

茶卷叶蛾寄生真菌球孢白僵菌几丁质酶基因的克隆与序列分析

王定锋, 曾明森, 王庆森, 刘丰静, 吴光远

(福建省农业科学院茶叶研究所, 福建 福安 355015)

摘要: 球孢白僵菌是最重要的虫生真菌之一, 在农林害虫生防中发挥着重要的作用。本研究从茶卷叶蛾球孢白僵菌 JYBb201-11 菌株中克隆了几丁质酶 *Bbchit1* 基因(GenBank 登录号: HQ435871)。根据 GenBank 上昆虫病原真菌几丁质酶基因序列同源性设计引物, 分别进行 DNA-PCR 和总 RNA-RT-PCR 反应, 对得到的目的片段, 回收纯化后通过 PMD18-T 载体转化到大肠杆菌 DH5 α 中, 获得几丁质酶基因序列的重组质粒 PMD18-*chit*, 并测序。结果表明, DNA-PCR 和总 RNA-RT-PCR 获得的基因序列完全一样, 都是一个完整 ORF 序列, 含 1 047 bp 核酸序列, 编码 348 个氨基酸, 信号肽长度为 22 个氨基酸, 成熟蛋白理论分子量约为 36.78 kD, 理论等电点为 5.95。该蛋白序列中包含 2 个保守区域, 即底物结合区域(SIGG)和几丁质的活性位点(DGIDIDIE), 该蛋白可归为几丁质酶 18 族 V 类。氨基酸序列同源性分析表明, 球孢白僵菌 JYBb201-11 菌株几丁质酶与球孢白僵菌 Bb0062 菌株(AAN41259)和 NCIM1216 菌株(ACF32998)几丁质酶 *chit1* 氨基酸序列同源性都达 99.43%; 与球孢白僵菌 MTCC 2028 菌株(ACZ28129)几丁质酶 *chit1* 氨基酸序列同源性达 98.28%。

关键词: 球孢白僵菌; 茶卷叶蛾; 几丁质酶基因; 克隆; 序列分析

中图分类号: S 435

文献标识码: A

Cloning and Sequence Analysis on A Chitinase Gene of *Beauveria bassiana* Isolated from *Homona coffearia*

WANG Ding-feng, ZENG Ming-sen, WANG Qing-sen, LIU Feng-jing, WU Guang-yuan

(Tea Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fu'an, Fujian 355015, China)

Abstract: *Beauveria bassiana* is one of the most important entomopathogenic fungi. It plays a crucial role in biocontrol of the farming and forestry pests. The chitinase gene, *Bbchit1*, was cloned from JYBb201-11 isolate of *Beauveria bassiana*, which is highly virulent to *Homona coffearia*. The expected DNA fragments were amplified by DNA-PCR, and the total RNA-RT-PCR with a pair of primers. The fragments were introduced into DH5 α isolate of *Escherichia coli* by PMD18-T vector, and sequenced subsequently. The results from DNA-PCR and the total RNA-RT-PCR showed that the fragments were both 1047 bp. The gene consisted of an open reading frame with 1047 bp (GenBank accession NO. HQ435871), encoding 348 amino acids, which contains an N-terminal 22 amino acid residue displaying the characteristics of a signal peptide. The mature chitinase had a molecular mass of 36.78 kD and a calculated pI of 5.95. The protein sequence contained two conserved regions including a putative substrate binding site (SIGG) and catalytic domain (DGIDIDIE) of fungal chitinases. The chitinase belonged to the class V of family 18 of glycosyl hydrolases. The analysis showed that the deduced amino acid sequence was 99.43% homologous to that of *B. bassiana* strain Bb0062 (AAN41259) and *B. bassiana* strain NCIM1216 (ACF32998), and 98.28% to that of *B. bassiana* strain MTCC 2028 (ACZ28129).

Key words: *Beauveria bassiana*; *Homona coffearia*; chitinase gene; cloning; sequence analysis

球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 是一种常见的昆虫病原真菌, 能侵染 15 个目 149 个科的 700 多种昆虫, 已被广泛应用于农林害虫的生物防治^[1], 并在全球很多国家商业化生产。截至 2007 年, 全

世界已注册成功的 171 个真菌杀虫剂产品中, 以球孢白僵菌为有效成分的制剂占 33.9%^[2]。但球孢白僵菌也存在击倒害虫时间长、受环境影响较大和防效不稳定等弊端。为克服这些弊端, 有必要加强

收稿日期: 2011-04-13 初稿; 2011-05-18 修改稿

作者简介: 王定锋 (1981-), 男, 硕士, 助研, 主要从事害虫生物防治和杀虫微生物分子生物学方面的研究 (E-mail: wangdf2005@yahoo.com.cn)

