

过氧化氢酶基因 *CsKat01* 与柑橘溃疡病相关性分析

祁静静, 秦秀娟, 谢宇, 陈善春, 何永睿*, 李强*

(西南大学/中国农业科学院柑桔研究所, 重庆 400712)

摘要: 为了探究过氧化氢酶基因 *CsKat01* 在柑橘抵御溃疡病过程中的作用, 对感病品种‘晚锦橙’和抗病品种‘四季橘’中 *CsKat01* 进行了生物信息和表达分析, 并探究了溃疡病菌接种处理后两品种中 CAT 酶活性和 H_2O_2 含量的关系。克隆 *CsKat01* 的编码序列并对该基因及其编码蛋白进行结构和功能分析, 发现 *CsKat01* 编码框全长为 1 482 bp, 共编码 493 个氨基酸残基, 蛋白序列中含有典型的 CAT 结构域; 通过启动子序列克隆和分析发现‘晚锦橙’和‘四季橘’核心启动子区域均含有水杨酸、茉莉酸和脱落酸的响应元件, 但数量不同; 利用 qRT-PCR 分析水杨酸、茉莉酸、脱落酸和柑橘溃疡病菌 (*Xcc*) 对 *CsKat01* 的诱导表达特性, 发现 *CsKat01* 的高表达可能使柑橘相对更感病; 结合 *Xcc* 诱导后植物组织中 *CsKat01* 酶活性和 H_2O_2 含量, 综合分析 *CsKat01*、CAT 酶活、 H_2O_2 含量和柑橘对溃疡病抗性之间的关系, 推测 *CsKat01* 基因可能通过调控 CAT 的酶活性, 改变 H_2O_2 含量进而影响柑橘对溃疡病的抗性。

关键词: 柑橘; 溃疡病; 过氧化氢酶; *CsKat01*; 过氧化氢

中图分类号: S 666

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2021) 01-0026-11

Correlation Analysis of Citrus Catalase Gene *CsKat01* and Citrus Canker Disease

QI Jingjing, QIN Xiujuan, XIE Yu, CHEN Shanchun, HE Yongrui*, and LI Qiang*

(Citrus Research Institute, Southwest University/Chinese Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 400712, China)

Abstract: In order to investigate the correlation between *CsKat01* and citrus bacterial canker disease (CBCD) response, bioinformatics and expression analysis of *CsKat01* as well as the relationship between CAT activity and Hydrogen peroxide (H_2O_2) contents in CBCD susceptible variety Wanjincheng and resistant variety Calamondin were performed. Firstly, the coding sequence (CDS) of the *CsKat01* gene was cloned and the structure and function of the coding protein were analyzed. The full-length CDS of *CsKat01* is 1 482 bp and it encodes 493 amino acid residues with a typical catalase domain. Secondly, by cloning and analyzing the promoter sequence, we studied the promoter regulatory elements and found that the core promoters of both Wanjincheng and Calamondin contained salicylic acid (SA), jasmonic acid (JA) and abscisic acid (ABA) response elements whose numbers are different. Thirdly, qRT-PCR was used to

收稿日期: 2020-06-05; **修回日期:** 2020-09-06

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFD1000306); 中央高校基本科研业务费项目 (SWU115025); 广西科技重大专项 (桂科 AA18118046-6); 国家现代农业产业技术体系建设专项资金项目 (CARS-26)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: heyongrui@cric.cn, liqiang@cric.cn)

analyze the induced expression profiles of plant hormones and *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*) on *CsKat01*, and then the correlation between the enzyme and CBCD was determined. Finally, the relations between *CsKat01*, CAT activity, H_2O_2 content and CBCD resistance were analyzed. We speculate that *CsKat01* may regulate CAT enzyme activity, which further regulates H_2O_2 accumulation, and then regulates CBCD resistance.

Keywords: citrus; bacterial canker disease; catalase; *CsKat01*; hydrogen peroxide

由柑橘黄单胞杆菌柑橘亚种 (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*, *Xcc*) 引起的柑橘细菌性溃疡病 (Citrus bacterial canker disease, CBCD) 是柑橘产业的检疫性病害之一 (He et al., 2019; Li et al., 2019, 2020a)。分子育种可克服传统柑橘育种周期长、培育优良品种难度大的困难 (Jia et al., 2017), 而准确高效地挖掘抗性基因则是抗性品种分子育种的基础。

过氧化氢 (Hydrogen peroxide, H_2O_2) 在介导植物胁迫反应中有重要作用。大量的研究已证实胁迫反应中 H_2O_2 的作用和调控机制: 一方面, H_2O_2 可作为信号分子参与响应各种胁迫的信号途径, 启动病程相关基因表达, 使植物产生病害耐受性 (陈金峰 等, 2008); 另一方面, H_2O_2 浓度升高会引起超敏反应 (Hypersensitive response, HR), 促进细胞程序性死亡从而增加植物对病害的耐受性 (Ina et al., 2016)。 H_2O_2 作为活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 的主要成分之一, 其浓度过高也会对植物细胞造成不可逆的严重损伤。所以, H_2O_2 的适度平衡在植物对病害的耐受过程中至关重要 (Fawal et al., 2013; Li et al., 2015)。

过氧化氢酶 (Catalase, CAT) 是维持 H_2O_2 平衡、参与氧化还原反应和离子结合等过程的一个重要的酶 (Scott et al., 1999), 可通过降解 H_2O_2 , 维持活性氧各成分的平衡, 在植物应对生物和非生物胁迫过程中发挥重要作用。该酶可参与植物防御 (Murl et al., 2006)、响应多种胁迫 (Mhamdi et al., 2010)、维持细胞氧化还原平衡 (Dat et al., 2003; Li et al., 2015) 和延缓衰老 (Hong et al., 2005) 等过程。Yuan 等 (2017) 研究发现, 植物抗病信号因子水杨酸 (Salicylic acid, SA) 可抑制 CAT 的活性, 产生较多 H_2O_2 , 进而引起系统性防卫反应 (Systemic acquired resistance, SAR); Zhang (2006) 研究发现脱落酸 (Absciscic acid, ABA) 可诱导 H_2O_2 浓度增加, H_2O_2 作为信号分子可激活促分裂原活化蛋白激酶 (Mitogen-activated protein kinase, MAPK) 的信号级联反应, 从而传递外界信号, 调控抗性基因表达并促进 H_2O_2 的产生。但 CAT 的功能也并非完全不清楚。例如, 超表达玉米 *CAT2* 基因的烟草 CAT 活性和 H_2O_2 浓度提高、引发更为严重的超敏反应, 从而有效地控制细菌感染 (Polidoros et al., 2001)。Yu 等 (1999) 发现表达烟草 II 类过氧化氢酶基因 *Cat2Nt* 可诱导马铃薯内源的同源基因 *Cat2St* 表达, 同时提高植株叶片内 SA 结合活性, 改变 H_2O_2 含量, 进而对马铃薯晚疫病病菌产生抗病性。

