

储俊东,刁澎云,李旭光,等. 中华绒螯蟹表皮蛋白基因 *EsCAP* 的克隆与表达分析[J]. 江苏农业科学,2021,49(8):74-80.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.08.012

中华绒螯蟹表皮蛋白基因 *EsCAP* 的克隆与表达分析

储俊东^{1,2}, 刁澎云^{1,2}, 李旭光^{1,2}, 毕可然¹, 周刚², 周军², 邓燕飞², 许郑超²

(1. 江苏海洋大学, 江苏连云港 222005; 2. 江苏省淡水水产研究所, 江苏南京 210017)

摘要:以中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)为试验对象,克隆中华绒螯蟹表皮蛋白 *CAP* 基因序列,分析其表达规律,为探索中华绒螯蟹蜕皮发生机理提供参考。运用生物信息学从中华绒螯蟹转录组数据中比对筛查表皮蛋白 *CAP* 基因序列信息,克隆扩增获得表皮蛋白 *CAP* 基因 cDNA 序列,运用 RT-qPCR 分析表皮蛋白 *CAP* 基因在不同组织、不同发育阶段和不同蜕皮时期的表达特征。结果表明,中华绒螯蟹表皮蛋白 *CAP* 基因 cDNA 序列全长 380 bp,编码 101 个氨基酸,包括 1 个信号肽和 1 个 R&R 结合域。表皮蛋白基因 *CAP* 主要在蜕皮后期的表皮组织中表达,在蜕皮间期不表达;在不同发育阶段的仔蟹 1 期表达量最高,根据其发育表达模式推测表皮蛋白基因 *CAP* 参与表皮的形成和钙化,为后续深入研究表皮蛋白基因的生理功能奠定基础。

关键词:中华绒螯蟹;表皮蛋白;基因克隆;mRNA 表达

中图分类号: S917 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2021)08-0074-06

甲壳动物的体表包裹着 1 层厚厚的外骨骼,它不但保护着甲壳动物免受外来细菌和病毒的侵袭,还在其维持正常生命活动和体态的建成中均发挥着非常重要的作用。甲壳类表皮由外向内依次可分为上表皮、外表皮、内表皮及真皮细胞,其中内表皮是表皮皮层中的主要组成部分,主要由几丁质、表皮蛋白及钙盐等构成^[1]。坚硬外骨骼虽然极大地增强了甲壳动物的生存和适应能力,但也限制了其生长。因此,甲壳类需要周期性地蜕去旧表皮,合成新表皮。甲壳类动物的蜕皮周期主要分为蜕皮前期(D)、蜕皮期(E)、蜕皮后期(A、B)和蜕皮间期(C)4 个阶段。蜕皮前期(D),在蜕皮类调控激素的诱导下旧表皮被几丁质代谢酶类及蛋白水解酶类部分消化和再吸收,新表皮开始逐渐分泌形成;蜕皮期(E),机体旧表皮褪去,新表皮替代旧表皮;

蜕皮后期(A、B),机体吸收大量水分迅速增长增质量,同时表皮组织迅速钙化;当表皮钙化终止,机体进入蜕皮间期(C)^[2-3]。

表皮蛋白是构成甲壳类表皮的重要结构蛋白,不同类型的表皮蛋白与长链几丁质相结合,从而影响表皮结构及其性能。早期由于传统的提取分离纯化方法的局限性限制了对表皮蛋白的发掘,因此有关表皮蛋白种类与数量的报道较少。近年来,随着基因组、转录组等测序技术的兴起,大大加速了人们对于表皮蛋白的发现,目前已在一些模式昆虫如黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)、冈比亚按蚊(*Anopheles gambiae*)、家蚕(*Bombyx mori*)及一些重要经济甲壳类如南美白对虾(*Penaeus vannamei*)、红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*)中鉴别出大量表皮蛋白基因家族^[4-5]。其中,具有与几丁质相结合 R&R 结构域(rebers & riddiford consensus)的 CPR 家族数量多、分布广,是迄今为止表皮蛋白家族中含量最丰富的一个家族。根据 R&R 结构域的保守型序列,CPR 家族又可细分为 RR-1、RR-2 和 RR-3 等 3 个亚家族。其中,RR-1 亚族主要分布于柔软的未钙化表皮;而 RR-2 亚族主要存在于坚硬的钙化表皮;RR-3 家族数量最少,其分布特征还不太明确^[6-7]。值得注意的是,在克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)中发现的一种特殊的钙相关蛋白 CAP-1 和 CAP-2,序列分析发现其属于 CPR 家族,同时具有几丁质结合能力和抑制碳酸钙沉淀

