

龚凤珍, 吕俊婷, 侯朝英, 等. 辣椒胶孢炭疽菌中糖苷水解酶蛋白的找寻及生物信息学分析[J]. 江苏农业学报, 2025, 41( 10 ): 1926-1935.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2025.10.006

# 辣椒胶孢炭疽菌中糖苷水解酶蛋白的找寻及生物信息学分析

龚凤珍<sup>1,2</sup>, 吕俊婷<sup>1</sup>, 侯朝英<sup>1</sup>, 韩长志<sup>1</sup>

(1. 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; 2. 岳阳市林业局, 湖南 岳阳 414000)

**摘要:** 由胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)引起的辣椒炭疽病, 是制约辣椒产业高质量发展的重要病害, 明确该病原菌中糖苷水解酶(GH)的特征与功能, 对解析其致病机制具有重要意义。本研究采用生物信息学方法预测辣椒胶孢炭疽菌中糖苷水解酶蛋白, 通过 ProtParam、ProtScale、SMART 等在线工具分析其理化性质、亲疏水性及保守结构域, 利用 MEGA 11 软件构建系统发育树以解析遗传关系, 并借助 EggNOG-mapper 工具进行直系同源簇(COG)蛋白功能注释。结果显示, 在该病原菌中共预测到 24 个糖苷水解酶蛋白, 多数为酸性、稳定的疏水性蛋白质, 氨基酸数量集中于 201 aa 至 400 aa, 且含有糖苷水解酶保守结构域的糖苷水解酶主要归属于 GH28 亚家族; 系统发育树将 24 个糖苷水解酶划分为 3 大类; COG 功能注释表明, 这些酶主要参与碳水化合物的转运与代谢, 同时在蛋白质翻译后修饰及伴侣蛋白调控等生物过程中发挥作用。本研究明确了辣椒胶孢炭疽菌中糖苷水解酶的数量、理化特性及功能定位, 为深入揭示该病原菌的致病分子机制、精准挖掘病原菌防治靶点、研发新型生物防治技术提供了重要理论支撑, 同时对保障辣椒产业安全生产具有很高的实践价值。

**关键词:** 辣椒; 胶孢炭疽菌; 分泌蛋白; 糖苷水解酶

**中图分类号:** S436.418.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2025)10-1926-10

## Finding and bioinformatic analysis of glycoside hydrolase proteins in *Colletotrichum gloeosporioides* of pepper

GONG Fengzhen<sup>1,2</sup>, LYU Junting<sup>1</sup>, HOU Chaoying<sup>1</sup>, HAN Changzhi<sup>1</sup>

(1. Forestry College of Southwest Forestry University/The Key Laboratory of Forest Disaster Warning and Control of Yunnan Province, Kunming 650224, China; 2. Forestry Bureau of Yueyang City, Yueyang 414000, China)

**Abstract:** Pepper anthracnose, caused by *Colletotrichum gloeosporioides*, is a major disease that restricts the high-quality development of the pepper industry. Clarifying the characteristics and functions of glycoside hydrolases (GHs) in this pathogen is of great significance for deciphering its pathogenic mechanism. In this study, bioinformatic methods were used to predict the GH proteins in *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from pepper. Online tools including ProtParam, ProtScale, and SMART were employed to analyze the physicochemical properties, hydrophobicity, and conserved domains

of these proteins. MEGA 11 software was utilized to construct a phylogenetic tree for analyzing genetic relationships, while the EggNOG-mapper tool was applied for functional annotation of orthologous group (COG) proteins. The results showed that a total of 24 GH proteins were predicted in this pathogen. Most of these proteins were acidic, stable, and hydrophobic, with amino acid lengths ranging from 201 aa to 400 aa. Moreover, glycoside

收稿日期: 2025-05-23

基金项目: 云南省“兴滇英才支持计划”青年人才专项(YNWR-QN-BJ-2020-188); 云南省研究生导师团队建设项目(2022100); 西南林业大学林学学科和重点实验室开放基金项目(LXXK-2025M06)

作者简介: 龚凤珍(1983-), 湖南岳阳人, 硕士, 研究方向为资源利用与植物保护。(E-mail)349456513@qq.com

通讯作者: 韩长志, (E-mail)swfuhcz@163.com

hydrolases containing conserved *GH* domains were mainly classified into the *GH28* subfamily. Based on the phylogenetic tree, the 24 glycoside hydrolases were classified into three major categories. COG functional annotation indicated that these enzymes were primarily involved in the transport and metabolism of carbohydrates, and also played roles in biological processes such as post-translational modification of proteins and chaperone protein regulation. This study clarifies the number, physicochemical properties, and functional localization of glycoside hydrolases in *Colletotrichum gloeosporioides* of pepper. It provides important theoretical support for in-depth exploration of the molecular pathogenic mechanism of this pathogen, accurate identification of targets for pathogen control, and development of novel biological control technologies. Meanwhile, it holds high practical value for ensuring the safe production of the pepper industry.

**Key words:** pepper; *Colletotrichum gloeosporioides*; secreted protein; glycoside hydrolase

辣椒 (*Capsicum annuum*) 原产于南美洲<sup>[1]</sup>, 既是农民增收的重要蔬菜, 其提取物还可应用于工业生产, 同时因富含多种营养成分, 也被广泛用于医药健康产业。中国地域辽阔, 自然环境多样, 不同的气候与土壤条件孕育出了适应各地环境条件的辣椒品种, 如遵义朝天椒、柘城辣椒、金乡辣椒、三樟黄贡椒等都是具有代表性的地方品种。随着辣椒产业发展, 辣椒炭疽病、病毒病及疫病等多种病害的发生愈发严重<sup>[2]</sup>。胶孢炭疽菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 是引起辣椒炭疽病的病原之一<sup>[3]</sup>, 此外, 它还能侵染多种农林植物并引发炭疽病。目前已有研究结果表明, 该病菌可危害桃、芒果、葡萄、草莓等经济作物, 造成很大的经济损失。前人对该病菌的研究主要集中在形态特征、生活史及遗传关系等方面<sup>[4]</sup>。胶孢炭疽菌产生的分生孢子通过风雨、昆虫等媒介传播到健康的辣椒植株上, 进而导致炭疽病的发生<sup>[2]</sup>。目前生产上主要采用化学药物和植物提取物防治辣椒炭疽病<sup>[5]</sup>, 化学药物包括苯并咪唑类、三唑类及甲氧基丙烯酸酯类等; 植物提取物有爵床提取物<sup>[6]</sup>、云麻提取物<sup>[7]</sup>以及植物源抗生素大蒜素<sup>[8]</sup>等。

