

吴志明, 董文琦, 党志红, 等. 半夏凝集素基因克隆及其对桃蚜的抗性研究 [J]. 南京农业大学学报, 2010, 33 (2): 45-50

半夏凝集素基因克隆及其对桃蚜的抗性研究

吴志明^{1,2}, 董文琦², 党志红³, 潘文亮³, 谢晓亮², 温春秀², 陈劲枫^{1*}

(1. 南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室/园艺学院, 江苏 南京 210095;

2. 河北省农林科学院经济作物研究所, 河北 石家庄 050051; 3. 河北省农林科学院植物保护研究所, 河北 保定 071000)

摘要: 研究了半夏凝集素 (*Pinellia ternata* agglutinin, PTA) 基因对桃蚜 (*Myzus persicae*) 的抗性。从半夏幼叶中提取总 RNA, 采用 RT-PCR 法分离克隆出 *PTA-1* 基因 cDNA 片段, 该基因在 GenBank 中登录号为 DQ092435。序列分析表明: 该 cDNA 片段全长为 810 bp, 编码 269 个氨基酸组成的蛋白, 具有单子叶植物甘露糖凝集素基因家族的特征, 含有 3 个由 4 个氨基酸 (QDNY) 组成的甘露糖专一结合位点, 与报道的天南星科凝集素基因氨基酸序列的同源性在 72.7% ~ 92.9%。构建了 35S 启动子控制下的 *PTA-1* 基因的植物表达载体 pBI121-*PTA-1*, 该载体含有抗卡那霉素的选择标记基因 (*npt II*), 利用根瘤农杆菌介导法转化烟草获得抗卡那霉素的植株。PCR 和半定量 RT-PCR 分析表明: *PTA-1* 基因已经整合到植物基因组中并在转录水平上得到了有效表达。抗蚜虫鉴定表明: 转基因植株有效地抑制了蚜虫的群体增长率, 平均抑制率达 77.02%, 表明该基因对同翅目害虫的抗虫基因工程有重要的应用价值。

关键词: 半夏凝集素; 基因克隆; 转基因烟草; 抗性; 桃蚜

中图分类号: S634.3

文献标志码: A

文章编号: 1000-2030(2010)02-0045-06

The gene cloning of *Pinellia ternata* agglutinin and its resistance to peach aphids (*Myzus persicae*)

WU Zhi-ming^{1,2}, DONG Wen-qi², DANG Zhi-hong³, PAN Wen-liang³,
XIE Xiao-liang², WEN Chun-xiu², CHEN Jin-feng^{1*}

(1. State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement/College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Economic Crop, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050051, China; 3. Institute of Plant Protection, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Baoding 071000, China)

Abstract: The effects of *PTA* gene encoding *Pinellia ternata* agglutinin (PTA) on the *Myzus persicae* were studied. Using total RNA isolated from *Pinellia ternata* young leaves, a cDNA containing *PTA-I* gene was amplified by RT-PCR and cloned, and the gene sequence was accepted and released by GenBank with accession number DQ092435. Sequence analysis results showed that this gene is of 810 base pairs, and encoding a lectin protein of 269 amino acids, it was found that the *PTA-I* gene had many common characters of mannose-binding lectin superfamily including three mannose-binding sites (QDNY). It showed 72.7%–92.9% homology among the reported monocotyledon mannose-binding lectins of Araceae. Using the vector pBI121 containing the selectable marker neomycin phosphotransferase (*npt II*) gene, we constructed a plant expression vector pBI121-*PTA-I* in which the *PTA-I* gene was under the control of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. Transgenic tobacco plants that are resistant to *npt II* were regenerated by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. PCR and semi-quantitative RT-PCR analyses confirmed that the *PTA-I* gene had integrated into the plant genome and was expressed at various levels in mRNA levels. The pest-resistance biological test showed that transgenic plant expressing *PTA-I* reduced the population increase rate of the *Myzus persicae*, and the average inhibition rate was 77.02%, showing that the *PTA-I* gene has applied value for plant transgenic engineering against homopteran insect pests.

