

大豆疫霉细胞凋亡相关基因的鉴定与表达分析

陈琳琳¹ 耿雪晶¹ 王 雯² 张 雄² 窦道龙² 李洪连^{1*}

(1. 河南农业大学植物保护学院, 小麦玉米作物学国家重点实验室, 河南省粮食作物协同创新中心, 郑州 450002;

2. 南京农业大学植物保护学院, 南京 210095)

摘要: 为探讨大豆疫霉 *Phytophthora sojae* 细胞凋亡潜在的调控机制, 根据已知的细胞凋亡蛋白, 利用在线工具 BLASTP、pFAM 和 SMART 在大豆疫霉蛋白组数据库中鉴定细胞凋亡同源蛋白并构建其进化树, 通过转录组数据和实时荧光定量 PCR 技术分析细胞凋亡相关基因在大豆疫霉生长、发育及侵染不同时期的表达情况。结果显示: 在大豆疫霉中共鉴定到 13 个细胞凋亡同源蛋白, 包括核酸内切酶 G (PsNUC1)、细胞色素 c (PsCYCS)、凋亡诱导因子 (PsAIF)、丝氨酸蛋白酶 (PsHtrA-1、PsHtrA-2 和 PsHtrA-3)、多聚 ADP 核糖聚合酶 (PsPARP-1、PsPARP-2 和 PsPARP-3) 和 TatD 核酸酶 (PsTatD1、PsTatD2、PsTatD3 和 PsTatD4)。在进化上, PsNUC1、PsCYCS、PsAIF、PsHtrA-1、PsPARP-1、PsPARP-2、PsPARP-3、PsTatD1 和 PsTatD2 与人及秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 的同源蛋白亲缘关系较近, 而与真菌相关蛋白亲缘关系较远, PsHtrA-2、PsHtrA-3、PsTatD3 和 PsTatD4 与酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 相关蛋白相似度更高, 说明大豆疫霉细胞凋亡蛋白在进化中发生了较大变异。大豆疫霉细胞凋亡相关基因 *PsHtrA-1* 和 *PsRARP-1* 在孢子囊阶段诱导表达, *PsHtrA-2* 和 *PsRARP-2* 在游动孢子阶段上调表达, *PsAIF*、*PsHtrA-3*、*PsRARP-1* 和 *PsRARP-2* 在侵染阶段明显诱导表达, *PsCYCS* 在侵染阶段下调表达。细胞凋亡相关基因在大豆疫霉不同阶段的表达模式有较大差异, 说明细胞凋亡在大豆疫霉生长、发育及致病过程中具有重要作用。

关键词: 大豆疫霉; 细胞凋亡; 基因鉴定; 表达分析

Identification and expression analysis of apoptosis-related genes in soybean stem and root rot pathogen *Phytophthora sojae*

Chen Linlin¹ Geng Xuejing¹ Wang Wen² Zhang Xiong² Dou Daolong² Li Honglian^{1*}

(1. Collaborative Innovation Center of Henan Grain Crops, National Key Laboratory of Wheat and Maize Crop Sciences, College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, Henan Province, China; 2. College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China)

Abstract: To investigate the possible mechanisms of apoptosis in soybean stem and root rot pathogen *Phytophthora sojae*, the apoptosis-related proteins in *P. sojae* were identified based on known apoptosis-related protein sequences by using BLASTP, pFAM and SMART. Apoptosis-related homologous neighbor-joining phylogenetic trees were constructed using Mega 4.0, and apoptosis-related genes transcription levels in *P. sojae* growth, development and infection were examined by qRT-PCR and transcriptome data. The results showed that endonuclease G (PsNUC1), cytochrome c (PsCYCS), apoptosis inducing factor (PsAIF), serine protease (PsHtrA-1, PsHtrA-2 and PsHtrA-3), poly (ADP-ribose) polymerase (PsPARP-1, PsPARP-2 and PsPARP-3) and TatD nuclease (PsTatD1, PsTatD2, PsTatD3 and PsTatD4) were identified by bioinformatics methods in *P. sojae*. In the phylogenetic trees, PsNUC1,

基金项目: 国家自然科学基金(31501594), 河南省高等学校重点科研项目(16A210007)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: honglianli@sina.com

收稿日期: 2017-01-19

PsCYCS, PsAIF, PsHtrA-1, PsPARP-1, PsPARP-2, PsPARP-3, PsTatD1 and PsTatD2 in *P. sojae* were close to homolog proteins from *Homo sapiens* and *Caenorhabditis elegans*, rather than fungi, while PsHtrA-2, PsHtrA-3, PsTatD3 and PsTatD4 were closer to related proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. These results suggested that apoptosis genes had undergone great changes in *P. sojae* evolution. Transcriptome data and real-time PCR analysis revealed that *PsHtrA-1* and *PsRARP-1* were highly expressed in *P. sojae* sporangia, and both *PsHtrA-2* and *PsRARP-2* were highly upregulated in zoospores. Four apoptosis-related genes, including *PsAIF*, *PsHtrA-3*, *PsRARP-1* and *PsRARP-2*, showed a relatively higher expression level during infection stages, while PsCYCS was downregulated during infection stages. The apoptosis might function in *P. sojae* growth and pathogenicity.

