

水稻纹枯病菌 *RsPhm* 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; *通讯联系人, E-mail: exzhou@scau.edu.cn)

Cloning and Expression Analysis of *RsPhm* Gene in *Rhizoctonia solani* AG-1 I A of Rice Sheath Blight Pathogen

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; *Corresponding author, E-mail: exzhou@scau.edu.cn)

Abstract: 【Objective】 In order to elucidate the functions of phenol 2-monooxygenase (*RsPhm*) gene in melanization of *Rhizoctonia solani* Kühn AG-1 I A, the causal agent of rice sheath blight, **【Method】** the gene was cloned by routine PCR and RT-PCR techniques, and the bioinformatics analysis of this gene was conducted; furthermore, the relative expression level under catechol stress was determined by using fluorescence quantitative real-time PCR (qRT-PCR) technique.

【Result】 Bioinformatics analysis showed that the full-length DNA and cDNA sequences of *RsPhm* gene were 2 628 bp and 1 983 bp, respectively, which encode 660 amino acids. The phylogenetic tree analysis showed that *RsPhm* gene had a close relationship in different anastomosis groups (AGs) of *R. solani*, and a certain evolutionary conservation among different fungal species. Results of qRT-PCR indicated that the exposure to exogenous catechol could improve the expression level of *RsPhm* gene, and which peaked at 12.5 µg/mL of catechol, with a significant increase of 35.7 times, 19.1 times and 28.4 times up-regulated at 25 µg/mL and 50 g/mL, respectively, but only 2.1 times up-regulated at 100 g/mL. **【Conclusion】** The full-length sequence of *RsPhm* gene was obtained, its basic biological information was understood, and its expression pattern under catechol stress was clarified. These findings will lay a basis for the scientific and systematic elucidation of regulatory mechanism of melanin formation by *RsPhm* gene of *R. solani* AG-1 I A.

Key words: *Rhizoctonia solani* Kühn AG-1 I A; *RsPhm* gene; gene clone; expression analysis

摘 要: 【目的】为了阐明苯酚 2-单加氧酶基因(*RsPhm*)在水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani* AG-1 I A)黑化中的功能, **【方法】**采用常规 PCR 和 RT-PCR 技术对该基因进行克隆和生物信息学分析, 通过荧光定量 PCR(qRT-PCR)技术检测在儿茶酚胁迫下该基因的相对表达量。 **【结果】**生物信息学分析结果表明, *RsPhm* 基因的 DNA 和 cDNA 全长序列分别为 2 628 bp 和 1 983 bp, 编码 660 个氨基酸。系统进化树分析显示, *RsPhm* 基因在立枯丝核菌(*R. solani*)不同融合群中具有较近的亲缘关系, 在不同真菌之间在进化上具有一定保守性。通过 qRT-PCR 技术分析了在不同浓度儿茶酚胁迫下水稻纹枯病菌 *RsPhm* 基因的转录表达情况。外源儿茶酚能提高 *RsPhm* 基因的表达量, 在 12.5 µg/mL 浓度下表达量最高, 极显著上调 35.7 倍, 在 25 µg/mL 和 50 µg/mL 浓度下表达量分别上调 19.1 倍和 28.4 倍, 但在 100 µg/mL 浓度下表达量仅上调 2.1 倍。 **【结论】**获得了 *RsPhm* 基因全长序列, 了解了其基本生物学信息, 明确了其在儿茶酚胁迫下的表达模式。研究结果为科学、系统地阐明水稻纹枯病菌 *RsPhm* 基因调控黑色素形成机制奠定了理论基础。

关键词: 水稻纹枯病菌; 苯酚 2-单加氧酶基因; 基因克隆; 表达分析

中图分类号: Q785; S435.111.4⁺2

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2018)02-0111-08

由立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani* Kühn) AG-1 I A 融合亚群引起的水稻纹枯病是世界范围内分布最为广泛的水稻三大真菌病害之一。立枯丝核菌(*R.*

solani)是一种经济上非常重要的土传性病原真菌, 其分布范围广泛, 寄主类型多种多样, 除为害水稻外, 还可为害马铃薯、玉米、小麦、大豆和甘蓝等

收稿日期: 2017-08-10; 修改稿收到日期: 2017-08-25。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31271994, 31470247)。

260 多种植物^[1-4]。

加氧酶指能催化氧分子加入到有机物质中的酶,是芳香化合物降解过程中的重要酶类,它广泛存在于各种生命活动的新陈代谢过程中。加氧酶按照催化氧原子的个数可以划分为两类:将两个氧原子都催化反应进入底物的双加氧酶和只催化一个氧原子进入底物的单加氧酶^[5]。苯酚 2-单加氧酶(phenol 2-monooxygenase, Phm)是一种单加氧的氧化还原酶,能催化苯酚、NADPH 和 H^+ 在有氧条件生产儿茶酚、NADP⁺ 和水^[6]。微生物对芳香族化合物的降解可以分为苯环的激活以及对被激活苯环的开环两个过程,加氧酶参与芳香族化合物、多环芳烃、农药等多个种类的污染物(如六六六、甲苯、二甲苯、萘和蒽等)的降解代谢途径^[6-8]。苯酚 2-单加氧酶是苯酚降解中的关键芳环加氧酶。首先,通过苯酚羟基化作用下生成儿茶酚;然后儿茶酚在 $C_{12}O$ 和 $C_{23}O$ 作用下分别通过邻位开环和间位开环形式被进一步降解^[9]。

黑色素是植物病原真菌的主要毒力因子和抗逆因子。许多植物病原真菌的菌丝、分生孢子和菌核都能产生黑色素,从而以多种方式增强真菌的毒力和抗逆性^[10-11]。大多数致病真菌可通过内源性前体物质代谢合成黑色素,但新生隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)需要添加外源性左旋多巴(L-DOPA)才能形成黑色素^[12]。儿茶酚是合成黑色素的前体物质,已经在玉蜀黍黑粉菌(*Ustilago maydis*)的厚垣孢子内发现^[13]。本实验室在前期研究中发现培养基中添加儿茶酚有利于促进水稻纹枯病菌黑色素的生物合成和积累,从而加快细胞壁的黑化和增厚^[14]。目前,尚未见到关于水稻纹枯病菌苯酚 2-单加氧酶(*RsPhm*)基因的研究报道。本研究通过对 *RsPhm* 基因的克隆及其在儿茶酚诱导下的表达分析,为深入研究 *RsPhm* 基因调控水稻纹枯病菌黑色素形成机制奠定理论基础。

