

研究报告

梨黑斑病菌 *CHD* 基因克隆及其在代谢梨果皮酚酸类物质中的作用解析

徐文怡, 李荣, 李永才*, 王小晶

甘肃农业大学 食品科学与工程学院, 甘肃 兰州 730070

徐文怡, 李荣, 李永才, 王小晶. 梨黑斑病菌 *CHD* 基因克隆及其在代谢梨果皮酚酸类物质中的作用解析[J]. 微生物学通报, 2024, 51(9): 3510-3522.

XU Wenyi, LI Rong, LI Yongcai, WANG Xiaojing. *CHD* in *Alternaria alternata*: gene cloning and degradation performance against phenolic acids in pear fruit peel[J]. Microbiology China, 2024, 51(9): 3510-3522.

摘要:【背景】植物病原真菌必须有效解毒寄主组织中酚类物质等具有抗菌活性的次生代谢产物才能成功侵染和定殖, 目前已有研究表明部分病原真菌可通过合成邻苯二酚 1,2-双加氧酶(catechol 1,2-dioxygenase, CHD)等降解寄主中的酚类物质, 但梨黑斑病菌互隔交链孢(*Alternaria alternata*)对果皮酚类物质是否具有降解作用及作用机制尚不清楚。【目的】对梨黑斑病菌中 *CHD* 进行克隆和生物信息学分析, 并研究其对梨果皮酚酸类物质的降解作用, 以期为进一步揭示 *A. alternata* *CHD* 在代谢梨果皮酚类物质过程中的分子机制提供支撑。【方法】采用同源克隆法从 *A. alternata* 中克隆 *CHD*; 通过 Smart、SOPMA 等软件对其进行生物信息学分析; 利用四元超快速液相色谱仪检测 *A. alternata* 代谢后酚酸含量的变化, 并通过 RT-qPCR 分析 *CHD* 在代谢酚酸类过程中的表达情况。

【结果】从 *A. alternata* 克隆得到 2 个 *CHD* 基因, 分别编号为 *AaCHD1* 和 *AaCHD2*, 其蛋白均含有双加氧酶的 C 末端和 N 末端保守结构域; 系统发育分析表明, 其分别与番茄匍柄霉(*Stemphylium lycopersici*)及异旋孢腔菌(*Cochliobolus heterostrophus*)中的 *CHD* 氨基酸序列具有高度同源性。进一步分析发现 *A. alternata* 能够以酚酸类物质为唯一碳源生长, 但对梨果皮主要酚酸类物质的代谢作用存在差异, 对阿魏酸、绿原酸、咖啡酸的代谢强于对香豆酸; 同时外源酚酸促进了 *A. alternata* 中 *AaCHD1* 和 *AaCHD2* 显著上调表达, 其中外源咖啡酸的诱导作用最强, 其次是阿魏酸和对香豆酸。【结论】*A. alternata* 的 *AaCHD* 对梨果皮酚酸类物质具有降解作用且降解效果因底物种类而异, 为全面揭示 *AaCHD* 在 *A. alternata* 克服梨果皮酚类物质的防御作用进而侵染寄主的分子机制提供一定的理论依据。

关键词: 互隔交链孢; 邻苯二酚 1,2-双加氧酶; 生物信息学分析; 酚酸类物质

资助项目: 国家自然科学基金(32060567)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32060567).

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

Received: 2023-12-05; Accepted: 2024-01-19; Published online: 2024-03-07

CHD in *Alternaria alternata*: gene cloning and degradation performance against phenolic acids in pear fruit peel

XU Wenyi, LI Rong, LI Yongcai*, WANG Xiaojing

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

Abstract: [Background] To successfully infect and colonize the host tissue, phytopathogenic fungi need to detoxify the antifungal secondary metabolites such as phenolic compounds in the host. Studies have shown some pathogenic fungi can degrade phenolic compounds in the host by synthesizing catechol 1,2-dioxygenase (CHD). However, whether the *Alternaria alternata* can degrade phenols in pear fruit peel and the mechanism remain unclear. [Objective] To clone *CHD* from *A. alternata*, conduct bioinformatics analysis of *CHD*, and study the degradation performance of phenolic acids in pear fruit peel by CHD, thus providing support for further clarifying the molecular mechanism of this enzyme. [Methods] *CHD* was cloned from *A. alternata* by homologous cloning. Smart and SOPMA were used for bioinformatics analysis. The changes in phenolic acid content after metabolism of *A. alternata* were determined by quaternary ultra-fast liquid chromatography, and the expression level of *CHD* during the metabolism of phenolic acids was analyzed by RT-qPCR. [Results] Two *CHD* genes were cloned from *A. alternata* and designated as *AaCHD1* and *AaCHD2*. The proteins encoded by the two genes both contained C-terminal and N-terminal conserved domains of dioxygenases. The phylogenetic analysis showed that *AaCHD1* and *AaCHD2* were highly homologous to the CHD amino acid sequences in *Stemphylium lycopersici* and *Cochliobolus heterostrophus*, respectively. Furthermore, *A. alternata* can grow with phenolic acids as the sole carbon source and differentially metabolize phenolic acids in pear fruit peel. Specifically, it showed stronger degradation effects on ferulic acid, chlorogenic acid, and caffeic acid than on *p*-coumaric acid. At the same time, exogenous phenolic acids up-regulated the expression of *AaCHD1* and *AaCHD2*, and exogenous caffeic acid had the strongest up-regulatory effect, followed by ferulic acid and *p*-coumaric acid. [Conclusion] *AaCHD* in *A. alternata* played a role in degrading phenolic acids in pear fruit peel, and the degradation effects vary with different phenolic acids, which provides a theoretical basis for comprehensively revealing the molecular mechanism of *AaCHD* in overcoming the defense effect of phenolic acids in pear peel.

Keywords: *Alternaria alternata*; catechol 1,2-dioxygenase; bioinformatics analysis; phenolic acids

互隔交链孢(*Alternaria alternata*)是一种可引起多种园艺作物病害且具有潜伏侵染性的植物病原真菌。*A. alternata* 可造成梨果实采后黑斑病,其可在果实发育期通过完整果皮或皮孔侵入而潜伏于皮下。在采后贮藏期间,当果实抗病性减弱时病原菌开始侵入果实组织进而产生病害症状^[1-2]。造成 *A. alternata* 潜伏的主要原因一方

面是发育期间的果实缺乏病原物容易利用的营养物质,另一方面是组织中富含具有抗菌活性的次生代谢产物。病原菌侵染后寄主预合成抗菌物质暂时限制病原菌扩展,但随着果实成熟次生代谢产物含量均随果实的成熟而降低,寄主自身防卫能力下降,病原物分泌致病因子促进菌丝的形成和扩展^[3]。

植物次生代谢物在植物生长发育、胁迫响应和抵御病原物侵染等方面具有重要的功能^[4-6], 其主要包括酚类、萜烯类、类固醇类、生物碱类和黄酮类^[7]。酚类物质, 作为植物重要的次生代谢产物, 可在植物正常生长发育或受到外界生物、非生物胁迫后通过莽草酸途径及苯丙酸途径合成, 其可通过直接抑菌或影响病原物致病因子细胞壁降解酶等而抑制病原物的侵染^[8-10]。因此, 植物病原真菌为了成功侵染并在寄主上定殖, 必须克服一系列具有广泛抗菌特性的植物次生代谢产物。

