

柑橘绿霉病菌木聚糖酶基因(*PdXY2*)功能初步研究

由书妍¹, 刘红霞¹, 于瑞君¹, 郑丽君¹, 范诗言¹, 李红叶^{2*}

(1. 大连市农业科学研究院, 大连 116036; 2. 浙江大学生物技术研究所, 杭州 310058)

摘要 柑橘绿霉病菌(*Penicillium digitatum*)是引起柑橘储藏期腐烂最主要的病原之一,严重影响了柑橘产业发展。本试验克隆了柑橘绿霉病菌的木聚糖酶基因(*PdXY2*),对其表达进行研究,在柑橘发病过程中,*PdXY2*的表达显著升高,至48 h达到最高,其表达量为对照的4倍。为进一步明确*PdXY2*基因功能,构建了*PdXY2*基因缺失突变株($\Delta PdXY2$), $\Delta PdXY2$ 突变株的致病性与野生型相比没有明显差异。由此我们推断,在柑橘绿霉病菌侵染柑橘的过程中*PdXY2*有一定的作用,但是单一缺失木聚糖酶*PdXY2*基因不能影响其致病性。

关键词 柑橘绿霉病菌; 木聚糖酶; 基因表达; 基因突变

中图分类号: S 436.66 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2016.06.016

Preliminary study on the function of *PdXY2* in *Penicillium digitatum*

You Shuyan¹, Liu Hongxia¹, Yu Ruijun¹, Zheng Lijun¹, Fan Shiyan¹, Li Hongye²

(1. Dalian Academy of Agricultural Sciences, Dalian 116036, China;

2. Institute of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract *Penicillium digitatum* is one of the most important pathogen causing green mold disease which impedes the development of citrus industry. In this study, we cloned a xylanase gene *PdXY2* and characterized its functions via knock-out strategy. The expression of *PdXY2* was up-regulated during the primary stage of infection, and reached a peak at 48 h. However, *PdXY2*-disrupted mutant ($\Delta PdXY2$) showed no reduction in virulence. Taken together, our results demonstrated that *PdXY2* may play an important role in infection and single knock-out of *PdXY2* showed no reduction in virulence.

Key words *Penicillium digitatum*; Xylanase; gene expression; gene disruption

植物病原菌侵入寄主时必须先破坏寄主的细胞壁,这个过程主要有两方面作用:一方面破坏寄主的天然屏障,使病原物能侵入寄主,建立侵染关系;另一方面降解的产物能够为病原物提供营养物质。在细胞壁的降解过程中,细胞壁水解酶起到了重要的作用^[1-2]。已有研究表明细胞壁水解酶对致病性至关重要,如在黄曲霉(*Aspergillus flavus*)中,内切多聚半乳糖醛酸酶突变株对棉铃的致病性降低^[3];在灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)中,内切多聚半乳糖醛酸酶突变株对番茄的致病性降低^[4],果胶甲酯酶突变株对多种作物的致病性均有所下降^[5];在稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*)中,角质酶突变株对水稻和大麦的致病性下降^[6];在胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)中,果胶裂解酶突变株对

牛油果的致病性下降^[7-8];紫麦角菌(*Claviceps purpurea*)中,多聚半乳糖醛酸酶基因突变株对黑麦的致病性下降^[9]。因此,研究细胞壁水解酶对探索病原菌的致病性有重要意义。

柑橘是我国最主要的水果之一,而储藏期柑橘腐烂病对柑橘的经济效益造成了严重的影响,通常造成的损失达到20%~30%,而其中90%以上是由柑橘绿霉病菌(*P. digitatum*)引起的^[10-11]。在柑橘绿霉病菌中,内切多聚半乳糖醛酸酶对致病性有非常重要的作用^[12]。为明确柑橘绿霉病菌中其他水解酶的作用,本试验克隆柑橘绿霉病菌的木聚糖酶基因,并对其表达及功能进行分析,以阐明其在柑橘绿霉病菌致病过程中的作用,增加对柑橘绿霉病菌致病机制的了解。

