接种方法: ZL201511016106.1[P]. 2019-04-02.
- TU M, CAI H B, HU Y S, CHENG H, SUN A H, HUANG H S. A method for inoculation of red root disease of rubber tree: ZL201511016106.1[P]. 2019-04-02. (in Chinese)
- [25] 孙茜茜, 何其光, 靳鹏飞, 吴迪, 张骅, 缪卫国, 刘文波, 邬国良. 橡胶树红根病菌 *GPFTR1* 基因的克隆、亚细胞定位与表达分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2019, 38(8): 3646-3653.
- SUN Q Q, HE Q G, JIN P F, WU D, ZHANG S, MIAO W G, LIU W B, WU G L. Cloning, subcellular localization and expression analysis of *GPFTR1* gene from *Ganoderma pseudoferreum*[J]. Genomics and Applied Biology, 2019, 38(8): 3646-3653. (in Chinese)
- [26] 孙明明, 吕世翔, 李智媛, 王萍, 王冠, 赵雪, 韩英鹏, 李文滨. 大豆菌核病菌丝侵染茎叶过程扫描电镜观察研究[J]. 大豆科学, 2020, 39(1): 123-129.
- SUN M M, LYU S X, LI ZH Y, WANC P, WANC G, ZHAO X, ZHAO X, HAN Y P, LI W B. Study of scanning electron microscopic observation on the mycelium infection process of soybean sclerotinia sclerotirum on leaf and stem[J]. Soybean Science, 2020, 39(1): 123-129. (in Chinese)
- [27] 孙佳宁, 秦嘉星, 王倩楠, 李保华, 周善跃. 木葡聚糖酶基因 *CvXEG1* 在葡萄白腐病菌致病中的功能解析[C]//中国植物病理学会. 植物病理科技创新与绿色防控——中国植物病理学会 2021 年学术年会论文集.
- SUN J L, QIN J X, WANG Q N, LI B H, ZHOU S Y. Functional analysis of xyloglucanase gene *CvXEG1* in the pathogenesis of grape white rot[C]//Chinese Society of Plant Pathology. Technological innovation of plant pathology and green prevention and control——Proceedings of the 2021 Annual Conference of the Chinese Society of Plant Pathology. (in Chinese)
- [28] LU L, LIU Y, ZHANG Z. Global characterization of *GH10* family xylanase genes in *Rhizoctonia cerealis* and functional analysis of xylanase *RcXYN1* during fungus infection in wheat[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(5): 1812.
- [29] LAI M W, LIOU R F. Two genes encoding *GH10* xylanases are essential for the virulence of the oomycete plant pathogen *Phytophthora parasitica*[J]. Current Genetics, 2018, 64: 931-943.
- [30] GARCÍA N, GONZÁLEZ M A, GONZÁLEZ C, BRITO N. Simultaneous silencing of xylanase genes in *Botrytis cinerea*[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 2174.