

不同温度影响下绿盲蝽丝氨酸蛋白酶基因 *AISP3* 的表达谱分析

盛洋^{1,2}, 孙洋², 柏立新^{2*}, 肖留斌², 谭永安²

(1. 南京农业大学植物保护学院, 南京 210095; 2. 江苏省农业科学院植物保护研究所, 南京 210014)

摘要: 利用荧光定量 PCR 技术, 系统分析了不同温度处理下绿盲蝽成、若虫丝氨酸蛋白酶基因 *AISP3* 的表达谱。结果表明: 在 24 °C 下, 若虫各虫龄 *AISP3* 表达量差异未达到显著水平 ($P > 0.05$), 而雌虫交配前期与雄虫交配后期的 *AISP3* 表达量分别达 1 龄若虫对照的 19.71 倍与 7.16 倍, 显著高于其他时期。但在 21~30 °C 内, 4~5 龄若虫 *AISP3* 的表达量随温度升高而上升, 2~5 龄若虫在 30 °C 时 *AISP3* 的表达量均达最高; 不同温度处理下, 刚羽化、交配前的雌、雄成虫的 *AISP3* 的表达量较 24 °C 对照均显著升高 ($P < 0.01$); 而交配后的雌、雄成虫的表达量却是 18 °C 下显著高于其他温度处理。此外, 极端温度 4 °C 与 40 °C 诱导后, 雌、雄成虫 *AISP3* 的表达量均显著高于 24 °C。绿盲蝽 *AISP3* 的表达谱综合分析表明, 外在环境温度与绿盲蝽虫龄与性别因素均可显著影响绿盲蝽 *AISP3* 的表达量 ($P < 0.01$), 并存在一定的互作效应。由此可见, *AISP3* 对于绿盲蝽雌成虫早期获取寄主营养具有重要作用, 并且温度是影响 *AISP3* 表达的一个很重要的因素。

关键词: 绿盲蝽; 丝氨酸蛋白酶; 表达谱分析; 温度

中图分类号: S435.622 文献标志码: A

文章编号: 1002-7807(2013)06-0541-08

Expression Patterns of the Serine Protease Gene *AISP3* in *Apolygus lucorum* (Hemiptera: Miridae) at Different Temperatures

SHENG Yang^{1,2}, SUN Yang², BAI Li-xin^{2*}, XIAO Liu-bin², TAN Yong-an²

(1. College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: As an important digestive enzyme gene, the serine protease gene *AISP3* plays a key role in *Apolygus lucorum* for digesting conventional cotton. To understand the effect of different temperatures on the expression level of *AISP3*, we analyzed the expression patterns of *AISP3* in *A. lucorum* reared at different temperatures using real-time polymerase chain reaction. The results showed that at the normal temperature of 24 °C, the expression of *AISP3* in *A. lucorum* at different nymphal stages was similar. The expressions of *AISP3* in the female adult at the pre-mating stage and the male adult at post-mating stage were 19.71- and 7.16-fold higher than their control at the 1st nymphal stage, respectively, which were significantly higher than at any other stages. However, expression in the 4th to 5th *A. lucorum* at the nymphal stage increased with rising temperature in the range of 21~30 °C. At 30 °C, the expression of *AISP3* in the 2nd to 5th *A. lucorum* was the highest. The expression levels of *AISP3* in adult *A. lucorum* reared at different temperatures during the new emergence and pre-mating stages were significantly higher than that of the control reared at 24 °C ($P < 0.01$), while the expression during the post-mating stage at 18 °C was higher than that at other temperatures. When incubated at extreme temperatures (4 °C and 40 °C), the expression of *AISP3* in female and male adult *A. lucorum* was significantly higher than that at 24 °C ($P < 0.01$). Taken together, our results showed that the external environment temperature and the internal stage of *A. lucorum* or its sex all had significant effects on the expression of *AISP3* in *A. lucorum* ($P < 0.01$), and that there was some interactions between them. Therefore, *AISP3* is very important for the female adult *A. lucorum* to obtain nutrition at the early stages and temperature is an important limiting factor for the expression of *AISP3*.

Keywords: *Apolygus lucorum*; serine protease; expression pattern analysis; temperature

收稿日期: 2013-04-28 作者简介: 盛洋(1989-), 女, 硕士研究生, 2011102068@njau.edu.cn; * 通讯作者, jaasblx@jaas.ac.cn
基金项目: 江苏省自然科学基金青年基金项目 (BK20130717); 植物病虫害生物学国家重点实验室开放基金 (SKL2012OP03); 财政部公益性行业专项(201103012); 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-18-16)

绿盲蝽(*Apolygus lucorum*)属半翅目盲蝽科,为多食性昆虫,寄主十分广泛。除为害棉花外,还为害苜蓿、绿豆、蚕豆、茼蒿、冬枣、葡萄等植物^[1]。在棉田,绿盲蝽以成、若虫刺吸方式危害棉株幼嫩部位汁液,造成破头破叶,蕾铃脱落,从而造成棉花减产。近年来,随着 Bt 棉的大面积种植,棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)等棉田主要鳞翅目靶标害虫的危害得到了有效的控制,棉田防治鳞翅目兼治盲蝽的化学农药使用量大幅度减少,导致了棉田害虫的生态位发生了一系列的演替。因此,以绿盲蝽为主的盲蝽科害虫,种群数量急剧上升,危害加重,成为我国包括 Bt 棉田在内的多种作物上的重要致灾因子^[2-5]。生产上和学术上均迫切需要探明绿盲蝽的暴发成灾机制与监测防控新技术。

