

QIANJINZHONGDE YUNNANNONGYE SHENGWUJISHU YANJIUYUYINGYONG

前进中的云南农业生物技术研究与应用 ——云南省农业生物技术重点实验室

论文选集

1994. 10 ~ 2004. 10

顾 问

张敖罗 吴自强

樊永言 郑伟军

编委会主任

黄兴奇

编委会成员

唐开学 张仲凯

程在全 李成云

许明辉 鄢 波

寸守铄 赵永昌

云南科技出版社

前进中的云南农业生物技术研究与应用
—— 云南省农业生物技术重点实验室

论文选集

1994. 10 — 2004. 10

顾 问

编委会主任

编委会成员

张敖罗

樊永言

黄兴奇

唐开学

程在全

许明辉

寸守铨

吴自强

郑伟军

张仲凯

李成云

鄢 波

赵永昌

图书在版编目 (CIP) 数据

前进中的云南农业生物技术研究与应用——云南省农业
生物技术重点实验室论文选集/云南省农科院生物技术与
种质资源研究所编. —昆明: 云南科技出版社,
2004.10

ISBN 7-5416-2071-8

I. 前... II. 云... III. 农业技术: 生物技术—云
南省—文集 IV. S188-53

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2004) 第 108755 号

云南科技出版社出版发行

(昆明市环城西路 609 号云南新闻出版大楼 邮政编码: 650034)

云南地质矿产局印刷厂印刷 全国新华书店经销

开本: 889mm × 1194mm 1/16 印张: 36 字数: 1000 千字

2004 年 10 月第 1 版 2004 年 10 月第 1 次印刷

印数: 1 ~ 1000 定价: 80.00 元

内容简介

本书是云南省近年来在农业生物技术研究领域取得的进展和成果的代表作。内容涉及主要农经作物的生物技术研究各个环节，从功能基因的识别分离到基因转化应用，内容丰富，涵盖面广，展示了生物技术在农业科学研究方面的先驱性、开拓性作用。本书共有 6 部分：第一部分介绍了植物功能基因（如抗病、抗虫、花色控制基因）的识别，文库构建和分离克隆的研究结果；第二部分介绍了水稻、花卉、马铃薯、烟草等作物上的基因表达载体构建，农杆菌或基因枪法介导的基因转化和转基因后的功能分析；第三部分介绍了应用电镜技术、ELISA 技术，以及分子手段相结合对植物病毒的鉴定，分子病理的研究结果；第四部分介绍了菌物分子生物学的研究结果；第五部分介绍了生物技术应用用于油菜、花卉、水稻等作物育种的研究方法和取得的结果；第六部分介绍了应用生物技术对云南省一些资源生物的研究情况。论文还涉及到一些新方法的摸索和技术体系的建立。

本书可供从事生物技术、分子生物学、育种、资源鉴定评价科研人员，以及有关大中专院校生物学的教师、学生、研究生参考。

序 言

20 世纪 90 年代初，为加速云南科技进步，云南省委、省政府决定建设省级重点实验室和中试基地。在重要学科和主要产业领域构建开放式的公共研发平台，按照“开放、流动、联合、竞争”的运行机制，围绕科技产业发展的需求，加速科学和技术体系建设，加快人才培养，为重点产业的跨越式发展提供技术支撑。

重点实验室和中试基地建设十余年来，取得了一批在国内外有重大影响的科技成果，使云南的科技发展水平得到明显提高，增强了竞争力，培养了一大批学术技术带头人。实践证明，云南省委、省政府关于重点实验室和中试基地建设的决策是正确的，具有前瞻性的。

云南省农业生物技术重点实验室，1992 年经云南省人民政府批准，依托云南省农业科学院建设，于 1994 年 10 月建成验收，是云南省第一个建成验收的重点实验室，也是全国省级农业科学院系统最早建立的专业从事农业生物技术研发的科研机构。十年来，在上级各有关部门和国内外合作单位的关心支持下，实验室在曲折中不断向前发展。1998 年，根据云南省人民政府关于开展省院省校合作的决定，与北京大学植物基因工程、蛋白质工程国家重点实验室结缘，共建“北京大学—云南省农业生物技术联合实验室”；2002 年，通过农业部考核评估，成为“农业部南方高原农业生物技术重点开放实验室”；同年与云南大学、中科院昆明分院等单位共同申报成为“国家生命科学和技术人才培养基地”；2003 年，与云南大学合作申报并获准生物化学与分子生物学硕士和博士学位点；2004 年，获云南省高新技术重点实验室提升改造专项支持，并与美国贝克曼库尔特曼有限公司共建“基因测序联合实验室”，使实验室的装备不断完善，研发能力得到进一步提高。

