

马铃薯腐烂茎线虫 L 型半胱氨酸蛋白酶新基因 (*Dd-cpl-1*) 的克隆与序列分析

王高峰^{1,2}, 彭德良², 孙建华¹, 黄文坤², 彭焕², 龙海波²

1 天津师范大学生命科学学院, 天津 300387

2 中国农业科学院植物保护研究所 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193

摘要: L 型半胱氨酸蛋白酶基因 (Cathepsin L-like cysteine proteinase gene) 为与植物寄生线虫寄生能力相关的多功能基因。运用 RT-PCR 和 RACE 的方法从马铃薯腐烂茎线虫 *Ditylenchus destructor* 中克隆出 1 个 L 型半胱氨酸蛋白酶新基因 *Dd-cpl-1* (GenBank 登录号为 GQ180107)。该基因 *Dd-cpl-1* cDNA 全长序列含有 1 个 1 131 bp 的开放性阅读框 (ORF), 编码 376 个氨基酸残基, 其 5' 末端及 3' 末端分别含有 29 bp 和 159 bp 的非编码区 (UTR)。 *Dd-cpl-1* 内含子外显子结构分析结果表明, 其基因组序列包含 7 个内含子, 且各内含子两端剪接位点序列遵守 GT/AG 规则。 *Dd-cpl-1* 基因推定的蛋白 Dd-CPL-1 与松材线虫 L 型半胱氨酸蛋白酶高度同源, 一致性达到 77%。以不同物种中 L 型半胱氨酸蛋白酶氨基酸序列进行比对分析, 推测推定的蛋白 Dd-CPL-1 含有 L 型半胱氨酸蛋白酶基因家族高度保守的催化三联体 (Cys¹⁸³, His³²² 和 Asn³⁴³) 以及 ERFNIN 基系和 GNFD 基系。半胱氨酸蛋白酶系统发育分析表明, *Dd-cpl-1* 属于由 L 型半胱氨酸蛋白酶组成的进化分支。 *Dd-cpl-1* 的这些序列特征进一步表明其为 L 型半胱氨酸蛋白酶基因。这是首次在马铃薯腐烂茎线虫中克隆到的 L 型半胱氨酸蛋白酶, 为今后在蛋白水平对其进行进一步的功能分析提供基础。

关键词: 马铃薯腐烂茎线虫, L 型半胱氨酸蛋白酶, *Dd-cpl-1*

Cloning and sequence analysis of a new cathepsin L-like cysteine proteinase gene from *Ditylenchus destructor*

Gaofeng Wang^{1,2}, Deliang Peng², Jianhua Sun¹, Wenkun Huang², Huan Peng², and Haibo Long²

1 College of Life Sciences, Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China

2 The State Key Laboratory for Biology of Plant Disease and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

Abstract: The Cathepsin L-like cysteine proteinase genes (*cpls*) are multifunction genes related to the parasitic abilities of plant parasitic nematodes. A new cathepsin L-like cysteine proteinase gene (*Dd-cpl-1*) (GenBank Accession GQ 180107) was cloned from

Received: March 7, 2010; **Accepted:** August 11, 2010

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30871627), National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2009CB119200).

Corresponding author: Deliang Peng. Tel: +86-10-62815611; E-mail: dlpeng@ippcaas.cn

国家自然科学基金 (No. 30871627), 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2009CB119200) 资助。

Ditylenchus destructor by RT-PCR and RACE. The cDNA sequence consisted of a 1 131 bp open reading frame (ORF) encoding 376 amino acid residues that were flanked by a 29 bp 5'-untranslated region (UTR) and a 159 bp 3'-UTR. Genomic sequence analysis showed that *Dd-cpl-1* contained 7 introns, obeyed the GT/AG rule in the splice-site junctions. Homology analysis showed that the identity was 77% between *Dd-cpl-1* deduced protein Dd-CPL-1 and cathepsin L-like cysteine proteinase of *Bursaphelenchus xylophilus*. Multi-sequence alignment indicated that there were the catalytic triad (Cys¹⁸³, His³²² and Asn³⁴³) and two motifs ERFNIN motif and GNFD motif in deduced protein Dd-CPL-1. Cysteine proteinases phylogenetic analysis showed that *Dd-cpl-1* belonged to the sub-clade of cathepsin L-like cysteine proteinases.

