

香蕉几丁质酶基因家族的鉴定及在枯萎病感染时的表达分析

林秋妹^{1,2}, 王霞², 赵东方², 贾彩红², 王静毅², 刘菊华², 徐碧玉², 张玄兵¹, 王卓²

(¹海南大学园艺学院, 海口 570228; ²中国热带农业科学院热带生物技术研究所 / 农业部热带生物技术重点开放实验室, 海口 571101)

摘要: 几丁质酶 (CHi, Chitinase) 是一种能够催化真菌细胞壁中几丁质水解的病程相关蛋白, 在植物与真菌互作中起着重要的作用。本研究以拟南芥几丁质酶基因的蛋白序列为查询序列, 在香蕉 A 基因组数据库中进行 BLASTp 比对, 鉴定出 23 个香蕉几丁质酶 (MaChi, Musa chitinase) 基因家族成员。根据其染色体上的位置, 分别命名为 MaChi01~MaChi23。系统进化树分析表明 23 个 MaChis 可分为糖苷水解酶 18 (GH18, glycosyl hydrolase 18) 和糖苷水解酶 19 (GH19, glycosyl hydrolase 19) 2 个亚家族。转录组数据分析表明接种尖孢镰刀菌古巴专化型热带 4 号生理小种 (Foc TR4, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4) 后 MaChi05、MaChi06、MaChi07、MaChi11、MaChi19 和 MaChi20 基因在感病品种巴西蕉中显著下调或不表达, 在抗病品种 GCTCV-119 中显著上调。利用 RT-qPCR 技术对 MaChi05、MaChi06、MaChi07、MaChi11 和 MaChi19 在抗病和感病品种接种 Foc TR4 中进行表达分析, 结果发现在抗病品种中这些基因的表达都被激活, 而在感病品种中没有激活, 且在抗病品种中的相对表达量远大于感病品种, 表明这些基因以正调控方式参与香蕉抗枯萎病过程。本研究结果为进一步解析 MaChi 基因家族成员在香蕉抗枯萎病过程中的功能提供理论参考。

关键词: 香蕉; 几丁质酶基因; 表达分析; 枯萎病

Identification of Banana Chitinase Gene Family and Analysis of Its Expression in Fusarium Wilt Infection

LIN Qiu-mei^{1,2}, WANG Xia², ZHAO Dong-fang², JIA Cai-hong², WANG Jing-yi², LIU Ju-hua²,
XU Bi-yu², ZHANG Xuan-bing¹, WANG Zhuo²

(¹College of Horticulture, Hainan University, Haikou 570228; ²Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences/Key Laboratory of Tropical Crop Biotechnology of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Haikou 571101)

Abstract: Chitinase is a disease-related protein that can catalyze the hydrolysis of chitin in fungal cell walls and plays an important role in the interaction between plants and fungi. In this study, using the protein sequence of the *Arabidopsis* Heynh. chitinase gene as the query sequence, BLASTp alignment was performed in banana A genome, and 23 MaChis gene family members were identified. According to their position on the chromosome, they are named MaChi01 up to MaChi23, respectively. Phylogenetic tree analysis showed that the 23 MaChis can be divided into two subfamilies, GH18 and GH19. Transcriptome data analysis showed that MaChi05, MaChi06, MaChi07, MaChi11, MaChi19 and MaChi20 were significantly down-regulated or not expressed in the susceptible variety Baxijiao after inoculation with *fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4, and

收稿日期: 2021-06-22 修回日期: 2021-07-28 网络出版日期: 2021-08-04

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20210622001>

第一作者研究方向为香蕉与枯萎病互作机制, E-mail: 2208983657@qq.com

通信作者: 王卓, 研究方向为香蕉功能基因组学研究, E-mail: wangzhuocd@126.com

张玄兵, 研究方向为观赏植物种质资源引种与栽培, E-mail: 13807550102@139.com

基金项目: 海南省科技计划三亚崖州湾科技城联合项目资助 (320LH020); 现代农业产业技术体系 (CARS-32)

Foundation projects: Hainan Provincial Science and Technology Plan SanyaYazhou Bay Science and Technology City Joint Project Funding (320LH020), Modern Agricultural Industry Technology System (CARS-32)

significantly up-regulated in the disease-resistant variety GCTCV-119. Using RT-qPCR technology to analyze the expression of *MaChi05*, *MaChi06*, *MaChi07*, *MaChi11* and *MaChi19* in the resistant and susceptible varieties inoculated with Foc TR4, it was found that the expression of these genes was activated in the resistant variety, but not in the susceptible variety, and the relative expression in the resistant variety was much greater than that in the susceptible variety, indicating that these genes participated in the process of banana fusarium wilt resistance in a positively regulated manner. The results of this study provides a theoretical reference for further analysis of the functions of the members of the *MaChi* gene family in the process of banana fusarium wilt resistance.

Key words: banana; chitinase gene; expression analysis; fusarium wilt

香蕉 (*Musa* spp.) 隶属姜目, 芭蕉科, 芭蕉属, 是一种大型的多年生草本植物, 广泛分布在热带和亚热带地区, 是最早被驯化的作物之一^[1]。香蕉作为一种重要的经济和粮食作物, 在生长发育过程中, 易受干旱^[2]、低温^[3]、盐^[4]等非生物和生物胁迫^[5]的影响。其中, 香蕉枯萎病为害最严重, 它是由尖孢镰刀菌古巴专化型病原真菌引起的一种土传病害^[6]。香蕉枯萎病菌有 4 个生理小种, 分别是 Race 1、Race 2、Race 3 和 Race 4, 其中 Race 4 又分为热带型和亚热带型 (STR4, subtropical race 4)^[7]。在 4 个生理小种中, Foc TR4 破坏性最大, 能够危害如大蜜舍、野蕉、粉蕉和大蕉等^[8]所有香蕉栽培品种。迄今为止, 香蕉枯萎病的爆发导致香蕉种植面积大幅萎缩, 严重影响香蕉产业的健康发展^[9-10], 对其常用防治方法有化学防治^[11]和生物防治^[12-13]等, 但这些防治手段不能从根本上抑制香蕉枯萎病。抗病品种的选育是防治香蕉枯萎病的有效途径, 通过挖掘抗病关键基因及功能解析能促进抗病品种的培育。

几丁质酶 (Chi, Chitinase) 是一种能够催化几丁质中 β -1, 4-糖苷键水解生成 N-乙酰氨基葡萄糖寡聚体或 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖单体的酶^[14]。几丁质酶包括糖苷水解酶 18 (GH18) 和糖苷水解酶 19 (GH19) 2 个亚家族, GH18 家族广泛分布于细菌、真菌、动物、病毒和高等植物等不同生物体中, GH19 家族主要存在于高等植物中^[15-16]。基于结构和氨基酸序列同一性, 几丁质酶又可分为 5 大类 (I~V)。其中第 I、II 和 IV 类几丁质酶属于 GH19 家族, 而第 III 和 V 类几丁质酶属于 GH18 家族^[17]。在结构上, I 类几丁质酶含有 2 种结构域, 分别是 Glyco_hydro_19 催化结构域和在 N 末端富含半胱氨酸的几丁质结合域 (CBD, chitin-binding domain), 这两个结构域含脯氨酸和甘氨酸的衔接, 它们的衔接体长度是可发生变化的^[18]。II 类几丁质酶仅由 1 个与 I 类几丁质酶具有高度序列和结构相似性的催化结构域组成, 但缺乏几丁质结合域和衔接区域^[19]。

