

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2019.01.006

核盘菌几丁质酶基因家族分析与表达特性研究^①

杜 娇¹, 王娅波¹, 肖继芬², 李雪华¹,
杨宇衡¹, 毕朝位¹, 余 洋¹

1. 西南大学 植物保护学院, 重庆 400715; 2. 凉山民族师范学校, 四川 西昌 615000

摘要: 核盘菌菌核以子实体形式萌发是作物菌核病害循环中关键性的一环, 研究菌核子实体萌发分子机理将为菌核病的安全控制提供线索. 该研究通过生物信息学方法对核盘菌几丁质酶基因家族进行分析, 并利用实时荧光 RT-PCR 对其在菌核子实体萌发阶段的表达进行探讨. 生物信息学分析表明核盘菌中共有 12 个基因编码假定的几丁质酶, 它们均具有 GH18 结构域, 部分蛋白还具有几丁质结合结构域和纤维素结构域; 除 SS1G_11212 外其余蛋白均为亲水性蛋白; 亚细胞定位预测表明其中 10 个假定几丁质酶位于胞外, 其余 2 个分别位于细胞核和细胞质中. 通过构建系统发育树分析发现假定几丁质酶可以分为 2 大类, 其中 3 个与酵母几丁质酶 CTS1 归为一类, 其余 9 个与 CTS2 归为另一类. 除 SS1G_00773 外, 其余 11 个几丁质酶基因在核盘菌菌核子实体萌发过程中表达量均有变化, 推测几丁质酶家族蛋白可能参与核盘菌菌核子实体萌发过程.

关键词: 核盘菌; 菌核子实体萌发; 几丁质酶; 基因表达

中图分类号: S432.4⁺4

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2019)01-0039-07

核盘菌 [*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary] 是一种世界性分布的重要植物病原真菌, 寄主范围十分广泛, 能侵染 75 科 278 属 450 多种植物^[1], 由它引起的作物菌核病每年都造成巨大的经济损失^[2-3]. 由于缺乏高抗的种植品种, 到目前为止对菌核病的防治仍以化学防治为主^[4-7]. 长期使用化学农药已导致田间核盘菌菌株出现严重的抗药性, 开发新的防治方法迫在眉睫.

核盘菌能在寄主上产生坚硬、黑色的菌核, 菌核以子实体形式萌发并释放的子囊孢子是作物菌核病的重要初侵染来源^[2]. 为有效抵抗外界不良环境, 菌核中的细胞壁外围绕较厚的碳水化合物层. 菌核萌发过程中需要分泌多种多糖水解酶来降解细胞壁, 使得子囊柄原基穿透菌核, 但到目前为止在其中起关键性作用的水解酶及其功能仍不清楚. 研究表明菌核加厚的细胞壁主要由 β -葡聚糖、几丁质以及其他多种未知多糖共同组成^[8-9]. 几丁质是由 N-乙酰-D-氨基葡萄糖以 β -1, 4 糖苷键连接而成的长链多聚物^[10]. 几丁质酶可将几丁质水解为几丁寡糖和 N-乙酰-D-氨基葡萄糖单体^[11], 在动物、植物、微生物中均有分布^[12-19]. 研究核盘菌几丁质酶的功能将为揭示核盘菌菌核的子实体萌发机制提供线索, 也为开发新的安全的菌核病防治措施奠定基础.

自酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中的几丁质酶基因 CTS1 和 CTS2 被克隆之后^[20-21], 随着越来越多的丝状真菌基因组测序完成, 许多真菌几丁质酶基因家族已被鉴定并进行了分析^[22-23]. 丝状真菌基因组中一般含有 10~25 个几丁质酶, 且都属于糖基水解酶 18 家族^[24]. 韩艺娟等^[25]对稻瘟病菌 (*Magna-*

① 收稿日期: 2017-10-30

基金项目: 重庆市基础与前沿研究一般项目 (cstc2017cyjAX0096); 中央高校基本科研业务费“创新团队”专项 (XDJK2017A006).

作者简介: 杜 娇 (1992-), 女, 硕士研究生, 主要从事分子植物病理学研究.

