

松材线虫果胶酶基因 *Bxpe1* 的克隆及其生物信息学分析

邱秀文^{1,2,3}, 周桂香^{1,2,3}, 王慧娟³, 杨丽丽³

(1. 九江学院 鄱阳湖生态经济研究中心, 江西 九江 332005; 2. 九江学院 九江市流域管理与生态保护重点实验室, 江西 九江 332005;
3. 九江学院 化学与环境工程学院, 江西 九江 332005)

摘要: 以松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* 转录本为模板, 通过 RT-PCR 技术克隆果胶酶 *Bxpe1* 基因。结果表明, 松材线虫果胶酶 *Bxpe1* 基因序列全长为 795 bp, GC 含量为 50.44%, 编码 252 个氨基酸。通过 Blast 比对克隆的 *Bxpe1* 基因与已知序列 (Gen-Bank ID: AB232908.1) 的同源性达到 98%。系统进化分析表明, *Bxpe1* 基因编码产物的氨基酸序列与拟松材线虫 *Bursaphelenchus mucronatus*, 燕麦真滑刃线虫 *Aphelenchus avenae* 的 *Bxpe1* 蛋白序列具有高度同源性。*Bxpe1* 基因编码的产物的 0~25 序列有可能是跨膜结构域, 而其他序列均位于膜外, 其二级结构主要是以无规则卷曲和 β -折叠为主, 信号肽的剪切位点位于第 17 至第 18 位氨基酸之间, 主要在细胞外发挥生物学作用。*Bxpe1* 基因的克隆及其生物信息学分析对进一步研究 *Bxpe1* 基因在松材线虫致病过程中的功能具有重要意义。

关键词: 松材线虫; *Bxpe1* 基因; 克隆; 生物信息学

中图分类号: S763 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-3776 (2018) 04-0008-07

Cloning and Bioinformatics Analysis of *Bxpe1* Gene from *Bursaphelenchus xylophilus*

QIU Xiu-wen^{1,2,3}, ZHOU Gui-xiang^{1,2,3}, WANG Hui-juan³, YANG Li-li³

(1. Poyang Lake Eco-economy Research Center, Jiujiang University, Jiujiang 332005, China;

2. Jiujiang Key Laboratory of Basin Management and Ecological Protection, Jiujiang University, Jiujiang 332005, China;

3. School of Chemistry and Environmental Engineering, Jiujiang University, Jiujiang 332005, China)

Abstract: *Bxpe1* gene sequence from *Bursaphelenchus xylophilus* cDNA as a template was amplified and cloned by RT-PCR. *Bxpe1* gene (795bp) was successfully cloned with GC content of 50.44% and encode of 252 amino acids. The cloned sequence had 98% similarity to the *pe1* gene previously published in the GenBank (ID: AB232908.1). Phylogenetic analysis showed that *Bxpe1* had high homologies with that from *B. mucronatus* and *Aphelenchus avenae*. *Bxpe1* gene encode from 0 to 25 sequences may be transmembrane structure, while the other sequences outside membrane. The secondary and tertiary structures were abundant in random coils and beta helix. The signal peptide cleavage sites locate between No. 17 to No. 18 amino acid and performs biological effects at extracellular.

Key words: *Bursaphelenchus xylophilus*; *Bxpe1* gene; clone; bioinformatics

松材线虫病 (Pine Wilt Disease) 是由松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* 引起松属 *Pinus* 植物死亡的一种世界性森林病害^[1-3]。果胶酶基因是松材线虫的重要致病因子, 有研究表明, 松材线虫入侵松树时会分泌大量果

收稿日期: 2017-12-25; 修回日期: 2018-05-25

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31660205); 江西省自然科学基金项目 (20161BAB214152, 20151BAB213018)

作者简介: 邱秀文, 副教授, 从事森林病理相关研究; E-mail: qiuxiuwen3@163.com。通信作者: 周桂香, 副教授, 从事森林生态相关研究; E-mail: 727424712@163.com。

