

# 刀孢轮枝菌胞外几丁质酶的基因克隆及系统发育分析

甘中伟 杨金奎 陶南 黄静文 张克勤\*

云南大学生物资源保护与利用重点实验室 昆明 650091

**摘要:** 食线虫真菌是植物寄生线虫的重要天敌, 它们所产生的胞外水解酶(蛋白酶、几丁质酶和胶原蛋白酶等)能够降解线虫体壁和卵壳中的蛋白质及几丁质等结构成分并在侵染过程中发挥着重要的作用。本文中, 我们发现刀孢轮枝菌 *Lecanicillium psalliotae* 对南方根结线虫 *Meloidogyne incognita* 卵具有较强的侵染能力。为了进一步研究刀孢轮枝菌胞外几丁质酶的性质, 我们通过简并引物设计和 DNA walking 方法从刀孢轮枝菌的基因组中成功地克隆得到一个内切几丁质酶基因 *Lpchi1*, 该几丁质酶编码基因含有 3 个内含子, 编码 423 个氨基酸。同源性和系统发育分析表明, 不同生防真菌来源的几丁质酶具有较高的同源性并根据分子量的大小形成三个不同的进化分枝。

**关键词:** 食线虫真菌, 南方根结线虫, 几丁质酶, 系统发育分析

## Cloning of the chitinase gene *Lpchi1* and phylogenetic analysis of *Lecanicillium psalliotae*

GAN Zhong-Wei YANG Jin-Kui TAO Nan HUANG Jing-Wen ZHANG Ke-Qin\*

Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-resources, Yunnan University, Kunming 650091, China

**Abstract:** Nematophagous fungi, one of the natural enemies of nematodes, have been employed in biological control. Extracellular enzymes secreted from nematophagous fungi, including protease, chitinase and collagenase serve as virulence factors of infection. In this study, we found *Lecanicillium psalliotae* can penetrate the eggs of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and influence development of the eggs. A chitinase

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 30630003, No. 30660107); 云南省应用基础研究重点项目 (No. 2004C001Z)

\*Corresponding author. E-mail: kqzhang111@yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-07-12, 接受日期: 2007-09-20

gene *Lpchi1* was isolated from *L. psalliotae* using degenerate primers and DNA-walking technique. Comparison of the chitinase amino acid sequences from different pathogenic fungi revealed that the enzymes were highly similar. The phylogenetic analysis demonstrated that the chitinases derived from different fungi were clustered into three main clades corresponding to different molecular weight.

**Key words:** nematophagous fungi, *Meloidogyne incognita*, chitinase, phylogenetic analysis

几丁质 (Chitin) 又称甲壳素或甲壳质, 是由 N-乙酰- $\beta$ -D-氨基葡萄糖以  $\beta$ -1, 4 糖苷键连接而成的高分子生物多聚体, 是许多真菌细胞壁和昆虫表皮的主要组成成分 (Bartnick-Garcia 1968)。几丁质酶 (chitinase, Ec. 3. 2. 14) 是一类能催化降解几丁质  $\beta$ -1, 4 糖苷键的水解酶, 几丁质酶作为丝状真菌和寄主病原物相互作用中的一种重要蛋白质, 已成为生防病原真菌研究中的热点。线虫卵壳的主要组成成分是几丁质, 卵壳作为抵御外界作用的天然屏障在线虫卵的发育过程中起着非常重要的功能 (Wharton 1980)。Mercer 等 (1992) 研究表明, 从菜豆提纯的几丁质酶可提高根结线虫卵的孵化效率, 从而导致过早孵化的二龄幼虫死亡。Tikhonov 等 (2002) 从萨克拉轮枝菌中纯化的丝氨酸蛋白酶 P32 和几丁质酶 CHI43 分别处理马铃薯孢囊线虫 *Globodera pallida* 卵, 可以观察到线虫卵表面被降解的痕迹及轻微剥落的表皮, 而用两种酶共同作用时, 对线虫卵壳降解作用明显加强。

