

水稻纹枯病菌 *RsCat* 基因的克隆及其表达分析

江绍锋 王陈骄子 舒灿伟 周而勋

华南农业大学农学院/广东省微生物信号与作物病害防控重点实验室, 广州 510642

摘要 为阐明水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani* AG-1 IA)过氧化氢酶基因(*RsCat*)的功能,采用常规 PCR 和 RT-PCR 技术克隆得到 *RsCat* 基因。生物信息学分析表明,*RsCat* 基因 DNA 和 cDNA 的全长序列分别为 1 814 bp 和 1 395 bp,开放阅读框(ORF)编码 464 个氨基酸。保守结构域分析显示,*RsCat* 蛋白具有过氧化氢酶超家族结构域和过氧化氢酶相关免疫反应结构域。系统进化分析显示:水稻纹枯病菌不同融合群的 *RsCat* 基因具有较高的序列同源性。荧光定量 PCR(qRT-PCR)分析表明:*RsCat* 基因的表达受儿茶酚的诱导,随着儿茶酚质量浓度增大,表达量上调,而随着儿茶酚质量浓度增大,CAT 活性降低。说明 *RsCat* 基因的转录表达和 CAT 酶活不存在对应性。推测 *RsCat* 基因可能存在转录后或表达产物翻译后修饰。

关键词 水稻纹枯病菌; 过氧化氢酶; 儿茶酚; RT-PCR

中图分类号 S 435.111.4⁺2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2018)03-0025-07

水稻是世界上最重要的粮食作物,然而水稻纹枯病常常肆虐世界各国稻区,引起水稻大幅度减产甚至绝收,严重影响水稻的产量和品质,是一种非常重要的植物真菌病害。水稻纹枯病是由立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*) AG1-IA 融合亚群引起的。立枯丝核菌(*R. solani*)是一种重要的土传植物病原真菌,种内类群较多,目前至少可划分为 14 个融合群(anastomosis group, AG)。该菌寄主范围广,除为害水稻外,还可为害小麦、玉米等 200 多种植物^[1-3]。

过氧化氢酶(catalase, CAT)是一种常见的抗氧化酶,几乎存在于所有生物体内的有氧环境中^[4-5]。它通过催化过氧化氢分解为水和氧气,从而保护细胞免受活性氧(reactive oxygen species, ROS)氧化损伤^[6]。目前的研究表明,ROS 是细胞代谢的毒性副产物,能对体内的重要大分子物质(如 DNA、脂质、蛋白等)造成损伤;另一方面,ROS 也在细胞的信号转导、基因调控和氧化还原调控等过程中起着至关重要的作用^[7-9]。此外,过氧化氢酶是所有酶中催化效率最高的一种酶,一个过氧化氢酶分子可以将数百万个过氧化氢分子转化成水分子和氧分子^[10]。

前期研究中发现儿茶酚有利于水稻纹枯病菌细胞壁的黑化和增厚,促进黑色素积累^[11]。目前尚未

见到有关水稻纹枯病菌过氧化氢酶基因(*RsCat*)克隆及其相关分子生物学研究的报道。儿茶酚是合成黑色素的前体物质,这在玉蜀黍黑粉菌(*Ustilago maydis*)厚垣孢子黑色素积累中已被证实^[12]。因此,本研究对 *RsCat* 基因进行克隆,研究不同浓度儿茶酚胁迫下该基因的定量表达及酶活性变化,以期为深入研究 *RsCat* 基因调控黑色素形成以及氧化胁迫提供重要的基础数据和理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株和培养基配制

水稻纹枯病菌(*R. solani* AG1-IA)GD-118 菌株是广东省微生物信号与作物病害防控重点实验室保存的强致病力菌株^[13]。

马铃薯葡萄糖液体培养基(potato dextrose broth, PDB):马铃薯 200.0 g,葡萄糖 20.0 g,双蒸水 1 000.0 mL;马铃薯葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar, PDA)为 PDB 加入琼脂粉 18.0 g;LB 液体培养基(Luria-Bertani broth, LB):胰蛋白胨 10.0 g,酵母提取物 5.0 g,NaCl 10.0 g,调 pH 至 7.4,双蒸水 1 000 mL;LA 固体培养基(Luria-Bertani agar, LA)为 LB 加入琼脂粉 15.0 g。于 121 ℃、

收稿日期: 2017-08-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(31470247, 31271994)

江绍锋, 博士研究生, 研究方向: 植物病原真菌及真菌病害. E-mail: jiangshaofeng98@foxmail.com

通信作者: 周而勋, 教授, 研究方向: 植物病原真菌及真菌病害. E-mail: exzhou@scau.edu.cn

105 MPa 条件下在高压蒸汽灭菌器灭菌 20 min。

1.2 主要试剂

真菌 DNA 提取试剂盒、RNA 提取试剂盒、克隆载体 pEAST-T1、Tran1-T₁ 感受态细胞、PCR 反应试剂及 RT-PCR 试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、普通 *Taq* 酶、高保真 *Taq* 酶和凝胶回收试剂盒均购自北京全式金生物技术有限公司。儿茶酚、氨基青霉素钠、IPTG 和 X-Gal 购自 Sigma 公司。考马斯亮蓝 G-250、过氧化氢酶 (CAT) 试剂盒购自南京建成生物工程研究所。引物 (表 1) 的合成和测序由生物工程 (上海) 股份有限公司完成。

