分类号： 密级：

UDC ： 编号：



硕士学位论文

**草地螟对不同寄主植物的选择特性研究**

**Character analysis of the Selection of Meadow Moth,**

***Loxostege sticticalis* to Host Plant**

**硕士研究生： 王倩倩**

**指导教师： 肖** 春 **教授**

**尹** 姣 **副研究员申请学位类别：农学硕士**

**专** 业：农 **药 学**

**培 养 学 院 ：植物保护学院**

**二〇一四年五月**

**Character analysis of the Selection of Meadow Moth,**

***Loxostege sticticalis* to Host Plant**

**Wang Qianqian**

A thesis submitted to Yunnan Agricultural University In special fulfillment of requirements for Master Degre of

Pesticide

Directed by Professor Xiao Chun

Department of Pesticide Sciences, College of Plant Protection Yunnan Agricultural University

Kunming 650201

P.R.China June 2014

**独创性声明**

本人声明所呈交的学位论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得云南农业大学或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名： 时间： 年 月 日

**关于学位论文使用授权的声明**

本人完全了解云南农业大学有关保存、使用学位论文的管理办法及规定，即： 云南农业大学有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意云南农业大学可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

**(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 研究生签名： | 时间： | 年 | 月 | 日 |
| 导师签名： | 时间： | 年 | 月 | 日 |

摘 要

草地螟是一种在我国东北、华北和西北地区严重多发的杂（多）食性的世界性分布的害虫，可以取食35科200余种植物，其中包括多种农牧业经济作物，给我国的农牧业生产造成严重损失。随着与植物的长期协同进化，草地螟在一生中的某个或某几个时期可以在适宜的寄主上取食和产卵，不同的寄主植物对其生长发育和种群增长也有所不同。研究草地螟对不同寄主植物的选择特性可以更深入地了解草地螟与其寄主植物的协同进化机制，有助于提出更有效更环保的草地螟防治策略。

本文主要通过不同寄主植物挥发物的提取和鉴定、用不同寄主植物分别饲喂幼虫并观察其生长发育历期的变化和成虫的产卵选择性实验三个方面来探讨草地螟与寄主植物之间的协同进化机制。此外，通过荧光竞争结合性实验对双突变

OBP1蛋白进行了功能验证并对草地螟OBP1蛋白的功能位点进行研究探讨，为从分子生物学层面研究昆虫与寄主植物之间的协同进化提供途径。主要研究成果如下：

（1）取食不同寄主植物的幼虫，其生长发育历期明显不同。单一取食草木樨、苜蓿和灰菜的幼虫可以完成世代，但取食沙打旺和老芒麦的在转接后三天之内全部死亡。产卵选择实验中，草木樨、苜蓿和灰菜上的落卵量明显多于其他供试植物，沙打旺和老芒麦上的落卵量则为同类供试植物中最少。

（2）利用顶空吸附法提取草木樨、苜蓿、胡枝子、沙打旺、高羊茅、黑麦草和老芒麦七种寄主植物的挥发物，并利用GC-MS分析鉴定了挥发物组分。从草木樨和沙打旺中提取出8种挥发物，从黑麦草和苜蓿中提取出7种物质，从老

芒麦中提取出9种物质，从高羊茅中提取出11种物质，从胡枝子中提取出13种物质。

（3）与未突变蛋白相比，双突变气味结合蛋白OBP1对性信息素、莰烯、1-己醇、1-庚醇、反-2-己烯醛、肉桂醛和苯甲醛的结合性明显降低，这说明草地螟OBP1蛋白的功能位点很可能就是双突蛋白中突变的位点。

**关键词 ：**草地螟；寄主植物；选择性；生长发育；气味结合蛋白

**Character analysis of the Selection of Meadow Moth,**

***Loxostege sticticalis* to Host Plant**

Wang Qianqian(Pesticide Science) Directed by Professor Xiao Chun

**Abstract**

Meadow moth, *Loxostege sticticalis* L. (Lepidoptera: Pyralidae) is one of worldwide insect pests which often occurs in the North China, Northeast and Northwest of China. It feeds upon a wide range of crops ( approximately 35 Families, nearly 200 species of host plants) including many economic crops in

Farming and stockbreeding. Great loss has been recorded due to the damage by *Loxostege sticticalis* L. Based on long-term co-evolution with its host plants, *Loxostege sticticalis* L. feeds and oviposits on suitable host plants once or several times during its life cycle. Different host plants also influence its growth, development and population growth. The selection of *Loxostege sticticalis* L to different host plant was studied in order to clarifying the mechanisms of the co-evolution of *Loxostege sticticalis* L with host plant and putting forward effective and safe measures to control it.

The co-evolution of *Loxostege sticticalis* L with host plants was clarified from plant volatile collection and identification, its growth and development when the larvae feeding with different plants, and its ovposition selection. Moreover, the function of double mutant OBP1 was verified by site-directed mutagenesis and binding experiments, as well as the function-site of LstiGOBP1 was investigated. It provides a new pathway to study the co-evolution between insect pest and host plant

At a molecular level. The primary results are as follows:

(1) Their developmental durations were obviously different from each other when the larvae feeding on different host plants. They could complete the life cycle feeding on *Melilotus suaveolens* Ledeb*, Medicago sativa* Linnor *Chenopodium album* Linn, but died within 3d after feeding on *Astragalus adsurgens* Pall and *Elymus sibiricus* Linn. The female moths laid more eggs on *Melilotus suaveolens* Ledeb*, Medicago sativa* Linnand *Chenopodium album* Linn than on the other plants, and laid least eggs on *Astragalus adsurgens* Pall and *Elymus sibiricus* Linn.

*(2)* The volatiles of 7 host plant (*Melilotus suaveolens* Ledeb．*, Medicago sativa*

Linn*, Lespedeza bicolor* Turcz*, Astragalus adsurgens* Pall*., Festuca elata* Keng*, Lolium and Elymus sibiricus* Linn were collected by headspace absorption method and analyzed by GC-MS. 8 compounds were identified from *Melilotus suaveolens Ledeb* and *Astragalus adsurgens* Pall*.* samples. 7 compounds were identified from *Lolium* and *Medicago sativa* Linn*.* samples. 9 compounds were identified from *Elymus sibiricus* Linn samples. 11compounds were identified from *Festuca elata* Keng Linn samples. 13compounds were identified from 11compounds were identified from *Festuca elata* Keng Linn samples. Linn samples.

(3) Compared with unmutated protein, associativities of mutant protein with sex pheromone, camphene, 1-hexanol, heptanol, olefin aldehyde, cinnamyl aldehyde and benzaldehyde were decreased significantly. It proved that the function site of LstiGOBP1 may be two mutated sites.

**Key Words :** Meadow moth *Loxostege sticticalis* L.; Host plant; Selection growth and development; Odorantbinding protein(OBP)

目 录

[摘 要](#_Toc686545747) 3

**[Abstract](#_Toc686545748)** 3

[目 录](#_Toc686545749) 4

**[1](#_Toc686545750)** [前言](#_Toc686545750) 4

**[1.1](#_Toc686545751)** [昆虫与植物的关系](#_Toc686545751) 5

**[1.1.1](#_Toc686545752)** [寄主植物对昆虫Th长发育及种群增长的影响](#_Toc686545752) 5

[1.1.1.1 寄主植物对直接取食的昆虫的影响](#_Toc686545753) 5

[1.1.1.2 寄主植物对天敌昆虫生长发育的影响](#_Toc686545754) 5

**[1.1.2](#_Toc686545755)** [寄主植物对昆虫体内一些酶和Th理指标的影响](#_Toc686545755) 5

**[1.1.3](#_Toc686545756)** [植物表层物质及次Th代谢物等对昆虫寄主选择性的影响](#_Toc686545756) 5

[1.1.3.1 植物表层物质对昆虫寄主植物选择性的影响](#_Toc686545757) 5

[1.1.3.2 植物次生代谢物对昆虫寄主植物选择性的影响](#_Toc686545758) 5

**[1.1.4](#_Toc686545759)** [寄主植物对昆虫敏感性的影响](#_Toc686545759) 6

**[1.2](#_Toc686545760)** [昆虫的嗅觉机制](#_Toc686545760) 6

**[1.2.1](#_Toc686545761)** [昆虫的触角感受器和嗅觉识别过程](#_Toc686545761) 6

**[1.2.2](#_Toc686545762)** [昆虫的嗅觉识别过程](#_Toc686545762) 6

**[1.2.3](#_Toc686545763)** [昆虫气味结合蛋白](#_Toc686545763) 7

[1.2.3.1 昆虫气味结合蛋白的种类](#_Toc686545764) 7

[1.2.3.2 气味结合蛋白的结构特点和结合机制](#_Toc686545765) 7

[1.2.3.3 气味结合蛋白的功能](#_Toc686545766) 7

**[1.3](#_Toc686545767)** [草地螟研究现状及立题依据](#_Toc686545767) 7

**[2](#_Toc686545768)** [材料与方法](#_Toc686545768) 7

**[2.1](#_Toc686545769)** [实验材料](#_Toc686545769) 8

**[2.1.1](#_Toc686545770)** [虫源](#_Toc686545770) 8

**[2.1.2](#_Toc686545771)** [供试植物](#_Toc686545771) 8

[2.1.2.1 草地螟对不同寄主植物的产卵选择性及不同寄主植物对草地螟Th长发育的影响实验所用供试植物](#_Toc686545772) 8

[2.1.2.2 不同寄主植物挥发物抽提实验所用植物](#_Toc686545773) 8

**[2.1.3](#_Toc686545774)** [菌种](#_Toc686545774) 8

**[2.1.4](#_Toc686545775)** [试剂、材料及仪器](#_Toc686545775) 8

**[2.2](#_Toc686545776)** [实验方法](#_Toc686545776) 9

**[2.2.1](#_Toc686545777)** [草地螟对产卵寄主的选择性](#_Toc686545777) 9

**[2.2.2](#_Toc686545778)** [不同寄主植物对草地螟Th长发育的影响](#_Toc686545778) 9

**[2.2.3](#_Toc686545779)** [挥发物提取方法](#_Toc686545779) 9

[2.2.3.1 吸附柱的填装及预处理](#_Toc686545780) 9

[2.2.3.2 挥发物的抽提和洗脱](#_Toc686545781) 10

[2.2.3.3 挥发物的分析和鉴定](#_Toc686545782) 10

[2.2.3.4 程序升温](#_Toc686545783) 10

**[2.2.4](#_Toc686545784)** [双突变](#_Toc686545784)**[OBP1](#_Toc686545784)**[的表达纯化及荧光竞争结合验证](#_Toc686545784) 10

[2.2.4.1. 双突序列测定及比对](#_Toc686545785) 10

[2.2.4.2 蛋白表达与SDS-PAGE电泳检测](#_Toc686545786) 10

[2.2.4.3 Western blot 验证诱导结果](#_Toc686545787) 10

[2.2.4.4 蛋白大量表达和纯化](#_Toc686545788) 11

[2.2.4.5 蛋白透析复性及超滤浓缩](#_Toc686545789) 11

[2.2.4.6 蛋白浓度测定](#_Toc686545790) 11

[2.2.4.7 组氨酸标签的切除](#_Toc686545791) 12

[2.2.4.8 草地螟OBP1双突蛋白功能位点验证](#_Toc686545792) 12

**[2.3](#_Toc686545793)** [数据处理](#_Toc686545793) 12

**[3](#_Toc686545794)** [结果与分析](#_Toc686545794) 12

**[3.1](#_Toc686545795)** [草地螟对不同寄主植物的产卵选择性](#_Toc686545795) 12

**[3.2](#_Toc686545796)** [不同寄主植物对草地螟Th长发育的影响](#_Toc686545796) 16

**[3.3](#_Toc686545797)** [不同寄主植物挥发物的提取和鉴定](#_Toc686545797) 18

**[3.4](#_Toc686545798)** [草地螟](#_Toc686545798)**[OBP1](#_Toc686545798)**[双突蛋白的表达纯化和荧光竞争结合验证](#_Toc686545798) 41

**[3.4.1](#_Toc686545799)** [双突序列测序结果及与原蛋白的比对分析](#_Toc686545799) 41

**[3.4.2](#_Toc686545800)** [蛋白表达与](#_Toc686545800)**[SDS-PAGE](#_Toc686545800)**[电泳检测及](#_Toc686545800)**[Western blot](#_Toc686545800)**[验证](#_Toc686545800) 41

**[3.4.3](#_Toc686545801)** [尿素溶解及蛋白纯化](#_Toc686545801) 41

**[3.4.4](#_Toc686545802)** [透析复性、超滤及](#_Toc686545802)**[His-tag](#_Toc686545802)**[切除](#_Toc686545802) 41

**[3.4.5](#_Toc686545803)** [荧光竞争结合验证](#_Toc686545803) 42

**[4](#_Toc686545804)** [讨论](#_Toc686545804) 43

**[5](#_Toc686545805)** [结论](#_Toc686545805) 43

[参考文献](#_Toc686545806) 44

[附 录](#_Toc686545807) 46

# **1** 前言

在自然界中，植食性昆虫与植物长期的协同进化导致了植食性昆虫特定寄主范围的形成，这使得它们在一生中的某个或某几个时期可以在适宜的寄主植物上产卵或取食。多种全变态的植食性昆虫，如蝇类。甲虫类、蝶类和蛾类等，因其幼虫不适于远距离的迁移觅食，其成虫常常会选择适宜的寄主产卵以保证幼虫孵化后有充裕的食物。因此，植食性昆虫对适宜寄主的选择性对其生存和种群增长起着至关重要的作用。

## **1.1** 昆虫与植物的关系

自然界中许多昆虫可取食危害多种植物。然而经调查研究发现，对于这些可取食危害多种植物的昆虫来说，当几种不同寄主植物同时存在时其取食危害是有一定的选择性的，取食不同寄主植物可以对其生长发育和种群增长产生影响[1]。此外，对于某些昆虫来说，取食不同寄主植物对其药物敏感性也有影响[2]。研究不同寄主植物对昆虫生长发育和繁殖的影响及不同寄主植物对昆虫药物敏感性的影响，有助于探讨其广泛的食物适应机制[3]，并可为害虫的预测预报和综合防治提供一定的理论依据[4-7]。

### **1.1.1** 寄主植物对昆虫Th长发育及种群增长的影响

### 1.1.1.1 寄主植物对直接取食的昆虫的影响

昆虫幼虫期的食物营养会对其生长发育及繁殖产生重大影响。已有研究证明，在相同的环境条件下，食物营养不同，昆虫幼虫期和成虫期的生长发育及繁殖均表现出一定的差异，从而影响昆虫种群的增长[8]。

尹姣等（2001）采用灰菜、大豆、玉米和马铃薯苗四种植物分别饲养草地螟并做转主取食实验，结果表明取食灰菜和大豆的幼虫发育历期最短且蛹重最高，取食玉米和马铃薯苗的幼虫则发育历期较长，蛹重较轻；但低龄幼虫取食灰菜3龄后再取食玉米或马铃薯苗的幼虫发育历期和蛹重均有显著改善；在灰菜与其他几种寄主植物同时存在时幼虫仅取食灰菜。这一结果与田间成虫产卵选择性调查