刀孢轮枝菌 *Lecanicillium psalliotae* 是一种重要的食线虫真菌 (Zare *et al.* 2000; Gan *et al.* 2007), 在我们以前的报道中, 从该菌中纯化和克隆得到一个丝氨酸蛋白酶 Ver112, 该蛋白酶在侵染线虫的过程中发挥着重要的作用 (Yang *et al.* 2005a; Yang *et al.* 2005b)。在本论文中, 我们发现刀孢轮枝菌能够侵染南方根结线虫 *Meloidogyne incognita*, 并能分泌另外一种胞外酶几丁质酶, 利用简并引物设计和 DNA walking 技术, 从刀孢轮枝菌中成功地克隆得到一个内切几丁质酶基因 *Lpchi1*, 并将该几丁质酶 LPCHI1 与相关生防真菌来源的几丁质酶氨基酸序列进行同源性比对和系统进化分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株与质粒

刀孢轮枝菌 *Lecanicillium psalliotae* 由本实验室分离得到, 保存于中国微生物菌种保藏中心 (CGMCC 1312)。刀孢轮枝菌 *L. psalliotae* 在 28℃ 的 PDA 平板上培养。 *E. coli* DH5 $\alpha$  在 37℃ 的 LB 培养基中培养。南方根结线虫 *Meloidogyne incognita* 卵的制备方法参考张克勤等 (1993) 的报道。pMD18-T 载体 (TaKaRa, Japan) 用于 PCR 产物的克隆和测序。

### 1.2 刀孢轮枝菌的生长和几丁质酶产酶曲线

挑取新鲜培养的刀孢轮枝菌菌丝块接种到 PL-4 产酶培养基 (Yang *et al.* 2005a) 中 (加入 0.5% 胶体几丁质进行诱导), 200r/min, 26℃ 摇床培养 9d, 从第 3d 开始检测胞外几丁质酶的活性, 一直到菌丝开始自溶。胶体几丁质制备方法参考 Roberts 和 Selitrennikoff (1988) 的报道。几丁质酶活力测定方法参考 Miller (1959) 的报道。

1.3 刀孢轮枝菌对根结线虫卵的寄生性测定

选择透光性能较好的培养皿（直径 8cm），加入灭菌的水琼脂培养基（1%）制成薄层平板，在无菌条件下滴加 10μL刀孢轮枝菌孢子（ $8.3\times10^6$ 个/mL）悬浮液于水琼脂平板上，均匀分散。菌丝萌发形成小菌落后，在菌落边缘挖去一小孔（直径 1cm），滴加 10μL根结线虫卵（50 粒）悬浮液，培养皿封口在 26℃进行培养 2-5d。用显微镜直接观察培养皿内根结线虫卵被寄生状况。

1.4 刀孢轮枝菌 CGMCC1312 基因组 DNA 的分离

挑取新鲜培养的刀孢轮枝菌菌丝块接种到 PL-4 培养基中，200r/min，26℃摇床培养 4-5d，用灭菌滤纸和漏斗收集新鲜菌丝用于基因组 DNA 的分离。基因组 DNA 的提取方法采用改良 CTAB 法（Zhang *et al.* 1996）。

1.5 刀孢轮枝菌（CGMCC1312）几丁质酶全基因的扩增

根据相关的文献报道（Bogo *et al.* 1998），使用简并引物（表 1，引物 1）扩增得到刀孢轮枝菌几丁质酶编码基因的保守序列。根据扩增测序的几丁质酶保守序列，分别在序列的 3'和 5'端设计了两对巢式PCR引物（表 1，引物 2、3），利用DNA Walking Speedup™ Premix Kit（Seegene, Korea）分别扩增得到几丁质酶基因的 5'端和 3'端编码序列。PCR产物回收后与pMD18-T（TaKaRa）载体连接并转化感受态*E. coli* DH5α，筛选出阳性克隆，用ABI PRISM 3730 自动测序仪（Perkin-Elmer, America）进行序列测定。利用DNAMAN生物学软件进行拼接就可以得到刀孢轮枝菌几丁质酶的全长编码基因序列，用GenBank BLAST 程序（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>）比较该序列与其它几丁质酶基因序列的同源性。大肠杆菌感受态细胞制备、阳性克隆的筛选及酶切鉴定参照《分子克隆实验指南》（萨姆布鲁克等 1992）。

