

陈欣瑜,周 荃,罗 梅,等. 花生黑腐病菌碳水化合物水解酶的全基因组分析[J]. 江苏农业科学,2019,47(22):52-56.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.22.010

花生黑腐病菌碳水化合物水解酶的全基因组分析

陈欣瑜,周 荃,罗 梅,董章勇

(仲恺农业工程学院,广东广州 510225)

摘要:花生黑腐病(*Cylindrocladium black rot of peanut*,简称 CBR)是由寄生帚梗柱孢霉(*Cylindrocladium parasiticum* Crous, Wingfield & Alfenas) 侵染引起的一种严重的检疫性病害,给农业生产造成了巨大的经济损失。以笔者所在实验室前期获得的花生黑腐病菌全基因组 18 366 个蛋白序列为基础,利用 CAZymes Analysis Toolkit 预测程序进行注释,共获得注释碳水化合物水解酶(CAZymes)1 197 个,分为 6 个家族,分别为 191 个辅助酶(auxiliary activities,简称 AAs)、137 个糖基转移酶(glycosyl transferases,简称 GTs)、422 个糖苷水解酶(glycoside hydrolases,简称 GHs)、48 个多糖裂解酶(polysaccharide lyases,简称 PLs)、300 个碳水化合物酯酶(carbohydrate esterases,简称 Ces)、99 个碳水化合物绑定结构(carbohydrate-binding modules,简称 CBMs)。根据 Blast2GO 对花生黑腐病菌 CAZymes 蛋白的功能分析结果,将 CAZymes 分为 3 大类分别为生物进程、细胞成分、分子功能类。该研究可为进一步解析 CAZymes 的功能奠定基础,为深入研究该致病菌侵染植物的作用机制提供了一定的理论依据。

关键词:花生黑腐病菌;寄生帚梗柱孢霉;水化合物水解酶;全基因组;分析

中图分类号: S435.652 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)22-0052-04

花生黑腐病(*Cylindrocladium black rot of peanut*,简称 CBR),别称圆锥黑斑病或大豆红顶腐烂病,是一种由寄生帚梗柱孢霉(*Cylindrocladium parasiticum* Crous, Wingfield & Alfenas) 侵染引起的真菌性病害^[1-2]。该病害最早于 1965 年在美国乔治亚州的花生产区被发现^[1],目前已蔓延到美国东南部、日本、印度及澳大利亚的花生产区^[1-4]。该病害可侵染花生的果针、荚果和根系,罹病部位变黑腐烂,并导致植株萎蔫和死亡,是一种毁灭性的病害^[5]。由于其潜在危险性,我国于 2007 年将寄生帚梗柱孢霉列入《中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录》中^[6-7]。花生黑腐病是一种典型的土传和种传病害。其中,种子传播是病害迅速蔓延的最主要原因,这也加大了其防治难度。农业防治采取 3~5 年轮作的防治方法,该方法仅能控制微小菌核数量,不能有效控制病害的发生;化学防治方面,目前没有有效的杀菌剂可以使用;在发病严重区域,土壤熏蒸可起到一定作用,但是费用昂贵^[7-8]。目前,我国对花生黑腐病病害防治的主要方法是培养抗性品种,但目前还没有培育出高抗品种,只有一些中抗的花生品种^[9]。因此,从分子生物学角度进一步研究花生黑腐病菌致病机制对于该病的防治具有重要意义。

碳水化合物水解酶类(carbohydrate active enzymes,简称 CAZymes)在病原真菌的致病过程中具有重要的作用。病原真菌分泌的碳水化合物水解酶参与了侵染寄主植株的过程,是植物病原菌侵染过程中突破寄主细胞第 1 道屏障的关键因

