

棉花倍半萜合成酶基因 *GhTPS1* 的克隆 及棉铃虫取食诱导表达谱分析*

黄欣蒸^{1,2**} 武娟² 徐绮霞² 张永军^{2***} 郭予元^{1,2***}

(1. 西北农林科技大学植物保护学院 杨陵 712100;

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

摘 要 棉花被植食性昆虫取食后大量释放的特异性萜烯挥发物,能够有效吸引天敌昆虫进行寄主搜索和定位。本文从陆地棉(中棉12) *Gossypium hirsutum* 叶片中克隆获得一个倍半萜合成酶基因的全长 cDNA,命名为 *GhTPS1* (GenBank 登录号:JQ365627)。该基因编码 545 个氨基酸的蛋白,预测分子量为 63.3 ku,等电点为 5.92。氨基酸序列比对分析表明该基因与其它被子植物倍半萜合成酶基因一致性为 34%~60%,其中与欧洲葡萄(—)-germacrene D synthase 一致性最高(60%)。聚类分析表明 *GhTPS1* 属于由被子植物倍半萜合成酶基因组成的 TPSa 亚家族。采用实时荧光定量 PCR 检测了 *GhTPS1* mRNA 在棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 幼虫为害棉花不同时间的表达谱,结果表明接虫 24 h 该基因表达量显著上调。

关键词 棉铃虫, 萜烯合成酶, *GhTPS1*, 表达谱

Molecular cloning of the sesquiterpene synthase gene *GhTPS1* of *Gossypium hirsutum* and its induction by the feeding activity of cotton bollworm larvae

HUANG Xin-Zheng^{1,2**} WU Juan² XU Qi-Xia² ZHANG Yong-Jun^{2***} GUO Yu-Yuan^{1,2***}

(1. College of Plant Protection, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, China;

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

Abstract Cotton plants attacked by herbivorous insects emit large amounts of characteristic volatile terpenoids that are highly attractive to predatory insects and trigger specific behavioral reactions in these, such as detection and location of the chemical source. Here, we identified a novel sesquiterpene synthase gene *GhTPS1* (GenBank accession no. JQ365627) from leaves of *Gossypium hirsutum* cv. Zhongmian12. *GhTPS1* encodes a protein comprised of 545 amino acid residues with a calculated molecular mass of 63.3 ku and an isoelectric point of 5.92. Multiple sequence alignment revealed that the deduced amino acid sequence has 34%—60% identity with the sesquiterpene synthases of other angiosperm species, and shared the highest identity with that of (—)-germacrene D synthase from *Vitis vinifera*. Phylogenetic analysis clustered *GhTPS1* into the TPSa subfamily, which is predominantly comprised of angiosperm sesquiterpene synthase genes. We used real-time quantitative PCR to further investigate the temporal expression of *GhTPS1* in *G. hirsutum* leaves induced by the feeding activity of *Helicoverpa armigera* (Hübner) larvae. The results indicate that the *GhTPS1* transcription level significantly increased after 24 hours of larval feeding activity.

Key words *Helicoverpa armigera*, terpene synthase, *GhTPS1*, expression pattern

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 是农业生产上的一种重要害虫。转 Bt 棉的大规模推广

* 资助项目:国家重点基础研究发展计划 973 项目 (No. 2012CB114104)、国家自然科学基金 (31071694, 31171858)。

**E-mail: huangxinzheng85@163.com

***通讯作者, E-mail: yjzhang@ippcaas.cn; yuyuanguo@hotmail.com

收稿日期:2012-03-07, 接受日期:2012-04-16

有效控制了棉铃虫的为害 (Wu *et al.*, 2008), 但靶标害虫对 Bt 棉具有潜在抗性演化风险 (Liang *et al.*, 2008)。因此, 寻求新的害虫控制途径和方法来持续有效控制棉铃虫的为害显得尤为迫切。

在长期进化过程中, 植物为抵御害虫的取食为害逐渐形成了一套有效的防卫体系, 害虫取食会诱导其释放的挥发物发生质和量的变化。其中一些虫害诱导植物挥发物通过吸引害虫的天敌, 在植物的间接防御中发挥了重要作用 (Takabayashi and Dicke, 1996; Pichersky and Gershenzon, 2002; Dudareva *et al.*, 2006)。萜烯挥发物包括单萜、倍半萜及其衍生物, 是虫害诱导植物挥发物的主要组分 (Visser, 1986)。棉铃虫为害后增强释放的罗勒烯、蒎烯、月桂烯和柠檬烯等挥发物能使棉铃虫寄生性天敌中红侧沟茧蜂产生明显趋性, 说明棉铃虫为害诱导的棉花萜烯挥发物在寄生蜂搜寻棉铃虫幼虫的过程中起着重要作用 (于惠林等, 2006)。

萜烯合成酶 (terpene synthases, TPS) 是萜烯挥发物生物合成途径中的关键酶, 催化前体底物香叶基焦磷酸 (geranyl diphosphate, GPP) 和法呢基焦磷酸 (farnesyl diphosphate, FPP) 分别形成单萜和倍半萜。目前已有超过 30 种植物中的各种萜烯挥发物合成酶基因被克隆出来, 并有研究证明过量表达 TPS 基因的转基因植株能显著吸引天敌昆虫 (Kappers *et al.*, 2005; Beale, 2006; Schnee, 2006; Degenhardt *et al.*, 2009), 但是棉花萜烯挥发物合成酶基因的相关研究却鲜见报道。本文从陆地棉 (中棉 12) 中克隆了一个倍半萜合成酶基因, 并分析了该基因在棉铃虫取食不同时间后的表达谱, 以期利用植物挥发性信息化合物调控昆虫行为提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

