

卵寄生真菌虫草棒束孢几丁质酶基因 *IFCHII* 的克隆与分析

王 凯,赵 洋,朱先婷,才秀华,武 侠

(青岛农业大学 农学与植物保护学院,山东省植物病虫害综合防控重点实验室,山东 青岛 266109)

摘要:为研究卵寄生真菌在寄生并破坏卵的过程中几丁质酶的作用,本研究从烟草南方根结线虫卵上分离得到虫草棒束孢 HNE3,采用 RT-PCR 及 RACE 技术,首次克隆得到一个几丁质酶基因 *IFCHII*。该基因 DNA 序列全长 1 417 bp,具有 1 个内含子,长度为 61 bp,包含 1 个 1 185 bp 的开放阅读框(ORF),编码 1 个由 394 个氨基酸组成的蛋白。通过在线软件分析,该蛋白理论分子量为 44.1 kDa,等电点为 4.88。通过 GenBank 比对,几丁质酶 *IFCHII* 属于第 18 家族糖基水解酶,比对分析不同来源真菌几丁质酶,发现该几丁质酶具有典型的催化区保守序列 SIGGW 和 FDGIDIDWE 及结合区保守序列 GTWEQGVYDY 和 GLGGAMWWESS。同源性比对发现,该几丁质酶同昆虫寄生真菌几丁质酶同源关系近。结果表明,从虫草棒束孢 HNE3 克隆得到几丁质酶基因 *IFCHII*,为进一步明确该菌产生的几丁质酶对南方根结线虫卵壳降解及降低孵化率的作用机理提供理论依据。

关键词:虫草棒束孢;南方根结线虫卵;克隆;几丁质酶基因;序列分析

中图分类号:Q78 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2015)02-0078-09

doi:10.7668/hbxb.2015.02.015

Cloning and Analysis of Chitinase Gene *IFCHII* from Egg-parasitic Fungus *Isaria farinosa*

WANG Kai,ZHAO Yang,ZHU Xian-ting,CAI Xiu-hua,WU Xia

(College of Agronomy and Plant Protection,Qingdao Agricultural University,Key Lab of Integrated
Crop Pest Management of Shandong Province,Qingdao 266109,China)

Abstract:In order to explore the function of chitinase in parasitizing and destroying egg, a nematode egg-parasitic fungus *Isaria farinosa* HNE3 was isolated from *Meloidogyne incognita* infecting tobacco in Henan Province. By using RT-PCR and RACE, we had cloned a chitinase gene *IFCHII* for the first time. The full-length DNA of *IFCHII* was 1 417 bp, containing a intron with the length of 61 bp, ORF was 1 185 bp and it encoded 394 amino acids. Analyzing chitinase *IFCHII* by online biological software deduced that its molecular mass and isoelectric point were 44.1 kDa and 4.88, especially. By compared with other chitinase from different fungus in GenBank, *IFCHII* belongs to glycosyl hydrolase family 18 chitinase. We found two prevalent conserved catalytic domains with the sequence of SIGGW and FDGIDIDWE and two binding domains with the sequence of GTWEQGVYDY and GLGGAMWWESS. Comparison of chitinase *IFCHII* with other chitinases from entomopathogenic fungi revealed that enzymes were highly similar. It was concluded that the chitinase coded by gene *IFCHII* provided theoretical basis for damaging on eggshell structure and inhibiting on egg-hatching of *M. incognita*.

Key words:*Isaria farinosa*; *Meloidogyne incognita*; Cloning; Chitinase gene; Sequence analysis

南方根结线虫是根结线虫属中最具有破坏性的一个种,几乎能侵染所有栽培作物,在世界范围内每

年造成的经济损失达 1 500 亿美元^[1]。然而,利用化学杀线剂防治根结线虫病害不仅造成环境污染,

收稿日期:2015-01-27

基金项目:山东烟草专卖局资助项目(201001);农业部科研项目(2130108);山东省“泰山学者”建设工程专项经费

作者简介:王 凯(1990-),男,山东寿光人,硕士,主要从事植物病原线虫生物防治研究。

通讯作者:武 侠(1963-),男,吉林吉林人,教授,博士,主要从事植物线虫学研究。

而且提高了根结线虫对杀线剂的抗性,使得化学杀线剂的防治效率不断降低^[2]。因此,对环境友好可持续的生物防治成为研究热点。线虫生防因子—线虫病原真菌根据致病机理不同分4类:线虫诱捕真菌、内寄生真菌、卵和雌虫寄生菌及产毒真菌。其中,卵寄生真菌作为生防因子,因其对根结线虫病害的防治具有很大潜力,受到广泛关注。

卵是线虫生活史中抗性最强的发育阶段,能够保护胚胎不受化学或者生物杀线剂的影响,但是易被卵寄生真菌寄生和破坏^[3]。卵壳通常包括3层:脂质层、几丁质层、卵黄层,几丁质层是最厚的一层,承担维持卵结构强度的功能,也是抗真菌侵染的主要屏障^[4]。卵寄生真菌能分泌多种胞外水解酶,如几丁质酶、丝氨酸蛋白酶、脂肪酶、胶原酶等,能够降解线虫卵壳,在侵染根结线虫的过程中,发挥了重要作用^[5]。其中,几丁质酶的作用及基因序列被广泛研究。1980年,Wharton^[4]指出几丁质酶在侵染线虫卵过程中的潜在作用。Dackman等^[6]从被侵染线虫卵中分离到轮枝菌(*Verticillium* spp.),并在该菌提取物酶活试验中发现几丁质酶活性。Mercer等^[7]发现几丁质酶降解几丁质后,引起卵的过早孵化,导致存活的二龄幼虫数下降。Tikhonov等^[8]首次纯化并命名一个几丁质酶CHI43,并证明几丁质酶能引起线虫卵壳的破裂。Gan等^[9]从刀孢轮枝菌(*Lecanicillium psalliotae*)中纯化得到几丁质酶(LP-CHII)和蛋白酶(Ver 112),处理线虫卵发现,孵化率明显下降,显微镜观察处理后的卵,发现卵变得膨胀并且卵壳失去原有的结构特征,证明了2个酶在体外处理线虫卵中有重要的作用。张成敏等^[10]的研究表明,厚垣普奇尼亚菌(*Pochonia chlamydosporia*)产生的几丁质酶能够消解或软化根结线虫卵壳,抑制卵孵化或者杀死卵,且在卵寄生过程中起重要作用。林森等^[11]发现从烟草根结线虫卵中分离的交枝顶孢(*Acremonium implicatum*)具有高效产几丁质酶特性,能有效破坏线虫卵壳。赵洋等^[12]从食线虫真菌渐狭蜡蚧菌中成功克隆得到几丁质酶基因*LACHII*,丰富了几丁质酶基因的多样性。上述研究的结果均表明,几丁质酶在卵寄生真菌寄生及破坏卵结构的过程中起重要作用。

