

DOI:10.13718/j.cnki.zwyx.2024.06.006

苹果 OPR 基因家族鉴定及其在苹果绵蚜危害下的表达分析

高美瑞¹, 滕子文¹, 杜凌君¹, 范银君¹,
李津洋¹, 万方浩^{1,2}, 周洪旭¹

1. 青岛农业大学 植物医学学院 山东省环境友好型农业有害生物防治工程技术研究中心/
山东省生物入侵与生态安全高校特色实验室/中澳农业与环境健康联合研究院, 山东 青岛 266109;
2. 中国农业科学院 深圳农业基因组研究所, 广东 深圳 518120

摘要: 苹果绵蚜 (*Eriosoma lanigerum* (Hausmann)) 是一种重要的果树害虫, 不同苹果品种对苹果绵蚜抗性差异显著. 茉莉酸对植物抗虫有重要的作用, 12-氧-植物二烯酸还原酶 (12-oxo-phytodienoic Acid Reductase, OPR) 是控制茉莉酸合成的关键酶. 利用不同品种在苹果绵蚜危害后的转录组学和蛋白质组学分析, 研究茉莉酸代谢通路中 OPR 基因对苹果绵蚜的抗性作用. 结果表明: 通过本地 Blast 及功能域预测, 共筛选到 14 个 OPR 基因. 通过系统发育进化分析, MdOPRs 可分为 2 类, MdOPR1, MdOPR3 和 MdOPR4 与其他植物具有抗虫作用基因聚类在一起, 属于 OPR II 亚类, 其中 MdOPR1 和 MdOPR4 基因参与茉莉酸抗虫反应; 其他 11 个基因属于 OPR I 亚类, 不参与茉莉酸的抗虫反应. 通过对苹果绵蚜危害不同品种苹果树转录组以及蛋白组数据分析, 转录组筛选出 5 个有显著性差异的基因, 从在不同品种中的表达量来看, 2 个基因在“红富士”中显著上升, 在“小国光”和“新红星”中表达量显著下降或无显著性变化; 根据蛋白组筛选出 6 个有显著性差异的基因, 从在不同品种中的表达量来看, 2 个基因在 3 个品种中总体呈下降趋势, 4 个基因在 3 个品种中总体呈上升趋势. 苹果树在被苹果绵蚜危害后, MdOPR1 和 MdOPR4 表达量显著增加, 表明 MdOPR 基因可能通过特定的表达模式响应苹果绵蚜对其的生物胁迫.

关键词: 苹果绵蚜; 抗蚜机制; 12-氧-植物二烯酸还原酶

中图分类号: S433.3

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



文章编号: 2097-1354(2024)06-0053-11

收稿日期: 2024-01-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(32172395).

作者简介: 高美瑞, 硕士研究生, 主要从事果树害虫防治方面的研究.

通信作者: 周洪旭, 博士, 教授.

Identification of Apple *OPR* Gene Family and Analysis of Its Expression under the Damage of Wolly Apple Aphid, *Eriosoma lanigerum*

GAO Meirui¹, TENG Ziwen¹, DU Lingjun¹, FAN Yinjun¹,
LI Jinyang¹, WAN Fanghao^{1,2}, ZHOU Hongxu¹

1. College of Plant Health & Medicine, Qingdao Agricultural University, Shandong Engineering Research Center for
Environment-Friendly Agricultural Pest Management, Shandong Province Laboratory for Biological Invasions and Ecological Security,
China-Australia Joint Institute of Agricultural and Environmental Health, Qingdao Shandong 266109, China;
2. Agricultural Genomics Institute at Shenzhen, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shenzhen Guangdong 518120, China

Abstract: Wolly apple aphid (*Eriosoma lanigerum* (Hausmann)) is an important fruit pest, and the resistance of different apple varieties to *E. lanigerum* is significantly different. Jasmonic acid (JA) plays an important role in plant insect resistance. 12-oxo-phytodienoic acid reductase (OPR) is a key enzyme that controls the synthesis of JA. In this paper, the transcriptomics and proteomics of different varieties after damage were used to study the resistance of *OPR* gene in jasmonic acid metabolism pathway against *E. lanigerum*. The results showed that a total of fourteen *OPR* genes were screened out by local Blast and functional domain prediction. According to phylogenetic analysis, *MdOPRs* can be divided into two classes. *MdOPR1*, *MdOPR3* and *MdOPR4* were clustered together with anti-herbivore genes from other plants, belonging to *OPR II* subclass, in which, *MdOPR1* and *MdOPR4* genes were involved in anti-herbivore response of jasmonic acid. The other eleven genes belong to the *OPR I* subclass and were not involved in the anti-herbivore response of jasmonic acid. By analyzing the transcriptome and proteome data of different varieties of apple trees affected by *E. lanigerum*, five genes with significant differences were screened out by transcriptome analysis. Regarding to the expression levels in different varieties, the expressions of two genes were significantly increased in ‘Red Fuji’, and significantly decreased or had no significant changes in ‘Ralls Genet’ and ‘Starkrimson’. According to the proteome analysis, six genes with significant differences were screened out. For the expression levels in different varieties, the expressions of two genes showed an overall downward trend in the three varieties, and four genes showed an overall upward trend in the three varieties. The expression levels of *MdOPR1* and *MdOPR4* in apple trees were significantly increased after *E. lanigerum* damage, suggesting that *MdOPR* gene may respond to biological stress by *E. lanigerum* through specific expression patterns.

Key words: *Eriosoma lanigerum*; mechanism of aphidresistance; 12-oxo-phytodienoic acid reductase

我国是苹果生产大国,栽培面积和产量都居世界之首.苹果绵蚜(*Eriosoma lanigerum* (Hausmann))属于半翅目(Hemiptera)瘿绵蚜科(Pemphigidae)绵蚜属,又叫血色蚜虫、赤蚜、绵蚜等,原产于北美洲东部,随苗木传播至70多个国家和地区^[1].20世纪初苹果绵蚜传入我国山东威海,从20世纪末开始,入侵范围不断扩大,危害加重,先后传到河北、河南、甘肃、天津、山西、新疆等地,对北方苹果产业造成巨大危害^[2].苹果绵蚜主要刺吸危害苹果树的嫩枝、主干,造成营养失衡,影响开花结果,严重情况下会造成果树死亡.