棉铃虫 1996 年采自河南新乡, 室内用人工饲料饲养, 温度 26℃, 湿度 50% ~ 80%, 光照 L:D = 14:10, 未接触任何杀虫剂。选取 3 龄幼虫用于试验, 处理前饥饿 6 h。

1.2 供试棉花

棉花品种为中棉 12, 由中国农业科学院廊坊科研中试基地提供。人工培养箱内培养, L:D = 16

:8 (T:C = 29℃:5℃), 每盆 1 株, 长至 6 ~ 8 叶期用于试验。在上午 7:00 接入棉铃虫取食诱导, 每叶 1 头, 分别处理 0 (对照)、3、6、12、18 和 24 h, 每处理 3 次重复。分别采集不同处理棉花叶片, 液氮速冻后存于 -80℃ 冰箱备用。

1.3 棉株叶片总 RNA 提取及 cDNA 合成

参照葛晓萍和石琰璟 (2007) 的 CTAB 方法并加以改进提取棉叶总 RNA, 以 1% 的非变性琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 采用分光光度法检测 RNA 的含量和纯度。参照 Clontech 公司的 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 使用说明进行 3'RACE 和 5'RACE cDNA 第一链合成, 参照 Invitrogen 公司 SuperScript™ III 反转录试剂盒使用说明进行普通 PCR 和 real-time qPCR cDNA 第一链合成。

1.4 GhTPS1 克隆

根据 GenBank 中登录的倍半萜合成酶基因核苷酸序列 (登录号为: AY835398、AF374462 和 AF024615) 设计一对简并引物 FD 与 RD, 扩增 GhTPS1 序列中间片段。扩增程序为: 94℃ 4 min; 94℃ 30 s, 40℃ 30 s, 72℃ 1 min, 40 个循环。设计 3'端 RACE 引物 3F₁ 和 3F₂, 5'端 RACE 引物 5R₁ 和 5R₂, 参照 Clontech 公司的 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 使用说明扩增 GhTPS1 的 3'和 5'端序列 (表 1)。最后设计一对特异性引物

表 1 引物及探针
Table 1 Primers and probes

引物 Primer	序列 Primer sequence (5' - 3')
FD	RCTYCCAGAATACATGA
RD	TCYYBRTTTATAWCYTTCCA
3F ₁	GCAATCACATCTTTTGTGGAATGGGAG
3F ₂	CTCACACAAGTTTGAGCAAGAGAGAGGACA
5R ₁	GCACAATGTCCTCTCTTGTCTCAAACCTG
5R ₂	AACGCAAGTAAGAACTGGAATGGAGCC
ORFF	TAAGCTTGCATGTCTTCCATGTCCAAC
ORFR	GACTCGAGTCAAATCGGCACCG
TPS1F	GCATTGAGCGTCCCTTTT
TPS1R	ACCTTGCAAAGCCTTACGA
TPS1probe	CATTAGTCTCCCATGCCCCGAAACG
ACT4F	GGAGCTGAGAGATTCCGTTGTC
ACT4R	TGGATTCCAGCAGCTTCCA
ACT4probe	AGAAGTCCTCTTCCAGCCATCTCTCATTGG

(ORFF, ORFR) 扩增 *GhTPS1* 全长阅读框。PCR 扩增完毕后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 将 PCR 产物回收连接到 pEasy-T 克隆载体上, 挑选阳性克隆送博迈德公司测序。测序正确后, 对基因序列进行生物信息学分析。序列的同源性比对通过 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 完成; 蛋白质分子量及等电点的预测采用 Compute pI/Mw tool (http://web.expasy.org/compute_pi/) 完成; 使用 Clustal X 1.83 (Thompson *et al.*, 1997) 进行多重序列比对。最后基于比对结果, 使用 MEGA5 软件 (Tamura *et al.*, 2011) 的 neighbor-joining 算法构建进化树。

1.5 *GhTPS1* 表达谱分析

选择棉花 *GhACT4* (GenBank 登录号: AY305726) 作为内参基因 (Artico *et al.*, 2010)。目的基因 *GhTPS1* 的一对引物和探针分别为 TPS1F、TPS1R 和 TPS1probe, 内参基因 *GhACT4* 的一对引物和探针分别为 ACT4F、ACT4R 和 ACT4probe (表 1)。使用 ABI Prism® 7500 Fast 型荧光定量 PCR 仪进行实时荧光定量检测。选用 TaKaRa 公司的 *Premix Ex Taq*™ 荧光定量试剂盒, 各反应成分的含量为: 10 μ L *Premix Ex Taq*™ (2 $\times$) 反应液, 正向和反向引物各 0.4 μ L (10 μ mol $\cdot$ L⁻¹), 探针 0.8 μ L (10 μ mol $\cdot$ L⁻¹), 模板 cDNA 2 μ L, ROX Reference Dye II (50 $\times$) 0.4 μ L, 加水至 20 μ L。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C, 5 s; 60 $^{\circ}$ C, 34 s, 40 个循环。空白对照模板以水代替 cDNA, 每个样品重复 3 次。

