

欧洲山芥皂苷合成关键酶基因 *Bv-beta-AS* 克隆及表达分析

魏小春, 张晓辉, 吴青君, 王海平, 沈 镡, 邱 杨, 宋江萍, 李锡香*

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 农业部蔬菜作物基因资源与种质创制北京科学观测实验站, 北京 100081)

摘 要: 以能够产生抗虫皂苷的高抗小菜蛾资源 G 型欧洲山芥 (*Barbarea vulgaris* R. Br.) B44 为材料, 利用 RACE 技术克隆出皂苷合成关键酶 beta - 香树脂合成酶的基因 (*Barbarea vulgaris beta-amyrin synthase*, *Bv-beta-AS*)。该基因编码区序列长为 2 289 bp (GenBank 登录号 JQ172795), 推导其编码 762 个氨基酸; 在基因组水平上长度为 4 107 bp (GenBank 登录号 JQ172796), 含有 15 个内含子。*Bv-beta-AS* 编码的氨基酸具有 beta - 香树脂合成酶基因家族的保守序列, 即 DCTAE 序列和 QW 特征序列, 氨基酸多序列比对和进化树分析表明, 该基因与拟南芥 beta - 香树脂合成酶基因的相似性最高, 为 74%。利用荧光定量 PCR 对欧洲山芥在小菜蛾诱导下该基因的表达进行研究, 结果表明, 该基因受虫害诱导时上调表达, 但是上升到 12 h 达顶峰后随时间推移呈回归的趋势。从序列特征和表达模式上推测, *Bv-beta-AS* 可能是抗虫皂苷合成途径的一个关键酶的基因。

关键词: 欧洲山芥; 小菜蛾; 皂苷; beta - 香树脂合成酶; 克隆; 荧光定量 RT-PCR; 抗虫

中图分类号: S 63; S 436.341.2⁺4 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2012) 05-0923-08

Cloning, Characterization and Real-time RT-PCR Analysis of a Key Gene *beta-Amyrin synthase* for Saponin Biosynthesis in *Barbarea vulgaris*

WEI Xiao-chun, ZHANG Xiao-hui, WU Qing-jun, WANG Hai-ping, SHEN Di, QIU Yang, SONG Jiang-ping, and LI Xi-xiang*

(Institute of Vegetables and Flowers, China Academy of Agricultural Sciences, China Academy of Agricultural Sciences, Beijing Research Station of Vegetable Crop Gene Resource and Germplasm Enhancement Ministry of Agriculture, Beijing 100081, China)

Abstract: G-type *Barbarea vulgaris* R.Br. which produce saponins is a rare insect resistant vegetable in Cruciferae. A beta-amyrin synthase gene which codes a key enzyme of saponin biosynthesis pathway was cloned from *Barbarea vulgaris* R.Br. using RT-PCR and RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) method, and named as *Bv-beta-AS*. The *Bv-beta-AS* contained a coding sequence of 2 289 bp (GenBank accession number: JQ172795), which encoded 762 amino acids. The gene of 4 107 bp from genomic DNA was further cloned, which contained 15 introns embedded in its coding sequences. The deduced protein of this gene contained the conserved characteristic motif of beta-amyrin synthase -DCTAE and QW. And the

收稿日期: 2011 - 12 - 28; 修回日期: 2012 - 04 - 12

基金项目: 农业部 '948' 项目 (2011-G1-02); 农业部资源保护项目 (NB2012-2130135-28); 中国农业科学院基本科研业务费项目 (2012ZL026); 农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室项目

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: lixx0612@163.com)

high similarity of this gene with the *beta*-amyrin synthase from other plants indicated it was a homologue of *beta*-amyrin synthase. Multiple sequence alignments and phylogenetic tree analyses showed that *Bv-beta-AS* was clustered with *Arabidopsis beta*-amyrin synthase and showed the highly similarity (74%) in amino acid sequences. The expression of *Bv-beta-AS* under the diamondback moth (*Plutella xylostella*) attack was determined by real-time RT-PCR. The results showed that *Bv-beta-AS* gene expression was up-regulated within 12 h of diamondback moth attack, but decline tendency appeared after 12 hours. Both the sequences analysis results and the real-time RT-PCR data indicated that *Bv-beta-AS* may be an important candidate gene of saponin biosynthesis pathway.