近年来,生态因子对绿盲蝽在生长发育方面的作用已有相关报道,其中环境温度的高低是影响其生长发育、繁殖的一个重要因子^[6]。生命活动过程中,昆虫需要一定的能量基础,其新陈代谢速度通常随着环境温度的升高而加快。昆虫的生长发育、繁殖、行为习性等生命活动与温度具有密切的关系^[7]。研究表明,在一定适宜的温度范围内,随着温度的升高,绿盲蝽发育速率加快,整个世代所经历的时间缩短。其若虫期、成虫的产卵前期、产卵期以及寿命也随着温度的升高而缩短^[8]。因此,当田间温度适宜,食物充足时,绿盲蝽极易暴发成灾。

除温度直接影响绿盲蝽的生长发育速度,营养的吸收也是生长发育的必要基础。不同温度下,昆虫取食量存在很大差异,其生长发育速率也不一致^[9],进而形成其消化酶基因表达的差异。昆虫消化酶可分为蛋白酶类、淀粉酶类、海藻糖酶类和转化酶类等^[10-12],其活力的高低直接影响着对营养物质的消化利用程度。昆虫摄取食物中营养物质,完成其体内复杂的生长发育过程与其消化系统中蛋白酶、淀粉酶等消化酶消化吸收寄主的营养物质是密切关联的。盲蝽科昆虫的蛋白酶不仅参与其对摄食的营养物质的消化代谢,还与其特殊的口外消化过程有关,如可以帮助其突破植物表皮的防御作用,所以对其进行的研究受到了国内外的高度重视^[13-14]。其中丝氨酸蛋白酶

(AISP3) 是许多昆虫中比较普遍的一种蛋白酶,也是包括绿盲蝽在内的盲蝽科害虫体内重要的消化酶^[15-16]。

孙洋等研究表明,AISP3 是绿盲蝽成虫取食常规棉后的重要消化酶基因,并对雌成虫适应取食 Bt 棉具有重要作用^[17]。显然,温度不仅影响绿盲蝽的生长发育,同时也是影响酶反应速度的重要因素之一。绿盲蝽在不同温度下取食寄主植物后,其体内消化酶活性不同,消化酶基因的表达量也存在差异^[18-22]。然而,不同温度与绿盲蝽消化酶基因表达谱间的关系方面的研究尚未见报道。因此,本研究利用荧光定量 PCR (Polymerase chain reaction) 技术,系统研究不同温度影响下 AISP3 的表达趋势,为明确环境温度与绿盲蝽取食消化间的关系提供研究基础。

1 材料和方法

1.1 供试虫源

初始虫源为早春采自江苏大丰及东台蚕豆田的绿盲蝽,在室内用四季豆(*Phaseolus vulgaris* L.)豆荚继代饲养,饲养条件为温度(25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 $70\% \pm 5\%$,光周期 12L:12D,成虫期补充 10% 蜂蜜水。

1.2 绿盲蝽饲喂处理的设置

1.2.1 24 $^{\circ}\text{C}$ 下饲喂绿盲蝽不同虫龄处理的设置。将同一批绿盲蝽的卵置放于温度为 24 $^{\circ}\text{C}$ 的光照培养箱中,待卵孵化后按若虫与成虫设置不同虫龄(日龄)处理。若虫虫龄:均分别选择 1~5 龄若虫,每个虫龄取 5 头,重复 5 次,即每种温度处理分别取同一虫龄若虫共 25 头。成虫期:分别选择刚羽化(1 日龄成虫)、交配前(5 日龄成虫)、交配后(11 日龄成虫)3 个日龄的雌、雄虫,每个日龄各取 5 头,重复 5 次。即每个处理分别取同一日龄雌、雄成虫 25 头。

1.2.2 绿盲蝽虫龄与环境温度两因素处理的设置。利用光照培养箱设置温度梯度如下:18 $^{\circ}\text{C}$ 、21 $^{\circ}\text{C}$ 、24 $^{\circ}\text{C}$ 、27 $^{\circ}\text{C}$ 、30 $^{\circ}\text{C}$ 、33 $^{\circ}\text{C}$ 。将同一批绿盲蝽的卵分别放入其中。

分别对绿盲蝽若虫与成虫依据其发育进程设置上述 6 个不同温度梯度与不同虫(日)龄的两因素组合处理。将绿盲蝽卵放入 6 个温度处理

下进行孵化以及饲养。每天上午 10:00 调查虫(日)龄,待观察到所需虫(日)龄的绿盲蝽后,下午 4:00 取虫。若虫期:每个温度处理下,均分别选择 1~5 龄若虫,每个虫龄取 5 头,重复 5 次,即每种温度处理供试同一虫龄若虫共 25 头。成虫期:雌、雄虫各一头配对饲养。每个温度处理下,均分别选择刚羽化(1 日龄成虫)、交配前(5 日龄成虫)、交配后(11 日龄成虫)3 个时期的雌、雄虫,每个处理 5 头,重复 5 次,即每个温度处理供试同一日龄雌、雄成虫均为 25 头。