碳水化合物活性酶 (CAZyme) 在真菌的生命活动中扮演着关键角色, 它能帮助真菌破坏植物细胞壁, 进而实现对植物的侵染, 同时还能助力真菌吸收碳源营养以及适应周围环境<sup>[9]</sup>。为了更好地研究碳水化合物活性酶, 专家根据其功能建立了碳水化合物活性酶数据库, 其中包含多种不同的蛋白酶家族, 如糖苷水解酶 (*GH*)、糖基转移酶 (*GT*) 等<sup>[10]</sup>。糖苷水解酶是一类具有重要功能的酶, 它能够通过内切或外切的方式, 作用于各种含糖化合物中的糖苷键, 从而生成单糖、寡糖或糖复合物等<sup>[11]</sup>。此外, 糖苷水解酶还具备调控植物免疫反应和激活植物防御系统的能力<sup>[12]</sup>。不过, 糖苷水解酶的活性会受到

多种因素的影响, 例如温度、pH 值、光照、不同的培养基、不同的碳氮源以及金属离子等<sup>[13]</sup>。糖苷水解酶可划分为多个亚家族, 如 *GH3*、*GH6*、*GH18* 等亚家族<sup>[14]</sup>, 目前已确定有 173 个亚家族。不同亚家族的糖苷水解酶作用对象不同, 它们会作用于不同的糖苷键, 比如 *GH3* 亚家族的糖苷水解酶主要作用于  $\beta$ -葡萄糖苷键, 其功能是通过水解这类键来参与碳水化合物的代谢<sup>[15]</sup>; *GH18* 亚家族的糖苷水解酶主要与几丁质酶的活性相关, 能够水解几丁质中的糖苷键, 在植物防御真菌病害方面发挥重要作用<sup>[16]</sup>。糖苷水解酶在不同植物病原菌中呈现出不同的分布特征。虽然糖苷水解酶在微生物中广泛存在, 但并非所有微生物都含有糖苷水解酶<sup>[11]</sup>。在一些具体的病原菌中, 糖苷水解酶的作用也十分显著, 例如在稻瘟病菌中, 糖苷水解酶主要负责分解宿主中的重要复杂碳水化合物, 为菌体的生命活动提供所需的营养物质<sup>[17]</sup>; 在希金斯炭疽菌中, 糖苷水解酶同样发挥着致病的功能<sup>[18]</sup>。除了在病原菌中起作用, 糖苷水解酶在其他多个领域也有广泛应用。在医药方面, 它已被应用于生产人参皂苷及其衍生物<sup>[19]</sup>; 在食品工业方面, 可利用糖苷水解酶促进酿酒过程中糖基化物质的水解, 从而增加葡萄酒的香气, 改善其品质等<sup>[20]</sup>; 在生物防治领域, 糖苷水解酶能够调节玉米中的一些生物合成反应, 进而增强玉米对一些真菌性病害和玉米螟等害虫的抗性<sup>[21]</sup>。

碳水化合物依据其聚合程度可分为单糖、双糖、寡糖和多糖 4 大类<sup>[22]</sup>。在相关研究中, 前期项目组基于全基因组数据, 对禾谷炭疽菌<sup>[23]</sup>、希金斯炭疽菌<sup>[24]</sup>的糖苷水解酶开展了互作蛋白的筛选与分析, 结果明确这 2 种病菌中糖苷水解酶蛋白的互作模式均可划分为 3 大类。窦文俊等<sup>[25]</sup>通过比较基因组学对黏菌糖苷水解酶基因家族进行分析, 共注释到 40 个糖苷水解酶亚家族, 其中 *GH13*

亚家族成员数量占比最高,且该亚家族糖苷水解酶具有稳定性高、亲水性强及胞外分泌的特性。目前,已有研究对玉米大斑病病菌<sup>[26]</sup>、希金斯炭疽菌、禾谷炭疽菌、禾谷镰孢菌<sup>[27]</sup>等病菌的糖苷水解酶完成了蛋白质互作及相关分析。本项目组前期已对辣椒炭疽病病菌斯高维尔炭疽菌(*Colletotrichum scovillei*)强致病菌株 TJNH1 的全基因组序列进行了分泌蛋白的筛选及生物信息学分析<sup>[28]</sup>。然而,关于辣椒炭疽病病菌中糖苷水解酶蛋白的系统性分析仍存在空白。本研究拟基于全基因组数据,对辣椒胶孢炭疽菌中糖苷水解酶蛋白的数量进行预测,并系统开展其理化性质、保守结构域、亲疏水性、进化关系及直系同源簇(COG)蛋白功能等方面的分析,为深入解析辣椒炭疽病病菌中糖苷水解酶的功能提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 数据来源

本研究从 NCBI 数据库下载辣椒炭疽病病菌株(登录号为 GCF\_011800055.1)全部蛋白质的氨基酸序列,依据分泌蛋白的典型特征(如含信号肽、无跨膜结构域等<sup>[29]</sup>)筛选获得该菌株的分泌蛋白;随后将分泌蛋白与碳水化合物活性酶数据库(<http://www.cazy.org/>)进行比对注释,筛选出糖苷水解酶,并对其理化性质、亲疏水性、保守结构域、COG 蛋白功能及进化关系等进行分析。

### 1.2 糖苷水解酶蛋白找寻

首先从 NCBI 数据库中获取辣椒炭疽病病菌的全基因组序列,随后依据分泌蛋白的典型特征,运用系列在线工具开展针对性预测分析:通过 SignalP 6.0(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/>)<sup>[30]</sup>进行信号肽预测,利用 ProtComp 9.0<sup>[31]</sup>进行亚细胞定位预测,借助 TMHMM v2.0<sup>[32]</sup>进行跨膜结构域预测,通过 BIG-PI Fungal predictor 进行 GPI 锚定位点预测,同时使用 TargetP v2.0<sup>[33]</sup>进行转运肽预测。将同时满足上述 5 项筛选标准的蛋白质定义为辣椒炭疽病病菌的分泌蛋白,统计分泌蛋白总数并提取其完整氨基酸序列。进一步从 CAZy 数据库(<http://www.cazy.org/>)<sup>[34]</sup>中筛选出分泌蛋白中属于 GH 家族酶蛋白氨基酸序列,随后采用多种工具对 GH 家族酶蛋白氨基酸序列进行系统分析:利用 ProtParam 工具分析其理化性质,应用 ProtScale 工具分析其疏水性

特征,借助 SMART 工具分析其保守结构域,用 eggNOG-mapper 工具注释其 COG 蛋白功能,同时通过 MEGA 11 软件构建进化树以分析其遗传关系。最终明确辣椒炭疽病病菌中 GH 的数量、种类、功能及遗传关系等关键信息,为深入解析该病原菌的致病机制、筛选新型防治靶点等研究提供基础数据支撑。关于糖苷水解酶蛋白找寻的研究路线见图 1。

### 1.3 糖苷水解酶生物信息学分析

1.3.1 理化性质分析 利用 ProtParam 在线工具<sup>[35]</sup>,对糖苷水解酶蛋白的理论等电点、相对分子量、脂溶性指数、氨基酸残基数量、不稳定系数、脂肪族氨基酸指数等理化参数进行预测分析,采用 Origin 或 Graph Pad 软件对分析结果进行可视化作图。

