

悬铃木方翅网蝽非典型气味受体基因 *CcilOrco* 的克隆与序列分析

董 敏^{1*}, 杜立啸², 袁洪振¹, 夏延颖¹, 司军红¹, 董文慧¹

(1. 山东鸿林工程技术有限公司, 济南 250101; 2. 中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100193)

摘要 为进一步研究悬铃木方翅网蝽 *Corythucha ciliata* 嗅觉通讯分子机制和寻求新的悬铃木方翅网蝽防治技术, 本研究克隆了悬铃木方翅网蝽的非典型气味受体基因 *CcilOrco*, 并对其序列进行生物信息学分析。根据 GenBank 中已发表的半翅目昆虫非典型气味受体家族基因的氨基酸保守序列设计简并引物, 采用 RT-PCR 方法扩增目的基因, 将其克隆至 pEASY-Blunt 载体并测序。将克隆获得悬铃木方翅网蝽非典型气味受体 *Orco* 的 cDNA 序列命名为 *CcilOrco* (GenBank 登录号: MF564288), 序列分析结果显示, *CcilOrco* 开放阅读框长 1 419 bp, 编码 472 个氨基酸。预测其分子量为 53.25 kD, 等电点为 6.22, 序列中有 7 个跨膜区, N-端在细胞膜内, C-端在细胞膜外。通过在 GenBank 中进行序列的同源性比较, 该基因与已公布的半翅目昆虫的非典型气味受体基因序列有较高的同源性。克隆所获得的基因属于非典型气味受体家族基因。qPCR 结果显示 *CcilOrco* 主要在雌雄成虫触角中高表达。

关键词 悬铃木方翅网蝽; 气味受体; 基因克隆; 序列分析; 表达分析

中图分类号: S 763.7 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2017290

Gene cloning and sequence analysis of the odorant receptor gene *CcilOrco* in *Corythucha ciliata*

DONG Min¹, DU Lixiao², YUAN Hongzhen¹, XIA Yanying¹, SI Junhong¹, DONG Wenhui¹

(1. Shandong Honglin Engineering Technology Co., Ltd., Jinan 250101, China;

2. Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract For further studying the mechanism of olfactory communication and seeking new prevention technology for *Corythucha ciliata*, the olfactory receptor gene (*CcilOrco*) was cloned and analyzed by bioinformatics analysis. According to the conserved amino acid sequences of the Hemiptera insect olfactory receptor gene family published in GenBank, the degenerate primers were designed for RT-PCR. The cDNA sequence of *Corythucha ciliata* olfactory receptor gene was cloned, and named *CcilOrco* (GenBank accession no: MF564288). The results of sequence analysis showed that the open reading frame of *CcilOrco* consisted of 1 419 nucleotides, encoding 472 amino acids with a molecular weight of 53.25 kD, an isoelectric point of 6.22 and 7 putative transmembrane domains in the sequence, with an intracellular N-terminal and extracellular C-terminus. By comparing the homology of the sequences in GenBank, the sequence shared high identity with *Orco* orthologue chemoreceptor sequences from previously reported insects. The results indicated that the gene belonged to atypical olfactory receptor gene family. qPCR showed that *CcilOrco* was expressed highly in male and female antennae.

Key words *Corythucha ciliata*; odorant receptor; gene cloning; sequence analysis; expression profile

悬铃木方翅网蝽 *Corythucha ciliata* 属半翅目网蝽科, 原分布于北美和加拿大中东部^[1], 1964 年经意大利在欧洲迅速蔓延^[2-3]。目前在南美洲、亚洲和澳洲也已发现大面积为害现象^[4-5]。我国在 2006 年于武汉首次发现悬铃木方翅网蝽, 随后在上海、杭州、南京、重庆、武汉等长江流域多个城市发生危害,

形成了暴发态势^[6]。国家林业局随即将悬铃木方翅网蝽增列入我国林业危险性有害生物名单, 并要求各地监测和防治。悬铃木方翅网蝽具有传播速度快、为害严重等特点, 被认为是危险入侵物种, 一旦传入到新的地区, 短时间内可形成稳定的高密度种群^[7-10], 成为入侵地悬铃木的常发性主要害虫^[11-13],

收稿日期: 2017-08-04 修订日期: 2017-09-12

* 通信作者 E-mail: dongmin821126@163.com

暴发时难以控制^[14]。悬铃木是我国常见的城市绿化植物,广泛种植于中东部地区,具有特殊的美化和人文价值,悬铃木方翅网蝽严重影响着城市形象,给居民生活和城市管理带来了巨大困扰,因此急需寻找一种安全有效的防治方法。

嗅觉对昆虫的生存繁衍至关重要,它在昆虫寻找食物、配偶、产卵和发育场所、躲避敌害等方面发挥重要作用^[15-16]。气味受体(odorant receptor)是嗅觉系统的关键成分之一,是了解昆虫化学信号分子识别机制的重要基础^[17-19],对气味受体的研究可为悬铃木方翅网蝽的防治提供新的思路和途径。本研究采用 RT-PCR 技术,克隆获得悬铃木方翅网蝽 *CcilOrco* 基因,利用生物信息学技术对其序列进行分析,并与其他昆虫 *Orco* 基因同源性进行了比较,以期为进一步研究悬铃木方翅网蝽嗅觉通讯分子机制和寻求新的悬铃木方翅网蝽防治技术提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试样本与试剂

悬铃木方翅网蝽成虫采自山东省济南市历城区郭店镇相公庄区域山东鸿林工程技术有限公司的苗圃园内。将采集到的成虫存放于白色透明塑料盒中,用新鲜悬铃木叶片饲喂,放置于人工培养箱中,温度(27±1)℃、湿度 60%。取 300 头成虫的触角,用镊子将其头和触角一同夹下,立刻置于液氮中研磨至粉状,转入装有 1 mL TRIzol 的 EP 管中,-70℃保存至 RNA 提取。