1.6 数据处理

实时荧光定量 PCR 数据处理采用相对定量法, 依据各样品和其对应的 *GhACT4* 的 Ct 值, 参照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法 (Livak and Schmittgen, 2001) 进行计算。采用 STATA9.0 软件中的 Bonferroni 法进行多重比较不同处理是否存在差异。

2 结果与分析

2.1 *GhTPS1* 的克隆及生物信息学分析

基于同源序列比对, 首先用简并引物 FD 和 RD, 扩增得到约 500 bp 的条带, 经 BLAST 分析, 发现该片段与植物萜烯合成酶基因高度相似。随后利用 RACE 技术扩增得到该片段 5' 末端和 3' 末端, 拼接获得 *GhTPS1* 的 cDNA 全长序列。最后设

计一对引物 ORFF 和 ORFR, 扩增 *GhTPS1* 开放阅读框序列 (ORF), 得到约为 1 700 bp 的条带 (图 1)。

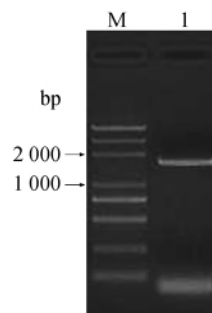


图 1 *GhTPS1* PCR 扩增

Fig.1 PCR amplification of *GhTPS1*

M: DNA 分子量标准 DNA marker DL2000 Plus;

1: 开放阅读框扩增产物

product of the open reading frame.

GhTPS1 的序列如图 2 所示, GenBank 登录号为 JQ365627。该 cDNA 开放阅读框为 1 638 bp, 编码 545 个氨基酸的蛋白, 预测分子量为 63.3 ku, 理论等电点为 5.92。将 *GhTPS1* 的氨基酸序列在 NCBI 网站进行 Blastp 分析, 发现其与欧洲葡萄 (-)-germacrene D synthase、亚洲棉 (+)- δ -cadinene synthase 及陆地棉 (+)- δ -cadinene synthase 表现较高的一致性, 分别为 60%、59% 和 57%。运用 Clustal X 软件将 *GhTPS1* 氨基酸序列与这 3 种倍半萜合成酶氨基酸序列进行比对, 结果显示 *GhTPS1* 具有植物 TPS 家族典型的保守序列, 包括 RR_xW、DDxxD、(N, D)D(L, I, V)x(S, T)xxxE 和 LQLYEASFL 等基序 (图 3)。

