

荔枝霜疫霉自噬相关基因 *PIATG26* 的鉴定及表达分析

王雪健^{1,2}, 杨成东^{1,2}, 于戈^{1,2}, 季贞希^{1,2}, 郭恒远^{1,2}, 叶琳琳^{1,2}, 陈庆河^{1,2*}

1. 海南大学南繁学院(三亚南繁研究院)/海南大学热带农林学院, 海南三亚 572025; 2. 热带农林生物灾害绿色防控教育部重点实验室, 海南海口 570228

摘要: Atg26 (或 Ugt51) 是一种 UDP-葡萄糖:甾醇葡萄糖基转移酶, 其调控甾醇转化成甾醇葡萄糖苷 (SG) 的生物过程, 参与多种细胞自噬过程, 在真菌生长发育及致病性方面具有重要作用。为探究 Atg26 对荔枝霜疫霉 (*Peronophythora litchii*) 生长发育及毒性作用的影响, 本研究通过生物信息学技术在荔枝霜疫霉中鉴定到 6 个与酿酒酵母 Atg26 同源的蛋白。蛋白质特性分析发现, 其二级结构以无规则卷曲为主, 且具有亲水性。基因结构和蛋白质结构分析结果显示, 除 *PIATG26a* 外, 其余荔枝霜疫霉的 *ATG26* 同源基因均具有内含子, 且大多分布在基因末端; 荔枝霜疫霉中 Atg26 同源蛋白均含有一个 UDP-葡萄糖基转移酶 (UDP-glucosyl transferase, UDPGT) 的催化结构域, 无 PH (pleckstrin 同源) 和 GRAM (糖基转移酶、GTPase 激活剂和肌管蛋白) 功能域。进一步对 Atg26 同源蛋白进行系统进化和保守基序分析发现, 荔枝霜疫霉中的 Atg26 同源蛋白之间存在多样性, 但不同物种中 Atg26 的 CAT 结构域具有保守性。蛋白质互作预测和蛋白质分子对接分析发现, *PIATG26* 的互作蛋白多位于细胞质或膜上, 集中在细胞代谢过程中, 具有催化活性、氧化还原活性或结合能力。实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析发现, 与菌丝阶段表达相比, *PIATG26b* 在荔枝霜疫霉游动孢子阶段和侵染初期上调表达, 在孢子囊阶段和侵染后期无明显差异, 表明 *PIATG26* 可能在荔枝霜疫霉的无性生殖和致病性中发挥重要作用。综上所述, *PIATG26* 与其他真菌中 Atg26 同源蛋白在结构上具有明显差异, 可能表现出与真菌不一样的生物学功能。

关键词: 荔枝霜疫霉; 细胞自噬; *PIATG26*; 生物信息学; qRT-PCR

中图分类号: S667.1 文献标志码: A

Identification and Expression Analysis of *PIATG26* in *Peronophythora litchii*

WANG Xuejian^{1,2}, YANG Chengdong^{1,2}, YU Ge^{1,2}, JI Zhenxi^{1,2}, GUO Hengyuan^{1,2}, YE Linlin^{1,2}, CHEN Qinghe^{1,2*}

1. School of Breeding and Multiplication (Sanya Institute of Breeding and Multiplication), Hainan University / School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Sanya, Hainan 572025, China; 2. Key Laboratory of Green Prevention and Control of Tropical Plant Diseases and Pests, Ministry of Education, Haikou, Hainan 570228, China

Abstract: Atg26 (or Ugt51) is a UDP-glucose: sterol glucosyltransferase, which regulates the biological process of sterol conversion to sterol glucoside (SG), participates in various cellular autophagy processes, and plays an important role in fungal growth, development and pathogenicity. In order to investigate the role of Atg26 in the growth, development and virulence of *Peronophythora litchii*, six Atg26 homologous proteins were identified through bioinformatics. The analysis of protein properties showed that the secondary structure of the protein was mainly random curling and had hydrophilic properties. The results of gene and protein structure analysis showed that except *PIATG26a*, the other *ATG26* homologous genes of *P. litchii* had introns, which were mostly distributed at the end of the gene. All Atg26 homologous proteins contained the CAT catalytic domain, but did not have the PH (pleckstrin homology) and GRAM

收稿日期 2025-02-19; 接受日期 2025-02-27

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 32160614); 海南省荔枝产业技术体系 (No. HNARS-08); 海南大学科研启动基金 [No. KYQD(ZR)-20080]。

作者简介 王雪健 (2000—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 热带作物病害防控。*通信作者 (Corresponding author): 陈庆河 (CHEN Qinghe), E-mail: qhchen@hainanu.edu.cn。

(glucosyltransferase, Rab-like GTPase activators, and myotubularins) domains that make up the PBD (phosphoinositide binding domain). Further phylogenetic and conserved motif analysis of Atg26 homologous proteins found that diversity existed among the Atg26 homologous proteins in *P. litchii*, but the CAT domain of Atg26 was conserved in different species. Protein interaction prediction and protein molecular docking analysis showed that the interacting proteins of PlAtg26 were mostly located in the cytoplasm or membrane, concentrated in the process of cell metabolism, and had catalytic activity, REDOX activity or binding ability, which also indicated that PlAtg26 may not require the binding ability of GRAM domain for localization. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis showed that *PlATG26b* was up-regulated in zoospore stage and early infection, but had no significant difference in sporangium stage and late infection. This result also indicated that Atg26 played an important role in the asexual reproduction and infection of *P. litchii*. In conclusion, PlAtg26 and Atg26 homologues in fungi have significant structural differences and may show different biological functions from fungi.

Keywords: *Peronophythora litchii*; autophagy; *PlATG26*; bioinformatics; qRT-PCR

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.06.021

中国大陆是全球最大规模的荔枝 (*Litchi chinensis* Sonn.) 生产区, 2022 年中国大陆荔枝种植面积约 52.61 万 hm^2 , 基本保持稳定; 荔枝产量约 222.27 万 $\text{t}^{[1]}$ 。由荔枝霜疫霉 (*Peronophythora litchii* Chen ex Ko et al.) 侵染引起的荔枝霜疫病严重影响荔枝的生长发育, 是影响我国荔枝产量及产后最为严重的病害^[2]。荔枝霜疫霉主要为害荔枝的果实, 也会影响花穗和叶片, 为害严重时, 损失率可达 30%~60%^[3-5]。荔枝霜疫霉首次在中国台湾荔枝病果上发现, 其孢囊梗为多级有限生长, 形态与霜霉菌相似, 但其他特性及基因组的序列特征与疫霉菌相似, 将其归于霜疫霉属^[6]。

自噬 (autophagy) 是真核生物体内一种进化保守的生物学过程, 是指细胞受到自噬起始信号后, 形成双膜囊泡, 即自噬体, 隔离细胞器、蛋白质或细胞质的一部分, 以便输送到溶酶体, 进而将其降解的过程^[7]。自噬过程受到多个自噬相关基因 (ATG) 的调控, 1997 年, YOSHINORI OHSUMI 发现并克隆到酵母中第一个自噬相关基因 *ATG1*, 目前在酵母中已经发现了 45 个自噬相关基因^[8-9]。