通讯作者: 吴光远 (1962-), 男, 研究员, 主要从事茶树植保和害虫生防研究 (E-mail: gywupt@163.com)

基金项目: 国家茶叶产业技术体系项目 (CARS-23); 福建省农业科学院青年人才基金项目 (2009QB-14)

对球孢白僵菌等昆虫病原真菌侵染的分子机理及相关毒力基因的研究,以便为利用基因工程技术改良菌株奠定基础。

昆虫病原真菌侵染寄主昆虫的主要过程主要包括体表附着、体壁穿透和体内定殖 3 个阶段。整个过程涉及寄主识别、机械破坏、营养竞争、代谢干扰、毒素分泌及寄主组织结构破坏等,这些多因子作用最终导致寄主死亡^[3]。在昆虫病原真菌菌丝穿透昆虫体壁时,会分泌蛋白酶、几丁质酶、脂酶等多种胞外水解酶类^[4-5]。几丁质酶可催化水解几丁质的 β -1,4 糖苷键生成 N-乙酰-D-氨基葡萄糖(NAG),是降解几丁质的关键酶类。几丁质酶的分泌与昆虫病原真菌侵染寄主的毒力是否存在相关性,还有较大的争议^[6-8]。由于同种昆虫病原真菌可能产生多种几丁质酶,且同种昆虫病原真菌的不同菌株产生的同一种几丁质酶也可能存在差异,这种差异是否会影响不同菌株之间的侵染毒力还有待进一步研究。因此,对不同几丁质酶基因进行克隆分析,对了解几丁质酶的特性和昆虫病原真菌致病的分子机理等具有重要的意义。本研究对寄生茶卷叶蛾的球孢白僵菌菌株 JYBb201-11 的几丁质酶基因进行了克隆及序列分析,以期了解该菌株几丁质酶的特性,为后续研究几丁质酶基因与菌株侵染毒力关系及利用基因工程技术改良菌株等提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

菌株 JYBb201-11 由茶卷叶蛾球孢白僵菌菌株 JYBb201^[9] 单孢分离所得,保存于本实验室。大肠杆菌 DH5 α 为本实验室保存。

1.2 培养基

球孢白僵菌培养基为 PDA;大肠杆菌培养基为 LB。

1.3 酶与试剂

Ex Taq 酶、PMD18-T 载体、Trizol 试剂、胶回收试剂盒以及反转录试剂盒均购自宝生物工程(大连)有限公司,DNA marker 为 MBI 产品。其他化学试剂都为国产或进口的分析纯。

1.4 总 DNA 和总 RNA 的提取

将菌接入 PDA 培养基平板培养 2 周,从培养皿中刮取菌丝体用于基因组 DNA 的提取,具体方法参照文献 [10]。按照 Trizol 试剂盒说明书步骤提取总 RNA, RNA 电泳检测采用 1% 琼脂糖凝胶电泳。

1.5 cDNA 第一链的合成

取总 RNA (约 1 μ g),加入 4 μ L 1 μ g \cdot μ L⁻¹ oligo (dT)₁₈,加 11 μ L DEPC 处理的双蒸水,65℃水浴 10 min,冰上放置 5 min;稍微离心后,加入 8 μ L 2.5 mmol \cdot L⁻¹ dNTP,5 μ L 10 \times 反转录缓冲液和 1 μ L 反转录酶。42℃保温 1 h,95℃水浴 5 min,存放于-20℃。

1.6 引物设计及 PCR 反应

根据 GenBank 上已登录的昆虫病原真菌几丁质酶基因序列,设计 PCR 引物

正向引物 Bbchit1 F:

5'-ATGGCTCCTTTTCTTCAAACCAGCCT-3',

反向引物 Bbchit 1 R:

5'-TTACGCAGTCCCCAAAGTCCCCT-3')。

引物由上海生工生物工程公司合成。

以菌株 JYBb201-11 的基因组 DNA 和 RNA 反转录产物为模板,进行 PCR 扩增。扩增结束后,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,得到预定扩增片段,回收纯化。PCR 反应体系:10 \times *Ex Taq* Buffer (Mg²⁺ Plus) 5 μ L, d ntp Mix (各 2.5 mmol \cdot L⁻¹) 4 μ L, 模板 DNA 1.5 μ L, 引物 (10 mmol) 各 1.5 μ L, TaKaRa *Ex Taq* (5 U \cdot μ L⁻¹) 0.5 μ L, ddH₂O 36 μ L, 总共 50 μ L。PCR 反应参数设置:94℃预变性 3 min;94℃变性 30 s;54℃退火 30 s;70℃延伸 1 min;30 个循环;72℃延伸 5 min。