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* AG-1 I A) GD-118 菌株是本实验室分离和保存的强致病力菌株^[15]。

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar, PDA): 马铃薯 200.0 g, 葡萄糖 20.0 g, 琼脂粉 18.0 g, 双蒸水 1 000.0 mL。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。

LBA 固体培养基(luria-bertani agar, LBA): 胰蛋白胨 10.0 g, 酵母提取物 5.0 g, NaCl 10.0 g, 调 pH 至 7.4, 琼脂粉 15.0 g, 双蒸水 1 000.0 mL。LBB 液体培养基(luria-bertani broth, LBB): 胰蛋白胨 10.0 g, 酵母提取物 5.0 g, NaCl 10.0 g, 调 pH 值至 7.4, 双蒸水 1 000.0 mL。

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、RT-PCR 试剂盒、普通 *Taq* 酶和高保真 *Taq* 酶均购自北京全式金生物技术有限公司。儿茶酚、氨苄青霉素钠、IPTG 和 X-Gal 购自 Sigma 公司。引物(表 1)合成和测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.3 菌丝体培养与收集

水稻纹枯病菌 GD-118 菌株在 PDA 平板上培养 2 d 后,用内径 5.0 mm 的打孔器在菌落边沿打取菌丝块,在每个装有 150 mL PDB 培养液(分别含 0, 12.5, 25, 50, 100 μ g/mL 儿茶酚)的三角瓶中接入 10 块菌丝块,28℃ 恒温下摇床振荡培养 3 d 后,用无菌滤纸过滤收集菌丝体,无菌水将菌丝体洗涤 2~3 次,菌丝体用多层灭菌滤纸吸干表面水分后,放入 -20℃ 冰箱中保存备用。

1.4 DNA 和 RNA 的提取

水稻纹枯病菌 GD-118 DNA 和 RNA 的提取按照真菌 DNA 提取试剂盒和 RNA 提取试剂盒的说明书进行。在采用琼脂糖凝胶电泳检测其完整性、紫外分光光度测定其纯度和含量,提纯后的 DNA 和 RNA 样品分别保存于 -20℃ 冰箱和 -80℃ 超低温冰箱中,备用。

1.5 *RsPhm* 基因 DNA 和 cDNA 克隆

根据水稻纹枯病菌基因组和转录组数据库^[16],用 Vector NTI 软件设计一对水稻纹枯病菌 *RsPhm* 基因特异性引物,引物序列为 DF01905 和 DR01905(表 1)。以总 RNA 为模板,利用 RT-PCR

表 1 本研究使用的引物序列

Table 1. Sequences of oligonucleotide primers used in this study.

引物 Primer	序列 Sequence(5'-3')
DF01905	ATGCCCGCTGTTGAATCTAA
DR01905	TCACGCGGAAGCCATAAACC
F01905	CCTGATATCCGAAACCGTACC
R01905	TCATCTTGCTCCTGTCCATTC
GAPDHF	TACTCCGCAATGCTATCG
GAPDHR	TACTCGGTCCCAGTGGT

试剂盒进行 RT-PCR 扩增得到 cDNA。以基因组 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,扩增体系如下:PCR 混合液 25 μ L, 10 μ mol/L DF01905 和 DR01905 引物各 1 μ L, 模板 1 μ L, 普通 *Taq* 酶或高保真 *Taq* 酶 1 μ L, 再加双蒸水 22 μ L。PCR 程序如下:94 $^{\circ}$ C 下预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 下变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 下退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 下延伸 3 min, 35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 下延伸 10 min。PCR 产物保存于 4 $^{\circ}$ C 冰箱。PCR 产物经回收、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,筛选阳性克隆。取 5 μ L PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳,加入 1 μ L 6 \times 上样缓冲液,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留存。阳性克隆的测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。测序结果利用 Conting Express 软件进行拼接,并利用 NCBI 在线工具对水稻纹枯病菌 *RsPhm* 基因进行序列基本结构和特征分析。

1.6 *RsPhm* 基因生物信息学分析

通过在线程序和软件对水稻纹枯病菌 *RsPhm* 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,预测和分析参数有 *RsPhm* 蛋白质理化性质、信号肽、跨膜结构、二级结构、三维结构和系统进化树分析,具体分析软件如下:

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)蛋白质二级结构预测

<http://imtech.res.in/raghava/apssp/>;

5)蛋白质三维结构的预测

<https://swissmodel.expasy.org/interactive>;

6)系统进化树分析

采用 MEGA 4 对水稻纹枯病菌 *RsPhm* 蛋白质与其他真菌 *RsPhm* 蛋白质的进化关系进行分析。

1.7 *RsPhm* 基因定量表达分析

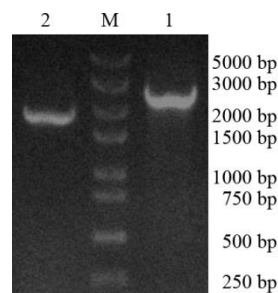
以水稻纹枯病菌甘油醛 3-磷酸(*GAPDH*)基因作为内参基因,检测水稻纹枯病菌在不同浓度儿茶酚处理下 *RsPhm* 基因在转录水平上的相对表达量。RNA 样品用 DNase I 进行预处理后,用反转录试剂盒合成单链 cDNA 作为模板。基于已克隆的水稻纹

枯病菌 *RsPhm* 基因的 cDNA 序列,设计的一对引物为 F01905 和 R01905;以 *GAPDH* 基因为内参,引物为 *GAPDH* 和 *GAPDHR*(表 1)。qRT-PCR 体系如下:SYBR Green PCR Master Mix 为 10 μ L、10 μ mol/L F01905 和 R01905 引物各 1 μ L、不同样本的 cDNA (稀释 5 倍)为 2.0 μ L,再加双蒸水 6 μ L,包括不加 cDNA 模板为阴性对照。在 Bio-Rad CFX 仪器上进行实时定量(qRT)PCR,反应程序如下:预变性 95 $^{\circ}$ C 2 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s; 60 $^{\circ}$ 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 *RsPhm* 基因。数据收集和分析采用 Bio-Rad CFX Manager Software 2.0 进行分析,每个样品 3 次重复。