胶酶来破坏松属植物细胞壁进而侵入寄主细胞^[4-5]。然而, 目前关于果胶酶基因在松材线虫致病过程中的功能还不清楚。果胶由杂多糖和半乳糖醛酸构成, 是植物细胞壁的主要成分之一。寄生生物在入侵植物的过程中会大量分泌果胶酶^[6], 导致植物细胞壁破坏, 从而有利于其成功入侵和定殖寄主植物^[7]。动物果胶酶基因 (*Bxpel1*) 最早是在土豆胞囊线虫 *Globodera rotochiensis* 中被发现^[8]。随后, 越来越多报道显示许多植物病原性线虫均有 *Bxpel1*, 如大豆胞囊线虫 *Heterodera glycines*^[9] 和根结线虫 *Meloidogyne* spp.^[10] 等。目前关于 *Bxpel1* 在松材线虫致病过程中的功能还不清楚, 有关该基因在松材线虫致病形成的遗传进化机理也尚不明确。

生物信息学 (Bioinformatics) 是由结合统计学、数学、计算机与生物医学多学科的一门新兴学科, 为功能基因的发现、基因表达及表达产物的功能研究提供了新思路。利用生物信息学与试验技术相结合研究基因结构及其编码产物的组织结构和信息结构越来越普遍^[11]。本研究利用分子实验技术克隆了松材线虫果胶酶基因 (*Bxpel1*), 并借助生物信息学相关软件预测和分析了其编码产物的理化性质、蛋白质二级和三级结构、序列特征及相关生物学功能, 研究结果有助于从分子水平上理解果胶酶基因 *Bxpel1* 的结构和功能, 为进一步研究松材线虫果胶酶基因在松材线虫致病过程中的功能及其遗传进化机理奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

供试松材线虫选用九江学院植物基因资源重点实验室分离保存的虫株 JJU-BLD, 该虫株于 2015 年 8 月从江西省九江市星子县白鹿洞书院一株病死黑松 *Pinus thunbergii* (胸径 45 cm) 上分离得到, 将松材线虫接种至灰葡萄孢 *Botrytis cinerea* 上, 置于 25℃ 生化培养箱中培养 7 d, 保存于 4℃ 冰箱备用。

1.2 松材线虫总 RNA 提取

松材线虫总 RNA 采用 Trizol 细胞裂解液按常规方法 (酚-氯仿) 进行抽提, 然后将抽提物溶解于适量 DEPC (Diethyl pyrocarbonate) 水中, 取少量总 RNA 进行浓度及 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值测定, 把合格的总 RNA 置于 -80℃ 冰箱保存备用。

1.3 引物设计与合成

根据已公布的松材线虫 *Bxpel1* 基因的序列 (GenBank 登录号为 AB232909.1), 利用分子生物学软件 Primer Premier 5.0 设计 RT-PCR 扩增引物。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成, 预期扩增产物的长度 795 bp。引物序列为: 上游引物 P1: 5'-TTTTGGCATTCTCAGTTGTAGC-3'; 下游引物 P2: 5'-CCATCTTGTCCTGTTTGTAAG-3'。

1.4 反转录 (Reverse transcription)

按照 Transgen 公司 (中国) 生产的 EasyScript® First-Strand cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒说明书合成松材线虫 cDNA, 反应体系为: Total mRNA 500 ng, Random Primer (N9) (0.1 μg·μl⁻¹) 1 μl, 2×ES Reaction Mix 10 μl, EasyScript® RT/RI Enzyme Mix 1 μl, 添加 RNase-free Water 至 10 μl, 轻轻混匀后置于 25℃ 孵育 10 min, 42℃ 孵育 30 min, 85℃ 加热 5 min 后冰上放置。

1.5 PCR 扩增

以上述 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 反应体系: Ex Tag Mix 25 μl, 引物 (10 μM) 各 1.0 μl, 模板 DNA 2.0 μl, 补 ddH₂O 至 50 μl, 反应条件为: 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 30 s, 54℃ 30 s, 72℃ 45 s, 35 个循环, 最后 72℃ 7 min。4℃ 保存 PCR 产物。

1.6 PCR 产物的回收与纯化

PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳后, 利用凝胶成像系统在紫外灯下将目的片段切胶回收, 用 Axygen 公司提供的 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒纯化目的片段, -20℃ 保存备用。

1.7 目的基因的克隆与测序

在 T4 DNA 连接酶作用下使 PCR 产物与 pMD19-T 载体连接, 然后转染至大肠杆菌感受态细胞中, 涂布在含有 Amp $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 X-gal/IPTG 的 LB 培养基上, 37°C 培养 16 h。挑选 3 个白色单菌落进行菌液 PCR, 扩增产物送华大基因测序公司进行测序鉴定。