Key words: *Barbarea vulgaris*; *Plutella xylostella*; saponin; beta-amyrin synthase; cloning; real-time RT-PCR; insect resistant

欧洲山芥 (*Barbarea vulgaris* R. Br.) 是一种十字花科野菜, 起源于地中海地区, 现已广泛分布于欧亚大陆和北美。在欧洲, 欧洲山芥被广泛栽培并制成沙拉食用, 是极有开发潜力的优异种质资源 (Senatore et al., 2000; Vera et al., 2009)。在中国新疆北部也有该物种的分布, 它可以作为特色蔬菜开发和推广 (中国科学院中国植物志编辑委员会, 2010)。在遗传进化关系上, 欧洲山芥介于拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* L.) 和甘蓝型油菜 (*Brassica napus* L.) 之间 (Bailey et al., 2006)。欧洲山芥根据叶表皮毛的有无分为两种生态型, 具有表皮毛的为 P 型, 无表皮毛的为 G 型 (Vera et al., 2009)。研究表明, 小菜蛾 (*Plutella xylostella* L.) 能够在 G 型欧洲山芥上产卵, 但不能存活 (Idris & Grafius, 1996)。因此, 欧洲山芥是一种非常有潜力的抗小菜蛾十字花科植物抗源 (Agerbirk et al., 2003; Ørgaard & Linde-Laursen, 2008; van Leur, 2008; Vera et al., 2009)。现已知其对小菜蛾等害虫起致死作用的代谢物成分为三萜烯皂苷 (常春藤皂苷、齐墩果酸皂苷、丝石竹皂苷及 4-Epi-常春藤皂苷) (Shinoda et al., 2002; Agerbirk et al., 2003; Nielsen et al., 2010)。皂苷能够致死真菌和昆虫的原因是它能够与定位在质膜上的甾醇形成一种能破坏细胞半渗透性的复合体, 进而促使细胞死亡, 而对包括人在内的哺乳动物却影响甚微。

皂苷是苷元为三萜或螺旋甾烷类化合物的一类糖苷, 主要分布于陆地高等植物中, 也有少量存在于海星、海参和海绵等海洋动物中 (Ricardo, 1997)。皂苷具有较大的商业价值, 可以作为医药、佐药、发泡剂、甜味剂、调节剂及化妆品等 (Hostettmann & Marston, 1995)。同时, 皂苷具有化感作用、抗微生物、抗虫及潜在的药理学作用等 (Vera et al., 2009)。三萜皂苷的五环三萜碳环骨架的生物合成主要通过氧化鲨烯环化酶 (OSC) 的环化作用生成, 即是由 2,3-氧化鲨烯在氧化鲨烯环化酶的催化下, 经过一系列的质子化、环化、重排和去质子化作用形成的。这一反应是三萜皂苷生物合成途径的一个重要分支反应, 因而氧化鲨烯环化酶是整个三萜皂苷生物合成的关键酶 (Wang et al., 2011)。该酶属于同一个基因家族, 目前已经从不同植物中分离得到了多个编码氧化鲨烯环化酶的基因, 包括环阿屯醇合成酶 CAS (Sawai et al., 2006; Basyuni et al., 2007a), 羽扇豆醇合成酶 LUS (Guhling et al., 2006; Basyuni et al., 2007b), beta-香树酯合成酶 beta-AS (Cammareri et al., 2008; Kirby et al., 2008; Shibuya et al., 2009; Scholz et al., 2009; Wang et al., 2011), 达玛烷合成酶 DS (Kim et al., 2009) 和多功能三萜合成酶 (Morlacchi et al., 2009; Shibuya et al., 2009; Wang et al., 2010) 等基因。因此, beta-香树酯合成酶对三萜皂苷的合成非常重要。

在欧洲山芥中尚未有 beta-香树酯合成酶基因的研究报道。本研究中首次从欧洲山芥中克隆到 beta-香树酯合成酶基因 (*Bv-beta-AS*), 并对其在小菜蛾诱导下的表达水平进行了荧光定量分析, 为十字花科植物抗小菜蛾分子设计和基因工程育种提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料和处理

将供试 G 型欧洲山芥（由丹麦哥本哈根大学 Agerbirk Niels 于 2008 年赠送）播种于装有灭菌基质的营养钵，置于人工气候箱中，生长条件为光照 16 h (21 ℃) /黑暗 8 h (16 ℃)，光照强度 160 ~ 220 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ，相对湿度 60% \pm 5% (Casper et al., 2005)。当植株达到 5 ~ 6 片真叶时（大约经历 6 ~ 7 周的生长时间），接种小菜蛾幼虫。小菜蛾种群为福建敏感型，由中国农业科学院蔬菜花卉研究所吴青君老师提供。对照为不接虫。每个处理和对照设 5 株植株，每株每个叶片接 3 ~ 4 龄小菜蛾幼虫 5 ~ 6 只 (Jürgen et al., 2008; Badenes-Pérez et al., 2010)。接种小菜蛾后 1、4、8、12 及 24 h 取样。取样时先用灭菌蒸馏水清洁每个处理的所有植株叶片。取样后立即浸入液氮中冷冻，并放入 -80 ℃ 超低温冰箱保存。

1.2 *Bv-beta-AS* 基因的克隆

1.2.1 总 RNA 的提取与 cDNA 第一链反转录

总 RNA 的提取采用 TRIZOL 法 (USA)，cDNA 第一链反转录采用 Invitrogen 公司试剂盒。

1.2.2 引物设计与合成

根据 GenBank 中 *beta-AS* 基因的保守序列设计简并引物 MF1101 及 MR2253 (表 1)，委托 Invitrogen 生物工程技术服务有限公司合成。

