

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.2014.03.011

低温胁迫下椰心叶甲啮小蜂正反向消减 cDNA 文库的构建及其序列分析

吕宝乾, 万 婕, 李艺琼, 金启安, 彭正强*, 温海波

中国热带农业科学院环境与植物保护研究所; 农业部热带农林有害生物入侵监测与控制重点
开放实验室, 农业部儋州农业环境科学观测实验站, 海南 儋州 571737

摘要:【背景】椰心叶甲啮小蜂在防治椰心叶甲危害上取得了重要成果,其耐低温胁迫能力将决定该寄生蜂是否能在低温环境下建立种群并发挥控害效能。筛选椰心叶甲啮小蜂低温胁迫下相关响应基因,可为揭示其耐寒性机理提供重要线索。【方法】采用抑制消减杂交技术,分别以经 0℃处理 24 h 后的试虫与未经低温处理的试虫 cDNA 互为 tester 与 driver,正反向构建椰心叶甲啮小蜂 cDNA 消减文库,经蓝、白斑筛选,鉴定阳性差异片段,并分别随机挑选正反向文库 224 和 119 个阳性克隆进行序列比对分析。【结果】本试验所构建的 cDNA 消减文库为椰心叶甲啮小蜂低温胁迫下特异表达的 cDNA 消减文库;经蓝、白斑筛选,分别得到了 40 和 4 个高质量 ESTs,经 PCR 鉴定插入片段长度主要分布于 200~700 bp 之间;序列分析结果表明,差异表达基因的功能主要涉及新陈代谢、细胞结构、信号传导、氨基酸和蛋白质合成的生理过程,并筛选出 5 类与啮小蜂耐寒性相关的基因,包括 Hsp 家族蛋白、海藻糖磷酸合酶、谷氨酰胺合成酶、ATP 合成酶 β 亚基和 NADH 脱氢酶。【结论与意义】该研究对进一步研究椰心叶甲啮小蜂抗寒性状的表达具有一定的参考价值,为揭示啮小蜂抗低温耐寒机制打下一定的理论基础。

关键词: 椰心叶甲啮小蜂; 差异表达基因; 抑制消减杂交

Construction and preliminary analysis of forward and reverse subtracted cDNA libraries from *Tetrastichus brontispae* Ferriere under low temperature

Bao-qian LV, Jie WAN, Yi-qiong LI, Qi-an JIN, Zheng-qiang PENG*, Hai-bo WEN

Environment and Plant Protection Institution, CATAS/Key Laboratory of Monitoring and Control of Tropical Agricultural
and Forest Invasive Alien Pests, Ministry of Agriculture/Danzhou Scientific Observing and Experimental Station
of Agro-Environment, Ministry of Agriculture, Danzhou, Hainan 571737, China

Abstract: 【Background】*Tetrastichus brontispae* (Ferriere), is a parasitoid that progressively improved the prevention of damage caused by the *Brontispa longissima* (Gestro). Its cold tolerance plays an important role in its population establishment and control efficiency. Thus, exploring the tolerance genes of this pest induced by cold temperatures could provide important clues for the study of cold tolerance mechanism of this parasitoid. 【Method】In this study, cDNA libraries was constructed using forward and reverse suppression subtractive hybridization (SSH). Here, cDNA from cold-acclimated insects were used as testers against the cDNA of none-acclimated insects used as drivers and vice versa, cold-acclimated insects as drivers with none-acclimated insects as testers. Identification of positive differential fragments by white-blue plague selection and those confirmed clones were randomly selected for sequencing analysis, of which the results were aligned with GenBank database via BLASTX programme. 【Result】The specific cDNA subtractive library of *T. brontispae* under low temperature was successfully constructed. The data showed that 40 and 4 high quality ESTs defined from the forward and reverse suppression subtractive libraries were selected of which the length for the inserted sequences varied between 200 bp and 700 bp. The 44 high quality ESTs of subject were highly homogenous with that of other known species and the main function of these ESTs involved in metabolism, cell structure, signal transduction, amino and protein synthesis. We speculated that there were at least 5 different candidate genes that might be related to the cold tolerance of *T. brontispae*, in-

cluding HSP proteins, trehalose-phosphate synthase, glutamine synthetase, ATP synthase subunit beta, and NADH dehydrogenase (ubiquinone).【Conclusion and significance】This study is important for future research on the expression of cold hardness of *T. brontispae*, and lays some theoretical basis on the molecular mechanism of cold hardness of *T. brontispae*.

