

蝴蝶兰几丁质酶基因的克隆及表达特性分析

袁秀云¹, 许申平¹, 宋彩霞², 崔波^{1*}, 魏博³

(1 郑州师范学院 生物工程研究所, 郑州 450044; 2 郑州师范学院 生命科学学院, 郑州 450044; 3 河南农业大学 生命科学学院, 郑州 450002)

摘要: 利用 RT-PCR 及 RACE 技术, 克隆到蝴蝶兰 1 个几丁质酶基因 *PhCHT* (GenBank 登录号为 KT992851), 该基因 cDNA 全长 1 210 bp, 包含 37 bp 的 5'-UTR、933 bp 开放阅读框和 240 bp 3'-UTR, 编码 310 个氨基酸; 该蛋白为糖苷水解酶第 19 家族成员, 兼具有溶菌酶活性; 生物信息学分析显示, 该蛋白具 N-端信号肽和跨膜结构, 为胞外分泌蛋白; 该蛋白与海枣、谷子、油棕和拟南芥的几丁质酶类似蛋白相近, 并且在系统进化树上与甘蔗和陆地棉的Ⅶ类几丁质酶同属一个分支。*PhCHT* 基因的表达分析表明, *PhCHT* 在蝴蝶兰营养器官和生殖器官中均有表达, 根中表达量最高; 13 ℃/8 ℃低温处理 3、6、9 和 15 d 时该基因的表达被抑制, 4 ℃低温处理 1、2 和 4 h 表达量升高。研究表明, *PhCHT* 基因能够响应短期的冷胁迫。研究结果为进一步研究蝴蝶兰几丁质酶的系统进化及抗性育种奠定了基础。

关键词: 蝴蝶兰; 几丁质酶; 表达分析; 低温胁迫

中图分类号: Q785; Q786

文献标志码: A

Bioinformatics and Expression Analysis of a Chitinase Gene from *Phalaenopsis* spp.

YUAN Xiuyun¹, XU Shenping¹, SONG Caixia², CUI Bo^{1*}, WEI Bo³

(1 Institute of Bioengineering, Zhengzhou Normal University, Zhengzhou 450044, China; 2 College of Life Science, Zhengzhou Normal University, Zhengzhou 450044, China; 3 College of Life Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Using RT-PCR combined with RACE techniques, we cloned the chitinases gene *PhCHT* (GenBank accession number: KT992851) from *Phalaenopsis*. The full length cDNA was 1 210 bp, containing a 5'-UTR of 37 bp, a 3'-UTR of 240 bp, and an opening reading frame of 933 bp encoding 310 amino acids; The deduced protein belonged to glycoside hydrolase family 19 and may have lysozyme activity. The bioinformatics analysis indicated that this protein was predicted to be an extracellular secreted protein with a N-terminal signal peptide and a transmembrane structure; It was highly identified with the chitinase-like protein of *Phoenix dactylifera*, *Elaeis guineensis*, *Setaria italica*, and *Arabidopsis thaliana*. Phylogenetic analysis showed that *PhCHT* belongs to a clade with other class Ⅶ chitinase genes from *Gossypium hirsutum* and *Saccharum* spp. The *PhCHT* gene was expressed in vegetative and reproductive organs with a higher expression level in root than others. The expression of *PhCHT* was decreased by a low temperature of 13 ℃/8 ℃ for 3, 6, 9 and 15 d, and increased by 4 ℃ treatment for 1, 2 and 4 h. Our results suggest that the *PhCHT* plays a crucial role in responding to the short-term cold stress. These results could provide the

收稿日期: 2015-11-07; 修改稿收到日期: 2016-01-02

基金项目: 河南省科技攻关项目(092102110128)

作者简介: 袁秀云(1970—), 女, 博士, 教授, 主要从事植物生物技术研究。E-mail: yuanxiuyun@163.com

* 通信作者: 崔波, 博士, 教授, 主要从事花卉育种研究。E-mail: laocuiibo@163.com

foundation for further study the phyletic evolution of chitinase genes and the stress resistance breeding of *Phalaenopsis*.

Key words: *Phalaenopsis* spp.; chitinase; expression patterns; low temperature stress

几丁质酶(chitinase)是一种降解几丁质的糖苷酶,具有 N-端信号肽、几丁质结合区和催化区等 3 个典型的结构域^[1-2]。在植物中,几丁质酶由多基因家族编码,根据氨基酸序列的差异及结构域的有无,几丁质酶被分为 2 个家族(18 家族和 19 家族)共 7 类(Class I ~ VII),I、II、IV、VI 和 VII 属于 19 家族,III 和 V 属于 18 家族^[3]。在植物中几丁质酶不但参与植物的抗病防御反应^[4],还能对环境中的各种非生物胁迫做出响应^[5],参与植物发育^[6-7]及机械损伤^[8]、低温^[9-11]、高盐、干旱^[12-13]和重金属^[14-15]等多种非生物胁迫的调控。因此研究几丁质酶及其功能有助于深入了解植物的抗病及逆境生理调控机制,同时也可以为经济作物的抗性品种培育提供理论依据。