1.7 DNA 回收及克隆、测序

在紫外灯下切下含目的片段的凝胶块,利用 DNA 纯化回收试剂盒进行目的片段的回收纯化,将纯化的目的片段直接与 PMD-18T 载体连接,然后将重组质粒转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,通过蓝白斑筛选和 PCR 鉴定出阳性重组子,送上海生工生物工程公司测序。大肠杆菌感受态细胞制备及克隆转化具体方法参照《分子克隆实验指南》^[11]。

1.8 序列及进化分析

采用 Blast 软件在 GenBank 中对基因序列及其推测的氨基酸序列进行同源搜索,得到的氨基酸序列在 EBI 提供的在线 clustalw 服务 (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) 进行多序列比对,并用 DNAMAN 做进化树分析。利用 SignalP 3.0 Server 进行信号肽预测。

2 结果与分析

2.1 球孢白僵菌 JYBb201-11 菌株几丁质酶基因的克隆

利用基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增和总

RNA 为模板进行 RT-PCR 扩增, 获得 2 条大小相当的片段, 并与预期目的片段的大小基本一致, 约为 1 000 bp (图 1)。测序结果表明, 2 条序列完全一致, 都为 1 047 bp, 是一个包括起始密码子 (ATG) 和终止密码子 (TAA) 的完整 ORF 序列, 编码 348 个氨基酸 (图 2)。该基因序列已经在 GenBank 中注册, 登录号 HQ435871。该序列与 GenBank 中已登录的其他球孢白僵菌菌株 (AY145440、EU828354、GU166156) 的 *chit1* 基因序列同源性极高, 分别为 99.52%、99.52%、97.61%。但与球孢白僵菌几丁质酶 *chit2* (AY147011) 和 bacterial-type endochitinase (AY758397) 基因序列同源性很低, 分别为 34.60% 和 34.42%。

2.2 *Bbchit1* 基因编码氨基酸及特征分析

球孢白僵菌 *Bbchit1* 基因成熟蛋白理论分子量 36.78 kD, 理论等电点为 5.95, 共有 348 个氨基酸, 其中强碱氨基酸 23 个 (K, R), 强酸氨基酸 26 个 (D, E), 疏水氨基酸 123 个 (A, I, L, F, W, V), 极性氨基酸 98 个 (N, C, Q, S, T, Y), 分别占总氨基酸数

量的 8.14%、8.27%、35.94%、29.36%。*Bbchit1* 基因编码氨基酸序列中包含底物结合区域 (SIGG) 和几丁质的活性位点 (DGIDIDIE), 属于几丁质酶 18 族 V 类。N 端的 22 个氨基酸被 SignalP 3.0 Server 预测为信号肽 (图 2), 这段信号肽含疏水氨基酸 13 个 (A, I, L, F, W, V)、极性氨基酸 7 个 (N, C, Q, S, T, Y)。

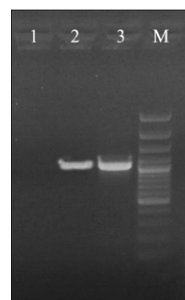


图 1 几丁质酶基因 PCR 扩增

Fig 1 PCR amplification of *Bbchit1*

注: 1 泳道为清水对照; 2 泳道为 DNA 模板的扩增产物; 3 泳道为 cDNA 模板的扩增产物; M 泳道为 100 bp DNA marker

```

1  atgtctcctttttcttcaaacacgctcgcctcctttcattgttggcttccaccatggtc
1  M A P F L Q T S L A L L S L L A S T M V
61  agcgcctcgccttggcgccgcgagccgacacctgcgcaaccaaggcgccggcgccgc
21  S A S P L A P R A D T C A T K G R P A G
121 aaagtgtctcagggtacttgggagaactgggacgggtgccagaacgggtgcacctccg
41  K V L Q G Y W E N W D G A K N G V H P P
181 tttggctggacgccatccaaaccccgacattcgcaagcagcgctacaacgtcatcaat
61  F G W T P I Q N P D I R K H G Y N V I N
241 gctgcctttcccatcatccagcctgacggcaccgcgctctgggaggacggcatggacacg
81  A A F P I I Q P D G T A L W E D G M D T
301 ggcgtcaaggtggcgagcccgccgacatgtgcgagccaaggcagcaggtgccaccatc
101 G V K V A S P A D M C E A K A A G A T I
361 ttgatgtcattggcggtgctactgcggccattgacctgagctcgtcggtgtggtgac
121 L M S I G G A T A A I D L S S S A V A D
421 aagtttgtctcgaccattgtgctgattctgaaaaagtacaactttgacggcattgatatc
141 K F V S T I V P I L K K Y N F D G I D I
481 gacattgaatccggcctcacaggcagcggaacataaacaccctgtccacctgcagacc
161 D I E S G L T G S G N I N T L S T S Q T
541 aacctgattagaatcattgacggcgcttctcgcgcagatgcccgcaactttggctgacc
181 N L I R I I D G V L A Q M P A N F G L T
601 atggcgccagagactgctacgttaccggtgggactattacgtacggatcaatctgggc
201 M A P E T A Y V T G G T I T Y G S I W G
661 tcttacctcccatattcaaaaagtacctggacaatggctcgtctctgtgtgctcaacatg
221 S Y L P I I K K Y L D N G R L W W L N M
721 cagtactacaatggcgaaatgtacggctgctcggcgactcgcaaggccggtactgtc
241 Q Y Y N G E M Y G C S G D S H K A G T V
781 gaaggattcattgtcagaccgactgcctgaacaaggacttagtattcaggcggtgaca
261 E G F I A Q T D C L N K G L S I Q G V T
841 atcacgattccctatgacaagcaagtgcctggccttctgcccagcctgggctggcgcc
281 I T I P Y D K Q V P G L P A Q P G A G G
901 ggtcacatgtccccgtccaacgtggcgcaagtctcttccactacaaggcgctttgaag
301 G H M S P S N V A Q V L S H Y K G A L K
961 ggattgatgacttggtctctgaactgggacggctccaagaattggacatttggcgacaat
321 G L M T W S L N W D G S K N W T F G D N
1021 gtcaaggggactttggggactgcgtaa
341 V K G T L G T A -

