

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (11) :1304 - 1310; 4 November 2014
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.11.008

灰葡萄孢菌 *AURI* 基因内含子对肌醇磷脂酰神经酰胺合成酶表达的影响及致病性

王新绘, 孙九丽, 苟萍*

新疆大学生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830046

摘要:【目的】*AURI* 编码的肌醇磷脂酰神经酰胺 (IPC) 合成酶是真菌鞘脂代谢的关键酶, 在转录水平和翻译水平研究 *AURI* 内含子对其基因表达的影响, 以及 *AURI* 内含子对相关致病因子的影响, 为内含子调控基因表达的分子机制提供理论依据。【方法】实时定量 PCR 测定野生型灰葡萄孢菌 (Bc*AUR1*) 和 *AURI* 缺失 115 bp 内含子突变体 (Bc*AUR1a*) 的 mRNA 表达量, 高效液相层析测定 IPC 合成酶活性, 分别采用辣根过氧化物酶法、邻苯三酚自氧化法、愈创木酚法和紫外分光光度法测定单位菌体的 H₂O₂ 含量、超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD) 和过氧化氢酶 (CAT) 的酶活力。【结果】突变体 Bc*AUR1a* 的 IPC 合成酶基因 cDNA 测序结果表明, IPC 合成酶无氨基酸突变。实时定量 PCR 和高效液相层析的结果表明 Bc*AUR1a* 的 *AURI* 基因 mRNA 表达量和 IPC 合成酶活力比野生型 Bc*AUR1* 分别增加了 50.2% 和 14.16%。短梗霉素 A (AbA) 显著刺激 Bc*AUR1* H₂O₂、SOD、POD 和 CAT 的分泌, 但对 Bc*AUR1a* 的这几种物质的分泌无显著影响。【结论】突变体 Bc*AUR1a* 的 *AURI* 基因在转录和翻译水平上表达上调, AbA 显著增强野生型灰葡萄孢菌致病力, 但对突变体影响较小。突变体产生了对 AbA 的抗性, 推测 *AURI* 基因内含子在 *AURI* 基因表达调控中起转录抑制子的作用。

关键词: 灰葡萄孢菌, 突变体, *AURI* 基因, mRNA 表达, 肌醇磷脂酰神经酰胺合成酶

中图分类号: Q936 文章编号: 0001-6209 (2014) 11-1304-07

脂类是生物膜最重要的组成成分之一, 它不仅是细胞膜结构的重要组成部分, 而且还参与细胞几乎所有水平上的生物学功能; 如参与细胞的粘附和识别、调节细胞的生长、分化、衰老、膜运输和脂筏的形成等许多重要的信号转导过程^[1-5]。目前已相继在酵母等真菌、原生动物和拟南芥中发现鞘脂合成代谢的关键酶——肌糖磷脂酰神经酰胺合成酶 (IPC synthase), 该酶由 *AURI* 基因编码 (aureobasidin A resistant gene), 催化神经酰胺和磷脂酰肌醇生成肌醇磷脂酰神经酰胺 (IPC) 和甘油二

酯 (图 1)。*AURI* 表达和调控对真菌生长和发育具有至关重要的的作用, 缺乏 IPC 合成酶的酵母细胞中神经酰胺积累, 而且最终因不能合成复杂鞘脂类而死亡^[6]。短梗霉素 A (Aureobasidin A, AbA) 是 IPC 合成酶的强烈抑制剂, 真菌用 AbA 处理或 IPC 合成酶基因表达抑制均导致细胞多重形态学和细胞组织结构生理生化特性的改变, 最终细胞死亡^[7-8]。Hashida-Okado 等^[7] 以及 Heidler 和 Radding^[9] 通过筛选抗 AbA 的酵母突变体中获得 *AURI* 基因, 在其他真菌粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 和

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31160031)

* 通信作者。Tel: +86-991-8879585; E-mail: gou_ping@sina.com

作者简介: 王新绘 (1979 -), 男, 安徽太和人, 博士研究生, 生物化学与分子生物学专业。E-mail: wangxh@xju.edu.cn

收稿日期: 2014-02-28; 修回日期: 2014-04-14

曲霉 (*Aspergillus*) 中亦获得具有 AbA 抗性的 *AURI* 基因突变体^[7, 10]。迄今, 对植物病原真菌灰葡萄孢菌 (*Botrytis cinerea*) 的 *AURI* 基因的特征, 表达调控, 以及在病菌生长发育和致病过程中的作用, 尚不明了。我们通过紫外诱变和 AbA 筛选得到抗 AbA 的灰葡萄孢菌突变株, 其中一种突变是 *AURI* 基因中精确地缺失 115 bp 的内含子, 通过对该突变株进行细胞形态学、IPC 合成酶活力及致病性检测, 均证明对 AbA 产生了抗性^[11-12]。

