



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110257407 B

(45) 授权公告日 2023.04.28

(21) 申请号 201910611164.0

(22) 申请日 2019.07.08

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 110257407 A

(43) 申请公布日 2019.09.20

(73) 专利权人 东北林业大学

地址 150040 黑龙江省哈尔滨市香坊区和
兴路26号

(72) 发明人 王峰 陈俏丽 王佳楠 李丹蕾

(74) 专利代理机构 哈尔滨华夏松花江知识产权

代理有限公司 23213

专利代理师 侯静

(51) Int. Cl.

C12N 15/56 (2006.01)

C12N 9/24 (2006.01)

A01N 57/16 (2006.01)

A01P 5/00 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 109402171 A, 2019.03.01

CN 1260001 A, 2000.07.12

CN 101680001 A, 2010.03.24

CN 101617050 A, 2009.12.30

US 2010180352 A1, 2010.07.15

陈照天等. Bx-daf-2 与 Bx-tre-1 协同调控
海藻糖促进松材线虫低温抗逆.《湖南农业大学
学报(自然科学版)》.2020, 21-27.

Zhenkai Liu et al.. Cold adaptive
potential of pine wood nematodes
overwintering in plant hosts.《Biology
Open》.2019, 1-8.

黄瑞芬等. 湖北三峡地区松材线虫的耐寒
性.《东北林业大学学报》.2014, 138-141.

陈俏丽等. 高渗透压胁迫下水稻干尖线虫
Ab-tre 基因表达.《中国农学通报》.2018, 141-
146.

审查员 毛舒燕

权利要求书1页 说明书4页

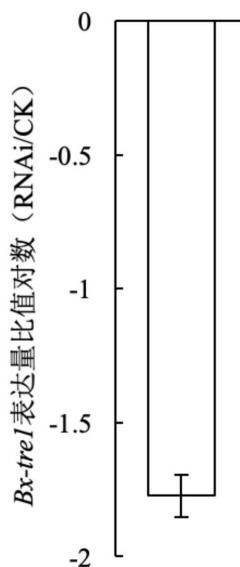
序列表3页 附图2页

(54) 发明名称

一种海藻糖酶基因Bx-tre1及其应用

(57) 摘要

一种海藻糖酶基因Bx-tre1及其应用, 它涉及一种海藻糖酶基因Bx-tre1及其应用。本发明的目的是为了解决松材线虫抗逆态幼虫可进入变渗隐生状态在高渗透压环境下存活, 从而导致松材线虫蔓延的问题。本发明应用在松树病害防治上。海藻糖酶基因的核苷酸序列如序列表Seq ID No: 1所示。本发明通过基因沉默降低海藻糖酶基因在松材线虫雄虫中的表达量, 可有效降低海藻糖酶酶活, 阻断海藻糖代谢路径, 从而显著降低松材线虫雄虫在高渗透压胁迫下的存活率, 进而抑制有性繁殖, 本发明应用于松材线虫防治领域。



1. 一种海藻糖酶基因*Bx-tre1*, 其特征在于该基因的核苷酸序列如序列表Seq ID No:1所示, 长度为1413 bp。

2. 沉默权利要求1所述的海藻糖酶基因*Bx-tre1*的试剂在松材线虫防治上的应用。

3. 根据权利要求2所述的应用, 其特征在于松材线虫防治是指通过海藻糖酶基因*Bx-tre1*影响松材线虫的有性繁殖。

4. 根据权利要求3所述的应用, 其特征在于影响松材线虫有性繁殖的方式为: 通过基因沉默降低海藻糖酶基因*Bx-tre1*在松材线虫雄虫中的表达量, 从而降低海藻糖酶酶活, 阻断海藻糖代谢路径, 进而阻断松材线虫雄虫通过变渗隐生度过高渗透压环境, 降低松材线虫雄虫在高渗透压胁迫下的存活率, 最终抑制松材线虫的有性繁殖。

5. 根据权利要求4所述的应用, 其特征在于基因沉默的方法为: 采用浓度为3 mg/mL的dsRNA浸泡法处理松材线虫雄虫6-48 h。

6. 根据权利要求5所述的应用, 其特征在于构建dsRNA的引物组为:

合成正义链RNA上游引物*Bx-tre1-TTF*的核苷酸序列如序列表Seq ID No.4所示;

合成正义链RNA下游引物*Bx-tre1-iR*的核苷酸序列如序列表Seq ID No.5所示;