IV 类与 II 类几丁质酶具有高度同源性, 但由于 CBD 中的 1 个缺失和催化域中的 3 个缺失, 其编码的氨基酸长度小于 I 类几丁质酶^[20]。III 类几丁质酶含有溶菌酶活性, 与 V 类几丁质酶一样, 均具有 Glyco_hydro_18 催化结构域, 但其与 I 类或 II 类几丁质酶在序列比对上并无同源性^[21]。

在正常情况下, 几丁质酶常处于低水平表达状态, 但当植物细胞受到病原体攻击时, 它们的表达量显著增加, 在抵抗真菌病原体方面发挥重要作用^[22]。过表达几丁质酶基因能增强植物对真菌病原体的抗性, 这在水稻 (*Oryza sativa* L.)^[23]、罗望子 (*Tamarindus indica* L.)^[24]、沙棘 (*Hippophae rhamnoides* L.)^[25]、葡萄 (*Vitis vinifera* L.)^[26]、大麦 (*Hordeum vulgare* L.)^[27] 和小麦 (*Triticum aestivum* L.)^[28] 等植物中已有报道。目前, 在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.)^[29]、水稻^[30]、棉花 (*Gossypium* spp.)^[31]、白菜 (*Brassica rapa* var. *glabra* Regel.)^[32]、番茄 (*Solanum lycopersicum* L.)^[33] 和马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.)^[34] 等植物中的几丁质酶基因家族已获得全基因组鉴定。在香蕉中, 基于香蕉 A 基因组 V1 版本, Backiyarani 等^[35] 鉴定出 14 个香蕉几丁质酶 (*MaCHis*, *Musa chitinase*), 并发现在香蕉接种叶斑病 (*Mycosphaerella eumusae*) 时有 1 个 *MaChi* (GSMUA_Achr9G16770_001) 呈显著的上调表达, 而在香蕉接种线虫 (*Pratylenchus coffeae*) 时有 2 个 *MaCHis* (GSMUA_Achr9G25580_001 和 GSMUA_Achr8G27880_001) 表达量显著增加^[35]。但关于 *MaChi* 在香蕉与 Foc TR4 互作中的作用还未见详细报道。2016 年, 香蕉 A 基因组经过更新组装和注释, 进一步完善基因组数据^[36]。本研究基于香蕉 A 基因组 V2 版本对 *MaChi* 基因家族成员进行系统的鉴定, 分析 23 个 *MaCHis* 的理化特性、系统进化关系、保守结构域以及在枯萎菌感染时的表达特征, 为今后香蕉抗枯萎病育种奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 MaCHi 基因的鉴定及理化特性分析

在香蕉 A 基因组数据库 (<http://banana-genome.cirad.fr/>) 中以 22 个拟南芥几丁质酶蛋白序列^[29]为查询序列进行 Blastp (<https://banana-genome-hub.southgreen.fr/home1>) 搜索比对, 筛选条件为: E 值 $\leq 1 \times 10^5$; 覆盖度 >60%, 获得与拟南芥同源性较高的所有 MaCHi 家族成员的基因序列、CDS 序列以及蛋白序列。利用 NCBI-CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 数据库分析所有非冗余序列的保守域。利用 SMART (https://smart.embl.de/smart/set_mode.cgi) 和 Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) 网站证实所鉴定的基因是否存在 Glyco-hydro-18 或 Glyco-hydro-19 的保守结构域, 以此来确定其是否属于几丁质酶基因家族。

MaCHi 基因家族成员的基本理化性质通过 ExPASy (<http://www.expasy.org/>) 软件在线分析, 并使用 WoLF PSORT (<https://wolfsort.hgc.jp/>) 网站预测 MaCHi 基因家族成员的亚细胞定位情况。

1.2 MaCHi 家族系统进化关系及多序列比对

采用 MGEA 7.0 软件中邻接法 (NJ, neighbor-joining) 对 22 个拟南芥和 23 个香蕉 CHis 蛋白序列构建系统进化树, 抽样次数 (Bootstrap) 设置为 1000 次, 其他参数默认。利用 DNAMAN 软件对 MaCHi 家族成员的蛋白序列进行多序列比对。

1.3 MaCHi 基因响应 Foc TR4 处理下表达模式分析

从本实验室前期对感病品种巴西蕉 (*Musa* AAA group Baxijiao) 和抗病品种 GCTCV-119

(*Musa* AAA group GCTCV-119) 根系接种 Foc TR4 0 d 和 2 d 后的转录组测序数据中提取出 *MaCHi* 基因的表达数据, 该数据已上传至国家基因库 (<https://db.cngb.org/cnsa>) 的 CNGBdb 数据库 (登录号: CNP0000292)。上述表达数据用 RPKM (Reads per kilo bases per million reads) 值表示, 通过对 2 d 和 0 d 的表达数据的比值取对数 (\log_2), 利用 MeVv 4.3 软件作热图。取 RPKM>10 的 *MaCHis* (*MaCHi05*、*MaCHi06*、*MaCHi07*、*MaCHi11* 和 *MaCHi19*) 在接种 Foc TR4 后进行荧光定量 PCR (RT-qPCR, reverse transcription quantitative PCR) 验证。每个实验组均做 3 次生物学重复, 结果利用 Excel 2010 软件进行显著性分析, 并通过 KyPlot 软件进行绘图。

2 结果与分析

2.1 MaCHi 的鉴定和分类

在本研究中, 通过序列比对筛选, 获得 23 个 MaCHis 基因家族成员。根据这 23 个成员在染色体上的顺序和位置将其命名为 *MaCHi01*~*MaCHi23* (表 1)。23 个 MaCHis 基因分别分布在 Chr.1 (1 个)、Chr.3 (6 个)、Chr.5 (1 个)、Chr.6 (4 个)、Chr.7 (2 个)、Chr.8 (5 个) 和 Chr.9 (4 个)。理化性质分析结果表明, 23 个 MaCHis 成员编码 262~454 个氨基酸不等; 等电点范围在 4.15~8.53 之间; 分子量在 28.27~49.90 kDa 之间。亚细胞定位预测表明, 23 个 MaCHis 基因分别定位于细胞外 (9 个)、叶绿体 (7 个)、细胞质 (2 个)、线粒体 (1 个)、液泡 (2 个)、过氧化物酶体 (1 个) 和质膜 (1 个) (表 1)。