1.8 生物信息学分析

根据 *Bxpe11* 基因的克隆测序结果, 利用 BioEdit 软件推导出 *Bxpe11* 的氨基酸序列。利用 ProtParam 工具分析蛋白质的基本理化性质; 利用 Hopfield 神经网络预测蛋白质的二级结构。利用 Siss-model 预测蛋白质的三级结构。利用 SignalP v4.0, HMM 2.0 和 PSORT II 分别进行信号肽、蛋白质序列的跨膜区和亚细胞定位分析。从 GenBank 中下载其它物种的 *pel1* 基因序列, 利用 MEGA4 软件将克隆所得到的序列与 GenBank 上已发表的拟松材线虫 *Bursaphelenchus mucronatus*, 燕麦真滑刃线虫 *Aphelenchus avenae*, 马铃薯腐烂茎线虫 *Ditylenchus destructor* 和链霉菌属 *Streptomyces canus* 等序列进行同源性分析, 并构建系统进化树。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的提取

采用 Trizol 试剂法提取松材线虫总 RNA, 经紫外分光光度测定, 其 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 比值为 1.92, 浓度为 $1.678 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 说明提取的总 RNA 质量合格, 可以进行后续实验。

2.2 RT-PCR 扩增

以提取的松材线虫总 RNA 为模板, 反转录合成 cDNA 后进行 PCR 扩增, $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果见图 1。由图 1 可知, 在 750 bp ~ 1 000 bp 之间, 靠近 750 bp 处有较亮的特异性条带, 与预期的目的片段的大小 (795 bp) 一致。

2.3 阳性重组质粒测序结果比对及分析

将测序结果在 NCBI 中与松材线虫已知序列^[12] (Gen-Bank ID: AB232908.1) 进行 BLAST 比对, 结果二者之间的同源性为 98% (图 2), 说明本实验成功克隆到松材线虫 *Bxpe11* 基因。BioEdit 软件分析表明, 该序列 GC 含量为 50.44%, 编码 252 个氨基酸, 与拟松材线虫的同源性为 93%。

2.4 *Bxpe11* 基因编码产物的理化性质

通过相关生物信息学软件 (Bio-Edit) 和在线网站 (<http://www.expasy.org>) 预测松材线虫 *Bxpe11* 基因编码产物的理化性质。由 *Bxpe11* 基因编码产物的氨基酸组成 (图 3) 可知, *Bxpe11* 基因编码 252 个氨基酸, 组分中最多的氨基酸是 Gly (甘氨酸), 占全部组分的 12.7%。*Bxpe11* 基因编码的氨基酸理论等电点为 8.43, 理论分子质量约为 26.68 ku。

2.5 *Bxpe11* 基因编码产物的二级结构预测

通过 Hopfield 神经网络 (HNN) 预测松材线虫 *Bxpe11* 基因编码蛋白的二级结构, 结果如图 4 所示, 上行为氨基酸序列, 下行为其所对应的二级结构, 其中 h 代表 helix (α -螺旋), e 代表 extended (β -折叠), c 代表 coil (无规则卷曲)。从预测结果可知, *Bxpe11* 蛋白的二级结构中, α -螺旋占 11.51%, β -折叠占 35.32%, 无规则卷曲占 53.17%。