几丁质酶在植物中是一种主要的病程相关蛋白,多年来的研究主要集中在抗病方面^[16]。在非生物胁迫中,几丁质酶也参与植物的低温胁迫生理调控。研究显示,黑麦中有 2 个冷诱导基因 *CHT9* 和 *CHT46* 的蛋白分别属于 Class I 和 II 几丁质酶,具有抗冻活性^[9];无芒雀麦中冷诱导几丁质酶基因 *BiCHT1* 与黑麦中的 *CHT9* 同源,但不受渗透胁迫、脱落酸和乙烯利等胁迫的影响,其在 4 °C 具有抗冻活性,在 10 °C 具有轻微的抗冻活性^[17];狗牙根在冷驯化和脱水过程中,其 Class II 几丁质酶基因被诱导表达^[11];甘蔗的 Class III^[18]、I、IV 和 VII^[19] 几丁质酶基因能响应多种生物胁迫和非生物胁迫,其中包括 4 °C 低温胁迫;除此之外,植物中还存在一些几丁质酶类似蛋白(chitinase-like protein, CHL),也具有几丁质酶的功能^[20]。例如,在桑树^[21]、水稻^[22]和拟南芥^[23]等植物中均克隆出几丁质酶类似基因,研究发现这些基因在病虫害防御、环境胁迫和植物发育等方面具有重要作用。通过生物工程技术将几丁质酶基因转入不同植物,其抗病能力能够增强^[24]。例如,转马铃薯几丁质酶茶树增强了抗疱状疫病的能力^[25];水稻几丁质酶基因在转基因番茄中的表达增强了番茄对枯萎病和早疫病抗性^[26];水稻几丁质酶基因转入香蕉增强了香蕉对黑叶条纹病的抗性^[27];在烟草中过表达几丁质酶基因,不但具有较高的真菌和细菌抗性,其对高盐和重金属胁迫的抗性也增强^[28]。可见,通过几丁质酶基因的遗传

转化提高抗逆能力为作物抗性育种提供了一条新途径。

尽管目前在很多植物中都克隆到不同的几丁质酶基因,而兰科植物中几丁质酶基因及其研究还未见报道。蝴蝶兰(*Phalaenopsis* spp.)是兰科植物中常见的观赏兰花,具有很高的观赏价值。由于其原产于热带及亚热带地区,正常生长需要较高的温度和湿度,低温胁迫是其生长的制约因素,研究蝴蝶兰低温胁迫下调控基因的功能有助于理解其低温胁迫的调控机制。本研究以蝴蝶兰为材料,利用 RACE 和 RT-PCR 方法克隆到 1 个几丁质酶基因的全编码区序列,利用实时荧光定量的方法分析其在蝴蝶兰不同组织及低温胁迫下的表达特性,旨在进一步理解该基因在植物中的调控作用,并为蝴蝶兰低温抗逆机理的研究及今后通过基因工程手段选育抗逆新种质奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料与处理

以蝴蝶兰品种‘满天红’为试验材料,首先将生长大小一致的生根瓶苗放在 13 °C/8 °C 的昼夜温度、12 h/12 h 光暗条件的培养箱中,分别于培养 0、3、6、9 和 15 d 时取第二叶片组织,接着再放回正常温室条件下(27 °C/22 °C 昼夜温度)、12 h/12 h 光暗条件下恢复培养,并于 1 和 3 d 时取第二叶片组织;另外将蝴蝶兰植株放于 4 °C 冰箱分别于 0、1、2、4、8、12、24 和 48 h 时取第二片叶组织材料。除此之外,取温室中盛花期的根、叶、花茎、萼片、花瓣、唇瓣、蕊柱和子房(授粉发育后)等组织;每次取样包含 3 个生物学重复,所有组织取材后迅速用液氮速冻,于 -80 °C 冰箱备用。

1.2 方法

1.2.1 蝴蝶兰几丁质酶基因全长的克隆 叶片组织总 RNA 用 Trizol 试剂(Invitrogen)提取,经 1% 琼脂糖凝胶电泳判断其完整性,利用 Q5000 核酸蛋白分析仪(美国 Quawell)测定 RNA 的浓度和纯度。

采用 M-MLV 反转录酶(TaKaRa),以 4 °C 处理 1 h 的叶片总 RNA 为模板合成单链 cDNA;根据 NCBI 登录的序列设计 1 对简并引物 CHT-F(5'-CW-CMGACTTCTTCMAGGKTACCA-3') 和 CHT-R

(5'-GSTTAKGAAGAAGCAGRTTKGMC-3'),用于扩增蝴蝶兰几丁质酶基因的中间片段。PCR 扩增体系为 20 μ L,含 10 \times buffer 2 μ L,cDNA 模板 1 000~2 000 ng,4 种 dNTP 各 150 μ mol \cdot L⁻¹,每条引物 0.5 μ mol \cdot L⁻¹,*Taq* DNA 聚合酶 1 U。PCR 扩增程序为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 40 s,56 $^{\circ}$ C 退火 40 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s,32 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。回收目的片段,连接到 pGEM-T EASY 载体上,转入大肠杆菌 DH5 α 菌株,进行克隆和测序。

根据几丁质酶基因的中间片段序列,设计 1 对 3' 端特异引物 GSP3-1 (5'-TAGGTGATGGGCT-GAAAGTTGA-3') 和 GSP3-2 (5'-CGGCCAGGGC-TATGTAGATTTC-3'),1 对 5' 端特异引物 GPS5-1 (5'-TCCAGGTGAGCAAGGATAAAGG-3') 和 GPS5-2 (5'-AAGAAATGCCGCCACCTCCT-3'),按 Clontech 公司 SMARTTM RACE Amplification kit 操作说明进行扩增,回收扩增产物,克隆到 pGEM-T EASY 载体上,转入大肠杆菌 DH5 α 菌株,鉴定后进行测序,并与中间片段进行拼接。

然后根据拼接序列设计 1 对引物 CHI-ORFF (5'-TGTCGAAGAAAATGTGCAGTCG-3') 和 CHI-ORRR (5'-GGGTTATGAAGAAGCAGTTGG-3') 进行开放阅读框(ORF)扩增。引物和测序由上海立菲生物技术有限公司完成。