总 RNA 提取试剂 TRIzol 购自 Invitrogen 公司;First Strand cDNA Synthesis Kit 购自 Fermentas 公司;PCR 试剂购自 TaKaRa 公司;普通琼脂糖胶回收试剂盒、感受态细胞、pEASY-Blunt Vector、抗生素类、X-gal、IPTG 均购自全式金生物技术有限公司;GoTaq qPCR Master Mix 购自 Promega 公司;其他均为国产或进口分析纯试剂;引物合成、测序由华大基因生物技术公司完成。

1.2 引物设计

根据 GenBank 中已发表的半翅目昆虫中黑盲蝽 *Adelphocoris suturalis* (GenBank: KC881257)、绿盲蝽 *Apolygus lucorum* (GenBank: KC881255)、豆荚草盲蝽 *Lygus hesperus* (GenBank: JQ639213)、美国牧草盲蝽 *Lygus lineolaris* (GenBank: JQ639214)等非典型气味受体家族基因的氨基酸保守序列,设计扩增悬铃木方翅网蝽 *CcilOrco* 基因的简并引物,上游引物:5'-ATGATGACCAARGTGAARGC-3';下游引

物:5'-TTAYTTGAGYTGTAAYCAAYACCATG-3'。

1.3 总 RNA 提取和 cDNA 的合成

使用 TRIzol 试剂提取 1.1 节中收集的悬铃木方翅网蝽成虫头部和触角的总 RNA,提取步骤参照说明书。提取的总 RNA 浓度和质量通过 NanoDrop-2000(NanoDrop Products)和琼脂糖凝胶电泳检测。取 1 μg 总 RNA,以 Oligo dT 为引物合成 cDNA,试验操作依照 First Strand cDNA Synthesis Kit 使用手册。

1.4 基因克隆

以悬铃木方翅网蝽头部及触角 cDNA 为模板,利用简并引物扩增 *CcilOrco* 的完整开放阅读框序列。反应体系为:2×PrimeStar Premix 25 μL,cDNA 2 μL,上下游引物(10 μmol/L)各 2 μL,ddH₂O 补充至 50 μL。混匀,短暂离心,放入 PCR 仪中进行扩增。反应条件:94℃预变性 5 min;接着进行 35 个循环,循环条件为 94℃ 15 s,55℃ 20 s,72℃ 45 s;最后 72℃延伸 5 min。将产物于 1%的琼脂糖凝胶上进行电泳检测。将回收的 PCR 产物连接到 pEASY-Blunt 克隆载体并测序。

1.5 序列分析

通过 DNAMAN、Gendoc 等软件对测序获得的悬铃木方翅网蝽 *CcilOrco* 基因核苷酸序列及其编码的氨基酸序列进行分析;利用 NCBI 上 BLAST 工具进行同源性比对;使用 EXPASY(Expert Protein Analysis System, <http://www.expasy.org>)的 Translate tool(<http://web.expasy.org/translate>)将核酸序列翻译成氨基酸序列,通过 Compute pI/Mw 工具(http://web.expasy.org/compute_pi/)预测蛋白分子量和等电点。使用 TMHMM(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>)进行跨膜结构域预测。使用 Mega 6.0 采用邻接法(neighbor-joining method)构建进化树,分支的支持率通过 bootstrap 验证,重复次数 1 000。

1.6 *CcilOrco* 基因表达分析

为了明确 *CcilOrco* 基因在雌雄成虫不同部位表达量的差异,我们利用 qPCR 对该基因在雌雄成虫触角、头(去除触角)、胸、腹、足中的表达情况进行了分析。根据获得的 *CcilOrco* 基因的核酸序列,利用 Primer 5 设计特异引物,上游引物:5'-CTTCT-GTTTCATTCGTCATATTTGCC-3';下游引物:5'-ATCGTTTCCATCCCCATTGGTA-3'。内参基因选用 β actin (GenBank: KX108734) 基因,上游引物:5'-CCAAGGCCAACAGAGAAAAGAT-3';

下游引物:5'-GATGGGCACAGTGTGGGAAA-3'。

收集 200 头雌、雄成虫的触角, 200 头雌、雄成虫的头(去除触角), 100 头雌、雄成虫的胸, 50 头雌、雄成虫的腹, 50 头雌、雄成虫的足, 液氮中研磨至粉状, 转入装有 1 mL TRIzol 的 EP 管中, -70℃ 保存至 RNA 提取, RNA 提取的方法步骤同 1.1。所有部位均取 1 μg 的 RNA 进行 cDNA 的合成, 具体步骤同 1.3。qPCR 反应体系为: GoTaq qPCR Master Mix 10 μL, 上下游引物(10 μmol/L) 各 0.8 μL, cDNA 1 μL, 无 RNA 酶的 H₂O 7.4 μL。反应程序为: 95℃, 2 min; 95℃, 15 s, 60℃, 50 s, 循环数为 40。整个反应在 ABI 7500 Fast 平台上完成。将雌

性成虫触角 cDNA 以 10 倍浓度进行梯度稀释, 共 8 个浓度, 并以此为模板进行 qPCR 扩增, 以确定引物的特异性及扩增效率。每个部位独立重复 3 次。数据采用 2^{-ΔΔCT} 法进行处理, 采用 SPSS 16.0 进行 ANOVA 比较不同组织间 *CcilOrco* 基因表达量的差异(LSD, *P* < 0.05)。