Key words: *Tetrastichus brontispae*; differentially expressed gene; suppression subtractive hybridization

椰心叶甲啮小蜂 *Tetrastichus brontispae* (Ferriere) 是入侵害虫椰心叶甲 *Brontispa longissima* (Gestro) 的重要蛹寄生蜂,自 2004 年从中国台湾引入大陆后,在防治椰心叶甲危害上取得了阶段性成果。椰心叶甲发生区所处纬度较低,主要包括海南全省,广东、广西和云南省区的部分地区。这些地区 1 月份平均气温仍有 10 ℃,在冬季,受南下冷空气影响,会有接近 0 ℃ 的短时极端低温天气。因此,椰心叶甲啮小蜂耐低温胁迫能力将决定该寄生蜂是否能在低温环境下建立种群并发挥控害效能。为保护机体免受寒害损伤,昆虫体内会发生一系列的应急性代谢变化。郭东峰(2013)曾对椰心叶甲啮小蜂耐寒性做了相关研究,初步明确其抗寒系统为海藻糖—甘油—脂肪—糖原。为了从分子生物学角度解释椰心叶甲啮小蜂低温胁迫的内在响应机制,本研究利用抑制消减杂交(suppression subtractive hybridization,SSH)技术筛选椰心叶甲啮小蜂耐寒相关基因。

抑制消减杂交技术是一门被广泛应用于细胞分化、发育、衰老等领域,旨在分离不同组织间或个体发育的不同阶段以及因外界因子作用而导致差异表达基因的技术(张锴,2010),由 Diatchenko *et al.* (1996)首次提出,该技术操作简便、稳定可靠、灵敏性高,因此在动植物研究中,具有十分广阔的应用前景。郭新红和姜孝成(2001)利用 SSH 证实了甘露醇处理后的梭梭 *Halonxylon ammodendron* (Men.) Bge. 幼苗中有 3 个特异表达或表达增强的基因;Wang & Rowley (1998)利用 SSH 分离得到水稻 *Oryza sativa* L. 经硝酸盐胁迫下诱导的基因;王衍海等(2006)采用 SSH 从日本吸血虫 *Schistosoma japonicum* Katsurada 雌虫体内筛选出了 6 个表达水平明显高于雄虫的基因;梁利群等(2006)采用 SSH 明确了鲤鱼 *Cyprinus carpio* L. 脑组织里 13 个低温下特异表达的未知基因;季相华(2008)利用 SSH 分离并鉴定了稻水象甲 *Lissorhoptrus oryzophilus* Kuschel 夏季滞育的相关基因;陈浩等(2012)利用 SSH 分离和鉴定了梨小食心虫 *Grapholitha molesta* (Busck) 滞育的相关基因等。本试验利用抑制杂

交消减技术研究了低温处理(0 ℃ 下处理 24 h)后椰心叶甲啮小蜂体内差异基因的表达情况,分离并获得与椰心叶甲啮小蜂耐寒相关基因,为揭示其耐寒性机理提供重要线索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试昆虫 椰心叶甲啮小蜂由中国热带农业科学院环境与植物保护研究所椰心叶甲天敌饲养室提供,以椰心叶甲蛹为寄主进行繁殖,正常饲养条件下(25 ℃,RH = 75% ± 10%,L:D = 12:12)饲养的试虫为对照组,0 ℃ 下处理 24 h 的试虫为处理组。

1.1.2 试验试剂 TRIZOL RNA 抽提试剂(INVITROGEN 厂),DNTP 三磷酸脱氧核苷(大连宝生物工程有限公司),Taq 酶(KAPA),TBE 缓冲液(华大科技),10 × Loading buffer(华大科技),DNA Marker(华大科技),QIAGEN II Gel Extraction Kit Qiagen(QIAGEN 公司),PMD-18T 载体(大连宝生物工程有限公司),SSH 试剂盒(CLONTECH 公司),其他常规生化试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 抽提 按照 TRIZOL 试剂盒说明书分别提取处理组与对照组试虫总 RNA,用 NANO DROP 分光光度计测浓度并定量后,组建 2 个总 RNA 库,将总 RNA 适当稀释,取 1 μL 用 NANO FROP 测浓度并定量。

1.2.2 抑制消减杂交 以处理组作 tester,对照组作 driver 进行正向杂交,富集处理组高表达的转录本;以对照组作 tester,处理组作 driver 进行反向杂交,富集对照组高表达的转录本。按照 PCR-Select™ cDNA Subtraction kit 说明,分别合成 cDNA 第一链与双链 cDNA 并纯化。将所有 tester cDNA 酶切后分为 2 份,分别与接头 1(Adaptor 1)与 2R(Adaptor 2R)连接,制成 tester cDNA 1 和 tester cDNA 2,16 ℃ 过夜处理后,分别与 driver cDNA 在 68 ℃ 下进行第 1 次杂交,8 h 后,向第 1 次消减杂交的混合体系中加入过量变性 driver 进行第 2 次杂交,68 ℃ 过

