



李培谦,杨瑾,冯宝珍.灰葡萄孢基因组果胶酶生物信息学分析[J].黑龙江农业科学,2021(2):17-22.

# 灰葡萄孢基因组果胶酶生物信息学分析

李培谦,杨瑾,冯宝珍

(运城学院 生命科学系,山西 运城 044000)

**摘要:**为有效防控果蔬灰霉病,本研究采用生物信息学方法对灰葡萄孢基因组内果胶酶的分布情况、理化性质及三级结构进行了分析。结果表明:灰葡萄孢基因组内检索出6条PG氨基酸序列,4条PME蛋白氨基酸序列和4个PEL家族蛋白。BcPG1~BcPG16蛋白序列长度为370~514 aa,信号肽长度在16~22 aa,磷酸化位点丰富;BcPME1~BcPME14蛋白序列长度为327~348 aa,信号肽长度在18~23 aa,都不存在N-糖基化位点,磷酸化位点多;BcPEL1~BcPEL4蛋白序列长度为236~353 aa,信号肽长度在17~20 aa,存在多个O-糖基化位点,磷酸化位点多。3种果胶酶氨基酸序列分别存在保守区域,三级结构预测结果显示同一家族存在相似结构域,进化分析表明灰葡萄孢中的3种果胶酶具有保守性。

**关键词:**灰霉病;多聚半乳糖醛酸酶;果胶酯酶;果胶裂解酶;基因组

植物细胞壁具有一定的机械强度和刚性以保护植物免受病原感染,是防御病原物的第一道屏障。而病原物能够分泌大量的细胞壁降解酶(cell wall degrading enzymes, CWDEs),既能使其侵入寄主又能满足自身营养需求,成功定殖<sup>[1]</sup>。在侵染过程中,CWDEs作为病原菌的毒力因子发挥重要作用。例如,木聚糖酶 *Xyn11A* 基因的缺失对灰霉侵染番茄叶片和葡萄浆果的能力有显著影响<sup>[2]</sup>。而内木聚糖酶 *xynB* 与水稻黄单胞菌毒力有关<sup>[3]</sup>。另外,植物能够通过感应 CWDEs 或者自身细胞壁释放的多糖以激发自身的防御系统<sup>[4]</sup>。近年来,研究已发现多种植物病原菌的 CWDEs 能够参与 PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) 诱导植物防御反应。大豆疫霉 (*Phytophthora sojae*) 的糖苷水解酶 GH12 和 *xeg1*、棉花枯萎病 VdEG1 和 VdEG3、VdPEL1, 灰霉菌分泌的木葡聚糖酶 BcXYG1 等都作为 PAMPs 既具有致病力又同时能触发植物免疫反应<sup>[5-7]</sup>。而果胶酶就属于 CWDEs 中的一大类,又包括多聚半乳糖醛酸酶(polygalacturonase, PG)、果胶酯酶(pectin methylesterase, PME)以及果胶

裂解酶(pectin lyase, PEL)<sup>[8]</sup>。3种酶协同作用降解果胶,PEL可以直接水解高度酯化的果胶<sup>[9]</sup>,PME去除半乳糖醛酸基部分上的甲酯基团,生成甲醇和酸性果胶,再由PG、PEL继续降解<sup>[10]</sup>。果胶酶在真菌、细菌基因组中以基因家族的形式广泛存在,在侵染过程中,果胶酶作为病原菌的毒力因子发挥重要作用<sup>[7]</sup>。

灰霉病主要由灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)引起,在植物生长发育过程中及果蔬采后储藏期间均可发病,造成严重损失。该病菌寄主范围广泛,繁殖快,易变异,几乎对所有农药产生了抗性。灰霉病的防控仍然是生产中的难题。因此分析灰葡萄孢基因组致病因子、发掘抗性基因对该病害的防控具有重要科学意义。本文采用生物信息学方法对灰葡萄孢基因组内果胶酶的分布情况、理化性质及三级结构进行了分析,为有效防控果蔬灰霉病提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 数据来源

灰葡萄孢(*B. cinerea* B05.10)基因组数据由NCBI (National Center for Biotechnology Information)下载。