2 结果与分析

2.1 悬铃木方翅网蝽气味受体基因 *CcilOrco* 序列分析

通过基因克隆获得悬铃木方翅网蝽气味受体基因的序列, 命名为 *CcilOrco* (GenBank: MF564288)。如图 1 所示。

```

1   ATGCAGAAAGTGAAGATGCATGGTCTGGTTGGAGACCTTTGGCCGAATATCCGGCTCATGCAACTGACAGGACAC
1   M Q K V K M H G L V G D L W P N I R L M Q L T G H
76  TGGCTCCTTGAGTACCACGAGGACAACGGCGGACTCACTCGACTTCTTAGCGAGGCCATTGCTGGATGACCACA
76  W L L E Y H E D N G G L T R L R Q A Y C W M T T
151 CTGCTCCTTTTACAAATTTTGGATTTCATCTGCTGTTTCTCATACTGGAAACGTACAGTTCCGATCAAATGGCC
151 L L L L F T N F G F I C C F L I L E T Y S S D Q M A
226 GGTGCAACTATAACGACGTTGTTTTCTTGATAGCGTTACTAAATTCGCTTACTTTGCTTTACGAAGCAAGTAT
226 G A T I T T L F F L H S V T K F A L R S K Y
301 TTCTATAGGACGTTAAGTGCTTGAATCAGATGAACCTCTACCCGTTGTTTGGGAATCAAACGCTCGCCATAGA
301 F Y R T L S A W N Q M N S H P L F A E S N A R H R
376 GCTACATCCCTCTCGAGAAATGAGAAAACCTCTCATGATTATTGGTGTGGAAACGATTCTATCAGTTCTCGCTTG
376 A T S L S R M R K L L M I I G V G T I L S V L A W
451 ACCATCATCAGCTTTTGGATGAACCTGTTTGGGAAGTGACGGACCCGTGATAATGTGAACGCGACAATAACAGTT
451 T I I T F L D E P V W E V T D P D N V N A T I T V
526 GAAGTACCACAATTGATGATACACGCTTGGTATCCTTGGGATGCCGTTCTGGAAATGGCTTACATGATCAGCTTT
526 E V P Q L M I H A W Y P W D A R S G M A Y M I T F
601 ATTTATCAGCTCTACTGGCTCTTCATCTCCCTAAGTCATGCAAAACCTTCTAGACGTTCTCTTCTGTTTCATTGTC
601 I Y Q L Y W L F I S L S H A N L L D V L F C S F V
676 ATATTGCGCTGCGAACAATTAACAACTTGAAGAAATCCTTCAGCCACTAATGGATCTAAGCGCTGCTCTCGAT
676 I F A C E Q L K H L K E I L Q P L M D L S A A L D
751 TCTGTTGTACCAAATTCAGGAGATTTTATTCAGAGCCTCATCCACATCGTCAAAATATTCCTTTGATTACCAATGGG
751 S V V P N S G D L F R A S S T S S N I P L I T N G
826 GATGGAACGATTTTGTATGTCGAGGAATTTACAGCAATCAGCGAGATTTCCTCGGTTTTCAAGGTGGTAATTTA
826 D G N D F D V R G I Y S N Q R D F S G F Q G G N L
901 ATAAATACAAATGGGGGTGTTGGTCCTAATGGGCTGAGCAAGAAACAGGAGCTTCTAGTCAGATCTGCGATCAAA
901 I N T N G G V G P N G L S K K Q E L L V R S A I K
376 GCTACATCCCTCTCGAAGATGAGAAAACCTCTCATGATTATTGGTGTGGAAACGATTCTATCAGTTCTCGCTTGG
376 A T S L S R M R K L L M I I G V G T I L S V L A W
451 ACCATCATCAGCTTTTGGATGAACCTGTTTGGGAAGTGACGGACCCGTGATAATGTGAACGCGACAATAACAGTT
451 T I I T F L D E P V W E V T D P D N V N A T I T V
526 GAAGTACCACAATTGATGATACACGCTTGGTATCCTTGGGATGCCGTTCTGGAAATGGCTTACATGATCAGCTTT
526 E V P Q L M I H A W Y P W D A R S G M A Y M I T F
601 ATTTATCAGCTCTACTGGCTCTTCATCTCCCTAAGTCATGCAAAACCTTCTAGACGTTCTCTTCTGTTTCATTGTC
601 I Y Q L Y W L F I S L S H A N L L D V L F C S F V
676 ATATTGCGCTGCGAACAATTAACAACTTGAAGAAATCCTTCAGCCACTAATGGATCTAAGCGCTGCTCTCGAT
676 I F A C E Q L K H L K E I L Q P L M D L S A A L D
751 TCTGTTGTACCAAATTCAGGAGATTTTATTCAGAGCCTCATCCACATCGTCAAAATATTCCTTTGATTACCAATGGG
751 S V V P N S G D L F R A S S T S S N I P L I T N G
826 GATGGAACGATTTTGTATGTCGAGGAATTTACAGCAATCAGCGAGATTTCCTCGGTTTTCAAGGTGGTAATTTA
826 D G N D F D V R G I Y S N Q R D F S G F Q G G N L
901 ATAAATACAAATGGGGGTGTTGGTCCTAATGGGCTGAGCAAGAAACAGGAGCTTCTAGTCAGATCTGCGATCAAA
901 I N T N G G V G P N G L S K K Q E L L V R S A I K
301 INTNNGGVGPNGLSKKQE L L V R S A I K
976 TATTGGGTTGAGCGTCATAAGCATGTTGTTAAGTTTGACAAAGTATTGGAGACGCTACGGTGTCGCACTTTTA
326 Y W V E R H K H V V K F V T S I G D A Y G V A L L
1051 CTTACATGCTTACAAAGTACCGTTACTCTTACCCTGCTTGCCTATCAGGCCACAAGATCGAAGGGGTTGACGTG
351 L H M L T S T V T L T L L A Y Q A T K I E G V D V
1126 TACGCTCAACAGTCATTTGGCTATCTTCTACACGCTCGCTCAAGTATTCGTTTTTTCGATTTTCGGAAATGAA
376 Y A S T V I G Y L F Y T L A Q V F V F C I F G N E
1201 CTCATCGAAGAGAGTTTACCGTTATGGAGGCTGCGTACAGTTGCCACTGGTACGAGCGGTCGGAAAGAGGCTAAG
401 L I E E S S S V M E A A Y S C H W Y D G S E E A K
1276 ACGTTTCGTTCAAAATCGTTTGTCAGCAGTGTCAAAAGTCGTTGTCGGTGTCGGGAGCGCAATTTTTCACCGTGCTCA
426 T F V Q I T Q C Q C Q K S L S V S G A A F F T V S
1351 CTCGATTTATTTCGCTTCTGTATTTCGGCGCTGTCGTAACCTACTTTCATGGTGTGGTGCAGCTCAAAATAA
451 L D L F A S V F G A V V T Y F M V L V Q L K *
    
```