1.2.3 绿盲蝽成虫极端温度单因素处理的设置。选择羽化后 2 d 的成虫进行 4 °C 和 40 °C 的极端温度处理 1 h,每个温度处理均选择雌雄成虫各 5 头,重复 5 次,即每个温度处理供试雌、雄成虫各 25 头。

1.2.4 其他饲养条件与样本收集保存条件。上述绿盲蝽不同饲养处理试验均设置在相对湿度 70%±5%,光周期 12L:12D 的光照培养箱中。每隔 2 d 换一次四季豆,成虫期补充 10% 蜂蜜水。不同温度处理后的绿盲蝽不同虫龄若虫与雌雄成虫样本分别用 1.5 mL 离心管收集,液氮迅速冷却,-70 °C 保存供测定用。

1.3 绿盲蝽不同处理的样本总 RNA 的提取与反转录

将上面不同试验处理下收集的绿盲蝽 5 头为一组,分别放入研钵后,液氮研磨,TRIzol 法(Invitrogen, SanDiego)提取总 RNA^[23]。

反转录使用 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time)试剂盒,模板使用上面提取的总 RNA,所有操作均按试剂盒说明书进行,反转录后的 cDNA 加入 PCR 水稀释于 -20 °C 保存备用。

1.4 荧光定量 PCR 引物的合成与扩增效率的检测

本研究所用的 AISP3 引物(退火温度均在 50~60 °C)依据 cDNA 文库所得到的基因序列设计,并以绿盲蝽持家基因 β -actin 为内标基因(GenBank 登录号为:JN616391),引物设计运用 Primer 5.0 软件由生工生物工程上海合成部合成,引物序列见表 1。

表 1 荧光定量 PCR 反应的引物序列

Table 1 Oligonucleotide primers designed for Real-time PCR reaction

基因 Gene	引物序列(5'-3') Primer sequence
AISP3	F: GTCGTTGCGTCTTGTTTAT R: TGAAAGGCGGTGAGAAT
β -actin	F: ACCTGTACGCCAACACCGT R: TGGAGAGAGAGCGGAGGAT

取不同温度处理下的绿盲蝽 cDNA 模板,测定浓度并稀释成 100, 10, 1, 0.1 和 0.01 ng· μ L⁻¹。分别利用以上 2 对引物进行扩增,每个浓度 5 次重复。利用公式 $E = 10^{-1/\text{Slope}}$ (E 为扩增效率, Slope 为 5 个浓度平均 C_T 值所构成直线的斜率值)计算引物的扩增效率,比较待测丝氨酸蛋白酶基因 AISP3 与内标基因 β -actin 扩增效率的数值,确定本研究所用的荧光定量 PCR 引物均达到要求。

1.5 荧光定量 PCR 反应

荧光定量 PCR 试验所用试剂采用 SYBR Premix Ex Taq Kit (TaKaRa, Tokyo, Japan), 仪器为 iCycler iQ (Bio-Rad), 分析软件为 Version 3.0a (Bio-Rad)。荧光定量 PCR 反应以 RNase-free 水 (TaKaRa, Tokyo, Japan) 为阴性对照,起始 cDNA 浓度为 40 ng· μ L⁻¹,取 2 μ L,每个样品 5 次重复,反应条件为 3 步法,循环数 40 个。

1.6 数据统计与分析

标准样品的荧光定量 PCR 扩增曲线由定量 PCR 仪自动生成,绿盲蝽不同温度处理后各基因的相对表达量变化以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算^[24]。绿盲蝽不同温度处理后, AISP3 相对表达量的差异显著性分析采用统计软件 DPS V8.01,并采用 LSD 测验法进行多重比较。测定环境温度与绿盲蝽各虫龄 AISP3 相对表达量之间的相关性,并对测定数据采用温度与虫龄或性别的两因素方差分析法解析各因素对测定结果的贡献大小及两者互作的程度。

2 结果与分析

2.1 24 °C 处理下绿盲蝽各龄虫 AISP3 表达谱分析

内标基因 β -actin 经过检测可以用来进行荧

光定量 PCR 反应。适宜温度(24 °C)下,绿盲蝽不同生长期 *AISP3* 表达谱分析表明,若虫各虫龄表达量虽有差异,但未达到显著水平($P > 0.05$)。雌成虫交配前期 *AISP3* 的表达量最高,达到对照(1 龄若虫)的 19.71 倍,显著高于其他各期 ($P <$

0.01),而交配后其 *AISP3* 的表达量降低,显著低于其他日龄成虫($P < 0.05$)。雄虫刚羽化、交配前、交配后期 *AISP3* 的表达量逐渐上升,并达到显著水平 ($P < 0.01$),交配后达到对照(1 龄若虫)的 7.16 倍(表 2)。

表 2 24 °C 条件下绿盲蝽各阶段 *AISP3* 的相对表达量

Table 2 Relative expression levels of *AISP3* from *Apolygus lucorum* of different stages at 24 °C