Key words: *Phytophthora sojae*; apoptosis; gene identification; expression analysis

细胞凋亡是生物体主动将不需要的细胞杀死的一种程序性过程,在多细胞生物的发育及其内稳态的维持等方面发挥着重要作用。在人体中,细胞凋亡紊乱将引起老年痴呆、癌症或机体免疫等疾病(Ekshyyan & Aw, 2004; Mahoney & Rosen, 2005; Hanahan & Weinberg, 2011)。在植物中,当机体识别病原菌的攻击时,将启动侵染点位置局部细胞凋亡的发生,抑制病原菌进一步的侵染和定殖,该防卫反应策略也被称为过敏性坏死反应(Pontier et al., 1998; Mur et al., 2008)。近年来研究发现丝状真菌发生的类细胞凋亡过程调控机体的多个生理过程,例如细胞衰老、菌丝融合、孢子形成和致病性等(Ramsdale, 2008; Shlezinger et al., 2012)。植物病原菌灰葡萄孢 *Botrytis cinerea* 在侵染初期,植物通过分泌次生代谢物质诱导灰葡萄孢细胞凋亡来抑制其侵入,而灰葡萄孢则需要抑制自身细胞凋亡过程使更多细胞存活以实现有效的侵染和定殖(Shlezinger et al., 2011)。

在真核生物中,细胞凋亡是一个复杂的、精细的和能量依赖的分子级联反应过程,其信号网络由很多种蛋白组成。人和哺乳动物的细胞凋亡信号通路包括内部凋亡途径和外部凋亡途径(Delhalle et al., 2003)。内部凋亡途径由激素等细胞内信号直接作用于靶标蛋白,刺激线粒体跨膜电位改变增强通透性,将细胞色素c(cytochrome c, CYC)、凋亡诱导因子(apoptosis inducing factor, AIF)、核酸内切酶G(endonuclease G, NUC1/EndoG)、半胱天冬酶激活因子Smac/Diablo和丝氨酸蛋白酶(serine protease, HtrA/Nma111)Htr/Omi(Orrenius, 2004; Gogvadze & Orrenius, 2006)等线粒体蛋白释放到细胞质中,激活含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(cysteine aspartic acid specific protease, Caspase)级联反应(Danial

et al., 2010);内部凋亡途径也包括内质网内环境钙离子浓度调节的应激性细胞凋亡反应(Szegezdi et al., 2009)。外部凋亡途径则通过肿瘤坏死因子受体、Fas/CD95受体和肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体等多种跨膜受体蛋白接收细胞表面死亡信号,激发细胞内的Caspase级联反应,诱导细胞凋亡的发生(Ashrafi et al., 2003; Kurokawa & Kornbluth, 2009)。而植物和真菌细胞凋亡信号途径研究相对较少,但已发现与高等动物有明显区别,即植物和真菌中未发现Caspase,却存在该蛋白酶家族的远源蛋白偏赖氨酸-半胱氨酸蛋白酶(metacaspase),虽然二者同源性非常低,但后者具有Caspase活性,调控植物和多种真菌细胞凋亡的发生(Sharon et al., 2009; Tsiatsiani et al., 2011; Choi & Berges, 2013)。

大豆疫霉 *Phytophthora sojae* 属于卵菌,在形态和生理上与真菌非常相似,但在进化上与真菌亲缘关系比较远,与藻类亲缘关系比较近。大豆疫霉主要侵染大豆,引起大豆疫霉茎基腐病,每年造成经济损失达10亿美元(Tyler, 2007)。本课题组前期研究中,在大豆疫霉中鉴定到一类TatD核酸酶(TatD nuclease, TatD),通过分析PsTatD4的功能发现其正调控大豆疫霉细胞凋亡的发生,且在细胞凋亡过程从细胞质向细胞核转移,PsTatD4正调控大豆疫霉无性孢子的产生,负调控其致病性。由此推测细胞凋亡在大豆疫霉侵染循环过程中起着非常重要的作用:大豆疫霉侵染初期,抑制自身细胞凋亡的发生,以实现有效侵染;而在侵染后期寄主植物大量死亡后,调控自身细胞凋亡的发生以诱导无性孢子产生,传播扩散寻找新的寄主植物(Chen et al., 2014)。本研究拟通过鉴定大豆疫霉细胞凋亡相关蛋白并分析其进化关系,利用转录组数据和实时荧光定量PCR分析细胞凋亡相关基因在大豆疫霉菌丝、无性孢子