表 1 本研究使用的 PCR 引物序列

Table 1 Sequences of the oligonucleotide primers used in this study

引物 Primer	引物序列 (5' to 3') Sequence (5' to 3')
DF08773	ATGTTTCCCAGTGGACCAAG
DR08773	TTAGAGCGGCATACCCATAA
F08773	GGTTCGATTCCTTGCCAATG
R08773	CCTATCCTTATTTGTCCAGCGG
GAPDHF	TACTCCGCAATGCTATCG
GAPDHR	TACTCGGTCCAGTGGT

1.3 供试菌株的培养和菌丝体的收集

用直径 5.0 mm 的打孔器在 2 d 菌龄的水稻纹枯病菌 (*R. solani* AG1-1A) GD-118 菌株的菌落 (PDA 培养基) 边缘打取菌丝块, 将 10 个菌丝块移植到装有 150 mL 含不同质量浓度 (0、12.5、25、50 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 儿茶酚的 PDB 培养基的三角瓶中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 摇床振荡培养 3 d 后, 过滤收集菌丝体, 再用无菌水将菌丝体洗涤 2~3 次, 然后用多层灭菌滤纸吸干菌丝体表面多余的水分, 放入 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。

1.4 DNA 和 RNA 的提取

按照真菌 DNA 和 RNA 提取试剂盒说明书, 分别提取水稻纹枯病菌的 DNA 和 RNA, 采用琼脂糖凝胶电泳检测其完整性, 紫外分光光度法测定其纯度和含量, 检测合格后的 DNA 和 RNA 样品分别保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 普通冰箱和 -80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱备用。

1.5 *RsCat* 基因 DNA 和 cDNA 克隆

根据水稻纹枯病菌全基因组序列^[14], 用 Vector NTI 软件设计 *RsCat* 基因一对特异性引物, 引物序列为 DF08773: 5'-ATGTTTCCCAGTGGACCAAG-3', DR08773: 5'-TTAGAGCGGCATACCCATAA-3'。以总 RNA 为模板, 利用 RT-PCR 试剂盒进行 RT-PCR 扩增得到 cDNA。以 DNA 和 cDNA 为模板, 分别采用北京全式金生物技术有限

公司的普通 *Taq* 酶和高保真 *Taq* 酶进行 PCR 扩增, 扩增体系为: PCR Master Mix 为 25 μL 、10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ DF08773 和 DR08773 引物各 1 μL 、模板 1 μL 、普通 *Taq* 酶或高保真 *Taq* 酶 1 μL 、再加双蒸水 21 μL 。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min, 35 个循环后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, PCR 产物保存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。PCR 产物经琼脂糖凝胶回收、连接, 化学法转入到 Tran1-T₁ 感受态细胞, 经过蓝白斑筛选及菌液 PCR 电泳鉴定, 筛选出阳性克隆用于测序。电泳检测: 取 5 μL PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳, 加入 1 μL 6 \times 点样缓冲液, 在 5~8 V/cm 电压条件下电泳 30 min, 于凝胶成像系统下观察分析并拍照保存。阳性克隆的测序由生物工程 (上海) 股份有限公司完成。测序结果利用 ContingExpress 软件进行拼接, 并利用 NCBI 在线工具对水稻纹枯病菌 *RsCat* 基因进行序列基本结构和特征分析。

1.6 *RsCat* 基因的生物信息学分析

通过在线程序和软件对水稻纹枯病菌 *RsCat* 基因所编码的蛋白质氨基酸序列进行生物信息学预测和分析, 预测和分析软件: (1) 蛋白质理化性质预测: <http://web.expasy.org/protparam/>; (2) 信号肽的预测: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>; (3) 跨膜结构预测与分析: http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html; (4) 疏水性的分析: <http://web.expasy.org/protscale/>; (5) 蛋白质二级结构预测: https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_hnn.html; (6) 蛋白质三维结构的预测: <https://swissmodel.expasy.org/interactive/>; (7) 系统进化树分析: 采用 MEGA 4 软件对水稻纹枯病菌 *RsCat* 蛋白质与其他真菌 Cat 蛋白的进化关系进行分析。

1.7 *RsCat* 基因定量表达分析

以水稻纹枯病菌甘油醛 3-磷酸基因 (*GAPDH*) 作为内参基因, 检测水稻纹枯病菌在不同浓度儿茶酚胁迫 3 d 后 *RsCat* 基因在转录水平上的相对表达量。RNA 样品用 DNase I 进行预处理后, 用反转录试剂盒合成单链 cDNA 作为模板。基于已克隆的水稻纹枯病菌 *RsCat* 基因的 cDNA 序列, 设计的引物为 F08773: 5'-GGTTCGATTCCTTGCCAATG-3', R08773: 5'-CCTATCCTTATTTGTCCAGCGG-3'。以 *GAPDH* 基因为内参, 引物

序列为: GAPDHF: 5'-TACTCCGCAATGC-TATCG-3'; GAPDHR: 5'-TACTCGGTCCCAGT-GGT-3'。qRT-PCR 反应体系: SYBR Green PCR Master Mix 10 μ L, 10 μ mol/L F08773 和 R08773 引物各 1 μ L, 不同样本的 cDNA (稀释 5 倍) 2.0 μ L, 再加双蒸水 6 μ L, 不加 cDNA 模板的为阴性对照。在 Bio-Rad CFX 仪器上进行 qRT PCR 反应, 反应程序: 预变性 95 $^{\circ}$ C 2 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s; 55 $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 40 个循环收集荧光。内参基因 qRT-PCR 体系, 除引物不同外, 其余参数同 *Cat* 基因。采用 Bio-Rad CFX Manager Software (Version 2.0) 进行数据处理和分析, 每个样品 3 次重复。