根据细胞内容物进入溶酶体的不同方式, 细胞自噬被分为巨自噬、微自噬和分子伴侣介导的自噬, 而自噬根据底物的不同还可分为非选择性自噬 (nonselective autophagy) 和选择性自噬 (selective autophagy)^[10-11]。在毕赤酵母中, Atg26 (Ugt51) 是一种 UDP-葡萄糖: 甾醇葡萄糖基转移酶, 合成一种较小的膜脂质甾醇葡萄糖苷 (SG)。该酶含有 1 个磷酸肌醇结合结构域 (PBD) 和 1 个含有 UDP-葡萄糖基转移酶 (UDP-glucosyl transferase, UDPGT) 的催化结构域 (catalytic, CAT)^[12-13]。其中, PBD 结构域包括 1 个截断的 GRAM (糖基

转移酶、GTPase 激活剂和肌管蛋白)-PH (pleckstrin 同源)[trGRAM-pH] 结构域和 1 个 GRAM 结构域, 该结构域对于 Atg26 在自噬体前结构 (preautophagosomal structure, PAS) 的定位至关重要^[12-13]。Atg26 在多种丝状真菌中被鉴定, 其功能已被证明与真菌的生长发育、自噬及毒力相关。在米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 中, Atg26 不仅调控其过氧化物酶体自噬, 还参与其线粒体自噬和细胞自噬, 且该基因的缺失会影响米曲霉气生菌丝和分生孢子的形成^[13]。在瓜类炭疽菌 (*Colletotrichum orbiculare*) 中, Atg26 调控其过氧化物酶体自噬但不参与巨自噬, 并且通过影响其附着胞内部压力, 从而导致致病性的减弱^[14], 这些研究结果表明 Atg26 在病原真菌生长发育、细胞自噬和植物致病中发挥重要作用。但是 Atg26 在包括荔枝霜疫霉在内的植物病原卵菌生长发育及致病过程中的功能尚未报道。

前期的研究表明, 荔枝霜疫霉中已鉴定到多个 Atg 蛋白, 其中 PlAtg2、PlAtg3、PlAtg8、PlAtg12 对荔枝霜疫霉的生长发育、致病性以及细胞自噬具有重要作用, 但 Atg26 还未得到鉴定^[15-19]。本研究通过同源比对及 pfam 查找鉴定荔枝霜疫霉中的 Atg26 同源蛋白, 利用生物信息学对其进一步分析, 并通过 qRT-PCR 探究其在荔枝霜疫霉生长发育和侵染过程中的表达规律。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 荔枝霜疫霉 (*P. litchii*) 菌株 SHS3 为实验室长期保存。

1.1.2 供试植物 荔枝品种为妃子笑。

1.2 方法

1.2.1 荔枝霜疫霉 Atg26 的鉴定 荔枝霜疫霉 SHS3 基因组为实验室转录组测序数据,为了鉴定荔枝霜疫霉的 Atg26,在文献中查找真菌中已报道的 Atg26 同源蛋白,毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) PpAtg26、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) ScAtg26、米曲霉 (*A. oryzae*) AoAtg26、稻瘟菌 (*Magnaporthe oryzae*) MoAtg26、禾谷镰刀菌 (*Fusarium graminearum*) FgAtg26,并从 GenBank 获得其氨基酸序列^[13, 20-22]。利用 NCBI 本地 blast 工具建立荔枝霜疫霉本地数据库,通过 Blastp 的方法分别将以上 Atg26 序列在本地数据库中查找,设置目标功能域的 *E*-value 阈值为 1e-5。通过 pfam (<http://pfam-legacy.xfam.org/>) 搜索 PpAtg26 的功能域 (PF03033、PF00169、PF06722、PF02893),并利用 TBtools^[23]工具在荔枝霜疫霉数据库中进行 hmmsearch,与 Blastp 查找结果取交集以获得候选蛋白。在 NCBI Batch CD-search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>) (*E*<1e-5) 上对候选蛋白及已知蛋白进行功能域预测,并进一步对比。

1.2.2 PIATg26 蛋白理化特性及基因结构分析 利用 ExPASy-ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 对 PIATg26 蛋白亲水性、等电点及分子量进行分析;利用 PIATg26 及已知蛋白的 DNA 序列和 CDS 序列,在 TBtools 上对其基因结构进行可视化;通过 CELLO (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>) 对 PIATg26 进行亚细胞定位预测;利用 MEME (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) 预测分析 PIATg26 及其同源序列的保守基序 (motif), motif 数量为 10, 长度为 10~60 aa。

1.2.3 PIATg26 蛋白二、三级结构预测分析 通过 SOPMA 预测 PIATg26 蛋白二级结构;利用在线工具 SWISS-MODEL^[24] (<https://swissmodel.expasy.org/>) 预测 PIATg26 蛋白的三级结构,并进行可视化。

1.2.4 系统发育树的构建 在 GenBank 下载大豆疫霉 (*Phytophthora sojae*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、家鼠 (*Mus musculus*) 的基因组数据,通过已知的 PpAtg26、ScAtg26、AoAtg26 和 FgAtg26 使用 Blastp 法查找其 Atg26 同源序列。通过 PhyloSuite^[25]中的 IQ-TREE 插件构建荔枝霜疫霉、酿酒酵母、毕赤酵母、致病疫霉、大豆疫霉、稻瘟菌、家鼠及拟南芥的 Atg26 蛋白系统发

育树。采用 maximum likelihood (ML) 法,并设置 ultrafast bootstrap 参数为 1000 进行构建,其他参数采用默认值。

1.2.5 蛋白互作分析方法 通过 STRING 网络对 PIATg26 蛋白在线分析,发现 PIATg26 在恶疫霉 (*P. cactorum*) 中存在对应蛋白。利用 STRING^[26] (<https://cn.string-db.org/>) 对恶疫霉中对应蛋白的互作关系进行分析,参数设置:最低要求交互分数,中等置信度 (0.4000),显示最大交互数量不超过 10 个。

1.2.6 分子对接方法 通过 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 对相关蛋白进行同源建模;利用 GRAMM^[27]进行分子对接;在 PDBePISA (https://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/pistart.html) 上分析分子对接结果,并使用 Pymol 软件进行可视化。

1.2.7 PIATg26b 基因克隆及磷酸化位点、信号肽和跨膜结构域预测 将荔枝霜疫霉接种在 V8 液体培养基 (取新鲜 V8 蔬菜汁过滤 100 mL,加超纯水定容至 1 L) 中,25 °C,120 r/min 培养 2 d,用 ddH₂O 清洗之后收集菌丝提取 DNA。引物序列: PIATg26b-F, 5'-ATGGAGGCCACACAGACG-3'; PIATg26b-R, 5'-TTAAAGAGCAACTGACGATG-3'。PCR 反应体系:2×Phanta Max Master Mix (Dye Plus) 25 μL, Primer F / Primer R 各 2 μL, DNA 1 μL, ddH₂O 20 μL。通过在线工具 NetPhos-3.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/>)、SignalP-4.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>) 和 TMHMM-2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 预测 PIATg26b 的磷酸化位点、信号肽及跨膜结构域。

1.2.8 荔枝霜疫霉不同时期样品制备 参考王荣波等^[15]的方法收集试验样品。将荔枝霜疫霉在 V8 固体培养基上暗培养 2 d,随后切割边缘新鲜菌丝在 V8 液体培养基中,25 °C,120 r/min 培养 2 d,用 ddH₂O 清洗之后收集,获得荔枝霜疫霉营养菌丝 (MY);将荔枝霜疫霉在 V8 固体培养基上培养 5 d 后,用 ddH₂O 刮洗菌面,用滤纸过滤后,4000 r/min 离心 10 min 后,弃上清后获得游动孢子囊 (SP) 样品;将上述 SP 样品在 12 °C 低温处理 1 h 后,转移到 25 °C 培养箱培养 1 h,3800 r/min 离心 10 min 后弃上清液获得游动孢子 (ZO)。不同侵染时期样品获得:荔枝霜疫霉在 V8 液体培

