

研究报告



灰葡萄孢犬尿氨酸途径关键酶基因的鉴定

王畅^Δ 李白^Δ 张超 张虎 朱少东 袁雪梅 张康 邢继红* 董金皋*

河北省植物生理与分子病理学重点实验室 河北农业大学真菌毒素与植物分子病理学实验室

河北 保定 071000

摘要:【背景】灰葡萄孢是一种重要的植物病原真菌，实验室前期明确了灰葡萄孢犬尿氨酸单加氧酶(kynurenine 3-monooxygenase, KMO)基因 *BcKMO* 参与调控病菌的生长发育和致病力。犬尿氨酸单加氧酶(KMO)是犬尿氨酸途径的关键酶，但灰葡萄孢是否存在犬尿氨酸途径及其在病菌生长、发育和致病过程中的功能尚未见相关报道。【目的】鉴定灰葡萄孢犬尿氨酸途径中的关键酶基因，确定灰葡萄孢犬尿氨酸途径的存在，为阐明灰葡萄孢生长发育和致病力的分子机理奠定基础。【方法】利用生物信息学方法，对灰葡萄孢犬尿氨酸途径中犬尿氨酸酶(kynureninase, KYN)、吲哚-2,3-双加氧酶(indoleamine-2,3-dioxygenase, IDO)、犬尿氨酸氨基转移酶(kynurenine amino transferase, KAT)的编码基因进行分析；利用 Real-time PCR 技术，检测灰葡萄孢野生型 BC22、*BcKMO* 基因 T-DNA 插入突变体 BCG183、恢复菌株 BCG183/*BcKMO* 中犬尿氨酸途径关键酶基因的表达水平；利用真菌犬尿氨酸酶 KYN 检测试剂盒，测定 *BcKMO* 突变体中犬尿氨酸酶(KYN)的含量。【结果】灰葡萄孢中含有 2 个犬尿氨酸氨基转移酶(KAT)的编码基因、3 个吲哚-2,3-双加氧酶(IDO)的编码基因、10 个犬尿氨酸氨基转移酶(KAT)的编码基因。灰葡萄孢 KYN 编码基因、IDO 编码基因、KAT 编码基因在突变体 BCG183 中的表达水平显著高于或低于在野生型和恢复菌株。突变体 BCG183 中犬尿氨酸酶(KYN)的含量显著低于野生型 BC22 和恢复菌株。【结论】灰葡萄孢中存在犬尿氨酸途径，灰葡萄孢 *BcKMO* 基因突变影响 KYN、IDO 和 KAT 编码基因的表达以及犬尿氨酸酶(KYN)的含量。

关键词: 灰葡萄孢, 犬尿氨酸途径, 关键酶基因, 生物信息学分析, Real-time PCR

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31972217); Natural Science Foundation of Hebei Province (C2018204045); Higher Education Research Fund of Hebei Province (ZD2016001); Scientific Research Foundation for Returned Chinese Scholars of Hebei Province (0316012)

^ΔThese authors equally contributed to this work

*Corresponding authors: E-mail: XING Ji-Hong: xingjihong2000@126.com; DONG Jin-Gao: dongjingao@126.com

Received: 25-08-2019; Accepted: 04-12-2019; Published online: 12-12-2019

基金项目: 国家自然科学基金(31972217); 河北省自然科学基金(C2018204045); 河北省高等学校科学技术研究项目(ZD2016001); 河北省留学人员科技活动择优资助项目(0316012)

^Δ对本文贡献相同

*通信作者: E-mail: 邢继红: xingjihong2000@126.com; 董金皋: dongjingao@126.com

收稿日期: 2019-08-25; 接受日期: 2019-12-04; 网络首发日期: 2019-12-12

Identification of key enzyme genes of kynurenine pathway in *Botrytis cinerea*

WANG Chang^Δ LI Bai^Δ ZHANG Chao ZHANG Hu ZHU Shao-Dong
YUAN Xue-Mei ZHANG Kang XING Ji-Hong* DONG Jin-Gao*

Key Laboratory of Hebei Province for Plant Physiology and Molecular Pathology, Mycotoxin and Molecular Plant Pathology Laboratory of Hebei Agricultural University, Baoding, Hebei 071000, China

Abstract: [Background] *Botrytis cinerea* is an important phytopathogenic fungus. In previous studies, it was confirmed that the *BcKMO* gene encoding kynurenine 3-monooxygenase (KMO) is involved in the regulation of the growth and pathogenicity of *Botrytis cinerea*. KMO is a key enzyme in the kynurenine pathway, but the presence of the kynurenine pathway in *Botrytis cinerea* and its function in the growth, development and pathogenesis of pathogens have not yet been related reported. [Objective] To identify the key enzyme genes in the kynurenine pathway of *Botrytis cinerea*, and to determine the presence of kynurenine pathway in *Botrytis cinerea*, lay the foundation for elucidating the molecular mechanism of growth and pathogenicity of *Botrytis cinerea*. [Methods] Bioinformatics methods were used to analyze the coding genes of key enzyme, kynureninase (KYN), indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO), and kynurenine amino transferase (KAT), in the kynurenine pathway of *Botrytis cinerea*. Real-time PCR was used to detect the expression level of key enzyme genes of the kynurenine pathway in *Botrytis cinerea* wild-type BC22, *BcKMO* mutant BCG183, and the *BcKMO* complementing strain BCG183/*BcKMO*. The content of kynureninase in the *BcKMO* mutant was determined by using a fungal kynureninase assay kit. [Results] *Botrytis cinerea* contains 2 genes coding KYN, 3 genes coding IDO, and 10 genes coding KAT. The expression levels of *Botrytis cinerea* KYN, IDO, KAT coding genes in mutant BCG183 were significantly higher or lower than those in BC22 and BCG183/*BcKMO*. The content of kynureninase (KYN) in the mutant BCG183 was significantly lower than that of BC22 and BCG183/*BcKMO*. [Conclusion] Kynurenine pathway is present in *Botrytis cinerea*. *BcKMO* mutation affects the expression of *KYN*, *IDO* and *KAT* encoding genes and the content of kynureninase (KYN) in *Botrytis cinerea*.