1.3.2 疏水性分析预测 利用 ProtScale 在线工具<sup>[35]</sup>对糖苷水解酶蛋白的疏水性进行预测,统计疏水性与亲水性氨基酸残基的分布特征。该分析可明确蛋白质的亲水区域与疏水区域,为判断糖苷水解酶蛋白是否为膜蛋白及潜在跨膜区域提供依据。

1.3.3 保守结构域分析 通过 SMART 在线分析工具<sup>[29]</sup>预测糖苷水解酶蛋白的保守结构域特征,记录并保存保守结构域图谱,最终对结构域组成及功能关联性进行分析并作图展示。

1.3.4 遗传进化关系分析 使用 MEGA 11 软件<sup>[36]</sup>对目标糖苷水解酶蛋白氨基酸序列进行多重序列比对,基于比对结果构建遗传进化树,进而分析其遗传亲缘关系。

1.3.5 COG 蛋白功能注释与聚类分析 通过 EggNOG-mapper 在线工具及 EggNOG 数据库<sup>[37]</sup>,对糖苷水解酶蛋白氨基酸序列进行 COG 功能注释,同时完成功能聚类分析,明确其在进化过程中的功能分类及同源蛋白质关联。

## 2 结果与分析

### 2.1 辣椒胶孢炭疽菌中糖苷水解酶找寻

2.1.1 信号肽预测 本研究利用在线预测网站对辣椒胶孢炭疽菌的蛋白质氨基酸序列进行分析,结果(表 1)显示,在辣椒胶孢炭疽菌的 15 367 个蛋白质氨基酸序列中,有 1 974 个具有典型的 N-端信号肽,占总蛋白质氨基酸序列数的 12.84%。蛋白质中信号肽切割位点以 18 aa 至 19 aa 之间的数量最多。

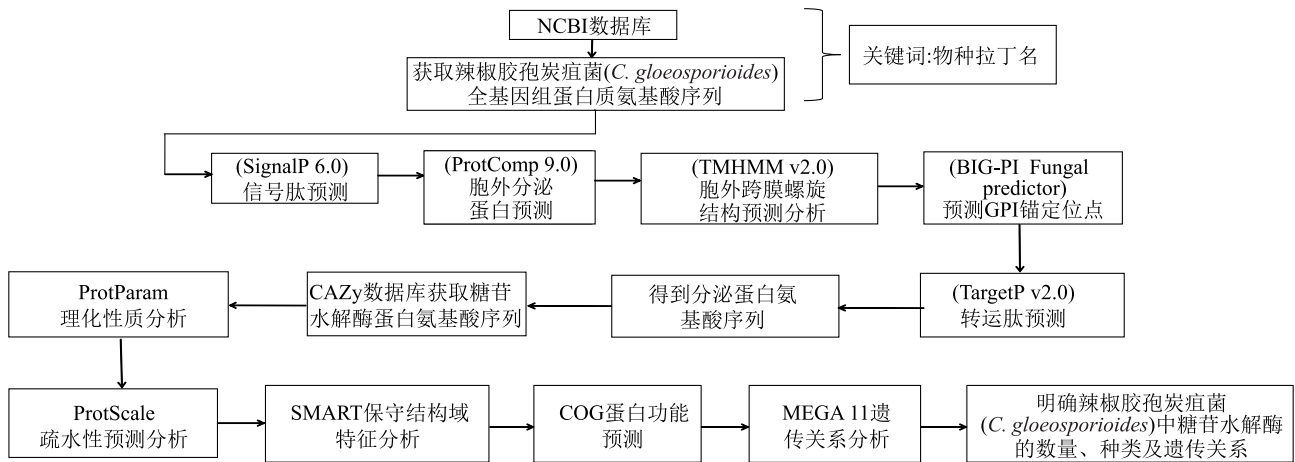


图1 糖苷水解酶蛋白找寻的研究路线

Fig.1 Research route for the identification of glycoside hydrolase proteins

表1 信号肽切割位点统计

Table 1 Statistics of signal peptide cleavage sites

切割位点 (aa)	数量 (个)	切割位点 (aa)	数量 (个)	切割位点 (aa)	数量 (个)	切割位点 (aa)	数量 (个)
13~14	2	22~23	129	31~32	24	40~41	5
14~15	6	23~24	123	32~33	5	42~43	1
15~16	37	24~25	91	33~34	12	43~44	1
16~17	107	25~26	57	34~35	6	44~45	4
17~18	192	26~27	45	35~36	6	45~46	0
18~19	295	27~28	28	36~37	5	46~47	1
19~20	289	28~29	24	37~38	1	48~49	2
20~21	240	29~30	32	38~39	3	49~50	1
21~22	181	30~31	15	39~40	2	50~51	2

2.1.2 亚细胞定位预测 进一步对含有 N-端信号肽的1 974个蛋白质进行亚细胞定位预测分析,结果(表2)发现,定位在膜结合细胞外受体、细胞外和质膜的蛋白质数量较多,分别为 765 个、507 个和 266 个;定位在细胞核和液泡内的蛋白质数量较少,分别为 11 个、8 个。

表2 亚细胞定位结果

Table 2 Subcellular localization results

亚细胞定位	蛋白质数量 (个)	亚细胞定位	蛋白质数量 (个)
膜结合胞外受体	765	溶酶体	58
细胞外	507	内质网	56
质膜	266	过氧化酶体	26
线粒体	181	细胞核	11
细胞质	66	液泡	8
高尔基体	32		

2.1.3 跨膜结构域预测 对 507 个胞外蛋白质进行跨膜结构域分析,发现其中有 475 个蛋白质氨基酸序列没有跨膜结构域,30 个蛋白质氨基酸序列有 1 个跨膜结构域,2 个蛋白质氨基酸序列具有 2 个跨膜结构域。

2.1.4 GPI 锚定位点预测 对不含跨膜结构域(475 个)和含有 1 个跨膜结构域(30 个)的 505 个蛋白质氨基酸序列进行 GPI 锚点定位预测。结果显示,有 30 个蛋白质氨基酸序列具有 GPI 锚定位点,剩余 475 个蛋白质氨基酸序列没有 GPI 锚定位点。