收稿日期: 2015-12-24

修订日期: 2016-02-24

基金项目: 国家自然科学基金(31371961); 国家现代农业产业技术体系(CARS-27)

* 通信作者 E-mail:hyli@zju.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料

柑橘绿霉病菌野生型菌株 Pd01(CBS 130525)分离于浙江^[13],保存于本实验室;根癌农杆菌 AGL-1、大肠杆菌 DH5 α 保存于本实验室;质粒 pTFCM 含有 T-DNA 插入臂序列,其潮霉素基因由构巢曲霉强启动子 PtrpC 启动,由强终止子 TrpC 终止,保存于本实验室;Real-time RT-PCR 采用 7300 real-time PCR 系统;本试验使用到的引物见表 1,由上海桑尼公司合成。

表 1 试验中使用的引物
Table 1 Primers for this study

引物名称 Primer name	序列 Sequence (5' to 3')	酶切位点 Restriction site
PdXY2-F	GCACGGATTGAACTGAGCC	—
PdXY2-R	TGAAACATTCCTTCCGTGCC	—
PdXY2-qF	TAAGGGAACCGTGACCAGTG	—
PdXY2-qR	GGTAGTTGTGCGAGCCAAGA	—
XY2jd-F	GCCCATCTTCAGAGTTGCT	—
XY2jd-R	GGTTGTAGTCGCCATAGTTTT	—
PdXY2A	GGGGTACCGCACGGATTGAACTGAGCC	<i>Kpn</i> I
PdXY2B	CCGAGCTCTGTAGGAAGACATGCCACGAT	<i>Sac</i> I
PdXY2C	GACTAGTCTGGAATGCTTACCTCGCTGTC	<i>Spe</i> I
PdXY2D	CCGCTCGAGCGTGAAACATTCCTTCCGTGCC	<i>Xho</i> I
Actin-qF	TCCACTACTGCCGAGCGTGAAAT	—
Actin-qR	CCGCCAGACTCAAGACCAAGAAC	—

1.2 方法

1.2.1 柑橘绿霉病菌木聚糖酶 PdXY2 基因克隆

根据基因组信息设计扩增木聚糖酶基因的引物 PdXY2-F 和 PdXY2-R(表 1),以柑橘绿霉病菌野生型 Pd01 基因组 DNA 为模板扩增 PdXY2 基因的片段,PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,利用 AxyPrepTM DNA Gel Extration Kit (Axygen, 杭州)回收目的条带,将目的片段连接到克隆载体 pMD18-T(TaKaRa, 大连)上并送到 Invitrogen 公司进行测序。

1.2.2 柑橘绿霉病菌 PdXY2 在侵染过程中的表达分析

从市场上购买成熟温州蜜柑(*Citrus nobilis*),经 0.1% 次氯酸浸泡 5~10 min 后吹干待用;用无菌水洗脱 PDA 培养基上培养 7 d 的野生型菌株 Pd01 孢子,并将孢子稀释到 1.0 $\times$ 10⁶ 个/mL,取 3 μ L 孢子悬浮液接种于柑橘果实的伤口上(用针簇在果皮

上刺 1~2 mm 深的伤口),25 $^{\circ}$ C 保湿培养,分别在接种后间隔 12 h 提取发病组织的总 RNA(Xygen),并反转录成 cDNA(TaKaRa),使用 SYBR Premix Ex TaqTM 试剂盒(TaKaRa)进行 real-time RT-PCR,用 PdXY2-qF 与 PdXY2-qR 引物扩增木聚糖酶基因,以 γ -Actin 基因(GenBank 登录号:AB030227)作为内参,Actin-qF 和 Actin-qR 引物扩增内参基因,相对表达量的计算方法参考文献[14]。