1.2.3 *Bv-beta-AS* 基因 cDNA 全长克隆

以 cDNA 第一链为模板，用 *beta-AS* 基因简并引物进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为：95 ℃ 5 min；95 ℃ 30 s；50 ℃ 1 min；72 ℃ 2 min，35 个循环；72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后回收，与 pEASY-T1 载体连接（北京全试金公司），热击法转化 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞，测序，得到一个目的片段。再根据得到的序列设计 3'RACE 及 5'RACE 特异引物（表 1）进行扩增，所用试剂为 CLONTECH 公司的 SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit，方法参照说明书。

在 RACE 拼接得到全长的基础上设计引物 beta-ASF 及 beta-ASR (表 1) 进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为：95 ℃ 5 min；95 ℃ 30 s；60 ℃ 30 s；72 ℃ 3 min，共 35 个循环，最后 72 ℃ 延伸 10 min。将获得的全长，与 pEASY-T1 载体连接，转化大肠杆菌感受态细胞，测序，得到目的片段。

表 1 扩增所用引物
Table 1 Primers used in amplification

编号 Code	序列 (5' - 3') Sequence	编号 Code	序列 (5' - 3') Sequence
MF1101	WACYATTGGNTGTGTBGAAAAGG	5UTR	ATGTGGAGGTTGAAGTTAGG
MR2253	YTCWGC DAGWGCCCAYA	648R	ATAGGTAACACCACACGAT
3'RACE	CCAGGCGATGCGTAAAGGTGTGAGT	253F	GAAGACGCCAAAGACATAAC
5'RACE	CATTTTCATTCCATCTTCGGCTACCCAC	1500R	CATAGAAAGCAGCAGGCAAC
beta-ASF	ATGTGGAGGTTGAAGTTAGGAGAGGGAA	1247F	GTCAACAATGGGATACAGGG
beta-ASR	TTAATGTTTATGAGTGACGAACGCAGCT	2012R	ATGTATCTCTGTTTCAGGGCA
Actin F	CGGAATGGTCAAGGCTGGTTTC	1725F	ATTCCAGCAACTCTATCCAG
Actin R	GCTCGTTGTAGAAAGTGTGATGCC	3UTR	ATTCCTCCAGATACACTAA
q-beta-ASF	CAACACCTTACGCATCG		
q-beta-ASR	TCTGGCTAATCTTGTGGC		

1.2.4 *Bv-beta-AS* 基因组 DNA 全长克隆

根据所获得的 cDNA 全长设计 4 对引物 (5UTR-648R; 253F-1500R; 1247F-2012R; 1725F-3UTR,

各对引物所扩增的片段之间相互重叠, 见表 1), 对 *Bv-beta-AS* 基因进行 DNA 水平的克隆, PCR 反应产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后回收, 与 pEASY-T1 载体连接, 转化大肠杆菌感受态细胞, 测序, 拼接, 得到目的片段。

1.3 序列分析

利用 NCBI 上 Blast 分析工具对 *Bv-beta-AS* 基因编码的部分蛋白进行氨基酸基本性质分析、序列比对, 并结合 MEGA4.0 构建进化树。

1.4 实时荧光定量分析

对上述各个接虫处理后的欧洲山芥叶片提取总 RNA, 并反转录为第一链 cDNA (全试金反转录试剂盒)。仪器为基因公司 ABI StepOne Real-Time PCR System。反应体系为 20.0 μL , 含有 10.0 μL $2 \times \text{TransStar}^{\text{TM}}$ Green qPCR Super Mix, 0.4 μL Passive Reference Dye, 2.0 μL cDNA, 上、下游引物 (q-beta-ASF 及 q-beta-ASR) 各 0.4 μL (引物浓度 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 6.8 μL ddH₂O。运行程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 s, 40 次循环。每个样品 3 次重复。

以 *Actin* 基因为内参, 引物用 Actin F 和 Actin R; *Bv-beta-AS* 基因片段为目的片段, 扩增引物为 q-beta-ASF 和 q-beta-ASR。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算基因相对表达量 (Livak & Schmittgen, 2001)。