阶段 Stage		<i>AISP3</i> 的相对表达量 Relative expression levels of <i>AISP3</i>
若虫 Nymph	1 龄 1 st instar	1.00 ± 0.00eF
	2 龄 2 nd instar	1.09 ± 0.05deE
	3 龄 3 rd instar	0.97 ± 0.10eE
	4 龄 4 th instar	0.82 ± 0.07efE
	5 龄 5 th instar	0.55 ± 0.03efE
雌成虫 Female adult	1 日龄刚羽化雌虫 New emergence (1-day-age female)	0.93 ± 0.05eE
	5 日龄交配前雌虫 Pre-mating (5-day-age female)	19.71 ± 1.38aA
	11 日龄交配后雌虫 Post-mating (11-day-age female)	0.23 ± 0.01fE
雄成虫 Male adult	1 日龄刚羽化雄虫 New emergence (1-day-age male)	1.88 ± 0.09dD
	5 日龄交配前雄虫 Pre-mating (5-day-age male)	3.03 ± 0.16cC
	11 日龄交配后雄虫 Post-mating (11-day-age male)	7.16 ± 0.25bB

注:同列数值后标注不同小写、大写字母分别表示在 0.05 和 0.01 水平上差异显著。

Note: Values followed by different small and capital letters mean significantly different at 0.05 and 0.01 levels, respectively.

2.2 不同温度与虫龄组合处理下绿盲蝽若虫 *AISP3* 表达谱分析

测定结果表明,绿盲蝽若虫 *AISP3* 的表达量受虫龄与环境温度的双重影响。从不同虫龄角度看,1 龄若虫不同温度处理后的 *AISP3* 表达量均较低,其中 24 °C 处理极显著高于其他温度处理($P < 0.01$)。而 2~5 龄若虫在 30 °C 时的 *AISP3* 表达量最高,均达到 24 °C 对照的 10 倍以上,最高达 20 倍以上,极显著高于其他温度处理($P < 0.01$);当温度升高到 33 °C 时,3~5 龄若虫 *AISP3* 表达量较 30 °C 时极显著下降($P < 0.01$),但仍处于较高水平,并极显著高于其他温度处理($P < 0.01$)。从温度变化的角度看,随着温度的升高(21~30 °C),绿盲蝽 4~5 龄若虫 *AISP3* 的表达量逐渐上升,而 1~3 龄若虫则呈现一种不规则的形式(表 3)。不同温度与各若虫龄测定值间相关分析表明,随着虫龄的增加, r 值呈增大趋势,说明随虫龄的增加温度高低对 *AISP3* 表达量影响越来越大。其

中,温度对 3 龄若虫的影响达到了显著水平($P < 0.05$),对 4~5 龄若虫的影响达到了极显著水平($P < 0.01$)。不同温度与所有若虫虫龄测定值间复相关分析也显示温度与绿盲蝽不同虫龄 *AISP3* 表达量的总体相关性较大($R = 0.99$),且影响是显著的($P < 0.05$)。

2.3 不同温度与日龄组合处理下绿盲蝽成虫 *AISP3* 表达谱分析

由表 4 可看出,不同温度处理的绿盲蝽雌、雄成虫在刚羽化(1 日龄成虫)、交配前(5 日龄成虫)、交配后(11 日龄成虫)3 个重要时期,*AISP3* 的相对表达水平较 24 °C 对照处理均表现出显著差异。其中刚羽化与交配前的雌雄成虫及交配后的雄成虫的 *AISP3* 的相对表达水平显著升高 1.7~7.0 倍($P < 0.01$)。交配后的雌成虫的 *AISP3* 的相对表达水平也仅在 21 °C、33 °C 时略有下降,其余也显著升高 1.49~4.76 倍($P < 0.01$)。不同温度与各成虫日龄测定值间的相关分析表明,雌成

虫在刚羽化时的 AISP3 的表达水平与温度变化的相关性较小($r = 0.26$),在交配前与交配后的 AISP3 的表达水平与温度变化的相关性增大 ($r \geq 0.5$);而雄成虫则相反,在刚羽化时的 AISP3 的表达水平与温度变化的相关性较高($r = 0.82$),在交配前与交配后的 AISP3 的表达水平与温度变化的

相关性较低 ($r \leq 0.38$),但均未达到显著水平 ($P > 0.05$)。不同温度与雌雄成虫各日龄测定值间的复相关分析结果表明:温度与绿盲蝽成虫不同日龄 AISP3 表达量的总体相关性较高($R \geq 0.89$)。由此可见,温度高低可影响绿盲蝽成虫的 AISP3 的表达量,但影响作用的大小与成虫性别、龄期均有一定关系。

表 3 不同温度下绿盲蝽若虫各虫龄 AISP3 的相对表达量

Table 3 Relative expression levels of AISP3 from *Apolygus lucorum* nymph at different temperatures

温度 Temperature / $^{\circ}$ C	若虫龄期 Nymph stage				
	1 龄若虫 1 st instar	2 龄若虫 2 nd instar	3 龄若虫 3 rd instar	4 龄若虫 4 th instar	5 龄若虫 5 th instar
18	0.25 \pm 0.02C	0.35 \pm 0.05C	1.78 \pm 0.19C	2.16 \pm 0.25C	2.46 \pm 0.33C
21	0.23 \pm 0.03C	1.72 \pm 0.22B	0.52 \pm 0.06DE	0.59 \pm 0.06D	0.62 \pm 0.07D
24	1.00 \pm 0.00A	1.00 \pm 0.00BC	1.00 \pm 0.00D	1.00 \pm 0.00D	1.00 \pm 0.00CD
27	0.10 \pm 0.01E	0.39 \pm 0.03C	0.30 \pm 0.02E	2.98 \pm 0.16C	1.69 \pm 0.17CD
30	0.34 \pm 0.03B	10.14 \pm 1.06A	12.30 \pm 0.74A	15.04 \pm 1.39A	21.14 \pm 1.21A
33	0.17 \pm 0.01D	1.11 \pm 0.08BC	2.95 \pm 0.32B	10.40 \pm 0.59B	15.34 \pm 1.59B
相关系数 r	0.16	0.40	0.47*	0.78**	0.76**
复相关系数 R			0.99*		