```

图 2 球孢白僵菌 JYBb201-11 菌株几丁质酶核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig 2 DNA and deduced amino acid sequences of *Bbchit1*

注: 左侧数字为核苷酸和氨基酸位置, 斜体部分为起始密码子 (ATG) 和终止密码子 (TAA), 阴影部分为信号肽序列, 方框部分为潜在的几丁质结合位点, 下划线部分为推断的几丁质的活性位点

EFY96204	-----MAPLLNTGLVILPLIVSTLL--GMPAFAQNETCATKGKPKAGKVLQGYWEN	49
EFY91615	-----MAPLFNTGFVLLPIIVSTLL--GPIPAFAQNGTCATKGKPKAGKVLQGYWEN	49
AAN41259	-----MAPFLQTSLLALLPLLASTMV--SASPLAPRAGTCATKGRPAGKVLQGYWEN	49
ACF32998	-----MAPFLQTSLLALLPLLASTMV--SASPLAPRAGTCATKGRPAGKVLQGYWEN	49
ADP44708	-----MAPFLQTSLLALLSLLASTMV--SASPLAPRADTCATKGRPAGKVLQGYWEN	49
ACZ28129	-----MAPFLQTSLLALLCVASTMV--SASPLAPRADTCATKGRPAGKVLQGYWEN	49
NP_626743	MIRRTIRLLAAALAAATVLVPLGVATASAAPEGAAPTGAADTCAVKSXPAGKVLQGYWEN	60
AAN41261	-----MLGLFGKLIAAAACLHSA--LIPPIVTEIGVEKRSGGFANSVYFTNWGI	49
AAX19143	-----MLGLFWKLIATAVCLHSA--LIPPIVTEIGVEKRSGGFANSVYFTNWGI	49
EFY96204	WDGAKNGVHPFFG---WTPIQDAQIRQHGYNVISAAPFVILPN-GTALWEDGMDNVKVA	105
EFY91615	WDGAKNGVHPFFG---WTPIQDAQIRQHGYNVISAAPFVILPD-GTALWEDGMDNVKVA	105
AAN41259	WDGAKNGVHPFFG---WTPIQNPDIRKHGYNVINAAPFIIQPD-GTALWEDGMDTGKVA	105
ACF32998	WDGAKNGVHPFFG---WTPIQNPDIRKHGYNVINAAPFIIQPD-GTALWEDGMDTGKVA	105
ADP44708	WDGAKNGVHPFFG---WTPIQNPDIRKHGYNVINAAPFIIQPD-GTALWEDGMDTGKVA	105
ACZ28129	WDGAKNGVHPFFG---WTPIQNPDIRKHGYNVINAAPFIIQPD-GTALWEDGMDTGKVA	105
NP_626743	WDGAANGVHPFFG---WTPITDPQIGAHGYNVINAAPFVILSD-GTALWEDGMDRGYKVA	116
AAN41261	YGRNFQPTDLPASKITHVIYAFMNVTSNGTVYSGDSYADYEKHYANDTWKDDGNNAYGCV	109
AAX19143	YGRNFQPTDLPASKITHVIYAFMNVTSNGTVYSGDSYADYEKHYANDTWKDDGNNAYGCV	109
EFY96204	TPAEMCQAKAAGATILMSIGGATAAIDLSSSS---VADKFVSTIVPILKRYNFDGVDID	161
EFY91615	TPAEMCQAKAAGATILMSIGGATAAIDLSSST---VADKFISTIVPILKRYNFDGVDID	161
AAN41259	SPADMCEAKAAGATILMSIGGATAAIDLSSSA---VADKFVSTIVPILKRYNFDGVDID	161
ACF32998	SPADMCEAKAAGATILMSIGGATAAIDLSSSA---VADKFVSTIVPILKRYNFDGVDID	161
ADP44708	SPADMCEAKAAGATILMSIGGATAAIDLSSSA---VADKFVSTIVPILKRYNFDGVDID	161
ACZ28129	SPADMCEAKAAGATILMSIGGATAAIDLSSSA---VADKFVSTIVPILKRYNFDGVDID	161
NP_626743	TPAEMCAAKASGQTLILLSIGGATAGIDLNSTA---VADRFVDITVPIKRYNFDGVDID	172
AAN41261	KQLFLLKKQHRHLKVMLSIGGWTWSKNFPATASSASTRKTFAQSAVGLMKDWGFDGVDID	169
AAX19143	KQLFLLKKQHRHLKVMLSIGGWTWSKNFPATASSASTRKTFAQSAVGLMKDWGFDGVDID	169
EFY96204	IEAGLSGSGTIGTILSTSQANLVRIIDGILAQMPNS--FGLTMAPETAYVTGGSVTYGAIW	219
EFY91615	IEAGLSGSGSINTLSASQANLIRIIDGILAQMPNS--FGLTMAPETAYVTGGSVTYGSIW	219
AAN41259	IESGLTSGSNINTLSTSQTNLIRIIDGVLAQMPAN--FGLTMAPETAYVTGGTITYGSIW	219