2.1.5 Target 信号肽预测 对 475 个没有 GPI 锚定位点的蛋白质信号肽进行验证分析,最终明确辣椒胶孢炭疽菌中具有典型特征的分泌蛋白数量为 475 个,占总蛋白质数量的 3.09%。

2.1.6 碳水化合物活性酶的预测 对辣椒胶孢炭疽菌中分泌蛋白氨基酸序列进行比对注释,共注释到

53 个碳水化合物活性酶,其中有 24 个糖苷水解酶(表 3),占比达 45.28%;其次为辅助活性酶(AA),11 个;碳水化合物酯酶和多糖裂解酶分别有 8 个、9 个;碳水化合物结合模块(CBM)最少,仅 1 个(图 2)。对糖苷水解酶的分析结果表明,6 个糖苷水解酶归属 GH28 亚家族,此外还含有 GH11、GH12、GH3、GH128、GH6、GH62、GH16\_23、GH5、GH131、GH29、GH5\_23、GH20、GH5\_7、GH132、GH45、GH43\_21、GH32 等亚家族。对辅助活性酶的分析结果表明,AA9 占比最高,另外还含有 AA1、AA11、AA7、AA16 等。对多糖裂解酶分析发现,多糖裂解酶中占比最高的为 PL3\_2,此外还含有 PL9\_3、PLA\_3、PL1\_7、PLA\_1 等。对碳水化合物酯酶分析发现,碳水化合物酯酶中占比最高的为 CE5,此外还有 CE8、CE3、CE12、CE16 等。碳水化合物结合模块中仅含有 CBM63。

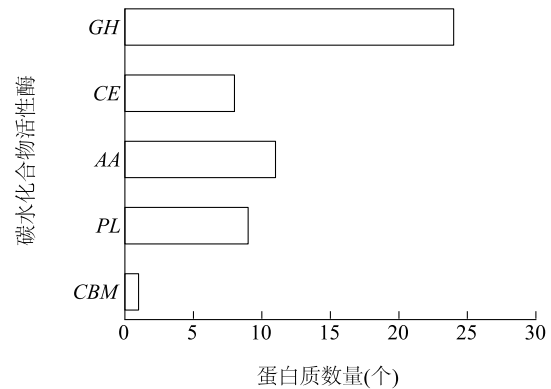
表 3 辣椒胶孢炭疽菌中的糖苷水解酶

Table 3 Glycoside hydrolases in *Colletotrichum gloeosporioides* of pepper

糖苷水解酶蛋白 ID	归属亚家族	糖苷水解酶蛋白 ID	归属亚家族
XP_045256144.1	GH11	XP_045262794.1	GH20
XP_045256317.1	GH28	XP_045263545.1	GH5
XP_045256762.1	GH12	XP_045263755.1	GH28
XP_045256872.1	GH3	XP_045264077.1	GH132
XP_045257005.1	GH128	XP_045264335.1	GH28
XP_045258851.1	GH6	XP_045264447.1	GH45
XP_045259889.1	GH62	XP_045264645.1	GH43_21
XP_045260029.1	GH28	XP_045264919.1	GH28
XP_045260430.1	GH16_23	XP_045264946.1	GH5_7
XP_045261075.1	GH131	XP_045265167.1	GH28
XP_045261120.1	GH29	XP_045265219.1	GH32
XP_045262289.1	GH5_23	XP_045265438.1	GH131

## 2.2 辣椒胶孢炭疽菌中糖苷水解酶的生物信息学

2.2.1 理化性质 糖苷水解酶预测流程见图 3。对辣椒胶孢炭疽菌中分泌蛋白氨基酸序列注释到的 24 个糖苷水解酶进行不稳定系数预测分析,结果发现其中稳定蛋白 20 个,不稳定蛋白 4 个,最大不稳定系数为 45.42,最小不稳定系数为 15.56。对分泌蛋白的理论等电点进行分析,结果(图 4)发现,理论等电点位于 5.01~6.00 的蛋白质数量最多,有 13 个,所占比例为 54.16%;位于 4.01~5.00 和位于 6.01~7.00 的蛋白质数量位居第 2,各有 4 个;位于 8.01~9.00 的蛋白质数量最少,仅有 1 个。理论等电点最低值为



CBM:碳水化合物结合模块中活性酶;PL:多糖裂解酶;AA:辅助活性酶;CE:碳水化合物酯酶;GH:糖苷水解酶。

图 2 碳水化合物活性酶中各种酶类数量

Fig.2 Number of enzymes in various carbohydrate-active enzyme classes

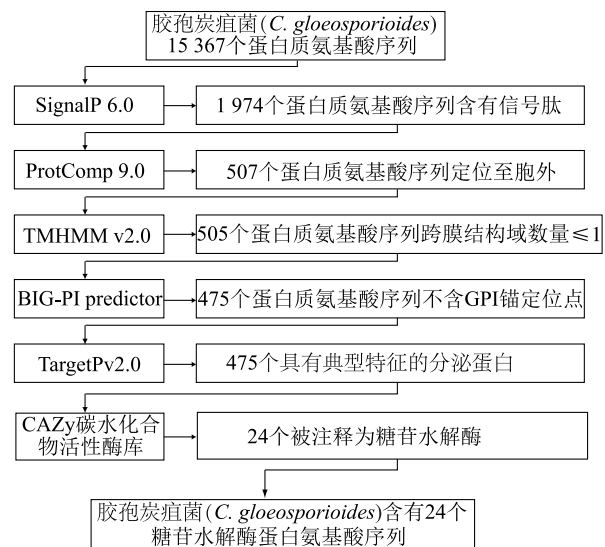


图 3 糖苷水解酶预测流程图

Fig.3 Flowchart for glycoside hydrolase prediction

4.43,最高值为 8.87,理论等电点小于 7.00 的蛋白质为酸性蛋白质,数量为 21 个,占比达 87.50%。对糖苷水解酶蛋白氨基酸数量进行分析,结果发现氨基酸数量在 201 aa 至 300 aa 之间和 301 aa 至 400 aa 间的蛋白质数量分别有 8 个,氨基酸数量在 401 aa 至 500 aa 间的蛋白质数量有 4 个,氨基酸数量在 101 aa 至 200 aa 间的蛋白质数量为 3 个,氨基酸数量在 501 aa 至 600 aa 之间的蛋白质数量仅有 1 个。对糖苷水解酶蛋白的相对分子量进行分析发现,相对分子量最小的为 24 019.56,最大的为 100 691.12,平均相对分子量为 44 232.09。对糖苷水解酶蛋白的亲水性总平均

值分析发现,亲水性总平均值都小于 0,其中最小亲水性总平均值为-0.453,最大的为-0.009。

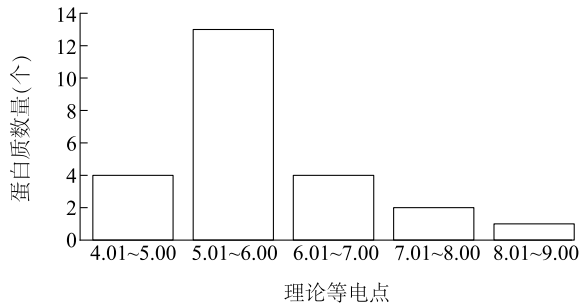


图4 辣椒胶孢炭疽菌中GH酶蛋白的理论等电点图

Fig.4 Theoretical isoelectric point diagram of glycoside hydrolase proteins in *Colletotrichum gloeosporioides* of pepper