及侵染过程中的表达情况,初步阐述大豆疫霉细胞凋亡信号途径,解析细胞凋亡在大豆疫霉不同阶段可能的生物学功能,以期为深入探究细胞凋亡在大豆疫霉侵染循环中的功能提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株和大豆:大豆疫霉全基因组测序菌株 P6497 为美国俄勒冈州立大学 Brett M. Tyler 教授馈赠,由南京农业大学植物与疫霉互作实验室保存在 12℃ 的 10% V8 固体培养基中。大豆品种是对大豆疫霉菌株 P6497 侵染表现感病的 Williams,种子由南京农业大学国家大豆改良中心提供,大豆种子在植物培养基质中种植后,25℃、16 h 光照/8 h 黑暗条件下生长 10 d,取最初生长的 2 片叶供试。

10% V8 固体培养基:100 mL V8 蔬菜汁加 1 g CaCO_3 ,充分搅拌混匀,3 000 r/min,离心 10 min,取上清液与去离子水以 1:9 比例稀释制成 10% V8 培养液,再加入 1.5% 琼脂粉。

试剂及仪器:RNA 提取 Trizol、PrimeScript™ RT Reagent Kit、SYBR® Premix Ex Taq™ 试剂盒,日本 TaKaRa 公司;引物合成和测序均由生工生物工程(上海)股份有限公司完成;其它试剂均为国产分析纯。5430R 小型台式高速离心机,德国 Eppendorf 公司;ND-1000 微量紫外可见分光光度计,美国 Thermo 科技公司;TP600 梯度 PCR 仪,日本 TaKaRa 公司;7500 型实时荧光定量 PCR 仪,美国 ABI 公司。

1.2 方法

1.2.1 大豆疫霉细胞凋亡同源蛋白的鉴定

为了鉴定大豆疫霉细胞凋亡同源蛋白,在 GenBank 中获得人 *Homo sapiens*、秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans*、酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 和稻瘟菌 *Magnaporthe grisea* 细胞凋亡蛋白的氨基酸序列。大豆疫霉的数据信息来自 <http://genome.jgi-psf.org>。通过 BLASTP(Altschul et al., 1990)检索大豆疫霉数据库,查找细胞凋亡的同源蛋白,然后通过在线工具 pFAM(E -value<1e-5)(Finn et al., 2008)和 SMART 预测同源蛋白的结构域,并根据同源关系对不同的候选蛋白进行重新命名。

1.2.2 大豆疫霉总 RNA 及 cDNA 的制备

为了获得大豆疫霉侵染大豆不同时期的样品,将生长 10 d 的大豆,取最初生长的 2 片叶用 0.5% 吐温处理后,在叶片的正面放置用灭菌蒸馏水清洗过的大豆疫霉菌丝体,用滤纸吸去多余水分,再在菌丝

体上面盖 1 片大豆叶片,放置在 25℃ 培养,分别于 0、3、6、12、24、48 h 收集菌丝。所有样品参照 Trizol 试剂说明书提取总 RNA,最终溶解于 30 μL RNase-free H_2O ,0.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 质量,用超微量分光光度计测量 RNA 样品的纯度和浓度。取 1 μg RNA 按照 PrimeScript™ RT Reagent Kit 说明书进行 DNA 消解和逆转录反应获得 cDNA。

1.2.3 转录组及实时荧光定量 PCR 分析

为了分析大豆疫霉细胞凋亡相关基因在生长、发育及侵染不同阶段的表达情况,根据 Ye et al.(2011)报道的大豆疫霉菌丝体、孢子囊、游动孢子、休止孢、休止孢萌发和侵染时期的转录组数据分析大豆疫霉细胞凋亡基因在不同阶段的表达量。