2 结果与分析

2.1 *RsPhm* 基因核苷酸和氨基酸序列分析

将 PCR 产物纯化回收、连接转化、测序,对测序结果进行拼接并去掉载体序列,得到 DNA 和 cDNA 全长序列分别为 2 628 bp 和 1 983 bp,与琼脂糖凝胶电泳结果一致(图 1)。用 DNASTar 软件分析筛选获得的 *RsPhm* 基因 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列,以 ATG 为起始密码子, TAA 为终止密码子,共编码 660 个氨基酸(图 2)。经生物信息学分析, *RsPhm* 基因编码蛋白质分子式为 $C_{3226}H_{5056}N_{908}O_{970}S_{23}$; 相对分子质量为 72 818.51 ku,理论等电点为 5.94,含碱性氨基酸 74 个,酸性氨基酸 83 个,疏水性氨基酸 230 个,极性氨基酸 149 个,属于酸性亲水性蛋白。*RsPhm* 蛋白不含信号肽,预测其为非分泌蛋白。*RsPhm* 蛋白存在 5 个跨膜螺旋结构域,由 3 个内到外和 2 个外到内的双向跨膜



M—250 bp DNA 标记; 1—以 DNA 为模板的 *RsPhm* 基因 PCR 产物; 2—以 cDNA 为模板的 *RsPhm* 基因 PCR 产物。

M, 250 bp DNA marker; 1, The PCR product of *RsPhm* using DNA as template; 2, The PCR product of *RsPhm* using cDNA as template.

图 1 水稻纹枯病菌 *RsPhm* 基因的 PCR 产物

Fig. 1. PCR products of *RsPhm* gene in *Rhizoctonia solani*.