已有研究发现,目前苹果生产中的主栽品种“红富士”的父本“小国光”及与其母本“红元帅”

亲缘关系较近的“新红星”品种相对抗蚜,而“红富士”高感苹果绵蚜^[3-4].在果树生长期调查苹果绵蚜在不同苹果品种上的数量,发现“红富士”的绵蚜数量(137.7~172.9头/株)显著高于“乔纳金”(20.0~46.1头/株)与“新红星”(23.3~41.9头/株);在苹果树落果后调查苹果绵蚜对不同苹果品种的危害率及虫落数量,发现苹果绵蚜对“红富士”的危害率为64.8%,显著高于“青香蕉”“乔纳金”“新红星”“小国光”的危害率(26.6~38.5%).尹学伟等^[5]对“红富士”“金帅”“昭锦108”接种苹果绵蚜,将苹果绵蚜危害苹果树后产生的肿瘤进行石蜡切片研究发现,“红富士”是感性品种,对苹果绵蚜抗性最弱,“昭锦108”抗性最强.通过模拟田间温度发现,苹果绵蚜取食“红富士”的发育速度、繁殖数量以及内禀自然增长率、净增值率、周限增长率均显著高于“新红星”“小国光”^[6],这与新西兰研究结果类似^[7-8].通过EPG刺吸电位(Electrical Penetration Graph, EPG)技术进一步研究发现,苹果绵蚜取食“新红星”和“小国光”韧皮部阶段产生的E1波(取食)总时间显著长于“红富士”,而E2波(分泌唾液)总时间显著短于“红富士”^[9].由此可见,“红富士”“珊夏”“嘎啦”是苹果绵蚜的高感品种,“金冠”“首红”“乔纳金”“小国光”“昭锦108”“新红星”等则是高抗品种,这可能是苹果绵蚜危害加重的重要原因之一.

在植物中,12-氧-植物二烯酸还原酶(12-oxo-phytodienoic acid reductase, OPR)属于古老黄酶(Old Yellow Enzyme, OYE)家族,是一种黄素单核苷酸(Flavin Mononucleotide, FMN)依赖的氧化还原酶,典型的OPR蛋白只有1个Oxidored_FMN结构域.植物OPR家族成员表现出多种生物学功能,可以被茉莉酸(Jasmonic Acid, JA)、乙烯(Ethylene, ET)、脱落酸(Abscissic Acid, ABA)和水杨酸(Salicylic Acid, SA)等各种激素以及各种生物和非生物胁迫诱导^[10].

OPR是亚麻酸合成茉莉酸途径中的一个关键酶,茉莉酸及其衍生物统称为茉莉素(Jasmonates, JAs),是广泛存在于植物中的一类植物内源激素,对植物生长和发育具有广泛的生理效应,同时可作为内源信号分子参与植物的抗逆反应.植物遭遇昆虫取食或机械损伤后,激发茉莉酸的生物合成过程^[11],JA生物合成始于细胞膜释放的 α -亚麻酸,接着在叶绿体中, α -亚麻酸在脂氧合酶(lipoxygenase, LOX)、丙二烯氧化合酶(Allene Oxide Synthase, AOS)、丙二烯氧化环化酶(Allene Oxide Cyclase, AOC)作用下转化为12-氧-植物二烯酸(12-oxo-phytodienoic acid, OPDA)^[12-14],继而在过氧化物酶体中,OPDA被OPR还原为茉莉酸的前体OPC-8:0^[15].

在高等植物中,第一个被发现的OYE成员为拟南芥中的AtOPR1^[16],随后在其他高等植物中也相继发现了OPR基因,其中包括拟南芥的另外两个OPR基因AtOPR2和AtOPR3^[17-18],番茄中的3个OPR基因^[19-20],豌豆中的6个OPR基因^[21],玉米中的8个OPR基因^[22]以及水稻中的13个OPR基因^[23-25].OPR在茉莉酸的合成过程中,是控制JA合成的最后步骤,即催化OPDA生成JA的前体OPC-8:0^[26-28].OPDA有4种立体异构体的结构,根据底物偏好性将OPR分为2类,OPRI主要催化9R,13R-OPDA,也催化9S,13R-OPDA,产生一些副产物,几乎不催化另外2种13S构型的OPDA;OPRII能有效地利用OPDA的4种异构体,是唯一能够将天然的9S,13S-OPDA转化为相应的9S,13S-OPC-8:0,即(+)-7-epi-JA的前体物质,因此只有OPRII亚类基因参与内源茉莉酸的合成^[29].

本研究根据项目组前期完成的不同苹果品种被苹果绵蚜危害后的转录组学和蛋白质组学,鉴定了茉莉酸代谢通路中OPR基因,并通过生物信息学和qPCR分析了茉莉酸代谢通路中对苹果绵蚜起抗性作用的OPR基因,旨在为阐明抗性品种对苹果绵蚜的抗性机理奠定基础.

1 材料与方法

1.1 材料

2019年3月选择烟台栖霞苗圃1年生苹果品种“红富士”(RF)、“新红星”(SM)、“小国光”(RG)各50棵。苹果绵蚜采集于山东烟台,带回实验室用苹果幼苗饲养。

1.2 转录组、蛋白组取样

5—6月选取1年生“红富士”(RF)、“新红星”(SM)、“小国光”(RG)苹果苗,选定接种的枝条后,在距顶芽8~10 cm处接种25头蚜虫。将苹果树放到培养箱中,条件为:14 h光照,10 h黑暗,温度23℃,相对湿度60%。分别在12 h、5 d和18 d取样,用灭菌的毛笔清除蚜虫、虫蜕等残余污染物,用灭菌的剪刀去掉叶片,剪下苹果绵蚜危害处的6 cm左右的枝条,装到无酶离心管中,液氮速冻,以未接种蚜虫的苗木为对照,每个处理重复3次。由安诺优达生物科技有限公司对0 h、危害12 h、危害5 d、危害18 d的4个时间段样本进行转录组测序,对0 h、危害12 h、危害5 d后的3个时间段样本进行蛋白组测序。