### 1.2 基因组信息分析

从NCBI下载已报道的真菌、细菌的PG、PME和PEL的基因,其基因银行号分别为PG(AAA62349.1、BAA24524.1、CUA74723.1、

收稿日期:2020-11-05

**基金项目:**国家自然科学基金(31501665);山西省重点研发计划项目(201903D211001-1);山西省教育厅科技创新项目(2019L0849,2019L0851)。

**第一作者:**李培谦(1983—),男,博士,副教授,从事植物病原菌生物防治研究。E-mail: lipeiianfly@126.com。

**通信作者:**冯宝珍(1981—),女,博士,教授,从事植物病原菌抗药机理研究。E-mail: fengbaozhen@126.com。

GAO92307.1 和 AUJ09168.1)、PME (AXH37591.1、CAD21438.1、OAG23893.1 和 WP\_132009657.1)、PEL ( AAC64368.1、EMR89234、EGY16604、AVI47216 和 WP\_116923571)。以下载的序列为诱饵,利用 TBLASTN 软件对灰葡萄孢基因组内的相关基因序列进行筛查分析,参数设置为 E-value cut-off<10-15,检测相应的果胶酶基因。

1.3 序列分析

利用 DNAMAN 软件中的 Protein 程序分析氨基酸序列的组成及理化性质。利用在线软件 SignalP v5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)<sup>[11]</sup>将获得的基因的氨基酸序列进行信号肽分析。同时利用 NCBI CDD(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>)软件对蛋白功能域进行分析。蛋白质 N-糖基化位点(N-glycation sites)、O-糖基化位点(O-glycation sites)和磷酸化位点(phosphorylation sites)均在 CBS 在线服务软件预测(<http://www.cbs.dtu.dk/services>)<sup>[12]</sup>。

1.4 系统进化分析

将得到的蛋白序列用 MEGA X 构建进化树,所有设置采用其默认值,采用邻近结合法(neighbor-joining,即 NJ)构建距离树,进行 1 000 次bootstrap 自举法检验。

1.5 果胶酶蛋白二级及三级结构预测

利用 ExPaSy 提供的在线 SOPMA 程序预测分析蛋白二级结构特性,包括  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠和无规则卷曲。利用 ExPaSy 提供的 Prot Param tool(<http://web.expasy.org>)进行同源建模分析蛋白序列三级结构特性,预测蛋白质的空间模型<sup>[11]</sup>。

2 结果与分析

2.1 灰葡萄孢基因组 PG 基因家族分析

根据灰葡萄孢(*Botrytis cinerea* B05.10)基因组编码蛋白检索出其 PG 家族蛋白,去除冗余序列共得到 6 条灰葡萄孢 PG 氨基酸序列,命名为 BcPG1~BcPG6(表 1)。BcPG1~BcPG6 蛋白序列长度为 370~514 aa,预测分子量为 37.87~50.72 kDa,等电点(PI)为 4.23~8.84。除了 BcPG2 外,所有序列都具备信号肽,长度为 16~22 aa。BcPG1 没有 N-糖基化位点,其余序列为 1~5 个;BcPG3 具有 32 个 O-糖基化位点,其他序列较少。各序列中磷酸化位点非常丰富,最多达到 84 个(表 1)。与下载的细菌、真菌 PG 氨基酸序列进行比对,发现在真菌中 PG 具有保守的氨基酸基序,如“NQDDC”和“CSGGHGLSIGSVG”(图 1)。

