

侯巨梅, 崔佳, 左豫虎, 等. 玉米致病菌新月弯孢漆酶基因家族鉴定与分子结构特征分析[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(6): 32–36.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.06.008

# 玉米致病菌新月弯孢漆酶基因家族鉴定 与分子结构特征分析

侯巨梅, 崔佳, 左豫虎, 王玉莹, 赵丰舟, 申永强, 刘铜

(黑龙江八一农垦大学农学院植物病理与应用微生物研究所, 黑龙江大庆 163319)

**摘要:**漆酶在真菌的孢子分裂、子实体分化、黑色素生成、木质素降解酶和病菌致病中均起重要作用。采用生物信息学的方法,在玉米致病菌新月弯孢基因组基础上对漆酶基因家族成员进行了鉴定和序列特征分析,结果表明玉米致病菌新月弯孢共有 8 个漆酶基因,分布在 6 个不同的 scaffolds 上,其漆酶基因结构显示外显子和内含子大小与位置都不一样,表现出复杂的基因结构。序列比对和系统发育分析发现,8 个漆酶氨基酸序列与其他真菌来源漆酶一样具有 4 个特征保守序列区,位于系统发育树的 2 个不同分支上,表明玉米致病菌新月弯孢漆酶可能与其他真菌的漆酶具有相似的进化关系和功能。

**关键词:**漆酶;新月弯孢;基因家族;基因结构

**中图分类号:** S435.131 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)06-0032-05

漆酶是一种含铜的多酚氧化酶,具有较强的氧化还原能力,能够氧化酚类物质,催化木质素的降解,并且促进 DHN 黑色素的合成<sup>[1-4]</sup>。此外,研究还发现漆酶可以影响真菌的发育、子实体和侵染结构的形成<sup>[5-7]</sup>,例如在大斑凸脐蠕孢(*Exserohilum turcicum*)中漆酶基因被敲除后表现出黑色素合成受阻,不产生分生孢子,侵染能力下降等<sup>[7]</sup>。在隐丛赤壳菌(*Cryphonectria parasitica*)中漆酶与病原致病力强弱直接相关<sup>[8]</sup>。因此漆酶在病菌生长发育和致病性中具有重要的作用。

由新月弯孢[*Curvularia lunata* (Wakker) Boed.]引起的玉米弯孢叶斑病已成为玉米主要病害之一,对我国玉米生产造成了严重的损失<sup>[9-12]</sup>。早期对该菌致病机制的研究发现,它在离体和活体条件下可以产生一系列的细胞壁降解酶,如多聚半乳糖醛酸酶(polygalacturonase, PG)、聚甲基半乳糖醛酸酶(polymethylgalacturonase, PMG)、多聚半乳糖醛酸反式消除酶(PGTE)、果胶甲基反式消除酶(polygalacturonic acid trans-eliminase, PMTE)和纤维素酶(cellulose, Cx),在病菌侵染早期主要产生 PG 和 PMG,后期可以产生 Cx<sup>[13]</sup>。然而 2010 年周舒扬等研究发现该菌不但产生上述细胞壁降解酶,而且可以产生一种漆酶,并推断可能该漆酶在病菌侵入过程中发挥重要作用<sup>[14]</sup>。但目前关于漆酶基因在玉米致病菌新月弯孢侵染中的作用还未见报道。

本研究基于玉米致病菌新月弯孢基因组数据,通过生物信息学方法对漆酶基因家族成员数目、基因结构、蛋白质同源

性和系统发育进行了分析,为进一步研究漆酶基因在侵染过程中的表达模式和作用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 漆酶蛋白的获得

利用 NCBI 数据库,获得来自稻梨孢(*Magnaporthe oryzae*)所有漆酶氨基酸序列。从 NCBI 数据库下载玉米致病菌新月弯孢(*C. lunata*)基因组(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JFHG00000000>),利用 BioEdit 构建本地核苷酸和预测的蛋白质数据库。在玉米致病菌新月弯孢蛋白数据库,查询来自稻梨孢(*M. oryzae*)和大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)的所有漆酶氨基酸序列,设其  $E < 10^{-10}$ ,将获得的蛋白序列列为候选蛋白质序列(每个序列都有固定的号码)。将这些候选序列提交到 NCBI 的在线工具 CDD Search 和 Pfam 进行保守区域分析,将其有漆酶家族保守区的序列认为假定漆酶蛋白,对没有漆酶家族保守区的则认为不属于该家族。利用 SIB 生物信息学门户网站([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/))进行漆酶基因蛋白质的氨基酸数目、分子量和理论等电点等理化特性的预测。应用 SignalP 4.1(<http://www.cbs.dtu.dk/services/>)对信号肽进行分析。