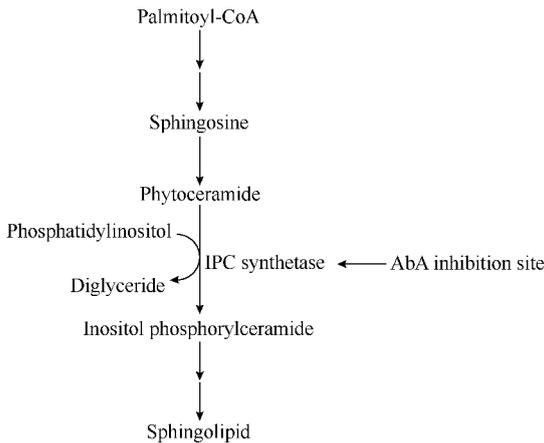


图 1. 鞘脂代谢途径中 IPC 合成酶催化的反应

Figure 1. IPC synthetase catalyzed reaction in sphingolipid metabolic pathways.

真核生物含有大量的非编码区, 基因表达的信息主要蕴藏在这些非编码区中, 内含子 (intron) 作为非编码区的重要成员, 被认为是分子进化不可缺少的推动者及基因表达的关键调控者。已有众多的研究表明一些内含子具有调控基因转录的功能, 在其序列中发现了转录调控元件, 起着启动子 (promoter)、增强子 (enhancer) 和抑制子 (repressor) 的作用^[13-16]。目前国内外对 *AURI* 基因中的内含子调控功能方面的研究尚未见报道, 对于该内含子的特性、及其对 *AURI* 基因表达的影响及分子机制等尚不清楚。本研究在转录水平和翻译水平探讨灰葡萄孢菌 *AURI* 基因内含子缺失对 *AURI* 基因表达及致病性的影响, 为明确 *AURI* 基因内含子调控基因表达及致病机制提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 灰葡萄孢菌 (*Botrytis cinerea*) BcAUR1: 浙江大学农业与生物技术学院李红叶教授

惠赠。

灰葡萄孢菌突变体 BcAUR1a: 本实验室通过紫外诱变, AbA 筛选获得^[11], 提取总 DNA, IPC 合成酶基因序列的特异引物 PCR 扩增, 酶切鉴定, 测序。该突变体未发生氨基酸突变, 但在基因序列中缺失 117-231 位的 115 bp 内含子序列^[12]。

1.1.2 培养基和培养条件: 马铃薯培养基 (PDA) 用于培养灰葡萄孢菌, LB 培养基用于培养大肠杆菌 (*Escherichia coli*), 均按常规配方配制。灰葡萄孢菌在 28 °C 培养, *E. coli* 在 37 °C 培养。抗生素使用浓度为: 氨苄青霉素 100 μg/mL。

1.1.3 主要试剂和仪器: 各种限制性内切酶、连接酶、T 载体 pMD18-T Vector, 反转录 Primescript RT reagent kitase 试剂盒, 实时定量 PCR SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒等购自大连宝生物工程有限公司 (TaKaRa)。Taq DNA Polymerase、10 mmol/L dNTP mix、10 × PCR buffer、DNA 片段回收/纯化试剂盒、质粒提取试剂盒和大肠杆菌 DH5α 感受态细胞购自北京鼎国生物技术有限公司。总 RNA 提取为美国 OMEGA 公司的 E. Z. N. A. TM Fungal RNA Kit 试剂盒。其余生化药品均为进口或国产分析纯试剂。使用的主要仪器有高速冷冻离心机 (德国 Heraeus 公司), 85P-72 型冷冻超速离心机 (日本日立公司), 凝胶成像系统 (美国 BIO-RAD 公司), ABI 7500 Fast 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司), LC-20A 液相色谱仪 (日本岛津公司)。

1.2 总 RNA 提取及反转录反应

菌种用平板划线法进行活化, 28 °C 培养箱中倒置培养一周, 待其菌丝变为灰色长满平皿后再进行 2 次活化, 直至产生孢子。用无菌水洗下孢子, 接种到液体培养基, 28 °C 180 r/min, 摇菌培养, 直至瓶中有大量小球状菌体, 抽滤, 液氮研磨。提总 RNA (按试剂盒说明书步骤进行), 用紫外分光光度计测量 RNA 样品的 A_{260} 值和 A_{280} 值, 以确定其纯度和浓度; 对 RNA 样品进行凝胶电泳检测 (110 V, 20 min), 以确定其完整性。立即进行反转录反应 (按试剂盒说明书进行), 获得第一链 cDNA。