实时荧光定量 PCR 扩增所用引物包括:TEF1a 基因扩增引物 RTF: 5'-TGATCGTGCTGAACCAC-CC-3' 和 RTR: 5'-CGAGCGACGGTCCATCTT-3'; PsNUC1 基因扩增引物 RTF: 5'-GCCCAAGACGCT-GCTGAAACAT-3' 和 RTR: 5'-TCCATCACCCACG-CCGCATT-3'; PsCYCS 基因扩增引物 RTF: 5'-ACA-AGAACTCGGGCGTCGTCTG-3' 和 RTR: 5'-ACTC-GTTGGTGGCCTCCATCAG-3'; PsAIF 基因扩增引物 RTF: 5'-GACCGATACGACCACGCAGTGA-3' 和 RTR: 5'-AAGAGTCCACCTCGCCGATTCC-3'。将不同样品反转录后的 cDNA 进行实时荧光定量 PCR。反应体系为:SYBR Premix Ex Taq™ 10 μL 、10 $\mu\text{mol/L}$ Primer F/Primer R 各 0.4 μL 、ROX Reference Dye II 0.4 μL 、cDNA 2 μL 、ddH₂O 6.8 μL 。反应程序:95℃ 预变性 30 s;95℃ 变性 5 s,60℃ 退火 30 s,40 个循环。引物的特异性可以通过熔解曲线和电泳来判断。以稳定表达的 TEF1a 基因为参照进行模板标准化,将大豆疫霉菌丝体待分析基因表达量定为 1,分析比较相应基因在大豆疫霉与植物互作过程中的相对表达量。

1.2.4 大豆疫霉细胞凋亡同源蛋白进化分析

为了分析大豆疫霉细胞凋亡同源蛋白的进化关系,选择人、秀丽隐杆线虫、酿酒酵母、稻瘟菌和大豆疫霉的核酸内切酶 G、细胞色素 c、凋亡诱导因子和丝氨酸蛋白酶,利用 Meag 4.0 软件以邻接法构建系统进化树,Bootstrap 值为 1 000(Tamura et al., 2007)。

1.3 数据分析

采用 MeV 4.9 软件构建基因表达量热图;利用 Graphpad Prism 5 软件分析基因的相对表达量,应用 Excel 软件的 TESS 函数中的 t 测验法进行各处理间的差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 大豆疫霉细胞凋亡同源蛋白的鉴定

基于生物信息学分析结果,在大豆疫霉中共鉴定到13个细胞凋亡同源蛋白(表1),并预测了蛋白的保守结构域,包括核酸内切酶G(PsNUC1)、细胞色素c(PsCYCS)、凋亡诱导因子(PsAIF)、丝氨酸蛋白酶PsHtrA-1~PsHtrA-3、多聚ADP核糖聚合酶(poly(ADP-ribose) polymerase, PARP)PsPARP-1~PsPARP-3和TatD核酸酶PsTatD1~PsTatD4。其中

PsNUC1、PsCYCS、PsAIF、PsHtrA-1、PsPARP-1、PsPARP-2、PsPARP-3、PsTatD1、PsTatD2与人和秀丽隐杆线虫的相关蛋白同源性较高,而与真菌的蛋白同源性较低。尤其是在大豆疫霉中鉴定到了3个多聚ADP核糖聚合酶,该类蛋白在哺乳动物中非常保守,而在真菌中未发现。在大豆疫霉中未鉴定到Caspase和偏赖氨酸-半胱氨酸蛋白酶的同源蛋白,这与其它高等生物具有明显差异,说明在进化过程中大豆疫霉的细胞凋亡途径可能发生了较大改变。

表1 大豆疫霉细胞凋亡的同源蛋白信息
Table 1 The information of each apoptosis-related homolog protein in *Phytophthora sojae*

蛋白名称 Protein name	基因ID Gene ID	蛋白长度(氨基酸) Protein sequence length (aa)	最相似同源蛋白 Most homologous protein		保守结构域 Conserved domain	结构域E值 E-value of domain
			名称Name	同源性 Homology (%)		
PsNUC1	Ps139372	335	CeEndoG	32.5	NUC	1.98e-81
PsCYCS	Ps109170	112	HoCYCS	63.8	Cytochrom_c	1.8e-16
PsAIF	Ps135211	561	HoAIF1	21.9	Pyr_redox	1e-8
PsHtrA-1	Ps157071	521	HoHtrA	29.7	Trypsin_2, PDZ	4.4e-32, 2.42e-8
PsHtrA-2	Ps113916	875	ScNma111	34.4	Trypsin_2, PDZ	2.2e-13, 2.48e-1
PsHtrA-3	Ps133655	968	MgNma111	29.9	Trypsin_2, PDZ	5.6e-19, 1.6e-1
PsPARP-1	Ps136701	546	HoPARP1	35.0	PARP	5.1e-52
PsPARP-2	Ps136700	1 063	HoPARP2	36.0	PARP	6.8e-39
PsPARP-3	Ps128140	721	HoPARP3	36.0	PARP	6.6e-45
PsTatD1	Ps109568	307	HoTatD1	52.2	TatD_DNase	8.9e-53
PsTatD2	Ps310392	309	HoTatD3	24.8	TatD_DNase	3e-44
PsTatD3	Ps108936	271	ScTatD1	24.8	TatD_DNase	1.3e-28
PsTatD4	Ps117339	266	ScTatD1	30.8	TatD_DNase	3.3e-36

Ho: 人; Ce: 秀丽隐杆线虫; Sc: 酿酒酵母; Mg: 稻瘟菌; Ps: 大豆疫霉。Ho: *Homo sapiens*; Ce: *Caenorhabditis elegans*; Sc: *Saccharomyces cerevisiae*; Mg: *Magnaporthe grisea*; Ps: *Phytophthora sojae*.

