点蜂缘蝽效应子新型筛选体系的建立及应用*

鲁王善** 李继芬 董玉妹 沈丹宇 窦道龙 夏 爱***

（南京农业大学植物保护学院，南京 210095）

摘 要 【目的】 建立以荧光素酶为报告基因且调控不同植物抗性相关通路的点蜂缘蝽效应子筛选新体系，并应用于点蜂缘蝽效应子的研究。**【方法】** 通过对点蜂缘蝽 *Riptortus pedestris* 取食前后的大豆叶片转录组比较分析，挑选出了 4 个点蜂缘蝽取食后高度上调表达且影响不同信号通路的大豆抗性相关基因。其中 *Gm2* 参与异黄酮代谢、*Gm3* 参与生长素和硫苷代谢、*Gm6* 参与免疫信号识别和 *Gm8* 参与茉莉酸生物合成。利用 PCR 扩增 4 个基因的启动子序列并构建到 pGreen-LUC 载体上。构建成功的载体转化到大肠杆菌中，再利用根癌农杆菌注射在本氏烟中瞬时过表达建立报告系统。其次，在烟草叶片上表达点蜂缘蝽候选效应子 12 h 后再分别表达报告系统。通过观察效应子对荧光素酶表达活性的影响来研究效应子的功能。**【结果】** 琼脂糖凝胶电泳和测序证明了 PCR 成功扩增了 4 个抗性相关基因的启动子。荧光素酶报告基因检测、酶标仪酶活检测以及 Western Blot 验证了 4 个基因启动子在烟草叶片上成功表达。昆虫取食、机械处理和 MeJA 处理验证了该报告系统的可行性。最后利用该筛选体系对 9 个点蜂缘蝽效应子进行了筛选，结果显示 9 个点蜂缘蝽效应子对 4 个报告基因的表达有不同的调控作用。**【结论】** 成功建立了以荧光素酶为报告基因的点蜂缘蝽效应子筛选新体系，该体系可应用于点蜂缘蝽效应子的大量筛选，且具有高效、快速和操作简易等特点，为其他昆虫效应子的研究提供了新思路。

关键词 点蜂缘蝽；荧光素酶；大豆基因启动子；昆虫效应子；信号通路；烟草瞬时表达

Establishment and application of a new screening system for *Riptortus pedestris* effectors

LU Wang-Shan** LI Ji-Fen DONG Yu-Mei SHEN Dan-Yu DOU Dao-Long XIA Ai***

(College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract [Aim] To develop a new screening system for *Riptortus pedestris* effectors that target different plant resistance related pathways using luciferase as a reporting gene, and apply these it to the study of *R. pedestris* effectors. **[Methods]** Four resistance-related soybean genes that are highly upregulated after *R. pedestris* damage to soybean plants, and that are involved in different soybean signaling pathways, were selected after comparative analysis of two soybean transcriptomes from *R. pedestris* infested, and non-infested, leaves. The four genes were, Gm2, which participates in the isoflavone metabolism, Gm3, which is involved in the auxin and glucosinolate metabolism, Gm6, which is related to immune signal recognition and Gm8, which is involved in the biosynthesis of jasmonic acids. All promoter sequences of these four genes were amplified with PCR, then inserted into the pGreen 35s-LUC vector. Successfully constructed vectors were transferred to *Escherichia coli*, and then transiently expressed in the leaves of *Nicotiana benthamiana* using the *A. tumefaciens* infiltration method to establish reporting systems. After each *R. pedestris* effector had been transiently expressed in the leaves of *N. benthamiana* for 12 h, the reporting systems were expressed in the same area of each leaf. The function of each effector was determined by observing the impact of each gene on the expression of luciferase. **[Results]** Agarose gel electrophoresis and gene sequencing confirmed that four promotors of soybean resistance-related genes were successfully amplified using PCR. The luminous intensity of the luciferase reporter gene and an enzyme activity detection assay using Microplate Reader and Western Blot, demonstrated that all four promoters were successfully expressed in the leaves of *N. benthamiana*. The results of a feeding assay, mechanical plant

*资助项目 Supported projects：国家自然科学基金面上项目（32372531）

**第一作者 First author，E-mail：E-mail：luwangshan@stu.njau.edu.cn

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：xiaai@njau.edu.cn

收稿日期 Received：2022-11-11；接受日期 Accepted：2023-12-05

damage, and treatment with methyl jasmonate (MeJA), confirm that this new screening system is reliable. The system was subsequently used to screen *R. pedestris* effectors and indicates that nine *R. pedestris* effectors have different regulatory functions on the expression of the four reporter genes. **[Conclusion]** A new screening system for *R. pedestris* effectors, using luciferase as reporter, was successfully developed and used to select *R. pedestris* effectors. This new screening system is easy to operate, efficient and fast. It provides a novel approach for research on other insect effector genes.

Key words *Riptortus pedestris*; luciferase; promotor of soybean gene; insect effector; signal pathway; transient gene expression in *Nicotiana benthamiana*

点蜂缘蝽 *Riptortus pedestris* 隶属于半翅目（Hemiptera）蛛缘蝽科（Alydidae），也被称为豆缘蝽，是我国农业生产上一种重要的多食性害虫，寄主达 200 多种，包括重要的作物如棉花、大豆、水稻和玉米等，还危害果树和蔬菜等（高宇等，2019）。然而，点蜂缘蝽最适宜的寄主是大豆、豌豆、豇豆、蚕豆和绿豆等豆科植物，是我国大豆田间常见的刺吸式害虫之一（李文敬等，2020）。大豆开花结荚时，大量的点蜂缘蝽成虫或若虫涌入大豆田，利用针式口器刺吸植物汁液（Li *et al.*，2019；闫秀等，2021）。此虫尤其喜欢取食大豆豆荚，受害的豆荚外皮常见针孔状斑点（田鑫月等，2021；Jin *et al.*，2022）。大豆收割时受害植株枝青叶茂、籽粒瘪烂或空荚，被称为“荚而不实”型大豆“症青”（李文敬等，2020）。近几年，由点蜂缘蝽引起的大豆“症青”已经对黄淮海地区夏大豆的安全生产造成了严重威胁，且具有向西北、东北春大豆产区蔓延的趋势（高宇和史树森，2019；莫先树等，2019）。例如，2018 年在河南洛阳由点蜂缘蝽危害造成夏大豆的减产高达 46.9%（张华敏和刘建平，2019）。点蜂缘蝽除了直接危害也会传播酵母菌和核黄菌等病原菌，给农作物生产带来间接危害（Kimura *et al.*，2008；Li *et al.*，2021）。因此，点蜂缘蝽的危害严重制约着我国大豆产业的发展，为了顺利保障我国大豆生产，对点蜂缘蝽的防治显的尤为重要（高宇等，2019）。

点蜂缘蝽的防治现主要采用化学防治、农业防治和生物防治相结合的综合治理措施（张华敏和刘建平，2019）。在大豆花蕾期，喷洒吡虫啉、啶虫脒、联苯菊酯等化学药剂和阿维菌素、印楝素等生物农药；大豆收获后，清除植株残体和周围的杂草，减少越冬场所；冬季深耕，深埋枯枝落叶，消灭部分越冬成虫；大豆播种前，清除杂草和野生豆科植物，避免使其成为过度寄主（魏然等，2023）。植食性昆虫效应子是近些年来昆虫与植物互作研究的热点，为害虫的绿色防控提供了新的研究思路。例如，抗昆虫的植物 NLR 基因的挖掘和转基因植物的创建（Kloth *et al.*，2021）以及靶向昆虫效应蛋白的 RNA interference（RNAi）防虫技术等（Grover *et al.*，2019）。从效应子着手探索新的点蜂缘蝽防治策略是点蜂缘蝽研究的一个重点。Huang 等（2021a）通过分析点蜂缘蝽唾液腺蛋白组和转录组数据，预测到了 136 个候选效应子，其中 5 个基因：*RpSP10.3*，*RpSP13.4*，*RpSP13.8*，*RpSP17.8* 和 *RpSP10.2* 在烟草表达后诱导细胞死亡和活性氧爆发。Ji（2021）等也结合水样唾液收集，获得了 68 个候选效应子。然而，大多数点蜂缘蝽候选效应子在植物中的功能未知。