1.3 *AURI* 基因 cDNA 全长序列的克隆

根据 *AURI* 基因序列, 设计 *AURI* 基因特异性引物 F: 5'-AGACGGGAGCGGCTACCCTTTTA-3' 和 5'-R: CACCTAACAAATGACCTCACTAAGC-3', 以获得的第一链 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。扩增体系如下: PCR Buffer (Mg^{2+}) 5 μL, dNTP (2.5 mmol/L)

4 μL , F (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , R (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , DNA 聚合酶 0.6 μL , cDNA 模板 5 μL , ddH₂O 33.4 μL , 总体系 50 μL 。反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 50 s, 64 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 扩增产物回收、连接 pMD18-T Vector 及转化(均按试剂盒说明书进行)。挑取阳性克隆进行菌落 PCR(体系和反应条件同上)、酶切鉴定, 送华大基因公司测序。引物设计采用软件 Primer premier 5.0, 引物合成由华大基因完成。

1.4 实时定量 PCR

实时荧光定量分析采用相对定量的方法进行, 为了消除起始样本量不同对定量分析的影响, 以灰葡萄孢菌看家基因 β -actin 作为内参, 引物序列为 F: 5'-TGGCTGGTCGTGATTTGA-3' R: 5'-TGGCGGT TTGGATTTCTT-3'。AURI 基因引物为 F: 5'-TCTTC CCTTGTTCGCCTC-3' R: 5'-GTTGCCACCCACATCC AC-3'。反应使用 ABI 7500 Fast 实时荧光定量 PCR 仪, 按试剂盒说明书步骤进行。反应体系: SYBR Premix Ex II 12.5 μL , 混合引物 0.5 μL , Rox Reference Dye II 1 μL , cDNA 4 μL , ddH₂O 7 μL , 总体系 25 μL 。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 34 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 30 个循环。PCR 反应均做 3 个重复, 以验证每个样品扩增的重复性。每次反应同时设置一个不加 DNA 模板的阴性对照 (NTC)。反应结束, 导出 Ct 值, 用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 mRNA 的相对表达量^[17]。

1.5 微粒体的提取

参照 Burke 等^[18] 进行, 取培养好的菌体抽滤, 称重, 加液氮迅速研磨至白色粉末, 加入 25 mL 缓冲液 [0.1 mol/L NaCl, 0.05 mol/L Tris-HCl (pH8.0), 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L Benzamidine, 1 mmol/L PMSF, 1.5 $\mu\text{g/mL}$ Leupeptin, 3 $\mu\text{g/mL}$ Pepstatin A], 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 2000 \times g 离心 15 min。取上清, 20000 \times g 离心 15 min。取上清, 100000 \times g 离心 1 h, 沉淀即为微粒体。将沉淀溶于 400 μL 缓冲液中 [含 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 10% 甘油, 0.25 mol/L 蔗糖, 1 mol/L DTT], 轻轻混匀, Bradford 法测定微粒体蛋白浓度。

1.6 IPC 合成酶活性的测定

IPC 合成酶活性的测定参照 Zhong 等^[19] 的方法进行, 以 pH7.0 50 mmol/L 的 Tris-HCl、10 mmol/L EDTA、150 mmol/L NaCl、10% 甘油和 2 mmol/L CHAPS 配制成反应缓冲液; 向反应缓冲液中加入底

物 C₆-NBD-Cer (6-[N-(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl) amino]-hexanoylceramide, 带荧光标记的神经酰胺) 和 PI (磷脂酰肌醇), C₆-NBD-Cer 的终浓度为 0.1 mmol/L、PI 终浓度为 2 mmol/L, 最后加入微粒体终浓度为 0.1 mg/mL。反应混合液 50 μL 置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中 30 min, 加入 10% 的乙酸终止反应。10000 \times g 离心 3 min, 取 10 μL 进行 HPLC。色谱条件: C₁₈ 的反向色谱柱 (15 cm \times 4.6 mm), 荧光波长: $\lambda_{\text{ex}} = 465 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$, 流速 1 mL/min, 柱温: 25 $^{\circ}\text{C}$, 洗脱梯度 50% CH₃CN-50% H₂O (0.1% CH₃COOH) 到 90% CH₃CN-10% H₂O (0.1% CH₃COOH), 然后用 100% CH₃CN 洗柱 10 min。以荧光底物 C₆-NBD-Cer 的减少量来计算 IPC 合成酶活力。IPC 合成酶活力单位定义为: 每分钟转化 1 微摩尔底物的酶量为 1 个活力单位。