表 1 本实验所使用的引物  
Table 1 List of oligonucleotides used in this experiments

|   | 引物<br>Primer | 序列<br>Sequence (5'-3')                        |
|---|--------------|-----------------------------------------------|
| 1 | Forward      | GC(TC) GT(TC) TA(TC) TT(TC) AC(TC) AA(TC) TGG |
|   | Reverse      | GG(AG) TA(TC) TCC CA(AG) AT(AG) TC(CGAT) AT   |
| 2 | Forward TSP1 | AAG TTG CGT CCG TAG ATA CC                    |
|   | Forward TSP3 | TTA GAT CCA ATG ATA CAC CAT GAG               |
| 3 | Reverse TSP1 | CTG TCG GCT TCC TAA AGG                       |
|   | Reverse TSP3 | AAG GAC TGG GGC TTT GAC G                     |

1.6 几丁质酶同源性和系统发育分析

收集 GenBank 上已经报道的不同真菌来源的几丁质酶序列，利用 DNAMAN 生物学软

件 (Version 5.2.2) 对几丁质酶氨基酸序列进行同源性分析。利用 PAUP version 4.0b10 (Swofford 2002) 软件进行几丁质酶的系统发育分析。

2 结果

2.1 刀孢轮枝菌胞外几丁质酶的产酶曲线及对根结线虫卵的寄生

刀孢轮枝菌在 PDA 平板上生长速度较快, 一般 6-7d 左右菌落直径为 6-8cm, 菌丝致密, 菌落呈白色, 并产生较多的镰刀状分生孢子。刀孢轮枝菌在 PL-4 培养液中也生长良好, 接种后的第 2-3d, 胞外几丁质酶活性开始增加, 并在第 6d 达到最高, 随后呈缓慢下降趋势 (图 1)。刀孢轮枝菌对根结线虫卵有明显的寄生现象, 在处理的 6 个平板上均能观察到根结线虫卵被寄生现象 (图 2)。接种 2d 后, 就可以观察到线虫卵被刀孢轮枝菌侵染, 5d 后线虫卵逐渐被降解并严重变形, 并且所有被侵染的线虫卵都停止发育。

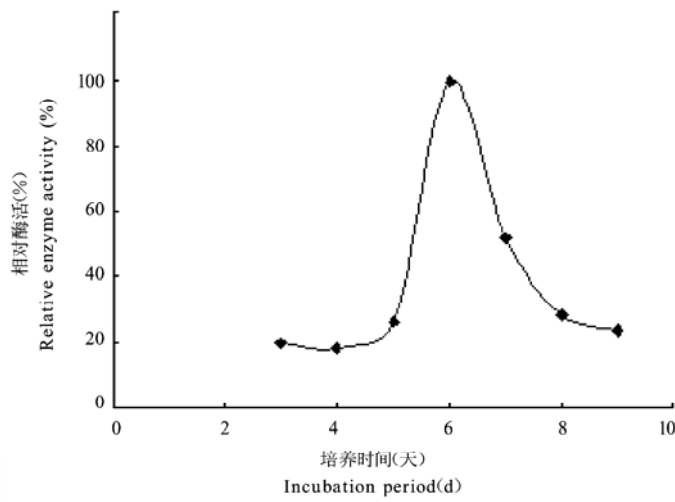


图 1 刀孢轮枝菌 CGMCC1312 的胞外几丁质酶时间-产酶曲线

Fig. 1 Time-extracellular chitinase producing curve of *Lecanicillium psalliotae* strain CGMCC1312.

