

研究报告

梨果黑斑病菌互隔交链孢(*Alternaria alternata*) *hnr* 基因的克隆及其对侵染结构分化的调控

李荣, 徐文怡, 李永才*, 毕阳, 张苗, 蒋倩倩, 刘勇翔

甘肃农业大学食品科学与工程学院, 甘肃 兰州 730070

李荣, 徐文怡, 李永才, 毕阳, 张苗, 蒋倩倩, 刘勇翔. 梨果黑斑病菌互隔交链孢(*Alternaria alternata*) *hnr* 基因的克隆及其对侵染结构分化的调控[J]. 微生物学通报, 2022, 49(7): 2550-2562

Li Rong, Xu Wenyi, Li Yongcai, Bi Yang, Zhang Miao, Jiang Qianqian, Liu Yongxiang. Cloning of *hnr* and characterization of its regulatory role in the infection structure differentiation of *Alternaria alternata*[J]. Microbiology China, 2022, 49(7): 2550-2562

摘要: 【背景】羟基萘还原酶(hydroxynaphthalene reductase, HNR)是 1,8-间苯二酚(1,8-dihydroxynaphthalene, DHN)黑色素合成途径中起关键作用的酶, 研究表明 HNR 不仅参与真菌黑色素合成, 而且对其生长发育及致病性也具有一定的调控作用, 但 HNR 对真菌病原物侵染结构分化的调控研究鲜见报道。【目的】在对梨果黑斑病菌互隔交链孢(*Alternaria alternata*) HNR 的基因进行克隆与生物信息学分析的基础上, 通过药理学方法初步探讨 HNR 对 *A. alternata* 生长及侵染结构分化的调控作用, 为进一步揭示 HNR 在 *A. alternata* 侵染结构分化形成过程中的分子机制提供理论依据。【方法】对梨果黑斑病菌 *A. alternata* 的 2 个 *hnr* 基因进行了克隆; 通过 gene structure display server、open reading frame (ORF) Finder 及 conserved domain search 等数据库及相关软件, 对 *hnr* 基因及蛋白进行生物信息学分析, 并利用 HNR 特异性抑制剂三环唑处理分析其对 *A. alternata* 生长发育、黑色素合成和侵染结构形成的影响, 同时采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 技术分析 *hnr* 基因在 *A. alternata* 不同侵染结构分化时期的表达特性。【结果】从梨果黑斑病菌 *A. alternata* 克隆得到 2 个羟基萘还原酶基因 *hnr* 的编码区全长, 分别命名为 *Aa4hnr* 和 *Aa3hnr*, 其中 *Aa4hnr* 基因全长为 1 266 bp, 编码了 268 个氨基酸, 无内含子, 有 9 个 ORF; *Aa3hnr* 基因全长为 1 356 bp, 编码了 267 个氨基酸, 含有 2 个大小分别为 51 bp 和 49 bp 的内含子, 有 17 个 ORF; 进化分析表明, *Aa4hnr* 和 *Aa3hnr* 与 *Ophiobolus disseminans* 和 *Alternaria arborescens* 分别具有较高的一致性, 同时 *Aa4hnr* 和 *Aa3hnr* 编码的蛋白均含有 NAD(P)结合域, 属于短链脱氢酶/还原酶(short-chain dehydrogenase/reductase, SDR)家族。药理学结果表明, 三环唑处理显著降低了 *A. alternata* DHN 黑色素的生物合成, 抑制了疏水性诱导的 *A. alternata* 侵染结构的形成; 进一步分析 *Aa4hnr* 和 *Aa3hnr*

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目(31860456, 32060567)

Supported by: Regional Science Foundation Project of National Natural Science Foundation of China (31860456, 32060567)

*Corresponding author: E-mail: lyc@gsau.edu.cn

Received: 2021-11-09; Accepted: 2021-12-06; Published online: 2022-01-25

在疏水表面诱导的 *A. alternata* 孢子萌发阶段(2 h)、附着胞形成阶段(6 h)、侵染菌丝形成阶段(8 h)的基因表达量, *Aa4hnr* 的基因表达量在 *A. alternata* 侵染结构分化的各个时期均发生下调, *Aa3hnr* 在附着胞形成阶段(6 h)表达量下调, 然而在侵染菌丝形成阶段(8 h)显著上调表达。【结论】*Aa4hnr* 和 *Aa3hnr* 对梨果黑斑病菌侵染具有一定的调控作用。

关键词: 互隔交链孢; 羟基萘还原酶; 生物信息学分析; 表达分析; 侵染结构分化

Cloning of *hnr* and characterization of its regulatory role in the infection structure differentiation of *Alternaria alternata*

LI Rong, XU Wenyi, LI Yongcai*, BI Yang, ZHANG Miao, JIANG Qianqian, LIU Yongxiang

College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu, China

Abstract: [Background] Hydroxynaphthalene reductase (HNR), a key enzyme in the biosynthesis of 1,8-dihydroxynaphthalene (DHN) melanin, is involved in fungal melanin synthesis and has regulatory effect on the fungal growth and pathogenicity. However, the regulatory role of HNR in the infection structure differentiation of fungal pathogens remains unknown. [Objective] On the basis of the cloning and bioinformatics analysis of the *hnr* genes of *Alternaria alternata*, we preliminarily evaluated the regulatory role of HNR in the growth and infection structure differentiation of *A. alternata* through pharmacological methods, aiming to provide a theoretical basis for revealing the molecular mechanism of HNR regulating the infection structure differentiation of *A. alternata*. [Methods] The *hnr* genes were cloned by homologous cloning method, and the nucleotide and amino acid sequences were analyzed via bioinformatics tools including gene structure display server, open reading frame Finder, conserved domain search. The HNR-specific inhibitor tricyclazole was used for the study about the regulatory role of *hnr* in the growth and development, melanin synthesis, and infection structure formation of *A. alternata*. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was employed to determine the expression levels of *hnr* genes at the spore germination (2 h), appressorium formation (6 h), and hypha formation (8 h) stages throughout the infection structure differentiation of *A. alternata*. [Results] The full-length coding sequences (CDSs) of two *hnr* genes were cloned from *A. alternata* and designated as *Aa4hnr* and *Aa3hnr*. *Aa4hnr* had a length of 1 266 bp, encoded 268 amino acid residues, and contained 9 ORFs and no intron. *Aa3hnr*, with a length of 1 356 bp, encoded 267 residues and contained 2 introns (51 bp and 49 bp) and 17 ORFs. The phylogenetic analysis showed that *Aa4hnr* and *Aa3hnr* shared high homology with the *hnrs* from *Ophiobolus disseminans* and *Alternaria arborescens*, respectively. The presence of NAD(P) binding domain indicated that *Aa4hnr* and *Aa3hnr* belonged to the short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family. Tricyclazole treatment significantly reduced the DHN melanin synthesis in *A. alternata* and inhibited the infection structure formation of *A. alternata* on hydrophobic surface. The expression of *Aa4hnr* was down-regulated at all the stages of infection structure differentiation, and that of *Aa3hnr*

was down-regulated at the appressorium formation stage (6 h) while significantly up-regulated at the hypha formation stage (8 h). [Conclusion] *Aa4hnr* and *Aa3hnr* have some regulatory effects on infection of *A. alternata*.