实验室投入运转以来，累计承担国家及云南省各类科技项目 90 余项，其中国家自然科学基金 11 项，国家和云南省其他重大科技项目等 80 余项。建立了覆盖面广、配套衔接的农业生物技术主要领域的研究实验技术体系，在农业基因工程、细胞工程、分子植物病理、特色种质资源的生物技术评价与创新领域形成了初步的特色和优势。实验室累计发表研究论文 580 余篇（SCI 收录 20 多篇），出版专著 5 部（科学出版社 2 部），申报专利 14 项，获得授权 5 项；选育农作物新品种 10 余个，科技成果累计示范推广 1500 多万亩，新增经济效益 25 亿元以上，为科技扶贫、农民增收致富作出了重要贡献。同时与中国科学院、云南大学、云南农业大学等单位开展了联合培养博士、硕士研究生工作，实验室自身人才队伍建设取得重要进展，先后有 8 人成为云南省中青年学术带头人。

本论文集从众多论文中精选 105 篇，从一个重要的侧面反映了云南省农业生物技术研究各个领域的发展进程。在重要功能基因的分离克隆技术体系建立、基因识别定位与分离克隆、农作物基因工程育种、农作物细胞工程育种、植物病毒的系统诊断鉴定、稻瘟病菌的分子生物学研究、农作物和菌物资源的遗传特性评价与创新等方面展示了现代生物技术在云南农业产业发展研究中的应用。

本论文集的出版，凝聚了全科室科技人员的心血，反映了他们永攀科技高峰和刻苦攻关的精神，也是国家和云南省以及合作单位对本实验室长期支持的结晶。

值此实验室建成 10 周年之际，感谢各有关部门、有关专家多年来对本实验室的关心和支持，感谢各合作单位的精诚合作。

书中错误之处难免，敬请同行批评指正。

云南省农业生物技术重点实验室 黄兴奇

2004 年 10 月 20 日

目 录

一、基因和基因片段克隆、文库构建

美洲商陆核基因组抗病毒蛋白基因的克隆及序列分析	赵 扬等 (3)
美洲商陆一种抗真菌蛋白的 cDNA 克隆及序列分析	鄢 波等 (7)
Cloning and Sequence Analysis of Disease Resistance Gene Analogues from Three Wild Rice Species in Yunnan.	刘继梅 程在全 黄兴奇等 (10)
稻瘟病菌细菌人工染色体 (BAC) 基因组文库的构建	周晓罡 李成云等 (19)
水稻中编码甘油 - 3 - 磷酸转酰酶部分 cDNA 的克隆及序列分析	刘继梅等 (23)
烟草渗调蛋白基因的分离克隆及序列分析	鄢 波等 (27)
烟草野火病毒毒素的抗性基因的克隆及序列分析	张绍松 鄢 波等 (29)
云南烟草花叶病毒外壳蛋白基因的分离克隆及序列分析	王 芳 鄢 波等 (34)
不同花色矮牵牛中细胞色素 b5 编码基因的克隆及序列分析 ...	刘继梅 鄢 波 郑丽屏等 (39)
控制花色的细胞色素 P450 基因的 cDNA 克隆及限制性内切酶图谱分析	鄢 波等 (40)
用保守氨基酸区段序列分离克隆几种云南高原作物 <i>GPAT</i> 基因 cDNA 片段	鄢 波等 (43)
简并引物在 PCR 扩增甘油 - 3 - 磷酸转酰酶基因中的应用	刘继梅等 (45)
苦参凝集素蛋白基因的分离克隆	马志刚等 (49)
枯草芽孢杆菌 β -1, 3-1, 4- 葡聚糖酶基因 (<i>bglS</i>) 在酵母菌中的克隆与表达	黄兴奇 宋大新等 (55)