素。碳水化合物水解酶类尤其是植物细胞壁降解酶对病原菌的侵染能力和特性具有重要作用^[10-11]。近年来,随着越来越多病原菌全基因组测序的完成,CAZymes 的注释和比较分析成为了重要的研究方向^[12]。近年来,碳水化合物结构与功能活性酶类(carbohydrate-active enzymes database,简称 CAZy)数据库的建立^[13]极大地推进了国内外学者对于植物病原菌细胞壁降解酶活性基因的注释与聚类分析工作。目前 CAZymes 主要分为 6 大类分别为辅助酶类家族(auxiliary activities,简称 AAs)、糖基转移酶(glycosyl transferases,简称 GTs)、糖苷水解酶(glycoside hydrolases,简称 GHs)、多糖裂解酶(polysaccharide lyases,简称 PLs)、碳水化合物酯酶(carbohydrate esterases,简称 CEs)、碳水化合物绑定结构家族(carbohydrate-binding modules,简称 CBMs)^[14]。目前,已经有多种病原菌的 CAZymes 得到分析^[10,15-16]。但是迄今为止,对帚梗柱孢霉 CAZymes 的分析仍未见报道。笔者所在实验室前期测定并组装了花生黑腐病菌 Cylpar14017 菌株的全基因组序列,本研究在此基础上利用生物信息学手段对其 CAZymes 进行注释分析,揭示 CAZymes 家族的分类情况,以期今后深入开展其 CAZymes 的功能研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 基因组数据来源

本研究分析所用基因组数据来源于仲恺农业工程学院植物病理学研究所前期测序获得的花生黑腐病菌 Cylpar14017 菌株的全基因组拼接序列,共包含 18 366 个蛋白序列。

1.2 方法

CAT(CAZymes Analysis Toolkit, <http://cricket.ornl.gov/cgi-bin/cat.cgi>)数据包是专门用于 CAZymes 注释和分析的程序^[14]。基于 dbCAN 数据库,用 Hmmer 3.0 搜索 CAZymes 的编码基因,采用 hmmscan-parser 和 all.hmm.ps.len 进行处

收稿日期:2018-07-26

基金项目:广东省普通高校特色创新项目(编号:2016KTSCX060)。

作者简介:陈欣瑜(1994—),女,四川自贡人,硕士研究生,主要从事植物病理学研究。E-mail:1084918406@qq.com。

通信作者:董章勇,博士,副教授,主要从事植物病理学研究。E-mail:dongzhangyong@hotmail.com。

理,然后通过 CAT 程序进行 CAZymes 比对预测,获得花生黑腐病菌的 CAZymes 蛋白。用 Blast2GO 分析花生黑腐病菌 CAZymes 蛋白,结合 WEGO 整理分析结果。

2 结果与分析

2.1 花生黑腐病菌 CAZymes 总体分布

将“1.1”节中获得的 18 366 个序列和 CAT 数据包进行比对,共有 1 114 个蛋白序列,获得注释水解酶家族总数为 1 197 个。其中 CBM 为 99 个、CE 为 300 个、GH 为 422 个、GT 为 137 个、PL 为 48 个、AA 为 191 个。GHs 含量最高,占总数的 35%,CEs、AAs、GTs、CBMs、PLs 分别占总数的 25%、16%、11%、8%、4%(图 1)。而 CBM 的 99 个基因归类于 22 个基因家族;CE 的 300 个基因归类为 12 个基因家族;GH 的 422 个基因归类在 64 个基因家族;GT 的 137 个基因归类为 37 个基因家族;PL 则为 8 个家族,而 AA 的 191 个基因归类于 9 个家族中。

2.2 花生黑腐病菌中含有的 GHs

根据糖苷水解酶数据进行分析结果(图 2)显示 GH109 数量最多,为 52 个,紧随其后为 GH3,为 48 个,同时 GH16、GH18、GH28、GH31、GH43、GH47、GH5、GH76、GH78 数量较

多,均超过了 10 个。该类别为六大水解酶类中亚家族数最多的类别,共有 64 个亚家族类别。

2.3 花生黑腐病菌中含有的 GTs

根据糖基转移酶数据进行分析结果(图 3)发现,GT2 数量远远多于其他亚家族,为 31 个,约占 GTs 总数量的 23%。其次,GT1 和 GT32 的数量也较多,都为 13 个。除此之外,还含有 GT4、GT64、GT90 等 34 类蛋白。该类别为六大水解酶类中亚家族数第 2 多的类别。