表 1 灰葡萄孢基因组果胶酶信息分析

蛋白名称	Genbank	氨基酸	分子量/kDa	信号肽/aa	等电点	N-糖基化位点	O-糖基化位点	磷酸化位点
BcPG1	XP_001550077.1	382	37.94	20	8.05	0	2	47
BcPG2	XP_024552770.1	402	41.07	无	8.84	4	5	44
BcPG3	XP_024548409.1	514	50.72	16	4.41	4	32	84
BcPG4	XP_024547538.1	397	40.93	22	4.49	1	4	65
BcPG5	XP_024546447.1	380	38.24	19	4.23	1	5	55
BcPG6	XP_001552698.1	370	37.87	21	5.03	5	3	51
BcPME1	XP_024550333.1	346	37.24	20	6.28	0	7	45
BcPME2	XP_001560589.1	348	37.99	19	4.38	0	6	47
BcPME3	XP_001550078.1	327	34.51	18	6.14	0	9	65
BcPME4	XP_024546734.1	332	34.89	23	7.52	0	3	45
BcPEL1	XP_001554464.1	236	24.72	19	5.78	0	6	23
BcPEL2	XP_001551403.1	353	36.05	20	4.56	0	57	74
BcPEL3	XP_024552848.1	335	34.71	19	6.22	0	18	46
BcPEL4	XP_001560884.1	329	34.41	17	7.80	0	9	49

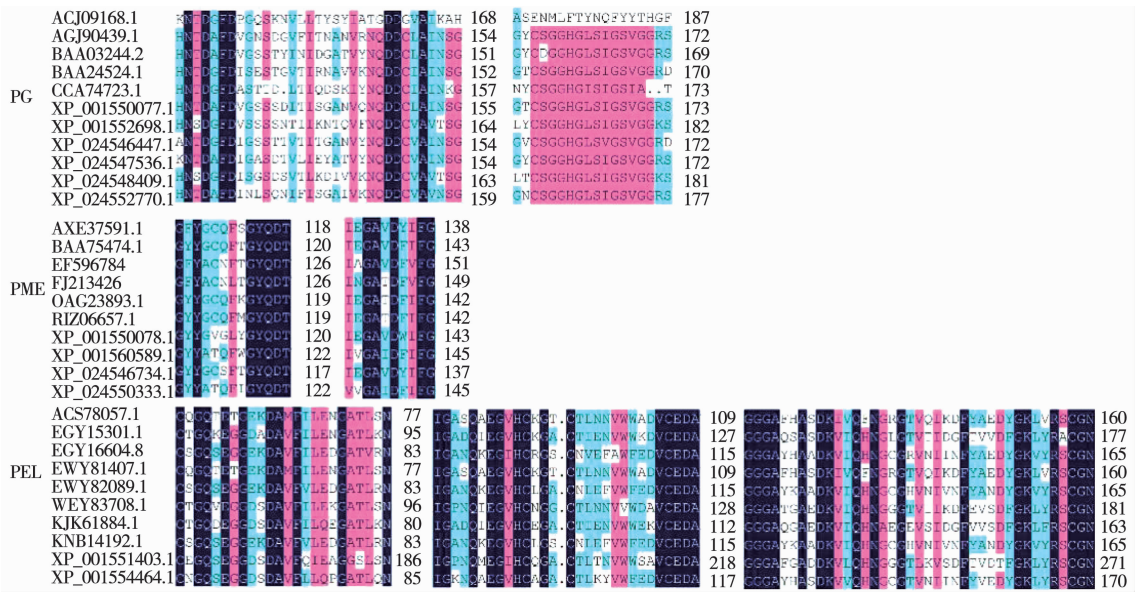


图 1 灰葡萄孢 PG、PME 和 PEL 序列比对

2.2 灰葡萄孢基因组 PME 基因家族分析

灰葡萄孢基因组中共检索出 4 条 PME 蛋白氨基酸序列,命名为 BcPME1~BcPME4 (表 1)。BcPME1~BcPME4 蛋白序列长度为 348~327 aa,预测分子量为 34.51~37.99 kDa,PI 为 4.38~7.52。所有序列都具备信号肽,长度为 18~23 aa。BcPME1~BcPME4 都没有 N-糖基化位点;具有 3~9 个 O-糖基化位点;各序列中磷酸化位点较丰富,为 45~65 个(表 1)。与下载的细菌、真菌 PME 氨基酸序列进行比对,发现在真菌中 PME 具有保守的氨基酸基序,如“GYQDT”和“DFI/VFG”(图 1)。