1.2.3 柑橘绿霉病菌 PdXY2 突变体构建

采用同源重组原理构建 PdXY2 基因敲除质粒,基本过程如图 1:以柑橘绿霉病菌野生型菌株 Pd01 的基因组 DNA 为模板,用引物 PdXY2D(含 *Xho*I 酶切位点)和 PdXY2C(含 *Spe*I 酶切位点)扩增 PdXY2 基因 3'端侧翼 0.75 kb 的序列,产物用限制性内切酶 *Xho*I 和 *Spe*I 消化后连接到质粒 pTF-CM 的 *hph* 的 3'端;用引物 PdXY2B(含 *Sac*I 酶切位点)和 PdXY2A(含 *Kpn*I 酶切位点)扩增 PdXY2 基因 5'端侧翼 0.82 kb 的序列,产物用限制性内切酶 *Sac*I 和 *Kpn*I 消化回收后连接到质粒 pTFCM 中 *hph* 基因的 5'端。PCR 鉴定选择成功连接的单菌体,碱法小量抽提质粒,得到新的质粒 pTFCM-XY2,将质粒电击到农杆菌 AGL-1 中。

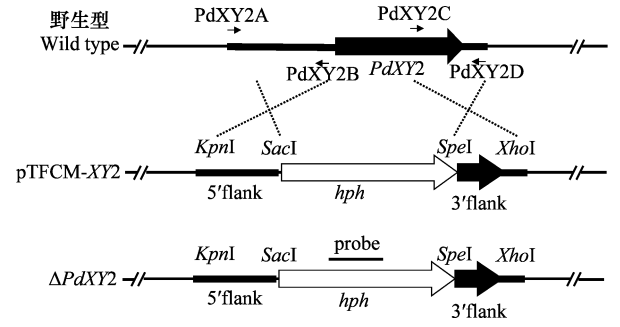


图 1 PdXY2 功能缺失突变株的构建
Fig. 1 Construction of PdXY2 knock-out mutant

1.2.4 柑橘绿霉病菌转化及转化子的分析

农杆菌转化的方法参考文献[15]。挑取含有潮霉素抗性的单菌落转入含有潮霉素的 PDB 培养基中,28 $^{\circ}$ C 培养 5 d 后取部分菌丝提取基因组 DNA,用引物 PdXY2jd-F 和 PdXY2jd-R 进行 PCR 鉴定。利用 Southern 杂交分析 PdXY2 基因缺失突变株中外源插入潮霉素抗性基因的拷贝数,其步骤是用限制性内切酶 *Hind*III 消化野生型 Pd01 和 Δ PdXY2 的基因组 DNA 10 μ g,在 37 $^{\circ}$ C 的水浴条件下酶切

24 h,将经过酶切处理后的基因组 DNA 在 1%琼脂糖凝胶中电泳 12 h(电压 20 V),将电泳后的基因组 DNA 经毛细管法转移到尼龙膜(Millipore)上,再以地高辛标记的潮霉素基因片段为探针,用 DIG High Primer DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche)试剂盒进行杂交,具体的操作方法详见使用说明书。

1.2.5 $\Delta PdXY2$ 突变株菌丝生长及产孢能力

野生型 Pd01 和 $\Delta PdXY2$ 的菌碟制作方法见文献[16],将菌碟放在 PDA 中培养 7 d 后测量菌落直径,并用无菌水或者 5%吐温洗脱孢子,将孢子稀释后用血球计数板计数孢子量,每次试验 3 个重复,整个试验重复 3 次。

1.2.6 $\Delta PdXY2$ 突变株致病性分析

柑橘准备方法同上,在 PDA 培养基上培养野生型菌株 Pd01 和 $\Delta PdXY2$ 突变株 7 d,再用无菌水洗脱孢子并稀释到 1.0×10^6 个/mL,接种方法同上,25℃保湿培养,观察发病情况,每个菌株接种约 20~30 个果实,整个试验重复 3 次以上。

