

西藏一种芥菜型油菜 PGIP 基因的克隆与序列分析

庞 博, 刘何春

(西藏自治区农牧科学院农业研究所, 拉萨 850032)

摘要 防治油菜菌核病的有效方法是培育抗菌核病的油菜品种。多聚半乳糖醛酸酶阻遏蛋白 (polygalacturonase inhibiting protein, PGIP), 是植物体内一种重要的抗真菌蛋白。本研究根据 NCBI 中发表的 PGIP 基因序列设计引物, 从芥菜型油菜‘藏油 6 号’中克隆得到全长 1 048 bp 的 PGIP 基因序列。其核酸序列与 NCBI 数据库中登录的 PGIP 基因序列同源性为 99%。该序列翻译后得到的氨基酸序列与 NCBI 上公布的油菜 PGIP 序列同源性为 99%。该蛋白质序列中包含 8 个亮氨酸重复区 (leucine-rich repeat, LRR)。过去研究结果显示芥菜型油菜比甘蓝型、白菜型油菜对菌核病的抗性普遍较高, 但是未能搞清楚具体的原因, 只是提出抗菌核病基因主要分布在芥菜型油菜中, 其次是甘蓝型油菜中。通过研究证实了芥菜型油菜上 PGIP 基因具有保守性、疏水性, 而且结构稳定, 具有多个信号肽, 能够高效地发挥其抗核盘菌的功能。今后在油菜育种上应利用芥菜型油菜的优势, 发挥其抗病育种的潜力。

关键词 芥菜型油菜; PGIP 基因; 基因克隆; 生物信息学

中图分类号: S435.654 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2017204

Cloning and bioinformatic analysis of PGIP gene from *Brassica juncea* in Tibet

PANG Bo, LIU Hechun

(Institute of Agricultural Sciences, Tibet Academy of Agricultural and Animal Husbandry Science, Lhasa 850032, China)

Abstract The best way to prevent Sclerotinia is to cultivate varieties against Sclerotinia. PGIP is an important anti-Sclerotinia protein. The full-length of PGIP CDS (1 048 bp) was cloned from *Brassica juncea* No. 6 in Tibet based on sequence homology, showing 99% similarity with PGIP from *B. napus*. The protein sequence contained 8 LRRs (leucine-rich repeats). Previous studies showed that *B. juncea* had higher resistance to *S. sclerotiorum* than *B. napus* and *B. campestris*, but the underlying mechanism was unknown, though it was known that *S. sclerotiorum* genes were mainly distributed in *B. juncea*. The PGIP gene in *B. juncea* is conservative, hydrophobic, and stable in structure with several signal peptides, which has the potential for resistance to *S. sclerotiorum* and disease resistance breeding.

Key words *Brassica juncea*; PGIP gene; gene cloning; bioinformatics

油菜是我国最主要的油料作物, 油菜菌核病是危害我国油菜生产的常见病害, 对油菜的产量和品质造成严重的影响, 选育抗菌核病油菜品种是防控菌核病最经济有效的途径。油菜菌核病的病原菌为核盘菌 *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, 该菌分泌产生的多聚半乳糖醛酸酶 (polygalacturonase, PG) 可降解植物细胞壁, 参与多个植物致病信号的传递, 是病原真菌重要的致病因子^[1]。多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白 (polygalacturonase inhibiting

proteins, PGIPs) 是一种植物细胞壁糖蛋白, 它能抑制真菌所分泌的 PG 水解植物细胞壁的活性, 并在植物体内积累能激活多种防御反应, 从而抑制真菌的侵染^[2-4]。此外, PGIP 与 PG 的相互作用使植物细胞壁形成有生物活性的寡聚半乳糖醛酸 (oligogalacturonide, OG), 能有效地激活植物体内的防御系统, 从而诱导植物的抗病性响应, 使植物获得系统抗病性^[2,5-6], 维护了植物细胞的完整性, 使病原真菌可利用的营养物质减少, 减缓了真菌生长繁殖速度^[7]。

芥菜型油菜 *Brassica juncea* L. 是中国重要的油料作物之一,在我国西部地区广泛种植,芥菜型油菜具有耐热、耐贫瘠、抗旱等特点^[8]。目前甘蓝型油菜 PGIP 基因的研究较多^[1,9-10],但是芥菜型油菜 PGIP 基因的研究还未见报道,本研究目的是通过对菌核病有一定抗性的芥菜型油菜 PGIP 基因进行克隆和生物学分析,为油菜抗菌核病育种提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 植物材料