结果相符合[1]。李定旭等（2012）在相同条件下对桃小食心虫在杏、李、桃、枣、苹果和梨上取食后各发育阶段的历期、存活率和产卵量进行统计，并组建了桃小食心虫在各寄主植物上的生命表，结果表明桃小食心虫的生长发育和繁殖在不同寄主植物间存在显著差异：幼虫的发育历期以李最短，梨最长；整个幼虫期的存活率以李为最高，梨最低；单雌平均产卵量以枣( 214.50粒/雌)和桃( 197.94粒/雌)最高；分析生命表结果表明，净生殖率*R*0以枣（117.49）最大，平均世代周期*T*则以梨( 41.31d)和苹果( 41.51 d)最长，内禀增长率*r*m以李（0.1294）为最高，其次为枣（0.1201）和杏（0.1128）。韩秀楠等（2012）通过实验发现豌豆蚜在蚕豆、豌豆、苜蓿和红豆草4中寄主植物上的发育历期存在显著差异，内禀增长率*r*m分别为0.2632, 0.2619, 0.2243和0.2171，豌豆蚜在蚕豆上的适应度和嗜食性最好且繁殖速度最快[9]。席瑞华等（1984）研究了不同寄主植物对亚洲小车蝗生长和生殖力的影响，证明不同食料植物可以对蝗虫的发育历期、死亡率、体长、体重、寿命和生殖力造成差异[10]。以上结果均表明不同寄主植物不仅对昆虫幼虫的生存发育产生影响，也对成虫的生长发育和繁殖及种群增长有一定的影响[11]。

### 1.1.1.2 寄主植物对天敌昆虫生长发育的影响

寄主植物因其所含营养成分的差异，不仅可以影响直接取食昆虫的生长发育，还可以间接影响取食昆虫的天敌昆虫的生长发育和繁殖情况。徐维红等（2007）将粉虱成虫接于菜豆、烟草、棉花、黄瓜和茄子五种寄主植物上，之后挑取粉虱分布均匀的叶片置于丽蚜小蜂( *Encars ia f or mosa G ahan*)饲养室，测定其寄生情况及小蜂生长发育、存活和增殖情况。结果表明不同寄主植物间丽蚜小蜂的寄生率存在显著差异。其中在番茄上的寄生率最高，达84%；其次依次为菜豆、烟草、棉花和黄瓜（低至26.9%）。不同寄主植物上丽蚜小蜂的生长发育、成虫寿命和产卵量也有限制差异，但其存活率无明显差异[12]。由上可知，因寄主昆虫的质量可直接影响丽蚜小蜂的成虫寿命和生育能力及生理指标[13]，而寄主植物又对粉虱的生长发育和存活率等生理指标有明显的影响，所以寄主植物间接地对丽蚜小蜂的生长发育和增殖及寄生情况也产生了影响。

### **1.1.2** 寄主植物对昆虫体内一些酶和Th理指标的影响

不同寄主植物对昆虫的生理生化、行为表现、繁殖发育等方面都会产生不同

程度的影响。寄主植物体内所含的营养物质与昆虫的消化生理特性间的联系，对昆虫的存活率、发育速度和产卵率都会产生一定的影响。一般而言，昆虫取食适应生长的植物存活率高、发育速度快，繁殖力强，反之则存活率低、发育慢，繁殖力差，这是造成田间世代重叠的一个重要因素，也影响着下一代种群的增长趋势[14]。寄主植物对昆虫的营养效应是昆虫与寄主植物之间的相互作用中的一个极为重要的因素。昆虫取食寄主植物可从中获取其生长发育和繁殖所必须的营养物质，包括氨基酸、蛋白质、核苷酸、碳水化合物、维生素、留醇和矿物质等。不同植物所含营养物质的质和量不同。昆虫只有将寄主植物中的营养物质进行消化和吸收，并将其中的有毒物质分解排泄才能获得营养，其生理活动才能正常进行[15]。因此不同寄主植物可通过影响昆虫体内的各成分含量和一些酶的活性来影响昆虫的生长发育和繁殖。

王蕾等（2012）用灰菜、向日葵、大豆、玉米和马铃薯分别饲养草地螟，发现其相对取食量，相对生长率和食物利用率均有较大差异。草地螟幼虫最喜取食的灰菜处理组的各项营养指标均显著高于其他寄主植物处理组，而草地螟幼虫不喜食的玉米和马铃薯处理组各项指标均低于其他处理组。取食供试的5种寄主植物12h后的草地螟中肠胰蛋白酶活性顺序为灰菜>向日葵>大豆>马铃薯>玉米，中肠淀粉酶活性顺序为马铃薯>灰菜>大豆>向日葵>玉米，中肠酯酶活性顺序为大豆>玉米>灰菜>马铃薯>向日葵[15]。李子玲等（2005）分别用豇豆、菜心、苋菜、蕹菜和葱饲喂小菜蛾后测定幼虫体内羧酸酯酶和乙酰胆碱酯酶活性，结果表明取食豇豆和菜心的幼虫羧酸酯酶活性显著高于取食其他食料的幼虫，取食蕹菜的活性最低，取食葱和苋菜的居中；乙酰胆碱酯酶活性高低依次为葱>菜心>豇豆=蕹菜>苋菜[13]。由此可见，昆虫取食不同寄主植物后一些生理指标和体内一些酶的活性都会不同，由此可以导致昆虫生长发育历期和繁殖力的差异，从而影响其种群增长趋势。

### **1.1.3** 植物表层物质及次Th代谢物等对昆虫寄主选择性的影响

### 1.1.3.1 植物表层物质对昆虫寄主植物选择性的影响

植物表皮层的外壁分化为角质层，角质层上通常覆盖着一层蜡质层。在植物抵御外界生物和非生物因子的威胁如昆虫、病菌、干旱、辐射、低温、机械磨损、

酸雨等的过程中具有重要作用；其蜡质的化学组成也是昆虫定位和选择寄主植物的重要线索，既可直接影响植食性昆虫的取食和产卵活动，又可通过影响其寄生生物，并对其天敌产生间接影响[16-18]. Bergman等研究认为，增加蜡质的数量会增强紫花苜蓿*Medicago sativa*对苜蓿彩斑蚜*Therioaphis maculatus*的抗性。有的则相反，表面蜡质少会妨碍植食性昆虫对寄主植物的选择，如光滑蜡质少的高粱幼苗比蜡质多的对高粱芒蝇*Phaonia soccata*、甘蓝对粉蝶*Pieris rapae*（L.）和甘蓝蚜*Brevicoryne brassica*（L.）、加拿大紫荆*Cercis Canadensis var. mexicana*

(L.)对切叶蜂*Megachile*的抗性强。Epicuticular lipids of alfalfa leaves relative to its susceptibility to spotted alfalfa aphids (Homoptera: Aphididae) [23]。

有些植物的表层特征也会间接影响天敌昆虫的定位取食行为。例如研究表明丽蚜小蜂对粉虱有较好的防治效果，然而实践证明应用丽蚜小蜂防治粉虱在番茄上效果较好，但在黄瓜和茄子上的实际效果并不理想，究其原因可能与黄瓜和茄子的叶表皮特征有关。黄瓜叶片绒毛密度较大，可能阻碍丽蚜小蜂对寄主的搜索和定位从而使其寄生能力下降，影响其生长发育和繁殖[12]。

### 1.1.3.2 植物次生代谢物对昆虫寄主植物选择性的影响

植物的次生代谢物是指由植物产生的但并非正常生长发育所必需的一类小分子有机化合物，其产生和分布通常具有种属、器官、组织和生长发育时期的特异性，是植物在长期进化过程中对环境的一种适应，在植物对环境胁迫的适应、植物与植物之间的相互竞争和协同进化、植物性昆虫的危害、草食性动物的取食及病原微生物的侵袭等过程的防御中起着重要作用。植食性昆虫可通过植物挥发物等次生代谢物来寻找和定位寄主植物，但植物次生性物质也是植食性昆虫取食过程中的主要障碍之一。

#### 1.1.3.2.1 植食性昆虫通过植物挥发物来寻找定位寄主植物

因为每种植物的挥发物组分都有不同，且同种植物不同生长发育状态下所散发的挥发物也会有所不同，所以这些不同的挥发物就构成了该植物特有的“身份证”[24]。几乎所有植食性昆虫都可以通过感受植物挥发物来寻找定位和选择寄主植物。如对马铃薯甲虫来说，只要有马铃薯叶片气味存在，马铃薯甲虫就会产生寄主定向行为[25]；而许多植物挥发性气味成分中的苯乙醛对棉铃虫、亚洲玉米

螟、粉纹夜蛾等多种蛾类具有引诱作用；多种果树挥发物中的一种法尼烯成分对苹果蠹蛾具有较强的引诱作用；杨树叶的挥发物则对雌性棉铃虫有很强的引诱作用[26]；在玉米穗的挥发物成分中含有十三碳烯-酮、(E, E) -3,5-十八二碳-2-酮和( E, Z) -2,6-十九碳二烯醛等，经测定对玉米根叶甲有引诱活性[27]；松针叶挥发物中的单萜成分A-蒎烯、B-蒎烯、月桂烯和莰烯能够引诱天牛科、象甲科、小蠹虫科及郭公甲科的昆虫，这些都是危害松树的重要害虫[28]；油菜叶片挥发物中的3-丁烯基异硫氰酸酯、4-戊烯基异硫氰酸酯和2-苯乙基异硫氰酸酯的混合物是一种长距离引诱剂，对甘蓝荚象甲有强烈的引诱作用，但是成虫一旦进入田间这类混合物便不再对成虫有引诱作用[29]。也有研究表明（Z）-3-己烯醇乙酸酯、里那醇和水杨酸甲酯的混合物对马铃薯甲虫有很强的引诱作用，但这三种物质单个组分却无引诱活性[30]；Hammack等（2001）将水杨酸甲酯和三种萜烯[（±）里那醇、(+) -α-萜品醇和β-紫罗兰酮]混合时所诱捕到的玉米根叶甲的数量明显高于单独组分的诱捕量[31]。此外，也有研究证明寄主植物的某些挥发性物质可引诱抱卵雌蛾在寄主上降落产卵，如棉花、番茄等作物作为美洲棉铃虫的寄主植物，其散发的一些物质可诱导已交配的雌蛾产生寄主定向行为并可刺激其产卵[32]。

#### 1.1.3.2.2 植物通过次生代谢物来干扰害虫定位和抵御昆虫取食

植物挥发物除可作为信息素为昆虫寄主定位起引导作用外，一部分挥发物还可作为植物抵御外界侵害的手段，干扰昆虫对寄主的定位，甚至可以向周围的同类植物报警，使其进入警戒状态（如报警信息素）[24]。如Blaakmeer等发现甘蓝植株被大菜粉蝶取食后，挥发物中萜类化合物的相对含量和种类均有下降[33]。此外，对于一些植物来说，昆虫取食和产卵行为可以诱导其产生特殊的挥发性物质，该种挥发物可以诱导寄生蜂等天敌昆虫的寄主定位，从而减少植食性昆虫对自身的伤害[34, 35]。如被桑天牛产卵为害的桑树苗上的健康枝条对桑天牛卵长尾啮小蜂的引诱力显著高于健康植株的桑枝，这种释放机制在欧洲赤松上同样存在

[36, 37]。

植食性昆虫的产卵不仅可以诱导植物释放挥发物引诱天敌昆虫，还可以通过改变叶片表面的化学物质为天敌昆虫提供可靠的信息[38]。Fatouros等通过接触反应实验表明大菜粉蝶在芽甘蓝上产卵72h后其产卵植株上未被产卵的叶片对甘蓝夜蛾赤眼蜂雌蜂有明显的滞留作用，据研究这种滞留作用是由于甘蓝夜蛾产

卵后诱导叶片表层化学物质发生变化所至[39]。已有研究证明该种变化对其它卵期寄生蜂（如盔奥啮小蜂和红金姬小蜂）也有诱导作用[40, 41]。但是植食性昆虫产卵后植株对寄生蜂的引诱能力也受寄主植物和寄生蜂种类的影响，如螟黄赤眼蜂对高粱上棉铃虫卵的寄生率高于木豆上的，广赤眼蜂则对5种不同品种葡萄上的葡萄花翅小卷蛾的卵表现出不同程度的偏好[42, 43]。

### **1.1.4** 寄主植物对昆虫敏感性的影响

因不同寄主植物所含营养物质不同，因此昆虫取食不同寄主植物后体内各组分含量及一些酶的活性也会有所不同[1]，这些不同可能会影响昆虫对外界环境尤其是杀虫剂的敏感性[2]。有研究表明，植食性昆虫取食寄主植物后对药剂的敏感性变化与不同植物中次生物质诱导激活/抑制昆虫体内相关解毒酶活性有关，而这种诱导作用则可受到植物体内营养物质种类和含量、次生代谢物种类及其含量分布、植食性昆虫的种类和生长时期及外界的环境条件等多种因素的影响，且昆虫体内诱导出的解毒酶对不同杀虫剂的代谢能力一般都不相同，从而可导致昆虫对不同药物的敏感性有明显变化。解毒酶系的诱导激活在害虫抗药性形成早期被认为有利于提高隐性抗性基因频率，从而可促进害虫抗药性的发展。

寄主植物对植食性昆虫药物敏感性的影响因植物、昆虫和药物种类而异，大致可分为3类：敏感性下降、耐药性明显上升；敏感性明显上升、耐药性下降和敏感性与耐药性均无明显变化。

取食薄荷叶片的杂豆角夜蛾对有机磷类和氨基甲酸酯类药物的敏感性明显较取食大豆的低[44]，取食薄荷的苜蓿银纹夜蛾和粉纹夜蛾对西维因和乙肟威的敏感性明显低于取食苜蓿或绿花椰菜的[45]；有实验证明取食野生番茄品系

（I2134417）或添加番茄次生物质—2-十三烷酮的饲料均可提高美洲棉铃虫对西维因的耐药性，而在人工饲料中添加棉酚或棉蕾提取物则可显著提高对甲基对硫磷的耐药性[46]。这可能是因为薄荷和番茄等这类寄主植物中往往含有一些次生物质可直接导致植食性昆虫对某些药物的敏感性降低，耐药性增加。但有些植物，植食性昆虫取食后则可导致其对药物的敏感性提高。如取食谷子的草地粘虫对敌百虫、西维因和二氯苯醚菊酯的敏感性明显高于取食其他植物的[47]；不过也有一些植物对昆虫的药物敏感性无明显影响。

由于不同寄主植物对昆虫的生长发育、一些生理指标及种群增长特征均有显著影响，且植食性昆虫对不同寄主植物常具有明显的选择性，因此可以考虑通过进一步探究昆虫的选择性和植物对其的影响直接的关系，从而通过“间作套种”等方法来防治害虫。此外，一些植物在受到害虫危害时可引诱害虫天敌，因此我们可以考虑利用天敌昆虫来防治害虫，从而减少化学农药的使用，达到有害生物综合防治的效果。

目前，对寄主植物和昆虫之间的关系的研究虽然比较多，但真的能够实现田间应用的还很少，且田间不定因素太多，因此对最终防治效果也不确定。我们还需要继续努力，进一步探究昆虫和寄主植物之间的关系并将其应用到实际中来，以期实现真正的高效、环保的“有害生物综合防治”。

## **1.2** 昆虫的嗅觉机制

昆虫是一种生物，取食是其生物的本能。植食性昆虫通过取食寄主植物才能生存和繁衍，而在寻找、识别、接受食物和适应食物（寄主植物）的过程中，运用了包括视觉、嗅觉、触觉和味觉等感觉功能（陆宴辉等，2008）。这是昆虫与寄主植物在长期协同进化过程中所形成特性，即构成了昆虫与植物之间的特定关系。植食性昆虫在寻找、识别、定位寄主植物过程中主要凭借化学通信，在自然界中化学通信普遍存在，昆虫依靠其灵敏的感觉系统而感知化学信号，并通过嗅觉系统的传递实现寻找和获得食物，以满足自身繁衍的需要（戴建青等，2010）。

