

玉米大斑病菌小柱孢酮脱水酶基因(*scd*) 的克隆与功能分析

于 清, 曹志艳, 董金皋*

(河北农业大学真菌毒素实验室 保定 071001)

摘 要 根据已知植物病原真菌黑色素生物合成相关基因 *scd* (scytalone dehydratase) 氨基酸序列保守区域设计简并引物, 分别以玉米大斑病菌基因组 DNA 和 cDNA 为模板, 通过 PCR 技术获得 *scd* 基因的同源片段, 利用 SMART-RACE 技术和 3'RACE 技术获得了 *scd* 的 cDNA 全长序列。并根据 *scd* 基因 cDNA 全长序列设计基因特异性引物扩增玉米大斑病菌基因组 DNA 获得了该基因 DNA 全长。通过 DNA 序列和 cDNA 序列对比分析发现 *scd* 基因编码一个 180 个氨基酸的开放阅读框架, DNA 序列含有两个分别为 50bp 和 78bp 的内含子。生物信息学分析表明其氨基酸序列与水稻胡麻叶斑病菌的 *scd* 基因的相似性很高。DHN 黑色素生物合成途径特异性抑制剂—Carpropamid 处理玉米大斑病菌, 在 12 ~ 24h 之内可以抑制病菌分生孢子的萌发和附着胞的产生, 但随着处理时间的延长抑制剂的抑制作用变弱, 并且经过抑制剂处理的病菌不能侵入寄主组织或不能在寄主组织内扩展。初步明确了 *scd* 与玉米大斑病菌黑色合成途径及致病性的关系。

关键词 : Carpropamid ; 玉米大斑病菌 ; 黑色素 ; *scd*

中图分类号 : Q786 ; Q936 **文献标识码** : A **文章编号** : 0001-6209 (2007) 06-1013-06

玉米大斑病是威胁玉米生产的一种重要真菌病害, 该病害在主要玉米产区都曾造成过重大经济损失。研究表明, 玉米大斑病菌主要靠机械力穿透寄主组织^[1]。附着胞是病菌致病过程中所形成的一种特殊侵染结构, 一般呈半球状, 四周沉积着黑色素。附着胞必须产生足够的压力才能保证病菌穿透寄主角质层完成侵入过程, 而黑色素则是附着胞产生压力的前提。

真菌中黑色素的形成途径为 1,8-二羟萘酚聚合体 (polymers of 1,8-dihydroxynaphthalene, DHN) 途径, 即醋酸盐在多聚合酮合成酶基因 (polyketide synthase, *pks*) 作用下合成四羟萘 (4HN), 通过 NADH 作用还原成小柱孢酮 (scytalone), 再在小柱孢酮脱水酶基因 (scytalone dehydratase, *scd*) 作用下脱水转化成三羟萘 (3HN), 然后在三羟萘酚还原酶基因 (HN reductase, *hnr*) 作用下, 依赖于 NADPH 脱氢酶, 以 3HN 为底物还原成柱孢酮 (Vermelone, VER), VER 经脱水合成二羟萘, 最后合成多聚二羟黑色素^[2-5]。研究表明, 对于某些植物和动物病原菌来讲, DHN

黑色素都被认为是重要的毒力因子^[6,7]。Carpropamid 为真菌病害防治中的一种有效的化学制剂, 其主要的作用靶标为黑色素合成途径中的小柱孢酮脱水酶基因 (*scd*)^[8,9]。Chumley 和 Valent 利用获得的水稻稻瘟病菌 (*Magnaporthe grisea*) 突变体分离到 *pks*、*scd* 和 *3hnr* 3 个基因, 它们编码的黑色素合成酶基因对合成 DHN 黑色素起着关键作用^[10]。丧失上述任何一个基因, 黑色素则不能形成, 附着胞也就丧失形成穿透能力的高膨压, 最终导致病菌丧失致病性。可见, 真菌中黑色素的合成与致病性密切相关, 对玉米大斑病菌黑色素生物合成相关基因进行研究可为杀真菌剂的研制奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与玉米品种 : 玉米大斑病菌菌株 01-23, 玉米品种 B37 (由河北农业大学真菌毒素实验室保存)。