本实验室前期研究发掘到一个对柑橘溃疡病有一定抗性的转录因子 *CsAP2-09* (贾瑞瑞 等, 2017; He et al., 2019), 进一步研究发现其与柑橘的 *CsKat01* 直接发生互作 (祁静静 等, 2020), 但 *CsKat01* 是否与柑橘溃疡病相关尚不清晰。本研究中通过对 *CsKat01* 进行全面的生物信息分析、水杨酸、茉莉酸、脱落酸和柑橘溃疡病菌诱导表达分析以及溃疡病菌诱导下的 CAT 酶活性和 H_2O_2 含量相关性分析, 初步判断 *CsKat01* 与柑橘抗溃疡病发生的相关性, 为抗溃疡病分子育种提供参考。

1 材料与方法

1.1 植物与细菌材料

2019年6月在中国农业科学院柑桔研究所国家柑橘种质资源圃及品种改良中心温网室取感病品种‘晚锦橙’和抗病品种‘四季橘’的成熟叶片(约3月龄)作为对柑橘溃疡病的植物材料;由国家柑橘苗木脱毒中心提供的柑橘黄单胞杆菌柑橘亚种(*Xanthomonas citri* subsp. *citri*, *Xcc*)作为试验菌株。

1.2 *CsKat01* 及其启动子的克隆

利用 EASY Spin 植物快速提取盒(艾德莱, 北京)提取‘晚锦橙’和‘四季橘’叶片总 RNA, 使用 cDNA Synthesis Kit (TaKaRa, 日本)反转录为 cDNA, 于 -20 °C 保存; 根据甜橙基因组数据库(<http://citrus.hzau.edu.cn/orange/>)获取的 *CsKat01* (CAP ID: Cs3g27280.1) 基因编码序列(Wang, 2014), 使用 SnapGene V2.3.2 (Bhatt & Challa, 2018) 设计引物 F₁: ATGGATCCCTACAAATTGCTTCCG, R₁: TCAAATG CTTGGCCTCACATTGAG; 以上述 cDNA 和引物对进行 PCR 扩增, 产物纯化后连接 T 载体并转大肠杆菌 DH5 α (TaKaRa, 日本); 阳性克隆子送测序(擎科, 北京), 测序成功的 *CsKat01* 基因编码序列进行生物信息分析。

利用植物基因组 DNA 快速提取试剂盒(艾德莱, 北京)提取‘晚锦橙’和‘四季橘’叶片 DNA; 根据甜橙基因组数据库中基因的启动子序列设计引物 F₂: TCTTGGGTCTCCACTTTTCTTAAATG, R₂: GGCGATATTTCTTGAAGATTTTGCT; 以上述基因组 DNA 和引物对进行 PCR 扩增、克隆和测序(擎科, 北京), 测序成功的 *CsKat01* 启动子序列进行生物信息分析。

1.3 生物信息分析

多序列比对和进化树构建使用软件 MEGA V7.0 (Kumar et al., 2016); 基因结构分析使用甜橙基因组数据库 (Li et al., 2020); 蛋白理化性质分析使用在线工具 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>); 基因比对和功能注释使用数据库 CitGVD (<http://citgvd.cric.cn/home>); 亚细胞定位预测使用软件 Wolf Psort Prediction (http://www.genscript.com/psort/wolf_psort.html) (Sprenger et al., 2006); 蛋白质二级结构预测使用在线工具 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) (Geourjon & Deleage, 1996); 蛋白功能域预测使用在线工具 PFAM V32 (<http://pfam.xfam.org>) (Finn et al., 2008); 信号肽预测使用在线工具 SignalP V5.0 (Zhang et al., 2012); 蛋白跨膜结构域预测使用在线工具 TMHMM Server V2.0 (Sonnhammer et al., 1998); 启动子元件分析使用在线工具 Plant CARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) (Lescot, 2002)。

1.4 水杨酸、茉莉酸、脱落酸和柑橘溃疡病菌诱导处理

按照胡安华等(2019)的方法处理样品: 叶片清洗消毒后置于无菌培养皿; 将 OD₆₀₀ = 0.5 的溃疡病菌悬液注射到叶片下表皮, 对照注射无菌 LB 液体培养基, 于 28 °C 光照培养; 分别于 0、12、24、36 和 48 h 取样, 切取叶片的接种部位提取总 RNA 并反转录; 实时定量 PCR (Quantitative real time PCR, qRT-PCR) 检测各样品中 *CsKat01* 的相对表达量。

将‘晚锦橙’和‘四季橘’叶圆片(直径 7 mm)分别浸泡于水杨酸 (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、茉莉酸

(Jasmonic acid, JA, $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、脱落酸 ($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 溶液和无菌水 (对照) 置于 28°C 光照培养, 0、6、12、24、36 和 48 h 对各处理及取样, 提取总 RNA 并反转录; qRT-PCR 检测各样品中 *CsKat01* 的相对表达量。

1.5 CAT 酶活与 H_2O_2 含量测定

CAT 酶活测定方法: 取叶片 0.1 g, 加 1 mL 酶提取液后冰浴匀浆; $8\,000 \times g$ 、 4°C 离心 10 min, 取上清液, 置冰上; 使用酶标仪在波长 240 nm 下测定吸光度值降低的速度, 根据吸光度的变化率计算 CAT 活性, 即每 g 组织在反应体系中每 min 催化 1 nmol H_2O_2 降解定义为 1 个酶活力单位 ($\text{U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$)。

H_2O_2 与硫酸钛反应生成黄色的过氧化钛在 415 nm 处有特征吸收, 通过此原理可测定 H_2O_2 含量 (刘小为 等, 2010)。称取 0.1 g 叶片, 于 0.5 mL 丙酮中进行冰浴匀浆; 转移至 EP 管中, 用丙酮定容到 1 mL; $8\,000 \times g$ 、 4°C 离心 10 min, 取上清液, 置冰上; 在波长 415 nm 下测定吸光度, 通过标准条件下测定的回归曲线计算 H_2O_2 含量。