氨基酸同源性分析在 NCBI 上进行;保守结构域及功能域在 NCBI 的蛋白保守区数据库中搜索,并用 ScanProsite 软件分析;利用 SignalP、TargetP 和 WoLFPSORT 软件分别进行信号肽和亚细胞定位预测;蛋白理论分子量和等电点采用 ProtParm 软件分析;采用 TMHMM 2.0 分析跨膜结构;蛋白质二级结构预测采用 ExPASy 网站上的 GOR Protein secondary structure prediction 分析;使用 MEGA 软件的 NJ 法构建系统进化树。

1.2.2 蝴蝶兰几丁质酶基因的表达分析 各种组织总 RNA 用 PrimeScriptRT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa) 反转录成单链 cDNA。根据基因全长设计 1 对特异引物 qCHI-F (5'-TGCAG-TAAGGGATGGGAGTGT-3') 和 qCHI-R (5'-AAT-CCGAGCGGCTGATACAC-3'),产物长度 185 bp,以 *Actin* (JN185655) 及 *EF1 α* (KC153045) 为内参基因,引物分别为 Act-F (5'-GCAGCATGAAGAT-CAAGGTGG-3') 和 Act-R (5'-GCCTTAGAAATC-CACATCTGTTG-3'), *EF1 α* -F (5'-CCCTTCTT-

GCTTTCACCCTTG-3') 和 *EF1 α* -R (5'-GGATTG-TAACCCACCTTCTTCA-3')。采用 SYBR Premix Ex *Taq*TM II kit (TaKaRa) 进行 qRT-PCR 反应。反应体系为 25 μ L,反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 15 s,56 $^{\circ}$ C 变性 15 s,72 $^{\circ}$ C 退火 15 s (40 个循环)。qRT-PCR 反应在 Eppendorf Mastercycler 荧光定量 PCR 仪上进行,3 次重复。引物特异性分别通过溶解曲线分析并测序,相对表达量按照 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算。

2 结果与分析

2.1 蝴蝶兰几丁质酶基因全长的克隆

以蝴蝶兰 4 $^{\circ}$ C 处理 1 h 叶片的 cDNA 为模板,以简并引物 CHI-F 和 CHI-R 进行中间片段的 PCR 扩增,得到 1 个 771 bp 保守片段(图 1,A),此片段经 BlastX 分析,包含 1 个 19 家族几丁质酶结构域,表明该片段为几丁质酶片段。根据该片段序列,采用 RACE 技术,利用 GSP5-1 和 GSP5-2 引物扩增获得 5' 端目的片段为 385 bp (图 1,B),利用 GSP3-1 和 GSP3-2 引物扩增获得 3' 端目的片段为 394 bp (图 1,C)。将中间片段、3' 和 5' 端片段序列拼接,然后在开放阅读框区域设计引物,进行扩增,得到了预期的片段(图 1,D),最终得到该基因全长 cDNA 为 1 210 bp。通过 ORF 查找具有完整的开放阅读框。其中包含 37 bp 5'-UTR、933 bp 开放阅读框和 240 bp 3'-UTR (图 2),编码 310 个氨基酸。其核苷酸序列通过 BlastN 分析,发现其与野芭蕉和甜菜的几丁质酶基因分别具有 80% 和 76% 一致性。将该基因命名为 *PhCHT*,提交 GenBank,登录号为 KT992851。

2.2 蝴蝶兰几丁质酶基因的生物信息学分析

利用 NCBI 的蛋白保守区数据库 (conserved domain database, CDD) 对蝴蝶兰几丁质酶基因编

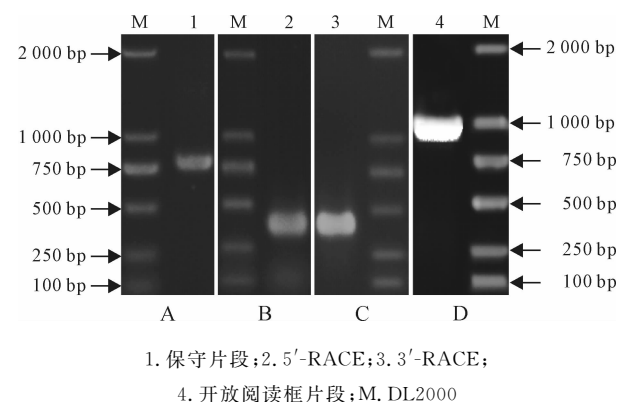


图 1 蝴蝶兰几丁质酶基因的扩增

1. Conserved region; 2. 5'-RACE; 3. 3'-RACE; 4. ORF; M. DL2000
Fig. 1 Amplification of chitinase gene in *Phalaenopsis* spp.

码蛋白的保守区进行预测,结果表明,该蛋白在第 59~295 氨基酸残基之间有一个几丁质酶糖苷酶 19 家族结构域(cd00325,E 值 6.55e-103),在此结构域内有 3 个催化残基位点和 7 个糖结合位点(图 3),说明该结构域包含催化区;该结构域还是一个溶菌酶相似超家族基因的保守结构域,推测该蛋白兼具溶菌酶活性。利用 ScanProsite 软件分析,该蛋白不具有几丁质酶结合区和 19 家族几丁质酶特异的序列标签;ProtParm 软件预测结果表明该蛋白分子量为 34.25 kD,等电点为 6.44,为酸性蛋白。SignalP 的预测结果显示,该蛋白在 N-端的第 1~31 氨基酸残基之间有一信号肽区域,第 31 位丙氨酸(Ala,A)和 32 位赖氨酸(Lys,K)之间为信号肽切割位点,从 32 位氨基酸以后为成熟蛋白。利用 TargetP 和