Key words: *Pinellia ternata* agglutinin (PTA); gene cloning; transgenic tobacco plants; resistance; *Myzus persicae*

收稿日期: 2009-01-20

基金项目: 河北省农林科学院青年基金项目 (A06030101); 河北省自然科学基金项目 (C2009001301); 国家转基因重大专项资助项目 (2009ZX08002-005B)

作者简介: 吴志明, 博士研究生, 副研究员。* 通讯作者: 陈劲枫, 教授, 博导, 从事蔬菜遗传育种和生物技术研究, E-mail: jfchen@njau.edu.cn。

随着人们生活水平的不断提高,人们对无公害蔬菜的要求也越来越高,而同翅目害虫严重危害蔬菜作物,且这些害虫也是植物病毒的传播介体,常给蔬菜生产带来重大经济损失^[1]。化学农药的施用可减少虫害的同时引起一系列副作用,如农药残留、环境污染、诱导害虫产生抗药性和引起次要害虫的大发生等^[2]。利用基因工程技术导入抗虫基因创造抗虫蔬菜作物,是持续控制虫害的根本措施。已有研究^[3-5]表明,植物凝集素基因能有效控制同翅目昆虫,转植物凝集素基因的作物对蚜虫、褐飞虱等同翅目昆虫具有良好的抗性,显示了其在抗虫基因工程研究中的潜力。

天南星科植物半夏凝集素对棉蚜有强致死作用^[6-7]。Yao等^[8]首次从半夏中克隆了1个PTA基因,转基因植株对蚜虫具有显著抑制作用^[9]。由于凝集素抗虫活性与其和糖类可逆性结合的能力密切相关,如果结合位点突变使凝集素丧失与昆虫消化道糖的结合能力,那么它就丧失了抗虫活性^[10]。笔者从半夏中克隆了1个PTA-1基因,与Yao等^[8]报道的序列在糖结合位点具有明显差异,为了评价该基因的抗蚜虫活性,笔者利用植物双元载体pBI121构建了该基因的植物表达载体,并进行了转基因烟草抗蚜虫活性研究,以期利用该基因进行蔬菜作物抗蚜虫基因工程奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

半夏(*Pinellia ternata*)采自河北省农林科学院药用植物研究中心中药材种质资源圃。植物双元质粒载体pBI121和农杆菌菌株EHA105由中国农业科学院作物研究所赵开军研究员惠赠。

Trizol RNA提取试剂盒、M-MLV反转录酶、TaqDNA聚合酶、T₄DNA连接酶、pGEM-T Easy载体试剂盒、限制性内切酶购自Promega公司; dNTPs、凝胶回收试剂盒等购自TaKaRa公司;卡那霉素、氯霉素、利福平、头孢霉素等购自北京鼎国生物技术公司;PCR引物由北京赛百盛公司合成。

1.2 方法

1.2.1 PTA-1基因的克隆 以半夏幼叶为材料,按照Promega公司的Trizol RNA提取试剂盒说明书提取RNA。根据GenBank上的PTA基因序列(登录号为:AY191305)设计合成引物,上游引物P1:5'-AGAGTCTAGAATGGCCTCCAAGCTCCTCCTC-3',下游引物P2:5'-AGATGGGCCCGGAATTAATTCACCT-TCTCCGTCACACT-3',为了随后亚克隆方便,分别在引物的5'端加上了酶切位点Xba I和Sma I。以提取的总RNA为模板,按照M-MLV试剂说明书合成cDNA第1链。取1 μL cDNA进行常规PCR扩增,反应条件:94℃ 4 min; 94℃ 30 s, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min, 30个循环;最后72℃延伸10 min。

PCR产物按照常规方法克隆到质粒pGEM-T载体上,随机挑取2个克隆进行测序,并将序列提交GenBank,记为PTA-1,利用DNAMAN5.22分析软件与GenBank上的单子叶甘露糖结合凝集素基因比对分析。