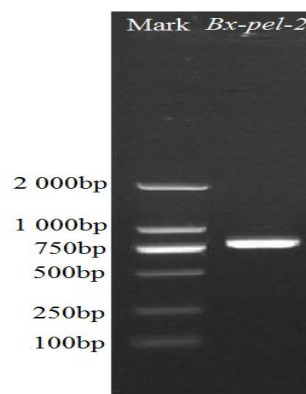


图 1 松材线虫果胶酶基因 RT-PCR 产物电泳

Figure 1 Electrophoresis of *Bxpe11* gene amplified by RT-PCR

Sbjct :	TTTCGCTTC	20	40	60	
Query :	TTTCGCTTC	20	40	60	
	T G	G T	TTCGCCATTATAACCTTA	TCTCTGTTGCCGTGTTTTCGGC	TCAGTTTGGAG
Sbjct :	CTTGGCCG	80	100	120	140
Query :	CTTGGCCG	80	100	120	140
	CTTGGCC	AAACCCAAAGCTCCACCCAAAG	TGCCCAAAGAAGATCACCGTGAAGAGCGGGCAGACCTACGAT	CTTGGCC	AAACCCAAAGCTCCACCCAAAG
Sbjct :	GTTAAGAAT	160	180	200	
Query :	GTTAAGAAT	160	180	200	
	GTTAAGAAT	GCGCGATTCGTC	CTGGATTGCGG	TGGTGACGGTTCTCAAGCTGAAGGACAAGACCCAAAT	GTTAAGAAT
Sbjct :	TTTTGTGTTG	220	240	260	280
Query :	TTTTGTGTTG	220	240	260	280
	TTTTGTGTTG	AGCAGGGCGCA	AGATTGTCAATGTTGTCTGGGAAATCCAGCTGCCAT	TTGGAATTCAT	TTTTGTGTTG
Sbjct :	GTCTGGGTG	300	320	340	
Query :	GTCTGGGTG	300	320	340	
	GTCTGGGTG	GCTTCCGAAATCGTGAACCTG	TGGTGGGAGGACGTCGGGAGAAGACGCC	GCCACATTTAAGGGC	GTCTGGGTG
Sbjct :	AAAAGCGGGC	360	380	400	420
Query :	AAAAGCGGGC	360	380	400	420
	AAAAGCGGGC	CGTATTCTGTAACCGGAGGTGGTGCCAAAGAGGCCGACGACAAGGTCTT	CAACACAA	AAAAGCGGGC	CGTATTCTGTAACCGGAGGTGGTGCCAAAGAGGCCGACGACAAGGTCTT
Sbjct :	CGGAGGTGGC	440	460	480	
Query :	CGGAGGTGGC	440	460	480	
	CGGAGGTGGC	CCTTAACCATCAAGAATTTCCAGACTCAAGACATTGGAAAGCTCTATCGTCTT	TCCGGGAA	CGGAGGTGGC	CCTTAACCATCAAGAATTTCCAGACTCAAGACATTGGAAAGCTCTATCGTCTT
Sbjct :	ACTGCAATAT	500	520	540	560
Query :	ACTGCAATAT	500	520	540	560
	ACTGCAATAT	CAACGGGTTTGACCGTCAAGTTGTCATGTATGATACCGTGAAACTCTCCGGAGGCCACGAAGTC	ACTGCAATAT	CAACGGGTTTGACCGTCAAGTTGTCATGTATGATACCGTGAAACTCTCCGGAGGCCACGAAGTC	ACTGCAATAT
Sbjct :	ATTGCCGGAG	580	600	620	64
Query :	ATTGCCGGAG	580	600	620	64
	ATTGCCGGAG	TCGA CGGGAACACACAGGATTCGCT	CGTTGAGGAACATCG	ATTGCCGGAG	TCGA CGGGAACACACAGGATTCGCT
Sbjct :	GACGGTTTG	660	680	700	
Query :	GACGGTTTG	660	680	700	
	GACGGTTTG	GAACTTCAGGGACCAACAA	ACAA	CAGGAACCCAAAGCGCTAGGAAGTACACAA	GACGGTTTG
Sbjct :	GCCTAGAGA	720	740	760	780
Query :	GCCTAGAGA	720	740	760	780
	GCCTAGAGA	TGGAGATGC	AAGATCTGCATCTACAAGCAGCGCATCAAGGCTTGATCAGGTTCTGA	GCCTAGAGA	TGGAGATGC
Sbjct :	GTCAGTAA	795			
Query :	GTCAGTAA	795			