虫草棒束孢(*Isaria farinosa*)异名为虫花棒束孢、粉棒束孢,此前一直被称作粉拟青霉(*Paecilomyces farinosus*),是一种常见的昆虫病原真菌,世界范围内分布广泛,有相当广阔的寄主范围,并且已被用作一种生物因子防治农业害虫^[13]。早在1931年,Clement等^[14]就将*I. farinosa*作为棒束孢属的新选

模式。1957年,Brown和Smith^[15]把原来属于棒束孢属中的虫生种归入拟青霉属(*Paecilomyces bainier*)中,并将虫草棒束孢重新整理归为*Paecilomyces farinosus*。之后,瓶梗成瓶形、向上突然变细,且分生孢子链生的棒束孢被移入拟青霉属中的拟棒束梗孢组(sect. *Isarioidea*)。2005年,经Hodge、Gams、Luangsa-ard等^[16-18]商定,恢复棒束孢属,并重新选定虫草棒束孢为该属模式种。与已深入研究的2种昆虫病原真菌绿僵菌(*Metarhizium anisopliae*)和白僵菌(*Beauveria bassiana*)相比,虫草棒束孢在低温下能够稳定的生长、发育,且保持较高致病力,在冬季控制越冬害虫种群有着特有的优势^[15]。

本研究从河南三门峡烟草根结上分离的线虫卵样品中分离得到虫草棒束孢一直用于防治有害昆虫,但对南方根结线虫防治的相关研究甚少。在选择培养基发现该菌有产几丁质酶活性,但查阅文献,未发现有关该菌的产几丁质酶活性、几丁质酶基因序列及几丁质酶在卵寄生过程中作用机理的研究。

南方根结线虫卵寄生真菌能够寄生并破坏线虫卵壳,在这一过程中,几丁质酶已被证明起重要作用。为了探究虫草棒束孢产生的几丁质酶在卵寄生过程中的作用,采用RT-PCR及RACE技术克隆几丁质酶基因,并对该基因编码的几丁质酶进行生物信息学分析,为下一步表达几丁质酶,明确几丁质酶对南方根结线虫卵壳降解及降低孵化率奠定了理论基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

虫草棒束孢HNE3菌株分离自河南三门峡渑池县烟草根结线虫卵,现保存于青岛农业大学线虫学研究室。

DNA提取试剂盒DV811A和RACE提取试剂盒SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit(PT4096-1, Clon-tech TaKaRa Bio Company)购自TaKaRa公司;RNA提取所用TRIzol购自生工公司;反转录试剂盒Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit和扩增用聚合酶PCR Master Mix(2X)购自Thermo公司;其他常用化学试剂为国产或进口分析纯。试验所用仪器经严格灭菌后使用。

半选择性培养基:(NH₄)₂SO₄ 3 g, K₂HPO₄ 0.7 g, KH₂PO₄ 0.3 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, 1%胶体几丁质100 mL,酵母粉3 g, FeSO₄ 0.01 g, 琼脂13 g, 加无菌水定容至1 000 mL, pH值调至5.5。产酶诱导培养基:KNO₃ 3 g, KH₂PO₄ 1 g, FeSO₄ 0.01 g, NaCl 0.3 g,

MgSO₄·7H₂O 0.3 g, 蛋白胨 3 g, 1% 胶体几丁质 200 mL, 加无菌水定容至 1 000 mL, pH 值调至 5.0。PDA 培养基: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 000 mL。1% 胶体几丁质制备: 将 10 g 几丁质粉末与 100 mL 85% H₃PO₄ 充分溶解于 4 ℃ 放置 24 h, 取出后加 2 mL 超纯水, 电动搅拌使其分散, 在 8 000 r/min 低温离心数次, 用蒸馏水将 pH 值洗至 5.5, 停止离心, 用 1N NaOH 调节 pH 值至 6.0 ~ 7.0, 加超纯水定容至 1 000 mL。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株 HNE3 的分离、培养 采用过筛法获得来自河南三门峡渑池县烟草根结中的南方根结线虫卵, 用 2% 的 NaClO 表面消毒 2 ~ 3 min, 移至半选择性培养基, 于 27 ℃ 恒温箱中培养, 定期观察菌落生长情况, 将有透明圈产生的真菌挑至 PDA 培养基上培养, 长出单菌落后鉴定。得到的真菌接种到 PDA 培养基上, 于 27 ℃ 恒温箱中培养。

1.2.2 菌株的形态学观察及鉴定 将 4 ℃ 保存的菌株接种到 PDA 培养基上, 27 ℃ 培养 4 d, 活化菌株。用直径 6 mm 的打孔器沿菌落边缘打孔, 转移到新的 PDA 培养基上, 27 ℃ 恒温培养, 3 次重复。第 2 天开始记录菌落生长情况, 直至长满平板。采用玻片培养法进行形态学观测, 将 PDA 培养基分成 5 mm × 5 mm 的小薄片, 挑于载玻片上, 之后将活化的菌丝挑于培养基上。置于 27 ℃ 恒温箱中培养, 在显微镜下连续观察该菌的分生孢子、分生孢子梗等形态特点, 测量并照相。

1.2.3 菌株 HNE3 的分子生物学鉴定 取培养 4 d 的菌落, 用 6 mm 打孔器沿菌落边缘打孔, 在无菌条件下转移到 120 mL 液态胶体几丁质培养基中, 每 100 mL 培养基接 10 块菌饼。在摇床 (170 r/min) 中恒温 (27 ℃) 振荡培养 5 d。之后抽去液体, 取下残留的菌丝在液氮中研磨成粉末, 利用 DNA 提取试剂盒 (TaKaRa DV811A), 按说明提取总 DNA, 并保存, 供下面试验使用。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量, 选取高质量 DNA 做 PCR 扩增的模板。采用 PCR 通用引物 ITS1-F 和 ITS4-R (表 1), PCR 反应体系 (50 μL): PCR Master Mix (2 ×) 25 μL、上下游引物各 2.5 μL、DNA 模板 2.5 μL、ddH₂O 17.5 μL。扩增条件: 94 ℃ 4 min; 94 ℃ 1 min, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 90 s, 35 个循环; 72 ℃ 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 选取高质量产物送交上海生工生物工程技术服务有限公司测序。将测序结果在 NCBI 数据库中进行 Blast (<http://blast.st-va.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 比对, 找出相似性最高的序

列及真菌种类, 并申请登录号。选取相关的 ITS 序列, 使用 MEGA 5.0 软件采用邻接法 (Neighbor-joining, NJ) 进行系统发育树的构建与分析。