### **1.2.1** 昆虫的触角感受器和嗅觉识别过程

昆虫触角位于头部顶端，前伸且灵活机动，能更大范围搜索空气中的信息化合物，是昆虫感受外界环境的主要器官，其表面着生有多种由表皮特化形成的感受器，一般处于易接触外界化学信号的地方，可产生相应的信号编码，使信息能够传递到神经处理系统。昆虫在寻求配偶、寻找食物或生殖场所的过程中，主要是通过触角上的感器感知性外激素或寄主植物的挥发性物质来完成。研究昆虫触角感器的种类、分布、形态和功能，可以为探明昆虫的行为学机制奠定基础。图1-1所示为昆虫嗅觉感器结构图。

根据昆虫触角感受器形态特征，一般将感受器分为刺形感器、毛形感器、锥形感器、腔锥形感器、瓶形感器、板形感器、栓锥形感器、鳞形感器、钟形感器、剑鞘形感器十种类型，此外还有耳形感器、Böhm氏鬃毛等。不同感受器，其功能也所不同。其中毛形感器是昆虫触角上数量最多、分布最广的感器，是一种机械感受器，同时也是一种触觉感器，对信息素敏感；锥形感器和腔锥形感器则为感受植物挥发物的主要感器[48-62]。

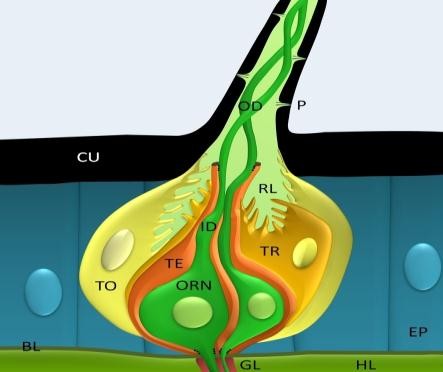


图1-1 昆虫嗅觉感器结构图（Stengl 2013）

P：感器壁孔；OD：远端树突；CU：表皮；RL：受体淋巴液；ID：近端树突；TR：鞘原细胞；TE：毛原细胞；TO：膜原细胞；ORNs：嗅觉受体神经元；BL：基底膜；EP：上皮细胞；HL：血淋巴。

Fig. 1-1 General organization of an insect olfactory sensillum（Stengl 2013）

P: pores; OD: outer dendrite; CU: cuticle; RL: receptor lymph; ID: inner dendrite; TR: thecogen cell; TE: trichogen cells; TO: tormogen; ORNs: olfactory resectors neuron; BL: basal

Lamina; EP: epithelial cells; HL: hemolymph.

### **1.2.2** 昆虫的嗅觉识别过程

昆虫依靠嗅觉系统识别环境中成千上万的信号分子。昆虫的嗅觉相关蛋白主要包括气味结合蛋白（odorant binding proteins, OBPs）、化学感受蛋白

（chemosensory proteins, CSPs）、气味受体（odorant receptors, ORs）、气味降解酶（odorant degrading enzymes, ODEs）、感觉神经元膜蛋白（sensory neuron membrane proteins, SNMPs）等。在昆虫嗅觉识别过程中，不同的蛋白其所起的作用是不同的。图1-2所示为昆虫嗅觉识别过程示意图。昆虫在活动时，空气中的气味化合物（F）可以通过触角感器表皮上的小孔（G）进入，气味化合物包

括挥发性与非挥发性化合物，一般为疏水性分子，无法独立穿过亲水性淋巴液，因此需要借助化学感受蛋白和气味结合蛋白完成，其中化学感受蛋白主要用于运输非挥发性亲脂性配体，帮助其到达受体，对环境中化学因子刺激进行感受、识别、转运和传导；而挥发性气味化合物，需要水溶性气味结合蛋白的辅助到达受体。气味结合蛋白与气味分子复合体（I）通过淋巴液到达树突膜上的受体蛋白，并激活受体蛋白，此过程有两种假说，一种认为是气味结合蛋白与气味化合物形成的复合体共同作用于气味受体；另一种假说认为只有配体气味分子激活受体蛋白。受到刺激后树突膜的通透性发生变化，产生神经冲动，指导昆虫做出行为反应。此时气味化合物被气味降解酶和谷光氨肽转移酶降解。



图1-2 昆虫的嗅觉识别过程（刘召和花保祯2011）

A：空气；B：触角壁；C：膜原细胞；D：毛原细胞；E：神经细胞；F：气味化合物；

G：感受器表皮上的小孔；H：感受器表皮；I：气味结合蛋白与气味分子复合体；J：到达树突表面的气味分子；K：嗅觉受体蛋白；L，M，N：产生的神经冲动。

Fig. 1-2 The olfactory process of insects(Liu Zhao and Hua Baozhen 2011)

A: air; B: antennae cuticle; C: tormogen; D: trichogen; E: neuron cell; F: odorant molecules;

G: sensillum surface pore; H: sensillum surface; I: complex odorant binding proteins and odorant molecules; J: odorant mocule on the dendrite surface; K: olfactory receptor protein; L, M, N: nervous impulse.

### **1.2.3** 昆虫气味结合蛋白

### 1.2.3.1 昆虫气味结合蛋白的种类

关于气味结合蛋白的研究，目前主要集中在鳞翅目昆虫中。1981年，多音天蚕蛾（Antheraea polyphemus）触角中的性信息素结合蛋白（pheromone binding protein, PBP）首次被发现[63]。之后，多种普通气味分子结合蛋白（general binding

proteins，GOBPs）在鳞翅目昆虫触角中被相继发现[64, 65]。此外，关于果蝇

（Drosophila melanogaster）的气味结合蛋白也有较多研究，并研究在果蝇触角中发现了触角结合蛋白（antennal binding proteins, ABPs）[66, 67]。迄今为止，气味结合蛋白（OBPs）通常被分普通气味结合蛋白（GOBPs）[63][67]、性信息素结合蛋白（PBPs）[64, 65]和触角结合蛋白X(ABPX)[68]几大类。

### 1.2.3.2 气味结合蛋白的结构特点和结合机制

做为气味分子进入嗅觉感器后接触的第一个嗅觉蛋白，气味结合蛋白对嗅觉编码起着关键的作用。气味结合蛋白分子量较小，一般介于11-20kDa之间，是一种水溶性，具有α螺旋结构和信号肽的球状蛋白。其多肽链中的6个半胱氨酸两两配对形成3个二硫键[69, 70]，这对维持与功能相关的三维蛋白结构的稳定有重要意义。

利用X-ray结晶学分析家蚕PBP1结构，可以看到其6个保守的Cys残基确实为两两对应形成二硫键，三个二硫键将6个α螺旋连接在一起，这形成了稳定的蛋白结构；研究发现α1、α2、α4、α5和α6螺旋围绕组成圆锥形疏水腔的壁，α3螺旋则位于疏水腔入口处的顶端(Zhou, 2010)。

目前普遍认为气味结合蛋白结合与释放气味分子的过程与气味分子自身的构象、触角感器淋巴液的pH值和神经元树突膜附近的盐离子浓度有关，并且不同昆虫的气味结合蛋白的结合、释放配体的机制有差异[71-73]。家蚕信息素结合蛋白BmorPBP与信息素的结合/释放过程是目前比较经典的蛋白与配体分子的结合理论（如图3所示）。有研究表明，家蚕信息素结合蛋白BmorPBP的构象随pH的改变而变化，当pH为6.5且其信息素蚕蛾醇存在时，BmorPBP为“紧口”构型，可以结合配基；当pH为4.5时，BmorPBP则为“开口”型，其C末端折叠形成一个α-螺旋并占据结合腔内部，这样的结构被认为有利于PBP/配体复合物到达气味受体时信息素分子从结合腔内释放；当没有蚕蛾醇存在时，C末端氨基酸形成α-螺旋替配基的位置占据结合腔，而在pH为7.0时C末端并不形成α-螺旋(Zhang& Leal,2002; Wojtasek& Leal,1999)[73, 74]。但是由于氨基酸序列的差异，某些昆虫的蛋白结构会略有不同。如蟑螂（*Leucophaea maderae*）的OBP的C末端部分很短，进入疏水腔时不形成α-螺旋，而是与腔内的氨基酸形成疏水键[75, 76]。双翅目昆虫果蝇的LUSH、冈比亚按蚊OBP1、埃及伊蚊OBP1和膜翅目昆虫意大利

蜜蜂（*Apis mellifera*）ASP1被称为中等长度PBP，其序列长度介于鳞翅目昆虫和蟑螂的气味结合蛋白之间，解析这些气味结合蛋白的结构发现它们的C端会折叠并进入蛋白核心区域，但不形成α-螺旋，而且在结合的配体时C端也没有被置换出来。在酸性pH条件下，果蝇的气味结合蛋白LUSH并没有发生构象的改变(Keuse, *et al*.,2003)；意大利蜜蜂AmelASP1在酸性条件下结合配体，而在中性环境中释放配体[77]；这些发现都与在家蚕和冈比亚按蚊中观察到的结果正好相反[78,

79]。



图1-3 家蚕PBP1 和GOBP2 与信息素结合的三维结构图（引自Zhou 2010）

C 末端和N 末端已标注，α-螺旋标为α1-α7。蓝色箭头表明蛾类PBPs 之间分化最大

的区域。

Fig.1- 3 Three-dimensional structure of Bombyx mori PBP BmorPBP1 and BmorGOBP2 bound with the pheromone（Zhou 2010）.

N-and C-termini are indicated. Theα-helices are labeledα1-α7. The most variable region between moth PBPs is indicated

### 1.2.3.3 气味结合蛋白的功能

By an blue arrow.

虽然目前还不能明确气味结合蛋白在嗅觉周缘神经系统中的具体作用，但可通过其在嗅觉神经元树突周围的高浓度表达来推测这些可溶性蛋白在昆虫嗅觉识别中具有重要的作用。到目前为止已经明确OBPs的主要功能是结合并转运化学信息物质到达膜结合气味受体。根据已有研究，我们推测OBPs的作用机制可能有以下几种：（1）OBPs/配体复合物共同激活受体；（2）复合物在与受体结合

解离，配体单独激活受体；（3）OBPs做为传递介质，将配体运送到感觉神经元膜蛋白（SNMP），再通过SNMP将化合物传递给受体，最终由气味降解酶将信息物质降解[80, 81]。由此可以推断OBPs的主要功能可能是以下几种：（1）做为转运者，携带气味分子穿过感器淋巴液；（2）与气味分子结合后携带气味分子到达神经树突，之后OBPs先与受体作用，再卸载气味分子；（3）直接与气味分子配体形成复合物与受体发生作用；（4）将与受体结合后的气味分子带离[82]。综上所述，气味结合蛋白OBPs作为脂溶性的气味分子的溶剂和载体，通过特异性结合过滤、筛选环境中的信号物质，参与生物体的气味识别的过程。

## **1.3** 草地螟研究现状及立题依据

草地螟（*Loxostege sticticalis* L.）属鳞翅目（Lepidoptera）,螟蛾科（Pyralidae）野螟亚科（Pyraustinae）锥额野螟属（Loxotege），别名黄绿条螟、甜菜网螟，俗称罗网虫、吊吊虫或网锥额野螟；取食范围较广，是严重危害我国农牧业的重要害虫之一[1,83]。草地螟幼虫可取食危害多种寄主植物，如苜蓿、胡枝子、高羊茅等，成虫具有远距离群集迁飞和周期性暴发危害的特点，是我国东北、华北和西北农牧业种植区重要的间歇暴发的多食性害虫，对农牧业的生产造成了严重危害[84, 85]。草地螟幼虫取食植物方式有4种类型：一是啃食叶肉仅剩叶脉和表皮，如大豆、玉米和小麦、葱等作物表现此为害状；二是咬食梗茎，如取食向日葵、蒿类等植物茎秆表皮；三是取食植物花器，如取食玉米花丝、向日葵花瓣、绿豆花萼等；四是蛀食果实，如取食玉米细嫩籽粒、向日葵子盘、西瓜瓜皮、葡萄果肉、豆角、西红柿等。孙雅杰等报道，草地螟幼虫还可取食马铃薯的块茎、萝卜的块根和树皮等[86]。

由于草地螟的发生常伴随有来势猛、密度大、危害严重的特点，如果防治不及时便可能造成毁灭性的灾害。自建国以来，我国曾于二十世纪50年代、70年代末至80年代初及90年代中期发生三次草地螟大暴发[87]。对此，50年代，我国在河北、ft西、内蒙三省（区）建立了草地螟试验站；80年代，河北、ft西、内蒙、黑龙江和吉林省等相应研究和推广单位成立了草地螟研究协作组，对其防治技术与生物学特性等开展了大量研究工作，对于草地螟的生物学习性、与环境的关系、防治措施及迁飞等问题进行了初步的探讨（草地螟科研协作组，1987）。康爱国等

（1999）对各种作物田草地螟落卵量的调查表明，杂草上的卵量占总卵量的85%以上，其中以灰菜上卵量最高；杂草多的作物田受害严重。罗礼智等对草地螟进行了广泛深入的研究，曾经先后报道了草地螟的发育起点温度、有效积温及世代区的划分、温度对草地螟产卵与寿命的影响、不同日龄草地螟成虫飞行能力及行为的变异、张家口1997年一代草地螟幼虫大发生原因分析、草地螟第三次猖撅为害周期己经来临等一系列文章，为草地螟测预报水平的改善和提高提供了重要的科学依据，并提出了“除草防治”是控制我国一代草地螟为害的关键措施的科学思路。尹姣等（2001）对不同的寄主植物苜蓿、大豆、玉米、马铃薯和向日葵对草地螟种群增长的影响及草地螟对寄主植物进行选择的重要感器做了深入研究。这些都为我国草地螟的研究和防治工作做出了重要的贡献。在国外，草地螟的发生为害也很严重，国外学者也对草地螟作了较深入的研究。如Zhauerakiw等（1932）、

Tempyxa等（1975）、Hondru(1977)、PoPov(1976)、Topucin等（1980）先后研究报道了温、湿度对草地螟生长、发育及成虫繁殖的影响，对积温和发育起点温度等也进行了相应研究。

虽然上述研究已较为广泛，然而近几年，随着农田栽培耕作制度的改变，农田生态环境也有很大的变化，草地螟的为害亦有随之呈加重的趋势。1996年以后特别是进入21世纪以来，草地螟在我国北方草原上连年发生，给农牧业生产造成了严重的损失，对畜牧业可持续发展构成了严重威胁。因此，及时高效的防控草地螟，降低其对农牧业的为害依然是目前植保工作的热点问题。

本文中，作者选取苜蓿、草木樨、沙打旺、胡枝子、高羊茅、老芒麦和黑麦草这几种常见牧草作为供试寄主植物，研究草地螟对其的选择性差异及其对草地螟的生长发育和种群增长的影响，分析不同寄主植物之间挥发物的差别，从而进一步研究影响草地螟对不同寄主选择性的因素。这不仅有利于草地螟的预测预报，还可为寻找草地螟的生态防治方法奠定基础。此外，对草地螟OBP1蛋白功能位点的预测也可为草地螟的生态防治提供一条新的思路。

# **2** 材料与方法

## **2.1** 实验材料

### **2.1.1** 虫源

虫源来自内蒙古乌兰浩特市郊区田间采集的越冬代蛹，室内羽化为成虫后用

5%蜂蜜水饲养，使其产卵繁殖。卵孵化后幼虫用灰绿藜（*Chenopodium album* L., 俗称灰菜）饲养，成虫和幼虫饲养条件均为22+l℃，光照为L16: D8，湿度为70%-80%。