合成反义链RNA上游引物*Bx-tre1-iF*的核苷酸序列如序列表Seq ID No.6所示;

合成反义链RNA下游引物*Bx-tre1-T7R*的核苷酸序列如序列表Seq ID No.7所示。

一种海藻糖酶基因Bx-tre1及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种海藻糖酶基因Bx-tre1及其应用。

背景技术

[0002] 松材线虫 (*Bursaphelenchus xylophilus*) 引起松树萎蔫病 (pine wilt disease), 从北美传入东亚后已危害日本、中国和韩国松林近半个世纪, 造成巨大的经济损失。该线虫的生活史复杂, 适应环境的能力较强, 目前已逐步向北方寒冷地区扩散。寒冷地区松树适应低温环境, 为防止由于树体含水量过高而冻裂, 树木新陈代谢在秋季开始减慢, 树体含水量下降, 渗透压急剧上升, 不利于松材线虫存活。但对大连和抚顺地区越冬的松材线虫采样调查表明, 松材线虫可通过进入变渗隐生状态在高渗透压环境下存活, 进而成功越冬。松材线虫进入变渗隐生状态时, 新陈代谢趋于停滞, 当外界环境适宜时, 新陈代谢又恢复正常。因此, 阻断松材线虫通过变渗隐生度过高渗透压环境, 可成为防治该线虫的新方法。

发明内容

[0003] 本发明的目的是为了解决松材线虫抗逆态幼虫可进入变渗隐生状态在高渗透压环境下存活, 从而导致松材线虫蔓延的问题, 提供一种海藻糖酶基因Bx-tre1及其应用。

[0004] 本发明一种海藻糖酶基因Bx-tre1的核苷酸序列如序列表Seq ID No:1所示, 长度为1413bp。

[0005] 本发明海藻糖酶基因Bx-tre1应用在松树病害防治上。

[0006] 海藻糖 (trehalose) 是一种非还原性二糖 (α -D-吡喃葡萄糖基- α -D-吡喃葡萄糖苷), 具有极强的吸水性可作为渗透保护剂, 在保护线虫细胞膜结构的完整性和防止蛋白质变性方面起重要作用。海藻糖酶 (trehalase) 是唯一专一性地将海藻糖水解为葡萄糖的水解酶。海藻糖酶可与激素协同作用, 调控生物体内海藻糖和葡萄糖等糖类物质的浓度, 以保护体内细胞, 使生物适应并度过相应的逆境环境。因此, 海藻糖酶是海藻糖代谢中的关键酶。对松材线虫各个虫龄海藻糖酶基因表达量测定中发现, 雄虫的海藻糖酶基因 (Bx-tre1) 的表达量显著高于其它虫龄。若通过对Bx-tre1进行基因沉默, 阻断雄虫通过变渗隐生度过高渗透压环境, 则可有效抑制松材线虫的有性繁殖, 为防治该线虫提供新思路。

[0007] 本发明的有益效果是:

[0008] 本发明的海藻糖酶基因在松材线虫雄虫中表达量显著高于其它虫龄, 表明该基因对于松材线虫雄虫至关重要。通过基因沉默降低该基因在松材线虫雄虫中的表达量, 可有效降低海藻糖酶酶活, 阻断海藻糖代谢路径, 从而降低松材线虫雄虫在高渗透压胁迫下55%-60%的存活率, 进而抑制有性繁殖, 在防治松材线虫中具有重要的应用价值。

附图说明

[0009] 图1为实施例1中Q-PCR技术检验Bx-tre1基因沉默效果图;

[0010] 图2为实施例1中分别对松材线虫进行Bx-tre1基因沉默处理与对照处理后,海藻糖酶活和海藻糖含量对比图;

[0011] 图3为实施例1中分别对松材线虫进行Bx-tre1基因沉默处理与对照处理后,进行高渗透压胁迫时松材线虫存活率对比图。

具体实施方式

[0012] 具体实施方式一:本实施方式一种海藻糖酶基因Bx-tre1的核苷酸序列如序列表Seq ID No:1所示,长度为1413bp。

[0013] 本实施方式的海藻糖酶基因在松材线虫雄虫中表达量显著高于其它虫龄,表明该基因在松材线虫雄虫中起到重要作用。通过基因沉默降低该基因在松材线虫雄虫中的表达量,可有效降低海藻糖酶活,阻断海藻糖代谢路径,从而降低松材线虫雄虫在高渗透压胁迫下55%-60%的存活率,进而抑制有性繁殖,在防治松材线虫中具有重要的应用价值。