夜处理。杂交产物经稀释后取 1 μL 进行 PCR 扩增,反应体系除杂交产物外还包括:5 μL H_2O ,35.5 μL MgCl_2 (KAPA),5 μL 10 $\times$ buffer (KAPA),1 μL dNTP(10 mmol $\cdot$ L^{-1}),1 μL Primer 1 (up 50 pmol $\cdot$ μL^{-1}),1 μL Primer 1 (down 50 pmol $\cdot$ μL^{-1})和 0.5 μL *Taq* (5 U $\cdot$ μL^{-1}),总体积 50 μL 。将第 1 次 PCR 产物稀释后取 1 μL ,加入与第 1 次 PCR 扩增相同的其他反应体系,进行第 2 次 PCR 扩增,反应总体积 50 μL 。

1.2.3 消减 cDNA 文库的构建及插入片段的初步鉴定 将正反向消减杂交产物利用 QIAGEN II Gel Extraction Kit Qiagen 胶回收试剂盒(QIAGEN 公司)分别过柱纯化,与 PMD-18T 载体连接,完成正反向消减 cDNA 文库的构建。转化大肠杆菌 *Escherichia coli* 感受态细胞 DH5a,涂布在含有 90 mm AMP 的 LB 平板中,37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养。挑选转化了的单菌落,1 mL LB 培养基培养过夜,取 20 μL 菌液离心后作为模板,加入与前 2 次 PCR 扩增相同的其他反应体系进行 PCR 鉴定。

1.2.4 部分 EST(expression sequence tag)片段序列分析 随机挑选 500 个阳性克隆进行测序。所测序列与 Genbank (<http://www.ncbi.nlm.gov>) 中的序列进行比对,并进行同源性检索和分析。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的提取、双链 cDNA 的合成及选择性扩增

高纯度和完整的总 RNA 是构建 cDNA 文库的前提条件。本试验中提取的处理组与对照组总 RNA 电泳结果如图 1 所示,28S、18S 2 条带清晰可见,表明提取的 RNA 完整性好。处理组与对照组样品的 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 分别为 1.81 和 1.88,二者均介于 1.8~2.0 之间,符合建库要求。

2.2 椰心叶甲啮小蜂 cDNA 的 2 次差减杂交和 2 次抑制性 PCR

2 次消减杂交后的 PCR 结果如图 2 所示。由于第 1 次 PCR 扩增条带不明显,故进行第 2 次 PCR 检测,第 2 次 PCR 产物电泳下产生了连续的条带,且大小片段介于 200~700 bp,说明检测子中的差异表达基因得到了有效富集与扩增。

2.3 抑制消减 cDNA 文库的构建

取 110 μL 转化菌涂于平板,库 1 与库 2 分别得到 498 与 524 个白色克隆,克隆饱满清晰。随机

选取 24 个阳性克隆培养,取菌液进行 PCR 检测。如图 3 所示,95% 以上的阳性克隆 cDNA 插入片段大小在 200~700 bp 之间,且都能检测到明显条带。

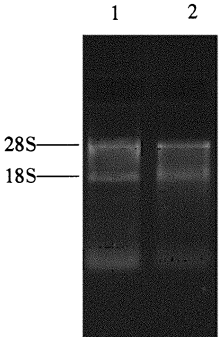


图 1 处理组与对照组试虫总 RNA 检测
Fig.1 Total RNA of *T. brontispae* from control and treatment group
1: 处理组; 2: 对照组。
1: Treatment group; 2: Control group.

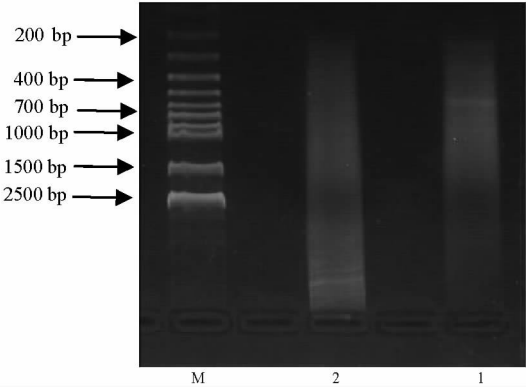


图 2 正反文库抑制差减杂后第 2 次 PCR 扩增产物电泳图

Fig.2 Electrophoresis of products before and after SSH
M: DNA marker; 1: 以处理组为 tester,对照组为 driver,经过 SSH 过程的 PCR 产物; 2: 以对照组为 driver,处理组为 tester,经过 SSH 过程的 PCR 产物。
M: DNA marker; 1: PCR products using treatment group as tester, control group as driver; 2: PCR products using control group as tester, treatment group as driver.