1.1.2 主要试剂 : Carpropamid-黑色素生物合成相关

基金项目 : 国家自然科学基金 (30471126) ; 河北省自然科学基金 (C2006000432)

* 通讯作者。Tel 86-312-7528266 ; Fax 86-312-7528266 ; E-mail : shmdjg@hebau.edu.cn

作者简介 : 于清 (1979 -), 女, 河北遵化人, 硕士研究生, 研究方向为植物分子病理学。E-mail : yuqing2898@126.com

收稿日期 : 2007-01-29 ; 接受日期 : 2007-03-20 ; 修回日期 : 2007-08-15

增获得一条约 380bp 的条带(图 1)。

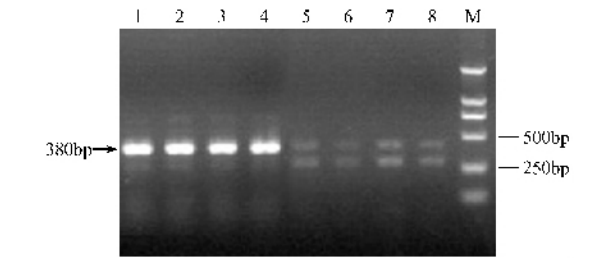


图 1 玉米大斑病菌 *scd* 基因同源片段扩增结果
Fig.1 PCR of *scd* gene homologous fragment with cDNA and DNA of *Exerohilum turcicum*. Lane 1~4. cDNA lane 5~8. Genomic DNA ,M. Marker DL2000.

2.2 *scd* 基因 cDNA 全长序列和结构基因的克隆

以合成的玉米大斑病菌 3'末端和 5'末端 cDNA 为模板 ,进行 3'-RACE 和 5'-RACE 扩增。经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分析证明扩增获得的条带与预期大小一致 ,分别为 447bp 和 361bp(图 2)。将所获得的 3'末端和 5'末端 cDNA 序列进行拼接 ,拼接后的 cDNA 序列经过 ORF 分析 ,发现其内部含有编码 180 个氨基酸的开放阅读框架。根据拼接后所得到的 cDNA 序列设计引物扩增病菌基因组 DNA ,得到大小为 777bp 的条带(图 3)。经过序列分析 ,该基因序列含有 674bp 的基因全长序列 ,在其内部含有 2 个分别为 50bp 和 78bp 的内含子。

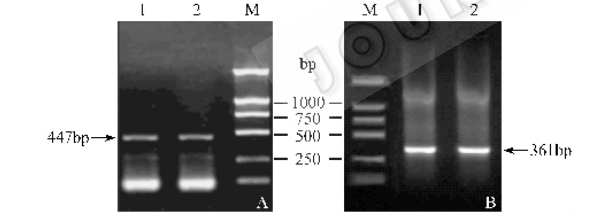


图 2 *scd* 基因 3'-RACE 和 5'-RACE 扩增结果
Fig.2 3'-RACE (A) and 5'-RACE (B) of *scd* gene. 1 and 2 :Product of PCR ; M : Marker DL2000.

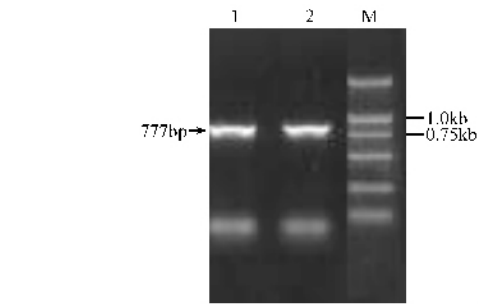


图 3 玉米大斑病菌 *scd* 基因 DNA 全长扩增结果
Fig.3 PCR of *scd* gene with DNA of *Exerohilum turcicum*. 1 and 2 :Product of PCR ; M : Marker DL2000.