单头饲养实验供试幼虫为孵化后用灰菜饲养的三日龄幼虫。

### **2.1.2** 供试植物

### 2.1.2.1 草地螟对不同寄主植物的产卵选择性及不同寄主植物对草地螟Th长发育的影响实验所用供试植物

供试植物为温室种植的苜蓿、草木樨、沙打旺、达乌里胡枝子、高羊茅（法恩）、老芒麦和多年生黑麦草（金多福），对照植物为草地螟最喜食的灰菜。采集生长旺盛的叶片作为实验材料进行实验。

### 2.1.2.2 不同寄主植物挥发物抽提实验所用植物

根据田间调查结果和文献记载数据及草地螟成虫的生物学特性选择几种牧草做为供试材料：苜蓿（*Medicago sativa L.*）、草木樨(*Melilotus suaveolens Ledeb．*)、沙打旺(*Astragalus adsurgens Pall.*)、达乌里胡枝子(*Lespedeza bicolor Turcz.*)、高羊茅(*Festuca elata Keng ex E. Alexeev*)、老芒麦(*Elymus sibiricus Linn*)和多年生黑麦草（*Lolium perenne* L.）。所用牧草来源均为廊坊基地试验田人工种植。

### **2.1.3** 菌种

已构建好的含突变位点质粒的转Resotta（DE3）菌株，来自实验室之前保存的菌种。

### **2.1.4** 试剂、材料及仪器

Tenax-TA 吸附（北京康林科技有限责任公司，60-80mesh）、正己烷（色谱纯）、活性炭、玻璃棉；

巴斯德管（15cm）、医用硅胶管、生胶带、微量进样器（上海安亭微量进样器厂）、大试剂瓶（瓶盖上打孔）、小样品瓶（棕色）；

表2-1 仪器设备

Table 2-1 Instruments and equipments

| 仪器名称 | 生产厂家 |
| --- | --- |
| Sigma 1-14 小型离心机 | 赛维斯科技北京有限公司 |
| Kodak Gel Logic 200 Imaging System | Eastman Kodak Company |
| Eppendorf 台式高速冷冻离心机5804R | 艾本德中国有限公司 |
| 雷磁PHSJ-3F 型 pH计 | 上海精密科学仪器有限公司 |
| H2O3-PRO型干式恒温金属浴 | 金银杏生物科技北京有限公司 |
| LRH-15-生化培养箱 | 上海一恒科学仪器有限公司 |
| DYY-6C 型电泳仪电源 | 北京六一仪器厂 |
| DSY-2-4 孔电热恒温水浴锅 | 北京国华医疗器械厂 |
| DL-CJ-1ND 型超净工作台 | 北京东联哈尔仪器制造有限公司 |
| 分光光度计（NanoDrop 1000 v3..5.1） | 美国NanoDrop Technologies |
| LX-100手掌型离心机 | 江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司 |
| 78-1 型磁加热搅拌器 | 江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司 |
| IS-RDD3台式恒温振荡器 | 美国精骐有限公司 |
| 奥豪斯电子天平CAV214C | 美国奥豪斯有限公司 |
| 大气采样仪 | 北京市劳动保护科学研究所 |
| 气质联用仪 | Thermo |

## **2.2** 实验方法

### **2.2.1** 草地螟对产卵寄主的选择性

为了控制试验条件，本项研究主要采用室内观测的方法，以明确草地螟对供试寄主植物的产卵选择性。

将生长旺盛的供试植物放入五面均为纱网的正方体纱网罩中，放入15对三日龄以上的成虫，记录牧草摆放位置并用5%蜂蜜水为成虫提供食物。每日更换牧草位置以减少方位对草地螟成虫产卵选择性的影响，并检查记录成虫在不同寄主植物上的落卵量。

### **2.2.2** 不同寄主植物对草地螟Th长发育的影响

在此通过单头饲养的方法来观测不同寄主植物对草地螟生长发育的影响。挑选生长状况良好，大小一致的幼虫，分别接入装有不同牧草的直径2.3cm

长10cm指形管中，每管一头，每种牧草接30管。每天更换牧草并检查记录取食不同牧草的幼虫的存活情况。至其化蛹，记录其幼虫期时长；继续单头饲养至其羽化，记录其蛹期时长；待其羽化后分辨雌雄，之后雌雄配对，每对单独放置于一个透明硬塑料罩筒中，其中底端采用培养皿，内放5%蜂蜜水饲喂，其顶端采用纱布封口；记录其产卵前期长短、每天的产卵量及产卵期长度，并记录卵的孵化率。

### **2.2.3** 挥发物提取方法

### 2.2.3.1 吸附柱的填装及预处理

称取0.5g吸附剂，装入两端用玻璃棉封口的巴斯德管中，使其紧密不留空隙。用色谱纯的正己烷冲洗填装后的吸附柱并氮吹使其干燥，最后用生胶带将吸附柱两端密封好备用。

### 2.2.3.2 挥发物的抽提和洗脱



图 2-1 顶空吸附法装置示意图

Fig. 2-1 Equipment of Headspace collecting method

本实验采用顶空吸附法对寄主植物挥发物进行抽提，其装置如图2-1所示。由于样品采集是在室外，植物蒸腾作用较强，因此气流经过植物后先通过图

中空瓶将其中的水蒸气部分冷却，以减少经过吸附柱的气流中的水分，降低水分对吸附柱吸附效率的影响。

具体步骤为：选取生长旺盛的植物，用无味的袋子套好后用无味的医用硅胶管按照上图连接装置。首先将出气口硅胶管连接在大气采样仪上，用夹子夹住进气口管，打开采样仪，将袋内空气抽空排净，然后将出气口夹住，进气口连接采样仪，给袋内充气。待气体充满后按照图示连接装置，控制气流为200ml/min，循环采气。抽提5h后取下吸附柱，用2-3ml正己烷洗脱至棕色小样品瓶中，氮吹浓缩至1ml，封好瓶口，置于20℃冰箱备用。

### 2.2.3.3 挥发物的分析和鉴定

将抽提的挥发物用气象色谱-质谱联用（GC-MS）进行分离鉴定。所用气质联用仪为美国Thermo公司生产的仪器，色谱柱为HP公司生产。

### 2.2.3.4 程序升温

40℃保持3min 6℃/min升至150℃10℃/min升至250℃，保持5min。



### **2.2.4** 双突变**OBP1**的表达纯化及荧光竞争结合验证

### 2.2.4.1. 双突序列测定及比对

将保存的转有突变质粒的菌种接于加有5µl 50 mg/ml Kan的5 ml LB液体培养基中（Kan终浓度为50µg/mL），37℃/200 rpm过夜培养使其活化后送样测序，将结果与原蛋白序列比对，检测突变位点。

### 2.2.4.2 蛋白表达与SDS-PAGE电泳检测

##### （1） 将保存的转有突变质粒的菌种接于加有5µl 50 mg/ml Kan 的5 ml LB

液体培养基中（Kan终浓度为50µg/mL），37℃/200 rpm过夜培养使其活化。

（2）将活化后的菌按1%的浓度转接于5 ml加有5µl 50 mg/ml Kan的LB液体培养基中，37℃/200 rpm培养2 h左右，待其OD600值达到0.5-0.6时取出1 ml做为对照，剩余的加入3.2µl 1M/L的IPTG，是其终浓度为0.8 mM/L，28℃/160 rpm连续诱导8小时。

##### （3） 诱导表达完成后取1mL置于1.5mL离心管中，与之前取出的对照一起

12000rpm离心2min收集菌体。加入40µl ddH 2o重悬菌体后加入10µl 5×上样缓冲液，混匀后沸水浴5min，冰置冷却。取上清进行SDS-PAGE电泳检测诱导表达情况。

##### （4）SDS-PAGE凝胶的配制及电泳前准备：组装凝胶模具，确保其密闭性以避免凝胶渗漏。按照附录配方配制分离胶，并将其缓缓适量加入凝胶板的中间，注意应尽量避免产生气泡。之后轻轻在分离胶溶液上层覆上一层蒸馏水，以保证分离胶表面平整。约1 h后蒸馏水层与分离胶之间会出现一条明显的分界线，这说明分离胶已聚合完全。倾去蒸馏水并用滤纸吸干多余水分，再将按附录配方配制好的浓缩胶缓缓加至分离胶上面，直至凝胶溶液到达前玻璃板顶端。轻轻将梳子插入两块搅拌之间，注意应尽量避免气泡的产生。约30 min后浓缩胶凝胶完全。小心拔去数字，将凝胶板放入电泳槽中并加入足够的1×电泳缓冲液，准备电泳。

##### （5）上样及电泳

取20µl之前制备好的蛋白诱导产物样品，小心加入胶孔中，记录点样顺序。

80V/70mA电泳30 min左右直至样品到达浓缩胶与分离胶分界线；200V/100mA电

泳1 h左右，直至样品和Marker均在分离胶中分离完全。

##### （6）染色与脱色

电泳结束后取下胶板，小心切除浓缩胶后将分离胶置于考马斯亮蓝染液（配方见附录）中，于水平摇床上震荡染色15 min，脱色液脱色后即可查看诱导情况。扫描或拍照后保存图片。

### 2.2.4.3 Western blot 验证诱导结果

##### （1）电转印

准备与凝胶同样大小的NC膜一张和稍小于NC膜的Whatman滤纸两张，于转印缓冲液（配方见附录）中浸泡5min。之后从负极到正极按照凝胶支持纤维—滤纸—凝胶—NC膜—滤纸—凝胶支持纤维的顺序放好（注意各层之间不能有气泡），使正负极方向与支撑体的正负极方向相对于。之后将支撑体整个放入转印槽中，加入转印缓冲液。80mA/75V恒流转印2 h，完成转印。此时凝胶上的蛋白已转印至NC膜上。小心将膜取下，置于5%脱脂牛奶中封闭。

##### （2）Western blot验证

a封闭：将转印有蛋白的NC膜小心置于TBST（配方见附录）配制的5%脱脂牛奶中，室温摇动封闭至少1 h。

b孵育一抗：将封闭后的NC膜放入20mL用TBST配制的5%脱脂牛奶中，加入20µl鼠源His-tag多克隆抗体（1:1000），室温摇动孵育1 h。

c洗涤：将NC膜于TBST中室温摇动洗涤，每次5min，重复5次。

d孵育二抗：将洗涤后的NC膜置于20 mLTBST配制的5%脱脂牛奶中，加入10µl羊抗鼠IgG（1:2000），室温摇动孵育1 h。

e洗涤：将NC膜于TBST中室温摇动洗涤，每次5min，重复5次。

f 显色：将洗涤后的NC膜置于20 mL显色液（配方见附录）中，加入132µlNBT

（50mg/mL, 终浓度为0.3mg/mL）和66µlBCIP(50mg/mL, 终浓度为0.15mg/mL)，用锡箔纸包裹避光，水平摇床上室温摇动使其显色。条带清晰时立即将膜转移至蒸馏水中终止显色。

### 2.2.4.4 蛋白大量表达和纯化

本实验采用Ni亲和层析柱纯化蛋白。Ni2+可与融合蛋白的6×His氨基酸之间产生吸引力，主要是组氨酸残基的五元咪唑环是蛋白与镍离子发生作用，从而可以在蛋白溶液经过镍柱时将带有His-tag的融合蛋白与其他杂蛋白区分开来。咪唑可与His-tag竞争结合镍离子。因此我们可在融合蛋白与层析柱中的镍离子结合后用高浓度的咪唑将其洗脱下来。

##### （1）蛋白的大量表达和菌体收集

将过夜活化后的菌按1%的浓度转接于500 ml加有500µl 50 mg/ml Kan的LB液体培养基中，37℃/200 rpm培养2 h左右，待其OD600值达到0.5-0.6时取出1 ml做为对照，剩余的加入400µl 1 M/L的IPTG，是其终浓度为0.8 mM/L，28℃/160

rpm连续诱导8小时。诱导完成后用50 mL离心管4℃/8000rpm/10 min离心收集菌体，然后加入50ml结合缓冲液（配方见附录）重悬菌体。

##### （2）超声波破碎和蛋白表达位置检测

将重悬后的菌液超声波破碎（5s/5s, 50%）约30min。待其破碎完全后4℃/5000rpm/30 min离心，分别收集上清和沉淀。SDS-PAGE电泳检测蛋白表达情况。

##### （3）尿素溶解包涵体蛋白

经检测，发现蛋白表达与包涵体沉淀中，因此需先用尿素溶液（用pH8.5，

0.1mol/L的Tris-Hcl配制）将其溶解才能进一步进行纯化。实验中经预实验摸索，最终决定使用1M尿素溶解包涵体蛋白。

##### （4）镍柱纯化蛋白

①镍柱填装

a填料的装填：取5mL左右的GE填料，低速离心2出去乙醇后按照3: 1比例加入双蒸水。充分悬匀后用移液枪小心加入层析柱中。打开出水口，用电子蠕动泵连续均匀地向层析柱中加入灭菌蒸馏水以去除填料中残留的乙醇，之后继续向柱中加入蒸馏水，使填料缓缓均匀沉降，形成平整的表面。柱子装填好后关闭出水口。

b固化镍离子：向柱中加入0.2M的二价镍离子溶液。之后用5个柱体积的灭菌蒸馏水冲洗，去除多余的镍离子；再用至少5个柱体积的酸性缓冲液（配方见

附录）润洗填料以洗去松散结合的镍离子，直至流出液pH为4.0左右；最后用2个柱体积的结合缓冲液（配方见附录）润洗填料。至此镍柱的填装完成。

②蛋白质纯化

将用尿素溶解后的蛋白溶液以0.5-1mL/min 的流速引入柱子，是溶液中的蛋白与柱子填料重复接触结合。之后用平衡缓冲液冲（配方见附录）洗填料，直至无杂蛋白从柱中流出。分别用5-10倍柱体积的含有10mM、50mM、100mM、150mM、

200mM、200mM和250mM咪唑的洗脱缓冲液（配方见附录）洗脱融合蛋白，流出液用1.5mL离心管单管分步收集，洗脱期间控制流速约为1mL/min。洗脱完毕后加入5-10倍柱体积的平衡缓冲液平衡树脂，再向柱中加入20%乙醇保存柱子。最后，用SDS-PAGE凝胶电泳检测分布收集的产物。

### 2.2.4.5 蛋白透析复性及超滤浓缩

尿素可使包涵体蛋白溶解，但会是蛋白变性，可通过加精氨酸、甘油、还原型谷胱甘肽（GSH）和氧化型谷胱甘肽（GSSG）使其复性。经过之前的纯化过程，蛋白溶液中会有盐和少量小分子蛋白等杂质。因此，为了进一步得到纯净的、更高浓度的蛋白，需要将尿素、盐、复性剂及小分子蛋白等杂质去除。透析是利用渗透压，用有一定大小孔径的半透膜做为分子筛，对一定大小的分子进行截留从而去除小分子杂质的方法。在透析过程中，小分子的盐离子和小分子蛋白等杂质会自由扩散至整个溶液中，而分子量较大的融合蛋白则被截留，从而将杂质从融合蛋白溶液中去除。本试验中选用截留分子量为6000-8000的透析袋。

##### （1）蛋白透析复性

a 透析袋处理：将透析袋剪成10-20cm的小段；将剪好的透析袋在大体积的

2%（W/V）碳酸氢钠和1mMEDTA（pH8.0）中煮沸10min；用蒸馏水将煮后的透析带反复彻底清洗，之后放在1mMEDTA（pH8.0）中再次煮沸10min；冷却后置于4℃，使之浸泡在液体中，备用。此时起取用透析袋必须戴手套，防治损坏透析袋；使用前需先在透析袋内装满水，检漏后排出，再用清水将之彻底清洗干净。

b透析：向完好的清洗干净的透析袋中加入待透析蛋白，加入蛋白的量约为透析袋体积的1/2-2/3，透析袋两端用夹子加紧防止渗漏。4℃透析36 h，中间增

环透析液以加快透析速度。完成透析后透析袋内溶液体积会有增长。

##### （2）超滤浓缩

透析后蛋白溶液体积增加，浓度降低，因此需将进行超滤浓缩。实验选择

10KD超滤管。使用前先用ddH2O将超滤管内滤膜润湿并将管预冷。向超滤管内加入待浓缩蛋白液，4℃/5000rpm/30 min离心超滤，用移液枪将浓缩后的蛋白溶液小心移除置于干净的管中，弃去废液。