[0014] 具体实施方式二:本实施方式与具体实施方式一不同的是:构建海藻糖酶基因Bx-tre1的上游引物的核苷酸序列如序列表Seq ID No:2所示;下游引物的核苷酸序列如序列表Seq ID No:3所示。其他与具体实施方式一相同。

[0015] 具体实施方式三:本实施方式海藻糖酶基因Bx-tre1应用在松树病害防治上。

[0016] 具体实施方式四:本实施方式与具体实施方式三不同的是:海藻糖酶基因Bx-tre1在松材线虫防治上的应用。其他与具体实施方式三相同。

[0017] 具体实施方式五:本实施方式与具体实施方式三或四不同的是:在松材线虫防治上是指通过海藻糖酶基因Bx-tre1影响松材线虫的有性繁殖。其他与具体实施方式三或四相同。

[0018] 具体实施方式六:本实施方式与具体实施方式三至五之一不同的是:影响松材线虫有性繁殖的方法为:通过基因沉默降低海藻糖酶基因Bx-tre1在松材线虫雄虫中的表达量,从而降低海藻糖酶活,阻断海藻糖代谢路径,进而阻断松材线虫雄虫通过变渗隐生度过高渗透压环境,降低松材线虫雄虫在高渗透下胁迫下的存活率,最终降低松材线虫的有性繁殖。其他与具体实施方式三至五之一相同。

[0019] 具体实施方式七:本实施方式与具体实施方式三至六之一不同的是:基因沉默的方法为:采用浓度为3mg/mL的dsRNA浸泡法处理松材线虫雄虫6-48h。其他与具体实施方式三至六之一相同。

[0020] 具体实施方式八:本实施方式与具体实施方式三至七之一不同的是:构建dsRNA的引物组为:

[0021] 合成正义链RNA上游引物Bx-tre1-TTF的核苷酸序列如序列表Seq ID No.4所示;

[0022] 合成正义链RNA下游引物Bx-tre1-iR的核苷酸序列如序列表Seq ID No.5所示;

[0023] 合成反义链RNA上游引物Bx-tre1-iF的核苷酸序列如序列表Seq ID No.6所示;

[0024] 合成反义链RNA下游引物Bx-tre1-T7R的核苷酸序列如序列表Seq ID No.7所示。

[0025] 其他与具体实施方式三至七之一相同。

[0026] 具体实施方式九:本实施方式与具体实施方式三至八之一不同的是:海藻糖酶基因Bx-tre1 Q-PCR检测的引物组为:

[0027] 上游引物Bx-tre1-qF:如序列表Seq ID No.8所示,下游引物Bx-tre1-qR:如序列

表Seq ID No.9所示。其他与具体实施方式三至八之一相同。

[0028] 通过以下实验验证本发明的效果:

[0029] 实施例1:海藻糖酶基因Bx-tre1的获得及其功能验证:

[0030] (一)RNA抽提及cDNA合成:

[0031] DEPC处理水清洗松材线虫雄虫,离心去水后,液氮下研磨。取研磨粉末,应用TRIzol法(Invitrogen,cat.No.15596-026)提取总RNA。DEPC处理水溶解RNA后,应用AMV反转录系统(Promega,cat.No.A3500),以Oligo(dT)₁₈为引物,合成第一链cDNA。根据试验手册,应用随机引物法合成第二链cDNA。

[0032] (二)松材线虫海藻糖酶基因Bx-tre1完整阅读框克隆

[0033] 根据转录组测序结果合成松材线虫海藻糖酶基因Bx-tre1引物组:

[0034] Bx-tre1-F:5`-GAT CAA GAA TGC GCC GGA AC-3`,

[0035] Bx-tre1-R:5`-TGG AAC ACC TCC ATC TTC GC-3`。

[0036] 以cDNA为模板进行完整阅读框序列的PCR扩增(TaKaRar-Taq酶50μL反应体系:94℃30s,58℃1min,72℃1min,进行35个循环),扩增得到全长为1413bp的序列,其核苷酸序列如列表中的SEQ ID No:1所示,送生物公司测序,验证后命名为Bx-tre1。

[0037] (三)Bx-tre1基因沉默

[0038] 以松材线虫雄虫cDNA为模板,应用引物组:

[0039] Bx-tre1-T7F:5`-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC ACA ACC TCC ACT TCT CGC T-3`,

[0040] Bx-tre1-iR:5`-TCG CTA AAA GCC CCC TTC AA-3`

[0041] 进行PCR扩增生产正义链模板。

[0042] 应用引物组:

[0043] Bx-tre1-iF:5`-CAC AAC CTC CAC TTC TCG CT-3`,

[0044] Bx-tre1-T7R:5`-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC TCG CTA AAA GCC CCC TTC AA-3`

[0045] 进行PCR扩增生产反义链模板。应用MEGAscript® RNAi试剂盒合正义链与反义链RNA,经退火生产dsRNA。蒸馏水稀释dsRNA浓度至3mg/mL,采用dsRNA浸泡法处理松材线虫雄虫12h,以蒸馏水相同时间为对照(CK)。

[0046] 处理后一部分线虫用于提取RNA,反转录后应用Stratagene Mx3000P qPCR system(Agilent,USA)和GoTaq 2-Step RT-qPCR System试剂盒进行Q-PCR扩增。

[0047] 应用引物组:

[0048] Bx-tre1-qF:5`-TCC AAT ATC GCG CCG ATT CA-3`,

[0049] Bx-tre1-qR:5`-GCC AAA CTC AGC TTG TCT GC-3`

[0050] 进行Q-PCR扩增,使用2步法PCR,第一步:预变性95℃3min。第二步:95℃30s,58℃1min,72℃30s共40个循环。融解曲线测定从55℃到95℃。

[0051] 应用松材线虫28s rRNA基因引物组:

[0052] Bx-28s-qF:5`-CAG CTT TGT GGA GAC GTG G-3`,

[0053] Bx-28s-qR:5`-GAA GAA CGC AGA GCA CAC C-3`

[0054] 进行Q-PCR扩增作为对照,验证RNAi效果。对Q-PCR扩增采用相对定量法计算次重

复试验初始模板量比值,两配对样本t检验 $p < 0.01$,差异显著。结果如图1所示, RNAi后Bx-tre1表达量显著下降。RNAi后海藻糖酶酶活显著下降,海藻糖酶含量增高,结果如图2所示。

[0055] 另一部分线虫用于饱和硫酸镁溶液浸泡进行高渗透压处理,每天随机选取30条雄虫测定存活率,每个试验重复三次,持续7天。结果如图3所示,图中黑色柱为对照组, RNAi后松材线虫雄虫在高渗透压胁迫1天后全部死亡,对照组线虫存活率无明显变化。说明松材线虫海藻糖酶基因Bx-tre1沉默,对该线虫雄虫抗高渗透压能力起到显著影响。通过降低雄虫数量,可显著减少有性繁殖,从而有效降低线虫数量,因此对松材线虫雄虫Bx-tre1进行基因沉默后,再对其进行高渗透压胁迫可为该线虫的防治提供思路。