1.3 生物信息学分析

使用TBtools做基因表达量热图;使用NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)、Smart(http://smart.embl.de/smart/save_user_preferences.pl)对基因功能域进行预测,使用DOG 2.0进行做图;蛋白质多序列比对通过Clustalw完成(<https://www.genome.jp/tools-bin/>),蛋白质理化性质分析通过Ex-pasy(<https://web.expasy.org/protparam/>)进行;使用MEGA5软件构建系统进化树。采用SPSS软件对试验数据进行独立样本 T 检验。

1.4 抗虫基因荧光定量PCR引物设计

使用Primer 5.0软件根据目的基因*MdOPR1*, *MdOPR4*的序列设计引物,设计的引物序列见表1。

表1 引物序列

名称	序列
<i>MdOPR1</i>	F: CCCTCGAGGGAAGTTTCGGATACTGCTCG R: CGGGATCCCGCAGTGGCTTGTCAGTGCA
<i>MdOPR4</i>	F: CCCTCGAGGGTCGCTTCATTTCTCGTCCTT R: CGGGATCCCGTCGGAGATTATGGTGCCTTC

1.5 qRT-PCR验证

以EF- α 为内参基因,按以下体系加样(表2)。

表2 qRT-PCR体系

uL

试剂	使用量
TB Green Premix Ex Taq II (2×)	10
PCR Forwards Primer	0.8
PCR Reverse Primer	0.8
Rox Reference Dye(50×)	0.4
DNA模板	2
灭菌水	6
Total	20

1.6 PRM 验证

上机前预扫:将靶标蛋白列表导入 SpectroDive 软件,匹配相应的 Library(即上述 DDA 库),软件会自动计算目标蛋白理论肽段序列的质荷比,并保留符合以下条件的独特肽段:①目标蛋白特有的肽段;②无漏切位点;③无可变修饰;④电荷数:2~3.导出以上列表,设置质谱方法上机一针 mix pre-scan.

PRM 方法导出:将预扫的 raw data 导入 SpectroDive 软件,根据 iRT 标准肽段进行保留时间校正,设置 scheduled 方法,并导出.

PRM 模式检测:色谱条件,流动相 A 相:ACN-H₂O-FA(0:100:0.1, v:v:v);流动相 B 相:ACN-H₂O-FA(80:20:0.1, v:v:v);流速:300 nL/min;梯度洗脱条件:0~60 min, 8%~25% B;60~79 min, 25%~45% B;79~80 min, 45%~100% B;80~90 min, 100% B. 主要扫描参数包括:MS2 分辨率 30 000,分离窗口(Isolation Window)1.2 m/z, AGC 设置为 1e5,最大累计时间 80 ms, HCD 能量 28.

2 结果与讨论

2.1 苹果树 OPR 基因鉴定

从 NCBI 查找拟南芥、小麦、玉米和丹参等植物的 OPR 基因,下载其蛋白序列,通过本地 Blast 方法,以 e-5 为标准,在使用的基因库中共找到 16 个基因,通过功能域分析,11 个基因含有 FMN 结构域,3 个基因含有 PLN02411 结构和 FMN 结构域,2 个基因无 FMN 结构域,因此,共 14 个基因属于 OPR 家族.将这 14 个基因与玉米 *ZmOPR5* 和水稻 *OsOPR7* 的序列进行整理,使用在线多序列比对工具进行比对(图 1),利用 NCBI 数据库进行分析,共有 4 类关键位点,其中活性位点 15 个,其中在 *OsOPR7* 蛋白序列中位于第 245 位的组氨酸(His, H)对还原酶的底物选择起到关键作用.底物结合位点有 6 个,包括 T34, W109, H186, H189(N189), Y191, R344. FMN 结合位点 10 个,包括 P32, T34, G65(A65), Q107, R238, G321, S341(A341), G343, R344, L345.催化残基只有 Y191.