2.3 灰葡萄孢基因组 PEL 基因家族分析

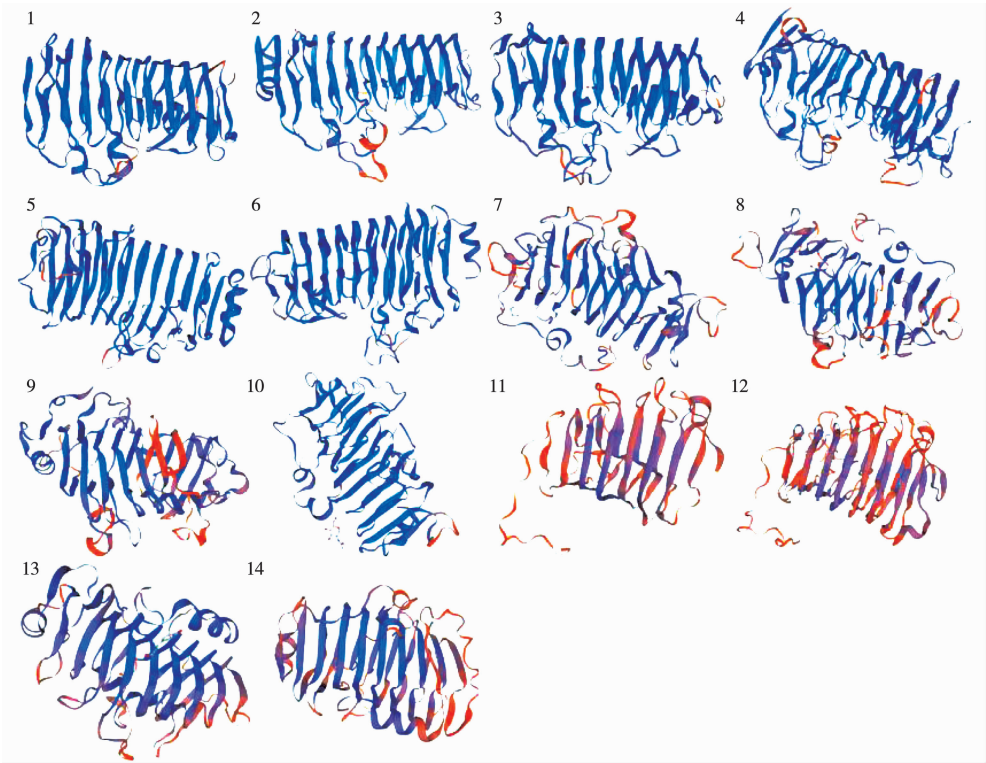
灰葡萄孢基因组共检索出 4 条 PEL 家族蛋白氨基酸序列,命名为 BcPEL1~BcPEL4(表 1)。BcPEL1~BcPEL4 蛋白序列长度为 236~353 aa,预测分子量为 24.72~36.05 kDa,PI 为 4.56~7.80。所有序列都具备信号肽,长度为 17~20 aa。BcPEL1~BcPEL4 都没有 N-糖基化位点;具有较多的 O-糖基化位点,其中 BcPEL2 具有 57 个 O-糖基化位点;各序列中磷酸化位点较丰富,为 23~74 个(表 1)。与细菌、真菌 PEL 氨基酸序列具有高度保守的氨基酸基序,如“VCEDA”“GGGA”和“GKLV/Y/FRSCGN”(图 1)。

2.4 果胶酶蛋白三级结构分析

利用 ProtParam tool 对灰葡萄孢果胶酶氨基酸进行同源建模,结果显示同类果胶酶具有相似的三级结构(图 2)。BcPG1~BcPG 6 的三级结构非常相似,由多个平行的  $\beta$  片层形成一个疏水的“口袋”结构,主螺旋上伸出大小不等的 loop 环。BcPME1~BcPME 4 在整体折叠上表现出高度相似性,由右螺旋平行的  $\beta$  片层及转角形成主要结构,螺旋内部形成疏水空间。蛋白序列 5' 和 3' 氨基酸形成较多无规则卷曲。BcPEL1~BcPEL 4 同源建模三级结构相似,氨基酸主链形成以  $\beta$  片层为主的右螺旋结构,中央螺旋上形成大小、组成不同的环。