Keywords: *Ditylenchus destructor*, cathepsin L-like cysteine proteinase, *Dd-cpl-1*

由马铃薯腐烂茎线虫 *Ditylenchus destructor* 引起的甘薯茎线虫病是制约我国甘薯生产的三大病害之一, 近年来已成为北方薯区最严重的病害。马铃薯腐烂茎线虫 *Ditylenchus destructor* Thorne, 又称马铃薯茎线虫, 是 1945 年作为一个单独的种从鳞球茎线虫 *Ditylenchus dipsaci* 中分离出来的, 许多国家和地区都将其列为检疫性有害生物^[1-3]。2006 年葛建军等在国内首次报道从马铃薯上分离到马铃薯腐烂茎线虫^[4]。宛菲等对来自国内的 21 个马铃薯腐烂茎线虫种群及 1 个韩国马铃薯腐烂茎线虫种群的 rDNA-ITS 进行测序研究, 根据 ITS 扩增片段大小将其分为 A 型和 B 型 2 类群体^[3]。依据 D2/D3 序列对上述 22 个马铃薯腐烂茎线虫不同种群进行系统进化分析, 结果表明 A 型和 B 型种群形成 2 个亚进化分支, 这说明了马铃薯腐烂茎线虫 A 型和 B 型群体在 ITS 区差异的实质^[5]。对马铃薯腐烂茎线虫的分子生物学研究相对于其他植物寄生线虫而言比较滞后, 目前只从马铃薯腐烂茎线虫中克隆出 3 个乙酰胆碱酯酶基因 (Acetylcholinesterase gene)^[6-8]和 2 个 β -1,4-内切葡聚糖酶基因 (β -1,4-endoglucanase gene)^[9]。

L 型半胱氨酸蛋白酶 (Cathepsin L-like cysteine proteinase) 亚基因家族为半胱氨酸蛋白酶 (Cysteine proteinase) 基因家族成员之一^[10]。半胱氨酸蛋白酶为多种内寄生生物的许多重要生理过程所必需, 如蜕皮、角质层重塑、胚胎发生、取食及免疫逃避^[11]。Urwin 等首次从植物寄生线虫大豆孢囊线虫 *Heterodera glycines* 中克隆出 1 个 L 型半胱氨酸

蛋白酶基因^[12]。现已从植物寄生线虫中克隆到多个 L 型半胱氨酸蛋白酶基因, 如大豆孢囊线虫 (GenBank Accession No. CAA70693)、南方根结线虫 *Meloidogyne incognita* (GenBank Accession No. CAD89795)、马铃薯白线虫 *Globodera pallida* (GenBank Accession No. AAY45896)、肾状肾形线虫 *Rotylenchulus reniformis* (GenBank Accession No. AAY45870) 和松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* (GenBank Accession No. ACH56225)。在秀丽小杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 中发现, *Ce-cpl-1* 为其早期胚胎发生所需^[13-14], 参与秀丽小杆线虫卵黄蛋白修饰的调节过程^[15]。人体寄生线虫马来丝虫 *Brugia malayi* 成年雌虫中的 *Bm-cpl-1* 和 *Bm-cpl-5* 与秀丽小杆线虫中的 L 型半胱氨酸蛋白酶基因因为不同种但功能相同的基因 (Functional orthologs)^[11]。在南方根结线虫中, 对 *Mi-cpl-1* 进行原位杂交实验, 结果表明其表达部位为南方根结线虫肠道细胞, 推测 *Mi-cpl-1* 可能主要在南方根结线虫肠道中起消化作用^[10]。Shingles 等对 *Mi-cpl-1* 的实时表达情况进行分析, 结果发现 *Mi-cpl-1* 在南方根结线虫整个生长发育阶段的表达水平较高, 且 RNAi 实验结果表明 *Mi-cpl-1* 与南方根结线虫的寄生能力相关^[16]。因此, 植物寄生线虫 L 型半胱氨酸蛋白酶参与植物寄生线虫侵染寄主植株的过程, 但其具体生物学功能仍不确定。在本研究中, 用简并引物 FP 和 RP^[17]从马铃薯腐烂茎线虫中首次克隆出 1 个 L 型半胱氨酸蛋白酶基因, 为今后在蛋白水平对其进行进一步的功能分析提供了基础。

1 材料与amp;方法

1.1 线虫材料

马铃薯腐烂茎线虫为本实验室收集、培养和保存的实验种群。马铃薯腐烂茎线虫培养方法为：在 PDA 培养基上接种半裸镰刀菌 *Fusarium semitectum*，25 °C 培养 4 d 后，将马铃薯腐烂茎线虫接种在半裸镰刀菌上，马铃薯腐烂茎线虫以半裸镰刀菌为食，25 °C 条件下进行生长繁殖^[8,18-19]。培养 40~50 d 后收集培养皿盖上的线虫，用 DEPC 处理水多次洗涤后，将约 100 μL 的线虫加入到 1.5 mL 的 DNase/RNase-free 离心管中，并加入 1 mL TRIzol，液氮速冻，-80 °C 保存备用。