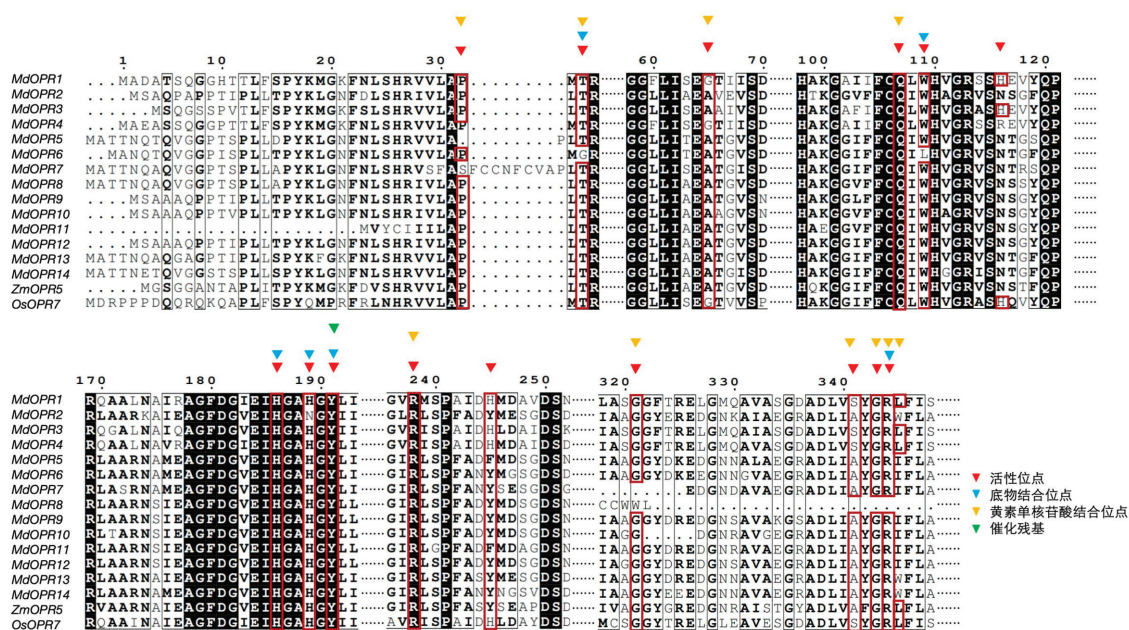


图 1 OPR 蛋白的多序列比对

2.2 系统进化树

利用 MEGA5 软件, 将筛选到的 14 个基因与拟南芥、水稻、玉米、云杉、莱茵衣藻的 OPR 基因序列进行系统进化树比对. 根据结果来看, OPR 家族分为两大枝, 苹果树中的 *MdOPR1*, *MdOPR2*, *MdOPR4* 共 3 个基因与水稻 *OsOPR7*、拟南芥 *AtOPR02-1*(*AtOPR3*)、玉米 *ZmOPR7*, *ZmOPR8* 聚类在 OPRII 亚类, 苹果树另外的 11 个基因与 OPRI 亚类聚合在一起. 因此, 在苹果树中有 3 个基因(*MdOPR1*, *MdOPR3* 和 *MdOPR4*)属于 OPRII 亚类, 可能参与茉莉酸的抗虫反应(图 2).

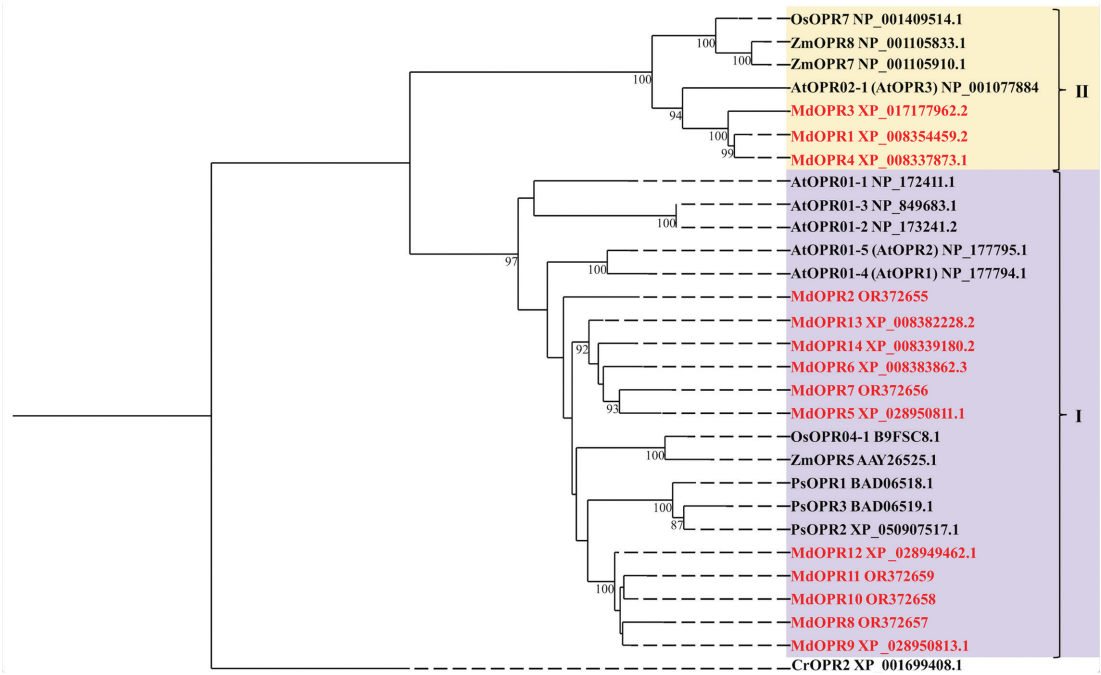


图 2 OPR 蛋白的进化分析

2.3 基因理化性质

通过鉴定分析筛选到的 14 个 OPR 基因, 将其命名为 *MdOPR1*~14. 利用生物信息学方法对基因编码的蛋白理化性质分析结果如表 3 所示, 氨基酸序列长度为 305~398 个氨基酸残基 AA. 从等电点来看, 聚合在于 OPRII 亚类的 3 个基因(*MdOPR1*, *MdOPR3* 和 *MdOPR4*)等电点均大于 7, 其余蛋白等电点为 5.10~6.80(表 3), 也即 OPRII 亚类的基因等电点均大于归属于 OPRI 亚类的基因, 这也与 Schaller 等^[29]的研究结果相符.

表 3 苹果 OPR 蛋白理化性质信息

基因名称	蛋白编号	分子式	氨基酸数	等电点 pI	NCBI 编号
<i>MdOPR1</i>	MD00G1142600	C ₁₉₆₀ H ₃₀₄₂ N ₅₄₈ O ₅₇₅ S ₁₀	398	8.26	XP_008354459.2
<i>MdOPR2</i>	MD08G1216100	C ₁₈₃₉ H ₂₈₂₉ N ₅₀₅ O ₅₅₅ S ₁₀	372	5.21	OR372655
<i>MdOPR3</i>	MD12G1067300	C ₁₉₆₃ H ₃₀₆₈ N ₅₅₀ O ₅₇₇ S ₉	397	7.21	XP_017177962.2
<i>MdOPR4</i>	MD15G1216200	C ₁₉₅₉ H ₃₀₆₈ N ₅₅₄ O ₅₆₉ S ₉	398	9.02	XP_008337873.1
<i>MdOPR5</i>	MD15G1400600	C ₁₈₃₀ H ₂₈₂₃ N ₅₀₅ O ₅₆₂ S ₁₀	376	5.46	XP_028950811.1
<i>MdOPR6</i>	MD15G1400700	C ₁₈₁₆ H ₂₈₀₆ N ₅₀₄ O ₅₄₆ S ₁₁	370	5.94	XP_008383862.3
<i>MdOPR7</i>	MD15G1401100	C ₁₇₈₇ H ₂₇₄₃ N ₄₉₃ O ₅₄₈ S ₁₁	364	5.10	OR372656

