

# 甜菜夜蛾 *PAP* 基因克隆 及在高温胁迫下其表达量的变化

胡 振 龚 亮 张彦博 胡美英\*

(华南农业大学 农药与化学生物学教育部重点实验室 广东 广州 510642)

摘要:紫色酸性磷酸酯酶(purple acid phosphatase, PAP)在生物逆境胁迫中具有至关重要的作用,而在昆虫中此类基因极少见于报道。首次克隆和分析了甜菜夜蛾 *PAP* 基因 cDNA 3' 末端序列,在 GenBank 登录后,获得序列号为 HM566114,其长为 759 个碱基对,推测编码 252 个氨基酸。此多肽序列具有高度保守性,其相似性分别为:埃及伊蚊(*Aedes aegypti*) 84%;黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*) 52%,赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*) 50%。为了研究高温对甜菜夜蛾 *PAP* 基因表达量的影响,利用 RT-PCR 技术,检测 30 °C、35 °C、40 °C 胁迫下甜菜夜蛾 2 龄幼虫体内 *PAP* 基因表达量的变化,其中设对照组为 25 °C。结果表明:高温对甜菜夜蛾 2 龄幼虫 *PAP* 基因表达具有明显的诱导作用,30 °C、35 °C、40 °C 分别处理 10、20 h 的表达量均显著高于对照组 25 °C 分别处理的 10、20 h ( $P < 0.05$ )。相比于对照组,在 30 °C 处理 20 h 的表达量最高,表明 *PAP* 基因的表达与其抗高温能力之间存在一定的关系。

关键词:甜菜夜蛾; cDNA 克隆; 序列分析; 半定量 RT-PCR; *PAP* 表达

中图分类号:S436.3 文献标志码:A 文章编号:1000-2286(2011)03-0458-07

## Cloning and Expression of *PAP* cDNA in the Larvae of Beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) under High Temperature Stress

HU Zhen, GONG Liang, ZHANG Yan-bo, HU Mei-ying\*

(Key Laboratory of Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education of P. R. China. South China Agricultural University, Guangzhou, 510642, China)

**Abstract:** Purple acid phosphatase (PAP) plays a critical role of organism under adversity stress. However, little work has been reported on PAP associated with adversity stress in insect. In this study, *Sexi-PAP*, a partial cDNA of the 3' end (GeneBank accession NO: HM566114) encoding purple acid phosphatase of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner) was cloned, sequenced and analyzed. The cDNA is 759 bp that encodes 252 putative amino acids, which exhibited a significant similarity to purple acid phosphatase of *Aedes aegypti* (84%), *Drosophila melanogaster* (52%) and *Tribolium castaneum* (50%). Semi-quantitative RT-PCR was used to understand the effect of high temperature on the expression of PAP. The results indicated that high temperature could significantly induce the expression of PAP. The detailed results were that the PAP expression levels in the second instar larvae under 30 °C, 35 °C and 40 °C for 10 h and 20 h, respectively, were

收稿日期:2011-01-05 修回日期:2011-03-30

基金项目:国家自然科学基金(31071713)和教育部高等学校博士学科点专项科研基金项目(20094404110019)

作者简介:胡振(1987—)男,硕士生,主要从事农药分子毒理学研究, E-mail: huzh111@163.com; \* 通讯作者:胡美英,教授, E-mail: humy@scau.edu.cn.

significantly higher than those of the control groups ( $P < 0.05$ ). Furthermore, the expression of the treatment at 30 °C for 20 h had the highest relative gray value, and that at 25 °C for 20 h was the lowest. This study has suggested the possibility physiological role of the *PAP* at high temperature stress.

**Key words:** *Spodoptera exigua*; cDNA clone; sequence analysis; semi-quantitative RT-PCR; *PAP* expression

甜菜夜蛾 [*Spodoptera exigua* (Hübner)] 俗称白菜褐夜蛾, 隶属于鳞翅目、夜蛾科, 是一种世界性分布、间歇性大发生的以危害蔬菜为主的杂食性害虫。该虫源于南亚地区, 常年发生于亚热带地区, 并经常在温带地区大发生, 对高温有较强的适应能力<sup>[1]</sup>。危害最严重的时期均出现在当地的高温期和食物充足的作物生长期。另一方面, 甜菜夜蛾幼虫易产生抗药性, 近年来南方地区该虫对菊酯类和有机磷等杀虫剂产生了很高的抗药性, 造成频繁暴发, 成为常发性重要害虫。从 20 世纪 90 年代初, 我国学者便从生态学、生理学角度阐明了甜菜夜蛾抗寒、耐热的机制<sup>[1-4]</sup>, 但从分子水平上深入研究其对抗逆境的报道仍然甚少。