Keywords: *Botrytis cinerea*, Kynurenine pathway, Key enzyme genes, Bioinformatics analysis, Real-time PCR

灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)是一种典型的死体营养型植物病原真菌,其危害严重时可造成减产达到40%以上^[1-3],已成为我国蔬菜生产中的重大障碍,而灰葡萄孢已对多种杀菌剂产生了明显的抗药性^[4-5]。因此发掘灰葡萄孢的生长发育、致病相关基因,为阐明灰葡萄孢生长发育和致病的分子机理奠定基础。

犬尿氨酸途径是色氨酸分解代谢的主要途径^[6-7],色氨酸在肝脏中是由色氨酸-2,3-双加氧酶(tryptophan-2,3-dioxygenase, TDO)或者是其他组织当中的吲哚-2,3-双加氧酶(indoleamine-2,3-dioxygenase, IDO)的作用下生成了N-甲酰基犬尿氨酸(N-formylkynurenine),犬尿氨酸甲酰胺酶

(kynurenine formamidase, KFA)将其水解后得到犬尿氨酸(kynurenine)。犬尿氨酸位于犬尿氨酸途径的分支位点:犬尿氨酸可以在犬尿氨酸氨基转移酶(kynurenine aminotransferase, KAT)的作用下生成犬尿喹啉酸(kynurenic acid);犬尿氨酸可在犬尿氨酸单加氧酶(kynurenine 3-monooxygenase, KMO)的作用下生成3-羟基犬尿氨酸(3-hydroxykynurenine, 3-HK),再在犬尿氨酸酶(kynureninase, KYN)的作用下生成3-羟基-2-氨基苯甲酸(3-hydroxyanthranilic acid, 3-HAA),经3-羟基-2-氨基苯甲酸双加氧酶(3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase, 3-HAD)作用生成喹啉酸(quinolinic acid, QUIN),最后在喹啉酸转磷酸核糖基酶(quinolinic acid

phosphoribosyltransferase, QPRT)的作用下生成 NAD^{+} ^[8-9];犬尿氨酸可在犬尿氨酸酶的酶促作用下,转化成邻氨基苯甲酸(anthranilic acid),进而被邻氨基苯甲酸羟化酶(anthranilic acid 3-hydroxylase)羟基化生成 3-HAA,最终完成 NAD^{+} 的生物合成。

灰葡萄孢犬尿氨酸途径及其途径关键基因的功能至今尚未见报道。本实验室前期研究获得了灰葡萄孢致病基因 *BcKMO*,利用生物信息学分析、体外酶活性测定方法,明确了 *BcKMO* 基因编码犬尿氨酸单加氧酶(KMO)^[10]。由此推测,灰葡萄孢中存在犬尿氨酸途径。基于此,本研究利用生物信息学方法,对灰葡萄孢犬尿氨酸途径中关键酶基因进行分析、鉴定;利用 Real-time PCR 技术检测灰葡萄孢野生型 BC22、*BcKMO* 基因 T-DNA 插入突变体 BCG183 和恢复菌株 BCG183/*BcKMO* 中犬尿氨酸途径关键酶基因的表达水平;利用真菌犬尿氨酸酶检测试剂盒,测定 *BcKMO* 突变体中犬尿氨酸酶的含量,为明确灰葡萄孢犬尿氨酸途径及其功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株

灰葡萄孢野生型菌株 BC22、*BcKMO* 基因的 T-DNA 插入突变体 BCG183、恢复菌株 BCG183/*BcKMO*,均由河北农业大学的真菌毒素与植物分子病理学实验室保存并提供。恢复菌株 BCG183/*BcKMO* 是通过 PEG 介导的遗传转化方法将 *BcKMO* 基因的表达载体 pBARKS1-*BcKMO*-eGFP 转化到突变体 BCG183 的原生质体中获得的,该菌株的表型和致病力与野生型菌株 BC22 基本一致,而突变体 BCG183 不产生分生孢子和菌核、生长速率减慢、致病力明显增强^[10]。

1.1.2 主要试剂和仪器

反转录试剂盒 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser,宝生物工程(大连)有限公司;RNA 提取试剂 TransZol Up Plus RNA Kit、TransStart

Top Green qPCR SuperMix,北京全式金生物技术有限公司;真菌犬尿氨酸酶联免疫试剂盒,上海酶联生物科技有限公司。荧光定量 PCR 仪, Thermo Fisher 公司。

1.2 犬尿氨酸途径关键酶基因的生物信息学分析

利用人类和小鼠的犬尿氨酸酶(kynureninase, KYN)、吲哚-2,3-双加氧酶(indoleamine-2,3-dioxygenase, IDO)、犬尿氨酸氨基转移酶(kynurenine aminotransferase, KAT)的氨基酸序列在 Ensembl Fungi 真菌数据库中搜索灰葡萄孢 B05.10 的全基因组序列;对搜索的结果进行深入的分析,并利用 MEGA 7.0 软件构建系统发育树;利用 InterProScan 网站对灰葡萄孢 KYN、IDO、KAT 的功能域进行分析。