使用 Clustal X 软件将 23 个植物萜烯合成酶基因进行多序列比对, 然后使用 MEGA5.0 软件中的 neighbor-joining 算法构建聚类树 (图 4)。从聚类树结果可以看出, copalyl diphosphate (cdp) synthase 和 ent-kaurene synthase 等初级代谢相关萜烯合成酶分别聚类为 TPSc 和 TPSe 亚家族, 而次级代谢相关的被子植物单萜合成酶、被子植物倍半萜合成酶和裸子植物萜烯合成酶分别聚类为 TPSb、TPSa 和 TPSd。Tpsf 和 TPSg 亚家族成员酶产物为非环化单萜, 其中 Tpsf 是进化关系比较遥远的一个分支。目的基因 *GhTPS1* 聚类到 TPSa 亚家族, 与亚洲棉和陆地棉 (+)- δ -cadinene synthase

```

1  AATATCACAAAGAAGATATCGTCTCATTTTATAGTGTACTTTTCAAACCTCAATTACTAGGTAGAGAAATGCTCTCCATGTCCAACGT
1  M S S M S N V
91  CAATCGTCGCTCCGTTAACTATCATCCTAGTATTTGGGGTGATATTTCCCTTTTCATGTCCCTCCAAAATGAAAATAGATACTGTAACCTG
8  N R R S V N Y H P S I W G D I F L S C P S K M K I D T V T R
181  ACAAGAATACGAAGAACTGAAACAAGAAATAACGAGGATGCTTATGGTGGCTCCTGATGGGTCTCTCAAAAATACCGTTTAAATTGCTAC
38  Q E Y E E L K Q E I T R M L M V A P D G S S Q K Y R L I A T
271  AATAAAACGCTTAGGTGTGAGTTACCTTTTCGAAAAGAGATAGAGGATGCTTTACAGACTGATTTCCATCACCATGGATACAAAGCTGA
68  I K R L G V S Y L F E K E I E D A L Q T D F H H H G Y K A D
361  CCAAACCTTTGAGTATACGTCTCTTCAATTTTCGATTGCTTAGAGAGAATGGTTTAAATGCTCAAGCTGAAATATTCACCAATTTCAAGA
98  Q T L E Y T S L Q F R L L R E N G F N A Q A E I F N N F K D
451  TGACAAAGGAAATTTCAAGATATCCTTAACAAGTGATGTCAAAGGCTTGCTAGAATTATATGAAGCGAGTCATTTGCTTGTTCATGGAGA
128  D K G N F K I S L T S D V K G L L E L Y E A S H L L V H G E
541  GCATATACTAGAAGAAGCACTTGCTTTCCACCACCTCATCTAGAGCTTGCCCAAAGGATTGGCATTGAGCGTCCCCTTTAGCATTAGT
158  H I L E E A L A F T T T H L E L A Q R I G I E R P L S A L V
631  CTCCCATGCCGGAAACGACCAATTCGTAAGGCTTTGCCAAGGTTAGAGGCAAGGCAGTTCATTTCCCTGTATCAAGAAGATGATTACA
188  S H A R K R P I R K A L P R L E A R Q F I S L Y Q E D D S H
721  TGACAAGACGTTATTGAAGTTGCAAGTTGGATTCAACTTATTACAAAATTTGACAAGGAAGAACTAAGCAAGATCTCTAGGTGGTG
218  D K T L L K F A K L D F N L L Q N L H K E E L S K I S R W W
811  GAAAGATTTAGATTTTGAACAAATCTACCTTTTGACGAGATAGATTGGTTGAATGTTATTTTGGATATTAGGAGTGTACTTTGAACC
248  K D L D F A T N L P F A R D R L V E C Y F W I L G V Y F E P
901  CCAATACTCCTTTGCAAGAGAGATAATGACAAAAGCAATAGTCATGGCATCAACCATGGATGACATATATGATGTACATGGGACATATGA
278  Q Y S F A R E I M T K A I V M A S T M D D I Y D V H G T Y E
991  AGAATTTGAACCTTTTCAAAATGCGATTGAGAGGTGGGATAGCAACTTTATTGATCGGCTCCAGCATACATGAAAGTTTCTACAAAGC
308  E L E L F T N A I E R W D S N F I D R L P A Y M K V F Y K A
1081  ACTCTTAGATCTTTATGAAGAAATGGAGAAAGTGATGACCAAGCAAGGAAATCATACAGAGTCCAATACGCAAAAGAAGCAATGAAACA
338  L L D L Y E E M E K V M T K Q G K S Y R V Q Y A K E A M K Q
1171  ATTATCTCAGGCTTATTTTATGAGGCCAAATGGTACCATGAAAACCTACGTACCGATGGTAGAAGAGTACTTGAAAACCTGCCTTAGTATC
368  L S Q A Y F I E A K W Y H E N Y V P M V E E Y L K T A L V S
1261  TTCTGGCTACCCCATGGTTGCAATCACATCTTTTGTGGAATGGGAGACGTCGTTACAGAAGAAACCTTCAATTGGGCATCTAACAACCC
398  S G Y P M V A I T S F V G M G D V V T E E T F N W A S N N P
1351  TAAGATCGTAAGAGCTTCTTCGATGATTTCCCGTATTATGGATGATATCGTCTCACACAAGTTTGAGCAAGAGAGAGGACATTGTGCATC
428  K I V R A S S M I S R I M D D I V S H K F E Q E R G H C A S
1441  GGCGGTTGAATGCTACATGAAGCAACATGGAGTTTCAGAAGAAAAGGCATATGAAGAGTTAAAGAAGCTAATTGATTTCTGCTTGGAAAGA
458  A V E C Y M K Q H G V S E E K A Y E E L K K L I D S A W K D
1531  TATAAACAGGAGTTGCTGTTTAAGCCAGCTAGGGCTCCATTTCCAGTTCTTACTTGCGTTCTCAATCTTGGCGTTATGGATTTCCT
488  I N Q L F K P A R A P F P V L T C V L N L A R V M D F L
1621  TTACAAAGAAGGAGATGGTTATACACAGTCGAAATGTTACAAAGGCTGGGATTACTTCACTGTTGATTGATCCGGTGCCGATTGATG
518  Y K E G D G Y T H V G N V T K A G I T S L L I D P V P I *
1711  ACGAATTTTGGATTTGAGAAAGCTGACAACTGGCCAACCTCTTTCCCTTTAGTCTACGATCCAGGGAATTTGCGGTTTGACAGCATGTGT
1801  TTTTAAGCTGCTTTGTGATGGCTTTGTTATAGCTCAATCTGTTGTGTGCTTTGTGAGTTAGGCTTTAGTCTCTTTGTGCTGTGATTCTG
1891  TTTCTCAAATTTGTGTGGTTTCATCTCGGCATGTTGTGCTATCATGTGGCGATATTAATGGTTTAAATAAGCGCTTATATCTAAATAAA
1981  CACTTTTAAAGAAATTGGG

```

图2 *GhTPSI* 核酸序列及推导的氨基酸序列Fig.2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *GhTPSI*

及欧洲葡萄 (–)-germacrene D synthase 亲缘关系较近。

2.2 棉铃虫取食诱导 *GhTPSI* 表达谱分析

利用实时荧光定量 PCR 方法研究 *GhTPSI* 在棉铃虫 3 龄幼虫连续取食不同时间后转录水平的表达量 (图 5)。结果显示, 棉铃虫幼虫接到棉株上取食 3~8 h (第 1 天), 棉花叶片中 *GhTPSI* 的表达量与对照处理相比没有显著差异, 但是接虫取食 24 h (第 2 天早晨), 其表达量显著升高 (P