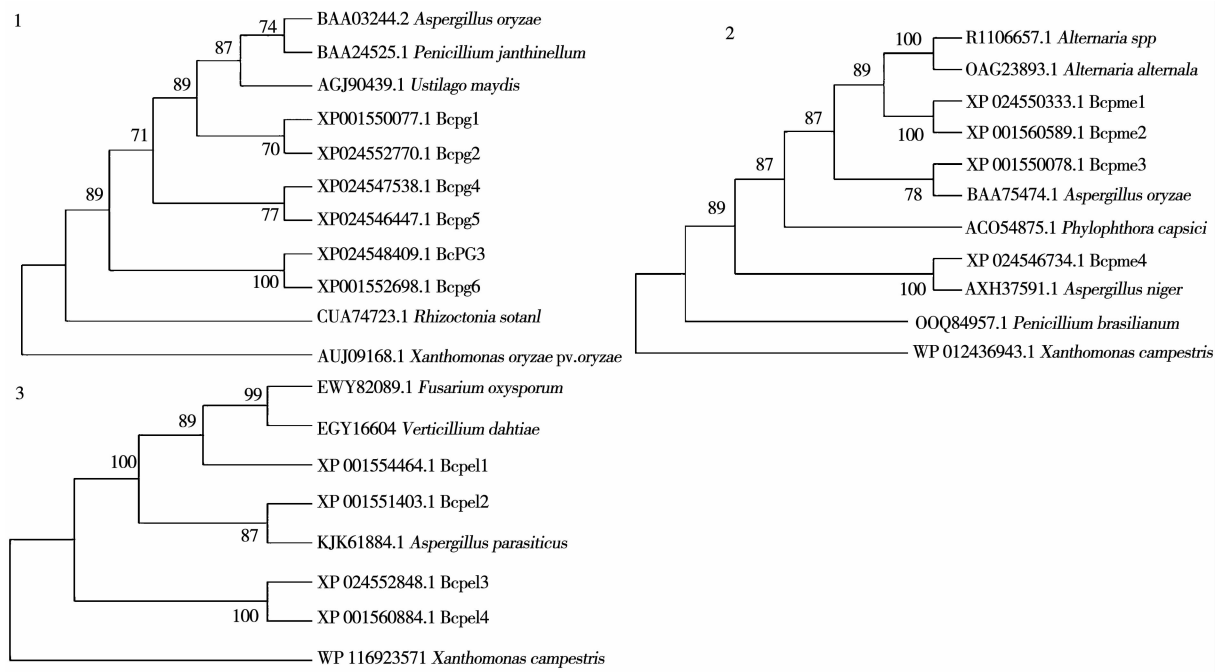
2.5 系统进化分析

如图 3 所示,BcPG1 和 BcPG 2,BcPG4 和 BcPG 5,BcPG3 和 BcPG 6 分别聚成一枝,与真菌 PG 亲缘关系近,与细菌 PG 明显分开(图 3-1)。BcPME1~BcPME 3 聚为一簇,BcPME4 与 *Aspergillus niger* PME 聚为一枝,与细菌 PME 亲缘关系较远(图 3-2)。BcPEL3 和 BcPEL 4 聚成一枝,BcPEL1 与来自 *Fusarium oxysporum*、*Verticillium dahliae* 的 PEL 聚到一起,而 BcPEL2 与 *Aspergillus parasiticus* 聚到一起(图 3-3)。总之,灰葡萄孢 PG、PME、PEL 均能与真菌 PG、PME 及 PEL 聚在一起,明显与细菌分开。