二、基因转化、表达和遗传分析

外源 DNA 导入水稻西南 175 引起的性状变异	宋令荣 黄兴奇等 (63)
Tobacco matrix attachment region sequence increased transgene expression levels in rice plants.	程在全等 (69)
基因枪法和农杆菌介导法对水稻转基因拷贝数和基因重排概率的影响	程在全等 (82)
Development of Dehydration - Stress - Tolerant Transgenic Rice Plants, and a Method to Generate a Superior Insertion - Mutant Library for Identifying Gene Functions	程在全等 (92)
Wheat LEA genes, PMA80 and PMA1959, enhance dehydration tolerance of transgenic rice (<i>Oryza sativa</i> L.)	程在全等 (94)
绿色荧光蛋白基因作为报告基因在水稻基因转化中的应用研究	程在全 丁玉梅 曾黎琼等 (108)
高效抗虫基因 <i>PinII</i> 转化水稻的研究	丁玉梅 曾黎琼等 (118)

农杆菌介导的水稻转 Bt 基因研究	张伟媚	程在全等	(126)
提高农杆菌介导法将 <i>Pin</i> II 杀虫基因导入滇型水稻的转化效率	曾黎琼	丁玉梅等	(133)
几丁质酶 - 葡聚糖酶双价基因导入滇型杂交稻恢复系提高稻瘟病抗性的研究			
.....	许明辉	唐祚舜等	(140)
转溶菌酶基因水稻稻瘟病抗谱分析	许明辉	唐祚舜等	(147)
抗生素 G418 胁迫条件下转基因水稻种子发芽特性及应用	许明辉	唐祚舜等	(154)
甘蓝型油菜双低品种抗病毒遗传转化的研究	万 萌	寸守铄等	(159)
抗芜菁花叶病毒转基因甘蓝型油菜的研究	卢爱兰	寸守铄等	(163)
$\Delta 12$ - 脂肪酸去饱和酶 (<i>fad2</i>) 基因的突变对油菜叶片表面结构和透性的影响			
.....	王敬乔等		(169)
油菜转几丁质酶、 β -1, 3- 葡聚糖酶基因的研究	李根泽等		(178)
油菜高效转基因平台及无选择基因转化	王敬乔等		(186)
利用云南自然条件建立油菜高效小孢子培养技术及育种体系	寸守铄等		(195)
抗烟草花叶病毒 (TMV) 转基因烟草的初步选育	吕华飞	何云昆等	(201)
表达 <i>Harpin_{Ea}</i> 基因的转基因马铃薯的晚疫病抗性分析	李先平	何云昆等	(203)
通过农杆菌介导把 <i>Harpin_{Ea}</i> 基因导入马铃薯的初步研究	李先平	何云昆等	(212)
用 PDS - 1000/He 型基因枪将外源基因质粒 pZFX ₂ 导入小麦细胞的研究	曾黎琼等		(218)
外源基因质粒 pZFX ₂ 导入小麦半原生质体的研究	程在全等		(222)
几种基因转移技术在小麦上的应用	曾黎琼	程在全等	(228)
番茄转基因受体系统的研究	张绍松等		(233)
人促红细胞生成素基因在番茄中的表达	贺竹梅	曹 俊	黄兴奇等 (238)
反义 ACC 合成酶基因导入番茄的研究	曾黎琼	张绍松等	(242)
Molecular Cloning and Expression of <i>bacillua subtilis bgl</i> S Gene in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>			
.....	陈永青	黄兴奇等	(248)
枯草芽孢杆菌 <i>bglS</i> 基因在酵母染色体上整合	张绍松	陈永青等	(253)
将重组质粒高效导入农杆菌的电脉冲转化研究	杨 明	黄兴奇等	(259)
大肠杆菌 <i>ppsA</i> 基因的克隆表达	柴红梅	赵永昌等	(263)
人血管内皮抑素基因的克隆及其在质核中的表达	吴成军	叶力建等	(267)

三、植物病毒鉴别和病毒分子生物学研究

云南主要鲜切花感染病毒状况研究初报	张仲凯	方 琦等	(275)
马铃薯病毒病原种类电镜研究初报	张仲凯	李云海等	(277)
马铃薯脱毒组培苗的免疫电镜检测研究	张仲凯	李云海等	(279)
马铃薯脱毒组培苗的电镜检测研究	张仲凯	方 琦等	(282)
<i>Tobacco curly shoot virus</i> isolated in Yunnan is a distinct Species of <i>Begomovirus</i>			
.....	谢 艳	张仲凯	李正和等 (283)
粉虱传双生病毒的 TAS - ELISA 及 PCR 快速检测	谢 艳	张仲凯	李正和等 (289)
粉虱传双生病毒在云南的发生分布	张仲凯	丁 铭	方 琦等 (294)
Characterization of DNA β associated with begomoviruses in China and evidence for co - evolution with their cognate viral DNA - A	Xueping Zhou	Yan Xie	Xiaorong Tao
	Zhongkai Zhang		(296)