培养基培养 2 d 后, 接种在新鲜荔枝嫩叶正面, 吸去多余水分后, 再盖上一片嫩叶, 放于 25 ℃ 黑暗培养。分别于 12、24、36、48、60 h 收集, 其中 12 h 只收集菌丝, 其余时期收集菌丝和叶片, 液氮冷冻后, 置于-80 ℃ 保存, 用于 RNA 提取。

1.2.9 qRT-PCR 分析 内参基因 actin 引物序列: *PIAct-F*, 5'-TCACGCTATTGTTTCGTCTGG-3'; *PIAct-R*, 5'-TCATCTCCTGGTCGAAGTCC-3'; *qp-PIAtg26b* 引物序列: *qp-PIAtg26b-F*, 5'-CGCACGAAATGAAGCTGTCT-3', *qp-PIAtg26b-R*, 5'-GGAGTACTTGAGCGGCTTGT-3'。在 AriaMx Real-Time PCR 反应仪上进行 qRT-PCR 分析, 反应体系: 2×Q3 SYBR qPCR Master Mix (Universal) 10 μL, Primer F / Primer R 各 0.4 μL, cDNA 2 μL, ddH₂O 7.2 μL。反应程序: 95 ℃ 预变性 30 s; 95 ℃ 变性 10 s, 60 ℃ 退火 30 s, 循环 40 次。以菌丝阶段基因表达水平为 1, 采用比较 Ct 值法 (2^{-ΔΔCt} 法) 分析 *PIATG26b* 在不同时期的相对表达量。每组样品进行 3 次重复。

2 结果与分析

2.1 荔枝霜疫霉中 Atg26 同源蛋白的鉴定

为了鉴定荔枝霜疫霉中的 Atg26 同源蛋白, 利用已报道的 Atg26 蛋白氨基酸序列, 通过 Blastp 方法和 HMM 方法在荔枝霜疫霉数据库中查找, 将其结果取交集分析, 最终确定 6 个 Atg26 同源蛋白。

通过 pfam 网站共获得酵母 Atg26 蛋白的 4 个功能域 (PF03033、PF00169、PF06722、PF02893), 其中 PF00169 和 PF02893 组成 PBD 结构域, PF03033 和 PF06722 组成 CAT 结构域。将 4 个功能域通过 hmmsearch 的结果取交集分析, 并未在荔枝霜疫霉中发现同时具有 4 个功能域的蛋白, 且 Blastp 结果中的 6 个蛋白均含有 CAT 结构域中的 PF03033 和 PF06722, 而无 PBD 结构域中的功

能域 (图 1)。有趣的是, 在荔枝霜疫霉中未发现同时含 PBD 中 PF00169 和 PF02893 的蛋白, 且含 CAT 结构域中任一功能域的蛋白均不含 PF00169 和 PF02893 (图 1)。这一结果表明, 荔枝霜疫霉 Atg26 与真菌中的同源蛋白在结构域上差异极大。

通过在线工具 ProtParam 对 6 个候选蛋白进行理化性质分析表明, 6 个候选蛋白的氨基酸数目在 707~1503 aa 之间, 多数蛋白在 1200 aa 以上, 其分子量 (molecular weight, Mw) 在 96.66~167.14 kDa 之间, 等电点 (isoelectric point, IP) 在 6.39~8.59 之间, 脂溶指数 (aliphatic index, AI) 在 80.11~90.53 之间, 亲水性平均值 (GRAVY) 均为负数, 具有亲水性 (表 1)。通过在线工具 SOPMA 预测 *PIAtg26* 的二级结构, 其二级结构以无规则卷曲为主, 6 个同源蛋白均不含 β-折叠 (表 2)。在 CELLO 上预测候选蛋白的亚细胞定位情况, 6 个候选蛋白分别定位在不同的细胞位置 (表 2)。由此可以看出荔枝霜疫霉中的 Atg26 具有多样性, 其可能参与多个细胞过程。

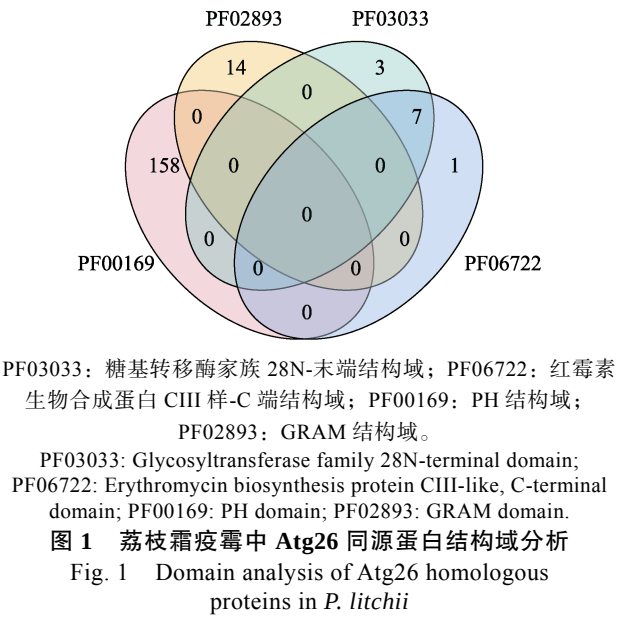


表 1 荔枝霜疫霉中 Atg26 同源蛋白的理化性质
Tab. 1 Physicochemical properties of Atg26 homologous proteins in *P. litchii*

基因名称 Gene name	E 值 E-value	基因 ID Gene ID	氨基酸数量 Number of amino acid	分子量 Mw/kDa	等电点 IP	不稳定系数 II	脂溶指数 AI	亲水性平均值 GRAVY
<i>PIAtg26a</i>	7e-73	PI_g13547.t1	890	96.99	6.39	40.47	90.53	-0.131
<i>PIAtg26b</i>	4e-70	PI_g1166.t1	1503	167.14	6.50	39.62	81.86	-0.336
<i>PIAtg26c</i>	8e-74	PI_g9701.t1	1451	162.48	6.64	44.61	82.86	-0.324
<i>PIAtg26d</i>	1e-70	PI_g7406.t1	1375	151.72	7.14	38.25	84.84	-0.218
<i>PIAtg26e</i>	2e-71	PI_g2814.t1	1263	139.64	7.17	40.94	90.21	-0.177
<i>PIAtg26f</i>	7e-74	PI_g9702.t1	707	139.64	8.59	51.79	80.11	-0.326

表 2 荔枝霜疫霉中 Atg26 同源蛋白的亚细胞定位和二级结构分析
Tab. 2 Subcellular localization and secondary structure analysis of Atg26 homologous proteins in *P. litchii*

基因名称 Gene name	α -螺旋 Alpha helix/%	β -折叠 Beta turn/%	无规则卷曲 Random coil/%	延伸链 Extended strand/%	亚细胞定位 Subcellular
<i>PIAtg26a</i>	38.54	0.00	52.58	8.88	cytoplasm
<i>PIAtg26b</i>	40.59	0.00	49.37	10.05	nucleus
<i>PIAtg26c</i>	39.08	0.00	50.59	10.34	cytoplasm
<i>PIAtg26d</i>	38.84	0.00	50.84	10.33	mitochondrion
<i>PIAtg26e</i>	36.34	0.00	54.16	9.5	plasma membrane
<i>PIAtg26f</i>	39.75	0.00	50.07	10.18	mitochondrion