1.3 犬尿氨酸途径关键酶基因的表达分析

提取灰葡萄孢野生型菌株 BC22、*BcKMO* 基因的 T-DNA 插入突变体 BCG183 和恢复菌株 BCG183/*BcKMO* 的 RNA,反转录合成其 cDNA,利用 Real-time PCR 技术,检测野生型 BC22、突变体 BCG183、恢复菌株 BCG183/*BcKMO* 中犬尿氨酸途径关键基因的表达水平。以 BC22、BCG183、BCG183/*BcKMO* 菌株的 cDNA 为模板, *Tublin* 基因为内参,用基因特异性引物(表 1)进行荧光定量 PCR 检测。PCR 反应体系(10 μL):模板 cDNA 2.0 μL 、Mix (5 U/ μL) 7 μL 、上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.5 μL 。PCR 反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,35 个循环,每个样品重复 3 次。

1.4 犬尿氨酸酶(KYN)的含量检测

利用真菌犬尿氨酸酶联免疫试剂盒进行灰葡萄孢野生型菌株 BC22、突变体 BCG183 和 BCG183/*BcKMO* 中犬尿氨酸酶(KYN)的检测。其具体步骤按照试剂盒的说明进行,以空白孔为基准进行调零,使用微量滴定板读数器在 15 min 内读取 450 nm 处的吸光度(OD 值)。以所测标准品的 OD_{450} 值为横坐标,标准品的浓度值为纵坐标,绘制标准曲线,并得到直线回归方程,将样品的 OD_{450} 值代

表 1 引物序列
Table 1 Primers sequence

基因名称	引物名称	引物序列	产物大小
Genes name	Primers name	Primers sequence (5'→3')	Product size (bp)
<i>Tubulin</i>	<i>Tubulin-F</i>	TCTGGCGAGCACGGTCTTGACGGTT	140
	<i>Tubulin-R</i>	TGGCTCCAAATCGACGAGGACGGCA	
<i>Bcin03g07660</i>	<i>Bcin03g07660-F</i>	AGATTGTCTATGCCCCCTTCC	180
	<i>Bcin03g07660-R</i>	GGTAAACACAGGGATCGCCA	
<i>Bcin12g01070</i>	<i>Bcin12g01070-F</i>	ACCCATTGTAGGAGCCAAGG	189
	<i>Bcin12g01070-R</i>	TCGGGGTTATATCCGTGTCC	
<i>Bcin14g04320</i>	<i>Bcin14g04320-F</i>	CTGCCAGTTCTTTCGACTGC	212
	<i>Bcin14g04320-R</i>	AAGTTCCAGAGACAGACGGC	
<i>Bcin14g01360</i>	<i>Bcin14g01360-F</i>	GCGTACCTTTTGGAAACCCTG	230
	<i>Bcin14g01360-R</i>	TCAAAGGCACGGATGAGACG	
<i>Bcin12g01060</i>	<i>Bcin12g01060-F</i>	GGAAGATGAATGGCGAAGAGC	190
	<i>Bcin12g01060-R</i>	GCTGCTGGTGAAGTTCAGA	
<i>Bcin17g00010</i>	<i>Bcin17g00010-F</i>	TCTCTCCTTTGCCGAGAACT	215
	<i>Bcin17g00010-R</i>	CCGCTCCTGCTGTCAATACA	
<i>Bcin16g05198</i>	<i>Bcin16g05198-F</i>	GAACCTTTCGGTTGGGTCAG	187
	<i>Bcin16g05198-R</i>	CTGGTTGAAGAACGAGGCGA	
<i>Bcin11g03480</i>	<i>Bcin11g03480-F</i>	CCGATCACTTTGTCTGTTGCC	212
	<i>Bcin11g03480-R</i>	CGCTTCGAGAGCAGGAATCA	
<i>Bcin08g02100</i>	<i>Bcin08g02100-F</i>	GGTCAATGATGGTAAAGGCGG	211
	<i>Bcin08g02100-R</i>	AAGCTTGGCGGACTTGAGTA	
<i>Bcin13g00720</i>	<i>Bcin13g00720-F</i>	TCGCCGAAAAAGATGAAGCA	211
	<i>Bcin13g00720-R</i>	TTACAGAGCATGAGTCCCCG	
<i>Bcin04g01000</i>	<i>Bcin04g01000-F</i>	GCATGCGCTATCAATCTGGC	182
	<i>Bcin04g01000-R</i>	GCATCAAGTAATGCATGCTCGT	
<i>Bcin13g01610</i>	<i>Bcin13g01610-F</i>	GAGAGCGAGGTGGTTGTTGA	193
	<i>Bcin13g01610-R</i>	GGCACAGATGACGTGAAGGA	
<i>Bcin06g02430</i>	<i>Bcin06g02430-F</i>	GTATGAGGTCACACCTGGCG	202
	<i>Bcin06g02430-R</i>	CGACGCAGTTCTAGCAGAGT	
<i>Bcin05g05960</i>	<i>Bcin05g05960-F</i>	CTACCCATGATCCTTCTGCCA	183
	<i>Bcin05g05960-R</i>	GGTTTGCCCATTTCTCAGGC	
<i>Bcbna3</i>	<i>Bcbna3-F</i>	CTAAGCTCCAACCTGCTGCT	228
	<i>Bcbna3-R</i>	TTGCTTGCTTGAGACGTGGA	