<i>Malvastrum yellow vein virus</i> , a new <i>Begomovirus</i> species associated with satellite DNA molecule	Xueping Zhou Yan Xie Yan Peng Zhongkai Zhang (309)
赛葵黄脉病毒: 一种含有卫星 DNA 的双生病毒新种	周雪平 彭 燕 谢 艳 张仲凯 (316)
与烟草曲叶病毒伴随的新型 DNA 分子鉴定	谢 艳 李正和 张仲凯等 (323)
Identification of a novel DNA molecule associated with <i>Tobacco leaf curl virus</i>	谢 艳 周雪平 张仲凯等 (329)
烟草主要病毒病的细胞病理研究	张仲凯等 (336)
侵染烟草的番茄斑萎病毒 (TSWV) 电镜诊断鉴定	张仲凯等 (341)
应用电子显微镜技术检测云南省烟草病毒病原	张仲凯 李彦刚等 (343)
云南省滇南地区观察到急性蜜蜂麻痹病毒	张仲凯等 (345)
电镜技术在植物病毒交互保护研究中的应用	张仲凯 方 琦等 (346)
毒疫苗 CMV - S52 的抗病毒机理	张仲凯等 (349)
应用电镜技术研究植物病毒复合感染	张仲凯等 (352)
大花蕙兰 (<i>Cymbidium faberi</i>) 花叶病原的电镜诊断	丁 铭 方 琦等 (354)
南瓜主要病毒病的细胞病理观察	方 琦等 (356)

四、菌物分子生物学研究

稻瘟病菌无毒基因的分子标记	李成云等 (361)
Mapping Avrulence Gene in the Rice Blast Fungus <i>Magnaporth grisea</i> with RAPD markers	李成云等 (366)
稻瘟病菌八个组合后代菌株对楚梗 3 号的致病性遗传分析	李成云 李进斌 周晓昱等 (371)
稻瘟病菌基因组中微卫星序列的频率和分布	李成云 李进斌 周晓昱等 (376)
Analysis of Resistant Spectrum to Rice Blast in Transgenic Rice Lines Introduced Lysozyme Gene from T4 Phage.	许明辉 李成云 李进斌 谭学林等 (385)
Inheritance of resistance to rice stripe virus in rice line BL 1	Kazuo Ise Cheng yun Li et al (393)
转几丁质酶 - 葡聚糖酶基因水稻稻瘟病抗谱分析	许明辉 李成云等 (402)
稻瘟病菌基因组中微卫星序列的频率和分布	李成云等 (408)

五、生物技术育种和植物组织培养

通过茎尖分生组织离体培养获得马铃薯脱毒试管苗	李云海 何云昆等 (419)
马铃薯脱毒原种繁殖技术	李云海等 (424)
脱毒马铃薯试管苗剪尖扦插无土繁殖研究	吴毅歆等 (427)
芥菜型油菜花药培养诱导花粉胚状体的研究	寸守铤 万 萌等 (431)
芥菜型油菜 (<i>Brassica juncea</i>) 游离体细胞培养及细胞无性系的建立	寸守铤 邱仕芳等 (435)
用花药培养和转基因技术进行油菜遗传改良的研究	李根泽等 (439)
BREEDING A CHIEVEMENTS OF <i>Brassica napus</i> BY BIOTECHNOLOGICAL MEANS IN YUNNAN	寸守铤 李根泽 王敬乔等 (442)

用 EMS 诱变和小孢子培养快速获得甘蓝型油菜高油酸种质材料的研究	和江明等 (444)
情人草的组织培养快速繁殖技术	郑丽屏 张小雷等 (448)
蝴蝶兰的组织培养快速繁殖技术	郑丽屏等 (451)
提高小麦体细胞诱导出胚性愈伤组织的方法研究	程在全等 (453)
白魔芋不同外植体的组培和分化条件初探 (简报)	吴毅歆 谢庆华 (458)