昆虫效应子的筛选大都借鉴了植物病原菌效应子的筛选体系，主要通过烟草过表达观察是否诱导细胞死亡和抑制病原相关分子模式（Pathogen-associated molecular patterns，PAMP）诱导的细胞死亡作为筛选表型（Mutti *et al.*，2008；Ma *et al.*，2015）。但缺点是利用此体系筛选出的效应子数量极少，如 Huang 等（2021a）从 136 个点蜂缘蝽唾液蛋白中筛选出了 5 个诱导烟草细胞死亡的候选效应子，Dong 等（2022）从 200 个蛋白中鉴定到了 4 个点蜂缘蝽效应子。RNAi 基因沉默也被广泛应用于昆虫效应子功能的研究，如烟粉虱 *Bemisia tabaci* Armet 和 Bt56 效应子利用 RNAi 沉默后影响了烟粉虱的取食行为（Xu *et al.*，2019；Du *et al.*，2022）。但 RNAi 只适用于研究单个或者几个昆虫效应子的功能，不适于大批效应子的初筛。其他研究方法例如转

基因植物的建立（Zhou *et al.*，2021）和 CRISPR-cas9 基因敲除（Chen *et al.*，2016）等，由于体系建立复杂、周期长和操作繁琐等问题也不适用于昆虫效应子的大规模筛选。因此，迫切需要建立新的昆虫效应子筛选体系。

利用荧光素酶作为报告基因已被广泛应用于人类基因功能的研究，并应用于人 I 型胶原 α2 基因激活子和抑制子的筛选（Bagchi *et al.*，2016）。荧光素酶基因报告系统也被应用于病原菌效应子的研究，如 FRK1 启动子控制下的拟南芥荧光素酶报告基因用于筛选影响 FRK1 的效应子（Mang *et al.*，2017）。因此，本研究拟建立以荧光素酶作为报告基因，且调控不同植物信号通路的点蜂缘蝽效应子筛选新体系，同时应用于点蜂缘蝽效应子的大量筛选。结果表明，本体系操作简单、结果易于观察且周期短，可广泛应用于昆虫效应子的研究。

1　材料与方法

1.1　供试植物和昆虫

野生型本氏烟 *Nicotiana benthamiana* 种子和大豆 *Glycine max* 种子由南京农业大学植物与疫霉互作实验室保存。两种植物材料的培养条件均为：相对湿度 60%-80%，温度为（25±1）℃，光周期为 L：D=16：8。本氏烟播种后 14 d 进行移栽，移栽后幼苗长到 28-42 d 用于实验。大豆植株长到一个月后进行实验。

点蜂缘蝽于 2019 年从江苏省农业科学院大豆实验田中采集，带回实验室后饲养至今。点蜂缘蝽饲养在 50 cm×50 cm×50 cm 的纱网笼子里，将生长 21-28 d 的大豆植株（Wiliams 82）以及大豆豆粒放在笼子里作为点蜂缘蝽的食料。养虫室的相对湿度为 60%-80%，温度为（25±1）℃，光周期为 L：D=14：10。选取点蜂缘蝽成虫进行实验。斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 幼虫由南京农业大学赵春青和董双林老师实验室提供，用小麦胚芽和豆粉制作成的人工饲料作为斜纹夜蛾的食料。饲养条件为相对湿度为 60%-80%，温度为（25±1）℃，光照时间 14 h 与黑暗时间 10 h 交替饲养。选用 2-3 龄斜纹夜蛾幼虫进行实验。

1.2　大豆抗性基因挑选与启动子序列分析

前期我们将点蜂缘蝽成虫取食的和对照大豆叶片分别采样和提取总 RNA，测序获得了大豆叶片转录组数据。通过对两个转录组数据的比较分析，从中挑选出了点蜂缘蝽取食后上调表达水平最高的大豆基因。进一步对这些上调基因的 KEGG pathway 分析，从中挑选出了 4 个参与不同信号通路的大豆基因，分别命名为 *Gm2*、*Gm3*、*Gm6* 和 *Gm8*（表 1）。通过与拟南芥的同源基因分析并查阅相关文献，发现 *Gm2* 为黄酮醇合酶，

表 1　大豆抗虫性相关基因信息

Table 1　Gene information of insect resistance genes from soybean

基因编号 Gene ID	检索号 Accession no.	拟南芥同源基因 Arabidopsis homologous	功能注释 Functional annotation	上调倍数 Fold change of gene upregulation
Gm2	Glyma.07G150900	AT5G05600（*JOX2*）	异黄酮代谢 Isoflavone metabolism	44.42↑
Gm3	Glyma.11G197300	AT4G39950（*CYP79B2*）	将色氨酸转化为吲哚-3-乙醛肟（生长素和硫代葡萄糖苷的前体） Convert Trp to indole-3-acetaldoxime (IAOx) (a precursor to IAA and indole glucosinolates)	67.96↑
Gm6	Glyma.14G048100	AT4G08850（*MIK2*）	编码一种类受体激酶参与非生物和生物胁迫 Encode a receptor kinase involving in abiotic and biotic stresses	12.60↑
Gm8	Glyma.13G239000	AT1G17420（*LOX3*）	以 α-亚麻酸为底物合成 13S-氢过氧亚麻酸 Using α-linolenic acid as substrate to synthesize (13S)-hydroperoxy-(9Z,11E,15Z)-octadecatrienoic acid	16.10↑

参与芳香族代谢产物的合成（Hernandez-Vega *et al.*，2017）；*Gm3* 编码细胞色素 P450，参与生长素和次生代谢产物硫代葡萄糖苷的合成（Hull *et al.*，2000）；*Gm6* 编码一种类受体激酶，参与感知生物和非生物胁迫（Rhodes *et al.*，2021）；*Gm8* 为脂氧合酶 3，催化茉莉酸生物合成的第一步反应，以 α-亚麻酸为底物合成 13S-氢过氧亚麻酸（Bürger and Chory，2019）。然后结合已发表的大豆 Williams 82 的基因组数据（https://phytozome-next.jgi.doe.gov/info/Gmax_Wm82_a4_v1），获取了 4 个基因的启动子序列。

1.3 大豆抗性相关基因启动子的 PCR 扩增

采集大豆叶片在液氮中速冻，然后利用预冷研磨器具充分研磨，研磨后的样品按照 Plant Genomic DNA Kit 试剂盒（天根生化科技（北京）有限公司，货号：DP305）的说明提取大豆基因组 DNA 并保存于实验室 - 80 ℃冰箱中备用。以大豆基因组 DNA 为模板，以表 2 中的序列作为扩增引物，利用 Phanta® Max Super-Fidelity DNA Polymerase 试剂盒（南京诺唯赞生物科技股份有限公司，货号：P505-d1）进行 PCR。PCR 反应条件为 95 ℃预变性 5 min、95 ℃变性 15 s、55 ℃退火 30 s、72 ℃延伸 2 min，循环 32 个反应后 72 ℃延伸 10 min，最后在 16 ℃下保温。PCR 反应后的产物利用琼脂糖凝胶进行电泳分离来验证目的基因是否扩增成功，将成功扩增的目的基因电泳条带采用 FastPure® Gel DNA Extraction Mini Kit 试剂盒（南京诺唯赞生物科技股份有限公司，货号：DC301-01）进行切胶回收。

表 2 大豆基因启动子扩增引物

Table 2 Amplification primers of soybean gene promoters

基因编号 Gene ID	5′引物 5′ Primers	3′引物 3′ Primers
Gm2	CTATAGGGCGAATTGGGTACCTTTTCTACCTGTCAATTTGGA	ATCGATACCGTCGACCTCGAGCATGTTTGGGAGGCCAATGATTC
Gm3	CTATAGGGCGAATTGGGTACCTTAACATGCGGCCGAGAAAGA	ATCGATACCGTCGACCTCGAGGGCTTGGAACAGGGTTTTTGAGG
Gm6	CTATAGGGCGAATTGGGTACCCAGTCTTACCAGAGTAAACCT	ATCGATACCGTCGACCTCGAGCAATTATCAACGAGTTGACTAAG
Gm8	CTATAGGGCGAATTGGGTACCATAAATTAGCCTGTTAAAATC	ATCGATACCGTCGACCTCGAGTATATACTTATGCTATTTGGCAC