2 结果与分析

2.1 欧洲山芥 *Bv-beta-AS* 基因的克隆和序列分析

通过设计简并引物 MF1101 和 MR2253 进行 PCR 扩增, 从欧洲山芥叶片 cDNA 中得到一个约 1100 bp 的中间片段 (图 1, A)。将 PCR 产物克隆到 pEASY-T1 载体上, 测序, 在 GenBank 上进行 Blastx 分析, 发现该序列编码的氨基酸序列与其他植物上 beta - 香树脂合成酶蛋白有较高的同源性, 证明该序列是 *Bv-beta-AS* 基因的一部分。在此基础上进行 5'RACE (图 1, B) 和 3'RACE (图 1, C) 扩增, 克隆测序拼接后, 获得一条包含 5'UTR 及 3'UTR, 总长为 2 673 bp 的 DNA 序列, 其编码区大小为 2 289 bp, 编码 762 个氨基酸, 命名为 *Bv-amyrin synthase* (*Bv-beta-AS*), GenBank 登录号为 JQ172795。如图 2 所示, 该基因与其他植物上克隆的同源基因在蛋白结构域上具有很高的保守型, 均包含有该家族蛋白特有的高度保守序列, 一个是与底物结合有关的 DCTAE 序列, 另一个是 QW 特征序列 (Abe & Prestwich, 1994; Poralla et al., 1994)。通过设计引物 beta-ASF 及 beta-ASR 进行 PCR 扩增获得该基因全长 cDNA (图 1, D), 所获得的全长 cDNA 序列与 RACE 所得到的编码区序列完全一致, 为超表达转基因验证奠定了基础。

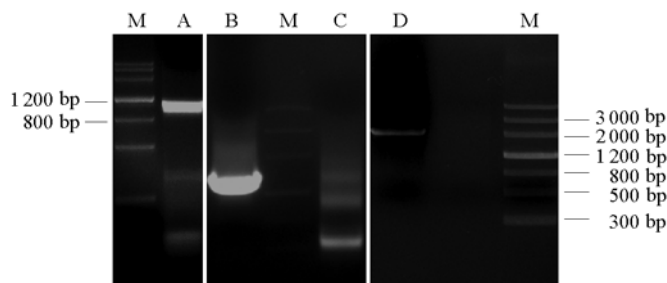


图 1 欧洲山芥 *Bv-beta-AS* 基因扩增电泳图

A.: 目的基因片段; B: 5'RACE 片段; C: 3'RACE 片段; D: 全长阅读框; M: 1 200 bp marker.

Fig. 1 PCR amplification of *Bv-beta-AS*

A: Partial sequence; B: 5'RACE sequence; C: 3'RACE sequence; D: Full-length open reading fragment sequence; M: 1 200 bp marker.