图 1 悬铃木方翅网蝽 *CcilOrco* 核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and amino acid sequences of the gene *CcilOrco* in *Corythucha ciliate*

CcilOrco 开放阅读框长 1 419 bp, 编码 472 个氨基酸。预测其分子量为 53.25 kD, 等电点为 6.22。利用 TMHMM 2.0 蛋白跨膜结构预测软件分析, 获得的序列具有 7 个 α 螺旋跨膜区 (图 2), 跨膜区氨基酸的位置是 47-69, 74-96, 135-157, 204-226, 344-366, 376-398 和 446-468, 是一个典型的 G 蛋白偶联受体, 序列 N-端在细胞膜内, C-端在细胞膜外。

2.2 悬铃木方翅网蝽 *CcilOrco* 基因氨基酸同源性比较

选取半翅目昆虫绿盲蝽 (*AlucOrco*; KC881255)、美国牧草盲蝽 (*LlinOrco*; JQ639214); 双翅目昆虫黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (*DmelOrco*; AY567998)、冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* (*AgamOrco*; AY843205); 鳞翅目昆虫黄地老虎 *Agrotis segetum* (*AsegOrco*;

KC526964)、桃蛀螟 *Conogethes punctiferalis* (*CpunOrco*; JX101681) 与悬铃木方翅网蝽 *CcilOrco* 基因进行序列比对分析, 结果显示, 这 8 种昆虫的 Orco 受体的 C 端序列具有高度的保守性 (图 3)。

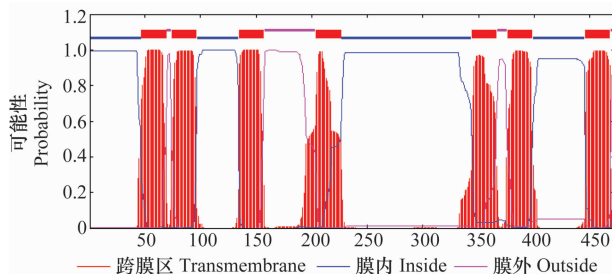


图 2 悬铃木方翅网蝽 *CcilOrco* 的跨膜结构预测

Fig. 2 The predicted transmembrane domains of the olfactory co-receptor *CcilOrco* from *Corythucha ciliate*