2.3 *scd* 基因的 cDNA 序列及其推测氨基酸序列的同源性及其可能功能分析

所获得的 cDNA 序列已经提交国际基因库 (GenBank) ,序列登陆号为 DQ993186。RACE 扩增产物与原 cDNA 序列进行拼接 ,得到大小为 762bp 的 cDNA 序列。利用 BLASTX 软件与 GenBank 中的已知蛋白进行同源性分析 ,发现该开放阅读框所编码的氨基酸序列与许多真菌如 *Bipolaris oryzae*、*Colletotrichum lagenarium*、*Magnaporthe grisea* 等的小柱孢酮脱水酶基因的相似性为 48% ~ 92%。同时 ,利用 DNAMAN 软件 ,将该序列与其它已知真菌的小柱孢酮脱水酶基因进行多序列比对 ,发现该序列含有 *scd* 基因保守的氨基酸残基(图 4)。因此 ,初步推测该序列为玉米大斑病菌小柱孢酮脱水酶基因 *scd*。

2.4 玉米大斑病菌小柱孢酮脱水酶基因 *scd* 的功能分析

2.4.1 Carpropamid 对分生孢子萌发的影响 :试验发现 ,玉米大斑病菌的分生孢子悬浮液经抑制剂 Carpropamid 处理后 ,分生孢子的萌发受到抑制 ,且受抑制的程度与处理时间和抑制剂的浓度呈正相关 ,其中 20mg/L 的处理在 12h 时 ,抑制率高达 91.4% ,处理 24h 后 ,尽管仍然具有一定的抑制作用 ,但处理间差异不明显(图 5A) ;分生孢子悬浮液产生附着胞的数量在 12 ~ 24h 内受抑制明显 ,且随着抑制剂浓度的增加而减少 ,但 36h 以后 ,附着胞产生的数量受抑制剂的影响就不明显了(图 5B)。

2.4.2 Carpropamid 对附着胞形成的影响 :将经过抑制剂处理的分生孢子悬浮液接种玉米离体叶片 ,病菌的侵入过程发生了显著变化。未经抑制剂处理的分生孢子所产生的附着胞在接种 48h 时就可以侵入寄主组织并在寄主组织内扩展 ,导致寄主组织的坏死(图 6A)。经过抑制剂处理的分生孢子悬浮液 ,接种离体叶片后 ,在抑制剂浓度为 1.25mg/L 时 ,所产生的附着胞虽能侵入寄主组织但并不能在寄主组织内扩展(图 6B) ;抑制剂浓度为 2.5mg/L 时分生孢子虽然能够产生附着胞 ,但附着胞的颜色变浅且不能侵入寄主组织(图 6C)。

3 讨论

稻瘟病菌中已经克隆到了 *scd* 基因的 cDNA 序列 ,经过大肠杆菌异源表达 ,纯化得到了多聚肽的晶体结构 ,并且氨基酸残基 Tyr-30 ,Asp-31 ,Tyr-50 ,His-35 ,His-110 ,Ser-129 和 Asn-143 为小柱孢酮脱水酶的