大肠杆菌感受态 TOP010；普通 DNA 纯化试剂盒（天根生化科技有限公司）；EX *Taq* 酶（TaKaRa 公司）；TRIzol 试剂、Gene Race[®] Core Kit 及 SuperScribe[™] III First-Strand Synthesis System for RT-PCR 试剂盒（Invitrogen 公司），pGEM-T easy 系统试剂盒（Promega 公司）。

1.2 马铃薯腐烂茎线虫总 RNA 提取及 cDNA 第一链合成

采取冻融法用 TRIzol 试剂提取马铃薯腐烂茎线虫的总 RNA。按照 Gene Race[®] Core Kit 及 SuperScribe[™] III First-Strand Synthesis System for RT-PCR 试剂盒说明书步骤合成 5'端及 3'端完整的 cDNA 第一链。

1.3 马铃薯腐烂茎线虫的基因组 DNA 的提取

线虫 DNA 的提取参照彭德良的方法^[20]，略有改动。挑取 10 头马铃薯腐烂茎线虫于含有 10 μL ddH₂O 的 0.2 mL Eppendorf 管中，在液氮中速冻，用 75% 酒精消毒并用酒精灯烤干后自然冷却的玻璃棒研磨至冰融化，反复 3 次，加入 7 μL 的 WLB (Worm lysis buffer)，3 μL 蛋白酶 K 溶液 (600 μg/mL)，混匀，4 000 r/min 离心 5~10 s 收集虫液于管底，-20 °C 冷冻 30 min 以上，然后转入 PCR 仪，在 65 °C 下温育 1.5 h，95 °C 反应 10 min，取出后 12 000 r/min 离心 1 min，取上清，于 -20 °C 保存备用。

1.4 马铃薯腐烂茎线虫 cDNA 片段的同源克隆

以简并引物 FP 和 RP 为引物（表 1），以 cDNA 第一链为模板进行 PCR 扩增，反应条件为：94 °C 预变性 3 min；94 °C 变性 30 s，48 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 1 min，35 个循环；72 °C 延伸 10 min。扩增的 PCR 产物以 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测和分离，用普通 DNA 纯化试剂盒纯化后连接到 pGEM-T 载体中，转化 TOP010 感受态细胞，挑取阳性单克隆摇菌，以 FP、RP 为 PCR 引物，用上述同样的反应条件进行菌液检测，送上海生工生物工程有限公司测序。

表 1 本研究所用的 PCR 引物

Table 1 PCR primers used in this study

| Primer name | Primer sequence (5'-3') |
|-------------|---------------------------------|
| FP | TGYGGNTCNTGYTGGGCNTTY |
| RP | CCANGARTTYTTNACNARCCARTA |
| CPF1 | ATGGACTTGCCTGAAGGAGATGAG |
| CPF2 | GCTCTACAAAACGGGTGTCTACTAC |
| CPF3 | CGAGGACACTGAAAATGAGCGC |
| CPF4 | TGCTGGTGGTATCGCTATTCTGAC |
| CPR1 | TGGGTGGCAACGGCGATTTTCAACT |
| CPR2 | CCAAAGAACCAGTAGCACTAAACGC |
| CPR3 | CAAAATAATTAATAATCGTTGAAGTTGTACA |
| CPR4 | AGTCTCCGTGGTCTGGGTCA GTTCC |

1.5 3' RACE

根据测序获得的 EST 片段，用软件 Primer 5.0 及 DNAMAN 设计基因特异引物 CPF1、CPF2（表 1），以 cDNA 第一链为模板，以 3' GeneRace Primer 及 CPF1 为引物，PCR 反应条件为：94 °C 预变性 3 min；94 °C 变性 30 s，72 °C 延伸 1 min，5 个循环；94 °C 变性 30 s，70 °C 延伸 1 min，5 个循环；94 °C 变性 30 s，65 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 1 min，25 个循环；72 °C 延伸 10 min。再以该 PCR 产物为模板，以 3' GeneRace Nested Primer 和 CPF2 为 PCR 引物，进行 Nested PCR，PCR 反应条件与上述 PCR 反应条件相同。PCR 产物以 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离，纯化目的片段，再进行连接、转化、克隆、PCR 菌液检测后测序。

1.6 5' RACE

根据测序获得的 EST 片段, 用软件 Primer 5.0 及 DNAMAN 设计基因特异引物 CPR1、CPR2 (表 1)。以 cDNA 第一链为模板, 以 CPR1 和 5' GeneRace Primer 为引物, 进行 PCR 扩增; 再以 PCR 产物为模板, 以 CPR2 和 5' GeneRace Nested Primer 为引物, 进行 Nested PCR; PCR 反应条件与 3' RACE 相同。PCR 产物以 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离, 纯化目的片段, 再进行连接、转化、克隆、PCR 菌液检测后测序。