材料选择在大田种植对菌核病表现有抗性的芥菜型油菜‘藏油 6 号’。

1.2 仪器与试剂

S1000 Thermal Cycler PCR 扩增仪、台式冷冻离心机、SIGMA1-14 小型离心机、琼脂糖凝胶成像系统、高压灭菌锅、恒温水浴锅、超净工作台、摇床,北京六一电泳槽、电泳仪。TaKaRa *Ex Taq* DNA 聚合酶、10×*Ex Taq* Buffer (20 mmol/L Mg²⁺ plus)、dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L)、TaKaRa MiniBEST Plant Genomic DNA 提取试剂盒、TaKaRa 凝胶回收试剂盒、TaKaRa AgaroseD-5 琼脂糖凝胶、100 bp DNA Ladder (Dye Plus)、GoldView 核酸染料、酵母提取物、TaKaRa 6×Loading Buffer。有机试剂均为化学分析纯。

1.3 试验方法

1.3.1 油菜 DNA 的提取及 PGIP 基因的克隆

采用 CTAB 法提取油菜总 DNA。根据 NCBI 上已经公布的油菜 PGIP 基因序列设计引物 Pf/Pr, Pf: TCATCTCCCTAACCATAT, Pr: GTATTTCG-TCCTTATTCTTC,引物由北京华大公司合成。Pf/Pr 的目的片段长度为 1 048 bp,编码全长的 PGIP 基因。以提取的油菜总 DNA 为模板进行 PCR 扩增。反应体系(25 μL): ddH₂O 16 μL; 10×PCR Buffer (Mg²⁺ Plus) 3 μL; dNTP(各 2.5 mmol/L) 2 μL; 上游和下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μL; *Taq* DNA 聚合酶(5 U/μL) 1 μL; DNA Templet 2 μL。将 PCR 管内的反应液用枪头轻轻吹打混匀,用小型离心机瞬时离心 1 次,放置于 PCR 仪进行扩增,PCR 反应参数:94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s; 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min; 35 次循环; 72℃ 终末延伸 10 min。通过琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,并将剩余产物保存于 4℃ 冰箱。

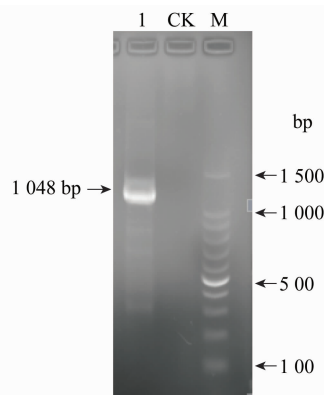
1.3.2 PCR 产物的回收、测序、核酸序列分析及其蛋白结构分析和预测

回收 1.3.1 所得的 PCR 产物并送交华大基因公司进行测序。使用 NCBI BLAST 分析 PCR 产物序列的同源性,并对核酸序列进行结构功能上的分析,推导其氨基酸序列。使用软件 DNASTAR 对其氨基酸序列进行分析,确定其分子量、等电点、各氨基酸在蛋白中的比例,以及各种极性氨基酸、带电氨基酸、疏水性氨基酸的组成。使用 SignalP 4.1 Server 对 PGIP 氨基酸序列进行信号肽分析。使用 ProtScale 软件预测蛋白质分子的疏水性和亲水性。通过 ProtComp Version 9.0 软件预测 PGIP 蛋白的亚细胞定位,使用在线分析软件 SOPMA 和 Swiss-Model 分析预测蛋白的二、三级结构。

2 结果与分析

2.1 PCR 结果分析与比对

以芥菜型油菜 DNA 作为 PCR 反应模板进行扩增,结果显示,引物 Pf/Pr 扩增出 1 048 bp 的目的条带(图 1)。



M: 100 bp DNA Marker; 1: Pf/Pr 的扩增产物; CK: 空白对照
M: 100 bp DNA Marker; 1: PCR product by Pf/Pr; CK: Negative control