六、资源生物的遗传特性研究、发掘和创新

稻瘟病菌有性世代及色素的基因表达分析	李成云等 (463)
Preliminary Study on the Relationship between the <i>Indica</i> - <i>Japonica</i> Differentiation of Parents and Heterosis in Dian Type Hybrid Rice by RAPD Markers	龙雯虹 许明辉 张树华 (467)
籼稻和粳稻品种在 RAPD 上的遗传差异	龙雯虹 许明辉 (478)
Genetic diversity among and within populations of <i>Oryza granulata</i> from Yunnan of China revealed by RAPD and ISSR markers: implications for conservation of the endangered species	吴成军 程在全等 (482)
云南省 3 种作物品种 RAPD 指纹图谱的构建	熊华斌 吴渝生 程在全 (493)
珍稀濒危植物——云南药用野生稻自然生态群的新发现及其特性	程在全 黄兴奇等 (499)
云南五个不同地区烟草花叶病毒外壳蛋白基因的序列比较	丁 铭 方 琦等 (507)
粗糙脉孢菌基因组中的微卫星序列的组成和分布	李成云等 (511)
云南 3 种野生稻中抗病基因同源序列的克隆及序列分析	刘继梅 程在全等 (522)
云南野生稻不同染色体组型和外植体材料的离体培养研究	丁玉梅等 (532)
云南稻种对水稻白叶枯病抗性的评价	钱 君等 (539)
马铃薯 RAPD 分析方法优化初探	李先平 何云昆等 (549)
导致云南马铃薯品种中甸红退化的 PVX 分离物提纯及鉴定	张仲凯 魏春红等 (556)
Studies on Genetic Improvemnt of <i>Brassica napus</i>	李根泽 寸守铤等 (561)
云南兰花生物技术的商品化开发	郑丽屏 王剑文 (564)

一、基因和基因片段 克隆、文库构建

美洲商陆核基因组抗病毒蛋白基因的 克隆及序列分析*

赵 扬 鄢 波 张绍松 赵永昌 黄兴奇

(云南省农业生物技术重点实验室, 昆明 650223)

摘 要 通过 PCR 扩增, 从美洲商陆 (*Phytolacca americana*) 核基因组中克隆了商陆抗病毒蛋白基因, 序列分析表明, 该基因含 885 个核苷酸, 与已报道的序列比较, 核苷酸同源性为 99.3%。

关键词 抗病毒 基因 克隆 美洲商陆

Cloning and Sequencing Analysis of the Antiviral Protein Gene from Genome of *Phytolacca americana*

ZHAO Yang YAN Bo ZHANG Shao - Song

ZHAO Yong - Chang HUANG Xing - Qi

(Agricultural Biotechnology Laboratory of Yunnan, Kunming 650223)

Abstract The antiviral protein gene was amplified from genomic DNA of *Phytolacca americana* by polymerase chain reaction. After cloning into BamHI sites of p GEM - T, the fragment was subcloned into pUC18 and then sequenced on Pharmacia A. L. F auto - sequencer. The results indicated that the cloned fragment contained 885 nucleotides, and shared a sequence homology of 99.3% with that of the reported.

Key words Antiviral Gene Cloning *Phytolacca americana*

美洲商陆抗病毒蛋白 (*Pokeweed Antiviral Protein*, *PAP*), 目前国外已报道了 3 种: 即从商陆成熟种子中分离纯化出的抗病毒蛋白 s - PAP (Kung *et al*, 1990); 来自商陆生长期叶片 cDNA 编码的抗病毒蛋白 c - PAP (Lin *et al*, 1991); 以及商陆核基因组编码的抗病毒蛋白 α - PAP。三者之间氨基酸同源性达 74%, 是核糖体抑制蛋白, 具有广谱抗病毒活性 (Kataoka *et al*, 1992)。Jennifer 等 (1993) 报道了转 c - PAP 基因烟草的广谱抗病毒活性, 研究表明, c - PAP 转基因烟草对虫媒及机械磨擦传播的 CMV、PVX、PVY 病毒具有明显的抗性 (Jennifer *et al*, 1993), 这表明商陆抗病毒基因在作物基因工程抗病育种中是十分有价值的。目前国内对以上 3 种商陆抗病毒蛋白基因的分离克隆及分子生物学研究工作尚未见报道。为此, 我们从美洲商陆中克隆了其核基因组编码的 α - PAP 基因, 并拟将其导入云南烟草优良品种中, 以期利用基因工程手段选育广谱抗病