续表						
基因名称	蛋白编号	分子式	氨基酸数	等电点 pI	NCBI 编号	
<i>MdOPR8</i>	MD15G1401200	C ₁₅₀₈ H ₂₃₁₈ N ₄₂₄ O ₄₅₀ S ₁₂	305	6.12	OR372657	
<i>MdOPR9</i>	MD15G1401300	C ₁₈₁₉ H ₂₈₀₉ N ₅₀₅ O ₅₄₂ S ₁₀	368	6.21	XP_028950813.1	
<i>MdOPR10</i>	MD15G1401800	C ₁₇₉₀ H ₂₇₆₉ N ₅₀₃ O ₅₂₉ S ₉	363	6.80	OR372658	
<i>MdOPR11</i>	MD15G1402400	C ₁₇₂₄ H ₂₆₅₆ N ₄₇₈ O ₅₁₂ S ₁₁	348	5.52	OR372659	
<i>MdOPR12</i>	MD15G1402700	C ₁₈₂₃ H ₂₈₀₅ N ₅₀₇ O ₅₄₀ S ₉	368	6.13	XP_028949462.1	
<i>MdOPR13</i>	MD15G1402800	C ₁₈₄₆ H ₂₈₃₉ N ₅₁₃ O ₅₅₀ S ₉	376	6.26	XP_008382228.2	
<i>MdOPR14</i>	MD15G1403000	C ₁₈₃₆ H ₂₈₂₈ N ₅₀₈ O ₅₅₆ S ₁₀	376	5.58	XP_008339180.2	

2.4 转录组表达量分析

对筛选出的 14 个 OPR 家族基因进行转录组表达量分析(图 3),其中差异基因有 5 个(*MdOPR2*, *MdOPR5*, *MdOPR6*, *MdOPR12* 和 *MdOPR14*). 根据转录组分析结果,对于属于 OPRII 亚类的 3 个基因,基因 *MdOPR1* 表达量在“红富士”和“新红星”中均呈现先升高后下降的趋势,在苹果绵蚜危害 12 h 时表达量最高;基因 *MdOPR3* 表达量在“红富士”和“小国光”中呈现出先升高后下降的趋势,在“新红星”中表达量呈下降趋势;基因 *MdOPR4* 在 3 个品种中,表达量均呈现出逐步升高的趋势. 基因 *MdOPR5* 和 *MdOPR14* 的表达量在“红富士”和“小国光”中均呈下降趋势.

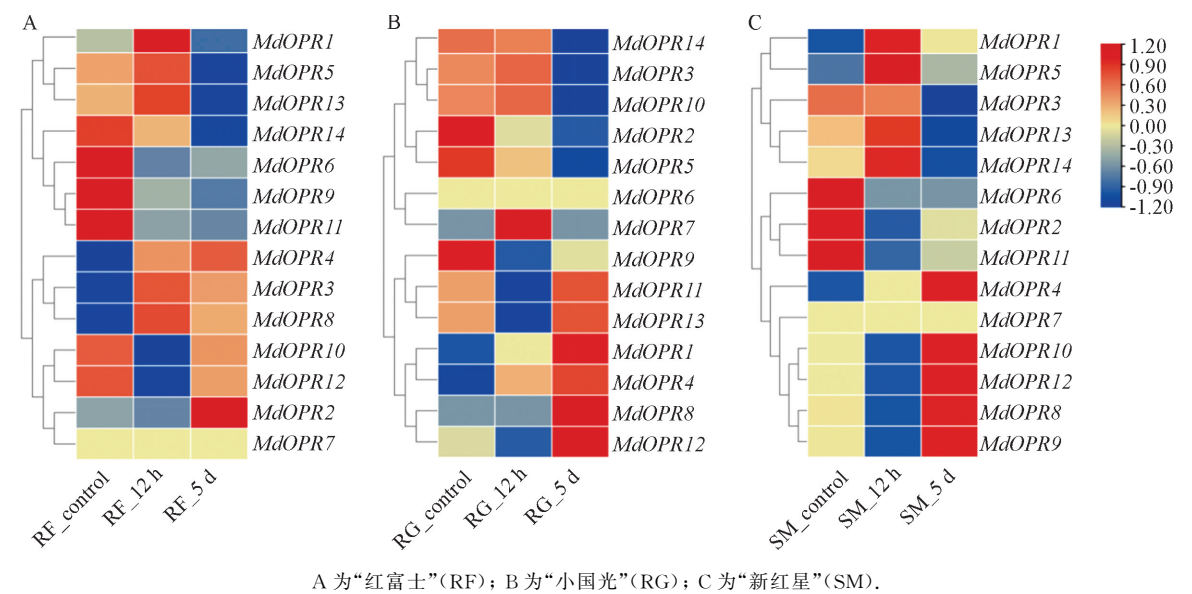


图 3 苹果 OPR 基因的转录组热图分析

2.5 蛋白组表达量分析

将 14 个 OPR 基因在蛋白组中进行表达量分析,共筛选到 6 个(*MdOPR1*, *MdOPR2*, *MdOPR4*, *MdOPR10*, *MdOPR12* 和 *MdOPR13*)具有显著性差异基因, *MdOPR1* 基因在 3 个品种中的表达量均呈上升趋势,苹果绵蚜危害 5 d 时表达量最高; *MdOPR4* 基因在抗性品种“小国光”中表达量呈上升趋势,而在“红富士”和“新红星”品种中表达量呈下降趋势. 基因 *MdOPR12*, *MdOPR13* 基因在“小国光”中表达量呈下降趋势,在“新红星”和“红富士”中表达量先上升后下降,苹果绵蚜危害 12 h 时表达量最高; *MdOPR2* 基因在“小国光”中表达量呈下降趋势,在“红富士”和“新红星”中表达量总体呈上升趋势; *MdOPR10* 基因在 3 个品种都呈下降趋势(图 4).