1.8 CAT 酶活测定

蛋白质提取方法参照丁国云等^[15]的方法。按照本文“1.3”方法将培养 3 d 后冰冻的菌丝体放入预冷灭菌的研钵中, 倒入液氮将菌丝研磨成细粉末, 装入 2.0 mL 的离心管中, 按菌丝体与提取液 1:10 (*m/V*) 的比例加入预冷的生理盐水, 涡旋混匀后, 于 4 $^{\circ}$ C 下 3 000 r/min 离心 10 min, 用移液器吸取上清液, 放入冰上预冷的 1.5 mL 离心管中。酶液提取后立即进行酶活测定, 以保证其活性。

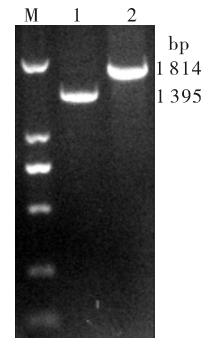
采用考马斯亮蓝染色法 (G-250 法) 测定酶液蛋白质含量。取 250 μ L 酶液, 加入 2.75 mL 考马斯亮蓝 G-250, 充分振荡混合后, 室温下反应 3 min, 在 595 nm 下测定吸光度, 以 250 μ L 去离子水加入 2.75 mL 考马斯亮蓝作为空白对照。用已知浓度的蛋白质溶液标准曲线作为定量的依据, 采用南京建成生物工程研究所提供的 CAT 试剂盒进行测定: 过氧化氢在 240 nm 下有最大吸收值, CAT 能分解过氧化氢, 反应溶液体系的吸光度 A_{240} 随反应时间而降低。

2 结果与分析

2.1 *RsCat* 基因的克隆

提取水稻纹枯病菌总 RNA, 用凝胶电泳进行质量检测, 可以看到 28 S rDNA 和 18 S rDNA 的条带清晰明亮, 说明基因完整性很好, 无 DNA 污染 (结果未显示); 同时用微量分光光度计检测 $D_{260}/D_{280}=1.91$, 符合后续试验要求。对 PCR 产物进行纯化回收、连接转化、测序, 并去掉载体序列, 得到 DNA 和 cDNA 全长序列分别为 1 814 和 1 395 bp, 与琼脂糖凝胶电泳结果一致 (图 1), 序列含有 8 个

外显子, 7 个内含子。用 ORF Finder 软件分析获得的水稻纹枯病菌 *RsCat* 基因 cDNA 序列, 共编码 464 个氨基酸 (图 2)。经生物信息学分析, *RsCat* 基因编码蛋白质分子式为 $C_{2391}H_{3572}N_{652}O_{688}S_{14}$; 分子质量为 52 907.46 ku, 理论等电点为 6.52, 属于酸性亲水性蛋白。水稻纹枯病菌 *RsCat* 蛋白不含有信号肽, 预测其可能为非分泌蛋白。*RsCat* 蛋白没有跨膜结构域, 预测不是跨膜蛋白。通过神经网络 (HNN) 预测 *RsCat* 基因编码的蛋白, 结果表明 *RsCat* 蛋白的二级结构主要由 25.43% 的 α -螺旋、18.10% 的延伸链和 56.47% 的不规则卷曲组成。保守结构域预测显示 *RsCat* 蛋白具有 2 个典型的保守结构域: 一是过氧化氢酶超家族结构域 (catalase-like superfamily), 称为 N-末端结构域, 主要由 1~324 位的高度保守序列基序组成; 二是过氧化氢酶相关免疫反应结构域 (catalase-related immune-responsive), 由 366~423 位共 58 个氨基酸长度的高度保守序列基序组成, 主要包括识别免疫反应 T 细胞的八肽结构。利用 SWISS-MODEL 网站对 *RsCat* 蛋白进行三维结构预测, 结果显示 α -螺旋、延伸链和不规则卷曲分布较均匀。



M: DNA 分子质量标准; 1: *RsCat* 基因 cDNA PCR 产物; 2: *RsCat* 基因 DNA PCR 产物。M: Tran 2000 DNA marker; 1: The amplification cDNA product of *RsCat* gene; 2: The amplification DNA product of *RsCat* gene.

图 1 水稻纹枯病菌 *RsCat* 基因 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳
Fig.1 Agarose gel electrophoresis of the PCR product of *RsCat* gene in *Rhizoctonia solani* AG-1 IA

2.2 *RsCat* 蛋白系统进化树分析

为了解水稻纹枯病菌 *RsCat* 蛋白与其他真菌 *Cat* 蛋白的进化关系, 本研究对水稻纹枯病菌 *RsCat* 蛋白进行多序列比对及系统进化树分析, 结果表明: 水稻纹枯病菌 *RsCat* 蛋白与其他 19 种真菌 *Cat* 蛋白亲缘关系的远近和本身的分类学地位与传统形态学分类结果相一致。其中水稻纹枯病菌 GD-118 菌