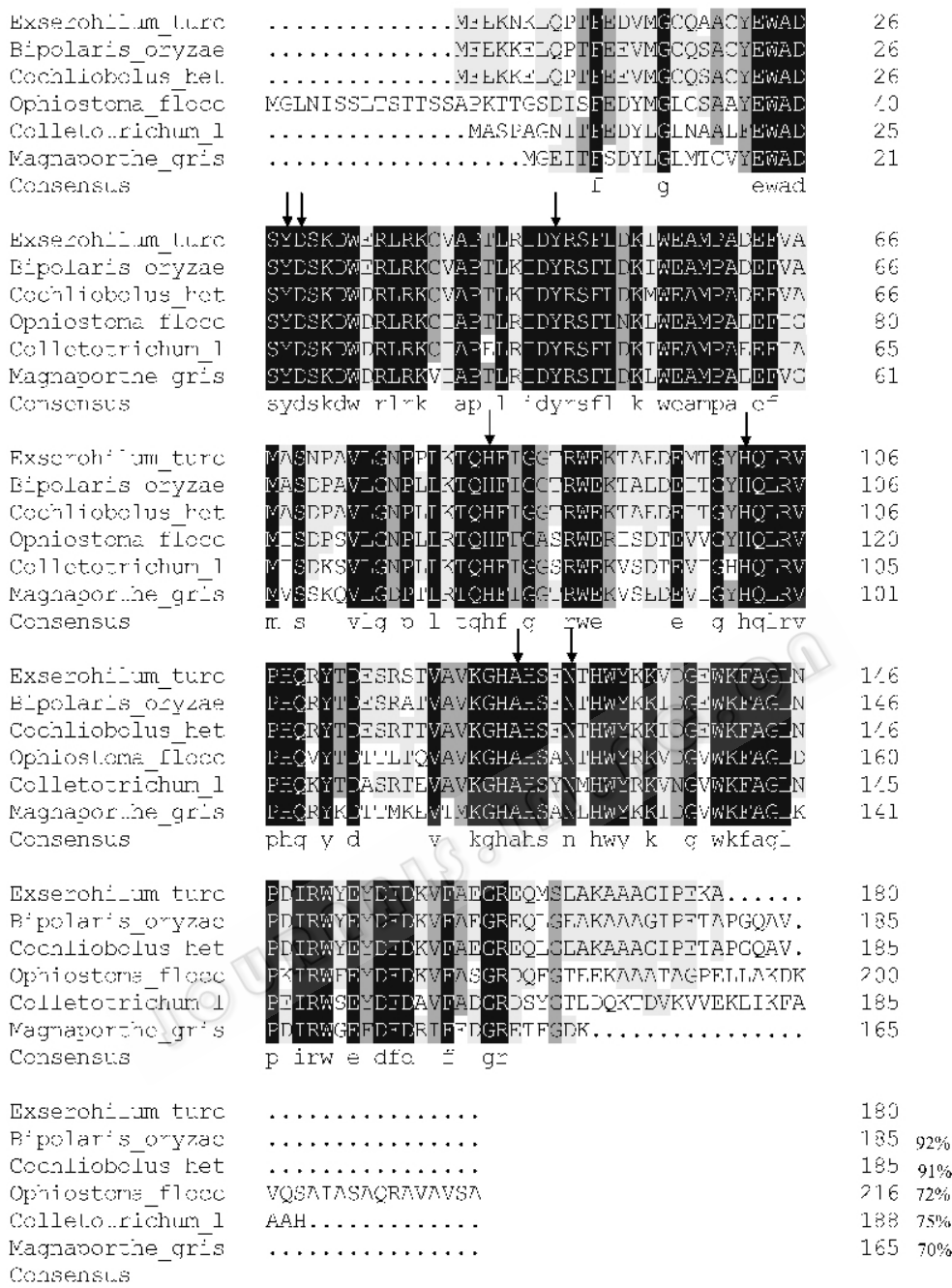


图4 scd 基因多序列比对结果

Fig.4 Result of multiple alignment of scd .

催化及底物的结合位点^[12]。C. lagenarium 的小柱孢酮脱水酶活性分析表明碳端区域在催化和与底物的结合过程中起重要作用^[13,14]。

真菌黑色素的合成过程是由多基因控制的。已有报道表明,Carpropamid 和三环唑是黑色素合成途径的特异性抑制剂。在黑色素合成途径中三环唑抑制从 1,3,8-THN 向 scytalone 的还原过程,能够有效的防治稻瘟病。Carproamid 为真菌病害防治中的另一种有效的化学制剂,其主要的靶标为黑色素

合成途径中的小柱孢酮脱水酶。Carpropamid 处理稻瘟病菌以后,对病菌的分生孢子萌发,芽管的伸长以及附着胞的形成均没有显著的影响,但 Carpropamid 可以显著的抑制附着胞内黑色素的合成,并使附着胞颜色变浅,导致病菌既不能侵入人工的赛洛芬膜,也不能侵入水稻叶片角质层^[15]。本试验中经过抑制剂处理的分生孢子悬浮液所产生的附着胞颜色变浅且不能侵入寄主组织。可能是由于 scd 基因功能受阻,黑色素不能正常形成所致。