1.7 cDNA 全长扩增

依据 cDNA 拼接序列, 用软件 Primer 5.0 及 DNAMAN 设计基因特异引物 CPF3、CPR3 (表 1), 对 cDNA 序列进行全长扩增。以 cDNA 第 1 链为模板, 以 CPF3、CPR3 为引物进行 PCR 扩增, PCR 反应条件: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 65 °C 延伸 2 min, 5 个循环; 94 °C 变性 30 s, 53 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2.5 min, 25 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物以 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离, 纯化目的片段, 再进行连接、转化、克隆、PCR 菌液检测后测序。

1.8 基因组序列克隆

依据已获得的目的基因 cDNA 序列, 用 Primer 5.0 及 DNAMAN 在两端非编码区及其附近设计基因特异引物 CPF4、CPR4 (表 1)。以马铃薯腐烂茎线虫 DNA 为模板, 以 CPF4 与 CPR4 为引物进行 PCR 反应, 扩增目的基因基因组序列。PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min, 58 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 3 min, 37 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物以 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离, 纯化目的片段, 再进行连接、转化、克隆、PCR 菌液检测后测序。

1.9 L 型半胱氨酸蛋白酶基因 cDNA 序列及其编码蛋白氨基酸序列分析

在 NCBI 网站 (www.ncbi.nlm.nih.gov/) 进行基因 Blastx 同源比对分析, 用软件 DNAMAN 对基因 cDNA 序列进行开放性阅读框预测及其核苷酸序列

翻译, 以软件 MEGA 4.0 UPGMA 算法构建系统树。以 Compute pI/Mw (http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html) 进行蛋白分子量 (Mw) 预测。以 GSDS (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) 进行基因内含子外显子结构分析。以 SingalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 进行蛋白质信号肽预测。

2 结果与分析

2.1 马铃薯腐烂茎线虫 L 型半胱氨酸蛋白酶基因 cDNA 全长克隆与序列分析

用简并引物进行 PCR 扩增, 纯化此扩增产物并进行测序, 结果获得 1 个 498 bp 的 cDNA 片段 (图 1)。经 Blastx 分析发现该片段与松材线虫 L 型半胱氨酸蛋白酶 (GenBank 登录号: ACH56255) 高度同源, 一致性 (Identities) 达到 83%, 表明实验获得的 cDNA 片段为目的基因 L 型半胱氨酸蛋白酶基因片段。依据马铃薯腐烂茎线虫中该目的基因 cDNA 片段核苷酸序列设计基因特异引物, 用 RACE 技术对目的基因 3' 和 5' cDNA 末端序列进行克隆, 测序结果表明, 其大小分别为 383 bp 和 606 bp (图 2, 图 3)。对已获得的 3 个 cDNA 片段进行序列拼接, 结果获得了 1 个全长为 1 319 bp 的 cDNA 序列。在该 cDNA 序列两端设计基因特异引物, 进行 PCR 扩增、测序, 结果得到了 1 个大小为 966 bp 的 cDNA 片段 (图 4)。将此 966 bp 的 cDNA 片段和目的基因 cDNA 拼接序列进行比对分析, 分析结果显示两序列一致, 这表明马铃薯腐烂茎线虫中所获得的 L 型半胱氨酸蛋白酶基因 cDNA 拼接序列正确。马铃薯腐烂茎线虫中该 L 型半胱氨酸蛋白酶基因 cDNA 全长含有 1 个 1 131 bp 的开放性阅读框, 其 5' 端起始密码子 ATG 前有 1 个大小为 29 bp 的非编码区, 3' 端有 1 个 159 bp 的非编码区, 且 3' 端有多聚腺苷酸尾及加尾信号 (AATAAA)。这表明马铃薯腐烂茎线虫中该 L 型半胱氨酸蛋白酶基因 cDNA 序列为完整序列, 并命名为 *Dd-cpl-1*, 其 GenBank 登录号为 GQ 180107。

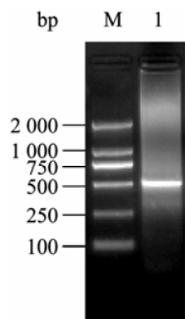


图1 CP简并引物PCR扩增

Fig. 1 Agarose gel (1.0%) showing the PCR product of degenerate primers FP & RP. M: DL2000 marker; 1: PCR product of degenerate primers FP & RP.

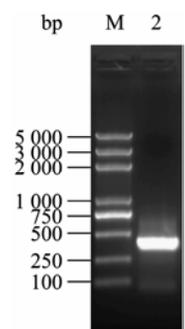


图2 *Dd-cpl-1* 基因 3' RACE 扩增

Fig. 2 Agarose gel (1.0%) showing the PCR product of *Dd-cpl-1* 3' RACE. M: DL2000 plus marker; 2: PCR product of *Dd-cpl-1* 3' RACE.