< 0.05)。

3 讨论

萜烯挥发物在调节寄主植物—植食性害虫—天敌三营养级关系方面有着重要作用 (Heil, 2008; Dicke, 2009)。深入研究萜烯挥发物基因调控机制可以补充和完善害虫综合治理的手段和措施, 对利用基因工程手段培育有效挥发物高释放量的作物品种具有指导意义 (孙晓玲和陈宗

```

VvGDS : MSVSSGVLLAPSKNLSPEVGRRCANFHSIWGDHFSYASEFTNTDHLKHQVQDLKENVKMLMAADDSACILLLLDAQRLGVAFHFESEIDEVKHMDGSSVVS-REEDYTTAS : 118
GaCDS : MASQASQVLASPHPAISS-ENPKADFHGIGMFCIP--DTDIAATELQYSELKAQVRKMIPEVDDNQLFFIDAWQLGVSHFESEIDEENIXRDNTNNDADTDYTTA : 116
VvCPS : MSVSSGVLLAPSKNLSPEVGRRCANFHSIWGDHFSYASEFTNTDHLKHQVQDLKENVKMLMAADDSACILLLLDAQRLGVAFHFESEIDEVKHMDGSSVVS-REEDYTTAS : 118
GhTPS1 : SSMN-----VNRSVYHSISGDTISCPKMK-TTVTRQEYSELKQRTMLNVAPEGSDYRLATIKRLGVSLRFESEIDEAQOTDEHHGYK-ADQTEYTS : 104

VvGDS : ERFLLRLQGGYHVSCLDNFNKFNENFESLSLSDVRGMLSLYEATHFRVHGEDILOALATTHQSATKHSSN-FLABQVHALQPIRGLRLEARNHFVYQADDSHNALLK : 236
GaCDS : ERFLLRLRHGFDISCDANFKFDEANFASLTSDVQGLLELYEATYMRVHGEDILOATSTTAQTLALPTLHH-PSBQVHALQSRRLGPRVEARNHISYQDLESNHSLLQ : 234
VvCPS : ERFLLRLQGGYHVSCLDNFNKFNENFESLSLSDVRGMLSLYEATHFRVHGEDILOALATTHQSATKYSSN-FLABQVHALQPIRGLRLEARNHFVYQAYDSHNALLK : 236
GhTPS1 : ECFLLRLRNGNAQABINFKKDKENSTSLSDVKLELLEASHLLEALATTHSELQRIQIERESALNCHARRPERRALPRLEARNHISLYQSDSHDHTLLK : 223
LQLYEASFLI

VvGDS : LAKLDENLLQLKHQKLSLSAHHKDLDSAHKLPFARDRVVECFWILGVYFEPQSFARLRVLAHTITIDIDYVYGLLESELTEAVERWISALIDQLPBMRVCKQALLYV : 355
GaCDS : FAKIDENLLQLLHRRKLSLSCRWKDLDSFTRKLPFARDRVVECFWILGVYFEPQSLGKNLRYLAHTITIDIDYVYGLLESELTEAVERWISALIDQLPBMRVCKQALLYV : 353
VvCPS : LAKLDENLLQLKHQKLSLSAHHKDLDSAHKLPFARDRVVECFWILGVYFEPQSFARLRVLAHTITIDIDYVYGLLESELTEAVERWISALIDQLPBMRVCKQALLYV : 355
GhTPS1 : FAKLDENLLQLHRELSLSCRWKDLDSATNLPFARDRVVECFWILGVYFEPQSFARLRVLAHTITIDIDYVYGLLESELTEAVERWISALIDQLPBMRVCKQALLYV : 342
RxR DDxxD

VvGDS : ERIEERHAGEGSRVLYIYAREAKNQVRAIYERAKNLQVQOITMEEMPVAVTSAHSLATCFVGHGDAITKEEDFIPSKIVKASAIYCLNDENVFHFKEQRGHVAEVEC : 474
GaCDS : EEMDOLLANGROYRYVYAKKAIIRLVQALLAKVTHONYKTFEEREDNALPSSGALALAIAYVGHSEVITPSEKHAASDPKILKASTICFHDIDAEHFNHRHDCSALBC : 472
VvCPS : ERIEERHAGEGSRVLYIYAREAKNQVRAIYERAKNLQVQOITMEEMPVAVTSAHSLATCFVGHGDAITKEEDFIPSKIVKASAIYCLNDENVFHFKEQRGHVAEVEC : 474
GhTPS1 : EMEKRVYTKGSGRYVYVYAREAKNQVRAIYERAKNLQVQOITMEEMPVAVTSAHSLATCFVGHGDAITKEEDFIPSKIVKASAIYCLNDENVFHFKEQRGHVAEVEC : 461
DDxxSxxxE
NDxxTxxxX

VvGDS : YMKQHAESEETPNFPQDVRANKDINEECIPTA-VMKPIIMRVNLARVIVTYKNGDGYTHSAVLDFVTSMLIDFVP : 557
GaCDS : YMKQHAESEETPNFPQDVRANKDINEECIPTA-VMKPIIMRVNLARVIVTYKNGDGYTHSAVLDFVTSMLIDFVP : 555
VvCPS : YMKQHAESEETPNFPQDVRANKDINEECIPTA-VMKPIIMRVNLARVIVTYKNGDGYTHSAVLDFVTSMLIDFVP : 557
GhTPS1 : YMKQHAESEETPNFPQDVRANKDINEECIPTA-VMKPIIMRVNLARVIVTYKNGDGYTHSAVLDFVTSMLIDFVP : 545

```

图3 *GhTPS1* 编码蛋白与已知倍半萜合成酶的同源性比较Fig. 3 Comparison of the deduced amino acid sequence of *GhTPS1* with those of other sesquiterpene synthases

比对序列下方为保守基序 conserved motifs are shown below the sequences.