1.2.2 植物表达载体的构建及转化 利用克隆测序的PTA-1基因序列,经Xba I和Sma I双酶切后将PTA-1基因亚克隆到植物载体pBI121的相应位点上,转化到农杆菌菌株EHA105中。按照王关林等^[11]的方法采用叶盘法转化烟草获得抗卡那霉素(*npt II*)标记的转化再生植株。

1.2.3 转基因植株的鉴定 1) PCR检测:剪取转基因植株和非转基因植株的幼叶,采用CTAB法提取基因组DNA^[12],提取的DNA模板量调整为50 ng·μL⁻¹,取1 μL作为模板进行PCR扩增,反应条件同1.2.1。

2) 半定量RT-PCR鉴定:对用PCR检测呈阳性的植株提取总RNA,进行半定量RT-PCR。参照马恢等^[13]的方法利用双重RT-PCR技术进行内标基因和PTA-1基因的双重RT-PCR检测,内标为马铃薯的线粒体NADH脱氢酶基因。

3) 抗蚜虫鉴定:将PCR分子检测呈阳性的7个不同的转基因单株进行接种鉴定,桃蚜采自河北省农林科学院植物保护研究所温室内烟草上自然发生的种群,于温室内饲养稳定一段时间后,选取健康活泼、生理状态一致的无翅成蚜进行试验。将室内饲养的桃蚜分别接种到8~10 d叶龄的转基因烟草和非转基因烟草植株中层叶片上,每株苗接无翅成蚜约20头,置于同一条件下(23~25℃)饲养,隔日调查记载各处理烟苗上蚜虫数量,直至15 d。按照袁正强等^[14]的方法以转基因烟草对蚜虫的种群抑制率作为指标,来评价各转基因烟草对蚜虫的毒力效果:种群抑制率=(对照株活蚜数-处理株活蚜数)/对照株活蚜数×100%。

2 结果与分析

2.1 PTA-1 基因 cDNA 序列比较分析

采用 RT-PCR 技术扩增出 1 条 810 bp 的 cDNA 片段, 经克隆测序后记为 PTA-1, 该序列在 GenBank 登录号为 DQ092435。利用 DNAMAN 分析软件将该基因与 GenBank 上的凝集素基因进行序列比对, 并在氨基酸水平上进行了同源性分析 (图 1)。结果表明: 该基因编码一个具有信号肽的前体蛋白, 根据预