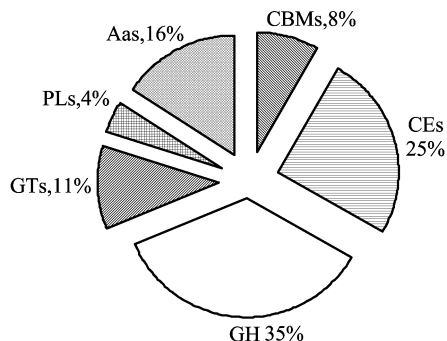


图1 6种碳水化合物水解酶类数量分布

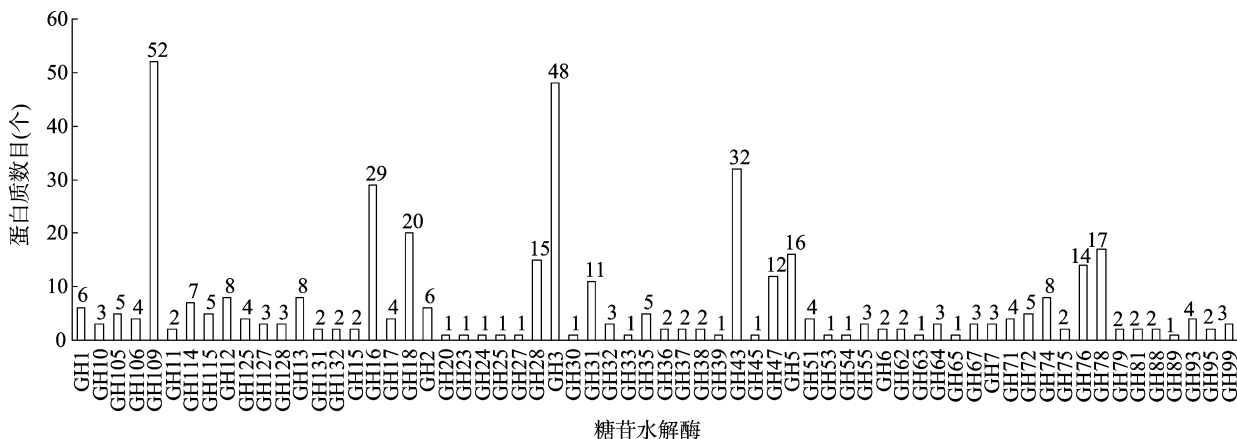


图2 糖苷水解酶(GHs)蛋白分布情况

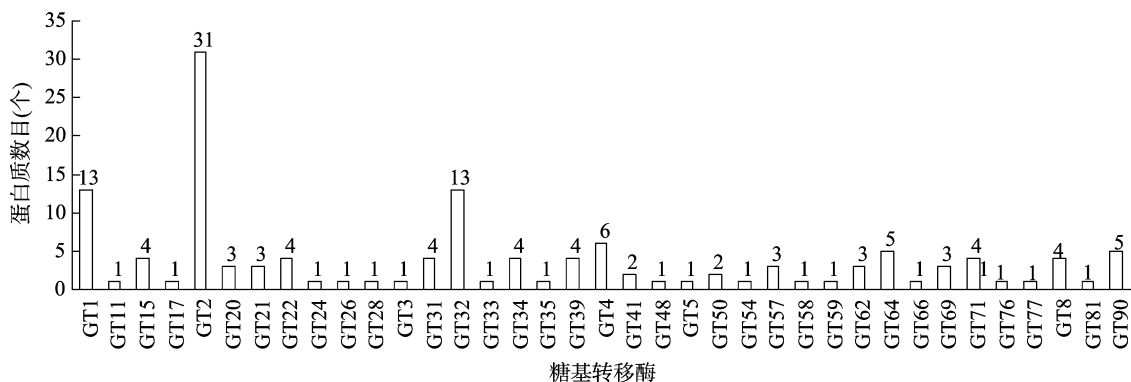


图3 糖基转移酶(GTs)蛋白分布情况

2.4 花生黑腐病菌中含有的 CBMs

根据碳水化合物结合结构家族数据进行分析结果(图 4)表明,数量最多的蛋白类别为 CBM50,为 20 个,约占 CBMs 总数的 20%,其次是 CBM1,约占 CBMs 总数的 15%。除此之外,还含有 CBM18、CBM67、CBM24 等 20 类蛋白。