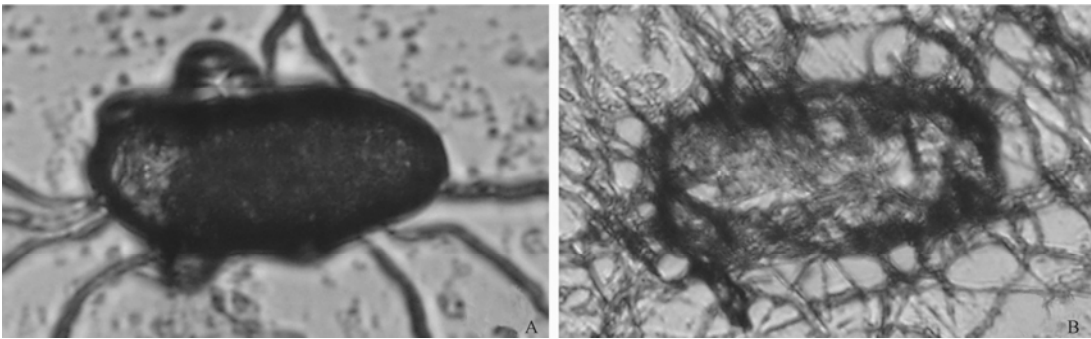


图 2 刀孢轮枝菌对根结线虫卵的寄生和侵染 A: 被寄生的根结线虫卵; B: 被降解的根结线虫卵。

Fig. 2 The eggs of root-knot nematode *Meloidogyne incognita* was infected by *Verticillium psalliotae*. A: Infected nematode egg; B: Degraded nematode egg.

## 2.2 刀孢轮枝菌几丁质酶基因 *Lpch1* 的 PCR 扩增

利用简并引物, 通过 PCR 扩增得到一段大约 550bp 的单一一条带, 与预期结果一致。将目的 PCR 产物回收、连接、转化, 并对经酶切鉴定的重组质粒进行克隆测序。

根据扩增得到的 548bp 刀孢轮枝菌几丁质酶基因保守序列, 分别设计了两对巢式 PCR 引物, 用 DNA Walking Speedup<sup>TM</sup> Premix Kit (Seegene, Korea) 分别扩增得到几丁质酶编码基因的 5'端和 3'端序列。利用 DNAMAN 生物学软件将 PCR 测序结果进行序列拼接得到几丁质酶基因的全长序列。用 GenBank BLAST 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 分析表明该序列与其它已知真菌几丁质酶基因序列有较高的同源性, 证实该序列的确是几丁质酶基因。该基因序列已经被递交 GenBank, 序列的索引号为 EF203917。

## 2.3 不同真菌来源几丁质酶的氨基酸序列的同源性分析

刀孢轮枝菌的几丁质酶基因含有 3 个内含子, 编码 423 个氨基酸, 和其它真菌来源的几丁质酶一样, 刀孢轮枝菌的几丁质酶也含有一段较短的信号肽和前肽序列 (图 3), 几丁质酶的成熟肽含有 389 个氨基酸, 预测的分子量和等电点分别为 42.4kDa 和 5.56 (<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>)。利用 DNAMAN 软件, 我们将 GenBank 上报道的真菌来源的几丁质酶氨基酸序列和刀孢轮枝菌的几丁质酶的氨基酸序列进行了比对, 发现这些不同真菌来源的几丁质酶具有较高的同源性 (图 3)。刀孢轮枝菌的几丁质酶 LPCHI1 与 *Aphanocladium album* (P32470) 几丁质酶的同源性高达 88.18%, 与 *Hypocrea lixii* (CAA55928) 几丁质酶的同源性高达 74.76%, 与 *Trichoderma atroviride* (AAF19614) 几丁质酶的同源性高达 73.35%, 与 *Metarhizium anisopliae* (AAB81999) 几丁质酶的同源性高达 68.40%。这些几丁质酶都属于糖基水解酶 18 家族, 并包含许多保守序列, 其中 2 个高度保守序列 SIGGW 和 GFDGIDVDWE 是糖基水解酶 18 家族水解活性中心位点。

