

# 疫霉属果胶裂解酶基因家族的系统发育分类

齐明星<sup>1</sup>, 朱杰华<sup>1</sup>, 杨志辉<sup>1</sup>, 杨玉荣<sup>2</sup>, 朱丽丹<sup>1</sup>

(1. 河北农业大学 植物保护学院, 河北 保定 071000; 2. 河北农业大学 教务处, 河北 保定 071000)

**摘要:**以疫霉属果胶裂解酶(pectin lyase, PL)基因家族的蛋白序列为材料,用邻接法和最小进化法构建系统发育树,根据所形成的分支确定 PL 基因家族的类群和分布规律。研究了疫霉属(*Phytophthora*)的果胶裂解酶基因家族的类群及在病原菌间的分布规律,以期为研究病原菌果胶裂解酶的专化性和病原菌的寄主专化性的关系奠定基础。结果表明:所构建的疫霉属 PL 基因家族的系统发育树共形成了 11 个分支,分别将其命名为 PL1~PL11。其中,致病疫霉、橡树疫霉和大豆疫霉等 3 个病原疫霉属所共有的分支为 5 个,即 PL1、PL6、PL7、PL10 和 PL11。橡树疫霉和大豆疫霉共有的分支为 PL8。而上述 3 种疫霉均具其独有的 1~2 个分支,即 PL4 为橡树疫霉特有的分支,PL3 和 PL5 为大豆疫霉的特有的分支,而 PL2 和 PL9 是致病疫霉特有的分支。利用疫霉果胶裂解酶基因家族的系统发育树的分支对其进行了分类和命名,并探究了疫霉属病原菌果胶裂解酶基因家族的分化与其寄主专化性的关系。

**关键词:**疫霉属;果胶裂解酶;系统发育树;专化性

**中图分类号:**S 432.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)23-0109-04

疫霉属(*Phytophthora*)隶属卵菌门,是一类重要的植物病原菌,已报道该属有 100 多个种<sup>[1]</sup>。疫霉对寄主植物的破坏性强、危害性大,由疫霉引起的植物病害大多难以控制。由致病疫霉(*Phytophthora infestans*)引起的马铃薯晚疫病一直以来都是马铃薯生产上最具毁灭性的病害,每年给全球马铃薯生产造成约 67 亿美元的损失<sup>[2]</sup>。果胶裂解酶是疫霉属病原菌在侵染植物过程中分泌的,能够降解植物细胞壁中的果胶,在疫霉侵染植物过程中发挥着重要作用<sup>[3]</sup>。而确定疫霉属中果胶裂解酶基因家族的种类和在不同病原菌中的分布对于研究果胶与果胶裂解酶的相互作用,以及揭示果胶裂解酶的种类在病原菌上的寄主专化性具有重要的理论价值。果胶是一类天然高分子化合物,由不同酯化度的半乳糖醛酸以  $\alpha$ -1,4 糖苷键聚合而成的多糖链,常带有鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、木糖、海藻糖和芹菜糖等组成的侧链。果胶在初生壁中与不同含量的纤维素、半纤维素和木质素的微纤丝以及某些伸展蛋白相互交联,使各种细胞组织结构坚硬,表现出固有的形态,既不阻碍细