RsCat		-----	
CEL54483.1	1	MTSFIQDALSKIPGVDPRVLRNQAFSGSLNDGPAATAARLQAGLVQESHAKRDDSPITYTNSFGQIPDSSGHALNIGGIPYQG	80
EUC65952.1	1	MTSFIQDLTKIPGVDPRVLRNQAFSGSLNDGPAATAARLQAGLVQESHAKRDDSPITYTNSFGQIPDSSGHALNIGGIPYQG	80
KDN41214.1	1	MTSFIQDLTKIPGVDPRVLRNQAFSGSLNDGPAATAARLQAGLVQESHAKRDDSPITYTNSFGQIPDSSGHALNIGGIPYQG	80
CUA75461.1	1	MTSFIQDLTKIPGVDPRVLRNQAFSGSLNDGPAATAARLQAGLVQESHAKRDDSPITYTNSFGQIPDSSGHALNIGGIPYQG	80
ELU37193.1	1	-----	
RsCat		-----VSQWTKAALFQPGKKTTPAYTRFST-VTYGREFFDSARNRFGFA	42
CEL54483.1	81	DTLLLEKQQAQFDRGKIQERIVHPCGSSAFGYFOVTDVSHLTKAALFQPGKKTTPAYTRFST-VTYGREFFDSARNRFGFA	159
EUC65952.1	81	DTLLLEKQQAQFDRGKIQERIVHPCGSSAFGYFOVTDVSHLTKAALFQPGKKTTPAYTRFST-VTYGREFFDSARNRFGFA	159
KDN41214.1	81	DTLLLEKQQAQFDRGKIQERIVHPCGSSAFGYFOVTDVSHLTKAALFQPGKKTTPAYTRFST-VTYGREFFDSARNRFGFA	159
CUA75461.1	81	DTLLLEKQQAQFDRGKIQERIVHPCGSSAFGYFOVTDVSHLTKAALFQPGKKTTPAYTRFST-VTYGREFFDSARNRFGFA	159
ELU37193.1	1	-----MFFSGPRLRCFRRERRLLILREFFDSARNRFGFA	35
RsCat		TRFYTEEGNYDLVGLNMFVFFVRDFFPMGPDNIRSQQRNFKSLGLIDYDAWFDPLANVFESQIAGLMLSDHATPVGWRFS	122
CEL54483.1	160	TRFYTEEGNYDLVGLNMFVFFVRDFFPMGPDNIRSQQRNFKSLGLIDYDAWFDPLANVFESQIAGLMLSDHATPVGWRFS	239
EUC65952.1	160	TRFYTEEGNYDLVGLNMFVFFVRDFFPMGPDNIRSQQRNFKSLGLIDYDAWFDPLANVFESQIAGLMLSDHATPVGWRFS	239
KDN41214.1	160	TRFYTEEGNYDLVGLNMFVFFVRDFFPMGPDNIRSQQRNFKSLGLIDYDAWFDPLANVFESQIAGLMLSDHATPVGWRFS	232
CUA75461.1	160	TRFYTEEGNYDLVGLNMFVFFVRDFFPMGPDNIRSQQRNFKSLGLIDYDAWFDPLANVFESQIAGLMLSDHATPVGWRFS	232
ELU37193.1	36	TRFYTEEGNYDLVGLNMFVFFVRDFFPMGPDNIRSQQRNFKSLGLIDYDAWFDPLANVFESQIAGLMLSDHATPVGWRFS	115
RsCat		GYGCHTFRWNTKDKRSVFKYHWRSSQGTKEFTHEQSIVMCGEDPDKAKRDLWQHIIEQGGDARWTFVQVITPEDLASGK	202
CEL54483.1	240	GYGCHTFRWNTKDKRSVFKYHWRSSQGTKEFTHEQSIVMCGEDPDKAKRDLWQHIIEQGGDARWTFVQVITPEDLASGK	319
EUC65952.1	240	GYGCHTFRWNTKDKRSVFKYHWRSSQGTKEFTHEQSIVMCGEDPDKAKRDLWQHIIEQGGDARWTFVQVITPEDLASGK	319
KDN41214.1	233	-----GVFKYHWRSSQGTKEFTHEQSIVMCGEDPDKAKRDLWQHIIEQGGDARWTFVQVITPEDLASGK	297
CUA75461.1	233	-----GVFKYHWRSSQGTKEFTHEQSIVMCGEDPDKAKRDLWQHIIEQGGDARWTFVQVITPEDLASGK	291
ELU37193.1	116	GYGCHTFRWNTKDKR-----GTEKFTHEQSIVMCGEDPDKAKRDLWQHIIEQGGDARWTFVQVITPEDLASGK	183
RsCat		LDLDFDFVTKVFWRNFKPMHEVGEVLNLRNRPEDYHRDVEQAAPFSFGLVFGIELSPDT	279
CEL54483.1	320	LDLDFDFVTKVFWRNFKPMHEVGEVLNLRNRPEDYHRDVEQAAPFSFGLVFGIELSPDT	396
EUC65952.1	320	LDLDFDFVTKVFWRNFKPMHEVGEVLNLRNRPEDYHRDVEQAAPFSFGLVFGIELSPDT	396
KDN41214.1	298	LDLDFDFVTKVFWRNFKPMHEVGEVLNLRNRPEDYHRDVEQAAPFSFGLVFGIELSPDT	374
CUA75461.1	292	LDLDFDFVTKVFWRNFKPMHEVGEVLNLRNRPEDYHRDVEQAAPFSFGLVFGIELSPDT	368
ELU37193.1	184	LDLDFDFVTKVFWRNFKPMHEVGEVLNLRNRPEDYHRDVEQAAPFSFGLVFGIELSPDT	261
RsCat		AN IHQIFVNCFFMA RFSH PDNYAGN MRIDGNVASKPTFFPNYHNNKPTTAGAGFLPQAEVFM	344
CEL54483.1	397	AN IHQIFVNCFFMA RFSH PDNYAGN MRIDGNVASKPTFFPNYHNNKPTTAGAGFLPQAEVFM	461
EUC65952.1	397	AN IHQIFVNCFFMA RFSH PDNYAGN MRIDGNVASKPTFFPNYHNNKPTTAGAGFLPQAEVFM	461
KDN41214.1	375	AN IHQIFVNCFFIA [24] RFSH PDNYAGT MRVDGNVASKPTFFPNYHNNKPTTAGAGFLPQAEVFM	463
CUA75461.1	369	AN IHQIFVNCFFMA RFSH PDNYAGT MRVDGNVASKPTFFPNYHNNKPTTAGAGFLPQAEVFM	433
ELU37193.1	262	AN [8] LSTIYLEAIFPT RSL [11] PSSLGN [20] MRIDGNVASKPTFFPNYHNNKPTTAGAGFLPQAEVFM	365
RsCat		QVANSILSRKGYLHEGSPTEYNQVRELYRVLTQPKREELHSNTARLLKHAADIVQKMYLQLYAIIEPGYAKAIYDLE	424
CEL54483.1	462	QVANSILSRKGYLHEGSPTEYNQVRELYRVLTQPKREELHSNTARLLKHAADIVQKMYLQLYAIIEPGYAKAIYDLE	541
EUC65952.1	462	QVANSILSRKGYLHEGSPTEYNQVRELYRVLTQPKREELHSNTARLLKHAADIVQKMYLQLYAIIEPGYAKAIYDLE	541
KDN41214.1	464	QVANSILSRKGYLHEGSPTEYNQVRELYRVLTQPKREELHSNTARLLKHAADIVQKMYLQLYAIIEPGYAKAIYDLE	543
CUA75461.1	434	QVANSILSRKGYLHEGSPTEYNQVRELYRVLTQPKREELHSNTARLLKHAADIVQKMYLQLYAIIEPGYAKAIYDLE	513
ELU37193.1	366	QVANSILSRKGYLHEGSLSEYNQVRELYRVLTQPKREELHSNTARLLKHAADIVQKMYLQLYAIIEPGYAKAIYDLE	445
RsCat		ENHGYTLEDIAEGAKSAHLVGNKPCFFSAGKASPMGMFL	464
CEL54483.1	542	ENHGYTLEDIAEGAKSAHLVGNKPCFFSAGKASPMGMFI	581
EUC65952.1	542	ENHGYTLEDIAEGAKSAHLVGNKPCFFSAGKASPMGMFL	581
KDN41214.1	544	ENHGYTLEDIAEGAKSAHLVGNKPCFFSAGKASPMGMFI	583
CUA75461.1	514	ENHGYTRDDIVEGAKSAHLVGNKPCFFSAGKGTGPMGMFI	553
ELU37193.1	446	ENHGYTLEDIAEGAKSAHLVGNKPCFFSAGKASPMGMFL	485