图 2 测序结果与已知序列的比对

Figure 2 Comparison of sequencing result between *Bxpel1* and knowns

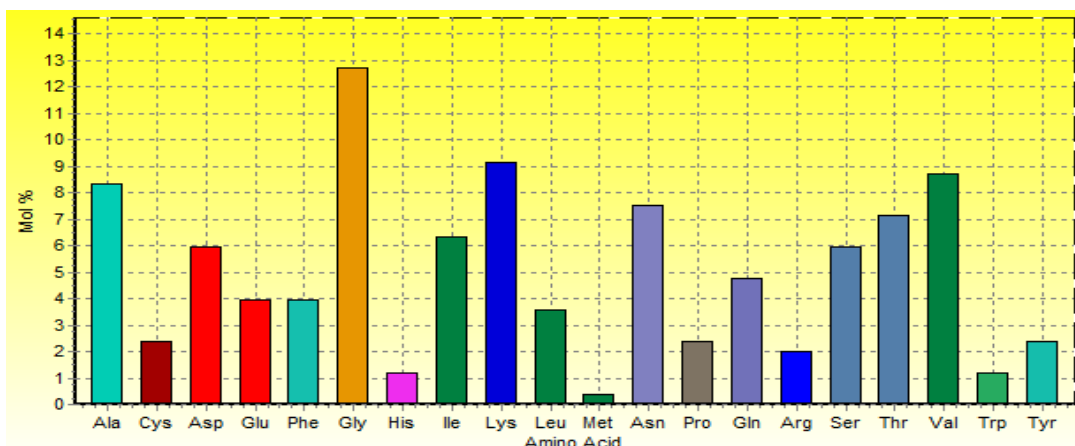


图 3 *Bxpel1* 蛋白氨基酸组成

Figure 3 Amino acid composition of *Bxpel1* protein

10 20 30 40 50 60 70

MVQFAIITLLSVAVVSQFGAWPNPSSTTKVPKKITVKSGQTYDGKNGRFVAGFAGGDGSQAEGQDPIFE
ccccceec hhhhhhhhhccccccccccccccccceeeeccccccccccccceeeecccccccccccc hhhh
LQAGAKIVNVVLGNPAADGIHCLGACEIENVWEDVGEDAATFKGKSGDTYSVTGGGAKKADDKVFAQHNG
hhhhceeeeeccccceeeceeeeeeececccc hhhhccccceeeeccccccccceeeccc
GGTLTIKNFQTQDIGKLYRSCGNCKNNGFDRHVVIDTVKLSGATKVIAGVNGNYKDSATLRNIEIAGSVK
ccccccccccccceeeeeccccccccccccceeeeeccccceeeeecccccc hhhhhhhhhcee
TVCENFQGTNNNNQEPKSVRKYSQENGDKICIKYKTSDIKA
eeeeccccccccccccceeeeeccccceeeeeceec

图 4 Hopfield 神经网络 (HNN) *Bxpel1* 蛋白二级结构预测

Figure 4 Prediction of secondary structure of *Bxpel1* protein based on HNN

2.6 *Bxpe11* 基因编码产物的三级结构预测

蛋白质的三级结构是在 α 螺旋、 β 折叠、 β 转角和无规则卷曲等二级结构基础上通过侧链基团的相互作用进一步卷曲、折叠而形成特定的构象。本研究利用 SWISS-MODEL 在线预测 *Bxpe11* 结构域区的三级结构, 结果如图 5 显示, *Bxpe11* 结构域区构成圆柱状结构。

2.7 *Bxpe11* 基因编码产物信号肽分析

通过在线蛋白质序列信号肽分析工具 SignalP4.1 对 *Bxpe11* 基因编码产物的前 70 个氨基酸序列进行了分析, 程序分别自动利用神经网络模型 (NN) 进行信号肽分析, 并给出了 3 种 C, Y, S-score 计算结果。神经网络模型 (NN) 预测的信号肽结果如图 6 所示, 松材线虫 *Bxpe11* 编码产物的分值曲线非常典型, C 值为 0.599, Y 值为 0.746, S 值为 0.970, 其切割点位于第 17 至第 18 位的氨基酸之间, 基本可以判定 *Bxpe11* 编码产物存在信号肽。