胞生长,又可以保护细胞避免病原生物物的入侵<sup>[4-5]</sup>。因此,果胶在植物抵抗病原物侵染过程中发挥着重要作用。而植物病原疫霉在侵染寄主植物过程中,会分泌多种分解果胶的酶类,从而使病原菌能侵染寄主植物细胞<sup>[6]</sup>。而分解植物果胶的果胶酶类有果胶裂解酶(pectin lyase, PL)、果胶水解酶(pectin hydrolase)、果胶酯酶(pectinesterase, PE)和原果胶酶等<sup>[7]</sup>。其中,果胶裂解酶(PL)对甲酯化的果胶分子亲和力非常高,其裂解贴近甲酯基的  $\alpha$ -1,4 糖苷键,裂解反应遵循  $\beta$ -消去机制,在邻近羧基或酯化的羧基上进行  $\beta$ -消除<sup>[8]</sup>,生成在非还原末端的 C4 和 C5 位置有不饱和键的半乳糖醛酸,PL 对果胶分子的降解活性随着甲酯化度的降低而降低<sup>[9]</sup>并在果胶降解过程中起着重要的作用<sup>[3]</sup>。病原物在侵染寄主过程中所释放的 PL 能分解植物细胞中的果胶,使细胞渗透性增强,从而有利于病原侵入寄主细胞而导致植株感病<sup>[10]</sup>。随着疫霉属中的致病疫霉(*Phytophthora infestans*)、大豆疫霉(*P. sojae*)和橡树疫霉(*P. ramorum*)等基因组的公布<sup>[11]</sup>,截至目前可获得 103 条疫霉属果胶裂解酶基因序列,而疫霉属中非病原菌 *P. tricornutum* 和 *Thalassiosira pseudonana* 未发现 PL 基因<sup>[12-13]</sup>,这说明 PL 基因在疫霉致病过程中可能发挥着重要的作用,但疫霉属中 PL 基因家族的基因分类和在不同病原菌中的分布及其意义目前仍不清楚。该研究旨在对疫霉属中 PL 基因家族的基因和蛋白序列分析的基础上,明确疫霉属 PL 基因所包括的类群及在不同种间的分布规律,

**第一作者简介:**齐明星(1988-),男,河北保定人,硕士研究生,研究方向为植物病理学。E-mail:qi\_mingxing@hotmail.com.

**责任作者:**杨志辉(1975-),男,河北藁城人,博士,副教授,硕士生导师,研究方向为植物病理学。E-mail:bdyangzhahui@163.com.

**基金项目:**国家自然科学基金青年基金资助项目(31000833);国家公益性行业(农业)科研专项资助项目(201303018)。

**收稿日期:**2013-06-19

为亲缘关系很近的病原疫霉与亲缘关系很远的寄主之间存在的专化性提供科学合理的解释。

## 1 材料与方法

### 1.1 疫霉属果胶裂解酶蛋白和基因序列

果胶裂解酶蛋白序列来自 Pfam 数据库(<http://pfam.sanger.ac.uk/>),通过该数据库分别下载了致病疫霉、大豆疫霉和橡树疫霉等 3 种疫霉属的果胶裂解酶氨基酸序列 39 条(D),36 条(G)和 28 条(H),共计 103 条。

### 1.2 序列分析

用 Clustal X<sup>[14]</sup>对氨基酸和 DNA 序列进行分别比对后,利用 BioEdit<sup>[15]</sup>对序列进行人工调整和对齐。利用 TreePuzzle<sup>[16]</sup>对调整并序列的序列进行似然性分析。分析结果显示为等边三角形中的点。3 个顶点( $A_1$ 、 $A_2$ 和  $A_3$ )上点的密度表示能否适合构建系统发育树,用“tree-likeness”( $A_1 + A_2 + A_3$  之和)大小表示,大于 90% 表明适合构建系统发育树进行系统发育分析<sup>[17-18]</sup>。

### 1.3 系统发育树的构建

用 MEGA<sup>[19]</sup>软件,采取邻接法和最小进化法构建系统发育树,bootstrap 值重复 1 000 次。用 FigTree<sup>[20]</sup>对所构建的系统发育树进行标注和显示<sup>[21]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 果胶裂解酶基因家族数据似然映射分析

利用 TreePuzzle 对疫霉属果胶裂解酶基因家族蛋白序列所作的似然图显示,由图 1 可知,三角形的顶点呈现出高密度的位点(图 1A),3 个顶点的概率都在 30% 以上(图 1B),表明该数据组具有很强的系统发育信息。