Keywords: *Alternaria alternata*; hydroxynaphthalene reductase (HNR); bioinformatics analysis; expression analysis; infection structure differentiation

早酥梨(*Pyrus bretschneideri* ‘Zaosu’)是中国西北地区主要种植的梨品种,具有果大核小、果皮翠绿、质地酥脆、汁多味甜等特点,备受消费者的青睐^[1]。然而早酥梨采后贮藏期间品质劣变和腐烂比较严重,容易造成严重的经济损失,其中由互隔交链孢(*Alternaria alternata*)引起的黑斑病为主要的采后病害^[2]。*A. alternata*是一种常见的潜伏侵染真菌,广泛地存在于土壤、各种植物和腐烂的植物残骸中,可以侵染多种水果和蔬菜而引起黑斑病。*A. alternata*菌丝和孢子细胞壁中均可以产生黑色素,黑色素赋予病原真菌对紫外线等外源胁迫的抗性^[3-4],但在病原中的调控机制尚需进一步揭示。

黑色素是一种普遍存在于生物体的酚类聚合物疏水色素,主要分为 1,8-间苯二酚(1,8-dihydroxynaphthalene, DHN)和 3,4-二羟基苯丙氨酸(3,4-dihydroxyphenylalanine, L-DOPA)两种^[5]。子囊菌亚门和半知菌真菌如链格孢菌、灰霉菌、稻瘟病菌、玉米小斑病菌、炭疽菌、玉米大斑病菌、罗伯茨绿僵菌和大丽轮枝菌等均能合成 DHN 黑色素^[6]。植物病原真菌 DHN 黑色素底物为醋酸盐,首先由聚酮合酶(polyketide synthase, PKS)聚合后形成四羟基萘(1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene, 4HN),然后通过四羟基萘还原酶(1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene reductase, 4HNR)的脱氢反应生成小柱孢酮(scytalone),小柱孢酮脱水酶(scytalone dehydratase, SCD)继而脱水形成了三羟基萘(1,3,8-trihydroxynaphthalene, 3HN),再

由三羟基萘还原酶(1,3,8-trihydroxynaphthalene reductase, 3HNR)脱氢形成柱孢醌(vermelone, VER),小柱孢酮脱水酶再次脱水形成二羟基萘(1,8-dihydroxynaphthalene, 1,8-DHN),最后经过氧化反应聚合形成 DHN 黑色素^[7-10]。已有研究发现, DHN 黑色素可以有效清除羟自由基、活性氧自由基和 DPPH,也可以使生物体免受辐射伤害^[11]。同时,作为病原真菌产生的一种次级代谢产物,黑色素既可以增强病原菌抗逆能力,也与其致病性有关^[12]。

*hnr*基因参与了 DHN 黑色素生物合成途径中两步重要的还原脱氢反应,有研究表明, HNR 属于短链脱氢酶/还原酶(short-chain dehydrogenase/reductase, SDR)超家族,含有保守的辅酶结合位点与催化位点^[13],三环唑通过抑制 HNR 的活性成为 DHN 黑色素合成的特异性抑制剂之一。研究发现,在稻瘟病菌和烟曲霉中 *3hnr* 可以参与两步脱氢反应,但主要参与第二步脱氢反应, *4hnr* 只参与第一步脱氢反应;同时发现 *3hnr* 与 *4hnr* 均与致病力密切相关,还会降低附着胞的数量,从而影响穿透能力^[8,14-15]。在胡麻叶斑病菌中的研究发现, *4hnr* 基因突变体可以影响黑色素的合成并提高其应对紫外胁迫的能力^[16]。在灰葡萄孢中的研究发现, *4hnr* 基因突变体不影响菌丝的生长,但在培养后期会使菌核及分生孢子的颜色变为浅褐色,同时该基因对致病力也无影响^[17]。在番茄互隔交链孢中的研究发现, *3hnr* 基因突变体会影响分生孢子的大小、形状及颜色,降低抵抗紫外胁迫的

能力^[18]。在瓜类炭疽病菌中的研究发现, *3hnr* 基因突变体会影响致病力^[19]。综上所述, HNR 在真菌病原生长发育及致病性的调控方面具有多样性。

植物病原真菌首先通过孢子黏附在寄主表面, 感知并识别表皮物化信号后, 通过信号级联反应将信号传递下去, 从而激活侵染或致病相关基因的表达, 进而启动侵染过程。细胞信号传导通路包括 MAPK 级联信号通路、cAMP-PKA 信号途径、Ca²⁺信号传导和 G 蛋白耦联信号通路等。本实验室前期研究发现, 梨果黑斑病菌 *A. alternata* 中 MAPK 信号级联途径^[20]、cAMP-PKA^[21]和 Ca²⁺信号传导途径^[22]均参与了 *A. alternata* 响应果实表皮信号物质, 进而启动侵染结构分化的过程, 同时在实验中还发现信号途径相关基因进行敲除后, *A. alternata* 黑色素含量均产生了变化。为了阐明黑色素在 *A. alternata* 侵染结构形成过程中的调控作用, 本研究对梨果黑斑病菌 *A. alternata hnr* 基因进行克隆和生物信息学分析, 同时使用黑色素合成途径中 HNR 特异性抑制剂三环唑进行药理学实验, 并对其在侵染结构分化过程中的基因表达情况进行测定, 以期为进一步揭示 DHN 黑色素对 *A. alternata* 侵染结构分化调控的分子机制提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 供试菌株

A. alternata JT-03 菌株分离于早酥梨的病斑部位, 本实验室保存, 于马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 培养基上 28 °C 培养。

1.1.2 供试试剂

克隆载体 pClone007 Versatile Simple Vector Kit、DNA Marker 和大肠杆菌 DH5 α 感受态菌

于北京擎科生物科技有限公司; 胶回收试剂盒及 TRIzol 试剂均购自北京天根生化科技有限公司; cDNA 反转录试剂盒购于 TaKaRa 公司。

1.2 方 法

1.2.1 获取 *Aa4hnr* 和 *Aa3hnr* 基因序列

使用 NCBI 数据库查找得到 *A. alternata* (ID 登录号为 SRC11rK2f) 中 *Aa4hnr* 基因(基因登录号为 29116424)与 *Aa3hnr* 基因(基因登录号为 29117620)。

1.2.2 提取 RNA 及反转录 cDNA

样品总 RNA 的提取使用 TRIzol 试剂进行, 经过反转录后获得 cDNA, 具体步骤参照试剂说明书。

1.2.3 克隆 *Aa4hnr* 和 *Aa3hnr* 基因编码区(coding sequence, CDS)

根据已测序的 *A. alternata* (taxon: 5599, SRC11rK2f) 基因组序列, 使用软件 DNAMAN 6.0 分别设计 *4hnr* 和 *3hnr* 的扩增引物(表 1), 使用 *A. alternata* JT-03 的 cDNA 作为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(20 μ L): 2 \times Phanta Max Master Mix 10 μ L, cDNA 1 μ L, F/R 引物(10 μ mol/L) 各 0.5 μ L, ddH₂O 8 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 15 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1 kb/min, 33 个循环; 72 °C 5 min。PCR 反应结束后, 通过凝胶检测后进行胶回收, 将胶回收产物与 pClone007 Versatile Simple Vector Kit 载体连接后进行测序。