表 1 香蕉几丁质酶家族成员的理化性质
Table 1 Physical and chemical properties of chitinase in banana

| 基因 ID | 蛋白 ID | 染色体 | 起始位置 | 终止位置 | 大小 | 等电点 | 分子量 (kDa) | 亚细胞定位 |
|----------------|---------------|------------|------------|----------|------|------|------------------|--------------------------|
| Gene ID | Protein ID | Chromosome | Start site | End | Size | PI | Molecular weight | Subcellular localization |
| <i>MaCHi01</i> | Ma01_p02630.1 | Chr.1 | 1760416 | 1761512 | 313 | 5.57 | 33.63 | 细胞外 |
| <i>MaCHi02</i> | Ma03_p06280.1 | Chr.3 | 4364871 | 4366088 | 326 | 6.05 | 35.61 | 叶绿体 |
| <i>MaCHi03</i> | Ma03_p23790.1 | Chr.3 | 28255165 | 28256064 | 299 | 6.98 | 32.25 | 细胞外 |
| <i>MaCHi04</i> | Ma03_p26300.1 | Chr.3 | 30071143 | 30076785 | 434 | 8.36 | 48.57 | 线粒体 |
| <i>MaCHi05</i> | Ma03_p28020.1 | Chr.3 | 31214677 | 31215782 | 315 | 6.77 | 33.59 | 细胞外 |
| <i>MaCHi06</i> | Ma03_p28030.1 | Chr.3 | 31219921 | 31221026 | 315 | 6.28 | 33.25 | 细胞外 |
| <i>MaCHi07</i> | Ma03_p28040.1 | Chr.3 | 31225281 | 31226227 | 262 | 8.53 | 28.27 | 细胞外 |
| <i>MaCHi08</i> | Ma05_p21440.1 | Chr.5 | 33103148 | 33104113 | 269 | 8.46 | 29.79 | 细胞质 |
| <i>MaCHi09</i> | Ma06_p13470.1 | Chr.6 | 9235978 | 9237407 | 446 | 5.06 | 49.85 | 液泡 |
| <i>MaCHi10</i> | Ma06_p24760.1 | Chr.6 | 23948299 | 23973131 | 303 | 6.16 | 33.70 | 细胞外 |
| <i>MaCHi11</i> | Ma06_p31980.1 | Chr.6 | 32954630 | 32956498 | 384 | 5.51 | 42.13 | 叶绿体 |
| <i>MaCHi12</i> | Ma06_p38320.1 | Chr.6 | 37115822 | 37118165 | 304 | 6.06 | 33.73 | 液泡 |
| <i>MaCHi13</i> | Ma07_p16390.1 | Chr.7 | 13277456 | 13278670 | 378 | 5.17 | 41.34 | 细胞外 |
| <i>MaCHi14</i> | Ma07_p24810.1 | Chr.7 | 32030472 | 32031553 | 300 | 5.14 | 33.41 | 过氧化物酶体 |
| <i>MaCHi15</i> | Ma08_p18970.1 | Chr.8 | 32726882 | 32728334 | 454 | 5.10 | 49.90 | 质膜 |
| <i>MaCHi16</i> | Ma08_p24190.1 | Chr.8 | 37468130 | 37469212 | 308 | 6.58 | 33.92 | 细胞外 |
| <i>MaCHi17</i> | Ma08_p28490.1 | Chr.8 | 40376475 | 40377371 | 298 | 4.15 | 31.17 | 叶绿体 |

表 1(续)

| 基因 ID | 蛋白 ID | 染色体 | 起始位置 | 终止位置 | 大小 | 等电点 | 分子量 (kDa) | 亚细胞定位 |
|---------|---------------|------------|------------|----------|------|------|------------------|--------------------------|
| Gene ID | Protein ID | Chromosome | Start site | End | Size | PI | Molecular weight | Subcellular localization |
| MaCHi18 | Ma08_p28510.1 | Chr.8 | 40392271 | 40393206 | 311 | 4.61 | 32.53 | 叶绿体 |
| MaCHi19 | Ma08_p28520.1 | Chr.8 | 40400994 | 40401929 | 311 | 4.41 | 32.73 | 叶绿体 |
| MaCHi20 | Ma09_p02310.1 | Chr.9 | 1648772 | 1649705 | 264 | 4.95 | 28.40 | 细胞质 |
| MaCHi21 | Ma09_p16070.1 | Chr.9 | 11393369 | 11394372 | 285 | 8.31 | 31.30 | 叶绿体 |
| MaCHi22 | Ma09_p20710.1 | Chr.9 | 29901969 | 29902896 | 270 | 4.70 | 28.56 | 细胞外 |
| MaCHi23 | Ma09_p26030.1 | Chr.9 | 37383215 | 37384129 | 304 | 6.59 | 33.56 | 叶绿体 |

2.2 MaCHi 系统发育分析

以拟南芥几丁质酶的分类为参考,从系统进化结果可以看出,45 个(拟南芥 22 个和香蕉 23 个)CHis 可分为 GH18 和 GH19 两个亚家族,这和下文内容蛋白结构分类结果一致。根据保守域与序列同源性又进一步将这 2 个亚家族细分为 5 种亚类(I-V)。其中 GH18 亚家族包含 III 和 V 类几丁质酶, GH19 亚家族包含 I、II 和 IV 类几丁质酶。在香蕉中,第 I 类几丁质酶包含 MaCHi01、MaCHi05、MaCHi06 和 MaCHi07 共 4 个成员,与拟南芥中唯一 1 个已知的 I 类几丁质酶(At3g12500)聚集在一起;II 类几丁质酶含有 5 个成员,分别是 MaCHi02、MaCHi10、MaCHi12、MaCHi16、MaCHi21;III 类几丁质酶有 MaCHi03、MaCHi04、MaCHi17、MaCHi18 和 MaCHi19 共 5 个成员;IV 类几丁质酶成员数目最少,仅有 MaCHi20 和 MaCHi22;V 类几丁质酶含有的成员数最多,共有 6 个成员,分别是 MaCHi09、MaCHi11、MaCHi13、MaCHi14、MaCHi15、MaCHi23(图 1)。

2.3 MaCHi 保守结构域分析

多序列比对结果表明,12 个 MaCHis 成员(MaCHi01、MaCHi02、MaCHi05、MaCHi06、MaCHi07、MaCHi08、MaCHi10、MaCHi12、MaCHi16、MaCHi20、MaCHi21、MaCHi22)在第 47~300 位氨基酸残基间存在 Glyco_hydro_19 催化结构域(登录号:PF00182),说明它们属于 GH19 家族的成员。以上成员的氨基酸序列中具有 N 端和 C 端两个高度保守区,并且这两个保守区由一段富含苯丙氨酸、丙氨酸、甘氨酸和谷氨酸的可变交联区衔接。其中在氨基酸序列的 N 端上,5 个成员(MaCHi01、MaCHi05、MaCHi06、MaCHi20 和 MaCHi22)还存在一个富含半胱氨酸且高度保守的结合域 CBD(登录号:PS00026),该结合域含有一段高度保守的基序 C-x(4)-C-C-S-x(2)-G-x-C-G-x(2)-C,其作用主要是与几丁质结合;而氨基酸序列的 C 端是高度保守的催化区,含 7 个活性位点,分别为甘氨酸、苏氨酸、赖氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、丝氨酸和苯丙氨酸(图 2)。

酸、丝氨酸和苯丙氨酸(图 2)。

香蕉 GH18 家族成员属于 III 和 V 类几丁质酶,它们不含与几丁质结合 CBD 结构域,在氨基酸残基第 34~378 位间只存在一个 Glyco_hydro_18 催化结构域(登录号:PF00704)。其中 MaCHi03、MaCHi11、MaCHi13、MaCHi14、MaCHi17、MaCHi19