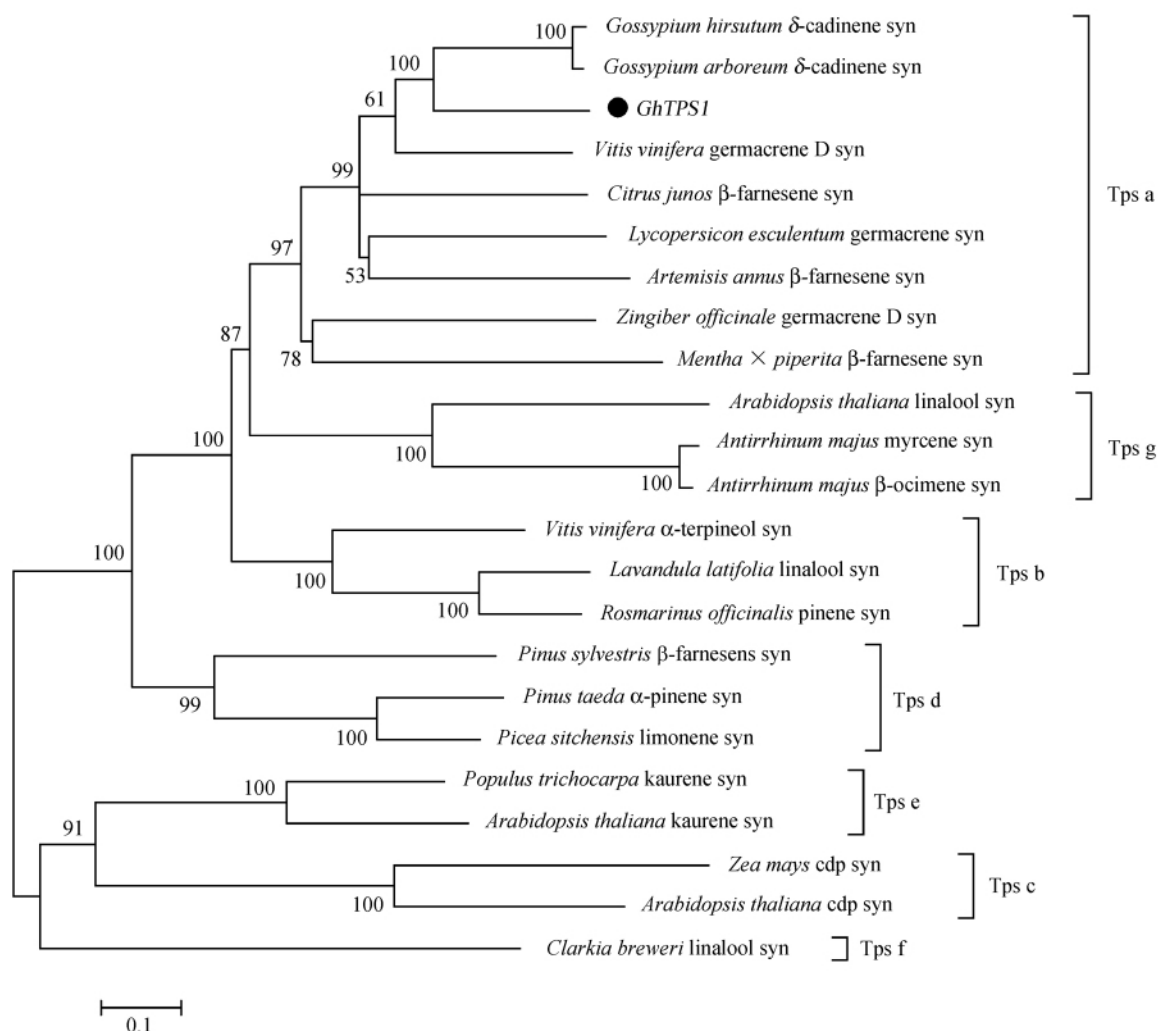
VvGDS: *Vitis vinifera* germacrene D synthase (Q6Q3H3); *GaCDS*: *Gossypium arboreum* δ -cadinene synthase (CAA77191); *VvCPS*: *Vitis vinifera* β -caryophyllene synthase (AEP17005).

懋, 2010)。TPS 基因在萜烯挥发物生物合成中起关键作用。有报道指出, 超表达草莓橙花叔醇合成酶基因 *FaNES1* 的拟南芥植株能吸引害虫天敌智利小植绥螨 (Kappers *et al.*, 2005)。Schnee 等 (2006) 研究发现超表达玉米萜烯合成酶 *TPS10* 基因的拟南芥能显著吸引有产卵经验的雌性缘腹绒茧蜂。Beale 等 (2006) 从薄荷中克隆了 (E)- β -法尼烯合成酶基因, 并将其在拟南芥中超表达, 发现该转基因植株不仅能驱避蚜虫, 而且能引诱天敌菜蚜茧蜂。目前, 棉花 TPS 基因的研究尚处于起步阶段。