### 1.2 漆酶基因结构与 motif 分析

在 CDS 数据库查询获得的预测漆酶蛋白质,获得其相应的预测 CDS 序列。以 CDS 序列进行基因组数据对比,获取相应的基因序列,采用 Clustal W2 软件(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)比较 CDS 序列和基因序列,利用 GSDS 2.0 在线软件(<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)获取基因结构图。采用基于 motif 的序列分析工具 MEME 在线软件(<http://meme.nbcr.net/meme/cgi-bin/meme.cgi>)对蛋白的基序进行分析,其参数设置为:同一基序在一条序列中出现的次数为 0 或者 1,基序长度范围 10~200,基序最大发现数目为 5。

收稿日期:2014-12-09

基金项目:黑龙江省自然科学基金(编号:C201448)。

作者简介:侯巨梅(1979—),女,黑龙江齐齐哈尔人,硕士,讲师,主要从事植物病理学研究。E-mail:amliutong@163.com。

通信作者:刘铜,博士,副教授,主要从事分子植物病理学与环境微生物学研究。E-mail:liutongamy@sina.com。

1.3 漆酶蛋白序列分析和系统发育树构建

为了比对鉴定出来的玉米致病菌新月弯孢漆酶基因的同源性,使用 DNAMAN 软件对预测漆酶家族成员氨基酸序列进行两两比较,获得其同源性的数值。采用 Clustal W2 程序 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) 对所有待鉴定的玉米致病菌新月弯孢漆酶进行比对,并输出到 GENEDOC 软件,分析其保守结构域。从 NCBI 数据库中搜索来源于真菌的漆酶基因氨基酸序列,下载后与玉米致病菌新月弯孢漆酶基因构成比对文件,采用 MEGA5 (<http://megasoftware.net>) 软件进行系统发育进化树的构建,所用方法为邻近比较法。

2 结果与分析

2.1 漆酶家族成员的鉴定

通过 BioEdit 软件搜索玉米致病菌新月弯孢基因组数据库,并结合对保守区的分析,一共获得 12 个含 cupredoxin 结构域的基因,分别为 CUR - 10008001、CUR - 10003363、CUR - 10004729、CUR - 10008028、CUR - 10008191、CUR - 10002613、CUR - 10000456、CUR - 10004710、CUR -

10009995、CUR - 10004252、CUR - 10003735 和 CUR - 10002249。用 Pfam 进行结构域分析时发现这 12 个基因中 CUR - 10003735 属抗坏血酸氧化酶、CUR - 10002249 为胞外胆红素氧化酶、CUR - 10008001 和 CUR - 10004252 是铁运输多铜氧化酶,CUR - 10004710 含有 1 个二酚氧化酶结构域和 2 个多铜氧化酶结构域,其余的与子囊菌热白丝菌 (*Melanocarpus albomyces*) 的漆酶基因一样含有 3 个多铜氧化酶结构域,因此除 CUR - 10008001、CUR - 10002249、CUR - 10003735 和 CUR - 10004252 外其他都被认为漆酶基因家族成员,并命名为 *CILAC1* ~ *CILAC8*,它们分布在 6 个不同 scaffolds 上。通过 ExPASy 工具,发现 8 个 CILAC 基因编码蛋白的氨基酸最长的序列包含 724 个氨基酸残基,最短的含有 478 个氨基酸残基。所有的 CILAC 基因家族成员编码蛋白的分子量大小范围为 52.2 ~ 79.9 ku,等电点范围为 4.21 ~ 8.02。Signalp4.1 结果显示,*CILAC1*、*CILAC2*、*CILAC3*、*CILAC4* 和 *CILAC6* 含有信号肽,其剪切位点都含有 11 氨基酸,*CILAC5*、*CILAC7* 和 *CILAC8* 显示不存在信号肽剪切位点。其结果显示如表 1。