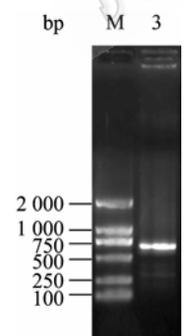


图3 *Dd-cpl-1* 基因 5' RACE 扩增

Fig. 3 Agarose gel (1.0%) showing the PCR product of *Dd-cpl-1* 5' RACE. M: DL2000 marker; 3: PCR product of *Dd-cpl-1* 5' RACE.

2.2 马铃薯腐烂茎线虫 L 型半胱氨酸蛋白酶基因基因组序列克隆及序列分析

根据已获得的马铃薯腐烂茎线虫 L 型半胱氨酸蛋白酶基因 cDNA 全长序列, 设计基因特异引物

CPF4 和 CPR4, 以马铃薯腐烂茎线虫 DNA 为模板扩增目的基因的基因组序列并测序, 结果获得了 1 个 2 242 bp 大小的 DNA 片段 (图 5)。依据马铃薯腐烂茎线虫 L 型半胱氨酸蛋白酶基因 cDNA 全长序列及其基因组序列进行内含子外显子结构分析发现, 马铃薯腐烂茎线虫 L 型半胱氨酸蛋白酶基因含有 7 个内含子, 且内含子两端拼接位点序列遵守 GT/AG 规则 (图 6)。

2.3 马铃薯腐烂茎线虫 L 型半胱氨酸蛋白酶氨基酸序列分析

根据马铃薯腐烂茎线虫 L 型半胱氨酸蛋白酶基因 cDNA 全长序列推测其编码蛋白含有 376 个氨基酸残基, 分子质量约为 42.4 kDa。以 SingalP 3.0 对

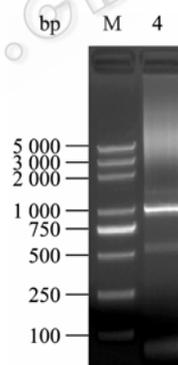


图4 *Dd-cpl-1* 基因 cDNA 全长 PCR 扩增

Fig. 4 Agarose gel (1.0%) showing the PCR product of CPF3 & CPR3. M: DL2000 plus marker; 4: PCR product of CPF3 & CPR3.

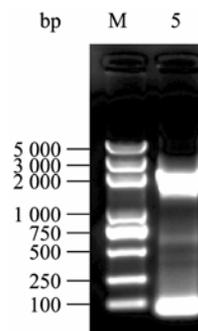


图5 马铃薯腐烂茎线虫 L 型半胱氨酸蛋白酶基因基因组序列 PCR 扩增

Fig. 5 Agarose gel (1.0%) showing the PCR product of CPF4 & CPR4. M: DL2000 plus marker; 5: PCR product of CPF4 & CPR4.

2.4 不同类型半胱氨酸蛋白酶系统进化分析

马铃薯腐烂茎线虫 L 型半胱氨酸蛋白酶与不同物种中不同类型的半胱氨酸蛋白酶系统进化分析表明, 其系统进化树包含 4 个进化分支 (Subclade), 分别由 B 型、L 型、S 型及 Z 型半胱氨酸蛋白酶组成; 其中, L 型半胱氨酸蛋白酶进化分支包含 2 个支系, 第 1 个支系由植物寄生线虫、人寄生线虫捻转血矛线虫 *Haemonchus contortus* 和自由生线虫秀丽小杆线虫 L 型半胱氨酸蛋白酶组成, 另 1 个支系由非线虫动物蓖子硬蜱 *Ixodes ricinus*、甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*、菜蛆 *Delia radicum* 与黄粉甲虫 *Tenebrio molitor* L 型半胱氨酸蛋白酶组成 (图 8)。这表明, 马铃薯腐烂茎线虫 L 型半胱氨酸蛋白酶同松材线虫、秀丽小杆线虫、大豆孢囊线虫、捻转血矛线虫、马铃薯白线虫、肾状肾形线虫和南方根结线虫 L 型半胱氨酸蛋白酶亲缘关系较近。同源比对分析结果显示, 马铃薯腐烂茎线虫 L 型半胱氨酸蛋白酶与上述 7 种线虫 L 型半胱氨酸蛋白酶一致性

(Identities) 分别为 77%、67%、66%、65%、64%、64% 和 60%, 这再一次表明马铃薯腐烂茎线虫的 *Dd-cpl-1* 为 L 型半胱氨酸蛋白酶基因。