本文成功克隆了一个棉花倍半萜合成酶基因 *GhTPS1*, 生物信息学结果表明, *GhTPS1* 具有 DDxxD 和 (N, D) D (L, I, V) x (S, T) xxxE 等植物萜烯合成酶基因典型保守序列 (Roeder *et al.*, 2007; Degenhardt *et al.*, 2009)。其中富含天冬氨酸的 DDxxD 基序高度保守, 几乎在所有的萜烯合成酶中都存在, 是二价金属离子结合位点 (Bohlmann *et al.*, 1998)。LQLYEASFLI 基序保守性稍低, 常常略有变化 (Bohlmann *et al.*, 1999)。另外, 在 DDxxD 基序上游 35 个氨基酸处存在保守的 RxR 基序, 该位点在底物离子化后络合二磷酸, 从而阻止其与后续形成的碳正离子发生亲核反应 (Köpke *et al.*, 2010)。序列比对分析

表明 *GhTPS1* 与棉花 (+)- δ -cadinene synthase 和葡萄 ($\rightarrow$)-germacrene D synthase 一致性较高 (57%~60%)。构建聚类树发现, 包括 *GhTPS1* 在内的 23 个 TPS 聚类为 7 个亚家族, 与先前关于 TPS 基因分类的报道一致 (Bohlmann *et al.*, 1998; Degenhardt *et al.*, 2009; Nagegowda, 2010)。GhTPS1 聚类到被子植物倍半萜合成酶基因组成的 TPSa 亚家族中, 说明 *GhTPS1* 是倍半萜合成酶基因, 而不是单萜合成酶基因。但是该基因的蛋白水平酶活性尚待进一步深入研究。

棉铃虫幼虫取食 24 h 后诱导 *GhTPS1* 表达量显著上调, 说明该基因参与棉花的诱导性防御反应。*GhTPS1* 的表达量在取食后第 1 天一直很低, 在第 2 天早晨才显著升高, 与棉贪夜蛾幼虫取食诱导利马豆 β -罗勒烯合成酶基因的表达模式相似 (Arimura *et al.*, 2008)。已有的研究表明, TPS 基因转录水平表达量通常与萜烯挥发物的释放量呈正相关 (McConkey *et al.*, 2000; Dudareva *et al.*, 2004; Tholl, 2006)。同样, 本文结果显示 *GhTPS1* 转录水平的表达模式与棉花中罗勒烯、芳樟醇和法尼烯等萜烯挥发物释放节律相类似, 这些挥发物在甜菜夜蛾幼虫为害前期释放量很低, 在第 2 天早晨释放量才开始增加 (Loughrin *et al.*, 1994)。另外, *GhTPS1* 表达量在取食后第 2 天早

图4 *GhTPS1* 和其它植物萜烯合成酶构建的聚类树Fig. 4 Phylogenetic tree of *GhTPS1* and other plant terpene synthase genes

晨显著上调,这种昼夜节律性增加萜烯挥发物释放量的生物学功能可能是吸引一些嗜好者在早晨觅食定位寄主的天敌 (Kaas *et al.*, 1993; Arimura *et al.*, 2008)。

参考文献 (References)

- Arimura G, Köpke S, Kunert M, Volpe V, David A, Brand P, Dabrowska P, Maffei ME, Boland W, 2008. Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean leaves: IV. Diurnal and nocturnal damage differentially initiate plant volatile emission. *Plant Physiol.*, 146 (3):965—973.
- Artico S, Nardeli SM, Brilhante O, Grossi-de-Sa MF, Alves-Ferreira M, 2010. Identification and evaluation of new reference genes in *Gossypium hirsutum* for accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data. *BMC Plant Biol.*, 10 (1):49.
- Beale MH, Birkett MA, Bruce TJA, Chamberlain K, Field LM, Huttly AK, Martin JL, Parker R, Phillips AL, Pickett JA, Prosser IM, Shewry PR, Smart LE, Wadhams LJ, Woodcock CM, Zhang YH, 2006. Aphid alarm pheromone produced by transgenic plants affects aphid and parasitoid behavior. *PNAS*, 103 (27):10509—10513.
- Bohlmann J, Meyer-Gauen G, Croteau R, 1998. Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis. *PNAS*, 95 (8):4126—4133.
- Bohlmann J, Phillips M, Ramachandiran V, Katoh S, Croteau R, 1999. cDNA cloning, characterization, and functional expression of four new monoterpene synthase members of the *tpsd* gene family from grand fir (*Abies grandis*). *Arch. Biochem. Biophys.*, 368 (2):232—243.
- Degenhardt J, Köllner TG, Gershenzon J, 2009. Monoterpene