<i>CcilOrco</i>	...MOKVMMHGLVGDLPNIRLMOLTCWHLLEYHEDNGGLTRLLRQACWMTTLLLTFTNFGICCFLEILETYSSDQAGATITF	81
<i>AgamOr83b</i>	..MQVOPTRYVGLADLMENIRLMQASCHFLFRYVTG...PILIRKVSXWTLAMVLIQFFAILGNLATNADDVNELTANTITF	79
<i>DmelOr83b</i>	MTTSMQPSRYTGLADLMENIRAMKYSCLFMHNETGG...SAFMKKVYSSVHLVFLMQQFTILVNMAINAEVNEVNSGNTITF	81
<i>AsegOrco</i>	...MMTKVRAQGLSDLLPNIKLMQAACHFLFNHSEAGMSNLLRKIVASTHAILITIHFGCMVNNMAQYSDEVNELTANTITF	82
<i>CponOrco</i>	...MMNKVKALGLVSDLPNIRLMQAACHFLFNHSDNSGMAMLLRKIVASVHAFILVHYLCMAVNNMAQYSEEVNELTANTITF	82
<i>LlinOrco</i>	...MOKVMMHGLVGDLPNIRLMOLTCWHLLEYHEETGGMARLLRLAKCWMTTFSVYIQYAFVLCFLEILETYNADEMAAYTITF	81
<i>AlucOrco</i>	...MOKVMMHGLVGDLPNIRLMOLTCWHLLEYHEENGMLRLRLAKCWMTTFSYIQYAFVLCFLEILETYNADEMAAYTITF	81
<i>CcilOrco</i>	LFFLHVSVTKEFYFAFRSKYFYRTLAWNQVNSHPLFAESNARHRATSLSRMRKLLMIIGVGTILSVLAWTITFLDEPWEVETDP	166
<i>AgamOr83b</i>	LFFLHVSVTKEFYFAVNSENFYRTLAINNQVNTPLFAESDARYHSIALAKMRKLLVLVMATVLSVVAWVITFFGDSVKTVLD	163
<i>DmelOr83b</i>	KEINTELTPEVRLPLKAFYFNAMSGTMYIVAFARQVYLLFSMAIANLMDVDFCSWLLIFACEQLQHLKRAIMKPLMELSASLDT	165
<i>AsegOrco</i>	LFFLHVSVTKEFYFAFRSKYFYRTLAWNQVNSHPLFAESDARYHQIALTKMRRLLYFCIGMTCLSVVWITLTFFGESVRLITN	166
<i>CponOrco</i>	LFFLHVSVTKEFYFAFRSKYFYRTLAWNQVNSHPLFAESDARYHQLSLTKMRRLLYFCIGMTCLSVVWITLTFFGESVRLITN	166
<i>LlinOrco</i>	LFFLHVSVTKEFYFAFRSKYFYRTLAWNQVNSHPLFAESNARHRATSLSRMRKLLMIIGVGTILSVLAWTITFLDEPWEVETDP	166
<i>AlucOrco</i>	LFFLHVSVTKEFYFAFRSSYFYRTLAWNQVNSHPLFAESNARHRATSLSRMRKLLMIIGVGTILSVLAWTITFLDEPWEVETDP	166
<i>CcilOrco</i>	DNVNETISVEIPEQMIHAWYFPWDARSQMAVMTIFVQYVWLFISLSHANLLDVLFCFVIFACEQLKHLKEILQPLMDLSAALDS	251
<i>AgamOr83b</i>	KATNETYTVDIRPEIKSYWYFNAMSGPAYIFSFYVQYVWLFISLSHANLLDVLFCFVIFACEQLKHLKEILQPLMDLSAALDS	248
<i>DmelOr83b</i>	HETNSSIPVEIPEIKSYWYFNAMSGPAYIFSFYVQYVWLFISLSHANLLDVLFCFVIFACEQLKHLKEILQPLMDLSAALDS	250
<i>AsegOrco</i>	KEINTELTPEVRLPLKAFYFNAMSGTMYIVAFARQVYLLFSMAIANLMDVDFCSWLLIFACEQLQHLKRAIMKPLMELSASLDT	251
<i>CponOrco</i>	KEINTELTPEVRLPLKAFYFPDAMGCTMYVAVFVQVYLLFSMAIANLMDVDFCSWLLIFACEQLQHLKRAIMKPLMELSASLDT	251
<i>LlinOrco</i>	DNVNETISVEIPEQMIHAWYFPWDARSQMAVMTIFVQYVWLFISLSHANLLDVLFCFVIFACEQLKHLKEILQPLMDLSAALDS	251
<i>AlucOrco</i>	DNVNETISVEIPEQMIHAWYFPWDARSQMAVMTIFVQYVWLFISLSHANLLDVLFCFVIFACEQLKHLKEILQPLMDLSAALDS	251
<i>CcilOrco</i>	VVPNSGDLFRASSTSSNIPLITNGGN...DDVVRGIYSNQRDFSGFGGGLNTNGGVGP.....NGLSKROELLV	320
<i>AgamOr83b</i>	YRPNSSQLPRAISAGSKSELINEEKDPDVKDDLSGIYSSKADWGAQFRAPSTLQFDENGRNGN.....PGLTRKOEEMV	326
<i>DmelOr83b</i>	YRPNSSQLPRAISAGSKSELINEEKDPDVKDDLSGIYSSKADWGAQFRAPSTLQFDENGRNGN.....PGLTRKOEEMV	334
<i>AsegOrco</i>	YRPNSSQLPRAISAGSKSELINEEKDPDVKDDLSGIYSSKADWGAQFRAPSTLQFDENGRNGN.....PGLTRKOEEMV	321
<i>CponOrco</i>	YRPNSSQLPRAISAGSKSELINEEKDPDVKDDLSGIYSSKADWGAQFRAPSTLQFDENGRNGN.....PGLTRKOEEMV	322
<i>LlinOrco</i>	VVPNSGDLFRASSTSSNIPLITNGGN...DDVVRGIYSNQRDFSGFGGGLNTNGGVGP.....NGLSKROELLV	321
<i>AlucOrco</i>	VVPNSGDLFRASSTSSNIPLITNGGN...DDVVRGIYSNQRDFSGFGGGLNTNGGVGP.....NGLSKROELLV	319
<i>CcilOrco</i>	RSAIKYVVERHKHVVRVSAIGDYGALLHMLTSTVTLTLLAYQATKIEGVVYASTVIGYLYTLAQVVFVFCIFGNRLIEES	405
<i>AgamOr83b</i>	RSAIKYVVERHKHVVRVSAIGDYGALLHMLTSTVTLTLLAYQATKIDGVNYYGLTVGYLYTLAQVVFVFCIFGNRLIEES	411
<i>DmelOr83b</i>	RSAIKYVVERHKHVVRVSAIGDYGALLHMLTSTVTLTLLAYQATKIDGVNYYGLTVGYLYTLAQVVFVFCIFGNRLIEES	419
<i>AsegOrco</i>	RSAIKYVVERHKHVVRVSAIGDYGALLHMLTSTVTLTLLAYQATKIDGVNYYGLTVGYLYTLAQVVFVFCIFGNRLIEES	406
<i>CponOrco</i>	RSAIKYVVERHKHVVRVSAIGDYGALLHMLTSTVTLTLLAYQATKIDGVNYYGLTVGYLYTLAQVVFVFCIFGNRLIEES	407
<i>LlinOrco</i>	RSAIKYVVERHKHVVRVSAIGDYGALLHMLTSTVTLTLLAYQATKIEGVVYASTVIGYLYTLAQVVFVFCIFGNRLIEES	406
<i>AlucOrco</i>	RSAIKYVVERHKHVVRVSAIGDYGALLHMLTSTVTLTLLAYQATKIEGVVYASTVIGYLYTLAQVVFVFCIFGNRLIEES	404
<i>CcilOrco</i>	SSVMEAAYSCHWYDGESEAKTFVQIVCQCCQKSLVSGAKFFTSLDLFASVVGAVVTFYFVVLVQL	471
<i>AgamOr83b</i>	SSVMEAAYSCHWYDGESEAKTFVQIVCQCCQKAMTISGAKFFTSLDLFASVVGAVVTFYFVVLVQL	477
<i>DmelOr83b</i>	SSVMEAAYSCHWYDGESEAKTFVQIVCQCCQKAMTISGAKFFTSLDLFASVVGAVVTFYFVVLVQL	485
<i>AsegOrco</i>	SSVMEAAYSCHWYDGESEAKTFVQIVCQCCQKAMTISGAKFFTSLDLFASVVGAVVTFYFVVLVQL	472
<i>CponOrco</i>	SSVMEAAYSCHWYDGESEAKTFVQIVCQCCQKAMTISGAKFFTSLDLFASVVGAVVTFYFVVLVQL	473
<i>LlinOrco</i>	SSVMEAAYSCHWYDGESEAKTFVQIVCQCCQKSLVSGAKFFTSLDLFASVVGAVVTFYFVVLVQL	472
<i>AlucOrco</i>	SSVMEAAYSCHWYDGESEAKTFVQIVCQCCQKSLVSGAKFFTSLDLFASVVGAVVTFYFVVLVQL	470