1.2.4 总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成 总 RNA 提取菌丝样本收集同上述总 DNA 提取。总 RNA 提取采用 TRIzol 总 RNA 提取试剂 (TIANGEN RP120420), 并严格按操作说明进行试验, 所有仪器试剂均严格灭菌。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量是否符合进一步试验的要求, 并将符合要求的总 RNA 放于 -80 ℃ 保存或立即进行下一步试验。利用上述提取的总 RNA, 按照反转录试剂盒 Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 的操作说明, 进行 cDNA 第一链的合成, 将所得产物放于 -80 ℃ 保存或立即进行下一步试验。

1.2.5 *IFCHII* 基因保守序列的扩增 在 GenBank 中查找并筛选不同来源真菌几丁质酶基因编码的氨基酸序列, 利用 DNAMANv. 6.0 进行多序列比对, 确定保守区, 并用 Primer Premier 5.0 设计简并引物 IFC1 和 IFC2 (表 1)。以合成的 cDNA 第一链为模板进行 RT-PCR 扩增, 反应体系 (50 μL) 同上, 扩增条件: 94 ℃ 4 min; 94 ℃ 30 s, 53 ℃ 45 s, 72 ℃ 60 s, 34 个循环; 72 ℃ 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 选取高质量产物送交上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

1.2.6 *IFCHII* 基因 3' 端及 5' 端序列扩增 根据测序公司测得保守序列利用 Primer Premier 5.0 设计 3' 端巢式引物 Ifp1 和 Ifnp1 及 5' 端巢式引物 Ifp2 和 Ifnp2 (表 1)。3'/5'-RACE-Ready cDNA 的合成严格按照 SMARTer™ RACE cDNA 扩增试剂盒操作说明进行, 反应产物直接进行 PCR 扩增或存放于 -80 ℃。5'RACE-PCR 扩增: 第 1 次 PCR 反应体系 (25 μL): PCR Master Mix (2 ×) 15 μL、引物 Ifp2 1.5 μL、引物 UPM (试剂盒自带) 1.5 μL、5' cDNA 模板 1.5 μL、ddH₂O 5.5 μL; 扩增条件: 94 ℃ 4 min; 94 ℃ 1 min, 61 ℃ 30 s, 72 ℃ 90 s, 34 个循环; 72 ℃ 10 min。将第 1 次扩增产物用 ddH₂O 稀释 10 倍为模板, 以 Ifnp2 和 NUP (试剂盒自带) 为引物进行巢式扩增, 反应体系同上, 扩增条件中退火温度改为 58 ℃。3'RACE-PCR 第 1 次扩增以 Ifp1 和 UPM 为引物, 3'RACE cDNA 为模板; 巢式扩增以 Ifnp1 和 NUP 为引物, 第 1 次产物稀释 10 倍为模板。扩增条件同上述 5'RACE-PCR 扩增条件。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 于 -20 ℃ 存放。并将符合条件的扩增产物送交上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

1.2.7 *IFCHII* 基因全序列及验证 利用 DNAMA-

Nv. 6.0 将 3'和 5'RACE 测序所得序列及保守序列拼接,获得 *IFCHII* 基因的全长 cDNA 序列,利用在线软件 ORF Finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)找到该基因 ORF 区,并用引物设计软件设计特异性引物 ORFup 和 ORFdown(表 1)。分别以之前提取所得的总 DNA 及反转录所得 cD-

NA 为模板,进行 PCR 扩增,反应体系(50 μL)同上,扩增条件:94℃ 4 min;94℃ 30 s,65℃ 45 s,72℃ 60 s,34 个循环;72℃ 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,并送交上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

表 1 引物序列设计

Tab. 1 Primer and sequences used in the study

引物 Primer	序列 Sequence(5' - 3')	引物 Primer	序列 Sequence(5' - 3')
ITS1-F	CTTGGTCAITTAGAGGAAGT	ITS4-R	CCTCCGCTTATTGATATGC
IFC1	GATGGYATYGAYRTYGAYTGGA	IFC2	GCGCTGTCTCTCCACCACAT
Ifp1	CACCAAGCCAACCTGTATCCCTG	IfNp1	CGCAGAGGAGCACAAGGACGACG
Ifp2	GCACGACCATACAACGGCATTCCA	IfNp2	CAGGGATACAGGTTGGCTTGCTG
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
ORFup	ATGAGTTATCGATCCGTAGCCTATT	ORFdown	GAGCAACCACCTCGCATGGCACACA

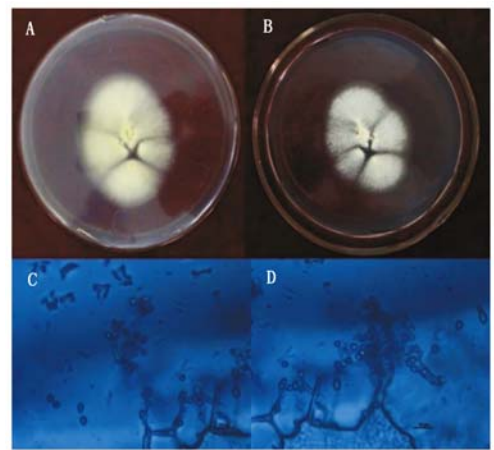
2 结果与分析

2.1 菌株 HNE3 的形态学鉴定

虫草棒束孢在 PDA 培养基上培养,观察到菌落绒状,气生菌丝发达,白色。在显微镜下观察,发现分生孢子梗轮枝状分枝,每枝着生 4~5 个瓶梗细胞。瓶梗柱状或基部膨大,顶端为一细长颈。分生孢子链生,有分支。不形成厚垣孢子(图 1)。

2.2 菌株 HNE3 rDNA-ITS 序列分子鉴定

经电泳检测,从虫草棒束孢基因组 DNA 中扩增出一条特异性序列,测序结果显示该 ITS 序列长度为 587 bp,申请 GenBank 登录号为 KM035983。NCBI 网站 Blast 比对,结果显示 *I. farinosa* HNE3 的 ITS 序列与 *I. farinosa* (JF429897) 相应序列同源性高达 99%。利用 MEGA 5.0 软件采用邻接法构建系统发育树(图 2),该菌与 *I. farinosa* 属于同一类群。



A. 菌落正面观;B. 菌落背面观;C~D. 分生孢子梗、瓶梗和分生孢子。
A. Colony face view; B. Colony reverse view;
C - D. Conidiophores, phialides and Conidia.