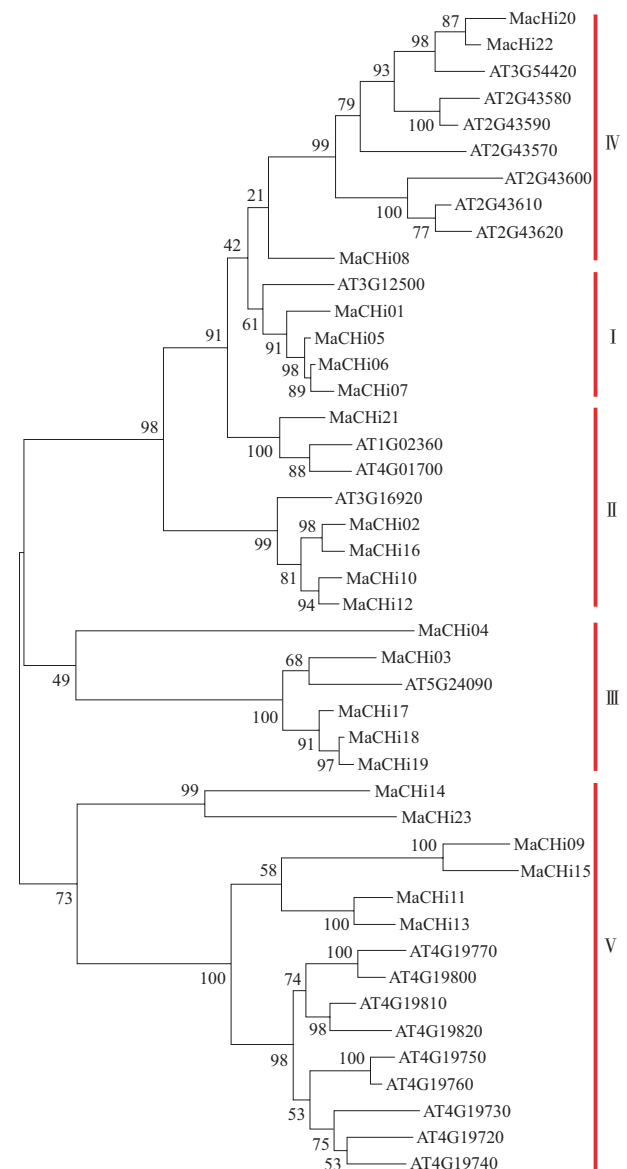
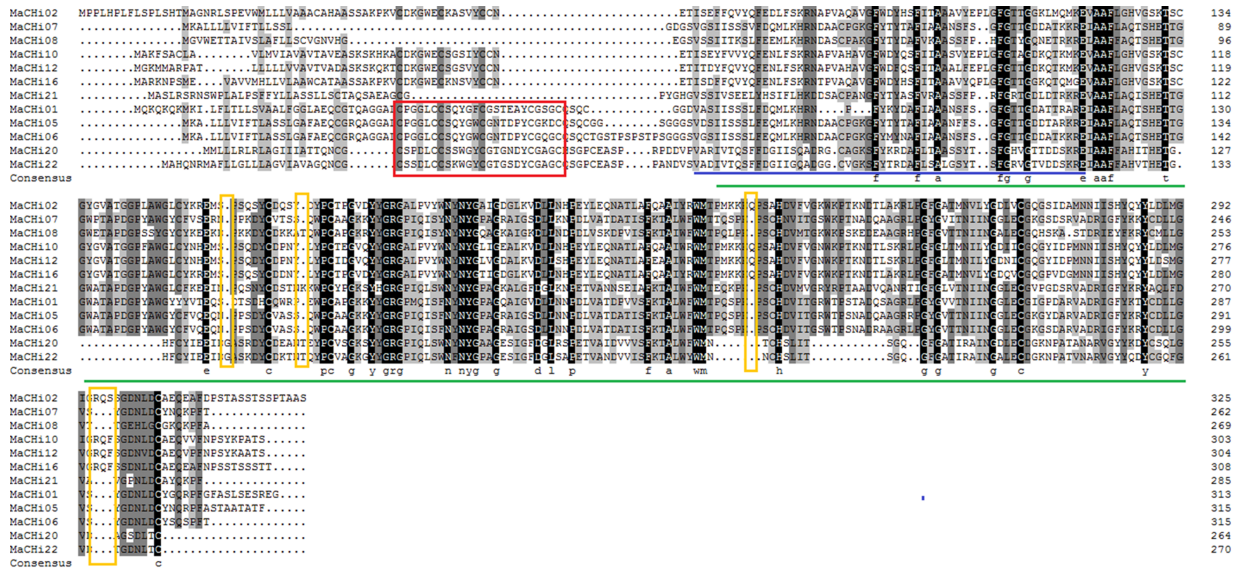


图 1 MaCHis 的系统进化树
Fig.1 Phylogenetic tree of the MaCHis

和 MaChi23 7 个成员均有一个谷氨酸活性中心位点; MaChi04 的活性中心位点为甘氨酸; MaChi09、

MaChi15 和 MaChi18 的活性中心位点则是谷氨酰胺(图 3)。

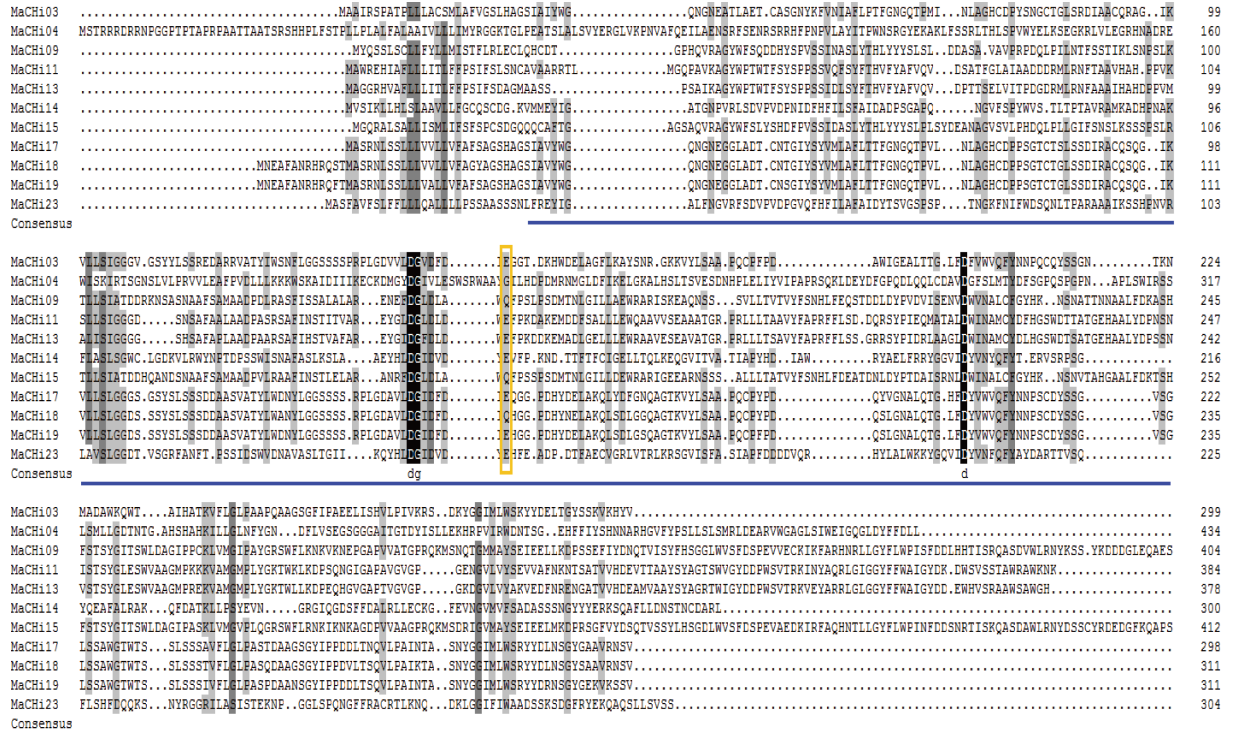


红色实线框表示富含半胱氨酸几丁质结合域 CBD (PS00026); 绿色下划线表示 Glyco_hydro_19 催化结构域; 蓝色下划线表示可变交联区区域; 黄色框表示活性位点位置