ACF32998	IESGLTSGSNINTLSTSQTNLIRIIDGVLAQMPAN--FGLTMAPETAYVTGGTITYGSIW	219
ADP44708	IESGLTSGSNINTLSTSQTNLIRIIDGVLAQMPAN--FGLTMAPETAYVTGGTITYGSIW	219
ACZ28129	IESGLTSGSNINTLSTSQTNLIRIIDGVLAQMPAN--FGLTMAPETAYVTGGTITYGSIW	219
NP_626743	IETGLTSGSNINQLSASQSNLIRIIDGVLAQMPNS--FGLTMAPETAYVTGGSVITYGSIW	230
AAN41261	WEYPEDATQAQDMIFLLQA--VRDELDSYASQHAHNNHFLLSIAAPTGAKEYKKLKLALG	228
AAX19143	WEYPEDATQAQDMIFLLQA--VRDELDSYASQHAHNNHFLLSIAAPTGAKEYKKLKLALG	228
EFY96204	GAYLPIIKKYADNGLRLWNLNMQYYNGDMYG-----CSGDSYKAGTVEGFVA---QTDCLN	271
EFY91615	GAYLPIIKKYADNGLRLWNLNMQYYNGAMYG-----CSGDSYKAGTVEGFVA---QTDCLN	271
AAN41259	GSYLPIIKKYLDNGLRLWNLNMQYYNGEMYG-----CSGDSHKAGTVEGFVA---QTDCLN	271
ACF32998	GSYLPIIKKYLDNGLRLWNLNMQYYNGEMYG-----CSGDSHKAGTVEGFVA---QTDCLN	271
ADP44708	GSYLPIIKKYLDNGLRLWNLNMQYYNGEMYG-----CSGDSHKAGTVEGFVA---QTDCLN	271
ACZ28129	GSYLPIIKKYLDNGLRLWNLNMQYYNGEMYG-----CSGDSHKAGTVEGFVA---QTDCLN	271
NP_626743	GAYLPIIKKYAENGLRLWNLNMQYYNGSMYG-----CAGDSYSAGTVQGFVA---QTDCLD	282
AAN41261	-QVLDYINLMAYDFAGAWSNATGHGANLYNNTENPAATPFNTKDAVDAYINGGVFANKLV	287
AAX19143	-QVLDYINLMAYDFAGAWSNATGHGANLYNNTENPAATPFNTKDAVDAYINGGVFANKLV	287
EFY96204	KGLVIQGTITIRVPYDKQVPLPAQPG-----AGGGYMSPSLVGQAWDHYNGS	318
EFY91615	KGLVIQGTITIRLPYSMPVPLPAQPG-----AGGGYMSPSLVGQALDHYHGS	318
AAN41259	KGLSIQGVTTITIPYDKQVPLPAQPG-----AGGGHMSPSNVAQVLSHYKGA	318
ACF32998	KGLSIQGVTTITIPYDKQVPLPAQPG-----AGGGHMSPSNVAQVLSHYKGA	318
ADP44708	KGLSIQGVTTITIPYDKQVPLPAQPG-----AGGGHMSPSNVAQVLSHYKGA	318
ACZ28129	KGLSIQGVTTITIPYDKQVPLPAQPG-----AGGGHMSPSNVAQVLSHYKGA	318
NP_626743	KGLVIQGTITIRVPYDKQVPLPAQPG-----AGGGYMSPSPVQAWNHNGA	329
AAN41261	LGMPLYGSSSQQTGEGIKPYTGVGSGTWEYGTWYRVLPKPGAEIMCDNTAQGCYSYDAQ	347
AAX19143	LGMPLYDRSFQQTGEGIKPYTDVGSSTWEYGTWYRGSSQPGAEIMCDNTAQGCYSYDAQ	347
EFY96204	LKGLMTWS-----INWD-----GSKGWTFGDNVKGRL-----	345
EFY91615	LKGLMTWS-----INWD-----GSKGWTFGDNLKRRL-----	345
AAN41259	LKGLMTWS-----LNWD-----GSKNWTFGDNVKGTLGTA-----	348
ACF32998	LKGLMTWS-----LNWD-----GSKNWTFGDNVKGTLGTA-----	348
ADP44708	LKGLMTWS-----LNWD-----GSKNWTFGDNVKGTLGTA-----	348
ACZ28129	LKGLMTWS-----LNWD-----GSKNWTFGDNVKGTLGTA-----	348
NP_626743	LKGLMTWS-----LNWD-----GSKNWTFGINVKSLQGR-----	358
AAN41261	TKELISFDTPDIVAAKVEWLKEKGLGGSFWEASGDKNSSSLINKSFVGLSLESTPNF	407
AAX19143	TKELISFDTPDIVAAKVEWLKKKGLGGSFWEASGDKNSSSLINKSFVGLSLESTPNF	407
EFY96204	LDYPNSTYANIIGMA	423
EFY91615	LDYPNSTYANIIGMA	423
AAN41259		
ACF32998		
ADP44708		
ACZ28129		
NP_626743		
AAN41261		
AAX19143		