## 2.4 不同真菌来源几丁质酶的系统发育分析

为进一步研究来自不同真菌几丁质酶之间的系统进化关系, 我们从 GenBank 中广泛选取不同来源的几丁质酶氨基酸序列, 大约选取 50 多条, 用 Clustal W 软件 (Thompson *et al.* 1994) 进行序列比较。为简化序列、排除重复序列, 最终我们选取 24 条代表不同来源的几丁质酶氨基酸序列, 利用软件 PAUP (Version 4.0 beta 10) Maximum parsimony 算法运算 1000 次得到一棵同源进化树 (图 4)。多年生植物大刍草 *Zea diploperennis* (AAT40053) (Tiffin 2004) 几丁质酶作为糖基水解酶 19 家族代表, 被定义为外群, 其余几丁质酶都属于糖基水解酶 18 家族。从几丁质酶的系统进化分析可以看出这些来源于不同真菌的几丁质酶根据分子量的大小形成三个明显的进化分枝, 其中第三个分枝由分子量大约 58kDa 的几丁质酶组成, 第二个分枝由分子量大约 42kDa 的几丁质酶组成, 第一个分枝由分子量大约 35kDa 的几丁质酶组成。第二个分枝上的几丁质酶分别来源于捕食线虫真菌、昆虫病原真菌和重寄生真菌, 这些几丁质酶又形成 3 个亚枝, 第一个亚枝包括捕食线虫真菌和大多昆虫病原真菌 (*Aphanocladium album*, *Lecanicillium psalliotae*, *Verticillium fungicola*, *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Lecanicillium lecanii*, *Paecilomyces*

farinosus), 第二个亚枝由昆虫病原真菌构成 (*Nomuraea rileyi*, *Metarhizium anisopliae*, *Metarhizium flavoviride*), 第三个亚枝由重寄生真菌构成 (*Trichoderma hamatum*, *Trichoderma viride*, *Hypocrea lixii*, *Trichoderma atroviride*)。刀抱轮枝菌的几丁质酶LPCHII 位于第二个分枝上,它与*Verticillium fungicola*(AAP45631)和*Aphanocladium album*(P32470)的几丁质酶亲缘关系最近(图 4)。而蜡蚧轮枝菌(*L. lecanii*, AAX56960)的几丁质酶形成了一个独立的分枝,我们预测它的分子量为 40.9kDa (<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>)。