1.4 大豆基因启动子表达载体的构建与烟草瞬时表达

利用 Fast Pure Plasmid Mini Kit 试剂盒（南京诺唯赞生物科技股份有限公司，货号：DC201-01）提取实验室现有的自带荧光素酶报告基因的 Pgreen 载体质粒。提取后的 pGreen 载体质粒利用 *Kpn* Ⅰ（酶切位点 GGTACC）和 *Bam*HⅠ（酶切位点 GGATCC）两种限制性内切酶酶切。同时利用相同的酶对纯化的大豆基因启动子序列进行切割。将酶切后的载体质粒和目的基因使用 ClonExpress® ⅡOne Step Cloning Kit（南京诺唯赞生物科技股份有限公司，货号：C112-01）进行同源重组，并将重组产物通过热激转化的方式转入大肠杆菌 *Escherichia coli* JM109 感受态中（南京巨匠生物科技有限公司）。再通过电击转化的方法将质粒转化到根癌农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101（南京巨匠生物科技有限公司）。转化后的农杆菌在 28 ℃和 220 r/min 下培养 36-48 h，通过离心收集细胞，洗涤 3 次后将其重新悬浮在 10 mmol·L^{-1} $MgCl_2$ 中，将 OD_{600} 调至 0.4。挑选长势良好的本氏烟叶片，将农杆菌悬浮液通过注射的方式在烟草中瞬时基因表达。

1.5 蛋白提取及 Western Blot 检测

取 0.1 g 表达目的蛋白的烟草叶片，用研磨机（Tissuelyser-48）（上海净信实业发展有限公司）研磨成细粉。将研磨好的蛋白样品与 1 mL 的蛋白提取液（配方：948 μL HePes Buffer；50 μL

10% Trition X-100；1 μL PI；1 μL 1 mol/L）混匀后离心取上清液。用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）分离蛋白质，然后将其转移到一块 20 μm 的聚偏二氟乙烯（PVDF）膜。用封闭缓冲液（含 5%脱脂奶粉的 TBST）在室温、40 r/min 摇床封闭 1 h。将 anti-LUC 加入封闭缓冲液中，在室温、40 r/min 摇床孵育 60-90 min。用 TBST 清洗 3 次（每次 5 min）。然后将膜与山羊抗小鼠（1∶10 000，奥德赛，no.926-32210；Li-178 Cor）（在含 5 %脱脂奶粉的 TBST 中，室温、40 r/min 孵育 45 min。孵育结束后使用 TBST 清洗 3 次（每次洗 5 min）。取 1 mL SuperSignal™ West Pico PLUS Stable Peroxide 和 1 mL SuperSignal™ West Pico PLUS Luminol/Enhancer（赛默飞世尔科技公司，货号：34578）1∶1 混合。将混合液滴加至 PVDF 膜上，避光放置 2 min 后放入成像仪（BioTek）中进行成像拍照。

1.6　活体成像仪荧光观察与荧光素酶活测定

本实验使用工作浓度为30 mg/mL D-Luciferin，Potassium Salt D-荧光素（钾盐）（南京沃博生物科技有限公司，货号：Y302A）（工作浓度为 30 mg/mL）喷施在烟草叶片的表面，避光放置 5 min，将烟草叶片置于活体成像仪（BioTek）中进行成像分析并拍照。液氮预冷研磨器具，用研磨机研磨样品。之后按照 Dual Luciferase Reporter Assay Kit（南京诺唯赞生物科技股份有限公司，货号：DL101-01）检测试剂盒说明分别测定 LUC 和 Renilla Luciferase （RLUC）的酶活值，并计算出 LUC/RLUC 的相对比值代表荧光素酶活性，最后再利用学生 *t* 检验分析不同样品之间的酶活显著性差异。

1.7　点蜂缘蝽效应子筛选体系的验证

把花椰菜花叶病毒 CaMV35S 强启动子替代大豆基因启动子插入 pGreen 载体（p35S-Luc）建立阳性对照，以 pGreen 空载体（empty vector, EV）作为阴性对照用于体系的验证。斜纹夜蛾取食处理方法为报告系统在本氏烟表达 36 h 后，利用 2-3 龄斜纹夜蛾幼虫取食同一烟草叶片的右侧作为处理，取食时间为 2 min，未经取食的左边作为对照。机械损伤处理为报告系统表达 36 h 后使用 1 mL 注射器针头穿刺叶片。外源喷施茉莉酸甲酯（methyl-jasmonate，MeJA）为喷施 400 μmol MeJA（sigma-aldrich 西格玛奥德里奇（上海）贸易有限公司，货号：392707），喷施 ddH_2O 作为对照，处理 2 h 后荧光素酶底物进行酶活性观察。

1.8　点蜂缘蝽效应子的表达及筛选

从实验室现有的点蜂缘蝽分泌到大豆的效应子中，随机选取了 9 个且功能尚未报道的效应子，详见表 3。并把这些基因的 cDNAs 分别构

表 3　点蜂缘蝽效应子 PCR 扩增引物及基因组编号

Table 3　PCR primers and genome ID of *Riptortus pedestris* effectors

点蜂缘蝽效应子编号 *Riptortus pedestris* effector code	5′引物 5′ Primers	3′引物 3′ Primers	基因组编号 Genome ID
RP36	ATGGTTGCCATATTCAAGGC	TTAAGAAGTATTTTTGGTGC	GWHPBAZH008699
RP382	ATGAAGTCGATTGTTATATT	TCACAATGAACAAATCTCAG	GWHPBAZH001967
RP384	ATGGCCTCACATCTCCTACA	TTACAACCTTCCTAAAATGA	GWHPBAZH005043
RP369	ATGCGTGCCCCAGTCGTTCT	TTAAATCGTAAGAGGTTTGC	GWHPBAZH013375
RP377	ATGCAACTGTTATTGGCTCT	TTATTTAGGAGTGAATGGAA	GWHPBAZH012582
RP438	ATGCGATTCTCTTTGGTCAT	TTAAAAAAGTCCCCAGAAAG	GWHPBAZH000271
RP400	ATGCTAGGGCCAACCATGGC	TCATGCTGAGAAATACAGTA	GWHPBAZH000256
RP401	ATGCTAGGGCCAACCATGGT	CTAGCGAATCCCTCGCTGAG	GWHPBAZH000260
RP403	ATGAGGCTCTGTCTGGTCAT	TTAGTAAAGCCCAAAGTGAG	GWHPBAZH000517

效应子序列可通过基因组编号从 Huang 等，2021b 文献获取。

Effector sequences can be acquired from an article of Huang *et al*, 2021b.

建到实验室现有的 pCambia 1300-FLAG 载体上，在本氏烟瞬时表达。效应子在本氏烟叶片上过表达 12 h 后再表达报告系统，36 h 后将叶片取下，在体外喷施荧光素酶底物，置于活体成像仪中观察荧光素酶生物荧光强度。

2 结果与分析

2.1 大豆抗性基因启动子序列 PCR 扩增

通过分析点蜂缘蝽取食的大豆转录组数据，挑选出了 4 个点蜂缘蝽取食后高度上调表达且参与不同信号通路的大豆抗性相关基因（*Gm2*，*Gm3*，*Gm6* 和 *Gm8*），并结合已发表的大豆基因组，获取了 4 个基因的启动子分别命名为 pGm2，pGm3，pGM6 和 pGm8，详见材料与方法 1.2。研究思路见图 1（A），4 个大豆基因参与的不同信号通路见图 1（B）。利用提取的大豆基因组 DNA 作为模板和表 2 中的序列作为引物，PCR 扩增了 4 个大豆基因的启动子，琼脂糖电泳结果发现 4 个基因的启动子片段扩增后的条带大小与预期的大小一致（图 1：C），表明这 4 个基因启动子被扩增成功。