图 3 球孢白僵菌 JYBb201-11 菌株几丁质酶 chit1 与其他丝状真菌几丁质酶氨基酸序列相似性分析

Fig 3 Homologs of putative amino acid sequence alignment of JYBb201-11 Bbchit1 of chitinase and other filamentous fungi

注：连字号表示氨基酸比缺口；“*”表示相同氨基酸；“:”和“.”表示相似氨基酸；EFY96204; *Metarhizium anisopliae* ARSEF 23; EFY91615; *Metarhizium acridum* CQM 102; AAN41259; *Beauveria bassiana* strain 0062; ACF32998; *Beauveria bassiana* strain NCIM1216; ADP44708; *Beauveria bassiana* strain JYBb201-11; ACZ28129; *Beauveria bassiana* strain MTCC 2028; NP_626743; *Streptomyces coelicolor* A3 (2); AAN41261; *Beauveria bassiana* endochitinase (chit2); AAX19143; *Beauveria bassiana* strain ARSEF # 252 bacterial-type endochitinase

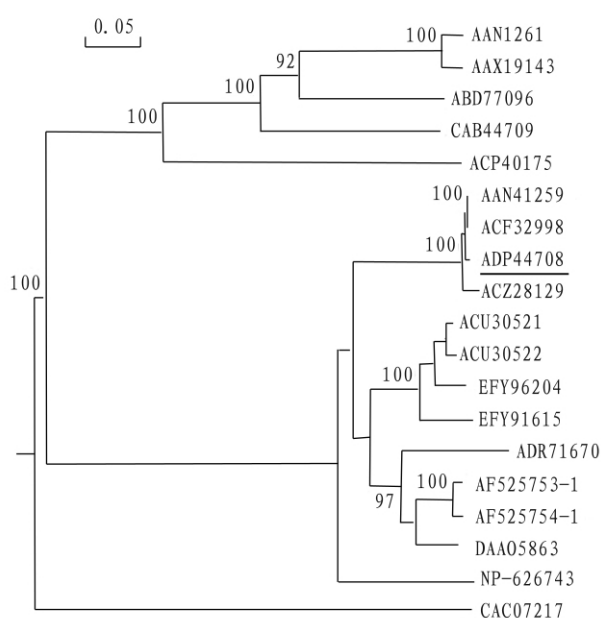


图 4 球孢白僵菌 JYBb201-11 菌株几丁质酶及其同源蛋白的系统树

Fig 4 Phylogenetic analysis of JYBb201-11 chitinase

注：AAN41261: *Beauveria bassiana* endochitinase (chit2); AAX19143: *Beauveria bassiana* strain ARSEF # 252 bacterial-Type endochitinase; ABD77096: *Lecanicillium lecanii* strain 432; CAB44709: *Metarhizium flavoviride*; ACP40175: *Isaria fumosorosea*; AAN41259: *Beauveria bassiana* strain 0062; ACF32998: *Beauveria bassiana* strain NCIM1216; ADP44708: *Beauveria bassiana* strain JYBb201-11 (红色下划线); ACZ28129: *Beauveria bassiana* strain MTCC 2028; ACU30521: *Metarhizium anisopliae* ARSEF 7524; ACU30522: *Metarhizium anisopliae* M34412; EFY96204: *Metarhizium anisopliae* ARSEF 23; EFY91615: *Metarhizium acridum* CQMa 102; ADR71670: *Trichoderma atroviride*; AF525753-1: *Hypocrea lixii*; AF525754-1: *Trichoderma inhamatum*; DAA05863: *Hypocrea jecorina*; NP-626743: *Streptomyces coelicolor* A3 (2); CAC07217: *Metarhizium anisopliae* var. *aridum*