AgamOr83b, 冈比亚按蚊 (AY843205); *DmelOr83b*, 黑腹果蝇 (AY567998); *AsegOrco*, 黄地老虎 (KC526964); *CponOrco*, 桃蛀螟 (JX101681); *LlinOrco*, 美国牧草盲蝽 (JQ639214); *AlucOrco*, 绿盲蝽 (KC881255)
AgamOr83b, *Anopheles gambiae* (AY843205); *DmelOr83b*, *Drosophila melanogaster* (AY567998); *AsegOrco*, *Agrotis segetum* (KC526964); *CponOrco*, *Conogethes punctiferalis* (JX101681); *LlinOrco*, *Lygus lineolaris* (Q639214); *AlucOrco*, *Apolygus lucorum* (KC881255)

图 3 悬铃木方翅网蝽 *CcilOrco* 与其他昆虫气味受体蛋白的序列比对

Fig. 3 Sequence alignment of *Corythucha ciliate* *CcilOrco* with olfactory receptors in other insects

为研究悬铃木方翅网蝽 *CcilOrco* 与其他物种之间的进化关系,利用 Mega 6.0 软件邻接法构建半翅目、鳞翅目、膜翅目、鞘翅目、直翅目、双翅目部分昆虫非典型气味受体的系统进化树(图 4)。结果显示,24 个非典型嗅觉受体基因分成 2 个大的分支,不同目之间氨基酸序列差异较大,同一目昆虫之间

差异较小;悬铃木方翅网蝽 *CcilOrco* 与麦长管蚜 *SaveOrco*、绿盲蝽 *AlucOrco*、豆莢草盲蝽 *LhesOrco*、美国牧草盲蝽 *LlinOrco* 聚为一类,它们都属于半翅目昆虫非典型气味受体,相似性较高。而与其他目昆虫遗传距离较远,相似性很低。

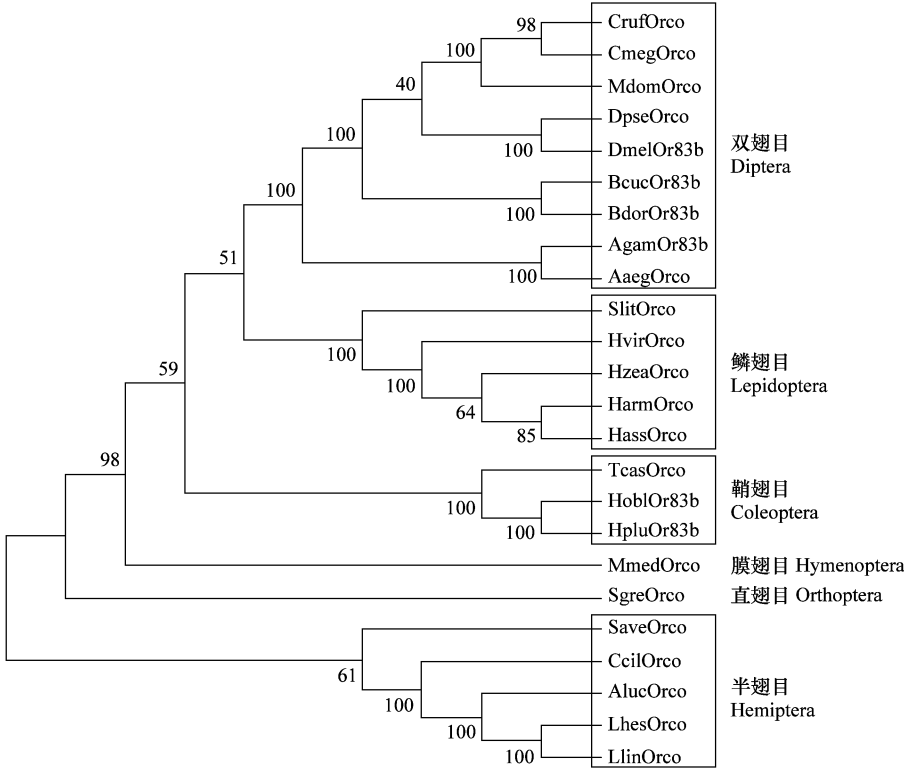


图 4 悬铃木方翅网蝽与其他昆虫 Orco 氨基酸的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of *Corythucha ciliate* Orcos and those from other insects based on amino acid sequence

2.3 悬铃木方翅网蝽 *CcilOrco* 基因在不同部位表达分析

采用 qPCR 对悬铃木方翅网蝽 *CcilOrco* 基因在雌雄成虫不同部位的表达情况进行了比较分析。以雌成虫触角不同浓度的 cDNA 为模板,进行 qPCR,根据 CT 值得到悬铃木方翅网蝽 *CcilOrco* 基因和 β -actin 基因的标准曲线,其相关系数 r 分别为 0.999 6 和 0.999 7,扩增效率分别为 102%和 103%,符合试

验的要求。

以雌虫和雄虫足中 *CcilOrco* 基因的表达量为 1,分别对雌虫和雄虫其他部位中获得的数据进行处理。结果显示,*CcilOrco* 基因在雌性和雄性成虫之间表达模式一致,均在触角中表达量最高,显著高于其他部位;其次为头部,在胸、腹和足中的表达量最低,且三者之间不存在显著性差异(图 5)。