RsPhm	1	MPAVESKVDVLIIGAGPAGLMCAHGLAKAGVNVRIIDKRPSKVAAGQADGIQPTIEVLQ	SYGLADRLLEKGNQMH	76
ELU44059.1	1	MPAVESKVDVLIIGAGPAGLMCAHGLAKAGVNVRIIDKRPSKVAAGQADGIQPTIEVLQ [36]	SYGLADRLLEKGNQMH	112
CEL56393.1	1	MPAVESKVDVLIIGAGPAGLMCAHGLAKAGVNVRIIDKRPSKVAAGQADGIQPTIEVLQ	SYGLADRLLEKGNQMH	76
CUA74266.1	1	MPAVESKVDVLIIGAGPAGLMCAHGLAKAGVNVRIIDKRPSKVAAGQADGIQPTIEVLQ	SYGLAERLLEKGNQMH	76
EUC54794.1	1	MPAIESKVDVLIIGAGPAGLMCAHGLAKAGVNVRIIDKRPSKVAAGQADGIQPTIEVLQ	SYGLAERLLEKGNQMH	76
CCO31161.1	1	MPAVESKVDVLIIGAGPAGLMCAHGLAKAGVNVRIIDKRPSKVAAGQADGIQPTIEVLQ	SYGLADRLLEKGNQMH	76
KEP48781.1	1	MPAIESKVDVLIIGAGPAGLMCAHGLAKAGVNVRIIDKRPSKVAAGQADGIQPTIEVLQ	SYGLAERLLEKGNQMH	76
RsPhm	77	MAAFYNFAPDGGSGIQRSDRLPDVTAFTARFFFEVTLHQGAIEINIFRDAMRALGKPTAPNGACPREFEKRSNDANDQFFWFF		156
ELU44059.1	113	MAAFYNFAPDGGSGIQRSDRLPDVTAFTARFFFEVTLHQGAIEINIFRDAMRALGKPTAPNGACPREFEKRSNDANDQFFWFF		192
CEL56393.1	77	MAAFYNFAPDGGSGIQRSDRLPDVTAFTARFFFEVTLHQGAIEINIFRDAMRALGKPTAPNGACPREFEKRSNDANDQFFWFF		156
CUA74266.1	77	MAAFYNFAPDGGSGIQRSDRLPDVTAFTARFFFEVTLHQGAIEINIFRDAMRALGKPTAPNGACPREFEKRSNDANDQFFWFF		156
EUC54794.1	77	MAAFYNFAPDGGSGIQRSDRLPDVTAFTARFFFEVTLHQGAIEINIFRDAMRALGKPTAPNGACPREFEKRSNDANDQFFWFF		156
CCO31161.1	77	MAAFYNFAPDGGSGIQRSDRLPDVTAFTARFFFEVTLHQGAIEINIFRDAMRALGKPTAPNGACPREFEKRSNDANDQFFWFF		156
KEP48781.1	77	MAAFYNFAPDGGSGIQRSDRLPDVTAFTARFFFEVTLHQGAIEINIFRDAMRALGKPTAPNGACPREFEKRSNDANDQFFWFF		156
RsPhm	157	RSIEVEQPVVPTSISLSTDAEELASRDSYFVTVHLKLLSEAEQRLSRFVAGAPPNSNEAAADGNSNVQIEEEREIEIVRAK		236
ELU44059.1	193	RSIEVEQPVVPTSISLSTDAEELASRDSYFVTVHLKLLSEAEQRLSRFVAGAPPNSNEAAADGNSNVQIEEEREIEIVRAK		272
CEL56393.1	157	RSIEVEQPVVPTSISLSTDAEELASRDSYFVTVHLKLLSEAEQRLSRFVAGAPPNSNEAAADGNSNVQIEEEREIEIVRAK		236
CUA74266.1	157	RSIEVEQPVVPTSISLSTDAEELASRDSYFVTVHLKLLSEAEQRLSRFVAGAPPNSNEAAADGNSNVQIEEEREIEIVRAK		236
EUC54794.1	157	RSIEVEQPVVPTSISLSTDAEELASRDSYFVTVHLKLLSEAEQRLSRFVAGAPPNSNEAAADGNSNVQIEEEREIEIVRAK		236
CCO31161.1	157	RSIEVEQPVVPTSISLSTDAEELASRDSYFVTVHLKLLSEAEQRLSRFVAGAPPNSNEAAADGNSNVQIEEEREIEIVRAK		236
KEP48781.1	157	RSIEVEQPVVPTSISLSTDAEELASRDSYFVTVHLKLLSEAEQRLSRFVAGAPPNSNEAAADGNSNVQIEEEREIEIVRAK		236
RsPhm	237	YVVGCDGAHSWTRAQMGWMEGEHTDYVWGVDVTDIPDTPFDIRNRTAIHSDNGSCMIVPREGDLVRLVYQLAEIELGGT		316
ELU44059.1	273	YVVGCDGAHSWTRAQMGWMEGEHTDYVWGVDVTDIPDTPFDIRNRTAIHSDNGSCMIVPREGDLVRLVYQLAEIELGGT		352
CEL56393.1	237	YVVGCDGAHSWTRAQMGWMEGEHTDYVWGVDVTDIPDTPFDIRNRTAIHSDNGSCMIVPREGDLVRLVYQLAEIELGGT		316
CUA74266.1	237	YVVGCDGAHSWTRAQMGWMEGEHTDYVWGVDVTDIPDTPFDIRNRTAIHSDNGSCMIVPREGDLVRLVYQLAEIELGGT		316
EUC54794.1	237	YVVGCDGAHSWTRAQMGWMEGEHTDYVWGVDVTDIPDTPFDIRNRTAIHSDNGSCMIVPREGDLVRLVYQLAEIELGGT		316
CCO31161.1	237	YVVGCDGAHSWTRAQMGWMEGEHTDYVWGVDVTDIPDTPFDIRNRTAIHSDNGSCMIVPREGDLVRLVYQLAEIELGGT		316
KEP48781.1	237	YVVGCDGAHSWTRAQMGWMEGEHTDYVWGVDVTDIPDTPFDIRNRTAIHSDNGSCMIVPREGDLVRLVYQLAEIELGGT		316
RsPhm	317	GRMDRSGMTPEKIMDVAKRSFQFFRLEFPKALDWWTIYIIGQRVASNFSAQERVFIAGDACHTHSPKAGQGMNASMNDTH		396
ELU44059.1	353	GRMDRSGMTPEKIMDVAKRSFQFFRLEFPKALDWWTIYIIGQRVASNFSAQERVFIAGDACHTHSPKAGQGMNASMNDTH		429
CEL56393.1	317	GRMDRSGMTPEKIMDVAKRSFQFFRLEFPKALDWWTIYIIGQRVASNFSAQERVFIAGDACHTHSPKAGQGMNASMNDTH		396
CUA74266.1	317	GRMDRSGMTPEKIMDVAKRSFQFFRLEFPKALDWWTIYIIGQRVASNFSAQERVFIAGDACHTHSPKAGQGMNASMNDTH		396
EUC54794.1	317	GRMDRSGMTPEKIMDVAKRSFQFFRLEFPKALDWWTIYIIGQRVASNFSAQERVFIAGDACHTHSPKAGQGMNASMNDTH		396
CCO31161.1	317	GRMDRSGMTPEKIMDVAKRSFQFFRLEFPKALDWWTIYIIGQRVASNFSAQERVFIAGDACHTHSPKAGQGMNASMNDTH		396
KEP48781.1	317	GRMDRSGMTPEKIMDVAKRSFQFFRLEFPKALDWWTIYIIGQRVASNFSAQERVFIAGDACHTHSPKAGQGMNASMNDTH		396
RsPhm	397	NLIWKLTVLRGWASPDLLKTYELERRKYAQDLIEFDRKFSALFSGKAQSAANMDGVSHQQFVSVFOTFGGFTSGIGIHY		476
ELU44059.1	430	NLIWKLTVLRGWASPDLLKTYELERRKYAQDLIEFDRKFSALFSGKAQSAANMDGVSHQQFVSVFOTFGGFTSGIGIHY		509
CEL56393.1	397	NLIWKLTVLRGWASPDLLKTYELERRKYAQDLIEFDRKFSALFSGKAQSAANMDGVSHQQFVSVFOTFGGFTSGIGIHY		476
CUA74266.1	397	NLIWKLTVLRGWASPDLLKTYELERRKYAQDLIEFDRKFSALFSGKAQSAANMDGVSHQQFVSVFOTFGGFTSGIGIHY		476
EUC54794.1	397	NLIWKLTVLRGWASPDLLKTYELERRKYAQDLIEFDRKFSALFSGKAQSAANMDGVSHQQFVSVFOTFGGFTSGIGIHY		476
CCO31161.1	397	NLIWKLTVLRGWASPDLLKTYELERRKYAQDLIEFDRKFSALFSGKAQSAANMDGVSHQQFVSVFOTFGGFTSGIGIHY		476
KEP48781.1	397	NLIWKLTVLRGWASPDLLKTYELERRKYAQDLIEFDRKFSALFSGKAQSAANMDGVSHQQFVSVFOTFGGFTSGIGIHY		476
RsPhm	477	APSAIVETRHQSLASKLIIGQRLIPQTIIRTADARPFIEQDLIPSDIRYKLVIFAGNTKDVTKQARVQQFADELKPERF		556
ELU44059.1	510	APSAIVETRHQSLASKLIIGQRLIPQTIIRTADARPFIEQDLIPSDIRYKLVIFAGNTKDVTKQARVQQFADELKPERF		589
CEL56393.1	477	APSAIVETRHQSLASKLIIGQRLIPQTIIRTADARPFIEQDLIPSDIRYKLVIFAGNTKDVTKQARVQQFADELKPERF		556
CUA74266.1	477	APSAIVETRHQSLASKLIIGQRLIPQTIIRTADARPFIEQDLIPSDIRYKLVIFAGNTKDVTKQARVQQFADELKPERF		556
EUC54794.1	477	APSAIVETRHQSLASKLIIGQRLIPQTIIRTADARPFIEQDLIPSDIRYKLVIFAGNTKDVTKQARVQQFADELKPERF		556
CCO31161.1	477	APSAIVETRHQSLASKLIIGQRLIPQTIIRTADARPFIEQDLIPSDIRYKLVIFAGNTKDVTKQARVQQFADELKPERF		556
KEP48781.1	477	APSAIVETRHQSLASKLIIGQRLIPQTIIRTADARPFIEQDLIPSDIRYKLVIFAGNTKDVTKQARVQQFADELKPERF		556
RsPhm	557	YKXYTPAGAAVDTVFEILVSSMTKTTGDYTDIPPTLRTHWSKVFMDDEAVQSRLLGGGLYETYGIGPEGCVAVVRPDGY		636
ELU44059.1	590	YKXYTPAGAAVDTVFEILVSSMTKTTGDYTDIPPTLRTHWSKVFMDDEAVQSRLLGGGLYETYGIGPEGCVAVVRPDGY		669
CEL56393.1	557	YKXYTPAGAAVDTVFEILVSSMTKTTGDYTDIPPTLRTHWSKVFMDDEAVQSRLLGGGLYETYGIGPEGCVAVVRPDGY		636
CUA74266.1	557	YKXYTPAGAAVDTVFEILVSSMTKTTGDYTDIPPTLRTHWSKVFMDDEAVQSRLLGGGLYETYGIGPEGCVAVVRPDGY		636
EUC54794.1	557	YKXYTPAGAAVDTVFEILVSSMTKTTGDYTDIPPTLRTHWSKVFMDDEAVQSRLLGGGLYETYGIGPEGCVAVVRPDGY		636
CCO31161.1	557	YKXYTPAGAAVDTVFEILVSSMTKTTGDYTDIPPTLRTHWSKVFMDDEAVQSRLLGGGLYETYGIGPEGCVAVVRPDGY		636
KEP48781.1	557	YKXYTPAGAAVDTVFEILVSSMTKTTGDYTDIPPTLRTHWSKVFMDDEAVQSRLLGGGLYETYGIGPEGCVAVVRPDGY		636
RsPhm	637	IGNVFLDGVDELDSWFGGFMASA	660	
ELU44059.1	670	IGNVFLDGVDELDSWFGGFMASA	693	
CEL56393.1	637	IGNVFLDGVDELDSWFGGFMASA	660	
CUA74266.1	637	IGTIVFLEGVDELDSWFGGFMASA	658	
EUC54794.1	637	IGTIVFLEGVDELDSWFGGFMASA	660	
CCO31161.1	637	IGNVFLDGVDELDSWFGGFMASA	660	
KEP48781.1	637	IGTIVFLEGVDELDSWFGGFMASA	660	