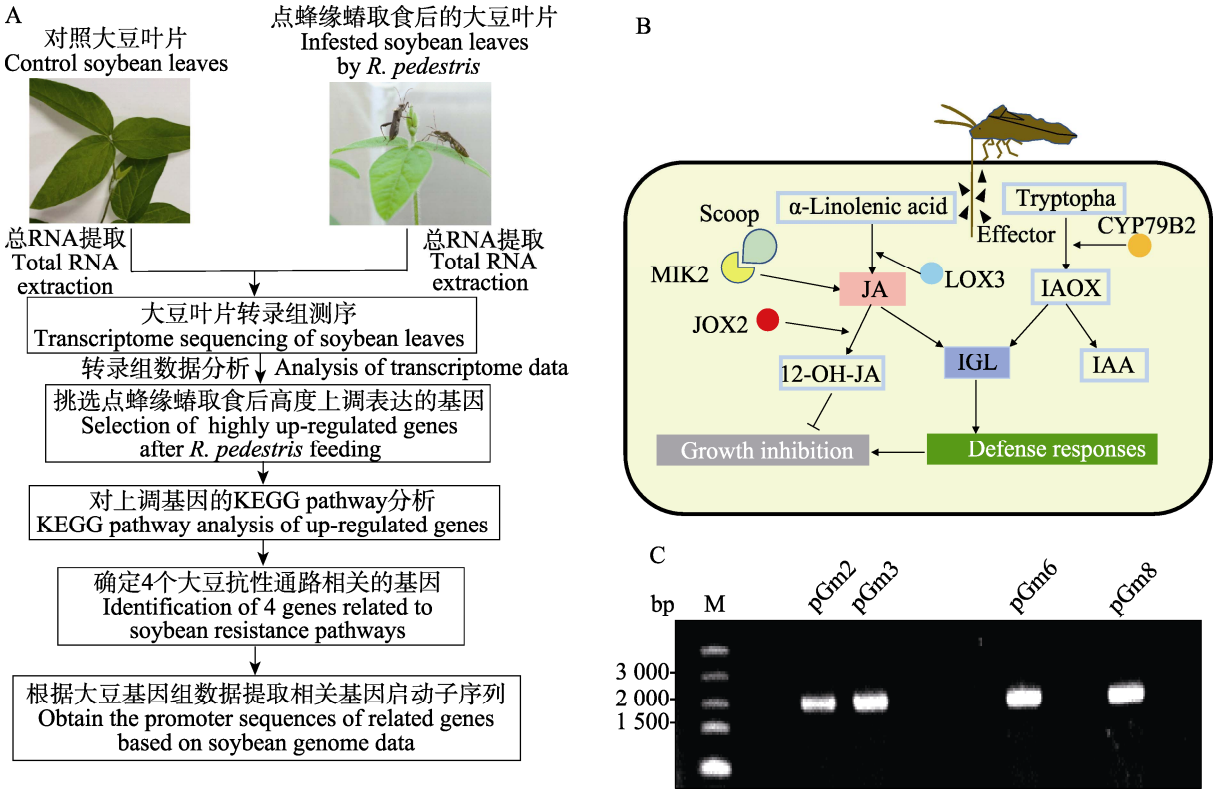

图 1 大豆抗性相关基因的选取及启动子序列的 PCR 扩增

Fig. 1 Selection of soybean resistance-related genes and PCR amplification of promoter sequences

A. 大豆抗性相关基因的选取流程；B. 4 个大豆抗性相关基因在调控植物抗性过程发挥的作用；黑色箭头表示正调控，黑色平末端线条表示负调控；C. 抗性相关基因启动子的扩增电泳图。

A. Selection process of soybean resistance related genes; B. The roles of 4 soybean resistance-related genes in regulation of plant immunity; Black arrow indicates positive regulation, and barred line represents negative regulation; C. The gel images of amplified resistance-related gene promoters.

2.2 大豆基因启动子表达载体的构建与大肠杆菌转化

扩增成功的 pGm2、pGm3、pGm6 和 pGm8 PCR 产物，利用 *Kpn* Ⅰ和 *Bam*H Ⅰ酶切构建到 pGreen 载体上，载体图谱和目的基因插入位点详见图 2（A，B）。构建成功的 pGreen 载体转化到大肠杆菌感受态细胞中，并利用 PCR 和测序

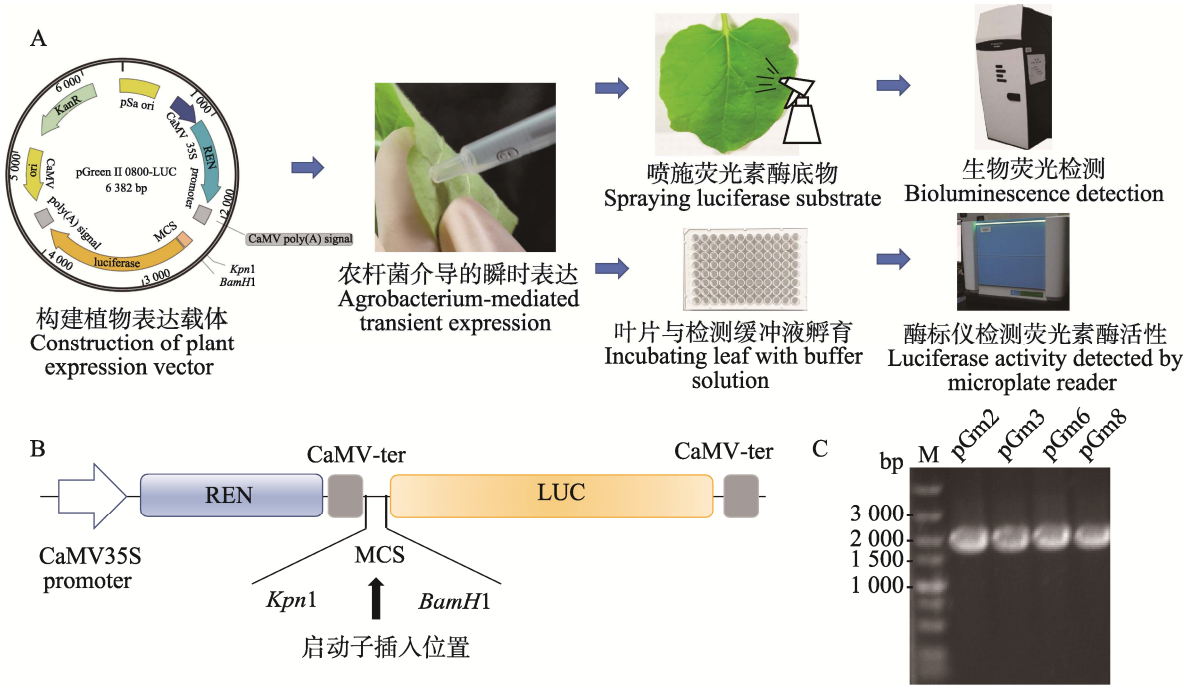

图 2　大豆抗性相关基因启动子表达载体的构建及 PCR 验证

Fig. 2　Construction of expression vectors of soybean resistance-related gene promoters and PCR validation

A. 载体图谱及农杆菌介导的瞬时表达实验流程；B. 启动子插入位点示意图；箭头所指即为启动子插入位点，位于 LUC 基因的上游；C. PCR 扩增产物电泳图。M 表示分子量标准。

A. Vector map and the experiment procedure of agrobacterium-mediated transient expression; B. The insertion sites of promoters; Arrow indicates the insertion site of promotors, located upstream of LUC gene. C. Gel images of PCR products; M indicates the standard molecular weights.

方法对阳性转化子进行验证。结果表明，pGm2、pGm3、pGm6 和 pGm8 的 PCR 产物与目的条带大小一致，表明（图 2：C）。利用软件 SeqHunter 将测序序列与目标序列进行比对，结果显示，pGm2、pGm3、pGm6 和 pGm8 的序列与目标序列完全一致。因此，以上结果表明，pGm2、pGm3、pGm6 和 pGm8 植物表达载体成功构建。

2.3　烟草瞬时表达和筛选体系的验证

2.3.1　阳性对照验证报告系统　阳性大肠杆菌转化子转化到农杆菌 GV3101 感受态，并在本氏烟中瞬时表达。然后在烟草叶片表面喷施荧光素酶发光底物进行荧光素酶活性观察（图 2：A）。以 pGreen 空载体（empty vector, EV）作为阴性对照，以 pGreen 35S-LUC 作为阳性对照。结果发现，阴性对照 pGreen EV 没有观察到荧光素酶发光，pGm2-Luc、pGm3-Luc、pGm6-Luc 和 pGm8-Luc 以及阳性对照 pGreen 35S-LUC 均能观察到荧光素酶发光（图 3：A），表明 4 个基因启动子驱动的荧光素酶都能正常表达。为了验证以上结果，我们进一步利用荧光素酶抗体通过 Western blot 检测蛋白的表达情况。结果显示，pGm2-Luc、pGm3-Luc、pGm6-Luc 和 pGm8-Luc 蛋白均能够在本氏烟中正常表达（图 3：B）。最后，利用酶标仪对 4 个报告系统的荧光素酶活性进行检测分析，结果发现，4 个报告系统均能检测到荧光素酶活性（图 3：C）。综合以上结果表明，4 个大豆抗性相关基因启动子的报告系统均能在烟草中正常表达。