### 2.2.4.6 蛋白浓度测定

实验选择BCA法测定蛋白浓度，所用试剂盒为从上海生工购买的BCA试剂盒。

##### （1）试剂准备

BCA工作液：将A液和B液按照50: 1的比例混合均匀即为BCA工作液。按照以下公式计算所需BCA工作液体积（V）：



BSA标准蛋白溶液：用1×PBS（配方见附录）试剂盒里的标准蛋白稀释为

500µg/ml，之后再用1×PBS进行稀释，使其终浓度分别为0、25、50、100、200、

300、400、500μg/mL，每个浓度稀释300μl。

##### （2）酶标板法测定蛋白浓度

a标准曲线的制作：

在96孔酶标板上选取8个孔，分别加入200μlBCA工作液和20μl稀释后浓度为0、25、50、100、200、300、400、500μg/mL的BSA标准蛋白液，混匀并于水平摇床上震荡30 s，60℃恒温放置30 min，待其冷却至室温后用酶标仪测各孔内样品的A570值，以上操作重复两次，取平均值为各浓度标准蛋白的A570值。以各浓度标准蛋白的A570值为纵坐标，以对应的蛋白浓度为横坐标，在Microsoft

Excle中绘制标准曲线。

b目的蛋白浓度测定：由于用BCA法测定蛋白浓度时为保证测定的准确性，需保证待测蛋白浓度不大于标准蛋白浓度的最大值，因此常在测定前将蛋白进行稀释。实验中将待测蛋白稀释10倍。在96孔酶标板上取三个孔，各加入200μlBCA工作液和20μl稀释后的待测蛋白溶液，并另取三个空加入200μlBCA工作液和20

μl1×PBS，混匀并置于水平摇床上震荡30 s后60℃恒温放置30 min，用酶标仪测定各孔A570。取三个重复的平均值后将平均值带入标准曲线，求得稀释后待测蛋白的浓度。最后根据以下公式计算样品的蛋白的浓度：



### 2.2.4.7 组氨酸标签的切除

为避免His-tag对后续的蛋白功能的研究带来影响，我们需先将融合蛋白上的组氨酸标签切除。实验用的酶为上海启发生物的重组牛肠激酶（EK酶）。

（1）向超滤后的蛋白溶液中加入适量EK酶切缓冲液（EK Buffer，配方见附录）和EK酶，4℃酶切4 h；

（2）将酶切后的蛋白用镍柱过滤，切下的His-tag及未切除His-tag的蛋白会与Ni离子结合，切除His-tag的蛋白则会流出。用干净的离心管收集流出的蛋白溶液，之后再用含不同浓度咪唑的洗脱缓冲液润洗柱子直至蛋白被完全洗脱，用平衡缓冲液平衡柱子后加入20%乙醇，保存镍柱。

（3）用BCA法检测酶切后蛋白浓度。

### 2.2.4.8 草地螟OBP1双突蛋白功能位点验证

实验采用荧光竞争结合实验对蛋白的功能进行验证。目前，在蛋白荧光竞争结合试验中所用的荧光探针主要有1-氨基蒽醌（1-Aminoanthracene, 1-AMA），N-苯基-1-萘胺（N-Phenyl-1-naphthylamine, 1-NPN）和8-苯胺-1-萘磺酸

（8-Anilino-1-naphthalenesulfonic sulfonic, 1,8-ANS），其中荧光探针1-NPN效果较好。

荧光结合实验所用容器为1×1×4cm的石英比色皿，所用仪器为上海精密科学公司970CRT荧光分光光度计，缝宽为10nm，激发光337nm，扫描波长为350-550nm。实验中所用荧光探针1-NPN与气味标样均用HPLC级别甲醇配制为1mM的浓度，实验前用50mMTris-Hcl（pH=7.4），将蛋白稀释为2μM的浓度。

（1）标准曲线的绘制：向比色皿中加入2 mL稀释好的待测蛋白溶液，等待大约1 min，荧光强度稳定后扫描并记录发射光谱，之后以每次4μl的速度向蛋白

中加入1mM的1-NPN探针溶液，使蛋白溶液中1-NPN的浓度按2μM/次的速率上升，直至荧光信号稳定。记录每次加入1-NPN后的最大荧光强度，利用Scatchard方程计算样品蛋白与1-NPN的结合常数（Kd值）。

（2）样品蛋白与气味分子结合能力的测定：向比色皿中加入2 mL终浓度为2μmol/L的蛋白液，加入4μl1-NPN，使1-NPN浓度为2μM，混匀，待其荧光信号稳定时扫描并记录发射光谱，记录最大荧光值。之后按4μM/次的速率加入气味化合物溶液，记录不同浓度时的最大荧光强度值，至最大荧光强度下降至起始最大值的一半或者最大荧光强度稳定时停止加入气味化合物。

（3）根据以下公式计算蛋白与气味分子（配体）的竞争接力常数（*Ki*）



其中，[IC50]为荧光强度下降为初始荧光值一般时的配体浓度；[1-NPN]为结合的探针浓度；K1-NPN为蛋白与探针的结合常数。

## **2.3** 数据处理

通过SPSS对不同处理间的实验数据进行方差分析，比较草地螟对不同寄主植物的产卵选择性及不同寄主植物对草地螟幼虫生长发育的影响。

# **3** 结果与分析

## **3.1** 草地螟对不同寄主植物的产卵选择性

由表3-1可知，仅供试豆科植物存在时，草地螟对苜蓿和草木樨的选择性明显高于对沙打旺和胡枝子的选择性，其产卵量及所占比例间存在显著差异（*P*＜0.05）；草木樨上的产卵量略少于苜蓿，但其间无显著差异（*P*≥0.05）。

表3-1 草地螟成虫对几种豆科植物的产卵选择性

Table 3-1 Selection of*Loxostege sticticalis* L. to Legume plant

| 寄主植物 | 产卵量（粒/株） | 产卵量所占百分比  （%） |
| --- | --- | --- |
| 沙打旺 | 9.67±2.03b | 15.34±2.01b |
| 草木樨 | 19.33±0.88a | 30.68±1.52a |
| 胡枝子 | 12.67±2.33b | 20.11±1.98b |
| 苜蓿 | 21.33±1.33a | 33.86±1.29a |

注：表中数据为平均值±标准误，同列相同小写字母表示处理间差异不显著（*P*≥0.05）；下同。

Date in the table are mean±SE. Same small letters in the same column indicate non -significant difference at

0.05; The same blow.

由表3-2可知，当灰菜存在时，其他供试豆科植物上的落卵量及所占比例均明显少于灰菜（*P*＜0.05），但草木樨与苜蓿上的落卵量仍多余沙打旺和胡枝子，且它们之间存在显著差异（*P*＜0.05）。

表3-2 灰菜存在时草地螟对几种豆科植物产卵选择性

Table 3-2 Selection of *Loxostege sticticalis* L. to Legume plant while Chenopodium album L.

exists

| 寄主植物 | 产卵量（粒/株） | 产卵量所占百分比  （%） |
| --- | --- | --- |
| 灰菜 | 24.67±0.33a | 39.15±1.01a |
| 草木樨 | 12.67±1.45b | 20.11±1.54b |
| 苜蓿 | 15.67±1.86b | 24.87±1.72b |
| 胡枝子 | 8.33±1.20c | 13.22±0.29c |
| 沙打旺 | 1.67±0.88d | 2.65±0.75d |

由表3-3可知，当仅有供试禾本科植物存在时，高羊茅上的落卵量明显高于黑麦草和老芒麦，其间存在显著差异（*P*＜0.05）。

表3-3 草地螟成虫对几种禾本科植物的产卵选择性

Table 3-3 Selection of*Loxostege sticticalis* L. to Gramineae plant

| 寄主植物 | 产卵量（粒/株） | 产卵量所占百分比  （%） |
| --- | --- | --- |
| 黑麦草 | 14.67±1.45b | 29.94±1.32b |
| 高羊茅 | 22.00±1.53a | 44.90±1.65a |
| 老芒麦 | 12.33±2.21b | 25.16±2.09b |

由表3-4可知，灰菜存在时，灰菜上的落卵量明显高于其他供试禾本科植物，其间存在显著差异（*P*＜0.05）；几种禾本科寄主之间，草地螟对高羊茅的选择性仍显著高于对黑麦草和老芒麦的选择性（*P*＜0.05）。

表3-4 灰菜存在时草地螟对几种禾本科植物的产卵选择性

Table 3-4 Selection of*Loxostege sticticalis* L. to Gramineae plant while Chenopodium album

L. exists

| 寄主植物 | 产卵量（粒/株） | 产卵量所占百分比  （%） |
| --- | --- | --- |
| 灰菜 | 44.00±2.08a | 43.86±1.98a |
| 黑麦草 | 18.00±1.53c | 17.94±1.61c |
| 高羊茅 | 25.33±1.20b | 25.25±1.32b |
| 老芒麦 | 13.00±1.16c | 12.96±1.12c |

由表3-5可知，当豆科供试植物苜蓿存在时，草地螟对苜蓿的选择性也明显高于对供试禾本科植物的选择性（*P*＜0.05）；但在几种禾本科寄主中，高羊茅上的落卵量仍明显高于黑麦草和老芒麦上的落卵量（*P*＜0.05）。这说明当草地螟选择性较高的禾本科和豆科植物同时存在时，草地螟更趋向于选择豆科植物。

表3-5 苜蓿存在时草地螟对几种禾本科植物的产卵选择性

Table 3-5 Selection of *Loxostege sticticalis* L. to Gramineae plant while *Medicago sativa* L.

exists

| 寄主植物 | 产卵量（粒/株） | 产卵量所占百分比  （%） |
| --- | --- | --- |
| 苜蓿 | 18.00±1.73a | 39.31±1.82a |
| 黑麦草 | 8.67±0.88c | 18.85±1.01c |
| 老芒麦 | 6.33±0.88c | 13.76±0.79c |
| 高羊茅 | 13.00±1.53b | 28.26±1.49b |

由表3-6可知，当几种供试植物和草地螟最喜食寄主灰菜同时存在时，草地螟更喜选择灰菜为产卵寄主，灰菜上的落卵量与其他植物上的落卵量之间存在明显差异（*P*＜0.05）；除灰菜外，草地螟对苜蓿和草木樨及高羊茅也有较好的选择性，但对高羊茅的选择性略小于对苜蓿和草木樨的选择性，三者的落卵量之间无明显差异（*P*≥0.05）；草地螟最不喜在老芒麦和黑麦草上产卵，在灰菜和豆科及禾本科寄主植物同时存在时，草地螟几乎不在老芒麦和黑麦草上产卵。

表3-6 豆科和禾本科植物共存时草地螟对不同寄主植物的产卵选择性

Table 3-6 Selection of*Loxostege sticticalis* L. to Legume and Gramineae host plant

| 寄主植物 | 产卵量（粒/株） | 产卵量所占百分比  （%） |
| --- | --- | --- |
| 灰菜 | 31.83±5.34a | 24.97±4.19a |
| 苜蓿 | 22.33±1.50b | 17.45±1.38b |
| 草木樨 | 20.50±0.62b | 16.02±0.77b |
| 胡枝子 | 13.83±0.60cd | 10.81±0.49cd |
| 沙打旺 | 6.83±1.08e | 5.34±1.10e |
| 高羊茅 | 17.67±0.49bc | 13.81±0.52bc |
| 黑麦草 | 9.67±0.76de | 7.56±0.78de |
| 老芒麦 | 5.33±0.67e | 4.16±0.59e |

## **3.2** 不同寄主植物对草地螟Th长发育的影响

表3-7 取食不同寄主植物的幼虫存活时长

Table 3-7 Living time of*Loxostege sticticalis* L. feeding with different host plant

| 寄主植物 | 存活时长（龄期） |
| --- | --- |
| 灰菜 | 1 |
| 苜蓿 | 1 |
| 草木樨 | 1 |
| 胡枝子 | 2 |
| 沙打旺 | 5 |
| 高羊茅 | 3 |
| 黑麦草 | 4 |
| 老芒麦 | 5 |

注：1：完成整个世代；2：化蛹但未能羽化；3：五龄左右死亡；4：四龄左右死亡；

5：二龄左右死亡）

(1Means complete the generation; 2 means pupate but can't emergence; 3 means died at 5 age; 4 means died at 4 age; 5 means died at 2 age)

表3-7结果表明仅取食草木樨、苜蓿和灰菜的可以完成及世代，其中取食沙打旺和老芒麦的在转接后三天之内（二龄左右）全部死亡；取食胡枝子的有少数可以化蛹，但蛹未能羽化为成虫；取食高羊茅的有少数可以长至五龄左右死亡，取食黑麦草的则最多仅至四龄左右即全部死亡。观察死亡幼虫，发现未能化蛹的幼虫几乎均在快要蜕皮时或者龄期交替时死亡，由此可以推断幼虫取食胡枝子、沙打旺、老芒麦、高羊茅和黑麦草不能完成世代可能是由于这几种植物中中缺乏幼虫蜕皮、化蛹或羽化所需激素的前体，幼虫取食后不能正常合成或不能合成足够的蜕皮、化蛹或者羽化所需的激素，从而导致虫体死亡。

表3-8为取食灰菜、草木樨和苜蓿的幼虫的一些生长发育指标。发现取食灰菜的幼虫生长发育最快，产卵量最大，羽化率也最高，且与取食草木樨和苜蓿存在显著差异（*P*＜0.05）；成虫期和产卵期最长，但与草木樨和苜蓿的无明显差异

（*P*≥0.05）。这说明草地螟幼虫最喜取食的灰菜不仅对幼虫本身的生长发育最为有利，且对取食昆虫的种群增长也是最有利的。取食苜蓿和草木樨的幼虫在各方面指标上均不如取食灰菜的，但也较好；该结果与草地螟的产卵选择结果可以相互呼应，即：有利于幼虫生长发育的植物上落卵量多，不利于幼虫生长发育的植物上落卵量则较少。这可能是因为成虫要为幼虫选择更适宜生存的环境，所以通常选择幼虫喜食的植物产卵。由此我们可以考虑利用成虫的这种特性在田间进行

间作等，使成虫集中产卵，之后及时将落卵量大的植物集中处理，达到生态防治害虫的效果。

表3-8 取食不同寄主植物的草地螟的生长发育历期

Table 3-8 Development period of*Loxostege sticticalis* L. feeding with different host plant

| 寄主植物 | 幼虫期（天） | 蛹期（天） | 蛹重（毫克） | 羽化率  （%） | 产卵量 | 孵化率（%） | 产卵天数 | 成虫期  （天） |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 灰菜 | 16.38±0.67 b | 16.64±0.73 b | 30.00±12 .00a | 82.75% | 206.00±67 .00a | 97.00±0.12a | 7.40±1.2 0a | 18.46±1.1 0a |
| 草木  樨 | 19.53±0.85 a | 19.61±0.8 0a | 23.00±9 .00b | 53.33% | 153.75±35 .00b | 97.20±0.19a | 5.41±0.65 a | 15.35±0.98 a |
| 苜蓿 | 19.21±0.87 a | 18.04±0.59 a | 28.00±11 .00b | 61.70% | 169.67±29 .00b | 96.50±1.21a | 6.02±0.72 a | 16.28±1.61 a |