图 1 PCR 扩增健康芥菜型油菜中 PGIP 基因

Fig. 1 PCR amplification of PGIP gene from *Brassica juncea*

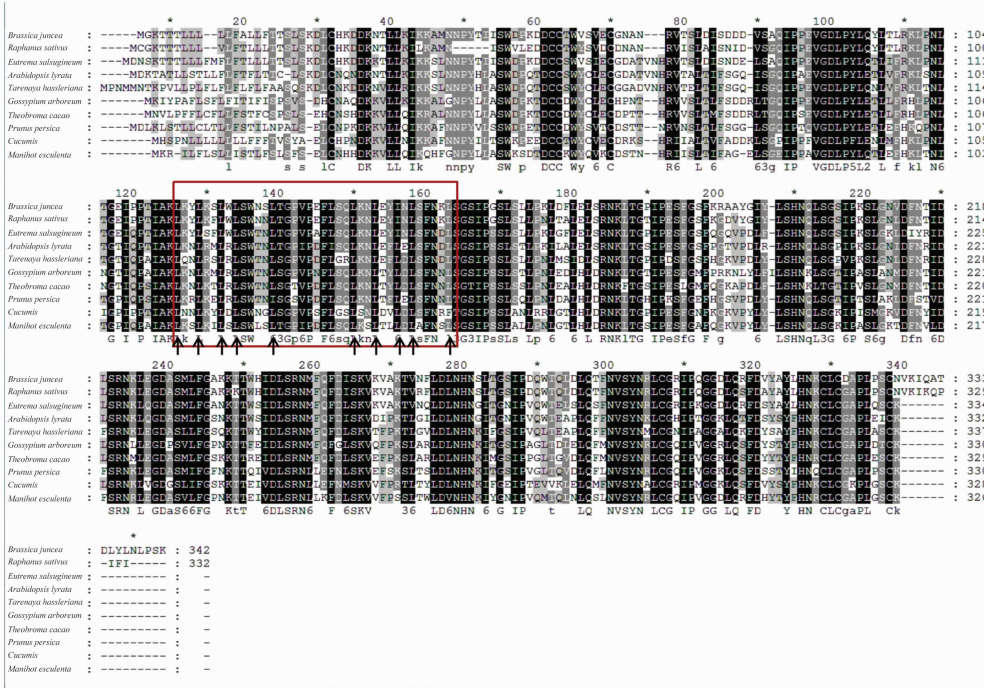
2.2 BLAST 分析结果

扩增得到 1 048 bp 长度的 PGIP 序列,将测序得到的核酸序列与 NCBI 数据库中登录号为 EU142023.1 的序列进行 BLAST 比对,同源性为 99%。根据 PCR 产物推导出的氨基酸序列与 NCBI 上公布的甘蓝型油菜 *Brassica napus* (NP_001303064) 序列同源性为 99%。

将该段序列与其他 9 种植物上的 PGIP 蛋白序列进行比对,结果显示与不同种属植物深山拟南芥 *Arabidopsis lyrata*、醉蝶花 *Tarenaya hassleriana*、山

葵 *Eutrema salsugineum*、棉花 *Gossypium*、可可 *Theobroma cacao*、李 *Prunus persica*、萝卜 *Raphanus sativus*、黄瓜属 *Cucumis* 和木薯 *Manihot esculenta* 的相似度分别为 70%、67%、82%、63%、65%、62%、68%、60%、61%。由 PCR 产物推导出的该段氨基酸序列富含亮氨酸重复序列,PGIP 的亮氨酸重复结构域(LRR)保守性很高,其除个别碱基替换、插入或

缺失外,序列高度保守(图 2)。用 BLAST2GO 对该段富含亮氨酸的序列进行功能分析(表 1),结果表明,这段亮氨酸重复区包含酪氨酸激酶受体、细胞黏附分子,毒力因子和细胞外基质结合蛋白,表明该蛋白很可能参与了细胞的信号转导、细胞黏附、细胞膜通道、细胞凋亡、细胞免疫反应等多种生物功能。



红色标记区为亮氨酸重复区

The red box indicates the LRR conserved sequence of PGIP protein sequence

图 2 芥菜型油菜 PGIP 与其他种属植物 PGIP 氨基酸序列比对

Fig. 2 Comparison of PGIP amino acid sequences between *Brassica juncea* and other species