2.5 花生黑腐病菌中含有的 CEs

根据碳水化合物酯酶数据进行分析结果(图 5)发现,CE10 数量远远多于其他亚家族,为 164 个,约占 CEs 总数量的 55%。其次,CE1 数量较多,为 51 个。除此之外,还含有 CE4、CE5、CE8、CE16 等 10 类蛋白。

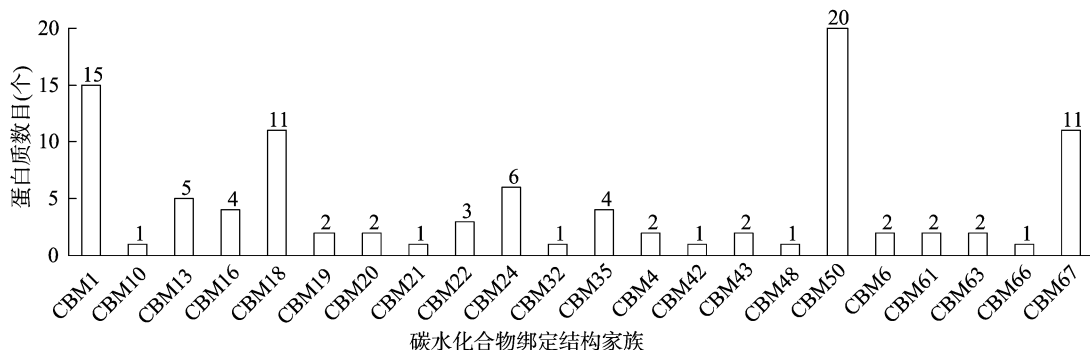


图4 碳水化合物结合结构家族(CBMs)蛋白分布情况

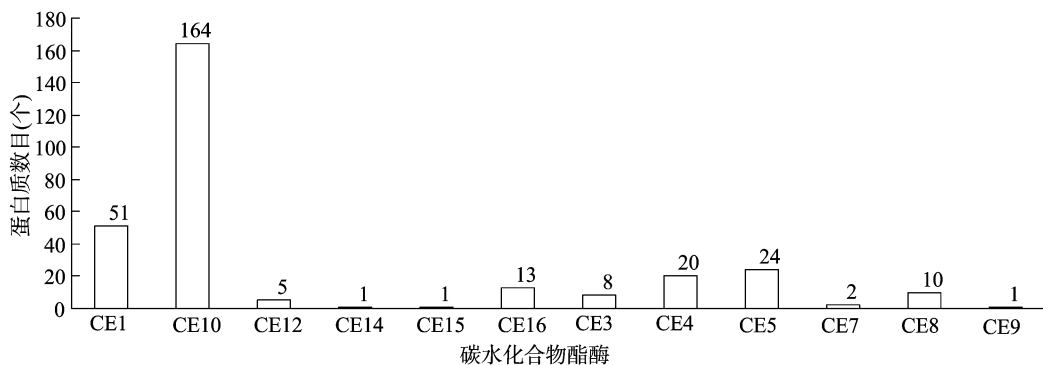


图5 碳水化合物酯酶(CEs)蛋白分布情况

2.6 花生黑腐病菌中含有的 AAs

根据辅助酶类家族数据进行分析结果(图6)发现,数量最多的蛋白类别为 AA7,为 82 个,约占 AAs 总数的 43%,其次是 AA3,约占 AAs 总数的 26%。除此之外,还含有 AA1、AA2、AA4、AA9 等 7 类蛋白。