表 1 *Aa4hnr* 和 *Aa3hnr* 基因扩增引物

Table 1 Primers used for amplification of *Aa4hnr* and *Aa3hnr* genes

基因	序列	长度
Gene	Sequence (5'→3')	Length (bp)
<i>Aa4hnr</i>	F: ATGGTCATCAACGTGCCCA	1 266
	R: TTACTGCGACGAGCCACCAG	
<i>Aa3hnr</i>	F: ATGGCATCAATCGAGCAGAC	1 356
	R: TTACATGCAAGCAGCGCC	

1.2.4 *Aa4hnr* 和 *Aa3hnr* 基因的生物信息学分析

使用 NCBI 数据库中 BLAST 在线分析工具, 对氨基酸序列的同源性进行分析, 并下载其他真菌中 *4hnr* 和 *3hnr* 编码蛋白的氨基酸序列, 利用 MEGA 7.0 软件使用邻近法构建系统发育树, bootstrap 值设定为 1 000; 通过在线分析工具 gene structure display server (GSDS) 分析基因的结构; 利用 ORF Finder 预测 DNA 序列开放阅读框(open reading frame, ORF); 采用 SOPMA 预测蛋白二级结构; 通过 conserved domain search 软件分析 *Aa4hnr* 和 *Aa3hnr* 基因保守结构域, 相关预测网址汇总见表 2。

1.2.5 配制孢子悬浮液

参照高春丽等^[23]配制孢子悬浮液的方法并稍做修改, 在无菌操作台中, 将 10 mL 无菌水加入培养了 5 d 的 *A. alternata* JT-03 中, 使用无菌涂布器轻轻刮取培养基表面, 用四层无菌纱布过滤除去菌丝后收集至 50 mL 无菌离心管中。振荡均匀后, 吸取 20 μ L 孢子悬液滴加在血球计数板上, 放置于光学显微镜下进行镜检计数, 最终配制浓度为 1×10^5 spores/mL。

1.2.6 三环唑处理对 *A. alternata* 菌落形态的影响

菌落形态观察参照刁春英等^[24]的方法并做修改。经过前期的浓度筛选工作, 称取 3 mg 三环唑溶解于 100 μ L DMSO, 经无菌 0.22 μ m 有

机膜过滤除菌后, 加入 100 mL 已灭菌的 PDA 培养基, 使得最终浓度为 30 μ g/mL。经过混合均匀后倒入直径为 7 cm 的培养皿。等培养基凝固后接种培养了 6 d 后的 *A. alternata* JT-03 孢子悬浮液 2 μ L, 然后在 28 $^{\circ}$ C 的条件下恒温培养, 每天拍照记录菌落形态、测量菌落直径, 添加等量的 DMSO 作为对照处理。每个处理 3 个平行, 重复 3 次。

1.2.7 三环唑处理对黑色素含量的影响

参照张苗^[21]的方法进行黑色素的提取、纯化与测定。

1.2.8 三环唑处理对 *A. alternata* 侵染结构形成的影响

将浓度为 1×10^5 spores/mL 的 *A. alternata* 孢子悬浮液(1 mL)以 5 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 向沉淀物中加入 1 mL 终浓度为 30 μ g/mL 的三环唑溶液。吸取 20 μ L 孢子悬液滴加到置于载玻片上方的疏水膜, 并将其放置于铺有潮湿滤纸的玻璃培养皿, 在 28 $^{\circ}$ C 培养条件下分别于 2、4、6、8 h 使用染色液乳酸酚棉兰染色后, 通过光学显微镜计数计算孢子萌发率及附着胞形成率。每个处理 3 个平行, 每次计数 100 个分生孢子。

1.2.9 三环唑处理对 *A. alternata* 致病性的影响

挑选大小均一、无机械伤的早酥梨, 使用 0.1%次氯酸钠水溶液浸泡 2 min 消毒, 再次用

表 2 在线预测软件网址

Table 2 Online prediction software website

Online software	Internet site	Use
GSDS 2.0	http://gsds.cbi.pku.edu.cn/chinese.php?input=se	基因结构
ORF Finder	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder	Genestructure 开放阅读框
SOPMA	http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html	Open reading frame 蛋白二级结构
Conserved domain search	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/	Protein secondary structure 保守结构域 Conserved domain

清水进行冲洗, 置于室温条件下晾干。用 75% 乙醇沿梨果实赤道部位擦拭后, 使用接种钉(直径为 3 mm, 深 3 mm)沿赤道部位均匀打 3 个孔, 每孔内接 20 μ L 浓度为 30 μ g/mL 三环唑处理的 *A. alternata* JT-03 孢子悬浮液, 室温放置 2 h, 装入干净的保鲜盒进行贮藏。接种后从第 3 天开始每间隔 3 d 测量果实表面的病斑直径, 拍照记录果实病斑扩展情况。每个处理使用 9 个果实测定, 重复 3 次。

1.2.10 *Aa4hnr* 和 *Aa3hnr* 基因在 *A. alternata* 侵染结构分化中的表达分析

将浓度为 1×10^6 spores/mL 的 *A. alternata* 孢子悬浮液振荡后滴加在疏水膜上, 分别在 28 $^{\circ}$ C 培养 2、6、8 h 后取样。提取样品 RNA, 具体操作步骤参照 1.2.2 进行。根据 *Aa4hnr* 和 *Aa3hnr* 基因序列, 使用 Premier 5 设计实时荧光定量引物, 见表 3。使用 RT-qPCR 技术分析 *Aa4hnr* 和 *Aa3hnr* 基因在侵染结构不同分化时期的表达量变化情况。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 40 s, 40 个循环。反应体系 (20 μ L): Master Mix 10 μ L, 引物 F/R (10 μ mol/L) 各 0.5 μ L, cDNA 1 μ L, ddH₂O 8 μ L。各基因转录水平分别用内参基因 *GAPDH* 调平, 每个样品 3 个平行, 结果均以 2 h 基因表达量为对照, 数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 公式进行分析。

1.3 数据处理

实验数据以平均值 \pm 标准差(mean \pm SD)表示, 作图软件使用 Origin 8.0; 数据方差分析软

件使用 SPSS 20.0, 差异分析使用单因素方差分析(one-way ANOVA)和邓肯氏(Duncan's)多重比较, 在 $P=0.05$ 水平上进行差异显著检测。

2 结果与分析

2.1 *Aa4hnr* 和 *Aa3hnr* 基因的克隆

从梨果黑斑病菌 *A. alternata* 中提取总 RNA, 进行反转录生成 cDNA, 使用引物对 *Aa4hnr*-F/R、*Aa3hnr*-F/R 进行目的基因的扩增, 产物的凝胶电泳鉴定结果如图 1 所示, 对 PCR 扩增产物进行胶回收测序, 比对后得到长度分别为 807、804 bp 的 *Aa4hnr*、*Aa3hnr* 基因的 cDNA 序列, 它们分别编码 268、267 个氨基酸。