利用 NCBI 网站上的 BLAST 软件进行同源蛋白搜索, 采用 EBI 提供的在线 Clustalw 对几个来源于丝状真菌的几丁质酶氨基酸序列进行同源比对 (图 3), 结果表明, 球孢白僵菌 JYBb201-11 菌株几丁质酶与球孢白僵菌 Bb0062 菌株 (AAN41259) 和 NCIM1216 菌株 (ACF32998) 几丁质酶 chit1 氨基酸序列同源性都达 99.43%; 与球孢白僵菌 MTCC 2028 菌株 (ACZ28129) 几丁质酶 chit1 氨基酸序列同源性达 98.28%; 与金龟子绿僵菌 ARSEF 23 菌株 (EFY96204) 和金龟子绿僵菌蝗变种 CQMa 102 菌株 (EFY91615) 的同源性分别为 79.31% 和 78.16%; 但却与来源于球孢白僵菌的 chit2 (AAN41261) 和 bacterial-type endochitinase

(AAX19143) 同源性很低, 分别为 14.15% 和 14.82%。采用 DNAMAN 软件对几种丝状真菌 (包括白僵菌、绿僵菌和天蓝色链霉菌等) 的几丁质酶氨基酸序列进行系统聚类, 结果表明 JYBb201-11 菌株几丁质酶与来源于其他白僵菌菌株的 chit1 氨基酸序列 (AAN41259、ACF32998、ACZ28129) 高度同源; 与其他昆虫病原真菌 [金龟子绿僵菌 (ACU30521、ACU30522、EFY96204)、金龟子绿僵菌蝗变种 (EFY91615)、蜡蚧轮枝菌 (ABD77096) 等]、木霉属真菌 (ADR71670、AF525754-1)、链霉菌属真菌 (NP_626743) 等几丁质酶以及来源于球孢白僵菌的 chit2 (AAN41261) 和 bacterial-type endochitinase (AAX19143) 同源性都较差 (图 4)。

3 讨论

几丁质是组成昆虫外骨骼的重要元件, 约占昆虫体壁干重的 17%~50%, 可以稳定上表皮蛋白, 也是防止病原微生物入侵的有效屏障^[12]。昆虫病原真菌在侵入昆虫外骨骼过程中分泌一系列的表皮降解酶, 如蛋白酶、几丁质酶和脂酶等^[4-5]。几丁质酶的分泌、活性与昆虫病原真菌侵染寄主的毒力的相关性还没有定论。Askary 等^[13]在利用蜡蚧轮枝菌感染蚜虫时发现, 菌丝周围的几丁质含量较低, 显示在该过程中有几丁质酶的产生; 林海萍等^[5]研究表明球孢白僵菌蛋白酶、几丁质酶、脂肪酶活性越高, 对松墨天牛毒力越强^[5]; 通过基因工程技术, 在球孢白僵菌中超量表达几丁质酶 (Bbchit1)^[6]和融合几丁质酶 (Bbchit1-BmChBD)^[7], 都显著提高了球孢白僵菌的杀虫毒力; 转玫瑰色棒束孢几丁质酶的球孢白僵菌工程菌株, 对马尾松毛虫的杀虫效率也有了显著的提高^[14]。尽管如此, 刘智辉等^[15]的研究表明球孢白僵菌胞外蛋白酶和几丁质酶活性与对亚洲玉米螟幼虫的死亡率及 LT_{50} 的相关性都不显著。Screen 等^[8]在金龟子绿僵菌中高效表达几丁质酶基因 *chit* 却未能提高其对烟草天蛾 (*Manduca sexta*) 的毒力。

已有一些学者从球孢白僵菌菌株 Bb0062 (AY145440)^[6]、BbNCIM1216 (EU283354)^[16]、BbMTCC 2028 (GU166156) 等不同菌株中克隆到几丁质酶基因 *Bbchit1*、*Bbchit2* (AY147011) 和 Bacterial-Type endochitinase (AY758397), 表明球孢白僵菌中存在不同类型的几丁质酶基因, 暗示了其功能可能存在多样性; 而球孢白僵菌中同一种几丁质酶基因核苷酸序列在不同菌株之间也可能存