收稿日期:2020-08-11

基金项目:国家现代农业产业技术体系建设专项(编号:CARS-48);江苏省自然科学基金面上项目(编号:BK20161602);江苏省渔业科技类重点项目(编号:D2018-4);江苏省农业重大新品种创制项目(编号:PZCZ201748);江苏省现代农业(中华绒螯蟹)产业技术体系项目(编号:JATS[2019]386);江苏省研究生科研与实践创新计划(编号:SJCX20_1269、SJCX20_1293)。

作者简介:储俊东(1996—),男,江苏南通人,硕士研究生,主要从事水生甲壳类分子遗传学研究。E-mail:qichenchu1@gmail.com。

通信作者:李旭光,副研究员,主要从事水生甲壳类繁育与生态养殖研究。Tel:(025)86851575;E-mail:xuguangli1981@163.com。

的能力,这种具有多重功能的表皮蛋白是现在研究的重点。

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*) 又称河蟹,是重要的经济养殖蟹类,广泛分布于我国东南沿海以及长江、瓯江、辽河水域。江苏是长江流域中华绒螯蟹的发源地和故乡,跨江临海,水网密布,河湖众多,有着得天独厚的发展河蟹繁育与养殖的自然条件。2018 年,江苏河蟹养殖面积 2 666.67 km²,年产量 32 万 t,总产值 270 亿元,总产量和总产值均占全国总量的 1/2,河蟹养殖业成为江苏渔业的优势产业^[8]。目前,有关甲壳类表皮蛋白的研究主要集中在虾类和蟹类上,有关短尾派中华绒螯蟹 R&R 型表皮蛋白还鲜有报道。本试验通过转录组结合分子克隆获得中华绒螯蟹表皮蛋白 CAP(calcification-associated peptide) cDNA 序列,命名为 *EsCAP*,采用定量 PCR 检测 *EsCAP* 在不同组织的分布,分析 *EsCAP* 在不同发育阶段以及蜕皮周期的表达规律,为后续进一步研究其在蜕皮生长中的功能作用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 研究对象

2019 年 4 月从江苏省淡水水产研究所扬中基地挑取健康中华绒螯蟹 1 龄幼蟹作为试验样本,运至江苏省淡水水产研究所实验室室温下暂养并开展后续试验,水深 50 cm,使用空气泵不间断通氧,确保养殖时箱内水体溶氧。试验开展期间采用人工饲料饲喂,每晚喂食,早上对水族箱底部污物进行及时的清理,保证养殖水环境清洁。

1.2 主要试剂

Total RNA 提取试剂盒和反转录试剂盒购自 TaKaRa 公司,PCR 试剂购自生工生物(上海)股份有限公司,qPCR 试剂(SYBR Premix Ex TaqTM II 和荧光染料 ROX) 购自宝生物工程(大连)有限公司,DNA marker、PUCm-T 载体、琼脂糖凝胶回收试剂盒等购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司,其他试剂为国产分析纯。

1.3 组织样品的收集

参考甲壳类分期方法,根据中华绒螯蟹壳色与硬度等形态学特征分为蜕皮前期(D)、蜕皮后期(A、B 期)、蜕皮间期(C 期)4 个蜕皮时期。蜕皮前期(D),外表皮内陷,新的外表皮逐渐形成,新生刚毛逐步从旧刚毛中分离;蜕皮后期(A 期),中华

绒螯蟹刚刚从老旧的壳中挣脱出来,新生壳柔软黑亮而有弹性;蜕皮后期(B 期),新生表皮开始钙化,新壳逐渐硬化,体长固定;蜕皮间期(C 期),新表皮钙化完成,中华绒螯蟹开始大量摄食,进行营养积累,为下次蜕皮做准备。分别采集中华绒螯蟹蜕皮间期与蜕皮后期(B 期)表皮、肝胰腺、肌肉、鳃、眼柄、附肢、心脏、肠道、胃、血淋巴共 10 个组织样本。在解剖样品前先对样品进行清洗并用冰袋降低中华绒螯蟹的活跃度。采集中华绒螯蟹受精卵、蚤 1 期(Z_I)、蚤 3 期(Z_{III})、蚤 5 期(Z_V)、大眼幼体和仔蟹 1 期 6 个不同发育阶段的个体样本。所有收集样本经液氮冷却后放在 -80 ℃ 冰箱保存备用。

1.4 总 RNA 的提取与 cDNA 的逆转录

用 TaKaRa Mini BEST Universal RNA Extraction Kit 试剂盒提取中华绒螯蟹各组织、不同蜕皮时期表皮和不同发育阶段个体总 RNA。提取出的总 RNA 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其质量,并用紫外分光光度计检测其浓度,测完后立即置于 -80 ℃ 保存备用。逆转录反应按照 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 试剂说明书进行,获得第 1 链 cDNA,用于 RT-qPCR 反应,合成之后置于 -20 ℃ 保存备用。