图 1 虫草棒束孢 HNE3 的形态特征及培养性状

Fig. 1 The morphology and culture characteristics of *I. farinosa* HNE3

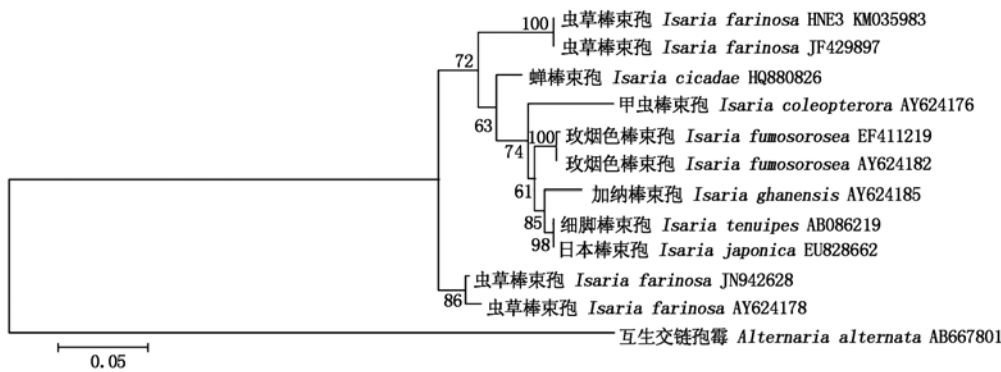


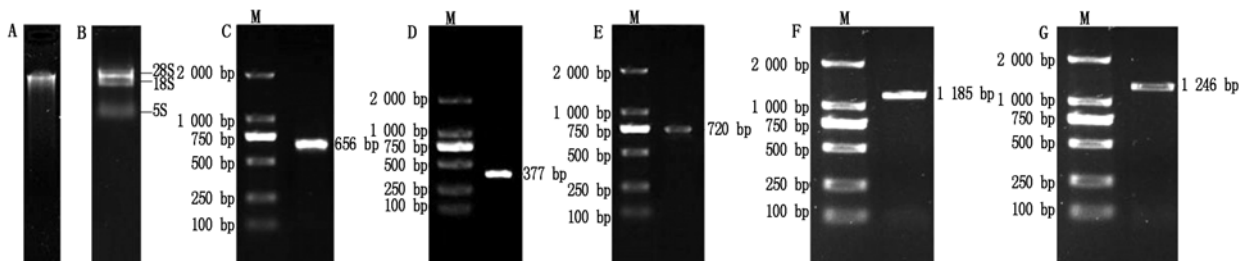
图 2 基于 rDNA-ITS 序列的菌株 HNE3 及 GenBank 中其他类真菌类群系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic trees constructed with ITS sequences of rDNA genes from HNE3 isolate and the other fungi deposited in GenBank *Isaria farinosa*

2.3 *IFCHII* 基因的克隆

电泳检测 DNA 及 RNA 提取质量,均符合后续试验要求(图 3-A,B)。通过保守序列的扩增,得到

一条 656 bp 的序列(图 3-C),通过 NCBI Blast 比对,显示此序列与真菌几丁质酶有高度的同源性,说明此序列是我们需要的保守序列。通过 3'和 5'RACE-



A. 总 DNA 提取条带;B. 总 RNA 提取条带;C. 保守序列;D. 3'-RACE 产物;E. 5'-RACE 产物;F. 特异性引物 ORFup、ORFdown 以 cDNA 为模板扩增产物;G. 特异性引物 ORFup、ORFdown 以 DNA 为模板扩增产物;M. 2 kb DNA ladder。

A. Total DNA product;B. Total RNA product;C. Conserved sequence of PCR with primers IF1 and IF2;D. 3'-RACE product;E. 5'-RACE product;F. Product of PCR with primers ORFup and ORFdown from cDNA;G. Product of PCR with primers ORFup and ORFdown from Genomic DNA;M. 2 kb DNA ladder.

图 3 PCR 扩增虫草棒束孢几丁质酶基因的琼脂糖凝胶电泳图

Fig.3 Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from chitinase gene of *I. farinosa*

```
1      ACATGGGGATCC TCATCATTTTCGCTTTTG TTT TC TTTCAACC TGTTT TTACCT TCAAG T
61     ACACCAACAATATGAGTTATCGA TCCGTAGCCTATTACGTCAACTG GGC CAT CTATGCG
1      M S Y R S V A Y Y V N W A I Y A
121    CGCAAGCATTGCGCGAG GATCTCCCGGCTCAA AACCTGACCCAC GTC TTGTACTCTTTT
17     R K H L P Q D L P A Q N L T H V L Y S F
181    GCGAATGTTTCG CAGTAAAGT GGTGAAGTGTTCGCTCTCTAGTCGAAGC TGTGTAGCCCC
37     A N V R S E S G E V
241    GCTACTATCACTGACCCCTGCGTACCAACAGCTTCATGACC GAT AGCTGGGCGGACACCGA
47     F M T D S W A D T D
301    CATCCATTGGGAAGGTGATTCATGGAATGAT ACC GGCACCAACGTGTATGGCTGTCTCAA
56     I H W E G D S W N D T G T N V Y G C L K
361    GCAACTCAATATCTGAAGAAACACAACCGGAA CTT CAAGGTGCTGCTCTCCATTGGTGG
76     Q L N I L K K H N R N F K V L L S I G G
421    CTGGACATATAGCTCAACTTCCCC GCTCCGGCTAG CAGGCCCGAGGG CCGCGACACATT
96     W T Y S S N F P A P A S R P E G R D T F
481    CGCCAAATCCTGTGTCGAG CTCGTCAAGA ACCTTGGTTTGTAT GGTAT TG ATATTGATTG
116    A K S C V E L V K N L G F D G I D I D W
541    GGAGTATCCCAAGACTCCGGAAGAGGCAGGCCACTTCGTTGAG CTTCTCGCC GAGGTCCG
136    E Y P K T P E E A G H F V E L L A E V R
601    CAAGCAACTAGACGAGTACTCTGCAAGAGCT GCTGACAAT TACCATTGAG CTCTCGGT
156    K Q L D E Y S A R A A D N Y H F E L S V
661    GGCCTGCCAGCAGGCGCTGACAACTATCAGAAGCTCGACATCAAG GGTATGGATGCATA
176    A C P A G P D N Y Q K L D I K G M D A Y
721    CTTGGATTTTGAACCTGATG GCATATGAC TACGCCGTTCT TGGGACAAGACCACTGG
196    L D F W N L M A Y D Y A G S W D K T S G
781    CCACCAAGCCAA CCTGTATCCCTGC AAGGACACAC CTGCTTC CACGCCATTCTTACCCT
216    H Q A N L Y P C K D T P A S T P F S T V
841    CGCAGCT GTC GATTACTATACTCAAACGGTGTGCTCCTGAT AAGCTA GTCCTTGAAT
236    A A V D Y Y T Q N G V A P D K L V L G M
901    GCCGTTGTATGGTCGT GCA TTCGAA AACTGTGATGGCATGGGCCAGCCTTCCAAGGTGT
256    P L Y G R A F E N C D G M G Q P F Q G V
961    GGACAGGGTACTTGGGAGCAGGCGGTGACGACTACAAGAAGCTGCCCTTGGGAAGGCGC
276    G Q G T W E Q G V Y D Y K K L P L E G A
1021   AGAGGAGCACAAGGACGACGATTATGTGCCACTTACTGCCAGAATCCT GCT GCGCGTAC
296    E E H K D D D S C A T Y C Q N P A A R T
1081   TCTTGTCACGTACGACACTCCGGAAGTAGCA AGGATCAAAGCCGGCTTCATCAAAGAG CG
316    L V T Y D T P E L A R I K A G F I K E R
1141   CGGACTAGGTGGTGTATGTGGTGGGAGAGCAGCGCT GACAAGACAGGTGACAACTCGCT
326    G L G G A M W W E S S A D K T G D N S L
1201   TATCAGTACTGTCGTGGCGAGCTCGGGGGCAGAGGCACTGAAAAAGCAGGAAAACTG
356    I S V V G E L G G T E A L K K Q E N S C
1261   CCTCAAGTATCTGAGACCAAGTATGATAACTTGAGAAACGG ATTGCCCGAC AACTAAAG
376    L K Y P E T K Y D N L R N G L P D N *
1321   ATGTGTCCATGCGAGGTGGT TGCTC GATAGAACCATGCGCTC ATGA ATTTTGACCACCTT
1381   TACCCCGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGT
```