Barbarea	WMRLKLGEGNGDDPYLFSSNNFVGRQTWEFDPK AGTLEERAARVEARRSFLVNRSRVKACSDLIWRMQFLKEAKFEQVT	79
Gentiana	... I . . . N . NLY . T . Y . . . I . Y . RN . . TA . . EE N . WN . RH . . PS . . I . . L . . R . KN . K . S .	78
Panax	... K . TA . . K Y . T DYVASPG . LFE . . QV . . Q . WD . . YQ . . PSG R . KN . R . T .	80
Pisum	... TA T Y . F . . SE Q N . YN . FE . . P . G F . VLR . NN . K . T .	78
Solanum	... K . TA . . QNG . . Y . T . Y N . G . . I KI QQ . WN . YK . . PS T . . G . KN . K . K .	78
Barbarea	PPVKTFDAKDITYENATDSLRGVSPFSAIQASDGHVGETAGPIFFLPPIVFCLYITGHIETDFEHRKEMLRHYVCH	159
Gentiana	... A . VD . GQE . NHQM . TA . . A . HIL . . S A . N . S IT NN . PT . TH . I . YI . .	168
Panax	... Q . VG . DEAV . . A . TT . . A . H . F A . NS M . V DTV . PA I . YI . .	160
Pisum	... GG EEE KT . TT . . THH . AT . . T AQ M V DSV . PP I . YI . .	158
Solanum	... A . V . EGFE . SH . V . TA . H . A . N T A . N M . M NTV . PA I . YI . .	158
Barbarea	QNEDGGWLIHVESKSTMPCTVLNYTCLRMIGEGPNNGGRDNACKRARQWTIDRGGVTYIPSWGKTIWLSITGYDWSGNTNPM	239
Gentiana	... T . GH . T M . T D . KE A . K H . S . . A . . I . . A	238
Panax	... T . GH . T T . S M . T D . VN . . A . G . K . . H . S . . A T V . E . I . S . .	240
Pisum	... T . GH . T A . M . T D . E V . . N . RQH H T VF . I . S . .	238
Solanum	... T . GH . T A . S M . T D . VN . . A . K H . S . . A T VFE . I . .	238
Barbarea	PPEIWLPLSFVPIHLAKTLCYCRMVMPMSYLYGKRFVGPITPLILQLREELHLQPYEAINWNTKRLRYAKEDMYFPHPL	319
Gentiana	... S SI . S . . PG . MG R SE CE . . NQ . R . KRY . HVC I . Y . .	318
Panax	... F . I I . M . P . . MW YG NE R VC T . Y . .	320
Pisum	... F . I I . M . P . . MW TE K T H . C I . Y . .	318
Solanum	... F . I L . V . P . . MW YDR DE K . V . HVC L . Y . .	318
Barbarea	VQDIWDTLHIFVEPIJTHWPINKIVREKALRIAMKHTHYEDENSHYITIGCEKVI.CMLACWTDPPNGDYFKKH.IARTP	399
Gentiana	... I FFY . CT V R . A DAT R V . S VE	397
Panax	... I L . S . YVLT R . F R QTT R E V . VE R	399
Pisum	... I I . S . Y R . F KR EVT R . L VE A I . V . .	398
Solanum	... V M . S . YICT R . F R . N EVT R VE Y	397
Barbarea	DYMWVAEDGMKMQSFGSQQWDITGFVQAIIASDLSSSETGDVKKRGHDYIKKSQIRENPSGDFKSMYRHISKGAWTLSDRD	479
Gentiana	... I L IC I . LL MTE . IT . T . RK F . N . . VK M S . F . Q .	477
Panax	... I I E SI LLD TH . I . PT . MK F VKD I . S . F . Q .	479
Pisum	... I I . TS T E . A IJ . TN . TE . TKPA . AK F VT H S . F . Q .	478
Solanum	... L L E I . LL EMND . IA . T . RK F . Q VTN G S . F . Q .	477
Barbarea	HGWQVSDCTAEALCKCLLSMMPAEVVGHKMDPEQLYDSVNLILLSQSANGGVTAWEPPVAYAWTELLNPTEFLANLVAE	559
Gentiana	... G T . Q . T . FRIEL . RT . A . T K LPG SD . I DSF . D . I .	557
Panax	... G IF . T . E . I . K . IK R V RK LS AG . QE . L F . DI . I .	559
Pisum	... G LL . P . I . E . E . R . F L KK . LA AG . QE . L F . DI . V .	558
Solanum	... G T . R . L . QA . E . GR . Y VV K . LA AG . SEYL F . DI . I .	557
Barbarea	REYVECTSSVYQALVLPQQLYPDIHKTKISRAIEKAVQFLENLQKPDGSMYGNWGVCFIYATWIFALGGLAAAGKYKTSQ	639
Gentiana	... H . HA A . AID KK N . M . E . ESF . TN . SNY DV . M G R S NNC .	637
Panax	... H A . I KK G . RK . E . DNF . TN . RY DI . M T . GS YNCA .	639
Pisum	... H G . AI KK G . RK . E . ENF . FN . R DT . TE T . GS TNCA .	638
Solanum	... H A . SI KK G . RT . E . NIF . DN KY DV . M T . GS V SYNNSA .	637
Barbarea	AMRKGVFLLITQKDDGGRESYLSCEPQRYIPLGNRSNLVQTAWAINGLIHAGQAERDPIPLHRAAKLIINSQMENG	719
Gentiana	... VV . A . N QK R MK H M S K C L	717
Panax	... V . A KS . M KKV . V H . G . L SE T L L	719
Pisum	... I K RE S . KKL . V V . HTA . L S T L L . Q .	718
Solanum	... V E R RS R DKV . RE T . D TA . L S AD K L D .	717
Barbarea	IPQQEIVGVIMRNCLLHYATFRNTIFPLWALAYRKAATVTHK	761
Gentiana	... A FK . GM F . SY . SIY QVP	755
Panax	... S K . M Y . IY RRVPLPSLGT	763
Pisum	... W T K . M PMY . DIY RRVPLP	758
Solanum	... T K . M AY . IY G NVLLPLENN	761

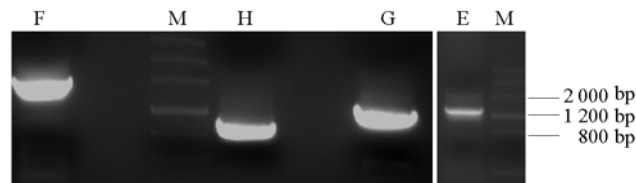
图2 *Bv-beta-AS* 与其它植物 *beta-AS* 的氨基酸序列比较

DCTAE模体用虚线框线标出, QW模体用矩形框标出。

Fig. 2 The amino acid sequence alignment of *Bv-beta-AS* and its homologues from other plants.

The DCTAE motif is marked with dashed box, and the QW motifs are boxed.

通过基因组DNA水平上的分段克隆(图3),得到该基因在基因组水平上的全长大小为4 107 bp, 包含15个内含子。

图3 欧洲山芥 *Bv-beta-AS* 基因组扩增电泳图Fig. 3 The genomic PCR amplification of *Bv-beta-AS*

E: 5UTR-648R; F: 253F-1500R; G: 1247F-2012R; H: 1725F-3UTR; M: 1 200 bp marker.

