

# 烟蚜热激蛋白*Hsp90*基因的克隆及在UV-B胁迫下的表达分析

苏丽<sup>1</sup> 孟建玉<sup>2</sup> 朱佳敏<sup>1</sup> 张长禹<sup>1\*</sup>

(1. 贵州大学昆虫研究所, 贵州省山地农业病虫害重点实验室, 贵阳 550025; 2. 贵州省烟草科学研究院, 贵阳 550081)

**摘要:** 为探讨UV-B胁迫对烟蚜*Myzus persicae*热激蛋白*Hsp90*基因表达量的影响,采用RT-PCR与RACE技术克隆了烟蚜热激蛋白*Hsp90*基因的全长,并对其进行生物信息学分析,利用实时荧光定量PCR技术研究了烟蚜*Hsp90*基因在不同时长UV-B胁迫下的表达量变化。结果表明,烟蚜*Hsp90*基因的cDNA全长为2 670 bp,编码728个氨基酸,编码蛋白质的相对分子量为82.6 kD,等电点为4.95,获得的氨基酸序列具有Hsp90蛋白家族的1个签名序列及C末端MEEVD基序,推测其属于胞质型热激蛋白。系统进化树结果显示,烟蚜*Hsp90*与其它昆虫*Hsp90*具有很高的相似性。实时荧光定量PCR结果表明,不同时长UV-B胁迫下烟蚜*Hsp90*均有表达,随着照射时间延长,*Hsp90*表达量表现为先上升后下降的趋势;与对照相比,照射时间为15、30、60、90和120 min时,*Hsp90*表达量均显著升高,且在60 min时*Hsp90*表达量达最大,是对照组的2.05倍。表明*Hsp90*基因在不同时长UV-B胁迫下差异表达,在烟蚜适应紫外胁迫的分子机制中具有重要作用。

**关键词:** 烟蚜; *Hsp90*; 基因克隆; 表达分析

## Cloning and expression of *Hsp90* gene from green peach aphid *Myzus persicae* under UV-B stress

Su Li<sup>1</sup> Meng Jianyu<sup>2</sup> Zhu Jiamin<sup>1</sup> Zhang Changyu<sup>1\*</sup>

(1. Guizhou Provincial Key Laboratory for Agricultural Pest Management in the Mountainous Regions, Institute of Entomology, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou Province, China; 2. Guizhou Research Institute of Tobacco Science, Guiyang 550081, Guizhou Province, China)

**Abstract:** To investigate the influences of UV-B stress on the expression of *Hsp90* gene from green peach aphid *Myzus persicae*, the full-length cDNA of *Hsp90* gene was amplified by the reverse transcription PCR (RT-PCR) and rapid amplification of cDNA ends (RACE) methods. The characteristics of *Hsp90* gene were analyzed by bioinformatic method, and the expression levels of the *M. persicae* *Hsp90* gene under different UV-B treatments were detected by the real-time quantitative PCR. The results showed that the full-length cDNA of *M. persicae* *Hsp90* gene was 2 670 bp, which encoded 728 amino acids, with a molecular weight of 82.6 kD and a theoretical isoelectric point of 4.95. The deduced amino acid sequence of *Hsp90* contained one signature sequence of Hsp90 family and a cytoplasmic character sequence (MEEVD) at C-terminal. Therefore, the *Hsp90* protein of *M. persicae* should belong to cytoplasmic heat shock protein. The phylogenetic tree indicated that the protein sequence shared a high homology with *Hsp90* proteins from other insect species. The results of real-time quantitative PCR analyses showed that *Hsp90* could be induced by UV-B irradiation. The expression of *Hsp90* gene increased firstly and then decreased with increasing treatment time. When the treatment time lasted for

基金项目: 国家自然科学基金(31401754), 贵州省科学技术基金(黔科合J字[2011]2135), 贵州省农业公关项目(黔科合NY字[2012]3007)

\*通信作者 (Author for correspondence), E-mail: zcy1121@aliyun.com

收稿日期: 2017-11-29

15, 30, 60, 90 and 120 min, the expression of *Hsp90* gene were significantly higher than that of the control, reaching a peak at 60 min, which was 2.05 times that of the control. The expression level of *M. persicae* *Hsp90* gene varied at different time points of UV-B stress, and it might play an important role in the response of the pests to UV-B stress.

**Key words:** *Myzus persicae*; *Hsp90*; gene cloning; expression analysis

近年来,随着臭氧层中臭氧的逐渐减少,辐射到地球表面的紫外线越来越强(Xu & Sullivan, 2010)。紫外线可分为UV-A(320~400 nm)、UV-B(280~320 nm)和UV-C(200~280 nm)3个波段,其中对生物圈影响最大的是UV-B(张丽,2013)。UV-B辐射的增强会对生物产生选择压力,给人类健康和生态环境带来多方面的危害(McKenzie et al., 2007)。作为一类重要的光生态因子,UV-B辐射增强还会对昆虫造成环境胁迫,严重影响昆虫的生长发育及种群结构。在UV-B胁迫下,蚜虫生长发育受到抑制,并且辐射时间越长,强度越大,抑制作用越强(周冬等,2014;袁伟宁等,2015)。金花虫科的幼虫在UV辐射增强的条件下会出现死亡率升高、蛹重减少的生物学效应(Bacher & Luder, 2005);张荣刚等(2003)研究发现增强UV-B辐射会降低麦蚜的发生总量和虫害发生概率。

