

黄翅绢丝野螟气味受体基因 *GcaeOR10* 的鉴定 及组织表达分析



张绍华^{1,2} 孟倩倩^{2*} 朱恩杭¹ 查学宗¹ 颜日辉¹
刘爱勤^{1,2} 吴刚² 王政^{1,2,3*}

(1. 海南大学植物保护学院, 热带农林生物灾害绿色防控教育部重点实验室, 海口 570228; 2. 中国热带农业科学院香料饮料研究所, 海南省热带香辛饮料作物遗传改良与品质调控重点实验室, 万宁 571533; 3. 重庆市疾病预防控制中心消毒与媒介生物控制所, 高致病性病原微生物重庆市重点实验室, 重庆 400042)

摘要: 为明确黄翅绢丝野螟 *Glyphodes caesalis* 气味受体基因 *GcaeOR10* (GenBank 登录号 MW701397) 的生物信息学特征及组织表达谱, 使用生物信息学软件对其进行序列分析, 并通过实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, qPCR) 技术检测其在黄翅绢丝野螟成虫不同组织中的表达量。结果显示, 黄翅绢丝野螟 *GcaeOR10* 基因开放阅读框 (open reading frame, ORF) 全长为 1 200 bp, 编码 399 个氨基酸残基, 预测其编码的蛋白质分子量为 45.67 kD, 等电点为 8.65, 无信号肽, 具有昆虫气味受体家族 7 个跨膜蛋白 (7 transmembrane proteins, 7tm-6) 超家族的保守结构域, 存在 26 个潜在的磷酸化位点, 含有 7 个跨膜结构域, 且 N 端位于细胞膜内, C 端位于细胞膜外。黄翅绢丝野螟 *GcaeOR10* 与桑螟 *Glyphodes pyloalis* 的 *GpylOR17* 亲缘关系最近, 其次与松蛀螟 *Conogethes pinicolalis* 的 *CpinOR39*、*CpinOR36* 和桃蛀螟 *Conogethes punctiferalis* 的 *CpunOR36* 亲缘关系较近。黄翅绢丝野螟 *GcaeOR10* 基因在雄成虫触角中的表达量最高, 在腹部的表达量次之。表明黄翅绢丝野螟 *GcaeOR10* 是典型的气味受体, 可能与该虫识别性信息素有关, 参与其寻找配偶及交配等行为过程。
关键词: 黄翅绢丝野螟; 气味受体; 生物信息学分析; 组织表达谱

Identification and tissue expression profiling of the odorant receptor gene *GcaeOR10* in jack fruit borer *Glyphodes caesalis* (Lepidoptera: Pyralidae)

Zhang Shaohua^{1,2} Meng Qianqian^{2*} Zhu Enhang¹ Zha Xuezhong¹ Yan Rihui¹
Liu Aiqin^{1,2} Wu Gang² Wang Zheng^{1,2,3*}

(1. Key Laboratory of Green Prevention and Control of Tropical Plant Diseases and Pests, Ministry of Education, College of Plant Protection, Hainan University, Haikou 570228, Hainan Province, China; 2. Hainan Provincial Key Laboratory of Genetic Improvement and Quality Regulation for Tropical Spice and Beverage Crops, Research Institute of Spice and Beverage, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Wanning 571533, Hainan Province, China; 3. Chongqing Municipal Key Laboratory for High Pathogenic Microbes, Department of Disinfection and Vector Control, Chongqing Center for Disease Control and Prevention, Chongqing 400042, China)

Abstract: To clarify the bioinformatics characteristics and tissue expression profile of the odorant receptor gene *GcaeOR10* in *Glyphodes caesalis* (GenBank accession no. MW701397), bioinformatics software was used for sequence analysis, and its expression in different tissues of adults was detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR). The results showed that the open reading frame (ORF)

基金项目: 海南省科技专项 (ZDYF2022XDNY202), 中国热带农业科学院基本科研业务费专项 (1630142021016)

* 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: mengzouzou@163.com, sallywz618@163.com