2 结果与分析

2.1 *PdXY2* 基因的克隆

利用引物 PdXY2-F 和 PdXY2-R 扩增柑橘绿霉病菌的基因组,得到一条 2 611 bp 的核苷酸序列,将该序列在 NCBI 官方网站上进行比对,发现与其他物种的木聚糖酶基因具有较高的一致性;根据转录组数据测序该基因 cDNA 全长 651 bp,含有 1 个大小为 58 bp 的内含子,能够编码出含有 216 个氨基酸的多肽,在 NCBI 中登录 *PdXY2* 基因序列,登录号为 JX495171。

2.2 *PdXY2* 蛋白分析

将柑橘绿霉病菌 *PdXY2* 编码的蛋白在 NCBI 进行 BLAST,结果表明该蛋白与其他丝状真菌中水解酶/内切木聚糖酶有较高的一致性(图 2),与 *Ophiostoma piliiferum* 中内切木聚糖酶(AFR33048)的一致性为 91%,与 *Penicillium camemberti* 中糖苷水解酶(CRL24571)的一致性为 90%,与 *Penicillium canescens* 内切木聚糖酶(ACP27610)的一致性为 81%。

<i>P. digitatum</i>	MVSFSSSLFVAACAAVTAFALPSELEKR-AITTSQQGTSNGYFYFSFWTNGGGSVSYNNGAS
<i>Ophiostoma piliiferum</i>	MVSFSSSLFVAACAAVTALALPSEVEKR-AITTSQQGTSNGYFYFSFWTNGGGSVSYNNGAA
<i>Penicillium camemberti</i>	MVSFSSSLFVAACAAVTAFALPSEVEKR-AITTSEQGTSNGYFYFSFWTNGGGSVSYTNGAA
<i>Penicillium canescens</i>	MVSFTQLFLAASTIVGAFAVPGEWNRQTITTSQTGTNNGYIYSFWTNGGGTVDTYNGAN ****. **.*.. * * *. * * ** .****. ** ****.*****. * *.***
<i>P. digitatum</i>	GEYSVSWSNCGSFTSGKGWATGSSRNINFGSGFKNPAGNAYLAVYGWTTSPLVEYYIMENY
<i>Ophiostoma piliiferum</i>	GQYSVDWTNCGSFTSGKGWATGSARNINFGSGFNPAGNAYLAVYGWTTSPLVEYYIMESY
<i>Penicillium camemberti</i>	GQYSVDWTNCGSFTSGKGWATGSSRNINFGSGFSPAGNAYLAVYGWTTGPLVEYYIMESY
<i>Penicillium canescens</i>	GQYSVSWQNCGDFTSKGWSTGSARNINFGSGFNPAGNAYLAIYGWTTSPLVEYYILEDY *.*** * *** *****. ****.***** *****.***** *****. * *
<i>P. digitatum</i>	GDYNPGRSMTFKGTVTSDGSVYDIYTHQQVNQPSISGTATFEQYWSIRRTKRSSSGTVTTA
<i>Ophiostoma piliiferum</i>	GEYNPGSSMTFKGTVTSDGSVYDIYTHQQVDQPSISGTATFNQYWSIRRSKRSSSGTVTTA
<i>Penicillium camemberti</i>	GEYNPGSSMTLKGTVTSDGSVYDIYTHQQVDQPSISGTATFNQYWSIRRSKRSSSGTVTTA
<i>Penicillium canescens</i>	GTYNPGPSMTYKGTVTSDGATYDIYEHQQVNQPSIQGTATFNQYWSIRRSKRSSSGTVTTA * **** * * *****. **** *
<i>P. digitatum</i>	NHFKAWASHGMYLGSHNYQIVSTEGYQSSGSSDITVS
<i>Ophiostoma piliiferum</i>	NHFNWASLGMSLGSHNYQIVSTEGYESSGSSSITVS
<i>Penicillium camemberti</i>	NHFNWASLGMSLGSHDYQIVSTEGYESSGSSSITVS
<i>Penicillium canescens</i>	NHFNWASHGMNLGNHNYQIVSTEGYQSSGSSSITVS *** **** * * * * * *****.***** ****