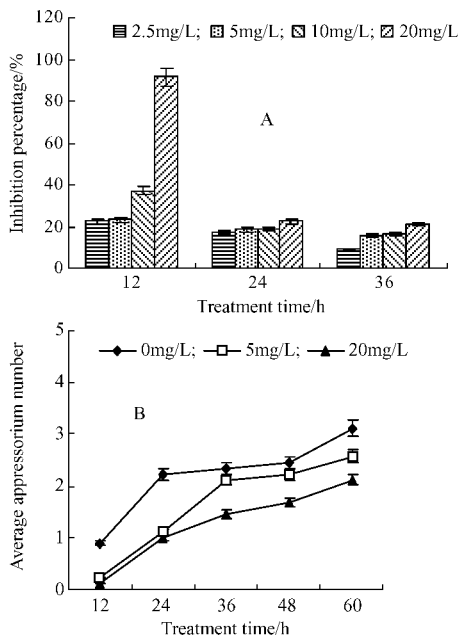


图 5 Carpropamid 对玉米大斑病菌分生孢子萌发 (A) 和附着胞形成 (B) 的影响

Fig.5 Inhibitory effect of carpropamid on the conidial germination (A) and the effect of carpropamid on the appressorium production (B) of *Esxerohilum turcicum*

本试验得到了玉米大斑病菌中一个黑色素生物合成相关的基因—小柱孢酮脱水酶基因(*scd*)。同源分析表明, 所获得的序列与水稻胡麻叶斑病菌、炭疽菌、稻瘟病菌等许多真菌的小柱孢酮脱水酶基因(*scd*)有高度的相似性。玉米大斑病菌中的 *scd* 基因氨基酸残基 Tyr-28 ,Asp-29 ,Tyr-48 ,His-83 His-108 , Ser-127 和 Asn-129 与稻瘟病菌中小柱孢酮脱水酶的氨基酸残基 Tyr-23 ,Asp-24 ,Tyr-43 ,His-78 ,His-97 , Ser-120 和 Asn-124 及玉米小斑病菌中小柱孢酮脱水酶的氨基酸残基 Tyr-28 ,Asp-29 ,Tyr-48 ,His-83 His-108 , Ser-127 和 Asn-129 一致。利用抑制剂 (carpropamid)分析表明, 经过 carpropamid 处理的玉米大斑病菌所产生的附着胞不能产生侵入钉, 进而不能侵入寄主组织, 导致病菌致病力的丧失。推测 *scd* 基因在玉米大斑病菌黑色素合成途径及致病过程中均起着重要的作用。

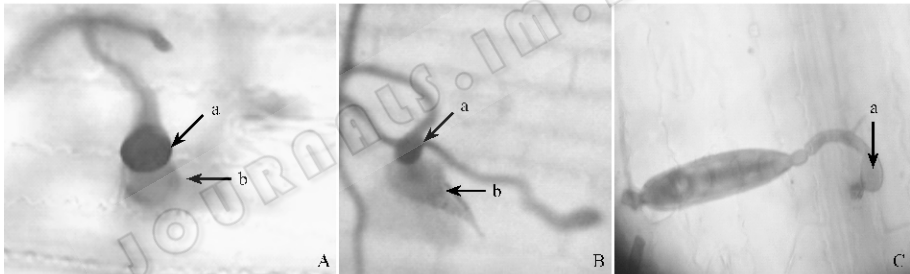


图 6 玉米大斑病菌在离体叶片上的侵入过程

Fig.6 Infection course of *Esxerohilum turcicum* on isolated corn leaves. A. CK ;B. carpropamid. 1.25mg/L , C. carpropamid 2.5mg/L a. appressorium b. Dead tissue dyed by trypan blue.

参 考 文 献

[1] 范永山,曹志艳,谷守芹,等. 不同诱导因素对玉米大斑病菌附着胞产生的影响. 中国农业科学 2004 37(5):769 – 772.

[2] Peter L ,Philippe T ,Colette B. Isolation and disruption of the melanin pathway polyketide synthase gene of the softwood deep strain fungus *Ceratocystis resinifera* . *Fungal Genetics and Biology* 2001 41 33 – 41.

[3] Thompson JE ,Fahnestock S ,Farrall L , et al . The second naphthol reductase of fungal melanin biosynthesis in *Magnaporthe grisea* . *Biological Chemistry* 2000 275 34867 – 34872.

[4] Funa N , Funabashi M , Yasuo O , et al . Biosynthesis of hexahydroxypyrrole quinone melanin via oxidative Aryl coupling by cytochrome P-450 in *Streptomyces griseus* . *Journal of Bacteriology* , 2005 187(23) 8149 – 8155.