WoLFPSORT 2 种软件对该蛋白的亚细胞定位进行预测,TargetP 的预测显示该蛋白是分泌途径蛋白,可能性为 94.8%,WoLFPSORT 的预测显示该蛋白位于胞外,可能性是 82%,推测该蛋白属于胞外分泌蛋白。跨膜结构分析表明,在第 13~31 氨基酸残基之间有一个跨膜信号区域。表明蝴蝶兰该几丁质酶为跨膜蛋白。二级结构预测表明,该蛋白 α 螺旋占 32.56%,延伸链占 18.71%, β 转角占 5.81%,随机卷曲占 42.90%。

将蝴蝶兰几丁质酶基因编码的蛋白进行 BlastP 比对,结果显示,该蛋白与多种植物几丁质酶具有 65%~86%一致性,其中与海枣、油棕、谷子、拟南芥等几丁质酶类似蛋白具有 70%~86%一致性。将这些蛋白与其它各类几丁质酶蛋白一起构建系统进

```
1 ACATGGGATCGGAGATCGCCGGCGATTTCGGATTCAATCTCGAAGAAAATGTGCAGTCGGAAAGTCGGCGGAGGC
M S K K M C S R K S A E A
76 GATAGCTATAGTTCTTCTAGCTGTGTCTTAATGGCGGCTGCAGGAGTGCAGGCGAAGTCGAACTGAAGACTTG
I A I V L L A V V L M A A A G V Q A K S K L K T C
151 CAGTAAGGGATGGGAGTGTACGGACTCGATCTATTGCTCAACGAGACAATCTCAGACTTCTTCCAGGTTTAOCA
S K G W E C T D S I Y C C N E T I S D F F Q V Y Q
226 ATTTGAAAATCTATTCTCCAAAGCGCAATTCCTCTGTAGCGCACGCCGTCGGATTCTGGGACTAACCCTCTTCAT
F E N L F S K R N S P V A H A V G F W D Y H S F I
301 CACTGCATCCACGGGTATCAGCCGCTGCGATTGCGCACCAACCGCGGGAGAGATGGGTATGAAGGAGGTGGC
T A S T V Y Q P L G F G T T G G K Q M G M K E V A
376 GGCATTTCCTGGCCATGTGCGCAGCAAGACTTCCTGCGGTTATGGTGTGCAAACTGCGGTCCTTCGATGGG
A F L G H V G S K T S C G Y G V A T G G P L A W G
451 TCTTTGCTATAACCATGAGATGAGCCCAGCCAATCCTACTGCAAGATGACTACCTTTATCCTGCTCACCCTGG
L C Y N H E M S P S Q S Y C K D D Y L Y P C S P G
526 AGCTGAATATCATGCGGAGCGCCCTTCCTGCTACTGGAACATAACACGGTCTCATAGGTATGGGCTGAA
A E Y H G R G A L P V Y W N Y N Y G L I G D G L K
601 AGTTGATCTTCTGAACACCCAGAAATCTTGAACAGAAATGCAACTTTGGCCTTCCAGCTGCCATGTGGAGATG
V D L L N H P E Y L E Q N A T L A F Q A A M W R W
676 GATGAACCCCATTAAGAAAGAAACAGCCATCCGCTCATGACGCTCTTCGTCGAAAATTGGAACCCAGCAAGAAOGA
M N P I K K K Q P S A H D V F V E N W K P T R K N D
751 TACTTTGGCTAAAAGGCTGCCCGCTTGGCACCACCATGAACATTCTTTATGGAGATGAGGTTTGGGCCAGGG
T L A K R L P G F G T T M N I L Y G D E V C G Q G
826 CTATGTAGATTCTATGAACCAATTATATCTCACTACCACTATTACCTTGATTGATGGGATTTGCCGGCAGAA
Y V D S M N N I I S H Y Q Y Y L D L M G I G R K N
901 TTCAGGAGACAATCTGGATTGTGTCAGCAGGAGCCCTTGAACCATCTGTCCAACTGCTTCTTCAATTAACCCAG
S G D N L D C A E Q E P L N P S V Q P A S S *
976 CTGCTGTTAGAGGAAAATATTCTTCTATAAGACGGTATAGCTTGGCTGTACGTCAATTATCCACCGTGATTTA
1 051 ACTTGTTATTTTGGTAATTGGTTGTGATGTTACATTATATATGGCAGTGCTCCGTTGATTTGAAGTGTTTGTGA
1 126 TGTTCGAGTATATGGGATGCATTTCGGACAAATGGTTGATTGTGTTATTTTGTAAATATGTTTGTGTTGAA
1 201 AAAAAAAAAA
```

ATG. 起始密码子;TAA. 终止密码子;阴影. N-端信号肽

图 2 蝴蝶兰几丁质酶基因核苷酸序列和推测的氨基酸序列

ATG. Start codon;TAA. Stop codon;Shadow. N-terminal signal peptide

Fig. 2 The nucleotide acid sequence and deduced amino sequence of chitinase gene in *Phalaenopsis* spp.

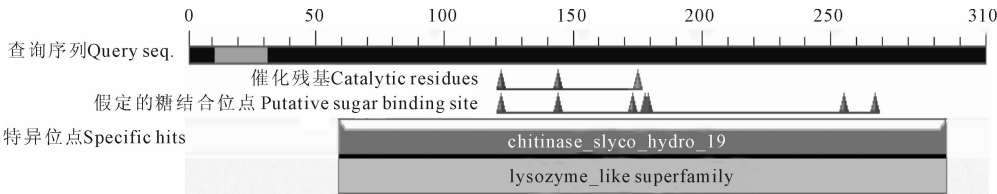


图 3 蝴蝶兰几丁质酶基因预测蛋白的结构域分析

Fig. 3 Conserved domain analysis of predicted protein of chitinase gene in *Phalaenopsis* spp.