植物真菌可以通过分泌氧化还原酶类、水解酶类等多种胞外酶氧化或降解酚类物质。Chen 等^[11]研究发现核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)能产生槲皮素双加氧酶, 催化裂解黄酮醇碳环, 以侵染富含黄酮醇的拟南芥组织。Xie 等^[12]发现内生真菌枫香拟茎点霉(*Phomopsis liquidambaris*)产生的阿魏酸脱羧酶、漆酶和原儿茶酸 3,4-双加氧酶能够降解液体培养基中外源添加及在土壤中积累的阿魏酸, 尤其漆酶可通过氧化脱羧和去甲基化作用降解酚类物质。真菌对酚类化合物的代谢通常先通过羟化、脱羧等途径转化形成邻苯二酚、原儿茶酸、羟基喹啉、对苯二酚、龙胆酸、没食子酸和邻苯三酚等中间产物, 再进一步通过 β -酮己二酸途径裂解。大多数真菌代谢芳香化物的中间产物为原儿茶酸或邻苯二酚^[13-16]。Lubbers 等^[17]发现黑曲霉(*Aspergillus niger*)可通过原儿茶酸 3,4-双加氧酶和羟基喹啉 1,2-双加氧酶这 2 种途径代谢原儿茶酸。可见真菌对酚类物质代谢的途径及相关酶呈现多样性, 尚需进一步研究。

邻苯二酚双加氧酶是酚类物质代谢的关键酶, 根据开环位置的不同, 可以分为邻苯二酚 1,2-双加氧酶(catechol 1,2-dioxygenase, CHD)和邻苯二酚 2,3-双加氧酶^[18]。其中 CHD 能够裂解邻苯二酚的苯环结构生成顺,顺-黏康酸, 其具有一个由铁离子、酪氨酸、羟基基团形成的催化活

性中心^[18]。Rocheleau 等^[19]研究发现在添加水杨酸为唯一碳源的合成低营养液体培养基(synthetic low nutrient medium, SNA)中接种禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)邻苯二酚 1,2-双加氧酶基因缺失菌株, 6 h 后培养基中水杨酸含量无明显变化, 而野生型菌株液体培养 4 h 后大部分水杨酸都被利用。同时, Shanmugam 等^[20]研究发现异旋孢腔菌(*Cochliobolus heterostrophus*)邻苯二酚 1,2-双加氧酶基因 *CCHD1* 在感知植物酚类化合物香豆酸和咖啡酸后显著上调表达。上述研究表明邻苯二酚 1,2-双加氧酶参与了真菌对植物酚类化合物的代谢, 但其具体的作用及调控机制仍需进一步研究。

本实验室前期分析发现苹果梨、早酥梨、皇冠梨等梨果表皮富含绿原酸、阿魏酸、咖啡酸和对香豆酸等酚类物质, 并且在果实的发育和贮藏期间酚酸类物质的种类和含量存在差异性^[21]。虽然梨果贮藏期间果皮仍富含酚类物质, 但 *A. alternata* 仍能够侵染而引起病害, 推测 *A. alternata* 可能会通过代谢或氧化梨果皮酚酸类物质从而成功定殖。因此, 本研究在对梨黑斑病菌 *A. alternata* 中 *CHD* 克隆的基础上, 通过 Smart、SOPMA 等软件对其进行生物信息学分析; 并进一步利用四元超快速液相色谱仪检测分析 *A. alternata* 对梨果皮主要酚酸类物质的降解作用, 同时通过 RT-qPCR 分析 *A. alternata* 在代谢酚酸类过程中 *CHD* 基因的表达情况, 以期为进一步揭示 *A. alternata* *CHD* 在代谢梨果皮酚类物质过程中的分子机制提供支撑。

1 材料与方法

1.1 样品

A. alternata JT-03 分离自黑斑病梨果的病变部位, 纯化后保存备用。

1.2 培养基

PDA 培养基(g/L): 马铃薯 200.0, 无水葡萄

糖 20.0, 琼脂 18.0。PDB 培养基参考文献[11]配制, 改良的查氏培养基参考文献[22]配制。

1.3 主要试剂和仪器

DNA Marker、pClone007 Versatile Simple Vector Kit 基因克隆载体和 TSC-C14 DH5 α Chemically Competant Cell, 北京擎科生物科技有限公司; cDNA 反转录试剂盒、FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; TRNzol Universal 总 RNA 提取试剂, 北京天根生化科技有限公司; 绿原酸(chlorogenic acid, CGA)、阿魏酸(ferulic acid, FA)、对香豆酸(*p*-coumaric acid, PCA)和咖啡酸(caffeic acid, CA)标准品, 上海源叶生物科技有限公司。实时荧光定量 PCR 分析仪, 杭州博日科技股份有限公司; 热循环仪, 伯乐生命医学产品(上海)有限公司; Waters ACQUITYArc 系统, 沃特世科技(上海)有限公司。

1.4 菌株 JT-03 菌丝体的制备

将菌株 JT-03 接种于 PDA 培养基, 28 °C 培养 5 d 后用血球计数板测定分生孢子浓度, 用无菌水调成终浓度为 1×10^6 spores/mL 的孢子悬浮液。将 40 μ L 孢子悬浮液接种于 200 mL 的 PDB 培养基中, 28 °C、180 r/min 活化 48 h, 收获真菌菌丝体, 用无菌水冲洗 2 次后接种于 200 mL 改良的查氏液体培养基中, 28 °C、180 r/min 培养 2 h, 以消除黏附在菌丝体表面的有效营养物质, 用于后续实验。

1.5 菌株 JT-03 中邻苯二酚 1,2-双加氧酶的基因克隆

取 0.1 g 新鲜的菌株 JT-03 菌丝在液氮中研磨, 使用 TRNzol Universal 总 RNA 提取试剂提取总 RNA, 按照 cDNA 反转录试剂盒说明书合成 cDNA, -20 °C 保存备用。下载 NCBI 中的 *Alternaria alternata* (SRC11rK2f, taxon: 5599) 基因组序列, 使用软件 DNAMAN 6.0 设计 *AaCHD1*、*AaCHD2* 的扩增引物。

以菌株 JT-03 的 cDNA 为模板进行目的基因扩增, *AaCHD1*、*AaCHD2* 分别采用引物对 *AaCHD1*-F (5'-ATGGCHDCTTCCAAGAGCG-3') 和 *AaCHD1*-R (5'-CTAGTCGACCTCTGGAACAG-3')、*AaCHD2*-F (5'-ATGTCTACAGGAACACCAGCTT-3') 和 *AaCHD2*-R (5'-ACGCGCTTTCTTCTGTCTG-3') 进行扩增。PCR 反应体系(25 μ L): 2 \times Phanta Max Master Mix 12.5 μ L, 正向引物 *AaCHD1*-F 或 *AaCHD2*-F (10 μ mol/L) 1 μ L, 反向引物 *AaCHD1*-R 或 *AaCHD2*-R (10 μ mol/L) 1 μ L, 模板 cDNA 1 μ L, ddH₂O 9.5 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 15 s, 56 °C 15 s, 72 °C 1 min, 33 个循环; 72 °C 5 min。将扩增产物进行凝胶电泳检测, 使用 FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit 进行胶回收, 之后与基因克隆载体连接, 转入 TSC-C14 DH5 α Chemically Competant Cell 中, 挑取单克隆培养后进行菌液 PCR 验证, 送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