表 1 玉米致病菌新月弯孢漆酶预测基因信息

基因名称	基因号	ORF 框长度 (bp)	氨基酸长度 (aa)	分子量 (ku)	等电点 (pI)	信号肽	基因组位置
<i>CILAC1</i>	CUR - 10003363	1689	562	61.9	4.63	Y(11)	Scaffold24
<i>CILAC2</i>	CUR - 10004729	1791	596	65.4	5.71	Y(11)	Scaffold18
<i>CILAC3</i>	CUR - 10008028	1803	600	66.1	5.59	Y(11)	Scaffold7
<i>CILAC4</i>	CUR - 10008191	1851	616	66.9	8.02	Y(11)	Scaffold7
<i>CILAC5</i>	CUR - 10002613	1437	478	52.2	4.21	N	Scaffold28
<i>CILAC6</i>	CUR - 10000456	1869	622	68.2	4.81	Y(11)	Scaffold82
<i>CILAC7</i>	CUR - 10004710	2067	688	77.4	5.30	N	Scaffold18
<i>CILAC8</i>	CUR - 10009995	2175	724	79.9	5.15	N	Scaffold3

注:“信号肽”一栏中,Y 表示存在信号肽,括号中表示信号肽剪切氨基酸数目;N 表示不存在信号肽。

2.2 漆酶基因结构与 motif 分析

对基因结构分析发现 *CILAC1* 和 *CILAC3* 含有 5 个外显子,*CILAC5* 含有 4 个外显子,*CILAC8* 含有 3 个外显子,*CILAC2* 和 *CILAC4* 含有 2 个外显子,*CILAC6* 和 *CILAC7* 含有 1 个外显

子,并且所有基因显示外显子和内含子的位置不一样,外显子的大小也存在差异,这表明玉米致病菌新月弯孢漆酶家族成员基因外显子-内含子结构比较复杂,其结果如图 1。

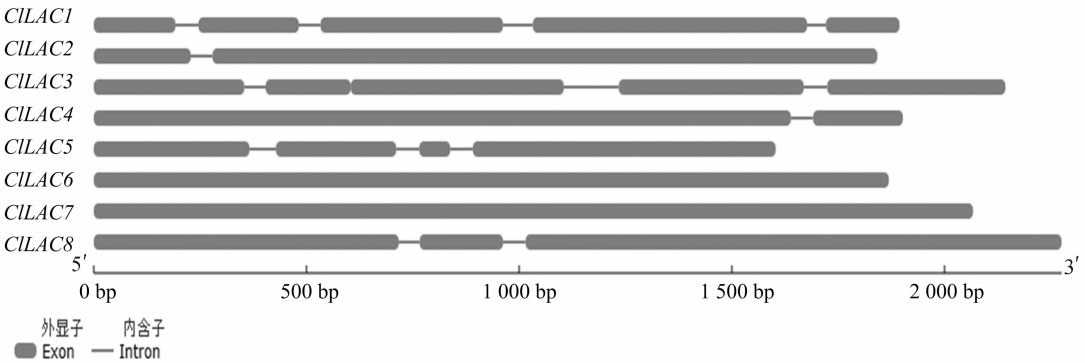


图 1 玉米致病菌新月弯孢漆酶预测基因外显子-内含子模式

对 8 个玉米致病菌新月弯孢漆酶蛋白的基序分析,结果显示 7 个漆酶基因都被 MEME 工具划分为 5 个基序,只有 *CILAC5* 含有 4 个基序,不包括基序 5 (图 2)。

2.3 漆酶蛋白序列对比和系统发育树构建

将玉米致病菌新月弯孢中预测的 8 个漆酶基因进行同源性比较发现,他们之间同源性在 19% ~ 47% 之间,其同源性比较低 (表 2)。但是采用 Clustal X 软件对 8 个漆酶蛋白进行序列多重比对,结果表明,这些预测蛋白都含有 L1 ~ L4 4 个

