

大豆食心虫非典型气味受体基因克隆及发育期表达分析

王 宇^{1,2}, 钱 华¹, 姜欣欣³, 张玉磊¹, 苏 戈⁴, 韩岚岚², 赵奎军²

(1. 黑龙江省农业科学院 农化研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 东北农业大学 农学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 3. 东北农业大学 水利与建筑学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 4. 黑龙江农业科学院 信息中心, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘 要:非典型气味受体是昆虫嗅觉识别过程中重要的蛋白之一。本研究利用 RT-PCR 和巢式 PCR 的方法克隆了大豆食心虫非典型气味受体 Olfactory co-receptor 基因, 命名为 *LglyOrco*, 其编码区为 1 419 bp, 编码 473 个氨基酸, 氨基酸序列中存在 3 个 N 位糖基化位点, 分子量为 53.5 kD, 等电点为 7.12, 含 7 个跨膜结构以及 4 个位于细胞膜外的亲水区, 符合气味受体的典型结构特征。与鳞翅目已知昆虫的 *Orco* 同源性达到 89% 以上。不同发育期 *LglyOrco* 表达量分析表明, *LglyOrco* 在二龄和三龄幼虫中的表达量是一龄幼虫的 4~5 倍, 在四龄和五龄幼虫中的表达量是一龄幼虫的 70% 和 50%, 而在雌性成虫中的表达量是雄性成虫中的 11 倍。本研究将为大豆食心虫的嗅觉识别系统和大豆食心虫防治技术研究提供理论依据。

关键词:大豆食心虫; 嗅觉受体; 基因克隆; 序列分析; 发育期表达量

中图分类号: Q963 **文献标识码:** A **DOI:** 10.11861/j.issn.1000-9841.2016.01.0124

Cloning and Developmental Stages Expression of the Olfactory Co-receptor Gene in *Leguminivora glycinivorella* (Lepidoptera: Olethreutidae)

WANG Yu^{1,2}, QIAN Hua¹, JIANG Xin-xin³, ZHANG Yu-lei¹, SU Ge⁴, HAN Lan-lan², ZHAO Kui-jun²

(1. Agricultural Chemistry Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China; 2. Agronomy College of Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 3. Water Conservancy and Civil Engineering College of Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 4. Information Center of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China)

Abstract: Olfactory co-receptor is one of the most important proteins in the process of insect identify system. In this study we cloned and analyzed an olfactory coreceptor of *L. glycinivorella*, which was named *LglyOrco*. The results showed that the full-length open reading frame of *LglyOrco* was 1 419 bp, encoding 473 amino acid residues and 3 N-glycosylation sites. The molecular weight of *LglyOrco* was 53.5 kDa and isoelectric point was 7.12. Blast searching in NCBI showed that the deduced amino acid sequence was highly similar with that of other *Orcos* of *Lepidoptera* with acid sequence identities above 89%. *LglyOrco* expression in second and third instar larva were 3 to 4 times higher than the first instar larva, forth and fifth instars larva were only 70% and 50% of the first instar larva respectively. The expression of *LglyOrco* was 10 times higher in the female adult than in the male adult. This study provides theoretical basis to the researching of *L. glycinivorella* identify system and control technique of *L. glycinivorella*.

Keywords: *Leguminivora glycinivorella*; Olfactory receptor; Gene clone; Sequence analysis; Expression quantity of developmental stages

昆虫在生存繁衍过程中的寄主定位、识别、取食、觅偶、交配、繁殖、栖息、防御与迁移等行为的调控,离不开其灵敏而复杂的嗅觉识别系统对环境中的化学气味分子的识别判断^[1]。昆虫感知和鉴别环境中成千上万种含量极低的化学信号的捕获、运输和嗅觉受体的激活,除了初步过滤和识别气味的气味结合蛋白(odorant binding proteins, OBP),与嗅觉神经的专一性结合的气味受体(odorant receptors, Ors)也起重要的作用^[2-10]。昆虫气味受体是具有 7 个跨膜结构域的膜蛋白,其位于嗅觉受体神经元树突的膜上^[11]。结构与脊椎动物和线虫的 OR 的拓扑结构正好相反,即 N 末端在膜内, C 末端在膜外^[12]。

昆虫的气味受体可以分成两大类:一类为传统的气味受体(conventional odorant receptors, CORs),在同种昆虫和不同种昆虫之间其序列高度分化,同

源性很低;另一类气味受体为非典型气味受体(olfactory receptor coreceptor, Orco),其氨基酸序列和功能在不同昆虫间高度保守,最早在果蝇中发现,命名为 OR83b,后来在多种昆虫中陆续被鉴定^[13]。与传统气味受体不同,Orco 广泛表达于各类嗅觉神经细胞,本身并无感受气味的功能,在大多数的嗅觉神经元中它必须与传统气味受体形成二聚,协助传统气味受体感受气味分子的功能^[14-17]。因此,非典型气味受体的深入研究对阐明嗅觉识别机制十分重要。