1.5 设计引物

利用在线设计引物软件 Primer 3 input 设计引物,扩增全长引物 *EsCAP* F1/R1,由表 1 可知 PCR 反应条件为:94 ℃ 30 s;55 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,30 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。配制 1% 琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行检测,回收所需 DNA 片段,之后按照 FastPure[®] Gel DNA Extraction Mini Kit 试剂盒进行纯化操作。纯化后的产物与 PUCm-T 载体结合,将结合产物导入感受态细胞中进行蓝白斑筛选,挑取目的菌落。经 PCR 筛选后送到生工生物(上海)股份有限公司测序。获得 *EsCAP* 开放阅读框(ORF)后,再设计定量引物 RT-*EsCAP* F2/R2 并用以进行 RT-qPCR。

1.6 RT-qPCR 检测

以 β -actin 基因为内参基因,无菌超纯水为阴性对照,采用 RT-qPCR(SYBR Green)检测表皮蛋白 CAP 在不同组织、不同蜕皮时期和不同发育阶段的表达量。RT-qPCR 反应程序:95 ℃ 预变性 5 min,1 次循环;PCR 反应 95 ℃ 30 s,60 ℃ 20 s,40 个循环。反应结束后获得扩增曲线。反应在 LightCycler480 荧光定量 PCR 仪上进行,设 cDNA 样

表 1 中华绒螯蟹表皮蛋白 *EsCAP* 基因扩增引物

基因	引物名称	引物序列(5'→3')	应用
<i>EsCAP</i>	<i>EsCAP</i> F1	GTTTTCGTGGTCTCGCTCTG	<i>EsCAP</i> 序列全长扩增
	<i>EsCAP</i> R1	CGTCGTCGTTTACTTGTTCGT	<i>EsCAP</i> 序列全长扩增
RT- <i>EsCAP</i>	RT- <i>EsCAP</i> F2	GGGGAGTACAAGTGGGAGAG	<i>EsCAP</i> 定量扩增
	RT- <i>EsCAP</i> R2	TGTCGTCTTCCTCGCTATCC	<i>EsCAP</i> 定量扩增
β - <i>actin</i>	β - <i>actin</i> F	GCATCCACGAGACCACTTACA	内参 β - <i>actin</i> 扩增
	β - <i>actin</i> R	CTCCTGCTTGCTGATCCACATC	内参 β - <i>actin</i> 扩增

品 3 次重复,反应结束后采集目标基因的 C_T 值(C 表示循环数; T 表示荧光阈值)和内参基因的 C_T 值,qRT-PCR 结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法分析,数据处理和作图使用 Excel 和 Sigma Polt 14.0 软件,结果均以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。采用 SPSS 软件的邓肯法分析 *EsCAP* 表达量是否具有显著差异。

1.7 生物信息学分析

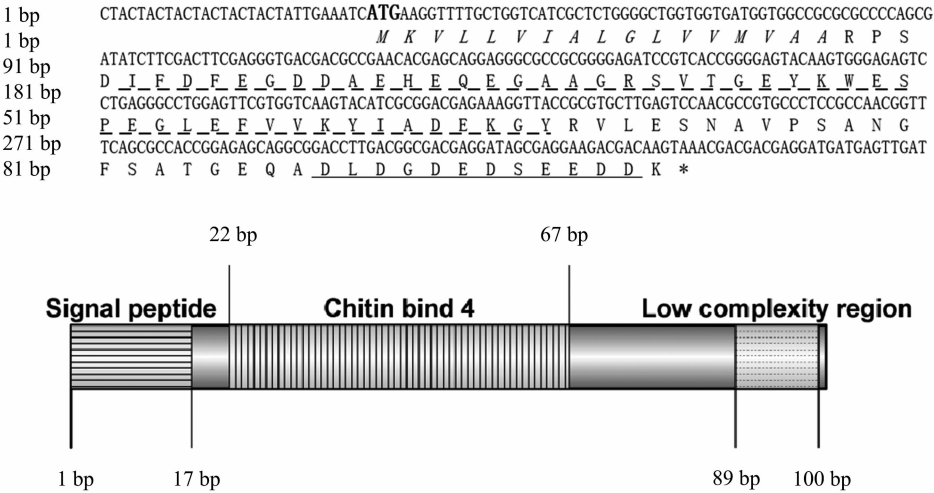
用 DNA MAN 软件将所得的 DNA 序列翻译成蛋白序列,用 Edit seq 软件对蛋白序列理化性质和相对分子质量进行预测,用 NCBI 在线工具 ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)搜索 *EsCAP* 开放阅读框;从 NCBI 数据库中用 BLASTP 程序检索氨基酸同源性序列,并用 Clustalw2 和 Genedoc 软件对中华绒螯蟹表皮蛋白 *EsCAP* 基因和检索出的氨基酸序列进行同源性比对,用 MEGA 6.0 软件构建进化树,用 DNA MAN 对其进行序列一致性分析,使用在线软件 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)进行氨基酸序列的结构域分析,使用 cuticleDB (<http://bioinformatics2.biol.uoa.gr/cuticleDB/index.jsp>)在