2.4 EST 片段的测序和同源性分析

在 PCR 鉴定为阳性克隆的正向文库中挑选 224 个菌落,从反向文库中挑选 119 个菌落测序,分别获得 40 与 4 个高质量 ESTs。正向文库检测的序列是在诱导条件下表达量上调的基因,反向文库检测的序列是在诱导条件下表达量下调的基因。将这些 ESTs 通过 Genbank 进行序列比对分析 (Blastx)。结果表明,与抗寒相关的 EST 表达不仅涉及不同物种,其中包括植物、动物及微生物(表

1),表 1 主要列举了同源性高达 80% 以上昆虫种类的功能基因,这些功能基因的来源也很广泛,主要包括新陈代谢、信号传导、转录调控、细胞结构功能、氨基酸和蛋白质的合成、以及某些未知的功能基因,并列出了可能与啮小蜂耐寒机制有关联的候选基因。

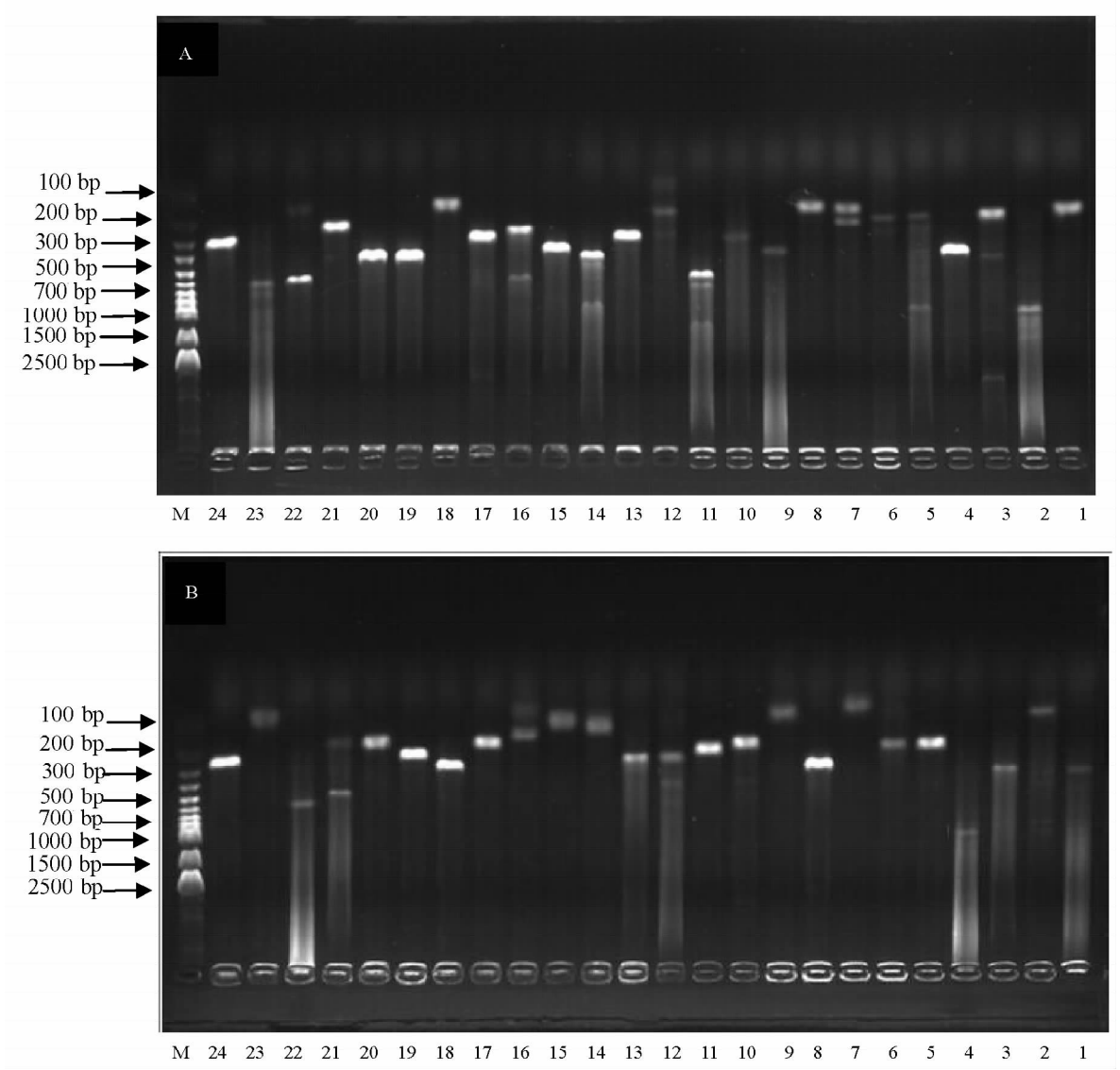


图 3 正反文库部分阳性克隆插入片段大小的检测

Fig. 3 Identification of inserted cDNA fragments from forward and reverse suppression cDNA libraries
A: 正向文库; B: 反向文库; M: DNA marker; 1 ~ 24: 从正反文库中随机挑取的 24 个克隆阳性。
A: Forward suppression cDNA library; B: Reverse suppression cDNA library; M: DNA marker;
1 ~ 24: The 24 randomly picked clones from the suppression cDNA libraries.

表 1 椰心叶甲啮小蜂低温胁迫正反向部分阳性克隆 Blast 同源比对分析结果

Table 1 The BLAST analysis results of some randomly selected clones from SSH libraries					
类别 Catalogue	克隆 Clone	登录号 Accession No.	同源序列的基因功能及来源 Name of proteins/genes and source	长度 Length (bp)	E 值 E-value
新陈代谢 Metabolism	F ₁ - 38	ERH70282.1	蔗糖结合转运系统中的 ATP 结合蛋白,灵杆菌 EGD-HP20 Sugar ABC transporter ATP-binding protein, <i>Serratia marcescens</i> Bizio EGD-HP2	237	2e - 47
	F ₁ - 1 - 42	ABN12066.1	预测的 ATP 合成酶 β 亚基,木槿曼粉蚱 Predictive ATP synthase subunit β , <i>Maconellicoccus hirsutu</i>	432	6e - 93
	F ₁ - 2 - 5	WP015378317.1	β -酮己二酰辅酶 A 硫解酶,粘质沙雷菌 β -ketoacyl CoA thiolase, <i>Serratia marcescen</i> Bizio	228	1e - 36