推导出的氨基酸序列以单个字母显示在 ORF 序列下;下划线标出了 1 个内含子序列;

阴影部分为糖基水解酶 18 家族水解区域和几丁质酶结合区域。

The deduced amino acid sequence is shown in one-letter code under the ORF; The intron is underlined;

The conserved catalytic domains of glycosyl hydrolase family 18 and chitin binding domain are shaded.

图 4 虫草棒束孢 HNE3 几丁质酶 *IFCHII* 基因序列及对应蛋白序列

Fig.4 The nucleotide sequence and amino acid sequence of *IFCHII*

PCR 扩增, 分别得到 377, 720 bp 的序列 (图 3-D, E), 利用 DNAMANv. 6.0 将 3 条序列拼接, 得到 cDNA 全长序列, 为 1 356 bp, GenBank 登录号 KM035984。以 cDNA 为模板, ORFup、ORFdown 为引物, 扩增得到一条 1 185 bp 序列 (图 3-F), 与利用 ORF Finder 在线软件推测的 ORF 完全符合。以总 DNA 为模板, ORFup、ORFdown 为引物, 扩增得到一条 1 246 bp 的序列 (图 3-G), 通过序列对比找到该基因仅有的一个内含子, 大小为 61 bp, 内含子边界符合 GT-AG 规则, 获得几丁质酶基因全序列 (图 4), 全长 1 417 bp。

2.4 *IFCHII* 基因的生物信息学分析

IFCHII 基因包含一段 1 185 bp 的 ORF 区, 编码 394 个氨基酸, 利用在线软件分析显示: 预测该蛋白分子量为 44.1 kDa, 等电点为 4.88, 氨基酸组成中带负电荷氨基酸 (Asp + Glu): 55 个, 占 14.0%, 氨基酸组成中带正电荷氨基酸 (Arg + Lys): 37 个, 占 9.3%, 分子式为 $C_{1968}H_{2947}N_{519}O_{609}S_{15}$, 不稳定系数为 34.72, 该分类蛋白物理性质稳定。

通过在线软件 InterPro 分析 *IFCHII* 蛋白表明, 该蛋白序列第 129 ~ 137 处氨基酸残基 (FDGIDIDWE) 为几丁质酶 18 家族活性位点, 证明通过上述试验获得的 *IFCHII* 基因属于第 18 家族几丁质酶基因。并且, 该蛋白存在糖基水解酶 18 家族水解区域 SIGGW 和 FDGIDIDWE, 以及 2 个保守的几丁质酶结合区域 GTWEQGVYDY 和 GLGGAMWWESS。

通过 Singal. P 服务器中的在线软件对推测的几丁质酶氨基酸序列进行信号肽分析, 显示该氨基酸序列无信号肽序列, 说明 *IFCHII* 蛋白可能是非分泌蛋白。通过 TMHMM ServerV2.0 预测几丁质酶没有跨膜结构, 属于非跨膜蛋白。通过 Psort II 预测蛋白亚细胞定位, 显示该几丁质酶定位于线粒体几率最大 (43.5%), 推测该几丁质酶是一个在线粒体内发挥转录激活作用的转录因子。

通过 NetNGlyc 1.0 和 NetPhos2.0 Serve (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos>) 在线分析 *IFCHII* 基因编码的氨基酸序列 N-糖基化位点和蛋白磷酸化位点, 结果显示该氨基酸序列有 2 个潜在的 N-糖基化位点 (图 5) 和 21 个磷酸化位点 (图 6), 这 21 个磷酸化位点非均匀分布于整条多肽链中, 其中丝氨酸 (Ser) 可能发生磷酸化的有 9 个, 苏氨酸 (Thr) 可能发生磷酸化的有 6 个, 酪氨酸 (Tyr) 可能发生磷酸化的有 6 个。

通过 PBIL LYON-GERLAND 对蛋白质序列进行二级结构预测, 结果显示 *IFCHII* 蛋白的二级结构

以 α -螺旋 (Alpha helix)、延伸链 (Extended strand) 和无规卷曲 (Random coil) 为结构元件, 比例分别为 31.73%, 12.18% 和 56.09%。通过 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/interactive>) 对 *IFCHII* 蛋白进行三级结构预测 (图 7), 发现与烟曲霉菌 (*Aspergillus fumigatus*) 几丁质酶三级结构 (2a3c.1) 相似, 具有 $(\alpha/\beta)_8$ 。该蛋白与数据库中提供的模板同源率为 61.18%, 结果较可靠。