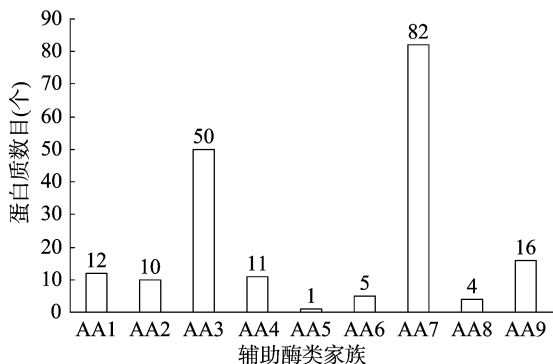


图6 辅助酶类家族(AAs)蛋白分布情况

2.7 花生黑腐病菌中含有的 PLs

根据多糖裂解酶数据进行分析结果(图7)发现,数量最多的蛋白类别为 PL1,为 20 个,约占 PLs 总数的 42%,其次是 PL3,约占总数的 27%。除此之外,还含有 PL22、PL4、PL9 等 6 类蛋白。该类别为 6 大水解酶类中亚家族数最少的类别。

2.8 花生黑腐菌 CAZymes 蛋白 Blast2GO 分析结果

根据 Blast2GO 对花生黑腐病菌 CAZymes 蛋白的功能分析结果,将 CAZymes 分为三大类,分别为生物进程、细胞成分、分子功能类(图8)。在生物进程大类中数量最多的为代谢进程类,为 311 个,约占生物进程大类总数的 69%,除此之

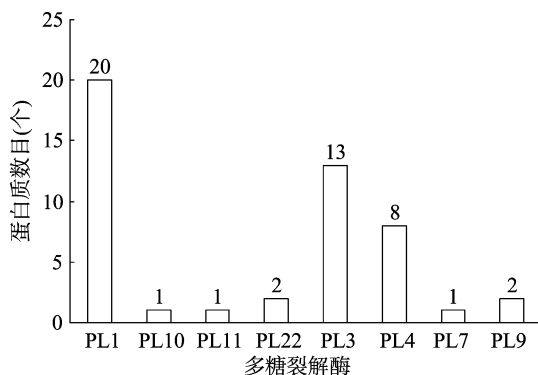


图7 多糖裂解酶(PLs)蛋白分布情况

外,还含有未进化、细胞生源或组织成分、细胞进程、生物调节进程、刺激反应、生物调节、信号命令、排毒等 8 小类。在细胞成分大类中数量最多的为细胞外区域类,为 58 个,约占细胞成分大类总数的 33%,除此之外,还含有细胞部分、细胞器部分、细胞膜、大分子复合物、细胞器、细胞膜部分、细胞外区域部分等 7 小类。在分子功能大类中数量最多的为催化活性类,为 426 个,约占分子功能大类总数的 73%,除此之外,还含有联结、转录活性调节剂、转运活性、抗氧化活性、营养储存活性等 5 小类。

3 结论与讨论

随着大量真菌基因组测序的完成,先后有人利用基因组信息开展 CAZymes 家族的预测分析。韩长志等分析了黏绿木霉(*Trichoderma virens*) Gv29-8 的 377 个分泌蛋白,并进行进一步的 CAZymes 家族分析,共得到 201 个 CAZymes^[16]。本