入方程，计算出样品的浓度。

2 结果与分析

2.1 犬尿氨酸酶(KYN)的系统发育树和功能域分析

利用人类和小鼠的犬尿氨酸酶(KYN)的氨基酸序列在 Ensembl Fungi 真菌数据库中搜索灰葡萄孢 B05.10 菌株的氨基酸序列，发现 *BCIN_12g01070* (XP_001557886.1)、*BCIN_03g07660* (XP_024547938.1)与其他物种的 KYN 相似性较高(图 1A)；利用 InterProScan 网站对 *BCIN_03g07660*、*BCIN_12g01070* 的功能域进行分析，发现它们都具有一个犬尿氨酸酶(kynureninase)的功能域(图 1B)；使用 MEGA 7.0 软件构建系统发育树，发现 *BCIN_12g01070* (XP_001557886.1)与

Sclerotinia sclerotiorum 的 KYN 同源基因 (APA12791.1)具有高度相似性，*BCIN_03g07660* (XP_024547938.1)与 *Saccharomyces cerevisiae* 的 KYN 同源基因(PJP09875.1)具有高度相似性(图 1)。

2.2 吲哚-2,3-双加氧酶(IDO)的系统发育树和功能域分析

利用人类和小鼠的吲哚-2,3-双加氧酶(IDO)的氨基酸序列在 Ensembl Fungi 真菌数据库中搜索灰葡萄孢 B05.10 菌株的氨基酸序列，发现 *BCIN_14g04320* (XP_001546533.2)、*BCIN_12g01060* (ATZ55517.1)、*BCIN_14g01360* (XP_001552850.1)与其他物种的 IDO 相似性较高(图 2A)；利用 InterProScan 网站对 *BCIN_14g04320*、*BCIN_12g01060*、*BCIN_14g01360* 的功能域进行分

析,发现它们都具有一个吡啶-2,3-双加氧酶(indoleamine-2,3-dioxygenase1)的功能域(图2B);使用MEGA 7.0软件构建系统发育树,发现BCIN_14g04320 (XP_001546533.2)与*Ophiostoma piceae*的IDO同源基因(EPE07943.1)具有高度相似

性、BCIN_12g01060 (ATZ55517.1)与*Sclerotinia sclerotiorum*的IDO同源基因(EDN92359.1)具有高度相似性、BCIN_14g01360 (XP_001552850.1)与*Homo sapiens*的IDO同源基因(NP_002155.1)具有高度相似性(图2)。

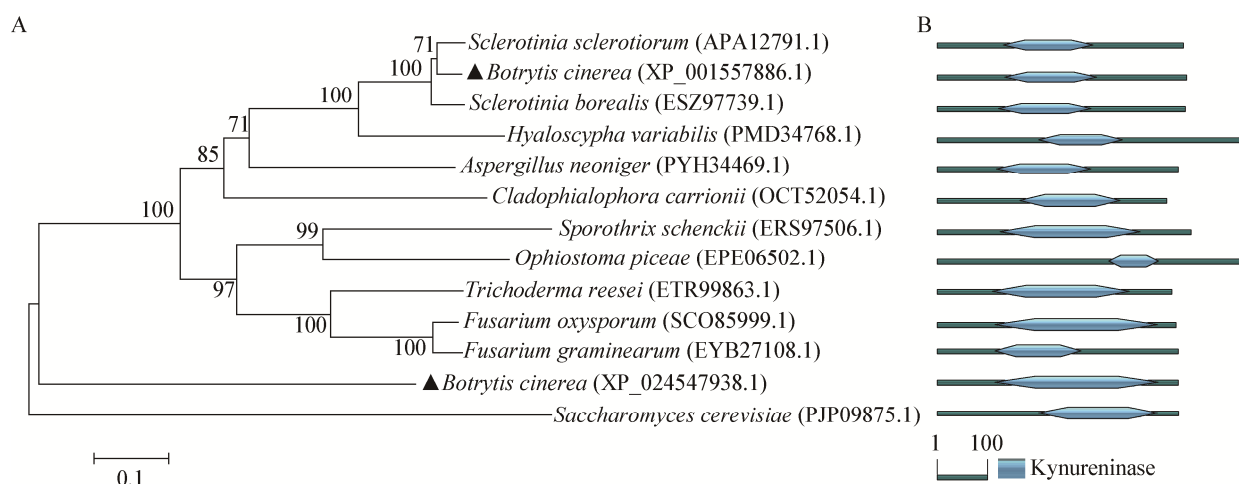


图1 犬尿氨酸酶的系统发育树和功能域分析

Figure 1 Phylogenetic tree and functional domain analysis of kynureninase

注: A: 犬尿氨酸酶的系统发育树分析; ▲: 灰葡萄孢的基因; 括号中的序号: 菌株在 GenBank 中的登录号; 分支点上的数字: 自展支持值; 标尺: 10% 的序列分歧. B: 犬尿氨酸酶的功能域分析; 标尺: 100 个氨基酸的长度.

Note: A: Phylogenetic tree analysis of kynureninase; ▲: Genes of *Botrytis cinerea*; Number in brackets: GenBank accession numbers; Number at nodes: Bootstrap values; Scale bar: 10% sequence divergence. B: Functional domain analysis of kynureninase; Scale bar: Length of 100 amino acids.