续表 1

类别 Catalogue	克隆 Clone	登录号 Accession No.	同源序列的基因功能及来源 Name of proteins/ genes and source	长度 Length (bp)	E 值 E-value
信号传导 Signal transductio	F ₁ - 2 - 38	EFN66498.1	5'-磷酸腺苷酸活化的蛋白激酶催化亚基 α -2,佛罗里达弓背蚁 5'-AMP-activated protein kinase catalytic subunit α -2, <i>Camponotus floridanu</i> Buckley	379	4e - 59
	F ₂ - 90	BAF03050.1	细胞粘附分子 AbsCAM-Ig7B,意大利蜜蜂 Cell adhesion molecule AbsCAM-Ig7B, <i>Apis mellifer</i> L.	317	2e - 34
细胞结构 Cell structure	F ₁ - 1 - 8	ABB45785.1	α -微管蛋白,共生菌 <i>Streblomastix strix</i> α -tubulin, <i>Streblomastix strix</i>	154	3e - 29
	F ₂ - 19	AGJ71765.1	原肌球蛋白,部分源于菊花和叶蝉 Tropomyosin, partial <i>Chrysanthemum morifolium</i> Ramat and <i>Euscelidius variegatus</i> Kirshbaum	136	8e - 04
	F ₂ - 46	ACC66067.1	肌动蛋白,琥珀蚕 Actin, <i>Antheraea assam</i> Westwood	209	1e - 41
	F ₁ - 21	EFN83272.1	肌联蛋白,印度跳蚁 Titin, <i>Harpegnathos saltato</i> Jerdo	127	3e - 16
	F ₂ - 95	EFN89426.1	接头蛋白复合体 mu-1,印度跳蚁 AP-2 complex subunit mu-1, <i>H. saltato</i>	175	2e - 31
	F ₂ - 72	ABJ09674.1	尼古丁乙酰胆碱受体的 6 号亚基的同型蛋白 VII,家蝇 Nicotinic acetylcholine receptor subunit 6 isoform VII, <i>Musca domestic</i> L.	286	0.020
	F ₁ - 1 - 10	NP001165851.1	围食膜因子 3-A2 前体样表皮蛋白 3-A2,丽蝇蛹集金小蜂 Cuticular protein analogous to peritrophins 3-A2 precursor, <i>Nasonia vitripenni</i> (Walker)	182	1e - 29
	F ₂ - 27	NP001166263.1	RR-1 家族 18 号表皮蛋白前体,丽蝇蛹集金小蜂 Cuticular protein RR-1 family member 18 precursor, <i>N. vitripenni</i>	129	2e - 14
转录调控 Transcriptional control	F ₂ - 1	BAA19776.1	聚合酶蛋白,家蚕 Pol protein, <i>Bombyx mor</i> L.	360	6e - 31
	F ₂ - 91	EFN82019.1	组蛋白去甲基化酶 UTX,印度跳蚁 Histone demethylase UTX, <i>H. saltato</i>	312	1e - 69
	F ₂ - 14	EGI57453.1	核内蛋白 1,切叶蚁 Nuclear protein 1, <i>Acromyrmex echinator</i> (Forel)	653	2e - 26
	R ₂ - 2 - 2	EHJ63313.1	逆转录酶,大红斑蝶 Reverse transcriptase, <i>Danaus plexippu</i> L.	117	2e - 08
与耐寒性相关的候选 基因 Candidate genes may be related to cold tolerance	F ₂ - 10	CAJ28988.1	热激蛋白 83,地中海果蝇 Heat shock protein 83, <i>Ceratitis capitat</i> (Wiedemann)	134	2e - 21
	F ₁ - 1 - 48	ABV48741.1	热激蛋白 70 同源类别(Hsc70),熊蜂蒺藜 Heat shock protein cognate 70, <i>Bombus terrestris</i> L.	205	4e - 41
	F ₂ - 24	ACO57619.1	热激蛋白 60,蝶蛹金小蜂 Heat shock protein 60, <i>Pteromalus puparu</i> L.	468	5e - 63
	F ₁ - 1 - 50	AFC76152.1	热激蛋白 90,刺桐姬小蜂 Heat shock protein 90, <i>Quadrastichus erythrina</i> Kim	763	1e - 34
	F ₁ - 2 - 31	ACO58580.1	热激蛋白 90,意大利蜜蜂 Heat shock protein 90, <i>A. mellifer</i>	221	7e - 40
	F ₂ - 63	WP028472695.1	海藻糖磷酸合酶,耐碱类诺卡氏菌 Trehalose-phosphate synthase, <i>Nocardioides alkalioleran</i> sp. nov.	199	2e - 04
	F ₁ - 2 - 7	NP001164445.1	谷氨酰胺合成酶,意大利蜜蜂 Glutamine synthetase, <i>A. mellifer</i>	117	1e - 09
	F ₁ - 1 - 29	XP003627732.1	ATP 合成酶 β 亚基,蒺藜苜蓿 ATP synthase subunit β , <i>Medicago truncatul</i> Gaertn.	336	2e - 39
	F ₁ - 1 - 41	NP001165787.1	NADH 脱氢酶(辅酶)1- α 亚复合体 9, 39 kD,丽蝇蛹集金小蜂 NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1- α subcomplex 9, 39 kD, <i>N. vitripenni</i>	287	3e - 52
氨基酸和蛋白质的合成 Synthesis of amino acids and proteins	F ₁ - 1 - 25	AAX62421.1	核糖体蛋白 L3,茶足柄瘤蚜茧蜂 Ribosomal protein L3, <i>Lysiphlebus testaceipe</i> (Cresson)	469	9e - 101
	F ₁ - 2 - 37	AAR01309.1	延伸因子 2,美洲大蠊 Elongation factor 2, <i>Periplaneta american</i> L.	646	1e - 143