1~6: 分别对应 BcPG1~BcPG6; 7~10: 分别对应 BcPME1~BcPME4; 11~14: 分别对应 BcPEL1~BcPEL4

图 2 灰葡萄果胶酶蛋白三级结构预测



1: PG; 2: PME; 3: PEL

图 3 系统进化树

### 3 结论与讨论

细胞壁是植物抵抗病原菌侵入的天然屏障,而病原体通过分泌一系列 CWDEs 穿透细胞壁侵入,成功定殖<sup>[13]</sup>。由于植物细胞壁的重要成分为果胶,因此 CWDEs 中果胶酶在降解果胶中起到重要作用而备受关注。本文利用生物信息学方法分析了灰葡萄孢基因组内三类果胶酶的分布、蛋白序列理化性质、信号肽及糖基化位点分布情况,并对三类果胶酶序列进行了氨基酸序列比对分析,利用在线同源建模法预测了各蛋白的三级结构,构建了系统进化树,分析了不同物种中 3 类果胶酶的亲缘关系。

灰葡萄孢基因组中多聚半乳糖醛酸酶家族存在 6 个成员, BcPG 大小为 370~514 aa, 大部分具有信号肽序列, 说明这些蛋白跨膜表达。序列比对显示不同物种 PG 存在保守基序, 且与前人研究结果一致<sup>[14]</sup>。三级结构预测模型与已报道的 PG 结构类似, 都是右螺旋的  $\beta$ -片层组成的“口袋”结构<sup>[15]</sup>。该基因组中果胶酯酶家族存在 4 个成员, BcPME 大小为 327~348 aa, 都具有信号肽序列。不同物种 PME 序列存在保守区域, 但是序列间也存在很大差异, 与前人报道结果一致<sup>[16]</sup>。BcPME1~BcPME 4 序列三级折叠与已有报道的 PME 结构类似<sup>[17]</sup>。该基因组中果胶裂解酶家族有 4 个成员 BcPEL1~BcPEL4, 大小在 236~353 aa, 都具有信号肽序列。PEL 序列间差异较大, 但真菌 PEL 序列仍存在一些保守位点, 本文分析结果与前人研究结果一致<sup>[7]</sup>。其三级结构与 *Aspergillus niger* 裂解酶晶体结构很相似<sup>[18]</sup>。

此外, 三类灰葡萄孢果胶酶蛋白序列系统进化分析结果表明, 三类果胶酶在各物种中具有保守性, 但序列间又存在差异。来源真菌的三类果胶酶亲缘关系较近, 与细菌的果胶酶能明显分开, 该分析结果也与前人分析结果一致<sup>[7,16,19]</sup>。

随着基因组学和蛋白组学时代的到来, 利用

生物信息学对病原菌基因组进行分析, 挖掘目的基因, 对于在分子和蛋白水平解析这些基因功能具有重要意义。这也为植物病原菌致病机理研究和抗病机制研究提供了重要前期基础。

### 参考文献:

- [1] Klöckner A, Bühl H, Viollier P, et al. Deconstructing the chlamydial cell wall[J]. Current Topics in Microbiology Immunology, 2016, 412: 1-33.
- [2] Brito N, Espino J J, González C. The endo-beta-1, 4-xylanase xyn11A is required for virulence in *Botrytis cinerea*[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2006, 19: 25-32.
- [3] Pandey A, Sonti R V. Role of the feob protein and siderophore in promoting virulence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* on rice[J]. Journal of Bacteriology, 2010, 192: 3187-3203.
- [4] Misas-Villamil J C, van der Hoorn R A. Enzyme-inhibitor interactions at the plant - pathogen interface[J]. Current Opinion on Plant Biology, 2008, 11: 380-388.
- [5] Gui Y, Zhang W, Zhang D, et al. A *Verticillium dahliae* extracellular cutinase modulates plant immune. Responses[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2017, 31: 260-273.
- [6] Zhu W, Ronen M, Gur Y, et al. BcXYG1, a secreted xyloglucanase from *Botrytis cinerea*, triggers both cell death and plant immune responses[J]. Plant Physiology, 2017, 175: 438-456.
- [7] Yang Y, Zhang Y, Li B, et al. A *Verticillium dahliae* pectate lyase induces plant immune responses and contributes to virulence[J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 1271.
- [8] Collmer A, Keen N T. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis[J]. Annual Review of Phytopathology, 1986, 24: 383-409.
- [9] Alana A, Gabilondo A, Hernando F, et al. Production of pectin lyase by a *Penicillium italicum* strain[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1989, 55: 1612-1616.
- [10] Wu M C, Lin G H, Wang Y T, et al. Novel cross-linked alcohol-insoluble solid(CI-Ais)affinity gel from Pea Pod for pectin esterase purification [J]. Journal of Agricultural Food Chemistry, 2005, 53: 7991- 7996.
- [11] 冯宝珍, 李培谦, 成娟丽, 等. 辣椒疫霉 NPP 效应子基因家族生物信息学分析[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(7):