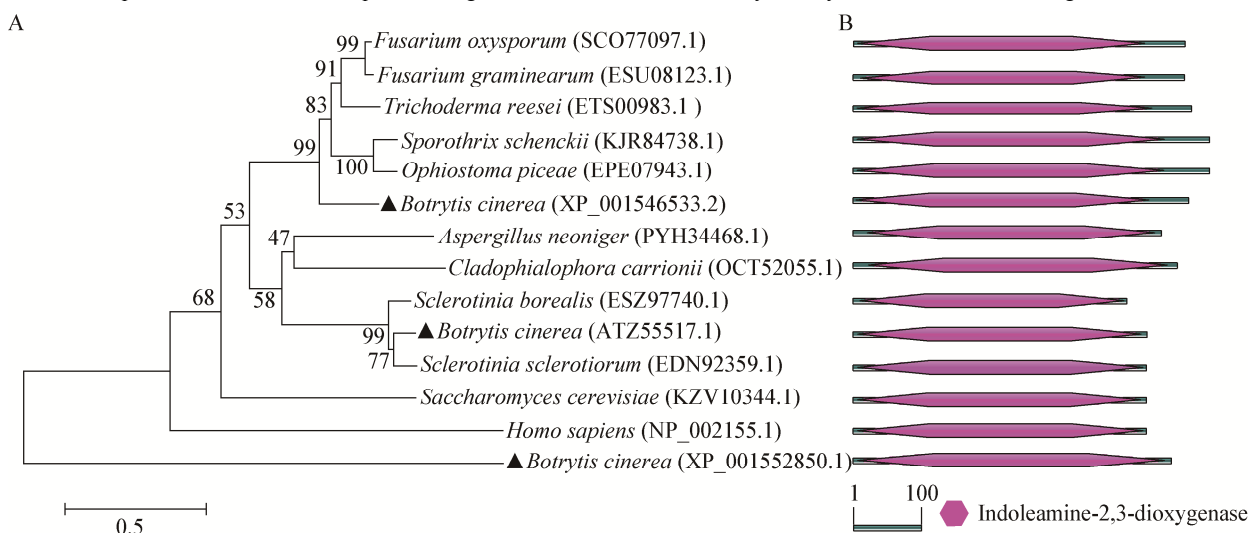


图2 吡啶-2,3-双加氧酶的系统发育树和功能域分析

Figure 2 Phylogenetic tree and functional domain analysis of indoleamine-2,3-dioxygenase

注: A: 吡啶-2,3-双加氧酶的系统发育树分析; ▲: 灰葡萄孢的基因; 括号中的序号: 菌株在 GenBank 中的登录号; 分支点上的数字: 自展支持值; 标尺: 50% 的序列分歧. B: 吡啶-2,3-双加氧酶的功能域分析; 标尺: 100 个氨基酸的长度.

Note: A: Phylogenetic tree analysis of indoleamine-2,3-dioxygenase; ▲: Genes of *Botrytis cinerea*; Number in brackets: GenBank accession numbers; Number at nodes: Bootstrap values; Scale bar: 50% sequence divergence. B: Functional domain analysis of indoleamine-2,3-dioxygenase; Scale bar: Length of 100 amino acids.

2.3 犬尿氨酸氨基转移酶(KAT)的系统发育树和功能域分析

利用人类和小鼠的犬尿氨酸氨基转移酶(KAT)的氨基酸序列,在 Ensembl Fungi 真菌数据库中搜索灰葡萄孢 B05.10 菌株的序列,发现 *BCIN_17g00010* (XP_024554067.1)、*BCIN_16g05198* (XP_001545487.1)、*BCIN_11g03480* (XP_024551762.1)、*BCIN_08g02100* (XP_024550246.1)、*BCIN_13g00720* (XP_024552440.1)、*BCIN_04g01000* (XP_024548132.1)、*BCIN_13g01610* (XP_001557050.1)、*BCIN_06g02430* (XP_001560444.1)、*BCIN_05g05960* (XP_024548891)、*Bcbna3* (XP_024553092.1)与其相似性较高(图 3A);利用 InterProScan 网站对其功能域进行分析,发现它们

都具有一个犬尿氨酸氨基转移酶(KAT)的功能域(图 3B);使用 MEGA 7.0 软件构建系统发育树分析,表明 *Bcbna3* (XP_024553092.1)与 *Sclerotinia sclerotiorum* 的 KAT 同源基因 (APA16305.1)和 *Sclerotinia borealis* 的 KAT 同源基因(ESZ90059.1)具有高度相似性(图 3)。

2.4 犬尿氨酸途径关键基因的表达分析

利用 Real-time PCR 技术,检测灰葡萄孢野生型 BC22、突变体 BCG183、恢复突变体 BCG183/*BcKMO* 中灰葡萄孢犬尿氨酸酶(KYN)编码基因、吲哚-2,3-双加氧酶(IDO)编码基因和犬尿氨酸氨基转移酶(KAT)编码基因的表达水平。结果发现,灰葡萄孢 KYN 编码基因 *BCIN_03g07660* 和 *BCIN_12g01070* 在突变体 BCG183 中的表达水平