1.6 *AaCHD* 生物信息学分析

利用 GSDS2.0、ORF Finder 等进行目的基因及其编码产物的生物信息学分析, 相关软件及在线网址如表 1 所示。使用 NCBI 数据库中的 BLASTp 在线分析工具进行氨基酸序列的同源性分析, 使用 MEGA 11.0 软件的邻近法构建系统发育树, bootstrap 值设定为 1 000。

1.7 基于梨果皮的外源酚酸类单体作为唯一碳源对菌株 JT-03 生长的影响

为了研究 *A. alternata* 能否利用梨果皮中主要酚酸单体为唯一碳源进行生长, 分别将 2 μ L 浓度为 1×10^6 spores/mL 的孢子悬浮液接种于以外源绿原酸、阿魏酸、咖啡酸、对香豆酸(0.1、0.2、0.3 和 0.4 mg/mL)为唯一碳源的改良查氏固体培养基, 以 5 g/L 葡萄糖为唯一碳源的改良查氏固体培养基为对照, 28 °C 培养 3、5 和 7 d, 测量菌落直径。每个处理 3 个平行, 重复 3 次。

表 1 预测相关软件及网址

Table 1 Online prediction software and website

Online software	Internet site	Use
GSDS 2.0	http://gsds.cbi.pku.edu.cn/chinese.php?input=se	基因结构 Gene structure
ORF Finder	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder	开放阅读框 Open reading frame
ProtParam	http://web.expasy.org/protparam/	理化性质 Physical and chemical properties
SMART	http://smart.embl-heidelberg.de/	保守结构域分析 Conservatied domain analysis
ProtScale	http://web.expasy.org/protscale/	亲/疏水性 Hydrophilic and hydrophobic
SOPMA	https://www.predictprotein.org/	蛋白二级结构 Protein secondary structure
ProtComp 9.0	http://linux1.softberry.com/cgi-bin/programs/	亚细胞定位 Subcellular localization
IBS2.0	https://ibs.renlab.org/	生物序列绘图 Illustrator for biological sequences

1.8 菌株 JT-03 对基于梨果皮外源酚酸类单体的代谢作用

A. alternata 菌株 JT-03 可以利用外源酚酸类物质为唯一碳源,在固体培养基上生长时添加浓度超过 0.1 mg/mL 时不同处理组间的菌落生长出现明显差异。因此为进一步研究其对外源酚酸类物质的代谢作用,添加浓度为 0.25 mg/mL 的外源阿魏酸、对香豆酸、咖啡酸和绿原酸作为唯一碳源,然后接种 0.1 g (湿重)菌株 JT-03 菌丝体于 50 mL 改良查氏液体培养基中,28 °C、180 r/min 培养 48 h,以不添加菌株 JT-03 菌丝体的查氏液体培养基作为对照,每个处理设置 3 个平行,检测 48 h 内外源酚酸的含量变化,每隔 12 h 过滤收集上清液。

参考 Ghosh 等^[23]的方法分析酚酸的含量,并略作修改。首先将上清液酸化至 pH 值为 1.0–2.0,然后用等体积的乙酸乙酯进行旋转蒸发,最后用 50%体积分数的甲醇水溶液定容至 3 mL 用于后续检测。外源酚酸类物质含量的检测使用 Waters ACQUITYArc 系统,配备 2998 PDA 光电二极管矩阵检测器,在 ZORBAXSB-C18 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)上进行分离。流动相为 0.1%甲酸水溶液和乙腈,流速为 0.8 mL/min,柱温为 28 °C,进样量为 5 μL。在检测波长为 280 nm 处将样品与标准品的保留时间进行比较来鉴定酚酸类物质,并根据峰面积和相应标准品的校正

曲线计算单个酚酸类物质的含量。并计算 *A. alternata* 对不同酚酸类物质的代谢效率。

代谢效率(%) =

$$\frac{\text{对照组酚酸含量} - \text{处理组酚酸含量}}{\text{对照组酚酸含量}} \times 100 \quad (1)$$

1.9 *AaCHD* 在菌株 JT-03 代谢外源酚酸类物质中的基因表达

菌株 JT-03 菌丝体的制备与 1.4 一致,以不添加酚类物质的培养基作为对照,每个处理 3 个重复。在 48 h 的培养过程中,每隔 12 h 进行取样,并用蒸馏水冲洗菌丝。将获得的菌丝在液氮中研磨,提取 cDNA。使用软件 Primer3.0 设计实时荧光定量 PCR 引物。使用实时荧光定量 PCR 分析仪进行 RT-qPCR 分析,内参基因为磷酸甘油脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH)基因。RT-qPCR 反应体系: 2×SYBR[®] Green Pro Taq HS 10 μL, 模板 cDNA 2 μL, 上游引物 *AaCHD1*-qF (5'-CTGTCGGCAAATTGCTTGAG-3')或 *AaCHD2*-qF (5'-AATGAGCTCACCGTCGATGAG-3')或 GAPDH-qF (5'-ATTGTCGCCGTAAACGACCC-3') (10 μmol/L) 1 μL, 下游引物 *AaCHD1*-qR (5'-GCCCTCCTTCTCGAACHDGA-3')或 *AaCHD2*-qR (5'-TTGCGTTTGAATCCGACHD-3')或 GAPDH-qR (5'-TTGACGGTCAGGTTGTTGCC-3') (10 μmol/L) 1 μL, RNase free water 6 μL。RT-qPCR 反应条件: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40 个循

环; 95 °C 15 s, 60 °C 60 s, 95 °C 15 s。结果以 0 h 不添加外源酚酸类物质的基因表达量作为对照, 通过用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 公式分析数据。

2 结果与分析

2.1 *CHD* 基因克隆

根据 Shanmugam 等^[20]在 *Cochliobolus heterostrophus* 中鉴别的 4 个邻苯二酚 1,2-双加氧酶的蛋白质序列, 通过 NCBI 中的 BLASTp 在线分析工具查找得到 *A. alternata* (taxon: 5599, SRC11rK2f) 中邻苯二酚 1,2-双加氧酶基因 *AaCHD1* (基因登录号为 29112679) 和 *AaCHD2* (基因登录号为 29118455)。以 *Alternaria alternata* 的 cDNA 为模板, 利用引物对 *AaCHD1*-F/R、*AaCHD2*-F/R 进行 PCR 扩增, 凝胶电泳检测后得到目的条带, 回收测序, 分别得到大小为 1 051 bp 和 1 048 bp 的 *AaCHD1* 和 *AaCHD2* 基因的 cDNA 序列(图 1)。

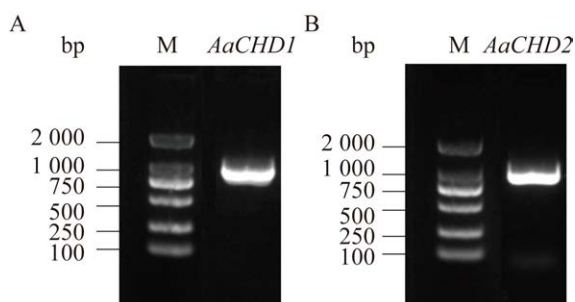


图 1 *AaCHD1*、*AaCHD2* 基因克隆扩增电泳图
Figure 1 Amplification electrophoretogram of *AaCHD1* and *AaCHD2* genes. M: DL2000 DNA Marker.