紫色酸性磷酸脂酶 (*PAP*) 是生物体内存在的一种金属磷脂酶蛋白, 其生化功能是分解有机磷底物, 释放磷酸根基团 ( $P_i$ )<sup>[5-7]</sup>。在哺乳动物及植物中对紫色酸性磷酸酶的研究表明不同的 *PAP* 可能具有不同的生物学功能。如: 它们可能参与铁的转运、骨的吸收和矿化、自由基呈现以及一些氧化还原作用<sup>[8]</sup>, 自拟南芥中的 29 个 *AtPAP* 被分离得到以后, 植物 *PAP* 的研究也已经受到越来越多的关注<sup>[9]</sup>。

过高的环境温度常常使昆虫生长发育、生殖及存活等受到严重的影响, 如果对这些影响缺乏了解就会降低害虫测报的准确性, 因此探索高温对昆虫生理生化的作用机理、阐明昆虫对高温适应性的分子基础是了解高温对昆虫生命活动影响的根本途径。然而, 在高温逆境胁迫下, 紫色酸性磷酸酯酶在昆虫体内的表达研究, 至今尚未见报道。本文采用 RT-PCR 技术, 从分子水平上揭示高温对甜菜夜蛾 *PAP* 的影响, 以期进一步了解甜菜夜蛾 *PAP* 基因的生理功能及其与高温胁迫的关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试昆虫及主要试剂

甜菜夜蛾 (*S. exigua*) 为本实验室长期用人工饲料饲养供试。收集 2、3 龄幼虫放在液氮中冷冻, -70 °C 保存备用。总 RNA 抽提 Trizol 试剂盒购自 OMEGA 公司; 琼脂糖凝胶 DNA 纯化回收试剂盒购自 TIAN-GEN 公司; *Taq* DNA 聚合酶、AMV 反转录酶、DL2000 DNA Marker、大肠杆菌感受态细胞 ( $DH_{5\alpha}$ )、PMD20-T 载体均购自 TaKaRa 公司。

### 1.2 总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成

将在液氮中保存的甜菜夜蛾取出加入液氮捣碎后, 参照 OMEGA 公司总 RNA 抽提 Trizol 试剂盒的说明书进行提取, 然后参照 TaKaRa 公司的 AMV 反转录酶使用说明书合成 cDNA 第一链, 并于 -20 °C 保存。

### 1.3 引物设计及合成

根据 GenBank 中已登录的昆虫 *PAP* 氨基酸保守序列区设计简并引物 *PAP*-F1 和 *PAP*-R1。得到甜菜夜蛾 *PAP* 基因 3' 末端序列后, 根据已知部分序列设计半定量 RT-PCR 引物 (PCR 反应引物见表 1), 所用引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

表 1 用于扩增甜菜夜蛾 *PAP* 基因的简并引物和半定量 RT-PCR 引物

Tab. 1 The degenerate primers and semi-quantitative RT-PCR for cloning *PAP* gene of *Spodoptera exigua*

引物 Primers	序列 Sequence(5' - 3')
简并引物	<i>PAP</i> -F1: 5'-GAGGCTCAWCGTAASAAGTAC-3'
Degenerate primers	<i>PAP</i> -R1: 5'-CTAGMGGTGWGACTKGTGT-3'
半定量 RT-PCR 引物	<i>XP</i> -1: 5'-GAGGCTCAACGTAACAAGTAC-3'
Semi-quantitative RT-PCR primers	<i>XP</i> -2: 5'-CTAGAGGTGAGACTTGT-3'
内参基因引物	$\beta$ -actin-F: 5'-GGTTGTTATGGGTCAGAAGGA-3'
Actin gene primers	$\beta$ -actin-R: 5'-GCCGTGGTGGTGAAGAGTA-3'