2.2 *Aa4hnr* 和 *Aa3hnr* 基因的生物信息学分析

2.2.1 构建 *Aa4hnr* 和 *Aa3hnr* 基因系统发育树

将 *Aa4hnr* 和 *Aa3hnr* 基因通过软件 DNAMAN 翻译成氨基酸序列, 利用 NCBI 数据库下载其他真菌的 *4hnr* 和 *3hnr* 基因序列, 通过邻近法进行系统发育树的构建。由图 2 可知, *Aa4hnr* 与 *Ophiobolus disseminans* 的 *4hnr* 基因具有较高的一致性, 位于同一个分支, 亲缘关系较近, *Aa3hnr* 与 *Alternaria arborescens* 的 *3hnr* 基因具有较高的相似性, 位于同一个分支, 亲缘关系较近, 但是这 2 个基因不属于同一个还原酶基因类群。

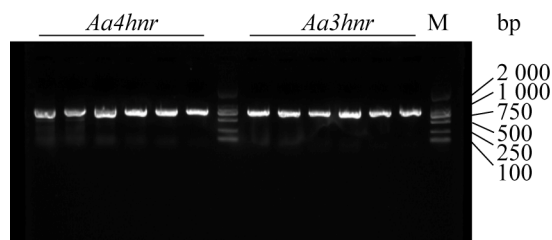


图 1 *Aa4hnr* 和 *Aa3hnr* 基因扩增电泳图
Figure 1 Amplification electrophoretogram of *Aa4hnr* and *Aa3hnr* genes. M: DL2000 DNA Marker.

表 3 定量目的基因引物序列设计

Table 3 Primers used for real-time PCR of target genes

基因 Gene	序列 Sequence (5'→3')
<i>Aa4hnr</i>	F: CATTGAAACGGGACTGC
	R: TCCGAAGAAACGAACACC
<i>Aa3hnr</i>	F: CGACATCTGCTGCTCAAACCTC
	R: CCTCTTGACGCCGCCTTA

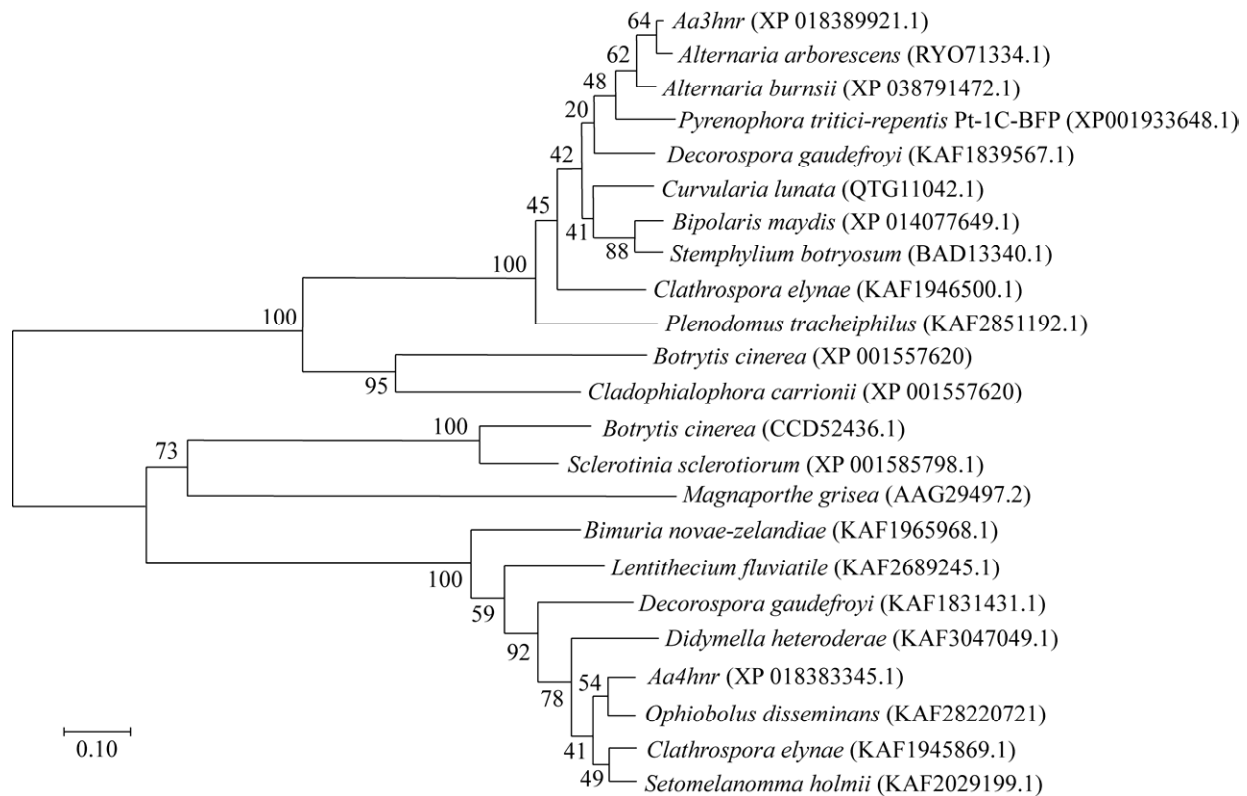


图 2 *Aa3HNR* 和 *Aa4HNR* 与其他真菌 *HNR* 同源蛋白的系统发育分析 括号中为不同真菌 *HNR* 蛋白登录号; 距离标尺表示为单位长度置信值; 分支节点上的数字为 bootstrap 自展值

Figure 2 Phylogenetic analysis of *Aa3HNR* and *Aa4HNR* and other fungal *HNR* homologous proteins. The accession numbers of different fungal *HNR* protein are in parentheses; At the branch nodes are 1 000 bootstrap replicates represented as percentage values; The distance scale is expressed as the confidence value of unit length.

2.2.2 *Aa4hnr* 和 *Aa3hnr* 基因序列及结构分析

使用在线软件 GSDS 2.0 分析测序结果可知, *Aa4hnr* 基因全序列长度为 1 266 bp, CDS 长度为 1 266 bp, 编码 268 个氨基酸, 不含有内含子。使用 ORF Finder 软件分析 *Aa4hnr* 基因开放阅读框, 发现共有 9 个 ORF。*Aa3hnr* 基因全序列长度为 1 356 bp, CDS 长度为 1 256 bp, 编码了 267 个氨基酸, 含有 2 个大小分别为 51 bp 和 49 bp 的内含子, 有 17 个开放阅读框。

2.2.3 *Aa4hnr* 和 *Aa3hnr* 基因编码产物的二级结构分析

采用在线软件 SOPMA 对 *Aa4hnr* (图 3A) 和 *Aa3hnr* (图 3B) 基因编码产物的二级结构进行

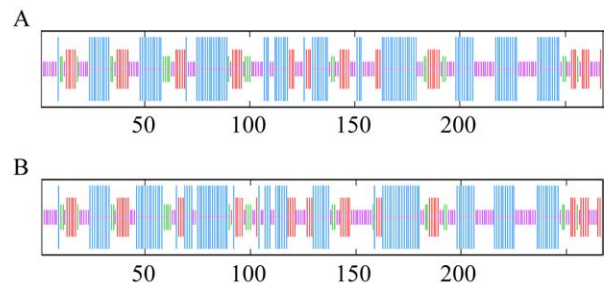


图 3 *Aa4hnr* (A) 和 *Aa3hnr* (B) 编码蛋白的二级结构分析 蓝色: α 螺旋; 紫色: 无规则卷曲; 绿色: β 转角; 红色: 延伸链

Figure 3 Secondary structure analysis of *Aa4hnr* (A) and *Aa3hnr* (B) gene coding protein. Blue: Alpha helix; Purple: Random coil; Green: Beta turn; Red: Extended strand.