RsCat 为本研究结果。R. solani AG-1 IB (CEL54483.1); R. solani AG-3 RhsIAP (EUC65952.1); R. solani AG-8WAC10335 (KDN41214.1); R. solani AG-8 WAC10335(CUA75461.1); R. solani AG-1 IA (ELU37193.1); 括号内代码为 NCBI GenBank 注册号。RsCat is the result of this study. R. solani AG-1 IB (CEL54483.1); R. solani AG-3 RhsIAP (EUC65952.1); R. solani AG-8WAC10335 (KDN41214.1); R. solani AG-8 WAC10335(CUA75461.1); R. solani AG-1 IA (ELU37193.1); The numbers in brackets are the NCBI GenBank accession numbers.

图 2 立枯丝核菌不同融合群的 Cat 基因编码的氨基酸序列对比

Fig.2 Comparison of amino acid sequences encoded by Cat gene in different AGs of Rhizoctonia solani

株属于 R. solani AG-1 IA, 系统进化树结果说明其 RsCat 蛋白的氨基酸序列与 R. solani AG-1 IA 其他菌株的同源性最高, 同时与立枯丝核菌(R. solani)其他融合群菌株(R. solani AG-1 IA、R. solani AG-1 IB、R. solani AG-3 RhsIAP 和 R. solani AG-8 WAC10335 和 R. solani)的 RsCat 蛋白独立聚为一支, 表明立枯丝核菌不同融合群的 RsCat 蛋白的氨基酸序列同源性较高, 而与其他真菌 RsCat 蛋白的氨基酸序列同源性较低(图 3)。

2.3 儿茶酚胁迫下 RsCat 基因相对定量表达分析

对水稻纹枯病菌 RsCat 基因在不同质量浓度

儿茶酚胁迫下的转录表达情况进行了 qRT-PCR 分析, 结果表明: 与对照相比, 在儿茶酚胁迫下, RsCat 基因普遍上调表达, 其中在质量浓度 100 μg/mL 下 RsCat 基因相对表达量最高。在 1.25 μg/mL 和 100 μg/mL 质量浓度下, 分别上调 1.75 倍和 1.84 倍, 差异显著; 在 25 μg/mL 和 50 μg/mL 质量浓度下, 分别上调 1.19 和 1.42 倍, 差异不显著(图 4)。前期研究表明儿茶酚是水稻纹枯病菌黑色素形成的前体物质。因此, 在儿茶酚胁迫下, RsCat 基因表达水平受到黑色素形成调控的影响, 随着儿茶酚质量浓度的提高, RsCat 基因表达水平普遍上调, 说明 RsCat 基因的表达与黑色素形成具有密切关系。