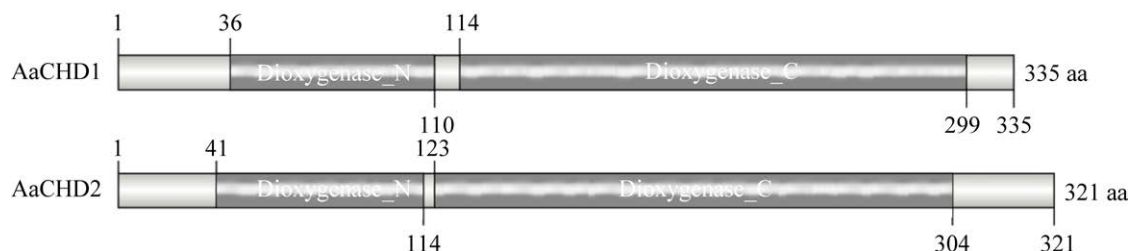


图 2 *AaCHD1* 和 *AaCHD2* 蛋白的保守结构域分析 深灰色: 具有双加氧酶 N 端和 C 端的蛋白保守基序; 灰色: 其余的蛋白基序

Figure 2 Domain analysis of *AaCHD1* and *AaCHD2*. Dark grey: Protein conservative motif with N-terminal and C-terminal of dioxxygenase; Grey: The remaining protein motifs.

2.2 *AaCHD* 基因的生物信息学分析

2.2.1 基因结构及蛋白质理化性质分析

通过 GSDS2.0 软件分析结果表明, *AaCHD1* 基因全长为 1 664 bp, 其编码序列 (coding sequence, CDS) 区长度为 1 008 bp, 共编码 335 个氨基酸; *AaCHD2* 基因全长为 1 445 bp, 其 CDS 区长度为 966 bp, 共编码 321 个氨基酸, 并且均含有 2 个内含子。利用 ProtComp 9.0 预测亚细胞定位的结果表明, *AaCHD1* 分别定位于质膜和细胞质中, 而 *AaCHD2* 定位在细胞质和线粒体中。通过 ProtParam 分析可知 *AaCHD1* 和 *AaCHD2* 带正、负电荷残基数分别为 53、36 和 45、32, 理论等电点分别为 5.06 和 5.22, 表明 *AaCHD1* 和 *AaCHD2* 蛋白均带正电; *AaCHD1* 和 *AaCHD2* 总平均亲水性分别为 -0.322 和 -0.464, 不稳定系数分别为 31.30 和 40.56, 即 *AaCHD1* 为稳定亲水蛋白、*AaCHD2* 为不稳定亲水蛋白。

2.2.2 *AaCHD* 蛋白的保守结构域分析

通过 SMART 网站和 IBS2.0 软件分析并绘制 *AaCHD1*、*AaCHD2* 蛋白结构域, 结果显示 *AaCHD1* 在第 36-110 aa 具有 Dioxxygenase_N 保守基序, 在第 114-299 aa 具有 Dioxxygenase_C 保守基序; *AaCHD2* 在第 41-114 aa 具有 Dioxxygenase_N 保守基序, 在第 123-304 aa 具有 Dioxxygenase_C 保守基序(图 2)。

2.2.3 AaCHD 编码产物的二级结构分析

使用在线软件 SOPMA 对蛋白二级结构进行预测, AaCHD1 二级结构中 α 螺旋、 β 转角、延伸链和无规则卷曲分别占 30.15%、4.78%、20.60%和 44.48%。AaCHD2 二级结构中 α 螺旋、 β 转角、延伸链和无规则卷曲分别占 27.1%、5.3%、19.63%和 47.98%。AaCHD1、AaCHD2 二级结构的类型中 α 螺旋结构和无规则卷曲出

现比例均较高, 其次为延伸链, 比例最低的是 β 转角(图 3)。

2.2.4 AaCHD 系统发育分析

由图 4 结果可见, AaCHD1 和 AaCHD2 分别与番茄匍柄霉(*Stemphylium lycopersici*)和异旋孢腔菌(*Cochliobolus heterostrophus*) CCHD3 的氨基酸序列相似性最高, 亲缘关系最近, 其相似性分别高达 82.55%和 81.19% (图 4)。

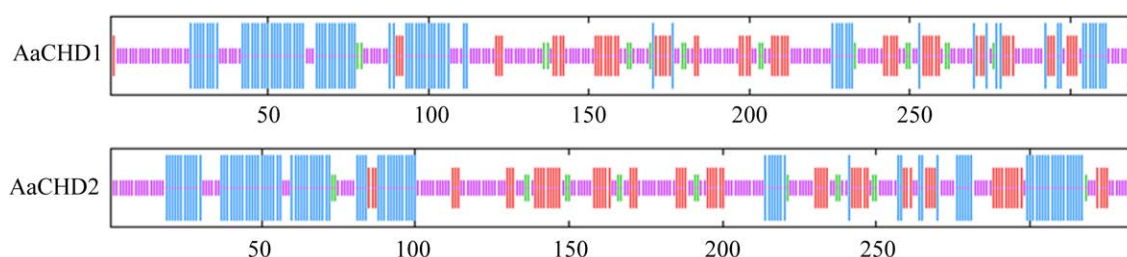


图 3 AaCHD1 和 AaCHD2 二级结构预测图 蓝色: α 螺旋; 红色: 延伸链; 绿色: β 转角; 紫色: 无规则卷曲

Figure 3 Protein secondary structure prediction of AaCHD1 and AaCHD2. Blue: Alpha helix; Red: Extended strand; Green: Beta turn; Purple: Random coil.

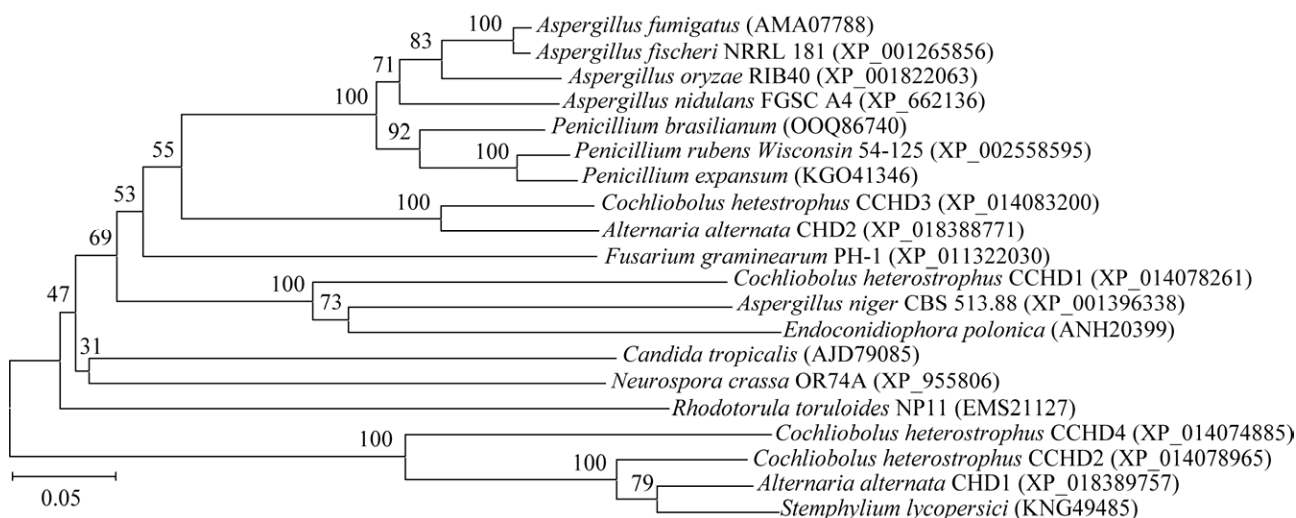


图 4 AaCHD1 和 AaCHD2 与其他真菌 CHD 同源蛋白的系统发育分析 发育树节点的数字表示 bootstrap 自展值; 括号中的数字为相应氨基酸序列的登录号; 标尺显示每个氨基酸是 0.05 的遗传距离

Figure 4 Phylogenetic analysis of AaCHD1, AaCHD2 and other fungal CHD homologous proteins. At the branch nodes are 1 000 bootstrap replicates represented as percentage values; The accession numbers of different fungal CHD protein are in parentheses; The scale bar indicates 0.05 substitutions per amino acid position.