1.6 qRT-PCR 方法

利用 NCBI Primer BLAST 设计 *CsKat01* 基因特异区域的实时定量引物 F₃: GTCTCAATGTGA GGCCAAGC, R₃: TAGGTGTCGGGAGCTTCTCT 和甜橙 *Actin* 内参基因 (GenBank: GU911361.1) 的引物 F_{actin}: CATCCCTCAGCACCTTCC、R_{actin}: CCAACCTTAGCACTTCTCC。利用 ChamQ™ Universal SYBR qPCR Master Mix (诺唯赞, 南京) 将 Xcc、SA、JA 和 ABA 处理的叶片 cDNA 分别进行实时定量检测。每个处理进行 3 次生物学重复和 3 次技术重复; 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算各时间点基因的相对表达量 [$\text{RQ} = \text{Power}(2, \text{Ct}_{\text{CsKat01-ck}} - \text{Ct}_{\text{CsKat01-test}}) / \text{Power}(2, \text{Ct}_{\text{CsActin-ck}} - \text{Ct}_{\text{CsActin-test}})$] (Livak & Schmittgen, 2001), ck 指每个时间点处理样品的各自对照。使用 SPSS V22 (IBM, 美国) 进行显著性差异分析。

2 结果与分析

2.1 *CsKat01* 编码序列和启动子克隆

从溃疡病易感品种 ‘晚锦橙’ 和抗病品种 ‘四季橘’ 的 cDNA 中 PCR 扩增得到 *CsKat01* 的编码序列。将两个品种测序成功的 *CsKat01* 的编码序列进行序列比对, 发现 ‘晚锦橙’ 和 ‘四季橘’ 中 *CsKat01* 编码序列其完全一致, 长度均为 1 482 bp。从这两个品种基因组 DNA 中扩增 *CsKat01* 的启动子序列并进一步将启动子序列进行比对, 发现 ‘晚锦橙’ 和 ‘四季橘’ 中 *CsKat01* 启动子序列长度分别为 1 624 和 1 639 bp, 序列也有部分差异, 存在碱基插入、缺失和突变现象。

2.2 *CsKat01* 的生物信息及其系统发育分析

序列比对 (图 1) 表明, *CsKat01* 位于柑橘的 3 号染色体, 基因全长 7 445 bp, 开放阅读框由 8 个外显子组成, 长度为 1 482 bp, 与本研究 PCR 扩增产物长度和序列均一致, 可编码 493 个氨基酸。利用 ProtParam 软件分析表明, *CsKat01* 编码蛋白的理论分子质量为 5.70 kD, 等电点为 6.64, 为弱酸性蛋白; 氨基酸组成分析发现其含有 62 个带负电荷的氨基酸残基和 58 个带正电荷的氨基酸残基; 蛋白质的不稳定指数 (II) 为 40.19, 脂肪族指数 (Aliphatic index, AI) 为 72.35; 该蛋白的总平均疏水性 (Grand average of hydropathicity, GRAVY) 为 -0.535, 预测为亲水性蛋白。利用 SignalP 分

析表明 *CsKat01* 不含信号肽序列; TMHMM 软件预测发现, 该蛋白无跨膜结构域, 为非跨膜蛋白; Wolf Psort 预测表明, 其亚细胞定位于过氧化物酶体 (Peroxisomal) 的可能性最大; PFAM 软件预测 *CsKat01* 蛋白功能域, 发现在 18 到 402 号氨基酸为典型的过氧化氢酶功能结构域, 表明该蛋白为过氧化氢酶; 该蛋白的二级结构元件最多的为无规卷曲 (含 261 aa), 占氨基酸总数的 52.94%。 α 螺旋 (含 131 aa) 占 26.57%, 延伸链 (含 72 aa) 占 14.60%, β 转角含量最少 (含 29 aa), 占氨基酸总数的 5.88% (图 1)。

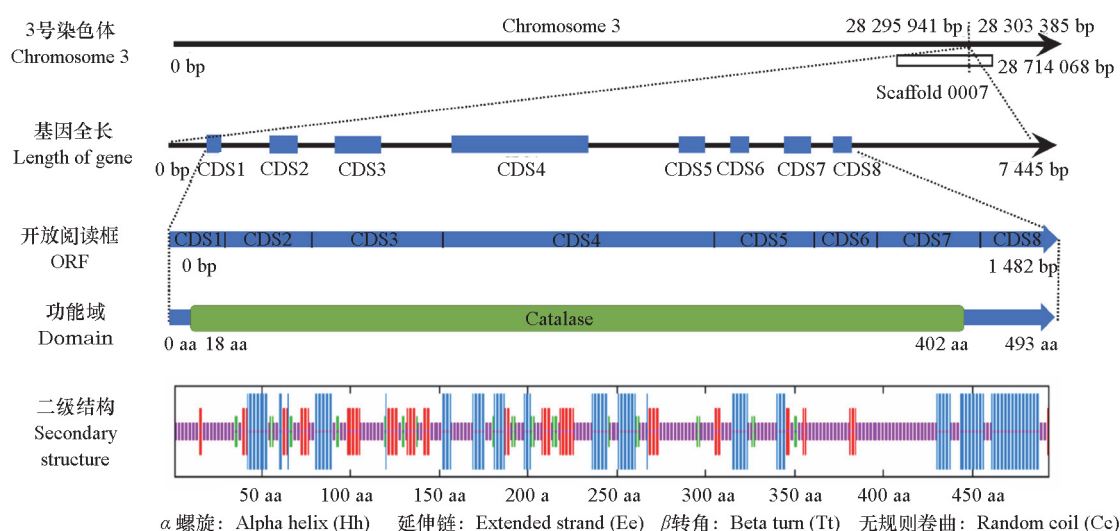


图 1 *CsKat01* 信息学分析

Fig. 1 Bioinformatics analysis of *CsKat01*

由 RedoxiBase 数据库 (<http://peroxibase.toulouse.inra.fr>, Savellia et al., 2019), 获取桉树 (*Eucalyptus globulus*, EglKat01)、葡萄 (*Vitis vinifera*, VvKat01)、烟草 (*Nicotiana tabacum*, NtKat03)、杨树 (*Populus trichocarpa*, PtKat02) 和拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*, AtKat02) 的 CAT 蛋白序列进行序列比对。