2.2 不同物种间 *beta*-AS 基因的序列比较及进化树分析

利用 MEGA4.0 软件构建了包括欧洲山芥在内的 *beta*-AS 基因系统进化树 (图 4)。结果表明, 欧洲山芥和拟南芥的亲缘关系最近。对不同物种的 *beta*-AS 基因的氨基酸序列比对结果显示, *Bv-beta*-AS 基因与拟南芥的 *beta*-AS 基因同源性最高, 达到 74%。

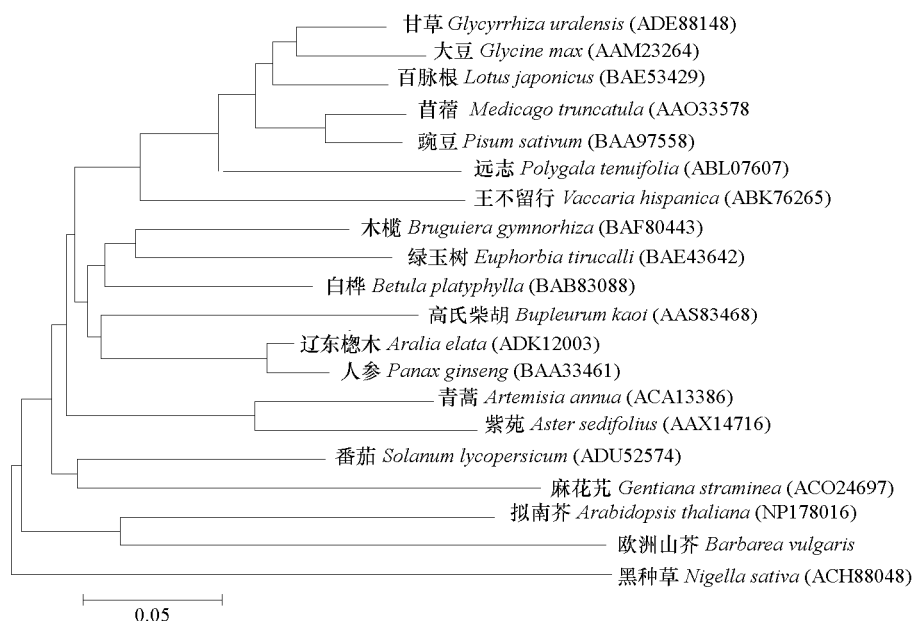


图 4 欧洲山芥中与其它物种的 *beta*-AS 基因氨基酸序列的系统进化树

Fig. 4 A phylogenetic analysis of the deduced peptide sequences of *beta*-AS genes from *Barbarea vulgaris* and other plants

2.3 小菜蛾取食后 *Bv-beta*-AS 基因的表达

通过 Real-time RT-PCR 对小菜蛾取食欧洲山芥叶片后皂苷生物合成途径关键酶基因 *Bv-beta*-AS 的定量分析, 结果显示, 与对照相比, 小菜蛾取食后的各个时间点的 *Bv-beta*-AS 表达量差异显著; 小菜蛾取食 1~12 h 后 *Bv-beta*-AS 表达呈现明显上升的趋势, 尤其是在取食 12 h, *Bv-beta*-AS 的表达量达到最大, 与对照相比将近上调至其 6 倍, 但随后表达量逐渐回落 (图 5)。

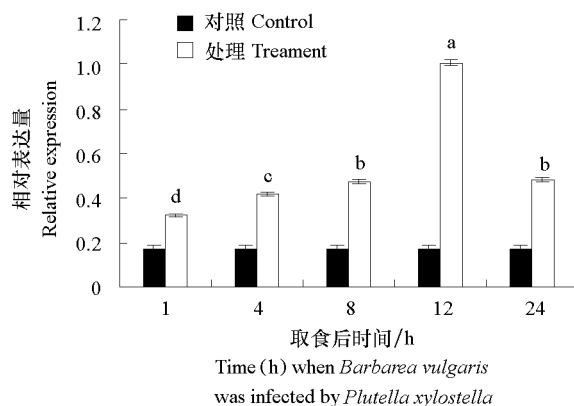


图 5 小菜蛾取食欧洲山芥后不同时间点 *Bv-beta*-AS 基因的荧光定量 PCR 分析

图中不同字母 (a、b、c、d) 代表差异显著 ($\alpha = 0.05$)。

Fig. 5 Real-time RT-PCR analysis of *Bv-beta*-AS expression in *Barbarea vulgaris* infected by *Plutella xylostella* at different time

The lower case letters (a, b, c and d) above the bars shows the significance ($\alpha = 0.05$).

3 讨论

小菜蛾是一种主要危害十字花科作物的世界性鳞翅目迁飞性害虫 (Shelton & Nault, 2004)。每年全世界由小菜蛾造成的直接和间接经济损失达 10 亿美元 (Taleker & Shelton, 1993)。尤其在中国, 十字花科蔬菜周年生产供应栽培模式的不断升级和迅速推广导致小菜蛾的危害日益猖獗和严重, 而在现有的栽培种和育种资源中难以找到有效的抗虫种质。欧洲山芥是多年生十字花科草本植物, 其生长期与小菜蛾的爆发期存在长期的重叠, 而其所含皂苷使得它具有抗小菜蛾的特点 (Agerbirk et al., 2003)。另外, 欧洲山芥作为特色蔬菜即将得到开发和利用。因此, 从欧洲山芥皂苷代谢途径入手克隆抗虫基因对十字花科作物抗虫育种具有非常重要的理论和现实意义。