1.7 H₂O₂ 含量及胞外抗氧化酶活性的测定

将 2 次活化后的 BcAURI 和 BcAURIa 用无菌水洗下孢子, 孢子浓度调整到 10⁷ 个/mL, 取 100 μL 分别接种至液体 PDA 培养基和含 2 $\mu\text{g/mL}$ AbA 的液体 PDA 培养基中, 28 $^{\circ}\text{C}$, 200 r/min 培养 6 d。将菌液转至 50 mL, 8000 \times g 离心 10 min, 上清液即为生理生化指标的待测液。菌体用滤纸吸干水分后称重, 以下指标的测定均以单位菌体重量的测定量表示。

1.7.1 H₂O₂ 含量的测定: 参照耿玉珍等^[20] 的方法, 在比色管中依次加入 5 mL pH = 9.6-11 的甘氨酸-NaOH 缓冲溶液, 2 mL 钙试剂羧酸钠溶液, 0.2 mL 辣根过氧化物酶溶液和 1 mL 稀释 5 倍待测液, 以水定容至 10 mL, 50 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中保温 17 min, 取出后经流水冷却 3 min, 在 630 nm 处以水为参比测定吸光度 A₆₃₀, 重复 3 次。

1.7.2 SOD 活性的测定: 采用邻苯三酚自氧化法^[21], 4.5 mL 0.1 mol/L Tris-HCl 和 4.2 mL 水, 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴 20 min, 加入 25 $^{\circ}\text{C}$ 预热的邻苯三酚溶液 0.3 mL 和 1 mL 稀释 5 倍, 摇匀, 对照管用 10 mmol/L HCl 代替, 立即于 319 nm 测吸光值, 每 0.5 min 测定 1 次, 持续测到 5 min, 重复 3 次。每分钟抑制邻苯三酚自氧化速率达 50% 的酶量为 1 个酶单位。

1.7.3 POD 活性的测定: 采用愈创木酚法^[22], 以高温煮沸使蛋白失活的待测液为阴性对照, 25 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中将 2 mL 的待测液加入 8 mL 过氧化物酶反应液, 混匀, 立即计时, 以蒸馏水调零, 测 420 nm 处的吸光值, 每 1 min 读取 1 次 A₄₂₀ 值, 共读 5 min, 重复 3

次。以每分钟 A_{420} 减少 0.01 的酶量为 1 个酶活力单位。

1.7.4 CAT 活性的测定: 采用紫外分光光度法^[23], 以高温煮沸使蛋白失活的待测液为阴性对照, 依次加入待测液 0.2 mL, 0.2 mol/L 磷酸缓冲液 1.5 mL 和 1 mL 水, 25 °C 预热后, 加入 0.3 mL 0.1 mol/L H_2O_2 , 立即计时, 并开始测 240 nm 处的吸光值, 每 1 min 读取 1 次 A_{240} , 共读 7 min, 重复 3 次。每分钟 A_{240} 减少 0.01 的酶量为 1 个酶活力单位。

2 结果和分析

2.1 *AURI* 基因 cDNA 克隆及序列比对

分别提取 BcAUR1 和 BcAUR1a 的总 RNA, 紫外分光光度法检测 $A_{260}/A_{280} = 2.0$, RNA 含量 = 50 ng/ μ L。利用 *AURI* 基因的特异引物以 cDNA 第一链为模板, PCR 扩增得到约 1000 bp 的条带, 该条带与已知序列 *AURI* 基因 cDNA 序列大小一致 (图 2)。将目的片段连接到 pMD18-T 载体上, 转化 DH5 α 。通过菌落 PCR (图 3) 和酶切鉴定均得到约 1000 bp 目的条带。测序结果表明, BcAUR1 和 BcAUR1a *AURI* 的 cDNA 序列相同, 与 GenBank 的序列 (序列号: XM_001546265.1) 比对有 3 个碱基发生变化 (第 426 位 T \rightarrow C, 第 474 位 C \rightarrow T, 第 588 位 A \rightarrow G), 但均未导致氨基酸突变, 它们的蛋白序列完全相同 (序列号 XP_001546315.1) 进一步证实了 BcAUR1a AbA 抗性的获得与 *AURI* 基因内含子缺失有关^[12], 与氨基酸突变无关。

