

禾谷炭疽菌 RGS 蛋白生物信息学分析

韩长志

(西南林业大学 林学院 云南省森林灾害预警与控制重点实验室 云南 昆明 650224)

摘要: 【目的】明确禾谷炭疽菌中存在的典型 RGS, 及其信号肽、跨膜区、二级结构特征, 明确该菌 RGS 与其他病菌之间的关系, 最终为深入开展 RGS 定位、功能研究打下坚实的理论基础, 也为进一步开展其他炭疽菌的研究提供重要的理论指导。【方法】基于酿酒酵母中已经报道的 4 个典型 RGS 序列, 利用 BLASTp 以及关键词对禾谷炭疽菌蛋白质数据库进行比对、搜索, 以及通过 SMART 保守结构域分析。同时, 通过对禾谷炭疽菌中典型 RGS 氨基酸序列进行细胞信号肽、跨膜区结构以及二级结构等生物信息学分析, 此外, 通过对禾谷炭疽菌中的典型 RGS 与其他物种中的同源序列进行遗传关系比较分析。【结果】明确禾谷炭疽菌存在 6 个典型的 RGS, 上述 RGS 在蛋白质二级结构中均含有较高比例的 α 螺旋结构, 而在信号肽方面, 除 CgRGS6 含有明显的信号肽序列外, 其他 RGS 则没有; 6 个 RGS 中 3 个定位在细胞核中, 其他则定位在质膜、内质网、线粒体上。【结论】禾谷炭疽菌中的 RGS 与 *C. higginsianum*、*C. gloeosporioides* Cg-14/Nara gc5、*C. orbiculare* 等炭疽菌属中的病菌具有较高的同源序列, 以及较近的亲缘关系。

关键词: 禾谷炭疽菌, G 蛋白信号调控因子, 信号肽, 二级结构, 炭疽菌属

Bioinformatics analysis on regulators of G-protein signaling in *Colletotrichum graminicola*

HAN Chang-Zhi

(College of Forestry, Southwest Forestry University, The Key Laboratory of Forest Disaster Warning and Control of Yunnan Province, Kunming, Yunnan 650224, China)

Abstract: [Objective] To determine the typical RGS in *Colletotrichum graminicola*, and its signal peptide, transmembrane region and the secondary structure, and to provide a strong theoretical foundation for studying the positioning and function of RGS, but also provide an important theoretical guidance to clarify the other pathogen in *Colletotrichum* spp.. [Methods] Based on the four typical RGS sequences have been reported in *Saccharomyces cerevisiae*, to search RGS related protein sequence from the protein databases of *Colletotrichum* spp. with the BLASTp as well as the use of words, and to search the conserved domain in the SMART online. Meanwhile, bioinformatics

基金项目: 云南省森林灾害预警与控制重点实验室开放基金项目(No. ZK11A101, ZK11SB01); 云南省教育厅科学研究基金项目(No. 2014Y330); 云南省应用基础研究计划(No. 2011FB066)

*通讯作者: Tel: 86-871-63863540; 信箱: hanchangzhi@gmail.com

收稿日期: 2013-10-26; 接受日期: 2013-12-11; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-01-02

analysis have made including the signal peptide, trans-membrane domain structure and the secondary structure, In addition, analysis of genetic relationships through comparative typical RGS in *C. graminicola* with homologous sequences of other species. **[Results]** There are six typical RGSs in *C. graminicola*, which have higher proportion of helical secondary structure. And these RGS do not contain the typical signal peptide sequence except for CgRGS6, and the half of six RGSs positioned in the nucleus, and the other is positioned in the plasma membrane, endoplasmic reticulum, and mitochondria, respectively. **[Conclusion]** *C. higginsianum*, *C. gloeosporioides* Cg-14/Nara gc5, *C. orbiculare* has a high sequence homology and close genetic relationship with *C. graminicola*.

Keywords: *Colletotrichum graminicola*, RGS, Signal peptide, Secondary structure, *Colletotrichum* spp.

禾谷炭疽菌[*Colletotrichum graminicola* (Cesati Wilson)]可以侵染玉米、小麦、高粱等禾本科农作物引起炭疽病,给各国农业生产造成巨大的经济损失^[1-5]。自 20 世纪 70 年代以来,由该病菌引起的玉米炭疽病在美国、印度等国家就非常普遍^[1,6-7]。植物与病原菌互作过程中,病原菌为了更好地操控植物,分泌大量的效应分子来与植物中的防卫反应相关分子发生作用,从而得以在植物中实现定殖、扩展等过程。在这一过程中,众多细胞信号转导途径参与其中,从而完成感知外界环境刺激、内部信号传递以及应对反应处置等,其中,尤以将外界信号传递到细胞内部的 G 蛋白(鸟嘌呤核苷酸结合蛋白, Guanine nucleotide binding protein)信号途径所发挥的作用最大,而这一途径中的 G 蛋白信号调控因子(Regulators of G-protein signaling, RGS),所具有的主要功能在于通过促进 G 蛋白 α 亚基($G\alpha$)耦连的 GTP 水解,使 $G\alpha$ 和 $G\beta\gamma$ 亚基发生重新聚合,导致 G 蛋白失活而实现快速关闭上述信号途径,即对异三聚体 G 蛋白途径具有负调控作用^[8-9]。

基于此,学术界对真菌 RGS 的研究从其结构特征、定位情况以及功能等方面开展了大量工作^[10]。众多病原菌中含有的 RGS 数量得以明确,如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae* S288c)中含有 4 个 RGS,分别为 Sst2、Rgs2、Rax1 和 Mdm1^[11-12]; 构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)中含有 5 个 RGS;分别为 F1bA、RgsA、RgsB、RgsC、GprK^[13-16];板栗疫病菌(*Cryphonectria parasitica*)中的 CPRGS-1^[17];绿僵菌(*Metarhizium anisopliae*)中的 Cag8^[18]及稻瘟菌(*Magnaporthe oryzae*)中的

MoRgs1、MoRgs2、MoRgs3、MoRgs4、MoRgs5、MoRgs6、MoRgs7 和 MoRgs8^[19-20];轮枝镰孢菌(*Fusarium verticillioides*)中有 6 个 RGS,分别为 RgsA、RgsB、RgsC1、RgsC2、FlbA1 和 FlbA2^[21];玉米赤霉菌(*Gibberella zeae*)中含有 7 个 RGS,分别为 FgFlbA、FgFlbB、FgRgsA、FgRgsB、FgRgsB2、FgRgsC 和 FgGprK^[22]。同样,一些其他真菌中含有 RGS 的数量也有报道,如新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)中含有 3 个,分别为 Crg1、Crg2 和 Crg3^[23-24];捕食线虫的真菌寡孢节丛孢(*Arthrobotrys oligospora*)中含有 7 个 RGS^[10]。然而,对于上述真菌中 RGS 功能的了解却十分有限^[10],现已明确真菌中的 RGS 多与菌丝生长发育过程中的有性生殖调控以及侵染过程中的次生代谢产物、色素合成等过程有关^[12]。