2.2 荔枝霜疫霉中 Atg26 结构分析

通过分析荔枝霜疫霉及已知 *ATG26* 基因结构,发现 *FgATG26*、*AoATG26* 均具有 3 个内含子,且其内含子的分布也有一定规律。在荔枝霜疫霉中,除 *PIATG26a* 外,其余同源基因均含有 1 个或 2 个内含子,且其内含子分布差异极大,但大多位于 5'或 3'末端(图 2A)。

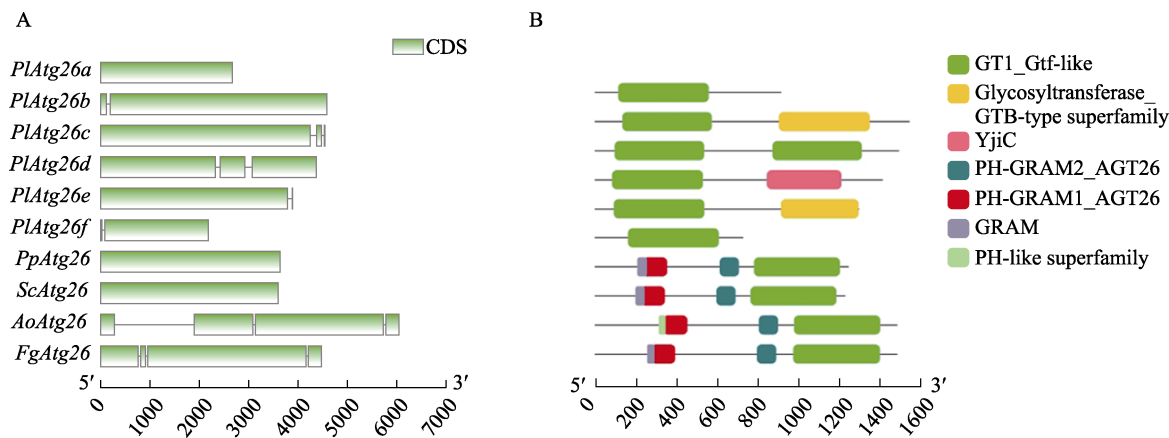
其他真菌中已知 Atg26 的 PBD 结构域分布在 N 端,而 CAT 结构域则在蛋白质的 C 端。通过 NCBI Batch CD-Search 对荔枝霜疫霉和已知 Atg26 的保守功能域进行分析,发现与 hmmsearch 结果一致,与其他已知 Atg26 不同,在荔枝霜疫霉中 Atg26 只含有 CAT 结构域而无 PBD 结构域。在荔枝霜疫霉中,CAT 结构域均分布在 Atg26 蛋白的 N 端,但除 *PIAtg26a* 和 *PIAtg26f* 外,不同的同源蛋白的 C 端功能域具有显著差异,多数是含有不同糖基转移酶的催化结构域。根据基因结构和保守功能域的分析结果,荔枝霜疫霉的 Atg26 与其他真菌具有显著差异,且其同源蛋白之间也具有多样性,但是不同物种间 Atg26 中 CAT 结

构域是保守的(图 2B)。

2.3 荔枝霜疫霉中 Atg26 的系统发育及保守基序分析

为了探究 Atg26 蛋白的进化特征,通过不同物种的 Atg26 同源蛋白建立系统发育树做进化分析。进化关系分析表明,荔枝霜疫霉与大豆疫霉中的 Atg26 较为接近,二者存在对应关系。拟南芥中的同源蛋白较多且都源自同一分支。真菌的 Atg26 与家鼠中的同源蛋白似乎来自于同一个祖先,而与拟南芥和卵菌都不同。有趣的是,*PIAtg26* 与大豆疫霉中的 Atg26 同源蛋白亲缘关系更近(图 3)。

通过 MEME 对荔枝霜疫霉中 Atg26 及其他物种中的同源蛋白的保守基序进行分析,发现卵菌中的同源蛋白都含有两组保守基序,且其分布具有一定规律;而在真菌中,其保守基序多分布在蛋白质的 C 端,N 端含有少量保守基序,这一结果也与 NCBI Batch CD-Search 保守功能域的分析结果相似。拟南芥中的 Atg26 同源蛋白只含有一组保守基序,且多数分布规律一样,与真菌同源



A: ATG26 同源基因的外显子-内含子结构; B: Atg26 同源蛋白保守功能域。
A: Exon-intron structure of *ATG26* homologous gene; B: Conserved domain of *Atg26* homologous proteins.

图 2 *ATG26* 同源基因外显子-内含子结构和蛋白质结构域分布

Fig. 2 Exon-intron structure of *ATG26* homologous gene and their conserved domains

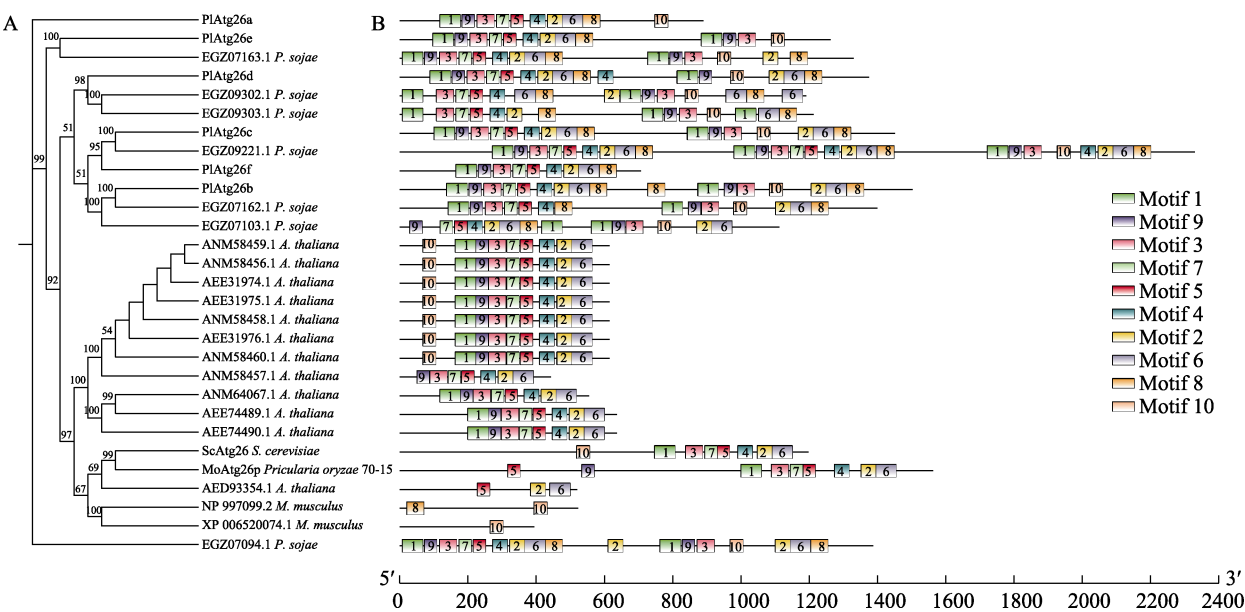


图 3 Atg26 同源蛋白系统发育树 (A) 和保守基序分析 (B)
Fig. 3 Phylogenetic tree (A) and motif analysis (B) of Atg26 homologous proteins