## **3.3** 不同寄主植物挥发物的提取和鉴定

经鉴定分析，得到各种植物挥发物的总离子流图（total lon

chromatograms，TIC），并将其中含量较高的物质列于表中。由下列图表可知，黑麦草和苜蓿鉴定出7种物质，草木樨和沙打旺鉴定出8种物质，老芒麦鉴定出 9

种物质，高羊茅鉴定出11种物质，胡枝子鉴定出13种物质。不同植物的挥发物中有些成分是相同的，但含量有所不同。不同植物挥发物的成分和含量的差异，可能就是指导昆虫选择不同寄主植物时所使用的“导航”，用以分辨不同植物。我们可以在后续的实验中通过EAG（GC-EAD）及Y型管或风洞等实验来验证草地螟对抽提所得到物质的反应，以进一步明确草地螟对这几种寄主植物的选择机制。

RT: 0.00 - 32.00



1.5

1.4

1.3

1.2

1.1

1.0

0.9

0.8

0.7

0.6

0.5

0.4

0.3

0.2

0.1

0.0

3.03

5.81

4.98

6.76

12.71

8.87 16.68

9.96

7.99

17.97

20.23

22.85

23.60 24.80

27.85

29.13

30.44

NL: 3.10E9 TIC MS

Caomuxi20 140423

0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30

Time (min)

图3-1 草木樨挥发物总离子流图

Fig. 3-1 TIC of*Melilotus suaveolens Ledeb*．

表 3-9 草木樨挥发物中主要物质成分

Table 3-9 Main composition of*Melilotus suaveolens Ledeb*．volatile

| 名称（草） | 分子式 | 分子量 | 出现时间（min） |
| --- | --- | --- | --- |
| 3-Hexen-1-ol，(z) | C6H12O | 100 | 5.84 |
| Oxime-methoxy-phenyl | C8H9NO2 | 151 | 6.76 |
| N'-[3-(1-hydroxy-1-phenylethyl)phen  yl]hydrazide | C16H18N2O2 | 270 | 7.99 |
| 3-Hexen-1-ol,acetate,(z) | C8H14O2 | 142 | 9.42 |
| Cyclobutane,1,3-butadienyl-(z) | C8H12 | 108 | 9.96 |
| Butanoic acid,3-hexenyl ester,(E) | C10H18O2 | 170 | 12.85 |
| 13-Heptadecyn-1-d | C17H32O | 252 | 13.85 |
| z,z-2,5-pentadecadien-1-ol | C15H28O | 224 | 15. 26 |

RT: 0.00 - 32.00



12.67

16.65

8.83

6.68

4.97

11.69

10.93

20.21

29.12 30.44

7.93

22.83

24.78

9.65

14.56

12.78

28.99

17.92 21.16

24

22

NL: 7.18E8 TIC MS

heimaicao

20

18

16

14

12

10

8

6

4

2

0

0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30

Time (min)

图 3-2 黑麦草挥发物总离子流图

Fig. 3-2 TIC of*Lolium perenne* L.

表3-10 黑麦草挥发物中主要物质成分

Table 3-10 Main composition of*Lolium perenne* L. volatile

| 名称（黑） | 分子式 | 分子量 | 出现时间（min） |
| --- | --- | --- | --- |
| 0-xylene | C8H10 | 106 | 6.12 |
| Oxime-methoxy-phenyl | C8H9NO2 | 151 | 6.65 |
| N'-[3-(1-hydroxy-1-phenylethyl)phen  yl]hydrazide | C16H18N2O2 | 270 | 7.91 |
| Benzene, 1,4-dichloro | C6H4Cl2 | 146 | 9.65 |
| Cyclohexene,1-methyl-4-  （1-methylethenyl）-(s) | C10H16 | 136 | 10.04 |
| Octadecane, 3-ethyl-5(- 2-ethylbutyl) | C26H54 | 366 | 16.00 |
| Teteadecane, 2,6,10-trimethyl | C17H36 | 240 | 16.03 |

RT: 0.00 - 32.00



1.5

1.4

1.3

1.2

1.1

1.0

0.9

0.8

0.7

0.6

0.5

0.4

0.3

3.09

4.97

7.20

10.23

12.70

16.67

NL: 3.16E9 TIC MS

gaoyangma

o20140423

5.85 8.39 14.51 20.23

0.2

19.38

22.84

24.80

27.85 29.13

0.1

0.0

18.41

21.49

23.67

27.80

0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30

Time (min)

图 3-3 高羊茅挥发物总离子流图

Fig. 3-3 TIC of*Festuca elata Keng ex E. Alexeev*

表 3-11 高羊茅挥发物中主要物质成分

Table 3-11 Main composition of*Festuca elata Keng ex E. Alexeev* volatile

| 名称（高） | 分子式 | 分子量 | 出现时间（min） |
| --- | --- | --- | --- |
| Furan, 2-ethyl | C6H8O | 36 | 3.05 |
| 3-Hexen-1-ol，(z) | C6H12O | 100 | 5.84 |
| Oxime-methoxy-phenyl | C8H9NO2 | 151 | 7.21 |
| N'-[3-(1-hydroxy-1-phenylethyl)phen  yl]hydrazide | C16H8N2O2 | 270 | 8.38 |
| 3-Hexen-1-ol,acetate,(z) | C8H14O2 | 142 | 9.49 |
| 4-Hexen-1-ol,acetate,(z) | C8H14O2 | 142 | 9.83 |
| 1,3,6-octatriene,3,7-dimethyl-(E) | C10H16 | 136 | 10.23 |
| Leoproturon | C12H18N2O | 206 | 11.03 |
| Methanethione,(2,5-dimethylphenyl)-  (2, 4, 6-trimethylpenyl)-S-oxide | C18H20OS | 284 | 11.70 |
| Butanoic acid,3-hexenyl ester,(E) | C10H18O2 | 170 | 13.92 |
| Acetic acid | C10H20O2 | 172 | 14.52 |

RT: 0.00 - 32.00



4.89

6.62

11.68

10.92

23.78

7.89

22.41

5.11

13.73 14.56

10.67

18.83

18.38

6.0

5.5

NL: 2.81E9 TIC MS

huzhizi

5.0

4.5

4.0

3.5

3.0

2.5

2.0

1.5

1.0

0.5

0.0

0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30

Time (min)

图 3-4 胡枝子挥发物总离子流图

Fig. 3-4 TIC of*Lespedeza bicolor Turcz.*

表3-12 胡枝子挥发物中主要物质成分

Table 3-12 Main composition of*Lespedeza bicolor Turcz.* volatile

| 名称（胡） | 分子式 | 分子量 | 出现时间（min） |
| --- | --- | --- | --- |
| Methylcyclopentane | C6H12 | 84 | 3.30 |
| Benzene, 1,4-dimethyl | C8H10 | 106 | 6.07 |
| Oxime-methoxy-phenyl | C8H9NO2 | 151 | 6.60 |
| N'-[3-(1-hydroxy-1-phenylethyl)phen  yl]hydrazide | C16H18N2O2 | 270 | 7.88 |
| Imipramine | C19H24N2 | 280 | 8.87 |
| Benzene, 1,2-dichloro | C6H4Cl2 | 146 | 9.60 |
| Benzene, 1,3-diethyl | C10H14 | 134 | 10.46 |
| Methyl, 10,13-octadecadiynoate | C19H30O2 | 290 | 10.49 |
| Dodecanoic acid, 3-hydroxy | C12H24O3 | 216 | 10.62 |
| Methyl(3E)-3-octadecen-12-ynoate | C13H32O2 | 292 | 11.44 |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Nonaldehyde | C3H18O | 142 | 11.87 |
| Benzene, 1,2,4,5-tetramethyl | C10H14 | 134 | 12.27 |
| Cycloheranol, 1-methyl-4-  (1-methylethyl) | C10H20O | 156 | 13.72 |

RT: 0.00 - 32.00



100 12.70

90

9.44

19.60

NL: 1.91E7 TIC MS

shadawang

20140423

80

70 4.94

8.85

19.19

60

50

40

3.09

30

6.80

11.73

15.00

16.68

20.23

22.85

20 3.04 18.41 30.45

3.33 11.02

21.19

24.80 29.13

14.62 23.61

10

26.42 27.85

0

0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30

Time (min)

图3-5 沙打旺挥发物总离子流图

Fig.3-5 TIC of*Astragalus adsurgens Pall.*

表3-13 沙打旺挥发物中主要物质成分

Table 3-13 Main composition of*Astragalus adsurgens Pall.* volatile

| 名称（沙） | 分子式 | 分子量 | 出现时间（min） |
| --- | --- | --- | --- |
| z,z,z-4,6,8-Nonadecatriene | C19H34 | 262 | 6.14 |
| Oxime-methoxy-phenyl | C8H9NO2 | 151 | 6.81 |
| Cyclohexene,4-isopropenyl-1-methox  ymethoxymethyl | C12H20O2 | 196 | 7.61 |
| 3-Hexen-1-ol,acetate,(z) | C8H14O2 | 142 | 9.46 |
| z,z,z-1,4,6,8-Nonadecatriene | C19H32 | 260 | 10.50 |
| 2,6-Tridecadienoic  acid,10,11-eposy-7-ethyl-3,11-dimeth | C18H30O3 | 294 | 11.54 |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Yl,methyl-methyl ester,(E,E)-cis |  |  |  |
| Cis-8,11,14-Eicosatrienoic Acid | C20H34O2 | 306 | 12.65 |
| N-(E)-[4-(dimethylamino)phenyl]met  hylidene-2-methyl-5-nitroanline | C16H17N3O2 | 283 | 14.59 |

RT: 0.00 - 32.00



12.70

3.07

16.68

8.87

4.97

6.79

7.97

11.73

9.93

20.23

13.92 15.01

20.10

22.84 24.80 26.42

29.12 30.44

3.0

2.8

2.6

2.4

2.2

2.0

1.8

1.6

1.4

1.2

1.0

0.8

0.6

0.4

0.2

0.0

NL: 2.86E9 TIC MS

laomangma

i20140425

0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30

Time (min)

图3-6 老芒麦挥发物总离子流图

Fig3-6 TIC of*Elymus sibiricus Linn*

表3-14 老芒麦挥发物中主要物质成分

Table 3-14 Main composition of*Elymus sibiricus Linn* volatile

| 名称（老） | 分子式 | 分子量 | 出现时间（min） |
| --- | --- | --- | --- |
| 1,2-pentadiene, 4,4-dimethyl | C7H12 | 96 | 3.09 |
| 3-Hexen-1-ol |  | 100 | 5.84 |
| Oxime-methoxy-phenyl | C8H9NO2 | 151 | 6.81 |
| N'-[3-(1-hydroxy-1-phenylethyl)phen  yl]hydrazide | C16H18N2O2 | 270 | 7.98 |
| 4-Hexen-1-ol,acetate | C8H14O2 | 142 | 9.93 |
| Cis-3-Hexenyl Acetate | C8H14O2 | 142 | 9.94 |
| Leoproturon | C12H18N2O | 206 | 11.03 |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 13-Heptadecyn-1-ol | C17H32O | 252 | 12.65 |
| Trans-3-Hexenyl Butyrate | C10H18O2 | 170 | 13.92 |

RT: 0.00 - 32.00



9.34

16.65

27.92 29.75

6.67

8.80

4.96

11.66

20.21

27.28

7.88

14.95

17.92

22.83 24.79

21.16 23.58

24

22

12.65

NL: 1.16E9 TIC MS

muxu\_1401

17174828

20

18

16

14

12

10

8

6

4

2

0

0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30

Time (min)

图3-7 苜蓿挥发物总离子流图

Fig.3-7 TIC of*Medicago sativa L.*

表3-15 苜蓿挥发物中主要物质成分

Table 3-15 Main composition of*Medicago sativa L.* volatile

| 名称（苜） | 分子式 | 分子量 | 出现时间（min） |
| --- | --- | --- | --- |
| (z)-Hex-3-en-1-ol | C6H12O | 100 | 5.82 |
| Benzene, 1,3-dimethyl | C8H10 | 106 | 6.12 |
| Oxime-methoxy-phenyl | C8H9NO2 | 151 | 6.65 |
| N'-[3-(1-hydroxy-1-phenylethyl)phen  yl]hydrazide | C16H18N2O2 | 270 | 7.88 |
| 4-Hexen-1-ol,acetate,(z) | C8H14O2 | 142 | 9.53 |
| Benzene, 1,2-dichloro | C6H4Cl2 | 146 | 9.61 |
| z,z,z-4,6,8-Nonadecatriene | C19H34 | 262 | 10.04 |

## **3.4** 草地螟**OBP1**双突蛋白的表达纯化和荧光竞争结合验证

### **3.4.1** 双突序列测序结果及与原蛋白的比对分析

定点突变时，预期突变为点为第15位和第43位氨基酸。下图为含突变位点质粒测序结果，将突变序列对应的氨基酸序列与原蛋白氨基酸序列进行比对。由图3-16可知，15和43位氨基酸成功突变为丙氨酸（A），与原预期相符，可以进行后续实验。



图3-8 OBP1突变前后氨基酸序列比对（1-p：原蛋白氨基酸序列；3-p：双突变蛋白氨基酸序列）

Fig. 3-8 Sequence alignment between original and mutation OBP1(1-p: aminoacidsequence of original protein;3-p: aminoacidsequence of double mutation)

### **3.4.2** 蛋白表达与**SDS-PAGE**电泳检测及**Western blot**验证

电泳检测诱导产物发现在25KD左右有特异性表达蛋白，与预测的目的蛋白大小一致。Western blot进一步验证目的蛋白。结果表明，Western blot获得25KD左右的特异表达的蛋白，为目的蛋白，如图3-17所示。



图 3-9 A为SDS-PAGE电泳后结果，B为Western blot验证结果，M：蛋白Marker；双突OBP1：转有突变质粒菌种的表达产物，CK：对照

Fig. 3-9 A: Result of SDS-PAGE analysis; B: Result of Western blot(M: protein Marker; Double mutation OBP1: Expression of culture conteins mutation

pla3s7mid.)