线分析 R&R 序列。

2 结果与分析

2.1 中华绒螯蟹表皮蛋白基因 *EsCAP* cDNA 的序列分析

序列结果显示,中华绒螯蟹表皮蛋白基因 *EsCAP* cDNA 序列全长 380 bp,其中包括 29 bp 的 5'端非编码区、45 bp 3'端非编码区和 306 bp 的开放阅读框,共编码 101 个氨基酸残基(GenBank 登陆号为 MT771647)。编码蛋白的理化性质分析预测该蛋白的相对分子质量为 10.9 ku,理论等电点为 3.87。蛋白质结构预测分析结果(图 1)表明,中华绒螯蟹 *EsCAP* 氨基酸序列主要有 1 个信号肽、1 个几丁质结合域 ChtBD4 和 1 个低复杂度区域。其中,几丁质结合域包含 R&R 保守序列 Gx8Gx6YxAxExGYx7P(其中 x 表示多个氨基酸占据的位置,数字表示氨基酸的数目),表明 *EsCAP* 属于 RR1 亚族。此外,*EsCAP* 氨基酸序列 C 端富含天冬氨酸、谷氨酸等酸性氨基酸,属于典型酸性蛋白。



始密码子 ATG 加粗表示信号肽序列;用斜体表示几丁质结合域;用虚线表示低复杂度区域;用下划线表示终止密码子用星号标注;signal peptide 表示信号肽;Chitin bind 4 表示几丁质结构域;Low complexity region 表示低复杂度区域

图 1 中华绒螯蟹表皮蛋白 *EsCAP* cDNA 序列和基因结构分析

2.2 中华绒螯蟹表皮蛋白 EsCAP 的同源性分析

由图 2 可知,与其他甲壳类表皮蛋白基因序列比较发现,中华绒螯蟹表皮蛋白 EsCAP 氨基酸序列与蓝蟹(*Callinectes sapidus*)、南美白对虾、克氏原螯虾(*P. clarkii*)、远海梭子蟹(*Portunus pelagicus*)的表皮蛋白相似度在 40.6%~59.5% 间。其中,中华绒螯蟹 EsCAP 与克氏原螯虾 CAP2 氨基酸序列同源性最高,为 59.5%。采用 Mega 6.0 软件对包括中华

绒螯蟹表皮蛋白 EsCAP 在内的 12 组表皮蛋白序列进行系统进化树的构建。使用软件中的 Neighbor-Joining(NJ)方法,进行 1 000 次独立分析。系统进化树分析结果(图 3)表明,中华绒螯蟹表皮蛋白 EsCAP 与其他虾蟹类酸性表皮蛋白聚类为一支,而昆虫类表皮蛋白聚为另一支,系统进化树表明 EsCAP 与虾蟹类 CAP 类表皮蛋白同源性较高。