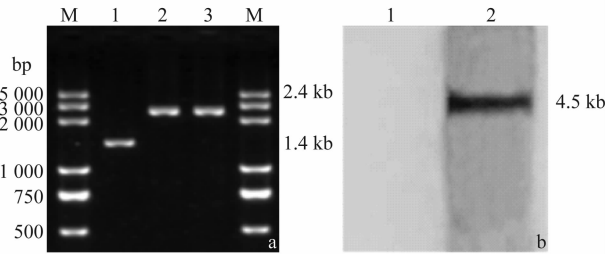
图 2 *PdXY2* 蛋白与其他同源蛋白比较

Fig. 2 Comparison of *PdXY2* with other homologous proteins

2.3 *PdXY2* 重组转化子的分析

将获得的转化子进行 PCR 鉴定,结果(图 3a)表明,在野生型 Pd01 中扩增出了一条 1.4 kb 的条带,而在重组突变株中扩增出一条 2.4 kb 的条带(2 kb 潮霉素抗性基因取代了 *PdXY2* 基因及其启动子区 1 kb 片段)。取其中一个转化子

($\Delta PdXY2A$)进行 Southern 杂交鉴定,结果如图 3b 所示,在野生型中潮霉素标记的探针没有杂交出条带,而在 $\Delta PdXY2$ 突变株中则会出现一条约 4.5 kb 的条带,结果表明获得的重组突变株只有一条潮霉素基因序列,不存在异位插入,可以进行后续研究。



M: BM 5000 DNA Marker; 1: 野生型; 2: $\Delta PdXY2$ 突变株; 3: 质粒 pTFCM-XY2
M: BM 5000 DNA Marker; 1: Wild type; 2: $\Delta PdXY2$ mutant; 3: Plasmid pTFCM-XY2

图 3 $\Delta PdXY2$ 突变株的 PCR 鉴定结果 (a) 和 Southern 鉴定结果 (b)

Fig. 3 Identification of *PdXY2*-disrupted mutant by PCR (a) and Southern blot (b)

2.4 *PdXY2* 基因的表达分析

在接种柑橘的发病过程中, *PdXY2* 基因的表达情况如图 4 所示, 侵染初期, *PdXY2* 基因的相对表达量呈现出一个升高趋势, 在接种后 48 h 达到高峰, 此时的相对表达量为对照的 4 倍, 随后其表达量逐渐下降, 至 84 h 与对照差异不大, 可见在侵染过程中, *PdXY2* 基因表现出了先升高后下降的趋势。

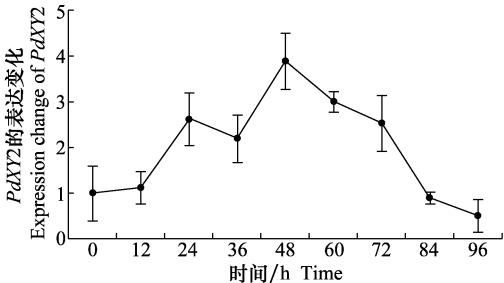


图 4 在侵染柑橘过程中 *PdXY2* 的表达
Fig. 4 Expression of *PdXY2* during infection

2.5 $\Delta PdXY2$ 突变株生长及产孢分析

菌丝生长试验结果表明, $\Delta PdXY2$ 突变株与野生型菌株生长速度相似, 生长速率均为 1.0~1.2 cm/d。产孢试验结果显示, $\Delta PdXY2$ 突变株与野生型菌株的产孢量相似, 在 PDA 平板上培养 7 d 后其孢子量均可达到 1×10^8 , 因此, $\Delta PdXY2$ 突变株与野生型菌株在菌落生长和产孢方面没有明显差异。

