

柞蚕性信息素合成相关基因的表达研究

侯洋¹, 张芳¹, 王郡¹, 胡飞¹, 刘彦群², 魏兆军^{1*}

(1. 合肥工业大学生物与食品工程学院, 安徽合肥 230009; 2. 沈阳农业大学生命科学技术学院, 辽宁沈阳 113001)

摘要 [目的]明确与性信息素合成相关基因的组织分布及其在性腺中的发育表达。[方法]利用荧光定量 PCR 方法,对柞蚕乙酰辅酶 A 羧化酶、超长链脂肪酸、醇脱氢酶、酯酶、脂肪酶基因在不同组织分布及性腺中的发育表达进行分析。[结果]乙酰辅酶 A 羧化酶、超长链脂肪酸 2 个基因在性腺中的表达量显著高于其他组织;醇脱氢酶、酯酶和脂肪酶 3 个基因在中肠或脂肪体等组织中表达量高于性腺。乙酰辅酶 A 羧化酶、超长链脂肪酸、醇脱氢酶、脂肪酶 4 个基因在羽化后 2 d 性腺中的表达量显著高于羽化前 2 d。酯酶基因在羽化后 2 d 性腺中的表达量显著低于羽化前 2 d。[结论]明确了柞蚕性信息素合成相关的 5 个基因的组织分布和发育表达,为进一步研究这些性信息素合成相关基因的功能奠定基础。

关键词 柞蚕;性信息素合成相关基因;表达

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)16-049-04

The Expression of the Genes Related to the Sex Pheromone Biosynthesis of *Antheraea pernyi*

HOU Yang, ZHANG Fang, WANG Jun, WEI Zhao-jun* et al (School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei, Anhui 230009)

Abstract [Objective] The distribution and developmental expression in pheromone gland of the genes related to the pheromone biosynthesis were investigated in *Antheraea pernyi*. [Method] The expression of Acetyl-CoA carboxylase, very long chain fatty acids, Alcohol dehydrogenase, Lipase, Esterase in different tissues and stages of pheromone gland were analyzed by quantitative PCR. [Result] Two genes showed the highest expression in pheromone gland, including Acetyl CoA Carboxylase, elongation of very longchain fatty acids. The other three genes express highly in midgut or fat body, including Alcohol dehydrogenase, Lipase, Esterase gene. The mRNA of five genes changes significantly with moth eclosion. The mRNA of four genes in the pheromone gland of 2 days after eclosion are higher than those in the gland of 2 days before eclosion, including Acyl-CoA dehydrogenase gene, elongation of very longchain fatty acids gene, Alcohol dehydrogenase gene, Lipase gene. The Esterase gene shows higher expression level in the pheromone gland of 2 days before eclosion than those in the gland of 2 days after eclosion. [Conclusion] The tissue distribution and development expression of 5 genes related to the pheromone biosynthesis was determined, which will lay a basis for study on these related genes.

Key words *Antheraea pernyi*; Genes related to pheromone biosynthesis; Expression

柞蚕(*Antheraea pernyi*)属于大型经济昆虫,起源于我国,由于其蚕体较大、易于操作、对光照敏感,长期以来一直是研究光周期、神经内分泌调控等方面很好的模式昆虫。性信息素首先在家蚕中被鉴定出来^[1],大约 1 600 种蛾的性信息素和引诱剂被化学鉴定出来^[2]。目前已经明确部分性信息素的生物合成路径^[3-5]。Vogel 等^[6]从烟芽夜蛾性腺的 cDNA 文库中鉴定 70 个在性信息素生物合成路径中起作用的候选基因,包括乙酰辅酶 A 羧化酶、脂肪酸合成酶、去饱和酶、脂肪酰基还原酶、醛还原酶、醇氧化酶、乙酰基转移酶、酰基酯酶、脂肪酶等基因。乙酰辅酶 A 羧化酶属于类型 I 生物素包含酶,在生物体内催化乙酰辅酶 A 形成丙二酰辅酶 A^[7]。超长链脂肪酸是指生物体内碳链中碳原子数超过 18 个,在生物体中具有广泛的生理功能,参与甘油酯、生物膜膜脂及鞘脂的合成^[8]。醇脱氢酶是生物体内重要的氧化还原催化剂之一,在生物体内,很多醇类代谢都通过醇脱氢酶催化完成^[9]。脂肪酶隶属于羧基酯水解酶类,能够将甘油三酯水解成甘油和脂肪酸。脂肪酸存在于含有脂肪的动物、植物和微生物组织中。酯酶是水解酶,在信息素合成和消化过程中水解酯类。羧酸酯酶与多种药物的解毒和代谢有关,并参与脂质运输和代谢^[10]。