大豆食心虫(*Leguminivora glycinivorella*)属昆虫纲鳞翅目小卷蛾科,是一种单食性害虫,主要为害大豆,一年仅发生 1 代,7 月下旬至 8 月初化为蛹盛期,8 月上、中旬为羽化盛期,幼虫孵化后多从豆荚边缘缝合处蛀入咬食豆粒,8 月下旬为入荚盛期,9 月中、下旬脱荚入土越冬。大豆食心虫不仅造成大

收稿日期:2015-08-16
基金项目:黑龙江省农业科技创新工程(2012ZD035)。
第一作者简介:王宇(1981-),男,博士,主要从事有害生物防治和综合治理研究。E-mail: wangyuryan@163.com。
通讯作者:赵奎军(1960-),男,博士,教授,主要从事害虫生物防治与综合治理研究。E-mail: kjzhao@163.com。

豆产量下降而且严重影响大豆品质,常年虫食率10%,严重时可达30%~50%。目前防治大豆食心虫使用的化学农药不仅毒性大,而且污染严重,通过干扰大豆食心虫化学通讯对其进行防治可以避免化学农药带来的危害。因此,本研究以大豆食心虫为试验材料,采用RT-PCR和巢式PCR的方法得到大豆食心虫嗅觉系统中起到重要作用的非典型气味受体 *Orco* 基因序列,并通过实时定量PCR方法对 *LgIyOrco* 基因在生长发育阶段表达谱进行分析,以期进一步了解大豆食心虫气味受体 *Orco* 在嗅觉识别中的作用,为研究大豆食心虫嗅觉机理提供理论依据,同时为寻求新的害虫防治技术奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 昆虫来源 大豆食心虫成虫采自东北农业大学香坊农场大豆田,待幼虫蛀入豆荚后收集豆荚中一龄幼虫、二龄幼虫、三龄幼虫、四龄幼虫、五龄幼虫、雌性成虫和雄性成虫,液氮中冷冻,−80℃保存备用。

1.1.2 菌株与质粒 载体 pEASY-T1 和大肠杆菌感受态细胞 *Trans*-T1 均购自全式金公司。

1.1.3 主要试剂 TRIzol® Reagent 购自 Invitrogen 公司;ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (FSQ-301) 反转录试剂盒和 THUNDER-BIRD® SYBR qPCR Mix (Code: QPS-201) 荧光定量试剂盒购自东洋纺 (TOYOBO) 生物科技有限公司;反转录酶 M-MLV Reverse Transcriptase 购自普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司;PCR 引物由哈尔滨博仕生物技术有限公司合成;Easy Taq DNA 聚合酶、质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒均购自北京全式金生物技术有限公司;其它试剂为国产或进口分析纯试剂,测序工作由华大基因公司完成。

1.2 方法

1.2.1 大豆食心虫各组织总 RNA 的提取和 cDNA 的合成 分别取大豆食心虫不同发育时期虫体用液氮研磨后,采用 Trizol 方法提取总 RNA,经电泳与分光光度计检测后,进行反转录获得第一链 cDNA,−20℃保存备用。

1.2.2 大豆食心虫 *Orco* 基因全长 cDNA 序列的克隆 以大豆食心虫触角 cDNA 为模板,与已报道的鳞翅目昆虫非典型气味受体蛋白基因的 cDNA 序列对比,根据保守区设计引物 *Orco*-F 和 *Orco*-R 扩增大豆食心虫 *Orco* 基因片段。PCR 反应条件:94℃预变性 5 min;94℃ 30 s,55℃ 60 s,72℃ 45 s,35 个循环;72℃延伸 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后切胶回收纯化,连接到 pEASY-T1 载体并测序。根据获得的大豆食心虫 *Orco* 基因保守区片段和在 cDNA 反转录过程中在 3' 末端加入的序列 Ro-Ri 设计 3' 引物 *Orco*-3' outer 和 *Orco*-3' inner,再利用已知鳞翅目昆虫 *Orco* 基因和已获得的基因片段设计大

豆食心虫的 *Orco* 基因开放读码框引物。将 RCR 产物切胶回收纯化,连接到 pEASY-T1 载体,然后转入大肠杆菌 *Trans*-T1 并测序,获得大豆食心虫 *Orco* 的全长 cDNA 序列。根据荧光定量引物设计原则,设计荧光定量引物 *Orco*RT-F 和 *Orco*RT-R,以 18S rRNA-F 和 18S rRNA-R 作为荧光定量的内参基因的上下游引物。引物序列如表 1 所示。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study	
引物名称 Primer	引物序列 Sequences of primers
<i>Orco</i> -F	5'-CACTATGGAACCACTCGAACAG-3'
<i>Orco</i> -R	5'-ACCAACATGTGGAACAGCAG-3'
Ri	5'-GGATCCAAAGCTTGAATTCGAGCTCT-3'
Ro	5'-ATCGATGCTCGACGCATCGGGATCC-3'
<i>Orco</i> -3' outer	5'-GTTCTGCTCCTGGCTGATCTTCGCCCTGTG-3'
<i>Orco</i> -3' inner	5'-AACGGGTTGACTCAGAAACAGGAGAT-3'
<i>Orco</i> F-F	5'-ATGATGGGTAAAGTAAATCTCAGG-3'
<i>Orco</i> F-R	5'-CTTCAGTTGTACCAACACCATGAAGTAGG-3'
<i>Orco</i> RT-F	5'-GTGGCGTCCATAGGAGATACT-3'
<i>Orco</i> RT-R	5'-CTCAATAAGCCTGTTACCGAAGATA-3'
18S rRNA-F	5'-ATTGACGGAAGGGCACC-3'
18S rRNA-R	5'-CGCTCCACCAACTAAGAACG-3'