热激蛋白(heat shock protein, Hsp)是细胞或生物体遭受一些不利因子胁迫时所产生的一种具有高度保守性的抗逆蛋白,广泛分布于各种生物体内,对生物的生命活动具有重要意义(Rassow et al., 1995; Zhao & Jones, 2012)。当遇到外界的刺激因子,如高温、低温、紫外线、重金属、细菌或病毒感染、寄生等,生物体内Hsp的表达量会显著增加以增强其抗逆能力(王建义和慈忠玲,2008)。昆虫在长期的进化过程中产生了各种各样的策略来应对环境胁迫,通过调节体内Hsp的表达来渡过不良环境条件是昆虫响应逆境胁迫的重要机制(张青等,2014)。Hsps分为5个类别,分别为Hsp60、Hsp70、Hsp90、Hsp100及小分子量的热激蛋白sHsp(Sørensen et al., 2003)。Hsp90作为分子伴侣,在遇到内外源性应激原的刺激时,能快速反应、保护细胞、抗衡逆境,在昆虫抵抗不良环境方面具有重要作用(Picard, 2002)。Hsp90在昆虫抗逆境中的作用受到广泛关注,在膜翅目、双翅目、鞘翅目、鳞翅目和半翅目等多种昆虫的抗逆机制研究中均有报道(张珂等,2014)。如高温胁迫下甜菜夜蛾*Spodoptera exigua*幼虫体内*Hsp90*基因表达量随温度升高而增加(翟会芳等,2010);在冷刺激条件下,南极贝摇蚊*Belgica antarctica*能够通过

*Hsp90*基因的持续表达来保护低温对幼虫的伤害(Rinehart et al., 2006)。

烟蚜 *Myzus persicae* 别名桃蚜,属半翅目蚜科,是世界性害虫(郭线茹等,1995)。烟蚜能直接刺吸烟草的汁液,导致植株变矮、叶片变褐变脆、易破碎;会分泌蜜露导致煤污病;此外,还可以传播很多烟草病毒病,严重威胁烟草的安全生产(任广伟和张连涛,2002;李军,2005;王亚锋,2014)。烟蚜常年暴露于太阳光下,太阳光中的UV-B一直是其无法摆脱的胁迫因子。而关于烟蚜如何适应UV-B的环境胁迫,其响应UV-B胁迫的分子机制尚不清楚。本研究通过克隆烟蚜 *Hsp90* 基因,分析其序列特征以及在不同时间UV-B辐射下的表达情况,揭示 *Hsp90* 基因在烟蚜响应UV-B胁迫中的作用,探索烟蚜响应UV-B胁迫的分子机制,以期为科学合理、高效地防治烟蚜提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试昆虫:烟蚜采自贵阳市花溪区周边烟田,以烟苗作为寄主植物进行人工饲养,饲养条件为温度25±1℃、相对湿度(70±5)%、光周期L 14 h:D 10 h。

试剂及仪器:Trizol试剂,美国Invitrogen公司;3' RACE、5' RACE、pMD<sup>TM</sup>18-T Vector试剂盒、感受态细胞、RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit、荧光iQ<sup>TM</sup> SYBR<sup>®</sup> Green Supermix、Premix *Taq*<sup>TM</sup> 酶、PCR *Taq* 等,日本TaKaRa公司;胶回收试剂盒,生工生物工程技术(上海)股份有限公司。紫外辐照计,北京师范大学光电仪器厂;UV-B灯管,南京华强公司;T100 PCR 扩增仪、Universal Hood II 凝胶成像系、C1000 实时荧光定量 PCR 仪,美国 Bio-Rad 公司;DYCP-31DN 型电泳仪,北京市六一仪器厂;高速冷冻离心机,上海实维实验仪器技术有限公司;核酸浓度检测仪,德国Eppendorf公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 总RNA的提取与第一链cDNA的合成

取15头烟蚜成蚜,用Trizol法提取总RNA,具体操作按照Trizol试剂盒说明书进行,检测总RNA的

质量和浓度,取2 μg总RNA为模板,以Oligo(DT)<sub>18</sub> Primer为反转录引物,按照RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit说明书合成第一链cDNA。

### 1.2.2 Hsp90基因中间片段的克隆

根据已知的昆虫Hsp90基因序列保守区域,设计引物Fa(5'-ATCTGATGATGTTGAGACCT-3')和Ra(5'-CTGAAGTTGAAGCCTCCG-3')。以第一链cDNA为模板扩增Hsp90基因片段,25 μL扩增体系:Premix Taq酶(1×)12.5 μL、10 μmol/L引物Fa和Ra各1 μL、模板cDNA 1 μL、无菌水9.5 μL;反应条件:94℃预变性3 min;94℃变性30 s,50℃退火30 s,72℃延伸1 min,共35个循环;72℃延伸5 min。扩增产物以1.0%琼脂糖凝胶检测和分离。将目的片段纯化回收,连接到pMD-18T载体上,转化至DH5 $\alpha$ 感受态细胞,进行蓝白斑筛选,挑取阳性克隆测序。