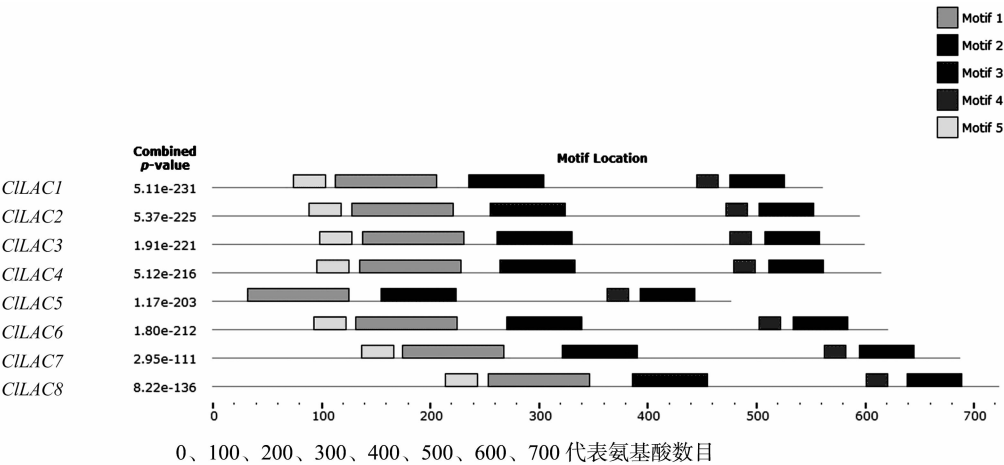


图2 玉米致病菌新月弯孢漆酶预测蛋白的基序

表 2 玉米致病菌新月弯孢漆酶预测蛋白同源性比对

基因名称	同源性(%)							
	<i>CILAC1</i>	<i>CILAC2</i>	<i>CILAC3</i>	<i>CILAC4</i>	<i>CILAC5</i>	<i>CILAC6</i>	<i>CILAC7</i>	<i>CILAC8</i>
<i>CILAC1</i>	100							
<i>CILAC2</i>	38	100						
<i>CILAC3</i>	38	44	100					
<i>CILAC4</i>	36	43	40	100				
<i>CILAC5</i>	47	33	33	33	100			
<i>CILAC6</i>	39	33	33	34	32	100		
<i>CILAC7</i>	23	21	21	21	22	23	100	
<i>CILAC8</i>	25	22	24	21	22	25	19	100

特征序列区(图3)。其中,L1:H-W-H-G-X9-D-G-X5-QCPI;L2:G-T-X-W-Y-H-S-H-X3-Q-Y-C-X-D-G-L-X-G-X-(FLIM);L3:H-P-X-H-L-H-G-H;L4:G-(PA)-W-X-(LFV)-HCHI-DAE-X-H-X3-G-(LMF)-X3-(LFM)。与其他物种的漆酶所特有的特征序列区相符合,这说明从玉米致病菌新月弯孢鉴定出来的8个漆酶基因应属于漆酶基因家族中的成员。

将8个漆酶蛋白与34个来源不同真菌的漆酶蛋白进行系统发育分析结果表明,漆酶蛋白被划分4个组。其中*CILAC7*与14个来源不同真菌的漆酶位于系统发育树的同一分支,其余的玉米致病菌新月弯孢漆酶蛋白与16个不同来源的真菌漆酶处于进化树的同一分支(图4)。表明玉米致病菌新月弯孢漆酶可能与其他真菌的漆酶具有相似的进化过程和功能。