笔者在前期利用转录组学方法,明确了柞蚕性信息素合成相关的基因序列。笔者利用定量 PCR 的方法,明确柞蚕性信息素合成相关的 5 个基因的组织分布和发育表达。

1 材料与方法

1.1 材料 柞蚕由沈阳农业大学提供。在冰上解剖柞蚕不同组织,包括性腺、脑、中枢神经系统、中肠、脂肪体和卵巢,不同发育时期的性腺分别是羽化前 2 d、羽化当天、羽化后 2 d,5 个个体作为一个样品。解剖后的样品迅速放入 -80 ℃ 冰箱中保存备用。

1.2 柞蚕组织总 RNA 的提取 抽提 RNA 使用 RNAiso Plus 试剂盒,具体操作参照试剂盒说明进行。总 RNA 经琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测浓度。

1.3 基因组 DNA 的去除 去除总 RNA 中的基因组 DNA,使用 TaKaRa 的 Recombinant Dnase I 试剂盒,具体操作参照试剂盒说明进行。去除基因组 DNA 后的 RNA 经琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测其浓度。

1.4 cDNA 的合成 分别以柞蚕性腺、脑、中枢神经系统、中肠、脂肪体和卵巢以及不同时期性腺中去除基因组 DNA 后的 RNA 为模板,使用 TaKaRa 的 PrimeScript™ RT reagent Kit 反转录试剂盒,反转录成 cDNA。cDNA 合成反应体系 25 μl 包括:PrimeScript™ Buffer 5 μl,PrimeScript™ RT Enzyme Mix I 1.25 μl,Oligo dT Primer(50 μmol/L)1.25 μl,Random 6 mers (100 μmol/L)1.25 μl,RNA 1 μg,加 RNase Free ddH₂O 到 25 μl。于 37 ℃ 反应 15 min,85 ℃ 5 s 使酶失活。

基金项目 国家自然科学基金项目(31072091;31272111)。

作者简介 侯洋(1989-),女,辽宁沈阳人,硕士研究生,研究方向:昆虫分子生物学。* 通讯作者,教授,博士生导师,从事昆虫分子生物学研究。

收稿日期 2015-04-14

1.5 引物设计与合成 根据前期测定的柞蚕转录组数据,明确与性信息素合成通路相关的主要基因,设计柞蚕与性信息素合成相关基因的定量 PCR 引物,引物序列见表 1。引物设计后交上海生物工程公司合成。

表 1 定量 PCR 引物

基因名称	引物名称	引物序列(5' -3')	序列长度 bp
乙酰辅酶 A 羧化酶	A-AceCC-F	CCAGGCGGCCATAAGATTG	90
	A-AceCC-R	TCGGGACTTTCAACTTTCCTGA	
延长的长链脂肪酸	A-LFA-F	GATGTCAGTGTGGTTCGGTGT	110
	A-LFA-R	CTGCCAGCATATACTACGTGTA	
醇脱氢酶	A-Alcohol-D	CCGAAGATGCAGGAATCAAGCT	131
	A-Alcohol-D-R	TTCAGCAGCCACAGTTCGAAT	
酯酶	A-esterase-F	GTAACGACAACACTACTACGGTCCC	149
	A-esterase-R	TGGGGCTACTTGCTTTTCAAA	
脂肪酶	A-lipase-F	ACTTTGGAACCACACAACGAAA	106
	A-lipase-R	GCACTGTGATGTGGTTGGATTA	