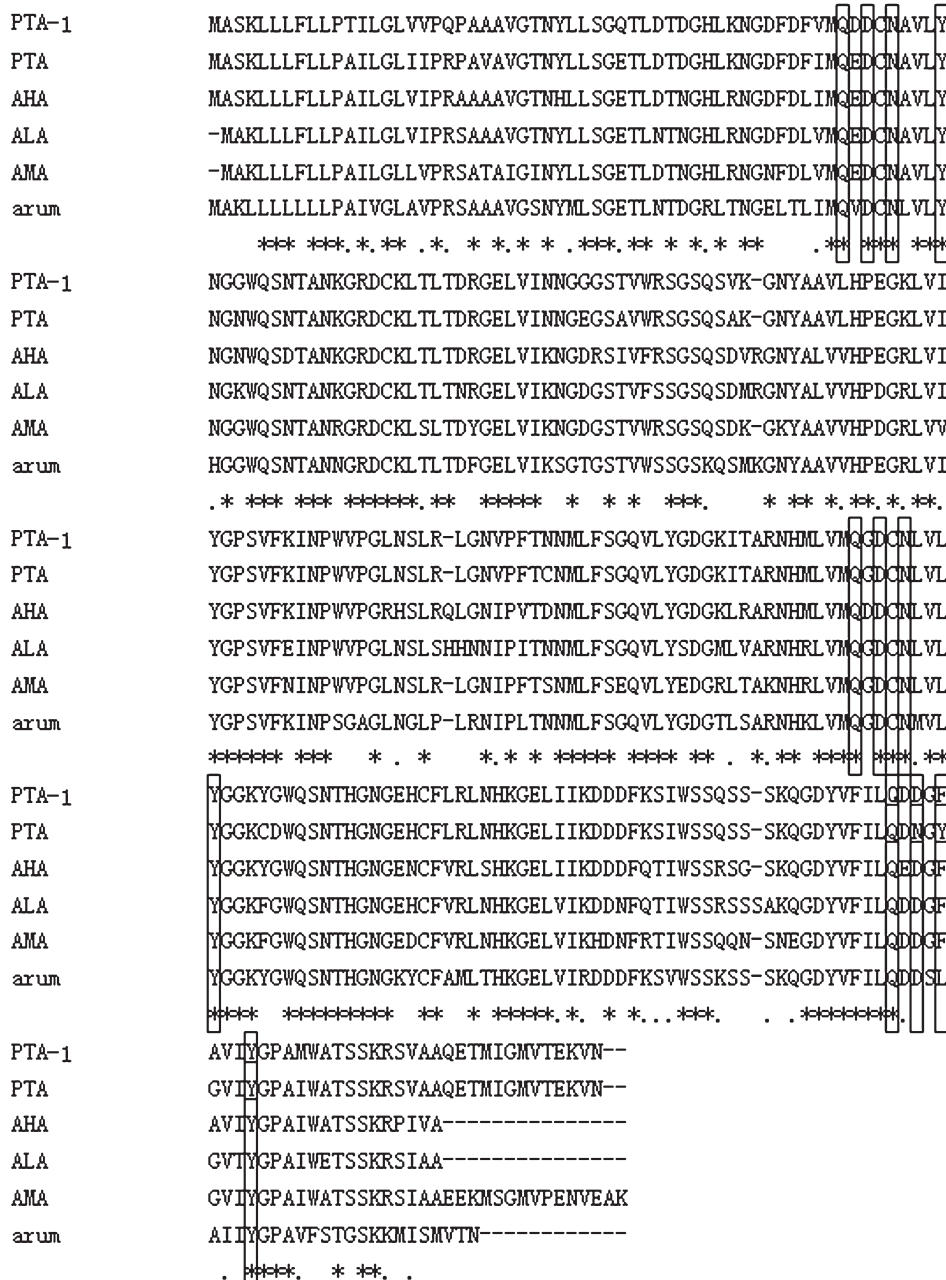


图 1 PTA-1 与单子叶植物甘露糖结合凝集素氨基酸序列比对结果

Fig. 1 The results of amino acid sequence alignment between PTA-1 and other monocotyledon mannose-binding agglutinins

AHA: 异叶天南星凝集素 *Arisaema heterophyllum* agglutinin (AY289926); ALA: 华南星凝集素 *Arisaema lobatum* agglutinin (AY557617); AMA: 海芋凝集素 *Alocasia macrorrhizos* agglutinin (DQ340864); PTA: 半夏凝集素 *Pinellia ternata* agglutinin (AY191305); ArMA: 疆南星凝集素 *Arum maculatum* agglutinin (U12198)

"*": 序列在该点具有相同的氨基酸 The site has the same amino acid; "·": 序列在该点存在氨基酸差异 The site has different amino acid; "□": 甘露糖凝集素的保守位点比较 The conserved lectin amino acid sequence comparison; "-": 表示在该序列位点无法比较 The sequence site cannot be compared.