预测, 编码产物由蓝、红、绿和紫代表的元件组成。*Aa4hnr* 基因编码产物含有 40.3% α 螺旋(alpha helix)、32.84% 无规则卷曲(random coil)、18.66% 延伸链(extended strand)和 8.21% β 转角(beta turn)。*Aa3hnr* 基因编码产物含有 41.95% α 螺旋、31.09% 无规则卷曲、18.35% 延伸链和 8.61% β 转角。*Aa4hnr* 和 *Aa3hnr* 编码产物主要的二级结构元件均为 α 螺旋与无规则卷曲。

2.2.4 *Aa4hnr* 和 *Aa3hnr* 基因保守结构域分析
 通过 conserved domain search 软件分析可知, *Aa4hnr* (图 4A) 和 *Aa3hnr* (图 4B) 所编码的蛋白均含有 NAD(P) 结合域, 这个结构域保守性很强, 存在于如糖酵解和许多其他氧化还原酶的代谢途径中。此外, 2 个还原酶均属于 SDR 家族。

2.3 三环唑处理对 *A. alternata* 菌落形态产生影响

由图 5A 可知, 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 三环唑处理后 *A. alternata* 菌落的颜色产生了明显的变化, 从墨绿色变为红褐色, 同时黑色素的合成也显著被抑制(图 5B), 处理组黑色素的含量仅为对照组的 66.5%, 且三环唑处理对 *A. alternata* 菌丝扩展具有抑制作用(图 5C)。

2.4 三环唑处理抑制 *A. alternata* 侵染结构的形成

由图 6 可知, 虽然随着培养时间的延长 *A. alternata* 的孢子萌发, 附着胞形成率均呈现上升趋势, 但三环唑处理明显抑制了 *A. alternata* 分生孢子在疏水表面的萌发率(图 6A)与附着胞的形成率(图 6B)。在培养 2 h 时, 处理组的孢子

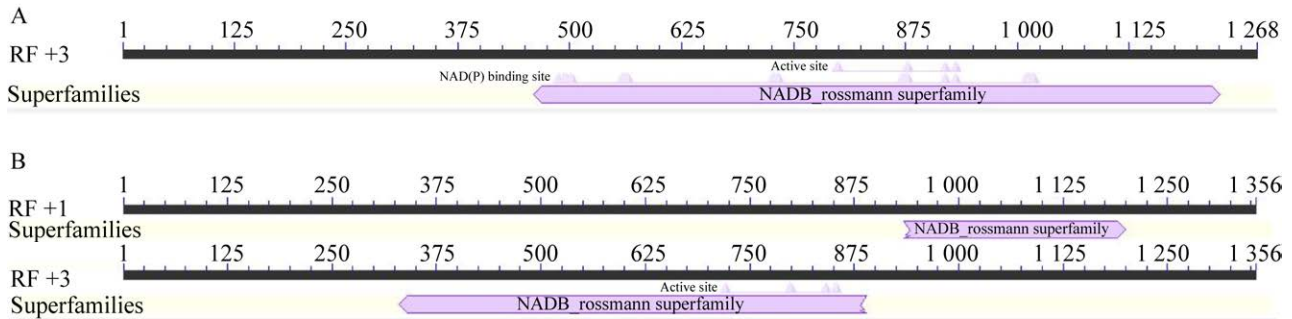


图 4 *Aa4hnr* (A) 和 *Aa3hnr* (B) 基因保守结构域
 Figure 4 Conserved domain of *Aa4hnr* (A) and *Aa3hnr* (B) genes.

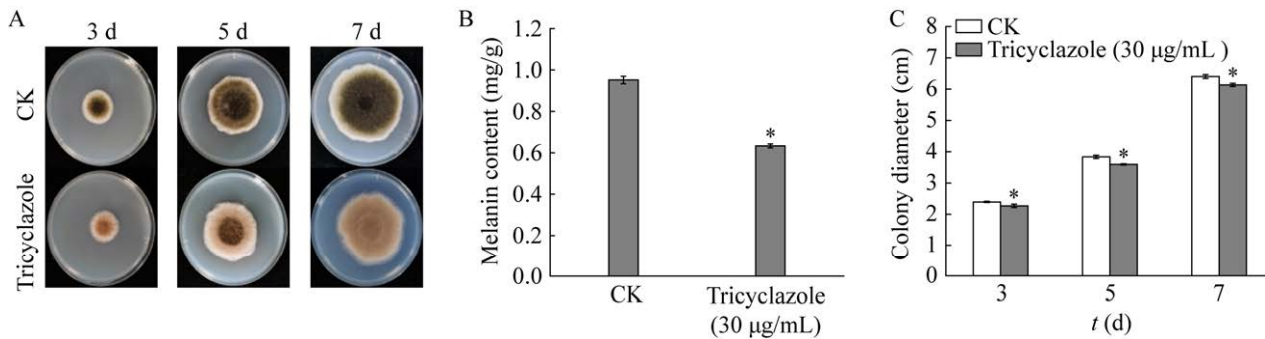


图 5 三环唑处理对 *A. alternata* 菌落形态(A)、黑色素含量(B)和菌丝生长(C)的影响
 Figure 5 The effect of tricyclazole treatment on morphology (A), melanin content (B) and mycelium growth (C) of *A. alternata*. *: $P < 0.05$. The same below.

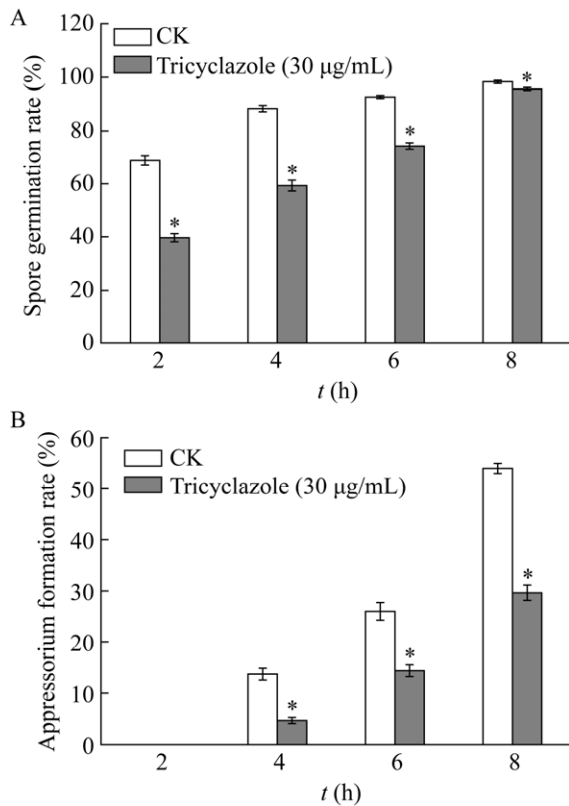


图6 三环唑处理对 *A. alternata* 在疏水表面上孢子萌发率(A)和附着胞形成率(B)的影响

Figure 6 The effect of tricyclazole treatment on spore germination (A) and appressorium formation (B) of *A. alternata* on hydrophilic surface.