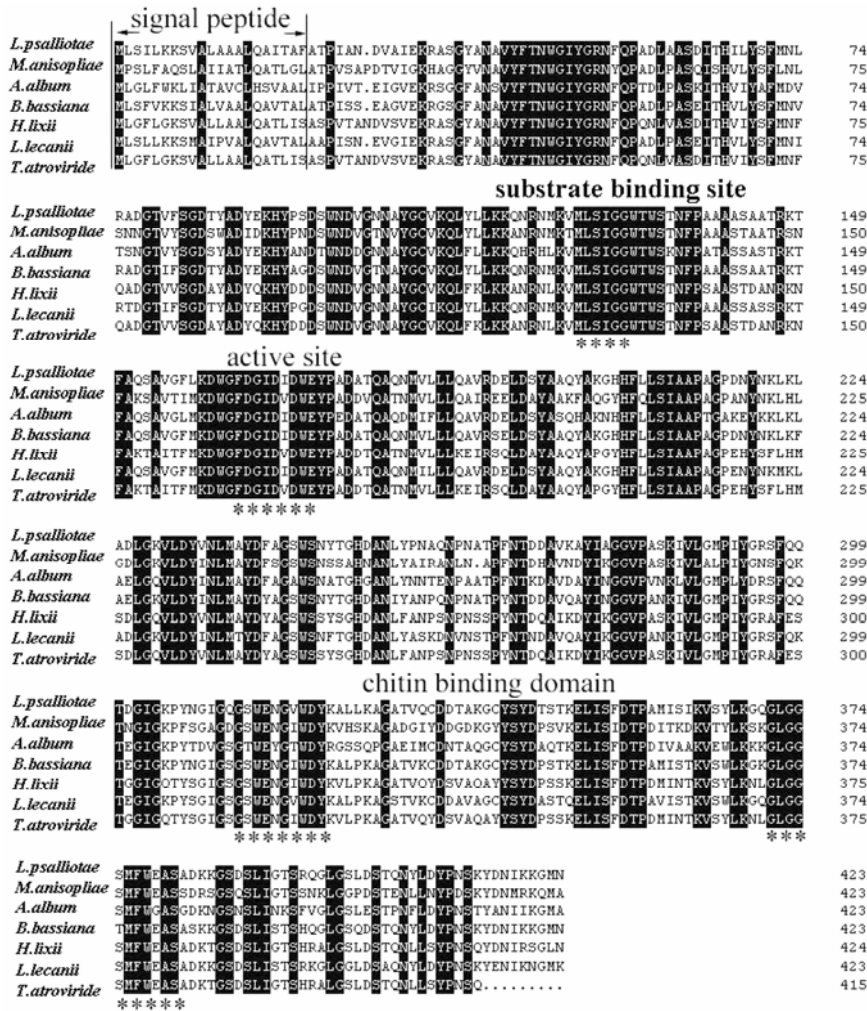


图 3 不同真菌来源几丁质酶氨基酸序列比对结果 黑色部分代表高度同源(100%)的区域,中间空白部分代表这些几丁质酶之间的可变区域.\*\*\*表示糖基水解酶 18 家族保守的水解区域(SXXG, DXDXDXE)和几丁质酶结合区域(GSWEAGIWDYK, GLGGSMSFWEAS)。

Fig. 3 Alignment of the amino acid sequences of chitinases from different fungi. The GenBank accession numbers of chitinases were described in Fig. 4. Areas shaded in black are high degree homology (100%) and unshaded areas are regions of variability between the chitinases. \*\*\* indicated the conserved catalytic domains (SXXG and DXDXDXE) of glycosyl hydrolase family



同来源的几丁质酶根据其分子量的差异,进化形成三个明显的进化分枝。有趣的是和真菌致病性相关的几丁质酶(42kDa)形成一个大的进化分枝,并且昆虫和线虫病原真菌几丁质酶的亲缘关系更为接近,说明它们所产生的几丁质酶在侵染宿主的过程中发挥着类似的功能。此外,相同的真菌可产生几种不同分子量的几丁质酶,如:*Clonostachys rosea* (ABD48217, ABD48218), *Hypocrea lixii* (CAA55928, AAM93195), *Beauveria bassiana* (AAN41259, AAX19143), *Lecanicillium lecanii* (AAX56960, AAV98691), 这些不同的几丁质酶由不同的基因编码产生,相互之间差异较大,同源性较低。最近的研究表明,木霉属 *Trichoderma* spp.中已经报道能产生分子量不同的多种几丁质酶,然而只有编码 42kDa 的 *ech42* 基因 (Lorito *et al.* 1998) 和编码 33kDa 的 *chit33* 基因 (Limon *et al.* 1999) 在侵染的过程中发挥作用。

总之,真菌几丁质酶的多样性非常丰富,其调控机理也很复杂。不同真菌产生的几丁质酶分子量差异较大,几丁质酶常常以同功酶的形式分泌。通常同一菌株能产生好几种几丁质酶,相互之间差异较大,这些几丁质酶在真菌的生长发育过程中发挥不同的功能 (St Leger *et al.* 1993)。随着分子生物学的蓬勃发展,人们对丝状真菌侵染昆虫病害的分子机制有了进一步的认识,相关基因不断得到克隆和研究,极大地加快了生物防治过程中侵染性几丁质酶的研究,并为真菌几丁质酶在几丁质资源的开发和植物病害防治中的应用开辟了广阔的应用前景。

## [REFERENCE]

- Bartnick-Garcia S, 1968. Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. *Annual Review of Microbiology*, **22**: 87-108
- Bogo MR, Rota CA, Pinto HJ, Ocampos M, Correa CT, Vainstein MH, Schrank A, 1998. A chitinase encoding gene (*chit1* Gene) from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*: isolation and characterization of genomic and full-length cDNA. *Current Microbiology*, **37**: 221-225
- Feng JL, Zhu XF, 2004. Molecular biology of microbial chitinase. *Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Sciences)*, **130**(1): 102-108 (in Chinese)
- Gan ZW, Yang JK, Tao N, Liang LM, Mi QL, Li J, Zhang KQ, 2007. Cloning of the gene *Lecanicillium psalliotae* chitinase *Lpch1* and identification of its potential role in the biocontrol of root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **76**: 1309-1317
- Joseph S, David WR, 2002. Molecular cloning: A laboratory manual. 3<sup>rd</sup> edition. Translated by Huang PT. Science Press, Beijing. 14-23 (in Chinese)
- Limon MC, Pintor-Toro JA, Benitez T, 1999. Increased anti-fungal activity of *Trichoderma harzianum* transformants that overexpress a 33-kDa chitinase. *Phytopathology*, **89**: 254-261
- Lorito MS, Woo L, Garcia I, Colucci G, Harman GE, Pintor-Toro JA, Filippone E, Muccifora S, Lawrence CB, Zoina A, Tuzun S, Scala F, 1998. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungi pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **95**: 7860-7865