皂苷种类繁多、分子结构复杂、侧链修饰变化多样, 相应的功能迥异。目前对皂苷生物合成途径的了解仍很粗浅, 对皂苷生物合成关键酶基因的功能解析也寥寥无几 (Maria et al., 2011)。本研究从抗虫欧洲山芥中克隆出了一个皂苷生物合成途径关键酶的新基因, 即 *Bv-beta-AS*。虽然其确切的生物学功能还有待于进一步的试验验证, 但是该基因全长序列的获得为深入认识其生物学功能和了解皂苷合成途径奠定了基础。

拟南芥中 *beta*-香树酯素合成酶基因大小为 4 242 bp, 含有 16 个内含子 (Shibuya et al., 2009)。本研究在欧洲山芥中获得的 *Bv-beta-AS* 基因全长为 4 107 bp, 包含 15 个内含子。目前所知, 十字花科植物中只有欧洲山芥能够合成抗虫皂苷, 该内含子的剔除可能是欧洲山芥进化出抗虫皂苷的原因之一。

荧光定量 PCR 分析显示 *Bv-beta-AS* 基因的表达受小菜蛾取食诱导而显著上调, 表明该基因与植物的抗虫应答反应密切相关。本研究中所克隆的欧洲山芥皂苷合成关键酶基因 *Bv-beta-AS* 将对解析抗虫皂苷生物合成途径起到促进作用, 为抗虫皂苷在十字花科蔬菜中超表达、培育抗虫蔬菜新品种提供有力支持。

References

- Abe I, Prestwich G D. 1994. Active site mapping of affinity labeled rat oxidosqualene cyclase. *Journal of Biology Chemistry*, 269: 802 - 804.
- Agerbirk N, Olsen C E, Bibby B M, Frandsen H O, Brown L D, Nielsen J K, Renwick J A A. 2003. A saponin correlated with variable resistance of *Barbarea vulgaris* to diamondback moth *Plutella xylostella*. *Journal of Chemistry Ecology*, 29: 1417 - 1433.
- Badenes-Pérez F R, Reichelt M, Heckel D G. 2010. Can sulfur fertilisation improve the effectiveness of trap crops for diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). *Pest Management Science*, 66: 832 - 838.
- Bailey C D, Koch M A, Mayer M, Mummenhoff K, O'Kane S L Jr, Warwick S I, Windham M D, Al-Shehbaz I A. 2006. Toward a global phylogeny of the Brassicaceae. *Molecular Biology and Evolution*, 23: 2142 - 2160.
- Basyuni M, Oku H, Tsujimoto E, Baba S. 2007a. Cloning and functional expression of cycloartenol synthases from mangrove species *Rhizophora stylosa* Griff. and *Kandelia candel* (L.) Druce. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 71: 1788 - 1792.
- Basyuni M, Oku H, Tsujimoto E, Kinjo K, Baba S, Takara K. 2007b. Triterpene synthases from the Okinawan mangrove tribe. *Rhizophoraceae*. *FEBS Journal*, 274: 5028 - 5042.
- Cammareri M, Consiglio M F, Pecchia P, Corea G, Lanzotti V, Ibeas J I, Tava A, Conicella C. 2008. Molecular characterization of beta-amyrin synthase from *Aster sedifolius* L. and triterpenoid saponin analysis. *Plant Science*, 175: 255 - 261.
- Casper J B, Kathleen V, Peter W, Jong D, van der M E, Brakefield P M, Vrieling K. 2005. AFLP markers for the R-gene in the flea beetle, *Phyllotreta nemorum*, conferring resistance to defenses in *Barbarea vulgaris*. *Journal of Insect Science*, 5: 38 - 46.
- Flora of China Editorial Committee, Chinese Academy of Sciences. 2010. *Flora of China*. Beijing: Science Press: 33: 250. (in Chinese)
- 中国科学院中国植物志编辑委员会. 2010. *中国植物志*. 北京: 科学出版社: 33: 250.
- Guhling O, Hobl B, Yeats T, Jetter R. 2006. Cloning and characterization of a lupeol synthase involved in the synthesis of epicuticular wax crystals on stem and hypocotyl surfaces of *Ricinus communis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 448: 60 - 72.