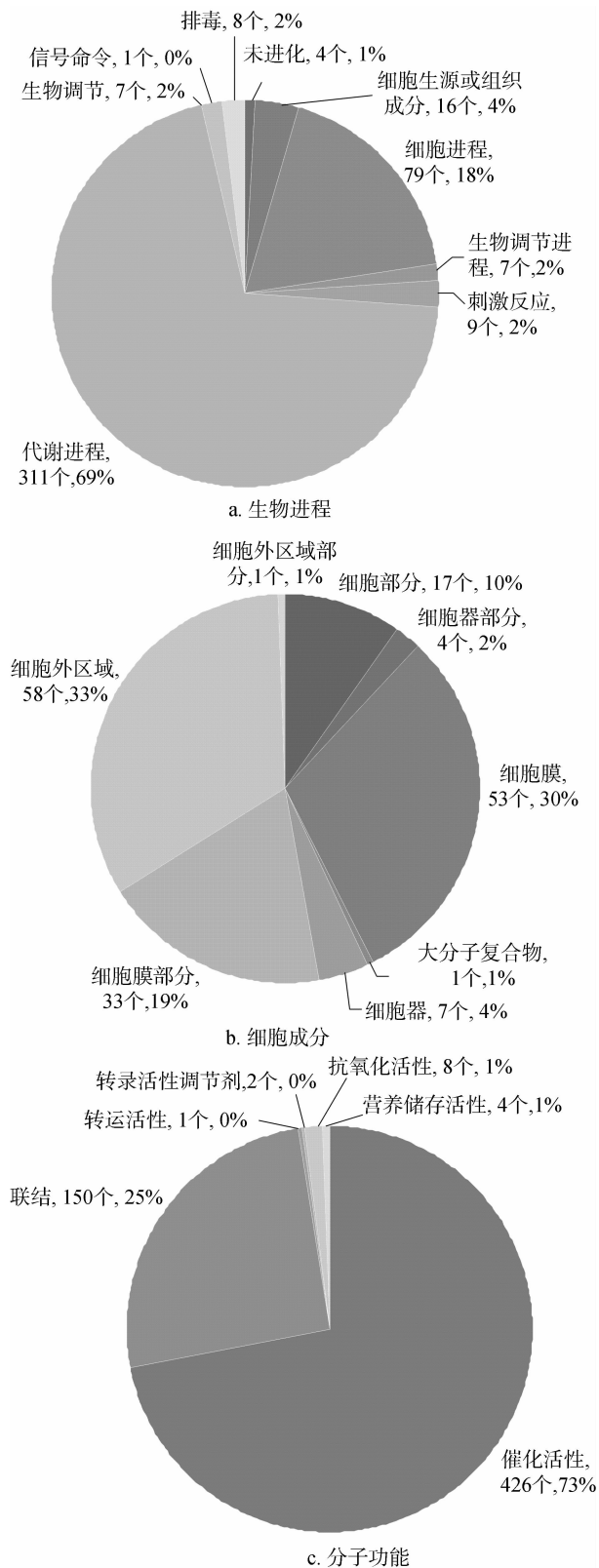


图8 CAZymes 的 GO 分析结果

本研究分析得到在花生黑腐病菌 CAZymes 家族类别中, GHs 含量最高, 占总数的 35%; 其次是 CEs、AAs 为 16%、GTs、CBMs, 分别占总数的 25%、16%、12%、8%, PLs 的含量最少, 只有 4%。GH 在大多数真菌 CAZymes 里的含量通常最高。韩长志等通过分析了黏绿木霉 Gv29-8 的分泌蛋白发现, GHs 在 CAZymes 中含量最多, 占了 46.27%^[16]。韩长志分析的禾谷炭疽菌 [*Colletotrichum graminicola* (Cesati) Wilson] 中也是 GH 最高, 占 33.33%^[18]。而其他种类往往有所差异, 在本研究中, CE 总数仅次于 GH, CBM 的数量仅为总数的 8%。而在黏绿木霉 Gv29-8 菌株中 CBM 占了 25.87%, CE 数量较少。在禾谷炭疽菌中 CBM 为总数的 19.85%, GT 数量占总数的 0.75%^[16-17]。这种数量上的差异可能是因为花生黑腐病菌和黏绿木霉、禾谷炭疽菌等病原菌遗传背景存在差异, 也可能是因为这些病原菌的寄主植物不同, 对寄主植物致病所需产生的水解酶家族和数量也会有不同。

在真菌 CAZymes 家族中往往都存在着复合类别。本研究中共有 1 114 个花生黑腐病菌蛋白序列获得注释, 得到的水解酶家族总数为 1 197 个。其中部分单个蛋白序列会获得 1 个或多个蛋白注释, 称之为复合型。韩长志等研究发现, 在多个真菌的基因组中均存在着此类现象。黏绿木霉 Gv29-8 中发现了 4 个 CBM35/GH27, 包括 2 个 CE4/CBM18、1 个 GH18/CBM1、1 个 GH7/CBM1。而禾谷炭疽菌中则发现了 30 个 GH/CBM、10 个 AA/CBM、1 个 CE/CBM 等。同一蛋白具有复合型酶注释功能, 推测此类蛋白在发挥功能方面具有复合性。