RsPhm 为本研究结果, *R. solani* AG-1 I A、*R. solani* AG-1 I B、*R. solani* AG 22IIIB、*R. solani* AG-3、*R. solani* AG-1 I B 和 *R. solani* 123E 的 NCBI GenBank 注册号分别为 ELU44059.1、CEL56393.1、CUA74266.1、EUC54794.1、CCO31161.1 和 KEP48781.1。

RsPhm is the result of this study, the NCBI GenBank accession numbers of *R. solani* AG-1 I A, *R. solani* AG-1 I B, *R. solani* AG 22IIIB, *R. solani* AG-3, *R. solani* AG-1 I B and *R. solani* 123E are ELU44059.1, CEL56393.1, CUA74266.1, EUC54794.1, CCO31161.1 and KEP48781.1, respectively.

图2 立枯丝核菌不同融合群 RsPhm 蛋白氨基酸序列的比较

Fig. 2. Comparison of amino acid sequences of RsPhm proteins in different anastomosis groups of *Rhizoctonia solani*.

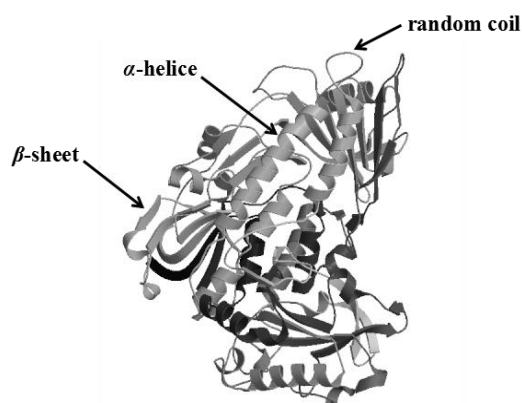
图3 水稻纹枯病菌 *RsPhm* 蛋白三维结构预测

Fig. 3. Three-dimensional structure prediction of *RsPhm* protein in *Rhizoctonia solani* AG-1 IA.

区域组成, 属于跨膜蛋白。利用 SWISS-MODEL 网站对 *RsPhm* 基因编码的蛋白质进行三维结构预测, 发现 *RsPhm* 蛋白的三维结构主要由 α -螺旋、 β -折叠和不规则卷曲组成, 并呈较均匀分布(图 3)。

2.2 *RsPhm* 蛋白氨基酸序列系统进化树分析

通过 NCBI 网站分析工具, 对立枯丝核菌与其他近缘真菌之间的 *RsPhm* 蛋白氨基酸序列同源性进行比较。结果显示, 本研究的水稻纹枯病菌(*R. solani* AG-1 I A)与立枯丝核菌(*R. solani*)其他融合群或亚群的氨基酸同源性最高, 均达到 91% 以上; 其中与同一融合亚群(*R. solani* AG-1 I A, ELU44059.1)另一个菌株的同源性达 94%, 与其他菌株或融合群的(123E、AG-1 I B、AG22IIIB 和 AG-3)的同源性分别为 93%、93%、91%和 91%。而与离心射脉革菌(*Phlebia centrifuga*)、多叶奇果菌(*Grifola frondosa*)、白腐菌(*Trametes pubescens*)、白环菇(*Leucoagaricus* sp. SymC. cos)、真姬菇