萌发率仅为对照组的 57.5%；而在培养 4 h 时，处理组的附着胞形成率仅为对照组的 34.3%。

2.5 三环唑处理降低了 *A. alternata* 的致病性

三环唑处理显著抑制了损伤接种 *A. alternata* 的早酥梨黑斑病的扩展(图 7)。虽然随着贮藏时间的延长果实病斑直径逐渐增加,但三环唑处理的病斑直径显著小于对照组($P < 0.05$),在第 6 天时,处理组的病斑直径仅为对照组的 73.5% (图 7B)。

2.6 *Aa4hnr* 和 *Aa3hnr* 在 *A. alternata* 侵染结构分化中的基因表达分析

为了解 *hnr* 基因在 *A. alternata* 侵染结构不同分化阶段的表达情况,提取 *A. alternata* 总

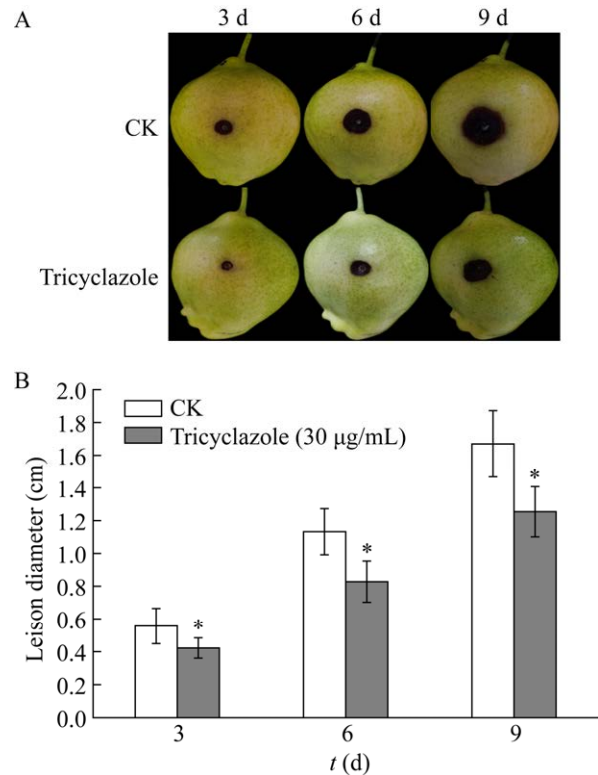


图7 三环唑处理对果实的病害扩展(A)和病斑直径(B)的影响

Figure 7 The effect of tricyclazole treatment on lesion morphology (A) and lesion diameter (B) of the fruit.

RNA,通过 RT-qPCR 分析在疏水诱导 *A. alternata* 侵染结构分化过程中的基因表达情况,结果表明, *Aa4hnr* 和 *Aa3hnr* 在 *A. alternata* 侵染结构分化的不同阶段表达存在差异。 *Aa4hnr* 基因在 *A. alternata* 侵染结构分化的各个时期表达量均发生下调(图 8A), *Aa3hnr* 基因的表达量在附着胞形成阶段(6 h)下调,而在侵染菌丝形成阶段(8 h)显著上调表达(图 8B)。

3 讨论

本研究从梨果黑斑病菌中克隆得到了羧基萘还原酶基因 *Aa4hnr* 和 *Aa3hnr*, 序列分析表明它们都属于 SDR 家族,两者有共同的保守

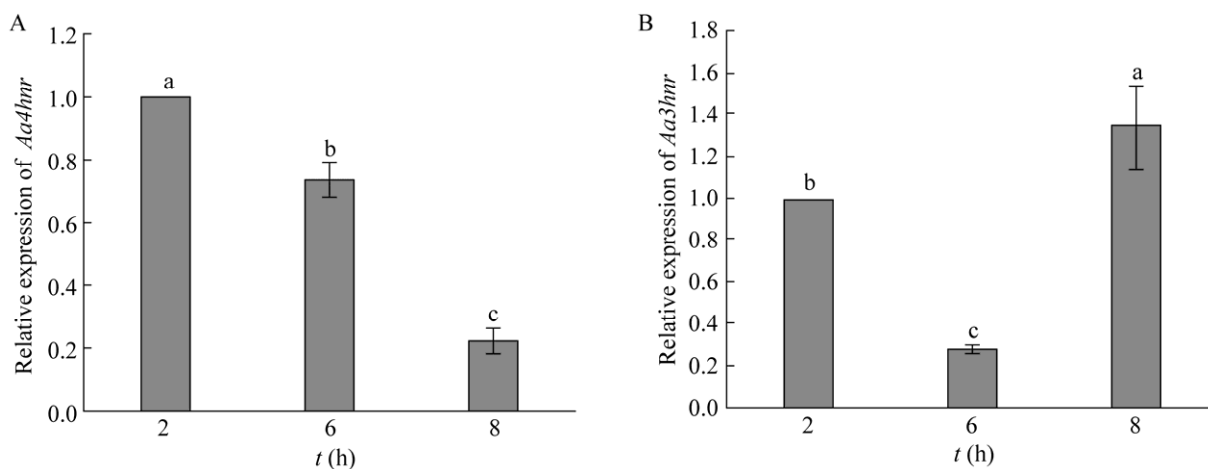


图8 *Aa4hnr* (A)和 *Aa3hnr* (B)在疏水诱导 *A. alternata* 侵染结构分化中的表达水平 不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)

Figure 8 Relative expression analysis of *Aa4hnr* (A) and *Aa3hnr* (B) in *A. alternata* under hydrophilic surface. Different lowercase letters mean significant difference ($P<0.05$).

结构域, 但通过 DNAMAN 软件对编码产物的氨基酸序列进行对比发现, *A. alternata* 中这 2 个基因的氨基酸序列相似性仅为 45.9%, 同样地, 在稻瘟病菌^[8]、玉米大斑病菌^[25]和里氏木霉^[26]中这 2 个基因编码的蛋白质序列的相似性也分别仅为 46%、45.9%和 44%, 表明 4HNR 和 3HNR 这 2 个酶分别属于不同的还原酶类群。郭欣欣^[27]在玉米大斑病菌证实了 St4HNR 和 St3HNR 分别属于不同的还原酶类群, 可见其蛋白序列及结构差异可能是导致其功能差异的原因。

羟基萘还原酶专一性抑制剂三环唑处理显著抑制了 *A. alternata* 黑色素的合成(图 5B), 同样有研究发现, 三环唑处理对深色有隔内生真菌 (dark septate endophytic species)^[28]、大丽轮枝菌 (*Verticillium dahliae*)^[29]、稻瘟病菌 (*Magnaporthe oryzae*)^[30]和桑椹菌核病菌 (*Sclerotinia shiraiana*)^[13] 的黑色素生物合成均有抑制作用, 进一步证实了羟基萘还原酶是 DHN 黑色素合成途径中的关键作用酶。同时本研究还发现, 三环唑处理