收稿日期: 2021-10-01

of *GcaeOR10* gene was 1 200 bp in length, encoding 399 amino acid residues. The predicted molecular weight was 45.67 kD and the isoelectric point was 8.65. However, the amino acid sequence of *GcaeOR10* had no signal peptide but contained a conserved domain belonging to odorant receptor seven transmembrane proteins (7tm-6) superfamily and 26 potential phosphorylation sites. Besides, it also contained seven transmembrane structures. The N-terminus was intramembrane and the C-terminus was extramembrane. *GcaeOR10* had the closest genetic relationship with *GpylOR17* of *G. pyloalis*, followed by *CpinOR39* and *CpinOR36* of *Conogethes pinicolalis* and *CpunOR36* of *Conogethes punctiferalis*. The qPCR results revealed that the expression of *GcaeOR10* was the highest in the antennae of male adults, followed by in the abdomen. These results indicated that *GcaeOR10* was a typical odorant receptor, which might be related to the mechanism of sex pheromone recognition and participate in its behavior processes such as finding a spouse and mating.

Key words: *Glyphodes caesalis*; odorant receptor; bioinformatics analysis; tissue expression profiling

黄翅绢丝野螟 *Glyphodes caesalis* 属鳞翅目螟蛾科,又名黄翅绢野螟,是菠萝蜜、榴莲蜜和面包果等热带特色果树的重要害虫,广泛分布在我国的热带和亚热带地区,包括海南、广东、广西、福建和云南等省区(Kallekkattil et al., 2019a; 孟倩倩等, 2021)。该虫幼虫可钻蛀嫩枝、花苞及果实,蛀道内、外堆积的粪便易引起果蝇进入,使果实受害部位变褐腐烂,导致果实发育不良、脱落,严重时造成 50% 以上的减产(Mridha, 2006; 王政等, 2017)。在海南省,黄翅绢丝野螟全年都有发生,1年可发生 8 代,世代重叠且无明显越冬现象(王政等, 2020)。目前,黄翅绢丝野螟的防控主要依赖化学药剂,但由于该虫幼虫在蛀道中生活,蛀道外有粪便堵塞,药剂难以接触;其成虫期较短,昼伏夜出,白天潜伏于附近非寄主植物上,不易被发现(孟倩倩等, 2017; Kallekkattil et al., 2019b),很难掌握准确的防治时期,不仅防效不佳,而且造成药剂频用、滥用现象,易引起害虫抗药性增加和环境污染等问题,因此亟需开发新的防治技术。

嗅觉系统在昆虫种群繁衍和生存等生命活动中发挥着重要作用,昆虫主要通过嗅觉感受进行寄主定位、求偶、躲避天敌和选择产卵场所等行为(李秋霖等, 2020; Xing et al., 2021)。昆虫的嗅觉识别是一个极其复杂的过程,需要多种蛋白参与,其中气味受体(odorant receptor, OR)在嗅觉识别中发挥着核心作用(Chen et al., 2020; 吴伟伟等, 2020),其具有 2 个重要功能:一个是特异性地识别某种或某类气味分子;另一个是将化学信号转为电信号,然后向中枢神经传导,最终引起昆虫作出相应的行为活动(Leal, 2013; 刘宁灿等, 2014)。可见,OR 具有作为害虫防控新靶标的潜力(Venthur & Zhou, 2018)。近年来,随着基因组和转录组等测序技术的快速发展,已经对包括梨小食心虫 *Grapholita molesta*(Li et

al., 2015)、桃蛀螟 *Conogethes punctiferalis*(Jia et al., 2016)、小菜蛾 *Plutella xylostella*(Yang et al., 2017)、甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*(Du et al., 2018)、二点委夜蛾 *Athetis lepigone*(Zhang YN et al., 2019)、烟青虫 *Helicoverpa assulta*(Li et al., 2020)和松蛀螟 *Conogethes pinicolalis*(Jing et al., 2020)等多种鳞翅目昆虫的 OR 基因进行了鉴定。然而,目前在黄翅绢丝野螟嗅觉方面的研究较少,尚未见关于该虫 OR 的研究报道。