蛋白的 C 端及卵菌同源蛋白的 N 端的保守基序具有相似的分布特征,该部分可能是 UDP-葡萄糖基转移酶 domain 的编码氨基酸序列。而在家鼠的同源蛋白中仅有个别保守基序(图 3)。综上表明,荔枝霜疫霉中的 Atg26 同源蛋白之间具有多样性,且不同物种中 Atg26 的 CAT 结构域具有保守性,但 PBD 结构域似乎是真菌中所特有的。

2.4 荔枝霜疫霉中 Atg26 蛋白互作预测分析

为了进一步分析荔枝霜疫霉中 Atg26 的功能,通过在线工具 STRING 预测恶疫霉 (*P. cactorum*) 中同源蛋白(表 3)的互作蛋白网络。通过 STRING 预测,发现恶疫霉中与 PIAtg26 同源蛋白具有强相互作用的蛋白质基本一致(图 4)。根据 STRING 数据库分析发现,这些蛋白位于细胞质或膜上,集中在细胞代谢过程中,也有少部分参与生物合成过程,具有催化活性、氧化还原活性或结合能力。

2.5 荔枝霜疫霉中 Atg26 蛋白分子对接分析

为了进一步确定荔枝霜疫霉中 Atg26 的蛋白功能,对恶疫霉中的分析结果在荔枝霜疫霉中进行分子对接分析。通过 Blastp 在荔枝霜疫霉数据库中查找 10 个互作蛋白的同源蛋白,只有 PC110_g10050、PC110_g2990、PC110_g5868 和 PC110_g8861 具有对应蛋白(PI_g7383.t1、PI_g9795.t1、PI_g4663.t2、PI_g8511.t1)。通过在线工具 SWISS-MODEL 对荔枝霜疫霉中的 Atg26 蛋白和上述 4 个蛋白进行同源建模。选择其中模板覆盖率较高的晶体结构(图 5),通过 GRAMM 对其进行分子对接,在 PDBePISA 上分析分子对接结果,并通过 PyMOL 对其进行可视化(图 6)。

PDBePISA 结果显示,PIAtg26a 与 PI_g7383 之间自由能为-2.4 kcal/mol,PIAtg26f 与 PI_g9795 之间自由能为-15.2 kcal/mol,2 个蛋白之间通过多个氢键和盐桥作用进行连接,并通过 PyMOL

表 3 恶疫霉中 PIAtg26 的同源蛋白
Tab. 3 Homologous proteins of PIAtg26 in *P. cactorum*

荔枝霜疫霉蛋白 <i>P. litchii</i> protein ID	恶疫霉 <i>P. cactorum</i>		同一性 Identity/%	比特分数 Bitscore	E 值 E-value
	蛋白 ID Protein ID	蛋白注释 Protein annotation			
PIAtg26a	PC110_g17974	sterol 3- β -glucosyltransferase	84.40	1449.5	0
PIAtg26b	PC110_g11397	sterol 3- β -glucosyltransferase	84.60	2551.9	0
PIAtg26c	PC110_g20840	sterol 3- β -glucosyltransferase	87.90	2559.3	0
PIAtg26d	PC110_g11832	sterol 3- β -glucosyltransferase	75.40	2208.3	0
PIAtg26b	PC110_g11398	sterol 3- β -glucosyltransferase	82.50	2107.4	0
PIAtg26f	PC110_g20839	sterol 3- β -glucosyltransferase	86.00	1248.0	0

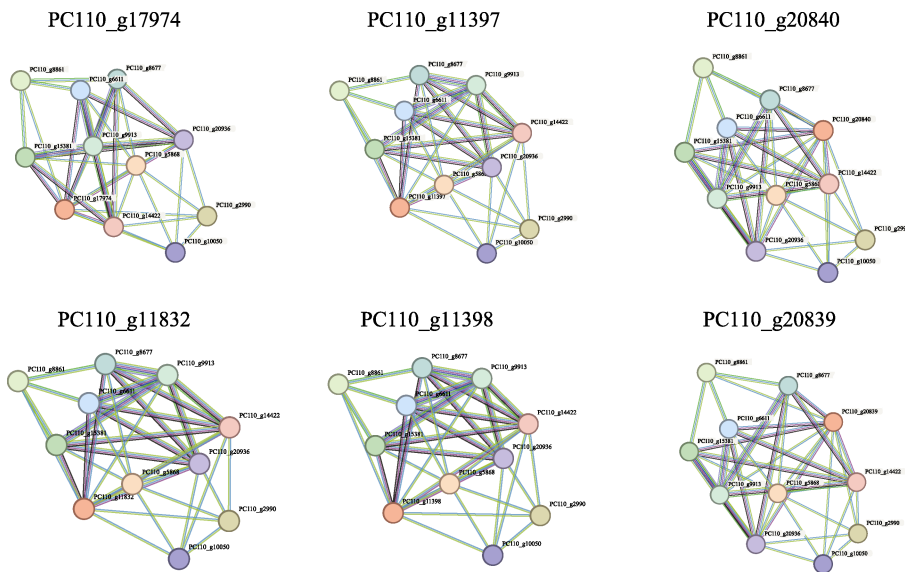


图 4 恶疫霉中 PIAtg26 同源蛋白互作网络分析
Fig. 4 Interaction network of PIAtg26 homologous proteins in *P. cactorum*

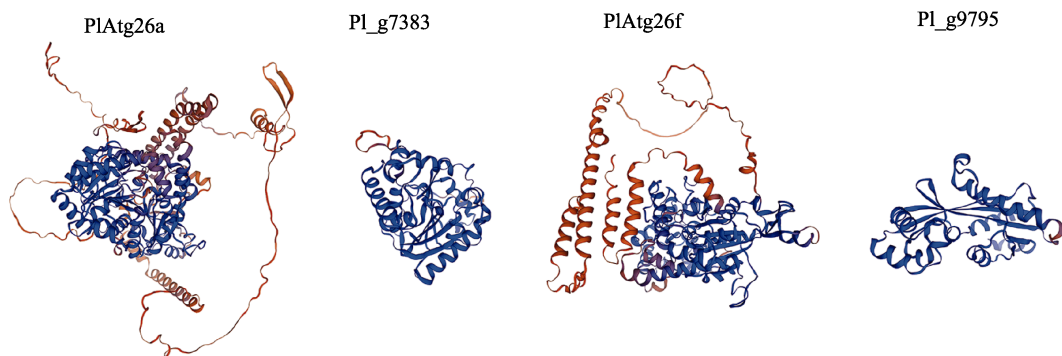
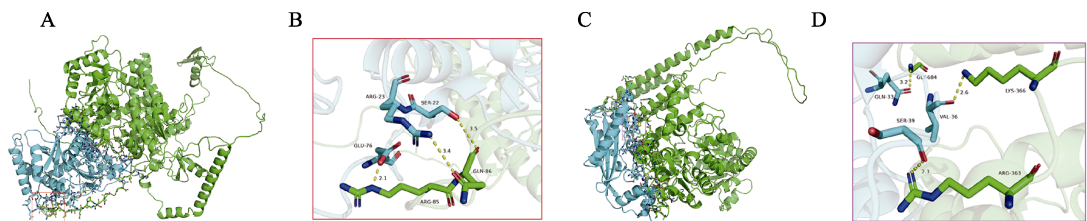


图 5 荔枝霜疫霉中 Atg26 同源蛋白及其互作蛋白的晶体结构模型
Fig. 5 Crystal structure model of Atg26 homologous protein and its interacting protein in *P. litchii*



A: PIAtg26a 和 Pl_g7383 分子对接晶体结构; B: PIAtg26a 和 Pl_g7383 的氢键作用力;
C: PIAtg26f 和 Pl_g9795 分子对接晶体结构; D: PIAtg26f 和 Pl_g9795 的氢键作用力。
A: Molecular docking crystal structure of PIAtg26a and Pl_g7383; B: Hydrogen bonding between PIAtg26a and Pl_g7383;
C: Molecular docking crystal structure of PIAtg26f and Pl_g9795; D: Hydrogen bonding between PIAtg26f and Pl_g9795.