- [0001] 序列表
- [0002] <110>东北林业大学
- [0003] <120>一种海藻糖酶基因Bx-tre1及其应用
- [0004] <160>9
- [0005] <210> 1
- [0006] <211> 1413
- [0007] <212> DNA
- [0008] <213>松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus*
- [0009] <400> 1
- [0010] atgtggagat ttcagcaaa ttccaccact gcggaagatc acattcccgc cagtttcaaa 60
- [0011] gtcgaccaaa tcgaaggcct tcaactatgct tgtgacaaca ccaccgcacc ccaaaaccac 120
- [0012] ttcatctact gttcggggcg catccttcaa gccgtgcaag ctttcaaact ctttgaggac 180
- [0013] tccaagactt tcgtcgacaa acctatgaaa tacagcccat tagaagtttt gcaaaagttt 240
- [0014] gaggagcgat ttccagagga tgagaacata acaaaggagg ctcttcaaga attcgtcgat 300
- [0015] gagaactttg aagggacgtg ccacgaatta gctgactgtg aattagaaga ttggaatccg 360
- [0016] aaccaccaaa gcttcaaaga cattgccaat caagactact tcaaatgggc cacgggtttg 420
- [0017] aacgatatct ggaagaaatt gtgccgtaaa atgaaccccg agatcaagaa tgcgccggaa 480
- [0018] cgctactcac tgatctacgt ggaacatccg ttcgtcgttc caggcgggcg attccgagag 540
- [0019] ttctactatt gggactctta ttgaccatc aagggttgc tagtgtcagg aatgtacaaa 600
- [0020] actgtagaac acatgcttat gaactttgct agcatggttag aacaatatgg catgattccg 660
- [0021] aacggaggga gagtetacta tttgacgcgt tcacaacctc cacttctcgc tggaatgttt 720
- [0022] ttggaatact ataaagcgag cggaacaaaa aaattcgttg agaaatactt gccagtcttg 780
- [0023] gaaaaggaat ttcaattctg gaacagctct cgtagagttag atgtcaaact aaaatccggg 840
- [0024] gaaaccact ccgtcttcca atatcgcgcc gattcagatg cccaagacc agaatcctc 900
- [0025] agagaggacg tcgagattat caaacaactc acctccgatt cgaagaagaa gacgggtctg 960
- [0026] aaggatctgg cttctgccgc tgaatctggtc tgggatttca gcagtcgttg gttcgcagac 1020
- [0027] aagctgagtt tggcaacat cgagacaacg aatgtttgtc cagtcgactt gaacgcgtac 1080
- [0028] atctgttga atctgaagat cttgcgacaa tttcacgatg agatttcagg gaacaaggag 1140
- [0029] aaggttgacc aatttgaaa attgcttgat gctcaccgca gcgctcttca agctgtcttc 1200
- [0030] ttcgltgaca acgagaatca aacaggatgg tttgactaca atctgaggtc ggaggtgcac 1260
- [0031] aattttgaat tctaccccag ttccgtaact ccgttgttca caaaagtgtt cgaaaatctt 1320
- [0032] gggcccgaga tggaagagaa aatctacaac aacatgaagt tgaagggggc ttttagcgaa 1380
- [0033] gatggagggtg ttccaacaag gtatcttaaa tga 1413
- [0034] <210> 2
- [0035] <211> 20
- [0036] <212> DNA
- [0037] <213>人工序列
- [0038] <220>
- [0039] <223>PCR引物Bx-tre1-F的核苷酸序列。
- [0040] <400> 2
- [0041] gatcaagaat gcgccgaac 20

- [0042] <210> 3
[0043] <211> 20
[0044] <212> DNA
[0045] <213>人工序列
[0046] <220>
[0047] <223>PCR引物Bx-tre1-R的核苷酸序列。
[0048] <400> 3
[0049] tggaacacct ccatcttcgc 20
[0050] <210> 4
[0051] <211>40
[0052] <212> DNA
[0053] <213>人工序列
[0054] <220>
[0055] <223>PCR引物Bx-tre1-TTF的核苷酸序列。
[0056] <400> 4
[0057] taatacgact cactataggg cacaacctcc acttctcgct 40
[0058] <210> 5
[0059] <211> 20
[0060] <212> DNA
[0061] <213>人工序列
[0062] <220>
[0063] <223>PCR引物Bx-tre1-iR的核苷酸序列。
[0064] <400> 5
[0065] tcgctaaaag ccccttcaa 20
[0066] <210> 6
[0067] <211> 20
[0068] <212> DNA
[0069] <213>人工序列
[0070] <220>
[0071] <223>PCR引物Bx-tre1-iF的核苷酸序列。
[0072] <400> 6
[0073] cacaacctcc acttctcgct 20
[0074] <210>7
[0075] <211> 41
[0076] <212> DNA
[0077] <213>人工序列
[0078] <220>
[0079] <223>PCR引物Bx-tre1-T7R的核苷酸序列。
[0080] <400> 7
[0081] taatacgact cactataggg ctcgctaaa gccccctca a 41
[0082] <210>8
[0083] <211> 20

- [0084] <212> DNA
- [0085] <213>人工序列
- [0086] <220>
- [0087] <223>PCR引物Bx-tre1-qF的核苷酸序列。
- [0088] <400> 8
- [0089] tccaatatcg cgccgattca 20
- [0090] <210>9
- [0091] <211> 20
- [0092] <212> DNA
- [0093] <213>人工序列
- [0094] <220>
- [0095] <223>PCR引物Bx-tre1-qR的核苷酸序列。
- [0096] <400> 9
- [0097] gccaaactca gcttgtctgc 20