### 1.2.3 Hsp90基因全长cDNA的获取

采用SMARTer®RACE 5'/3' Kit Components试剂盒合成5'-RACE和3'-RACE cDNA,根据所获得Hsp90基因序列片段设计5'-RACE特异性引物GSP1(5'-GTCAGCTACCAGATAGGC-3')/GSP3(5'-ACCAGTGTCAATAATGGTCAG-3')和3'-RACE的特异性引物GSP2(5'-ACGACAAGGCTGTCAG-AGAC-3')/GSP4(5'-GTTCACGCTTCTAGAAC-3'),用试剂盒内通用引物Universal Primer A Mix(UPM)分别与下游引物GSP1和GSP2进行OUT PCR反应,50 μL反应体系:5'/3'-RACE-Ready cDNA 2.5 μL、10 μmol/L GSP1/GSP2 1 μL、UPM(10×)1 μL、ddH<sub>2</sub>O 19.5 μL、SeqAmp™ PCR Buffer(2×)25 μL、SeqAmp™ DNA Polymerase 1 μL;反应条件:94℃变性30 s,50℃退火30 s,72℃延伸2 min,共25个循环。以稀释50倍后的OUT PCR产物为模板,分别用上游引物GSP3和GSP4与下游引物Universal Primer short作巢式PCR反应,50 μL反应体系:稀释50倍后的OUT PCR产物2.5 μL、10 μmol/L GSP3/GSP4 1 μL、10 μmol/L Primer short 1 μL、ddH<sub>2</sub>O 19.5 μL、SeqAmp™ PCR Buffer(2×)25 μL、SeqAmp™ DNA Polymerase 1 μL;反应条件:94℃变性30 s,50℃退火30 s,72℃延伸2 min,共25个循环。1.0%琼脂糖凝胶检测PCR产物,纯化回收,再克隆测序。将获得的序列用软件DNAMAN进行拼接,获得烟蚜Hsp90基因的cDNA序列全长。

### 1.2.4 Hsp90基因序列分析

利用NCBI中的ORF Finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>)分析烟蚜Hsp90基因的开

放阅读框;用BLAST对氨基酸序列进行同源性比较和保守区域分析;使用ProtParam(<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>)对蛋白质的理化性质进行预测;应用软件MEGA 6.0以邻接法(neighbour-joining, NJ)构建烟蚜与来自膜翅目、鳞翅目、半翅目、双翅目、鞘翅目等21种昆虫Hsp90的系统发育树,通过Bootstrap值检验系统树的置信度,各重复1 000次。

### 1.2.5 UV-B胁迫下烟蚜Hsp90基因的表达量分析

UV-B处理:以UV-B紫外灯(280~320 nm)为光源,在光期对烟蚜成虫进行辐射处理,强度为300 μW/cm<sup>2</sup>。UV-B辐射时间分别为0(对照组)、15、30、60、90、120、150 min,共7个处理,辐射完成后每个处理随机挑取15头试虫,立即置于液氮中冷冻后,转到-80℃冰箱保存备用。

烟蚜经过各种UV-B辐射处理后,分别提取总RNA,取2 μL RNA反转录获得cDNA,每个试验处理设置3次生物学重复和3次技术重复,分析烟蚜Hsp90基因在UV-B胁迫下的表达量变化。根据烟蚜Hsp90基因序列设计定量引物Hsp90F(5'-GGAAATTGCTGAAGACAAGG-3')和Hsp90R(5'-CTTAAGGGAGCATGATTG-3'),选用actin基因作为内参基因,引物为actin-F(5'-TGGTATCGT-CTTGGATTCTG-3')和actin-R(5'-TTAGGTAGTCG-GTGAGATCA-3'),采用SYBR Green Supermix染料法进行实时荧光定量PCR,20 μL反应体系:cDNA模板2 μL、iQ™ SYBR® Green Supermix(2×)10 μL、10 μmol/L Hsp90F/actin-F 1 μL、10 μmol/L Hsp90R/actin-R 1 μL、ddH<sub>2</sub>O 6 μL。反应条件:95℃预变性3 min;95℃变性30 s,55℃退火30 s,39个循环;65℃延伸5 s。利用2<sup>-ΔΔCt</sup>法(Livak & Schmittgen, 2001)对烟蚜Hsp90基因表达水平进行相对定量分析。

### 1.3 数据分析

采用软件Excel 2007和GraphPad Prism 5进行统计分析,用Turkey法进行差异显著性检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 烟蚜Hsp90基因的序列分析

以烟蚜cDNA为模板,用引物Fa/Ra扩增Hsp90基因片段,扩增产物经回收、克隆、测序,获得1 984 bp核苷酸序列。经BLAST比对,发现该基因序列与豌豆蚜Acyrthosiphon pisum的Hsp83基因序列(XM\_001943137)相似性为95%,与禾谷缢管蚜Rhopalosiphum padi的Hsp90基因序列(KR078260)相似性为92%,与其它昆虫的Hsp90基因序列相似性为

78%~80%,表明所获得的基因序列为烟蚜Hsp90基因片段。利用RACE技术进一步扩增,得到584 bp的5'端序列和526 bp的3'端序列。经DNAMAN拼接获得1个2 670 bp的烟蚜Hsp90基因cDNA序列全长(GenBank登录号:MF509826)。经ORF Finder分析表明开放阅读框为2 187 bp,编码728个氨基酸;5'UTR和3'UTR长度分别为176 bp和307 bp,3'UTR端具有典型的poly A结构。