注:同列数值后标注不同大写字母表示达差异极显著水平;**与*分别表示 1%、5%显著性。

Note: Values followed by different capital letters in the same column represent extremely significant difference ($P < 0.01$);

** and * represent extremely significant difference ($P < 0.01$) and significant difference ($P < 0.05$), respectively.

表 4 不同温度下绿盲蝽成虫各日龄 AISP3 的相对表达量

Table 4 Relative expression levels of AISP3 from *Apolygus lucorum* adults at different temperatures

温度 Temperature / $^{\circ}$ C	雌成虫日龄 Female adult stage			雄成虫日龄 Male adult stage		
	刚羽化 (1 日龄成虫) New emergence (1-day-age)	交配前 (5 日龄成虫) Pre-mating (5-day-age)	交配后 (11 日龄成虫) Post-mating (11-day-age)	刚羽化 (1 日龄成虫) New emergence (1-day-age)	交配前 (5 日龄成虫) Pre-mating (5-day-age)	交配后 (11 日龄成虫) Post-mating (11-day-age)
18	6.19 \pm 0.85AB	1.83 \pm 0.26D	4.76 \pm 0.24A	1.71 \pm 0.11D	6.45 \pm 0.40AB	3.85 \pm 0.38A
21	5.26 \pm 0.47B	2.68 \pm 0.40C	0.99 \pm 0.03D	2.87 \pm 0.29C	5.60 \pm 0.70C	2.17 \pm 0.19C
24	1.00 \pm 0.00C	1.00 \pm 0.00E	1.00 \pm 0.00D	1.00 \pm 0.00E	1.00 \pm 0.00D	1.00 \pm 0.00E
27	6.06 \pm 0.38AB	3.26 \pm 0.34B	1.49 \pm 0.04C	3.90 \pm 0.24B	5.81 \pm 0.39BC	2.40 \pm 0.16C
30	6.99 \pm 0.41A	4.04 \pm 0.22A	2.56 \pm 0.16B	4.15 \pm 0.44B	6.86 \pm 0.23A	2.86 \pm 0.16B
33	6.29 \pm 0.56A	3.42 \pm 0.34B	0.86 \pm 0.11D	5.25 \pm 0.39A	6.48 \pm 0.55AB	1.78 \pm 0.17D
相关系数 r	0.26	0.68	0.50	0.82	0.21	0.38
复相关系数 R		0.98			0.89	

注:同列数值后标注不同大写字母表示达差异极显著水平;**与*分别表示 1%、5%显著性。

Note: Values followed by different capital letters in the same column represent extremely significant difference ($P < 0.01$);

** and * represent extremely significant difference ($P < 0.01$) and significant difference ($P < 0.05$), respectively.

2.4 不同温度、不同生长发育阶段对绿盲蝽 *AISP3* 表达谱影响的两因素差异显著性分析

综上所述,绿盲蝽若虫与雌雄成虫体内 *AISP3* 的表达量与其所处阶段与环境温度这两个因素密切相关,同时二者互作也存在差异。因此,对上述不同组合处理的测定数据采取两因素方差分析,以明确各因素对测定结果的贡献大小及二者互作的程度。由表 5 可见,温度和阶段这两个因素对若虫以及雌雄成虫的 *AISP3* 的表达量均能产生极显著的影响($P < 0.01$)。但在若虫期,环境温度的外在影响要大于自身虫龄的内在影响。在成虫期,其所处日龄的内在影响要大于环境温度的外在影响。就成虫性别而言,雄成虫的 *AISP3* 的表达量受生理时期的影响较雌成虫大。外在环境温度和内在自身阶段的互作对绿盲蝽若虫与雌雄成虫体内 *AISP3* 的表达量也均产生极显著的影响($P < 0.01$)。若虫期环境温度的外在影响与自身虫龄的内在影响所形成的互作要高于成虫期的。而环境温度的外在影响与自身虫龄的内在影响所形成的互作在雌雄成虫不同性别间差异不大。

表 5 不同温度及生长发育阶段下绿盲蝽 *AISP3* 表达量两因素方差分析表(固定模型)

Table 5 Two-way ANOVA table of *AISP3* expression at different temperatures and stages (fixed model)

变异来源 Variance of source	F		
	若虫 Nymph	雌成虫 Female adult	雄成虫 Male adult
温度 Temperature	1790.02**	325.35**	269.46**
生长发育阶段 Stage	733.96**	1239.55**	1451.75**
温度×生长发育阶段 Temperature×Stage	231.07**	107.72**	104.51**

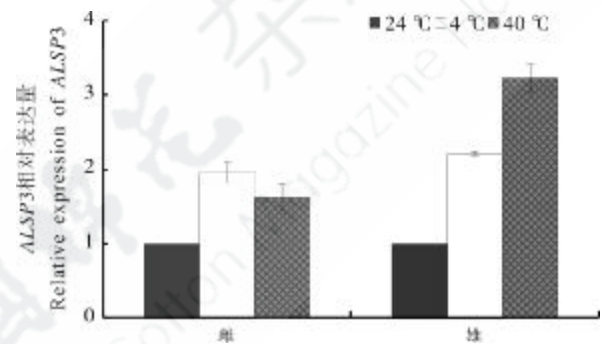
注:**表示差异达到极显著水平。

Note: ** represent extremely significant difference ($P < 0.01$).