本研究利用 *S. cerevisiae* S288c 中已经报道的 4 个典型 RGS 氨基酸序列,通过在炭疽菌属蛋白质数据库中进行 BLASTp 比对分析,以及通过关键词搜索,获得与酿酒酵母 RGS 同源的 *C. graminicola* 序列,并通过保守结构域分析、疏水性分析、二级结构预测、信号肽分析以及跨膜区结构分析、亚细胞定位等生物信息学分析,以期明确该菌中所存在的 RGS 数量、理化性质、结构特征以及定位情况。同时,基于上述发现的 RGS 氨基酸序列,在美国国家生物信息中心(National center for biotechnology information, NCBI)在线进行同源序列搜索,通过遗传关系分析,以期为进一步开展同属于炭疽菌属但其基因组序列尚未公布的其他炭疽菌的研究提供重要的理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料

根据 *S. cerevisiae* S288c 中含有的 4 个 RGS (Sst2、Rgs2、Rax1 和 Mdm1) 氨基酸序列, 利用炭疽菌属蛋白质数据库 (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/colletotrichum_group/MultiHome.html) 在线 BLASTp 比对^[25], 所有参数均选择默认值, 获得 *C. graminicola* 中所含有的典型 RGS, 同时, 通过输入“Regulators of G-protein signaling”、“RGS”关键词, 在上述数据库中进行检索 RGS; 另外, 利用 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 明确该菌中 RGS 蛋白质登录号信息。

1.2 方法

1.2.1 保守结构域预测: 利用 SMART 网站在线分析 *C. graminicola* 中所含 RGS 所具有的保守结构域特征。

1.2.2 蛋白质疏水性预测: 利用 ProtScale 程序 (<http://web.expasy.org/protscale/>)^[26] 对 *C. graminicola* 中所含 RGS 进行疏水性测定。

1.2.3 蛋白质转运肽及信号肽预测: 对蛋白质转运肽(Transit peptide)的预测利用 TargetP 1.1 Server 在线分析实现 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>)^[27]。氨基酸信号肽(Signal peptide)的预测则是利用 SignalP 3.0 Server^[28] 在线分析实现 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/>)。

1.2.4 蛋白质二级结构及跨膜区结构预测: 对蛋白质二级结构预测采用 PHD^[29] 在线分析实现 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>)。同时, 对 *C. graminicola* 中所含 RGS 的跨膜区结构预测, 利用 TMHMM Server v. 2.0 实现 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)^[28]。

1.2.5 亚细胞定位分析: 对 *C. graminicola* 中所含 RGS 进行亚细胞定位分析, 利用 ProtComp v9.0 (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=protcompan&group=programs&subgroup=proloc>) 实现^[30], 以期获得蛋白质的定位情况。

1.2.6 系统进化树构建: 在 NCBI 中, 以 *C.*

graminicola 中所含 RGS 氨基酸序列为基础, 在线进行 BLASTp 同源搜索, 获得来自于不同物种的同源蛋白质序列。对所获得的同源序列, 利用 ClustalX^[31] 进行多重比对分析, 随后利用 MEGA 5.2.2 软件^[32] 构建系统进化树: 采用邻近法(Neighbor-Joining)构建系统发育树, 各分支之间的距离计算采用 p-Distance 模型, 系统可信度检测采用自举法(Bootstrapping)重复 1 000 次进行。

2 结果与分析

2.1 禾谷炭疽菌 6 个 RGS 均具有典型的保守域

基于酿酒酵母 4 个典型 RGS (Sst2、Rgs2、Rax1 和 Mdm1) 氨基酸序列, 对禾谷炭疽菌蛋白质数据库进行 BLASTp 比对分析, 其中与 Rax1 同源的序列 ID 为 GLRG_02968.1, 与 Sst2 同源的序列 ID 为 GLRG_02926.1, 与 Mmd1 同源的序列 ID 为 GLRG_08761.1, 并未发现与 Rgs2 同源的序列(表 1); 同时, 通过在上述数据库中输入“Regulators of G-protein signaling”和“RGS”关键词, 进行 RGS 搜索, 也获得了 3 条序列, 其 ID 分别为 GLRG_08725.1、GLRG_06020.1、GLRG_05339.1 (表 1)。综合上述搜寻, 总共获得禾谷炭疽菌中 6 条与酿酒酵母 RGS 有关的氨基酸序列。随后, 利用 SMART 在线分析, 结果显示, 上述 6 条序列均具有典型的 RGS 保守域结构, 同时还具有诸如 DEP、PAC、PX、PXA 等保守结构域(图 1)。这与 *A. nidulans*、*C. neoformans*、*G. zeae*、*M. oryzae* 中所含有 RGS 的结构相似^[12], 根据上述 6 条序列所含氨基酸的大小进行排序, 分别将其命名为 CgRGS1、CgRGS2、CgRGS3、CgRGS4、CgRGS5 和 CgRGS6 (表 1)。

通过 TMHMM Server v. 2.0 分析, CgRGS1、CgRGS4 以及 CgRGS5 不具有跨膜区结构, CgRGS2、CgRGS3 和 CgRGS6 具有不同数量的跨膜结构, 上述结果与 SMART 在线分析结果一致(图 1), 具体而言, CgRGS2 具有 3 个跨膜区, 所在位置分别为 252–274、283–302、335–357; CgRGS3 则具有 7 个跨膜区, 位置分别为 24–46、59–81、91–113、160–182、211–233、246–268、278–300; CgRGS6 含有 2 个跨膜区, 位置分别为 4–26、33–55 (图 1)。

表 1 禾谷炭疽菌 6 个典型 RGS 的信息及获取方法						
Table 1 The information and access methods of six typical RGSs in <i>C. graminicola</i>						
数据库序列号 ID	名称 Name	蛋白质登录号 Accession ID	氨基酸长度 AA Length (aa)	获取方法 Access method		
GLRG_08725.1	CgRGS1	EFQ33446.1	310	关键词搜索		
GLRG_02968.1	CgRGS2	EFQ27824.1	361	BLASTp Rax1		
GLRG_06020.1	CgRGS3	EFQ30876.1	589	关键词搜索		
GLRG_02926.1	CgRGS4	EFQ27782.1	740	BLASTp Sst2		
GLRG_05339.1	CgRGS5	EFQ30195.1	876	关键词搜索		
GLRG_08761.1	CgRGS6	EFQ33482.1	1 211	BLASTp Mmd1		