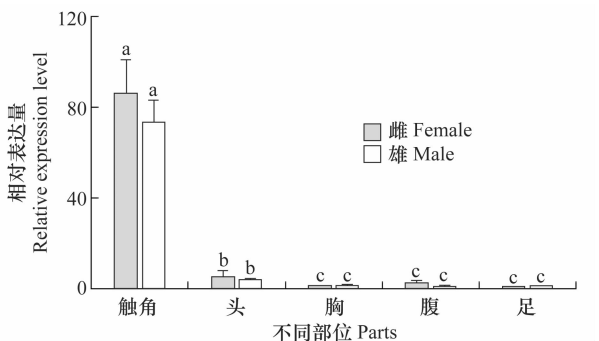


图5 悬铃木方翅网蝽 *Ccilorco* 的表达分析

Fig. 5 Expression profile of *Ccilorco* in different parts of *Corythucha ciliata*

3 结论与讨论

目前,随着测序技术的发展,多种昆虫的触角转录组被测定出来,利用昆虫各物种之间的保守区域进行同源克隆的方法,已从鳞翅目、双翅目、膜翅目、鞘翅目、直翅目等 8 个目的多种昆虫发现了非典型气味受体基因,并且在不同昆虫之间其序列相似性很高。本研究通过 RT-PCR 技术获得悬铃木方翅网蝽 *Ccilorco* 基因的 cDNA 序列,其编码的氨基酸序列与半翅目昆虫麦长管蚜 *SaveOrco*、绿盲蝽 *Alu-cOrco*、豆荚草盲蝽 *LhesOrco*、美国牧草盲蝽 *LlinOrco* 等同源性水平很高,与双翅目等昆虫的非典型气味受体也有高的同源性,这些都与 Orco 基因在不同昆虫体内的保守性相吻合。通过 qPCR 发现 *Ccilorco* 基因主要在雌雄成虫触角中高表达,在去除触角的头部表达量同样显著高于胸、腹和足等非嗅觉组织。这可能和其与 ORx 的共表达有关,目前的研究发现,绝大部分 ORx 主要在触角、喙、下唇须等嗅觉组织中表达。

Orco 与普通气味受体 ORx 共表达,形成一个异源二聚体结构,这样可以极大地提高 ORx 对气味的结合反应能力,但它对 ORx 的配体结合范围并无任何影响^[20-22]。Larsson 等^[23] 敲除果蝇 Orco 后发现,果蝇对大部分气味的电生理反应丧失,同时这些气味也无法引起果蝇相应的行为反应;但进行基因营救试验后,果蝇对这些气味的电生理反应和行为反应又得到了恢复。类似的研究在赤拟谷盗、黄曲条跳甲等昆虫的 Orco 中也得到了相似的结果^[24]。Orco 在昆虫嗅觉识别过程中发挥着重要的作用,但其本身并不与任何配体结合。在对果蝇 *Or22a/b* 基

因突变体中,只表达 Orco 的嗅觉神经神经元对测试的气味化合物无任何生理学反应^[25]。

目前已被证实,VUAAI 是 Orco 的兴奋剂,它可以通过激活 Orco 从而激发几乎所有嗅觉神经元的活性,进而丧失对不同气味物质的区分,抑制昆虫嗅觉诱发的行为反应^[26]。随后的研究也发现了多种 Orco 的抑制剂^[27-28],这些研究为以 Orco 为靶标的害虫防治提供了基础。本研究对悬铃木方翅网蝽气味受体 *Ccilorco* 基因的成功克隆,为悬铃木方翅网蝽的防控提供新的理论基础,具有重要的实践意义。

参考文献

- [1] HALBERT S E, MEEKER J R. The sycamore lace bug, *Corythucha ciliata* (Say) (Hemiptera: Tingidae) [J]. Entomology Circular (Gainesville), 1998(2): 387 - 388.
- [2] PELLIZZARI G, MONTÀ L D. The insect pests introduced into Italy between 1945 and 1995 [J]. Informatore Fitopatologico, 1997, 47(10): 4 - 12.
- [3] MAZZON L, GIROLAMI V. The sycamore lacebug [J]. Sherwood-Foreste ed Alberi Oggi, 2000, 6: 27 - 28.
- [4] PRADO C E. Presence in Chile of *Corythucha ciliata* (Say) (Hemiptera: Heteroptera: Tingidae) [J]. Revista Chilena de Entomologia, 1990, 18: 53 - 55.
- [5] CHUNG Y J, KWON T S, YEO W H, et al. Occurrence of the sycamore lace bug, *Corythucha ciliata* (Say) (Hemiptera: Tingidae) in Kore [J]. Korean Journal of Applied Entomology, 2006, 35: 137 - 139.
- [6] 李传仁, 夏文胜, 王福莲. 悬铃木方翅网蝽在中国的首次发现 [J]. 动物分类学报, 2007, 32(4): 944 - 946.
- [7] MACELJSKI M, BALARIN I. A new member of the infurius entomofauna of Yugoslavia *Corythucha ciliata* (Say), Tingidae, Heteroptera [J]. Zastita Biljia, 1972, 2: 193 - 205.
- [8] MACELJSKI M, BALARIN I. Studies of *Corythu ciliate*, a new pest in Europe [J]. Anzeiger fur Schadlingskunde Pf lanzen-und Umweltschutz, 1974, 47: 165 - 170.
- [9] MASUTTI L. Animals in forest ecosystems [J]. Economia Montana, 1984, 16: 1 - 8.
- [10] D' AGUILAR J, PRALAVORIO R, RABASSE J M. Introduction into France of the plane tree lace bug: *Corythucha ciliate* (Say) (Heteroptera: Tingidae) [M]. Bulletin de la Societe Entomologique de France, 1997, 82: 2 - 6.
- [11] BURES G, CZENCZ K, GEZA F, et al. Results of studies on leaf pests of sycamore maple (*Platanus* sp.) trees [J]. Novenyvedelem, 1997, 33: 23 - 27.
- [12] MARCHETTI L, NANNI C, VAI N. Principal phytosanitary