结果 (图 2) 表明, 柑橘与多个 CAT 序列相似性较高, 桉树、葡萄、烟草、杨树、拟南芥与柑橘 *CsKat01* 的蛋白相似性分别为 77.56%、81.05%、77.86%、78.71% 和 75.59%, CAT 结构域的相似度更高, 进一步确定 *CsKat01* 蛋白的 CAT 身份。

利用上述多个全长序列构建系统发育树 (邻接树, Neighbor-Joining Tree, NJ Tree), 系统发育选择自助法, 使用泊松模型。发现柑橘 *CsKat01* 与桉树 EglKat01 和葡萄 VvKat01 的亲缘关系较近, 与烟草 NtKat03、杨树 PtKat02 的亲缘关系较远 (图 3)。

2.3 启动子元件分析

使用启动子元件分析可以预测基因的诱导表达模式。为了研究 *CsKat01* 与生物胁迫响应的相关性, 用 Plant CARE 在线软件预测了 ‘晚锦橙’ 和 ‘四季橘’ *CsKat01* 启动子中与生物胁迫相关的顺式作用元件 (表 1)。该基因启动子在 ‘晚锦橙’ 和 ‘四季橘’ 中均含有脱落酸响应元件 ABRE 和茉莉酸响应元件 CGTCA-motif, 但两个品种中该元件数量存在差异; 两品种均含有 1 个环境胁迫相关转录因子 MYBHv1 结合位点 CCAAT-box 和 1 个 SA 响应元件 TCA-element, 元件位置有差异。

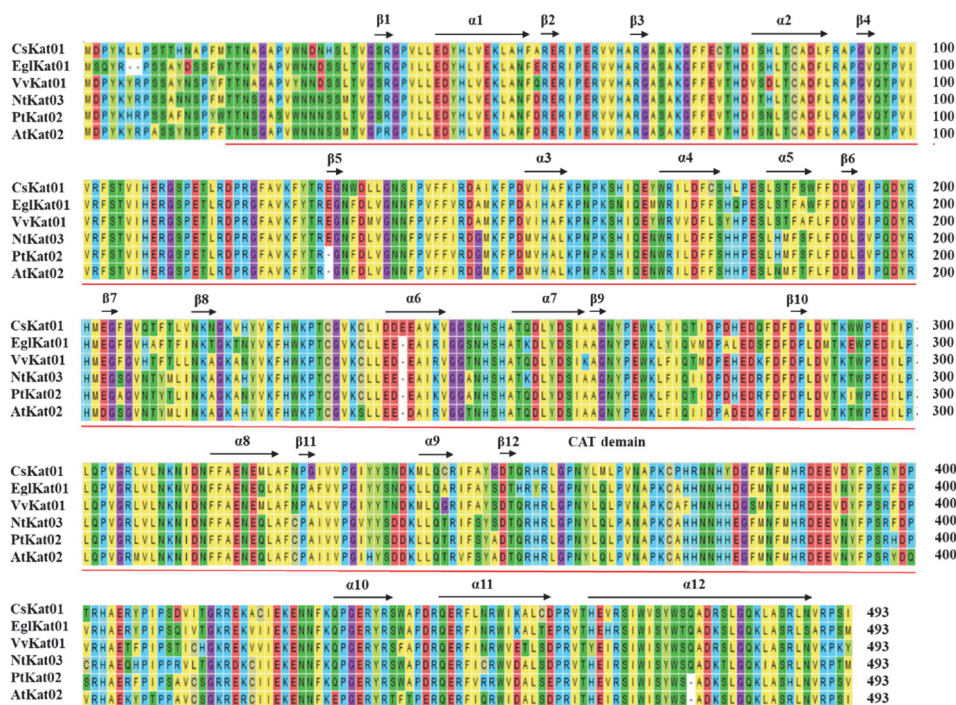


图 2 多个物种过氧化氢酶蛋白序列比对

Cs: 甜橙; Egl: 桉树; Vv: 葡萄; Nt: 烟草; Pt: 杨树; At: 拟南芥。

Fig. 2 Multiple alignment of catalases of several organisms

Cs: *Citrus sinensis*; Egl: *Eucalyptus globulus*; Vv: *Vitis vinifera*; Nt: *Nicotiana tabacum*; Pt: *Populus trichocarpa*; At: *Arabidopsis thaliana*.

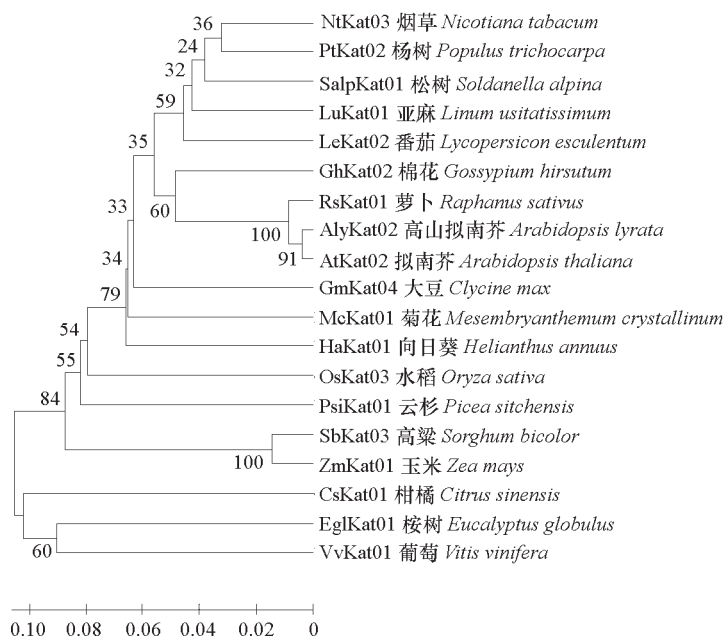


图 3 不同物种 CAT 的系统进化树

分支上的数字代表分支的可靠程度, 长度代表进化距离。

Fig. 3 The phylogenetic tree of CAT from different species

The number on the branch represents the reliability of the branch, and the length represents the evolutionary distance.