通过ProtParam分析,烟蚜Hsp90蛋白的相对分

子量是82.6 kD,等电点为4.95;N端氨基酸是蛋氨酸,带正电荷的氨基酸残基(Arg+Lys)为107个,含有带负电荷的氨基酸残基(Asp+Glu)为145个;具有8个糖基化位点;稳定性系数为39.79,表明该蛋白质性质稳定;总平均疏水指数为-0.643,为疏水性蛋白质。推导的Hsp90氨基酸序列有1个Hsp90家族标签的序列:YSNKEIFLRE(第34~43位残基),末端有MEEVD基序(图1),表明此蛋白具有细胞质型的热激蛋白氨基酸特点,属于胞质热激蛋白。

```

1 AAC CAG CGG TAT CAAC GCG C GAG GAC AT CGG GGG C ACT TTT GAG CT CGT CAG TAA ACT CAG AA CAC AGC AC GCG GAA AGC CT GCG CTT CTAC
91 TTG C GAT CAAC ACT GTT GGC CTATT GCT GCT TGCA ATT TTT TCATT CAAT T GCG AT CAT CAAT ACAT AACT CAATAA ATC ATGC
1 M P
181 CTGAAGACGTTACCATGACTGCATCTGATGATGTTGAGACCTTCGCTTCCAAAGCTGAGATCGCTCAGCTTATGTCCTCATCATCAACA
3 E D V T M T A S D D V E T F A F Q A E I A Q L M S L I I N T
271 CCTTCTACTCGAACAAAGAAATCTTTGCGAGAATTGGTATCCAATTCTTCTGATGCAATTGGACAAAATTGTTATGAGTCATTGACTG
33 F Y S N K E I F L R E L V S N S S D A L D K I R Y E S L T D
361 ATCCATCCAATTTGGAATCTGGCAAAGATTACACATTAAACATCCCCAATCGCGAGAAAAACTCTGACCATTATTGACACTGGTA
63 P S K L E S G K D L H I I K I P N A E K T L T I I D T G I
451 TCGGTATGACCAAAAGCTGATCTAGTCAACAACTTGGGAACCATTGCTAAATCTGGTACTAAGGCTTCTATGGAAGCCTTACAAGCTGGAG
93 G M T K A D L V N N L G T I A K S G T K A F M E A L Q A G A
541 CTGATATTCCATGATTGGTCAATTGGTGTGGGTTCTATTCCGCTATCTGGTAGCTGACAAAGTCACTGTTCTTCCAAACACAACG
123 D I S M I G Q F G V G F Y S A Y L V A D K V T V V S K H N D
631 ACAGATGAACAATATTGTTGGGAATCTGCTGCCGGAGGTTCATCACCATTCCGTA CACTGATCCTGGTGAACCATTGGCCGTGGTACCAAAA
153 D E Q L W E S A A G G S F T I R T D P G E P L G R G T K I
721 TTGTCCTCAAAATCAAAGAAGATCAAGCTGAGTTCTCCAACAAGAAAAAAATTACCAAGCATCATCAAGAAGCACTCTCAATTCTGGCT
183 V L Q I K E D Q A E F L Q E K I T S I I K K H S Q F I G Y
811 ACCCAATCAAATTAACTGTTGAGAATGAACGTAACCAAAGAAGTCAAGCGATGATGAAGCTGAAGAAGAAAAGAAAGATGAAGTTGAAGGTG
213 P I K L I V E N E R T K E V S D D E A E E E K K D E V E G E
901 AAACTGAAGAAGACAAAAACCCAAAATTGAGGATGTTGGTGGAGGATGAAGACGAAGACAAAAAGATGAAGACAAAAAGACAAAAAGAAGA
243 T E E D K P K I E D V G E D E D E D K D E D K K K K
991 AGAAGACTATTAAAGAAAAAGTACTGGATGAAGGGTCTGATAAGACACCAATCTGGACACGCAACCCGTATGATATCAGCCAAG
273 K T I K E K Y L D E E V L N K T K P I W T R N P D D I S Q D
1081 ATGAATATGGTGAATCTCACAAATCCCTAACCATGACTGGGAAGATCATTTAGCCGTAAACATTCTCTGTGGAAGGACAACCTGAAT
303 E Y G E F Y K S L T N D W E D H L A V K H F S V E G Q L E F
1171 TCAGAGCATTGTTATTCTCATCCCAAGCGTGCCTTATGACATGTTGAGAACAAAGAAGAACACATTAAATTATGTCCTGC
333 R A L L F I P K R A P Y D M F E N K K K K N N I K L Y V R R
1261 GTGTCTCATCATGGACAACTGCGAAGACCTCATGCCAGAATACTGAACTTCTCATCAAGGGTGTGAGCAGTGAGGATTGCCGTTGA
363 V F I M D N C E D L M P E Y L N F I K G V V D S E D L P L N
1351 ACATCTCCCGTGAATGCTCCAAACAAAGATCTTGAAGATTATCAGGAAGAATTGGTTAAGAAATGTTGGAATTGTTGAGGAA
393 I S R E M L Q Q N K I L K V I R K N L V K K C L E L F E G I
1441 TTGCTGAAGACAAGGACAACACTAACAGAAATTGTA CGAACAGTTCAGCAAGAACACTGGAACATCCACGAAAGATAGCCAAACAGAA
423 A E D K D N Y K K L Y E Q F S K N L K L G I H E D S Q N R K
1531 AGAAACTCTCAGACTGTTGAGATTCCACTCTCCAGCCAGTGGTGA CGAATCATGCTCTTAAAGGAGTATGTTGCACGTATGAAGCCAA
453 K L S D L L R F H S S A S G D E S C S L K E Y V A R M K P N
1621 ATCAAACCCACATTACTACATCACAGGTGAAGACCGTGAACAAAGTATCCA ACTCTTCATCGTTGAACGTGTCAAGAACGTGGTTTG
483 Q T H I Y Y I T G E S R E Q V S N S F V E R V K K R G F E
1711 AAGTTATTACATGACTGAACCAATTGATGAATACGTTGTCACAAATGAAAGAATATGACGGCAAGAACATTGTTATCTGTCACTAAAG
513 V I Y M T E P I D E Y V V Q Q M K E Y D G K N L V S V T K E
1801 AAGGGTGGACTTGCCTGAAACCGATGAAGAAAAGAAGAAGC GAGGATGATCAATCCAGATTGAAAATTGCAAGAACGTGGTTAAGG
543 G L D L P E T D E E K K R E D D Q S R F E K L C K V V K D
1891 ACATTTGGACAAGAAAAGTTGAGAAGGGTGTCACTAGTAACAGACTGTTGAGTCTCCCTGTTGCACTCATCTCAGTATGGTTGGA
573 I L D K V E K V V I S N R L V E S P C C I V T S Q Y G W T
1981 GCCAACATGGAACGTATCATGAAGGCACAAAGCACTCAGAGATTCTACCATGGGTTATATGTCGCCAAAACACTTGGAAATCAAC
603 A N M E R I M K A Q A L R D S S S T M G Y M S A K K H L E I N
2071 CTCCTGACCAACCGATCATGAAACACTCAGACAAAGCGTGAAGCTGATTCAGACAGACTGGTCAATGCTTGTGAGAGACTGGTCACTGTTTGT
633 P D H P I I E T L R Q K A E A D C N D K A V R D L V M L L F
2161 TCGAGACAAGTTGTTGTCATCGGTTGGACTTGAAGACCCACAAGTTCACGCTTCTAGAATCCACAGAAATGATCAAATTGGGTTGG
663 E T S L L S S G F G L E D P Q V H A S R I H R M I K L G L G
2251 GCATTGATGAAGATTGCCAGTAGTTGAAGAAAATCTGCTGAAGTTGAAGCTGCCAGCTGGTGTGAAGGCTCCGAGCTGGTGAAGCTGATGCTGAAGATTCTT
693 I D E D L P V V E E K S A E V E A S E P V V E A D A E D S S
2341 CTCGCAATGGAAGAAGTTGATTA A ATTATTACAAAGTGAATTATTTGAAGAACATTCTATATT TATTGTTAAATATTATTTG
723 R M E E V D *