深色代表相似度水平为 100%，浅色代表相似度水平 $\geq 50\%$

图2 中华绒螯蟹表皮蛋白 EsCAP 序列与其他甲壳类比对分析

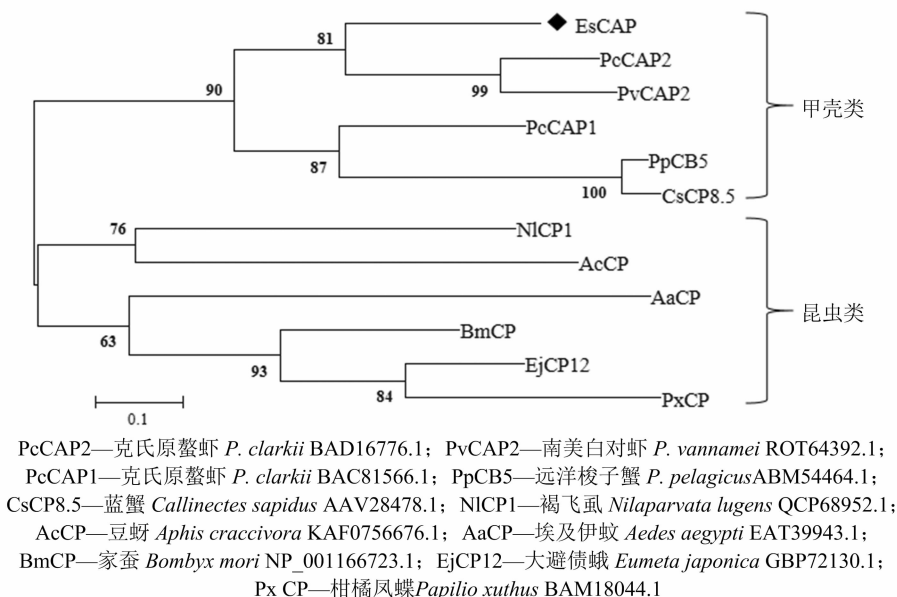


图3 中华绒螯蟹表皮蛋白EsCAP与其他节肢动物表皮蛋白的进化树

2.3 中华绒螯蟹表皮蛋白 EsCAP 在不同组织中的表达

由图 4 可知,以中华绒螯蟹肌球蛋白 β -*actin* 为内参对照,通过 RT-qPCR 方法检测中华绒螯蟹表皮蛋白 EsCAP 的组织分布情况。结果表明,EsCAP 在蜕皮间期不表达,主要在蜕皮后期的表皮组织中表达。

2.4 中华绒螯蟹表皮蛋白 EsCAP 在不同蜕皮时期的表达

选取中华绒螯蟹蜕皮前期(D)、蜕皮后期(A、B)、蜕皮间期(C)的表皮组织,以中华绒螯蟹肌球蛋白基因 β -*actin* 为内参对照,通过 RT-qPCR 方法检测中华绒螯蟹表皮蛋白 *EsCAP* 基因在不同蜕皮时期的表达。由图 5 可知,中华绒螯蟹表皮蛋白

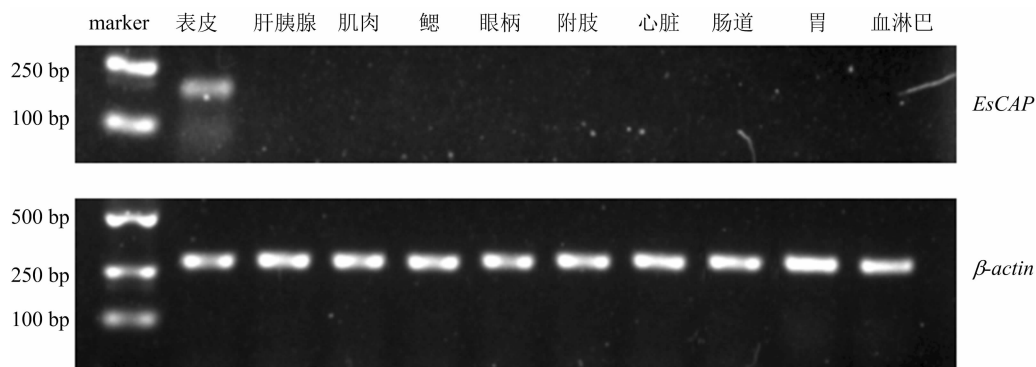
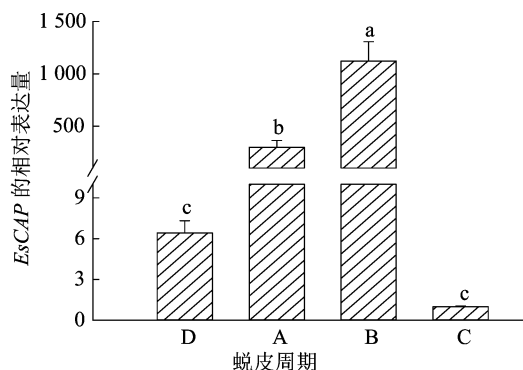


图4 中华绒螯蟹表皮蛋白 EsCAP 在蜕皮后期不同组织中的表达量

EsCAP 进入到蜕皮前期 (D) 表达量较低, 到蜕皮后期 (A、B) 高表达, 在蜕皮间期 (C) 不表达。中华绒螯蟹表皮蛋白 *EsCAP* 在蜕皮时期的表达趋势与表皮形成及钙化时间相一致。



柱形图上的不同字母表示 mRNA 表达水平存在显著差异 ($P < 0.05$)