#### 1.4 PCR 产物克隆与测序

反应体系 50  $\mu\text{L}$ : cDNA 1  $\mu\text{L}$ , dNTP 4  $\mu\text{L}$  (2.5 mmol/L),  $10 \times \text{E} \times \text{Taq}$  Buffer 5  $\mu\text{L}$ ,  $\text{E} \times \text{Taq}$  1  $\mu\text{L}$ , 正向引物和反向引物各 1  $\mu\text{L}$  (20  $\mu\text{mol/L}$ ), 加水至 50  $\mu\text{L}$ 。反应程序为: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 4 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  45 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 35 个循环, 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min, 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。PCR 产物经过 TIANGEN 凝胶回收试剂盒回收纯化后, 连入 pMD20 - T 载体 (TaKaRa), 连接产物转入大肠杆菌 (DH $_{5\alpha}$ ) 感受态细胞, 挑取白色菌落, 培养后参照 Sambrook 等的方法<sup>[10]</sup> 提取质粒, 用 PCR 的方法进行重组质粒的鉴定。选择经过 PCR 鉴定为阳性的菌液进行序列测定 (上海英骏生物技术有限公司)。

#### 1.5 序列分析

应用 DNASTar 软件推测甜菜夜蛾 *PAP* 基因的氨基酸序列, 并通过在线生物学软件 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast> 对推测的氨基酸序列与 GenBank 已知序列进行比较分析, 应用在线软件 <http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html> 进行多序列比对分析。

#### 1.6 胁迫处理

在恒温条件下, 温度设置分别为 30  $^{\circ}\text{C}$ 、35  $^{\circ}\text{C}$ 、40  $^{\circ}\text{C}$ , 分别处理甜菜夜蛾 2 龄幼虫 10 h 和 20 h, 每个处理设 3 个重复。室温 25  $^{\circ}\text{C}$  设为对照组。

#### 1.7 循环数确定

选择适当的循环数, 因为目的基因的模板量大大低于持家基因, 所以很少会同时到达平台期, 所以需要选择合适的循环数来保证目的基因和内参基因在分析时都处于线性扩增期。本试验将设置循环数梯度, 并对各梯度的电泳结果进行分析, 选择最佳循环数。

#### 1.8 甜菜夜蛾 *PAP* 基因表达的半定量 RT-PCR 分析

分别提取甜菜夜蛾处理组和对照组总 RNA, 反转录成第一链 cDNA 后 -20  $^{\circ}\text{C}$  保存。选择甜菜夜蛾  $\beta$ -actin 作为半定量分析的内参基因。反应程序如下: 94  $^{\circ}\text{C}$ , 变性 3 min; 接着 24、25、26、27、28、29、30、31 个循环, 循环条件为 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  45 s; 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min, 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。PCR 产物用 150 g/L 琼脂糖凝胶电泳进行检测。使用软件 SinsAnsyl 1.0.3 对电泳条带进行灰度值扫描, 每个样品重复 3 次, 以确定相对表达量, 应用 SAS 软件对数据进行统计学分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 甜菜夜蛾基因 cDNA 部分序列的克隆及推测的氨基酸序列分析

以甜菜夜蛾蛹的 cDNA 为模版, 以 *PAP*-F1 和 *PAP*-R1 为上下游引物对甜菜夜蛾 *PAP* 基因进行 PCR 扩增, 鉴定得到 1 条约 750 bp 的片段 (图 1)。测序后发现该序列长 759 bp, 编码 252 氨基酸, 其中, 末端为终止密码子 TAG, 因此该序列为甜菜夜蛾 *PAP* 基因的 3' 末端 (图 2)。多序列比对分析表明昆虫间 *PAP* 基因非常保守, 此克隆的甜菜夜蛾 *PAP* 与埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*)、果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 和赤拟谷盗 (*Tribolium castaneum*) 的 *PAP* 具有很高的相似性, 分别达到 84%、52% 和 50% (图 3)。在 GenBank 登录后, 获得 cDNA 序列号为 HM566114, 氨基酸序列号为 ADK11427。

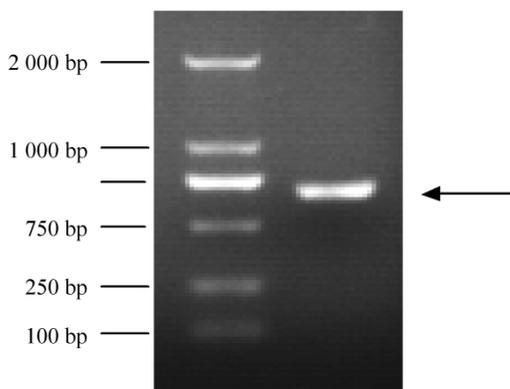


图 1 甜菜夜蛾 *PAP* 基因部分 cDNA 序列的凝胶电泳检测  
Fig. 1 Gel electrophoresis was used to test the partial cDNA sequence of *PAP* gene of *Spodoptera exigua*