本课题组前期通过触角转录组测序并克隆验证获得黄翅绢丝野螟 *GcaeOR10* 基因序列(GenBank 登录号 MW701397),本研究通过生物信息学软件进一步分析该虫 *GcaeOR10* 基因的序列特征及其编码蛋白质的理化性质和结构特征,并利用实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, qPCR) 技术分析 *GcaeOR10* 基因在黄翅绢丝野螟雌雄成虫不同组织中的表达量,以期为解析该基因在黄翅绢丝野螟嗅觉感受中发挥的作用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试虫源和植物:黄翅绢丝野螟各龄幼虫和菠萝蜜叶片及鲜果采自中国热带农业科学院香料饮料研究所菠萝蜜种植园,幼虫于人工气候室内置于 21 cm×14 cm×8 cm 带纱网保鲜盒中以菠萝蜜嫩叶饲养,待羽化为成虫后,多头饲养于 30 cm×30 cm×30 cm 的尼龙纱笼中,喂食 10% 的蜂蜜水。向笼中放置菠萝蜜叶片或鲜果用于黄翅绢丝野螟产卵,收集卵粒,待孵化后挑出幼虫至干净的保鲜盒内,放入新鲜菠萝蜜叶片进行继代饲养,饲养 2 代后以成虫作为供试昆虫。饲养条件为温度(26±1)℃、相对湿度(75±5)%、光周期 14 L:10 D。

试剂及仪器:总 RNA Trizol 提取试剂盒,美国 Invitrogen 公司;Revert Aid Premium Reverse Transcriptase 反转录试剂盒、qPCR 荧光染料 TB Green™ Premix Ex Taq™ II,日本 TaKaRa 公司;其余试剂均为国产分析纯。JY600D 通用型电泳仪,北京君意东方电泳设备有限公司;H1 荧光酶标仪,美国 Biotek 公司;CFX96 实时荧光定量 PCR 仪,美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 黄翅绢丝野螟 *GcaeOR10* 的序列分析

根据本课题组前期触角转录组测序和克隆验证结果获得黄翅绢丝野螟 *GcaeOR10* 基因序列(GenBank 登录号 MW701397),通过 DNAMAN 9.0 软件对其核苷酸序列进行翻译,使用在线程序 EXPASY (<http://expasy.org/protparam/>) 预测 *GcaeOR10* 基因编码蛋白质的分子量、等电点及其他理化特性;使用 SignalP 5.0 Server 软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测该蛋白质的信号肽;使用 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 预测该蛋白质的保守结构域;使用 TMHMM 2.0 软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) 预测该蛋白质的跨膜区域;使用 Net Phos 3.1 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 预测该蛋白质序列可能的磷酸化位点;使用在线程序 PSIPRED 4.0(<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) 进行该蛋白质二级结构的预测。

1.2.2 黄翅绢丝野螟 *GcaeOR10* 的系统进化分析

通过 NCBI 中的 BLAST 程序对黄翅绢丝野螟 *GcaeOR10* 序列进行比对分析,选取一致性排名靠前的 20 条鳞翅目昆虫 OR 氨基酸序列进行系统进化树构建,使用 Clustalx 1.83 软件对各条氨基酸进行多序列比对,然后利用 MEGA X 软件以邻接法构建系统进化树,重复检验 1 000 次。

1.2.3 黄翅绢丝野螟 *GcaeOR10* 的表达谱检测

为明确黄翅绢丝野螟 *GcaeOR10* 基因的组织表达情况,采用 qPCR 技术检测其在雌雄成虫不同组织的表达情况。收集 2 日龄或 3 日龄的黄翅绢丝野螟雌雄成虫各 10 头的触角、头(去除触角)、胸、腹、足和翅 6 个不同组织样品,立即放入液氮中速冻,并于 -80 °C 保存备用。采用总 RNA Trizol 提取试剂盒分别提取上述各组织样品的总 RNA,利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性,并用荧光酶标仪测定总 RNA 的浓度和纯度,取 $OD_{260\text{nm}}/OD_{280\text{nm}}$ 比值在 1.8~2.2 之间的样品用于 cDNA 合成。每个样品取 1 μg 总 RNA,按照 Revert Aid Premium Reverse Transcriptase 反转录试剂盒说明书合成 cDNA 第一链,稀