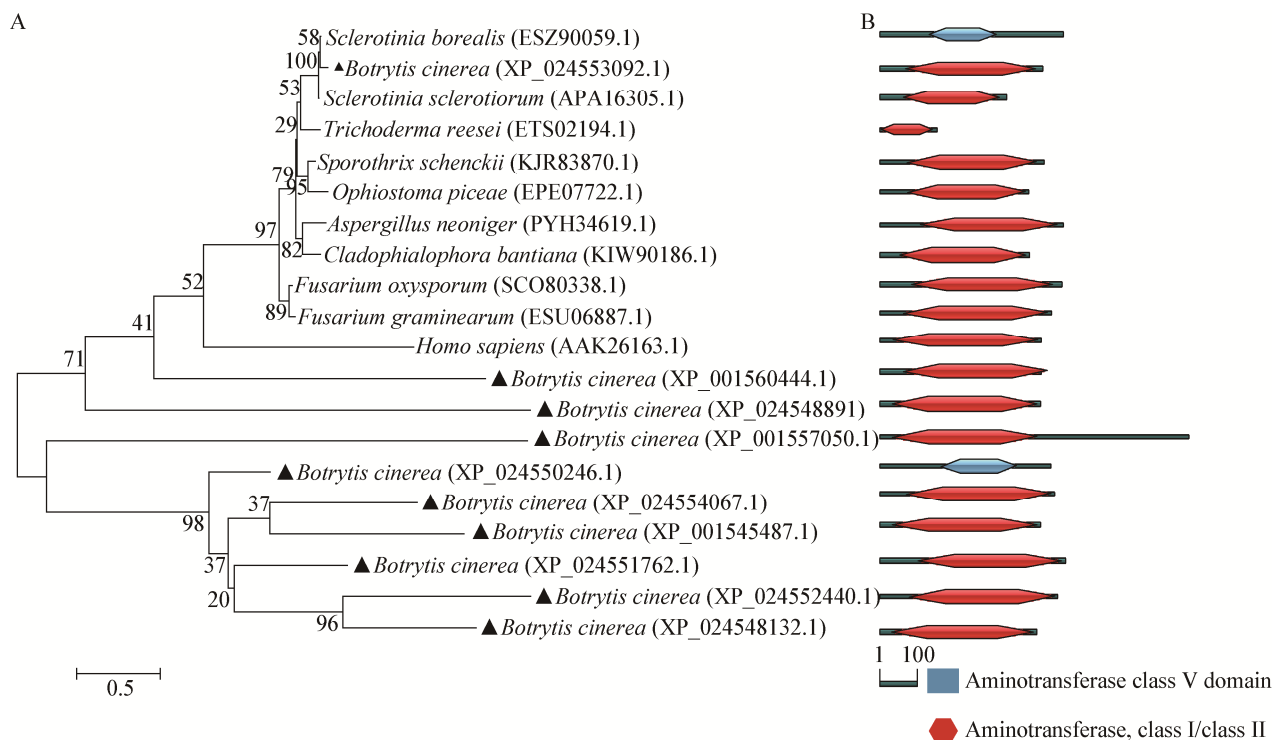


图 3 犬尿氨酸氨基转移酶的系统发育树和功能域分析

Figure 3 Phylogenetic tree and functional domain analysis of kynurenine aminotransferase

注: A: 犬尿氨酸氨基转移酶的系统发育树分析; ▲: 灰葡萄孢的基因; 括号中的序号: 菌株在 GenBank 中的登录号; 分支点上的数字: 自展支持值; 标尺: 50% 的序列分歧. B: 犬尿氨酸氨基转移酶的功能域分析; 标尺: 100 个氨基酸的长度.

Note: A: Phylogenetic tree analysis of kynurenine aminotransferase; ▲: Genes of *Botrytis cinerea*; Number in brackets: GenBank accession numbers; Number at nodes: Bootstrap values; Scale bar: 50% sequence divergence. B: Functional domain analysis of kynurenine aminotransferase; Scale bar: Length of 100 amino acids.

均显著低于野生型和恢复菌株；IDO 编码基因 *BCIN_14g04320*、*BCIN_14g01360* 在突变体 BCG183 中的表达水平均显著高于在野生型和恢复菌株，*BCIN_12g01060* 基因在突变体 BCG183 中的表达水平显著低于在野生型和恢复菌株；KAT 编码基因 *BCIN_17g00010*、*BCIN_16g05198*、*BCIN_08g02100*、

BCIN_13g00720、*BCIN_04g01000*、*BCIN_13g01610*、*Bcbna3* 在突变体 BCG183 中的表达水平均显著高于野生型和恢复菌株，*BCIN_11g03480*、*BCIN_06g02430*、*BCIN_05g05960* 基因在突变体 BCG183 中的表达水平均显著低于野生型和恢复菌株(图 4)。