2.3 基于梨果皮的外源酚酸类单体作为唯一碳源影响菌株 JT-03 的生长

由图 5 可知, 菌株 JT-03 能在以酚酸单体作为唯一碳源的培养基上生长, 但菌落直径随浓度增加而降低。当外源添加酚酸类物质浓度为 0.1 mg/mL 时, 各处理组间的菌落直径无明显差异。当外源添加酚酸类物质浓度为 0.2 mg/mL 时, 在第 7 天观察到在添加外源咖啡酸培养基上的生长显著好于外源添加其他 3 种酚酸类物质($P<0.05$)。因

此, 菌株 JT-03 能够利用酚酸单体作为唯一碳源生长, 但存在种类及浓度差异, 在固体培养基上对咖啡酸的利用能力好于绿原酸、阿魏酸和对香豆酸。

2.4 菌株 JT-03 对基于梨果皮外源酚酸类单体的代谢作用分析

随着培养时间的延长, 培养基中剩余酚酸含量均呈降低趋势, 但接种菌株 JT-03 的培养基中酚酸类物质含量显著低于对照组(图 6)。在培

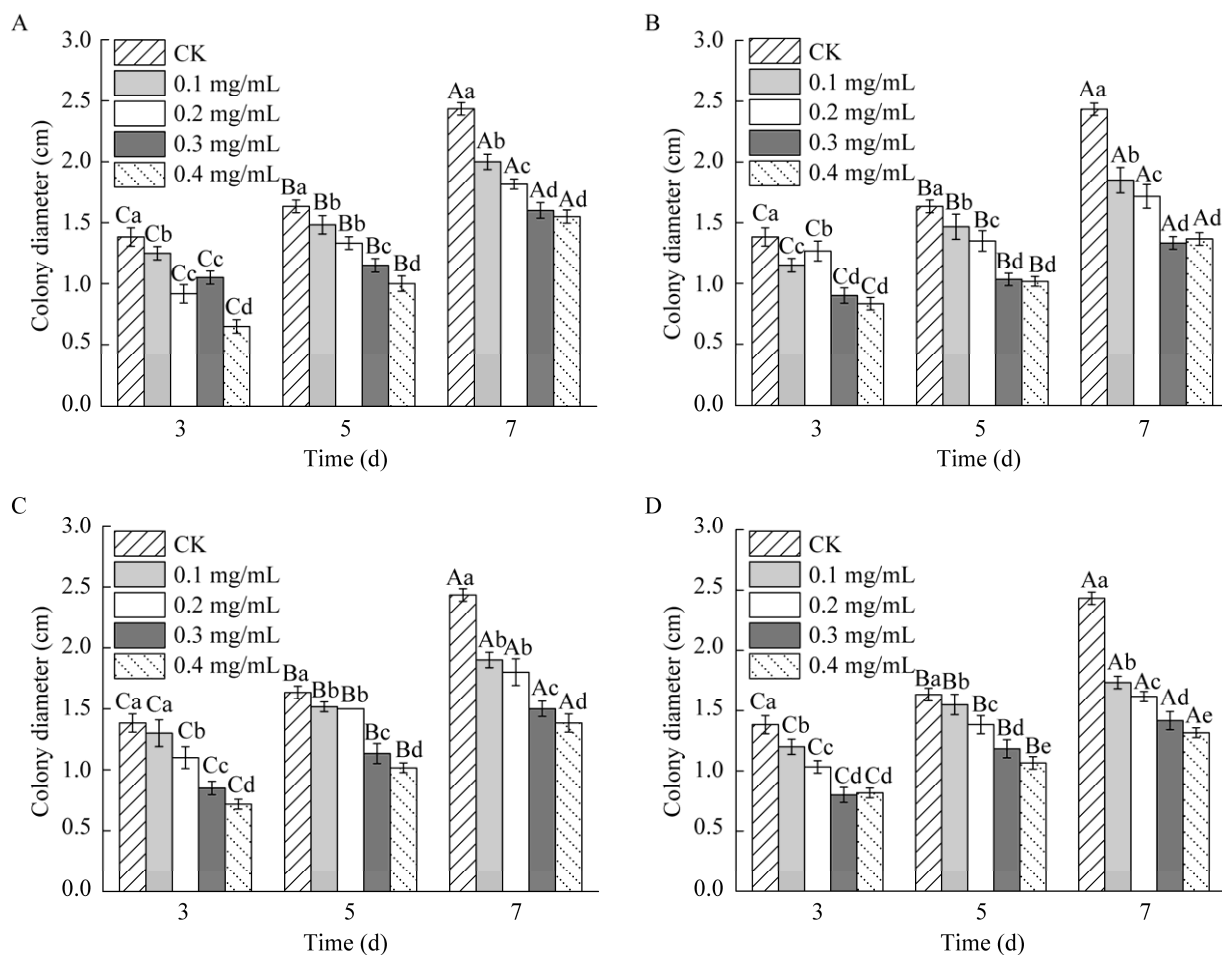


图 5 绿原酸(A)、阿魏酸(B)、咖啡酸(C)和对香豆酸(D)对菌株 JT-03 菌落直径的影响 不同大写字母和小写字母分别代表处理组间和处理组内存在显著性差异

Figure 5 Effect of chlorogenic acid (A), ferulic acid (B), caffeic acid (C) and *p*-coumaric acid (D) on colony diameter of strain JT-03. Different capital and lowercase letters indicate significant difference between and within treatments, respectively.