测信号肽规则^[15]，其N端有一个24个氨基酸组成的信号肽，信号肽位于A₂₄:V₂₅之间，切除信号肽后成为具有杀虫活性的成熟蛋白，该基因推测的氨基酸序列包含3个由4个氨基酸组成的甘露糖专一结合点，这与天南星科其他植物如异叶天南星凝集素 (*Arisaema heterophyllum* agglutinin, AHA)、疆南星凝集素 (*Arum maculatum* agglutinin, ArMA) 等很相似^[16-17]。氨基酸序列同源性分析 (图2) 表明：甘露糖凝集素是一类同源性很高的凝集素，其中天南星科的凝集素归类为一组，其同源性在72.7%~92.9%之间，它们之间的糖结合位点序列非常保守，其中PTA-1基因的前两个结合位点为QDNY，第3个保守结合位点PTA-1基因与天南星科植物AHA、华南星凝集素 (*Arisaema lobatum* agglutinin, ALA) 和海芋凝集素 (*Alocasia macrorrhizos* agglutinin, AMA) 一样，均为QDFY，而与Yao等^[8]报道的PTA基因结合位点(QNYY)明显不同，如图1下划线所示。因此有必要对PTA-1基因抗蚜功能进行研究。

2.2 PTA-1 基因植物表达载体的构建

将经Xba I和Sma I双酶切的PTA-1基因片段亚克隆到植物双元表达载体pBI121的相应位点上，构建成35S启动子：PTA-1+GUS：NOS终止子结构的植物表达载体pBI121-PTA-1 (图3)。提取质粒经Xba I和Sma I双酶切验证，表明PTA-1基因以正确的阅读框架插入到pBI121载体中 (图4)，并将该载体转化到农杆菌菌株EHA105中用于随后的烟草转化，获得转基因植株。

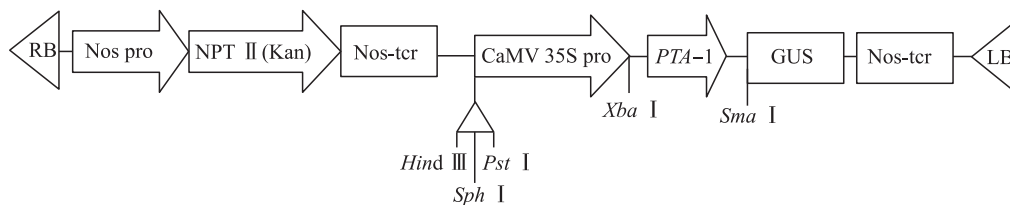


图3 植物转化载体 pBI121-PTA-1 表征示意图

Fig. 3 Schematic representation of transformation plasmid (pBI121-PTA-1)

2.3 转PTA-1基因烟草植株分子鉴定

对经卡那霉素筛选获得的抗性烟草再生植株进行PCR检测，其中7个不同的单株检测结果如图5所示。结果表明：PTA-1基因特异引物在非转基因烟草上只扩增出1条1200 bp的非特异带，通过提高PCR反应的退火温度和热启动进行扩增，这条带仍然得以扩增。而转基因烟草除了扩增出810 bp特异带外，也扩增出了1200 bp的带。这可能是烟草中含有与PTA-1基因高度同源的植物凝集素基因组DNA引起的，这条带不影响转基因植株检测结果的准确性，但可用作内标记区分转基因阴性植株和阳性植株。

对上述经过PCR检测的7株阳性植株进行了半定量RT-PCR检测，验证转基因植株PTA-1基因在转录水平的表达 (图6)。以马铃薯的线粒体NADH脱氢酶基因为内标，非转基因烟草扩增出大小约为190 bp的内标特异带，转基因烟草在扩增出

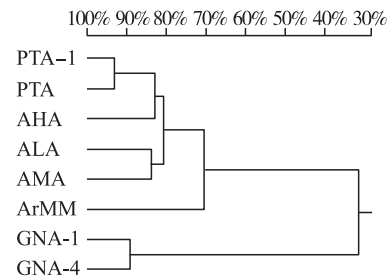


图2 不同单子叶植物甘露糖结合凝集素氨基酸序列同源聚类分析

Fig. 2 The homology tree analysis of the deduced amino acid sequence of monocotyledon mannose-binding agglutinins from different Araceae species

GNA-1: 雪花莲凝集素 *Galanthus nivalis* agglutinin (AF413087); GNA-4 (M55556)