### 2.2 PCR 循环数的确定

图 4 显示 *Sexi*-*PAP* 基因 29 个循环时进入平台期,  $\beta$ -actin 基因 28 个循环时进入平台期。为确保分析时两种基因都处于线性期, 选择 27 个循环进行半定量 PCR。

### 2.3 在逆境胁迫下甜菜夜蛾 *PAP* 基因表达的半定量 RT-PCR 分析

用甜菜夜蛾  $\beta$ -actin 为内参基因, 根据内参基因模板量确定甜菜夜蛾各个处理的模板量, 分别对目

的基因进行 PCR 特异扩增 27 个循环数, 每个 PCR 产物取 8  $\mu$ L 进行电泳检测(图 5)。用 Sinsiansys1.0.3 软件进行灰度值扫描后, 确定了甜菜夜蛾 *PAP* 基因各个处理的相对表达量。结果表明: 高温胁迫对甜菜夜蛾 2 龄幼虫体内的 *PAP* 表达具有明显的诱导作用, 30  $^{\circ}$ C、35  $^{\circ}$ C、40  $^{\circ}$ C 分别处理 10 h、20 h 的表达量均显著高于对照组 25  $^{\circ}$ C 分别处理的 10 h、20 h ( $P < 0.05$ )。其中 30  $^{\circ}$ C 处理 20 h 的表达量最高, 其相对灰度值为 0.71; 对照组 25  $^{\circ}$ C 处理 20 h 的最低, 其相对灰度值为 0.28。

### 3 讨 论

紫色酸性磷酸酯酶 (*PAP*) 是含铁的糖蛋白, 在酸性条件下能催化水解磷酸酯, 该类酶具双核铁中心活性部位, 每个蛋白有 2 个铁原子, 2 个铁原子以 Fe II、Fe III 形式存在时, 具有催化活性<sup>[11]</sup>。该蛋白