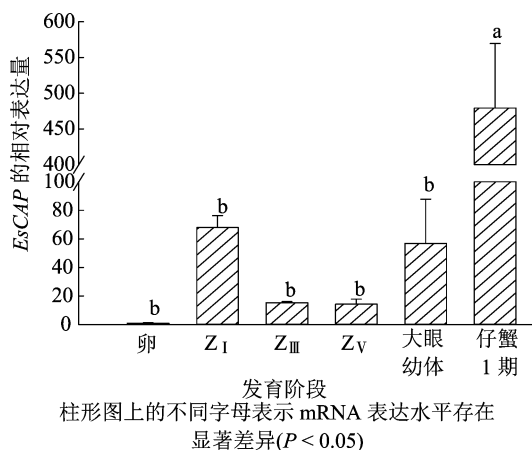
图5 中华绒螯蟹表皮蛋白 *EsCAP* 在蜕皮周期过程中的表达量

2.5 中华绒螯蟹表皮蛋白 *EsCAP* 在不同发育时期的表达

选取中华绒螯蟹受精卵、溞 1 期 (Z_I)、溞 3 期 (Z_{III})、溞 5 期 (Z_V)、大眼幼体和仔蟹 1 期共 6 个不同发育时期个体, 以中华绒螯蟹肌球蛋白 β -actin 作为内参对照, 通过 RT-qPCR 方法来检测 *EsCAP* 基因的表达趋势。由图 6 可知, 表皮蛋白 *EsCAP* 基因在受精卵时期表达最低, 进入到溞状幼体时期与大眼幼体时期表达量有所升高, 到仔蟹 1 期表达量明显升高, *EsCAP* 的表达量随着中华绒螯蟹发育阶段的推进而产生变化, 总体呈升高的趋势。

3 讨论与结论

表皮蛋白与几丁质结合构成支撑机体抵御外界不良环境的外骨骼, 在甲壳类的生长发育及蜕皮硬化中具有重要的作用^[3]。甲壳类表皮蛋白数量庞大, 根据其保守序列的不同, 可分为 CPR、CPAP、Crust-18、postmolt-18 等家族, 其中具有 R&R 保守



柱形图上的不同字母表示 mRNA 表达水平存在显著差异 ($P < 0.05$)

图6 中华绒螯蟹表皮蛋白 *EsCAP* 在不同发育阶段中的表达量

结构域序列的 CPR 家族分布最为广泛, 在甲壳类与昆虫中均存在^[9-10]。本研究克隆获得的中华绒螯蟹表皮蛋白 *EsCAP* 含有与几丁质结合的 R&R 结构域, 属于 CRP 家族中 RR-1 亚类, 对中华绒螯蟹表皮的形成是至关重要的。*EsCAP* 蛋白的 N 端与 C 端富含亲水氨基酸, 如丙氨酸、缬氨酸、脯氨酸和甘氨酸, 亲水性强, 主要分布于未钙化的表皮, 通过 R&R 结构域与几丁质相结合, 多肽 N 端和 C 端区域延伸至纤维间隙, 形成水填充的非共价键网络, 对保持表皮的柔韧性不可或缺^[5]。此外 *EsCAP* 蛋白的 C 端富含天冬氨酸、谷氨酸等酸性氨基酸, 等电点为 3.87, 是个典型的酸性分子。酸性大分子在表皮的硬化过程中起着至关重要的作用^[11-12]。在日本对虾 (*Penaeus japonicus*) 蜕皮后期尾扇表皮组织中克隆获得 DD4 (后来命名为 Crustocalcin) 和 DD5 酸性表皮蛋白, 具有钙结合能力^[13-14]。从克氏原螯虾表皮基质中分离纯化出 2 种钙化相关肽 CAP-1 和 CAP-2, 富含酸性氨基酸^[15-16]。其中, CAP-1 的钙结合能力明显大于 CAP-2, 这与 CAP-1 酸性氨基酸的数量多, 在 C 末端分布更为集中有关^[15-16]。中华绒螯蟹 *EsCAP* 氨基酸残基结构和分

布与其他钙化相关肽相似,是否具有钙离子结合能力还有待于进一步试验验证。

虽然 R&R 保守结构域具有一定的保守性,但甲壳类表皮蛋白 CAP 在不同物种之间的相似度并不高。EsCAP 与其他虾蟹类相似度在 50% 左右,与昆虫类相似度在 30% 左右(图 2),这远低于同一亲缘关系水平的相似度。而近源的一些虾蟹类表皮蛋白 CAP 之间的相似度也不高,克氏原螯虾 CAP-1 与 CAP-2 的氨基酸相似度为 46.2%。虽然表皮蛋白 EsCAP 的氨基酸残基相似性不高,但是该基因结构域保守序列位点非常保守。根据二级结构的预测,这些保守位点是 R&R 结构域形成 β 折叠构象的关键位点,影响着与几丁质结合^[17-18]。