表 1 PGIP 基因序列功能分析

Table 1 Functional analysis of PGIP gene sequences

GO term	名称 Name	Prob	SVM reliability	GO term	名称 Name	Prob	SVM reliability
GO:0007166	细胞表面受体信号通路	0.819	H	GO:0019538	蛋白质代谢过程	0.921	L
GO:0043413	大分子的糖基化	0.777	H	GO:0048856	解剖结构形态	0.854	L
GO:0019222	代谢过程的调控	0.756	H	GO:0007165	信号传导	0.842	L
GO:0006508	蛋白水解	0.730	H	GO:0051716	细胞对刺激的反应	0.833	L
GO:0006955	免疫反应	0.720	H	GO:0007275	多细胞发育	0.798	L
GO:0002376	免疫系统过程	0.700	H	GO:0006807	氮代谢过程	0.762	L
GO:0016192	囊泡运输	0.673	H	GO:0032502	发育进程	0.757	L
GO:0002682	免疫系统的调节过程	0.660	H	GO:0023052	发信号	0.737	L
GO:0005975	碳水化合物代谢过程	0.596	H	GO:0048513	器官发育	0.731	L
GO:0009056	分解代谢过程	0.535	H	GO:0050790	催化活性的调节	0.711	L
GO:0009101	糖蛋白的生物合成过程	0.521	H	GO:0007154	细胞通讯	0.705	L
GO:0002684	免疫系统的过程正调控	0.514	H	GO:0009893	代谢过程的正调控	0.701	L
GO:0006952	防御反应	0.512	H	GO:0009653	解剖结构形态	0.686	L
GO:0050896	对刺激的反应	0.937	L	GO:0030154	细胞分化	0.677	L
GO:0008152	代谢过程	0.937	L				

2.3 软件 DNASTar 对 PGIP 蛋白氨基酸序列分析结果

扩增得到的 PGIP 基因编码的蛋白包含 342 个氨基酸(表 2),其理论分子量为 38.2 kDa,等电点为 8.2。pH 为 7 时,电荷为 4.5,碱性氨基酸(KR)36 个,占总分子量 12.7%,占残基总数的 10.53%。酸性氨基酸(DE)32 个,占总分子量的 9.91%,占氨基酸残基总数的 9.36%,疏水氨基酸(AILFWV)119 个,占总分子量的 35.65%,占氨基酸残基总数 34.8%,极性氨基酸(NCQSTY)108 个,占总分子量的 30.76%,占氨基酸残基总数的 31.58%。其中亮氨酸的比例最高,占总分子量的 16.25%,占氨基酸残基总数 16.08%。氨基酸序列的理化性质分析表明,PGIP 蛋白为稳定类蛋白。

表 2 PGIP 蛋白氨基酸序列组成

Table 2 Amino acid sequence composition of PGIP

氨基酸 Amino acid	数量 Number	占总分子量的	
		百分比/% Ratio of molecular weight	频率/% Frequency
酸性氨基酸 Acidic(DE)	32	9.91	9.36
碱性氨基酸 Basic(KR)	36	12.70	10.53
极性氨基酸 Polar(NCQSTY)	108	30.76	31.58
疏水氨基酸 Hydrophobic(AILFWV)	119	35.65	34.80
丙氨酸 Ala(A)	13	2.41	3.80
半胱氨酸 Cys(C)	8	2.16	2.34
天冬氨酸 Asp(D)	24	7.21	7.02
谷氨酸 Glu(E)	8	2.70	2.34
苯丙氨酸 Phe(F)	14	5.38	4.09
甘氨酸 Gly(G)	18	2.68	5.26
组氨酸 His(H)	5	1.79	1.46
异亮氨酸 Ile(I)	18	5.32	5.26
赖氨酸 Lys(K)	27	9.04	7.89
亮氨酸 Leu(L)	55	16.25	16.08
甲硫氨酸 Met(M)	4	1.37	1.17
天冬酰胺 Asn(N)	24	7.15	7.02
脯氨酸 Pro(P)	20	5.07	5.85
谷氨酰胺 Gln(Q)	11	3.68	3.22
精氨酸 Arg(R)	9	3.67	2.63
丝氨酸 Ser(S)	32	7.28	9.36
苏氨酸 Thr(T)	22	5.81	6.43
缬氨酸 Val(V)	13	3.37	3.80
色氨酸 Trp(W)	6	2.92	1.75
酪氨酸 Tyr(Y)	11	4.69	3.22

2.4 SignalP 4.1 Server 对 PGIP 氨基酸序列信号肽分析结果

信号肽一般位于蛋白质的 N 端,与蛋白的定位

有关,有助于蛋白本身向细胞内特定区域移动,在蛋白质合成结束之前被切除,一般具有 16~26 个氨基酸残基,其中包括疏水核心区、信号肽的 C 端和 N 端。通过 SignalP 4.1 Server 分析表明,PGIP 蛋白上有 22 个氨基酸属于信号肽。这些信号肽可以引导 PGIP 顺利的合成、加工、运输到特定位置行使功能^[11-12]。