植物病原真菌通过产生大量的 CAZymes 来降解植物的多糖类物质, 以利于其对植物的侵染并获取其自身所需的营养^[18]。本研究通过大规模数据处理的方法, 对其进行 CAZymes 注释和比较分析。本研究可为花生黑腐病菌的致病因子研究提供材料和基础, 且为其他植物病原真菌 CAZymes 基因家族的分析建立了初步的筛选方法。

参考文献:

- [1] Bel D K, Sobers E K. A peg, pod, and root necrosis of peanuts caused by a species of *Calonectria* [J]. *Phytopathology*, 1966, 56 (12): 1361-1364.
- [2] Wheeler T A, Black M C. First report of *Cylindrocladium* black rot caused by *Cylindrocladium parasiticum* on peanut in Texas [J]. *Plant Disease*, 2005, 89 (11): 1245.
- [3] Wright L P, Davis A J, Wingfield B D, et al. Population structure of *Cylindrocladium parasiticum* infecting peanuts (*Arachis hypogaea*) in Georgia [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2010, 127 (2): 199-206.
- [4] Tazawa J, Takahashi M, Usuki K, et al. Nodulation during vegetative growth of soybean stage does not affect the susceptibility to red crown rot caused by *Calonectria ilicicola* [J]. *Journal of General Plant Pathology*, 2007, 73 (3): 180-184.
- [5] 刘会梅, 王向军, 封立平. 花生黑腐病研究进展 [J]. *中国植保导刊*, 2010 (5): 19-21.
- [6] 盖云鹏, 潘汝谦, 徐大高, 等. 进境检疫性有害生物——寄生帚梗柱孢霉 [J]. *植物检疫*, 2014 (4): 76-81.

研究并未对花生黑腐病菌 Cylpar 14017 全基因组进行分泌蛋白的筛选, 共有 1 114 个花生黑腐病菌蛋白序列获得注释, 得到的水解酶家族总数为 1 197 个。通过分析可知, 所得的 CAZymes 里包含有大量的非分泌蛋白。

姜 竹,陈丹丹,刘宏波. 花生 3-磷酸甘油酰基转移酶基因的功能鉴定[J]. 江苏农业科学,2019,47(22):56-60.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.22.011

花生 3-磷酸甘油酰基转移酶基因的功能鉴定

姜 竹,陈丹丹,刘宏波

(浙江农林大学农业与食品科学学院,浙江杭州 311300)

摘要:花生(*Arachis hypogaea*)是我国的主要油料作物,花生油脂的合成受 3-磷酸甘油酰基转移酶(GPAT)调控,但其调控机制尚不清楚。从花生中克隆了 13 个 GPAT 基因,编码含有 4 个酰基转移酶保守结构域的蛋白;同时,运用酵母遗传互补体系对基因功能进行了鉴定。在该体系中,酵母双突变体菌株 ZAFU1($\Delta gat1/\Delta gat2$)因缺少 GPAT 而不能在特定的葡萄糖培养基上生长。结果表明,AhGPAT1/2/3/6/9 与空白载体一样,其导入并不能恢复酵母双突变体 ZAFU1 在葡萄糖中的生长缺陷,而 AhGPAT5B、AhGPAT7A/B 的导入能恢复酵母双突变体 ZAFU1 在葡萄糖中的生长缺陷,说明上述 3 个基因具有酰基转移酶活性,从而为进一步研究花生油脂的合成代谢调控提供了参考。

关键词:花生;3-磷酸甘油酰基转移酶(GPAT);遗传互补;酵母双突变体菌株

中图分类号: S565.201 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)22-0056-05

油脂是高等植物的主要能量储存形式,可为植物的种子萌发、花粉发育和有性生殖等提供能量,对于植物的生长发育至关重要^[1]。植物油可为人类提供能量和营养,同时也是重要的工业原料^[2]。我国的花生(*Arachis hypogaea*)总产量、单位面积产量和出口量一直位居我国油料作物之首,在我国油脂供应、出口创税和国民经济发展中占有举足轻重的地位,但是花生油脂的合成机制目前尚不清楚^[3-4]。