- problems of urban greenery and relative trends in defence [J]. *Informatore Fitopatologico*, 1997, 47: 23–27.
- [13] MILEVOJ L. The occurrence of some pests and diseases on horse chestnut, plane tree and Indian bean tree in urban areas of Slovenia [J]. *Acta Agriculture Slovenica*, 2004, 83: 297–300.
- [14] CRAVEDI P. Organisms harmful to plants in the city [J]. *Informatore Fitopatologico*, 2000, 50: 7–8.
- [15] BRUCE T J A, WADHAMS L J, WOODCOCK C M. Insect host location: A volatile situation [J]. *Trends in Plant Science*, 2005, 10(6): 269–274.
- [16] SONG H G, KWON J Y, HAN H S, et al. First contact to odors: Our current knowledge about odorant receptors [J]. *Sensors*, 2008, 8(10): 6303–6320.
- [17] CLYNE P J, WARR C G, Freeman M R, et al. A novel family of divergent seven-transmembrane proteins: Candidate odorant receptors in *Drosophila* [J]. *Neuron*, 1999, 22(2): 27–338.
- [18] MOMBAERTS P. Seven-transmembrane proteins as odorant and chemosensory receptors [J]. *Science*, 1999, 286(5440): 707–711.
- [19] STORTKUHL K F, KETTLER R. Functional analysis of an olfactory receptor in *Drosophila melanogaster* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(16): 9381–9385.
- [20] BENTON R, SACHSE S, MICHNICK S W, et al. Atypical membrane topology and heteromeric function of *Drosophila* odorant receptors *in vivo* [J]. *PLoS Biology*, 2006, 4: e20.
- [21] NAKAGAWA T, PELLEGRINO M, SATO K, et al. Amino acid residues contributing to function of the heteromeric insect olfactory receptor complex [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7: e32372.
- [22] NEUHAUS E M, GISSELMANN G, ZHANG W, et al. Odorant receptor heterodimerization in the olfactory system of *Drosophila melanogaster* [J]. *Nature Neuroscience*, 2005, 8: 15–17.
- [23] LARSSON M C, DOMINGOS A I, JONES W D, et al. Or83b encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction [J]. *Neuron*, 2004, 43: 703–714.
- [24] ZHAO Y Y, LIU F, YANG G, et al. PsOr1, a potential target for RNA interference-based pest management [J]. *Insect Molecular Biology*, 2011, 20: 97–104.
- [25] DOBRITSA A A, NATERS WVDGV, WARR C G, et al. Integrating the molecular and cellular basis of odor coding in the *Drosophila* antenna [J]. *Neuron*, 2003, 37: 827–841.
- [26] JONES P L, PASK G M, RINKER D C, et al. Functional agonism of insect odorant receptor ion channels [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108(21): 8821–8825.
- [27] JONES P L, PASK G M, ROMAINE I M, et al. Allosteric antagonism of insect odorant receptor ion channels [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(1): e30304.
- [28] SISI C, LUETJE C W. Identification of new agonists and antagonists of the insect odorant receptor co-receptor subunit [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(5): e36784–e36784.
- (责任编辑: 田 喆)
-
- (上接 27 页)
- [12] MASAGO H, YOSHIKAWA M, FUHADA M, et al. Selective inhibition of *Pythium* spp. on a medium for direct isolation of *Phytophthora* spp. from soil and plants [J]. *Phytopathology*, 1977, 77(3): 425–428.
- [13] 段广荣, 石延霞, 谢学文, 等. 黄瓜枯萎病防治药剂的离体和活体筛选 [J]. *中国蔬菜*, 2010(12): 60–65.
- [14] 刘乐涛, 曹远银, 肖淑芹. 辣椒疫病拮抗菌的筛选及其防治效果研究 [J]. *沈阳农业大学学报*, 2008, 39(3): 313–317.
- [15] 中国科学院南京土壤研究所微生物室. 土壤微生物研究法 [M]. 北京: 科学出版社, 1985: 44–58.
- [16] 关松荫, 张德生, 张志明. 土壤酶及其研究法 [M]. 北京: 农业出版社, 1986.
- [17] 张超, 卜东欣, 张鑫, 等. 棉隆对辣椒疫霉病的防效及对土壤微生物群落的影响 [J]. *植物保护学报*, 2015, 42(5): 834–840.
- [18] 范昆, 王开运, 王东, 等. 1, 3-二氯丙烯药剂对土壤微生物数量和酶活性的影响 [J]. *生态学报*, 2008, 28(2): 695–701.
- [19] MARTIN J P, BAINES R C, ERVIN J O. Influence of soil fumigation for citrus replants on the fungus population of the soil [J]. *Proceedings of the Soil Science Society of America*, 1957, 21: 163–166.
- [20] 胡江春, 薛德林, 王书锦, 等. 大豆连作障碍研究 III. 海洋放线菌 MB-97 促进连作大豆增产机理 [J]. *应用生态学报*, 2002, 13(9): 1095–1098.
- [21] 张婷, 李世东, 缪作清. “秸秆降解生防菌强化技术”对黄瓜连作土壤微生物区系的影响 [J]. *中国生态农业学报*, 2013, 21(11): 1416–1425.
- [22] 边雪廉, 赵文磊, 岳中辉, 等. 土壤酶在农业生态系统碳、氮循环中的作用研究进展 [J]. *中国农学通报*, 2016, 32(4): 171–178.
- [23] PERUCCI P, VISCHETTI C, BATTISTONI F. Rimsulfuron in a silty clay loam soil: effects upon microbiological and biochemical properties under varying microcosm conditions [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1999, 31: 195–204.
- [24] 曹慧, 孙辉, 杨浩, 等. 土壤酶活性及其对土壤质量的指示研究进展 [J]. *应用与环境生物学报*, 2003, 9(1): 105–109.
- [25] MORENO J L, GARCÍA C, HERNÁNDEZ T. Toxic effect of cadmium and nickel on soil enzymes and the influence of adding sewage sludge [J]. *European Journal of Soil Biology*, 2003, 54: 377–386.
- (责任编辑: 田 喆)