通信作者: 余 洋, 副教授.

porthe oryzae) 假定几丁质酶家族基因表达进行分析, 指出几丁质酶家族蛋白可能参与稻瘟病菌的生长发育、形态建成和致病过程. 部分几丁质酶基因功能已经通过基因敲除等方法进行了深入研究^[26]. Takaya 等^[27]破坏构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)中几丁质酶基因 *chiA*, 发现菌丝生长和分生孢子形态没有发生变化, 但是分生孢子的萌发率和菌丝的生长速率明显降低. Yamazaki 等^[28]敲除构巢曲霉几丁质酶基因 *chiB*, 发现该基因缺失对菌丝的生长速率没有影响, 却降低了细胞内外几丁质酶活性影响了菌丝的自溶. 李培^[29]通过 RNAi 稻瘟病菌几丁质酶基因的表达, 发现菌丝生长和孢子分化出现异常. Dünkler 等^[30]敲除棉病囊霉(*Ashbya gossypii*)中几丁质酶基因 *AgCts2* 后, 发现该基因缺失不会影响菌丝的生长及形态建成, 但会形成异常的子囊孢子. 这些研究表明几丁质酶在丝状真菌的生长发育过程中起着重要作用.

迄今为止, 对于核盘菌菌核子实体萌发过程中起关键性作用的几丁质酶及其功能仍不清楚. 本研究拟通过生物信息学方法深入分析核盘菌几丁质酶基因家族的特性, 并利用实时荧光 RT-PCR 方法对其在菌核子实体萌发过程中的表达模式进行探讨, 研究结果将为深入揭示几丁质酶基因在核盘菌生长发育中的作用奠定基础, 也为菌核病的安全防治机制提供线索.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

核盘菌野生型菌株 1980 于 4 °C 条件下保存. PDA 培养基用于培养核盘菌菌株; 胡萝卜培养基用于培养核盘菌菌核.

1.1.1 主要试剂

TRIzol 试剂购于上海华舜生物工程有限公司; DNase 购于大连宝生物工程有限公司; RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒购于 MBI Fermentas 公司; 2×SYBR Green Realtime PCR Master Mix 购于东洋纺生物科技有限公司; 其他试剂为国产分析纯.

1.2 方法

1.2.1 核盘菌假定几丁质酶氨基酸序列的获取及其生物信息学分析

在核盘菌基因组数据库 (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/Scleraotinia_sclerotiorum/GenomesIndex.html) 中直接检索获得糖苷水解酶 18 家族 12 个成员的氨基酸序列, 并用于后续相关生物信息学分析. 在线软件 SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-2.0/>) 进行信号肽预测, ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测蛋白相对分子质量、等电点 (PI) 及疏水性 (GRA-VY), ProtComp 9.0 进行蛋白定位, Motif Scan (http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan) 与 Prosite (<http://prosite.expasy.org/prosite.html>) 预测蛋白结构域, MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 4.0 构建蛋白的系统发育树.

1.2.2 核盘菌菌核子实体萌发的诱导

将核盘菌 1980 菌株于胡萝卜培养基中 20 °C 下培养 1 个月后收集菌核. 菌核于 5% 次氯酸钠溶液中消毒后用无菌水漂洗 3 次洗净. 将菌核半埋于灭菌的湿润河沙中, 16 °C 条件下直到其萌发形成初始子囊柄.

1.2.3 核盘菌假定几丁质酶基因表达分析

用 TRIzol 试剂按说明书分别提取和萌发形成子囊柄的菌核总 RNA, 并用 DNase 处理总 RNA. 用 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒合成 cDNA 第一链. 以合成的 cDNA 为模板, 进行 RT-PCR 扩增, 使用仪器为 CFX96™ Realtime System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). 反应体系为 2×SYBR Green Real time PCR Master Mix: 10 μL, 正/反向引物各 0.2 μmol/L, cDNA 模板: 40 ng, 总体积: 20 μL. 反应程序为 95 °C, 2 min (1 cycle); 95 °C 20 sec, 56 °C 15 sec, 72 °C 20 sec (40 cycles). 荧光读数设在 56 °C. 以核盘菌 Beta-tubulin 基因 (*tub1*, SS1G_04652) 为内参进行基因表达分析, 实验重复 3 次, 利用 Excel 软件进行数据统计分析. RT-PCR 引物(表 1)由生工生物工程股份有限公司合成.