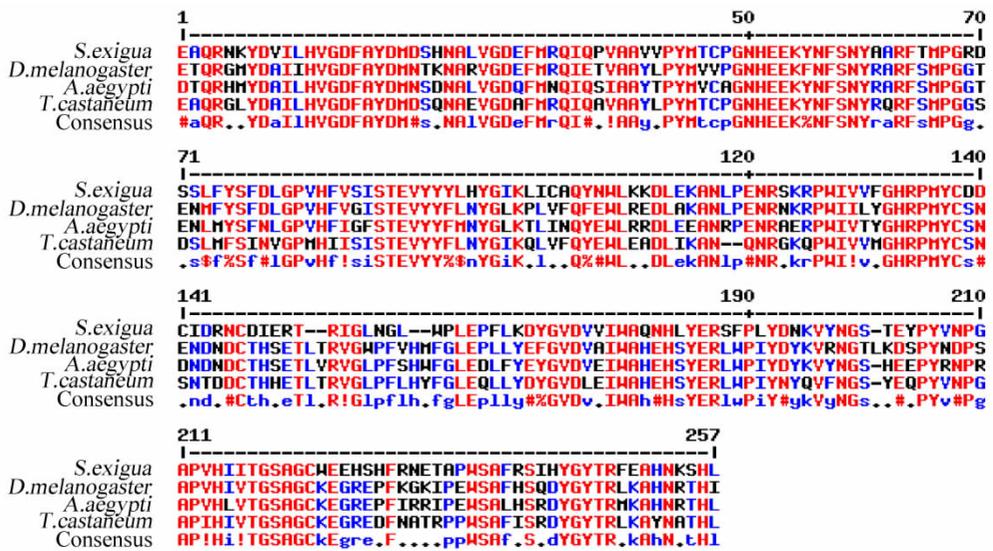
<u>GAG</u>	<u>GCT</u>	<u>CAA</u>	<u>CGT</u>	<u>AAC</u>	<u>AAG</u>	TAC	GAT	GTG	ATC	CTA	CAT	GTA	GGA	GAC
E	A	Q	R	N	K	Y	D	V	I	L	H	V	G	D
TTC	GCC	TAC	GAC	ATG	GAC	TCT	CAT	AAT	GCT	CTA	GTT	GGT	GAT	GAG
F	A	Y	D	M	D	S	H	N	A	L	V	G	D	E
TTT	ATG	CGA	CAG	ATC	CAG	CCG	GTT	GCT	GCT	GTC	GTA	CCA	TAC	ATG
F	M	R	Q	I	Q	P	V	A	A	V	V	P	Y	M
ACA	TGC	CCC	GGG	AAC	CAC	GAG	GAG	AAA	TAC	AAC	TTC	AGT	AAC	TAC
T	C	P	G	N	H	E	E	K	Y	N	F	S	N	Y
GCC	GCT	CGC	TTC	ACG	ATG	CCC	GGC	CGG	GAC	TCG	AGT	CTA	TTC	TAC
Y	A	A	R	F	T	M	P	G	R	D	S	S	L	F
AGC	TTT	GAC	CTG	GGC	CCC	GTG	CAC	TTT	GTG	TCT	ATC	TCC	ACT	GAA
Y	S	F	D	L	G	P	V	H	F	V	S	I	S	T
GTT	TAC	TAC	TAC	CTA	CAC	TAC	GGC	ATC	AAG	TTG	ATC	TGT	GCC	CAG
E	V	Y	Y	Y	L	H	Y	G	I	K	L	I	C	A
TAT	AAC	TGG	CTG	AAG	AAA	GAT	CTG	GAG	AAG	GCG	AAT	CIT	CCA	GAG
Q	Y	N	W	L	K	K	D	L	E	K	A	N	L	P
AAT	AGA	TCG	AAG	AGA	CCG	TGG	ATC	GTG	GTG	TTT	GGA	CAC	AGA	CCG
E	N	R	S	K	R	P	W	I	V	V	F	G	H	R
ATG	TAC	TGC	GAT	GAC	TGT	ATC	GAT	AGA	AAC	TGC	GAC	ATA	GAA	CGA
P	M	Y	C	D	D	C	I	D	R	N	C	D	I	E
ACG	AGG	ATC	GGA	CTG	AAC	GGG	CTT	TGG	CCT	TTG	GAG	CCT	TTT	TTG
R	T	R	I	G	L	N	G	L	W	P	L	E	P	F
AAG	GAT	TAT	GCT	GTA	GAT	GTG	GTG	ATC	TGG	GCC	CAA	AAT	CAT	TTG
L	K	D	Y	G	V	D	V	V	I	W	A	Q	N	H
TAC	GAG	AGG	TCG	TTC	CCA	CTG	TAC	GAC	AAT	AAG	GTG	TAC	AAC	GGT
L	Y	E	R	S	F	P	L	Y	D	N	K	V	Y	N
TCA	ACT	GAG	TAT	CCT	TAC	GTC	AAC	CCT	GGA	GCT	CCA	GTC	CAC	ATC
G	S	T	E	Y	P	Y	V	N	P	G	A	P	V	H
ATA	ACA	GGA	TCG	GCT	GGT	TGT	TGG	GAG	GAA	CAT	TCA	CAT	TTC	AGA
I	I	T	G	S	A	G	C	W	E	E	H	S	H	F
AAC	GAG	ACA	GCT	CCA	TGG	TCT	GCC	TTC	AGG	AGC	ATA	CAC	TAC	GGG
R	N	E	T	A	P	W	S	A	F	R	S	I	H	Y
TAC	ACA	AGG	TTC	GAA	GCT	<u>CAC</u>	<u>AAC</u>	<u>AAG</u>	<u>TCT</u>	<u>CAC</u>	<u>CTC</u>	<u>TAG</u>		
G	Y	T	R	F	E	A	H	N	K	S	H	*		

简并引物所在位置由下划线标示; \* 表示终止密码子。

The locations of the initial degenerate primers are also shown by underline; the asterisk marks the termination codon.

图 2 甜菜夜蛾 *PAP* 基因部分 cDNA 和推测的氨基酸序列

Fig. 2 cDNA and pupative amino acid sequence of *Sexi - PAP* gene



果蝇 *Drosophila melanogaster*; 埃及伊蚊 *Aedes aegypti*; 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*.

图 3 昆虫 PAP 多序列比对分析

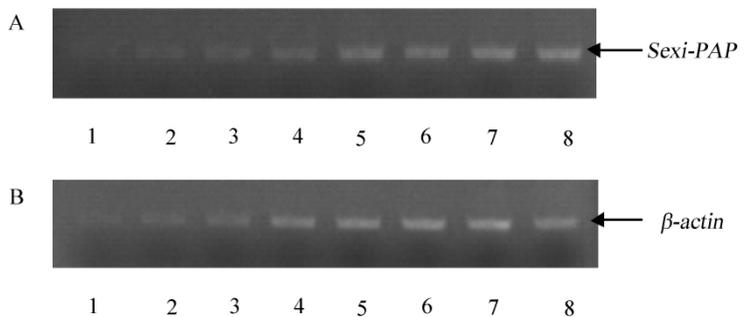
Fig. 3 Multiple alignments of Sexi - PAP with other insect PAP