(*Hypsizygus marmoreus*)的氨基酸同源性分别为 54%~59%、57%、55%, 56%和 54%, 同源性较低。

为比较立枯丝核菌 *RsPhm* 蛋白氨基酸序列与其他近缘真菌 *RsPhm* 蛋白氨基酸序列的亲缘关系, 本研究从 GeneBank 中查询得到立枯丝核菌不同融合群菌株与离心射脉革菌、多叶奇果菌、白腐菌、白环菇和真姬菇的 *RsPhm* 蛋白氨基酸序列, 与本研究克隆出来的 *RsPhm* 蛋白氨基酸序列进行比对, 随后利用 MEGA 4 软件 N-J 法构建系统进化树, Bootstrap 自举值取 1 000 次, 显示不同种属真菌的进化及亲缘关系(图 4)。系统进化树分析结果表明本研究克隆的 *RsPhm* 蛋白氨基酸序列和水稻纹枯病菌 AG-1 I A 其他菌株 *RsPhm* 蛋白氨基酸的序列同源性最高, 同属担子菌门(Basidiomycota), 同时立枯丝核菌不同的融合群菌株独立进化为一支, 表现出的亲缘关系较其他真菌门的真菌更近, 而与亲缘关系较远的其他真菌同源性则较低, 与分类学地位及传统形态学分类结果一致, 因而推测不同真菌种类的 *RsPhm* 基因在进化上具有一定的保守性。

2.2 儿茶酚诱导下 *RsPhm* 基因相对定量表达分析

对水稻纹枯病菌 *RsPhm* 基因在不同浓度儿茶酚诱导下的转录表达情况进行了 qRT-PCR 分析, 结果表明, 在 12.5~100 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内的儿茶酚普遍能诱导 *RsPhm* 基因上调表达。与对照相比, 在 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 儿茶酚诱导下表达量相对最高, 极显著上调 35.7 倍; 在 25 $\mu\text{g/mL}$ 和 50 $\mu\text{g/mL}$ 儿茶酚处理下上调表达量分别为 19.1 倍和 28.4 倍; 但在 100 $\mu\text{g/mL}$ 儿茶酚处理下上调表达量仅 2.1 倍。究其原因, 可能是高浓度儿茶酚抑制水稻纹枯病菌生长, 进而负调控 *RsPhm* 基因的表达(图 5)。儿茶酚是水稻纹枯病菌黑色素形成的前体合成物质, 推测

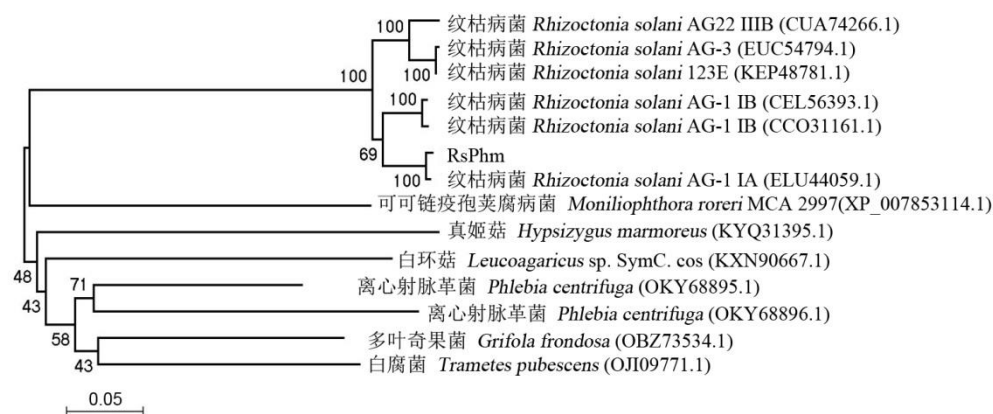
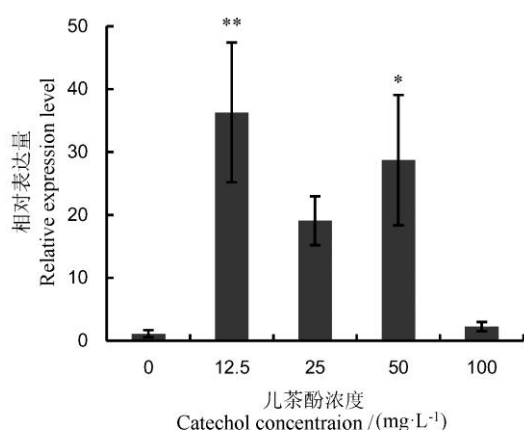
图4 立枯丝核菌与其他近缘真菌的 *RsPhm* 蛋白氨基酸序列的系统进化树

Fig. 4. Phylogenetic tree of amino acid sequences of *RsPhm* proteins from *Rhizoctonia solani* and other related fungi.



表中数据为 3 次重复的平均值±标准误。*和**分别表示相对于对照在 5%和 1%上差异显著。

Values are Mean±SE of three replicates. * and **, Significantly different at 5% or 1% levels compared to the control, respectively.

图 5 不同儿茶酚浓度处理下水稻纹枯病菌 *RsPhm* 基因的相对表达量

Fig. 5. Expression level of *RsPhm* gene in *Rhizoctonia solani* AG-1 IA at different concentrations of catechol.

RsPhm 基因表达水平与黑色素形成关系密切。

3 讨论

大多数的微生物都具有多个单加氧酶和双加氧酶。苯酚 2-单加氧酶属于加氧酶家族,它是电子传递链上最关键的蛋白,通常含有黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)和铁硫簇[2Fe-2S],通过辅基负责将电子从 NAD(P)H 传递给羟化酶的双铁中心。本研究中 *RsPhm* 蛋白具有 FAD 结构域,跟其他立枯丝核菌的二级结构大致相同(图 2)。在己烷、乙醚和抗坏血酸的存在下,能提高嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*) KB2 菌株的苯酚 2-单加氧酶的酶活^[17]。嗜酸硫化芽孢杆菌(*Bacillus acidophilus*)可以将苯酚羟化成低毒的中间物质,因此在降解污染物苯酚中发挥着重要的作用^[18]。恶臭假单胞菌菌株 DLL-E4(*Pseudomonas putida* DLL-E4)的偏三苯酚 1, 2-双加氧酶基因(*pnpC*)能够对硝基苯酚和对苯二酚进行降解,而敲除菌株 DLL-Δ*pnpC* 仍然具有利用硝基苯酚和对苯二酚的能力,表明恶臭假单胞菌 DLL-E4 中除 *pnpC* 参与 PNP 降解代谢过程外,还存在另一个双加氧酶能够代谢 PNP,进而部分恢复了敲除的 *pnpC* 的功能^[19]。恶臭假单胞菌 PaW85(*P. putida* PaW85)的 *pheBA* 包含儿茶酚 1,2-双加氧酶(*pheB*)和苯酚 2-单加氧酶(*pheA*)参与