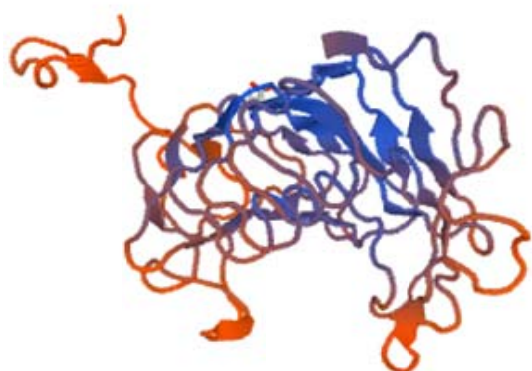


图 5 *Bxpe11* 蛋白结构域区三级结构预测

Figure 5 Prediction of tertiary structure domain of *Bxpe11* protein

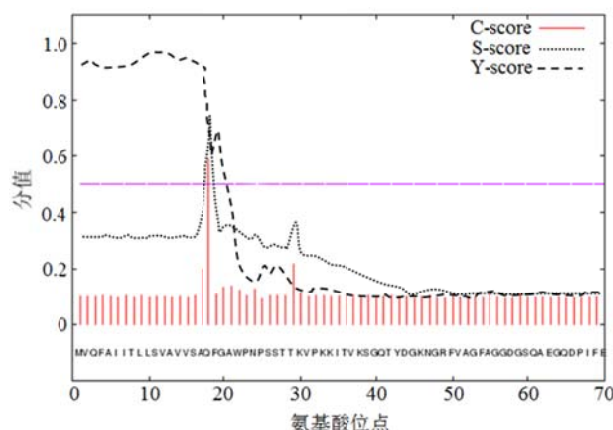


图 6 *Bxpe11* 基因编码产物信号肽分析

Figure 6 The signal peptide analysis of *Bxpe11* gene encoding protein

2.8 *Bxpe11* 基因编码产物跨膜结构的预测和分析

蛋白质的跨膜结构域一般由 20 ~ 30 个疏水氨基酸残基组成, 形成一螺旋固着于细胞膜上起锚定作用。通过使用 TMPRED 在线预测和分析了松材线虫 *Bxpe11* 基因编码蛋白质序列的跨膜区域。由图 7 可知, *Bxpe11* 基因编码的产物的 0 ~ 25 序列有可能是跨膜结构域, 而其他序列均位于膜外。

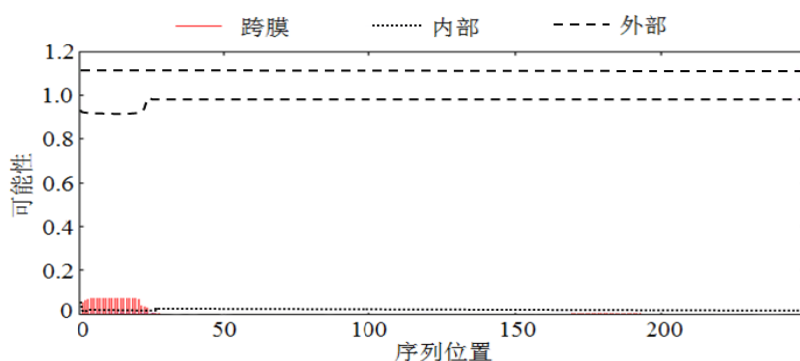


图 7 *Bxpe11* 蛋白跨膜区域分析

Figure 7 Transmembrane regional analyses of *Bxpe11* protein

2.9 松材线虫 *Bxpe11* 基因编码产物亚细胞定位分析

亚细胞定位的预测一般通过算法比较查询序列中所包含的特征参数与各类相应的亚细胞定位的相似度, 然后以一组概率值的形式作出判断。通过工具 PSORT II 预测, 松材线虫 *Bxpe11* 基因编码产物的亚细胞定位, 见

表 1。从表 1 可知,其分布在细胞外的可能性为 82.7%,分布在线粒体的可能性为 4.3%,分布在内质网的可能性为 4.3%,分布在细胞核的可能性为 8.7%。因此可以推断,松材线虫 *Bxpe11* 基因编码产物主要在细胞外发挥生物学作用。

2.10 松材线虫 *Bxpe11* 基因编码产物的分子进化分析

在 NCBI 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载拟松材线虫、燕麦真滑刃线虫、马铃薯腐烂茎线虫和链霉菌属的果胶酶基因的氨基酸序列,利用 MEGA 4.0 软件将其与松材线虫果胶酶基因编码产物进行系统进化分析,并构建系统进化树,如图 8。由图 8 可知,松材线虫与拟松材线虫、燕麦真滑刃线虫具有高度同源性,分子进化距离最近,关系最为密切,而与马铃薯腐烂茎线虫和链霉菌属进化距离相对较远。