- 28-32.
- [12] 解晓冬,耿雅萍,张鹏飞,等. 8 种易裂果实中果胶酶生物信息学分析[J]. 山西农业大学学报(自然科学版),2020,40(2):42-53.
- [13] Kubicek C P,Starr T L,Glass N L. Plant cell wall-degrading enzymes and their secretion in plant-pathogenic fungi[J]. Annual Review of Phytopathology, 2014, 52: 427-451.
- [14] Markovic O,Janecek S. Pectin degrading glycoside hydrolases of family 28: sequence-structural features, specificities, and evolution [J]. Protein Engineering, 2001, 14: 615-31.
- [15] Evangelista D E,Evandro A de Araújo, Neto M O, et al. Biochemical characterization and low-resolution SAXS structure of an exo-polygalacturonase from *Bacillus licheniformis*[J]. New Biotechnology,2017,40:268-274. .
- [16] Markovic O,Janecek S. Pectin methylesterases: sequence-structural features and phylogenetic relationships[J]. Carbohydrate Research,2004,339: 2281-2295.
- [17] Jolie R P,Duvetter T,Loey A M V, et al. Pectin methylesterase and its proteinaceous inhibitor: a review[J]. Carbohydrate Research,2010,345(18): 2583-2595.
- [18] Vitali J,Schick B,Kester H C M, et al. The three-dimensional structure of *Aspergillus niger* pectin lyase B at 1.7-Å resolution[J]. Plant Physiology,1998,116(1): 69-80.
- [19] Ke X,Wang H,Li Y, et al. Genome-wide identification and analysis of polygalacturonase genes in *Solanum lycopersicum* [J]. International Journal of Molecular Sciences,2018,19(8):2290.

## Bioinformatics Analysis of Pectinase in *Botrytis cinerea* Genome

LI Pei-qian, YANG Jin, FENG Bao-zhen

(Department of Life Science, Yuncheng University, Yuncheng 044000, China)

**Abstract:** In order to control the gray mold effectively, the distribution, physical and chemical properties, and tertiary structure of pectinase in *Botrytis cinerea* genome were analyzed by bioinformatics in this study. The results showed that there were 6 PG, 4 PME and 4 PEL in *B. cinerea* genome. PG sequences were 370-514 aa in length with 16-21 aa signal peptides and abundant phosphorylation sites. PME sequences were 327-348 aa in length with 18-23 aa signal peptides and many phosphorylation sites, but no N-glycation sites. While PEL protein sequences were 236-353 aa in length, with 17-20 aa signal peptides, and abundant in O-glycations sites and phosphorylation sites. Conservative regions existed three kinds of pectinase amino acid sequence respectively. Tertiary structure prediction results showed that similar domain structure presented in the same family. Evolutionary analysis indicated that pectinases were conserved in *B. cinerea* genome.

**Keywords:** grey mold; polygalacturonase; pectin methylesterase; pectin lyase; genome

(上接第 16 页)

**Abstract:** In order to breed new potato varieties with high resistance to late blight, high yield and high quality, the potato material CIP388676.1 with strong late blight resistance was used as female parent, and the variety Kexin 23 was used as male parent, we obtained hybrids  $F_1$  by crossing, and the SSR molecular marker technology was used to identify the  $F_1$  superior individuals. The results showed that combined with evaluation of agronomic traits including plant morphology, tuber yield and starch content, we finally selected two strains with excellent comprehensive traits. The SSR fingerprint of nine potato strains and their parents was established by using two SSR special primers to amplify genome DNA. The research results could promote rapid identification of potato.

**Keywords:** potato; hybrid progeny; SSR fingerprint