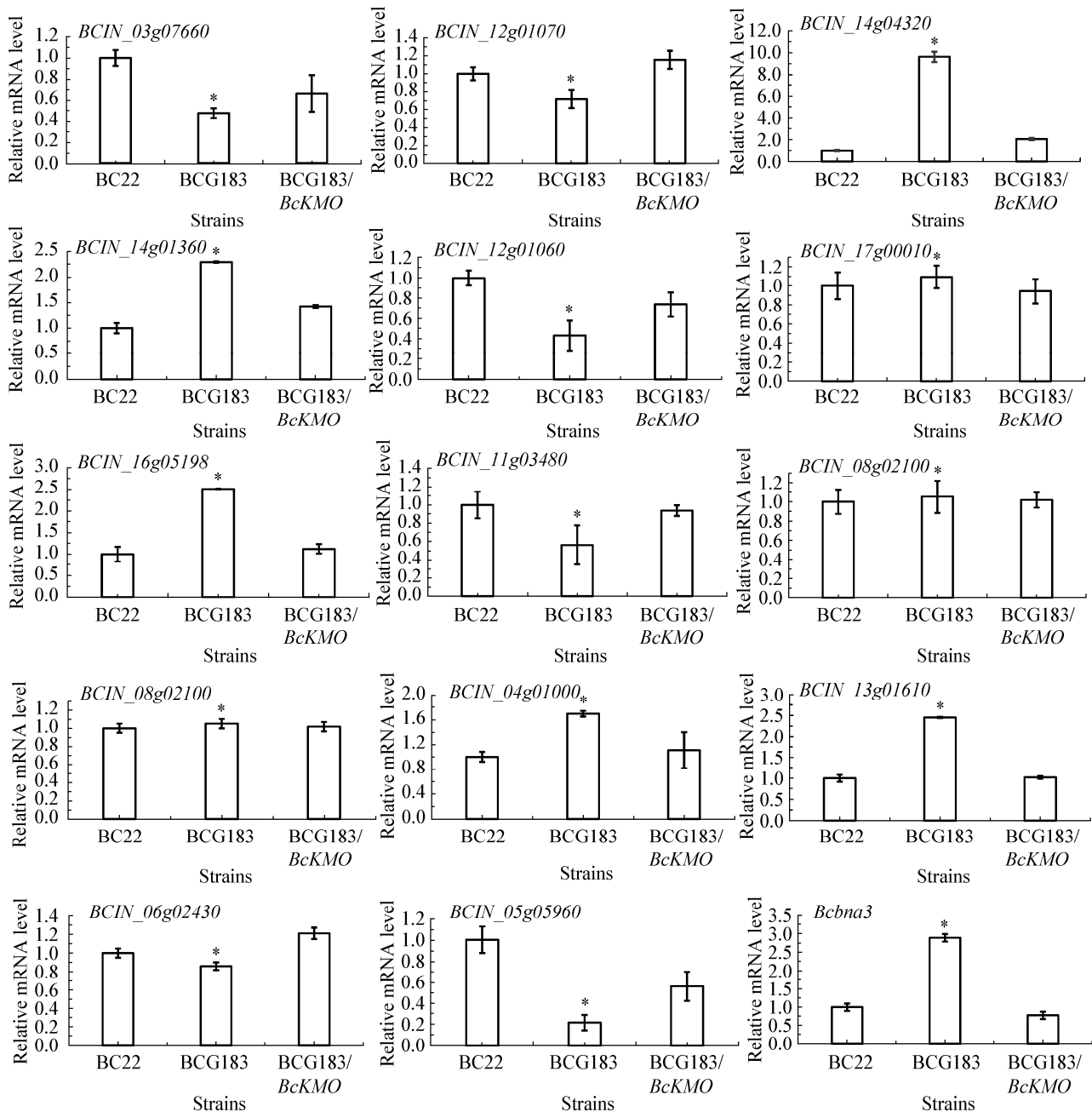


图 4 犬尿氨酸途径关键基因的表达分析

Figure 4 Expression level of kynurenine pathway key genes

Note: *: Significantly different at $P < 0.05$.

2.5 *BcKMO* 突变体中犬尿氨酸酶(KYN)的含量测定

利用犬尿氨酸酶检测试剂盒,检测灰葡萄孢野生型 BC22、突变体 BCG183 和恢复菌株 BCG183/*BcKMO* 中犬尿氨酸酶(KYN)含量。发现突变体 BCG183 中犬尿氨酸酶(KYN)的含量显著低于野生型 BC22 和恢复菌株(图 5)。

3 讨论与结论

犬尿氨酸途径是色氨酸分解代谢的一个重要途径^[6-7],最早在哺乳动物中发现。在细菌和部分真菌中也存在与哺乳动物类似的犬尿氨酸途径,如荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、链霉菌(*Streptomyces refuineus*)、哈氏噬纤维菌(*Cytophaga hutchinsonii*)中发现了犬尿氨酸途径相关基因,从色氨酸转化为喹啉的步骤与哺乳动物类似^[11]。但是大多微生物仅发现色氨酸-2,3-双加氧酶、犬尿氨酸甲酰胺酶和犬尿氨酸酶。灰葡萄孢是否存在犬尿氨酸途径至今尚未见报道。本实验室前期研究明确了 *BcKMO* 基因编码犬尿氨酸单加氧酶(KMO)^[10],由此推测灰葡萄孢犬尿氨酸途径的存在。本研究利用生物信息学分析,获得了灰葡萄孢中含有 3 个吡啶-2,3-双加氧酶(IDO)的编码基因、2 个犬尿氨酸酶(KYN)的编码基因和 10 个犬尿氨酸氨基转移酶(KAT)的编码基因,表明了灰葡萄孢犬尿氨酸途径的存在。本研究中,灰葡萄孢 KYN、IDO 和 KAT 的

编码基因在 *BcKMO* 基因的突变体 BCG183 中的表达水平被显著地上调或下调,且突变体 BCG183 中犬尿氨酸酶(KYN)的含量显著低于野生型 BC22 和恢复菌株,这些结果表明灰葡萄孢 *BcKMO* 基因突变影响了灰葡萄孢 KYN、IDO 和 KAT 的编码基因的表达和犬尿氨酸酶(KYN)的含量,进一步证明了灰葡萄孢犬尿氨酸途径的存在。

犬尿氨酸途径能够影响多种重要的生物过程,包括参与 NAD^+ 的生物合成,铁载体的生物合成以及抗生素的生物合成^[12-14]。研究报道,哈氏噬纤维菌(*Cytophaga hutchinsonii*)、金属罗尔斯顿菌(*Ralstonia metallidurans*)的基因组序列中包含了犬尿氨酸途径的相关酶 TDO、KFA、KMO、KYN 和 HAD,这些酶将色氨酸分解代谢成喹啉酸,进一步代谢生成 NAD^+ ,从而维持细胞的正常功能^[13]。假单胞菌(*Pseudomonas siderophore*)犬尿氨酸途径参与了铁载体的合成^[15],当将假单胞菌的 TDO 敲除后,铁载体合成受阻,而加入犬尿氨酸后,铁载体的合成得到恢复。金羊毛链霉菌(*Streptomyces chrysomallus*)放线菌素生物合成基因簇中含有犬尿氨酸途径的相应酶基因。在这些基因编码的酶的作用下,犬尿氨酸途径生成的中间产物为放线菌素生物合成提供了前体^[16-17]。链霉菌(*Streptomyces refuineus*)安曲霉素的生物合成基因簇中也含有犬尿氨酸途径相关酶基因。敲除这些参与犬尿氨酸途径的基因后,安曲霉素合成受阻,这表明犬尿氨酸途径在安曲霉素生物合成中的重要作用^[18-19]。灰葡萄孢犬尿氨酸途径及其功能至今尚未见报道。本实验室前期研究发现,灰葡萄孢 *BcKMO* 基因 T-DNA 插入突变体 BCG183 的生长速率减慢、不产生分生孢子和菌核、菌丝纤细,致病力较野生型和恢复突变体显著增强,明确了 *BcKMO* 参与灰葡萄孢的生长、发育和致病过程^[10]。由此推测,灰葡萄孢 *BcKMO* 基因所在的犬尿氨酸途径参与病菌的生长、发育和致病力的调控。