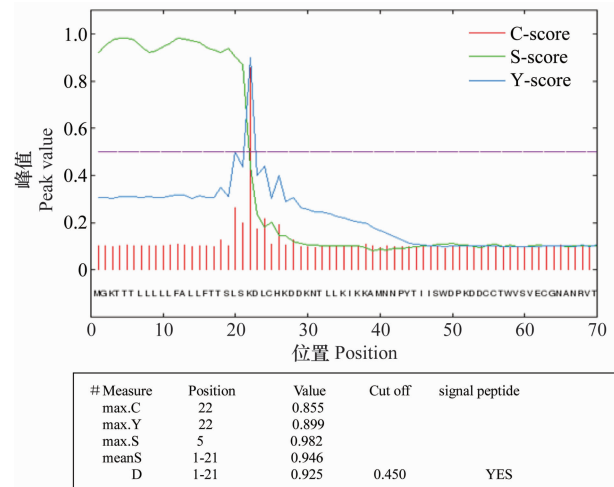


图 3 信号肽分析

Fig. 3 Signal peptide analysis

2.5 PGIP 蛋白的亲水性和疏水性分析

使用在线软件 ProtScale 预测蛋白质分子的亲水性和疏水性(图 4)^[13]。通常根据蛋白平均疏水值(GRAVY)来计算蛋白的亲水性和疏水性。GRAVY 值在 3~-2 之间,横坐标为蛋白质氨基酸残基的序号,纵坐标表示残基的疏水亲水的特性。若是正值表明此蛋白为疏水蛋白,且值越大越疏水,若是负值表明为亲水蛋白,值越大越亲水。从 ProtScale 工具统计分析的结果,GRAVY 值为 +0.45(最小值:-2.127,最大值:3.027),说明蛋白具有较强的疏水性,且在 N 末端有一典型的疏水区域。疏水性在蛋白质的结构、构象及与其他蛋白质的相互作用等方面具有重要作用,并且被认为与蛋白质的功能性性质密切相关。PGIP 的疏水性与蛋白质间的相互作用、形成蛋白功能结构域、维持 PGIP 蛋白质三级结构及信号肽的组成有关。

2.6 PGIP 蛋白亚细胞定位

通过 ProtComp Version9.0 软件预测 PGIP 蛋白的亚细胞定位,4 种预测方法(LocDB、NEuralNes、Pentames、Integral)权重值最高值均显示是胞外,由此将此蛋白定位于胞外,说明该蛋白是由细胞分泌到胞外并与 PG 结合,保护植物细胞壁不被降解(表 3)。

表 3 PGIP 蛋白亚细胞定位

Table 3 Subcellular localization of PGIP protein

定位权重 Location weight	LocDB	PotLocDB	NEuralNes	Pentames	Integral
细胞核 Nucleus	0.0	0.0	0.02	0.00	0.01
质膜 Plasma membrane	3.5	0.0	0.05	0.42	3.65
胞外 Extracellular	6.5	0.0	2.65	1.75	6.25
胞质 Cytoplasm	0.0	0.0	0.12	0.00	0.00
线粒体 Mitochondrion	0.0	0.0	0.05	0.13	0.03
内质网 Endoplasmic reticulum	0.0	0.0	0.04	0.24	0.00
过氧化物酶体 Peroxisome	0.0	0.0	0.00	0.13	0.00
高尔基体 Golgi	0.0	0.0	0.02	0.06	0.00
叶绿体 Chloroplast	0.0	0.0	0.05	0.64	0.00
液泡 Vacuole	0.0	0.0	0.00	0.00	0.05

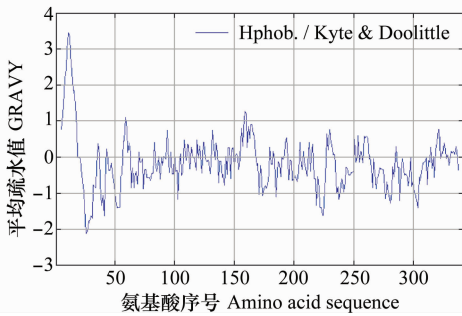


图 4 PGIP 蛋白的亲水性和疏水性分析

Fig. 4 PGIP protein hydrophilicity and hydrophobicity analysis

2.7 PGIP 蛋白二、三级结构分析

使用软件 SOPMA 对其二级结构进行分析^[14]。

结果显示 PGIP 氨基酸序列显示在二级结构中主要由 29.53% 的 α 螺旋 22.8% 的延伸链区和 41.8% 的无规则卷曲构成,凸面结构主要是无规则卷曲,第 90 个氨基酸出现“LxxLxxLxLxxLxxL”对称序列(图 5),芥菜型油菜 PGIP 具有 8 个亮氨酸重复序列(图 6),LRR 被认为是参与了 PG 蛋白质与 PGIP 蛋白相互识别和相互作用的区域^[15-16]。这样的序列保证了芥菜型油菜 PGIP 的功能,使其在与 PG 互作时能保持较高的活性和稳定性。使用 Swiss-Model 预测蛋白三级结构,三级结构是由 α 螺旋和延伸链通过 Loop 环连接形成一个马蹄形分子(图 7)。