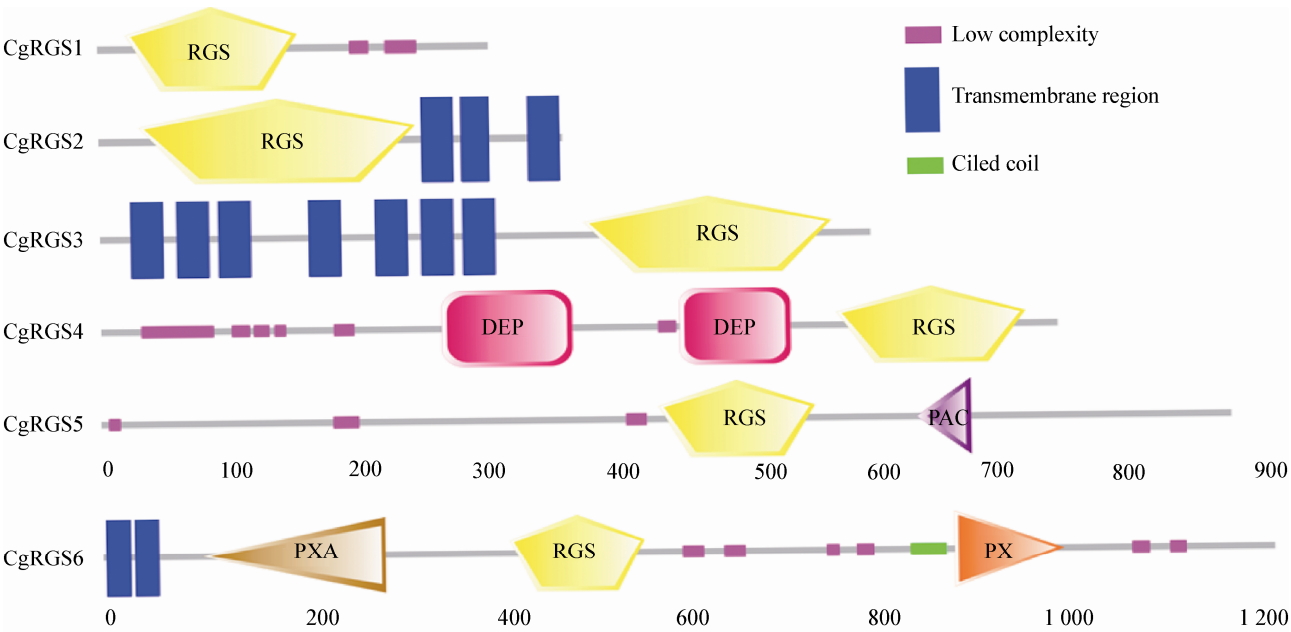


图 1 禾谷炭疽菌具有保守的结构域

Figure 1 The conserved domain of six RGS in *C. graminicola*
注：RGS：G 蛋白信号调节结构域；DEP：发现于 Dishevelled、Egl-10 和 Pleckstrin 的结构域；PAC：位于 PAS 基序的 C-端的结构域；RXA：与 PX 结构域相关；PX：PhoX 同源结构域。
Note: RGS: Regulator of G protein signalling domain; DEP: Domain found in Dishevelled, Egl-10, and Pleckstrin; PAC: Motif C-terminal to PAS motifs; RXA: Domain associated with PX domains; PX: PhoX homologous domain.

2.2 蛋白质疏水性预测

利用 ProtScale 程序，对禾谷炭疽菌 6 个典型 RGS 进行疏水性分析，结果显示，CgRGS1 中位于 164 位的甘氨酸(G)亲水性最强，为-1.979，而位于 18 位的亮氨酸(L)亲水性最弱(疏水性最强，下同)，为 1.184 (图 2A，表 2)；CgRGS2 中位于 130、131 位的蛋氨酸(M)、丝氨酸(S)亲水性最强，为-1.816，而位于 347 位的丙氨酸(A)亲水性最弱，为 2.763 (图 2B，表 2)；CgRGS3 中位于 128 位的酪氨酸(Y)

亲水性最强，为-1.916，而位于 292 位的谷氨酸(E)亲水性最弱，为 2.174 (图 2C，表 2)；CgRGS4 中位于 220 位的脯氨酸(P)亲水性最强，为-1.768，而位于 268 位的亮氨酸(L)亲水性最弱，为 1.232 (图 2D，表 2)；CgRGS5 中位于 257、258 位的天冬酰胺(N)、谷氨酸(E)亲水性最强，为-3.084，而位于 774 位的异亮氨酸(I)亲水性最弱，为 1.011 (图 2E，表 2)；CgRGS6 中位于 780、781、782 位的谷氨酸(E)、精氨酸(R)、天冬氨酸(D)亲水性最强，为

-2.442, 而位于 44 位的苏氨酸(T)亲水性最弱, 为 2.858 (图 2F, 表 2)。

对上述 6 个 RGS 的疏水性、亲水性数值进行统计分析, 结果显示, CgRGS1、CgRGS2、CgRGS3、CgRGS4、CgRGS5、CgRGS6 的疏水性氨基酸残基总和分别为 25.923、126.217、202.85、45.05、56.88、204.702, 而亲水性氨基酸残基数值总和则分别为-180.619、-136.595、-269.021、-453.516、-705.718、-679.026 (表 2), 上述结果表明, 禾谷炭疽菌中 6 个典型 RGS 尽管在“亲水性最强氨基酸残基位置、数值”、“疏水性最强氨基酸残基位置、数值”、“疏水性氨基酸残基数值总和”以及“亲水性氨基酸残基数值总和”等结果并不相同, 但是均为亲水性蛋白, 这与通过 GRAVY 计算所得结果一致

(数据未显示)。

2.3 转运肽及信号肽特征

转运肽是一种前导序列, 由 12-60 个氨基酸残基组成, 其功能在于引导某些在细胞溶质中合成的蛋白质进入线粒体和叶绿体等细胞器。除了细胞信号蛋白外各种内在蛋白均利用导肽到达细胞器。通过分析, CgRGS1 定位于线粒体上, 其预测值为 0.286, 所处的概率为 0.2 和 0.4 之间, 叶绿体转运肽、分泌途径信号肽的预测值分别为 0.505、0.073 (表 3); CgRGS2、CgRGS4 和 CgRGS5 没有确定出其定位情况, 有待于今后进一步的试验研究。值得注意的是, 尽管 CgRGS3 和 CgRGS6 均定位于分泌途径上, 但其预测概率不同, 前者概率较低, 仅为 0.2 和 0.4 之间, 而后者预测概率则大于 0.8 (表 3),