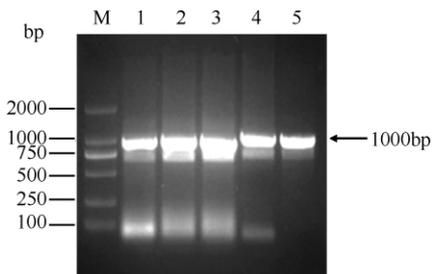


图 2. *AURI* 基因 cDNA 的扩增

Figure 2. *AURI* cDNA amplified. M: marker; lane 1 - 2: BcAUR1; lane 3 - 5: BcAUR1a.

2.2 *AURI* 基因 mRNA 的表达分析

BcAUR1 和 BcAUR1a 的总 RNA 含量为 80 ng/ μ L, 纯度 $A_{260}/A_{280} = 1.95$ 。通过 Real Time PCR 测定 BcAUR1a 的 *AURI* 基因 mRNA 的相对

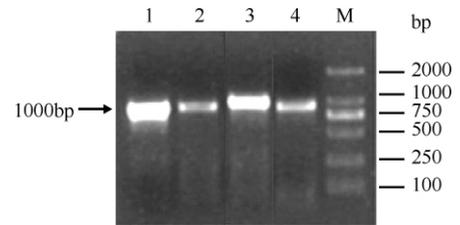


图 3. 菌落 PCR

Figure 3. Colony PCR. M: marker; lane 1 - 2: BcAUR1; lane 3 - 4: BcAUR1a.

表达量比 BcAUR1 增加了 50.2% (表 1), 说明突变体 BcAUR1a 的 *AURI* 基因在转录水平呈现高表达。

表 1. Real Time PCR Ct 值与 mRNA 相对表达量

Table 1. Real Time PCR Ct values and the relative value of mRNA expression

strains	genes	Ct values	relative value of mRNA expression
BcAUR1	<i>β-actin</i>	15.84 \pm 0.04	1 \pm 0.224
	<i>AURI</i>	18.47 \pm 0.43	
BcAUR1a	<i>β-actin</i>	15.90 \pm 0.03	1.502 \pm 0.070
	<i>AURI</i>	17.95 \pm 0.05	

2.3 IPC 合成酶活性测定

以 C_6 -NBD-Cer 和 PI 为底物, 加入 BcAUR1 和 BcAUR1a 的微粒体, 进行酶促反应。通过高效液相荧光光谱检测 C_6 -NBD-Cer 的减少量, 计算 IPC 合成酶活力 (表 2)。结果表明 BcAUR1a 的 IPC 合成酶活力比野生型 BcAUR1 高 14.16%, 证实了 BcAUR1a 在翻译水平呈现高表达。

表 2. IPC 合成酶活力测定

Table 2. Determine of IPC synthase activity

strains	retention time of substrate / min	IPC synthase activity / (μ mol / min / mg)
BcAUR1	20.362	2.8853 $\times 10^{-2}$
BcAUR1a	20.258	3.29387 $\times 10^{-2}$

2.4 AbA 对灰葡萄孢菌过氧化氢分泌的影响

过氧化氢是一种强氧化剂, 也是植物病原真菌致病的一种重要的毒力因子。在含有 AbA 时, 野生型 BcAUR1 过氧化氢分泌量比缺乏 AbA 时增加 130 倍 (表 3), 说明 AbA 显著刺激过氧化氢分泌。在缺乏 AbA 时, 突变体 BcAUR1a 的过氧化氢分泌量比野生型高 1.35 倍 (表 3), 表明突变体中 H_2O_2 累积, 增强菌体的侵染力, 有利于定植寄主植物。突变体

在 AbA 存在下过氧化氢的分泌增加不显著 (表 3), 说明突变体对 AbA 产生了抵抗。

表 3. 野生型和突变体 H_2O_2 的分泌量

Table 3. H_2O_2 secretion of wild-type *Botrytis cinerea* and the mutants

strains	$c(H_2O_2) / (\mu\text{mol/g})$
BcAUR1	8.76 ± 0.103
BcAUR1 (+ AbA)	1148 ± 6.16
BcAUR1a	20.61 ± 0.101
BcAUR1a (+ AbA)	27.76 ± 0.14