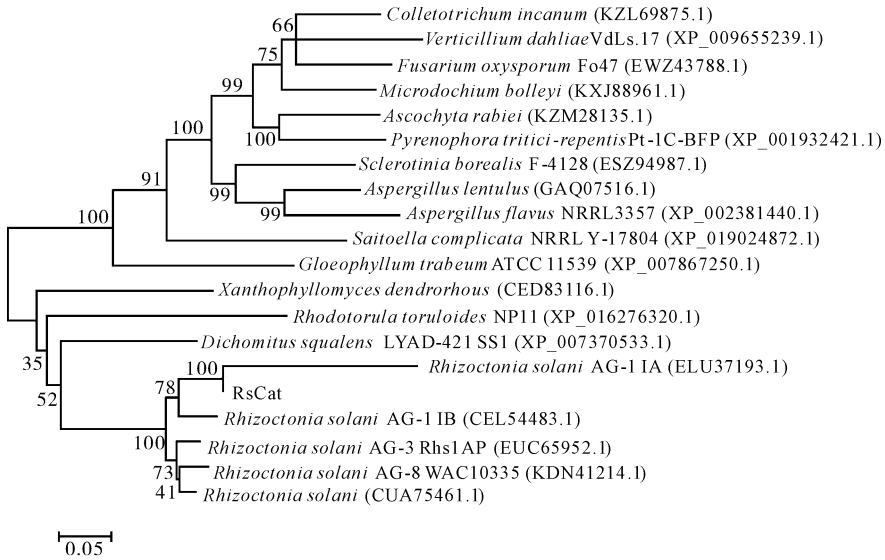
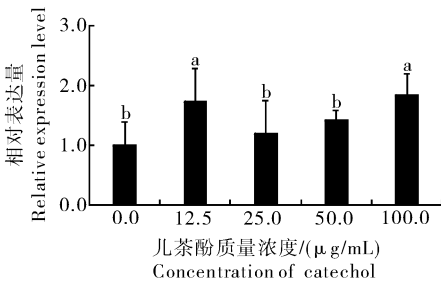


图 3 立枯丝核菌与其他近缘真菌的 *RsCat* 蛋白氨基酸序列的系统进化树

Fig.3 The phylogenetic tree of amino acid sequences of *RsCat* proteins from *Rhizoctonia solani* and other related fungi



以管家基因 *GAPDH* 为内参,用荧光定量 PCR 测定 *Cat* 基因相对表达量,图中数据为 3 次重复的平均值±标准误,采用 Duncan 氏新复极差法 (DMRT) 进行差异显著分析,数据后具有不同字母的表示差异显著 ($P < 0.05$)。下同。The gene expression levels were assessed using qRT-PCR analysis and normalized to the housekeeping gene *GAPDH*. The data are the the mean±SE of three replicates. The data with different letters are significantly different ($P < 0.05$) by using Duncan's multiple range test (DMRT).The same as follows.

图 4 水稻纹枯病菌在不同儿茶酚浓度下 *RsCat* 基因的相对表达量

Fig.4 The expression levels of *RsCat* gene in *Rhizoctonia solani* AG-1 IA at different concentrations of catechol

2.4 儿茶酚胁迫下水稻纹枯病菌 CAT 活性变化

在儿茶酚胁迫下水稻纹枯病菌的 CAT 活性变化如图 5 所示。从图 5 可以看出,在儿茶酚胁迫下水稻纹枯病菌的 CAT 活性总体上都有一定程度的降低,对照组的 CAT 活性最高,为 26.6 U/mg,随着儿茶酚质量浓度的增加,CAT 活性呈降低的趋

势。在 25 μg/mL 和 50 μg/mL 儿茶酚胁迫下, CAT 活性较低,分别为 5.52 和 5.48 U/mg,与对照组相比差异显著,其中在 50 μg/mL 儿茶酚胁迫下, CAT 活性最低,与对照组相比, CAT 活性降低了 79.3%;12.5 和 100 μg/mL 儿茶酚胁迫下 CAT 活性分别为 13.8 和 9.6 U/mg,与对照组相比差异不显著。过氧化氢酶 (CAT) 是一种重要的消除活性氧的抗氧化酶,主要清除体内 H_2O_2 含量,保护或降低机体受活性氧的损伤。当水稻纹枯病菌受到儿茶酚胁迫时,活性氧爆发,组织受到损伤,过氧化氢酶的活性随之降低。

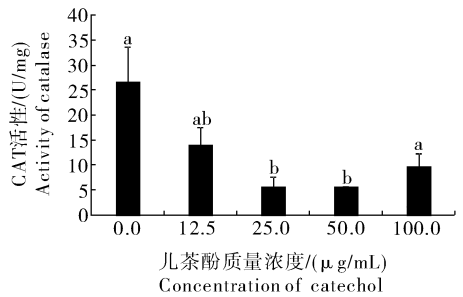


图 5 水稻纹枯病菌在不同质量浓度儿茶酚胁迫下 CAT 活性的变化

Fig.5 The changes of CAT activities in *Rhizoctonia solani* AG-1 IA at different concentrations of catechol