水杨酸、茉莉酸和脱落酸等植物激素是植物抗病信号转导过程中重要的信号分子，在不同品种中 *CsKat01* 基因启动子这些元件异同可能使该蛋白受相关激素或病原菌刺激的诱导表达产生差异，这些诱导差异可能进一步影响不同品种中 *CsKat01* 介导的抗/感病差异。

表 1 Plant CARE 预测 *CsKat01* 启动子区域顺式作用元件
Table 1 *cis*-Acting regulatory elements in promoter of *CsKat01* predicted by Plant CARE

| 元件名称 Cis elements | 功能 Funtion | 序列 Sequence | 位置 Position | | 方向 Strand | |
|----------------------|------------------------------------|----------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| | | | 晚锦橙 Wanjincheng | 四季橘 Calamondin | 晚锦橙 Wanjincheng | 四季橘 Calamondin |
| ABRE | 脱落酸响应 ABA-responsiveness | ACGTG | 733 | 733 1 536 | + | + |
| CCAAT-box | MYBHv1 结合位点 MYBHv1 binding site | CAACGG | 1 307 | 1 320 | - | - |
| CGTCA-motif | 茉莉酸响应 JA-responsiveness | CGTCA | 943 1 455 | 1 470 | + | - |
| TCA-element | 水杨酸响应元件 SA-responsiveness | CCATCTTTT | 1 298 | 1 128 | - | + |

注：“+”表示正向；“-”表示反向。

Note: “+” means forward direction; “-” means reverse direction.

2.4 *CsKat01* 受水杨酸、茉莉酸和脱落酸的诱导表达

水杨酸 (SA) 诱导时, *CsKat01* 的相对表达量在‘晚锦橙’中呈上升趋势, 于 36 h 达到最高水平, 之后又下降; ‘四季橘’的表达趋势与‘晚锦橙’基本类似 (图 4, SA)。两个品种该基因的启动子中均只含 1 个水杨酸诱导元件, 这可能是两个物种中该蛋白表达趋势相似的原因。

茉莉酸 (JA) 诱导 *CsKat01* 表达情况在两品种中明显不同 (图 4, JA), 在‘晚锦橙’中一直处

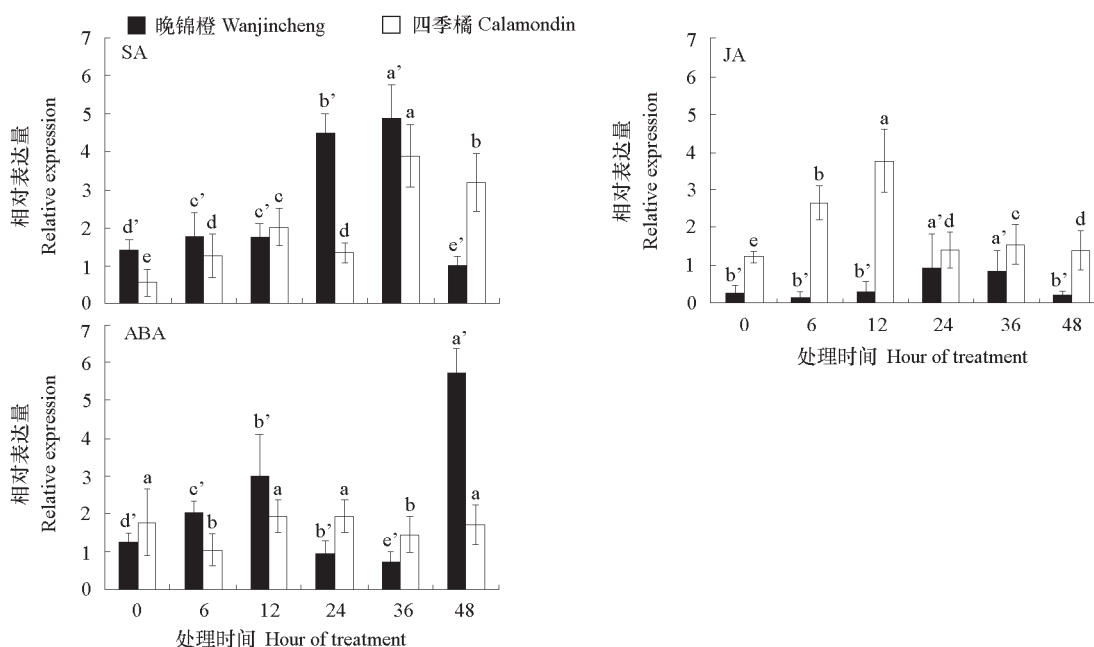


图 4 水杨酸、茉莉酸和脱落酸诱导下 *CsKat01* 的相对表达

a、a' 分别表示四季橘和晚锦橙的数据显著性差异, 不同字母表示差异显著, $P < 0.05$ 。下同。

Fig. 4 The relative expression of *CsKat01* induced by SA, JA and ABA

The data significant difference of Calamondin and Wanjincheng is indicated by a and a' respectively, and different letters indicate significant difference, $P < 0.05$. The same below.

于低表达水平, 而‘四季橘’中持续高于‘晚锦橙’, 12 h 前呈显著上升趋势, 之后虽有下降但仍高于‘晚锦橙’。结合启动子元件, 这种差异可能跟茉莉酸响应元件的数量有关。脱落酸 (ABA) 诱导‘晚锦橙’的 *CsKat01* 表达呈先升后降趋势, 48 h 其表达量急剧增加, 达到最高, 而‘四季橘’中持续处于低位, 响应 ABA 诱导不明显 (图 4, ABA)。两品种中的差异表达可能与启动子中脱落酸响应元件的数量不同相关。总体来看, *CsKat01* 在不同柑橘品种中响应不同植物生长调节剂诱导表达情况不同, 这些植物生长调节剂可通过调控抗病相关基因参与植物抗病过程, 从而推测 *CsKat01* 可能通过响应植物生长调节剂诱导参与植物抵抗生物胁迫的过程。

2.5 *CsKat01* 受柑橘溃疡病菌侵染的诱导表达分析

发现接种溃疡病菌后两品种 *CsKat01* 表达水平存在显著差异 (图 5), 感病品种‘晚锦橙’在 12 h 相对表达量达到最高, 之后有所下降但仍维持在较高表达水平; 抗病品种‘四季橘’在接种溃疡病菌后, 表达水平除 0 h 外均持续维持在较低水平。抗/感两个品种 *CsKat01* 表达总体存在差异, 并且不同时期‘晚锦橙’总体高于‘四季橘’。上述结果表明 *CsKat01* 与溃疡病菌的侵染具有密切关系, 初步推测 *CsKat01* 参与柑橘抗溃疡病过程。结合两个品种的抗/感病差异, 推测 *CsKat01* 的高表达可能使柑橘相对更感病。