表 1 RT-PCR 所用引物

基因编号	引物序列(5'→3')	基因编号	引物序列(5'→3')
SS1G_11212	ACCGTATCCCTCAACCCTAATG ATTGATCGCATCGAGAAATCC	SS1G_11700	CTTGAAGGCTATTTCGCTCTGC GGTGTATATCCCAGGACCCAGA
SS1G_00677	TTTGATACCACAGCCGTCCC CGAACTAAGCCAGCCCTCTAC	SS1G_00773	ACGCTGATTTGATGAGATTGC TTTCCTCCAAGTTTCTTCCCT
SS1G_03420	CACTGTCGCTCTTCGTCTGA GGTATTCGGGTCTCGTGCT	SS1G_05454	AAATGACGATGGGTTTGGGT TCAGCGTGTGCATGTATGA
SS1G_05897	ATGCAAATGCCCGTTGATG CCGACTTTCGAAATGGTCT	SS1G_12510	GCAGCAAACACTGGTGGACA CTTGAAGGGAGAAATGAGCC
SS1G_08020	CGCTCATCAAGCAAACCTATC AGAAGCCCATGTTCCCTGTC	SS1G_13155	GCTGAGGGAGTTTCTGTTTCG TAGATTGTCTCGGTGGTTACGG
SS1G_08695	CATCATTTCCCATCGCTTTCTT CGGCAGTAGTGGCTTCATCAG	<i>Beta-tubulin</i>	GTGAGGCTGAGGGCTGTGA CCTTTGGCGATGGGACG
SS1G_11304	GGTGGCTGGACCTATTCATCT CCGTGCTTCATCGGTGTTT		

2 结果与分析

2.1 核盘菌几丁质酶家族分析

核盘菌中共 12 个假定的几丁质酶蛋白, 分别为 SS1G_11212, SS1G_00677, SS1G_03420, SS1G_05897, SS1G_11304, SS1G_11700, SS1G_00773, SS1G_05454, SS1G_08020, SS1G_12510, SS1G_13155 和 SS1G_08695. 几丁质酶蛋白相对分子质量在 $3.4 \times 10^4 \sim 1.9 \times 10^5$ 之间. 等电点(*PI*)值位于 4.49~8.29 之间. 除 SS1G_11212 为疏水性蛋白外(GRAVY 值为 0.117), 其余蛋白均为亲水性蛋白(GRAVY 值为负数). 利用 SignalP 4.1 进行信号肽预测分析发现, 其中 6 个假定的几丁质酶(SS1G_00773, SS1G_00677, SS1G_03420, SS1G_05454, SS1G_11700, SS1G_08695)在 N 端具有典型的信号肽结构, 信号肽的平均长度为 19.3. 利用 ProtComp 9.0 对假定的几丁质酶进行蛋白定位预测, 结果表明具有信号肽的假定几丁质酶均位于胞外. 在另外 6 个假定的几丁质酶中, SS1G_05897, SS1G_08020, SS1G_11304 和 SS1G_11212 位于胞外, SS1G_13155 定位于细胞核, SS1G_12510 位于细胞质中(表 2). 对假定的几丁质酶进行蛋白结构分析, 结果表明 12 个蛋白均含有糖苷水解酶 18(Glyco_18)催化结构域. 此外, SS1G_00677, SS1G_00773, SS1G_05454 和 SS1G_12510 蛋白还具有几丁质结合结构域(Chitin-binding domain, ChtBD). SS1G_11212 和 SS1G_08695 蛋白中具有纤维素结合结构域(Cellulose-binding domain, CBM)(图 1).