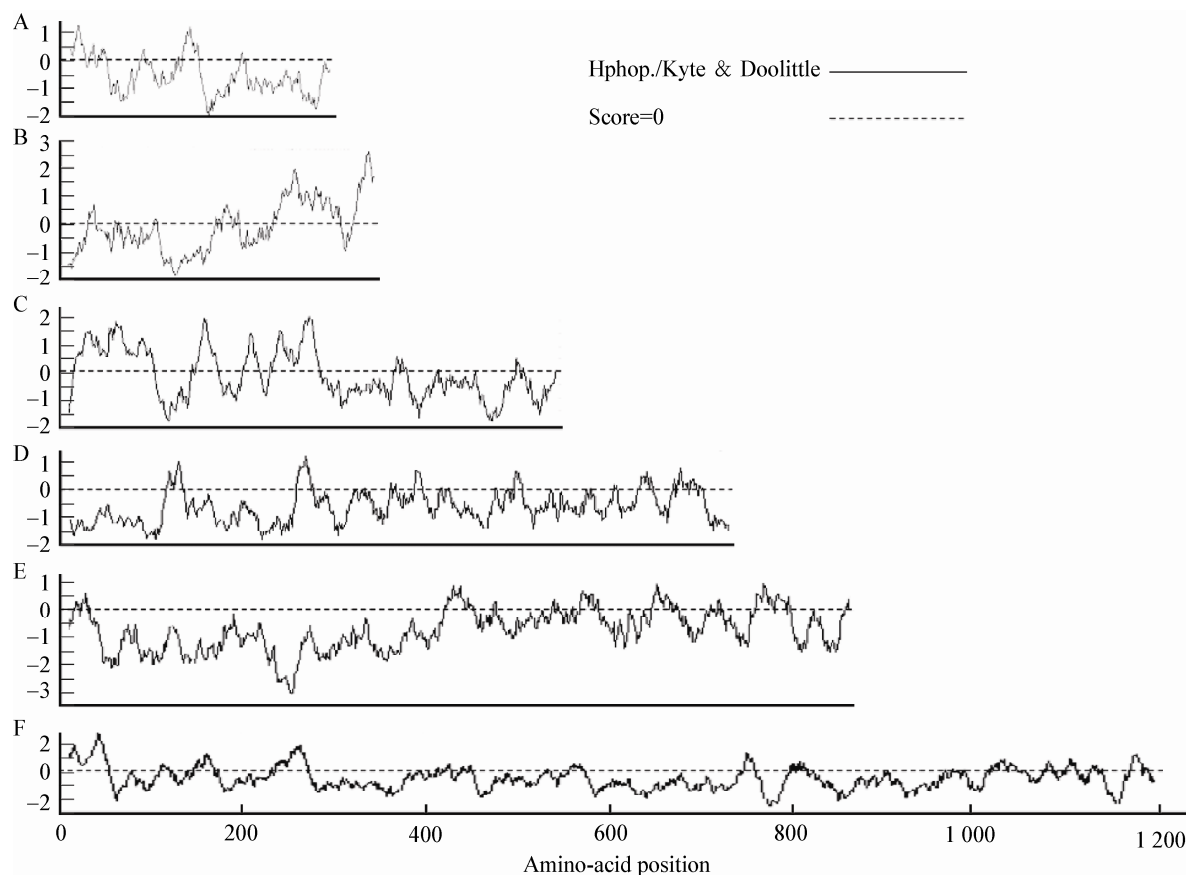


图 2 禾谷炭疽菌 RGS 疏水性情况

Figure 2 The hydrophobic of six RGS in *C. graminicola*

注: A、B、C、D、E、F 分别为 CgRGS1、CgRGS2、CgRGS3、CgRGS4、CgRGS5、CgRGS6 的疏水性分布情况。

Note: A, B, C, D, E, F, is distribution of hydrophobic of CgRGS1, CgRGS2, CgRGS3, CgRGS4, CgRGS5, CgRGS6, respectively.

表 2 禾谷炭疽菌 RGS 疏水性及亲水性氨基酸残基位置情况						
Table 2 The hydrophobic and hydrophilic amino acid residue position situation of RGS in <i>C. graminicola</i>						
	CgRGS1	CgRGS2	CgRGS3	CgRGS4	CgRGS5	CgRGS6
亲水性最强氨基酸残基	G	M、S	Y	P	N、E	E、R、D
Most hydrophilic amino acid residue						
位置 Position	164	130、131	128	220	257、258	780、781、782
数值 Value	-1.979	-1.816	-1.916	-1.768	-3.084	-2.442
疏水性最强氨基酸残基	L	A	E	L	I	T
Most hydrophobic amino acid residue						
位置 Position	18	347	292	268	774	44
数值 Value	1.184	2.763	2.174	1.232	1.011	2.858
疏水性氨基酸残基数值总和						
The numerical sum of hydrophobic amino acid residues	25.923	126.217	202.850	45.050	56.880	204.702
亲水性氨基酸残基数值总和						
The numerical sum of hydrophilic amino acid residues	-180.619	-136.595	-269.021	-453.516	-705.718	-679.026

表 3 禾谷炭疽菌 RGS 含有潜在转运肽的可能性预测结果					
Table 3 The possibilities of transit peptide of RGS in <i>C. graminicola</i>					
	叶绿体转运肽	线粒体目标肽	分泌途径信号肽	定位情况	预测可靠性
	Chloroplast transit peptide	Mitochondrial targeting peptide	Secretory pathway signal peptide	Localization	Reliability class
CgRGS1	0.505	0.286	0.073	线粒体	4
CgRGS2	0.232	0.023	0.867	—	2
CgRGS3	0.015	0.864	0.656	分泌途径	4
CgRGS4	0.313	0.028	0.721	—	3
CgRGS5	0.062	0.055	0.953	—	1
CgRGS6	0.009	0.997	0.043	分泌途径	1

注：可靠性(Reliability class, RC)分为 1-5 级，数值越大可靠性越差。1：概率为大于 0.8；2：概率在 0.6-0.8；3：概率在 0.4-0.6；4：概率在 0.2-0.4；5：概率为小于 0.2。

Note: Reliability class, from 1 to 5, where 1 indicates the strongest prediction. There are 5 reliability classes, defined as follows: 1: diff>0.800; 2: 0.800>diff>0.600; 3: 0.600>diff>0.400; 4: 0.400>diff>0.200; 5: 0.200>diff.