5 倍后于 -20 °C 保存备用。

根据黄翅绢丝野螟 *GcaeOR10* 基因全长序列利用 Primer Premier 5.0 软件设计 qPCR 引物,以雌雄成虫触角、头、胸、腹、足和翅的 cDNA 为模板,利用 qPCR 引物 *GcaeOR10*-F (5'-TTGACGTTTCGTCGC-GAGTAT-3') 和 *GcaeOR10*-R (5'-CGTGATTTCTC-CAGCGTTGC-3') 检测 *GcaeOR10* 在以上组织中的表达情况,选择 *ACT* 为内参基因,扩增引物为 ACT-F (5'-ACAATGAACTCCGTGTCGCC-3')/ACT-R (5'-GTACATGGCGGGTGTGTTGA-3') (Wang et al., 2020),所有引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。20 μL 反应体系:cDNA 模板 1 μL 、TB Green™ Premix Ex Taq™ II 10 μL 、10 $\mu\text{mol/L}$ 上下游引物各 0.5 μL 、Nuclease-free H₂O 8 μL 。扩增程序:94 °C 预变性 3 min;94 °C 变性 30 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,共 35 个循环;72 °C 终延伸 10 min。之后从 60 °C 升高至 95 °C 进行熔解曲线分析,各处理均设 3 次生物学重复,每个样品设 3 次技术重复。以黄翅绢丝野螟雌成虫触角中 *GcaeOR10* 的表达量为基准,采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法(Livak & Schmittgen, 2001) 计算该基因在雌雄成虫不同组织中的相对表达量。

1.3 数据分析

利用 SPSS 20.0 软件对目的基因在不同组织中的表达水平进行单因素方差分析,应用 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 黄翅绢丝野螟 *GcaeOR10* 的序列分析

黄翅绢丝野螟 OR 基因 *GcaeOR10* 完整开放阅读框(open reading frame, ORF) 全长为 1 200 bp,编码 399 个氨基酸残基(图 1),预测该基因编码蛋白质的分子质量为 45.67 kD,等电点为 8.65,为碱性蛋白。在组成 *GcaeOR10* 蛋白质的 20 种氨基酸中,亮氨酸所占比例最高,为 11.0%;其次是异亮氨酸,所占比例为 9.0%;色氨酸所占比例最低,为 1.0%;带正、负电荷的氨基酸总数分别为 38 个和 33 个。*GcaeOR10* 蛋白质的不稳定系数、脂溶指数和总平均疏水性系数分别为 37.91、106.57 和 0.453,表明其属于稳定的疏水性蛋白。*GcaeOR10* 基因编码的蛋白质无信号肽,可能是非分泌蛋白,具有昆虫气味受体家族 7 个跨膜蛋白(7 transmembrane proteins, 7tm-6)超家族的保守结构域,位于 71~388 位氨基酸之间,*E* 值为 3.62×10^{-17} 。*GcaeOR10* 蛋白质具有 7 个跨膜结构域,分别位于第 43~65、75~92、125~147、183~205、266~288、293~315 和 373~395 位氨基酸之间,且 N 端位于

细胞膜内,C端位于细胞膜外。该蛋白质含有26个潜在的磷酸化位点,包括14个丝氨酸(位于第46、72、74、88、91、153、164、169、229、232、275、289、297和376位)、10个苏氨酸(位于第9、43、160、173、180、189、193、266、293和387位)和2个酪氨酸(位于第4和323位);该蛋白质二级结构中 α -螺旋占比为78.70%, β -折叠占比为1.50%,卷曲环占比为19.80%。

2.2 黄翅绢丝野螟 *GcaeOR10* 序列比对与系统发育分析

将黄翅绢丝野螟 *GcaeOR10* 的氨基酸序列与其他物种同源氨基酸序列进行比对,结果显示黄翅绢丝野螟 *GcaeOR10* 与桑螟 *Glyphodes pyloalis* Gpy-*IOR17* 的一致性最高,为88.22%;与松蛀螟 *Conogethes pinicolalis* CpinOR39 的一致性次之,为