2.5 极端温度处理下绿盲蝽成虫 *AISP3* 表达谱分析

以 24 °C 处理作对照,经过极端温度(4 °C 和 40 °C)处理后的 *AISP3* 表达量都极显著上升($P < 0.01$),但是雌、雄成虫 *AISP3* 的增长幅度存在明显差异。其中,经过 4 °C 处理的雌虫的 *AISP3* 表达量极显著高于经过 40 °C 处理的表达量 ($P <$

0.01); 而经过 40 °C 处理的雄虫的 *AISP3* 表达量极显著高于经过 4 °C 处理的表达量($P < 0.01$)。极限温度与成虫性别两因素方差分析结果表明,极限温度可显著影响绿盲蝽成虫 *AISP3* 的表达量 ($F = 355.77, P < 0.01$),这与前述不同温度、不同日龄对绿盲蝽 *AISP3* 表达谱影响的两因素差异显著性分析中所得到的温度因素对雌雄成虫的 *AISP3* 的表达量均能产生极显著影响的结论是一致的;此外,成虫性别也可造成绿盲蝽成虫 *AISP3* 的表达量差异 ($F = 184.76, P < 0.01$)。极限温度与成虫性别所产生的互作也极显著($F = 118.89, P < 0.01$)。



注:不同大写字母表示差异极显著水平。

Note: Different capital letters represent extremely significant difference ($P < 0.01$).

图 1 极端温度下绿盲蝽成虫 *AISP3* 的相对表达量
Fig. 1 Relative expression levels of *AISP3* from adult *Apolygus lucorum* at extreme temperatures

3 讨论

昆虫的生长发育速度受很多因素影响^[25-26],其中温度是最重要的因素之一。在 10~30 °C 范围内,绿盲蝽卵和若虫的发育速率随着温度的上升而逐渐加快^[27-28],并且发育历期缩短。本研究表明,绿盲蝽 4~5 龄若虫在 21~30 °C 范围内随温度的升高,其 *AISP3* 的表达量逐渐升高。当温度升高到 33 °C 时,绿盲蝽若虫 *AISP3* 的表达量较 30 °C 时显著降低($P < 0.01$),且若虫死亡率已达到 50% 以上。在适宜的温度范围内,温度越高,绿盲蝽生长发育越快,新陈代谢加快,取食量随之增加。在这种情况下,绿盲蝽可能需要较高表达量的消化酶,加强其对取食寄主营养的消化吸收能力来满足快速生长的需要,从而导致 *AISP3* 表达量随温度升高逐渐增高的现象。当超过了最适温度,其取食量降低,故 *AISP3* 表达量也呈下降趋

势。相比4~5龄若虫,1~3龄若虫 AISP3 的表达量并无明显规律性,这可能是由于绿盲蝽若虫龄期随虫龄的增加而增加,而1~3龄若虫龄期相对较短^[6],故其 AISP3 的表达量呈现出紊乱的现象。

不同温度环境条件下,绿盲蝽雌虫在刚羽化时、雄虫在交配前期, AISP3 的表达量上升倍数最高。究其原因,这2个时期可能分别是雌、雄虫能量积累的最关键时期,成虫为了达到性成熟大量取食,为性细胞的发育提供不可缺少的成虫期营养^[29],以用来进行交配和产卵。雌、雄虫能量积累出现在不同时期,有可能与雌雄虫在交配过程中发挥的不同作用有关。18℃饲养条件下,绿盲蝽雌、雄虫交配后期 AISP3 的表达趋势相似,均显著高于其他温度。这可能由于18℃下的绿盲蝽的寿命、产卵期最长,需要持续维持营养,需要 AISP3 的高表达量以保持取食消化能力。

在24℃适温饲养条件下,对绿盲蝽的各个时期 AISP3 表达谱进行了分析。结果表明1~5龄若虫表达量差异不显著($P > 0.05$)。交配前期的雌成虫表达量显著高于其他生理时期,暗示绿盲蝽雌虫在交配前急需获取大量营养来完成生殖交配和产卵。相关研究也表明,昆虫在交配期间的行为与活动如配偶的搜寻、交配选择以及性信息素的传递等都需要花费大量的能量^[29]。进一步说明交配前期可能是雌成虫能量积累的关键时期。而交配后雌成虫表达量显著降低。这可能与昆虫在交配行为中,雄虫能提供大量的营养性婚食以诱雌虫交配有关;雌虫也可通过交配获取更多的营养物质^[30],从而取食量降低。相比于雌虫,雄虫从刚羽化到交配后 AISP3 的表达量逐渐上升,这可能是雄虫通过增加取食来维持寿命及进一步交配。有研究表明,绿盲蝽雌成虫在繁殖后代中担负着为后代寻找合适的生存条件的任务,而雄成虫则不然,是以交配对象作为定位目标^[31]。雌雄虫 AISP3 表达趋势的不一致性,暗示雌雄虫体内消化酶基因在分子调控机制上存在一定的差异。