2.2.2 信号肽切割位点 结合表4与图5分析可知,辣椒炭疽菌中糖苷水解酶的信号肽切割位点主要以丙氨酸(A)、缬氨酸(V)、谷氨酰胺(Q)、脯氨酸(P)等氨基酸残基为核心构成。且氨基酸残基组成在-3和-1位呈现出相对保守的特点,尤其是在-1位符合典型的A-X-A类切割类型特征。通过对各条目进行计数、统计和计算可知,在-1位切割位点,丙氨酸数量最高,为11个,所占比例达45.83%;缬氨酸数量次之,为7个,占比29.16%。在-2位切割位点,丙氨酸、丝氨酸数量最高,分别为8个、4个,占比依次为33.33%、16.66%。在-3位切割位点,丙氨酸数量占据绝对优势,为18个,占比75.00%;甘氨酸(G)和精氨酸(R)数量相对次之,分别为3个、2个,占比为12.50%、8.33%。在1位切割位点,谷氨酰胺数量最高,为8个,占比33.33%;丙氨酸数量次之,为3个,占比12.50%。在2位切割位点,脯氨酸和丙氨酸数量最高,均为5个,各占比20.83%。

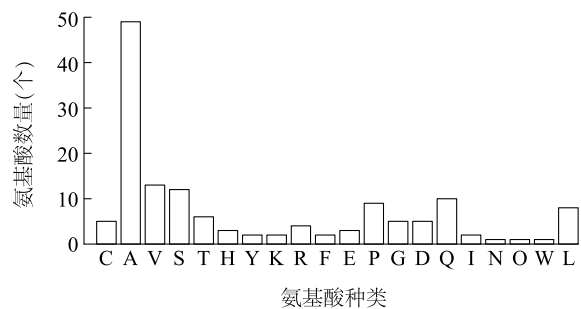
2.2.3 疏水性 分泌蛋白亲疏水性分析结果表明,24个糖苷水解酶蛋白均为疏水性蛋白,高疏水性氨基酸残基包括丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苏氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、半胱氨酸。其中排名前2位的分别为丙氨酸(7个)、亮氨酸(5个),分别占糖苷水解酶蛋白数量的29.17%和20.83%;数量最少的为苏氨酸、半胱氨酸,均有1个。高亲水性氨基酸包括天冬酰胺、酪氨酸、赖氨酸、天冬氨酸、组氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丝氨酸,其中排名最前的为天冬氨酸(5个),占比20.83%;数量最少的为组氨酸和脯氨酸,各1个。

表4 糖苷水解酶蛋白信号肽切割位点氨基酸类型

Table 4 Amino acid types at signal peptide cutting sites in glycoside hydrolase proteins

糖苷水解酶蛋白 ID	切割位点					
	-1	-2	-3	1	2	3
XP_045256144.1	C	L	A	A	P	A
XP_045256317.1	A	H	G	V	G	P
XP_045256762.1	A	A	A	E	T	Q
XP_045256872.1	A	Y	A	D	D	A
XP_045257005.1	A	F	A	Q	S	D
XP_045258851.1	V	K	A	R	Q	V
XP_045259889.1	V	A	A	Q	C	D
XP_045260029.1	S	S	A	I	E	L
XP_045260430.1	A	F	A	Q	L	S
XP_045261075.1	V	A	A	D	C	A
XP_045261120.1	T	R	A	Q	A	P
XP_045262289.1	A	E	A	I	P	S
XP_045262794.1	V	S	A	S	V	W
XP_045263545.1	E	P	R	Q	A	G
XP_045263755.1	V	A	A	Y	P	V
XP_045264077.1	V	V	A	Q	P	H
XP_045264335.1	T	S	G	L	N	V
XP_045264447.1	A	A	S	Q	A	S
XP_045264645.1	V	P	R	Q	A	T
XP_045264919.1	A	A	A	L	T	C
XP_045264946.1	A	A	A	A	O	C
XP_045265167.1	A	A	A	A	P	S
XP_045265219.1	T	H	A	L	A	L
XP_045265438.1	A	S	G	K	I	L

A: 丙氨酸; C: 半胱氨酸; D: 天冬氨酸; E: 谷氨酸; F: 苯丙氨酸; G: 甘氨酸; H: 组氨酸; I: 异亮氨酸; K: 赖氨酸; L: 亮氨酸; M: 甲硫氨酸; N: 天冬酰胺; P: 脯氨酸; Q: 谷氨酰胺; R: 精氨酸; S: 丝氨酸; T: 苏氨酸; V: 缬氨酸; W: 色氨酸; Y: 酪氨酸。



A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y 见表4注。

图5 糖苷水解酶蛋白信号肽切割位点处各氨基酸数量

Fig.5 Count of amino acid residues at the signal peptide cutting site in glycoside hydrolase proteins

2.2.4 保守结构域 对 24 个糖苷水解酶蛋白进行保守结构域预测,结果发现有 23 个蛋白质具有明显的保守结构域,所占比例为 95.83%。在这 23 个含有保守结构域的蛋白质中有 9 个蛋白质含有糖苷水解酶蛋白保守结构域,糖苷水解酶蛋白保守结构域

分别是 Glyco\_hydro\_11、Glyco\_hydro\_12、Glyco\_hydro\_cc、Glyco\_hydro\_6、Glyco\_hydro\_62、Glyco\_hydro\_28、Glyco\_hydro\_45、Glyco\_hydro\_2\_c、Glyco\_hydro-3、Glyco-hydro-3-c(图 6)。

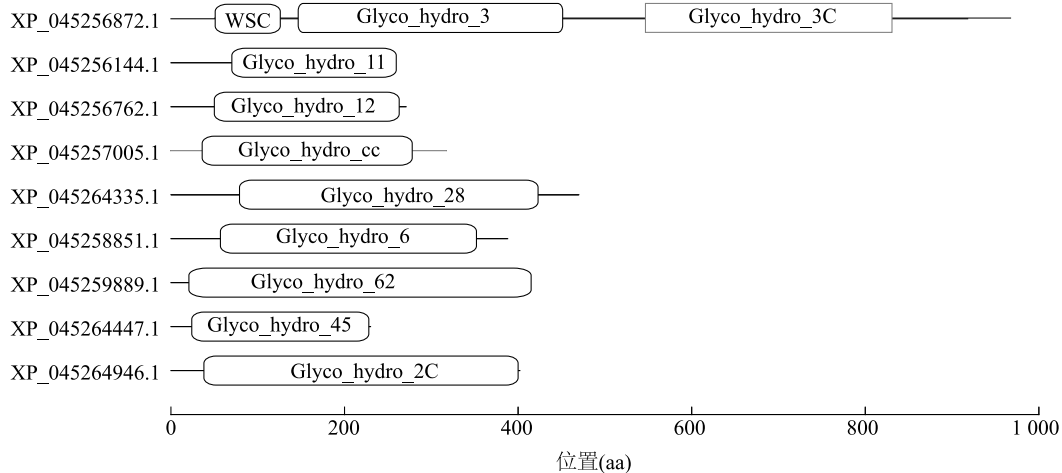


图 6 辣椒胶孢炭疽菌中糖苷水解酶蛋白保守结构域

Fig.6 Conserved domains of glycoside hydrolase proteins in *Colletotrichum gloeosporioides* of pepper