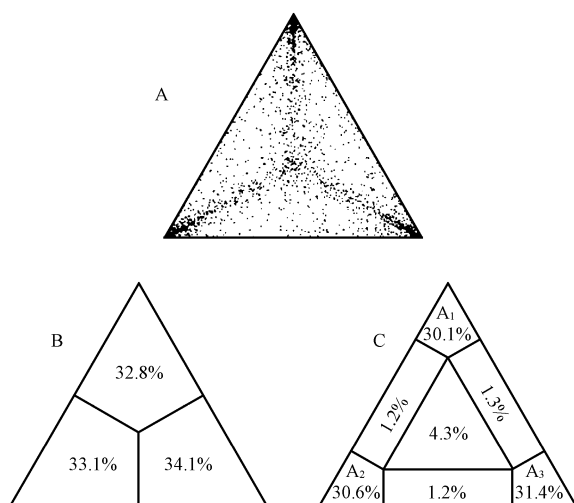


图 1 疫霉属 PL 基因家族数据似然图

注:A:似然性等边三角形位点图;B:三顶点区域概率图;C:“tree-like”值是  $A_1 + A_2 + A_3 = 92.1\%$ 。

Fig. 1 Likelihood map of *Phytophthora* PL gene family data

Note: A: Points inside an equilateral triangle; B: Probabilities of three topologies; C: Tree-like regions probability is 92.1%.

“tree-likeness”值即  $A_1 + A_2 + A_3 = 92.1\%$ (图 1C)很高,表明该数据组适合于构建果胶裂解酶基因家族的系统发育树并进行分析。

### 2.2 疫霉 PL 基因家族系统发育分类及命名

利用邻接法和最小进化法对疫霉果胶裂解酶基因家族蛋白序列所构建的 2 个系统发育树拓扑结构基本一致,由邻接法对蛋白序列所构建的系统发育树见图 2,由图 2 可知,将疫霉果胶裂解酶基因家族分为 11 个分支,分别命名为 PL1、PL2、PL3、... PL11。根据组成这 11 个分支基因数目,分别将其划分为大、中、小 3 种类型。因此,疫霉属果胶裂解酶基因家族包括 1 个含有 38 个果胶裂解酶的大分支(10 个果胶裂解酶以上)即 PL6; 4 个小分支(含 2~5 个果胶裂解酶),即 PL1、PL2、PL3 和 PL8 和剩余的 6 个中等分支(6~10 个果胶裂解酶),即 PL4、PL5、PL7、PL9、PL10 和 PL11。

致病疫霉、大豆疫霉和橡树疫霉等 3 种疫霉属病原菌都含有 7~8 个不同分支的果胶裂解酶,但不同病原菌种类的果胶裂解酶基因所处的分支明显不同。致病疫霉中的果胶裂解酶分布在 PL1、PL2、PL6、PL7、PL9、PL10 和 PL11 等 7 个分支;大豆疫霉中的果胶裂解酶分布在 PL1、PL3、PL5、PL6、PL7、PL8、PL10 和 PL11 等 8 个分支;而橡树疫霉中的果胶裂解酶分布在 PL1、PL3、PL6、PL7、PL8、PL10 和 PL11 等 7 个分支。其中,PL1、PL6、PL7、PL10 和 PL11 等 5 个分支是橡树疫霉、大豆疫霉和致病疫霉等 3 种疫霉所共享的分支。此外,PL8 是大豆疫霉和橡树疫霉所共享的分支。特别值得注意的是每个疫霉病原菌都具有自身独有的 1~2 个分支,如 PL4 是橡树疫霉特有的分支,PL3 和 PL5 为大豆疫霉的特有的 2 个分支,而 PL2 和 PL9 是致病疫霉特有的 2 个分支。

## 3 讨论

引起马铃薯晚疫病、大豆疫病和橡树疫病的 3 种疫霉菌,其亲缘关系尽管很近,但其侵染的寄主亲缘关系却很远,这可能与该 3 种疫霉所特有的果胶裂解酶有关。在致病疫霉、大豆疫霉和橡树疫霉等 3 种疫霉菌基因组中的果胶裂解酶所组成的 11 个分支中,PL2、PL3、PL4、PL5 和 PL9 等 5 个分支具有独特的病原专一性,而同时 3 种病原菌对所侵染的寄主也具有专一性。PL2 和 PL9 分支仅在致病疫霉中存在,而该菌主要侵染马铃薯和番茄而引起晚疫病,这可能与寄主植物中包含与之相对应的特定果胶结构有关<sup>[22]</sup>。PL3 和 PL4 仅在大豆疫霉中具有分布,而大豆疫霉也仅能引起大豆疫病,类似地,PL5 仅存在于橡树疫霉中,而橡树疫霉仅能侵染橡树而引起橡树疫病。