续表 1

类别 Catalogue	克隆 Clone	登录号 Accession No.	同源序列的基因功能及来源 Name of proteins/genes and source	长度 Length (bp)	E 值 E-value
	F ₂ - 38	ABX57482.1	核糖体蛋白 S2, 环眼蝶 Ribosomal protein S2, <i>Pararge aegeri</i> L.	129	1e - 18
	F ₁ - 2 - 12	ACZ13616.1	谷氨酰胺-tRNA 合成酶, 嗜线虫杆菌 Glutamyl-tRNA synthetase, <i>Xenorhabdus indic</i> sp. nov.	224	2e - 45
	F ₁ - 2 - 28	EFN62653.1	延伸因子 2, 佛罗里达弓背蚊 Elongation factor 2, <i>C. floridanu</i>	321	6e - 67
	F ₂ - 43	CBY32249.1	未命名蛋白产物, 异体住囊虫 Unnamed protein product, <i>Oikopleura dioic</i>	215	2e - 41
	F ₂ - 22	EGI68302.1	40S 核糖体蛋白 S29, 切叶蚁 40S ribosomal protein S29, <i>Acromyrmex echinatio</i> (Forel)	112	5e - 17
	F ₂ - 15	AGW44856.1	延伸因子 1- α , 部分源自 <i>Telenomus consimilis</i> Elongation factor 1- α , partial <i>Telenomus consimili</i>	186	2e - 34
	F ₂ - 52	EZA54050.1	60S 核糖体蛋白 L19, 毕氏粗角蚁 60S ribosomal protein L19, <i>Cerapachys biro</i> (Forel)	205	3e - 35
	F ₂ - 94	EZA50841.1	60S 核糖体蛋白 L13a, 毕氏粗角蚁 60S ribosomal protein L13a, <i>C. biro</i>	117	1e - 09
	F ₂ - 13	ABD36171.1	多毛细胞白血病蛋白 1, 家蚕 Hairy cell leukemia protein 1, <i>B. mor</i>	349	6e - 43
	F ₂ - 3	NP476874.1EHJ	核糖体蛋白 S2, 黑腹果蝇 Ribosomal protein S2, <i>Drosophila melanogaste</i> Meige	417	4e - 89
	R ₂ - 2 - 16	EHJ77067.1	聚合酶蛋白, 黑腹果蝇 Pol protein, <i>D. melanogaste</i>	167	8e - 12
未知功能 Unknown proteins	F ₁ - 2 - 13	EGI67437.1	假设蛋白 G5I_04082, 切叶蚁 Hypothetical protein G5I_04082, <i>A. echinatio</i>	213	1e - 41
	R ₂ - 2 - 46	EZA46989.1	THAP 结构域蛋白, 毕氏粗角蚁 THAP domain-containing protein, <i>C. biro</i>	317	1e - 17
	F ₂ - 6	XP001599602.1	预测: 40S 核糖体蛋白 S10, 丽蝇蛹集金小蜂 Predicted: 40S ribosomal protein S10, <i>N. vitripenni</i>	213	1e - 41
	F ₂ - 9	XP008209404.1	预测: 谷氧还蛋白 C4-异构体 X1, 丽蝇蛹集金小蜂 Predicted: glutaredoxin-C4-like isoform X1, <i>N. vitripenni</i>	278	2e - 42

F: 正向文库 EST; R: 反向文库 EST。
F: EST sequences of forward suppression library; R: EST sequences of reverse suppression library.

3 讨论

大多数亚热带、热带昆虫, 由于较少经历 0 ℃ 及以下低温, 冬季来临时, 低温在其体内易造成“不结冰冷伤害”(nonfreezing cold injury, NFCI)。为建立新的代谢过程以维持正常的生命活动, 昆虫体内会发生一系列的生理变化。本试验对椰心叶甲啮小蜂低温耐寒相关的 SSH-cDNA 正反向文库 EST 序列进行功能分类, 结果表明, 差异表达的基因主要与新陈代谢、信号传导、转录调控、细胞结构功能、氨基酸和蛋白质的合成等生理过程有关, 从中筛选出与啮小蜂耐寒性相关基因共 5 类。①Hsp 家族蛋白, 包括 Hsp60、Hsc70 (Hsp70 的另一表现型)、Hsp83 和 Hsp90。其中, Hsp90 蛋白能快速保护细胞对抗内外源性应激原的刺激, 增强细胞的修复功能及提高细胞对应激的耐受程度(李娟等,

2008); Hsp70 在细胞应激反应中扮演着重要的分子伴侣角色, 且在低温暴露条件下与变性蛋白质的复性过程相关(Feder & Hofmann, 1999; Sinclair *et al.*, 2007); Hsp83 在昆虫卵巢发育期间起重要的保护作用, Xu *et al.* (2010) 发现, Hsp83 的表达若受到抑制, 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* Herbst 雌虫就无法产出成熟的卵细胞; Hsp60 与能量代谢过程中酶和蛋白质的组装有关, 在胁迫环境下, Hsp60 的增加会使受损的蛋白质复性并恢复其生物活性(Cheng *et al.*, 1989; Martin *et al.*, 1992)。②海藻糖磷酸合酶(trehalose-phosphate synthase, Tps), 虽未直接报道在诺卡氏菌上与其耐寒性相关, 但海藻糖是昆虫在面临高低温、干燥、氧化等外界胁迫环境时体内普遍诱导的一种具保护作用的二糖, 有昆虫“血糖”之称(Thompson, 2003), Tps 可诱导海藻