图 5 PGIP 蛋白二级结构分析

Fig. 5 Analysis of secondary structure of PGIP

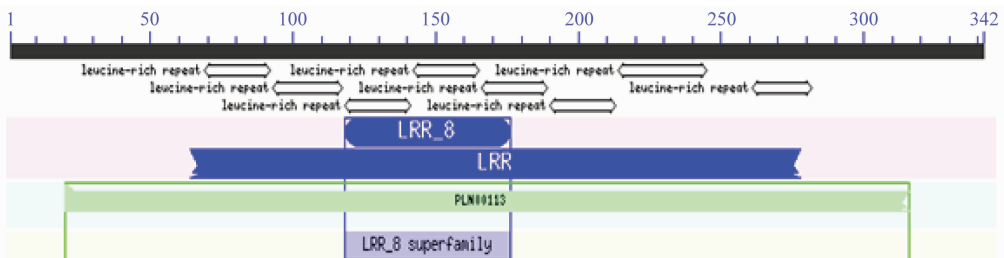


图 6 亮氨酸重复区

Fig. 6 Leucine repeat region

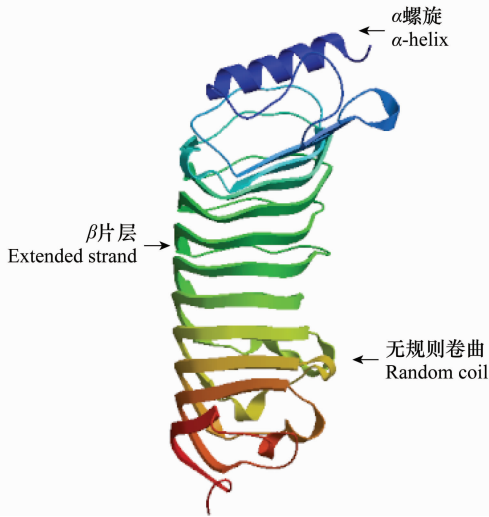


图 7 芥菜型油菜 PGIP 蛋白三级结构预测

Fig. 7 Predicted PGIP three-dimensional model in *Brassica juncea*

蛋白质氨基酸序列中,半胱氨酸残基对蛋白质二、三级结构的形成起着重要的作用,几乎所有蛋白质中都存在着半胱氨酸。位于同一蛋白质链或者不同蛋白质链的两个半胱氨酸通过共价关联形成二硫键。二硫键对维持蛋白质的正确折叠、维持结构稳定与生物活性具有重要作用。二硫键的形成可导致同一或不同肽链的不同区域的氨基酸残基靠拢集合在一起,由此肽链进行折叠并形成稳定的空间拓扑结构,具有疏水性的氨基酸残基围绕着二硫键形成局部的疏水中心,通过防止水分子的进入来保护氢键^[17],从而有利于形成稳定的蛋白质高级结构区域。在芥菜型油菜 PGIP 的氨基酸序列中,在 N 端 55、56 氨基酸位置和 C 端的 317、319 氨基酸位置各有 2 个半胱氨酸,它们之间形成二硫键的可能性较大。因为有这样的稳定结构使得芥菜型油菜上的 PGIP 能稳定发挥其功能作用。

3 结论与讨论

过去研究结果显示芥菜型油菜比甘蓝型、白菜型油菜对菌核病的抗性普遍较高,但是未能搞清楚具体的原因,只是推测抗菌核病基因主要分布在芥菜型油菜和甘蓝型油菜中^[18-19]。而 PGIP 在油菜抵抗菌核病过程中发挥了重要的作用。本文第一次在芥菜型油菜 cDNA 中克隆得到 PGIP 的完整氨基酸编码区序列。从生物信息学角度,以芥菜型油菜为主要分析对象对其 PGIP 基因的核苷酸及氨基酸序列的构成、结构特点、生物学功能、生化特性、二、三