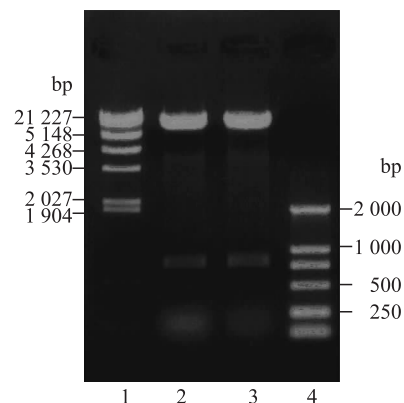


图4 表达载体 pBI121-PTA-1 的酶切验证

Fig. 4 The enzymes digesting identification of the plant expression vector pBI121-PTA-1

1. DNA marker; 2-3. Xba I和Sma I双酶切验证 The dual digestion with both Xba I and Sma I; 4. Marker DL2000

内标带的同时也不同程度地扩增出1条810 bp的特异条带,且不同植株在RNA水平上的转录水平不一致,有的甚至无法检测到转录(如2号转基因植株)。

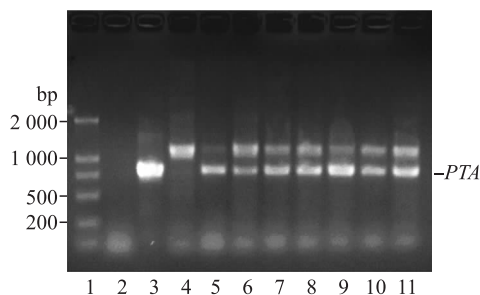


图5 转 *PTA-1* 基因烟草的 PCR 检测结果

Fig. 5 The PCR detection results of transgenic tobacco plants with *PTA-1*

1. Marker DL 2000; 2. 空白对照 Water control; 3. 质粒对照 Plasmid control; 4. 阴性烟草对照 Non-transgenic tobacco plant; 5~11. 转基因烟草植株 (1~7号) Transgenic tobacco plants (No. 1~7)

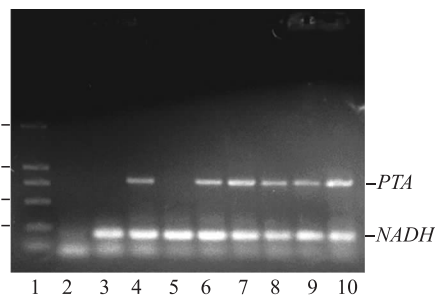


图6 转基因烟草的半定量 RT-PCR 检测

Fig. 6 The semi-quantitative RT-PCR results of transgenic tobacco plants

1. Marker DL 2000; 2. 空白对照 Water control; 3. 阴性烟草对照 Non-transgenic tobacco plant; 4~10. 转基因烟草植株 (1~7号) Transgenic tobacco plants (No. 1~7)

2.4 转基因烟草的抗虫鉴定

对经 PCR 检测的 7 株转基因植株进行了抗蚜虫接种鉴定研究,从接虫后第 15 天结果来看,不同的转基因植株抗虫性差异很大,其中表现抗性的转基因烟草对蚜虫的种群抑制力由大到小依次为 3、1、4、5 和 6,抑制率在 53.7%~100% 之间,平均抑制率为 77.02%,其中 3 号转基因植株接种 7 d 后蚜虫全部死亡,抑制率达到 100% (图 7)。而 7 号和 2 号转基因植株几乎没有抗性,尤其是 2 号转基因烟草接种 15 d 后群体增长是对照植株的 1.5 倍,半定量 RT-PCR 结果显示 2 号转基因植株在 mRNA 水平上几乎没有表达,说明转基因植株的抗性水平与转基因表达量密切相关,表达水平高的植株其抗性水平也较高。