表 2 核盘菌假定几丁质酶家族蛋白性质分析

基因编号	编码蛋白	相对分子质量	<i>PI</i>	信号肽	信号肽长度	蛋白定位	结构域
SS1G_11212	Chitinase II	6.9×10^4	4.97	无	—	胞外	Glyco_18, CBM
SS1G_00677	Chitinase II	5.2×10^4	4.90	有	19	分泌到胞外	Glyco_18, ChtBD
SS1G_03420	Chitinase II	3.5×10^4	4.80	有	15	分泌到胞外	Glyco_18
SS1G_05897	Chitinase II	3.4×10^4	6.09	无	—	胞外	Glyco_18
SS1G_08020	Chitinase II	7.5×10^4	8.29	无	—	胞外	Glyco_18
SS1G_08695	Chitinase III	4.4×10^4	5.70	有	22	分泌到胞外	Glyco_18, CBM
SS1G_11304	Chitinase II	4.4×10^4	4.94	无	—	胞外	Glyco_18
SS1G_11700	Chitinase II	4.8×10^4	6.49	有	23	分泌到胞外	Glyco_18
SS1G_00773	Chitinase II	1.9×10^5	4.79	有	18	分泌到胞外	Glyco_18, ChtBD
SS1G_05454	Chitinase II	1.9×10^5	4.95	有	19	分泌到胞外	Glyco_18, ChtBD
SS1G_12510	Chitinase II	1.2×10^5	5.95	无	—	胞质	Glyco_18, ChtBD
SS1G_13155	Chitinase II	1.2×10^5	4.49	无	—	胞核	Glyco_18

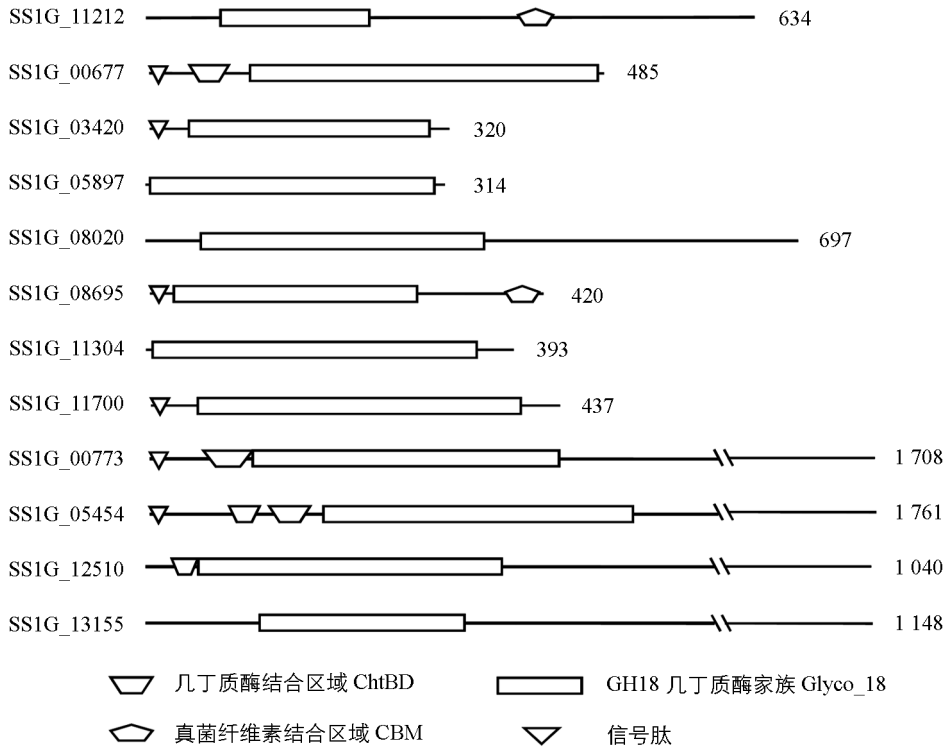


图 1 核盘菌假定几丁质酶家族蛋白功能域分析

2.2 核盘菌几丁质酶家族系统发育关系分析

图 2 中 12 个假定几丁质酶蛋白可以分为 2 大类, SS1G_13155, SS1G_08695 和 SS1G_11212 聚为一类, 与 CTS1 同源性较高. SS1G_00677 等 9 个假定几丁质酶聚为一类, 与 CTS2 同源性较高. 这 9 个假定几丁质酶可以分为 3 个亚类: 第 1 亚类包含 SS1G_08020, SS1G_11304, SS1G_11700 和 SS1G_05897, 该亚类中的蛋白与 CTS2 同源性最高; 第 2 亚类包含 SS1G_00677, SS1G_05454, SS1G_00773 和 SS1G_12510; 第 3 亚类仅有 SS1G_03420 蛋白.