2.3.2　斜纹夜蛾取食诱导报告基因上调表达　pGm2、pGm3、pGm6 和 pGm8 均能被刺吸式害虫点蜂缘蝽取食后诱导表达，为了验证报告系统的有效性，我们利用咀嚼式口器害虫斜纹夜蛾幼虫取食过表达 pGm2-Luc、pGm3-Luc、pGm6-Luc 和 pGm8-Luc 的本氏烟叶片。以 pGreen EV 作为阴性对照和 pGreen 35s-LUC 作为阳性对照

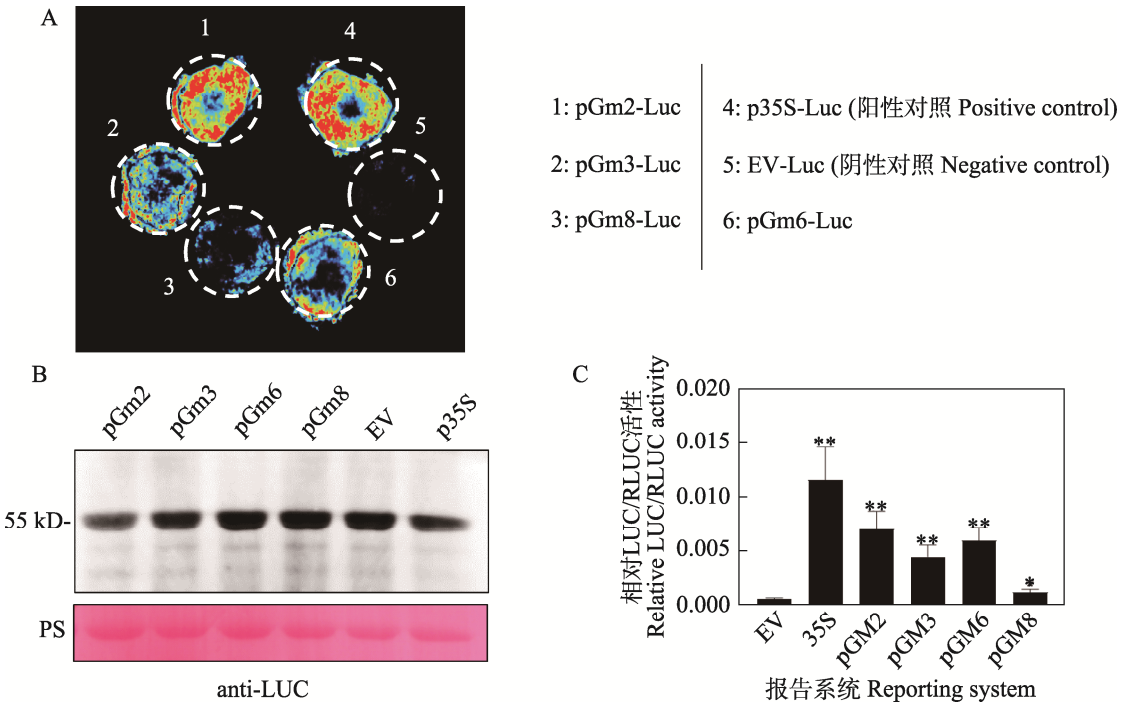

图 3　大豆抗性相关基因启动子的烟草瞬时表达及验证

Fig. 3　Transient expression of soybean resistance-related gene promoters in tobacco and validation

A. 大豆抗性相关基因启动子在本氏烟表达后的 LUC 活性观察；B. 利用 LUC 抗体 Western Blot 检测大豆抗性基因启动子的表达；C. 报告系统的荧光素酶活性检测结果。 阴性对照为 EV-Luc 和阳性对照为 P35S-Luc，图 4-图 6 同。**表示报告系统的荧光素酶活性与阴性对照相比具有极显著性差异（$P \leqslant 0.01$），*表示报告系统的荧光素酶活性与阴性对照相比具有显著性差异（$P \leqslant 0.05$）。

A. Observation of LUC activity of soybean resistance-related promoters after expression in tobacco; B. Western Blot detection of expressed soybean resistance-related promoters using LUC antibody; C. Measurements of luciferase activity in four report systems. EV-Luc was used as a negative control and P35S-Luc as a positive control. The same for fig.4-fig.6. **indicates that there is a highly significant difference in luciferase activity between reporter system and the negative control ($P \leqslant 0.01$). * indicates that there is a significant difference in luciferase activity between reporter system and the negative control ($P \leqslant 0.05$).

（图 4：A）。结果显示，被斜纹夜蛾幼虫取食后的 pGm2-Luc、pGm3-Luc、pGm6-Luc 和 pGm8-Luc 发光强度显著强于未被取食的烟草叶片（图 4：B-E）。表明，和刺吸式昆虫相似，咀嚼式昆虫的取食也能驱动 pGm2、pGm3、pGm6 和 pGm8 上调荧光素酶基因的表达。

2.3.3　机械损伤（针扎）增强报告基因的荧光强度　植食性昆虫取食过程中均会对植物造成机械伤害，我们采用机械损伤（针扎）模拟昆虫取食时造成的损伤。研究思路详见材料与方法 1.7 和图 5（A）。结果显示，未经过机械损伤处理的荧光强度没有明显差异，而经过机械损伤处理的右侧叶片 4 个报告基因的荧光强度则有不同程度的增强。结果表明，机械损伤同样使 Gm2、Gm3、Gm6 和 Gm8 的启动子表达上调（图 5：B，C）。

2.3.4　外源喷施茉莉酸甲酯不影响报告基因的表达　茉莉酸甲酯是茉莉酸（Jasmonic acid，JA）的挥发性甲酯衍生物，作为与损伤相关的植物激素，产生与机械损伤和昆虫取食相似的效果，诱导植物免疫防御基因的表达（杨乃博等，2014）。我们将 Gm2 promoter-Luc、Gm3 promoter- Luc、Gm6 promoter-Luc 和 Gm8 promoter-Luc 在本氏烟叶片过表达 36 h 后，体外喷施茉莉酸甲酯，以喷施 ddH_2O 作为对照，处理 2 h 后，喷施荧光素酶底物，将其置于活体成像仪中进行 LUC 荧光强度的观察（图 6：A）。结果显示，使用茉莉酸甲酯处理和使用 ddH_2O 处理两者之间并没有明显差异（图 6：B）。结果表明，茉莉酸甲酯不影响大豆抗性基因 *Gm2*、*Gm3*、*Gm6* 和 *Gm8* 表达。