1.6 定量 PCR 稀释 cDNA 样品,取 10 μ l 样品 cDNA 溶解到 30 μ l ddH₂O 中,即将样品稀释 4 倍。用荧光染料 SYBR

Premix Ex Taq II 配制 20 μ l 反应体系,包括 SYBR Premix Ex Taq II(Tli RnaseH Plus)10 μ l, primer1 (10 pmol)1 μ l, primer2 (10 pmol)1 μ l,模板 cDNA 1 μ l, ddH₂O 7 μ l。在 Bio-RAD Two Color Real-Time PCR Detection System 荧光定量 PCR 仪上进行荧光定量 PCR 反应,每个反应重复 3 次。数据分析采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算基因表达的相对变化。

2 结果与分析

2.1 柞蚕乙酰辅酶 A 羧化酶基因的表达 柞蚕乙酰辅酶 A 羧化酶(*Acetyl-CoA carboxylase*)基因在不同组织以及不同发育阶段的发育表达变化见图 1。由图 1a 可知,乙酰辅酶 A 羧化酶基因的表达量在性腺中最高,与其他组织均有显著性差异,中肠和脂肪体中的表达量均显著高于脑、中枢神经系统和卵巢,脑、中枢神经系统和卵巢中的表达量三者之间无显著性差异。由图 1b 可知,性腺中乙酰辅酶 A 羧化酶基因的表达量随着雌蛾羽化时间的增加,其表达量显著增大,其中,羽化当天性腺中的表达量是羽化前 2 d 的 15 倍,羽化后 2 d 性腺中的表达量显著高于羽化当天,是其 3 倍。

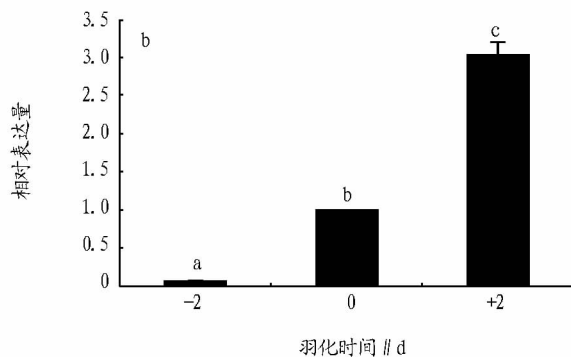
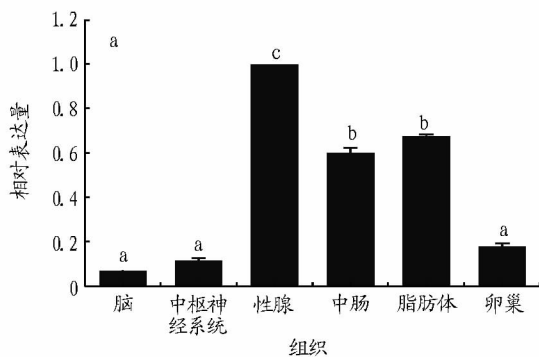


图 1 柞蚕乙酰辅酶 A 羧化酶基因在不同组织及不同发育阶段的发育表达

2.2 柞蚕超长链脂肪酸基因的表达 柞蚕超长链脂肪酸(*very long chain fatty acids*)基因在不同组织以及不同发育阶段的发育表达变化见图 2。由图 2 可知,超长链脂肪酸基因的表达量在性腺中最高,显著高于脑、中枢神经系统、中肠、脂肪体和卵巢,其中,卵巢中的表达量显著高于中肠,是其表达量的 1.6 倍,而中肠中的表达量显著高于脑、中枢神经系统和脂肪体。由图 2b 可知,性腺中超长链脂肪酸基因的表