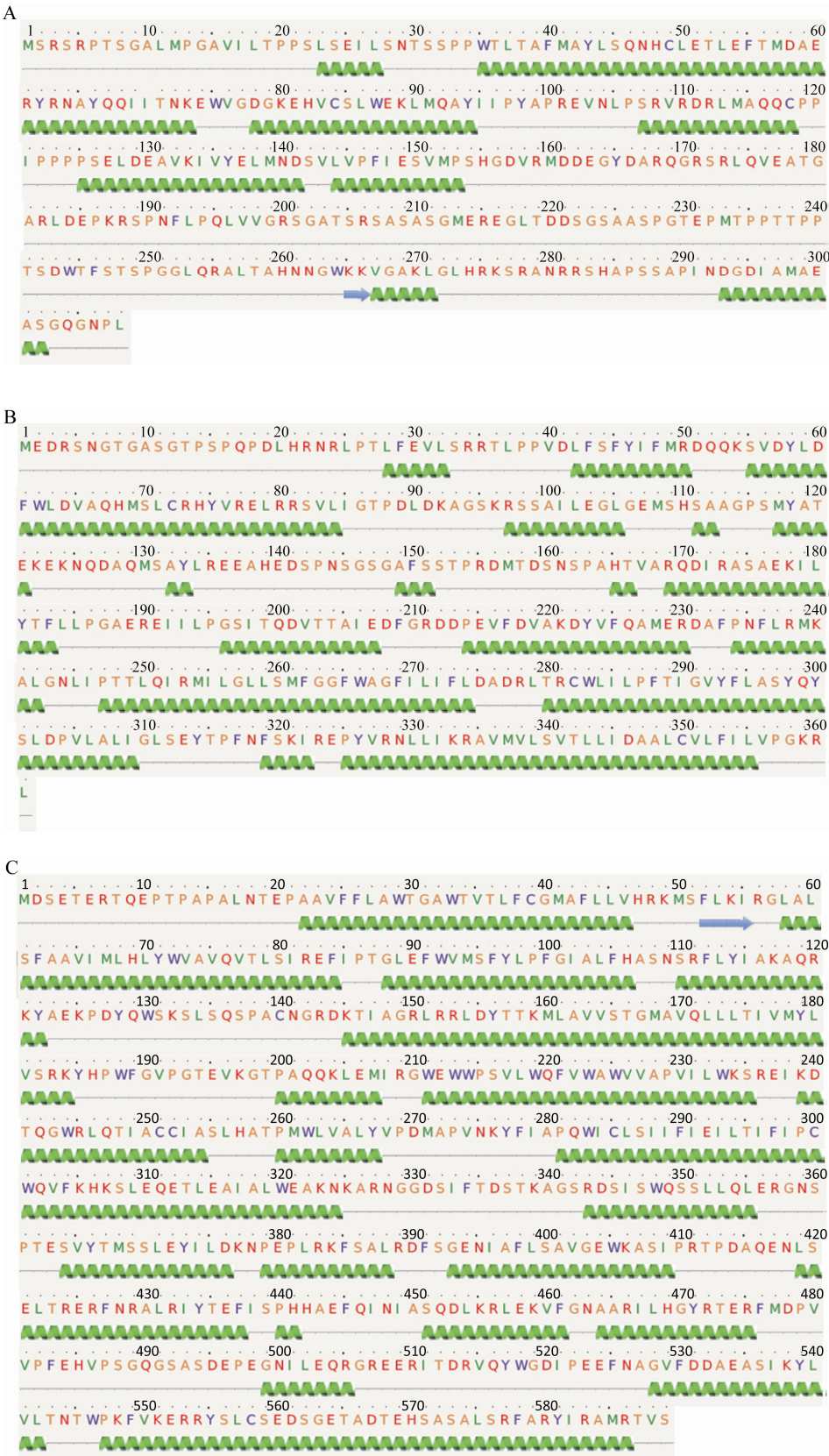
上述结果表明，CgRGS6 含有信号肽的可能性较大，后期的信号肽预测结果也验证了上述结论。

经过 SingnalP 3.0 分析，仅 CgRGS6 经 NN 和 HMM 预测具有信号肽序列，位置在 22-23 位，其切割位点为 GYA-VS；CgRGS1 经 NN 预测不具有信号肽序列，而通过 HMM 分析，其则含有信号肽序列，位置在 24-25，最大切割概率为 0.904；其他 RGS 则未发现有明显的信号肽序列(数据未显示)。

2.4 二级结构预测

目前，预测蛋白质二级结构的常用方法除

PHD 外，还有 PSIPRED^[33-34]和 JPRED^[35]。将 *C. graminicola* 的 6 个典型 RGS 氨基酸序列分别输入 PHD、PSIPRED、JPRED 蛋白质二级结构预测网站 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>)、(<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>)、(<http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/>) 获得其二级结构信息。上述网站所预测的二级结构基本类似(结果未显示)，以 PHD 预测结果为例，6 个 RGS 均含有α螺旋结构，所含比例也较高，而对于β转角结构，除 CgRGS2 不含有β转角外，其他 5 个尽管也含有该结构，但其比例均较低(图 3)。