2.2 细胞凋亡同源蛋白的系统进化分析

系统进化分析结果显示,在动物和真菌中细胞凋亡蛋白的进化符合物种进化的方向,人和秀丽隐杆线虫的蛋白亲缘关系较近,同为真菌的酿酒酵母和稻瘟菌的蛋白亲缘关系更近,而大豆疫霉PsNUC1、PsCYCS、PsAIF却与动物的相关蛋白同源性更高,与真菌相关蛋白亲缘关系较远;大豆疫霉PsHtrA-1与人的HtrA同源性更高,而PsHtrA-2和PsHtrA-3却与真菌的HtrA亲缘关系更近;PsTatD1和PsTatD2与人的TatD同源性更高,PsTatD3和PsTatD4与酿酒酵母的TatD同源性更高(图1)。进一步说明大豆疫霉细胞凋亡相关蛋白与其它物种相比有较大差异,其在进化过程中可能承受着较大的选择压力。

2.3 细胞凋亡基因在大豆疫霉侵染阶段的表达分析

大豆疫霉12个细胞凋亡相关基因(*PsTatD2*无转录组数据)在菌丝体、孢子囊、游动孢子、休止孢、休止孢萌发和侵染时期的表达结果显示,多个细胞凋亡基因参与无性孢子产生和侵染过程的调控,*PsHtrA-1*和*PsRARP-1*在孢子囊阶段诱导表达,*PsHtrA-2*和*PsRARP-2*在游动孢子阶段表达量高,*PsAIF*、*PsHtrA-3*、*PsRARP-1*、*PsRARP-2*和*PsTatD4*在侵染阶段明显诱导表达,而*PsCYCS*在侵染阶段下调表达(图2)。

为了进一步验证大豆疫霉细胞凋亡相关基因的表达,利用实时荧光定量PCR方法检测了*PsNUC1*、*PsCYCS*和*PsAIF*基因在大豆疫霉侵染阶段的表达。与转录组数据结果类似,*PsAIF*在侵染阶段上调表

达, *PsCYCS* 在侵染阶段相对表达量降低(图3)。细胞凋亡基因在不同阶段的表达变化说明细胞凋亡可能参与大豆疫霉生长、产孢及侵染等过程, 而不同凋亡基因表达模式的差异, 尤其是同一类基因, 如 *PsHtrA-1*、*PsHtrA-2*、*PsHtrA-3* 之间以及 *PsRARP-1*、*PsRARP-2*、*PsRARP-3* 之间的表达模式明显不同(图2), 说明大豆疫霉细胞凋亡可能是一套复杂的信号调控通路。