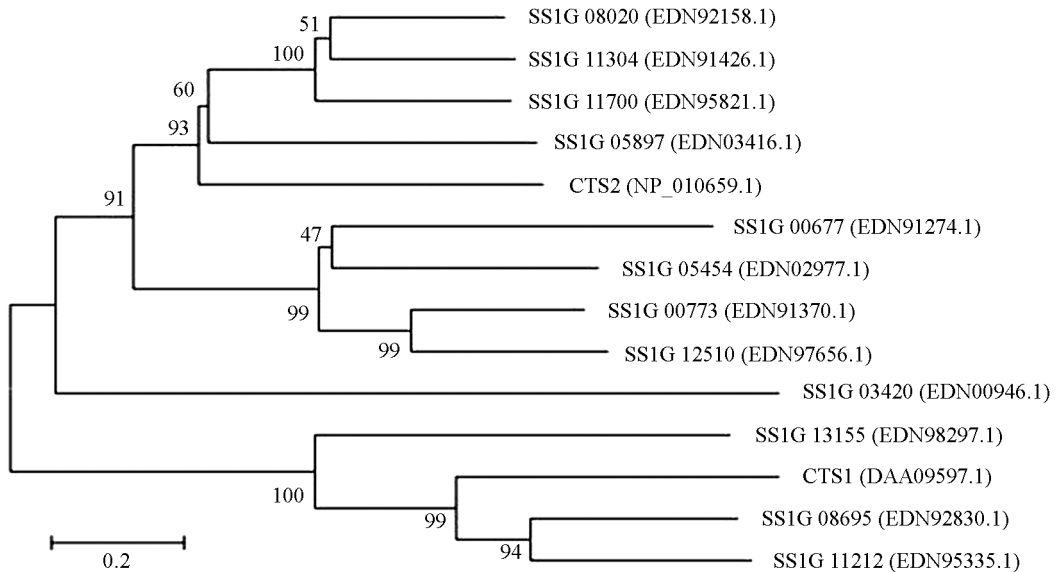


图 2 核盘菌假定几丁质酶家族系统发育关系

2.3 核盘菌假定几丁质酶基因的表达

为研究几丁质酶家族基因在核盘菌中的作用, 通过实时荧光 RT-PCR 方法检测了它们在核盘菌菌丝生长及菌核发育各阶段的表达量(图 3). SS1G_00677, SS1G_03420, SS1G_05897, SS1G_08020, SS1G_

05454 和 SS1G_12510 基因在菌核子实体萌发阶段表达量升高, 而 SS1G_11212, SS1G_08695, SS1G_11304, SS1G_11700 和 SS1G_13155 基因在菌核子实体萌发阶段表达量下降. 此外, SS1G_00773 基因在核盘菌菌核子实体萌发阶段表达量几乎无变化.