```

2431 AGACTGATTGTCATTCTTTTTCTTTTATTCAAATTGTCAAAATTAACTATTACATGGCAATT TATTAAATCTGGTAGATT
2521 TGTATAATCATCTAAATTCAATGTACACATGATAAGTTGCTTGGAAATTCTAGTTGATAGGTGTTACAGGTTAAAGATATT
2611 AAATACACATGGAATAATTGGTACATAAACAAAAAA

图1 烟蚜热激蛋白Hsp90的核苷酸序列以及氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of Hsp90 from *Myzus persicae*

单下划线表示起始密码子ATG用标记;\*表示终止密码子TAA;双下划线标记表示细胞质型Hsp90的C-端基序;单下划波浪线表示糖基化位点;框内为Hsp90家族签名序列。The single underline indicates the start codon ATG; \* indicates the stop codon TAA; double-underlined indicates C-terminal motif of cytoplasmic Hsp90; signature sequences of Hsp90 family are shown in box.

## 2.2 烟蚜 Hsp90 系统发育分析

氨基酸序列相似性分析结果表明,烟蚜 Hsp90 与豌豆蚜 Hsp83 氨基酸序列相似性为 93%,与其它昆虫的 Hsp90 氨基酸序列相似性达 81% 以上,说明 Hsp90 蛋白具有高度的保守性。以脊椎动物褐家鼠 *Rattus norvegicus* 的 Hsp90 为外群,将来自膜翅目、鳞翅目、半翅目、双翅目、鞘翅目等 21 种昆虫的 Hsp90 氨基酸序列进行完全比对,构建昆虫 Hsp90

系统发育树,结果表明,半翅目烟蚜、豌豆蚜、麦双尾蚜 *Diuraphis noxia* 和禾谷缢管蚜聚为一支,说明烟蚜的 Hsp90 与半翅目中的豌豆蚜、麦双尾蚜和禾谷缢管蚜的基因遗传距离最近,与膜翅目、鳞翅目、双翅目、鞘翅目和双翅目物种的 Hsp90 的遗传距离相对较远。系统发育分析显示,21 种昆虫的 Hsp90 蛋白分别聚为 5 支,且同一个目的昆虫聚在同一分支,说明 Hsp90 聚类结果可以较好地反映昆虫间的亲缘关系(图 2)。