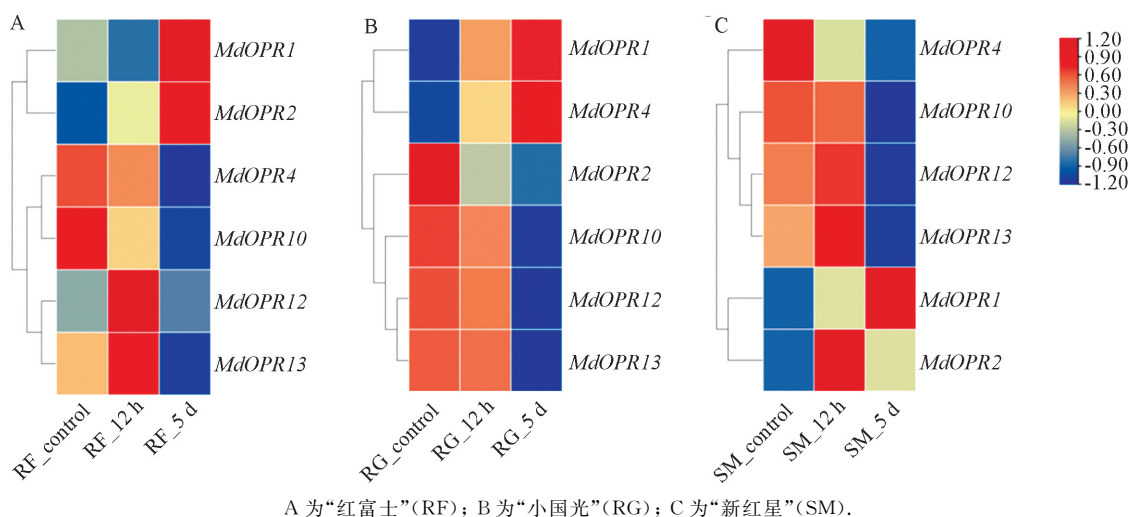


图4 苹果 OPR 蛋白的蛋白组热图分析

2.6 qRT-PCR 验证

对本研究筛选得到的苹果树 *MdOPR1* 和 *MdOPR4* 两个聚类在 OPRII 亚类的基因进行 qRT-PCR 验证, 结果与转录组数据相符. 苹果树在被苹果绵蚜危害后, *MdOPR1* 基因在感性品种“红富士”中表达量先上升, 后下降, 随后再上升; 在抗性品种“小国光”和“新红星”中表达量先上升, 后下降, 在“红富士”和“新红星”中危害 12 h 的表达量显著高于危害 0 h; 在“小国光”中, 危害 5 d 时的表达量最高, 显著高于危害 0 h. 在相同实验条件下, *MdOPR4* 基因在 3 个品种中表达量趋势均为先上升, 再下降, 在感性品种“红富士”中, 虽然上升, 但是差异不显著, 在抗性品种“小国光”和“新红星”中, 危害 12 h 时, 表达量显著高于危害 0 h, 分别在 5 d 和 12 h 时表达量到达最高值(图 5).

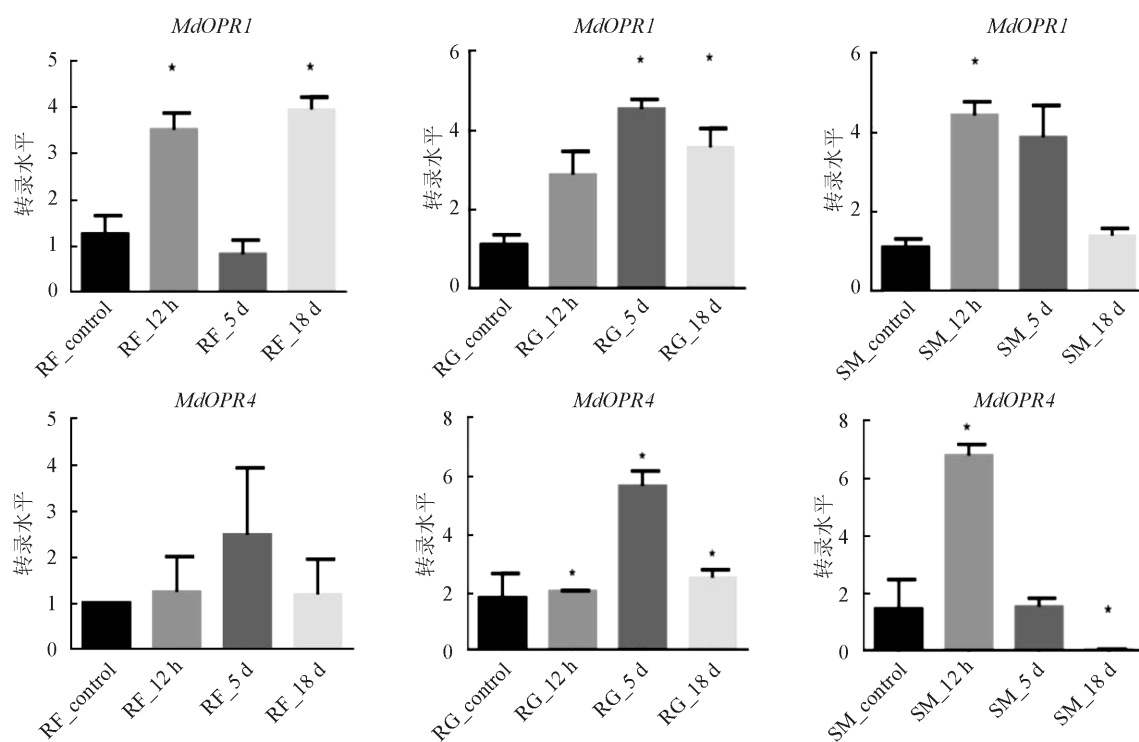


图5 qRT-PCR 验证

2.7 PRM 验证

对 *MdOPR1* 进行 PRM 验证, 结果发现该蛋白在抗性品种“小国光”中上调 1.14 倍, 在“新红星”中上调倍数最多, 上调 1.51 倍, 在感性品种“红富士”中上调倍数最低, 上调 1.13 倍, 这与蛋白组结果一致, 结果显示该蛋白与抗性相关。