疫霉属果胶裂解酶基因家族在病原菌中的种类专一性与病原菌的寄主专一性密切相关,这是病原菌与寄

主植物长期协同进化的结果<sup>[23]</sup>。在寄主和病原物长期互作和演化过程中,寄主和病原物彼此间存在着正向选择作用<sup>[24]</sup>。寄主植物为了避免或减轻病原物的侵染作用,在寄主植物抵抗病原物侵染中具有重要作用的果胶结构要发生变异<sup>[25]</sup>,而病原菌在果胶结构变化后的巨大选择压力下,其分解果胶的裂解酶也会发生相应的变异,以克服由于寄主果胶结构的变化而带来的侵染压力,从而保证病原菌可侵染具有新果胶结构的寄主。这样,在2种力量的相互作用下,寄主植物的果胶结构会变得愈来愈复杂<sup>[26]</sup>,而病原菌中分解不同果胶分子的果胶裂解酶也越来越多,且彼此间存在一一对应关系。通过转基因技术将疫霉菌的所特有果胶裂解酶转移到另外一种疫霉菌中,如将橡树疫霉所特有的 PL5 基因,转

移到致病疫霉或大豆疫霉,通过接种试验验证被转移后的致病疫霉或大豆疫霉是否可对橡树具有致病性,从而可以证明 PL5 在橡树疫霉寄主专一性中发挥着重要作用。

疫霉属不同的病原菌所共有的果胶裂解酶是分解植物果胶基本结构所必须的,是保持病原菌基本致病能力的前提。在疫霉果胶裂解酶家族所组成的 11 个分支中,PL1、PL6、PL7、PL10 和 PL11 等的 5 个分支是致病疫霉、大豆疫霉和橡树疫霉等 3 种疫霉所共有的分支,担负着分解植物果胶基本结构的功能,是病原菌侵染寄主所需的基本裂解酶,该类裂解酶的缺失可能会导致病原菌丧失其致病能力。