1.2.3 序列分析 应用 BioEdit 软件将所得到的 DNA 序列翻译成蛋白质序列,从 GenBank 数据库检索并下载昆虫非典型气味受体的基因序列,比较大豆食心虫与其它昆虫非典型气味受体基因的氨基酸序列一致性。序列比对使用 DNAMAN 软件;进化树构建使用 MEGA 4.0 软件中的 Neighbor joining 法。应用 ClustalX 和 MEGA 4.0 进行序列对比并建立系统发育树。利用 <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/> 网站对 *LgIyOrco* 跨膜结构分析。

1.2.4 大豆食心虫 *Orco* 基因不同发育期表达量分析 用大豆食心虫非典型气味受体基因特异性引物 *Orco*RT-F 和 *Orco*RT-R (表 1) 进行 PCR 扩增。以大豆食心虫 18S rRNA 基因作为内参基因引物 18S rRNA-F 和 18S rRNA-R (表 1)。qRT-PCR 检测大豆食心虫 *Orco* 基因的转录表达水平进行检测,PCR 反应在实时荧光定量 PCR 仪 LineGene 9620 上进行。荧光定量 PCR 反应体系为:THUNDERBIRD SYBR® qPCR Mix 5 μL,上下游特异性引物或内参基因 18S rRNA 引物 (10 mmol·L⁻¹) 各 0.6 和 2 μL cDNA 模板超纯水补足至 10 μL,反应条件为 95℃ 预变性 1 min,95℃ 15 s,55℃ 30 s,72℃ 30 s,45 个循环,空白对照模板以 ddH₂O 代替,所有样品均为 3 个重复。不同虫龄以 *Orco* 基因在一龄幼虫中的表达量为标准参量。

1.2.5 数据统计与分析 用 2^{-ΔΔC_t} 方法比较大豆食心虫 *Orco* 基因在各发育期相对表达量^[18]。

2 结果与分析

2.1 大豆食心虫 *Orco* 基因的克隆及编码蛋白特性分析

以大豆食心虫触角 cDNA 第一链为模板,*Orco*-

F 和 Orco-R 为引物扩增获得 673 bp 的大豆食心虫 *Orco* 的片段,*Orco*-3outer 和 Ro 及 *Orco*-3inner 和 Ri 两对引物扩增获得 713 bp 的 3' 片段,根据拼接后序列设计出全长序列下游引物 ORF-R,再根据已知鳞翅目 *Orco* 基因全长设计出全长序列上游引物 ORF-F,再利用全长引物扩增得到大豆食心虫 *Orco* 基因 cDNA 序列。克隆得到的大豆食心虫 *Orco* 基因包括一个由1 419个碱基组成的完整的开放读码框,编码 473 个氨基酸组成的多肽(图 1),分子量 53.5 kD,等电点为 7.12。同时发现大豆食心虫 *Orco* 的氨基酸序列中存在 3 个 N 位糖基化位点。跨膜结构分