级结构进行预测和分析。PGIP 蛋白结构具有典型的亮氨酸重复序列(LRR)结构,在多种不同种属的植物上都能找到这段蛋白质序列,并且具有保守性,说明这段序列在植物进化中或许扮演了非常重要的角色。通过分析,其在植物的防御系统中起着重要作用,能够识别外源分子、转导信号引起植物体作出免疫反应。对 PGIP 进行亚细胞定位结果表明 PGIP 定位于胞质外,其具有多个信号肽也印证了它具有的功能。芥菜型油菜上 PGIP 蛋白具有保守性、疏水性、而且结构稳定、具有多个信号肽,能够高效地发挥其功能。同时有研究报道 PGIP 提取物除了对核盘菌有抑制作用,对小麦禾谷镰刀菌 *Fusarium graminearum*、玉米大斑病菌 *Exserohilum turcicum*、水稻稻瘟病菌 *Pyricularia oryzae* 均有抑制作用^[20],由此可见 PGIP 蛋白对病原真菌可能具有广谱抗性。今后在抗菌核病的油菜新品种培育上应该多利用芥菜型油菜 PGIP 基因的优势,发挥其抗病育种上的潜力。

参考文献

- [1] 彭琦,陈松,张维,等. 甘蓝型油菜 PGIP 基因家族新成员 PGIP18 的克隆及序列分析[J]. 分子植物育种,2014,12(4):687-693.
- [2] 陈瑞,李金晶,关瑞攀,等. 三七多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白基因的克隆及表达分析[J]. 中草药,2016(24):4420-4427.
- [3] 周立. 小麦多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白对几种病原真菌抑制作用的研究[J]. 植物病理学报,1998,28(2):107-112.
- [4] D'OVIDIO R, MATTEI B, ROBERTI S, et al. Polygalacturonases, polygalacturonase-inhibiting proteins and pectic oligomers in plant-pathogen interactions[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2004,1696(2):237-244.
- [5] JUGE N. Plant protein inhibitors of cell wall degrading enzymes [J]. Trends in Plant Science, 2006, 11(7):359.
- [6] 朱佩佩,李艳梅,侯泳志,等. 基于 PGIP 基因的蔷薇科植物分子进化树构建与分析[J]. 湖北农业科学,2016,55(21):5672-5676.
- [7] DE LORENZO G, D'OVIDIO R, CERVONE F. The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) in defense against pathogenic fungi [J]. Annual Review of Phytopathology,2001, 39: 313-335.
- [8] 刘淑艳,刘忠松,官春云,等. 芥菜型油菜种质资源研究进展 [J]. 植物遗传资源学报,2007,8(3):351-358.
- [9] 皇甫海燕. 甘蓝型油菜 PGIP2 的原核表达、蛋白功能及其遗传转化的研究[D]. 长沙:湖南农业大学,2011.
- [10] 马田田. 甘蓝型油菜抗菌核病 QTL 定位及相关基因表达分析 [D]. 南京:南京农业大学,2012.
- [11] 彭佳师,龚继明. 信号肽与蛋白质的分选转运[J]. 植物生理学报,2011,47(1):9-17.

耐热能力,以适应高温环境。

昆虫为维持其正常的生命活动,其血淋巴中的蛋白质、游离氨基酸等重要代谢物必须维持在一个较为恒定的水平。外界胁迫,如高温、低温、真菌侵入^[10]等都会导致免疫蛋白和防御酶类的合成,大量消耗了昆虫体内的游离氨基酸。由此推断,在高温条件下,双斑长跗萤叶甲雌虫体内可能合成大量免疫蛋白和防御酶类,导致游离氨基酸含量大幅度下降。

糖类是昆虫血淋巴的重要组成部分,是血淋巴贮存和运输能源物质的重要形式。昆虫血淋巴中最主要的糖类为海藻糖,占整个血淋巴中糖类含量的 80%~90%^[11]。海藻糖还能作为蛋白质稳定剂,以保护昆虫躲避热压力等恶劣环境^[12],能够在高温、高寒、干燥失水等恶劣的条件下在细胞表面形成特殊的保护膜,有效地保护生物分子结构不被破坏^[11]。随着温度的升高(33~35℃),双斑长跗萤叶甲成虫体内可溶性糖含量和海藻糖含量也随之上升,这与西伯利亚蝗的研究结果类似^[13],进一步说明双斑长跗萤叶甲成虫对短时高温具有很强的适应性。