表 1 <i>Bxpe11</i> 编码产物的亚细胞定位分析	
Table1 The subcellular localization of protein <i>Bxpe11</i>	
亚细胞定位	可能性/%
细胞外	82.7
线粒体	4.3
内质网	4.3
细胞核	8.7

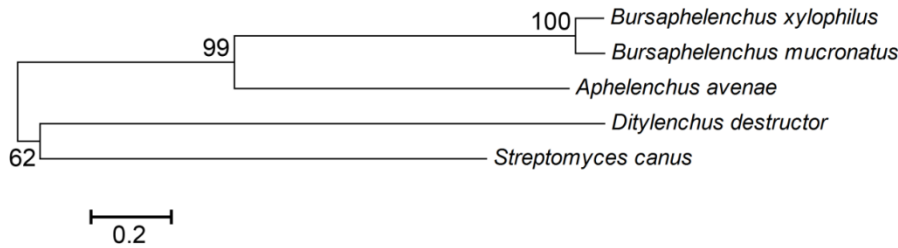


图 8 *Bxpe11* 基因编码产物的系统进化树

Figure 8 The phylogenetic tree of *Bxpe11*

3 结论与讨论

果胶是植物细胞壁的主要构成成分之一,果胶酶基因广泛存在于植物寄生线虫基因组中,在线虫入侵植物的过程中发挥着重要作用^[13-15]。松材线虫致病性相关的基因多是在食道腺细胞内表达,然后其产物通过口针分泌到寄主体内^[16-20]。Taisei Kikuchi 等^[21]研究表明, *Bxpe11* 基因在松材线虫食道腺细胞中表达,所编码的多肽活性依赖于 Ca^{2+} ,在 pH 值为 8~10 时具有最佳活性。松材线虫将果胶酶分泌到植物的组织内以助其取食与迁移,因此推断果胶酶基因是松材线虫关键致病相关基因。

本研究通过信号肽和跨膜结构的预测,分析 *Bxpe11* 基因编码蛋白功能。通过对 *Bxpe11* 基因编码产物进行同源比对,发现 *Bxpe11* 基因编码产物的氨基酸序列与拟松材线虫、燕麦真滑刃线虫的 *Bxpe11* 蛋白序列具有高度同源性,这种同源性在一定程度上代表着物种亲缘关系的远近,同时也反映了 *Bxpe11* 编码产物在不同物种结构上的稳定性对生物体的功能重要性。结果表明, *Bxpe11* 基因编码产物由 252 个氨基酸组成,其等电点为 8.43,分子质量约为 26.68 ku。 *Bxpe11* 基因编码产物二级结构主要是以无规则卷曲和 β -折叠为主,主要在细胞外发挥生物学作用,并且预测出信号肽的剪切位点位于第 17 至第 18 位的氨基酸之间,已知信号肽位于分泌蛋白的 N 端,它对于外分泌蛋白的分泌起主导作用^[22-23]。利用生物信息学的方法对松材线虫 *Bxpe11* 基因的编码产物序列进行分析,可以了解其蛋白质结构和功能,结果对进一步研究阐明 *Bxpe11* 基因松材线虫致病过程中的功能及松材线虫病的分子致病机理具有重要意义,同时为以后试验方案的制定提供了重要理论依据。

参考文献:

[1] ZHU L H, YE J R, NEGI Sapan, *et al.* Pathogenicity of aseptic *Bursaphelenchus xylophilus*[J]. PLoS ONE, 2012, 7 (5) : e38095.

[2] PEREIRA F, MOREIRA C, FONSECA L, *et al.* New insights into the phylogeny and worldwide dispersion of two closely related nematode species, *Bursaphelenchus xylophilus* and *Bursaphelenchus mucronatus*[J]. PLoS ONE, 2013, 8 (2) : e56288.