能够从植物和动物体内分离出来,然而在昆虫中此类蛋白极少见于报道。本研究在华南地区危害最非常严重的蔬菜害虫甜菜夜蛾中首次克隆了紫色酸性磷酸酯酶基因的 3' 末端 cDNA ,发现该序列与埃及伊蚊 PAP 具有很高的同源性(84%) ,表明该基因在昆虫中具有很高的保守性,这为利用同源克隆方法分离此类基因提供了基础,也为研究甜菜夜蛾 PAP 基因的具体生理功能提供基因序列信息。

紫色酸性磷酸酯酶在生物体内确切的生理功能,人们至今知之甚少。在哺乳动物中,它与

骨的重吸收等功能有关<sup>[12-13]</sup>。在拟南芥中 PAP 家族有 28 个成员, PAP 参与磷营养的活动,并且它们的表达受磷饥饿诱导<sup>[14]</sup> ,且在大豆中 PAP 的分解代谢为幼苗的生长发育提供磷源等<sup>[15]</sup>。另据报道,甜菜夜蛾热激蛋白 HSP90 在极端高温 43 ℃、45 ℃ 的条件下,表达量与常温相比显著提高,并且推测 45 ℃ 是甜菜夜蛾幼虫能忍受的极限高温<sup>[16]</sup>。本研究首次报道了在甜菜夜蛾中 PAP 的表达受高温的影响。在 25 ℃ 正常温度下, PAP 的表达水平处于较低的水平,而在 30 ℃ 热胁迫 20 h 后,其表达量显著升高,且与 35 ℃ 和 40 ℃ 处理 20 h 相比,其表达量都显著升高。这不仅表明 PAP 在甜菜夜蛾抗高温中有明显的作用,同时也说明甜菜夜蛾幼虫在 30 ℃ 时 PAP 在昆虫体内的表达已经达到一定的临界值,据此也明确了高温能诱导甜菜夜蛾幼虫体内 PAP 表达量增加的温度范围。

一般认为,高温使昆虫细胞骨架瓦解,细胞遭到破坏;细胞膜内磷脂组分比例改变,细胞膜流动性下降,甚至导致重要遗传物质 DNA 和 RNA 复杂的二级结构和三级结构在高温下发生改变<sup>[17]</sup>。本文初步证实了高温能显著诱导紫色酸性磷酸酯酶基因的表达,我们进一步推测认为 PAP 参与了甜菜夜蛾高温伤害的生理生化路径或是其产生耐热性的生化基础,但是其具体的生理功能还有待深入研究。