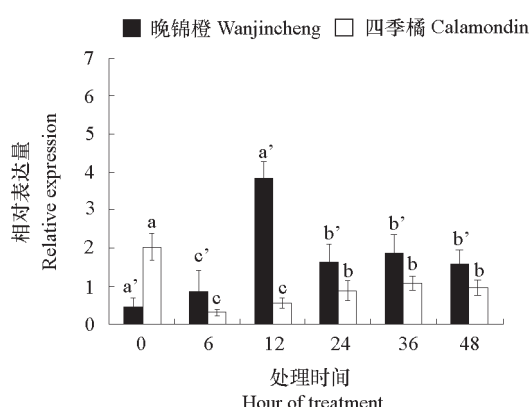


图 5 柑橘溃疡病菌诱导下 *CsKat01* 的相对表达量
Fig. 5 The relative expression of *CsKat01* induced by Xcc infection

2.6 柑橘溃疡病菌诱导下 CAT 酶活和 H₂O₂ 含量变化

‘晚锦橙’接种溃疡病菌后 CAT 酶活逐渐增加, 而 24 h 时下降至最低点, 之后上升并维持在高水平; ‘四季橘’中 CAT 酶活均明显低于‘晚锦橙’ (图 6)。结合溃疡病菌诱导不同时期 *CsKat01* 编码基因的相对表达量 (图 5), 发现 *CsKat01* 的相对表达量与 CAT 酶活呈一定正相关, 也就是说 *CsKat01* 编码蛋白可能为影响 CAT 酶活的关键蛋白。

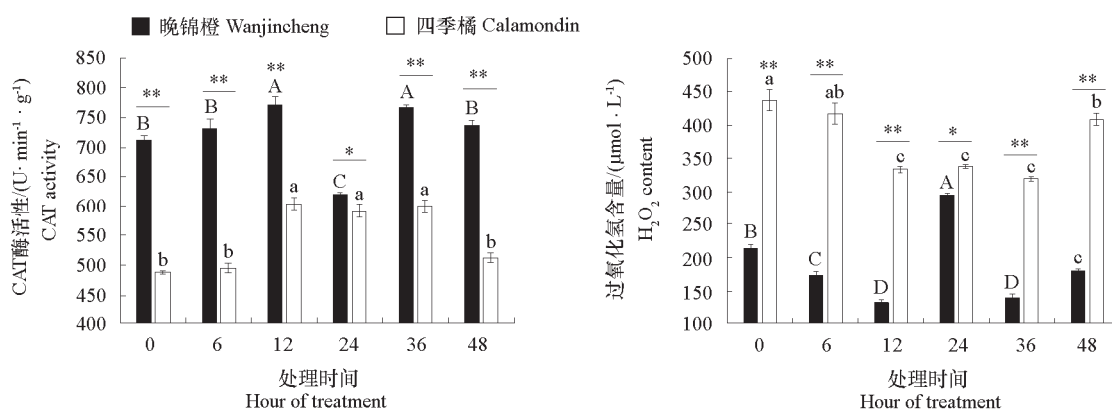


图 6 溃疡病诱导下 CAT 酶活和 H₂O₂ 含量变化

Fig. 6 CAT enzyme activity and H₂O₂ content induced by Xcc infection

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

进一步分析了 CAT 酶活与 H_2O_2 含量的关系。结果显示, ‘晚锦橙’接种溃疡病菌后 H_2O_2 含量逐渐下降, 但 24 h 时急剧上升至最高点, 之后下降维持低水平; 而 ‘四季橘’中 H_2O_2 含量总体呈先降后升的趋势(图 6), 且 ‘四季橘’中 H_2O_2 含量总体明显高于 ‘晚锦橙’。结合 CAT 酶与 H_2O_2 含量检测结果(图 6), 得出结论, CAT 酶活和 H_2O_2 含量呈一定负相关, 结果验证了 CAT 的主要功能, 即分解 H_2O_2 , 从而减少 H_2O_2 含量 (Vandenabeele et al., 2004)。

3 讨论

过氧化氢酶是生物体中常见的抗氧化酶之一, 可清除线粒体电子传输, 脂肪酸的 β -氧化以及光呼吸氧化过程中产生的过量的 H_2O_2 , 维持 H_2O_2 的平衡 (Yang & Poovaiah, 2002)。CAT 通过调控 H_2O_2 平衡进而影响植物对各种胁迫的抗性。大量研究表明 CAT 与生物胁迫紧密相关。拟南芥中敲除 CAT 编码基因 *CAT2* 后的突变体中含有较高含量的 H_2O_2 , 而 H_2O_2 又可诱导细胞程序化死亡, 进而影响植物坏死病变的扩散过程 (Queval, 2007)。Takahashi 等 (1997) 利用反义 RNA 技术抑制表达烟草 *CAT1* 或 *CAT2* 基因, 发现其转基因植株表现出 CAT 活性明显降低 (降低约 90%), 进而明显增加了 H_2O_2 含量, CAT 酶活下降最严重的 3 个转基因植株的叶片出现超敏化反应, 阻止了病情的继续恶化。*CsKat01* 是本实验室前期获得的 1 个柑橘溃疡病正调控转录因子 *CsAP2-09* (He et al., 2019) 的互作蛋白 (祁静静 等, 2020), 据此推测 *CsKat01* 可能也参与了对溃疡病的调控。