2.2.5 遗传关系 从图 7 糖苷水解酶进化关系树可见,24 个糖苷水解酶明显分为 3 类,分别命名为 A、B、C。其中,A 类共计 10 个糖苷水解酶,分布于 GH32、GH29、GH45、GH62、GH28 亚族;B 类的 9 个糖苷水解酶,分属于 GH132、GH6、GH5 等 8 个亚家族;C 类的 5 个糖苷水解酶,分别属于 GH5、GH12、GH128、GH131 等亚家族。进一步观察发现,不同类别中存在同亚家族的糖苷水解酶,这表明同一亚家族的糖苷水解酶在进化关系上可能存在分化。

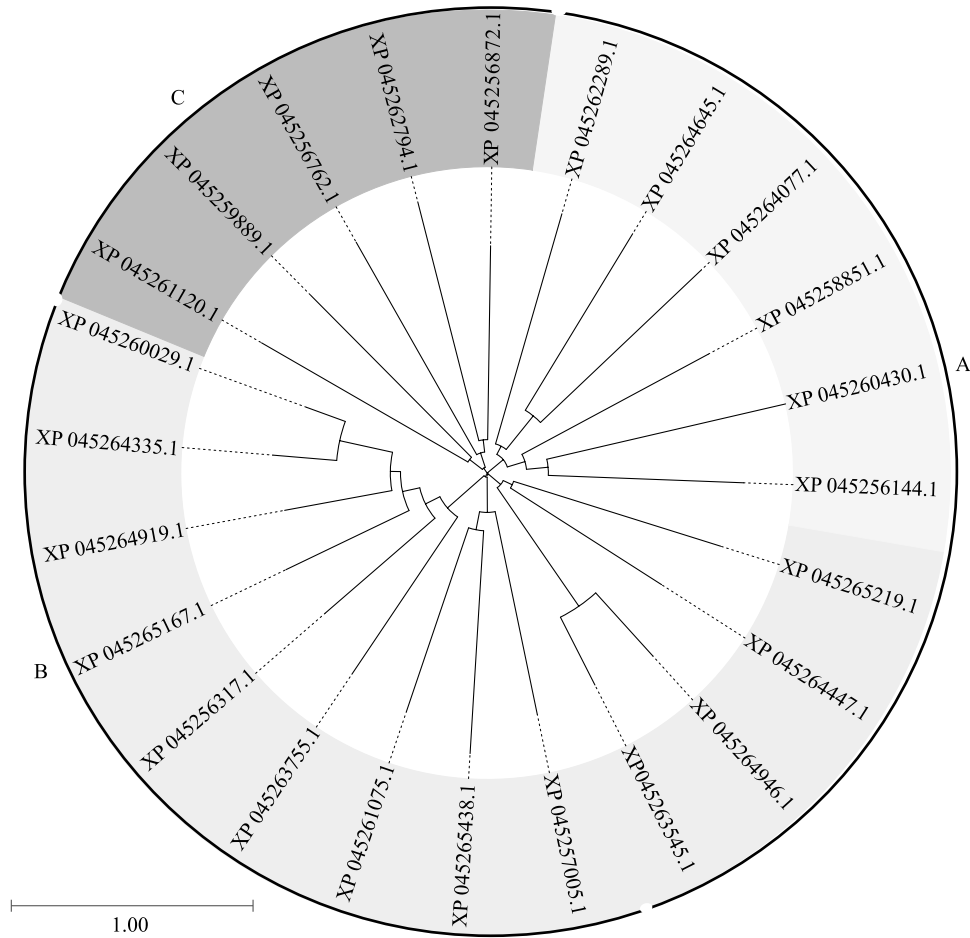
2.2.6 同源糖苷水解酶蛋白簇(COG)功能注释 进一步对 24 个糖苷水解酶蛋白进行功能分类分析(表 5),去除 1 条未能分类的序列,剩下 23 个分别属于功能未知(S)类 2 个,蛋白质翻译后修饰和伴侣蛋白(O)类 2 个,碳水化合物转运代谢(G)类 19 个。功能注释显示,这些糖苷水解酶主要参与碳水化合物转运代谢等生物功能,同时也涉及各类次生代谢物的合成、运输与分解以及蛋白质翻译后修饰等功能,体现出辣椒胶孢炭疽菌功能类别的多样性,其糖苷水解酶参与了多项生命活动。

### 3 讨论

辣椒炭疽病由子囊菌门真菌炭疽菌<sup>[38]</sup>引起,据

研究报告,能引起辣椒炭疽病的炭疽菌有多种,如斯高维尔炭疽菌、黑点炭疽菌<sup>[39]</sup>、平头炭疽菌<sup>[39]</sup>等。针对辣椒胶孢炭疽菌的研究,以往多集中在探究其病原鉴定、生物学特性、生防菌株的筛选及防治等方面,对其生物信息学方面的研究较少且不够深入。本研究基于胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)的全基因组序列,利用生物信息学方法从其 15 367 个蛋白质氨基酸序列中预测出糖苷水解酶,再对糖苷水解酶进行理化性质、保守结构域、COG 蛋白质功能注释,疏水性以及进化关系进行分析。结果显示,辣椒胶孢炭疽菌中具有典型特征的分泌蛋白数量为 475 个,占总蛋白质数量的 3.09%。前人研究结果表明,不同病原菌中所含分泌蛋白的数量和所占比例不完全相同,不同真菌中分泌蛋白质数量占总蛋白质数量的 3.65%~9.58%<sup>[40]</sup>,与该研究结果相比,辣椒胶孢炭疽菌中分泌蛋白占比较小。

前人对引起云南辣椒炭疽病的高致病性病菌 *Colletotrichum scovillei* 生物学特性的研究结果表明,该菌在 5~35 °C 条件下菌丝可正常生长,且在 25 °C 时菌丝生长速度最快<sup>[28]</sup>。这一结果与张翠文等<sup>[41]</sup>报道的甘肃省辣椒炭疽病病菌(*Colletotrichum capsici*) 在 15~40 °C 均可生长、产孢并萌发存在差异,推



XP\_045256144.1、XP\_045256317.1、XP\_045256762.1、XP\_045256872.1、XP\_045257005.1、XP\_045258851.1、XP\_045259889.1、XP\_045260029.1、XP\_045260430.1、XP\_045261075.1、XP\_045261120.1、XP\_045262289.1、XP\_045262794.1、XP\_045263545.1、XP\_045263755.1、XP\_045264077.1、XP\_045264335.1、XP\_045264447.1、XP\_045264645.1、XP\_045264919.1、XP\_045264946.1、XP\_045265167.1、XP\_045265219.1、XP\_045265438.1 为糖苷水解酶蛋白 ID。