2.5 胞外抗氧化酶活性的测定

SOD 能催化超氧阴离子自由基转化为 H_2O_2 , 过氧化物酶和过氧化氢酶能将 H_2O_2 分解为水, 3 种酶

组成一个完整的抗氧化防御系统, 抵抗植物的氧自由基的攻击, 在致病过程中发挥重要作用。在含有 AbA 时, 野生型 BcAUR1 的 SOD、POD、和 CAT 活性比缺乏 AbA 时增加了 6.6 倍、2.99 倍和 4.43 倍, 说明 AbA 显著刺激 SOD、POD 和 CAT 的分泌 (图 4)。这可能与 AbA 抑制 IPC 酶活力, 导致鞘脂合成受阻, 真菌细胞膜合成缺陷, 抗氧化酶类泄漏有关。与野生型相比, 突变体 BcAUR1a 在缺乏 AbA 时, SOD、POD 和 CAT 活性略有增加, 因此抵抗植物超氧阴离子自由基的能力较强, 致病能力增强。AbA 的存在与否对突变体中 3 个酶的影响不大, 进一步说明突变体对 AbA 产生了抗性。

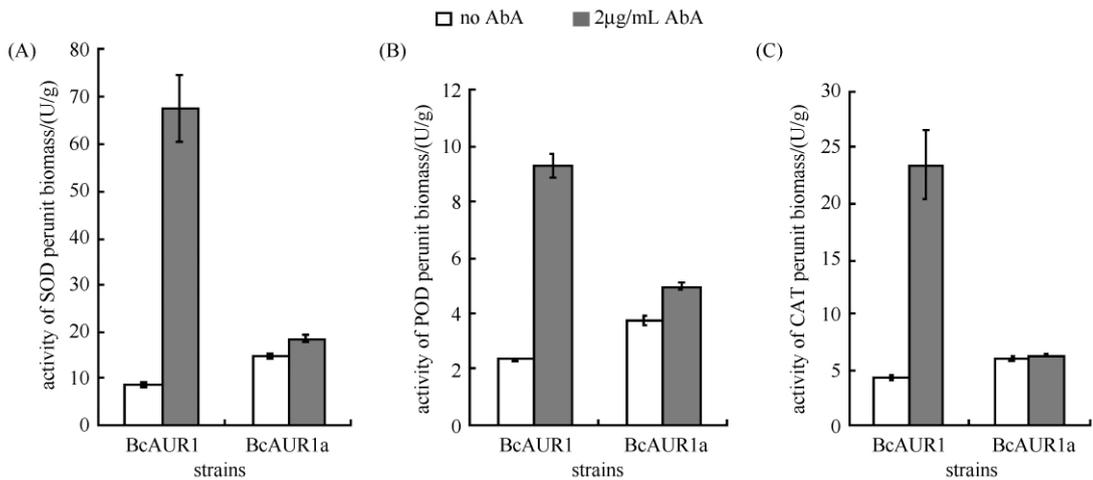


图 4. 单位菌体抗氧化酶活性测定

Figure 4. Determine of antioxidase activity per unit biomass. A: SOD; B: POD; C: CAT.

3 讨论

靶基因的高表达是真菌产生抗性的主要原因之一, Sanglard 等对大量病原真菌耐药和敏感菌株的 mRNA 表达量的比较发现, 大部分耐药菌株靶酶的 mRNA 含量会相应增高, 只有极少数例外^[24]。Marichal 等发现, 对唑类药物耐药的光滑念珠菌株中 Erg11 基因的拷贝数比敏感株高 3.7 倍, mRNA 水平比敏感株高 8 倍^[25]。酵母的 AURI 基因的过量表达导致酵母对 AbA 抗性的上升^[7]。我们的实验也证实了 BcAUR1a 的 AbA 抗性与 AURI 基因的高表达有关, BcAUR1a 的 mRNA 表达量是野生型 BcAUR1 的 1.5 倍, IPC 合成酶活力是野生型 BcAUR1 的 1.14 倍。近年许多研究发现真核基因内含子具有调控基因表达的功能, 充当转录促进子

和转录抑制子的作用^[13-15, 26]。BcAUR1a 的 AURI 基因中的内含子在抗 AbA 机制中发挥着重要的作用, 很可能是调控 AURI 基因表达的重要元件, 起着转录抑制子的作用。因此它的缺失, 导致 AURI 基因的高水平表达, 从而抵抗 AbA 的作用。