图 6 荔枝霜疫霉中 Atg26 同源蛋白及其互作蛋白的相互作用模型

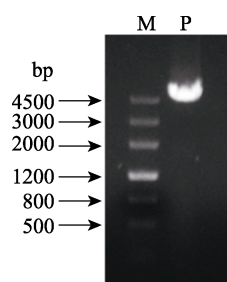
Fig. 6 Interaction model of Atg26 homologous proteins and interacting proteins in *P. litchii*

对氢键作用进行可视化。PyMOL 结果还显示，2 个蛋白之间具有多个相互作用的氨基酸残基位点。这一结果表明，荔枝霜疫霉中 Atg26 蛋白的互作网络可参考恶疫霉中的分析结果，由此推断，荔枝霜疫霉中 Atg26 可能参与其细胞代谢过程，并具有催化活性。

2.6 *PIATG26b* 基因克隆及磷酸化位点、信号肽和跨膜结构域预测

由于 PIAtg26 缺乏 GRAM 功能域（该结构域在酵母中负责 PAS 定位），我们推测其可能通过其他途径实现定位。通过序列分析发现，PIAtg26b/c/d 这三个亚型具有潜在的 Atg8 相互作用基序

(Atg8-interacting motif, AIM), 这可能是 PIAtg26 实现功能替代的关键结构^[28]。因此, 该试验以 PIAtg26b 为例, 进一步分析 PIAtg26 的功能。以荔枝霜疫霉菌丝 DNA 为模板, PIATG26b-F/R 为引物对 PIAtg26b 编码区进行扩增, 扩增产物共 4857 bp, 与之前转录组测序结果一致 (图 7)。对其蛋白质序列进一步分析发现, PIAtg26b 蛋白不含信号肽及跨膜结构域, 但具有多个磷酸化位点, 其中以丝氨酸和苏氨酸为主 (图 8)。PIAtg26b 可能通过蛋白质磷酸化-去磷酸化反应进行信号传导, 调控自噬的发生。



M: Marker III; P: PIATG26b.

图 7 PIATG26b 基因克隆

Fig. 7 Cloning of PIATG26b gene

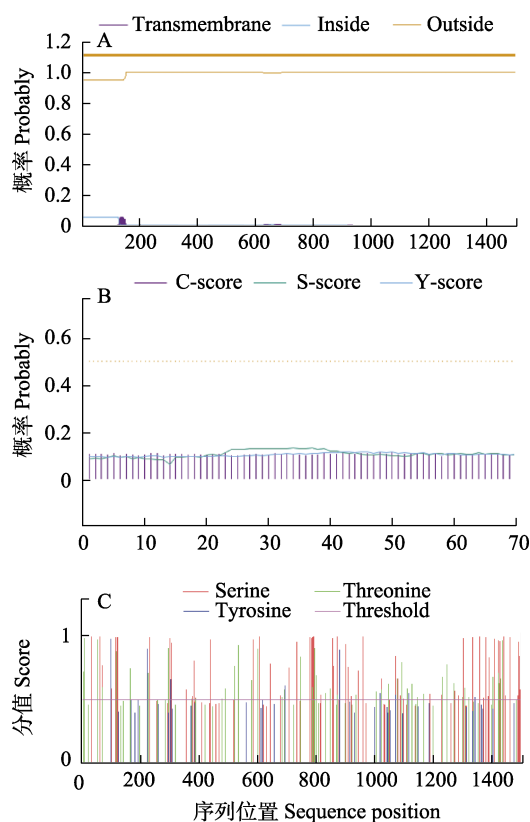


图 8 PIAtg26b 蛋白跨膜结构域 (A)、信号肽 (B) 及磷酸化位点 (C) 的预测

Fig. 8 Prediction of PIAtg26b protein transmembrane domain (A), signal peptide (B) and phosphorylation site (C)

2.7 PIATG26b 基因在荔枝霜疫霉不同阶段的表达水平分析

为进一步分析 Atg26 在荔枝霜疫霉中不同时期的作用, 以荔枝霜疫霉菌丝 (MY) 阶段的样本作为对照, 通过 qRT-PCR 分析 PIATG26b 在孢子囊 (SP)、游动孢子 (ZO) 及侵染 12、24、48、60 h 的表达量发现, 在游动孢子时期和侵染初期 (12 h), PIATG26b 表达量上调, 而在孢子囊时期和侵染后期, PIATG26b 的表达量并无明显变化 (图 9)。这一结果也说明 Atg26 在荔枝霜疫霉的无性繁殖及侵染阶段发挥重要作用。

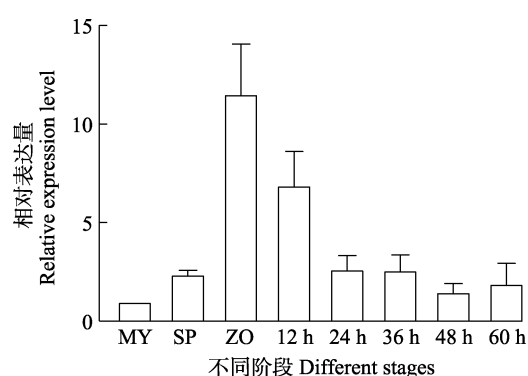


图 9 荔枝霜疫霉中 ATG26b 的 qRT-PCR 分析

Fig. 9 qRT-PCR analysis of ATG26b in *P. litchii*

3 讨论

细胞自噬是真核生物体内一种自我降解的过程, 对于在发育的关键时期平衡能量来源和应对营养应激非常重要^[29-30]。甾醇苷 (sterol glycosides) 广泛存在于细菌、真菌、植物和动物中, 并参与许多基本的细胞功能^[31-32]。Atg26 (Ugt51) 作为一种甾醇葡萄糖基转移酶, 能够将某些甾醇转化成甾醇葡萄糖苷 (SG)^[12]。在毕赤酵母 (*P. pastoris*) 中, 冗余的过氧化物酶体会通过巨自噬和微自噬 2 种方式降解。在过氧化物酶体微自噬过程中, 冗余的过氧化物酶体会被液泡隔离膜 (vacuolar sequestering membranes, VSMs) 吞没, 而 VSMs 的形成需要微噬膜装置 (micropexophagic membrane apparatus, MIPA) 的辅助^[33-34]。SG 的合成可以促进 PAS 的成熟及 MIPA 位点的形成, 并增强过氧化物酶体的选择性降解^[35-37]。