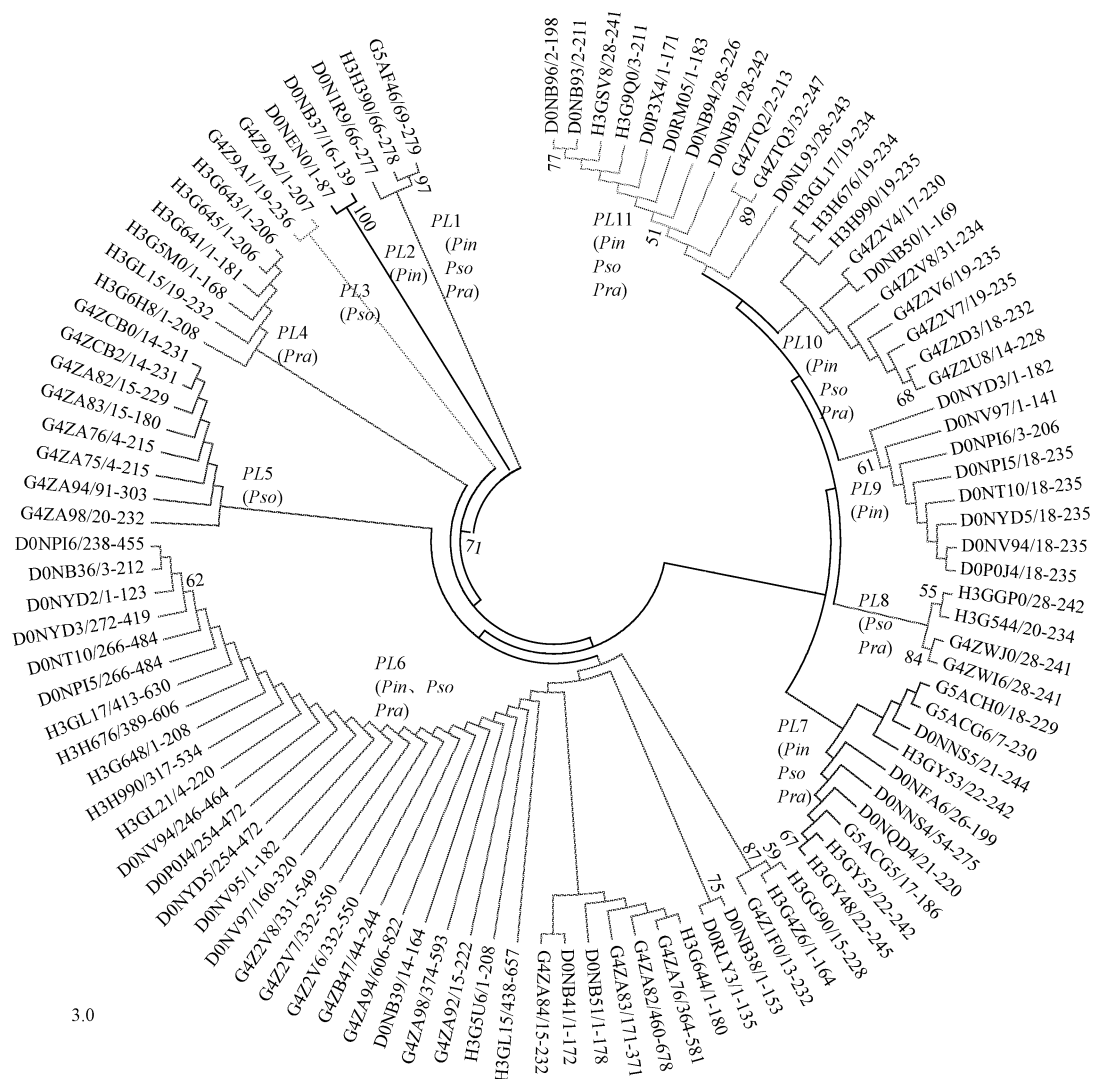


图2 疫霉属 PL 基因家族系统发育树

注:邻接法构建的无根树,bootstrap 值为 1 000,只显示大于 50 的支持率。Pin=*P. infestans*,Pso=*P. sojae*,Pra=*P. ramorum*。

Fig. 2 Phylogenetic tree of *Phytophthora* PL gene family using the Neighbour Joining method

Note:Phylogeny is unrooted. The numbers at the nodes indicate percentage bootstrap values of the 1 000 bootstrap replicates,only values greater than 50 are shown. Pin=*P. infestans*,Pso=*P. sojae*,Pra=*P. ramorum*.