### **3.4.3** 尿素溶解及蛋白纯化

SDS-PAGE电泳检测超声波破碎后产物，发现靶标蛋白表达在包涵体沉淀中，因此需用尿素将其溶出以进行下一步的蛋白纯化。如图3-18A所示，试验选取的尿素浓度均能成功将目的蛋白溶出，综合考虑后，后续试验选取的尿素浓度为1M。



分管收集含不同浓度咪唑的蛋白洗脱液，每个浓度收集15-20管，按照一定规律取其中一些样品进行SDS-PAGE电泳检测，明确蛋白洗脱最佳的咪唑浓度。由图3-18B和C可知，咪唑浓度为100-250mM时均可洗下蛋白，其中浓度为250mM的咪唑洗脱最为彻底。

图3-10 A为尿素溶解预实验结果，B和C为不同浓度咪唑洗脱蛋白后电泳检测结果，M：蛋白Marker；数字指洗脱液中所含咪唑浓度

Fig.3-10 A: Result of urea dissolution pre-experiment; B and C: Electrophoresis result of protein washed by different concentration Imidazole; M: protein Marker; Date means different concentration of Imidazole

### **3.4.4** 透析复性、超滤及**His-tag**切除

为得到较纯净的、浓度较高的活性蛋白，我们首先需要进行蛋白地复性。向含有尿素的蛋白溶液中加入复性剂，通过透析进行复性，同时去除多余盐和其他小分子蛋白等杂质，然后通过超滤将透析后的蛋白进行浓缩。经BCA法测定，超滤浓缩后的蛋白浓度为3.03mg/ml。切除His-tag目的蛋白再次过柱纯化，电泳检测结果（图4-4）显示，目的蛋白His-tag切除较完全，酶切效率高。BCA法测定酶切后目的蛋白浓度约为0.012mM。

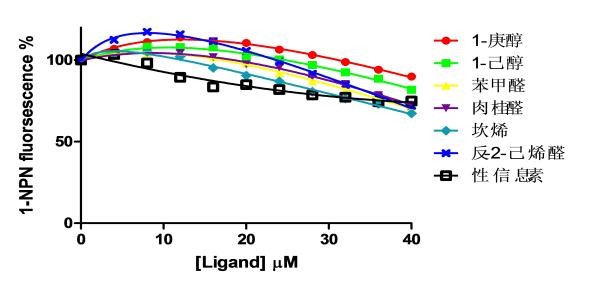


M

图3-11 酶切并镍柱纯化后电泳检测结果（M：蛋白Marker）Fig.3-11 Electrophoresis result of protein after EK digestion and purify by NI-column

### **3.4.5** 荧光竞争结合验证

将最终纯化好的蛋白做荧光竞争结合实验，采用1-NPN为荧光探针。记录不同浓度1-NPN与蛋白结合后的最大荧光值，利用Scatchard方程得双突OBP1的解离常数为16.75µM 。



**A**

**B**

图 3-12 A:荧光探针1-NPN与双突变OBP1的结合曲线以及Scatchard方程

B：七种气味化合物与双突变OBP1的竞争结合曲线

Fig. 3-12 A: Binding curve and reklative Scatchard equation of 1-NPN with double mutant OBP1 FigB: Competitive binding curves of selected ligands to the double mutant OBP1

挑选与原蛋白结合特异性好的7种化合物配体进行荧光竞争结合试验。假设获得的蛋白活性为100%，且在饱和状态下蛋白与气味分子以1: 1结合，根据公式*Ki* = [IC50] /(1 + [1-NPN] /*K1-NPN*)计算两个蛋白与配体的结合常数，其中IC50表示荧光值降到最大荧光值一半时所加入的配体浓度，[1-NPN]表示结合的1-NPN浓度，*K1-NPN*表示蛋白的解离常数。所得结果如下图所示。

表3-16 七种气味分子与双突变OBP1结合能力分析

Table 3-16 Binding affinities of 7 odors compounds to double mutant OBP1

| 配体化合物 Ligand | IC50 | 原蛋白 IC  50  （孙红岩，2011） |
| --- | --- | --- |
| 1-庚醇 1-Heptanol | 83.70 | 7.28 |
| 1-己醇 1-Hexanol | 79.50 | 8.99 |
| 反-2-己烯醛 trans-2-Hexenal | 53.00 | 12.84 |
| 苯甲醛 Benzaldehyde | 53.00 | 11.03 |
| 莰烯 Camphene | 57.50 | 9.81 |
| 肉桂醛 Cinnamaldehyde | 68.00 | 7.29 |
| 性信息素 sex pheromone | 95.00 | 13.82 |

孙红岩（2011）研究表明，草地螟LstiGOBP1原蛋白对以上七种物质均有很好的结合性，在20µM 浓度下即可替换50%[89]。由上表结果可以看出这七种

物质均不能在20µM时完成50%替换，说明突变后的蛋白对这七种物质的结合性均明显下降，其中性信息素的结合性下降尤为明显。由此我们可以推断草地螟

LstiGOBP1蛋白与气味化合物及性信息素的结合与基因序列中的第15和第43位氨基酸密切相关，其对LstiGOBP1蛋白的结合活性起着至关重要的作用。

# **4** 讨论

植食性昆虫对寄主植物选择性的研究是解析农业害虫与寄主植物之间关系、探索控制农作物害虫新途径的基础性工作。草地螟作为农牧业生产中一种重要的害虫，其寄主范围广杂、可在不同作物转移危害的特点已在生产和研究中得到证实（草地螟科研协作组，1987）。植食性昆虫与其寄主之间的关系及外界的环境条件在很大程度上决定了其发生和为害规律，而成虫的产卵选择性则是其与寄主建立关系和自身种群繁衍的关键。因而，本文中明确了草地螟对产卵寄主的选择性，这对认识草地螟的发生规律并进一步对其进行防治具有重要意义，且可以为揭示草地螟选择寄主植物的取食或产卵选择性行为和化学机制提供理论基础，并进而可为采取“农田生态调控策略”、“利用化学通讯手段控制害虫”等提供依据。

然而，虽然草地螟是一种多食性昆虫，其寄主范围广泛，但在食料充足的情况下，草地螟最嗜在灰菜等黎、觅科植物上产卵和取食。此外有研究证明草地螟幼虫在3龄时具有转移为害的习性，可转移为害多种作物、牧草和林木等，对不同的食料具有广泛的适应性。由于寄主植物是影响昆虫生长发育和种群增长的主要环境因素之一，因此，本文通过研究不同寄主植物对草地螟生长发育和繁殖的影响不仅可探讨草地螟选择该种寄主植物的原因，进一步明确其与寄主间的关系，而且还可以由此推断植物因子对草地螟种群动态的影响作用。

植食性昆虫通过嗅觉感器接受空气中的气味分子，从而完成对寄主植物的进行搜寻和定位。不同植物挥发物的成分和含量均有所不同，其中某些成分可能刺激昆虫定向选择其产卵或取食，昆虫也可以通过识别不同气味物质来选择适宜的寄主植物；有些挥发性次生物质则能通过影响昆虫的行为来保护植物，成为植物防御的重要组成部分。通过本文中对不同寄主植物挥发物的分析研究，有助于我们更好地理解昆虫与植物的协同进化，尤其是植食性昆虫食性和自然天敌寄主选择的机理及其演化（管致和，1991），也有利于进一步的利用“push-pull”原理，符合有害生物综合防治（IPM）原则的新型害虫防治方法的开发和研究[88]。在农药污染和昆虫抗药性日趋严重的今天，将植物他感化合物或次生物质用于害虫防治越来越受到人们的重视。

与气味分子结合是气味结合蛋白的重要特征和功能，探讨蛋白与气味分子的

结合机制是该领域重要的研究热点。首例昆虫OBP的发现就是利用同位素标记气味分子进行结合实验获得的（Pelosi et al., 2006）。孙红岩等通过荧光竞争结合实验检测了多种化合物与草地螟OBP1的结合能力，发现对肉桂醛、苯甲醛、1-己醇、1-庚醇、莰烯、反-2-己烯醛及性信息素有典型的结合特性[89]。本文中选择这七种化合物与OBP1双突变蛋白进行荧光验证实验，分析突变后蛋白对气味分子的结合能力与与突变前的差异，从而确定了OBP1结合气味化合物相关的特异结合位点。

# **5** 结论

1供试植物中仅草木樨和苜蓿及作为对照的草地螟最喜食的灰菜可以使幼虫正常生长发育，完成整个世代。取食其他供试植物的幼虫在实验过程中均不能完成其世代，其中取食沙打旺和老芒麦的幼虫最早死亡。在产卵选择性实验中，草木樨、苜蓿和灰菜上的落卵量最多，而沙打旺和老芒麦上的落卵量为同类供试植物中最少的。由此可以推断，虽然草地螟幼虫在三龄后即可转主取食，但成虫仍具有为后代选择最佳寄主生境的习性。

2分析抽提所得到的挥发物并鉴定其成分，黑麦草和苜蓿鉴定出7种物质，草木

樨和沙打旺鉴定出8种物质，老芒麦鉴定出9种物质，高羊茅鉴定出11种物质，

胡枝子鉴定出13种物质。

3通过双突OBP1蛋白的表达纯化和荧光竞争结合性验证，我们发现与未突变蛋白相比，突变后的蛋白与几种供试气味化合物的结合性均明显下降，由此可以推断突变的第15和43位氨基酸很可能就是草地螟OBP1蛋白与气味分子结合的功能位点，至少这两个位点对草地螟OBP1蛋白的结合功能有着至关重要的作用。

参考文献

[1]尹姣. 草地螟的寄主植物选择对其种群增长的影响[D]. 北京：中国农业科学院研究生院, 1999。

[2]姚洪渭，叶恭银. 寄主植物影响害虫药剂敏感性的研究进展[J]. 昆虫学报. 2002, 45（2）：

253-264.

[3]杨胜勇，曹志艳，黄大庄，等. 不同寄主植物对柳蓝叶甲生长发育的影响[J]. 河北农业大学学报. 2008, 31(4)：91-94.

[4]李超，程登发，郭文超，等. 不同寄主植物对马铃薯甲虫的引诱作用[J]. 生态学报. 2013, 33(8)：2410-2415.

[5] Hsiao T H. Host plant adaptations among geographic populations of the Colorado potato beetle[J]. Entomologia experimentalis et applicata. 1978, 24(3): 437-447.

[6] Hitchner E M, Kuhar T P, Dickens J C, et al. Host plant choice experiments of Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) in Virginia[J]. Journal of economic entomology. 2008, 101(3): 859-865.

7 a l arsavuran. The effects of some hosts on the water and dr matter amounts of Leptinotarsa decemlineata (Say)(Coleoptera: Chrysomelidae). [J]. EgeÜniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi. 2011, 48(2): 93 -102.

[8]阮永明，吴坤君. 不同食料植物对棉铃虫生长发育和繁殖的影响[J]. 昆虫学报. 2001，

44(2): 205-212.

[9]韩秀楠，王小强，赵林平，等. 不同寄主植物对豌豆蚜生长发育和繁殖的影响[J]. 植物保护. 2012, 38(1)：40-43.

[10]席瑞华，刘举鹏. 不同食料植物对亚洲小车蝗生长和生殖力的影响[J]. 昆虫知识. 1984, 4: 153-155.

[11]李定旭，雷喜红，李政，等. 不同寄主植物对桃小食心虫生长发育和繁殖的影响[J]. 昆

虫学报. 2012, 55(5): 554-560.

[12]徐维红，朱国仁，李桂兰，等. 温度对丽蚜小蜂寄生烟粉虱生物学特性的影响[J]. 中国生物防治. 2003, 19(3)：103-106.

[13]李子玲，韦绥概，韦飚，等. 寄主植物对甜菜夜蛾的发育和繁殖及体内酯酶活性的影响

[J]. 昆虫知识. 2005, 42(3): 284-289.

[14]郭萧，李克斌，尹姣，等. 不同小麦品种（系）对麦长管蚜生命参数的影响[J]. 中国农业科学. 2010, 43(10)：2056-2063.

[15]王蕾. 草地螟对寄主植物选择性及生物活性物质鉴定[D]. 东北农业大学, 2012。

[16]刘勇，陈巨莲，程登发. 不同小麦品种（系） 叶片表面蜡质对两种麦蚜取食的影响[J]. 应

用生态学报. 2007, 18(8): 1785-1788.

[17] Müller C, Riederer M. Plant surface properties in chemical ecology[J]. J ournal of chemical ecology. 2005, 31(11): 2621-2651.

[18] Woodhead S, Chapman R F, Juniper B, et al. Insect behaviour and the chemistry of plant surface waxes. [J]. Insects and the plant surface. 1986: 123-135.

[19] Robinson J. Identification and characterization of resistance to the Russian wheat aphid in small-grain cereals: Investigations at CIMMYT, 1990-92[M]. CIMMYT, 1994.

[20] Anderson J A, Sorrells M E, Tanksley S D. RFLP analysis of genomic regions associated with resistance to preharvest sprouting in wheat[J]. Crop Science. 1993, 33(3): 453-459.

[21] Dingxu L S H Y, Chongsheng G. THE RESEARCH ON THE RESISTIVE MECHANISM OF WHEAT VARIETIES TO THE ENGLISH GRAIN APHID MACROSIPHUM AVENAE (F.)[J][J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica. 1993, 3: 18.

[22] Li J, Zhao H, Li Z, et al. Resistance of different wheat varieties to Macrosiphum avenae[J]. Chinese Bulletin of Entomology. 2007, 4: 12.

[23] Bergman, D. K., et al., Epicuticular lipids of alfalfa relative to its susceptibility to spotted alfalfa aphids (Homoptera: Aphididae). Environmental entomology, 1991. 20(3): p. 781-785.

[24]戴建青，韩诗畴，杜家纬. 植物挥发性信息化学物质在昆虫寄主选择行为中的作用[J].

环境昆虫学报. 2010, 32(3): 407-414.

[25] Powell G, Tosh C R, Hardie J. Host plant selection by aphids: behavioral, evolutionary, and applied perspectives[J]. Annu. Rev. Entomol. 2006, 51: 309-330.

[26] Du J W. Current and future prospects for insect behavior-modifying chemicals in China[J]. Journal of Applied Biological Chemistry. 2000, 43(4): 222-229.

[27] Hibbard B E, Randolph T L, Bernklau E J, et al. Electroantennogram-active components of maize silk for adults of the western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae)[J]. Environmental entomology. 1997, 26(2): 285-296.

[28] Chénier J, Philogène B. Field responses of certain forest Coleoptera to conifer monoterpenes and ethanol[J]. Journal of Chemical Ecology. 1989, 15(6): 1729-1745.

[29] Bartlet E, Blight M M, Hick A J, et al. The responses of the cabbage seed weevil (Ceutorhynchus assimilis) to the odour of oilseed rape (Brassica napus) and to some volatile isothiocyanates[J]. Entomologia experimentalis et applicata. 1993, 68(3): 295-302.

[30] Dickens J C. Orientation of Colorado potato beetle to natural and synthetic blends of volatiles emitted by potato plants[J]. Agricultural and Forest Entomology. 2000, 2(3): 167-172.

[31] Hammack L. Single and blended maize volatiles as attractants for diabroticite corn rootworm beetles[J]. Journal of chemical ecology. 2001, 27(7): 1373-1390.

[32] Tingle F C, Mitchell E R, Heath R R. Preferences of matedHeliothis virescens andH. subflexa females for host and nonhost volatiles in a flight tunnel[J]. Journal of chemical ecology. 1990, 16(10): 2889-2898.

[33] Blaakmeer A, Geervliet J, Loon J V, et al. Comparative headspace analysis of cabbage plants damaged by two species of Pieris caterpillars: consequences for in‐flight host location by Cotesia parasitoids[J]. Entomologia Experimentalis et Applicata. 1994, 73(2): 175-182.

[34]李欣，白素芬. 寄主植物-植食性昆虫-天敌三重营养关系中化学生态学的研究进展[J]. 河南农业大学学报. 2003, 37(3)：224-232.

[35]郭祥令，何余容，潘飞，等. 植物挥发物在寄生蜂寄主定位中的作用[J]. 中国生物防治学报. 2011, 27(3)：388-393.

[36]仇兰芬. 天牛卵长尾啮小蜂生物学及寄主选择性研究[D]. ft东农业大学, 2003。

[37]李继泉，王树香，杨元，等. 桑天牛长尾啮小蜂产卵及寄主识别行为的观察与研究[J]. 蚕业科学. 2007, 32(4)：447-452.

[38]郭祥令，何余容，潘飞，等. 植物挥发物在寄生蜂寄主定位中的作用[J]. 中国生物防治学报. 2011, 27(3)：388-393.

[39] Fatouros N E, Bukovinszkine Kiss G, Kalkers L A, et al. Oviposition‐induced plant cues: do they arrest Trichogramma wasps during host location[J]. Entomologiaexperimentalisetapplicata. 2005, 115(1): 207-215.

[40]练永国，王素琴，王振营，等. 挥发性信息化合物对赤眼蜂寄生行为的影响及其利用[J].

中国生物防治. 2007, 23(1): 89-92.