达量随着雌蛾羽化的进行,其表达量显著增大,其中,羽化当天性腺中的表达量是羽化前 2 d 的 4 倍,羽化后 2 d 性腺中的表达量显著高于羽化当天,是其 3 倍。超长链脂肪酸基因在性腺中高表达,且随着羽化过程含量显著提高,可能是因为性腺中减数分裂形成大量配子,需要大量的生物膜,超长链脂肪酸能够参与合成生物膜。

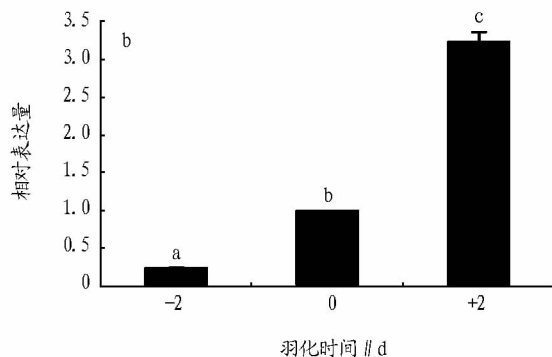
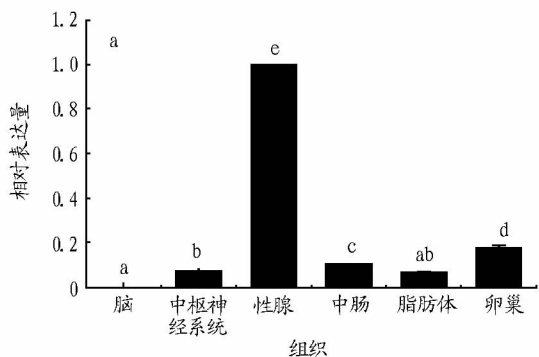


图 2 柞蚕超长链脂肪酸基因在不同组织及不同发育阶段的发育表达

2.3 柞蚕醇脱氢酶基因的表达 柞蚕醇脱氢酶基因(*Alcohol dehydrogenase*)在脂肪体中表达量最高(图 3),与其他组

织有显著性差异,脑、中枢神经系统、性腺、中肠、卵巢之间无显著性差异。性腺中醇脱氢酶基因的表达量在羽化后 2 d 表达量最高,显著高于羽化前 2 d 和羽化当天的表达量,其中羽化后 2 d 性腺中的表达量约是羽化前 2 d 的 3 倍、羽化当天

的 23 倍;羽化前 2 d 和羽化当天的表达量之间无显著性差异。虽然在性腺中表达量与其他组织无显著性差异,但羽化后 2 d 性腺显著高于羽化当天,说明醇脱氢酶基因与性信息素的合成密切相关。

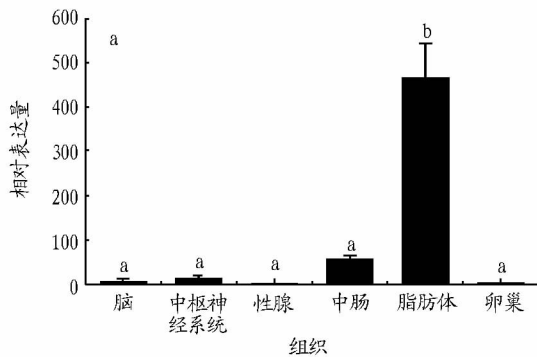


图 3 柞蚕醇脱氢酶基因在不同组织及不同发育阶段的发育表达

2.4 柞蚕脂肪酶基因的表达 柞蚕脂肪酶 (*Lipase*) 基因的表达量在中肠中最高,分别是脑、中枢神经系统、性腺、脂肪体、卵巢的 173、138、21、69 和 67 倍;其余 5 个组织之间均无显著性差异(图 4)。性腺中脂肪酶基因的表达量随着羽化