图 7 辣椒胶孢炭疽菌中糖苷水解酶进化关系树

Fig.7 Phylogenetic tree of glycoside hydrolases in *Colletotrichum gloeosporioides* of pepper

测原因可能是不同地区气候条件不同,导致病原菌的适宜生存条件存在差异。在适宜温度下,病菌生长旺盛,糖苷水解酶活性较高;而遭受高温或低温胁迫时,病菌生长会受到抑制,糖苷水解酶活性也随之下降。具体而言,适宜温度范围内,病菌更易分解植物细胞壁多糖,从而利于其侵染致病;温度不适宜时,病菌对植物的侵染能力会受到影响,进而导致致病性降低。同时,高温会改变酶的空间结构,造成酶活性降低甚至失活,还会影响细胞膜的流动性与通透性,干扰细胞内正常的代谢及生理功能。此外,李明瑾等<sup>[28]</sup>研究发现, *Colletotrichum scovillei* 在 24 h 全黑暗、24 h 全光照及 12 h 光照/12 h 黑暗条件下均能生长,且生长差异不明显,但在 24 h 黑暗条件

下菌丝生长速度最快、菌落面积最大<sup>[28]</sup>,这与程东等<sup>[42]</sup>的研究结果一致。值得注意的是,光照时长与光照度会对辣椒炭疽病病菌的生长、发育及糖苷水解酶活性产生影响;不同光照条件可能改变病菌的代谢途径与生理活动,例如适当光照可能促进病菌产生某些致病因子,增强其致病性。同时,光照也可能通过影响病菌整体代谢,间接作用于糖苷水解酶的合成与分泌——在利于病菌生长的光照条件下,糖苷水解酶的产量与活性可能提高,从而助力病菌侵染辣椒,而不适宜的光照则可能减弱糖苷水解酶的相关作用,降低病菌致病性。然而,目前关于不同温度及光照条件对辣椒胶孢炭疽菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 的影响尚不明确,其是否会作

表 5 糖苷水解酶同源蛋白簇功能注释信息表

Table 5 Functional annotation information table of glycoside hydrolase homologous protein clusters

糖苷水解酶蛋白 ID 号	COG 功能类别	描述
XP_045256144.1	G	糖苷水解酶 GH11 亚家族
XP_045256317.1	G	糖苷水解酶 GH28 亚家族
XP_045256762.1	G	糖苷水解酶 GH12 亚家族
XP_045256872.1	G	糖苷水解酶 GH3 亚家族
XP_045257005.1	O	糖苷水解酶催化核心
XP_045258851.1	G	糖苷水解酶 GH6 亚家族
XP_045259889.1	G	糖苷水解酶 GH62 亚家族
XP_045260029.1	G	糖苷水解酶 GH28 亚家族
XP_045260430.1	O	糖苷水解酶 GH16 亚家族
XP_045261075.1	-	-
XP_045261120.1	G	F5/8 类型 C 结构域
XP_045262289.1	G	糖苷水解酶 GH5 亚家族
XP_045262794.1	G	糖苷水解酶 GH20 亚家族
XP_045263545.1	G	糖苷水解酶 GH5 亚家族
XP_045263755.1	G	糖苷水解酶 GH28 亚家族
XP_045264077.1	S	$\beta$ -葡萄糖苷酶(SUN 亚家族)
XP_045264335.1	G	糖苷水解酶 GH28 亚家族
XP_045264447.1	G	糖苷水解酶 GH45 亚家族
XP_045264645.1	G	糖苷水解酶 GH43 亚家族
XP_045264919.1	G	糖苷水解酶 GH28 亚家族
XP_045264946.1	G	糖苷水解酶 GH5 亚家族
XP_045265167.1	G	糖苷水解酶 GH28 亚家族
XP_045265219.1	G	糖苷水解酶 GH32 亚家族
XP_045265438.1	S	碳水化合物结合模块家族 1 蛋白

S:功能未知;O:蛋白质翻译后修饰和伴侣蛋白;G:碳水化合物转运代谢。

用于该菌糖苷水解酶活性等问题,仍有待进一步研究。另外,辣椒胶孢炭疽菌分泌蛋白的氨基酸残基中,丙氨酸数量最高,且在信号肽切割位点-3 处的氨基酸以丙氨酸占比最大,-1 位属于典型的 A-X-A 切割类型,这一结果与覃悦等<sup>[43]</sup>、曹继东等<sup>[44]</sup>的研究结论相符合。

## 4 结论

本研究采用生物信息学方法,预测辣椒胶孢炭疽菌中具有典型特征的分泌蛋白共 475 个,占该菌总蛋白质数量的 3.09%。通过对分泌蛋白氨基酸序列的比对与注释,共鉴定出 53 个碳水化合物活性

酶,其中包含 24 个糖苷水解酶。进一步的生物信息学分析结果显示,这些糖苷水解酶蛋白多为酸性、稳定的疏水性蛋白质;氨基酸数量多集中在 201 aa 至 400 aa;含有糖苷水解酶保守结构域的糖苷水解酶主要分布于 GH28 亚家族;信号肽切割位点以丙氨酸占比最高,在-3 位与-1 位处的氨基酸残基组成相对保守,在-1 位符合 A-X-A 类型特征。系统发育树分析结果将其划分为 3 大类;COG 蛋白功能分析结果表明,这些糖苷水解酶不仅主要参与碳水化合物转运与代谢等生物过程,还涉及各类次生代谢物的合成、运输与分解,以及蛋白质翻译后修饰等功能。通过对辣椒胶孢炭疽菌糖苷水解酶的系统分析,明确了该类酶在病菌生命活动中的作用机制,不仅为挖掘病原菌防治靶点、开发新型生物防治策略提供理论依据,也为植物-病原菌互作研究提供了新思路。

## 参考文献:

- [1] 邹学校,朱凡. 辣椒传入中国的途径与传播路径[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版),2020,46(6):629-640.
- [2] 马顺尧,董若征,王胜辉,等. 辣椒炭疽病发生现状及防治措施研究[J]. 世界热带农业信息,2024(11):54-56.
- [3] 刁永朝,张灿,刘利,等. 中国辣椒炭疽病菌(*Colletotrichum truncatum*)地理种群的遗传分化研究[C]//中国植物病理学会. 中国植物病理学会 2014 年学术年会论文集. 北京:中国植物病理学会,2014.
- [4] 李叶彤. 辣椒胶孢炭疽菌生物学特性及其拮抗木霉菌筛选[D]. 长春:吉林农业大学,2023.
- [5] 董天韵,魏学军,刘昌清,等. 辣椒炭疽病综合防治研究进展[J]. 现代农业科技,2025(7):73-77.
- [6] 郭明程,李保同,汤丽梅,等. 爵床提取物对辣椒炭疽病菌的抑制作用及其苗期防效[J]. 植物保护,2013,39(4):119-123.
- [7] 朱春晖,程菊娥,周英,等. 工业大麻花提取物对 3 种植物病原真菌的抑菌活性[J]. 中国麻业科学,2023,45(4):177-182.
- [8] 周清,李保同,汤丽梅. 大蒜素对辣椒炭疽病和辣椒疫病菌的室内抑制活性测定及田间防效研究[J]. 草业学报,2014,23(3):262-268.
- [9] JOOST VAN DEN BRINK, RONALD P, DE VRIES. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2011,91(6):1477-1492.
- [10] 魏晓凤,范翰,马俊,等. 碳水化合物结合结构域的研究进展[J]. 齐鲁工业大学学报,2022,36(2):13-19.
- [11] 潘凤英,刘露露,孙大运,等. 植物病原菌糖基水解酶基因家族研究进展[J]. 生物学杂志,2022,39(6):94-100.
- [12] ZHANG S Y, CONG L, SI J P, et al. Action mechanisms of effectors in plant-pathogen interaction[J]. International Journal of Mo-