3 讨论

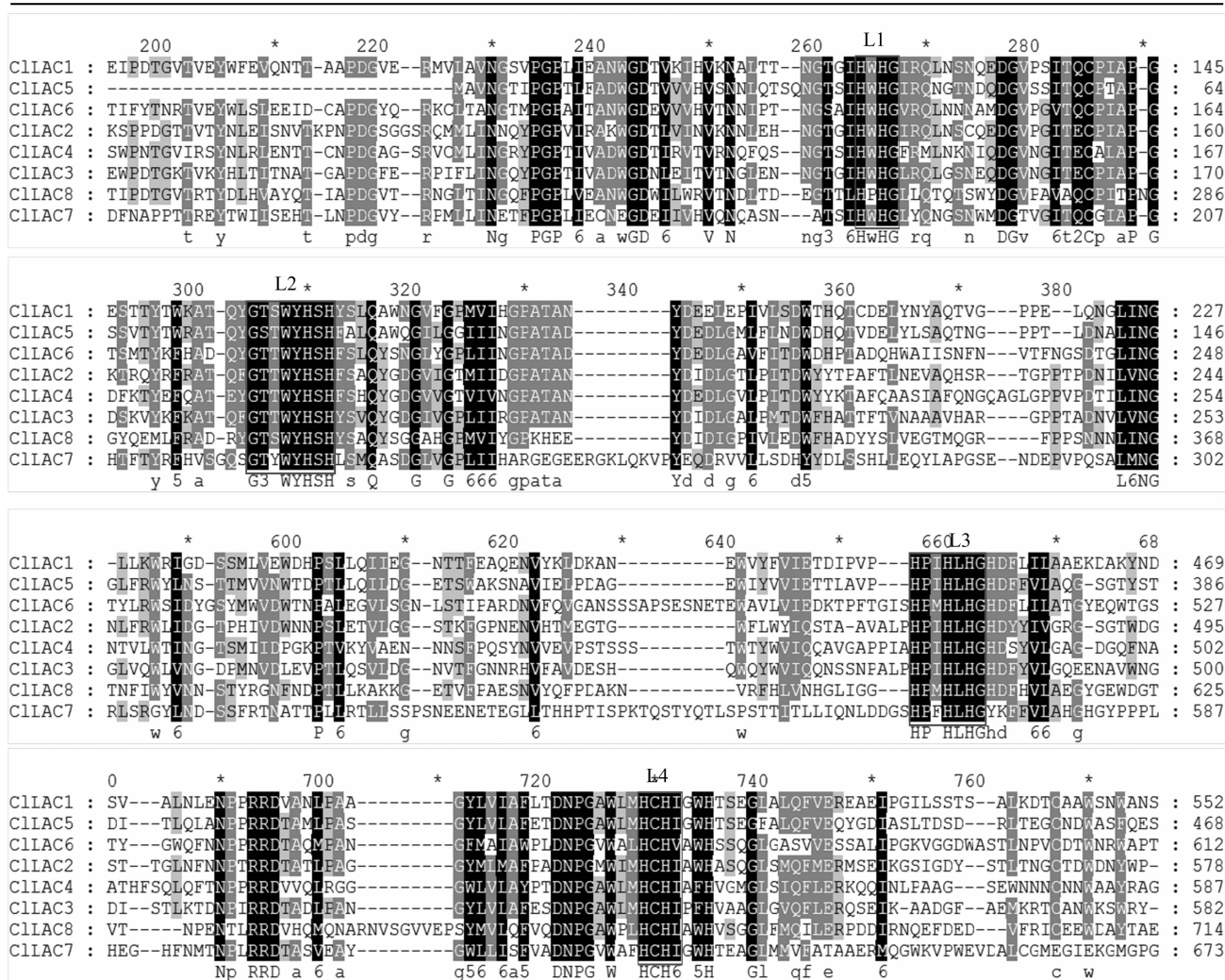
本研究首次根据玉米致病菌新月弯孢基因组对漆酶基因进行了鉴定和分析。漆酶与抗血氧化酶、血浆铜蓝蛋白同属蓝色多铜氧化酶家庭成员,都具有多个含铜结构域。经过BLAST比对和Pfam结构域分析,在玉米致病菌新月弯孢中最初鉴定出12个具有多个含铜的结构域的基因,但是通过Pfam注释只有7个基因与子囊菌热白丝菌(*Melanocarpus albomyces*)的漆酶基因一样含有3个多铜氧化酶结构域,还有1个含有1个二酚氧化酶结构域和2个多铜氧化酶结构域,根据这个结果初步推测这8个基因为漆酶家族成员。通过对这8个蛋白氨基酸序列进一步分析发现,他们都具有漆酶基因家族的4个特征序列结构,因此判定这8个预测的漆酶基

因为漆酶家族成员。

目前在其他植物病原真菌中已鉴定不少数目的漆酶基因,例如在大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)、苜蓿轮枝菌(*Verticillium albo-atrum*)、曲霉菌(*Aspergillus flavus*)、核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)中分别鉴定出3、2、4、1个漆酶基因<sup>[15]</sup>,然而在玉米致病菌新月弯孢鉴定出8个漆酶基因,表明玉米致病菌新月弯孢基因组具有较完整的信息。另外根据报道,该菌在致病过程中漆酶酶活的迅速提高,暗示漆酶基因可能在该菌致病中起重要作用<sup>[14]</sup>。许多研究发现漆酶与真菌黑色素相关,例如漆酶基因可以改变烟曲霉(*Aspergillus fumigates*)菌株的颜色<sup>[16]</sup>,大斑凸脐蠕孢(*E. turcicum*)*StLAC1*漆酶基因参与黑色素合成<sup>[17]</sup>,但是*StLAC2*对黑色素合成没有任何影响<sup>[18]</sup>。黑色素也是玉米致病菌新月弯孢的1种主要的致病因子<sup>[19]</sup>,漆酶是否也参与了黑色素合成,调控了病菌的致病性呢?本研究为进一步揭示漆酶在致病性中的作用奠定了基础。