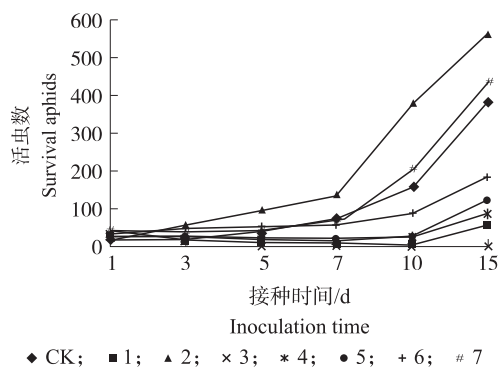


图7 转基因烟草对蚜虫虫口密度增长的抑制作用

Fig. 7 Inhibition effect of transgenic tobacco plants on the population development of *Myzus persicae*

3 讨论

转 *PTA-1* 基因烟草植株的抗蚜试验结果表明,转基因烟草能有效地抑制桃蚜的繁殖和发育,影响桃蚜群体的形成,表现出明显的抗虫作用,说明该基因是一个有潜在应用前景的抗蚜虫基因。凝集素的抗虫活性与它和糖类可逆性结合能力密切相关。有人通过定点突变技术,使豆科植物的凝集素 GAS II 丧失与糖结合的能力,结果该凝集素丧失了抗虫活性^[10]。笔者分离的 *PTA-1* 基因转化获得抗蚜虫转基因植株对蚜虫的平均抑制率为 77.02%,有的单株接种 7 d 后抑制率高达 100%,这比 Yao 等^[9]报道的 *PTA* 基因抗蚜虫活性高,这可能是两者在氨基酸水平上同源性差异引起的,它们的同源性为 92.9%,尤其是在与抗蚜虫活性密切相关的甘露糖结合位点上,它们的第 3 个保守位点明显不同, Yao 等^[8]报道 *PTA* 基因在该处的位点为 QNYY,而笔者分离的 *PTA-1* 基因的保守位点为 QDFY,由于凝集素结合位点与抗虫性差异密切相关,因此推测分离的 *PTA-1* 基因抗虫活性高可能是 QDFY 与蚜虫消化道上糖结合能力更强有关。

本研究中不同的 *PTA-1* 转基因烟草植株的抗性水平差异很大,大部分植株的抑制率在 53.7%~100% 之间,这与转基因在叶片中的表达水平有关,高抗水平的植株叶片外源凝集素基因表达的水平也高,而抗性极低甚至不表现抗性的转基因植株中凝集素表达水平很低甚至不表达。这种表达差异可能是

由转基因植株体内转基因沉默引起的,如转基因的拷贝数和构型、在基因组上的整合位点及整合方式、转基因的转录水平等都与沉默有关,也可能是由转基因植株的生理差异所致^[17]。不同转化植株的抗性不同,表明通过获得一定数量的转基因植株结合抗蚜虫鉴定试验筛选才能获得抗性良好的转基因株系,然后应用于植物育种实践中。也可通过选择所转入的植物的偏爱密码子优化 *PTA-I* 基因以提高其在该植物中的表达水平。另外蚜虫是刺吸式昆虫,主要吸食植物韧皮部汁液,因此在蚜虫主要取食部位(即韧皮部)表达 *PTA-I* 能更好地抑制蚜虫的生长^[18]。

单子叶植物甘露糖结合凝集素是一类同源性很高的凝集素,有大的基因家族编码^[19]。本研究在进行转基因植株的 PCR 检测时,以烟草的基因组 DNA 为模板,并以 *PTA-I* 基因特异引物进行扩增时得到了一条和目标片段不同的大小约为 1 200 bp 的非特异带,提高引物的退火温度仍然能扩增到该片段,这说明烟草中具有与单子叶甘露糖结合凝集素基因高度同源的序列,但是半定量 RT-PCR 时并未检测到该片段,说明其并没有发生转录,推测该片段可能是植物凝集素基因家族中的不活跃成员,对该片段产物测序也许对进一步研究烟草凝集素基因具有一定的意义。在本研究中,该片段可作为内标记来区分转基因烟草和非转基因烟草,弥补了 PCR 检测容易带来假阳性的不足,迅速准确地筛选阳性转基因植株。