3 讨论

过氧化氢酶 (CAT) 属于抗氧化酶中的一种,而

抗氧化酶对活性氧(ROS)的清除能力不仅取决于基因转录水平的表达量,更取决于抗氧化酶的合成量及翻译后修饰调控。大多数生物的 *Cat* 基因都属于多基因家族,如双孢蘑菇(*Agaricus bisporus*)有 3 个 *Cat* 基因,主要参与黑色素的调控和活性氧的代谢^[16];模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)也有 3 个 *Cat* 基因,包括 *Cat 1*、*Cat 2*、*Cat 3*,*Cat 1* 基因在拟南芥受到各种胁迫压力下起着消除 H_2O_2 的重要作用,而 *Cat 2* 和 *Cat 3* 基因是仅在光暗胁迫下清除 H_2O_2 的重要基因^[17-18]。水稻纹枯病菌的 *RsCat* 基因也属于多基因家族,在基因组中有 2 个 *Cat* 基因。本研究发现,与对照组相比,在培养基中添加外源儿茶酚,*RsCat* 基因表达量提高(图 4),但 CAT 活性降低(图 5),并且 CAT 活性在儿茶酚胁迫下的变化与 *Cat* 基因表达量表达变化规律并不同步(图 4、图 5),原因可能是 CAT 活性和 *Cat* 基因 mRNA 转录表达在不同的儿茶酚胁迫处理下不存在对应性,也就是说 *Cat* 基因 mRNA 表达量高,其 CAT 活性也可能低表达,反之亦然,这与苹果在钙胁迫下的研究结果一致^[19]。同时 Romero-Puertas 等^[20]研究证实,在豌豆叶片中受到镉毒害,*Cat* 基因翻译后 CAT 确实发生了氧化修饰。因此,水稻纹枯病菌在儿茶酚胁迫下,虽然提高了 *RsCat* 基因 mRNA 转录水平的表达量,但是 *RsCat* 基因的表达量变化与 CAT 的活性变化并不存在对应性,这表明水稻纹枯病菌 CAT 的活性不仅取决于 *RsCat* 基因的转录表达,更取决于该基因翻译水平后的修饰调控。

本研究对编码过氧化氢酶的 *RsCat* 基因进行了克隆和生物信息分析,结果表明,*RsCat* 基因的 DNA 和 cDNA 序列全长分别为 1 814 和 1 395 bp,其 ORF 编码 464 个氨基酸。通过多序列比对分析发现不同真菌 *Cat* 蛋白序列具有很高的同源性,真菌 *Cat* 蛋白序列都具有 2 个重要的保守区,这是过氧化氢酶(CAT)的主要功能区^[21]。对水稻纹枯病菌 *Cat* 蛋白保守结构域进行分析,发现该蛋白同样具有 2 个典型的保守结构域,一是 N-末端结构域,在 1~324 位含有 1 个过氧化氢酶超家族结构域(catalase_like superfamily),二是在 366~423 位含有过氧化氢酶相关免疫反应结构域(catalase-related immune-responsive),这 2 个功能域都是真菌 *Cat* 基因的主要功能区。系统进化树结果说明水稻纹枯病菌不同融合群菌株 *RsCat* 基因的同源性较

高,而与其他真菌 *Cat* 基因的同源性较低,这表明水稻纹枯病菌与其他真菌亲缘远近关系和本身的分类学地位与传统形态学分类结果相一致。

过氧化氢酶能催化 H_2O_2 分解为 H_2O 和 O_2 。研究表明毕赤酵母(*Pichia pastoris*)通过氧化还原系统来调节 ROS 代谢,从而消除 ROS 对其自身的毒害作用^[22-23]。而儿茶酚作为水稻纹枯病菌黑色素的前体物质,高浓度儿茶酚对菌丝生长有抑制作用,产生大量 ROS,本研究对水稻纹枯病菌儿茶酚胁迫下 *RsCat* 基因的转录表达量和 CAT 酶活变化进行了分析,可为进一步研究水稻纹枯病菌 *RsCat* 基因调控黑色素形成以及氧化胁迫提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] GHOSH S, KANWAR P, JHA G. Alterations in rice chloroplast integrity, photosynthesis and metabolome associated with pathogenesis of *Rhizoctonia solani* [J]. Scientific reports, 2017, 7: 41610.
- [2] FENG S, SHU C, WANG C, et al. Survival of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, the causal agent of rice sheath blight, under different environmental conditions [J]. Journal of phytopathology, 2017, 165(1): 44-52.
- [3] 朱名海, 贺晓霞, 杨媚, 等. 3 种作物纹枯病菌可溶性蛋白和酯酶同工酶的比较 [J]. 华中农业大学学报, 2016, 35(1): 55-59.
- [4] HANSBERG W, SALAS-LIZANA R, DOMINGUEZ L. Fungal catalases: function, phylogenetic origin and structure [J]. Arch Biochem Biophys, 2012, 525(2): 170-180.
- [5] OKADA H, UEDA M, SUGAYA T, et al. Catalase gene of the yeast *Candida tropicalis* sequence analysis and comparison with peroxisomal and cytosolic catalases from other sources [J]. Eur J Biochem, 2010, 170(1/2): 105-110.
- [6] WALTON P A, PIZZITELLI M. Effects of peroxisomal catalase inhibition on mitochondrial function [J]. Frontiers in physiology, 2012, 3: 1-10.
- [7] ANTELMANN H, HELMANN J D. Thiol-based redox switches and gene regulation [J]. Antioxidredox signal, 2011, 14(6): 1049-1063.
- [8] FRANSEN M, NORDGREN M, WANG B, et al. Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: implications for human disease [J]. Biochimica et biophysica acta (BBA) - molecular basis of disease, 2012, 1822(9): 1363-1373.
- [9] RAY P D, HUANG B W, TSUJI Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling [J]. Cellular signalling, 2012, 24(5): 981-990.
- [10] GOODSELL D S, DUTTA S, ZARDECKI C, et al. The RCSB PDB "Molecule of the Month": inspiring a molecular view of biology [J]. PLoS Biology, 2015, 13(5): e1002140.
- [11] CHEN J, WANG C, SHU C, et al. Isolation and characteriza-