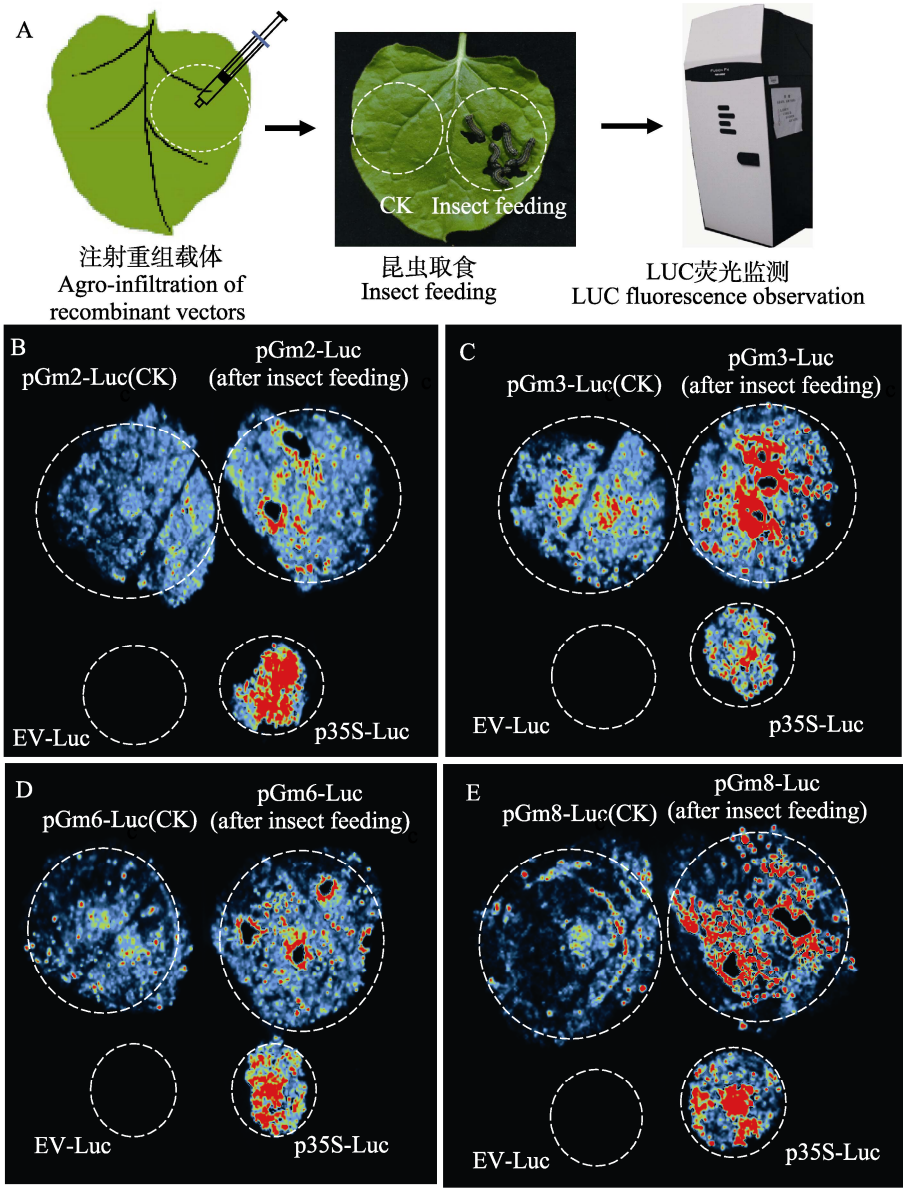

图 4　斜纹夜蛾取食诱导报告基因的上调表达

Fig. 4　Up-regulation of reporter genes induced by feeding of *Spodoptera litura*

A. 斜纹夜蛾取食对报告基因表达影响的实验设计；B-E：斜纹夜蛾取食后不同报告基因的荧光强度检测。

A. Experimental design of the effects of *S. litura* feeding on report gene expression;
B-E. Fluorescence intensity detection of different report genes after feeding by *S. litura*.

2.4　新筛选体系应用于点蜂缘蝽效应子的研究

我们实验室前期对点蜂缘蝽取食前后的大豆叶片蛋白进行质谱鉴定，从中选取了 9 个点蜂缘蝽取食后分泌到大豆中的效应子，分别在本氏烟叶片中过表达（以 GFP 作为对照），12 h 后在过表达候选效应子的区域分别注射 4 个大豆启动子植物表达载体。36 h 后取下叶片，在体外喷施荧光素酶底物，5 min 后置于活体成像仪中进行观察 LUC 荧光强度。结果表明 RP377、RP438，RP400，RP401 和 RP403 抑制大豆抗性基因 *Gm2* 的表达，RP36、RP382、RP384，RP377，RP438，RP400，RP401 和 RP403 下调大豆抗性基因 *Gm3* 的表达，RP401 上调大豆抗性基因 *Gm8* 的表达，RP377，RP438，RP400 和 RP403 抑制大豆抗性基因 *Gm8* 表达（图 7：A-E）。

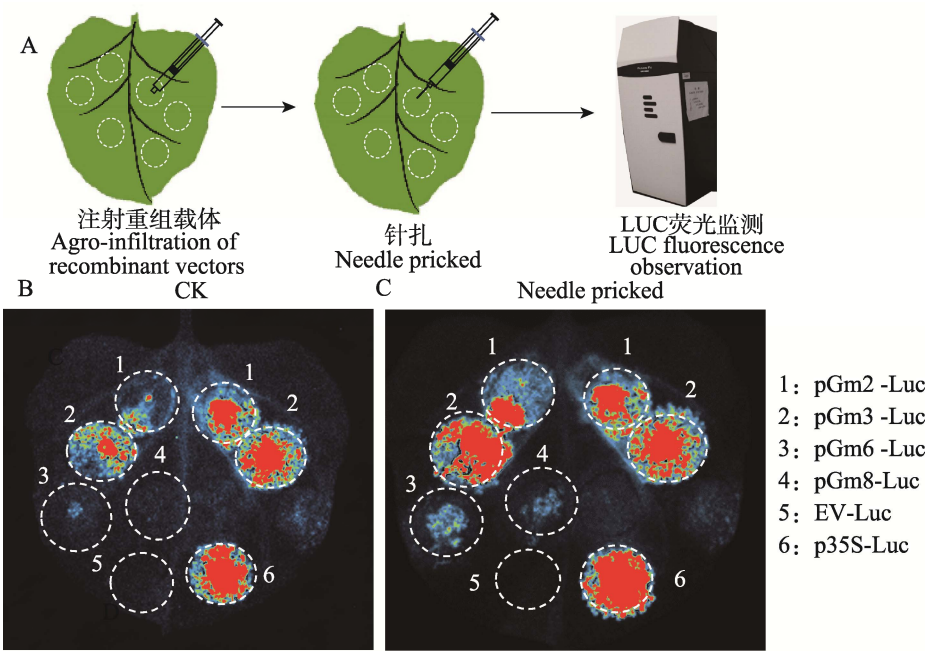

图 5　机械损伤增强了大豆抗性相关基因的表达

Fig. 5　Mechanical damage enhanced soybean resistance related gene expressions

A. 机械损伤对报告系统基因表达影响的实验设计；B-C. 机械损伤处理后报告基因表达的荧光检测。

A. Experimental design of mechanical damage impact on the gene expression of report systems; B-C. Fluorescence detection of report gene expressions after treatment of mechanical damage.

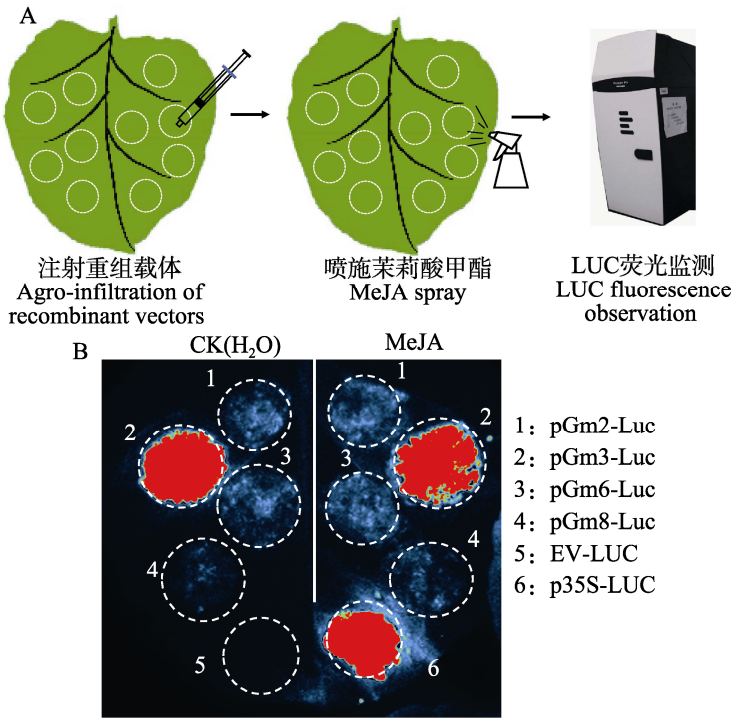

图 6　茉莉酸甲酯不影响大豆抗性相关基因的表达

Fig. 6　Methyl jasmonate did not affect the expression of soybean resistance related genes

A. 茉莉酸甲酯对报告系统影响的实验设计；B. 茉莉酸甲酯处理后前后本氏烟叶片荧光强度。

A. Experimental design of the impact of methyl jasmonate on the gene expression of report system; B. Fluorescence intensity of tobacco leaves before and after treatment of methyl jasmonate.