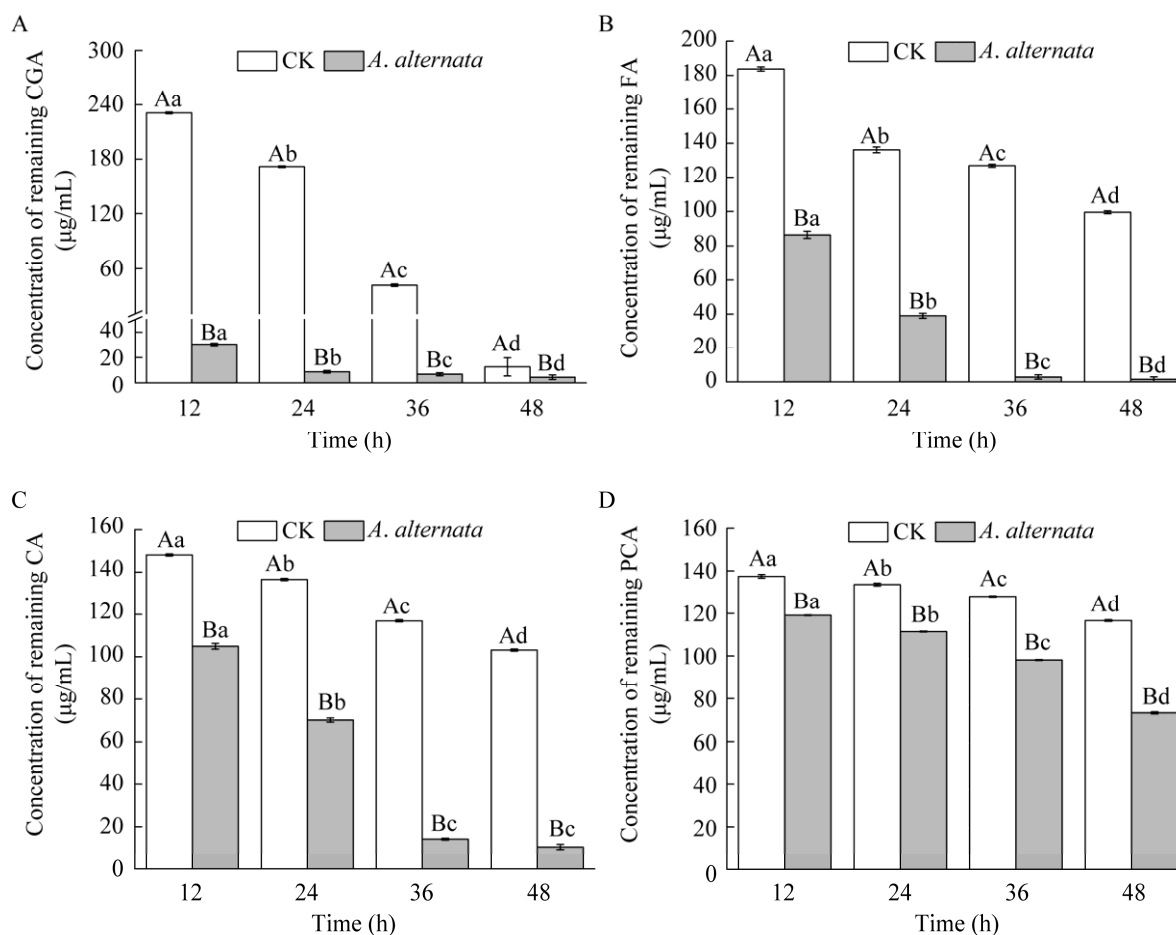


图 6 菌株 JT-03 对绿原酸(A)、阿魏酸(B)、咖啡酸(C)和对香豆酸(D)的降解作用 不同大写字母和小写字母分别代表处理组间和处理组内存在显著性差异

Figure 6 The degradation effect of strain JT-03 on chlorogenic acid (A), ferulic acid (B), caffeic acid (C) and *p*-coumaric acid (D). Different capital and lowercase letters indicate significant difference between and within treatments, respectively.

养初期(24 h), 接种菌株 JT-03 的培养基中绿原酸和阿魏酸的含量显著降低, 其降解率分别高达 99.49%和 71.37% (图 6A、6B), 随着培养时间延长, 咖啡酸也被显著降解(图 6C)。培养至 48 h 时, 菌株 JT-03 对咖啡酸和对香豆酸的降解率也分别达到 89.87%和 37.13% (图 6D)。可见菌株 JT-03 可差异性代谢梨果皮主要酚酸类物质, 对绿原酸、阿魏酸和咖啡酸的代谢能力好于香豆酸。

2.5 *AaCHD1* 和 *AaCHD2* 在菌株 JT-03 代谢外源酚酸类物质中的基因表达分析

在添加外源酚酸类物质为唯一碳源的培养基中菌株 JT-03 的 *AaCHD1* 和 *AaCHD2* 基因均显著上调表达(图 7), 但不同酚酸类物质的诱导作用存在时序性差异。*AaCHD1* 和 *AaCHD2* 基因表达量分别在培养 48 h 和 36 h 时在外源添加咖啡酸的培养基中上调表达, 为对照组的 231.43 倍和 714.95 倍(图 7C); 而在外源添加阿魏酸培养

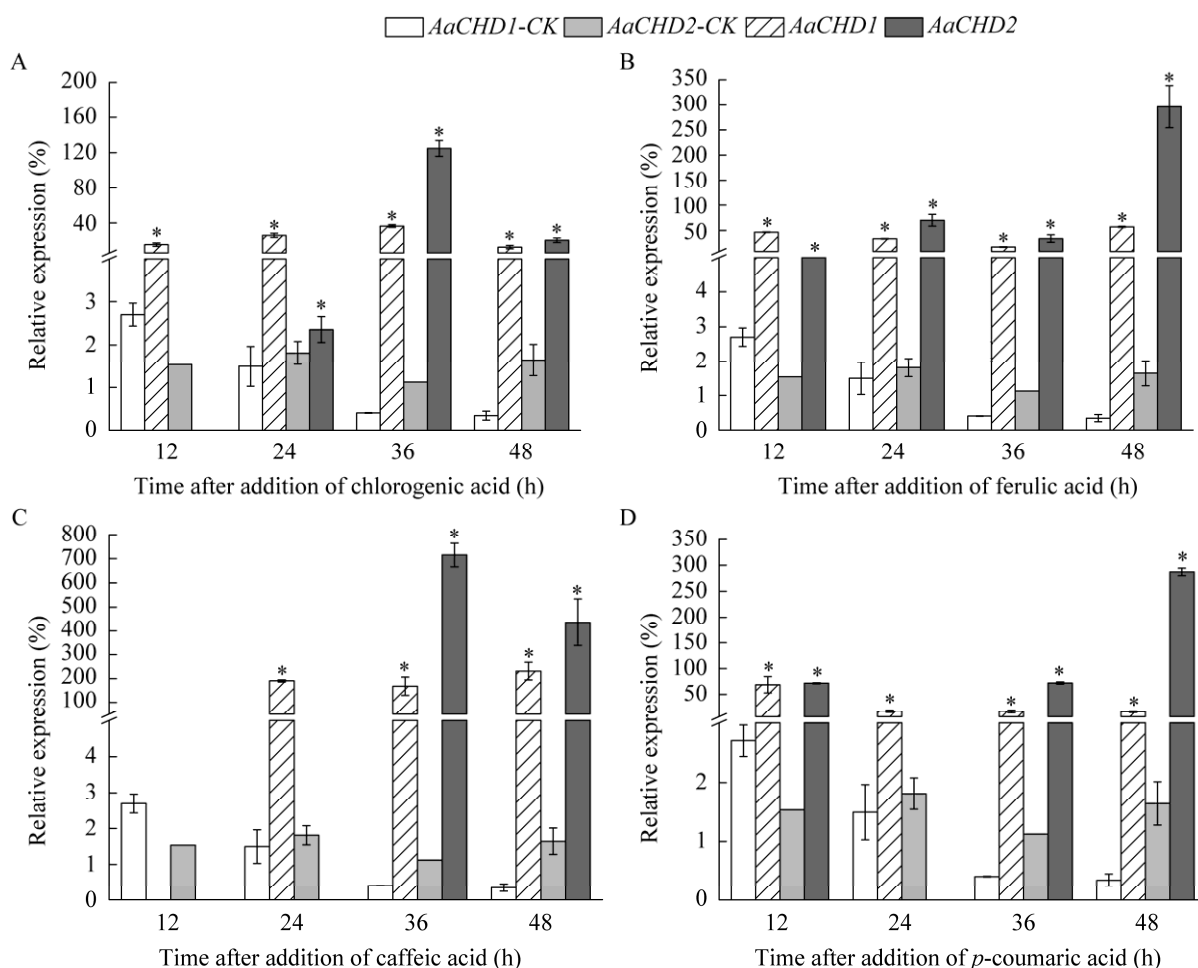


图 7 *AaCHD1* 和 *AaCHD2* 基因在绿原酸(A)、阿魏酸(B)、咖啡酸(C)和对香豆酸(D)诱导下的相对表达水平
Figure 7 Relative expression level of *AaCHD1* and *AaCHD2* gene induced by chlorogenic acid (A), ferulic acid (B), caffeic acid (C) and *p*-coumaric acid (D). *: $P < 0.05$.