荔枝霜疫霉属于卵菌门 (Oomycetes), 在系统发育上与真菌差异极大。在毕赤酵母中, PBD 结构域和 CAT 结构域都是 Atg26 介导过氧化物酶

体自噬所必需的^[35]。但是在荔枝霜疫霉数据库中,并未发现同时含有 PBD 结构域和 CAT 结构域的蛋白,通过 Blastp 得到的同源蛋白只含有 CAT 结构域。在进一步对 Atg26 同源蛋白的保守基序分析时发现,除真菌外,大豆疫霉、拟南芥以及家鼠中也未发现含有 PBD 结构域的 Atg26 同源蛋白。在毕赤酵母中,Atg26 通过其 PBD 结构域中的 GRAM 功能域与磷脂酰肌醇 4'-磷酸 (Phosphatidylinositol 4'-phosphate, PI4P) 结合,从而定位于 MIPA,并通过其催化结构域调控 SG 合成^[35-36]。与大豆疫霉、致病疫霉和拟南芥相同,荔枝霜疫霉中的 Atg26 存在多个同源蛋白且无 GRAM 结构域,但通过 PIAtg26 的亚细胞定位分析发现,其同源蛋白分布在细胞的多个位置,我们推测在这些物种中 Atg26 可能通过其他未知的方式进行定位。在酿酒酵母中,Atg26 具有与 PpAtg26 序列相似的 3 个相同功能域 (PH、GRAM 和 UDPGT),但是 ScAtg26 的缺失并未影响其 prApe1 的成熟、巨自噬以及过氧化物酶体自噬,这也表明了不同生物体之间同源基因功能的差异性^[20]。

PIAtg26 互作蛋白预测结果显示,其相互作用蛋白集中在细胞代谢过程,且具有催化活性及结合能力,此外,PIAtg26b/c/d 具有潜在的 AIM 基序,也暗示着 PIAtg26 可能通过其互作蛋白来替代 GRAM 功能域的结合能力。蛋白质的翻译后修饰 (post translational modifications, PTMs) 参与多种细胞活动,磷酸化途径是研究最广泛的 PTMs 之一,其中,AMPK (AMP activated protein kinase) 是自噬信号传导的重要因子^[38-40]。通过生物信息学分析,在 PIAtg26b 蛋白中含有多个磷酸化位点,其可能通过磷酸化-去磷酸化反应进行自噬信号传导,调控荔枝霜疫霉的细胞活动。据报道,荔枝霜疫霉中的自噬相关蛋白大多数在游动孢子时期显著上调表达^[15]。在本研究中,与菌丝相比,PIATG26b 在游动孢子时期和侵染 12 h 上调表达,但是在孢子囊时期及侵染 24~60 h 的各阶段其表达量未明显提高。这也说明在荔枝霜疫霉中,Atg26 对其生长发育及致病力具有重要影响。

本研究通过生物信息学鉴定了荔枝霜疫霉中的 Atg26 同源蛋白,并发现该蛋白与其他真菌中 Atg26 同源蛋白在结构上具有明显差异,暗示了 Atg26 在不同物种中的功能差异性。通过 qRT-PCR 分析发现,PIATG26b 在荔枝霜疫霉的无性繁殖阶

段及侵染初期具有重要作用。后续将进一步研究该基因功能,以便对荔枝霜疫霉病的发生和传播进行有效的预防和控制。

参考文献

- [1] 齐文娥,陈厚彬,李洁欣. 2022 年中国大陆荔枝产业发展状况、趋势与对策[J]. 广东农业科学, 2023, 50(2): 147-155. QI W E, CHEN H B, LI J X. Status, trend and countermeasures of development of litchi industry in the mainland of China in 2022[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2023, 50(2): 147-155. (in Chinese)
- [2] 蔡学清,林娜,陈炜,胡方平. 荔枝霜疫霉的生物学特性[J]. 热带作物学报, 2009, 30(9): 1226-1231. CAI X Q, LIN N, CHEN W, HU F P. Biological characteristics of *Peronophythora litchii*[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2009, 30(9): 1226-1231. (in Chinese)
- [3] 杨德东. 荔枝霜疫霉病的发生与防控[J]. 植物医生, 2015, 28(5): 2. YANG D D. Occurrence and control of litchi downy blight caused by *Peronophythora litchii*[J]. Plant Health and Medicine, 2015, 28(5): 2. (in Chinese)
- [4] WANG H, SUN H, STAMMLER G, MA J, ZHOU M. Generation and characterization of isolates of *Peronophythora litchii* resistant to carboxylic acid amide fungicides[J]. Phytopathology, 2010, 100(5): 522-527.
- [5] 吕林,杨成东,张雪,于戈,陈泰旭,陈庆河. TOR 抑制剂雷帕霉素对荔枝霜疫霉生长发育及自噬的影响[J]. 福建农业学报, 2022, 37(11): 6. LYU L, YANG C D, ZHANG X, YU G, CHEN T X, CHEN Q H. Effect of TOR inhibitor rapamycin on growth, development, and autophagy of *Peronophythora litchii*[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2022, 37(11): 6. (in Chinese)
- [6] 黄河,王春平,徐大雅. 荔枝霜疫霉的研究[J]. 真菌学报, 1983, 2(4): 201-206. HUANG H, WANG C P, XU D Y. Studies on *Peronophythora litchii*[J]. Acta Mycologica Sinica, 1983, 2(4): 201-206. (in Chinese)
- [7] 余州,王彤,宋雅娟,陈琳,王哲,马显杰. 细胞自噬的研究方法进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2019, 35(9): 849-854. YU Z, WANG T, SONG Y J, CHEN L, WANG Z, MA X J. Advances in research methods of cellular autophagy[J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2019, 35(9): 849-854. (in Chinese)
- [8] MATSUURA A, TSUKADA M, WADA Y, OHSUMI Y. Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic

- process in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Gene*, 1997, 192(2): 245-250.
- [9] ISODA T, TAKEDA E, HOSOKAWA S, HOTTA-REN S, OHSUMI Y. Atg45 is an autophagy receptor for glycogen, a non-preferred cargo of bulk autophagy in yeast[J]. *iScience*, 2024, 27(6): 109810.
- [10] MIZUSHIMA N, KOMATSU M. Autophagy: renovation of cells and tissues[J]. *Cell*, 2011, 147(4): 728-741.
- [11] FARUK M O, ICHIMURA Y, KOMATSU M. Selective autophagy[J]. *Cancer Science*, 2021, 112(10): 3972-3978.
- [12] WARNECKE D, ERDMANN R, FAHL A, HUBE B, MÜLLER F, ZANK T, ZÄHRINGER U, HEINZ E. Cloning and functional expression of UGT genes encoding sterol glucosyltransferases from *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Pichia pastoris*, and *Dictyostelium discoideum*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(19): 13048-13059.
- [13] KIKUMA T, TADOKORO T, MARUYAMA J I, KITAMOTO K. AoAtg26, a putative sterol glucosyltransferase, is required for autophagic degradation of peroxisomes, mitochondria, and nuclei in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*[J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2017, 81(2): 384-395.
- [14] ASAKURA M, NINOMIYA S, SUGIMOTO M, OKU M, YAMASHITA S, OKUNO T, SAKAI Y, TAKANO Y. Atg26-mediated pexophagy is required for host invasion by the plant pathogenic fungus *Colletotrichum orbiculare*[J]. *Plant Cell*, 2009, 21(4): 1291-1304.
- [15] 王荣波, 陈姝樽, 郭朦朦, 李文强, 刘裴清, 李本金, 翁启勇, 陈庆河. 荔枝霜疫霉自噬相关基因的鉴定与表达分析[J]. *植物病理学报*, 52(3): 310-320.
- WANG R B, CHEN S Z, GUO M M, LI W Q, LIU P Q, LI B J, WENG Q Y, CHEN Q H. Identification and expression analysis of autophagy-related genes in *Peronophythora litchii*[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 52(3): 310-320. (in Chinese)
- [16] YANG C, LUO M F, ZHANG X, YE L L, YU G, LYU Y, CHEN Y, CHEN T X, WANG X J, FENG W Z, CHEN Q H. Autophagy-related protein PIAtg3 participates in vegetative growth, sporangial cleavage, autophagy and pathogenicity of *Peronophythora litchii*[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2024, 23(11): 3788-3800.
- [17] LYU L, YANG C, ZHANG X, CHEN T, LUO M, YU G, CHEN Q. Autophagy-related protein PIATG2 regulates the vegetative growth, sporangial cleavage, autophagosome formation, and pathogenicity of *Peronophythora litchii*[J]. *Virulence*, 2024, 15(1): 2322183.
- [18] YU G, LI W, YANG C, ZHANG X, LUO M, CHEN T, WANG X, WANG R, CHEN Q. PIAtg8-mediated autophagy regulates vegetative growth, sporangial cleavage, and pathogenesis in *Peronophythora litchii*[J]. *Microbiology Spectrum*, 2024, 12(1): e0353123.
- [19] 陈泰旭, 杨成东, 于戈, 罗曼非, 张雪, 吕林, 陈庆河. 自噬相关基因 *PIATG12* 对荔枝霜疫霉生长发育和致病性的影响[J]. *农业生物技术学报*, 2024, 32(9): 2137-2149.
- CHEN T X, YANG C D, YU G, LUO M F, ZHANG X, LYU L, CHEN Q H. Effect of autophagy-related gene *PIATG12* on the growth, development and pathogenicity of *Peronophythora litchii*[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2024, 32(9): 2137-2149. (in Chinese)
- [20] CAO Y, KLIONSKY D J. Atg26 is not involved in autophagy-related pathways in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Autophagy*, 2007, 3(1): 17-20.
- [21] CHEN X L, WANG Z, LIU C. Roles of peroxisomes in the rice blast fungus[J]. *Biomed Research International*, 2016, 2016(1): 9343417.
- [22] LV W, WANG C, YANG N, QUE Y, TALBOT N J, WANG Z. Genome-wide functional analysis reveals that autophagy is necessary for growth, sporulation, deoxynivalenol production and virulence in *Fusarium graminearum*[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 11062.
- [23] CHEN C, CHEN H, ZHANG Y, THOMAS H R, FRANK M H, HE Y, XIA R. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [24] WATERHOUSE A, BERTONI M, BIENERT S, STUDER G, TAURIELLO G, GUMIENNY R, HEER FT, DE BEER T A P, REMPFER C, BORDOLI L, LEPORE R, SCHWEDE T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(W1): W296-W303.
- [25] ZHANG D, GAO F, JAKOVLIC I, ZOU H, ZHANG J, LI W X, WANG G T. PhyloSuite: an integrated and scalable desktop platform for streamlined molecular sequence data management and evolutionary phylogenetics studies[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2020, 20(1): 348-355.
- [26] SZKLARCZYK D, FRANCESCHINI A, WYDER S, FORSLUND K, HELLER D, HUERTA-CEPAS J, SIMONOVIC M, ROTH A, SANTOS A, TSAFOU K P, KUHN M, BORK P, JENSEN L J, VON MERING C. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life[J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(DI): D447-452.
- [27] SINGH A, COPELAND M M, KUNDROTAS P J, VAKSER I A. GRAMM Web server for protein docking[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2024, 2714: 101-112.

- [28] ROGOV V V, NEZIS I P, TSAPRAS P, ZHANG H, DAGDAS Y, NODA NN, NAKATOGAWA H, WIRTH M, MOUILLERON S, MCEWAN D G, BEHREND S, DERETIC V, ELAZAR Z, TOOZE S A, DIKIC I, LAMARK T, JOHANSEN T. Atg8 family proteins, LIR/AIM motifs and other interaction modes[J]. *Autophagy Reports*, 2023, 2(1): 27694127.
- [29] GOULD S J, KELLER G A, SUBRAMANI S. Identification of peroxisomal targeting signals located at the carboxy terminus of four peroxisomal proteins[J]. *Journal of Cell Biology*, 1988, 107(3): 897-905.
- [30] GLICK D, BARTH S, MACLEOD K F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms[J]. *Journal of Pathology*, 2010, 221(1): 3-12.
- [31] MADINA B R, SHARMA L K, CHATURVEDI P, SANGWAN R S, TULI R. Purification and characterization of a novel glucosyltransferase specific to 27 beta-hydroxy steroidal lactones from *Withania somnifera* and its role in stress responses[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2007, 1774(9): 1199-1207.
- [32] THUAN N H, YAMAGUCHI T, LEE J H, SOHNG J K. Characterization of sterol glucosyltransferase from *Salinispora tropica* CNB-440: potential enzyme for the biosynthesis of sitosteryl glucoside[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2013, 52(4/5): 234-240.
- [33] KIEL J A, KOMDUUR J A, VAN DER KLEI I J, VEENHUIS M. Macropexophagy in *Hansenula polymorpha*: facts and views[J]. *FEBS Letters*, 2003, 549(1/3): 1-6.
- [34] DUNN WA J R, CREGG J M, KIEL J A, VAN DER KLEI I J, OKU M, SAKAI Y, SIBIRNY A A, STASYK O V, VEENHUIS M. Pexophagy: the selective autophagy of peroxisomes[J]. *Autophagy*, 2005, 1(2): 75-83.
- [35] OKU M, WARNECKE D, NODA T, MÜLLER F, HEINZ E, MUKAIYAMA H, KATO N, SAKAI Y. Peroxisome degradation requires catalytically active sterol glucosyltransferase with a GRAM domain[J]. *EMBO Journal*, 2003, 22(13): 3231-3241.
- [36] YAMASHITA S, OKU M, WASADA Y, ANO Y, SAKAI Y. PI4P-signaling pathway for the synthesis of a nascent membrane structure in selective autophagy[J]. *Journal of Cell Biology*, 2006, 173(5): 709-717.
- [37] NAZARKO T Y, POLUPANOV A S, MANJITHAYA R R, SUBRAMANI S, SIBIRNY A A. The requirement of sterol glucoside for pexophagy in yeast is dependent on the species and nature of peroxisome inducers[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2007, 18(1): 106-118.
- [38] SINGH V, RAM M, KUMAR R, PRASAD R, ROY B K, SINGH K K. Phosphorylation: implications in cancer[J]. *Protein Journal*, 2017, 36(1): 1-6.
- [39] PAQUETTE M, EL-HOUJEIRI L C, ZIRDEN L, PUUSTINEN P, BLANCHETTE P, JEONG H, DEJGAARD K, SIEGEL P M, PAUSE A. AMPK-dependent phosphorylation is required for transcriptional activation of TFEB and TFE3[J]. *Autophagy*, 2021, 17(12): 3957-3975.
- [40] KIM J, KUNDU M, VIOLLET B, GUAN K L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2011, 13(2): 132-141.