通常不良环境下,昆虫会通过取食来抵抗环境胁迫。同样绿盲蝽也会通过增加取食量来抵抗非适温的环境。本研究表明,40℃、4℃极端温度诱导后,绿盲蝽雌、雄成虫 AISP3 表达量均比

24℃适温对照处理显著升高($P < 0.01$)。雌虫经4℃诱导的 AISP3 表达量比40℃的高,而雄虫的却相反,这说明雌雄虫在极端环境胁迫下具有不同的应答调控机制,此机制还有待进一步研究。

以上研究表明,昆虫体内生理代谢是一个复杂多变的过程,既受外界环境条件影响,也受自身内在生理条件的调节。外界温度变化与绿盲蝽体内消化酶的应答、调控具有重要联系,它们均是影响 AISP3 表达的重要限制因素。本研究的结果不仅对于了解田间不同温度下绿盲蝽的生长发育速率与成灾原因具有重要意义,还有助于进一步探讨绿盲蝽的生理代谢机理与综合防控提供理论研究基础。

参考文献:

- [1] 陆宴辉,吴孔明.我国棉花盲蝽生物学特性的研究进展[J].应用昆虫学报,2012,49(3):578-584.
LU Yan-hui, Wu Kong-ming. Advances in research on cotton mirid bugs in China[J]. Chinese Journal of Applied Entomology, 2012, 49(3): 578-584.
- [2] LU Yan-hui, Wu Kong-ming, Jiang Yu-ying, et al. Mirid bug outbreaks in multiple crops correlated with wide-scale adoption of Bt cotton in China[J]. Science, 2010(328): 1151-1154.
- [3] LU Y H, Wu K M, Wyckhuys K A G, et al. Overwintering hosts of *Apolygus lucorum* (Hemiptera: Miridae) in northern China[J]. Crop Protection, 2010(29): 1026-1033.
- [4] WU K M, Li W, Feng H Q, et al. Seasonal abundance of the mirids, *Lygus lucorum* and *Adelphocoris* spp. (Hemiptera: Miridae) on Bt cotton in northern China [J]. Crop Protection, 2002(21): 997-1002.
- [5] WU Kong-ming, Lu Yan-hui, Feng Hong-qiang, et al. Suppression of cotton bollworm in multiple crops in China in areas with Bt toxin-containing cotton[J]. Science, 2008(321): 1676-1678.
- [6] 赵宏霞,谭永安,肖留斌,等.不同温度对绿盲蝽种群生长发育和繁殖的影响[J].应用昆虫学报,2012,49(3):585-590.
ZHAO Hong-xia, Tan Yong-an, Xiao Liu-bin, et al. Effects of different temperatures on the development and reproduction of *Apolygus lucorum* [J]. Chinese Journal of Applied Entomology, 2012, 49(3): 585-590.
- [7] 丁岩钦.昆虫种群数学生态学[M].北京:科学出版社,1994:318.
DING Yan-qin. The mathematical ecology of insect populations [M]. Beijing: Science Press, 1994: 318.
- [8] 门兴元,于毅,张安盛,等.不同温度下绿盲蝽实验种群生命表研究[J].昆虫学报,2008,51(11):1216-1219.
MEN Xing-yuan, Yu Yi, Zhang An-sheng, et al. Life table of the