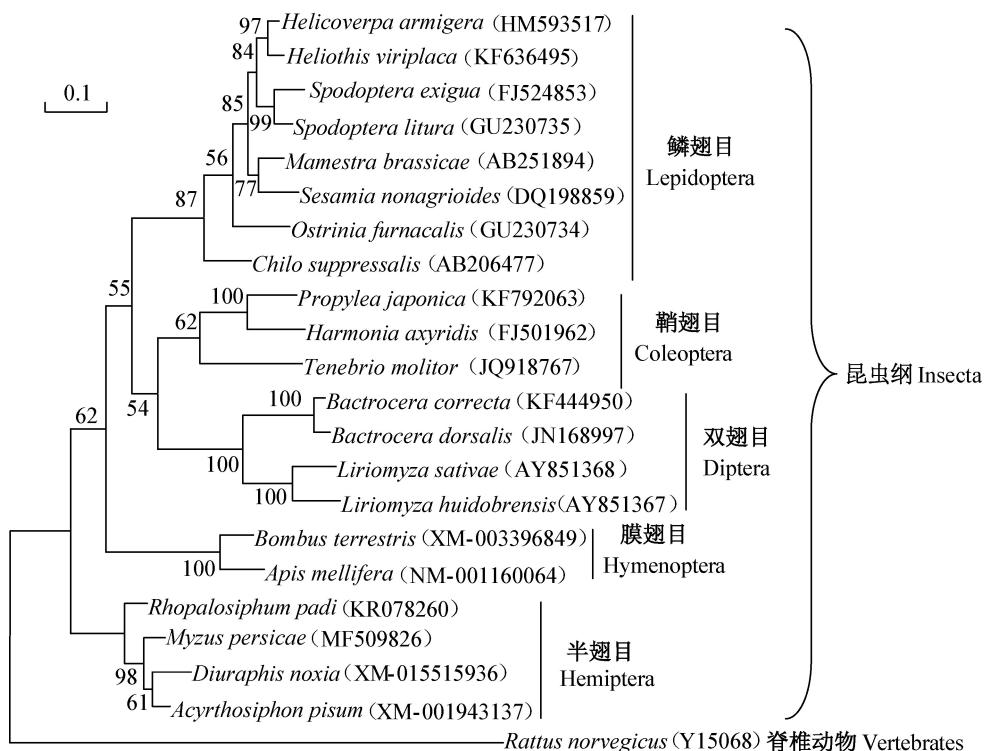


图 2 基于 Hsp90 序列采用邻接法构建烟蚜及其它 21 种昆虫的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of insect Hsp90 sequences by using neighbor-joining method

## 2.3 烟蚜 Hsp90 基因的表达分析

不同时长 UV-B 胁迫下烟蚜 Hsp90 基因均有表达,随着照射时间的延长,Hsp90 基因的表达量表现为先上升后下降的趋势;与对照相比,照射时间为 15、30、60、90 和 120 min 时,Hsp90 基因表达量均显著升高,且在 60 min 时 Hsp90 基因表达量达到最大,是对照组表达量的 2.05 倍(图 3)。

## 3 讨论

本研究根据昆虫 Hsp90 基因的保守区域设计通用引物,成功克隆了烟蚜 Hsp90 基因的 cDNA 片段,利用 RACE 技术获得了 Hsp90 基因全长序列。分析其蛋白氨基酸序列发现,烟蚜 Hsp90 含有 Hsp90 家族的 1 个典型特征序列,即 Hsp90 的 C 端基序为 MEEVD,说明克隆所得序列属于细胞质 Hsp90 家族

成员(杨丽红等,2016)。

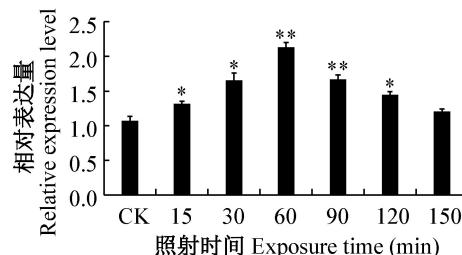


图 3 烟蚜 Hsp90 基因在不同时长 UV-B 胁迫下的相对表达水平

Fig. 3 Relative expression levels of Hsp90 gene of *Myzus persicae* under different UV-B treatments

图中数据表示平均数±标准误。\* 和 \*\* 分别表示处理组与对照组间经 Tukey 法检验在  $P<0.05$  和  $P<0.01$  水平差异显著。Data are mean±SE. \* or \*\* indicates significant differences between the control and the treatments at  $P<0.05$  or  $P<0.01$  level by Tukey test.

Hsp90进化方面高度保守,近年来已成功运用于分子进化和分子系统学研究(Theodoraki & Mitzas, 2006; Chen et al., 2014)。本研究中烟蚜Hsp90与其它昆虫Hsp90具有较高的同源性,与豌豆蚜的相似性达93%;本研究中系统发育分析结果也显示,亲缘关系近的昆虫在系统发育树上位置较近。这和苹果蠹蛾*Cydia pomonella*(申建茹等,2011)、禾谷缢管蚜(李玉婷等,2017)等昆虫Hsp90基因的研究结果一致。

Hsp在逆境条件下具有稳定细胞膜结构、协助正确折叠或降解变性蛋白的作用,Hsp90是Hsp家族中重要的一类,能够作为分子伴侣,在环境胁迫条件下维持生物正常的生理功能。大量研究表明胁迫环境能诱导昆虫Hsp90基因的表达,如禾谷缢管蚜Hsp90基因在热激时大量表达(李玉婷等,2017);申建茹等(2011)研究表明苹果蠹蛾Hsp90基因的响应表达在其耐热性及可塑性过程中具有重要意义;棉铃虫*Helicoverpa armigera*的Hsp90基因在热激和UV胁迫下均有大量表达(张长禹,2010);本研究也发现烟蚜Hsp90基因在UV-B胁迫条件下表达量上调,说明Hsp90基因参与了烟蚜对UV-B胁迫的响应,在昆虫适应环境胁迫的分子机制中发挥着重要作用。