[5] Langfelder K ,Streibel M ,Jahn B. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology* 2003 38 :143 – 158.

[6] Butler MJ ,Day AW ,Henson JM , et al . Pathogenic properties of fungal melanins. *Mycologia* 2001 93 :1 – 8.

[7] Rachael MJ ,Beatriz L ,Gomez. Synthesis of melanin pigment by *Candida albicans* in vitro and during infection. *Infection and Immunity* 2005 73(9) 6147 – 6150.

[8] Naoki Y , Takayuki M , Masayoshi N , et al . Enzymatic characterization of scytalone dehydratase Val75Met variant found in melanin biosynthesis dehydratase inhibitor (MBI-D) resistant strains of the rice blast fungus. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* , 2004 68 615 – 621.

[9] Souad EB ,Nicole B ,Odile C. The role of melanin in the antagonistic interaction between the apple scab pathogen *Venturia inaequalis* and *Microsphaeropsis ochracea*. *Canadian Journal of Microbiology* 2002 , 48 349 – 358.

[10] Chumley F G , Valent B. Genetic analysis of melanin-deficient , nonpathogenic mutants of *Magnaporthe grisea* . *Molecular Plant-Microbe Interaction* ,1990 3 :135 – 143.

- [11] 安鑫龙,董金皋,韩建民.玉米大斑病菌的 RAPD 分析 I. 应用 CTAB 法提取玉米大斑病菌 DNA. 河北农业大学学报, 2001 **24** (1) 38 – 41.
- [12] Junichi K, Akihiro M, Makoto U, *et al.* Cloning, functional analysis and expression of a scytalone dehydratase gene (*SCD1*) involved in melanin biosynthesis of the phytopathogenic *Bipolaris oryzae*. *Current Genetics* 2004 **45**:197 – 204.
- [13] Yasuyuki K, Yoshitaka T, Noriko E, *et al.* Cloning and structural analysis of the melanin biosynthesis gene *SCD* encoding scytalone dehydratase in *Colletotrichum lagenarium*. *Applied and Environment Microbiology*, 1996 **62**:4340 – 4344.
- [14] Takayuki M, Kinya I, Isamu Y. cDNA Cloning, expression, and mutagenesis of scytalone dehydratase needed for pathogenicity of the rice blast fungus, *Pyricularia oryzae*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 1998 **62**:564 – 566.
- [15] Kurahashi Y, Pontzen R. Carpropamid: a new melanin biosynthesis inhibitor. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 1998 **51**:245 – 256.

Cloning and functional analysis of scytalone dehydratase gene in *Exserohilum turcicum*

YU Qing, CAO Zhi-yan, DONG Jin-gao*

(Mycotoxin Laboratory of Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstract : Genomic DNA and cDNA homologous fragments of the *scd* (scytalone dehydratase) gene were obtained by polymerase chain reaction (PCR) amplification from degenerated primer sets designed on the basis of the conserved amino acid regions of scytalone dehydratase and polyketide synthase domains from others fungus. The completed cDNA sequence of *scd* in *E. turcica* was obtained by the method of SMART-RACE and 3'RACE. There is one open reading frame composed of 181 codons and two deduced introns of 50 and 78 nucleotides in the *scd* gene. The deduced amino acid sequence of the *scd* showed high similarity to the amino acid sequence of scytalone dehydratase from *Bipolaris oryzae*. Carpropamid, a specific inhibitor, could inhibit the conidial germination and appressorium production of *E. turcica* within 24h treatment but no evident inhibitory effect after 24h. The experimental results also suggested that *E. turcica* could not penetrate the surface of corn tissue or increase in the corn tissue. It was conclusion that *scd* gene might play an important role in melanin biosynthetic pathway and pathogenicity of *E. turcica*.

Keywords : Carpropamid; *Exserohilum turcicum*; Melanin; *scd*

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (30471126); Natural Science Foundation of Hebei Province (C2006000432)

* Corresponding author. Tel: 86-312-7528266; Fax: 86-312-7528266; E-mail: shmdjg@hebau.edu.cn

Received: 29 January 2007/ Accepted: 20 March 2007/ Revised: 15 August 2007