AURI 基因是真菌生长必需和特有的, 其表达调控对鞘脂合成具有关键的作用。真菌 AURI 基因表达异常, 不仅影响真菌的生长, 而且影响真菌与寄主的相互作用, 改变真菌的致病性。Rolke 等发现灰葡萄孢菌的致病力与 H_2O_2 成正比, 并发现 SOD 基因缺失会导致灰葡萄孢菌对大豆的致病力减弱^[27]。我们的实验也发现灰葡萄孢菌的致病性与 H_2O_2 以及与致病作用相关的酶活性呈正相关。野生型 BcAUR1 由于 AbA 加入 H_2O_2 分泌量、SOD、POD 和 CAT 酶活力显著增加, 导致了致病性增强。这可能与 AbA 刺激这些物质的分泌, 并且 IPC 合成

酶受到抑制,鞘脂合成受阻,细胞膜形成缺陷,胞内物质泄漏有关。突变体 BcAUR1a 无论 AbA 存在与否, H₂O₂ 分泌量、SOD、POD 和 CAT 酶活力无明显变化,表明 BcAUR1a 对 AbA 引起的刺激分泌 H₂O₂、SOD、POD 和 CAT 的作用产生了抵抗,这可能与 IPC 合成酶高表达有关,或存在其他的机制。

参考文献

- [1] Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signaling: lessons from sphingolipids. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2008, 9: 139-150.
- [2] Colomboaioni L, Garcia-Gil M. Sphingolipid metabolites in neural signalling and function. *Brain Research Reviews*, 2004, 46: 328-355.
- [3] Dickson RC, Lester RL. Shpingolipid functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, 1583: 13-25.
- [4] Dickson RC, Sumanasekera C, Lester RL. Functions and metabolism of sphingolipids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Progress in Lipid Research*, 2006, 45: 447-465
- [5] Obeid LM, Okamoto Y, Mao C. Yeast sphingolipids: metabolism and biology. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, 1585: 163-171.
- [6] Cerantola V, Guillas I, Roubaty C, Vionnet C, Uldry D, Knudsen J, Conzelmann A. Aureobasidin A arrests growth of yeast cells through both ceramide intoxication and deprivation of essential inositolphosphorylceramides. *Molecular Microbiology*, 2009, 71:1523-1537.
- [7] Hashida-Okado T, Ogawa A, Endo M, Yasumoto R, Takesako K, Kato I. AUR1, a novel gene conferring aureobasidin resistance on *Saccharomyces cerevisiae*: a study of defective morphologies in Aur1p-depleted cells. *Molecular Genetics and Genomics*, 1996, 251: 236-244.
- [8] Endo M, Takesako K, Kato I, Yamaguchi H. Fungicidal action of aureobasidin A, a cyclic depsipeptide antifungal antibiotic, against *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1997, 41: 672-676.
- [9] Heidler SA and Radding JA. The AUR1 gene in *Saccharomyces cerevisiae* encodes dominant resistance to the antifungal agent aureobasidin A (LY295337). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1995, 39: 2765-2769.
- [10] Kuroda M, Hashida-Okado T, Yasumoto R, Gomi K, Kato I, Takesako K. An aureobasidin A resistance gene isolated from *Aspergillus* is a homolog of yeast AUR1, a gene responsible for inositol phosphorylceramide (IPC) synthase activity. *Molecular Genetics and Genomics*, 1999, 261: 290-296.
- [11] 刘圣红. AbA 与灰葡萄孢菌 IPC 合成酶相互作用的功能域及灰葡萄孢菌对植物致病生化机理的研究. 新疆大学硕士学位论文, 2009.
- [12] 郭星军. AbA 对灰葡萄孢菌 IPC 合成酶的影响及其抗病机理的研究. 新疆大学硕士学位论文, 2010.
- [13] Jeong YM, Jung EJ, Hwang HJ, Kim H, Lee SY, Kim SG. Roles of the first intron on the expression of *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) genes for actin and actin-binding proteins. *Plant Science*, 2009, 176: 58-65.
- [14] Surinya KH, Cox TC, May BK. Identification and characterization of a conserved erythroid-specific enhancer located in intron 8 of the human 5-aminolevulinate synthase 2 gene. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273: 16798-16809.
- [15] Bhattacharyy N, Banerjee D. Transcriptional regulatory sequences within the first intron of the chicken apolipoprotein A I (apoA I) gene. *Gene*, 1999, 234 (2): 371-380.
- [16] Clement JQ, Wilkinson MF. Rapid induction of nuclear transcripts and inhibition of intron decay in response to the polymerase II inhibitor DRB. *Journal of Molecular Biology*, 2000, 299: 1179-1191.
- [17] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ Ct method. *Methods*, 2001, 25 (4): 402-408.
- [18] Burke D, Dawson D, Stearns T. *Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000.
- [19] Zhong WY, Murphy DJ, Georgopapadaku NH. Inhibition of yeast inositol phosphorylceramide synthase by aureobasidin A measured by a fluorometric assay. *FEBS Letters*, 1999, 463 (3): 241-244.
- [20] Gen Y, Liu K, Zhou J. Calcon-sodium carboxylate as substrate in enzymatic determination of hydrogen peroxide. *Chinese Journal of Applied Chemistry*, 2002, 19 (2): 199-201. (in Chinese)
- 耿玉珍, 刘葵, 周杰. 以钙试剂羧酸钠为底物酶法测定过氧化氢. *应用化学*. 2002, 19 (2): 199-201.
- [21] Zhou G, Gui X, Zhong X, Zhu R. The improved method to mensurate superoxide dismutase activity by benzene-1, 2, 3-triol oxidation. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 1986, 13 (4): 71-73. (in Chinese)
- 邹国林, 桂兴芬, 钟晓凌, 朱汝璠. 一种 SOD 的测活方法-邻苯三酚自氧化法的改进. *生物化学与生物物理进展*, 1986, 13 (4): 71-73.