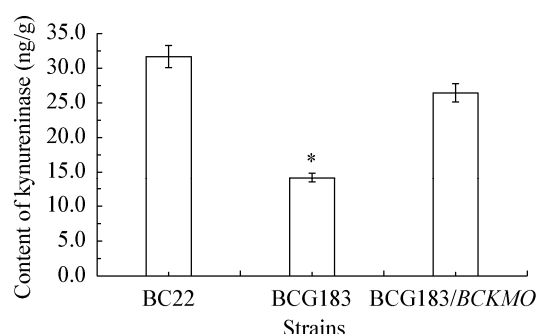


图 5 突变体中犬尿氨酸酶的含量测定

Figure 5 Determination of kynureninase in mutants

Note: *: Significantly different at $P < 0.05$.

REFERENCES

- [1] van Kan JAL, Shaw MW, Grant-Downton RT. *Botrytis* species: relentless necrotrophic thugs or endophytes gone rogue?[J]. Molecular Plant Pathology, 2014, 15(9): 957-961
- [2] Nakajima M, Akutsu K. Virulence factors of *Botrytis cinerea*[J]. Journal of General Plant Pathology, 2014, 80(1): 15-23
- [3] Elad Y, Pertot I, Cotes Prado AM, et al. Plant hosts of *Botrytis* spp.[A]/Fillinger S, Elad Y. *Botrytis* – the Fungus, the Pathogen and Its Management in Agricultural Systems[M]. Cham: Springer, 2016: 413-486
- [4] Weiberg A, Wang M, Lin FM, et al. Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways[J]. Science, 2013, 342(6154): 118-123
- [5] Wan R, Hou XQ, Wang XH, et al. Resistance evaluation of Chinese wild *Vitis* genotypes against *Botrytis cinerea* and different responses of resistant and susceptible hosts to the infection[J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6: 854
- [6] Smith JR, Jamie JF, Guillemain GJ. Kynurenine-3-monooxygenase: a review of structure, mechanism, and inhibitors[J]. Drug Discovery Today, 2016, 21(2): 315-324
- [7] Wilson K, Auer M, Binnie M, et al. Overexpression of human kynurenine-3-monooxygenase protects against 3-hydroxykynurenine-mediated apoptosis through bidirectional nonlinear feedback[J]. Cell Death & Disease, 2016, 7: e2197
- [8] Dantzer R, O'Connor JC, Lawson MA, et al. Inflammation-associated depression: from serotonin to kynurenine[J]. Psychoneuroendocrinology, 2011, 36(3): 426-436
- [9] Crozier-Reabe KR, Phillips RS, Moran GR. Kynurenine 3-monooxygenase from *Pseudomonas fluorescens*: substrate-like inhibitors both stimulate flavin reduction and stabilize the flavin-peroxo intermediate yet result in the production of hydrogen peroxide[J]. Biochemistry, 2008, 47(47): 12420-12433
- [10] Zhang K, Yuan XM, Zang JP, et al. The kynurenine 3-monooxygenase encoding gene, *BcKMO*, is involved in the growth, development, and pathogenicity of *Botrytis cinerea*[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1039
- [11] Kurnasov O, Goral V, Colabroy K, et al. NAD biosynthesis: identification of the tryptophan to quinolinate pathway in bacteria[J]. Chemistry & Biology, 2003, 10(12): 1195-1204
- [12] Phillips RS. Structure, mechanism, and substrate specificity of kynureninase[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, 2011, 1814(11): 1481-1488
- [13] Lima WC, Varani AM, Menck CFM. NAD biosynthesis evolution in bacteria: lateral gene transfer of kynurenine pathway in *Xanthomonadales* and *Flavobacteriales*[J]. Molecular Biology and Evolution, 2009, 26(2): 399-406
- [14] Yuan PH, Zhou RC, Chen XP, et al. DepR1, a TetR family transcriptional regulator, positively regulates daptomycin production in an industrial producer, *Streptomyces roseosporus* SW0702[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(6): 1898-1905
- [15] Matthijs S, Baysse C, Koedam N, et al. The *Pseudomonas* siderophore quinolobactin is synthesized from xanthurenic acid, an intermediate of the kynurenine pathway[J]. Molecular Microbiology, 2004, 52(2): 371-384
- [16] Hirose Y, Watanabe K, Minami A, et al. Involvement of common intermediate 3-hydroxy-L-kynurenine in chromophore biosynthesis of quinomycin family antibiotics[J]. The Journal of Antibiotics, 2011, 64(1): 117-122
- [17] Keller U, Lang M, Crnovcic I, et al. The actinomycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces chrysomallus*: a genetic hall of mirrors for synthesis of a molecule with mirror symmetry[J]. Journal of Bacteriology, 2010, 192(10): 2583-2595
- [18] Hu YF, Phelan V, Ntai I, et al. Benzodiazepine biosynthesis in *Streptomyces refuineus*[J]. Chemistry & Biology, 2007, 14(6): 691-701
- [19] Lombó F, Velasco A, Castro A, et al. Deciphering the biosynthesis pathway of the antitumor thiocoraline from a marine actinomycete and its expression in two *Streptomyces* species[J]. ChemBioChem, 2006, 7(2): 366-376