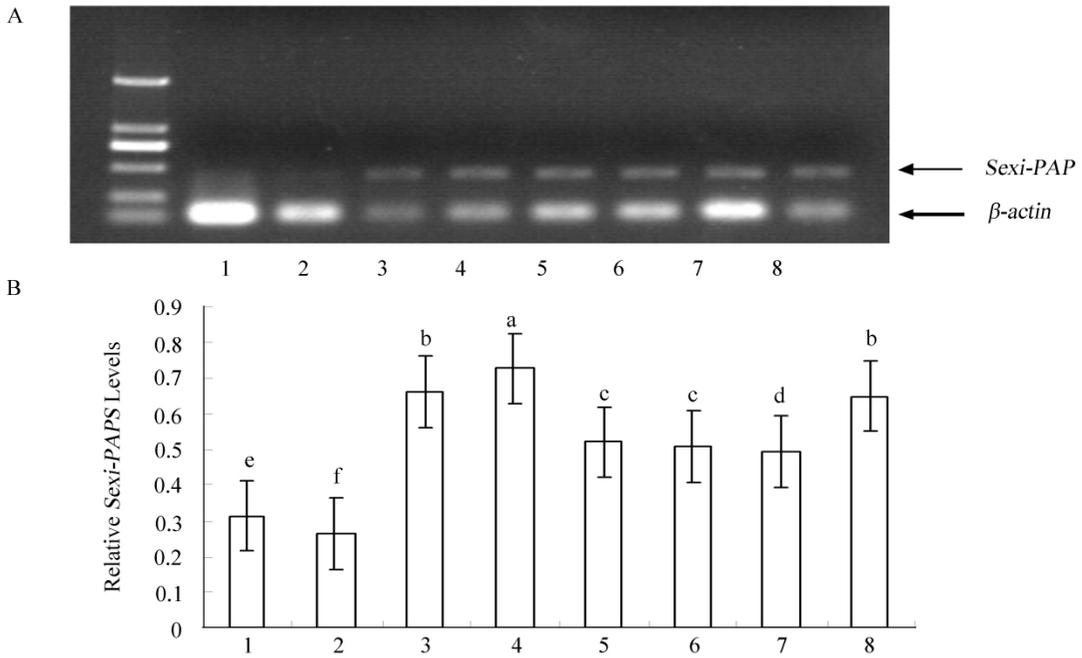


A. PAP PCR 结果: 1 ~ 8, 24、25、26、27、28、29、30、31 个循环; B.  $\beta$  - actin PCR 结果: 1 ~ 8, 24、25、26、27、28、29、30、31 个循环。

A. PCR product of PAP: 1 ~ 8, 24、25、26、27、28、29、30、31 cycles; B. PCR product of  $\beta$  - actin: 1 ~ 8, 24、25、26、27、28、29、30、31 cycles.

图 4 Sexi - PAP 和  $\beta$  - actin 平台期循环数电泳分析

Fig. 4 Electrophoresis result of Sexi - PAP and  $\beta$  - actin plateau cycles



A: 甜菜夜蛾 *PAP* 基因与内参基因  $\beta$ -actin 的相对表达量; B: 甜菜夜蛾 *PAP* 基因相对表达量灰度值的统计学分析。

横坐标 1-8: 25 °C 处理 10 h 25 °C 处理 20 h 30 °C 处理 10 h 30 °C 处理 20 h 35 °C 处理 10 h 35 °C 处理 20 h 40 °C 处理 10 h 40 °C 处理 20 h。纵坐标: 甜菜夜蛾 *PAP* 基因相对灰度值, 其中 a、b、c、d、e、f 表示不同处理间的显著差异性 ( $P < 0.05$ )。

A: The relative expression of *Sexi-PAP* gene and  $\beta$ -actin; B: Vertical scales show the relative grey value of *Sexi-PAP* relative to  $\beta$ -actin.

Horizontal data 1 ~ 8 represented the eight treated stages of *Spodoptera exigua*, treating at 25 °C for 10 h, 20 h; treating at 30 °C for 10 h, 20 h; treating at 35 °C for 10, 20 h; treating at 40 °C for 10 h, 20 h, respectively. Longitudinal data: The relative gray value of *Sexi-PAP* gene, a b c d e f represented significant differences of different treatments ( $P < 0.05$ ).

图 5 甜菜夜蛾 *PAP* 基因表达的半定量分析

Fig. 5 RT-PCR analysis showed the expression of *Sexi-PAP*

本试验在成功克隆甜菜夜蛾 *PAP* 基因的基础上, 利用半定量 RT-PCR 技术, 检测了不同温度、不同时间下 *PAP* 基因的表达水平。明确了随着高温的变化甜菜夜蛾幼虫 *PAP* 表达量的变化。同时, 阐明了 *PAP* 基因的表达与其抗高温能力之间存在一定的关系, 为今后进一步研究甜菜夜蛾抗逆境的分子机制提供基础, 同时也为从分子水平揭示甜菜夜蛾生态适应性开拓思路。

#### 参考文献:

- [1]江幸福, 罗礼智. 甜菜夜蛾抗寒与越冬能力研究[J]. 生态学报, 2001, 5(10): 1575-1582.
- [2]江幸福, 罗礼智, 李克斌, 等. 温度对甜菜夜蛾飞行能力的影响[J]. 昆虫学报, 2002, 45(2): 275-278.
- [3]韩兰芝, 翟保平, 张孝羲. 不同温度下的甜菜夜蛾实验种群生命表研究[J]. 昆虫学报, 2003, 46(2): 184-189.
- [4]王弘晟, 徐洪富, 崔峰, 等. 温度对甜菜夜蛾生殖行为及生殖力的影响[J]. 生态学报, 2004, 24(1): 162-166.
- [5]Bozzo G G, Raghothama K G, Plaxton W C. Purification and characterization of two secreted purple acid phosphatase isozymes from phosphate-starved tomato (*Lycopersicon esculentum*) cell cultures[J]. Eur J Biochem 2002, 26(9): 6278-6287.
- [6]Delpozo J C, Allona I, Rubiov et al. At type 5 acid phosphatase gene from *Arabidopsis thaliana* induced by phosphate starvation and by some other types of phosphate mobilizing/oxidative stress conditions[J]. Plant J, 1999, 19(5): 579-589.
- [7]Cashikar A G, Kumaresan R, Rao N M. Biochemical characterization and subcellular localization of the red kidney bean purple acid phosphatase[J]. Plant Physiol, 1997, 114: 907-915.
- [8]Lu K. Screening of Phosphorus-efficient *Brassica napus* genotype, and cloning, expression and molecular evolution of *Brassica PAP12* and *PAP17* Gene Families[D]. Chongqing: Southwest University, 2008.
- [9]LI D P, ZHU H F, LIU K F, et al. Purple acid phosphatases of *Arabidopsis thaliana*. Comparative analysis and differential