3 讨论

研究发现, 南方根结线虫 *Mi-cpl-1* 在南方根结线虫肠道细胞中表达^[10], 并且在整个发育过程中的表达量很高, 同时还与南方根结线虫的寄生能力表现出相关性^[16]。但至今仍未见关于植物寄生线虫 L 型半胱氨酸蛋白酶组织免疫定位分析的报道。马铃薯腐烂茎线虫 L 型半胱氨酸蛋白酶信号肽预测结果表明, 其氨基端有 1 个由 20 个氨基酸残基组成的信号肽, 这表明马铃薯腐烂茎线虫 L 型半胱氨酸蛋白酶为分泌型蛋白。马铃薯腐烂茎线虫 L 型半胱氨酸蛋白酶的组织免疫定位分析, 将为阐明该酶在马铃薯腐烂茎线虫侵染寄主过程中的具体生物学功能提供新的线索。

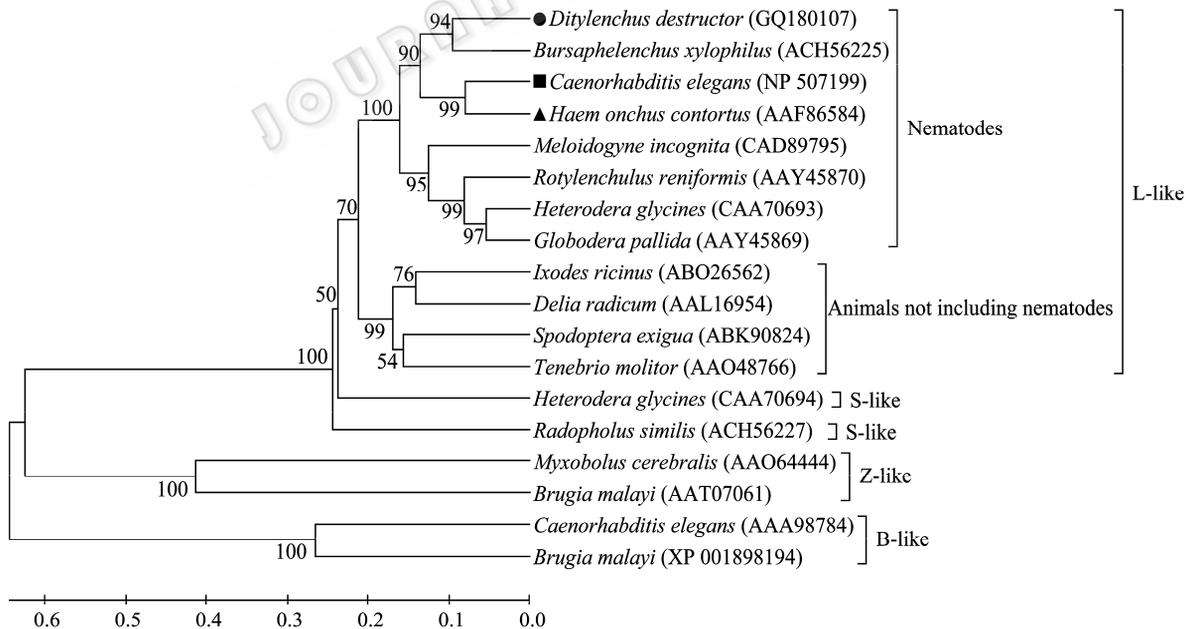


图 8 不同物种间半胱氨酸蛋白酶系统进化树

Fig. 8 Phylogenetic trees of cysteine proteinases from different species. ■: Cathepsin L-like cysteine proteinase (Ce-CPL-1) from free-living nematode *C. elegans*; ▲: Cathepsin L-like cysteine proteinase (Hc-CPL-1) from human parasitic nematode *Haemonchus contortus*; ●: Cathepsin L-like cysteine proteinase cloned from *D. destructor*. The GenBank Accession No. and the species' names of different cysteine proteinases are indicated in the ends of every branch.