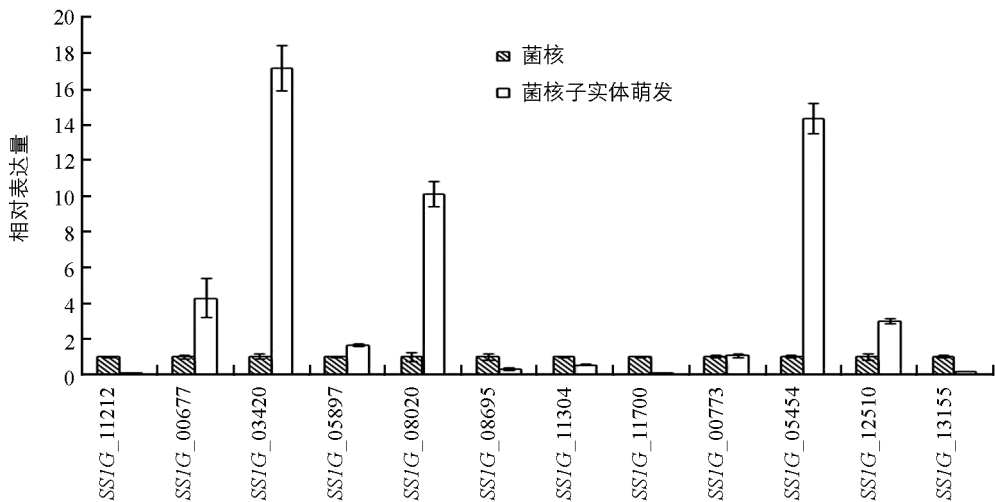


图 3 核盘菌菌核子实体萌发阶段各几丁质酶基因的表达

3 结 论

本研究发现核盘菌几丁质酶家族共有 12 个成员, 有 6 个假定几丁质酶(SS1G_03420, SS1G_05897, SS1G_08020, SS1G_11700, SS1G_00773 和 SS1G_13155)属于 A 亚组, 它们仅含有一个催化区, 没有几丁质或纤维素结合域. 这 6 个假定几丁质酶除 SS1G_13155 外, 均定位于胞外, 推测这些蛋白的主要作用区在细胞外. B 亚组除含有催化区外, 还含有一个纤维素结合域, 在核盘菌中共有 2 个假定几丁质酶归属于 B 亚组, 包括 SS1G_11212 和 SS1G_08695, 它们具有富含丝氨酸/苏氨酸结构域(Serine/threonine rich domains), 推测这 2 个蛋白成熟后可能结合细胞膜发挥作用. 剩余的 4 个假定几丁质酶属于 C 亚组, 它们蛋白相对分子质量较大, 除含有一个催化区外, 在靠近 N 端还含有 1~2 个几丁质结合域, 该结合域能够有效地增强几丁质酶对几丁质底物的亲和性, 提高酶的活性^[31].

系统发育树分析表明核盘菌 12 个假定几丁质酶中有 3 个与酵母几丁质酶 CTS1 聚为一类, 主要包括 B 亚组的 2 个蛋白和 A 亚组的 SS1G_13155, 其中 CTS1 与 B 亚组蛋白同源性最高. 研究表明 CTS1 与酵母细胞相互分离相关, CTS1 基因缺失突变体细胞分离不完全, 形成大量假菌丝^[32-33]. 构巢曲霉 B 亚组几丁质酶 CHIA 与细胞壁重塑密切相关^[27]. SS1G_11212 和 SS1G_08695 在核盘菌中的功能还不清楚, 推测有可能在菌核子实体萌发细胞壁重塑中起着重要作用. 另外 9 个假定几丁质酶与 CTS2 聚为一类, 主要包括 A 亚组和 C 亚组蛋白, 其中 A 亚组与 CTS2 同源性最高. 酵母 CTS2 基因敲除突变体与野生型菌株没有差别, 但棉病囊霉 CTS2 蛋白编码基因 *AgCts2* 被破坏后突变体形成异常的子囊孢子^[30]. 与棉病囊霉相比, 核盘菌通过菌核子实体萌发形成子囊孢子的过程更加复杂, A 亚组几丁质酶在该过程中的作用有待于进一步研究.

本研究对几丁质酶基因在菌核子实体萌发阶段的表达进行了分析, 结果显示 11 个基因在菌核子实体萌发前后表达量都出现了变化, 推测几丁质酶参与了核盘菌的菌核子实体萌发过程. 其中 6 个基因在菌核子实体萌发阶段上调表达, 它们分布于 A 亚组和 C 亚组, 预示这 2 个亚组在菌核子实体萌发中所起的作用. 下一步需要通过单个基因分别进行敲除或者沉默, 以阐明它们在菌核子实体萌发中的功能.