- regulation by phosphate deprivation [J]. *J Biol Chem* 2002 277(31): 27772 – 27781.
- [10] Sambrook J, Ritsch E F, Aniaty T. *Molecular cloning: A laboratory manual* [M]. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [11] 望天志, 吴鼎泉, 黄在银 等. 紫色酸性磷酸酯酶模型化合物水解 ATP 的研究 [J]. *物理化学学报* 1997 13(7): 644 – 646.
- [12] Lang P, Schultzberg M, Andersson G. Expression and distribution of tartrate-resistant purple acid phosphatase in the rat nervous system [J]. *J Histochem Cytochem*, 2001 49(3): 379 – 396.
- [13] EK-rylander B, Barkhen T, Ljusberg J et al. Comparative studies of rat recombinant purple acid phosphatase and bone tartrate-resistant acid phosphatase [J]. *Biochem J*, 1997 32(1): 305 – 311.
- [14] 李东屏, 王道文. 3 个拟南芥紫色酸性磷酸酯酶的 cDNA 克隆及体外表达 [J]. *湖南师范大学: 自然科学版* 2003, 26(3): 78 – 82.
- [15] Hegeman C E, Grabau E A. A novel phytase with sequence similarity to purple acid phosphatases is expressed in cotyledons of germinating soybean seedlings [J]. *Plant Physiol*, 2001, 126(4): 598 – 608.
- [16] 翟会芳, 江幸福, 罗礼智. 甜菜夜蛾 *HSP90* 基因克隆及高温胁迫下其表达量的变化 [J]. *昆虫学报* 2010, 53(1): 20 – 28.
- [17] 杜尧, 马春森, 赵清华 等. 高温对昆虫影响的生理生化作用机理研究进展 [J]. *生态学报* 2007 27(4): 1565 – 1572.
- 

(上接第 444 页)

- [8] 郭开宇, 赵谋明. 甲壳素/壳聚糖的研究进展及其在食品工业中的应用 [J]. *食品与发酵工业* 1999 26(1): 59-63.
- [9] 吴友根, 陈金印. 壳聚糖与果蔬保鲜生理生化效应的研究进展 [J]. *安徽农业科学* 2002 30(6): 856-868.
- [10] 郭振楚. 甲壳素研究进展 [J]. *日用化学工业* 1997(2): 29-38.
- [11] 胡文玉, 吴姣莲. 壳聚糖的性质和用途及其在农业上的应用前景 [J]. *植物生理学通讯* 1994 30(4): 294-296.
- [12] 单春会, 董军茂, 冯世江. 壳聚糖及其衍生物涂膜保鲜果蔬的研究现状与展望 [J]. *中国食品与营养* 2004(12): 29-31.
- [13] 夏文水, 陈洁. 甲壳素和壳聚糖的化学特性及其应用 [J]. *无锡轻工业学院学报* 1994 13(2): 162.
- [14] 秦卫东. 壳聚糖及其在食品加工中的应用 [J]. *江苏食品与发酵* 1998(2): 30.
- [15] Krochta J M. Control of mass transfer in food with edible-coating and films [J]. *Advance in Food Engineering*, 1992: 517-536.
- [16] 朱子华, 何贵友, 盛恒彬. 壳聚糖及其在果蔬保鲜上的应用机理 [J]. *河南林业科技* 2005 25(1): 7-10.
- [17] 曹健康, 姜微波, 赵玉梅. 果蔬采后生理生化实验指导 [M]. 北京: 中国轻工业出版社 2007.
- [18] 李合生. *植物生理生化实验原理和技术* [M]. 北京: 高等教育出版社 2000.
- [19] 林玲, 陈金印. 壳聚糖处理对“杨小-2 $\beta$ ”南丰蜜桔果实采后生理及贮藏效果的影响 [J]. *江西农业大学学报* 2010, 32(1): 45-50.
- [20] 曾荣, 李平, 陈金印. 天然保鲜剂处理对贮藏中猕猴桃果实品质的影响 [J]. *江西农业大学学报* 2004 26(4): 611-615.