析表明大豆食心虫 *Orco* 基因编码的多肽含有 7 个跨膜区域,除第 1 个长度为 20 个氨基酸外,其余长度都为 23 个氨基酸,N 末端在细胞膜内,C 末端在细胞膜外(图 2),每两个跨膜结构域之间都含有一段在细胞膜外的亲水序列,它们的氨基酸顺序分别为第 66~74、159~193、357~375、470~473 位氨基酸,且在第 159~193 位氨基酸序列处的亲水序列是最长的(图 1、图 2)。大豆食心虫 *Orco* 的 7 个跨膜特征符合气味受体的典型结构特征,由此推断该基因为 *Orco* 家族的一种 *Orco* 基因,该序列命名为 *LglyOrco*。

```
1  ATGATGGGTAAGTGAAATCTCAGGGCCTTGTGTCGACTTGATGCCAAACATCAAGCTGATGCAAAATGGCCGGA
1  M M G K V K S Q G L V S D L M P N I K L M Q M A G
76  CATTTCTATTTAATACACCGAAGAACCGGTGGCATGTTCATTGCTGCTCCGTAAGGTCTACGCCTCAATGCAT
26  H F L F N Y T E E T G G M S L L L R K V Y A S M H
151 GCCTTCCTCATCGTCATCAACTTCATCTGCAATGGGCATCAACATGGCTCAGTACCTCCGAGGAGTCAATGAGCTC
51  A F L I V I N F I C M G I N M A Q Y S E E V N E L
226 ACCGCCAACACTATCACGGTCTTGTCTTCGCTCACACCATTATCAAGCTGGCCTTCTTTCGCATCAACTCTAAG
76  T A N T I T V L F F A H T I I K L A F F A I N S K
301 AGCTTCTATAGGACTTTGGCAGTATGGAACCAAGTCGAACAGCCACCGCTGTTTCACGGAGTCCGATGCTAGGTAC
101 S F Y R T L A V W N Q S N S H P L F T E S D A R Y
376 CACCAGTATCGCTTGACAAGAGCCGTCGACTTCTGTACTTCATCTGTGGTACCACCTGCCTCTCTGTTGTCAGC
126 H Q L S L D K S R R L L Y F I C G T T C C L S V V S
451 TGGGTGACGCTCACATTTTTTCGCGAGTCTGTCCGCTAATTGCCGACAAGGAGAGTAAATGAGACCCCTCACTGAG
151 W V T L T F F G E S V R L I A D K E S N E T L T E
526 CCAGCTCCAGGCTCCCGTAAAGGCTGGTACCCCTTCGACGCTATGGTGGGACCATGTACATGGTGGCTTTC
176 P A P R L P L K A W Y P F D A M G G T M Y M V A F
601 GTTTATCAGATCTACTGGCTCCTATTCTCCATGTTGATGCCAATCTCATGGATGTCATGTTCTGCTCCTGGCTG
201 V Y Q I Y W L L F S M L I A N L M D V M F C S W L
676 ATCTTCGCCTGTGAGCAACTCCAGCACCTCAAGGCCATCATGAAGCCGCTCATGGAGCTCAGCGCTGCTCTGGAC
226 I F A C E Q L Q H L K A I M K P L M E L S A A L D
751 ACGTACCGCCCTAATACTGCTGAGCTGTTCAAGGCATCTTCTACTGAAAAGTCTGAAAAGTCCAGAACCTACA
251 T Y R P N T A E L F R A S S T E K S E K V P E P T
826 GACATGGACATTCGGGGTATATACTCAACGCAGCAGGATTTCGGCATGATGCTGAGAGGCGCCGGGGGTAGACTG
276 D M D I R G I Y S T Q Q D F G M M L R G A G G R L
901 CAGAACTTCAACTCTCCCAATCCAAACCCGAACGGGTTGACTCAGAAACAGGAGATGTTGCCAGGTCCGCTATC
301 Q N F N S P N P N P N G L T Q K Q E M L A R S A I
976 AAGATTGGGTGGAACGACATAAGCAGCTTGTGAGACTGGTGGCGTCCATAGGAGATACTATGCTACTGCTCTA
326 K Y W V E R H K H V V R L V A S I G D T Y G T A L
1051 CTGTTTCACATGTTGGTTTCAACCATCACGCTTACACTTCTGGCTTATCAAGCGACAAAGATCGATGGTCTCAAC
351 L F H M L V S T I T L T L L A Y Q A T K I D G L N
1126 GTGTATGATTCAGCACAAATCGATATCTCAGTTACACTCTGGGCGAGGTGTTCCATTCTGTATCTTCGGTAAC
376 V Y A F S T I G Y L S Y T L G Q V F H F C I F G N
1201 AGGCTTATTGAGGAGATTATCAGTGATGGAAGCAGCATACTCTGCCAATGGTACGACGGTCTGAAGAGGCC
401 R L I E E S S S V M E A A Y S C Q W Y D S E E A
1276 AAGACCTTCGTCCAGATTGTGTGCCAGCAATGTCAAAGGCTATGAGCATCTCAGGAGCCAAGTCTTTACGGTT
426 K T F V Q I V C Q Q C Q K A M S I S G A K F F T V
1351 TCATTGGATCTGTTTGCTTCTGTACTTGGCGCTGTCGTACCTACTTCATGGTGTGGTACAACCTGAAGTAGATG
451 S L D L F A S V L G A V V T Y F M V L V Q L K *
1426 CCATCGAAATCGTCAAAGGCAACTTACAAATACAAATTGTACCTTCGAGTCTGCTGAATGAAGTATTTGCCACTT
1501 TGAGGTTGTTGAAAAGTGTAAAGCAGTGACGTACGTATGATTAATTGTACTTGTATGAAATTAATAGGTAGTG
1576 AAAATGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAG
```

起始密码子 ATG 和终止密码子 TAG 用粗体标出;N-位糖基化位点用阴影表示;下划线序列是 7 个跨膜区;左侧的序号代表核苷酸和氨基酸位置。

The translation initiation codon ATG and termination codon TAA are in bold; N-glycosylation sites are indicated by shading; The seven transmembrane domains are underlined.