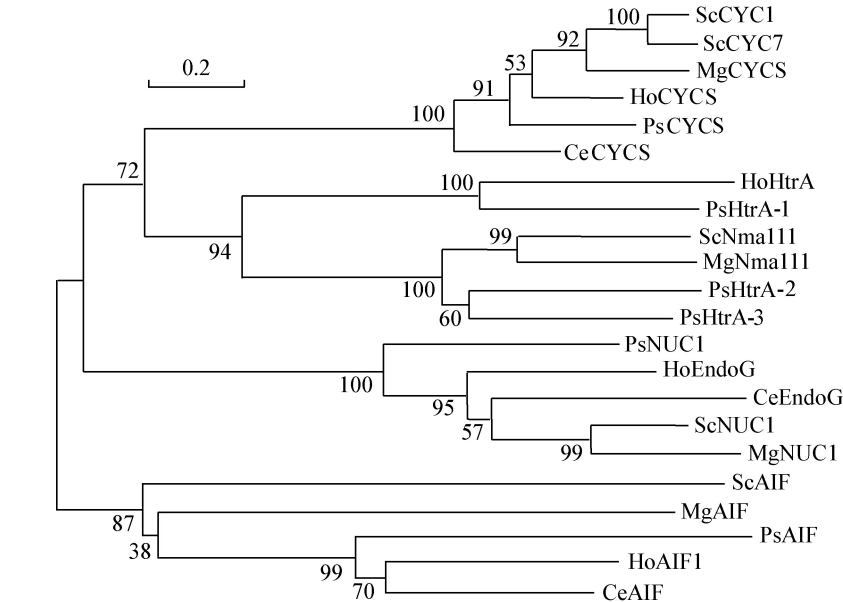


图1 大豆疫霉细胞凋亡相关蛋白细胞色素c、核酸内切酶G、凋亡诱导因子和丝氨酸蛋白酶的进化树
Fig. 1 The phylogenetic tree of apoptosis-related proteins, cytochrome c, endonuclease G, apoptosis-inducing factor and serine protease of *Phytophthora sojae*
Ho: 人; Ce: 秀丽隐杆线虫; Sc: 酿酒酵母; Mg: 稻瘟菌; Ps: 大豆疫霉。Ho: *Homo sapiens*; Ce: *Caenorhabditis elegans*; Sc: *Saccharomyces cerevisiae*; Mg: *Magnaporthe grisea*; Ps: *Phytophthora sojae*.

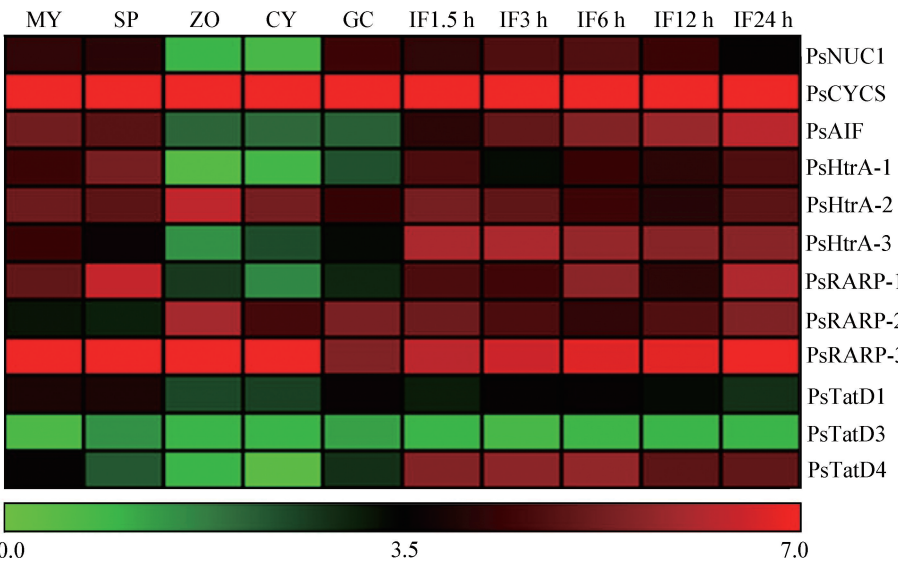


图2 大豆疫霉细胞凋亡基因的表达热图
Fig. 2 Heat map of expression profiles for *Phytophthora sojae* apoptosis-related genes
红色: 表达量高; 绿色: 表达量低; MY: 菌丝; SP: 孢子囊; ZO: 游动孢子; CY: 休止孢; GC: 休止孢萌发; IF1.5 h~IF24 h: 菌丝侵染大豆叶片1.5~24 h。Red indicates high expression, and green indicates low expression. MY: Mycelia; SP: zoosporangia; ZO: zoospores; CY: cysts; GC: germinated cysts; IF1.5 h~IF24 h indicate samples from 1.5 h to 24 h after infection of soybean leaves.

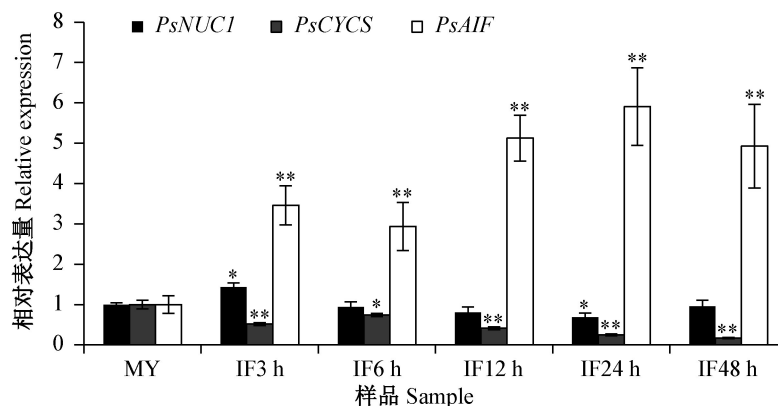


图3 大豆疫霉部分细胞凋亡基因表达谱

Fig. 3 Transcriptional profiles of selected *Phytophthora sojae* apoptosis-related genes

MY: 菌丝; IF3 h~IF48 h: 菌丝侵染大豆叶片3~48 h。图中数据为平均数±标准误。*和**表示同一基因在不同样品间经 *t* 测验法检验在 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 水平差异显著。MY: Mycelia; IF3 h~IF48 h indicate samples from 3 h to 48 h after infection of soybean leaves. Data are mean±SE. * or ** indicates significant difference among different samples with the same gene at $P<0.05$ or $P<0.01$ level by *t* test.