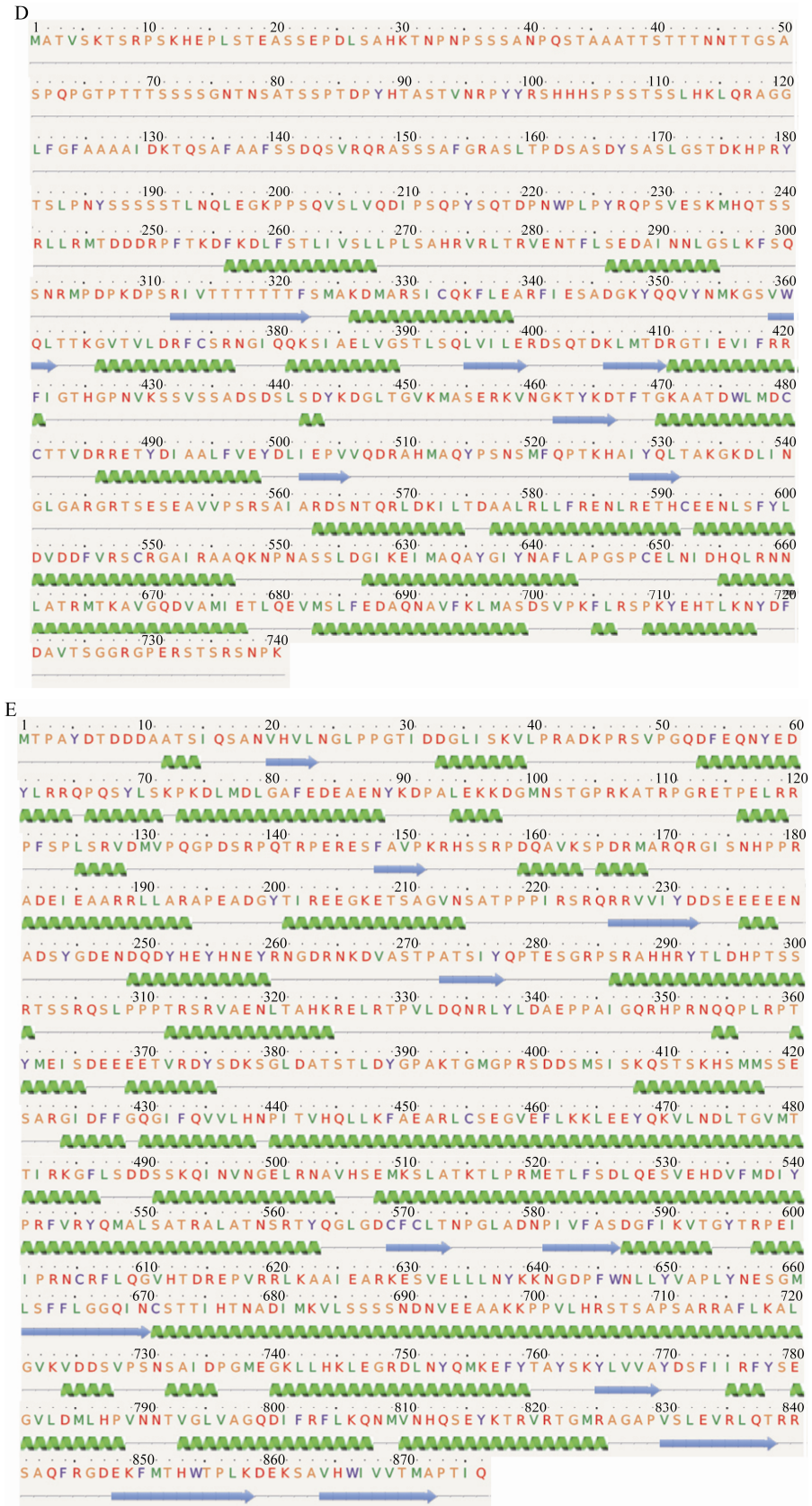




图3 禾谷炭疽菌 RGS 二级结构特征

Figure 3 The secondary structure character of six RGS in *C. graminicola*

注: A、B、C、D、E、F 分别为 CgRGS1、CgRGS2、CgRGS3、CgRGS4、CgRGS5、CgRGS6 的二级结构情况; G 为上述 6 个 RGS 所含有的 α 螺旋(Alpha helix)、 β 转角(Beta strand)以及无规卷曲(Disordered)在各自二级结构中所占比例情况。

Note: A, B, C, D, E, F, is secondary structure character of CgRGS1, CgRGS2, CgRGS3, CgRGS4, CgRGS5 and CgRGS6, respectively. G is the proportion of alpha helix, beta strand and disordered in secondary structure of every RGS in *C. graminicola*.

2.5 亚细胞定位分析

通过 TMHMM 分析 ,结果表明 ,*C. graminicola* 中 6 个典型的 RGS 亚细胞定位情况不尽相同 ,具体而言 ,CgRGS1、CgRGS4 以及 CgRGS5 均定位于细胞核中 ,而 CgRGS2 定位于质膜上 ,CgRGS3 定位于内质网上 ,CgRGS6 则定位于线粒体上(表 4)。

2.6 遗传关系

通过在 NCBI 中对 *C. graminicola* 6 个典型 RGS 序列进行 BLASTp 搜索 ,分别获得 CgRGS1、CgRGS2、CgRGS3、CgRGS4、CgRGS5、CgRGS6 的同源序列 ,对这些序列进行聚类分析。结果显示 ,就 *C. graminicola* 中 6 个 RGS 之间的亲缘关系而言 ,CgRGS1 与 CgRGS6 亲缘关系较近 ,CgRGS2 与 CgRGS4 亲缘关系较近 ,而 CgRGS3 和 CgRGS5 之间的亲缘关系较近(图 4) ;就 *C. graminicola* 中每一个 RGS 与其他物种同源序列之间的亲缘关系而言 ,CgRGS1 与希金斯炭疽菌(*Colletotrichum higginsianum*)中的 CCF46453.1、胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides* Cg-14)中的 EQB53246.1、西瓜炭疽病菌(*Colletotrichum orbiculare*)中的 ENH78898.1 之间亲缘关系较近 ;CgRGS2 与 *C. orbiculare* 中的 ENH80340.1、胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides* Nara gc5)

中的 ELA25443.1 之间的亲缘关系较近 ;CgRGS3 与 *C. higginsianum* 中的 CCF34848.1、*C. orbiculare* 中的 ENH78003.1、*C. gloeosporioides* Cg-14 中的 EQB56965.1 之间的亲缘关系较近 ;CgRGS4 与 *C. higginsianum* 中的 CCF36291.1、马唐炭疽菌(*Colletotrichum hanaui*)中的 ADE20133.1、*C. orbiculare* 中的 ENH80606.1、*C. gloeosporioides* Nara gc5 中的 ELA32529.1 之间的亲缘关系较近 ;CgRGS5 与 *C. orbiculare* 中的 ENH80005.1、*C. higginsianum* 中的 CCF45790.1、*C. gloeosporioides* Nara gc5 中的 ELA31285.1、*C. gloeosporioides* Cg-14 中的 EQB45833.1 之间的亲缘关系较近 ;CgRGS6 与 *C. higginsianum* 中的 CCF40340.1、*C. gloeosporioides* Cg-14 中的 ELA34238.1、*C. orbiculare* 中的 ENH85964.1 之间亲缘关系较近(图 4)。

此外 ,通过对 *C. graminicola*、*C. higginsianum*、*C. orbiculare*、*C. gloeosporioides* Nara gc5 和 *C. hanaui* β-微管蛋白序列的遗传关系分析 ,结果表明 ,*C. graminicola* 与其他炭疽菌属病菌 *C. higginsianum*、*C. orbiculare*、*C. gloeosporioides* Nara gc5、*C. hanaui* 亲缘关系均较近 ,这与上述 RGS 分析所得结果相一致(图 5)。

表 4 禾谷炭疽菌 RGS 亚细胞定位情况										
Table 4 The subcellular localization of RGS in <i>C. graminicola</i>										
名称 Name	核 Nuclear	质膜 Plasma membrane	胞外 Extra cellular	细胞质 Cytoplasmic	线粒体 Mitochondrial	内质网 Endoplasmic reticulum	过氧化 物酶体 Peroxisomal	溶酶体 Lysosomal	高尔 基体 Golgi	液泡 Vacuolar
CgRGS1	5.86	0.52	0.79	1.18	1.13	0	0.10	0.07	0.34	0
CgRGS2	0	6.27	0.68	0.35	1.75	0.29	0	0.10	0.56	0
CgRGS3	0	1.53	0	0.05	0.04	8.01	0.32	0.04	0	0
CgRGS4	4.88	1.14	1.15	1.09	1.43	0	0.31	0	0	0
CgRGS5	4.42	1.02	0.33	1.90	1.67	0.11	0.11	0.07	0.37	0
CgRGS6	0	0.98	0	0	8.22	0.04	0	0.21	0.16	0.39