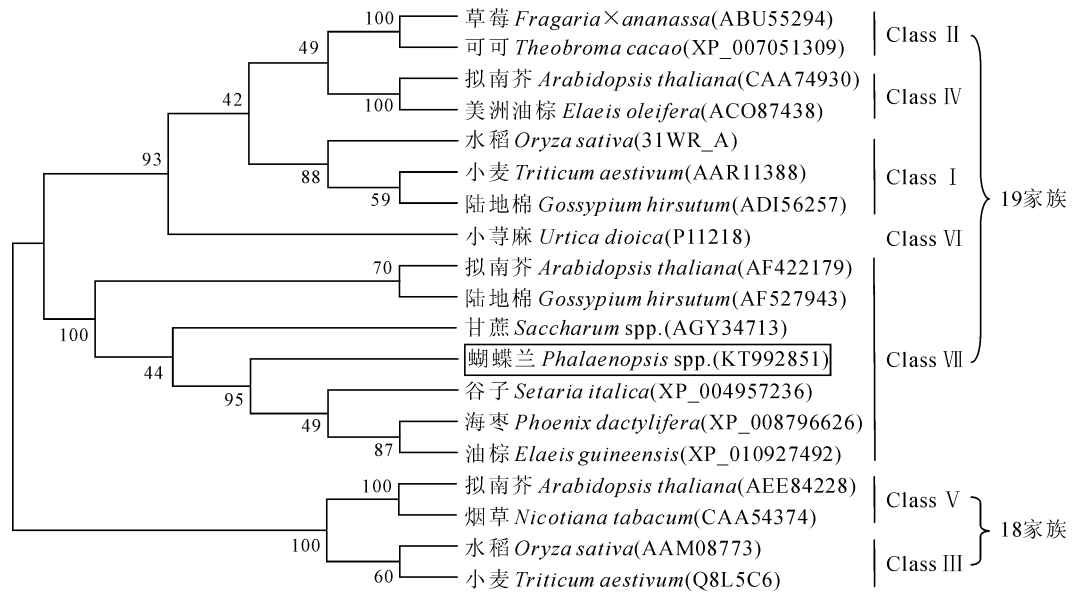


图 4 蝴蝶兰几丁质酶基因的系统进化分析

Fig. 4 Phylogenetic analysis of chitinase gene in *Phalaenopsis* spp.

化树,包括小麦的 Class I 和Ⅲ、陆地棉的 Class I 和Ⅶ、草莓的 Class II、拟南芥的 Class IV 和Ⅴ、美洲油棕的 Class IV、小荨麻的 Class VI、甘蔗的 Class Ⅶ、水稻的 Class I 和Ⅲ、烟草的 Class V 和可可的 Class II。结果表明,各类几丁质酶蛋白差异明显,19 个物种的几丁质酶蛋白被分为 2 大分支,Class Ⅲ和Ⅴ为一大分支,属于 18 家族几丁质酶,Class I、Ⅱ、Ⅵ、Ⅶ和Ⅶ为另一大分支,属于 19 家族几丁质酶,此大分支又分为 2 个亚组,Class I、Ⅱ、Ⅵ、Ⅶ为一亚组,蝴蝶兰几丁质酶与拟南芥、海枣、油棕、谷子的几丁质酶类似蛋白和陆地棉、甘蔗的 Class Ⅶ为第二亚组,其中蝴蝶兰几丁质酶蛋白在第二亚组中,与海枣、油棕、谷子和甘蔗等单子叶植物的关系最近(图 4)。

2.3 蝴蝶兰几丁质酶基因的表达模式

以 *Actin* 和 *EF1α* 两种内参基因对其转录表达进行分析。结果表明,该基因在各种组织中均有表达,其中在根中表达量最高,萼片和唇瓣中次之,在蕊柱中表达量最低,说明在形态建成中主要促进根的发育;以 *Actin* 和 *EF1α* 两种内参基因作为标准, *PhCHT* 基因的表达分析结果基本一致(图 5)。为了分析几丁质酶基因与不同低温胁迫的关系,分析了 13℃/8℃低温驯化温度和 4℃冷胁迫条件下该基因表达水平。结果显示,在 13℃/8℃昼夜温度培养 3、6、9 和 15 d 时,该基因表达随着低温处理时间的延长逐渐降低,恢复正常温度培养 1 和 3 d 时,该基因表达量没有回升(图 6, A),此时观察到植株

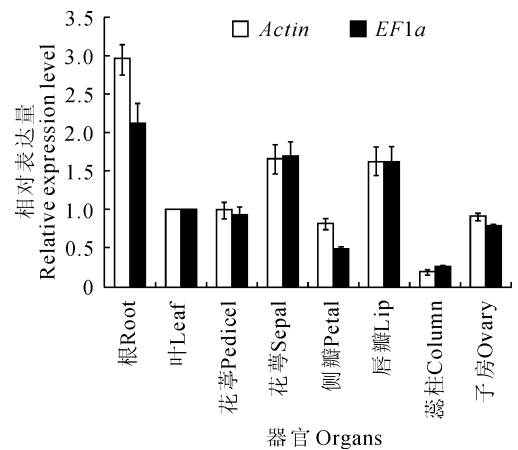


图 5 *PhCHT* 在不同组织中的表达

Fig. 5 The expression level of *PhCHT* in different organs 通过低温驯化后能恢复正常生长,没有冻伤现象。而在 4℃低温胁迫下,该基因表达与前者不同,在冷胁迫 1、2 和 4 h 时,几丁质酶基因的表达量均比处理前高,呈逐渐升高的趋势,在处理 4 h 时表达量达到最高,随后其表达量下降,在 8 h 表达量最低,12、24 和 48 h 维持在处理前的表达水平。分析认为,低温驯化 3、6、9 和 15 d 时, *PhCHT* 表达被抑制,当恢复正常温度培养时其表达在短期内没有恢复; *PhCHT* 对短期的 4℃低温胁迫能够及时做出响应,但是随着冷胁迫时间的延长,其表达又回到原来的表达水平(图 6, B);在两种低温处理条件下,以 *Actin* 和 *EF1α* 两种内参基因作为标准的表达水平分析也具有相似的结果。