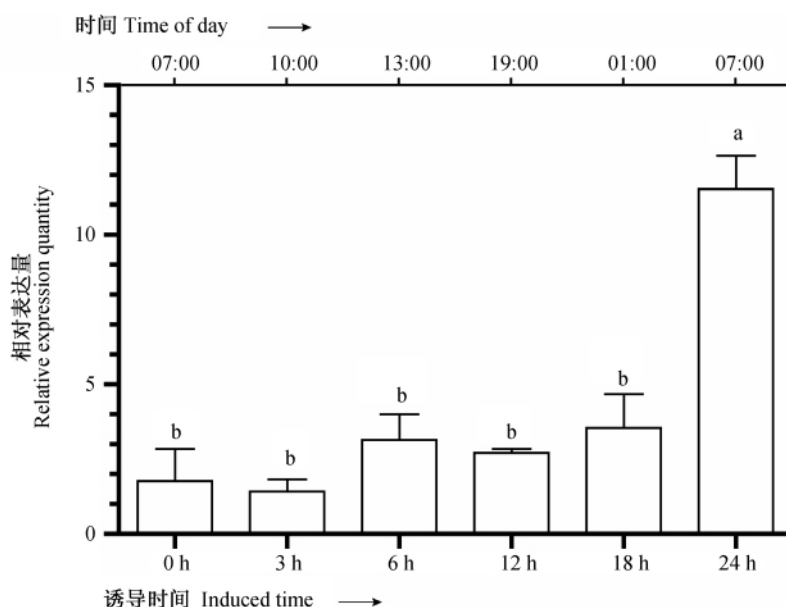


图5 *GhTPS1* 在不同诱导时间的表达量

Fig. 5 The expression level of *GhTPS1* along the different treatment stages

柱上不同小写字母表示表达量差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters above bars indicate significant difference in expression level ($P < 0.05$).

and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry*, 70 (15/16): 1621—1637.

Dicke M, 2009. Behavioural and community ecology of plants that cry for help. *Plant Cell Environ.*, 32 (6): 654—665.

Dudareva N, Negre F, Nagegowda DA, Orlova I, 2006. Plant volatiles: Recent advances and future perspectives. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 25 (5): 417—440.

Dudareva N, Pichersky E, Gershenzon J, 2004. Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiol.*, 135 (4): 1893—1902.

Heil M, 2008. Indirect defence via tritrophic interactions. *New Phytol.*, 178 (1): 41—61.

Kaas JP, Ramaswamy SB, Elzen GW, 1993. Behavioral time budget and periodicity exhibited by *Microplitis croceipes* in field cages with *Heliothis virescens* on spring host plants. *Entomophaga*, 38 (2): 143—154.

Kappers IF, Aharoni A, van Herpen TWJM, Luckerhoff LLP, Dicke M, Bouwmeester HJ, 2005. Genetic engineering of terpenoid metabolism attracts bodyguards to *Arabidopsis*. *Science*, 309 (5743): 2070—2072.

Köpke D, Beyaert I, Gershenzon J, Hilker M, Schmidt A, 2010. Species-specific responses of pine sesquiterpene synthases to sawfly oviposition. *Phytochemistry*, 71 (8/9): 909—917.

Liang GM, Wu KM, Yu HK, Li KK, Feng X, Guo YY,

2008. Changes of inheritance mode and fitness in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) along with its resistance evolution to Cry1Ac toxin. *J. Invertebr. Pathol.*, 97 (2): 142—149.

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25 (4): 402—408.

Loughrin JH, Manukian A, Heath RR, Turlings TCJ, Tumlinson JH, 1994. Diurnal cycle of emission of induced volatile terpenoids by herbivore-injured cotton plant. *PNAS*, 91 (25): 11836—11840.

McConkey ME, Gershenzon J, Croteau RB, 2000. Developmental regulation of monoterpene biosynthesis in the glandular trichomes of peppermint. *Plant Physiol.*, 122 (1): 215.

Nagegowda DA, 2010. Plant volatile terpenoid metabolism: biosynthetic genes, transcriptional regulation and subcellular compartmentation. *FEBS Lett.*, 584 (14): 2965—2973.

Pichersky E, Gershenzon J, 2002. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 5 (3): 237—243.

Roeder S, Hartmann AM, Effmert U, Piechulla B, 2007. Regulation of simultaneous synthesis of floral scent terpenoids by the 1, 8 - cineole synthase of *Nicotiana*

- suaveolens*. *Plant Mol. Biol.*, 65 (1) :107—124.
- Schnee C, Köllner TG, Held M, Turlings TCJ, Gershenzon J, Degenhardt J, 2006. The products of a single maize sesquiterpene synthase form a volatile defense signal that attracts natural enemies of maize herbivores. *PNAS*, 103 (4) :1129—1134.
- Takabayashi J, Dicke M, 1996. Plant-carnivore mutualism through herbivore-induced carnivore attractants. *Trends Plant Sci.*, 1 (4) :109—113.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S, 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 28 (10) :2731—2739.
- Tholl D, 2006. Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 9 (3) :297—304.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG, 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic. Acids Res.*, 25 (24) : 4876—4882.
- Visser JH, 1986. Host odor perception in phytophagous insects. *Annu. Rev. Entomol.*, 31:121—144.
- Wu KM, Lu YH, Feng HQ, Jiang YY, Zhao JZ, 2008. Suppression of cotton bollworm in multiple crops in China in areas with Bt toxin-containing cotton. *Science*, 321 (5896) : 1676—1678.
- 葛晓萍, 石琰璟, 2007. 一种适合富含多糖、多酚植物的 RNA 提取方法. 青岛科技大学学报 (自然科学版), 28 (1) :6—8.
- 孙晓玲, 陈宗懋, 2010. 虫害诱导植物挥发物的生态功能及应用 // 孔垂华, 姜永根主编. 化学生态学前沿. 北京:高等教育出版社. 110—142.
- 于惠林, 张永军, 孙国军, 郭予元, 高希武, 2006. 棉铃虫天敌中红侧沟茧蜂 *Microplitis mediator* 对不同处理棉花的趋性行为反应. 应用与环境生物学报, 12 (6) :809—813.