3 讨论

在生物体中,细胞凋亡的发生受多种蛋白组成极其精密的信号网络调控。在人和哺乳动物中,来源于外部或内部的凋亡信号激活 Caspase 级联信号网络,诱发细胞死亡(Nuñez et al., 1998),同时 Bcl-2 家族蛋白(Bak、Bax、tBid 等)促进或抑制细胞凋亡的发生(Willis et al., 2003)。在植物和真菌中,细胞凋亡途径还不明确,未发现 Caspase 和 Bcl-2 蛋白,但已有研究表明偏赖氨酸-半胱氨酸蛋白酶是调控其细胞凋亡的关键因子(Khan et al., 2005; Coll et al., 2010; Hill et al., 2014)。与哺乳动物、植物和真菌相比,在大豆疫霉中仅鉴定到6类13个细胞凋亡相关蛋白,包括核酸内切酶G、细胞色素c、凋亡诱导因子、丝氨酸蛋白酶、多聚ADP核糖聚合酶和TatD核酸酶等线粒体和细胞质蛋白,未发现 Caspase 和偏赖氨酸-半胱氨酸蛋白酶同源蛋白。而且大豆疫霉细胞凋亡相关蛋白在进化上与物种进化方向有较大差别,核酸内切酶G、细胞色素c、凋亡诱导因子和多聚ADP核糖聚合酶等大部分蛋白与人和动物的同源蛋白亲缘关系更近,而多个丝氨酸蛋白酶和TatD核酸酶与人和真菌的相关蛋白表现出不同的亲缘关系。大豆疫霉细胞凋亡相关蛋白存在较大变异,说明在进化过程中这类基因面临比较大的选择压力,在大豆疫霉的进化过程中可能起着重要作用。在酿酒酵母和胶胞炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 中表达人的 Bcl-2 蛋白,同样能够诱导或者抑制真菌细胞凋亡(Chen et al., 2003; Barhoom & Sharon, 2007),

说明生物中可能存在多条细胞凋亡调控途径,需要进一步去研究探索。

细胞凋亡在多细胞生物的发育及其内稳态的维持等方面发挥着重要作用(Taylor et al., 2008)。已有研究表明细胞凋亡在多种丝状病原菌侵染过程中起着重要的调控作用,例如曲霉菌 *Aspergillus fumigatus* 和灰霉菌在侵染初期,都通过调控自身细胞凋亡基因的表达抑制寄主诱发的病原菌细胞凋亡过程(Shlezinger et al., 2011; 2017)。大豆疫霉细胞凋亡相关蛋白 PsTatD4 核酸酶正调控病原菌细胞凋亡的发生,且作为一个开关,在侵染初期低表达,使更多病原菌得以存活从而实现有效的侵染,而在侵染后期高表达则诱导细胞凋亡的发生,诱导大量无性孢子的产生,以便病原菌进一步扩散(Chen et al., 2014)。但是细胞凋亡在植物病原丝状真菌中的调控机制还知之甚少。根据转录组数据和实时荧光定量PCR分析,发现不同细胞凋亡相关基因在大豆疫霉生长、产孢及侵染阶段的表达模式有较大差异,比如 *PsAIF* 在侵染阶段上调表达,而 *PsCYCS* 在侵染阶段表达量降低,进一步说明细胞凋亡参与调控大豆疫霉的生长发育和侵染,是一个非常复杂的信号网络,需要进一步去分析和完善。

参 考 文 献 (References)

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3): 403-410
- Ashrafi K, Chang FY, Watts JL, Fraser AG, Kamath RS, Ahringer J,