79.70%;与烟草天蛾 *Manduca sexta* MsexOR29、马尾松毛虫 *Dendrolimus punctatus* DpunOR29 和松蛀螟 CpinOR36 的一致性相对较低,分别为69.17%、68.50%和68.41%(图2)。将黄翅绢丝野螟 *GcaeOR10* 与20条鳞翅目昆虫的OR氨基酸序列进行系统进化树构建,结果显示桑螟 GpyOR17、松蛀螟 CpinOR39、CpinOR36、桃蛀螟 *Conogethes punctiferalis* CpunOR36 和黄翅绢丝野螟 *GcaeOR10* 这5个螟蛾科昆虫的OR聚类在一个分支,其中黄翅绢丝野螟 *GcaeOR10* 与桑螟 GpyOR17 聚为紧密的一支,自展值为99,表明黄翅绢丝野螟 *GcaeOR10* 与桑螟 GpyOR17 的亲缘关系最近,与松蛀螟 CpinOR39、CpinOR36 和桃蛀螟 CpunOR36 的亲缘关系较近(图3)。

```

1 ATGAAAGAATTACGTAATTTTAAAAACCTACTGCGAAAAAATATTTTGTGGCATCTGGTGATTCTGGTTCGAA
1 M K N Y V I L K T Y C E K I F L V A S G D F W F E
76 GAAGTAAAAATAGGAGATGATAGCAGTTGGTTTATAACATTTATAGAGGAACCATATTTTCACTTTATGGGTTTC
26 E G K I G D D S S W F Y N I Y R G T I F S L Y G F
151 ATGACTATCCTGAAATAATGGCTGCCATATTTGGCATCTTCTGAGGATGAGAAAAGAGATTCCGTTTCACCTT
51 M T I L E I M A A I F G I F P E D E K R D S V S L
226 GCTGTAGCCATACTATAGTGATGTTGAAAATATTCTCTGTGATATCAAAACAAGAAGCTGGTGAGAACATTGAAT
76 A V S H T I V M L K I F S V I S N K K L V R T L N
301 TACAATATGGTAAAAATCTGCGAGGGACATGAAGATCCAGTGCTGATGGCAAAAAAGTACAGAAATAGTCAAGATA
101 Y N M V K I C E G H E D P V L M A K K Y R I V K I
376 AATATCTGGCGTATTTTATAACTGTGTATGGATCAGCTGCATGCTTTGTTTTCGAAGGCATAAGAAGTTGTAC
126 N I W A Y F I T V Y G S A A C F V F E G I R K L Y
451 GCGGTTTACATTTTGTACTATAGTAACATACTATCCCAGTTTGGAGATAATTCATCACAGCAACAGTATTT
151 A G S H F V T I V T Y Y P S F E D N S I T A T V F
526 AGAATGGCGATGACTGTATTATTGATGATGATGTTGATGACAATGATAGTACAGTATAGTTCGTTTACAAATGGTT
176 R I A M T V L L M M M L M T M I V T V D S F T M V
601 TACTTGATACTGTATAAATAATAAATTCATTGCATTAAGGCATTATTTGAAAGATTGGCGGAAGAATTTCAAGAG
201 Y L I L Y K Y K F I A L R H Y F E R L A E E F Q E
676 CTAACGATTGGGTAATTTCTAGACTGGCGCGCAAAATGACTAACGGTTTGTAGTGAAGGAATTTATATGCAT
266 L N D S G N S R L A A D K L T N G L V E G I I M H
751 AAGGAATTGATTAGGATGGCTAAGGATATCGACCAAGCGTTCGGCACAGTAATAGCACTGCAACTGTTCCAGAGC
251 K E L I R M A K D I D Q A F G T V I A L Q L F Q S
826 TCAGGTTACGCTGTGTCCTGCTCCTCCAAATCGCCCTCTCCGACCAGTTGACGTTTCGTCGCGAGTATGAAAATA
276 S G S A V S L L L Q I A L S D Q L T F V A S M K I
901 ATATTCTCGTAGTGGCGCTCTCTTTTATTGGGCTTATTCTGTGCAACGGCTGGAGAAATCACGTTATCAGGGC
301 I F F V V A L F F L L G L F L C N A G E I T Y Q A
976 TCACTATTAGCAGACGCCATATTTACTGCGGGTGGCATGCTTGCCACCGCGGCATCCACCACAGCGCGGCCCT
326 S L L A D A I F Y C G W H A C P P R H P P Q R D P
1 051 AGACGCTGGTACTACTGGCTGCATGCAAGCGCAGAGACCCCTCATCATGAAAGCCTTCAAGATGATCGAGCTG
351 R R L V L L A C M Q A Q R P L I M K A F K M I E L
1 126 TCTTACGGCACTTTTCTCCAGGATTTGAGAGGAACCTACTCCGTTATTTGCTTTGTTTTATGCACAAAATAAGTCGA
376 S Y G T F L Q V L R G T Y S V F A L F Y A Q N K *

```

方框所示为起始密码子;方框下加标*为终止密码子;红色下划线所示为7个跨膜区序列。

The box indicates the start codon; the box marked with * below is the stop codon, and the red underlined sequences indicate the seven transmembrane domains.