在差异, 这些差异是否是导致不同菌株之间的侵染毒力不同的主要原因, 还有待进一步研究。因此, 有必要从昆虫病原真菌中克隆出更多的几丁质酶基因, 并用遗传转化等手段验证他们在侵染寄主过程中各自的作用。

本研究采用 DNA-PCR 和总 RNA-RT-PCR 法从茶卷叶蛾寄生真菌球孢白僵菌 JYBb201-11 菌株克隆获得的几丁质酶基因 *Bbchit1* 序列完全一致, 说明该基因序列中不存在内含子, 这与 Fang 等对白僵菌菌株 Bb0062 几丁质酶基因 *Bbchit1* 的研究结果一致^[6]。从 JYBb201-11 菌株几丁质酶基因 *Bbchit1* 与已发表的其他病原真菌的几丁质酶基因的同源性比较来看, 几丁质酶基因在同一种病原真菌中具有很高的保守性, 如与其他 2 株球孢白僵菌 (AY145440, EU828354) 的核苷酸序列同源性都达 99.52%, 氨基酸序列的同源性也都达 99.43%; 但不同种属来源的几丁质酶基因序列间存在着较大差异, 这可能与各自适应不同的寄主及不同的地理来源等都具有很大的相关性。因此, 克隆出更多的几丁质酶基因, 有助于揭示几丁质酶在真菌侵染寄主过程中的重要作用, 推测其与病原真菌侵染毒力间的相关性。

参考文献:

- [1] 蒲蛰龙, 李增智. 昆虫真菌学 [M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1996: 206—360.
- [2] FARIA M R D E, WRIGHT S P. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types [J]. Biol Control, 2007, 43 (3): 237—256.
- [3] CLARKSON J M, CHARNLEY A K. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects [J]. Trends in Microbiol, 1996, 4 (5): 197—203.
- [4] CHARNLEY A K, ST LEGER R J. The role of cuticle-degrading, enzymes in fungal pathogenesis in insects. In: Fungal Spore Disease Initiation in Plants and Animals [M]. New York: Plenum Press, 1991: 267—287.
- [5] 林海萍, 魏锦瑜, 毛胜凤, 等. 球孢白僵菌蛋白酶、几丁质酶、脂肪酶活性与其毒力相关性 [J]. 中国生物防治, 2008, 24 (3): 290—292.
- [6] FANG W, LENG B, XIAO Y, et al. Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene *Bbchit1* and its application to improve fungal strain virulence [J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71 (1): 363—370.
- [7] FAN Y, FANG W, GUO S, et al. Increased insect virulence in *Beauveria bassiana* strains overexpressing an engineered chitinase [J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73 (1): 295—302.
- [8] SCREEN S E, HU G, ST LEGER R J. Transformants of *Metarhizium anisopliae* sf. *anisopliae* overexpressing chitinase from *Metarhizium anisopliae* sf. *acridum* show early induction of native chitinase but are not altered in pathogenicity to *Manduca sexta* [J]. J Invertebr Pathol, 2001, 78 (4): 260—266.
- [9] 王定锋, 吴光远, 王庆森, 等. 茶卷叶蛾寄生真菌的分离、鉴定及毒力测定 [J]. 福建农业学报, 2010, 25 (3): 344—349.
- [10] 方卫国, 杨星勇, 张永军, 等. 真菌核酸的一种快速提取方法 [J]. 应用与环境生物学报, 2002, 8 (3): 305—307.
- [11] 萨姆布鲁克, EF 弗里奇, T 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南: 第 3 版 [M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [12] HILLERTON J E, BRAMLEY A J. Summer mastitis [J]. Vet Rec, 1984, 115 (12): 307.
- [13] ASKARY H, BENHAMOU N, BRODEUR J. Ultrastructural and cytochemical characterization of aphid invasion by the hyphomycete *Verticillium lecanii* [J]. J INVERTEBR PATHOL, 1999, 74 (1): 1—13.
- [14] 汤强, 章玉萍, 谢翎, 等. 玫瑰色棒束孢几丁质酶的转基因球孢白僵菌菌株的获得及其对马尾松毛虫的毒力增效作用 [J]. 昆虫学报, 2009, 52 (7): 755—762.
- [15] 刘智辉, 陈守文, 郭志红, 等. 球孢白僵菌胞外蛋白酶和几丁质酶活性与对亚洲玉米螟毒力的相关性分析 [J]. 华中农业大学学报, 2005, 24 (4): 364—368.
- [16] PINNAMANENI R, KALIDAS P, SAMBASIVA RAO K R S. Cloning and Expression of *Bbchit1* gene of *Beauveria bassiana* [J]. The Open Entomology Journal, 2010, 4: 30—35.

(责任编辑: 柯文辉)