The red frame indicates cysteine-rich chitin binding domains (PS00026), the green underline indicates the catalytic domain of Glyco_hydro_19, the blue underline indicates variable crosslinking regions, the yellow frames indicates the position of the active site

图 2 GH19 基因家族成员保守结构域氨基酸序列比对

Fig.2 Alignment of conserved regions of GH19 amino acid sequences



蓝色下划线表示 Glyco_hydro_18 催化结构域; 黄色实线框表示活性位点位置

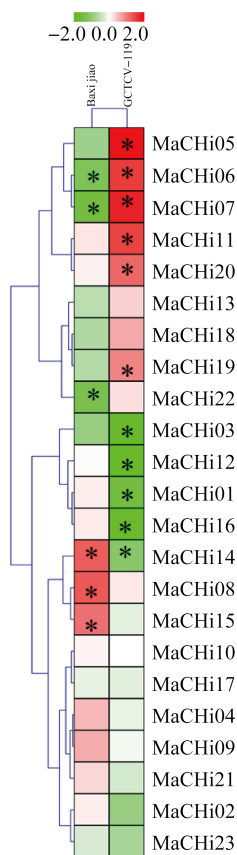
The blue underline indicates the Glyco_hydro_18 catalytic domain (PF00704), the yellow frames indicates the position of the active site

图 3 GH18 基因家族成员保守结构域氨基酸序列比对

Fig.3 Alignment of conserved regions of GH18 amino acid sequences

2.4 Foc TR4 处理后 *MaChi* 的表达热图

转录组数据分析表明接种 Foc TR4 后 *MaChi*05、*MaChi*06、*MaChi*07、*MaChi*11、*MaChi*19 和 *MaChi*20 在感病品种巴西蕉中呈下调表达或不表达, 在抗病品种 GCTCV-119 中均呈显著上调表达, 表明这些成员可能参与香蕉抗枯萎病过程。*MaChi*01、*MaChi*12、*MaChi*14 和 *MaChi*16 在 GCTCV-119 中呈显著下调表达, 在感病品种巴西蕉中呈上调表达或不表达, 说明这些成员可能以负调控的方式参与香蕉抗枯萎病过程。*MaChi*03 在巴西蕉和 GCTCV-119 中均出现显著的下调表达, 而其余的基因处于表达量较低或不表达状态, 表明上述 *MaChis* 成员可能不参与香蕉抗枯萎病过程(图 4)。



巴西蕉和 GCTCV-119 根系接种 Foc TR4 后 0 d 和 2 d 的表达数据, 此数据用 RPKM 值表示, 将 2 d 与 0 d 的表达数据的比值取对数 (\log_2)。 $\log_2 \leq -1$ 为表达量显著下调, $\log_2 \geq 1$ 为表达量显著上调, 使用 * 表示

The expression data of *Musa Baxijiao* and GCTCV-119, 0 d and 2 d after root inoculation with Foc TR4, indicated by RPKM, and the ratio of the expression data of 2 d to 0 d is taken as logarithm (\log_2). Where $\log_2 \leq -1$ means significantly down-regulated, and $\log_2 \geq 1$ means significantly up-regulated, as shown by *

图 4 *MaChi* 在巴西蕉和 GCTCV-119 接种 Foc TR4 后的表达热图

Fig.4 Expression heat map of *MaChi* in Baxijiao and GCTCV-119 after inoculation with Foc TR4

2.5 荧光定量 PCR 验证 *MaChi* 的表达

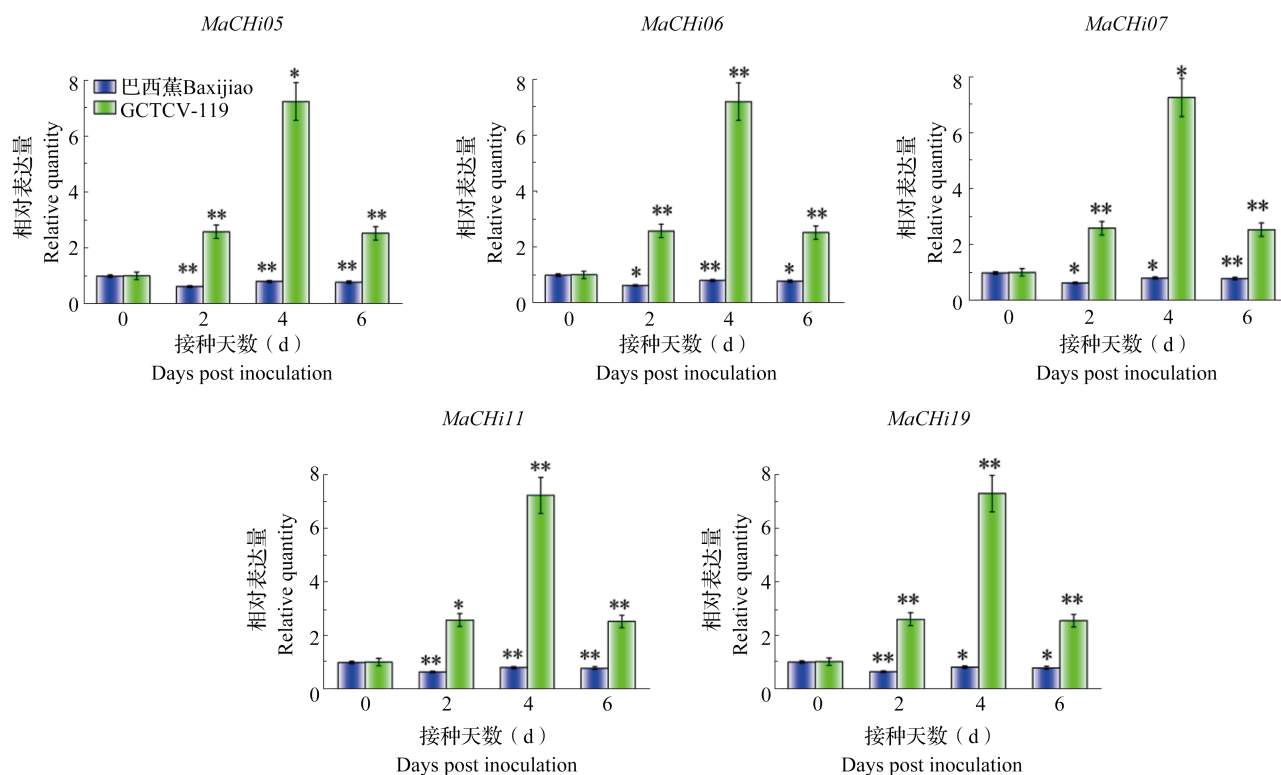
进一步选择 RPKM>10 的 *MaChis* (*MaChi*05、*MaChi*06、*MaChi*07、*MaChi*11 和 *MaChi*19) 进行荧光定量 PCR 验证。结果表明, 在感病品种中上述 5 个 *MaChis* 的相对表达量在接种 Foc TR4 后均呈下降趋势, 其中 *MaChi*05 和 *MaChi*11 接种 Foc TR4 后所有时间点上相对表达量均达到极显著差异水平; *MaChi*06、*MaChi*07、*MaChi*19 分别在接种 Foc TR4 后第 4 d、6 d 和 2 d 时相对表达量达到极显著差异水平, 所有成员均在接种后 2 d 时达到最低, 约为对照的 1/2; 在抗病品种中 *MaChi*05、*MaChi*06、*MaChi*07、*MaChi*11 和 *MaChi*19 的相对表达量在接种 Foc TR4 后显著增加, 在接种后 4 d 时达到最大, 是对照的 7 倍以上(图 5)。因此从相对表达量的变化上看, *MaChi*05、*MaChi*06、*MaChi*07、*MaChi*11 和 *MaChi*19 的表达在感病品种中被抑制, 而在抗病品种中显著被激活, 表明这些基因可能以正调控方式参与香蕉抗 Foc TR4 侵染的过程。以上结果与转录组结果一致, 证明转录组结果准确, 分析结果准确。