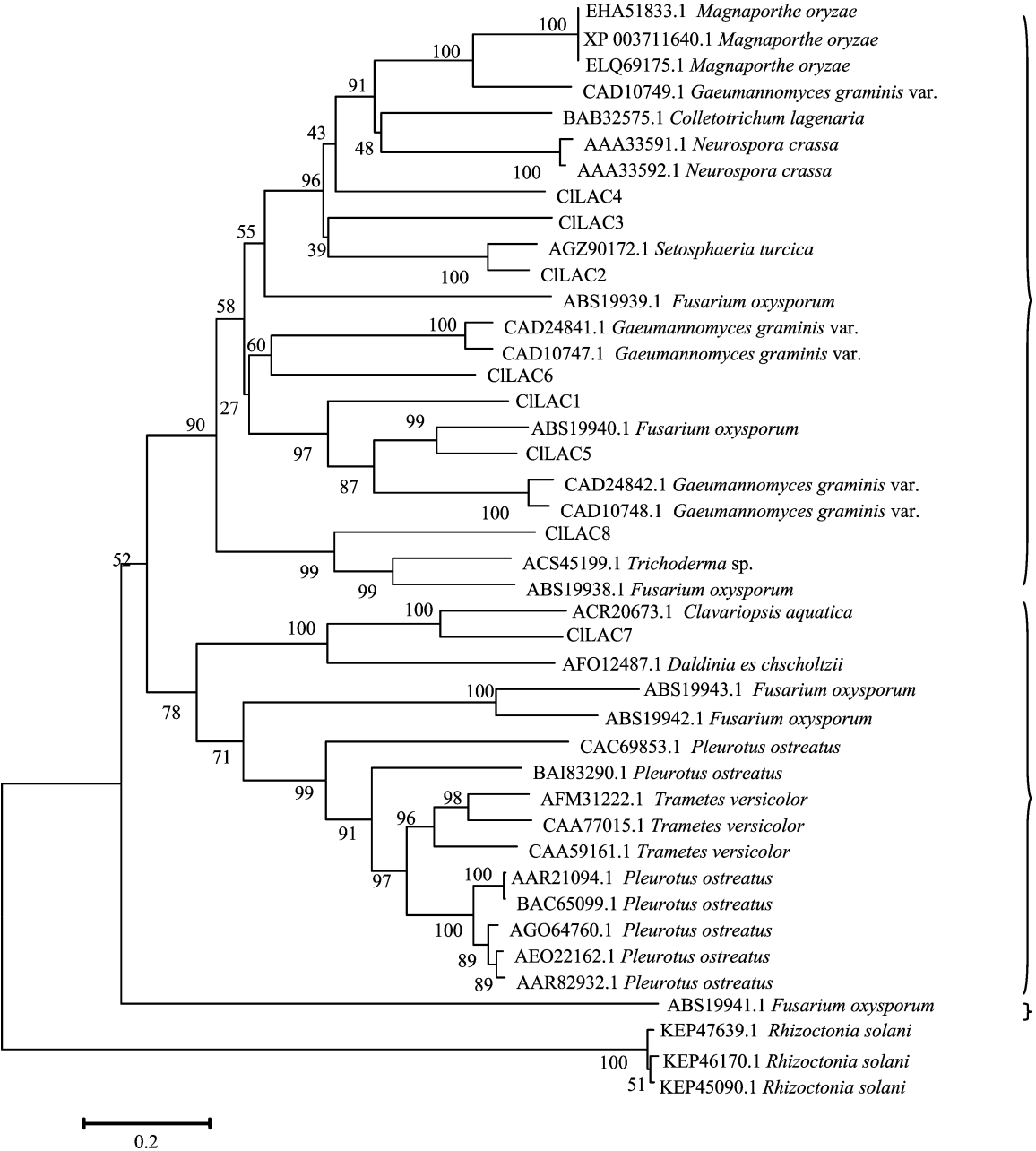
参考文献:

[1]赵敏,杨谦,宋小双,等. 真菌漆酶分子生物学研究进展[J]. 林产化学与工业,2005,25(1):115-120.  
[2]许颖,兰进. 真菌漆酶研究进展[J]. 食用菌学报,2005,12(1):57-64.  
[3]Kilaru S, Hoegger P J, Kües U. The laccase multi-gene family in *Coprinopsis cinerea* has seventeen different members that divide into two distinct subfamilies[J]. Current Genetics, 2006, 50(1):45-60.