表皮蛋白基因的表达具有明显的组织分布差异性与时期特异性。中华绒螯蟹表皮蛋白 EsCAP 仅在蜕皮后期的表皮组织中高表达,而在其他时期以及其他组织中几乎不表达,具有明显的时空表达特异性(图 4、图 5)。这与蓝蟹表皮蛋白 CAP、克氏原螯虾表皮蛋白 CAP-2 和 CAP-1、日本对虾表皮蛋白 DD4 和 DD5 基因的表达趋势一致,均集中于蜕皮后期的表皮组织中高表达^[11,13-16]。刚完成蜕皮后的甲壳类新表皮吸水后迅速延展,这一时期的表皮组织正伴随着表皮的快速扩张和钙化,具有几丁质结构域的表皮蛋白 EsCAP 可能通过 R&R 结构域与几丁质结合形成几丁质纤维复合物框架,参与新表皮的形成^[19-20];与此同时,EsCAP 中的酸性氨基酸与钙离子相结合,促进表皮组织碳酸钙沉淀,加速表皮钙化进程^[21-22]。在不同发育时期,中华绒螯蟹表皮蛋白 EsCAP 在仔蟹 1 期的表达量最高,这与一些昆虫类 RR1 型表皮蛋白的表达趋势相似^[23]。中华绒螯蟹从受精卵的孵化到仔蟹的发育,表皮的积累也越来越多,至仔蟹期表皮结构基本成型,表皮代谢需求量大,暗示表皮蛋白 CAP 可能参与不同发育阶段新表皮的合成。

中华绒螯蟹表皮蛋白 EsCAP 具有典型的 R&R 几丁质结合结构域,富含大量酸性氨基酸残基,主要在蜕皮后期的表皮组织中表达,推测 EsCAP 可能参与表皮的形成与钙化,其具体功能还有待于进一步验证。

参考文献:

[1] Delon I, Payre F. Evolution of larval morphology in flies: get in shape with shavenbaby [J]. Trends in Genetics, 2004, 20 (7): 305 -

313.
[2] Frédéric M, Luquet G. Unusually acidic proteins in biomineralization [M]. Handbook of Biomineralization: Biological Aspects and Structure Formation, 2008.
[3] Nagasawa H. The crustacean cuticle: structure, composition and mineralization [J]. Frontiers in Bioscience, 2012, 4 (1): 711 - 720.
[4] Roer R, Abehsera S, Sagi A. Exoskeletons across the pancrustacea: comparative morphology, physiology, biochemistry and genetics [J]. Integrative and Comparative Biology, 2015, 55 (5): 771 - 791.
[5] Andersen S O. Exoskeletal proteins from the crab, cancer pagurus [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 1999, 123 (2): 203 - 211.
[6] 郑征帆, 吕艳杰, 宁黔冀. 甲壳动物表皮几丁质结合蛋白结构与功能研究进展 [J]. 水产科学, 2017, 36 (4): 538 - 542.
[7] Andersen O S. Biochemistry of insect cuticle [J]. Annual Review of Entomology, 1979, 24 (1): 29 - 59.
[8] 2019 年中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2019.
[9] Andersen S O, Højrup P, Roepstorff P. Insect cuticular proteins [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 1995, 25 (2): 153 - 176.
[10] Karouzou M V, Spyropoulos Y, Iconomidou V A, et al. Drosophila cuticular proteins with the R&R consensus: annotation and classification with a new tool for discriminating RR-1 and RR-2 sequences [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2007, 37 (8): 754 - 760.
[11] Coblenz F E, Shafer T H, Roer R D. Cuticular proteins from the blue crab alter *in vitro* calcium carbonate mineralization [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 1998, 121 (3): 349 - 360.
[12] Glazer L, Sagi A. On the involvement of proteins in the assembly of the crayfish gastrolith extracellular matrix [J]. Invertebrate Reproduction & Development, 2012, 56 (1): 57 - 65.
[13] Endo H, Persson P, Watanabe T. Molecular cloning of the crustacean DD4 cDNA encoding a Ca^{2+} - binding protein [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000, 276 (1): 286 - 291.
[14] Endo H, Takagi Y, Ozaki N, et al. A crustacean Ca^{2+} - binding protein with a glutamate - rich sequence promotes CaCO_3 crystallization [J]. The Biochemical Journal, 2004, 384 (1): 159 - 167.
[15] Inoue H, Ohira T, Ozaki N, et al. Cloning and expression of a cDNA encoding a matrix peptide associated with calcification in the exoskeleton of the crayfish [J]. Comparative Biochemistry and Physiology (Part B Biochemistry & Molecular Biology), 2003, 136 (4): 755 - 765.
[16] Inoue H, Ohira T, Ozaki N, et al. A novel calcium - binding peptide from the cuticle of the crayfish, *Procambarus clarkii* [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, 318 (3): 649 - 654.
[17] Rebers J E, Riddiford L M. Structure and expression of a *Manduca sexta* larval cuticle gene homologous to drosophila cuticle genes [J]. Journal of Molecular Biology, 1988, 203 (2): 411 - 423.
[18] Rebers J E, Willis J H. A conserved domain in arthropod cuticular

沈煜洋,白微微,张航,等. 种衣剂减量施用对小麦幼苗生长的影响[J]. 江苏农业科学,2021,49(8):80-83.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.08.013

种衣剂减量施用对小麦幼苗生长的影响

沈煜洋¹,白微微¹,张航¹,杨安沛¹,雷钧杰²,高海峰¹,李广阔¹

(1. 新疆农业科学院植物保护研究所/农业农村部西北荒漠绿洲作物有害生物综合治理重点实验室,新疆乌鲁木齐 830091;