参考文献:

- [1] Ng J C K, Perry K L. Transmission of plant viruses by aphid vectors [J]. *Mol Plant Pathol*, 2004, 5(5): 505-511
- [2] Cameron P J, Walker G P, Hodson A J, et al. Trends in IPM and insecticide use in processing tomatoes in New Zealand [J]. *Crop Protection*, 2009, 28(5): 421-427
- [3] Yu Yang, Wei Zhiming. Increased oriental armyworm and aphid resistance in transgenic wheat stably expressing *Bacillus thuringiensis* (Bt) endotoxin and *Pinellia ternata* agglutinin (PTA) [J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2008, 94: 33-44
- [4] 孙小芬,唐克轩,万丙良,等. 表达雪花莲凝集素(GNA)的转基因水稻纯系抗褐飞虱[J]. *科学通报*, 2001, 46(13): 1108-1113
- [5] 周永刚,田颖川,莽克强. 苜蓿凝集素基因的克隆及在转基因烟草中抗蚜性研究[J]. *生物工程学报*, 2001, 17(1): 34-39
- [6] 黄大昉,潘映红,张淑香,等. 从掌叶半夏和半夏中发现对几种蚜虫有致死活性的蛋白[J]. *中国农业科学*, 1997, 3(2): 94-96
- [7] 潘映红,张淑香,曹景萍,等. 掌叶半夏凝集素的分离纯化及抗蚜活性研究[J]. *自然科学进展*, 1998, 8(4): 502-505
- [8] Yao Jianhong, Sun Xiaofen, Tang Kexuan. Molecular cloning of lectin gene from *Pinellia ternata* [J]. *复旦学报: 自然科学版*, 2001, 40(4): 461-464
- [9] Yao Jianhong, Pang Yongzhen, Qi Huaxiong, et al. Transgenic tobacco expressing *Pinellia ternata* agglutinin confers enhanced resistance to aphids [J]. *Transgenic Research*, 2003, 12: 715-722
- [10] Zhu-Salzman K, Shade R E, Koiwa H, et al. Carbohydrate binding and resistance to proteolysis control insecticidal activity of *Griffonia simplicifolia* lectin II [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 15123-15128
- [11] 王关林,方宏筠. 植物基因工程[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 2002: 203-205
- [12] Tai T H, Tanksley S D. A rapid inexpensive method for isolation of total DNA from dehydrated plant tissue [J]. *Plant Molecular Biological Report*, 1990, 8(4): 297-303
- [13] 马恢,谢晓亮,尹江,等. 以马铃薯 ND2 mRNA 为内对照双重 RT-PCR 法检测马铃薯纺锤块茎类病毒[J]. *园艺学报*, 2007, 34(5): 1213-1216
- [14] 袁正强,赵存友,周岩,等. 雪花莲凝集素基因(GNA)的改造及其抗蚜性[J]. *植物学报*, 2001, 43(6): 592-597
- [15] von Heijne G. A new method for predicting signal sequence cleavage sites [J]. *Nucl Acids Res*, 1986, 14: 4683-4690
- [16] Lin Juan, Zhou Xuanwei, Gao Shi, et al. cDNA cloning and expression analysis of a mannose-binding lectin from *Pinellia pedatisecta* [J]. *J Biosci*, 2007, 32(2): 241-249
- [17] Matzke M A, Aufsatz W, Kanno T, et al. Homology-dependent gene silencing and host defense in plants [J]. *Adv Genet*, 2002, 46: 235-275
- [18] Chakraborti D, Sarkar A, Mondal H A, et al. Cre/lox system to develop selectable marker free transgenic tobacco plants conferring resistance against sap sucking homopteran insect [J]. *Plant Cell Rep*, 2008, 27: 1623-1633
- [19] Lioi L, Galasso I, Santantonio M, et al. Lectin gene sequences and species relationships among cultivated legumes [J]. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2006, 53: 1615-1623

责任编辑: 范雪梅