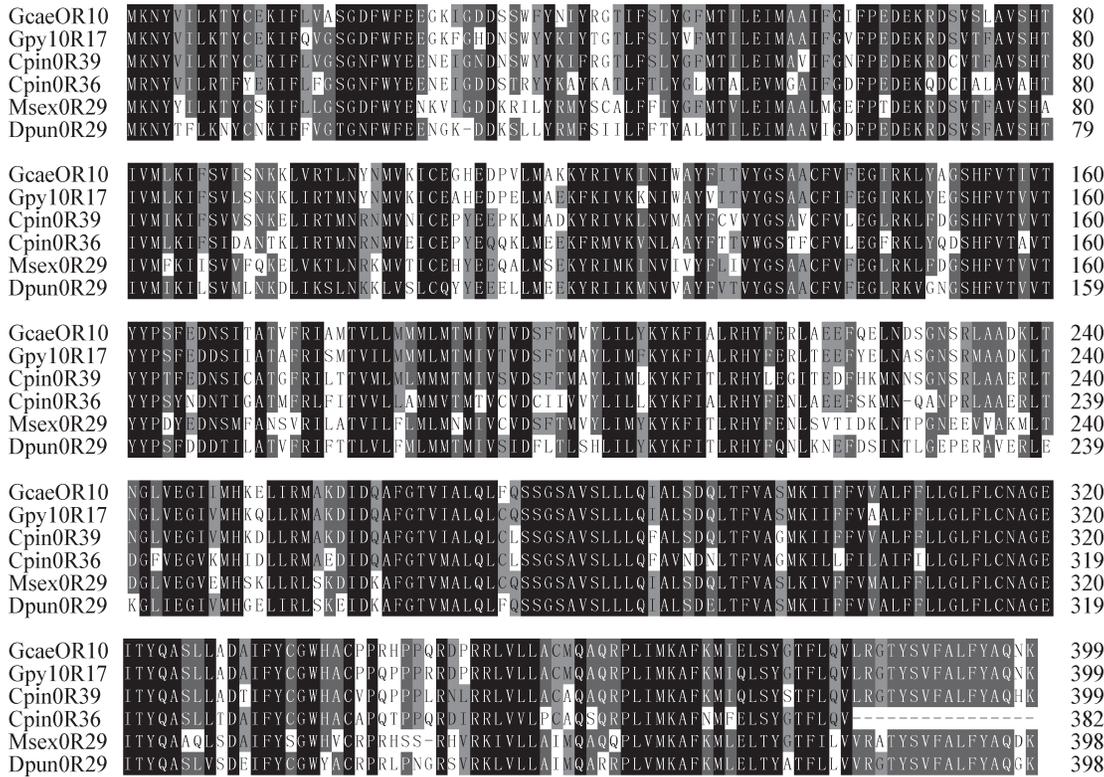
图1 黄翅绢丝野螟 *GcaeOR10* 的核苷酸序列及相应氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and amino acid sequences of *GcaeOR10* of *Glyphodes caesalis*

2.3 *GcaeOR10* 在黄翅绢丝野螟不同组织中的表达量

GcaeOR10 基因在黄翅绢丝野螟雌雄成虫各个组织中均有表达,其中在雄成虫触角中的相对表达量最高,显著高于在其他组织中的相对表达量,是其在雌成虫触角中相对表达量的26.24倍。*GcaeOR10* 基因在雄成虫腹部的相对表达量较高,仅次于雄成

虫触角中的相对表达量,并显著高于其余组织中的相对表达量,是其在雌成虫触角中相对表达量的3.01倍。*GcaeOR10* 基因在雌成虫触角、头、胸、腹、足、翅和雄成虫头、胸、足、翅中的相对表达量较低,且无显著差异,分别是其在雌成虫触角中相对表达量的33.33%~1.33倍(图4)。



黑色区域: 相似度为 100%; 深灰色区域: 80% ≤ 相似度 < 100%; 灰色区域: 60% ≤ 相似度 < 80%。GcaeOR10: 黄翅绢丝野螟 OR10(MW701397); Gpy1OR17: 桑螟 OR17(QIJ45795.1); CpinOR39: 松蛀螟 OR39(QEE82757.1); CpinOR36: 松蛀螟 OR36(QEE82754.1); MsexOR29: 烟草天蛾 OR29(CUQ99410.1); DpunOR29: 马尾松毛虫 OR29(ARO70241.1)。Dark areas: Similarity is 100%; dark gray areas: 80% ≤ similarity < 100%; gray areas: 60% ≤ similarity < 80%. GcaeOR10: OR10 of *Glyphodes caesalis* (MW701397); Gpy1OR17: OR17 of *G. pyloalis* (QIJ45795.1); CpinOR39: OR39 of *Conogethes pinicolalis* (QEE82757.1); CpinOR36: OR36 of *C. pinicolalis* (QEE82754.1); MsexOR29: OR29 of *Manduca sexta* (CUQ99410.1); DpunOR29: OR29 of *Dendrolimus punctatus* (ARO70241.1).