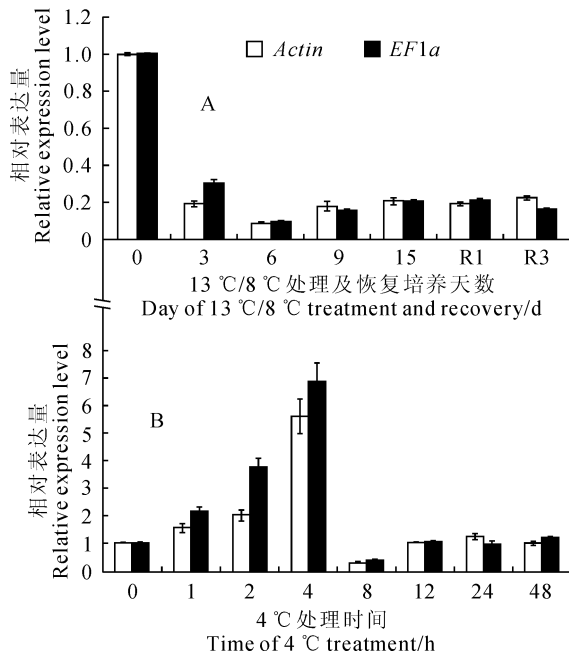


图6 蝴蝶兰 *PhCHT* 基因在不同低温条件下的表达

Fig. 6 The expression level of *PhCHT* under different low temperature in *Phalaenopsis*

3 讨论

本研究从蝴蝶兰叶片中克隆到 1 个几丁质酶基因,其生物信息学分析表明,该基因属于 19 家族几丁质酶基因,包含一个催化区,在 N-端有一个信号肽,具有跨膜结构,属于胞外分泌蛋白。系统进化分析显示该基因编码的蛋白与几丁质酶类似蛋白关系最近,在进化树上与 Class VII 几丁质酶在同一分支上;表达特性分析结果表明,该基因在蝴蝶兰的营养器官和生殖器官中均有表达,但表达水平有差异;低温驯化温度抑制其表达,能够响应短期的冷胁迫。

植物中各类几丁质酶的基因序列、亚细胞定位及酶活性存在较大差异。Class I 几丁质酶包含 N-端信号区、几丁质结合区和催化区 3 个功能结构域,有的 Class I 几丁质酶在 C 端还有一个液泡定位区^[29],Class II 几丁质酶有信号肽和催化区^[30-31],Class III 几丁质酶与 Class I 和 Class II 没有同源性^[32],Class IV 与 Class I 的结构域相似,但催化区较短^[33-34],Class V 几丁质酶在氨基酸结构上与 Class I 相似,但其序列与小荨麻凝结素蛋白前体序列相似性高,在 N-端有 2 个凝结素保守域^[35-36],Class VI 与前 5 类无相似性,有信号肽,2 个几丁质结合位点和催化区,与某些细菌的几丁质酶具有较高的相似性^[37],Class VII 几丁质酶 N-端有信号区和催化区,不含几丁质结合位点,其催化区不含 19 家

族几丁质酶特异的序列标签^[38]。还有一些几丁质酶类似蛋白,其序列与 18 和 19 家族几丁质酶蛋白同源,但不包含几丁质结合或者催化活性^[20],具有几丁质酶相似的抗病原体活性^[21-22]。拟南芥一个几丁质酶类似蛋白(*AtCTL1*),具有一个 19 家族几丁质酶的结构域,在 N-端有一个信号肽,属于分泌途径的蛋白,定位于细胞壁,其在种子、茎和花中均有表达,在成熟叶片和根中表达较低,该基因不被机械损伤、水杨酸和乙烯等处理诱导,其转录水平在机械损伤和乙烯处理 24 h 时明显降低^[39],推测拟南芥 *AtCTL1* 基因不是胁迫诱导型几丁质酶。在拟南芥中该蛋白的突变引起了根中木质素的异源沉淀、细胞形状的改变和过剩乙烯的产生^[39]。进一步研究发现该蛋白在根系发育中起重要作用,能够响应土壤环境的变化影响根系的结构^[23,40]。在棉花中有 2 个几丁质酶类似蛋白与拟南芥 *AtCHL1* 有较高的一致性,它们在细胞壁的纤维素合成中发挥重要作用^[41]。本研究的蝴蝶兰几丁质酶基因编码的蛋白与 *AtCHL1* 有较高的同源性,二者具有相似的功能结构域,如具有 N-端有信号肽,有 19 家族几丁质酶的结构域,但没有几丁质酶特异的序列标签,在系统进化树上与 Class VII 属于同一分支,由此判断,该研究中的几丁质酶类似蛋白可能属于 Class VII 几丁质酶。本研究中蝴蝶兰几丁质酶基因与拟南芥的 *AtCHL1* 具有相似的组织表达特性,均在营养器官和生殖器官中表达,由此推测,蝴蝶兰几丁质酶基因与拟南芥的 *AtCHL1* 有相似的功能。

在热带和亚热带物种中,番荔枝(*Annona cherimola*)的果皮中具有 2 个抗真菌和低温适应的几丁质酶,体外研究表明该蛋白不具有抗冻活性^[42]。甘蔗的 Class I 和 VII 几丁质酶在 4 °C 处理 12 和 24 h 时两种几丁质酶均表现持续升高的转录表达^[19],而本研究蝴蝶兰几丁质酶基因只在 4 °C 处理 4 h 时表达达到高峰,4 °C 处理 8 h 以后其表达下降至处理前的水平,分析原因可能与几丁质酶的种类和物种差异有关。蝴蝶兰作为热带和亚热带物种,适宜的生长需要温湿的环境,低温会抑制其生长和发育,目前蝴蝶兰低温胁迫下的响应机制还不明确,研究报道也较少。最近的研究表明,蝴蝶兰在驯化低温条件下有一个几丁质酶肽段上调表达^[43],本研究的几丁质酶编码的蛋白不包含该肽段,说明二者不是一个蛋白,同时也表明蝴蝶兰另有驯化低温诱导类型的几丁质酶,这些基因在蝴蝶兰的生物胁迫和非生物胁迫中如何调控生理代谢? 其作用底物是什么?