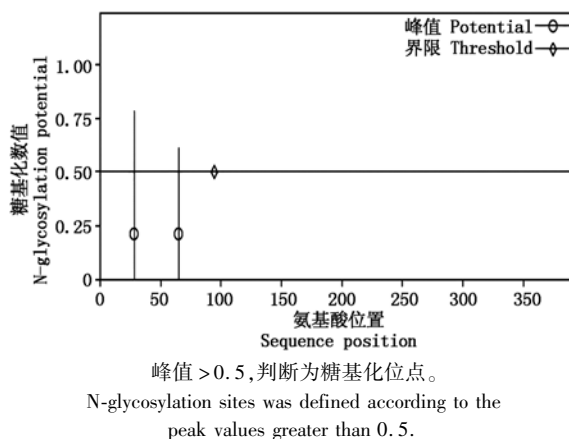


图 5 几丁质酶 *IFCHII* 氨基酸序列 N-糖基化位点分析

Fig. 5 Potential N-glycosylation sites of amino acid sequence from *IFCHII*

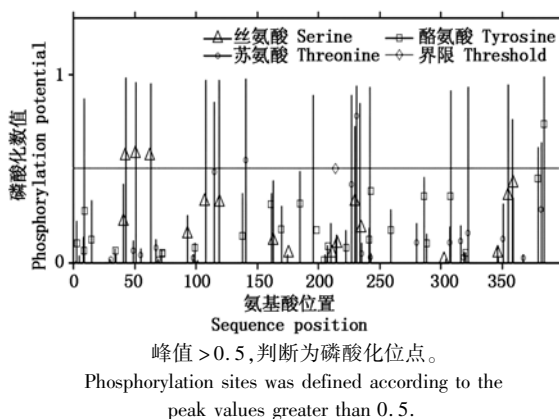


图 6 几丁质酶 *IFCHII* 氨基酸序列磷酸化位点分析

Fig. 6 Potential phosphorylation sites of amino acid sequence from *IFCHII*



图 7 虫草棒束孢 HNE3 几丁质酶三级结构预测

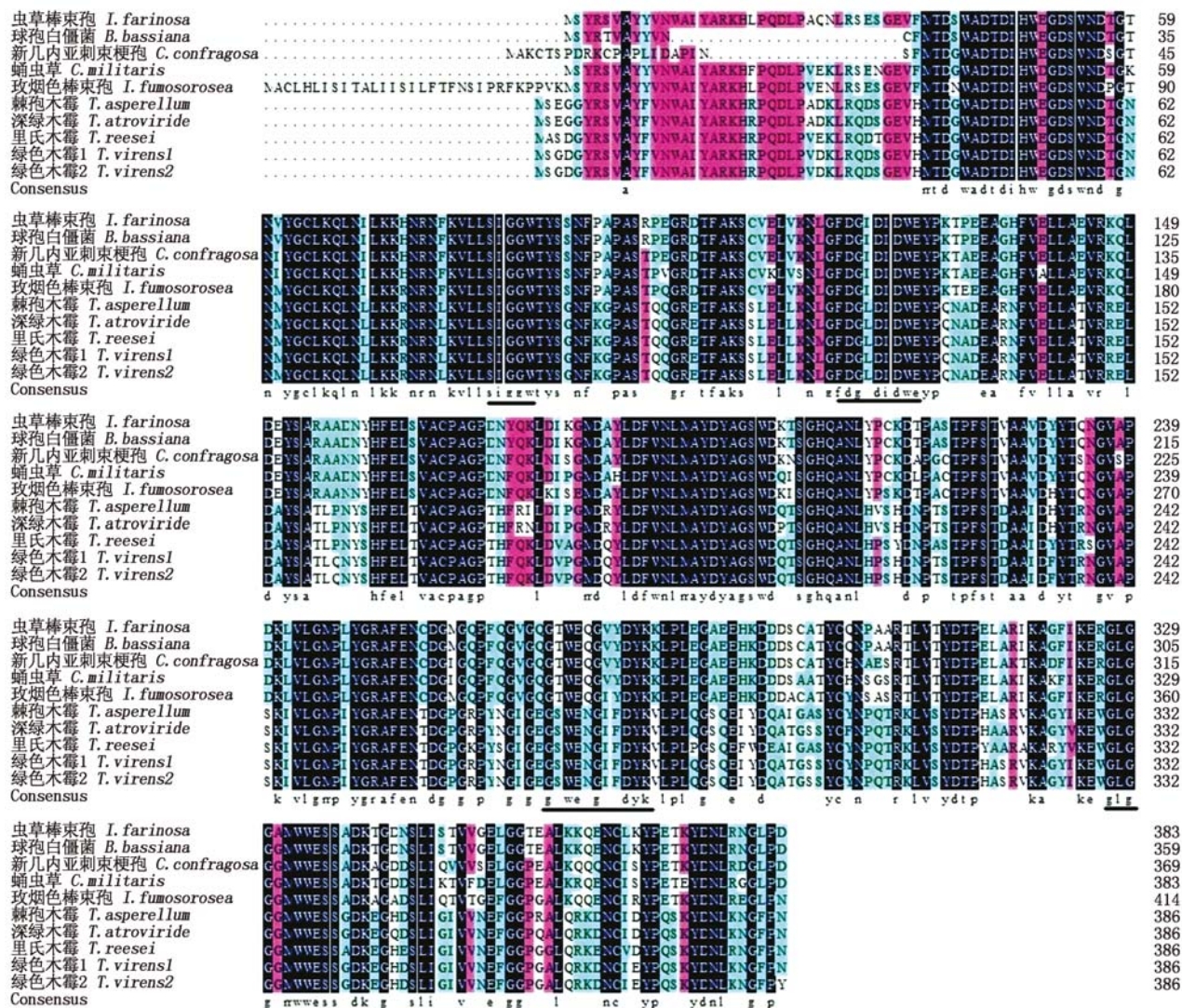
Fig. 7 Predicted tertiary structure of chitinase from *I. farinosa* HNE3

2.5 不同来源真菌几丁质酶同源性比对及系统发育分析

在 NCBI 数据库中与不同来源真菌几丁质酶进行蛋白 Blast 比对,发现这些真菌具有较高的同源性(图 8)。其中,虫草棒束孢 HNE3 几丁质酶与球孢白僵菌(*B. bassiana*, EJP61745)几丁质酶同源性高达 91%,与新几内亚刺束梗孢(*C. confragosa*, AAX56960)几丁质酶同源性高达 90%,与绿色木霉 2(*T. virens*, AAL78814)几丁质酶同源性达 70%,与深绿木霉(*T. atroviride*, EH44150)几丁质酶同源性高达 69%。

在 NCBI 数据库中,搜索来源不同的几丁质酶氨基酸序列,从中筛选确定 11 条,选用糖基水解酶

19 家族拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)几丁质酶作为外群,利用 MEGA 5.0 软件采用邻接法 Bootstrap 计算 1 000 次构建系统发育树(图 9)。分析系统发育树得出,这些几丁质酶被分成两大分支,Ⅰ分支主要为食线虫真菌和昆虫病原真菌,其中球孢白僵菌(*B. bassiana*)是一类广谱性的昆虫病原真菌,能感染多种昆虫^[19],同时玫烟色棒束孢(*I. fumosorosea*)及蛹虫草(*C. militaris*)都是常见的昆虫寄生真菌;Ⅱ分支主要为重寄生真菌,用来防治植物病害。虫草棒束孢几丁质酶位于Ⅰ分支,同球孢白僵菌(*B. bassiana*)Bootstrap 值高达 100%,说明两类真菌有很大的共性,在昆虫及线虫病害生物防治中具有重大潜力。



黑色部分代表高度同源(100%)的区域;空白部分代表几丁质酶之间的可变区域;划横线的部分表示糖

基水解酶 18 家族水解区域(SIGGW、FDGXIDWE)和几丁质酶结合区域(GXWEXGXXDY、GLGGXMWWESS)。

Areas shaded in black are high degree homology (100%) and unshaded areas are regions of variability between the chitinases; The conserved catalytic domains (SIGGW and FDGXIDWE) of glycosyl hydrolase family 18 and chitin binding domain (GXWEXGXXDY and GLGGXMWWESS) are underlined.