图 1 大豆食心虫 *Orco* 基因 cDNA 序列及编码氨基酸序列
Fig. 1 Nucleotide and coded amino acid sequence of *LglyOrco*

2.2 *LglyOrco* 与其它昆虫 *Orco* 基因编码氨基酸序列同源性分析

为了研究 *LglyOrco* 与其它已知鳞翅目昆虫的进化关系,选取 17 种已知鳞翅目昆虫的 *Orco* 基因,采

用 MEGA 4.0 软件中的邻位相连法 Neighbor-joining 进行1 000次重复计算后构建系统进化树(图 3)。结果发现大豆食心虫 *Orco* 与其它鳞翅目昆虫的 *Orco* 嗅觉受体具有很高的相似性,与苹果蠹蛾 *Cpo*-

mOrco 序列的一致性高达 96%,与蛾科昆虫 *Din-dOrco* 和卷蛾科 *CmedOrco*、*HassOrco* 的一致性分别为 91% 和 90%,与鳞翅目的一致性达到 89% 以上,且所有蛋白序列在 C 端均含有 1 个高度保守的区域(图 4)。由此可见昆虫的 *Orco* 受体家族基因有很强的同源性及高保守性,是一类与传统 *Ors* 不同的非常保守的基因^[19]。

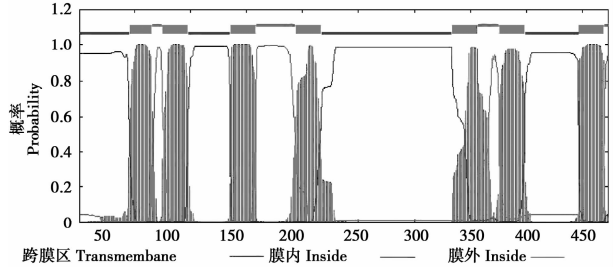
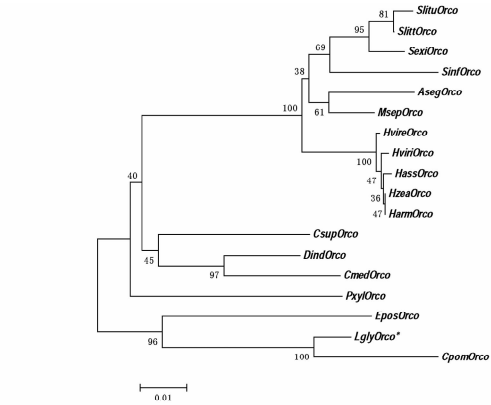


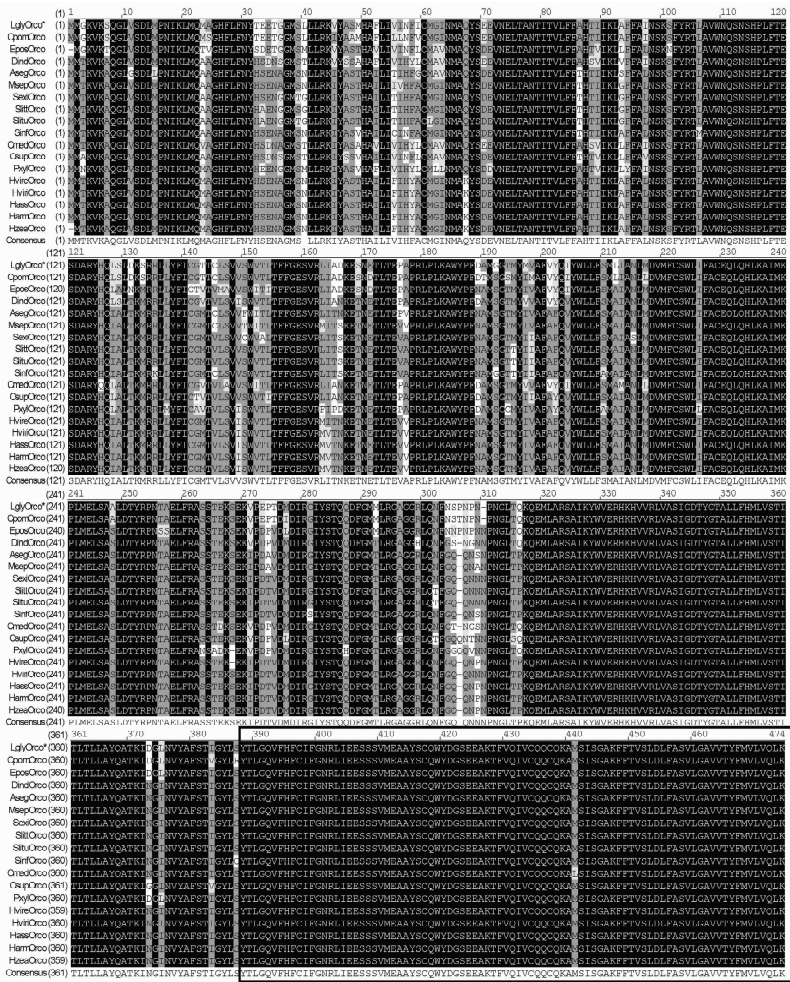
图 2 大豆食心虫 *LglyOrco* 的跨膜结构预测结果
Fig. 2 Predicted transmembrane domains of *LglyOrco* in *L. glycinivorella*