糖的形成 (Chung, 2008), 而海藻糖正是椰心叶甲啮小蜂耐寒系统的主要物质之一 (郭东峰, 2013)。

③谷氨酰胺合成酶 (glutamine synthetase), 虽未报道在意大利蜜蜂体内与其耐寒性直接相关, 但谷氨酰胺合成酶与麻蝇 *Sarcophaga crassipalpis* Macquart 耐寒性相关 (Michaud & Denlinger, 2007); ④ATP 合酶 β 亚基 (ATP synthase subunit β), 与竹节虫属 *Micrarchus* 耐寒性状的表达相关 (Dunning *et al.*, 2014)。

⑤NADH 脱氢酶, 与水稻耐寒性状的表达相关 (Yan *et al.*, 2006)。

本文对进一步研究椰心叶甲啮小蜂抗寒性状的表达具有一定的参考价值, 对揭示该蜂耐寒机制的探索打下一定的基础, 但就本试验获得的所有 EST 序列及其实际功能, 还需进一步验证。

参考文献

- 陈浩, 杨杰, 成卫宁, 仵均祥. 2012. 梨小食心虫滞育与非滞育幼虫抑制性消减文库的构建与分析. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 40(9): 90–95, 102.
- 郭东峰. 2013. 低温胁迫对椰心叶甲啮小蜂种群影响及机理. 海口: 海南大学.
- 郭新红, 姜孝成. 2001. 用抑制差减杂交法分离和克隆梭梭幼苗受渗透胁迫诱导相关基因的 cDNA 片段. 植物生理学报, 27(5): 401–406.
- 季相华. 2008. 稻水象甲夏季滞育相关基因的分离与鉴定. 杭州: 浙江大学.
- 李娟, 杨惠, 周元国. 2008. 热激蛋白 90 与热激应答. 生命的化学, 28(3): 299–301.
- 梁利群, 李绍戊, 常玉梅, 高俊生, 孙效文, 雷清泉. 2006. 抑制消减杂交技术在鲤鱼抗寒研究中的应用. 中国水产科学, 13(2): 193–199.
- 王衍海, 彭鸿娟, 陈晓光, 沈树满. 2006. 日本血吸虫消减雌性成虫 cDNA 文库的建立及其特异表达基因的筛选. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 24(1): 45–50.
- 张锴. 2010. 受松材线虫侵染的马尾松抑制消减文库构建与表达谱分析. 北京: 中国林业科学研究院.
- Cheng M Y, Hartl F U, Martin J, Pollock R A, Kalousek F, Neupert W, Hallberg E M, Hallberg R L, Horwich A L. 1989. Mitochondrial heat-shock protein hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria. *Nature*, 337: 585–674.
- Chung J S. 2008. A trehalose 6-phosphate synthase gene of the hemocytes of the blue crab, *Callinectes sapidus*: cloning, the expression, its enzyme activity and relationship to hemolymph trehalose levels. *Saline Systems*, 4: 18.
- Diatchenko L, Lau Y F, Campbell A P, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdllov E D and Siebert P D. 1996. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93: 6025–6030.
- Dunning L T, Dennis A B, Sinclair B J, Newcomb R D and Buckley T R. 2014. Divergent transcriptional responses to low temperature among populations of alpine and lowland species of New Zealand stick insects (*Micrarchus*). *Molecular Ecology*, 23: 2712–2726.
- Feder M E and Hofmann G E. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology*, 61: 243–282.
- Martin J, Horwich A L and Hartl F U. 1992. Prevention of protein denaturation under heat stress by the chaperonin Hsp60. *Science*, 258: 995–998.
- Michaud M R and Denlinger D L. 2007. Shifts in the carbohydrate, polyol, and amino acid pools during rapid cold-hardening and diapause-associated cold-hardening in flesh flies (*Sarcophaga crassipalpis*): a metabolomic comparison. *Journal of Comparative Physiology B*, 177: 753–763.
- Sinclair B J, Gibbs A G and Roberts S P. 2007. Gene transcription during exposure to, and recovery from, cold and desiccation stress in *Drosophila melanogaster*. *Insect Molecular Biology*, 16: 435–443.
- Thompson S N. 2003. Trehalose—the insect ‘blood’ sugar. *Advances in Insect Physiology*, 31: 205–285.
- Wang S M and Rowley J D. 1998. A strategy for genome-wide gene analysis: integrated procedure for gene identification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95: 11909–11914.
- Xu J, Tan A and Palli S R. 2010. The function of nuclear receptors in regulation of female reproduction and embryogenesis in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Journal of Insect Physiology*, 56: 1471–1480.
- Yan S P, Zhang Q Y, Tang Z C, Su W A and Sun W N. Comparative proteomic analysis provides new insights into chilling stress responses in rice. *Molecular & Cellular Proteomics*, 5: 484–496.