人寄生线虫捻转血矛线虫 L 型半胱氨酸蛋白酶基因 *Hc-cpl-1* 能够对秀丽小杆线虫 L 型半胱氨酸蛋白酶基因 *Ce-cpl-1* 缺失突变体进行功能补偿。因此推测动物寄生线虫中的 L 型半胱氨酸蛋白酶基因与秀丽小杆线虫 L 型半胱氨酸蛋白酶基因功能同源^[25], Ford 等的实验结果进一步支持了这一观点^[11]。但目前仍未有证据表明植物寄生线虫 L 型半胱氨酸蛋白酶基因同动物寄生线虫 L 型半胱氨酸蛋白酶基因一样, 与秀丽小杆线虫 L 型半胱氨酸蛋白酶基因功能同源。本研究中, 以来自不同物种的 B 型、L 型、S 型和 Z 型半胱氨酸蛋白酶进行系统进化分析, 结果表明, 秀丽小杆线虫、捻转血矛线虫与包括马铃薯腐烂茎线虫在内的 5 种植物寄生线虫 L 型半胱氨酸蛋白酶形成一个支系, 独立于由非线虫动物中的 L 型半胱氨酸蛋白酶所形成的另一个支系 (图 8)。这表明, 植物寄生线虫中的 L 型半胱氨酸蛋白酶基因与秀丽小杆线虫及捻转血矛线虫 L 型半胱氨酸蛋白酶基因 *Ce-cpl-1* 和 *Hc-cpl-1* 亲缘关系较近。由此推测, 植物寄生线虫 L 型半胱氨酸蛋白酶基因可能与动物寄生线虫和秀丽小杆线虫 L 型半胱氨酸蛋白酶因为不同种系但功能相同的基因, 其参与植物寄生线虫的早期胚胎发育等过程。马铃薯腐烂茎线虫 L 型半胱氨酸蛋白酶基因 cDNA 全长与基因组序列的克隆及其相关序列特征分析为今后在蛋白水平阐明该基因的生物学功能提供了基础。

REFERENCES

[1] Thorne G. *Ditylenchus destructor* n. sp. the potato rot nematode and *Ditylenchus dipsaci* (Kühn, 1857) Fillipjev, 1936, the teasel nematode (Nematoda: Tylenchidae). Proc Helminthol Soc Washington, 1945, 12(2): 27-33.

[2] Lin MS, Wen L, Fang ZD. Potato rot nematode (*Ditylenchus destructor*) and stem nematode disease of sweet potato. *Jiangsu J Agr Sci*, 1999, 15(3): 186-190. 林茂松, 文玲, 方中达. 马铃薯腐烂线虫与甘薯茎线虫病. *江苏农业学报*, 1999, 15(3): 186-190.

[3] Wan F, Peng DL, Yang YW, et al. Species specific molecular diagnosis of *Ditylenchus destructor* populations

occurring in China. *Acta Phytopathol Sin*, 2008, 38(3): 263-270.

宛菲, 彭德良, 杨玉文, 等. 马铃薯腐烂茎线虫特异性分子检测技术研究. *植物病理学报*, 2008, 38(3): 263-270.

[4] Liu XB, Ge JJ, Tan ZQ, et al. First report of *Ditylenchus destructor* doing harm to potato in China. *Plant Prot*, 2006, 32(6): 157-158.

刘先宝, 葛建军, 谭志琼, 等. 马铃薯腐烂茎线虫在国内危害马铃薯的首次报道. *植物保护*, 2006, 32(6): 157-158.

[5] Yu HY, Peng DL, Hu XQ, et al. Phylogeny and sequences analysis of D2/D3 region of 28S rDNA of *Ditylenchus destructor* on sweet potato in China// Peng YL, Wang ZZ. Proc Annu Meeting Chin Soc Plant Pathol. Beijing: Chinese Agricultural Science Technology Press, 2008: 441.

于海英, 彭德良, 胡先奇, 等. 马铃薯腐烂茎线虫 28S rDNA-D2/D3 区序列分析//彭友良, 王震中. 中国植物病理学会 2008 年学术论文集. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2008: 441.

[6] Ding Z, Peng DL, Gao BD, et al. Molecular cloning and characterization of a new acetylcholinesterase gene *Dd-ace-1* from the *Ditylenchus destructor* on sweet potato//Liao JL, Peng DL, Duan YX. *Nematol Res China*. Beijing: Chinese Agricultural Science Technology Press, 2008, 2: 304-305.

丁中, 彭德良, 高必达, 等. 甘薯茎线虫乙酰胆碱酯酶基因 *Dd-ace-1* 全长 cDNA 的克隆和序列分析//廖金铃, 彭德良, 段玉玺. 中国线虫学研究第二卷. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2008, 2: 304-305.

[7] Ding Z, Peng DL, Huang WK, et al. Molecular cloning and characterization of an acetylcholinesterase gene *Dd-ace-2* from sweet potato stem nematode *Ditylenchus destructor*. *Chin J Biotech*, 2008, 24(2): 239-244.

丁中, 彭德良, 黄文坤, 等. 甘薯茎线虫乙酰胆碱酯酶基因 *Dd-ace-2* 全长 cDNA 的克隆和序列分析. *生物工程学报*, 2008, 24(2): 239-244.

[8] Ding Z, Peng DL, Gao BD, et al. Cloning and sequence analysis of a new acetylcholinesterase gene *ace-3* from *Ditylenchus destructor*. *J Agr Biotechnol*, 2008, 16(2): 326-331.