显著抑制了疏水性诱导的 *A. alternata* 孢子萌发和附着胞形成(图 6), 在球毛壳菌 (*Chaetomium globosum*)^[31] 研究中发现, 使用三环唑处理后降低了产孢量与孢子的萌发率。何玉莲等^[32]还发现, 三环唑处理玉米大斑病菌 (*Setosphaeria turcica*) 后, 附着胞的膨压和穿透率下降, 导致致病菌致病力下降。另外, Kong 等^[33]研究发现, 使用 3 mg/L 三环唑处理刺孢曲霉 (*Aspergillus aculeatus*) 后其孢子萌发受到了抑制。遗传学实验还表明, 在玉米大斑病菌 (*Setosphaeria turcica*) 中, *St4hnr* 与 *St3hnr* 缺失会降低附着胞的穿透率, 从而影响病原菌的穿透能力^[27]; 在新月弯孢霉 (*Curvularia lunata*) 中 *3hnr* 基因缺失会导致其致病性降低^[34]。然而在核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 中 *3hnr* 基因缺失会导致菌丝生长缓慢、生物量减少、菌丝发育受损及对紫外线的抗性降低等现象, 但对病原菌的致病性无影响^[35]。上述实验表明, *hnr* 可通过调节真菌病原物黑色素的合成而调节其侵染和致病过程, 但对在不同病原物中的调控作用存在差异。本

实验发现,在疏水诱导 *A. alternata* 侵染结构分化过程中, *Aa4hnr* 与 *Aa3hnr* 的表达存在显著差异,我们初步分析,一方面因其催化的反应不同, *3hnr* 参与黑色素合成的两步脱氢反应, *4hnr* 只参与第一步脱氢反应;另外,在玉米大斑病菌中发现, *3hnr* 与 *4hnr* 在功能上有互相补充的作用,发现 *4hnr* 基因缺失后 *3hnr* 基因表达量与野生型相近,表明 *3hnr* 起主要的作用^[25],这与我们的研究结果基本一致,但是关于 HNR 调控侵染结构分化的分子机制及 *Aa4hnr* 和 *Aa3hnr* 在外界刺激后的时空表达特性,尚需进一步从分子水平揭示。

4 结论

从梨果黑斑病菌中克隆得到了 2 个羟基萘还原酶基因 *Aa4hnr* 和 *Aa3hnr*, 其基因全长分别为 1 266 bp 和 1 356 bp, 编码的氨基酸分别为 268 个和 267 个; 其编码的蛋白均含有 NAD(P)结合域, 属于 SDR 家族。羟基萘还原酶专一性抑制剂三环唑处理抑制了 *A. alternata* 的生长发育、黑色素合成及侵染结构的形成; 同时还发现 *Aa4hnr* 和 *Aa3hnr* 参与了疏水界面诱导下 *A. alternata* 侵染结构的分化过程, 但其分子调控机制尚需进一步揭示。

REFERENCES

- [1] 李永才, 毕阳. 苹果梨黑斑病菌潜伏侵染的组织学研究[J]. 甘肃农业大学学报, 2005, 40(4): 516-520
Li YC, Bi Y. Histopathological study on latent infection of *Alternaria alternata* in *Pyrus bretschneideri*[J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2005, 40(4): 516-520 (in Chinese)
- [2] Kustrzeba-Wójcicka I, Siwak E, Terlecki G, Wolańczyk-Mędrala A, Mędrala W. *Alternaria alternata* and its allergens: a comprehensive review[J]. Clinical Reviews in Allergy & Immunology, 2014, 47(3): 354-365
- [3] Thomma BPHJ. *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite[J]. Molecular Plant Pathology, 2003, 4(4): 225-236
- [4] Peng QQ, Li YQ, Deng LD, Fang JS, Yu X. High hydrostatic pressure shapes the development and production of secondary metabolites of Mariana Trench sediment fungi[J]. Scientific Reports, 2021, 11: 11436
- [5] Bell AA, Wheeler MH. Biosynthesis and functions of fungal melanins[J]. Annual Review of Phytopathology, 1986, 24: 411-451
- [6] Henson JM, Butler MJ, Day AW. The dark side of the mycelium: melanins of phytopathogenic fungi[J]. Annual Review of Phytopathology, 1999, 37: 447-471
- [7] Loppnau P, Tanguay P, Breuil C. Isolation and disruption of the melanin pathway polyketide synthase gene of the softwood deep stain fungus *Ceratocystis resinifera*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2004, 41(1): 33-41
- [8] Thompson JE, Fahnestock S, Farrall L, Liao DI, Valent B, Jordan DB. The second naphthol reductase of fungal melanin biosynthesis in *Magnaporthe grisea*: tetrahydroxynaphthalene reductase[J]. Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(45): 34867-34872
- [9] Funa N, Funabashi M, Ohnishi Y, Horinouchi S. Biosynthesis of hexahydroxyperylenequinone melanin via oxidative aryl coupling by cytochrome P-450 in *Streptomyces griseus*[J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(23): 8149-8155
- [10] Langfelder K, Streibel M, Jahn B, Haase G, Brakhage AA. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi[J]. Fungal Genetics and Biology, 2003, 38(2): 143-158
- [11] 苏玉春, 陈光, 汪树生, 马骁. 黑豆色素的稳定性研究[J]. 吉林农业科学, 2008, 33(6): 94-96
Su YC, Chen G, Wang SS, Ma X. Studies on stability of black-soybean pigment[J]. Journal of Jilin Agricultural Sciences, 2008, 33(6): 94-96 (in Chinese)
- [12] 吴斌, 韦建福. 病原真菌黑色素和毒力之间的关系[A]//中国植病、菌物学会杭州联合年会论文集[C]. 杭州: 中国植病、菌物学会杭州联合年会, 2008
Wu B, Wei JF. Relationships between melanin and virulence of pathogenic fungi[A]. Proceedings of Annual Meeting of Chinese Society of Phytopathology and Fungi[C]. Hangzhou: Annual Meeting of Chinese Society of Phytopathology and Fungi, 2008 (in Chinese)
- [13] 康鑫, 吕志远, 黄艳, 向仲怀, 何宁佳. 桑椹菌核病菌(*Sclerotium shiraiana*)黑色素生物合成相关基因的克隆与功能分析[J]. 植物病理学报, 2017, 47(4):