苯酚的降解途径^[20]。恶臭假单胞菌(*P. Putida*)和假单胞菌(*P. Aeruginosa*)都含有儿茶酚 1,2-双加氧酶基因和邻苯二酚 2,3-双加氧酶基因,能通过多元苯酚羟化酶和邻位裂解途径降解长链烷基酚^[21]。由此可见,单加氧酶和双加氧酶对微生物代谢有机污染物具有重要作用。水稻纹枯病菌 *RsPhm* 基因在儿茶酚诱导下的表达模式结果表明,随着儿茶酚浓度升高, *RsPhm* 基因表达水平提高,同时儿茶酚是 *RsPhm* 酶催化的底物,说明 *RsPhm* 基因起到降解儿茶酚的作用。实验室前期发现儿茶酚和硫脲等抗氧化剂显著减少了菌核质量和数量^[22]。儿茶酚作为菌丝和菌核黑色素形成的前体合成物质,促进黑色素的合成,从而使细胞壁和细胞膜黑化和加厚^[14]。这些结果说明 *RsPhm* 基因在水稻纹枯病菌菌核发育和黑色素形成中起到重要作用。

黑色素的合成和形成过程十分复杂。近年对生物体内黑色素合成途径的研究明确了黑色素起源于 4 种不同的中间产物: γ-谷氨酰胺酰-3, 4-对苯二酚(γ-glutaminy-3, 4-dihydroxybenzene, GDBH)、多巴(DOPA)、1, 8-二羟基萘(DHN)和儿茶酚^[23]。核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)能够不断产生 DHN 黑色素,当共同培养核盘菌与白腐菌(*Phanerochaete chrysosporium*)时,白腐菌释放的黑色素降解酶能使核盘菌的黑色素层降解,从而使失去保护层的核盘菌遭受其他溶菌酶的降解,原因是核盘菌黑色素层的存在能帮助其抵御 β-葡聚糖酶和几丁质酶的降解^[24]。白腐菌产生木质素降解酶,通过过氧化酶代谢途径可降解黑酵母(*Aureobasidium pullulans*)黑色素^[25]。人类致病真菌新生隐球菌(*C. neoforms*)合成黑色素与毒力密切相关,可以控制黑色素的合成从而降低致病力^[26, 27]。立枯丝核菌不同融合群菌株细胞壁黑色素含量与微生物裂解的敏感性或抗性之间存在相关性,同时也跟致病力密切相关^[28, 29]。

本研究结果表明,添加外源儿茶酚可以提高 *RsPhm* 基因的表达量,说明水稻纹枯病菌在儿茶酚胁迫下被诱导表达,但不同的儿茶酚浓度诱导表达量上调倍数不同。因此,水稻纹枯病菌苯酚 2-单加氧酶基因表达水平与黑色素形成和菌核发育关系密切。对 *RsPhm* 蛋白氨基酸序列的系统进化树分析表明,立枯丝核菌不同的融合群菌株独立进化为一支,说明不同的融合群的菌株具有较近的亲缘关系,而与离心射脉革菌、多叶奇果菌、白腐菌、白环菇、真姬菇的氨基酸同源性较低,亲缘关系的远近和本身的分类学地位及传统形态学分类结果一致。因此,不同种属真菌之间 *RsPhm* 基因在进化上具有一定

的保守性。该结果为进一步深入研究水稻纹枯病菌黑色素形成和菌核发育机理奠定了基础。

参考文献:

- [1] Webb K M, Freeman C, Broeckling C D. Metabolome profiling to understand the defense response of sugar beet (*Beta vulgaris*) to *Rhizoctonia solani* AG 2-2 IIIB. *Physiol Mol Plant Pathol*, 2016, 94: 108-117.
- [2] Hannukkala A O, Rastas M, Laitinen P, Latvala S. *Rhizoctonia solani* injuries in oilseed crops in Finland and impacts of different crop management practices on disease incidence and severity. *Ann Appl Biol*, 2016, 169(2): 257-273.
- [3] 邹成佳, 唐芳, 杨媚, 贺晓霞, 李献军, 周而勋. 华南 3 省(区)水稻纹枯病菌的生物学性状与致病力分化研究. *中国水稻科学*, 2011, 25(2): 206-212.
Zou C J, Tang F, Yang M, He X X, Li X J, Zhou E X. Studies on biological characteristics and pathogenicity differentiation of rice sheath blight pathogen from three provinces in South China. *Chin J Rice Sci*, 2011, 25(2): 206-212. (in Chinese with English abstract)
- [4] Feng S J, Shu C W, Wang C J Z, Jiang S H, Zhou E X. Survival of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, the causal agent of rice sheath blight, under different environmental conditions. *J Phytopathol*, 2017, 165(1): 44-52.
- [5] 刘卫东. *Pseudomonas putid* DLL-E4 1,2,4-苯三酚 1,2-双加氧酶的晶体结构及两种农药降解相关酶的蛋白质晶体学研究. 南京: 南京农业大学, 2010.
Liu W D. Structural analysis of hydroxyquinol 1, 2-dioxygenase from *Pseudomonas putida* DLL-E4 and crystallographic study on two pesticide degradation related enzymes. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2010. (in Chinese with English abstract)
- [6] Neujahr H Y, Gaal A. Phenol hydroxylase from yeast. Sulfhydryl groups in phenol hydroxylase from *Trichosporon cutaneum*. *Eur J Biochem*, 1975, 58(2): 351-357.
- [7] Yotinov I, Todorova Y, Schneider I, Daskalova E, Topalova Y. The effect of nanodiamonds on phenol biodegradation by *Pseudomonas* sp. strain isolated from polluted sediments. *J Nanosci Nanotechnol*, 2016, 16(7): 7696-7706.
- [8] Nakagawa H, Takeda Y. Phenol hydroxylase. *Biochim Biophys Acta*, 1962, 62(2): 423-426.
- [9] Yang R D, Humphrey A E. Dynamic and steady state studies of phenol degradation in pure and mixed cultures. *Biotechnol Bioeng*, 1975, 17(8): 1211-1235.
- [10] Hamada T, Asanagi M, Satozawa T, Araki N, Banba S, Higashimura N, Akase T, Hirase K. Action mechanism of the novel rice blast fungicide tolprocarb distinct from that of conventional melanin biosynthesis inhibitors. *J Pestic Sci*, 2014, 39(3): 152-158.
- [11] Chai L Y A, Netea M G, Sugui J, Vonk A G, van de Sande W W J, Warris A, Kwon-Chung K J, Jan Kullberg B. *Aspergillus fumigatus* conidial melanin modulates host cytokine response. *Immunobiology*, 2010, 215(11): 915-920.
- [12] Soares A R, de Lourdes Lucio Ferrarese M, de Cássia Siqueira-Soares R, Marchiosi R, Finger-Teixeira A, Ferrarese-Filho O. The allelochemical 1-dopa increases melanin production and reduces reactive oxygen species in soybean roots. *J Chem Ecol*, 2011, 37(8): 891-898.
- [13] Piattelli M, Fattorusso E, Magno S, Nicolaus R A. *Ustilago* melanin, a naturally occurring catechol melanin. *Tetrahedron Lett*, 1963, 4(15): 997-998.
- [14] Chen J Y, Wang C J Z, Shu C W, Zhu M H, Zhou E X. Isolation and characterization of a melanin from *Rhizoctonia solani*, the causal agent of rice sheath blight. *Eur J Plant Pathol*, 2015, 142(2): 281-290.
- [15] Yang Y Q, Yang M, Li M H, Zhou E X. Cloning and functional analysis of an endo-PG-encoding gene *Rrspgl* of *Rhizoctonia solani*, the causal agent of rice sheath blight. *Eur J Plant Pathol*, 2012, 34(3): 1-12.
- [16] Zheng A P, Lin R M, Zhang D H, Qin P G, Xu L Z, Ai P, Ding L, Wang Y R, Chen Y, Liu Y, Sun Z G, Feng H T, Liang X X, Fu R G, Tang C Q, Li Q, Zhang J, Xie Z L, Deng Q M, Li S C, Wang S Q, Zhu J, Wang L X, Liu H N, Li P. The evolution and pathogenic mechanisms of the rice sheath blight pathogen. *Nat Commun*, 2013, 4: 1424.
- [17] Wojcieszynska D, Gren I, Labuzek S, Respondek M. Substrate specificity and sensitiveness of phenol monooxygenase from *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2 versus their potential application to bioremediation of the environment. *Biotechnologia*, 2007, 2: 181-191.
- [18] 李滕. 嗜酸硫化芽孢杆菌苯酚羟化酶还原酶组分的重组表达与性质研究. 厦门: 国家海洋局第三海洋研究所, 2016.
Li M. Expression and characterization of the phenol hydroxylase reductase from *Sulfobacillus acidophilus* TYPY. Xiamen: The Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, 2016. (in Chinese with English abstract)
- [19] 沈文静, 张静, 曹慧, 崔中利. 恶臭假单胞菌 DLL-E4 对硝基苯酚降解途径关键基因 *pnpC* 的突变分析. *生态与农村环境学报*, 2008, 24(4): 77-82.
Shen W J, Zhang J, Cao H, Cui Z L. p-nitrophenol degradation characteristics of hydroxyquinol1, 2-D ioxygenase gene (*pnpC*) knock-out mutant of

- Pseudomonas putida* DLL-E4. *J Ecol Rural Environ*, 2008, 24(4): 77-82. (in Chinese with English abstract)
- [20] Kasak L, Hôrak R, Nurk A, Talvik K, Kivisaar M. Regulation of the catechol 1, 2-dioxygenase- and phenol monooxygenase-encoding *pheBA* operon in *Pseudomonas putida* PaW85. *J Bacteriol*, 1993, 175(24): 8038-8042.
- [21] Tuan N N, Hsieh H C, Lin Y W, Huang S L. Analysis of bacterial degradation pathways for long-chain alkylphenols involving phenol hydroxylase, alkylphenol monooxygenase and catechol dioxygenase genes. *Bioresource Technol*, 2011, 102(5): 4232-4240.
- [22] Lu L, Shu C W, Liu C J Z, Zhou E X. The impacts of natural antioxidants on sclerotial differentiation and development in *Rhizoctonia solani* AG-1 IA. *Eur J Plant Pathol*, 2016, 146(4): 729-740.
- [23] Weijn A, Bastiaan-Net S, Wichers H J, Mes J J. Melanin biosynthesis pathway in *Agaricus bisporus* mushrooms. *Fungal Genet Biol*, 2013, 55(6): 42-53.
- [24] Butler M J, Gardiner R B, Day A W. Melanin synthesis by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycologia*, 2009, 101(3): 296.
- [25] Butler M J, Day A W. Destruction of fungal melanins by ligninases of *Phanerochaete chrysosporium* and other white rot fungi. *Int J Plant Sci*, 1998, 159(6): 989-995.
- [26] Casadevall A, Rosas A L, Nosanchuk J D. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Curr Opin Microbiol*, 2000, 3(4): 354-358.
- [27] Eisenman H C, Chow S, Tsé K K, McClelland E, Casadevall A. The effect of L-DOPA on *Cryptococcus neoformans* growth and gene expression. *Virulence*, 2014, 2(4): 329-336.
- [28] Hyakumachi M, Yokoyama K, Ui T. Role of melanin in susceptibility and resistance of *Rhizoctonia solani* to microbial lysis. *T Brit Mycol Soc*, 1987, 89(1): 27-33.
- [29] Kim H T, Chung Y R, Cho K Y. Mycelial melanization of *Rhizoctonia solani* AG1 affecting pathogenicity in rice. *Plant Pathol J*, 2001, 17: 210-215.