新疆属高温干旱地区,双斑长跗萤叶甲成虫发生期正处于新疆高温时期,开展双斑长跗萤叶甲雌虫与短时高温之间关系的研究具有现实和生态意义。根据不同温度处理后双斑长跗萤叶甲的可溶性糖、游离氨基酸和海藻糖的变化趋势,综合分析得出,双斑长跗萤叶甲在 33~41℃下,均能正常生长,而且体内可溶性糖和海藻糖一直处于上升阶段,而对 45℃的高温也有一定的适应性。表明双斑长跗萤叶甲在高温胁迫下,通过不断积累体内抗逆物质

提高自身的耐热能力。这也预示着在新疆气候变暖趋势下,双斑长跗萤叶甲的发生仍会比较严重。本研究结果,为进一步研究高温对双斑长跗萤叶甲影响的生理机制奠定基础。

参考文献

- [1] 陈光辉,尹弯,李勤,等. 双斑长跗萤叶甲研究进展[J]. 中国植保导刊,2016,36(10):19-26.
- [2] 袁海滨,齐兴林,孙长东,等. 温度对水稻田双斑长跗萤叶甲种群发生动态的影响[J]. 吉林农业大学学报,2015,37(6):654-657.
- [3] 张聪,袁志华,王振营,等. 双斑长跗萤叶甲在玉米田的种群消长规律[J]. 应用昆虫学报,2014,51(3):668-675.
- [4] 张萌,崔娟,徐伟,等. 几种农作物寄主对双斑长跗萤叶甲成虫生殖力的影响[J]. 中国农学通报,2015(23):81-84.
- [5] 刘红霞. 新疆石河子总场棉花双斑萤叶甲的发生与防治[J]. 中国棉花,2016,43(2):41-42.
- [6] 陈静,张建萍,张建华,等. 双斑长跗萤叶甲的嗜食性研究[J]. 昆虫知识,2007,44(3):357-360.
- [7] 刘鑫,田岗,王枫叶,等. 谷田中双斑长跗萤叶甲种群动态初步研究[J]. 中国农学通报,2016,32(21):177-180.
- [8] 田径,崔娟,吴磊,等. 双斑长跗萤叶甲 *Monolepta hieroglyphica* (Motschulsky)的药剂防治试验[J]. 农药,2014,53(10):767-770.
- [9] 李广伟,陈秀琳. 新疆棉区双斑长跗萤叶甲生活习性及其消长动态调查研究[J]. 中国植保导刊,2010,30(6):8-10.
- [10] 张慧,吴圣勇,王晓青,等. 球孢白僵菌对葱蝇成虫血淋巴蛋白质及游离氨基酸的影响[J]. 中国农业科学,2017,50(3):591-598.
- [11] 于彩虹,卢丹,林荣华,等. 海藻糖-昆虫的血糖[J]. 昆虫知识,2008,45(5):832-837.
- [12] WYATT G R. The biochemistry of sugars and polysaccharides in insect [J]. *Insect Physiology*, 1967, 4(4): 287-360.
- [13] 李娟,李爽,王冬梅,等. 高温胁迫下西伯利亚蝗体内抗逆物质含量变化[J]. 昆虫学报,2014,57(10):1155-1161.

(责任编辑:田喆)

(上接 99 页)

- [12] DYRLOV B J, NIELSEN H H G, BRUNAK S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0 [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2004, 340(4):783-795.
- [13] 董娇,周军,辛培尧,等. 不同植物 LDOX/ANS 基因的生物信息学分析[J]. 基因组学与应用生物学,2010,29(5):815-822.
- [14] GEOURJON C, DELEAGE G. SOPMA: Significant improvement in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments [J]. *Bioinformatics*, 1995, 11(6):681-684.
- [15] SHANMUGAM V. Role of extracytoplasmic leucine rich repeat proteins in plant defence mechanisms [J]. *Microbiological Research*, 2005, 160(1):83-94.
- [16] KAJAVA A V, VASSART G, WODAK S J. Modeling of the

three-dimensional structure of proteins with the typical leucine-rich repeats [J]. *Structure*, 1995, 3(9):867.

- [17] 刘坤. 基于蛋白质序列信息预测二硫键的新方法研究[D]. 南京:南京理工大学,2017.
- [18] 王璐璐. 贵州地方油菜种质资源菌核病的抗性鉴定与评价[J]. 贵州农业科学,2014,42(4):42-46.
- [19] 晏立英,周乐聪,谈宇俊,等. 油菜菌核病拮抗细菌的筛选和高效菌株的鉴定[J]. 中国油料作物学报,2005,27(2):55-57.
- [20] GOMATHI V, GNANAMANICKAM S S. Polygalacturonase-inhibiting proteins in plant defence [J]. *Current Science*, 2004, 87(9):1211-1217.

(责任编辑:田喆)