- tion of a melanin from *Rhizoctonia solani*, the causal agent of rice sheath blight[J]. European journal of plant pathology, 2015,142(2):281-290.
- [12] PIATTELLI M, FATTORUSSO E, MAGNO S, et al. *Ustilago* melanin, a naturally occurring catechol melanin [J]. Tetrahedron letters, 1963, 4(15):997-998.
- [13] YANG Y Q, YANG M, LI M H, et al. Cloning and functional analysis of an endo-PG-encoding gene *Rrspg1* of *Rhizoctonia solani*, the causal agent of rice sheath blight[J]. Canadian journal of plant pathology, 2012, 34(3):436-447.
- [14] ZHENG A, LIN R, ZHANG D, et al. The evolution and pathogenic mechanisms of the rice sheath blight pathogen[J]. Nature communications, 2013, 4:1424.
- [15] 丁国云, 王克荣, 周而勋. 粟疫病菌群体的遗传结构[J]. 菌物系统, 1997, 16(4):281-290.
- [16] WEIJN A, BASTIAAN-NET S, WICHERS H J, et al. Melanin biosynthesis pathway in *Agaricus bisporus* mushrooms[J]. Fungal genetics and biology, 2013, 55(6):42-53.
- [17] DU Y Y, WANG P C, CHEN J, et al. Comprehensive functional analysis of the catalase gene family in *Arabidopsis thaliana* [J]. Journal of plant ecology, 2008, 50(10):1318-1326.
- [18] XING Y, JIA W, ZHANG J. AtMEK1 mediates stress-induced gene expression of CAT1 catalase by triggering H₂O₂ production in *Arabidopsis* [J]. Journal of experimental botany, 2007, 58(11):2969-2981.
- [19] 梁国庆, 孙静文, 周卫, 等. 钙对苹果果实超氧化物歧化酶、过氧化氢酶活性及其基因表达的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2011, 17(2):438-444.
- [20] ROMERO-PUERTAS M C, PALMA J M, GÓMEZ M, et al. Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants[J]. Plant cell & environment, 2002, 25(5):677-686.
- [21] MARCHLERBAUER A, BO Y, HAN L, et al. CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures[J]. Nucleic acids research, 2017, 45(D1):D200.
- [22] YANO T, TAKIGAMI E, YURIMOTO H, et al. *Yap1*-regulated glutathione redox system curtails accumulation of formaldehyde and reactive oxygen species in methanol metabolism of *Pichia pastoris* [J]. Eukaryotic cell, 2009, 8(4):540-549.
- [23] YANO T, YURIMOTO H, SAKAI Y. Activation of the oxidative stress regulator *PpYap1* through conserved cysteine residues during methanol metabolism in the yeast [J]. Bioscience biotechnology & biochemistry, 2009, 73(6):1404-1411.

Cloning and expression analyses of *RsCat* in *Rhizoctonia solani* AG-1 IA

JIANG Shaofeng WANG Chenjiaozi SHU Canwei ZHOU Erxun

Guangdong Province Key Laboratory of Microbial Signals and Disease Control, College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

Abstract In order to elucidate the function of the catalase (CAT) gene (*RsCat*) in *Rhizoctonia solani* Kühn AG-1 IA, the causal agent of rice sheath blight, the gene was cloned with PCR and RT-PCR. Result of bioinformatics analysis showed that the full-length DNA and cDNA sequences of *RsCat* gene were 1 814 bp and 1 395 bp, with an open reading frame (ORF) encoding 464 amino acids. Result of conserved domain analysis showed that the *RsCat* protein has the domains of catalase-like super family with catalase-related immune-response. Result of phylogenetic tree analysis showed that the *RsCat* gene in different anastomosis groups (AGs) of *R. solani* has a high sequence homology. Result of quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis showed that *RsCat* gene expression was induced by catechol. The expression levels of *RsCat* gene were up-regulated with the increase of catechol concentrations, whereas the activity of catalase (CAT) decreased with the increase of catechol concentrations, indicating that there is no corresponding between the transcriptional expression of *RsCat* gene and CAT activity. The *RsCat* gene may produce post transcriptional or post translational modifications. It will provide a foundation for further studying the regulatory mechanisms of melanin formation and ROS metabolism with *RsCat* of *R. solani* AG-1 IA.

Keywords *Rhizoctonia solani* Kühn AG-1 IA; catalase (CAT); catechol; RT-PCR