- lecular Sciences, 2022, 23(12):6758.
- [13] CANTAREL B L, COUTINHO P M, RANCUREL C, et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics[J]. Nucleic Acids Research, 2009, 37:233-238.
- [14] KETUDAT CAIRNS J R, ESEN A.  $\beta$ -glucosidases [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2010, 67(20):3389-3405.
- [15] 张贞宇, 罗正飞, 杨 帅, 等. 烟草糖苷水解酶 *GH3* 基因家族鉴定与表达分析[J]. 山东农业科学, 2024, 56(4):9-19.
- [16] HUANG Q S, XIE X L, GE L, et al. The *GH18* family of chitinases: their domain architectures, functions and evolutions [J]. Glycobiology, 2012, 22(1):23-34.
- [17] 周 洁, 郑祥梓, 兰 斓, 等. 稻瘟病菌假定的糖基水解酶 62 家族初步研究[J]. 中国农业科学, 2009, 42(8):2754-2762.
- [18] 肖 会, 韩长志. 植物病原丝状真菌中糖苷水解酶的研究进展 [J]. 江苏农业科学, 2024, 52(8):1-7.
- [19] LI W N, FAN D D. Biocatalytic strategies for the production of ginsenosides using glycosidase: current state and perspectives [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(9):3807-3823.
- [20] FAÚNDEZ C, PÉREZ R, RAVANAL C M, et al. *Penicillium purpurogenum* produces a novel, acidic, *GH3* beta-xylosidase: heterologous expression and characterization of the enzyme [J]. Carbohydrate Research, 2019, 482:107738.
- [21] CHUANG L, SHENGFENG H, JUNBIN C, et al. A dual-subcellular localized  $\beta$ -glucosidase confers pathogen and insect resistance without a yield penalty in maize [J]. Plant Biotechnology Journal, 2023, 22(4):1017-1032.
- [22] 金征宇, 程 昊, 陈 龙. 功能性碳水化合物研究进展 [J]. 食品科学技术学报, 2023, 41(6):1-8.
- [23] 薄淑文, 韩长志. 禾谷炭疽菌中糖苷水解酶互作蛋白找寻及遗传关系预测分析 [J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2024, 53(4):443-450.
- [24] 尹青晓, 韩长志. 希金斯炭疽菌中糖苷水解酶互作蛋白找寻及分析 [C]//中国植物病理学会. 中国植物病理学会 2023 年学术年会论文集. 北京:中国植物病理学会, 2023.
- [25] 窦文俊, 李 姝, 熊 杰, 等. 基于比较基因组的黏菌糖苷水解酶基因家族分析 [C]//中国菌物学会. 中国菌物学会 2024 年学术年会论文摘要. 北京:中国菌物学会, 2024.
- [26] 薛启鑫, 杨锦涛, 朱蒙芳, 等. 玉米大斑病菌糖苷水解酶 *GH12* 家族免疫诱导蛋白的筛选与应用初探 [C]//中国植物病理学会. 中国植物病理学会 2024 年学术年会论文集. 北京:中国植物病理学会, 2024.
- [27] 王欣桐. 禾谷镰孢 *GH16* 家族功能分析及致病机理研究 [D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2024.
- [28] 李明瑾, 霍建飞, 韩长志, 等. 辣椒炭疽病原菌中分泌蛋白的预测及特性分析 [J]. 江苏农业学报, 2025, 41(1):41-50.
- [29] LETUNIC I, BORK P. 20 years of the SMART protein domain annotation resource [J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(1):493-496.
- [30] DYRLØV BENDTSEN J, 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.
- [31] 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.
- [32] SONNHAMMER E L, VON HEIJNE G, KROGH A. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences [J]. Proceedings. International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology, 1998, 6:175-182.
- [33] EMANUELSSON O, BRUNAK S, VON HEIJNE G, et al. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools [J]. Nature Protocols, 2007, 2:953-971.
- [34] LOMBARD V, GOLACONDA RAMULU H, DRULA E, et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013 [J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42:490-495.
- [35] GASTEIGER E, HOOGLAND C, GATTIKER A, et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server [M]. Berlin: Springer, 2005.
- [36] 刘 丽, 刘长远, 王 辉, 等. 葡萄炭疽病菌鉴定及同源性分析 [J]. 中国农学通报, 2017, 33(35):132-136.
- [37] HUERTA-CEPAS J, FORSLUND K, COELHO L P, et al. Fast genome-wide functional annotation through orthology assignment by eggNOG-mapper [J]. Molecular Biology and Evolution, 2017, 34(8):2115-2122.
- [38] PAN F Y, HUANG Y, LIN L, et al. First report of *Colletotrichum capsici* causing grape ripe rot in Guangxi, China [J]. Plant Disease, 2016, 100(12):2531.
- [39] 许 媛, 肖 婷, 褚姝频, 等. 江苏省句容市葡萄炭疽病菌多样性及对苯并咪唑类杀菌剂的抗药性分析 [J]. 南京农业大学学报, 2022, 45(1):78-85.
- [40] 韩长志. 全基因组预测樟疫霉的候选效应分子 [J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2015, 39(2):69-74.
- [41] 张翠文, 魏立娟, 杨成德. 甘肃省辣椒炭疽病菌的分离鉴定及生物学特性 [J]. 西北农业学报, 2023, 32(10):1627-1636.
- [42] 程勋东, 隋益虎. 辣椒炭疽病原菌生物学特性研究 [J]. 安徽科技学院学报, 2015, 29(1):34-38.
- [43] 覃 悦, 祝友朋, 韩长志. 基于全基因组序列的黄单胞菌分泌蛋白质预测及其特征分析 [J]. 江苏农业学报, 2021, 37(1):53-59.
- [44] 曹继东, 刘 俊, 李遂焰. 基因组水平预测稻瘟菌分泌蛋白组及富集分析 [J]. 生物技术通报, 2016, 32(8):129-138.

(责任编辑:黄克玲)