本研究结果显示,UV-B辐射时间为15、30、60、90和120 min时Hsp90基因表达量显著升高,这表明UV-B能够诱导Hsp90基因的显著表达,从而帮助烟蚜维持细胞内稳态,提高对UV-B胁迫的耐受性。该研究结果与昆虫面对其它环境胁迫时的结论一致,如Verne et al.(2011)研究结果证明,热激处理能诱导生物体内的HSPs合成,使生物在高温环境中的存活率上升。随着UV-B辐射时间延长,Hsp90基因表达量先上升后下降,在60 min时达最高,分析认为Hsp90基因表达量的上调在烟蚜抗紫外胁迫中起着重要作用,但Hsp90基因对机体的保护有限,当UV-B胁迫超过一定范围后,Hsp90基因表达量将会下降。烟蚜Hsp90基因表达量在60 min后逐渐下降,可能是由于90、120、150 min长时间的UV-B胁迫对机体造成的损伤超出了Hsp90基因的保护作用。张长禹(2010)研究发现在UV胁迫下棉铃虫Hsp90基因的表达也出现先上升后下降的现象,在120 min时达到最高,与本试验结果相似。Hsp的表达是昆虫提高对不良环境耐受性的重要生理机制(Colinet et al., 2010),昆虫对不良环境条件的耐受能力对种群的消长有着直接影响,而Hsp的表达量

与昆虫对UV胁迫的耐受性和对不良环境的适应性紧密相关(Sang et al., 2012; Wang et al., 2014)。

UV-B辐射是一种重要的环境胁迫因子,UV-B的增强必然会不可避免的对生物产生选择压力。烟蚜长期暴露于UV-B辐射环境中,它的外骨骼不如鞘翅目昆虫特化,刺吸式口器的取食特性又使它不能像咀嚼式口器的昆虫那样频繁选择取食位点,加之自身活动能力较弱,因此,UV-B辐射对其是一种较强的环境胁迫。本研究初步阐明了Hsp90在烟蚜适应UV-B胁迫中的作用,为进一步揭示烟蚜响应UV-B胁迫的分子机制奠定了理论基础,对烟蚜的可持续治理具有重要意义。

### 参考文献(References)

- Bacher S, Luder S. 2005. Picky predators and the function of the faecal shield of a cassidine larva. *Functional Ecology*, 19(2): 263–272
- Chen H, Xu XL, Li YP, Wu JX. 2014. Characterization of heat shock protein 90, 70 and their transcriptional expression patterns on high temperature in adult of *Grapholita molesta* (Busck). *Insect Science*, 21(4): 439–448
- Colinet H, Lee SF, Hoffmann AA. 2010. Temporal expression of heat shock genes during cold stress and recovery from chill-coma in adult *Drosophila melanogaster*. *FEBS Journal*, 277(1): 174–185
- Guo XR, Luo MH, Dang RS. 1995. Effects of green peach aphid on the physiology, growth and development of tobacco plants. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 10(2): 95–99 (in Chinese) [郭线茹, 罗梅浩, 党润生. 1995. 烟蚜危害对烟草生理及生长发育的影响. 华北农学报, 10(2): 95–99]
- Li J. 2005. Responses of ecology of aphid under inducement condition. Master Thesis. Yangling: Northwest A&F University (in Chinese) [李军. 2005. 诱导条件下蚜虫生态学反应. 硕士学位论文. 杨凌: 西北农林科技大学]
- Li YT, Zhao Q, Fang B, Chen MH. 2017. Molecular cloning and expression analysis of the *Hsp90* gene in the bird cherry-oat aphid, *Rhopalosiphum padi*. *Journal of Plant Protection*, 44(1): 16–23 (in Chinese) [李玉婷, 赵奇, 房冰, 陈茂华. 2017. 谷缢管蚜热激蛋白Hsp90基因的克隆和表达分析. 植物保护学报, 44(1): 16–23]
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method. *Methods*, 25: 402–408
- McKenzie RL, Björn LO, Bais A, Ilyasd M. 2007. Changes in biologically-active ultraviolet radiation reaching the earth's surface. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2: 5–15
- Picard D. 2002. Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59(10): 1640–1648
- Rassow J, Voos W, P fanner N. 1995. Partner proteins determine multiple functions of *HSP70*. *Trends in Cell Biology*, 5: 207–212
- Ren GW, Zhang LT. 2002. Occurrence and control of *Myzus Persicae* (Sulzer) and *Heliothis assulta* Guenée. *Tobacco Science & Technology*, 46(5): 43–45 (in Chinese) [任广伟, 张连涛. 2002. 烟蚜和