植物油的主要成分是三酰甘油(TAG),由 3-磷酸甘油酰基转移酶(GPAT)、溶血磷脂酰基转移酶(LPAAT)和二酰甘油酰基转移酶(DGAT)依次催化脂肪酸链掺入甘油骨架

的 sn-1、sn-2、sn-3 位而生成^[5-6]。目前,关于甘油酯合成前 2 步酰化反应的酶,特别是第 1 步酰化反应的酶知之甚少。研究者在拟南芥、油菜、水稻和向日葵等多种植物中已成功克隆了多个编码酰基转移酶的 GPAT 基因^[7],但普遍认为,除了 ATSI,只有 GPAT9 直接参与甘油酯的合成,其他 GPAT 是否参与甘油酯合成并不清楚^[8-10]。已有研究者从花生中克隆了部分 GPAT 基因,并对其表达特性进行了分析,但是关于花生 GPAT 酶的特性尚无相关报道^[11-12]。本研究从山花 15 中分离了 13 个 3-磷酸甘油酰基转移酶基因,并用酵母遗传互补体系对上述基因进行了功能鉴定,发现 AhGPAT1/2/3/6/9 不能恢复酵母双突变体 ZAFU1 在葡萄糖中的生长, AhGPAT5B、AhGPAT7A/B 能恢复酵母双突变体 ZAFU1 在葡萄糖中的生长,说明上述 3 个基因具有酰基转移酶活性。

1 材料与方法

1.1 试验材料

花生品种山花 15、酵母菌株 ZAFU1^[13]、大肠杆菌菌株

收稿日期:2019-04-26

基金项目:国家重点研发计划(编号:2018YFD1000906-3)。

作者简介:姜 竹(1993—),女,山东青岛人,硕士研究生,主要从事植物脂类代谢研究。Tel:(0571)61100162;E-mail:2862446587@qq.com。

通信作者:刘宏波,博士,副教授,主要从事植物油脂代谢与生理生化研究。Tel:(0571)61100162;E-mail:hbliu@zafu.edu.cn。

[7]潘汝谦,关铭芳,徐大高,等. 警惕花生黑腐病菌的入侵[J]. 植物保护,2011,37(1):164-165.

[8]潘汝谦,关铭芳,徐大高,等. 花生黑腐病菌的生物学特性[J]. 华中农业大学学报,2011,30(6):701-706.

[9]蓝国兵,何自福,余小漫,等. 广东花生主要品种对黑腐病菌的抗性水平鉴定[J]. 生物安全学报,2016,25(3):214-217.

[10]陈相永,陈捷胤,肖红利,等. 植物病原真菌寄生性与分泌蛋白组 CAZymes 的比较分析[J]. 植物病理学报,2014,44(2):163-172.

[11] van den Brink J, de Vries R P. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation [J]. Applied microbiology and biotechnology,2011,91(6):1477.

[12] Lombard V, Golaconda Ramulu H, Drula E, et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013 [J]. Nucleic Acids Research,2014,42(1):490-495.

[13] Cantarel B L, Coutinho P M, Rancurel C, et al. The carbohydrate -

active enzymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics[J]. Nucleic Acids Research,2009,37:233-238.

[14] Park B H, Karpinet T V, Syed M H, et al. CAZymes analysis toolkit (CAT): web service for searching and analyzing carbohydrate-active enzymes in a newly sequenced organism using CAZy database [J]. Glycobiology,2010,20(12):1574-1584.

[15] 韩长志. 全基因组预测希金斯炭疽菌中碳水化合物酶类蛋白[J]. 江苏农业科学,2017,45(2):24-28.

[16] 韩长志,许 僖. 黏绿木霉 Gv29C8 的碳水化合物活性酶类蛋白预测及遗传关系分析[J]. 华中农业大学学报,2017,36(5):39-44.

[17] 韩长志. 基于全基因组测序的禾谷炭疽菌中碳水化合物酶类蛋白预测[J]. 河南师范大学学报(自然科学版),2016,44(4):118-124.

[18] Zhao Z T, Liu H Q, Wang C F, et al. Comparative analysis of fungal genomes reveals different plant cell wall degrading capacity in fungi [J]. BMC Genomics,2013,14(1):1-15.