## 参考文献

- [1] Kroon L P, Brouwer H, de Cock A W, et al. The genus *Phytophthora* anno 2012[J]. *Phytopathology*, 2012, 102(4):348-364.
- [2] Haverkort A J, Boonekamp P M, Hutten R, et al. Societal costs of late blight in potato and prospects of durable resistance through cisgenic modification[J]. *Potato Research*, 2008, 51(1):47-57.
- [3] 薛长湖, 张永勤, 李兆杰, 等. 果胶及果胶酶研究进展[J]. *食品与生物技术学报*, 2005, 24(6):94-99.
- [4] Pérez S, Mazeau K, Hervé du Penhoat C. The three-dimensional structures of the pectic polysaccharides[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2000, 38(1):37-55.
- [5] 杜继煜, 白岚, 白宝璋. 果胶的化学组成与基本特性[J]. *农业与技术*, 2002, 22(5):72-76.
- [6] Reignault P, Valette-Collet O, Boccara M. The importance of fungal pectinolytic enzymes in plant invasion, host adaptability and symptom type[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2008, 120(1):1-11.
- [7] Vander Vlugt-Bergmans C, Meeuwse P, Voragen A, et al. Endo-xylogalacturonan hydrolase, a novel pectinolytic enzyme[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(1):36-41.
- [8] 李祖明, 张洪勋, 白志辉, 等. 微生物果胶酶研究进展[J]. *生物技术通报*, 2010, 33(3):42-48.
- [9] Yadav S, Yadav P K, Yadav D, et al. Pectin lyase: a review[J]. *Process Biochemistry*, 2009, 44(1):1-10.
- [10] 娜仁, 赵君, 张之为, 等. 马铃薯抗晚疫病机制的研究进展[J]. *中国马铃薯*, 2008, 22(6):352-357.
- [11] The Btosd institute[EB/OL]. <http://www.broadinstitute.org>, 2013-05-10/2013-05-20.
- [12] Haas B J, Kamoun S, Zody M C, et al. Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*[J]. *Nature*, 2009, 461(7262):393-398.
- [13] Tyler B M, Tripathy S, Zhang X, et al. *Phytophthora* genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis[J]. *Science*, 2006, 313(5791):1261-1266.
- [14] Chenna R, Sugawara H, Koike T, et al. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs[J]. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(13):3497-3500.
- [15] Hall T A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT[C]. *Nucleic Acids Symposium Seres*, 1999, 41:95-98.
- [16] Schmidt H A, Strimmer K, Vingron M, et al. TREE-PUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing[J]. *Bioinformatics*, 2002, 18(3):502-504.
- [17] Zhaxybayeva O, Gogarten J P. Bootstrap, Bayesian probability and maximum likelihood mapping: exploring new tools for comparative genome analyses[J]. *BMC Genomics*, 2002, 3(1):4.
- [18] Strimmer K, Von Haeseler A. Likelihood-mapping: a simple method to visualize phylogenetic content of a sequence alignment[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997, 94(13):6815-6819.
- [19] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(8):1596-1599.
- [20] Rambaut A. FigTree version 1.3.1[EB/OL]. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>, 2011-02-11/2013-05-10.
- [21] Zwickl D J, Hillis D M. Increased taxon sampling greatly reduces phylogenetic error[J]. *Systematic Biology*, 2002, 51(4):588-598.
- [22] Vincken J. Remodelling pectin structure in potato[J]. *Developments in Plant Genetics and Breeding*, 2000(6):245-256.
- [23] Frank S A. Models of plant-pathogen coevolution[J]. *Trends in Genetics*, 1992, 8(6):213-219.
- [24] Casadevall A, Pirofski L. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity[J]. *Infection and Immunity*, 1999, 67(8):3703-3713.
- [25] Mccann M C, Shi J, Roberts K, et al. Changes in pectin structure and localization during the growth of unadapted and NaCl-adapted tobacco cells[J]. *The Plant Journal*, 1994, 5(6):773-785.
- [26] Schols H A, Voragen A. Complex pectins: structure elucidation using enzymes[J]. *Progress in Biotechnology*, 1996(14):3-19.

Phylogenetic Classification of Pectin Lyase Gene Family in the Genus *Phytophthora*

QI Ming-xing<sup>1</sup>, ZHU Jie-hua<sup>1</sup>, YANG Zhi-hui<sup>1</sup>, Yang Yu-rong<sup>2</sup>, ZHU Li-dan<sup>1</sup>

(1. College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071000; 2. Academic Affairs Office, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071000)

**Abstract:** The protein sequences of pectin lyase gene family of *Phytophthora* were used to construct phylogenetic tree using neighbor-joining and minimum-evolution methods. According to the formed clades, classification and distribution of PL gene family were determined. The objective of this study was to investigate the classification of PL gene family of *Phytophthora* fungi and the gene distribution among different species of pathogens, which could laid the foundation of the relationship between the species specificity of pectin lyase genes and host specificity of pathogens. The results showed that the tree was divided into 11 clades, which were nominated as PL1~PL11, respectively. Of 11 clades, 5 ones (i. e. PL1, PL6, PL7, PL10 and PL11) were shared by three *Phytophthora* species i. e. *P. infestans*, *P. sojae* and *P. ramorum* and PL8 was shared by *P. sojae* and *P. ramorum*. Nevertheless, three *Phytophthora* species had species-specific one or two clades. PL4 was specific to *P. ramorum*, PL3 and PL5 were specific to *P. sojae* and PL2 and PL9 were specific to *P. infestans*. The clades of phylogenetic tree were used to classify and nominate PL gene family of genus *Phytophthora*. The relationship of the division of PL gene family of *Phytophthora* pathogens and host specificity of pathogens was analyzed.

**Key words:** *Phytophthora*; pectin lyase; phylogenetic; specificit