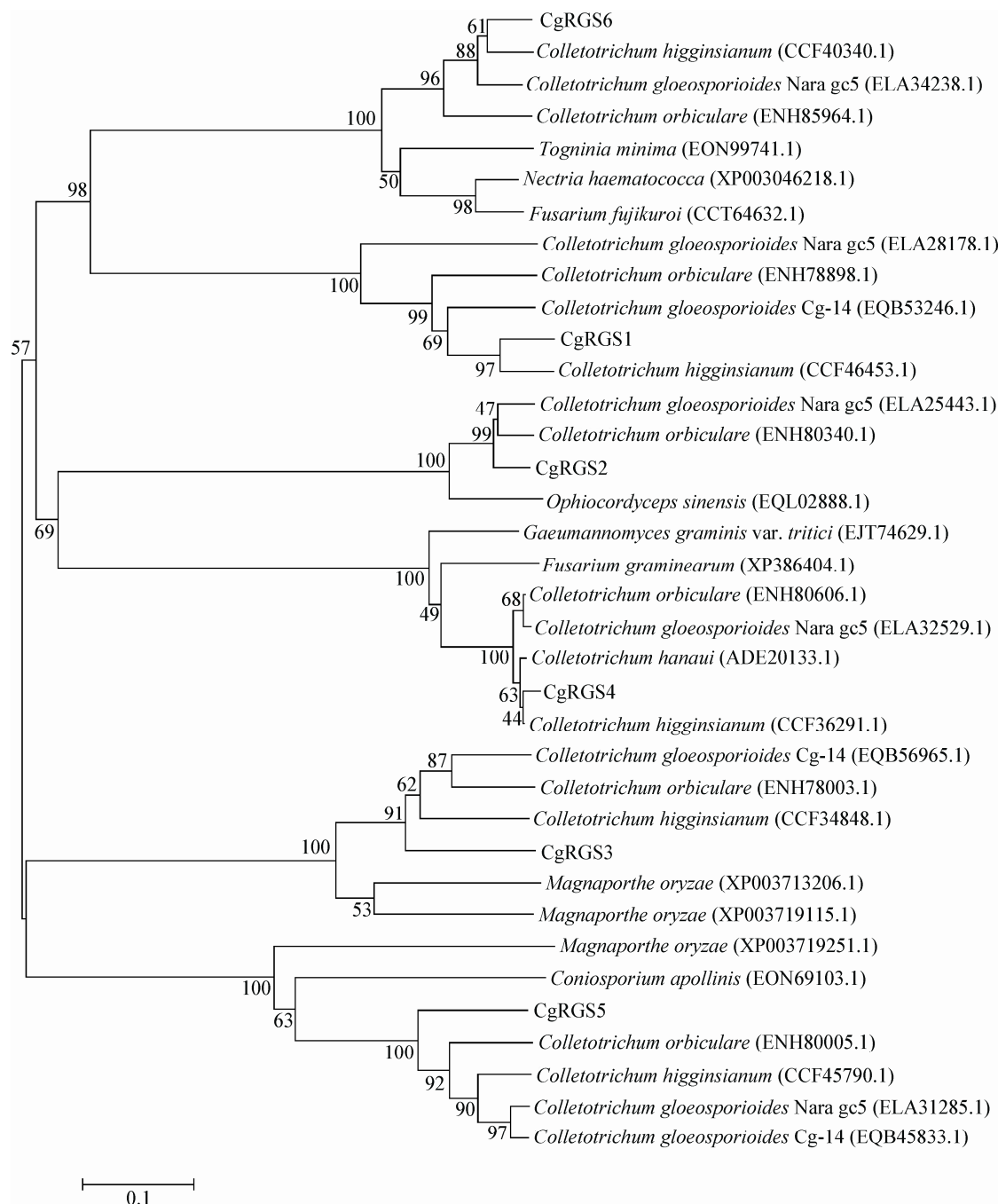


图4 禾谷炭疽菌中不同 RGS 与其他物种中同源序列之间的遗传关系

Figure 4 The genetic relationships of six RGSs in *C. graminicola* compared with its homologous sequences from other species

注: CgRGS1-6: 禾谷炭疽菌中 6 个 RGS. 图中节点数字为 Bootstrap 百分比支持率值(仅显示 50%以上), 自举数据集为 1 000 次; 括号内序列号为 GenBank 登录号; 标尺表示 10% 的序列差异.

Note: CgRGS1-6: Six RGSs in *C. graminicola*. Branch points were supported by parsimony bootstrap values (1 000 replicates) of >50%. Sequence numbers in parentheses are the GenBank accession numbers. Clusters designated clades with 10% intraclade divergence.

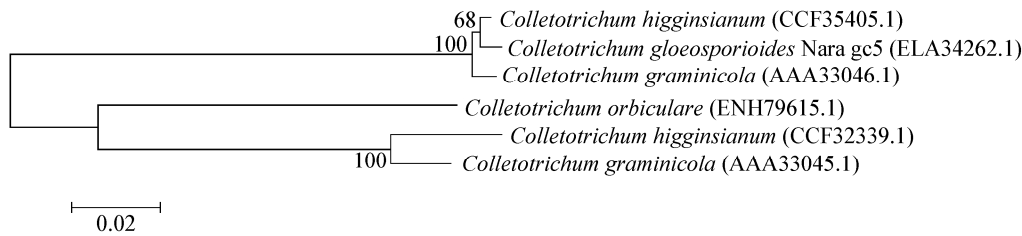


图 5 禾谷炭疽菌与其他炭疽菌属β-微管蛋白之间的遗传关系

Figure 5 The genetic relationships of β-tubulin in *C. graminicola* compared with *Colletotrichum* spp.

注：图中节点数字为 Bootstrap 百分比支持率值(仅显示 50%以上)，自举数据集为 1 000 次；括号内序列号为 GenBank 登录号；标尺表示 2% 的序列差异。
Note: Branch points were supported by parsimony bootstrap values (1 000 replicates) of >50%. Sequence numbers in parentheses are the GenBank accession numbers. Clusters designated clades with 2% intraclade divergence.

3 结论与讨论

C. graminicola 可以侵染众多粮食作物引起炭疽病，给生产上造成巨大的经济损失。深入解析该病菌致病因子，有助于为开发防治该病害的药剂提供重要的理论指导。同时，植物病原菌在感受外界条件刺激以及环境变化过程中，特别是在其生长发育以及致病过程中，其存在的细胞信号传递途径发挥着重要的作用。目前，已经明确有 MAPK、cAMP 以及 G 蛋白信号等 3 种保守途径，参与植物病原菌的上述过程，而 RGS 作为 G 蛋白信号转导过程中重要的调节因子，对其开展深入研究具有重要的意义。

本研究通过利用酿酒酵母中已经报道的 4 个 RGS 氨基酸序列，在炭疽菌属蛋白质数据库中进行 BLASTp 比对，以及通过搜索关键词等方法，共获得 *C. graminicola* 中 6 个典型的 RGS 氨基酸序列。基于上述氨基酸序列，利用 SMART、SignalP、TMHMM 等生物信息学分析网站，对其进行保守结构域、信号肽以及跨膜区等分析，结果表明上述 6 个 RGS 均具有典型的 RGS 保守结构域，根据氨基酸大小，分别命名为 CgRGS1、CgRGS2、CgRGS3、CgRGS4、CgRGS5 和 CgRGS6；除 CgRGS6 含有明显的信号肽序列外，其他 RGS 则没有；上述 RGS 均含有典型的α螺旋结构，其所占比例较高；6 个 RGS 亚细胞定位情况不尽相同，但有 3 个定位在细胞核中，其他则定位在质膜、内质网、线粒体上。此外，通过对 *C. graminicola* 中

的 6 个 RGS 与其他物种中的 30 个同源序列进行遗传关系比较分析，发现 *C. graminicola* 中的 RGS 与 *C. higginsianum*、*C. gloeosporioides* Cg-14/Nara gc5、*C. orbiculare* 等炭疽菌属中的病菌具有较高的同源序列，具有较近的亲缘关系。