时间的增加,表达量显著增大,其中,羽化当天和羽化后 2 d 性腺中的表达量是羽化前 2 d 的 5 倍,但羽化当天和羽化后 2 d 性腺中的表达量无显著性差异。

2.5 柞蚕酯酶基因的表达 柞蚕酯酶 (*Esterase*) 基因的表达

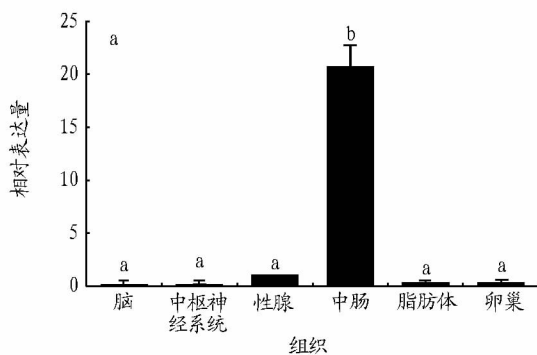


图 4 柞蚕脂肪酶基因在不同组织及不同发育阶段的发育表达

量在中肠中最高,分别是脑、中枢神经系统、性腺、脂肪体、卵巢的 85、9、99、6 和 21 倍;其余 5 个组织之间均无显著性差异(图 5)。中肠中的表达量较高可能与酯酶是一种水解酶有关,能够参与柞蚕中肠中食物的消化和吸收过程。性腺中酯

酶基因的表达量在羽化前 2 d 最高,显著高于羽化当天和羽化后 2 d 性腺中的表达量,两者之间无显著性差异。其中,羽化前 2 d 性腺中的表达量是羽化当天表达量的 80 倍,是羽化后 2 d 表达量的 3 倍。

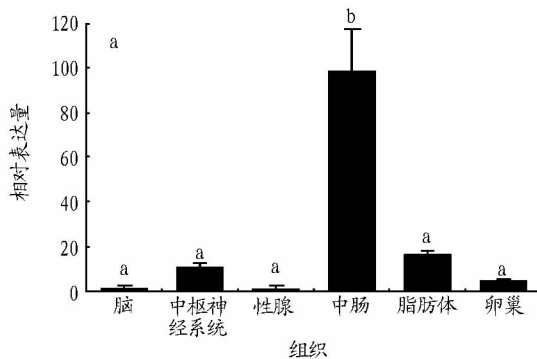


图 5 柞蚕酯酶基因在不同组织及不同发育阶段的发育表达

3 结论与讨论

该研究采用荧光定量 PCR 法对柞蚕与性信息素合成相

关基因在不同组织以及不同发育时期性腺中的表达量进行分析,其中,乙酰辅酶 A 羧化酶、超长链脂肪酸 2 个基因在性

腺中的表达量显著高于其他组织;醇脱氢酶、酯酶和脂肪酶 3 个基因在中肠或脂肪体等组织中的表达量高于性腺。乙酰辅酶 A 羧化酶基因、超长链脂肪酸基因、醇脱氢酶基因、脂肪酶基因 4 个基因在羽化后 2 d 性腺中的表达量显著高于羽化前 2 d。酯酶基因在羽化后 2 d 性腺中的表达量显著低于羽化前 2 d。与性信息素合成相关的基因,需要今后对其功能进行鉴定。下一步拟打算采取 RNA 干扰等方法,调查这些性信息素合成相关基因的功能。

参考文献

- [1] BUTENANDT A, BECKMANN R, STAMM D, et al. Über den sexual-lockstoff des seidenspinners *Bombyx mori*-reindarstellung und konstitution[J]. Zeitschrift Fur Naturforschung Part B-Chemie Biochemie Biophysik Biologie Und Verwandten Gebiete, 1959, 14(4): 283 - 284.
- [2] EL-SAYED A M. The Pherobase; Database of insect pheromones and semi-chemicals [J/OL]. 2008http://www.pherobase.com.