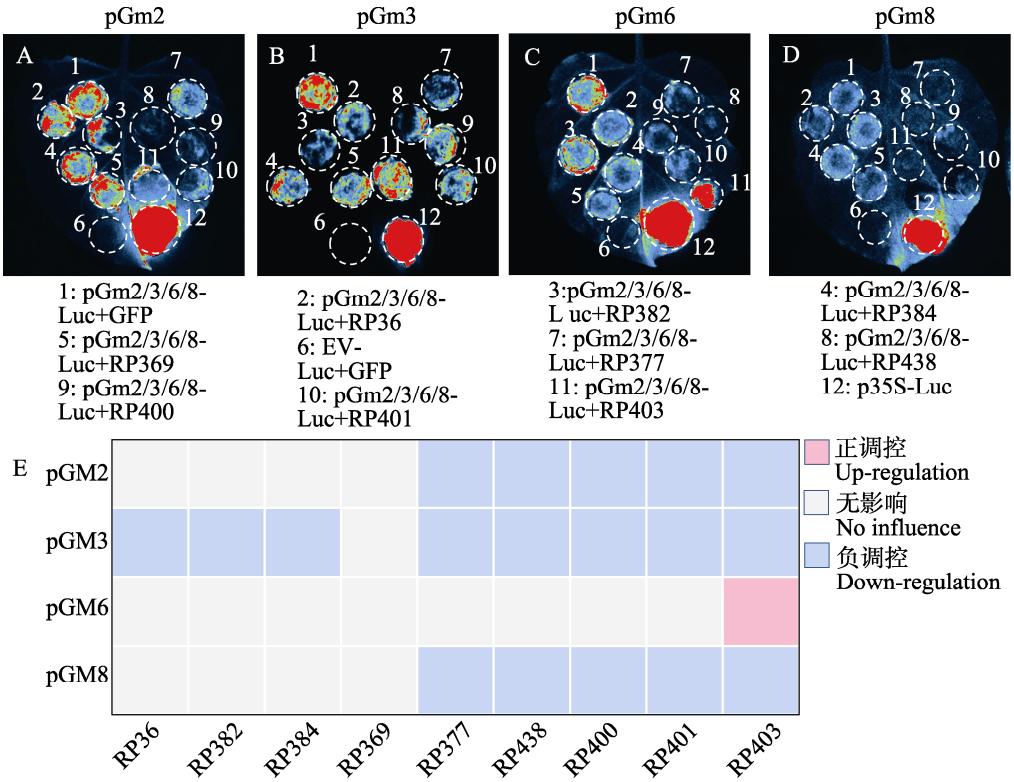

图 7　利用建立的筛选体系对点蜂缘蝽效应子进行筛选

Fig. 7　Using established screening system to screen *Spodoptera pedestris* effectors

A-D. 点蜂缘蝽效应子对大豆抗性相关基因表达的影响；GFP 作为对照；
E. 点蜂缘蝽效应子对报告基因表达调控的结果统计图。
A-D. Impacts of *R. pedestris* effectors on report gene expressions; GFP was used as a negative control;
E. Statistical result analysis of regulatory roles of *R. pedestris* effectors on reporter gene expressions.

3　讨论

本研究中，我们利用荧光素酶作为报告基因，构建了调控大豆不同信号通路的点蜂缘蝽效应子筛选体系。这些信号通路主要涉及异黄酮代谢、硫苷代谢、生物胁迫和激素，在抗虫中发挥着重要作用（Schuman and Baldwin，2016）。并通过建立 35S 强启动子驱动的 LUC 植物表达载体作为阳性对照和 GFP 为阴性对照，证实了 4 个报告系统在本氏烟中正常表达。随后通过设计昆虫取食和机械处理实验，结果发现，点蜂缘蝽和斜纹夜蛾取食以及针扎都能诱导寄主大豆 *Gm2*、*Gm3*、*Gm6* 和 *Gm8* 的上调表达，表明刺吸式害虫和咀嚼式害虫以及机械损伤都能诱发植物相似的免疫防御反应。前期研究表明咀嚼式口器害虫以撕裂植物组织的方式取食植物，因此这种取食行为诱发的植物免疫与机械损伤造成的免疫重叠（Bonaventure，2012）。刺吸式口器害虫利用针式口针刺入植物体内汲取汁液或细胞内含物，同样也会造成机械损伤，且机械损伤诱发的植物免疫信号通路与昆虫效应子激活的防卫反应相似（Erb and Reymond，2019）。因此，本设计进一步证实了筛选体系的合理性。

外源喷施茉莉酸甲酯，发现茉莉酸甲酯不影响 4 个基因的转录。分析原因可能为 Gm2、Gm3 和 Gm6 分别是异黄酮代谢、生长素和硫苷代谢和 RLK 信号通路中的蛋白，不参与茉莉酸合成和信号转导。而 Gm8 是脂氧合酶 3，其功能是以 α-亚麻酸为底物催化合成 13S-氢过氧亚麻酸 LOX3 基因，参与 JA 生物合成的第一步（Yang *et al.*，2020）。而茉莉酸甲酯是茉莉酸的挥发性物质，介于 JA 信号通路的下游（Bürger and Chory，2019）。因此，茉莉酸甲酯也不影响大豆抗性基因 Gm8 的表达。因此，外施 MeJA 不会

影响 4 个靶标基因的表达。

最后我们利用此筛选体系研究了 9 个之前尚未报道的点蜂缘蝽效应子，其中 RP36 和 RP382 为同源基因，序列高度相似，筛选结果表明 RP36 和 RP382 都能下调大豆抗性基因 *Gm3* 的表达，可能参与生长素和硫代葡萄糖苷的合成，而对其他 3 个基因表达没有影响，证明了新体系应用于点蜂缘蝽效应子筛选的可靠性。同时还发现报告系统 Gm2 和 Gm3 在本氏烟中的本底表达水平较高，比较适合用来筛选抑制该信号通路的效应子；而 Gm6 和 Gm8 在本氏烟中的本底表达水平较低，荧光强度较弱，更适合用来筛选诱导相关信号通路的效应子。

本实验建立的效应子筛选体系在昆虫效应子研究中具有广泛的应用前景：（1）根据选取的靶标基因启动子的不同可以筛选影响植物不同信号通路的昆虫效应子；（2）昆虫效应子的筛选可以突破寄主和非寄主植物的局限，例如点蜂缘蝽寄主是大豆，但由于缺乏大豆基因瞬时表达体系，不能用于效应子的筛选。而应用该体系可以筛选出调控大豆抗性的点蜂缘蝽效应子。现有的昆虫效应子筛选体系如利用本氏烟筛选引起细胞死亡和抑制 PAMPs 诱发的细胞死亡，能筛选出具有明显表型的效应子数量极少（Huang *et al*., 2021a；Dong *et al*., 2022），本体系能有效弥补其不足。同时，和 RNAi 方法研究昆虫效应子功能相比，本体系操作更简便、周期快且能获得更多不同功能的效应子（Du *et al*., 2022）。但本体系也有局限性，如不能筛选通过与靶标蛋白互作发挥功能的效应子。

参考文献 (References)

Bagchi RA, Mozolevska V, Abrenica B, Czubryt MP, 2015. Development of a high throughput luciferase reporter gene system for screening activators and repressors of human collagen Iα2 gene expression. *Canada Journal of Physiology and Pharmacology*, 93(10): 887 –892.

Bonaventure G, 2012. Perception of insect feeding by plants. *Plant Biology* (*Stuttg*), 14(6): 872–880.

Bürger M, Chory J, 2019. Stressed out about hormones: How plants orchestrate immunity. *Cell Host & Microbe*, 26(2): 163–172.

Chen L, Wang G, Zhu YN, Xiang H, Wang W, 2016. Advances and perspectives in the application of CRISPR/Cas9 in insects. *Zoological Research*, 37(4): 220–228.

Dong YM, Huang XG, Yang YX, Li JF, Zhang MQ, Shen H, Ren YR, Li XY, Tian JL, Shen DY, Dou DL, Xia A, 2022. Characterization of salivary secreted proteins that induce cell death from *Riptortus pedestris* (Fabricius) and their roles in insect-plant interactions. *Frontiers in Plant Science*, 13: 912603.

Du H, Xu HX, Wang F, Qian LX, Liu SS, Wang XW, 2022. Armet from whitefly saliva acts as an effector to suppress plant defences by targeting tobacco cystatin. *New Phytologist*, 234(5): 1848–1862.

Erb M, Reymond P, 2019. Molecular interactions between plants and insect herbivores.*Annual Review of Plant Biology*, 70: 527–557.

Gao Y, Chen JH, Shi SS, 2019. Research progress on soybean stink bug (*Riptortus pedestris*). *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 41(5): 804–815. [高宇, 陈菊红, 史树, 2019. 大豆害虫点蜂缘蝽研究进展. 中国油料作物学报, 41(5): 804–815.]

Gao Y, Shi SS, 2019. The relationship between staygreen syndrome in soybean and stink bugs and preventive strategy. *Soybean Science*, 38(4): 650–655. [高宇, 史树森, 2019. 大豆“荚而不实”型“症青”与蝽类害虫为害的相关性及防控策略. 大豆科学, 38(4): 650–655.]

Grover S, Jindal V, Banta G, Taning CNT, Smagghe G, Christiaens O, 2019. Potential of RNA interference in the study and management of the whitefly, *Bemisia tabaci*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 100(2): e21522.