目前，炭疽菌属中的 *C. graminicola* 与 *C. higginsianum* 均已经完成了基因组测序工作，对于其开展致病基因的研究起到了重要推动作用，同时，对于上述病菌所开展的研究工作也为炭疽菌属中其他病菌的工作开展提供重要的理论指导作用。特别是对于引起林业上重要的经济林树种核桃、板栗的炭疽病，造成生产上产生巨大经济损失的胶孢炭疽菌的研究具有重要意义，同样，对于引起西瓜、甜瓜等瓜类炭疽病的 *C. orbiculare* 开展 RGS 等致病基因的研究也具有重要的理论指导意义。

参 考 文 献

[1] Bergstrom GC, Nicholson RL. The biology of corn anthracnose: knowledge to exploit for improved management[J]. Plant Disease, 1999, 83(7): 596-608.
[2] Callaway M, Smith M, Coffman W. Effect of anthracnose stalk rot on grain yield and related traits of maize adapted to the northeastern United States[J]. Canadian Journal of Plant Science, 1992, 72(4): 1031-1036.
[3] Keller N, Bergstrom G. Developmental predisposition of maize to anthracnose stalk rot[J]. Plant Disease, 1988, 72(11): 972-980.
[4] Leonard KJ, Thompson DL. Effects of temperature and host maturity on lesion development of *Colletotrichum graminicola* (stalk rot) on corn (Fungus diseases)[J]. Phytopathology, 1976(66): 635-639.
[5] Warren H, Nicholson R, Ullstrup A, et al. Observations of *Colletotrichum graminicola* on sweet corn in Indiana[J].

- Plant Disease Report, 1973(57): 143-144.
- [6] Anderson B, White D. Fungi associated with cornstalks in Illinois in 1982 and 1983[J]. Plant Disease, 1987, 71(2): 135-137.
- [7] Byrnes K, Carroll R. Fungi causing stalk rot of conventional-tillage and no-tillage corn in Delaware[J]. Plant Disease, 1986, 70(3): 238-239.
- [8] Abramow-Newerly M, Roy AA, Nunn C, et al. RGS proteins have a signalling complex: interactions between RGS proteins and GPCRs, effectors, and auxiliary proteins[J]. Cell Signal, 2006, 18(5): 579-591.
- [9] McCudden CR, Hains MD, Kimple RJ, et al. G-protein signaling: back to the future[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2005, 62(5): 551-577.
- [10] 赵勇, 王云川, 蒋德伟, 等. 真菌 G 蛋白信号调控蛋白的功能研究进展[J]. 微生物学通报, 2014, 41(4): 712-718
- [11] Dohlman HG, Song J, Ma D, et al. Sst2, a negative regulator of pheromone signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: expression, localization, and genetic interaction and physical association with Gpa1 (the G-protein alpha subunit)[J]. Molecular and Cellular Biology, 1996, 16(9): 5194-5209.
- [12] Wang Y, Geng Z, Jiang D, et al. Characterizations and functions of regulator of G protein signaling (RGS) in fungi[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(18): 7977-7987.
- [13] Yu J. Heterotrimeric G protein signaling and RGSs in *Aspergillus nidulans*[J]. Journal of Microbiology, 2006, 44(2): 145.
- [14] Han KH, Seo JA, Yu JH. Regulators of G-protein signalling in *Aspergillus nidulans*: RgsA downregulates stress response and stimulates asexual sporulation through attenuation of GanB (Gα) signalling[J]. Molecular Microbiology, 2004, 53(2): 529-540.
- [15] Yu JH, Wieser J, Adams T. The *Aspergillus* FlbA RGS domain protein antagonizes G protein signaling to block proliferation and allow development[J]. The EMBO Journal, 1996, 15(19): 5184.
- [16] Lee BN, Adams TH. Overexpression of *flbA*, an early regulator of *Aspergillus* asexual sporulation, leads to activation of *brlA* and premature initiation of development[J]. Molecular Microbiology, 1994, 14(2): 323-334.
- [17] Segers GC, Regier JC, Nuss DL. Evidence for a role of the regulator of G-protein signaling protein CPRGS-1 in G-subunit CPG-1-mediated regulation of fungal virulence, conidiation, and hydrophobin synthesis in the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*[J]. Eukaryotic Cell, 2004, 3(6): 1454-1463.
- [18] Fang W, Pei Y, Bidochka MJ. A regulator of a G protein signalling (RGS) gene, *cag8*, from the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* is involved in conidiation, virulence and hydrophobin synthesis[J]. Microbiology, 2007, 153(4): 1017-1025.
- [19] 张海峰. 稻瘟病菌 G 蛋白及 MAPK 信号途径相关基因的功能分析[D]. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 2011.
- [20] Zhang H, Tang W, Liu K, et al. Eight RGS and RGS-like proteins orchestrate growth, differentiation, and pathogenicity of *Magnaporthe oryzae*[J]. PLoS Pathogens, 2011, 7(12): e1002450.
- [21] Mukherjee M, Kim JE, Park YS, et al. Regulators of G-protein signalling in *Fusarium verticillioides* mediate differential host-pathogen responses on nonviable versus viable maize kernels[J]. Molecular Plant Pathology, 2011, 12(5): 479-491.
- [22] Park AR, Cho AR, Seo JA, et al. Functional analyses of regulators of G protein signaling in *Gibberella zeae*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2012, 49(7): 511-520.
- [23] Wang P, Cutler J, King J, et al. Mutation of the regulator of G protein signaling *Crg1* increases virulence in *Cryptococcus neoformans*[J]. Eukaryotic Cell, 2004, 3(4): 1028-1035.
- [24] Shen G, Wang YL, Whittington A, et al. The RGS protein *Crg2* regulates pheromone and cyclic AMP signaling in *Cryptococcus neoformans*[J]. Eukaryotic Cell, 2008, 7(9): 1540-1548.
- [25] Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(17): 3389-3402.
- [26] Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, et al. Protein identification and analysis tools on the Expasy server[M]//The proteomics protocols handbook, Berlin: Springer, 2005: 571-607.
- [27] Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, et al. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools[J]. Nature Protocols, 2007, 2(4): 953-971.
- [28] Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, et al. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0[J]. Journal of Molecular Biology, 2004, 340(4): 783-795.
- [29] Kelley LA, Sternberg MJ. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server[J]. Nature Protocols, 2009, 4(3): 363-371.
- [30] Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, et al. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence[J]. Journal of Molecular Biology, 2000, 300(4): 1005-1016.
- [31] Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX[J]. Current Protocols in Bioinformatics, 2002, unit2.3.
- [32] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Molecular Biological Evolution, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [33] Jones DT. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices[J]. Journal of Molecular Biology, 1999, 292(2): 195-202.
- [34] Buchan DW, Minneci F, Nugent TC, et al. Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench[J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(Web Server issue): W349-357.
- [35] Cole C, Barber JD, Barton GJ. The Jpred 3 secondary structure prediction server[J]. Nucleic Acids Research, 2008, 36(Web Server issue): W197-201.