[3] MALLEZ S, CASTAGNONE C, ESPADA M, *et al.* First insights into the genetic diversity of the pine wood nematode in its native area using

- new polymorphic microsatellite loci[J]. PLoS ONE, 2013, 8 (3) : e59165.
- [4] QIU X W, WU X Q, HUANG L, *et al.* Specifically expressed genes of the nematode *Bursaphelenchus xylophilus* involved with early interactions with pine trees[J]. PLOS ONE, 2013, 8 (10) : e78063.
- [5] QIU X W, WU X Q, HUANG L, *et al.* Influence of *Bxpe1* Gene Silencing by dsRNA Interference on the Development and Pathogenicity of the Pine Wood Nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*[J]. Int J Mol Sci, 2016 (17) : 125.
- [6] BARRAS F, VAN GIJSEGEN F, CHATTERJEE A K. Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *Erwinia*[J]. Ann Rev Phytopathol, 1994, 32 (1) : 201–234.
- [7] DAVIS E L, HUSSEY R S, BAUM T J. Getting to the roots of parasitism by nematodes[J]. Trends Parasitol, 2004, 20 (3) : 134–141.
- [8] POPELIUS H, OVERMARS H, JONES J, *et al.* Enzymology: degradation of plant cell walls by a nematode[J]. Nature, 2000, 406 (6791) : 36–37.
- [9] DE BOER J M, DAVIS E L, HUSSEY R S, *et al.* Cloning of a putative pectate lyase gene expressed in the subventral esophageal glands of *Heterodera glycines*[J]. J Nematol, 2002, 34 (1) : 9.
- [10] DOYLE E A, LAMBERT K N. Cloning and characterization of an esophageal-gland-specific pectate lyase from the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*[J]. Mol Plant-Microb Interact, 2002, 15 (6) : 549–556.
- [11] 曹会萍, 常卫华, 马呈瑞, 等. 绵羊性腺褪黑素受体基因 MT2 的克隆及其生物信息学分析[J]. 中国兽医科学, 2013, 43 (12) : 1295–1300.
- [12] KIKUCHI T, SHIBUYA H, AIKAWA T, *et al.* Cloning and characterization of pectate lyases expressed in the esophageal gland of the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*[J]. Mol Plant-microb Interact, 2006, 19 (3) : 280–287.
- [13] JONES T M, ANDERSON A J, ALBERSHEIM P. Host-pathogen interactions IV. Studies on the polysaccharide-degrading enzymes secreted by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*[J]. Physiol Plant Pathol, 1972, 2 (2) : 153–166.
- [14] TOMASSINI A, SELLA L, RAIOLA A, *et al.* Characterization and expression of *Fusarium graminearum* endo-polygalacturonases in vitro and during wheat infection[J]. Plant Pathol, 2009, 58 (3) : 556–564.
- [15] 邱秀文, 吴小芹, 黄麟, 等. 松材线虫 *Bxpe12* 基因的克隆及 RNA 干扰载体构建[J]. 林业科学, 2016, 29 (29) : 283–288.
- [16] 王仕利, 曹福祥, 王猛, 等. 松材线虫基因研究进展[J]. 中南林业科技大学学报, 2009, 29 (3) : 195–198.
- [17] JONES J T, MONES M, MOTA M, *et al.* *Bursaphelenchus xylophilus*: opportunities in comparative genomics and molecular host-parasite interactions[J]. Mol Plant Pathol, 2008, 9 (3) : 357–368.
- [18] SANTOS C S, PINHEIRO M, SILVA A I, *et al.* Searching for resistance genes to *Bursaphelenchus xylophilus* using high throughput screening[J]. BMC Genomics, 2012, 13 (1) : 599.
- [19] KIKUCHI T, COTTON J A, DALZELL J J, *et al.* Genomic insights into the origin of parasitism in the emerging plant pathogen *Bursaphelenchus xylophilus*[J]. PLoS Pathog, 2011, 7 (9) : e1002219.
- [20] 马海宾. 松材线虫纤维素酶系及其 cDNA 基因的克隆与 RNA 干扰研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2008.
- [21] KIKUCHI T, SHIBUYA H, AIKAWA T, *et al.* Cloning and characterization of *pectate lyases* expressed in the esophageal gland of the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*[J]. Mol Plant-microbe Interact, 2006, 19 (3) : 280–287.
- [22] IZARD J W, DOUGHTY M B, KENDALL D A. Physical and conformational properties of synthetic idealized signal sequences parallel their biological function[J]. Biochemistry, 1995, 34 (31) : 9904–9912.
- [23] 杨运桂, 徐京宁, 胡泰山. 信号肽疏水性的提高促进青霉素 G 酰化酶分泌[J]. 生物化学与生物物理学报, 2000, 32 (2) : 163–168.