L1、L2、L3、L4 分别代表 4 个保守结构域特征性序列  
图3 玉米致病菌新月弯孢漆酶预测基因氨基酸序列比对

- [4] Castro - Sowinski S, Martinez - Drets G, Okon Y. Laccase activity in melanin - producing strains of *Sinorhizobium meliloti* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 209(1): 119 - 125.
- [5] Leatham G F, Stahmann M A. Studies on the laccase of *Lentinus edodes* specificity, localization and association with the development of fruiting bodies [J]. Journal of General Microbiology, 1981, 125(1): 147 - 157.
- [6] Leonard T J. Phenoxidase activity and fruiting body formation *Schizophyllum commune* [J]. Journal of Bacteriology, 1971, 106(1): 162 - 167.
- [7] 曹志艳. 玉米大斑病菌黑色素合成途径相关基因的克隆及功能分析[D]. 保定: 河北农业大学, 2009.
- [8] Choi G H, Larson T G, Nuss D L. Molecular analysis of the laccase gene from the chestnut blight fungus and selective suppression of its expression in an isogenic hypovirulent strain [J]. Molecular Plant - Microbe Interactions, 1992, 5(2): 119 - 128.
- [9] 戴法超, 高卫东, 王晓鸣, 等. 玉米弯孢菌叶斑病的初步研究简报 [J]. 植物保护, 1996, 22(4): 36 - 37.
- [10] 李富华, 王玉涛, 潘开文. 玉米弯孢菌叶斑病研究现状、问题与展望 [J]. 植物保护, 2004, 30(6): 5 - 10.
- [11] 吕国忠, 陈捷, 白金铠, 等. 我国玉米病害发生现状及防治措施 [J]. 植物保护, 1997, 23(4): 20 - 21.
- [12] 石洁, 刘玉瑛, 刘爱国, 等. 河北省玉米弯孢菌叶斑病发生调查 [J]. 河北农业大学学报, 1998, 21(2): 94.
- [13] 冯晶, 高增贵, 薛春生, 等. 玉米弯孢菌叶斑病菌产生的细胞壁降解酶的致病作用研究 [J]. 杂粮作物, 2002, 22(3): 164 - 166.
- [14] 周舒扬, 杨洪一, 赵敏, 等. 黑龙江省玉米弯孢菌叶斑病原鉴定及其产细胞壁降解酶和漆酶活性分析 [J]. 玉米科学, 2010, 18(5): 126 - 130.
- [15] 肖书笑, 田呈明, 王永林, 等. 黄栌枯萎病菌漆酶基因的鉴定及其在微菌核形成过程中的表达研究 [J]. 北京: 中国科技论文在线 [2013 - 12 - 20]. <http://www.paper.edu.cn/html/releasepaper/2013/12/625/>.
- [16] Clutterbuck A J. Absence of laccase from yellow - spored mutants of *Aspergillus nidulans* [J]. Journal of General Microbiology, 1972, 70(3): 423 - 435.
- [17] 詹旭. 玉米大斑病菌 *StlAC* 基因在黑色素合成中的功能分析 [D]. 保定: 河北农业大学, 2011.



CILAC1~CILAC8代表玉米致病菌新月弯孢不同漆酶蛋白, 每个分支点处的数字为 Bootstrap (1 000次抽样)的支持百分率

图4 玉米致病菌新月弯孢漆酶预测基因蛋白系统进化树

[18]孟 川. 玉米大斑病菌 *StLAC2* 基因与黑色素合成及致病性关系研究[D]. 保定:河北农业大学,2013.

病性中的作用研究[J]. 安徽农业科学,2007,35(21): 6476-6478.

[19]王晓飞,薛春生,徐书法,等. 玉米弯孢菌黑色素性质及其在致