*LglyOrco** 序列是本研究克隆的大豆食心虫 *Orco* 基因氨基酸序列;左侧线段表示昆虫 *Orco* 之间的亲源关系。
*LglyOrco** indicates amino acid sequence deduced by *LglyOrco*; Left lines indicate the genetic relationship between insects *Orcos*.

图 3 *LglyOrco* 与其它昆虫非传统型气味受体氨基酸序列系统进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree based on amino acid sequences of *LglyOrco* and atypical *Orcos* of other insects



*LglyOrco** 序列是本研究克隆的大豆食心虫 *Orco* 基因推导的氨基酸序列;黑色表示氨基酸序列完全相同者;深灰色表示氨基酸序列大部分相同者;浅灰色表示氨基酸序列少数相同者;无色表示氨基酸序列完全不同者;黑框为 C 端高度保守区域。

*LglyOrco** sequence is amino acid sequence deduced by the *LglyOrco*; Black shape indicate amino acid sequence identical completely; Dark gray shape indicate amino acid sequence identical mostly; Light grey shape indicate amino acid sequence identical few; Colorless indicate amino acid sequence different completely; Black box indicate highly conserved region in the C-terminal.

图 4 *LglyOrco* 与其它已知鳞翅目昆虫 *Orco* 氨基酸序列的对比
Fig. 4 Comparison of amino acid sequences of *LglyOrco* with other *Lepidoptera* insects

2.3 *LglyOrco* 基因在大豆食心虫不同发育时期的表达量分析

研究大豆食心虫 *LglyOrco* 基因在不同发育时期的表达情况(图 5)。以一龄大豆食心虫幼虫的表达量为基准,在二龄幼虫、三龄幼虫中的表达量分别是一龄幼虫的四倍和五倍,而四龄幼虫和五龄幼虫达到一龄幼虫的 70% 和 50% 左右。雌性成虫中的表达量是雄性成虫的 11 倍。

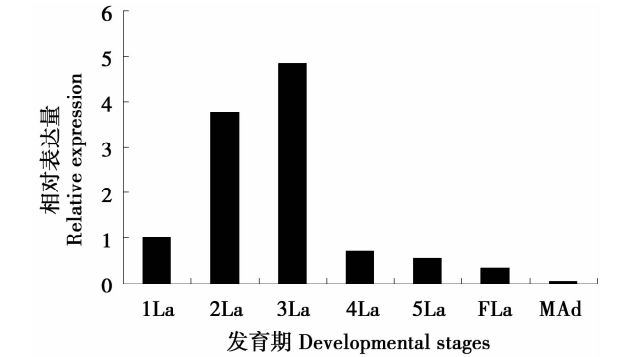


图 5 *LglyOrco* 在不同发育时期的相对表达情况
Fig. 5 Relative expression level of *LglyOrco* at different stages of *L. glycinivorella*

3 结论与讨论

本研究利用 RT-PCR 和 RACE 方法克隆了大豆食心虫非典型气味受体基因 *LglyOrco* 的 cDNA 序列,其编码区为 1 419 bp,编码 473 个氨基酸,分子量为 53.5 kD,等电点为 7.12,*Orco* 基因的氨基酸序列中存在 3 个 N 位糖基化位点。含有 7 个跨膜结构的气味受体典型特征,其中 N 端在细胞膜内,C 端在细胞膜外的亲水区,与果蝇嗅觉受体的结构一致^[12],符合 *Orco* 亚家族基因特征^[20]。与已知鳞翅目昆虫的同源性达到 89% 以上,其编码的蛋白质 C 端序列高度保守,特别是在跨膜区 6 之后的氨基酸序列。已经在黑腹果蝇中证实,这段保守序列在传统受体和 *Orco* 相互作用时起着非常重要的作用^[12,21-22]。在果蝇中已经证实了该基因的突变可能导致嗅觉缺失,新陈代谢改变,抗逆性增强以及寿命延长,表明该受体在昆虫进化过程中对其正常生存起到至关重要的作用^[23-24]。

通过对其发育期表达谱分析发现 *LglyOrco* 基因在二龄幼虫和三龄幼虫中的表达量是一龄幼虫的 4~5 倍,在四龄幼虫和五龄幼虫中的表达量只有一龄幼虫的 70% 和 50% 左右,而在雌性成虫中的表达量是雄性成虫的 11 倍。与瓜实蝇嗅觉受体 Or83b-like 在幼虫阶段表达量极低结果略有不同^[25],推测 *LglyOrco* 基因在前 3 龄幼虫的表达量高与其蛀莢时期有关。在后期干扰研究中可将二龄幼虫和三龄