* 云南植物研究, 1998, 20 (1): 67 ~ 70

毒的烟草品种。

1 材料和方法

1.1 材料

美洲商陆 (*Phytolacca americana*) 材料取自中国科学院昆明植物研究所引种栽培品种。按 Brian 等 (1984) 的方法从生长期叶中进行小量总 DNA 的制备。Taq DNA 聚合酶购自中国科学院遗传研究所; p GEM-T 载体系统购自 Promega; 质粒提取试剂盒, DNA 纯化试剂盒购自 Qiagen; DNA 测序试剂盒购自 Pharmacia; 其他酶及试剂购自华美生物工程公司。

1.2 PCR 引物

根据 Kataoka 等 (1992) 报道的序列设计引物, 两个引物的 5' 端引入 BamHI 位点。

I : 5' - CT 2GGATCCATGAAGATGATGGTGGTGGTTGTTGT - 3'

BamHI

II : 5' - CT 2GGATCCTTATAGGTGAGGGAACATGGCACTTT - 3'

BamHI

引物由云南省农业生物技术重点实验室合成。

1.3 PCR 扩增

以美洲商陆总 DNA 为模板, 进行预变性, 建立 50 μ L PCR 反应体系, 含 100 mmol/L Tris-HCl (pH9.0), 500 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L Mg-Cl₂, 0.2mmol/L dNTP, 20 μ mmol/L 引物, 模板 DNA 50~100ng, 1.5 单位 Taq 酶。反应条件为: 93 $^{\circ}$ C 1 min, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 35 个循环后延伸 7 min。

1.4 PCR 产物的克隆

PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳分离, 回收并纯化后直接连接到 p GEM-T 载体系统, 转化 *E. coli* DH5a 菌株, 在含氨苄青霉素及 X-gal 平皿上筛选白色菌落酶切鉴定重组转化子。

1.5 DNA 序列分析

克隆到的商陆 α -PAP 基因经 BamHI 和 EcoRI 双酶切亚克隆到 pUC18 载体上, 利用 Pharmacia AutoReadTM Sequencing 试剂盒在 Pharmacia A.L.F 自动测序仪上进行 DNA 序列测定。