3 讨论与结论

茉莉酸及其衍生物信号在植物抗虫、抗病方面有重要的作用。茉莉酸及其衍生物本身对昆虫无毒, 但将茉莉酸及其衍生物喷施在植物上却可以诱导植物次生化学物质和系统抗性的产生, 避免昆虫对植物的伤害。茉莉酸及其衍生物可能通过诱导多酚氧化酶(Polyphenol Oxidase, PPO)和蛋白酶抑制剂, 造成植食性动物蛋白质营养获取障碍, 从而抑制昆虫生长。在不同的物种中, 茉莉酸及其衍生物可诱导植物产生不同的次生代谢物, 如尼古丁、芥子油苷、异类黄酮、生物碱、萜类、酚类、醌类、胍胍质、硫代葡萄糖苷、生氰葡萄糖苷、酰基蔗糖等, 影响昆虫对营养物质的吸收, 或干扰植食动物神经信号传递^[30-33]。玉米中的双突变体 *opr7opr8* 的 JA 水平在所有器官中都显著降低, 双突变体导致了大量的发育缺陷和对病原体及昆虫的极端易感性^[34]。因此, 本文对苹果树被苹果绵蚜危害的转录组、蛋白组的茉莉酸通路中的 OPR 基因进行了研究。

“红富士”是以“红元帅”为母本、“小国光”为父本杂交得到, “新红星”是由“元帅”芽变得到, 这 3 个品种具有一定的亲缘关系, 而对苹果绵蚜的抗性不同。因此, 本文选择这 3 个品种苹果树进行抗蚜性研究。本研究通过本地 Blast 和功能域预测, 共鉴定出 14 个 OPR 基因, 其进化分析结果表明, *MdOPRs* 可分为两类, *MdOPR1*, *MdOPR3* 和 *MdOPR4* 与其他植物具有抗虫作用基因聚类在一起。有研究表明, 玉米 OPR 基因受 JA 调控^[20]; 在水稻的 OPR 家族中, 目前仅有处在 OPRII 亚类的 *OsOPR7* 被报道能够催化 OPDA。通常, 进化树中亲缘关系越近, 其具有相似基因功能的可能性也越大, 因此, 推测 *MdOPR1*, *MdOPR3* 和 *MdOPR4* 与 *AtOPR02-1* (*AtOPR3*)有相似功能, 可以有效催化 9R, 13R-OPDA, 使其转化为 JA 的前体 OPC-8 : 0^[29]。

本研究对苹果绵蚜危害后的苹果树转录组、蛋白组中的茉莉酸通路进行研究, 对筛选到的 14 个 OPR 基因, *MdOPR1* 在 3 个品种中抗性反应一致, 随着苹果绵蚜危害时间增加表达量增加; *MdOPR4* 基因在抗性品种“小国光”中随苹果绵蚜危害时间增加表达量增加, 在“新红星”和“红富士”中随苹果绵蚜危害时间增加表达量先升高后下降, 分别在 12 h 和 5 d 后达到最高值; *MdOPR6* 基因在“红富士”中随苹果绵蚜危害时间增加表达量增加; *MdOPR2* 在“红富士”中随苹果绵蚜危害时间增加表达量增加, 在“新红星”中苹果绵蚜危害 12 h 时表达量最高, 抗性最显著; *MdOPR14* 基因在 3 个品种中抗性反应一致, 随着苹果绵蚜危害时间增加表达量下降; *MdOPR12*, *MdOPR13* 基因在“小国光”中随苹果绵蚜危害时间增加表达量下降, 在“新红星”和“红富士”中随苹果绵蚜危害时间增加表达量先上升后下降, 苹果绵蚜危害 12 h 时表达量最高; *MdOPR5* 在“红富士”中随苹果绵蚜危害时间增加表达量下降。总体而言, 苹果树被苹果绵蚜危害后, *MdOPR1* 和 *MdOPR4* 表达量显著增加, 表明 *MdOPR* 基因可能通过调控 JA 的合成以响应苹果绵蚜对其生物胁迫。

参考文献:

- [1] 阴启忠, 张勇, 宫永铭. 山东省苹果绵蚜发生现状及防治对策[J]. 山东农业科学, 2006, 38(1): 56-57.
- [2] ZHOU H X, ZHANG R M, TAN X M, et al. Invasion Genetics of Woolly Apple Aphid (Hemiptera: Aphidi-

- dae) in China[J]. Journal of Economic Entomology, 2015, 108(3): 1040-1046.
- [3] 王西存, 周洪旭, 郭建英, 等. 苹果绵蚜在不同寄主果园中的种群数量动态比较[J]. 生物安全学报, 2011, 20(3): 220-226.
- [4] 王西存, 周洪旭, 于毅, 等. 夏季苹果新梢生理指标与抗苹果绵蚜的关系[J]. 生态学报, 2013, 33(17): 5177-5183.
- [5] 尹学伟, 李向永, 张龙, 等. 苹果品种对苹果绵蚜的抗性测定[J]. 云南农业大学学报, 2010, 25(1): 29-33.
- [6] TAN X M, YANG ZH SH, ZHOU H, et al. Resistance Performance of Four Principal Apple Cultivars to Woolly Apple Aphid, *Eriosoma lanigerum* (Hemiptera: Pemphigidae), by Simulated Seasonal Temperature in Northern China[J]. Arthropod-Plant Interactions, 2021, 15(1): 59-69.
- [7] SANDANAYAKA W R M, HALE C N. Electronically Monitored Stylet Penetration Pathway of Woolly Apple Aphid, *Eriosoma lanigerum* (Homoptera: Aphididae), on Apple (*Malus domestica*) [J]. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 2003, 31(2): 107-113.
- [8] SANDANAYAKA W R M, BUS V G M, CONNOLLY P. Mechanisms of Woolly Aphid [*Eriosoma lanigerum* (Hausm.)] Resistance in Apple[J]. Journal of Applied Entomology, 2005, 129(9-10): 534-541.
- [9] ZHOUH, DUL J, WANF H, et al. Comparative Analysis of Stylet Penetration Behaviors of *Eriosoma lanigerum* (Hemiptera: Aphididae) on Main Apple Cultivars in China[J]. Journal of Economic Entomology, 2020, 113(4): 1761-1767.
- [10] 王艳微, 王敏, 王江, 等. 大豆 OPR 基因家族全基因组鉴定与表达分析[J]. 大豆科学, 2022, 41(2): 129-139.
- [11] BELL E, CREELMAN R A, MULLET J E. A Chloroplast Lipxygenase is Required for Wound-Induced Jasmonic Acid Accumulation in *Arabidopsis* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995, 92(19): 8675-8679.
- [12] BLEE E, JOYARD J. Envelope Membranes from Spinach Chloroplasts are a Site of Metabolism of Fatty Acid Hydroperoxides[J]. Plant Physiology, 1996, 110(2): 445-454.
- [13] LAUDERT D, PFANNSCHMIDT U, LOTTSPEICH F, et al. Cloning, Molecular and Functional Characterization of *Arabidopsis thaliana* Allene Oxide Synthase (CYP 74), the First Enzyme of the Octadecanoid Pathway to Jasmonates[J]. Plant Molecular Biology, 1996, 31(2): 323-335.
- [14] WEILER E W. Octadecanoid-Mediated Signal Transduction in Higher Plants[J]. Naturwissenschaften, 1997, 84(8): 340-349.
- [15] VICK B A, ZIMMERMAN D C. Biosynthesis of Jasmonic Acid by Several Plant Species[J]. Plant Physiology, 1984, 75(2): 458-461.
- [16] SCHALLER F, WEILER E W. Molecular Cloning and Characterization of 12-Oxophytodienoate Reductase, an Enzyme of the Octadecanoid Signaling Pathway from *Arabidopsis thaliana*. Structural and Functional Relationship to Yeast Old Yellow Enzyme[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1997, 272(44): 28066-28072.
- [17] BIESGEN C, WEILER E W. Structure and Regulation of OPR1 and OPR2, Two Closely Related Genes Encoding 12-Oxophytodienoic Acid-10, 11-Reductases from *Arabidopsis thaliana* [J]. Planta, 1999, 208(2): 155-165.
- [18] SCHALLER F, BIESGEN C, MÜSSIG C, et al. 12-Oxophytodienoate Reductase 3 (OPR3) is the Isoenzyme Involved in Jasmonate Biosynthesis[J]. Planta, 2000, 210(6): 979-984.
- [19] STRASSNER J, FÜRHOlz A, MACHEROUX P, et al. A Homolog of Old Yellow Enzyme in Tomato. Spectral Properties and Substrate Specificity of the Recombinant Protein[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1999, 274(49): 35067-35073.
- [20] BREITHAUPT C, KURZBAUER R, LILIE H, et al. Crystal Structure of 12-Oxophytodienoate Reductase 3 from Tomato; Self-Inhibition by Dimerization[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98(12): 6581-6586.