Hernández-Veg JC, Cady B, Kayanja G, Mauriello A, Cervantes N, Gillespie A, Lavia L, Trujillo J, Alkio M, Colón-Carmona A, 2017. Detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in *Arabidopsis thaliana* involves a putative flavonol synthase. *Journal of Hazardous Materials*, 321: 268–280.

Huang HJ, Yan XT, Wei ZY, Wang YZ, Chen JP, Li JM, Sun ZT, Zhang CX, 2021a. Identification of *Riptortus pedestris* salivary proteins and their roles in inducing plant defenses. *Biology (Basel)*, 10(8): 753.

Huang HJ, Ye YX, Ye ZX, Yan XT, Wang X, Wei ZY, Chen JP, Li JM, Sun ZT, Zhang CX, 2021b. Chromosome-level genome assembly of the bean bug *Riptortus pedestris*. *Molecular Ecology Resources*, 21(7): 2423–2436.

Hull AK, Vij R, Celenza JL, 2000. Arabidopsis cytochrome P450s that catalyze the first step of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(5): 2379–2384.

Ji R, Fu JM, Shi Y, Li J, Jing MF, Wang L, Yang SY, Tian T, Wang LH, Ju JF, Guo HF, Liu B, Dou DL, Hoffmann AA, Zhu-Salzman K, Fang JC, 2021. Vitellogenin from planthopper oral secretion acts as a novel effector to impair plant defenses. *New Phytologist*, 232(2): 802–817.

Jin Y, Zhang WD, Dong YM, Xia, A, 2022. Feeding behavior of *Riptortus pedestris* (Fabricius) on soybean: Electrical penetration

graph analysis and histological investigations. *Insects*, 13(6): 511.

Kimura S, Tokumaru S, Kuge K, 2008. Morphology and viability of soybean yeast spot disease pathogen yeasts isolated from feces of *Riptortus pedestris*. *Annual Report of the Kansai Plant Protection Society*, 50: 73–76

Kloth KJ, Shah P, Broekgaarden C, Ström C, Albrectsen BR, Dicke M, 2021. SLI1 confers broad-spectrum resistance to phloem-feeding insects. *Plant Cell & Environment*, 44(8): 2765–2776.

Li K, Zhang XX, Guo JQ, Penn H, Wu TT, Li L, Jiang H, Chang LD, Wu CX, Han TF, 2019. Feeding of *Riptortus pedestris* on soybean plants, the primary cause of soybean staygreen syndrome in the Huang-Huai-Hai river basin. *The Crop Journal*, 7(3): 360–367.

Li WJ, Gao Y, Hu YL, Li S, Bi R, Zhang JP, Shi SS, 2020. Effects of the *Riptortus pedestris* on staygreen syndrome and yield of soybean. *Soybean Science*, 39(1): 116–122. [李文敬, 高宇, 胡英露, 李昇, 毕锐, 张金平, 史树森, 2020. 点蜂缘蝽(*Riptortus pedestris*)为害对大豆植株“症青”发生及产量损失的影响. 大豆科学, 39(1):116–122.]

Li WJ, Gao Y, Hu YL, Chen JH, Zhang JP, Shi SS, 2021. Field cage assessment of feeding damage by *Riptortus pedestris* on soybeans in China. *Insects*, 12(3): 255.

Ma ZC, Song TQ, Zhu L, Ye WW, Wang Y, Shao YY, Dong SM, Zhang ZG, Dou DL, Zheng XB, Tyler BM, Wang YC, 2015. A *Phytophthora sojae* glycoside hydrolase 12 protein is a major virulence factor during soybean infection and is recognized as a PAMP. *Plant Cell*, 27(7): 2057–2072.

Mang H, Feng B, Hu ZJ, Boisson-Dernier A, Christina M, Franck CM, Meng XZ, Huang YY, Zhou JG, Xu GY, Wang TT, Shan LB, He P, 2017. Differential regulation of two-tiered plant immunity and sexual reproduction by ANXUR receptor-Like kinases. *The Plant Cell*, 29: 3140–3156.

Mo XS, Liang JM, Li DX, Liang FQ, Zhang MJ, Liu MJ, Xiao JP, Zhang P, 2019. Exploring the causes and precautions of soybean staygreen syndrome in Huang-Huai-Hai regions. *Soybean Science*, 38(5): 770–778. [莫先树, 梁家铭, 李得孝, 梁福琴, 张明君, 刘萌娟, 肖金平, 张璞, 2019. 黄淮海夏大豆田“症青”的成因探析及预防. 大豆科学, 38(5): 770–778.]

Mutti NS, Louis J, Pappan LK, Pappan K, Begum K, Chen MS, Park Y, Dittmer N, Marshall J, Reese JC, Reeck GR, 2008. A protein from the salivary glands of the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*, is essential in feeding on a host plant. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(29): 9965–9969.

Rhodes J, Yang HJ, Moussu S, Boutrot F, Santiago J, Zipfel C, 2021. Perception of a divergent family of phytocytokines by the Arabidopsis receptor kinase MIK2. *Nature Communications*, 12(1): 705.

Schlaeppi K, Abou-Mansour E, Buchala A, Mauch F, 2010. Disease resistance of Arabidopsis to *Phytophthora brassicae* is established by the sequential action of indole glucosinolates and camalexin. *Plant Journal*, 62(5): 840–851.

Schuman MC, Baldwin IT, 2016. The layers of plant responses to insect herbivores. *Annual Review of Entomology*, 61: 373–394.

Tian XY, HU YL, Wang ZJ, Li WB, Sun Y, Gao Y, Shi SS, 2021. Effects of soybean organs in vitro feeding on the growth and development of *Riptortus pedestris* nymphs. *Soybean Science*, 40(3): 398–402. [田鑫月, 胡英露, 王自杰, 李文博, 孙烨, 高宇, 史树森, 2021, 大豆离体器官饲养对点蜂缘蝽若虫生长发育的影响. 大豆科学, 40(3): 398–402.]

Wei Ran, Yu XG, Li Y, Cui JY, Wu JY, Wei XY, Cui SB, Chen XJ, 2023. Research progress in the control of soybean pest, *Riptortus pedestris*. *Journal of Hebei Agricultural Sciences*, 27(2): 68–73. [魏然, 于晓光, 李阳, 崔杰印, 吴俊彦, 位昕禹, 崔少彬, 陈祥金, 2023. 大豆害虫点蜂缘蝽防治研究进展. 河北农业科学, 27(2): 69–73.

Xu HX, Qian LX, Wang XW, Shao RX, Hong Y, Liu SS, Wang XW, 2019. A salivary effector enables whitefly to feed on host plants by eliciting salicylic acid-signaling pathway. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(2): 490–495.

Yang NB, Wu SR, Shen LB, Zhang SZ, Yang BP, 2014. A review on plant resistance to insect pests. *Chinese Journal of Tropical Agriculture*, 34(9): 61–68, 89. [杨乃博, 伍苏然, 沈林波, 张树珍, 杨本鹏, 2014. 植物抗虫性研究概况. 热带农业科学, 34(9): 61–68, 89.]

Yang TH, Lenglet-Hilfiker A, Stolz S, Glauser G, Farmer EE, 2020. Jasmonate precursor biosynthetic enzymes LOX3 and LOX4 control wound-response growth restriction. *Plant Physiology*, 184(2): 1172–1180.

Yan X, An JJ, Gao ZL, Dang ZH, Pan WL, Li MY, Yuan WL, Li YF, 2021. Relationships between population density of *Riptortus pedestris* and spring sowing soybean yield using cumulative insect-days method. *Plant Protection*, 47(3): 96–100, 108. [闫秀, 安静杰, 高占林, 党志红, 潘文亮, 李明远, 袁文龙, 李耀发, 2021. 利用累积虫日法评估点蜂缘蝽种群密度与春播大豆产量的关系. 植物保护, 47(3): 96–100.]

Zhang HM, Liu JP, 2019. Cause of occurrence and control strategy of *Riptortus pedestris* in summer sowing soybean field in Luoyang city. *China Agricultural Technology Extension*, 35(12): 81–83. [张华敏, 刘建平, 2019. 洛阳市夏播大豆田点蜂缘蝽发生原因及防控策略. 中国农技推广, 35(12): 81–83.]

Zhou Y, Yang K, Yan Q, Wang XD, Cheng M, Si JR, Xue X, Shen DY, Jing MF, Tyler BM, Dou DL, 2021. Targeting of anti-microbial proteins to the hyphal surface amplifies protection of crop plants against Phytophthora pathogens. *Molecular Plant*, 14(8): 1391–1403.