3 讨论

现如今由尖孢镰刀菌古巴专化型真菌引起的香蕉枯萎病已严重影响了香蕉产业的发展。几丁质酶是病程相关蛋白的一类, 可以催化病原体细胞壁中几丁质的水解从而抑制真菌的生长和繁殖, 提高植物对真菌的防御能力, 利用转基因技术将几丁质酶基因应用于抗病品种的培育已成为当前的研究热点。

本研究采用生物信息学的方法系统分析 *MaChi* 基因家族, 鉴定出 23 个 *MaChis* 基因, 它们编码的蛋白质平均分子量为 35.26 kDa, 等电点平均为 6.06(表 1), 这与之前的报道结果一致^[37], 说明这些基因是香蕉的几丁质酶基因。

典型的几丁质酶基因都具有 Glyco_hydro_18 和 Glyco_hydro_19 结构域^[38]。在本研究中, 蛋白质序列同源比对发现有 12 个 *MaChis* 成员含有完整 Glyco_hydro_19 催化结构域(图 2), 11 个 *MaChis* 成员包含完整 Glyco_hydro_18 催化结构域(图 3), 这些典型的特征证明 23 个 *MaChis* 基因均属于几丁质酶基因家族。几丁质结合的保守结构域 CBD 是几丁质酶基因的又一典型特征, 但只存在于部分成员中^[39]。在本研究中, 5 个 *MaChis* 成员 (*MaChi*01、*MaChi*05、*MaChi*06、*MaChi*20 和



MaChi 在同一香蕉品种接种 Foc TR4 2、4 和 6 d 后的表达分别与对照 0 d 的表达进行显著性分析。

** 表示在 $P < 0.01$ 水平上差异达到极显著水平

Significance analysis of *MaChi* expression in each of the banana varieties, 0, 2, 4 and 6 d after inoculation with Foc TR4. **Indicating that $P < 0.01$ means that the difference is extremely significant level

图 5 不同抗性香蕉品种接种 Foc TR4 后 *MaChi* 的表达

Fig.5 Expression of *MaChi* in different resistance banana varieties after inoculation with Foc TR4

MaChi22) 含有与几丁质结合的保守结构域 CBD, 他们都属于 GH19 亚家族, 这与其他作物报道的结果一致^[40]。聚类分析结果表明, 23 个 *MaChis* 基因家族成员分为 GH18 和 GH19 两个亚家族, 并根据其保守域与序列同源性又进一步将其分为 5 类 (I~V), 这与拟南芥及水稻的进化树分支状况一致^[29-30]。

几丁质酶作为一种重要的防御基因, 目前已从梨 (*Pyrus* spp.)^[22]、川西云杉 (*Picea likiangensis* var. *balfouriana* (Rehd. & Wilson) Hillier)^[41]、茶树 (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze)^[42]、兴安落叶松 (*Larix gmelinii* (Rupr.) Kuzen.)^[43]、香蕉^[44]、猕猴桃 (*Actinidia chinensis* var. *chinensis*)^[45]、棉花^[46] 和黄瓜 (*Cucumis sativus* L.)^[47] 等多种植物中克隆获得。将其作为外源基因转入植物中, 能显著增强其抗病性, 如通过根癌农杆菌介导法将几丁质酶转入可提高花生 (*Arachis hypogaea* L.) 对黑斑病^[48]、水稻对稻瘟病^[49]、西瓜 (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai) 对枯萎病^[50]、节瓜 (*Benincasa hispida* var. *chieh-qua* F.C. How) 对枯萎病^[51]、香蕉对叶斑病和线虫^[35] 的抗病能力。由此可见, 几丁质

酶与植物抗病防御有着密切的联系。在本研究中, 我们鉴定出 5 个高表达 (RPKM>10) 的 *MaChis* 参与香蕉抗枯萎病过程, 并推测这 5 个 *MaChis* 在香蕉与 Foc TR4 互作中发挥着重要作用。

参考文献

- [1] Wang Z, Zhang J B, Jia C H, Liu J H, Li Y Q, Yin X M, Xu B Y, Jin Z Q. De Novo characterization of the banana root transcriptome and analysis of gene expression under *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 infection. BMC Genomics, 2012, 13 (1): 650
- [2] 苗红霞, 王园, 徐碧玉, 刘菊华, 贾彩红, 张建斌, 王卓, 孙佩光, 金志强. 香蕉 *MaASR1* 基因的抗干旱作用. 植物学报, 2014, 49 (5): 548-559
- [3] Miao H X, Wang Y, Xu B Y, Liu J H, Jia C H, Zhang J B, Wang Z, Sun P G, Jin Z Q. Drought resistance of banana *MaASR1* gene. Bulletin of Botany, 2014, 49 (5): 548-559
- [4] 王静毅, 刘菊华, 金志强, 徐碧玉. 香蕉冷胁迫相关 MicroRNA 差异表达分析. 中国农学通报, 2019, 35 (5): 49-57
- [5] Wang J Y, Liu J H, Jin Z Q, Xu B Y. Analysis of differential expression of MicroRNAs related to banana cold stress. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2019, 35 (5): 49-57
- [6] 吉福桑, 杨振, 徐亚, 汪奇, 李新国, 乔飞. 盐胁迫下巴西蕉叶片的转录组和蛋白质组关联分析. 分子植物育种, 2020, 18 (23): 7671-7678