病原物侵入抗病植物时, 细胞表面发生细胞坏死的 HR。HR 使病原的侵染局部化从而防止病原菌扩展。HR 可产生一类信号分子引起植物抵抗病原菌, 引发 SAR 反应 (Vernooij et al., 1994)。SA 是植物产生 HR 和 SAR 必不可少的条件, 亦是植物的抗病信号因子。外源使用 SA 能够增强易感病苹果对叶斑病的抗性 (Zhang et al., 2016)。生物体内各激素之间信号传导途径相互交叉、相互调控, 则生物胁迫相关激素的诱导表达可能与植物抗病过程息息相关。本试验中通过对该酶受某些生物胁迫信号途径相关的植物激素的诱导表达模式分析, 发现 *CsKat01* 受茉莉酸和脱落酸的诱导, 且在抗/感两个品种中 *CsKat01* 诱导表达模式存在差异。进一步通过溃疡病菌诱导后 *CsKat01* 表达分析证明了 *CsKat01* 响应溃疡病菌侵染, 但抗/感品种中的诱导表达趋势存在差异这个结果更从正反两方面验证了 *CsKat01* 与溃疡病的相关性。为进一步探讨 *CsKat01* 调控柑橘对溃疡病菌侵染的响应机制, 对溃疡病菌诱导处理后的柑橘叶片进行 *CsKat01* 相对表达量、CAT 酶活和 H_2O_2 含量测定, 发现三者有一定的相关性, 即 *CsKat01* 一定程度上决定了植物体内的 CAT 酶活, 而 CAT 酶活与 H_2O_2 含量又呈一定负相关, 这与其他物种 CAT 表达量和 H_2O_2 变化趋势相符。也就是说 *CsKat01* 在维持柑橘 CAT 酶活水平和 H_2O_2 含量的过程中起重要作用。而且, 在感病和抗病两个品种中, H_2O_2 含量存在一定差异, 柑橘溃疡病菌诱导不同阶段抗病品种中 H_2O_2 含量均高于感病品种。由此得出: 相对低的 CAT 酶活和高水平的 H_2O_2 含量赋予 ‘四季橘’ 更高的溃疡病抗性。

综上所述, 本研究中通过对 *CsKat01* 的基因结构的信息分析、生物胁迫相关激素和柑橘溃疡病菌诱导表达以及溃疡病诱导后 CAT 酶活性和 H_2O_2 含量分析, 证明了 *CsKat01* 可能为柑橘溃疡病的响应的感病基因, *CsKat01* 通过对 CAT 酶活性的影响调控 H_2O_2 含量进而影响柑橘对溃疡病的抗病性。所以, 该基因可作为柑橘抗溃疡病过程中具有一定潜力的候选基因, 本研究的结果可为该基因调控柑橘溃疡病抗性中的功能和机理研究提供参考。

References

Bhatt J M, Challa A K. 2018. First year course-based undergraduate research experience (CURE) using the CRISPR/Cas9 genome engineering

- technology in zebrafish. *Journal of Microbiology & Biology Education*, 19 (1): 1228 - 1245.
- Chen Jin-feng, Wang Gong-nan, Cheng Su-man. 2008. Progress about catalase function in plant stress reactions. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 28 (1): 188 - 193. (in Chinese)
- 陈金峰, 王宫南, 程素满. 2008. 过氧化氢酶在植物胁迫响应中的功能研究进展. *西北植物学报*, 28 (1): 188 - 193.
- Dat J F, Pellinen R, Beeckman T, Cotte B V D, Breusegem F V. 2003. Changes in hydrogen peroxide homeostasis trigger an active cell death process in tobacco. *The Plant Journal*, 33 (4): 621 - 632.
- Fawal N, Li Q, Savelli B, Brette M, Passaia G, Fabre M, Mathe C, Dunand C. 2013. PeroxiBase: a database for large-scale evolutionary analysis of peroxidases. *Nucleic Acids Research*, 41: D441 - D444.
- Finn R D, Tate J, Misty J, Tate J, Coghill P, Heger A, Pollington J E, Gavin O L, Gunasekaran P, Ceric G, Forslund K, Holm L, Sonnhammer E, Eddy S R, Bateman A. 2008. The pfam protein families database. *Nucleic Acids Research*, 32 (1): D138.
- Geourjon C, Deleage G. 1996. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Computer Applications in the Biosciences Cabios*, 11 (6): 681 - 684.
- He Y R, Jia R R, Qi J J, Chen S C, Lei T G, Xu L Z, Peng A H, Yao L X, Long Q, Li Z G, Li Q. 2019. Functional analysis of citrus AP2 transcription factors identified *CsAP2-09* involved in citrus canker disease response and tolerance. *Gene*, 707: 178 - 188.
- Hong F S, Song W P, Wan Z G, Yu M L, Yu J, Liu J J, Sheng Y, Xi Q H. 2005. Effect of La (III) on the growth and aging of loquat plantlet *in vitro*. *Biological Trace Element Research*, 104 (2): 185 - 192.
- Hu An-hua, Qi Jing-jing, Zhang Qin-wen, Chen Shan-chun, Zou Xiu-ping, Xu Lan-zhen, Peng Ai-hong, Lei Tian-gang, Yao Li-xiao, Long Qin, He Yong-rui, Li Qiang. 2019. Cloning and expression analysis of the citrus bacterial canker-related gene *CsPGIP* in citrus. *Scientia Agricultura Sinica*, 52 (4): 639 - 650. (in Chinese)
- 胡安华, 祁静静, 张庆雯, 陈善春, 邹修平, 许兰珍, 彭爱红, 雷天刚, 姚利晓, 龙 琴, 何永睿, 李 强. 2019. 柑橘溃疡病相关基因 *CsPGIP* 的克隆与表达. *中国农业科学*, 52 (4): 639 - 650.
- Ina S, Sandhya S, Zhong C. 2016. Cross talk between H₂O₂ and interacting signal molecules under plant stress response. *Frontiers in Plant Science*, 7: 570.
- Jia H, Zhang Y, Orbovic V, Xu J, White F F, Jones J B, Wang N. 2017. Genome editing of the disease susceptibility gene *CsLOB1* in citrus confers resistance to citrus canker. *Plant Biotechnol*, 15: 817 - 823.
- Jia Rui-rui, Hu An-hua, Chen Shan-chun, Zou Xiu-ping, Peng Ai-hong, Xu Lan-zhen, Lei Tian-gang, Yao Li-xiao, Bai Xiao-jing, He Yong-rui, Li Qiang. 2017. Cloning and expression analysis of *CsAP-09*: a transcription factor related to citrus canker disease. *Acta Horticulturae Sinica*, 44 (10): 1881 - 1893. (in Chinese)
- 贾瑞瑞, 胡安华, 陈善春, 邹修平, 彭爱红, 许兰珍, 雷天刚, 姚利晓, 白晓晶, 何永睿, 李 强. 2017. 柑橘响应溃疡病菌转录因子基因 *CsAP2-09* 的克隆与功能分析. *园艺学报*, 44 (10): 1881 - 1893.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33: 1870 - 1874.
- Lescot M. 2002. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Research*, 30 (1): 325 - 327.
- Li J, Liu J, Wang G Q, Cha J Y, Li G N, Chen S, Li Z, Guo J H. 2015. A chaperone function of no catalase activity is required to maintain catalase activity and for multiple stress responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 27: 908 - 925.
- Li Q, Dou W F, Qi J J, Qin X J, Chen S C, He Y R. 2020a. Genomewide analysis of the CIII peroxidase family in sweet orange (*Citrus sinensis*) and expression profiles induced by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and hormones. *Journal of Genetics*, 99: 10.
- Li Q, Hu A H, Dou W F, Qi J J, Long Q, Zou X P, Lei T G, Yao L X, He Y R, Chen S C. 2019. Systematic analysis and functional validation of citrus *XTH* genes reveals the role of *CsXTH04* in citrus bacterial canker resistance and tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 10: 1109.
- Li Q, Qi J J, Qin X J, Dou W F, Leu T G, Hu A H, Jia R R, Jiang G J, Zou X P, Long Q, Xu L Z, Peng A H, Yao L X, Chen S C, He Y R. 2020b. CitGVD: a comprehensive database of citrus genomic variations. *Horticulture Research*, 7: 12.
- Liu Xiao-wei, Chen Zhong-lin, Shen Ji-min, Ye Miao-miao, Chen Wen-hui. 2010. Spectrophotometric determination of low concentration of hydrogen peroxide in O₃/H₂O₂ system using titanium sulfate. *China Water & Wastewater*, (16): 126 - 129. (in Chinese)
- 刘小为, 陈忠林, 沈吉敏, 叶苗苗, 陈文辉. 2010. 硫酸钛光度法测定 O₃/H₂O₂ 体系中低浓度 H₂O₂. *中国给水排水*, (16): 126 - 129.
- Livak K J, Schmittgen T D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta C_t$} method. *Methods*, 25 (4):