丁中, 彭德良, 高必达, 等. 甘薯茎线虫乙酰胆碱酯酶基因 *Dd-ace-3* 全长 cDNA 的克隆和序列分析. *农业生物技术学报*, 2008, 16(2): 326-331.

[9] Peng H. Cloning two new genes of β -1,4-endoglucanase from *Ditylenchus destructor* and functional analysis with

- RNA interference. Beijing: Chinese academy of agricultural sciences, 2008.
- 彭焕. 马铃薯腐烂茎线虫内切葡聚糖酶新基因的克隆及基于 RNAi 的功能初步研究. 北京: 中国农业科学院, 2008.
- [10] Neveu C, Abad P, Castagnone-Sereno P. Molecular cloning and characterization of an intestinal cathepsin L protease from the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Physiol Mol Plant Pathol*, 2003, 63(3): 159–165.
- [11] Ford L, Zhang J, Liu J, et al. Functional analysis of the cathepsin-like cysteine protease genes in adult *Brugia malayi* using RNA interference. *PLoS Negl Trop Dis*, 2009, 3(2): e377.
- [12] Urwin PE, Lilley CJ, McPherson MJ, et al. Characterization of two cDNAs encoding cysteine proteinases from the soybean cyst nematode *Heterodera glycines*. *Parasitol*, 1997, 114(6): 605–613.
- [13] Hashmi S, Britton C, Liu J, et al. Cathepsin L is essential for embryogenesis and development of *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem*, 2002, 277(5): 3477–3486.
- [14] Hashmi S, Zhang J, Oksov Y, et al. The *Caenorhabditis elegans* cathepsin Z-like cysteine protease, *Ce-CPZ-1*, has a multifunctional role during the worms' development. *J Biol Chem*, 2004, 279(7): 6035–6045.
- [15] Britton C, Murray L. Cathepsin L protease (CPL-1) is essential for yolk processing during embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Sci*, 2004, 117(21): 5133–5143.
- [16] Shingles J, Lilley CJ, Atkinson HJ, et al. *Meloidogyne incognita*: Molecular and biochemical characterisation of a cathepsin L cysteine proteinase and the effect on parasitism following RNAi. *Exp Parasitol*, 2007, 115: 114–120.
- [17] Lü CH, Xiao L, Mao ZC, et al. Molecular cloning and sequence analysis of cathepsin S-like cysteine proteinase genes of *Radopholus similis*. *Plant Protection*, 2008, 34(5): 17–22.
- 吕春花, 肖罗, 茆振川, 等. 相似穿孔线虫 S 型半胱氨酸蛋白酶基因克隆与序列分析. *植物保护*, 2008, 34(5): 17–22.
- [18] Young HK, Seung HO. *In vitro* culture and factors affecting population changes of *Ditylenchus destructor* of ginseng. *Korean J Plant Pathol*, 1995, 11(1): 39–46.
- [19] Xu JJ, Li SD, Yang ZW. Culture of potato rot nematode. *Acta Agr Boreali-occidentalis Sin*, 2004, 13(4): 77–80.
- 徐进军, 李世东, 杨之为. 马铃薯茎线虫的培养. *西北农业学报*, 2004, 13(4): 77–80.
- [20] Peng DL, Subbotin S, Mones M. rDNA restriction fragment length polymorphism of *Heterodera avenae* in China. *Acta Phytopathol Sin*, 2003, 33(4): 323–329.
- 彭德良, Subbotin S, Mones M. 小麦和禾谷胞囊线虫 (*Heterodera avenae*) 的核糖体基因 (rDNA) 限制性片段长度多态性研究. *植物病理学报*, 2003, 33(4): 323–329.
- [21] Wijffels GL, Panaccio M, Salvatore L, et al. The secreted cathepsin L-like proteinases of the nematode, *Fasciola hepatica*, contain 3-hydroxyproline residues. *Biochem J*, 1994, 299(Pt 3): 781–790.
- [22] Karrer KM, Peiffer SL, DiTomas ME. Two distinct gene subfamilies within the family of cysteine protease genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(7): 3063–3067.
- [23] Vernet T, Berti PJ, de Montigny C, et al. Processing of the papain precursor. The ionization state of a conserved amino acid motif within the pro region participates in the regulation of intramolecular processing. *J Biol Chem*, 1995, 270(18): 10838–10846.
- [24] Wiederanders B. Structure-function relationships in class CA1 cysteine peptidase propeptides. *Acta Biochim Pol*, 2003, 50(3): 691–713.
- [25] Britton C, Murray L. A cathepsin L protease essential for *Caenorhabditis elegans* embryogenesis is functionally conserved in parasitic nematodes. *Mol Biochem Parasitol*, 2002, 122(1): 21–33.