- laboratory population of *Lygus lucorum* Meyer-Dür (Hemiptera: Miridae) at different temperatures[J]. Acta Entomologica Sinica, 2008, 51(11): 1216-1219.
- [9] 张文军, 庞义, 齐艳红, 等. 斜纹夜蛾生长发育与温度的关系[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 1997, 36(2): 6-9.
ZHANG Wen-jun, Pang-yi, Qi Yan-hong, et al. Relationship between temperature and development of *Spodoptera litura* F.[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 1997, 36(2): 6-9.
- [10] 谭永安, 柏立新, 肖留斌, 等. *Cry1AC* 及 *Cry1AC+CpTI* 基因对棉花上绿盲蝽 2 种消化酶活性及海藻糖含量的影响[J]. 棉花学报, 2011, 23(5): 394-400.
TAN Yong-an, Bai Li-xin, Xiao Liu-bin, et al. Effects of introducing *Cry1AC* and *Cry1AC+CpTI* genes in cotton on two digestive enzymes activities and trehalose content of *Apolygus lucorum*[J]. Cotton Science, 2011, 23(5): 394-400.
- [11] 钦俊德. 昆虫与植物的关系: 论昆虫与植物的相互作用及其演化[M]. 北京: 科学出版社, 1987.
QIN Jun-de. The relationships between insects and plants: insect-plant interactions and coevolution [M]. Beijing: Science Press, 1987.
- [12] FRANCO O L, Rigden D J, Melo F R, et al. Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases: structure, function and potential for crop protection [J]. Eur J Biochem, 2002(269): 397-412.
- [13] COHEN A C. Solid-to-liquid feeding: the inside(s) story of extra-oral digestion in predaceous Arthropoda[J]. American Entomologist, 1998(44): 103-117.
- [14] AGUSTI N, Cohen A C. *Lygus hesperus* and *L. lineolaris* (Hemiptera: Miridae), phytophages, zoophages, or omnivores: evidence of feeding adaptations suggested by the salivary and midgut digestive enzymes[J]. J Entomol Sci, 2000(35): 176-186.
- [15] RYAN C A. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens [J]. Annu Rev Phytopathol, 1990(28): 425-449.
- [16] COLEBATCH G, Cooper P, East P. cDNA cloning of a salivary chymotrypsin-like protease and the identification of six additional cDNAs encoding putative digestive proteases from the green mirid, *Creontiades dilutus* (Hemiptera: Miridae)[J]. Insect Biochem Mol Biol, 2002(32): 1065-1075.
- [17] 孙洋, 柏立新, 张永军, 等. 绿盲蝽丝氨酸蛋白酶基因 *AISP3* 的鉴定及表达谱分析[J]. 江苏农业学报, 2012, 28(5): 991-998.
SUN Yang, Bai Li-xin, Zhang Yong-jun, et al. Identification and expression analysis of serine protease *AISP3* gene in *Apolygus lucorum* (Meyer-Dür)[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Science, 2012, 28(5): 991-998.
- [18] ZENG F, Cohen A C. Comparison of α -amylase and protease activities of a zoophytophagous and two phytozoophagous Hemiptera [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 2000, 126: 101-106.
- [19] AGUSTI N, Cohen A C. *Lygus hesperus* and *L. lineolaris* (Hemiptera: Miridae), phytophages, zoophages, or omnivores: Evidence of feeding adaptations suggested by the salivary and midgut digestive enzymes[J]. Journal of Entomological Science, 2000(35): 176-186.
- [20] WYATT G R. The biochemistry of sugars and polysaccharides in insects[J]. Advances in Insect Physiology, 1967(4): 287-360.
- [21] 聂凌鸿. 海藻糖研究进展[J]. 粮食与油脂, 2002(8): 44-45.
NIE Ling-hong. Progress on the study of trehalose [J]. Cereals and Oils, 2002(8): 44-45.
- [22] 王世贵, 周莹, 冯利苹. 温度和食物种类对红褐斑腿蝗取食、生长及肠道消化酶活性的影响[J]. 植物保护学报, 2008, 35(1): 1-6.
WANG Shi-gui, Zhou Ying, Feng Li-ping. Food consumption, growth and activity of digestive enzymes of *Catantops pinguis* (Stal) fed on different diets under three temperatures [J]. Acta Phytopythologica Sinica, 2008, 35(1): 1-6.
- [23] 孙德权, 郭启高, 胡玉林, 等. 改良 Trizol 法提取香蕉叶片总 RNA[J]. 广东农业科学, 2009(5): 162-164.
SUN De-quan, Guo Qi-gao, Hu Yu-lin, et al. Extraction of total RNA from banana with improved Trizol method[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2009(5): 162-164.
- [24] LIVAK K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method[J]. Method, 2001, 25(4): 402-408.
- [25] CHRISTOPHERS S R. *Aedes aegypti* (L.) the yellow fever mosquito. Its life history [M] // Bionomics and structure. Cambridge: Cambridge University Press, 1960.
- [26] CLEMENTS A N. The biology of mosquitoes[M]. Wallingford, Oxon: CABI Publishing, 1999.
- [27] LU Yan-hui, Wu Kong-ming, Wyckhuys K A G, et al. Comparative study of temperature-dependent life histories of three economically important *Adelphocoris* spp [J]. Physiol Entomol, 2009, 34(4): 318-324.
- [28] LU Yan-hui, Wu Kong-ming, Wyckhuys K A G, et al. Temperature-dependent life history of the green plant bug, *Apolygus lucorum* (Meyer-Dür) (Hemiptera: Miridae)[J]. Appl Entomol Zool, 2010, 45(3): 387-393.
- [29] 孙洪武, 柏立新, 孙以文. 两种寄主作物的生育期对棉铃虫产卵选择的影响[J]. 江苏农业科学, 1999(6): 44-46.
SUN Hong-wu, Bai Li-xin, Sun Yi-wen. Effects of the growth stage of two host plants on the oviposition selection of *Helicoverpa armigera* Hübner [J]. Jiangsu Agriculture Science, 1999(6): 44-46.
- [30] 刘兴平, 彭接辉, 何海敏, 等. 多次交配对昆虫适应性的影响[J]. 江西农业大学学报, 2008, 30(4): 592-597.
LIU Xing-ping, Peng Jie-hui, He Hai-min, et al. The effect of multiple mating on fitness in insects[J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2008, 30(4): 592-597.
- [31] 张立娟, 崔建州, 李继泉, 等. 绿盲蝽对不同处理具花枣枝挥发物的趋性反应[J]. 河北农业大学学报, 2010, 33: 81-84
ZHANG Li-juan, Cui Jian-zhou, Li Ji-quan, et al. Taxis responses of *Lygus lucorum* Meyer-Dür to volatiles of *Ziziphus jujuba* flowering branches with different treatments [J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 2010, 33: 81-84. ●