2 结果和讨论

2.1 美洲商陆抗病毒蛋白 α -PAP 基因克隆

琼脂糖凝胶电泳分析表明 PCR 产物大小约 900 bp (图 1), 与预期 α -PAP 基因片段大小相符。PCR 产物回收后直接克隆到 pGEM-T 载体

上, 经 EcoRI/XbaI, BamHI 酶切分析, 确证克隆片段与报道的 α -PAP 基因酶切图谱相同 (图 2)。

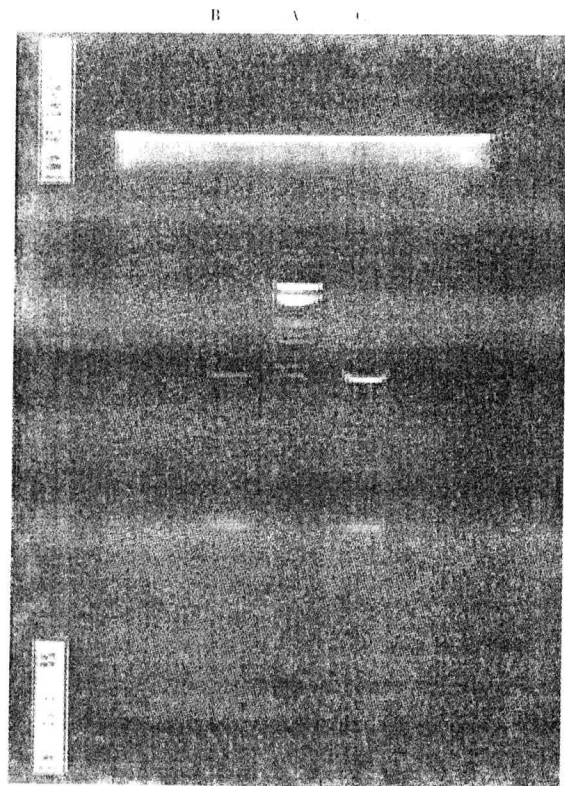


图 1 α -PAP 基因的 PCR 扩增

Fig.1 PCR amplification of α -PAP gene

A. λ DNA EcoRI-HindIII digestion as DNA ladder; B, C. PCR products

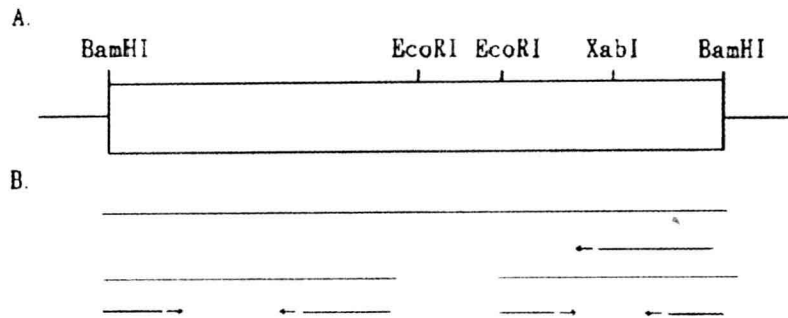


图 2 α -PAP 基因的物理图谱及测序策略

Fig.2 Physical map and sequencing strategy of α -PAP gene

A. Physical map of α -PAP gene;

B. Sequencing strategy of α -PAP gene Lines show 2 subclones and whole α -PAP gene; arrows indicate sequencing direction

```

(a) ATG AAG ATG ATG GTG GTG GTT GTT GTG ATG ATG TTA TCA TGG 42
(b) -----
CTC ATT CTT AAA CCA CCT TCA ACT TGG GCC ATA AAT ACA ATC ACC 87
-----
TTG GAT GTT GCA AAT GCA ACC ATT AAC AAG TAT GCC ACC TTT ATG 132
-----
AAA TGG ATT CAT AAT CAA GCG AAA GAT CCC ACC CTG AAG TGC TAT 177
-----
GGC ATA CCA ATG TTG CCC AAT ACT AAT TTG ACT CCC AAG TAC TTG 222
-----
TTG GTT ACG CTC CAA GAT TCA AGT TTA AAA ACA ATC ACA CTA ATG 267
-----
CTG AAG CGA AAC AAC TTG TAT GTG ATG GGC TAT GCT GAC ACC TAT 312
-----
AAT GGC AAG TGT CGT TAT CAT ATA TTT AAG GAT ATC TCA AAT ACT 357
-----
ACT GAA CGA AAT GAT GTG ATG ACT ACT CTT TGC CCA AAT CCG AGT 402
-----
TCT CGT GTT GGT AAA AAT ATT AAC TAT GAT AGC AGT TAT CCA GCA 447
-----
TTG GAA AAG AAA GTA GGA CGA CCA AGA AGT CAA GTC CAA CTC CGA 492
-----
ATT CAA ATA CTC AAC AGT GGC ATT GGA AAG ATC TAT GGA GTG GAT 537
-----
TCA TTC ACT GAG AAA ACT GAA GCC GAA TTC CTG TTA GTA GCC ATC 582
-----
CAA ATG GTT TCA GAG GCA GCG TGG TTC AAG TAC ATA GAA AAT CAG 627
-----
GTG AAG ACT AAT TTT AAT AGA GCA TTC TAC CCT AAT GCC AAA GTA 672
-----
CTT AAC TTG GAG GAG AGT TGG GGT AAG ATC TCT ACG GCG ATT CAC 717
-----
AAT GCC AAG AAT GGG GCT TTA ACC AGT CCT CTA GAG CTA AAA AAT 762
-----
GCA AAC GGT AGC AAG TGG ATA GTG CTG AGA GTG GAT GAT ATC AAA 807
-----
CCT GAT GTG GGA CTC CTT AAG TAC GTT AAT GCG ACC TGC CAG GCA 852
-----
ACT TAC CAA AGT GCC ATG TTC CCT CAC CTA TAA 886
    
```

图 3 美洲商陆 (云南材料) 中 α -PAP 基因序列 (a) 及与已报道的序列 (b) 的比较

Fig.3 Sequence of α -PAP gene of *Phytolacca americana* (from Yunnan) (a) and its comparison with the reported data (b) underlined regions show primers for PCR

2.2 美洲商陆抗病毒蛋白 α -PAP 基因序列分析

将克隆到 p GEM-T 载体上的 α -PAP 基因片段通过 EcoRI 和 BamHI 双酶切后亚克隆到 pUC18

载体上,同时亦将完整的 α -PAP基因转克隆到pUC18载体上,按图2所示策略进行测序。序列分析结果表明;扩增到的 α -PAP基因与Kataoka等(1992)报道的序列比较,核酸同源性达99.3% (图3)。