过程中这两个基因表达均在 48 h 达到最高；外源添加对香豆酸培养过程中分别在 12 h 和 48 h 基因表达达到最高(图 7B、7D)。外源咖啡酸的诱导效果显著好于其他外源酚酸类物质，绿原酸的诱导效果最弱(图 7A)。

3 讨论

邻苯二酚是酚类物质代谢过程中重要的中间产物，可以在邻苯二酚 1,2-双加氧酶的作用下进一步裂解最终进入三羧酸循环。本研究从梨黑斑病菌中克隆得到了 *AaCHD1* 和 *AaCHD2* 基因，

通过保守结构域分析表明其具有双加氧酶 C 末端和 N 末端的保守结构域，系统发育分析表明其分别与 Franco 等^[24]报道的 *Stemphylium lycopersic* 和 Shanmugam 等^[20]报道的 *Cochliobolus heterostrophus* CCHD3 相似性最高，表明病原真菌的邻苯二酚双加氧酶具有保守性。

酚类物质是植物主要的次生代谢产物，主要存在于植物种子、果实、花瓣等部位，包括丹宁类、酚酸类、黄酮类等，其结构和含量在植物生长发育及响应生物、非生物胁迫中具有多样性和

复杂性^[25-26]。在植物生长发育过程中酚类物质作为信号分子参与植物生理及抗病过程,表现出抗氧化、抑菌等活性^[27]。植物病原真菌为了成功感染和定殖寄主细胞,必须克服一系列具有广泛抗菌特性的植物防御化合物。本研究发现 *A. alternata* 可以在基于梨果皮酚酸类物质的酚酸单体如阿魏酸、对香豆酸、咖啡酸、绿原酸为唯一碳源的培养基上生长(图 5), 同样番茄枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* 野生型菌株也可以在外源添加阿魏酸、香豆酸、肉桂酸等酚类物质为唯一碳源的最小培养基上生长^[28]。但病原物对不同外源酚类物质的代谢存在差异, 本研究发现在外源添加 0.25 mg/mL 酚酸单体为唯一碳源的液体培养基中 *A. alternata* 对绿原酸、阿魏酸、咖啡酸、对香豆酸均具有一定的降解能力, 但在前 36 h 对绿原酸代谢效率最高, 随培养时间延长最终对于阿魏酸的代谢效率增高(图 6)。Xie 等^[12]证明了内生真菌枫香拟茎点霉(*Phomopsis liquidambaris*)对阿魏酸具有较强的降解能力, 48 h 可将外源添加浓度为 200 mg/L 阿魏酸完全降解; Patil 等^[29]发现白腐真菌毛栓菌(*Trametes hirsuta*) 和黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)在培养 48 h 后可分别将外源添加 350 mg/L 和 250 mg/L 阿魏酸完全降解, 可见不同病原真菌对外源酚类的耐受、降解能力及代谢速率均存在差异, 其具体代谢作用及调控机理尚需进一步揭示。

进一步研究发现 *A. alternata* 的 *AaCHD1* 和 *AaCHD2* 基因在外源绿原酸、阿魏酸、咖啡酸和对香豆酸存在的情况下显著上调表达(图 7)。同样 Shalaby 等^[30]研究发现异旋孢腔菌中邻苯二酚 1,2-双加氧酶基因 *CCHD1* 的表达水平受咖啡酸、阿魏酸、4-羟基苯甲酸和香豆酸的强烈诱导, 并且咖啡酸的诱导效果好于阿魏酸, 这与本实验

的结果一致。邻苯二酚 1,2-双加氧酶基因在不同病原物侵染和外源酚类物质诱导过程中的表达也存在差异, Wadke 等^[31]在研究 2 种不同毒力的波洛内分孢子虫(*Endoconidiophora polonica*)菌株侵染云杉树皮时发现, 毒力强的菌株侵染过程中 3 个邻苯二酚 1,2-双加氧酶基因中 *EpCDO1* 和 *EpCDO2* 在内部病变和扩张病变中的表达水平相似, 而 *EpCDO4* 在扩张病变中表达水平显著增高。本研究中同样发现 *A. alternata* *AaCHD1* 和 *AaCHD2* 在外源酚类物质诱导中基因表达存在上调水平和时序性差异(图 7)。综上, 邻苯二酚 1,2-双加氧酶对病原真菌在富含酚类物质的寄主植物上生长、侵染和定殖中起重要作用, 但不同病原的邻苯二酚 1,2-双加氧酶的基因数量及对酚类物质的代谢机制存在多样性和复杂性, 其具体的作用方式及调控机制仍须进一步系统研究。

4 结论

本研究从梨黑斑病菌中克隆得到了 *AaCHD1* 和 *AaCHD2* 两个邻苯二酚 1,2-双加氧酶基因, 生物信息学分析表明其均含有双加氧酶的 C 末端和 N 末端保守结构域, 系统发育分析表明, 其分别与番茄匍柄霉及异旋孢腔菌中的邻苯二酚 1,2-双加氧酶的亲源性最高。同时研究表明 *A. alternata* 能在以酚酸类物质为唯一碳源的培养基上生长且能代谢酚酸类物质, 其代谢作用因酚酸物质种类而异, 进一步分析表明 *A. alternata* 的基因 *AaCHD1* 和 *AaCHD2* 能被外源酚类物质诱导而显著上调表达。可见邻苯二酚 1,2-双加氧酶参与了 *A. alternata* 代谢梨果皮酚酸类物质的过程, 该结果将为全面揭示 *AaCHD* 在 *A. alternata* 克服梨果皮酚类物质的防御作用进而侵染寄生的分子机制提供理论依据。