- 495-504
Kang X, Lü ZY, Huang Y, Xiang ZH, He NJ. Cloning and functional analysis of the melanin biosynthesis gene in *Scleromitrua shiraiana*[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2017, 47(4): 495-504 (in Chinese)
- [14] Tsuji G, Sugahara T, Fujii I, Mori Y, Ebizuka Y, Shiraishi T, Kubo Y. Evidence for involvement of two naphthol reductases in the first reduction step of melanin biosynthesis pathway of *Colletotrichum lagenarium*[J]. Mycological Research, 2003, 107(7): 854-860
- [15] Youngchim S, Morris-Jones R, Hay RJ, Hamilton AJ. Production of melanin by *Aspergillus fumigatus*[J]. Journal of Medical Microbiology, 2004, 53(Pt 3): 175-181
- [16] Tanaka N, Haruki Y, Ueno M, Arase S, Kihara J. Expression of *T4HR1*, a 1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene reductase gene involved in melanin biosynthesis, is enhanced by near-ultraviolet irradiation in *Bipolaris oryzae*[J]. Advances in Microbiology, 2015, 5(3): 166-176
- [17] 周映君, 张静, 杨龙, 吴明德, 李国庆. 灰葡萄孢 1,3,6,8-四羟基萘还原酶基因(*bcbn2*)功能验证[A]//中国植物病理学会 2015 年学术年会论文集[C]. 海口: 中国植物病理学会 2015 年学术年会, 2015
Zhou YJ, Zhang J, Yang L, Wu MD, Li GQ. Functional verification of 1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene reductase gene (*bcbn2*) in *Botrytis cinerea*[A]// Proceedings of the Annual Meeting of Chinese Society for Plant Pathology[C], Haikou: Annual Meeting of Chinese Society for Plant Pathology, 2015 (in Chinese)
- [18] Kheder AA, Akagi Y, Akamatsu H, Yanaga K, Maekawa N, Otani H, Tsuge T, Kodama M. Functional analysis of the melanin biosynthesis genes *ALM1* and *BRM2-1* in the tomato pathotype of *Alternaria alternata*[J]. Journal of General Plant Pathology, 2012, 78(1): 30-38
- [19] Perpetua NS, Kubo Y, Yasuda N, Takano Y, Furusawa I. Cloning and characterization of a melanin biosynthetic *THR1* reductase gene essential for appressorial penetration of *Colletotrichum lagenarium*[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1996, 9(5): 323-329
- [20] 王调兰. Hog1、Slr2-MAP 激酶对梨果蜡质及疏水性诱导 *Alternaria alternata* 侵染结构分化的调控作用[D]. 兰州: 甘肃农业大学硕士学位论文, 2020
Wang TL. Regulation role of Hog1 and Slr2 MAP kinases on infection structural differentiation of *Alternaria alternata* induced by pear cuticular wax and hydrophobicity[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Gansu Agricultural University, 2020 (in Chinese)
- [21] 张苗. cAMP-PKA 信号途径调控梨果皮蜡质物化信号诱导 *Alternaria alternata* 侵染结构分化的分子机制[D]. 兰州: 甘肃农业大学硕士学位论文, 2020
Zhang M. Molecular regulatory mechanism of cAMP-PKA signaling pathway on infection structure differentiation of *Alternaria alternata* induced by physicochemical signals from pear fruit cuticular wax[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Gansu Agricultural University, 2020 (in Chinese)
- [22] 黄怡. 梨果黑斑病菌磷脂酶 C 生物学功能及其调控果皮物化信号诱导附着胞形成的分子机制[D]. 兰州: 甘肃农业大学硕士学位论文, 2021
Huang Y. Biological function analysis of phospholipase C in *Alternaria alternata* and its molecular regulatory mechanism on appressorium formation induced by peel physicochemical signals[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Gansu Agricultural University, 2021 (in Chinese)
- [23] 高春丽, 李永才, 毕阳, 刘筱, 杨兰, 乔文景, 王迪, 唐瑛. 采后亚硒酸钠处理对杏果黑斑病的控制及贮藏品质的影响[J]. 食品科学, 2016, 37(14): 258-263
Gao CL, Li YC, Bi Y, Liu X, Yang L, Qiao WJ, Wang D, Tang Y. Effects of sodium selenite treatment on black spot disease and storage quality of postharvest apricot fruit[J]. Food Science, 2016, 37(14): 258-263 (in Chinese)
- [24] 刁春英, 毕阳, 李永才. 壳聚糖对互隔交链孢菌 (*Alternaria alternata*) 的离体抑制作用[J]. 中国农学通报, 2010, 26(10): 91-94
Diao CY, Bi Y, Li YC. The inhibition of chitosan on *Alternaria alternata* *in vitro*[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2010, 26(10): 91-94 (in Chinese)
- [25] 何玉莲. 玉米大斑病菌 St3HNR 与 St4HNR 间功能互补关系研究[D]. 保定: 河北农业大学硕士学位论文, 2014
He YL. The functional complement relationship between St4HNR and St3HNR in *Setosphaeria turcica*[D]. Baoding: Master's Thesis of Hebei Agricultural University, 2014 (in Chinese)
- [26] 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: 河北农业大学博士学位论文, 2009
Cao ZY. Characterization and function analysis of the genes involved in melanin biosynthesis pathway in the phytopathogenic fungus *Setosphaeria turcica*[D]. Baoding: Doctoral Dissertation of Hebei Agricultural

- University, 2009 (in Chinese)
- [27] 郭欣欣. 玉米大斑病菌 *St4HNR* 与 *St3HNR* 基因在黑素合成中的作用研究[D]. 保定: 河北农业大学硕士学位论文, 2012
- Guo XX. Functional analysis of the melanin biosynthesis genes *St4HNR* and *St3HNR* in *Setosphaeria turcica*[D]. Baoding: Master's Thesis of Hebei Agricultural University, 2012 (in Chinese)
- [28] Berthelot C, Zegeye A, Gaber DA, Chalot M, Franken P, Kovács GM, Leyval C, Blaudez D. Unravelling the role of melanin in Cd and Zn tolerance and accumulation of three dark septate endophytic species[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(4): 537
- [29] Li JJ, Zhou L, Yin CM, Zhang DD, Klosterman SJ, Wang BL, Song J, Wang D, Hu XP, Subbarao KV, et al. The *Verticillium dahliae* Sho1-MAPK pathway regulates melanin biosynthesis and is required for cotton infection[J]. *Environmental Microbiology*, 2019, 21(12): 4852-4874
- [30] 黄星, 周明国, 张传清, 傅峰, 张永慧. 三环唑防治稻瘟病的应用技术及防效影响因素研究[J]. *农药学报*, 2005, 7(2): 131-134
- Huang X, Zhou MG, Zhang CQ, Fu F, Zhang YH. Study on application techniques of tricyclazole and the influence factors on its control effect against rice blast[J]. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2005, 7(2): 131-134 (in Chinese)
- [31] Hu Y, Hao XR, Lou J, Zhang P, Pan J, Zhu XD. A PKS gene, *pks-1*, is involved in chaetoglobosin biosynthesis, pigmentation and sporulation in *Chaetomium globosum*[J]. *Science China Life Sciences*, 2012, 55(12): 1100-1108
- [32] 何玉莲, 李秀辉, 孟庆江, 陶晔, 王绍新, 贾慧, 曹志艳. 三环唑影响玉米大斑病菌致病力的机制[J]. *玉米科学*, 2015, 23(3): 149-153
- He YL, Li XH, Meng QJ, Tao B, Wang SX, Jia H, Cao ZY. Mechanism of tricyclazole effect on *Setosphaeria turcica* pathogenicity[J]. *Journal of Maize Sciences*, 2015, 23(3): 149-153 (in Chinese)
- [33] Kong Q, Yu X, Song D, Ren XY. Effect of tricyclazole on morphology, virulence and gene expression of *Aspergillus aculeatus* for management of soft rot disease in peach[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2018: 2018 Aug 21
- [34] Zhang L, Li H, Xiao SQ, Lu YY, Li GF, Xue CS, Chen J. Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated target gene disruption in the maize pathogen *Curvularia lunata*[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2016, 145(1): 155-165
- [35] Liang Y, Xiong W, Steinkellner S, Feng J. Deficiency of the melanin biosynthesis genes *SCD1* and *THR1* affects sclerotial development and vegetative growth, but not pathogenicity, in *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2018, 19(6): 1444-1453