- Hostettmann K, Marston A. 1995. Saponins. Cambridge: Cambridge University Press.
- Idris A B, Grafius E. 1996. Effects of wild and cultivated host plants on oviposition, survival and development of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) and its parasitoid (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Environmental Entomology*, 25 (4): 825 – 833.
- Jürgen E, Sunita G C, Nathalie M, Dana S A, Gen-Ichiro A, Jörg B. 2008. Comparative transcriptome analysis of *Arabidopsis thaliana* infested by diamond back moth (*Plutella xylostella*) larvae reveals signatures of stress response, secondary metabolism, and signaling. *BMC Genomics*, 9: 154 – 173.
- Kim O T, Lee J W, Bang K H, Kim Y C, Hyun D Y, Cha S W, Choi Y E, Jin M L, Hwang B. 2009. Characterization of a dammarenediol synthase in *Centella asiatica* (L.) Urban. *Plant Physiology Biochemistry*, 47: 998 – 1002.
- Kirby J, Romanini D W, Paradise E M, Keasling J D. 2008. Engineering triterpene production in *Saccharomyces cerevisiae* – beta-amyrin synthase from *Artemisia annua*. *FEBS Journal*, 275: 1852 – 1859.
- Livak K J, Schmittgen T D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25 (4): 402 – 408.
- Maria C, Elisa B, Francesco P, Aldo T, Laura S, Andrea P, Neil G, Miriam O, Efisio P, Sergio A, Sean M, Carla S, Ornella C. 2011. *Medicago truncatula* CYP716A12 is a multifunctional oxidase involved in the biosynthesis of hemolytic saponins. *Plant Cell*, 23 (8): 3070 – 3081.
- Morlacchi P, Wilson W K, Xiong Q, Bhaduri A, Sttivend D, Kolesnikova M D, Matsuda S P T. 2009. Product profile of PEN3: The last unexamined oxidosqualene cyclase in *Arabidopsis thaliana*. *Organic Letters*, 11: 2627 – 2630.
- Nielsen N J, Nelsen J, Staerk D. 2010. New resistance-correlated saponins from the insect-resistant crucifer *Barbarea vulgaris*. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 58: 5509 – 5514.
- Ørgaard M, Linde-Laursen I. 2008. Meiotic analysis of danish species of *barbarea* (Brassicaceae) using FISH: Chromosome numbers and rDNA sites. *Hereditas*, 145: 215 – 219.
- Poralla K, Hewelt A, Prestwich G D, Abe I, Reipen I, Sprenger G. 1994. A specific amino acid repeat in squalene and oxidosqualene cyclases. *Trends in Biochemical Sciences*, 19 (4): 157 – 158.
- Ricardo R. 1997. Isolating bioactive compounds from marine organisms. *Journal of Marine Biotechnology*, 5 (4): 187 – 193.
- Sawai S, Shindo T, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Ayabe S, Aoki T. 2006. Functional and structural analysis of genes encoding oxidosqualene cyclases of *Lotus japonicus*. *Plant Science*, 170: 247 – 257.
- Scholz M, Lipinski M, Leupold M, Luftmann H, Harig L, Ofir R, Fischer R, Prüfer D, Müller K J. 2009. Methyl jasmonate induced accumulation of kalopanaxsaponin I in *Nigella sativa*. *Phytochemistry*, 70: 517 – 522.
- Senatore F, D'Agostino M, Dini I. 2000. Flavonoid glycosides of *Barbarea vulgaris* L. (Brassicaceae). *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48: 2659 – 2662.
- Shelton A M, Nault B A. 2004. Dead-end trap cropping: A technique to improve management of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Crop Protection*, 23: 497 – 503.
- Shibuya M, Katsube Y, Otsuka M, Zhang H, Tansakul P, Xiang T, Ebizuka Y. 2009. Identification of a product specific beta-amyrin synthase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology Biochemistry*, 47: 26 – 30.
- Shinoda T, Nagao T, Nakayama M, Serizawa H, Koshioka M, Okabe H, Kawai A. 2002. Identification of a triterpenoid saponin from a crucifer, *Barbarea vulgaris*, as a feeding deterrent to the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Journal of Chemical Ecology*, 28 (3): 587 – 595.
- Taleker N S, Shelton A M. 1993. Biology, ecology and management of the diamondback moth. *Annual Review Entomology*, 38: 275 – 301.
- van Leur H. 2008. Genetics, chemistry and ecology of a qualitative glucosinolate polymorphism in *Barbarea vulgaris* [Ph D thesis]. Wageningen: Wageningen University.
- Vera K, Claus T E, Sven B A, Jens K N, Carl E O, Søren B. 2009. Identification of defense compounds in *Barbarea vulgaris* against the herbivore *Phyllotreta nemorum* by an ecometabolomic approach. *Plant Physiology Preview*, 151.(4): 1977 – 1990.
- Wang Z, Guhling O, Yao R, Li F, Yeats T H, Rose J K C, Jetter R. 2011. Two oxidosqualene cyclases responsible for biosynthesis of tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit cuticular triterpenoids. *Plant Physiology*, 155: 540 – 552.
- Wang Z, Yeats T, Han H, Jetter R. 2010. Cloning and characterization of oxidosqualene cyclases from *Kalanchoe daigremontiana*: Enzymes catalyzing up to 10 rearrangement steps yielding friedelin and other triterpenoids. *Journal of Biological Chemistry*, 285: 29703 – 29712.