2.6 $\Delta PdXY2$ 突变株致病性分析

致病性试验结果 (图 5) 显示, $\Delta PdXY2$ 突变株能够侵染柑橘果实, 接种后培养 24 h, $\Delta PdXY2$ 和野生型 Pd01 均出现了腐烂, 且病斑扩展速度差异不大, 由此可见, $\Delta PdXY2$ 突变株对柑橘绿霉病菌的致病性与野生型相比没有明显差异。



图 5 野生型 (WT) 与 $\Delta PdXY2$ 突变株
接种 84 h 后发病情况

Fig. 5 Virulence of the wild type (WT) and $\Delta PdXY2$ mutant after 84 h of incubation

3 讨论

柑橘绿霉病菌是造成柑橘采后腐烂的最主要病原, 对柑橘产业造成了严重的损失, 为了增加对柑橘绿霉病菌致病分子机制的了解, 本研究对柑橘绿霉病菌中的木聚糖酶基因 (*PdXY2*) 进行研究, 表达分析表明 *PdXY2* 在侵染柑橘的过程中明显升高, 可能起到一定的作用。 $\Delta PdXY2$ 突变株的致病性与野生型相比没有明显的差异, 可见单一突变 *PdXY2* 基因对柑橘绿霉病菌的致病性影响不大, 可能与其他同源基因相关。细胞壁水解酶含有很多同源基因, 很多单一水解酶功能缺失不会引起致病性的下降^[17-18]。如在赤球丛赤壳 (*Nectria haematococca*) 中, 双突变果胶裂解酶 A 基因和果胶裂解酶 D 基因能够降低致病性, 然而单一突变其中任何一个基因都对致病性没有影响^[19]; 内切多聚半乳糖醛酸酶对柑橘链格孢 (*Alternaria citri*) 引起的柑橘黑腐病致病性有影响, 但是对链格孢 (*A. alternata*) 引起的褐斑病没有影响^[20]; 在稻瘟病菌 (*M. oryzae*) 中, 突变内切木聚糖酶对致病性没有影响^[21]; 在尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*) 中, 突变外切多聚半乳糖醛酸酶对致病性没有影响^[22]; 在玉米圆斑病菌 (*Cochliobolus carbonum*) 中, 双突变胞外多聚半乳糖醛酸酶可导致酶活下降, 但是致病性与野生型差异不大^[23]。此外还有一些报道也同样表明单一的突变对致病性没有影响^[24-26]。

参考文献

[1] Annis S L, Goodwin P H. Recent advances in the molecular genetics of plant cell wall-degrading enzymes produced by plant pathogenic fungi[J]. European Journal of Plant Pathology, 1997, 103(1): 1-14.
[2] Collmer A, Keen N T. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis [J]. Annual Review of Phytopathology, 1986,