- 402 – 408.
- Mhamdi A, Queval G, Chaouch S, Vanderauwera S, Breusegem F V, Noctor G. 2010. Catalase function in plant: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany*, 61 (15): 4197 – 4220.
- Murl L A J, Kenton P, Atzorn R, Miersch O, Wasternack C. 2006. The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiology*, 140 (1): 249 – 262.
- Polidoros A N, Mylona P V, Scandalios J G. 2001. Transgenic tobacco plants expressing the maize *Cat2* gene have altered catalase levels that affect plant-pathogen interactions and resistance to oxidative stress. *Transgenic Research*, 10 (6): 555 – 569.
- Qi Jing-jing, Dou Wan-fu, Zhang Qing-wen, Hu An-hua, Chen Shan-chun, Lei Tian-gang, Peng Ai-hong, Xu Lan-zhen, Yao Li-xiao, He Yong-rui, Li Qiang. 2020. Interacting protein screening and analysis of CsAP2-09-a citrus bacterial canker related transcription factor. *Acta Horticulturae Sinica*, 47 (3): 432 – 444. (in Chinese)
- 祁静静, 窦万福, 张庆雯, 胡安华, 陈善春, 雷天刚, 彭爱红, 许兰珍, 姚利晓, 何永睿, 李 强. 2020. 柑橘抗溃疡病转录因子 CsAP2-09 互作蛋白筛选与分析. *园艺学报*, 47 (3): 432 – 444.
- Queval G. 2007. Conditional oxidative stress responses in the *Arabidopsis* photorespiratory mutant *cat2* demonstrate that redox state is a key modulator of day length-dependent gene expression, and define photoperiod as a crucial factor in the regulation of H₂O₂ induced cell death. *Plant Journal*, 52 (4): 640 – 657.
- Savellia B, Li Q, Webbera M, Jemmata A, Robitaillea A, Zamocky M, Mathe C, Dunand C. 2019. RedoxiBase: a database for ROS homeostasis regulated proteins. *Redox Biology*, 26: 101247.
- Scott L J, Russell G I, Nixon N B, Dawes P T, Matthey D L. 1999. Oxidation of alphas-proteinase inhibitor by the myeloperoxidase-hydrogen peroxidase system promotes binding to immunoglobulin A. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 255 (3): 562.
- Sonnhammer E L L, Heijine G V, Krogh A V. 1998. A hidden markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*, 6: 175 – 182.
- Sprenger J, Fink J L, Teasdale R D. 2006. Evaluation and comparison of mammalian subcellular localization prediction methods. *BMC Bioinformatics*, 7 (Suppl 5): S3.
- Takahashi H, Chen Z, Du H, Liu Y, Kleaang D F. 1997. Development of necrosis and activation of disease resistance in transgenic tobacco plants with severely reduced catalase levels. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 11 (5): 993 – 1005.
- Vandenabeele S, Vanderauwera S, Vuylsteke M, Rombauts S, Breusegem F V. 2004. Catalase deficiency drastically affects gene expression induced by high light in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 39 (1): 45 – 58.
- Vernooij B, Friedrich L, Weymann K. 1994. A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science*, 266 (5188): 1247 – 1250.
- Wang J. 2014. *Citrus sinensis* annotation project (CAP): a comprehensive database for sweet orange genome. *PLoS ONE*, 9: e87723.
- Yang T, Poovaiah B W. 2002. Hydrogen peroxide homeostasis: activation of plant catalase by calcium/calmodulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 4097 – 4102.
- Yu D, Xie Z, Chen C, Fan B, Chen Z. 1999. Expression of tobacco class II catalase gene activates the endogenous homologous gene and is associated with disease resistance in transgenic potato plants. *Plant Molecular Biology*, 39 (3): 477 – 488.
- Yuan H M, Liu W C, Lu Y T. 2017. Catalase2 coordinates SA-mediated repression of both auxin accumulation and JA biosynthesis in plant defenses. *Cell Host & Microbe*, 21 (2): 143 – 155.
- Zhang A. 2006. Mitogen-activated protein kinase is involved in abscisic acid-induced antioxidant defense and acts downstream of reactive oxygen species production in leaves of maize plants. *Plant Physiology*, 141 (2): 475.
- Zhang Y, Shi X P, Li B H, Zhang Q M, Liang W X, Wang C X. 2016. Salicylic acid confers enhanced resistance to *Glomerella* leaf spot in apple. *Plant Physiology Biochemistry*, 106: 64 – 72.
- Zhang Y Y, Liu X L, Huang H H. 2012. Molecular cloning of Crustin-like gene in the white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and its mRNA expression with *Vibrio parahaemolyticus* challenge. *Journal of Northwest A & F University*, 40 (20): 119 – 132.