- ed States of America, 2006, 103(39): 14337-14342.
- [21] MATSUI H, NAKAMURA G, ISHIGA Y, et al. Structure and Expression of 12-Oxophytodienoate Reductase (Subgroup I) Genes in Pea, and Characterization of the Oxidoreductase Activities of Their Recombinant Products[J]. Molecular Genetics and Genomics: MGG, 2004, 271(1): 1-10.
- [22] ZHANG J L, SIMMONS C, YALPANI N, et al. Genomic Analysis of the 12-Oxo-Phytodienoic Acid Reductase Gene Family of Zea Mays[J]. Plant Molecular Biology, 2005, 59(2): 323-343.
- [23] AGRAWAL G K, JWA N S, SHIBATO J, et al. Diverse Environmental Cues Transiently Regulate OsOPR1 of the "Octadecanoid Pathway" Revealing Its Importance in Rice Defense/Stress and Development[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003, 310(4): 1073-1082.
- [24] AGRAWAL G K, TAMOGAMI S, HAN O, et al. Rice Octadecanoid Pathway[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, 317(1): 1-15.
- [25] SOBAJIMA H, TAKEDA M, SUGIMORI M, et al. Cloning and Characterization of a Jasmonic Acid-Responsive Gene Encoding 12-Oxophytodienoic Acid Reductase in Suspension-Cultured Rice Cells[J]. Planta, 2003, 216(4): 692-698. [PubMed]
- [26] SCHALLER F. Enzymes of the Biosynthesis of Octadecanoid-Derived Signalling Molecules[J]. Journal of Experimental Botany, 2001, 52(354): 11-23.
- [27] LIECHTI R, FARMER E E. The Jasmonate Biochemical Pathway[J]. Science's STKE, 2003, 2003(203): ecm18.
- [28] GFELLERA, DUBUGNONL, LIECHTIR, et al. Jasmonate Biochemical Pathway[J]. Science Signal, 2010, 3(109): cm4.
- [29] SCHALLER F, HENNIG P, WEILER E W. 12-Oxophytodienoate-10, 11-Reductase: Occurrence of Two Isoenzymes of Different Specificity Against Stereoisomers of 12-Oxophytodienoic Acid[J]. Plant Physiology, 1998, 118(4): 1345-1351.
- [30] SHRESTHA G, REDDY G V P. Field Efficacy of Insect Pathogen, Botanical, and Jasmonic Acid for the Management of Wheat Midge *Sitodiplosis mosellana* and the Impact on Adult Parasitoid *Macroglenes* Penetrans Populations in Spring Wheat[J]. Insect Science, 2019, 26(3): 523-535.
- [31] PATT J M, ROBBINS P S, NIEDZ R, et al. Exogenous Application of the Plant Signalers Methyl Jasmonate and Salicylic Acid Induces Changes in Volatile Emissions from Citrus Foliage and Influences the Aggregation Behavior of Asian Citrus Psyllid (*Diaphorina citri*), Vector of Huanglongbing[J]. PLoS One, 2018, 13(3): e0193724.
- [32] SOBHAY I S, WOODCOCK C M, POWERS S J, et al. Cis-Jasmone Elicits Aphid-Induced Stress Signalling in Potatoes[J]. Journal of Chemical Ecology, 2017, 43(1): 39-52.
- [33] MARTÍNEZ-MEDINA A, FERNÁNDEZ I, LOK G B, et al. Shifting from Priming of Salicylic Acid- to Jasmonic Acid-Regulated Defences by *Trichoderma* Protects Tomato Against the Root Knot Nematode *Meloidogyne incognita*[J]. New Phytologist, 2017, 213(3): 1363-1377.
- [34] YAN Y X, CHRISTENSEN S, ISAKEIT T, et al. Disruption of OPR7 and OPR8 Reveals the Versatile Functions of Jasmonic Acid in Maize Development and Defense[J]. The Plant Cell, 2012, 24(4): 1420-1436.