这些研究结果将有助于蝴蝶兰新种质品种的改良。因此有关蝴蝶兰几丁质酶基因的种类、酶活性及与

低温胁迫的关系待于进一步研究。

参考文献:

- [1] HONG J K, HWANG B K. Promoter activation of pepper class II basic chitinase gene, *CACHi2*, and enhanced bacterial disease resistance and osmotic stress tolerance in the *CACHi2*-overexpressing *Arabidopsis* [J]. *Planta*, 2006, **223**(3): 433-448.
- [2] XU F, FAN C, HE Y. Chitinases in *Oryza sativa* ssp. *japonica* and *Arabidopsis thaliana* [J]. *J. Genet Genomics*, 2007, **34**(2): 138-150.
- [3] KASPRZEWSKA A. Plant chitinases-regulation and function [J]. *Cell Mol. Biol. Lett.*, 2003, **8**(3): 809-824.
- [4] GUAN Y, RAMALINGAM S, NAGEGOWDA D, et al. *Brassica juncea* chitinase BjCHI1 inhibits growth of fungal phytopathogens and agglutinates gramnegative bacteria [J]. *J. Exp. Bot.*, 2008, **59**(12): 3 475-3 484.
- [5] TAKENAKA Y, NAKANO S, TAMOI M, et al. Chitinase gene expression in response to environmental stresses in *Arabidopsis thaliana*: chitinase inhibitor allosamidin enhances stress tolerance [J]. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2009, **73**(5): 1 066-1 071.
- [6] KIM H B, AN C S. Differential expression patterns of an acidic chitinase and a basic chitinase in the root nodule of *Elaeagnus umbellata* [J]. *Mol. Plant Microbe Interac.*, 2002, **15**: 209-215.
- [7] ROBINSON S P, JACOBS A K, DRY I B. A class IV chitinase is highly expressed in grape berries during ripening [J]. *Plant Physiol.*, 1997, **114**(3): 771-778.
- [8] BRAVO J M, CAMPO S, MURILLO I, et al. Fungus- and wound-induced accumulation of mRNA containing a class II chitinase of the pathogenesis-related protein 4 (PR-4) family of maize [J]. *Plant Mol. Biol.*, 2003, **52**(4): 745-759.
- [9] YEH S, MOFFATT B A, GRIFFITH M, et al. Chitinase genes responsive to cold encode antifreeze proteins in wheat cereals [J]. *Plant Physiol.*, 2000, **124**: 1 251-1 263.
- [10] STRESSMANN M, KITAO S, GRIFFITH M, et al. Calcium interacts with antifreeze proteins and chitinase from cold-acclimated winter rye [J]. *Plant Physiol.*, 2004, **135**: 364-376.
- [11] DE LOS REYES B G, TALIAFERRO C M, ANDERSON M P, et al. Induced expression of the class II chitinase gene during cold acclimation and dehydration of bermudagrass (*Cynodon* sp.) [J]. *Theoretical & Applied Genetics*, 2001, **103**(2-3): 297-306.
- [12] HONG J K, HWANG B K. Induction by pathogen, salt and drought of a basic class II chitinase mRNA and its *in situ* localization in pepper (*Capsicum annuum*) [J]. *Physiol. Plant*, 2002, **114**(4): 549-558.
- [13] TATEISHI Y, UMEMURA Y, ESAKA M. A basic class I chitinase expression in winged bean is up-regulated by osmotic stress [J]. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2001, **65**(7): 1 663-1 638.
- [14] WANG L Y, WANG Y S, ZHANG J P, et al. Molecular cloning of class III chitinase gene from *Avicennia marina* and its expression analysis in response to cadmium and lead stress [J]. *Ecotoxicology*, 2015.
- [15] WANG L Y, WANG Y S, CHENG H, et al. Cloning of the *Aegiceras corniculatum* class I chitinase gene (*AcCHI I*) and the response of *AcCHI I* mRNA expression to cadmium stress [J]. *Ecotoxicology*, 2015.
- [16] SYTWALA S, GÜNTHER F, MELZIG M F. Lysozyme-and chitinase activity in latex bearing plants of genus *Euphorbia*-a contribution to plant defense mechanism [J]. *Plant Physiol Biochem.*, 2015, **95**: 35-40.
- [17] NAKAMURA T, ISHIKAWA M, NAKATANI H, et al. Characterization of cold-responsive extracellular chitinase in bromegrass cell cultures and its relationship to antifreeze activity [J]. *Plant Physiol.*, 2008, **147**(1): 391-401.
- [18] SU Y, XU L, FU Z, et al. *ScChi*, encoding an acidic class III chitinase of sugarcane, confers positive responses to biotic and abiotic stresses in sugarcane [J]. *Int. J. Mol. Sci.*, 2014, **15**(2): 2 738-2 760.
- [19] SU Y, XU L, WANG S, et al. Identification, phylogeny, and transcript of chitinase family genes in sugarcane [J]. *Sci. Rep.*, 2015, **5**: 10 708.
- [20] KESARI P, PATIL DN, KUMAR P, et al. Structural and functional evolution of chitinase-like proteins from plants [J]. *Proteomics*, 2015, **15**(10): 1 693-1 705.
- [21] KITAJIMA S, KAMEI K, TAKETANI S, et al. Two chitinase-like proteins abundantly accumulated in latex of mulberry show insecticidal activity [J]. *BMC Biochem.*, 2010, **11**: 6.
- [22] WU J, WANG Y, KIM S T, et al. Characterization of a newly identified rice chitinase-like protein (OsCLP) homologous to xylanase inhibitor [J]. *BMC Biotechnol.*, 2013: 1-4.
- [23] HERMANS C, PORCO S, VERBRUGGEN N, et al. Chitinase-like protein CTL1 plays a role in altering root system architecture in response to multiple environmental conditions [J]. *Plant Physiol.*, 2010, **152**(2): 904-917.
- [24] CLETUS J, BALASUBRAMANIAN V, VASHISHT D, et al. Transgenic expression of plant chitinases to enhance dis-