- Ruvkun G. 2003. Genome-wide RNAi analysis of *Caenorhabditis elegans* fat regulatory genes. *Nature*, 421: 268–272
- Barhoom S, Sharon A. 2007. Bcl-2 proteins link programmed cell death with growth and morphogenetic adaptations in the fungal plant pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. *Fungal Genetics and Biology*, 44(1): 32–43
- Chen L, Shen D, Sun N, Xu J, Wang W, Dou D. 2014. *Phytophthora sojae* TatD nuclease positively regulates sporulation and negatively regulates pathogenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(10): 1070–1080
- Chen SR, Dunigan DD, Dickman MB. 2003. Bcl-2 family members inhibit oxidative stress-induced programmed cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radical Biology and Medicine*, 34(10): 1315–1325
- Choi CJ, Berges JA. 2013. New types of metacaspases in phytoplankton reveal diverse origins of cell death proteases. *Cell Death & Disease*, 4: e490
- Coll NS, Vercammen D, Smidler A, Clover C, van Breusegem F, Dangel JL, Epple P. 2010. *Arabidopsis* type I metacaspases control cell death. *Science*, 330(6009): 1393–1397
- Danial NN, Gimenez-Cassina A, Tondera D. 2010. Homeostatic functions of BCL-2 proteins beyond apoptosis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 687: 1–32
- Delhalle S, Duvoix A, Schnekenburger M, Morceau F, Dicato M, Diederich M. 2003. An introduction to the molecular mechanisms of apoptosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1010: 1–8
- Ekshyyan O, Aw TY. 2004. Apoptosis: a key in neurodegenerative disorders. *Current Neurovascular Research*, 1(4): 355–371
- Finn RD, Tate J, Mistry J, Cogill PC, Sammut SJ, Hotz HR, Ceri G, Forslund K, Eddy SR, Sonnhammer EL, et al. 2008. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research*, 36(Database issue): 281–288
- Gogvadze V, Orrenius S. 2006. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Chemico-Biological Interactions*, 163(1/2): 4–14
- Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5): 646–674
- Hill SM, Hao X, Liu B, Nyström T. 2014. Life-span extension by a metacaspase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, 344(6190): 1389–1392
- Khan MA, Chock PB, Stadtman ER. 2005. Knockout of caspase-like gene, *YCA1*, abrogates apoptosis and elevates oxidized proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(48): 17326–17331
- Kurokawa M, Kornbluth S. 2009. Caspases and kinases in a death grip. *Cell*, 138(5): 838–854
- Mahoney JA, Rosen A. 2005. Apoptosis and autoimmunity. *Current Opinion in Immunology*, 17(6): 583–588
- Mur LA, Kenton P, Lloyd AJ, Ougham H, Prats E. 2008. The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *Journal of Experimental Botany*, 59(3): 501–520
- Núñez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N. 1998. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene*, 17(25): 3237–3245
- Orrenius S. 2004. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Toxicology Letters*, 149(1/3): 19–23
- Pontier D, Balagué C, Roby D. 1998. The hypersensitive response: a programmed cell death associated with plant resistance. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Serie III, Sciences de la vie*, 321(9): 721–734
- Ramsdale M. 2008. Programmed cell death in pathogenic fungi. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1783(7): 1369–1380
- Sharon A, Finkelstein A, Shlezinger N, Hatam I. 2009. Fungal apoptosis: function, genes and gene function. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(5): 833–854
- Shlezinger N, Goldfinger N, Sharon A. 2012. Apoptotic-like programmed cell death in fungi: the benefits in filamentous species. *Frontiers in Oncology*, 2: 97
- Shlezinger N, Irmer H, Dhingra S, Beattie SR, Cramer RA, Braus GH, Sharon A, Hohl TM. 2017. Sterilizing immunity in the lung relies on targeting fungal apoptosis-like programmed cell death. *Science*, 357(6355): 1037–1041
- Shlezinger N, Minz A, Gur Y, Hatam I, Dagdas YF, Talbot NJ, Sharon A. 2011. Anti-apoptotic machinery protects the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* from host-induced apoptotic-like cell death during plant infection. *PLoS Pathogens*, 7(8): e1002185
- Szegezdi E, MacDonald DC, Chonghaile TN, Gupta S, Samali A. 2009. Bcl-2 family on guard at the ER. *American Journal of Physiology: Cell Physiology*, 296(5): 941–953
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24(8): 1596–1599
- Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(3): 231–241
- Tsiatsiani L, van Breusegem F, Gallois P, Zavalov A, Lam E, Bozhkov PV. 2011. Metacaspases. *Cell Death and Differentiation*, 18(8): 1279–1288
- Tyler BM. 2007. *Phytophthora sojae*: root rot pathogen of soybean and model oomycete. *Molecular Plant Pathology*, 8(1): 1–8
- Willis S, Day CL, Hinds MG, Huang DC. 2003. The Bcl-2-regulated apoptotic pathway. *Journal of Cell Science*, 116(Pt20): 4053–4056
- Ye W, Wang X, Tao K, Lu Y, Dai T, Dong S, Dou D, Gijzen M, Wang Y. 2011. Digital gene expression profiling of the *Phytophthora sojae* transcriptome. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(12): 1530–1539

(责任编辑:李美娟)