参考文献:

- [1] BOLAND G J, HALL R. Index of Plant Hosts of *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 1994, 16(2): 93-108.
- [2] BOLTON M D, THOMMA B P, NELSON B D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: Biology and Molecular Traits

- of a Cosmopolitan Pathogen [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2006, 7(1): 1–16.
- [3] 杨新美. 油菜菌核病(*Sclerotinia sclerotiorum*)在我国的寄主范围及生态特性的调查研究 [J]. *植物病理学报*, 1959, 5(2): 111–121.
- [4] CLARKSON J P, STAVELEY J, PHELPS K, et al. Ascospore Release and Survival in *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. *Mycological Research*, 2003, 107(2): 213–222.
- [5] SCHWARTZ H F, STEADMAN J R. Factors Affecting Sclerotium Populations of, and Apothecium Production by *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. *Phytopathology*, 1978, 68(3): 383–388.
- [6] ABAWI G S, GROGAN R G. Epidemiology of Diseases Caused by *Sclerotinia* Species [J]. *Phytopathology*, 1979, 69(8): 899–903.
- [7] STEADMAN J R. Control of Plant Diseases Caused by *Sclerotinia* Species [J]. *Phytopathology*, 1979, 69(8): 904–907.
- [8] YOUNG N, ASHFORD A E. Changes During Development in the Permeability of Sclerotia of *Sclerotinia* Minor to an Apoplastic Tracer [J]. *Protoplasma*, 1992, 167(3/4): 205–214.
- [9] WILLETTS HJ, BULLOCK S. Developmental Biology of Sclerotia [J]. *Mycological Research*, 1992, 96(10): 801–816.
- [10] WERR T C, SARR L W, CHEN M L. An Antifungal Chitinase Produced by *Bacillus subtilis* Using Chitin Waste as a Carbon Source [J]. *World Journal of Microbiol and Biotechnology*, 2010, 26(5): 945–950.
- [11] 胡燕梅, 杨 龙, 李国庆. 重寄生真菌盾壳霉产生几丁质酶的条件优化 [J]. *中国生物防治学报*, 2010, 26(2): 167–173.
- [12] 胡仕凤, 高必达, 陈 捷. 木霉几丁质酶及其基因的研究进展 [J]. *中国生物防治学报*, 2008, 24(4): 369–375.
- [13] 汤 伟, 夏 伟, 李雅华, 等. 棘孢木霉几丁质酶基因的克隆与生物信息学分析 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2012, 28(4): 385–392.
- [14] SEIDL V, HUEMER B, SEIBOTH B, et al. A Complete Survey of *Trichoderma* Chitinases Reveals Three Distinct Subgroups of Family 18 Chitinases [J]. *FEBS Journal*, 2010, 272(22): 5923–5939.
- [15] 林 毅, 彭 锬, 关 雄. 苏云金杆菌 entomocidus 亚种几丁质酶基因的克隆与生物信息学分析 [J]. *激光生物学报*, 2006, 15(6): 598–601.
- [16] 高 颂, 刘立会, 刘仕平, 等. 家蚕 GH18 家族几丁质酶的系统进化和 BmChi 的时期表达分析 [J]. *蚕业科学*, 2012, 38(3): 418–423.
- [17] 范晓军, 宋志芳, 仙笑笑, 等. 金纹细蛾几丁质酶基因生物信息学分析 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2013, 32(1): 91–96.
- [18] 李大琪, 杜建中, 张建琴, 等. 东亚飞蝗几丁质酶家族基因的表达特性与功能研究 [J]. *中国农业科学*, 2011, 44(3): 485–492.
- [19] XU F H, FAN C M, HE Y Q. Chitinases in *Oryza sativa* ssp. Japonica and *Arabidopsis thaliana* [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2007, 34(2): 138–150.
- [20] NICOL S. Life After Death for Emphth Shells; Crustacean Fisheries Create a Mountain of Waste Shells, Made of a Strong Natural Polymer, Chitin. Now Chemists Are Helping to Put This Waste to Some Surprising Uses [J]. *New Scientist*, 1991, 129(1): 46–48.
- [21] KURANDA M J, ROBBINS P W. Chitinase is Required for Cell Separation During Growth of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266(29): 19758–19767.
- [22] LI D C. Review of Fungal Chitinases [J]. *Mycopathologia*, 2006, 161(6): 345–360.
- [23] SEIDL V. Chitinases of Filamentous Fungi: a Large Group of Diverse Proteins with Multiple Physiological Functions [J]. *Fungal Biology Reviews*, 2008, 22(1): 36–42.
- [24] YANAI K, TAKAYA N, KOJIMA N, et al. Purification of Two Chitinases from *Rhizopus oligosporus* and Isolation and Sequencing of the Encoding Genes [J]. *Journal of Bacteriology*, 1992, 174(22): 7398–7406.
- [25] 韩艺娟, 林成增, 王琴秋, 等. 稻瘟病菌假定几丁质酶家族基因的表达特点 [J]. *热带作物学报*, 2013, 34(8): 1544–1551.
- [26] RAMOT O, VITERBO A, FRIESEM D, et al. Regulation of Two Homodimer Hexosaminidases in Themycoparasitic Fungus *Trichoderma asperellum* by Glucosamine [J]. *Current Genetics*, 2004, 45(4): 205–213.