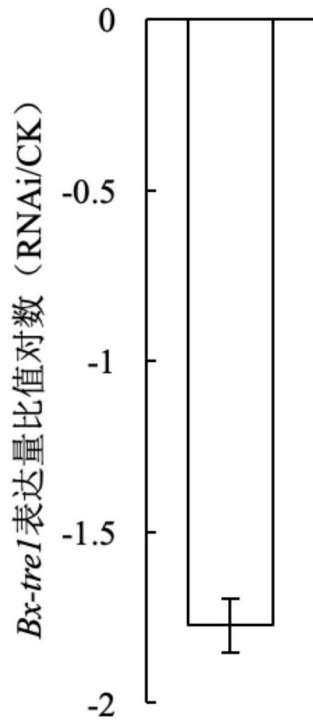


图1

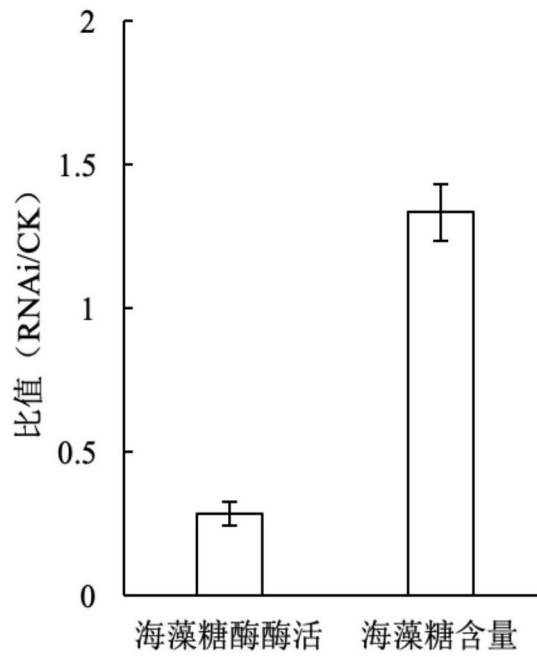


图2

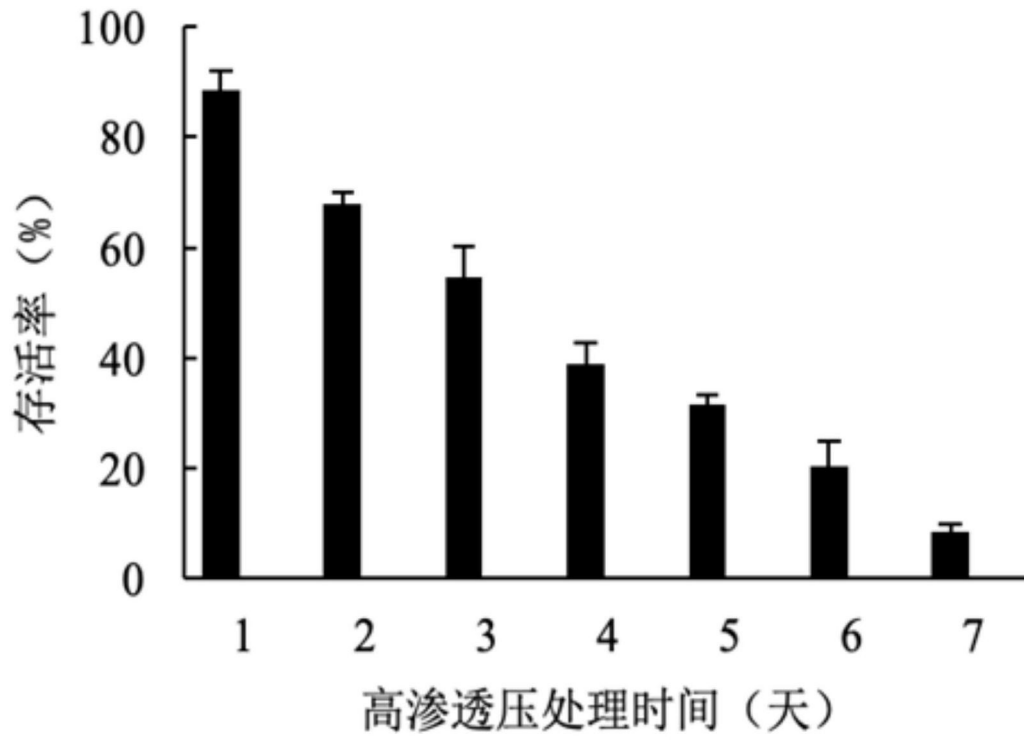


图3