幼虫作为干扰的最佳时期,使该基因在高表达量时沉默,进而利用干扰该基因防治大豆食心虫。同时,本文克隆的大豆食心虫的 18S 基因为看家基因,可在研究其它大豆食心虫基因时作为定量分析的内参基因使用。

本研究克隆了大豆食心虫非典型气味受体基因 *LglyOrco*,并对该基因在幼虫不同发育阶段的表达情况进行了分析,为进一步研究 *Orco* 的功能和昆虫化学通讯分子机制研究奠定了基础,也为利用嗅觉识别系统开发新技术和新方法防控大豆食心虫病害提供理论依据。

参考文献

- [1] 王宇. 苜蓿夜蛾和大豆食心虫气味感受相关蛋白基因的克隆分析及表达[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2012. (Wang Y. Molecular cloning, analysis and expression of olfactory genes of *Heliothis virescens* and *Leguminivora glycinivorella* [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2012)
- [2] Vogt R G, Riddiford L M. Pheromone binding and inactivation by moth antennae[J]. Nature, 1981, 293: 161-163.
- [3] 张林雅,谢冰花,倪翠侠,等. 中华蜜蜂 *Orco* 嗅觉受体基因的克隆、表达及亚细胞定位[J]. 昆虫学报, 2012, 55(11): 1246-1254. (Zhang L Y, Xie B H, Ni C X, et al. Cloning, expression and subcellular localization of the olfactory coreceptor *Orco* gene in the Chinese honeybee, *Apis cerana* (Hymenoptera: Apidae)[J]. Acta Entomologica Sinica, 2012, 55(11): 1246-1254.)
- [4] Wang G R, Guo Y Y, Wu K M. Molecular cloning, bacterial expression of pheromone binding protein in the antenna of *Helicoverpa armigera* (Htnbner) [J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 2004, 57(1): 15-27.
- [5] Clyne P J, Warr G G, Freeman M R, et al. A novel family of divergent seven transmembrane proteins: Candidate odorant receptors in *Drosophila* [J]. Neuron, 1999, 22(2): 327-338.
- [6] Vosshall L B, Amrein H, Morozov P S, et al. A spatial map of olfactory receptor expression in the *Drosophila* antenna [J]. Cell, 1999, 96: 725-736.
- [7] Hill C A, Fox A N, Pitts R J, et al. G protein-coupled receptors in *Anopheles gambiae* [J]. Science, 2002, 298(5591): 176-178.
- [8] Rogers M E, Jani M K, Vogt R G. An olfactory-specific glutathione-S-transferase in the sphinx moth *Manduca sexta* [J]. The Journal of Experimental Biology, 1999, 202: 1625-1637.
- [9] Wang G R, Guo Y Y, Wu K M. Cloning of cDNA fragment of an antennal-specific gene in *Helicoverpa armigera* (Htnbner) [J]. Chinese Journal of Agricultural Biotechnology, 2004, 1(1): 1-7.
- [10] Wang Y, Han L L, Wang S, et al. Molecular cloning and sequence analysis of an *Or83b* cDNA from antenna of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuoidea) [C]. 2012 International Conference on Biomedical Engineering and Biotechnology, 2012, 1562-1565.
- [11] Pelosi P. Odorant-binding proteins [J]. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 1994, 29: 199-228.
- [12] Benton R. On the origin of smell: odorant receptors in insects [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2006, 63(14): 1579-1585.
- [13] 谷少华. 小地老虎性信息素通讯的分子和细胞机制[D]. 北

京:中国农业科学院, 2013. (Gu S H. Molecular and cellular basis of sex pheromone communication in the black cutworm moth *Agrotis ipsilon*[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2013)

[14] Krieger J, Klink O, Mohl C, et al. A candidate olfactory receptor subtype highly conserved across different insect orders[J]. Journal of Comparative Physiology A-neuroethology Sensory Neural and Behavioral Physiology, 2003, 189(7): 519-526.

[15] Larsson M C, Dominguos A I, Jones W D, et al. Or83b encodes a broadly expressed odorant receptor essential for Drosophila olfaction[J]. Neuron, 2004, 43(5): 703-714.

[16] Hallem E A, Dahanukar A, Carlson J R. Insect odor and taste receptors[J]. Annual Review of Entomology, 2006, 51: 113-135.

[17] 赵慧婷, 高鹏飞, 张桂贤, 等. 东方蜜蜂气味受体基因 *Or1* 和 *Or2* 的克隆与序列分析[J]. 应用昆虫学报, 2012, 49(5): 1117-1124. (Zhao H T, Gao P F, Zhang G X, et al. Gene cloning and sequence analysis of *Or1* and *Or2* in *Apis cerana* [J]. Chinese Journal of Applied Entomology, 2012, 49(5): 1117-1124.)