2. 新疆农业科学院粮食作物研究所,新疆乌鲁木齐 830091)

摘要:开展 9% 氟环·咯·苯甲悬浮种衣剂和 11% 唑醚·灭菌唑悬浮种衣剂减施 30% 添加增效剂激健对小麦幼苗生长的影响试验,为农药减施提供科学指导。结果表明,9% 氟环·咯·苯甲悬浮种衣剂和 11% 唑醚·灭菌唑悬浮种衣剂减施 30% 添加增效剂激健处理小麦种子发芽率分别为 88.00%、91.00%,种子平均芽长为 3.65、3.70 cm,平均根长为 4.99、4.08 cm,返青总茎数为 902.50、887.50 个/m²,平均次生根数为 14.00、13.67 条,均显著高于空白对照。

关键词:小麦;种衣剂;幼苗;生长;氟环·咯·苯甲;唑醚·灭菌唑

中图分类号:S435.12 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2021)08-0080-04

小麦是新疆维吾尔自治区的主要粮食作物之一,年均种植面积占全区粮食作物播种面积的 50% 以上^[1]。近年来,小麦散黑穗病、小麦全蚀病、小麦根腐病、小麦雪腐(霉)病等种传病害和土传病害在新疆发生严重,尤以小麦散黑穗病的发生最为普遍,通常发病率在 0.1%~5.0% 之间,严重时可达 15% 以上^[2-3];小麦全蚀病造成小麦枯白穗,点片或成片死亡,一般病田减产 10%~20%,病害流行年份减产 50% 以上^[4-5];小麦根腐病在新疆昌吉回族

自治州奇台县、伊犁州新源县、巩留县等县市发生较重^[6];小麦雪腐(霉)病主要发生在昌吉州、伊犁州、塔城地区等冬季积雪时间长且积雪厚的近山冬麦区,病害大发生年份可使小麦减产 30%,毁种田超过播种面积的 15%^[7-9]。

种子包衣是目前农业生产中防治种传病害、土传病害最为有效的措施。氟环·咯·苯甲是新型复配杀菌剂,其内吸性较强,安全性也好于传统三唑类药剂,可有效防治小麦种传和土传病害,在新疆主要应用于小麦种子包衣防治黑穗病^[10]。唑醚·灭菌唑是甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂,种子包衣可提高青稞出苗率,促进其根系生长^[11],但其对小麦种子萌发和幼苗生长的影响尚未见报道。戊唑醇及戊唑·福美双复配剂被广泛应用于田间防治玉米丝黑穗病、小麦散黑穗病等病害且具有很好的防效^[12-15]。种子包衣不仅能增强作物抗病能力,还能促进种子萌发、提高发芽率和种子成苗率^[16-19]。此外,利用种衣剂还可以减少农药用量和提高农药利用率^[20]。因此,本研究开展了 9% 氟环·咯·苯

收稿日期:2020-02-29

基金项目:新疆农业科学院科技创新重点培育专项(编号:xjkcy-003);国家重点研发计划(编号:2018YFD0200406);国家小麦产业技术体系乌鲁木齐综合试验站项目(编号:CARS-3-49)。

作者简介:沈煜洋(1991—),男,甘肃兰州人,硕士,助理研究员,主要从事粮食作物病虫害防治研究工作。E-mail:sansirosoul@163.com。

通信作者:李广阔,博士,研究员,主要从事农作物病虫害防治研究工作,E-mail:1448832764@qq.com;高海峰,硕士,副研究员,主要从事粮食作物病虫害防治研究工作,E-mail:ghf20044666@163.com。

proteins binds chitin[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology,2001,31(11):1083-1093.

[19] Noh M Y, Muthukrishnan S, Kramer K J, et al. Tribolium castaneum RR-1 cuticular protein TcCPR4 is required for formation of pore canals in rigid cuticle[J]. PLoS Genetics,2015,11(2):e1004963.

[20] Mun S, Noh M Y, Dittmer N T, et al. Cuticular protein with a low complexity sequence becomes cross-linked during insect cuticle sclerotization and is required for the adult molt[J]. Scientific Reports,2015,5:10484.

[21] Abehsera S, Weil S, Manor R, et al. The search for proteins involved in the formation of crustacean cuticular structures[J]. Hydrobiologia,2018,825(1):29-45.

[22] Luquet G. Biomineralizations: insights and prospects from crustaceans[J]. ZooKeys,2012,176(176):103-121.

[23] Volovych O, Lin Z, Du J, et al. Identification and temporal expression profiles of cuticular proteins in the endoparasitoid wasp, Microplitis mediator[J]. Insect Science,2020,27(5):998-1018.