- [22] 张志良. 植物生理学实验指导. 第二版. 北京: 高等教育出版社, 1990.
- [23] 邹琦. 植物生理学实验指导. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [24] Sanglard D, Ischer F, Koymans L, Bille J. Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14 α -demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1998, 42 (2) : 241-253.
- [25] Marichal P, Bossche HV, Odds FC, Nobels G, Warnock DW, Timmerman V, Broeckhoven CV, Fay S, Mose-Larsen P. Molecular biological characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1997, 41 (10) : 2229-2237.
- [26] Lisman Q, Pomorski T, Vogelzangs C, Urli-Sram D, de Cocq van Dwlwijnen W, Holthuis JC. Protein sorting in the late Golgi of *Saccharomyces cerevisiae* does not require mannosylated sphingolipids. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279: 1020-1029.
- [27] Rolke Y, Liu SJ, Quidde T, Williamson B, Schouten A, Weltring KM, Siewere V, Tenberge KB, Tudzynski B, Tudzynski P. Functional analysis of H₂O₂-generating systems in *Botrytis cinerea*: the major Cu-Zn-superoxide dismutase (BCSOD1) contributes to virulence on French bean, whereas a glucose oxidase (BCGOD1) is dispensable. *Molecular Plant Pathology*, 2004, 5: 17-27.

Effect of *AUR1* gene intron on the expression of inositol phosphorylceramide synthase and pathogenicity in *Botrytis cinerea*

Xinhui Wang, Jiuli Sun, Ping Gou*

College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Abstract: [Objective] *AUR1* encoding inositol phosphorylceramide (IPC) synthase is the key enzyme for the sphingolipid metabolism in fungi. In this study, we explored the mechanism of *AUR1* intron on the regulation of *AUR1* gene expression at transcriptional and translational levels in *Botrytis cinerea*, as well as the influence of *AUR1* intron on the pathogenicity. [Methods] *AUR1* mRNA expression of wild-type *B. cinerea* (BcAUR1) and the mutant with deletion of 115 bp intron (BcAUR1a) was detected by Real-time quantitative PCR. The activity of IPC synthase from BcAUR1 and BcAUR1a was measured through high-efficiency liquid fluorescent chromatogram. In addition, H₂O₂ concentration and activities of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and catalase (CAT) per unit fungus were determined by horseradish peroxidase, pyrogallol oxidation, guaiacol and ultraviolet spectrophotometric, respectively. [Results] IPC synthase had no amino acid mutation in mutant BcAUR1a. The expression of *AUR1* gene at mRNA level and the activity of IPC synthase in BcAUR1a increased by 50.2% and 14.16% compared to those in BcAUR1. The secretion of H₂O₂, SOD, POD and CAT in BcAUR1 was significantly stimulated by Aureobasidin A (AbA) treatment, in contrast, no significant influence was detected upon the secretion of these substances in BcAUR1a via AbA treatment. [Conclusion] The expression of *AUR1* in BcAUR1a is significantly up-regulated at transcriptional and translational levels. AbA treatment can significantly enhance the pathogenicity of BcAUR1, but has a minor influence on the BcAUR1a. BcAUR1a is AbA-resistant. The results suggest that *AUR1* gene intron regulate the expression of *AUR1* as a transcriptional repressor.

Keywords: *Botrytis cinerea*, Mutants, *AUR1* gene, mRNA expression, IPC synthase

(本文责编:张晓丽)