(上接第 35 页)

这与 Mass-Hoffman 的研究结果一致^[8]。樱桃番茄的产量与叶面积持续时间高度相关($R^2 = 0.614, P < 0.01$), 相应的 T1 处理的叶鲜重和产量明显下降证实了叶面积持续时间可以作为产量的一个可信指示指标^[20]。尽管 T2 和 T3 处理的果实产量下降但其收获指数上升, 因为茎叶干物质的下降幅度小于产量的下降幅度; T1 处理的收获指数没有明显变化, 因为其茎叶干物质下降幅度与产量下降幅度相当。果实可溶性固形物总量的上升补偿了产量的下降^[1, 6, 20-22], 这点在该研究中也得到了证实。

4 结论

该试验条件下咸水灌溉降低了樱桃番茄的净光合速率、气孔导度和蒸腾速率, 却提高了水分利用效率; 其生殖生长期利用咸水灌溉可大幅度减少茎叶干物质积累量; 膜下滴灌的咸水灌溉方式抑制了土壤盐分的垂直运动; 影响果实上市产量的土壤电导率临界值为 4.10 dS/m, 高于此值时每增加单位土壤电导率则产量下降 7.85%; 果实可溶性固形物总量在所有处理中呈不断上升趋势, 只有在营养生长期才具有显著性增长特征。因此, 在不得不使用咸水进行灌溉的条件下, 生殖生长期使用淡水而在营养生长期使用咸水进行膜下滴灌是樱桃番茄在民勤绿洲种植较为合理的灌溉方式。

参考文献

- [1] MALASH N M, FLOWERS T J, RAGAB R. Effect of irrigation methods management and salinity of irrigation water on tomato yield, soil moisture and salinity distribution[J]. Irrigation Sciences, 2008, 26: 313 - 323.
- [2] 黄翠华, 薛娟, 彭飞, 等. 不同矿化度地下水灌溉对民勤土壤环境的影响[J]. 中国沙漠, 2013, 33(2): 590 - 596.
- [3] 黄翠华, 王涛, 薛娟, 等. 民勤咸水灌溉及 SWAP 模型模拟研究[J]. 中国沙漠, 2011, 31(2): 288 - 294.
- [4] ISMAIL M R, BURRAGE S W. Effects of salinity on growth, water relations and photosynthetic rate of tomatoes grown in nutrient film technique[J]. Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science, 1994, 17: 73 - 79.
- [5] MAGGIO A, DE PASCALE S, ANGELINO G, et al. Physiological response of tomato to saline irrigation in long-term salinized soils[J]. European Journal of Agronomy, 2004, 21: 149 - 159.
- [6] TEDESCHI A, LAVINI A, RICCARDI M, et al. Melon crops (*Cucumis melo* L., cv. Tendral) grown in a Mediterranean environment under saline - sodic

- [3] JURENKA R. Insect pheromone biosynthesis[J]. Chemistry of Pheromones and Other Semiochemicals 1, 2004, 239: 97 - 131.
- [4] RAFAELI A. Mechanisms involved in the control of pheromone production in female moths: Recent developments[J]. Entomologia Experimentalis Et Applicata, 2005, 115(1): 7 - 15.
- [5] TILLMAN J A, SEYBOLD S J, JURENKA R A, et al. Insect pheromones—An overview of biosynthesis and endocrine regulation[J]. Insect Biochemistry And Molecular Biology, 1999, 29(6): 481 - 514.
- [6] VOGEL H, HEIDEL A J, HECKEL D G, et al. Transcriptome analysis of the sex pheromone gland of the noctuid moth *Heliothis virescens*[J]. BMC Genomics, 2010, 11(2): 206 - 213.
- [7] 龚莹, 彭少丹, 汪莺, 等. 乙酰辅酶 A 羧化酶的结构·功能及基因的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(35): 19893 - 19896.
- [8] 倪郁, 郭彦军. 植物超长链脂肪酸及角质层蜡质生物合成相关酶基因研究现状[J]. 遗传, 2008, 30(5): 561 - 567.
- [9] 许松伟, 姜忠义, 吴洪. 醇脱氢酶结构和作用机理研究进展[J]. 有机化学, 2005, 25(6): 629 - 633.
- [10] 滕霞, 孙曼弄. 羧酸酯酶研究进展[J]. 生命科学, 2003, 15(1): 31 - 35.