- ease resistance[J]. *Biotechnol. Lett.*, 2013, **35**(11): 1 719-1 732.
- [25] SINGH HR, DEKA M, DAS S. Enhanced resistance to blister blight in transgenic tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] by overexpression of class I chitinase gene from potato (*Solanum tuberosum*) [J]. *Funct. Integr. Genomics*, 2015, **15**(4): 461-480.
- [26] JABEEN N, CHAUDHARY Z, GULFRAZ M, *et al.* Expression of rice chitinase gene in genetically engineered tomato confers enhanced resistance to fusarium wilt and early blight [J]. *Plant Pathol. J.*, 2015, **31**(3): 252-258.
- [27] KOVÁCS G, SÁGI L, JACON G, *et al.* Expression of a rice chitinase gene in transgenic banana ('Gros Michel', AAA genome group) confers resistance to black leaf streak disease [J]. *Transgenic Res.*, 2013, **22**(1): 117-130.
- [28] DE LAS MERCEDES DANA M, PINTOR-TORO J A, CUBERO B. Transgenic tobacco plants overexpressing chitinases of fungal origin show enhanced resistance to biotic and abiotic stress agents [J]. *Plant Physiol.*, 2006, **142**(2): 722-730.
- [29] ARAKI T, TORIKATA T. Structural classification of plant chitinases: two subclasses in class I and class II chitinases [J]. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1995, **59**(2): 336-338.
- [30] KHAN A A, DING S S. Molecular cloning, characterization, and expression analysis of two class II chitinase genes from the strawberry plant [J]. *Plant Science*, 2004, **166**(3): 753-762.
- [31] KIKUCHI T, MASUDA K. Class II chitinase accumulated in the bark tissue involves with the cold hardiness of shoot stems in highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) [J]. *Scientia Horticulturae*, 2009, **120**(2): 230-236.
- [32] SUN Y L, HONG S K. Effect of chitinase on resistance to fungal pathogens in sea buckthorn, *Hippophae rhamnoides*, and cloning of Class I and III chitinase genes [J]. *Biochem Genet*, 2012, **50**(7-8): 600-615.
- [33] WIWEGER M, FARBOS I, INGOUFF M, *et al.* Expression of Chia4-Pa chitinase genes during somatic and zygotic embryo development in Norway spruce (*Picea abies*): similarities and differences between gymnosperm and angiosperm class IV chitinases [J]. *J. Exp. Bot.*, 2003, **54**(393): 2 691-2 699.
- [34] ISHISAKI K, HONDA Y, TANIGUCHI H, *et al.* Heterogenous expression and characterization of a plant class IV chitinase from the pitcher of the carnivorous plant *Nepenthes alata* [J]. *Glycobiology*, 2012, **22**(3): 345-531.
- [35] LI D, ZHANG J, WANG Y, *et al.* Two chitinase 5 genes from *Locusta migratoria*: molecular characteristics and functional differentiation [J]. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2015, **58**: 46-54.
- [36] UMEMOTO N, OHNUMA T, URPILAINEN H, ET A L. Role of tryptophan residues in a class V chitinase from *Nicotiana tabacum* [J]. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2012, **76**(4): 778-784.
- [37] MEINS F, FRITIG B, LINTHORST H J M, *et al.* Plant chitinase genes [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1994, **12**(2): S22-S28.
- [38] JI L I, LIU J Y. A novel cotton gene encoding a new class of chitinase [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2003, **45**(12): 1 489-1 496.
- [39] ZHONG R, KAYS S J, SCHROEDER B P, *et al.* Mutation of a chitinase-like gene causes ectopic deposition of lignin, aberrant cell shapes, and overproduction of ethylene [J]. *Plant Cell*, 2002, **14**(1): 165-179.
- [40] HERMANS C, PORCO S, VANDENBUSSCHE F, *et al.* Dissecting the role of CHITINASE-LIKE1 in nitrate-dependent changes in root architecture [J]. *Plant Physiol.*, 2011, **157**(3): 1 313-1 326.
- [41] ZHANG D, HRMOVA M, WAN C H, *et al.* Members of a new group of chitinase-like genes are expressed preferentially in cotton cells with secondary walls [J]. *Plant Mol. Biol.*, 2004, **54**(3): 353-372.
- [42] GOÑI O, SANCHEZ-BALLESTA M T, MERODIO C, *et al.* Two cold-induced family 19 glycosyl hydrolases from cherimoya (*Annona cherimola*) fruit: an antifungal chitinase and a cold-adapted chitinase [J]. *Phytochemistry*, 2013, **95**: 94-104.
- [43] YUAN X Y, LIANG F, JIANG S H, *et al.* Differential protein expression in *Phalaenopsis* under low temperature [J]. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2015, **175**(1): 909-924.

(编辑: 宋亚珍)