- [27] TAKAYA N, YAMAZAKI D, HORIUCHI H, et al. Cloning and Characterization of a Chitinase-Encoding Gene (chiA) from *Aspergillus nidulans*, Disruption of Which Decreases Germination Frequency and Hyphal Growth [J]. *Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan*, 1998, 62(1): 60–65.
- [28] YAMAZAKI H, YAMAZAKI D, TAKAYA N, et al. A Chitinase Gene, chiB, Involved in the Autolytic Process of *Aspergillus nidulans* [J]. *Current Genetics*, 2007, 51(2): 89–98.
- [29] 李 培. 通过 RNA 干扰方法研究稻瘟病菌几丁质酶家族基因功能 [D]. 福州: 福建农林大学, 2014.
- [30] DÜNKLER A, JORDE S, WENDLAND J. An *Ashbya Gossypii* cts2 Mutant Deficient in a Sporulation-Specific Chitinase Can be Complemented by *Candida Albicans* CHT4. *Microbiological Research* [J]. 2008, 163(6): 701–710.
- [31] LIMÓN M C, MARGOLLES-CLARK E, BENÍTEZ T, et al. Addition of Substrate-Binding Domains Increases Substrate-Binding Capacity and Specific Activity of a Chitinase from *Trichoderma harzianum* [J]. *Fems Microbiology Letters*, 2001, 198(1): 57–63.
- [32] KING L, BUTLER G. Ace2p, a Regulator of CTS1 (Chitinase) Expression, Affects Pseudohyphal Production in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Current Genetics*, 1998, 34(3): 183–191.
- [33] 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(1/2): 173–177.

Characterization and Expression Analysis of Chitinase Family Genes in *Sclerotinia sclerotiorum*

DU Jiao¹, WANG Ya-bo¹, XIAO Ji-fen², LI Xue-hua¹,
YANG Yu-heng¹, BI Chao-wei¹, YU Yang¹

1. School of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. Liangshan National Normal School, Xichang Sichuan 615000, China

Abstract: The carpogenic germination of sclerotia for *Sclerotinia sclerotiorum* is a key step of crop sclerotiniose infection cycle. Studying the molecular mechanism involved in the carpogenic germination of sclerotia will provide clues to control the sclerotiniose safely. In this study, chitinase family proteins of *S. sclerotiorum* were analyzed with the bioinformation approach, and the expression levels of chitinase genes during the carpogenic germination of sclerotia were determined with RT-PCR method. Bioinformatics analysis showed that 12 genes were predicted to encode chitinase in *S. sclerotiorum*. All of them had GH18 domains and some also had a chitin-binding domain and a cellulose-binding domain. All the chitinases were hydrophilic except SS1G_11212. Ten chitinases were predicted to be located outside the cell, and the others were located in the nucleus cytoplasm. Phylogenetic tree analysis showed that the 12 chitinases could be divided into two categories, of which 3 with yeast chitinase CTS1 were clustered together and the rest with CTS2 were clustered together. The expression level of the 11 chitinase genes changed during the carpogenic germination of sclerotia, except SS1G_00773, suggesting that chitinase family proteins are involved in the carpogenic germination of sclerotia for *S. sclerotiorum*.

Key words: *Sclerotinia sclerotiorum*; carpogenic germination of sclerotia; chitinase; gene expression