- conditions; part I. Yeild quality[J]. Agricultural Water Management, 2011, 98: 1392 - 1338.
- [7] ROMERO-ARANDA R, SORIA T, CUARTERO J. Tomato plant-water uptake and plant - water relationships under saline growth conditions[J]. Plant Science, 2001, 160(2): 265 - 272.
- [8] MASS E V, POSS J A. Salt sensitivity of wheat at various growth stages[J]. Irrigation Science, 1989, 10: 29 - 40.
- [9] DEL AMOR F M, MARTINEZ V, CERDA A. Salt tolerance of tomato plants at affected by stage of plant development[J]. Horticulture Sciences, 2001, 36: 1260 - 1263.
- [10] WAN S Q, KANG Y H, WANG D, et al. Effect of drip irrigation with saline water on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) yield and water use in semi-humid area[J]. Agricultural Water Management, 2007, 90: 63 - 74.
- [11] 巴音达拉. (覆膜)滴灌技术的应用及其对土壤盐盐运移、根系分布的影响研究[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(29): 11787 - 11791.
- [12] 郭小芹, 刘明春, 曾婷, 等. 气候变化下石羊河流域水资源特征分析[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(5): 1385 - 1387, 1426.
- [13] FENG Q, WEI L, SU Y Z, et al. Distribution and evolution of water chemistry in Heihe River Basin[J]. Environmental Geology, 2005, 45: 947 - 956.
- [14] 尤全刚, 薛娟, 黄翠华. 地下水深埋区咸水灌溉对土壤盐渍化的影响的初步研究——以民勤绿洲为例[J]. 中国沙漠, 2011, 31(2): 302 - 308.
- [15] HUANG C H, ZONG L, BUONANNO M, et al. Impact of saline water irrigation on yield and quality of melon (*Cucumis melo* cv. Huanghemi) in northwest China[J]. European Journal of Agronomy, 2012, 43: 68 - 76.
- [16] KAMAN H, KIRDA C, CETIN M, et al. Salt accumulation in the root zones of tomato and cotton irrigated with partial root - drying technique[J]. Irrigation and Drainage, 2006, 55: 533 - 544.
- [17] RHOADES J D. Salinity: electrical conductivity and total dissolved solids[M]. In: Spark DL (ed) Methods of Soil Analysis. 1996.
- [18] BRENT C, SAUER T, SCOTTER D. Redistribution of water and solute following infiltration from a surface drip source[J]. Water Resource Research, 1991, 27: 2091 - 2097.
- [19] CUARTERO J, FERNANDEZ-MUNOZ R. Tomato and salinity[J]. Scientia Horticulturae, 1998, 78: 83 - 125.
- [20] KATERJI N, VAN HOORN J W, HAMDY A, et al. Salinity effect on crop development and yield, analysis of salt tolerance according to several classification methods[J]. Agricultural Water Management, 2003, 62: 37 - 66.
- [21] BUSTAN A, COHEN S, DE MALACH Y, et al. Effects of timing and duration of brackish irrigation water on fruit yield and quality of late summer melons[J]. Agricultural Water Management, 2005, 74: 123 - 134.
- [22] MAGAN J J, GALLARDO M, THOMPSON R B, et al. Effects of salinity on fruit yield and quality of tomato grown in soil - less culture in greenhouses in Mediterranean climatic conditions[J]. Agricultural Water Management, 2008, 95: 1041 - 1055.