图 8 不同真菌来源几丁质酶氨基酸序列比对结果

Fig. 8 Alignment of the amino acid sequences of chitinases from different fungi

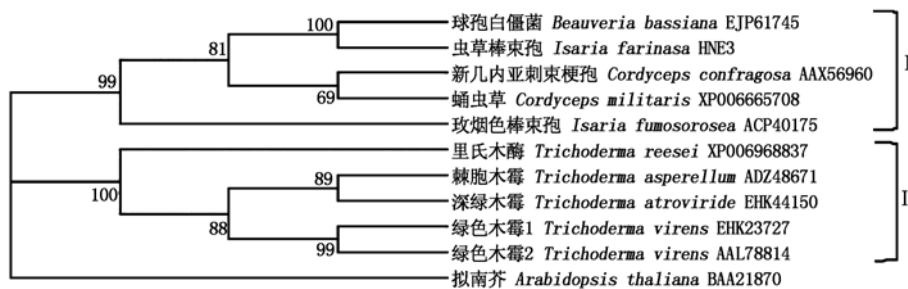


图9 不同来源真菌几丁质酶的系统发育树

Fig. 9 Phylogenetic trees constructed with amino acid sequences of different fungal chitinases

3 讨论

本研究分离到的虫草棒束孢在农业病虫害的生物防治领域有广阔的应用前景。Muller-Kögler^[20]提到,用虫草棒束孢能防治密柑根粉介、欧洲松毛虫、舞毒蛾、华中松天蛾和松尺蠖等农业害虫。用虫草棒束孢处理土壤,能明显提高处于冬眠状态马铃薯甲虫的死亡率(85.2%)。而且该菌对植物真菌病害防治的相关研究也有报道。从车轴草白粉病中分离得到的虫草棒束孢,对黄瓜白粉病菌有致病性^[21]。在叶培养试验中,虫草棒束孢的菌落能抑制番茄和马铃薯白粉菌菌落的生长^[22]。但利用虫草棒束孢防治南方根结线虫的相关研究未见报道,将其作为生防因子还需要进一步的研究,与其他许多生防菌一样,该菌对环境不存在安全问题^[23]。

线虫的卵壳是防御土壤微生物侵入的有效屏障,主要成分为几丁质(约占40%)和蛋白质^[24]。卵寄生真菌产生的几丁质酶,能降解线虫的卵壳,打破防御屏障,寄生并破坏线虫的卵。目前在分子水平上已从卵寄生真菌及食线虫真菌中克隆得到多个几丁质酶基因^[10,12,25],本研究采用RT-PCR及RACE技术,首次从卵寄生真菌虫草棒束孢中克隆得到几丁质酶基因 *IFCH1*,丰富了几丁质酶基因家族的多样性。利用InterPro和NCBI在线分析几丁质酶 *IFCH1*,结果表明,从虫草棒束孢克隆得到的几丁质酶 *IFCH1* 属于18家族糖基水解酶^[26]。该家族真菌几丁质酶包括5个结构域:N端信号肽、催化域、丝氨酸/苏氨酸酸富含区、几丁质结合区、C端延伸区^[27]。本研究扩增得到的几丁质酶 *IFCH1* 结构中不含信号肽,推测该蛋白是一种非分泌型蛋白,可能在真菌细胞形态形成和自身保护方面有重要作用^[3,28]。

几丁质酶催化域负责水解几丁质中的糖苷键。通过多序列比对分析,⁹³ SIGGW⁹⁷ 和¹²⁸ DFDGIDIDWE¹³⁷ 这2段催化水解域在18家族几丁质酶氨基酸序列中高度保守,具有这2个催化域的几丁质酶可

降解真菌的细胞壁,在真菌寄生过程中起重要作用^[29]。活性位点(¹²⁸ DFDGIDIDWE¹³⁷)符合18家族几丁质酶活性共有的序列特征 [L/I/V/M/F/Y]-[D/N]-G-[L/I/V/M/F]-[D/N]-[L/I/V/M/F]-[D/N]-x-E (PROSITE, PS01095),其中天冬氨酸(D)和谷氨酸(E)残基高度保守,谷氨酸是酸性催化剂,提供质子,在降解几丁质的过程中,直接参与酶活反应^[30]。通过化学改良和位点专一化突变确定天冬氨酸(D)和谷氨酸(E)残基是几丁质酶活性的基本要素^[31]。几丁质酶结合域(ChBD)是几丁质酶与几丁质特异性结合的基本结构,在环境中含有几丁质的情况下,能帮助几丁质酶沿N-乙酰氨基葡萄糖链移动^[32]。通过与GenBank数据库中其他几丁质酶氨基酸序列的比对,发现几丁质酶结合域位于氨基酸序列C端位置,²⁷⁹ GTWEQGVYDY²⁸⁸ 和³³⁷ GLGGAMWWESS³⁴⁵ 与其他真菌几丁质酶结合域共有序列相似,推测为该菌几丁质酶结合域^[33]。这些结构区域在几丁质酶催化降解几丁质的过程中发挥了重要作用。

在庞大几丁质酶家族中,来自同种或不同种的几丁质酶基因有相当大的变异。尽管几丁质酶 *IFCH1* 和筛选的不同来源真菌几丁质酶比对有着67%~91%的一致性,但它们都有着共同的底物结合和催化区域。通过分析这些不同来源几丁质酶的同源性,发现虫草棒束孢几丁质酶 *IFCH1* 同昆虫寄生菌产生的几丁质酶有较高的同源性,并且在构建的系统发育树中聚在同一分支,说明这些真菌产生的几丁质酶在真菌侵染农业害虫方面功能相似。

本研究首次从南方根结线虫的卵上分离到虫草棒束孢 HNE3,发现其不仅可以寄生昆虫而且对根结线虫也有影响,扩大了该菌在生防领域的应用范围。并成功克隆得到一条几丁质酶基因 *IFCH1*,并对其进行了生物信息学分析,丰富了几丁质酶的多样性。本研究结果为下一步真核表达,验证重组酶对根结线虫卵的影响及探究几丁质酶基因在真菌侵染卵的过程中表达量的变化规律提供前期研究基础。

参考文献:

- [1] Danchin E G J, Perfus-Barbeoch L. The genome sequence of *Meloidogyne incognita* unveils mechanisms of adaptation to plant-parasitism in metazoa[J]. *Evolutionary Biology*, 2009, 12: 287 – 302.
- [2] Kerry B R. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2000, 38: 423 – 441.
- [3] Cecilia Gortari M, Alberto Hours R. Fungal chitinases and their biological role in the antagonism onto nematode eggs. A review[J]. *Mycological Progress*, 2008, 7(4): 221 – 238.
- [4] Wharton D. Nematode egg-shells[J]. *Parasitology*, 1980, 81: 447 – 463.
- [5] Yang J K, Tian B Y, Liang L M, et al. Extracellular enzymes and the pathogenesis of nematophagous fungi[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 75(1): 21 – 31.
- [6] Dackman C, Chet I, Norbring H B. Fungal parasitism of cyst nematode *Heterodera schachtii*; infection and enzymatic activity[J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 1989, 62: 201 – 208.
- [7] Mercer C F, Greenwood D R, Grant J L. Effect of plant and microbial chitinases on the eggs and juveniles of *meloidogyne hapla* chitwood[J]. *Nematologica*, 1992, 8: 227 – 236.
- [8] Tikhonov V E, Lopez-Llorca L V, Salinas J, et al. Purification and characterization of chitinases from the nematophagous fungi *Verticillium chlamydosporium* and *v. suchlasporium*[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2002, 35(1): 67 – 78.
- [9] Gan Z W, Yang J K, Tao N, et al. Cloning of the gene *Lecanicillium psalliotae* chitinase *Lpchil* and identification of its potential role in the biocontrol of root-knot nematode *Meloidogyne incognita*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 76(6): 1309 – 1317.
- [10] 张成敏, 武 侠, 才秀华. 厚垣孢奇尼亚菌 *Pochonia chlamydosporia* 产生的几丁质酶对南方根结线虫卵孵化的影响[J]. *中国农业科学*, 2009, 42(10): 3509 – 3515.
- [11] 林 森, 武 侠, 曹君正, 等. 产生几丁质酶的交链顶孢(*Acremonium implicatum*) 对南方根结线虫生防潜力[J]. *植物病理学报*, 2013, 43(5): 509 – 517.
- [12] 赵 洋, 陈德鑫, 王凤龙, 等. 渐狭蜡蚧菌的鉴定及其几丁质酶基因 *LACHII* 的克隆[J]. *华北农学报*, 2014, 29(4): 63 – 70.
- [13] Gisbert Z. Review: the entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology and use in biological control[J]. *Biocontrol Science and Technology*, 2008, 18(9): 865 – 901.
- [14] Clement F E, Shear C L. The genera of fung [M]. New York: Wilson HW, 1931: 62 – 75.
- [15] Brown A H S, Smith G. The genus *Paecilomyces* bainier and its perfect stage *Byssoschlamys westling*[J]. *Transactions of the British Mycological society*, 1957(100): 17 – 89.
- [16] Hodge K T, Gams W, Samson R A, et al. Lectotypification and status of *Isaria* Pers. : Fr[J]. *Taxon*, 2005(54): 485 – 489.
- [17] Gams W, Hodge K T, Samson R A, et al. Proposal to conserve the Name *Isaria* Pers. : Fr. (anamorphic fungi) with a conserved type[J]. *Taxon*, 2005, 54(2): 537.
- [18] Luangsa-ard J J, Hywel-Jones N L, Manoch L, et al. On the relationships of *Paecilomyces* sect. *Isarioidea* species [J]. *Mycological Research*, 2005(109): 581 – 589.
- [19] Blake R, Bextun E, Harlan G, et al. Field applications of bait formulated *Beauveria bassiana* alginate pellets for biological control of the red imported fire ant[J]. *Biological Control*, 2002, 31(4): 746 – 752.
- [20] Muller-Kögler E. Pilzkrankheiten bei insekten; anwendung zur biologischen schädlingbekämpfung und Grundlagen der insektenmykologie [M]. Berlin: P. Parey, 1965: 444.
- [21] Hijwegen T, Buchenauer H. Isolation and identification of hyperparasitic fungi associated with erysiphaceae [J]. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 1984, 90: 79 – 84.
- [22] Szentivanyi O, Varga K, Wyand R, et al. *Paecilomyces farinosus* destroys powdery mildew colonies in detached leaf cultures but not on whole plants[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2006, 115: 351 – 356.
- [23] Faria M R, Wraight S P. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types[J]. *Biological Control*, 2007, 43(3): 237 – 256.
- [24] Moosavi M R, Zare R, Zamanizadeh H R. Pathogenicity of *Verticillium epiphytium* isolates against *Meloidogyne javanica* [J]. *International Journal of Pest Management*, 2011, 57(4): 291 – 297.
- [25] Dong L Q, Yang J K, Zhang K Q. Cloning and phylogenetic analysis of the chitinase gene from the facultative pathogen *Paecilomyces lilacinus* [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 103(6): 2476 – 2488.
- [26] Pishko E J, Kirkland T N, Cole G T. Isolation and characterization of two chitinase-encoding genes (cts1, cts2) from the fungus *Coccidioides immitis* [J]. *Gene*, 1995, 167: 173 – 177.
- [27] Duo-Chuan L. Review of fungal chitinases [J]. *Mycopathologia*, 2006, 161(6): 345 – 360.
- [28] Zhen-Xiang Lu, André L, Huang H C. Isolation and characterization of chitinases from *Verticillium lecanii* [J]. *Can J Microbiol*, 2005, 51: 1045 – 1055.
- [29] Nakahara K, Yoshida K, Kudo A, et al. Cloning and sequencing of endochitinase genes from *Gliocladium virens* and *Trichoderma* species [J]. *Phytopathology and Plant Protection*, 2001, 33(6): 519 – 527.
- [30] Lu Y, Zen K C, Muthukrishnan S, et al. Site-directed mutagenesis and functional analysis of active site acidic amino acid residues D142, D144 and E146 in *Manduca sexta* (tobacco hornworm) chitinase [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 32(11): 1369 – 1382.
- [31] Watanabe T, Kobori K, Miyashita K, et al. Identification of glutamic acid 204 and aspartic acid 200 in chitinase A1 of *Bacillus circulans* WL212 as essential residues for chitinase activity [J]. *Journal of biological chemistry*, 1993, 268: 18567 – 18572.
- [32] Svitil A, Kirchman D L. A chitin-binding domain in marine bacterial chitinase and other microbial chitinases: implications for the ecology and evolution of 1,4- β -glycanases [J]. *Microbiology*, 1998, 144: 1299 – 1308.
- [33] Ikegami T, Okada T, Hashimoto M, et al. Solution structure of the chitin-binding domain of *Bacillus circulans* WL-12 chitinase A1 [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(18): 13654 – 13661.