[41]郭祥令，何余容，潘飞，等. 植物挥发物在寄生蜂寄主定位中的作用[J]. 中国生物防治学报. 2011, 27(3)：388-393.

[42] Romeis J, Shanower T G, Zebitz C P. Volatile plant infochemicals mediate plant preference of Trichogramma chilonis[J]. Journal of Chemical Ecology. 1997, 23(11): 2455-2465.

[43] Moreau J, Richard A, Benrey B, et al. *Host plant cultivar of the grapevine moth<i> Lobesia botrana* affects the life history traits of an egg parasitoid[J]. Biological Control. 2009, 50(2): 117-122.

[44] Yu S J, Berry R E, Terriere L C. Host plant stimulation of detoxifying enzymes in a phytophagous insect[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology. 1979, 12(3): 280-284.

[45] Farnsworth D E, Berry R E, Yu S J, et al. *Aldrin epoxidase activity and cytochrome<i> P*-450 content of microsomes prepared from alfalfa and cabbage looper larvae fed various plant diets[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology. 1981, 15(2): 158-165.

[46] Muehleisen D P, Benedict J H, Plapp J R, et al. Effects of cotton allelochemicals on toxicity of insecticides and induction of detoxifying enzymes in bollworm (Lepidoptera:

Noctuidae)[J]. Journal of economic entomology. 1989, 82(6): 1554-1558.

[47] Wood K A, Wilson B H, Graves J B. Influence of host plant on the susceptibility of the fall armyworm to insecticides[J]. Journal of economic entomology. 1981, 74(1): 96-98.

[48] Tarumingkeng R C, Coppel H C, Matsumura F. Morphology and ultrastructure of the antennal chemoreceptors and mechanoreceptors of worker Coptotermes formosanus Shiraki[J]. Cell and tissue research. 1976, 173(2): 173-178.

[49] Le RüB, Renard S, Allo M, et al. *Antennal sensilla and their possible functions in the host-plant selection behaviour of<i> Phenacoccus manihoti*(Matile-Ferrero)(Homoptera: Pseudococcidae)[J]. International Journal of Insect Morphology and Embryology. 1995, 24(4): 375-389.

[50] Ljungberg H, Anderson P, Hansson B S. *Physiology and morphology of pheromone-specific sensilla on the antennae of male and female<i> Spodoptera littoralis*(Lepidoptera: Noctuidae)[J]. Journal of insect physiology. 1993, 39(3): 253-260.

[51] Palanaswamy P, Seabrook W D. Behavioral responses of the female eastern spruce budwormChoristoneura fumiferana (Lepidoptera, Tortricidae) to the sex pheromone of her own species[J]. Journal of Chemical Ecology. 1978, 4(6): 649-655.

[52] Saad A D, Scott D R. Repellency of pheromones released by females of Heliothis armigera and H. zea to females of both species[J]. Entomologia experimentalis et applicata. 1981, 30(2): 123-127.

[53] Schlyter F, Löfqvist J, Jakus R. Green leaf volatiles and verbenone modify attraction of European Tomicus, Hylurgops, and Ips bark beetles[C]. Ohio State University, OARDC, 1994.

[54] Cuperus P L. *Distribution of antennal sense organs in male and female ermine moth, < i> Yponomeuta vigintipunctatus*(Retzius)(Lepidoptera: Yponomeutidae)[J]. International Journal of Insect Morphology and Embryology. 1983, 12(1): 59-66.

[55] Ochieng S A, Hallberg E, Hansson B S. Fine structure and distribution of antennal sensilla of the desert locust, Schistocerca gregaria (Orthoptera: Acrididae)[J]. Cell and tissue research. 1998, 291(3): 525-536.

[56] Davis E E, Sokolove P G. Temperature responses of antennal receptors of the mosquito, Aedes aegypti[J]. Journal of comparative physiology. 1975, 96(3): 223-236.

[57] Shields V, Hildebrand J G. Fine structure of antennal sensilla of the female sphinx moth, Manduca sexta (Lepidoptera: Sphingidae). I. Trichoid and basiconic sensilla[J]. Canadian journal of zoology. 1999, 77(2): 290-301.

*[58]* Ochieng S A, Park K C, Zhu J W, et al. *Functional morphology of antennal chemoreceptors*

*Of the parasitoid<i> Microplitis croceipes*(Hymenoptera: Braconidae)[J]. Arthropod structure & development. 2000, 29(3): 231-240.

[59] Altner H, Prillinger L. Ultrastructure of invertebrate chemo-, thermo-, and hygroreceptors and its functional significance[J]. Int Rev Cytol. 1980, 67(6): 139.

[60]冯怀亮，张学东，常廷荣，等. 蚂蚁触角感受器和复眼的扫描电镜观察[J]. 昆虫知识.

1992, 29(5): 292-293.

[61] Dietz A, Humphreys W J. Scanning electron microscopic studies of antennal receptors of the worker honey bee, including sensilla campaniformia[J]. Annals of the Entomological Society of America. 1971, 64(4): 919-925.

[62]ågren L. *Flagellar sensilla of two species of<i> Andrena*(hymenoptera: Andrenidae)[J]. International Journal of Insect Morphology and Embryology. 1978, 7(1): 73-79.

[63] Vogt R G, Riddiford L M. Pheromone binding and inactivation by moth antennae[J]. 1981.

[64] Vogt R G, Prestwich G D, Lerner M R. Odorant‐binding‐protein subfamilies associate with distinct classes of olfactory receptor neurons in insects[J]. Journal of neurobiology. 1991, 22(1): 74-84.

[65] Breer H, Krieger J, Raming K. *A novel class of binding proteins in the antennae of the silk moth<i> Antheraea pernyi*[J]. Insect Biochemistry. 1990, 20(7): 735-740.

[66] Mckenna M P, Hekmat-Scafe D S, Gaines P, et al. Putative Drosophila pheromone-binding proteins expressed in a subregion of the olfactory system. [J]. Journal of Biological Chemistry. 1994, 269(23): 16340-16347.

[67] Pikielny C W, Hasan G, Rouyer F, et al. Members of a family of Drosophila putative odorant-binding proteins are expressed in different subsets of olfactory hairs[J]. Neuron. 1994, 12(1): 35-49.

[68] Krieger J, von Nickisch-Rosenegk E, Mameli M, et al. *Binding proteins from the antennae of<i> Bombyx mori*[J]. Insect biochemistry and molecular biology. 1996, 26(3): 297-307.

[69] Pelosi P, Zhou J, Ban L P, et al. Soluble proteins in insect chemical communication[J]. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS. 2006, 63(14): 1658-1676.

[70] Liu R, Lehane S, He X, et al. Characterisations of odorant-binding proteins in the tsetse fly Glossina morsitans morsitans[J]. Cellular and molecular life sciences. 2010, 67(6): 919-929.

[71] Briand L, Nespoulous C, Huet J C, et al. Ligand binding and physico‐chemical properties of

ASP2, a recombinant odorant‐binding protein from honeybee (Apis mellifera L.)[J]. European Journal of Biochemistry. 2001, 268(3): 752-760.

[72] Larsson M C, Stensmyr M C, Bice S B, et al. Attractiveness of fruit and flower odorants detected by olfactory receptor neurons in the fruit chafer Pachnoda marginata[J]. Journal of

Chemical ecology. 2003, 29(5): 1253-1268.

[73] Leal W S, Chen A M, Ishida Y, et al. Kinetics and molecular properties of pheromone binding and release[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2005, 102(15): 5386-5391.

[74] Wojtasek H, Hansson B S, Leal W S. Attracted or repelled—Amatteroftwoneurons, onepheromonebindingprotein, andachiralcenter[J]. Biochemicalandbiophysicalresearchcommunications. 1998, 250(2): 217-222.

[75] Robertson H M, Warr C G, Carlson J R. Molecular evolution of the insect chemoreceptor gene superfamily in Drosophila melanogaster[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2003, 100(suppl 2): 14537-14542.

[76] Lartigue A, Gruez A, Spinelli S, et al. The crystal structure of a cockroach pheromone-binding protein suggests a new ligand binding and release mechanism[J]. Journal of Biological Chemistry. 2003, 278(32): 30213-30218.

[77] Pesenti M E, Spinelli S, Bezirard V, et al. Structural basis of the honey bee PBP pheromone and pH-induced conformational change[J]. Journal of molecular biology. 2008, 380(1): 158-169.

[78] Horst R, Damberger F, Luginbühl P, e t al. NMR structure reveals intramolecular regulation mechanism for pheromone binding and release[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2001, 98(25): 14374-14379.

[79] Mohanty S, Zubkov S, Gronenborn A M. *The Solution NMR Structure of<i> Antheraea polyphemus* PBP Provides New Insight into Pheromone Recognition by Pheromone-binding Proteins[J]. Journal of molecular biology. 2004, 337(2): 443-451.

[80] Ishida Y, Leal W S. Chiral discrimination of the Japanese beetle sex pheromone and a behavioral antagonist by a pheromone-degrading enzyme[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2008, 105(26): 9076-9080.

[81] Vogt R G, Riddiford L M, Prestwich G D. Kinetic properties of a sex pheromone-degrading enzyme: the sensillar esterase of Antheraea polyphemus[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1985, 82(24): 8827-8831.

[82] Kaissling K. Chemo-electrical transduction in insect olfactory receptors[J]. Annual review of neuroscience. 1986, 9(1): 121-145.

[83]张李香，范锦胜，王贵强. 中国国内草地螟研究进展[J]. 中国农学通报. 2010, 26（1）：

215-218.

[84]牛呼和，包宝ft，柯建武，等. 我国北方草原草地螟暴发原因及防治对策[J]. 江苏农业科学. 2010(2)：136-138.

[85]尹姣，曹雅忠，罗礼智，等. 草地螟对寄主植物的选择性及其化学生态机制[J]. 生态学报. 2005, 25(8)：1844-1852.

[86]孙雅杰，陈瑞鹿，高月波，等. 草地螟成虫活动与幼虫发育的观察[J]. 吉林农业科学. 2005, 30(3)：15-17.

[87]罗礼智，李光博，曹雅忠. 草地螟第3 个猖獗为害周期已经来临[J]. 植物保护. 1996，

22(5): 50-51.

[88] 戴建青, 韩诗畴, 杜家纬. 植物挥发性信息化学物质在昆虫寄主选择行为中的作用[J]. 环境昆虫学报. 2010, 32(3): 407-414.

[89]孙红岩. 草地螟普通气味分子结合蛋白的组织特异表达及结合特性分析[D]. 吉林大学, 2011。

附 录

卡那霉素（Kan）（50 mg/mL）：取500 mg Kan溶于10 mL蒸馏水中，用0.22μm的过滤器消毒，分别装入10个灭菌1.5 mL离心管中，锡箔纸包裹，避光-20℃保存。 LB液体培养基：称取10 g NaCl、10 g蛋白胨和5 g酵母提取物，置于1 000 mL锥形瓶中，加蒸馏水800 mL，磁力搅拌器搅拌溶解，加蒸馏水定容至1 000 mL，高温高压灭菌。

IPTG（100 mmol/L）：取0.24 g IPTG溶于10 mL蒸馏水中；

50%甘油：100 mL甘油加入100 mL LB液体培养基，高温高压灭菌，4℃长期保存。

SDS-PAGE及电转印、Western Blot试剂配置：

A液（丙烯酰胺储存液）和TEMED：分别在公司购买。

B液：4×分离胶缓冲液，100 mL，75 mL 2 mol/L Tris-HCl(pH8.8)，4 mL 10%的SDS, 21 mL蒸馏水。

C液：4×堆积胶缓冲液，100 mL，50 mL 1 mol/L Tris-HCl(pH6.8)，4 mL 10%的SDS, 46 mL蒸馏水。

10%过硫酸铵：称取0.1 g过硫酸铵溶解到1 mL蒸馏水中，每一周换一次。

5×上样缓冲液：10 mL, 0.6 mL 1 mol/L Tris-HCl(pH6.8)，5 mL 50%甘油（LB

配置），2 mL 10%的SDS，1 mL 1%溴酚蓝，0.5 mLβ-巯基乙醇，0.9 mL蒸馏水。

10×电泳缓冲液：称取72 g甘氨酸，15 g Tris碱，5 g SDS，用蒸馏水定容至500 mL。考马斯亮蓝染液：1 L，1 g考马斯亮蓝R-250, 450 mL甲醇，450 mL蒸馏水，100

mL冰醋酸。

考马斯亮蓝脱色液：1 L, 100 mL甲醇，100 mL冰醋酸，800 mL蒸馏水。

电转印缓冲液：1 L, 5.82 g Tris碱，2.93 g甘氨酸，0.375g SDS, 200 mL甲醇，蒸馏水定容。

5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸盐（BCIP, 50 mg/mL）：50 mg BCIP溶于1 mL100%二甲基甲酰胺，-20℃保存。使用时稀释成浓度为0.15 mg/mL。

氮蓝四唑（NBT, 50 mg/mL）：50 mg NBT溶于1 mL70%二甲基甲酰胺，-20℃保存。使用时稀释成浓度为0.3 mg/mL。

TBST: 1 L, 8.8 g氯化钠，0.2 g氯化钾，3 g Tris碱，50μL Tween-20，加蒸馏水定容。

Western blot显色液：100 mL，10 mL 1 mol/L Tris-HCl(pH9.5)，0.585 g氯化钠，0.1017 g氯化镁，90 mL蒸馏水。

蛋白纯化相关：

尿素（1 mol/L）：将6.006 g尿素溶于100 mL 0.1 mol/L的Tris-HC（l pH8.5）溶液中。

结合缓冲液（pH7.8）：1 L, 7.6024 g磷酸钠（终浓度20 mmol/L），29.22 g氯化钠

（终浓度50 mmol/L）。10、50、100、150、200、250 mmol/L洗脱咪唑缓冲液：分别向500 mLpH6.0的结合缓冲液中加入0.340、1.702、3.404、5.106、6.808、

8.510 g咪唑。

致谢

在硕士三年期间，我不仅在专业知识方面得到了扩充，在个人专业素养和做人做事方面也获得了很大进步。这首先要感谢我的导师肖春教授。在工作学习中，我时刻谨记肖老师的教诲，低调做人，认真做事。我取得的进步和曹雅忠老师也是分不开的，从曹老师身上，我看到了资深学者所具有自身素养和专业精神，并以此为榜样，踏踏实实学习，认认真真工作。

我之所以能顺利完成硕士论文的研究，离不开尹姣老师在试验中直接地细心指导；也离不开家人在精神上的支持。在此，感谢李克斌老师和董文霞老师对我试验和生活的指导和关心。感谢兄弟课题组对我试验虫源的支持，感谢廊坊基地工作人员和锡林浩特野外监测站对我实验的支持。

试验初始阶段，由于专业知识不够丰厚，专业技术较为薄弱，实验室的师兄师姐、同届的同学们甚至师弟师妹们都给了我很大帮助，我才得以迅速丰富自己的专业知识，熟练掌握实验技能，使我的试验能够较快地步入正轨。感谢实验室的兄弟姐妹们：徐宁、李林、叶文丰、贾垚、费仁雷、程立龙、张晓娟、王俊超、刘美见、任智强、刘燕、彭莞云、吴文丹、王冰、钟涛、田雷雷、孙昊雨、王伟、阳任峰、谭树乾、杨爽、衣建坤、杜光青、赵莹、程乘、陈鹏和张美翠，在这三年间，你们对我的实验、学习和生活都提供了很多帮助，在此真诚地感谢你们……能够有缘与你们相识，我觉得我无比幸运……

最后，谨此向关心我、帮助我、支持我的领导、老师、同学和家人献上我最真诚的感谢和祝福！

王倩倩

2014年5月于云南农业大学