[18] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.

[19] Robertson H M, Wanner K W. The chemoreceptor superfamily in the honey bee, *Apis mellifera*: Expansion of the odorant, but not gustatory, receptor family [J]. Genome Research, 2006, 16: 1395-1403.

[20] Smart R, Kiely A, Beale M, et al. Drosophila odorant receptors are novel seven transmembrane domain proteins that can signal independently of heterotrimeric G proteins[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2008, 38(8): 770-780.

[21] Yang Y, Krieger J, Zhang L, et al. The olfactory co-receptor Orco from the migratory locust (*Locusta migratoria*) and the desert locust (*Schistocerca gregaria*): Identification and expression pattern [J]. International Journal of Biological Sciences, 2012, 8(2): 159-170.

[22] Nakagawa T, Pellegrino M, Sato K, et al. Amino acid residues contributing to function of the heteromeric insect olfactory receptor complex[J]. Plos One, 2012, 7(3): e32372.

[23] 王桂荣, 吴孔明, 苏宏华, 等. 棉铃虫嗅觉受体基因的克隆及组织特异性表达[J]. 昆虫学报, 2005, 48(6): 823-828. (Wang G R, Wu K M, Su H H, et al. Gene cloning and tissue specific expression of an olfactory receptor in *Helicoverpa armigera* [J]. Acta Entomologica Sinica, 2005, 48(6): 823-828.)

[24] Libert S, Zwiener J, Chu X W, et al. Regulation of Drosophila life span by olfaction and food derived odors[J]. Science, 2007, 315: 1133-1137.

[25] 申建梅, 胡黎明, 宾淑英, 等. 瓜实蝇嗅觉受体基因的克隆及表达谱分析[J]. 昆虫学报, 2011, 54(3): 265-271. (Shen H M, Hu L M, Bin S Y, et al. Cloning and expression profiling of an olfactory receptor gene in *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) (Diptera: Tephritidae) [J]. Acta Entomologica Sinica, 2011, 54(3): 265-271.)

黑龙江省大豆目标价格改革政策进一步完善

结合 2014 年大豆目标价格改革实施的实际情况,2015 年黑龙江省对《黑龙江省大豆目标价格改革试点工作实施方案》进行了修改和完善。省物价监管局有关人士介绍,该省现有耕地种类复杂,为增强大豆目标价格补贴政策的可操作性,减少发放补贴产生的不必要纠纷等问题,需要对大豆实际种植面积的合法性做出定义,实际种植的大豆面积中包含的非法开垦耕地不享受大豆目标价格补贴。

实施方案中,在“补贴对象”中增加了对“大豆合法实际种植面积”的定义,并明确了几种特殊情况的补贴问题。大豆合法实际种植面积是指拥有同村集体、乡级以上人民政府或有关单位(林业局、地方农牧场等)签订的土地承包、承租或开发使用合同,且用途为非林地、非草原、非湿地的耕地上实际种植的大豆面积。明确了未经过申报、公示、审核的大豆面积,在国家和省有明确退耕要求的土地上种植的大豆面积,在未经批准开垦的土地或者在禁止开垦的土地上种植的大豆面积不享受大豆目标价格补贴。

大豆目标价格改革试点能否顺利实施的关键是对种植户的合法实际种植面积能否准确核实。结合 2014 年大豆目标价格补贴发放情况,2015 年增加了大豆种植面积的核实方法、时间、公示的具体内容等内容。明确规定,各市(地)、县(市、区)政府组织统计部门于每年 6~10 月对大豆实际种植者申报的大豆种植面积开展入户调查和地块实地核实工作,并将调查核实的信息在行政村和屯进行公示。为了做好大豆种植面积调查核实工作,省政府办公厅还专门下发了《关于做好 2015 年大豆种植面积调查核实工作的通知》,对各县市调查核实工作作出部署和要求。实施方案同时对补贴资金发放时间作出具体规定,明确要求各市(地)、县(市、区)、单位在接到省级财政拨付的补贴资金后 15 日内,次年 5 月底前必须完成资金兑付工作。省物价监管局有关人士说,为了尽早发放补贴,保证农民春耕生产资金需要,国家将有可能提前拨付资金,省里也会尽量提早向下拨付资金,这样规定有利于督促市县加快发放补贴,提高补贴效率,将国家和省提早拨付资金节约的时间惠及农民。

实施方案在“补贴监管”中增加“对于弄虚作假、挤占、截留、挪用和套取补贴资金等违规行为,依照《财政违法行为处分条例》和《关于违反粮食补贴方式改革政策行为党纪政纪处分的暂行规定》有关规定依法惩处;对触犯刑律的,要依法移交司法机关追究刑事责任。对因工作不力造成不良影响和严重后果的单位和个人,要严肃问责”的内容,进一步明确对违规行为的惩处,强化问责。

转自《黑龙江日报》