REFERENCES

- [1] PRUSKY D. Pathogen quiescence in postharvest diseases[J]. Annual Review of Phytopathology, 1996, 34: 413-434.
- [2] 李永才, 毕阳. 苹果梨黑斑病的发生及侵染过程[J]. 植物保护学报, 2006, 33(2): 131-135.
LI YC, BI Y. Occurrence and infection of *Alternaria* rot of pingguoli pear, *Pyrus pyrifolia*[J]. Journal of Plant Protection, 2006, 33(2): 131-135 (in Chinese).
- [3] 白小东, 毕阳, 李永才, 王毅, 牛黎莉, 王婷, 尚琪. 果蔬采后病害的潜伏侵染机理研究进展[J]. 食品科学, 2015, 36(7): 278-282.
BAI XD, BI Y, LI YC, WANG Y, NIU LL, WANG T, SHANG Q. Mechanism of latent infection for postharvest diseases of fruits and vegetables[J]. Food Science, 2015, 36(7): 278-282 (in Chinese).
- [4] ISAH T. Stress and defense responses in plant secondary metabolites production[J]. Biological Research, 2019, 52(1): 39.
- [5] YANG L, WEN KS, RUAN X, ZHAO YX, FENG W, WANG Q. Response of plant secondary metabolites to environmental factors[J]. Molecules, 2018, 23(4): 762.
- [6] GUERRIERI A, DONG LM, BOUWMEESTER HJ. Role and exploitation of underground chemical signaling in plants[J]. Pest Management Science, 2019, 75(9): 2455-2463.
- [7] KESSLER A, KALSKE A. Plant secondary metabolite diversity and species interactions[J]. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 2018, 49: 115-138.
- [8] 张磊. 19 个苹果属植物酚类物质分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2017.
ZHANG L. Characterization of phenolic compounds in 19 *Malus* genotypes[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2017 (in Chinese).
- [9] BOY FR, CASQUETE R, GUDIÑO I, MERCHÁN AV, PEROMINGO B, BENITO MJ. Antifungal effect of autochthonous aromatic plant extracts on two mycotoxigenic strains of *Aspergillus flavus*[J]. Foods, 2023, 12(9): 1821.
- [10] SASAKI A, YAMANO Y, SUGIMOTO S, OTSUKA H, MATSUNAMI K, SHINZATO T. Phenolic compounds from the leaves of *Breynia officinalis* and their tyrosinase and melanogenesis inhibitory activities[J]. Journal of Natural Medicines, 2018, 72(2): 381-389.
- [11] CHEN JY, ULLAH C, REICHELT M, GERSHENZON J, HAMMERBACHER A. *Sclerotinia sclerotiorum* circumvents flavonoid defenses by catabolizing flavonol glycosides and aglycones[J]. Plant Physiology, 2019, 180(4): 1975-1987.
- [12] XIE XG, DAI CC. Degradation of a model pollutant ferulic acid by the endophytic fungus *Phomopsis liquidambari*[J]. Bioresource Technology, 2015, 179: 35-42.
- [13] VAILLANCOURT FH, BOLIN JT, ELTIS LD. The ins and outs of ring-cleaving dioxygenases[J]. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 2006, 41(4): 241-267.
- [14] MÄKELÄ MR, MARINOVIĆ M, NOUSIAINEN P, LIWANAG AJM, BENOIT I, SIPILÄ J, HATAKKA A, de VRIES RP, HILDÉN KS. Aromatic metabolism of filamentous fungi in relation to the presence of aromatic compounds in plant biomass[J]. Advances in Applied Microbiology, 2015, 91: 63-137.
- [15] LUBBERS RJM, DILOKPIMO A, VISSER J, MÄKELÄ MR, HILDÉN KS, de VRIES RP. A comparison between the homocyclic aromatic metabolic pathways from plant-derived compounds by bacteria and fungi[J]. Biotechnology Advances, 2019, 37(7): 107396.
- [16] WENG CH, PENG XW, HAN YJ. Depolymerization and conversion of lignin to value-added bioproducts by microbial and enzymatic catalysis[J]. Biotechnology for Biofuels, 2021, 14(1): 84.
- [17] LUBBERS RJM, DE VRIES RP. Production of protocatechuic acid from *p*-hydroxyphenyl (H) units and related aromatic compounds using an *Aspergillus niger* cell factory[J]. mBio, 2021, 12(3): e0039121.
- [18] 赵化冰, 覃琨, 谭之磊, 李华英, 李德金, 郭锦, 刘芳. 邻苯二酚 1,2-双加氧酶的结构、功能及同工酶现象研究进展[J]. 微生物学通报, 2019, 46(9): 2419-2425.
ZHAO HB, QIN K, TAN ZL, LI HY, LI DJ, GUO J, LIU F. Advances in study on structure, enzymatic property and isoenzymes of catechol 1,2-dioxygenases[J]. Microbiology China, 2019, 46(9): 2419-2425 (in Chinese).
- [19] ROCHELEAU H, AL-HARTHI R, OUELLET T. Degradation of salicylic acid by *Fusarium graminearum*[J]. Fungal Biology, 2019, 123(1): 77-86.
- [20] SHANMUGAM V, RONEN M, SHALABY S, LARKOV O, RACHAMIM Y, HADAR R, ROSE MS, CARMELI S, HORWITZ BA, LEV S. The fungal pathogen *Cochliobolus heterostrophus* responds to maize phenolics: novel small molecule signals in a plant-fungal interaction[J]. Cellular Microbiology, 2010, 12(10): 1421-1434.
- [21] 黄怡, 高春丽, 毕阳, 李冬美, 董玉鹏, 张彦东, 李永才. 低温贮藏期间梨果皮酚类物质及抗氧化性变化[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(19): 219-226.

- HUANG Y, GAO CL, BI Y, LI DM, DONG YP, ZHANG YD, LI YC. Changes in phenolic compounds and antioxidant activity of pear peel during cold storage[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(19): 219-226 (in Chinese).
- [22] TANG Y, LI YC, BI Y, WANG Y. Role of pear fruit cuticular wax and surface hydrophobicity in regulating the prepenetration phase of *Alternaria alternata* infection[J]. Journal of Phytopathology, 2017, 165(5): 313-322.
- [23] GHOSH S, SACHAN A, MITRA A. Degradation of ferulic acid by a white rot fungus *Schizophyllum commune*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2005, 21(3): 385-388.
- [24] FRANCO MEE, LÓPEZ S, MEDINA R, SAPARRAT MCN, BALATTI P. Draft genome sequence and gene annotation of *Stemphylium lycopersici* strain CIDEFI-216[J]. Genome Announcements, 2015, 3(5): e01069-15.
- [25] HEIM KE, TAGLIAFERRO AR, BOBILYA DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2002, 13(10): 572-584.
- [26] RINGLI C, BIGLER L, KUHN BM, LEIBER RM, DIET A, SANTELIA D, FREY B, POLLMANN S, KLEIN M. The modified flavonol glycosylation profile in the *Arabidopsis roll* mutants results in alterations in plant growth and cell shape formation[J]. The Plant Cell, 2008, 20(6): 1470-1481.
- [27] 张婷婷. 梨果表皮酚类物质对 *Alternaria alternata* 生长及其致病性的调控[D]. 兰州: 甘肃农业大学硕士学位论文, 2019.
- ZHANG TT. Regulation of phenolic compounds based on concentration level in pear fruit peel on growth and pathogenicity of *Alternaria alternata*[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Gansu Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [28] MICHIELSE CB, REIJNEN L, OLIVAIN C, ALABOUVETTE C, REP M. Degradation of aromatic compounds through the β -ketoadipate pathway is required for pathogenicity of the tomato wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*[J]. Molecular Plant Pathology, 2012, 13(9): 1089-1100.
- [29] PATIL PD, YADAV GD. Comparative studies of white-rot fungal strains (*Trametes hirsuta* MTCC-1171 and *Phanerochaete chrysosporium* NCIM-1106) for effective degradation and bioconversion of ferulic acid[J]. ACS Omega, 2018, 3(11): 14858-14868.
- [30] SHALABY S, HORWITZ BA, LARKOV O. Structure-activity relationships delineate how the maize pathogen *Cochliobolus heterostrophus* uses aromatic compounds as signals and metabolites[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI, 2012, 25(7): 931-940.
- [31] WADKE N, KANDASAMY D, VOGEL H, LAH L, WINGFIELD BD, PAETZ C, WRIGHT LP, GERSHENZON J, HAMMERBACHER A. The bark-beetle-associated fungus, *Endoconidiophora polonica*, utilizes the phenolic defense compounds of its host as a carbon source[J]. Plant Physiology, 2016, 171(2): 914-931.