- 24: 383–409.
- [3] Shieh M T, Brown R L, Whitehead M P, et al. Molecular genetic evidence for the involvement of a specific polygalacturonase, P2c, in the invasion and spread of *Aspergillus flavus* in cotton bolls [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(9): 3548–3552.
 - [4] ten Have 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.
 - [5] Valette-Collet O, Cimerman A, Reignault P, et al. Disruption of *Botrytis cinerea* pectin methylesterase gene Bcpme 1 reduces virulence on several host plants [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2003, 16(4): 360–367.
 - [6] Skamnioti P, Gurr S J. *Magnaporthe grisea* cutinase2 mediates appressorium differentiation and host penetration and is required for full virulence [J]. *The Plant Cell*, 2007, 19(8): 2674–2689.
 - [7] Yakoby N, Beno-Moualem D, Keen N T, et al. *Colletotrichum gloeosporioides* pelB is an important virulence factor in avocado fruit-fungus interaction [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2001, 14(8): 988–995.
 - [8] Yakoby N, Freeman S, Dinooor A, et al. Expression of pectate lyase from *Colletotrichum gloeosporioides* in *C. magna* promotes pathogenicity [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2000, 13(8): 887–891.
 - [9] Oeser B, Heidrich P M, Muller U, et al. Polygalacturonase is a pathogenicity factor in the *Claviceps purpurea*/rye interaction [J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2002, 36(3): 176–186.
 - [10] Kanetis L, Förster H, Adaskaveg J E. Comparative efficacy of the new postharvest fungicides azoxystrobin, fludioxonil, and pyrimethanil for managing citrus green mold [J]. *Plant Disease*, 2007, 91(11): 1502–1511.
 - [11] Macarasin D, Cohen L, Eick A, et al. *Penicillium digitatum* suppresses production of hydrogen peroxide in host tissue during infection of citrus fruit [J]. *Phytopathology*, 2007, 97(11): 1491–1500.
 - [12] Zhang Tianyuan, Sun Xuepeng, Xu Qian, et al. The pH signaling transcription factor PacC is required for full virulence in *Penicillium digitatum* [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(20): 9087–9098.
 - [13] Zhu Jinwen, Xie Qingyun, Li Hongye. Occurrence of imazalil-resistant biotype of *Penicillium digitatum* in China and the resistant molecular mechanism [J]. *Journal of Zhejiang University Science A*, 2006, 7(S2): 362–365.
 - [14] Pfaffl M W, Horgan G W, Dempfle L. Relative expression software tool (REST (c)) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR [J]. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30(9): e36.
 - [15] Wang Jiye, Li Hongye. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of the phytopathogenic fungus *Penicillium digitatum* [J]. *Journal of Zhejiang University Science B*, 2008, 9(10): 823–828.
 - [16] 张志芳, 吴可嘉, 李红叶. 浙江省柑橘绿霉病菌对啞菌酯的敏感性研究 [J]. *农药学报*, 2008, 10(3): 375–378.
 - [17] Walton J D. Deconstructing the Cell-Wall [J]. *Plant Physiology*, 1994, 104(4): 1113–1118.
 - [18] Hamer J E, Holden D W. Linking approaches in the study of fungal pathogenesis: A commentary [J]. *Fungal Genetics and Biology*, 1997, 21(1): 11–16.
 - [19] Rogers L M, Kim Y K, Guo Wenjin, et al. Requirement for either a host-or pectin-induced pectate lyase for infection of *Pisum sativum* by *Nectria haematococca* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(17): 9813–9818.
 - [20] Isshiki A, Akimitsu K, Yamamoto M, et al. Endopolygalacturonase is essential for citrus black rot caused by *Alternaria citri* but not brown spot caused by *Alternaria alternata* [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2001, 14(6): 749–757.
 - [21] Wu Shengcheng, Ham K S, Darvill A G, et al. Deletion of two endo- β 1,4-xylanase genes reveals additional isozymes secreted by the rice blast fungus [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1997, 10(6): 700–708.
 - [22] Garcia-Maceira F I, Di Pietro A, Roncero M I. Cloning and disruption of pgx4 encoding an in planta expressed exopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum* [J]. *Molecular plant-Microbe Interactions*, 2000, 13(4): 359–365.
 - [23] Scott-Craig J S, Cheng Yiqiang, Cervone F, et al. Targeted mutants of *Cochliobolus carbonum* lacking the two major extracellular polygalacturonases [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(4): 1497–1503.
 - [24] Wu Shengcheng, Kauffmann S, Darvill A G, et al. Purification, cloning and characterization of two xylanases from *Magnaporthe grisea*, the rice blast fungus [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1995, 8(4): 506–514.
 - [25] Wu Shengcheng, Halley J E, Luttig C, et al. Identification of an endo- β 1,4-D-xylanase from *Magnaporthe grisea* by gene knockout analysis, purification, and heterologous expression [J]. *Applied and environmental microbiology*, 2006, 72(2): 986–993.
 - [26] Mori T, Jung H Y, Maejima K, et al. *Magnaporthe oryzae* endopolygalacturonase homolog correlates with density-dependent conidial germination [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2008, 280(2): 182–188.

(责任编辑: 田 喆)