目前我们正利用 α -PAP基因结合云南优良烟草栽培品种抗病育种进行转基因研究,这项工作具有十分重要的意义。

致谢 美洲商陆材料由中国科学院昆明植物所胡忠先生惠赠,商陆总DNA的制备得到胡运乾先生的技术帮助。

参考文献

- [1] Brian T, Ann P, 1984. Isolation of Plant DNA and RNA. FOCUS, 4 (3): 4~6
- [2] Jennifer K L, Wojciech K K, Nilgun E T, 1993. Broad-spectrum Virus Resistance in Transgenic Plants Expressing Pokeweed Antiviral Protein. Proc Natl Acad Sci USA, 90: 7089~7093
- [3] Kung S S, Kimura M, Funatsu G, 1990. The Complete Amino Acid Sequence of Antiviral Protein from the Seeds of Pokeweed (*Phytolacca americana*). Agric Biol Chem, 54 (12): 3301~3318
- [4] Kataoka J, Noriyuki H, Chikara M, et al, 1992. Isolation and Analysis of a Genomic Clone Encoding a Pokeweed Protein. Plant Mol Biol, 20 : 879~885
- [5] Lin Q, Chen Z C, Antoniow J F, et al, 1991. Isolation and Characterization of a cDNA Clone Encoding the Anti-viral Protein from *Phytolacca americana*. Plant Mol Biol, 17: 609~614

美洲商陆一种抗真菌蛋白的 cDNA 克隆及序列分析*

鄢 波¹ 马志刚¹ 黄兴奇¹ 王铃仙¹ 胡 忠²

(1. 云南省农科院生物技术研究所, 昆明 650223; 2. 中国科学院昆明植物研究所, 昆明 650204)

摘 要 根据美洲商陆 (*Phytolacca americana*) 种子中一种抗真菌蛋白 PAFP (Hu et al, 1991) 的 N 端部分氨基酸顺序, 设计、合成一条 5' 端寡核苷酸引物, 通过 3' - RACE 技术从种子总 RNA 扩增出一约 350 bp 的 cDNA 片段, 成功地克隆到 p GEM - T 载体系统中。序列分析表明该 cDNA 含有 114 bp 的编码区, 由此推导的 38 个氨基酸序列有 36 个与 PAFP 的序列相同, 仅在第 35、第 36 位氨基酸分别由 Cys、Lys 替代了后者的 Gln 和 Ile。114bp 的编码序列也被克隆。该 cDNA 可能编码一种新的 38 个氨基酸的抗真菌蛋白。

关键词 美洲商陆 抗真菌蛋白 基因克隆

cDNA Cloning and Sequencing of an Antifungal Protein from the Seeds of *Phytolacca americana*

YAN Bo¹ MA Zhi - Gang¹ HUAN G Xing - Qi¹ WAN G Ling - Xian¹ HU Zhong²

(¹ Yunnan Provincial Laboratory of Agricultural Biotechnology, Kunming 650223)

(² Kunming Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204)

Abstract Basing on the amino acid sequences of 7 kD antifungal protein from *Phytolacca americana* (Hu Zhong et al, 1991), We designed a pair of degenerated primers. By using 3' - RACE technique, we have amplified a cDNA fragment about 350 bp from the total RNA of the seeds of *Phytolacca americana*. PCR product was cloned into p GEM - T vectoy system directly, and the cDNA sequences was then determinated. The results indicated that the cDNA fragment contains an encoding region about 114 bp, and that the deduced amino acid sequences is the same as the 36 amino acids of the PAFP protein, except the two amino acids of the No. 35 and No. 36, at which Gln and Ile is replaced by Cys and Lys respectively. In addition, the encoding region was cloned. The cDNA may encode a new antifungal protein of 38 amino acids.

Key words *Phytolacca americana* Antifungal protein cDNA cloning

昆明植物研究所首次从美洲商陆 (*Phytolacca americana*) 种子中分离获得一种 7 kD 抗真菌蛋白 (Huet al, 1991), 该蛋白含有 64 个氨基酸, 体外抑菌试验表明对棉枯萎镰刀菌、木霉、圆锥羊肚菌等多种真菌的生长有明显的抑制作用。我们在分离克隆该蛋白基因编码序列的研究过程

* 云南植物研究, 1998, 20 (3): 276 ~ 278