- Ji F S, Yang Z, Xu Y, Wang Q, Li X G, Qiao F. Association analysis of transcriptome and proteome of Brazilian banana leaves under salt stress. *Molecular Plant Breeding*, 2020, 18 (23): 7671-7678
- [5] James D, Anthony J, Jean Y P, Har J H, Mark S, Santy P E, Fernando G B, Gert K, Peter W, Kerrie M, Robert H. Transgenic Cavendish bananas with resistance to fusarium wilt tropical race 4. *Nature Communications*, 2017 (8): 1496
- [6] Wang Z, Jia C H, Li J Y, Huang S Z, Xu B Y, Jin Z Q. Activation of salicylic acid metabolism and signal transduction can enhance resistance to Fusarium wilt in banana (*Musa acuminata* L. AAA group, cv. Cavendish). *Functional and Integrative Genomics*, 2014, 15 (1): 47-62
- [7] 任陪娣, 谢碧玉, 陈翠, 贾彩红, 王静毅, 张建斌, 徐碧玉, 王卓, 金志强. 香蕉 NPR1 基因家族的鉴定及在枯萎病菌胁迫下表达分析. *植物遗传资源学报*, 2019, 20 (6): 1621-1629
- Ren P D, Xie B Y, Chen C, Jia C H, Wang J Y, Zhang J B, Xu B Y, Wang Z, Jin Z Q. Identification of banana NPR1 gene family and expression analysis under fusarium wilt stress. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2019, 20 (6): 1621-1629
- [8] Ploetz R C. Fusarium wilt of banana. *Phytopathology*, 2015, 105 (12): 1512-1521
- [9] Zheng S J, García-Bastidas F A, Li X, Zeng L, Bai T, Xu S, Yin K, Li H, Fu G, Yu Y, Yang L, Nguyen H C, Douangboupah B, Khaing A A, Drenth A, Seidl M F, Meijer H J G, Kema G H J. New geographical insights of the latest expansion of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 into the greater Mekong Subregion. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 457
- [10] Mostert D, Molina A B, Daniells J, Fourie G, Hermanto C, Chao C P, Fabregar E, Sinohin V G, Masdek N, Thangavelu R, Li C, Yi G, Mostert L, Viljoen A. The distribution and host range of the banana Fusarium wilt fungus, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, in Asia. *PLoS ONE*, 2017, 12 (7): e0181630
- [11] 施祖国. 植物镰刀菌枯萎病防治的研究进展. *现代农业科技*, 2016 (20): 102-103
- Shi Z G. Research progress in the control of fusarium wilt of plants. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2016 (20): 102-103
- [12] 孙勇, 曾会才, 彭明, 王旭初, 易小平. 香蕉枯萎病致病分子机理与防治研究进展. *热带作物学报*, 2012, 33 (4): 759-766
- Sun Y, Zeng H C, Peng M, Wang X C, Yi X P. Research progress on the pathogenic molecular mechanism and control of banana wilt. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2012, 33 (4): 759-766
- [13] Li X J, Li K, Zhou D B, Zhang M Y, Qi D F, Jing T, Zang X P, Qi C L, Wang W, Xie J H. Biological control of banana wilt disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* using *Streptomyces* sp. H4. *Biological Control*, 2021, 155: 104524
- [14] Mir Z A, Ali S, Shivaraj S M, Bhat J A, Singh A, Yadav P, Rawat S, Paplao P K, Grover A. Genome-wide identification and characterization of chitinase gene family in *Brassica juncea* and *Camelina sativa* in response to *Alternaria brassicae*. *Genomics*, 2020, 112 (1): 749-763
- [15] Henrissat B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal*, 1991, 280 (2): 309-316
- [16] Henrissat B, Bairoch A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal*, 1993, 293 (3): 781-788
- [17] Oliveira S T, Azevedo M I G, Cunha R M S, Silva C F B, Muniz C R, Monteiro-Júnior J E, Carneiro R F, Nagano C S, Girão M S, Freitas C D T, Grangeiro T B. Structural and functional features of a class VI chitinase from cashew (*Anacardium occidentale* L.) with antifungal properties. *Phytochemistry*, 2020, 180: 112527
- [18] Renner T, Specht C D. Molecular and functional evolution of class I chitinases for plant carnivory in the Caryophyllales. *Molecular Biology and Evolution*, 2012, 29 (10): 2971-2985
- [19] Liu G D, Wei X M, Qin Y Q, Qu Y B. Characterization of the endoglucanase and glucomannanase activities of a glycoside hydrolase family 45 protein from *Penicillium decumbens* 114-2. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2010, 56 (3): 223-229
- [20] Xu J, Xu X, Tian L, Wang G, Zhang X, Wang X, Guo W. Discovery and identification of candidate genes from the chitinase gene family for *Verticillium dahliae* resistance in cotton. *Scientific Reports*, 2016, 29 (6): 29022
- [21] Umamoto N, Kanda Y, Ohnuma T, Osawa T, Numata T, Sakuda S, Taira T, Fukamizo T. Crystal structures and inhibitor binding properties of plant class V chitinases: the cycad enzyme exhibits unique structural and functional features. *The Plant Journal*, 2015, 82 (1): 54-66
- [22] 李伟阳, 曾斌, 李疆, 田嘉, 李秀根, 王苏珂. 梨几丁质酶基因克隆及其生物信息学分析. *中国农学通报*, 2015, 31 (9): 184-193
- Li W Y, Zeng B, Li J, Tian J, Li X G, Wang S K. Gene cloning of pear chitinase and its bioinformatics analysis. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2015, 31 (9): 184-193
- [23] Park S M, Kim D H, Truong N H, Itoh Y. Heterologous expression and characterization of class III chitinases from rice (*Oryza sativa* L.). *Enzyme and Microbial Technology*, 2002, 30 (6): 697-702
- [24] Rao D H, Gowda L R. Abundant class III acidic chitinase homologue in tamarind (*Tamarindus indica*) seed serves as the major storage protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56 (6): 2175-2182
- [25] Sun X 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. *Biochemical Genetics*, 2012, 50 (7-8): 600-615
- [26] Grover A. Plant chitinases: genetic diversity and physiological roles. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2012, 31 (1): 57-73
- [27] Chen X W, Niks R E, Hedley P E, Morris J, Druka A, Marcel T C, Vels A, Waugh R. Differential gene expression in nearly isogenic lines with QTL for partial resistance to *Puccinia hordei* in barley. *BMC Genomics*, 2010, 11 (1): 629
- [28] 徐恩静. 小麦几丁质酶基因的检测及酶活性测定. 合肥: 安徽农业大学, 2011
- Xu E J. Detection of wheat chitinase gene and determination of enzyme activity. Hefei: Anhui Agricultural University, 2011
- [29] Passarinho P A, de Vries S C. *Arabidopsis* chitinases: a genomic survey. *Arabidopsis Book*, 2002, 1: e0023
- [30] Wu J, Wang Y, Kim S T, Kim S G, Kang K Y. Characterization of a newly identified rice chitinase-like protein (OsCLP) homologous to xylanase inhibitor. *BMC Biotechnology*, 2013, 13: 4
- [31] Xu J, Xu X, Tian L, Wang G, Zhang X, Wang X, Guo W. Discovery and identification of candidate genes from the chitinase gene family for *Verticillium dahliae* resistance in cotton. *Science Reports*, 2016, 6: 29022