- Lu ZX, Laroche A, Huang HC, 2005. Isolation and characterization of chitinases from *Verticillium lecanii*. *Canadian Journal of Microbiology*, **51**: 1045-1055
- Mercer CF, Greenwood DR, Grant JL, 1992. Effect of plant and microbial chitinases on the eggs and juveniles of *Meloidogyne hapla* Chitwood (Nematoda: Tylenchida). *Nematologica*, **38**: 227-236
- Miller GL, 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, **31**: 426-428
- Phillips DC, 1967. The hen-egg-white lysozyme molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **57**: 484-495
- Roberts WK, Selitrennikoff CP, 1988. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. *Journal of General Microbiology*, **134**: 169-176
- St. Leger RJ, Staples RC, Raberts DW, 1993. Entomopathogenic isolates of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Aspergillus flavus* produce multiple extracellular chitinase isozymes. *Journal of Invertebrate Pathology*, **61**(1): 81-84
- Swofford DL, 2002. PAUP\*: Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods). Version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland Massachusetts
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, 1994. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, **22**: 4673-4680
- Tiffin P, 2004. Comparative evolutionary histories of chitinase genes in the genus *Zea* and family poaceae. *Genetics*, **167**: 1331-1340
- Tikhonov VE, Lopez-Llorca LV, Salinas J, Jansson HB, 2002. Purification and characterization of chitinases from the nematophagous fungi *Verticillium chlamydosporium* and *V. suchlasporium*. *Fungal Genetics and Biology*, **35**: 67-78
- Wharton DA, 1980. Nematode egg-shells. *Parasitology*, **81**: 447-463
- Yang JK, Huang XW, Tian BY, Wang M, Niu QH, Zhang KQ, 2005a. Isolation and characterization of a serine protease from the nematophagous fungus, *Lecanicillium psalliotae*, displaying nematocidal activity. *Biotechnology Letters*, **27**: 1123-1128
- Yang JK, Huang XW, Tian BY, Sun H, Duan JX, Wu WP, Zhang KQ, 2005b. Characterization of an extracellular serine protease gene from the nematophagous fungus *Lecanicillium psalliotae*. *Biotechnology Letters*, **27**: 1329-1334
- Zare R, Gams W, Culham A, 2000. A revision of *Verticillium* section prostrate. I. Phylogenetic studies using ITS sequences. *Nova Hedwigia*, **71**: 465-480
- Zhang D, Yang Y, Castlebury LA, Cerniglia CE, 1996. A method for the large scale isolation of high transformation efficiency fungal genomic DNA. *FEMS Microbiology Letters*, **145**: 216-265
- Zhang KQ, Gowen S, Barbara T, 1993. Root knot nematode-destroying fungi and the screening of effective strains. *Acta Mycologica Sinica*, **12**(3): 240-245 (in Chinese)

#### [附中文参考文献]

- 冯俊丽, 朱旭芬, 2004. 微生物几丁质酶的分子生物学研究. 浙江大学学报 (农业与生命科学版), **30**(1): 102-108
- 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW, 2002. 分子克隆实验指南 (第3版). 黄培堂译. 北京: 科学出版社. 14-23

张克勤, S. 高恩, T. 巴巴拉, 1993. 根结线虫天敌真菌及其高效菌株筛选. 真菌学报, 12(3): 240-245

JOURNALS.IM.AC.CN