- 烟青虫的发生与防治. 烟草科技, 46(5): 43–45]
- Rinehart JP, Hayward SAL, Elnitsky MA, Sandro LH, Lee RE Jr, Denlinger DL. 2006. Continuous up-regulation of heat shock proteins in larvae, but not adults, in a polar insect. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103(38): 14223–14227
- Sang W, Ma WH, Qiu L, Lei CL. 2012. The involvement of heat shock protein and cytochrome P450 genes in response to UV-A exposure in the beetle *Tribolium castaneum*. Journal of Insect Physiology, 58(6): 830–836
- Shen JR, Li MF, Chen NZ, Wang JJ, Wan FH. 2011. Cloning and analysis of the expression characteristics under heat stress of *Hsp90* gene in the codling moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). Acta Entomologica Sinica, 54(11): 1236–1248 [申建茹, 李明福, 陈乃中, 王进军, 万方浩. 2011. 苹果蠹蛾热激蛋白Hsp90基因的克隆及热胁迫下的表达分析. 昆虫学报, 54(11): 1236–1248]
- Sørensen JG, Kristensen TN, Loeschke V. 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. Ecology Letters, 6(11): 1025–1037
- Theodoraki MA, Mintzas AC. 2006. cDNA cloning, heat shock regulation and developmental expression of the *hsp83* gene in the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*. Insect Molecular Biology, 15(6): 839–852
- Verne S, Jaquish B, White R, Ritland C, Ritland K. 2011. Global transcriptome analysis of constitutive resistance to the white pine weevil in spruce. Genome Biology and Evolution, 3(1): 851–867
- Wang JY, Ci ZL. 2008. Advances in study of heat shock protein. Shanxi Forestry Science and Technology, 17(1): 27–32 [王建义, 慈忠玲. 2008. 热激蛋白的研究进展. 山西林业科技, 17(1): 27–32]
- Wang LJ, Zhou LJ, Zhu ZH, Ma WH, Lei CL. 2014. Differential temporal expression profiles of heat shock protein genes in *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) under ultraviolet a radiation stress. Environmental Entomology, 43(5): 1427–1434
- Wang YF. 2014. The influence of infection with TMV and CMV in tobacco on the population development, food finding of *Myzus persicae* and CMV transmission efficiency by aphid. Master Thesis. Chongqing: Southwest University (in Chinese) [王亚峰. 2014. TMV与CMV复合侵染烟草对烟蚜的种群增长、取食选择和CMV蚜传效率的影响. 硕士学位论文. 重庆: 西南大学]
- Xu CP, Sullivan JH. 2010. Reviewing the technical designs for experiments with ultraviolet-B radiation and impact on photosynthesis, DNA and secondary metabolism. Journal of Integrative Plant Biology, 52(4): 377–387
- Yang LH, Dou W, Jiang HB, Niu JZ, Ding TB, Wang JJ. 2016. Cloning and expression profiling of heat shock protein gene *PcHsp90* in the citrus red mite, *Panonychus citri* (Acari: Tetranychidae). Acta Entomologica Sinica, 59(4): 411–420 [杨丽红, 豆威, 蒋红波, 牛金志, 丁天波, 王进军. 2016. 柑橘全爪螨热激蛋白基因PcHsp90的克隆及表达模式分析. 昆虫学报, 59(4): 411–420]
- Yuan WN, Lü N, Sun XL, Liu CZ. 2015. Effects of continuous UV-B stress on biological characteristics of green pea aphid. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 23(8): 1020–1025 [袁伟宁, 吕宁, 孙小玲, 刘长仲. 2015. 连续UV-B胁迫对绿色型豌豆蚜生物学特性的影响. 中国生态农业学报, 23(8): 1020–1025]
- Zhai HF, Jiang XF, Luo LZ. 2010. Cloning and expression of *HSP90* cDNA in larvae of the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) under high temperatures stress. Acta Entomologica Sinica, 53(1): 20–28 [翟会芳, 江幸福, 罗礼智. 2010. 甜菜夜蛾HSP90基因克隆及高温胁迫下其表达量的变化. 昆虫学报, 53(1): 20–28]
- Zhang CY. 2010. Study on the reproductive compensation of *Helicoverpa armigera* under UV stress and cloning and expression of *Hsp90* genes. Ph. D Thesis. Wuhan: Huazhong Agricultural University (in Chinese) [张长禹. 2010. UV胁迫下棉铃虫生殖补偿研究及Hsp90基因的克隆与表达. 博士学位论文. 武汉: 华中农业大学]
- Zhang K, Weng QF, Fu HH. 2014. Research progress on heat shock protein 90 of insects. Biotechnology Bulletin, 30(2): 15–23 [张珂, 翁群芳, 付昊昊. 2014. 昆虫热激蛋白90的研究进展. 生物技术通报, 30(2): 15–23]
- Zhang L. 2013. The effects of long-term different intensity of UV-B radiation on the ecological parameters and feeding behavior of *Sitobion avenae* (Fabricius) (Hemiptera: Aphididae). Master Thesis. Yangling: Northwest A&F University (in Chinese) [张丽. 2013. 不同强度UV-B长期胁迫对麦长管蚜种群生态学参数和取食行为的影响. 硕士学位论文. 杨凌: 西北农林科技大学]
- Zhang Q, Lu MX, Zhu SD. 2014. Cloning, sequence analysis and expression profiling of heat shock protein 90 gene in the small brown plant hopper, *Laodelphax striatellus* (Hemiptera: Delphacidae). Acta Entomologica Sinica, 57(7): 777–786 [张青, 陆明星, 祝树德. 2014. 灰飞虱热激蛋白Hsp90基因的克隆、序列分析与表达模式. 昆虫学报, 57(7): 777–786]
- Zhang RG, Zheng YF, He YH, Xiao W. 2003. Effects of enhanced UV-B radiation upon wheat aphids. Journal of Nanjing Institute of Meteorology, 26(2): 258–262 [张荣刚, 郑有飞, 何雨红, 肖微. 2003. 紫外UV-B辐射增强对麦田蚜虫的影响. 南京气象学院学报, 26(2): 258–262]
- Zhao L, Jones WA. 2012. Expression of heat shock protein genes in insect stress responses. Invertebrate Survival Journal, 9(1): 93–101
- Zhou D, Du YM, Yang J, Zhang L, Zhao HY, Hu ZQ, Hu XS. 2014. Effects of UV-B radiation generations on the activities of protective enzymes in the grain aphid, *Sitobion avenae* (Hemiptera: Aphididae). Acta Entomologica Sinica, 57(7): 762–768 [周冬, 杜一民, 杨杰, 张丽, 赵惠燕, 胡祖庆, 胡想顺. 2014. 连续多代UV-B照射对麦长管蚜保护酶活性的影响. 昆虫学报, 57(7): 762–768]

(责任编辑:王璇)