- [32] Chen J, Piao Y, Liu Y, Li X, Piao Z. Genome-wide identification and expression analysis of chitinase gene family in *Brassica rapa* reveals its role in clubroot resistance. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology*, 2018, 270: 257-267
- [33] Cao J, Tan X. Comprehensive analysis of the chitinase family genes in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Plants* (Basel, Switzerland), 2019, 8(3): 52
- [34] 荐红举, 万梦圆, 付毅, 丁艺, 琚熙三, 尚丽娜, 李辉, 王季春, 胡柏耿, 吕典秋. 马铃薯 CHI 家族基因鉴定及其对外源水杨酸和茉莉酸的响应分析. *园艺学报*, 2021, 48(1): 83-95
Jian H J, Wan M Y, Fu Y, Ding Y, Ju X S, Shang L N, Li H, Wang J C, Hu B G, Lv D Q. Potato CHI family gene identification and its response to exogenous salicylic acid and jasmonic acid analysis. *Acta Horticulture*, 2021, 48(1): 83-95
- [35] Backiyarani S, Uma S, Nithya S, Chandrasekar A, Saraswathi M S, Thangavelu R, Mayilvaganan M, Sundararaju P, Singh N K. Genome-wide analysis and differential expression of chitinases in banana against root lesion nematode (*Pratylenchus coffeae*) and eumusa leaf spot (*Mycosphaerella eumusae*) pathogens. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2015, 175(8): 3585-3598
- [36] Martin G, Baurens F C, Droc G, Rouard M, Cenci A, Kilian A, Hastie A, Doležel J, Aury J M, Alberti A, Carreel F, D'Hont A. Improvement of the banana "*Musa acuminata*" reference sequence using NGS data and semi-automated bioinformatics methods. *BMC Genomics*, 2016, 7: 243
- [37] 李惠敏, 李璐璐, 陈玉梅, 李佳慧. 罗汉果几丁质酶基因家族的生物信息学分析. *生物信息学*, 2019, 17(3): 167-174
Li H M, Li L L, Chen Y M, Li J H. Bioinformatics analysis of chitinase gene family in *Momordica grosvenori*. *Bioinformatics*, 2019, 17(3): 167-174
- [38] 欧阳石文, 赵开军, 冯兰香. 植物几丁质酶的结构与功能、分类及进化. *植物学通报*, 2001, 18(4): 418-426
Ouyang S W, Zhao K J, Feng L X. The structure, function, classification and evolution of plant chitinases. *Bulletin of Botany*, 2001, 18(4): 418-426
- [39] 黄乾生, 谢晓兰, 陈清西. 几丁质酶的结构特征与功能. *厦门大学学报: 自然科学版*, 2008, 47(2): 232-235
Huang Q S, Xie X L, Chen Q X. The structural characteristics and functions of chitinase. *Journal of Xiamen University: Natural Science Edition*, 2008, 47(2): 232-235
- [40] 徐文, 周腾胜, 鲁丹丹, 安素妨, 侯锦娜, 栗根义. 甘蓝型油菜几丁质酶基因家族进化及其应答病菌的表达分析. *河南农业科学*, 2020, 49(2): 89-103
Xu W, Zhou T S, Lu D D, An S F, Hou J N, Li G Y. The evolution of the chitinase gene family in *Brassica napus* and the expression analysis of its response pathogens. *Henan Agricultural Sciences*, 2020, 49(2): 89-103
- [41] 刘利娟, 刘裕峰, 杨帅, 刘应高. 川西云杉几丁质酶基因 PICH1 的克隆、表达与生物信息学分析. *植物科学学报*, 2019, 37(4): 503-512
Liu L J, Liu Y F, Yang S, Liu Y G. Cloning, expression and bioinformatics analysis of the chitinase gene PICH1 from western Sichuan spruce. *Acta Plant Science*, 2019, 37(4): 503-512
- [42] 朱晨, 张舒婷, 常笑君, 赵姗姗, 王仲, 许长同, 张梓浩, 林玉玲, 赖钟雄, 郭玉琼. 茶树几丁质酶基因的克隆及其在干旱胁迫下的表达分析. *热带作物学报*, 2017, 38(5): 894-902
Zhu C, Zhang S T, Chang X J, Zhao S S, Wang Z, Xu C T, Zhang Z H, Lin Y L, Lai Z X, Guo Y Q. The cloning of tea chitinase gene and its expression analysis under drought stress. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2017, 38(5): 894-902
- [43] 余利敏. 兴安落叶松几丁质酶基因的克隆及表达特性分析. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2014
Yu L M. Cloning and expression characteristics analysis of chitinase gene from *Larixgmelini*. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2014
- [44] 张妙霞. 野生香蕉 (*Musa* spp, AB group) 抗寒相关基因的克隆与表达分析. 福州: 福建农林大学, 2010
Zhang M X. Cloning and expression analysis of cold tolerance-related genes in wild banana (*Musa* spp., AB group). Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2010
- [45] 贺哲, 王园秀, 张圣洁, 蒋军喜. 猕猴桃几丁质酶基因克隆及生物信息学分析. *江西农业大学学报*, 2018, 40(6): 1241-1247
He Z, Wang Y X, Zhang S J, Jiang J X. Chitinase gene cloning and bioinformatics analysis of kiwi fruit. *Journal of Jiangxi Agricultural University*, 2018, 40(6): 1241-1247
- [46] 马银平, 王付欣, 杨淳淋, 沈法富, 夏桂先. 海岛棉几丁质酶基因 *GbCHI* 的克隆与功能分析. *研究学报*, 2012, 34(2): 240-247
Ma Y P, Wang F X, Yang C L, Shen F F, Xia G X. Cloning and functional analysis of the chitinase gene *GbCHI* of sea island cotton. *Chinese Journal of Research*, 2012, 34(2): 240-247
- [47] 罗晶晶, 张仁英, 齐晓花, 徐强, 陈学好. 黄瓜几丁质酶基因克隆及与白粉病抗性关系的初步研究. *分子植物育种*, 2015, 13(7): 1584-1591
Luo J J, Zhang R Y, Qi X H, Xu Q, Chen X H. Cucumber chitinase gene cloning and preliminary study on its relationship with powdery mildew resistance. *Molecular Plant Breeding*, 2015, 13(7): 1584-1591
- [48] 郭悦, 姜平平, 潘雷雷, 周文杰, 徐磊, 张茹琴, 隋炯明, 郭宝太, 王晶珊, 乔利仙. 花生几丁质酶基因的克隆及抗病性验证. *华北农学报*, 2018, 33(6): 42-48
Guo Y, Jiang P P, Pan L L, Zhou W J, Xu L, Zhang R Q, Sui J M, Guo B T, Wang J S, Qiao L X. Cloning and disease resistance verification of peanut chitinase gene. *North China Agricultural Journal*, 2018, 33(6): 42-48
- [49] Nishizawa Y, Nishio Z, Nakazono K, Soma M, Nakajima E, Ugaki M, Hibi T. Enhanced resistance to blast (*Magnaporthe grisea*) in transgenic japonica rice by constitutive expression of rice chitinase. *Theoretical and Applied Genetics*, 1999, 99(3): 383-390
- [50] 王果萍, 王景雪, 孙毅, 崔贵梅, 孟玉平, 乔燕祥. 几丁质酶基因导入西瓜植株及其抗病性鉴定研究. *植物遗传资源学报*, 2003, 4(2): 104-109
Wang G P, Wang J X, Sun Y, Cui G M, Meng Y P, Qiao Y X. Introducing chitinase gene into watermelon plant and its disease resistance identification. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2003, 4(2): 104-109
- [51] 赵芹, 谢大森, 何晓明, 彭庆务, 罗少波, 陈俊秋. 节瓜抗镰刀菌酸突变体内切几丁质酶基因的克隆与植物表达载体构建. *热带作物学报*, 2016, 37(3): 539-547
Zhao Q, Xie D S, He X M, Peng Q W, Luo S B, Chen J Q. Cloning and plant expression vector construction of chitinase gene in chiequat resistant mutants. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2016, 37(3): 539-547