图 2 黄翅绢丝野螟 GcaeOR10 与其他昆虫气味受体的氨基酸序列比对

Fig. 2 Alignment of amino acid sequences of GcaeOR10 from *Glyphodes caesalis* and other insects ORs

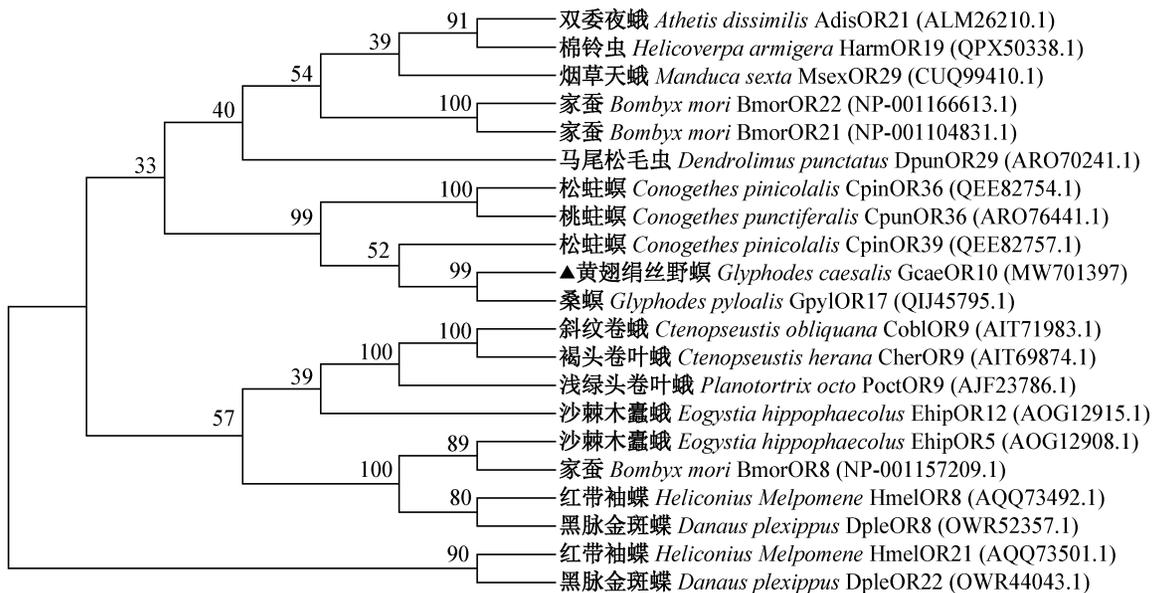


图 3 基于 OR 氨基酸序列以邻接法构建黄翅绢丝野螟 GcaeOR10 和其他鳞翅目昆虫气味受体的系统进化树
Fig. 3 Phylogenetic tree of GcaeOR10 of *Glyphodes caesalis* and other lepidopteran insect ORs constructed based on amino acid sequences of ORs using neighbor joining method

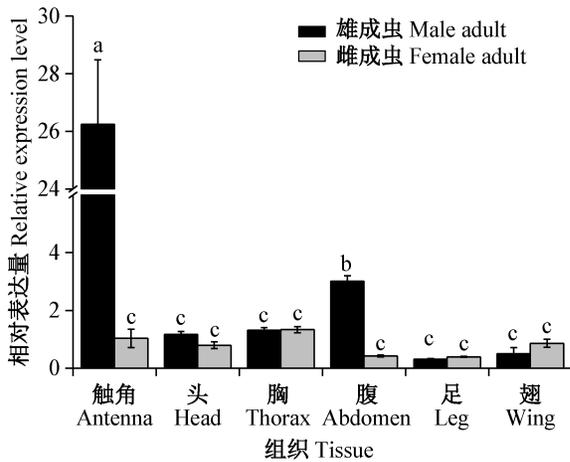


图4 *GcaeOR10*在黄翅绢丝野螟成虫各组织中的相对表达量

Fig. 4 Relative expression levels of *GcaeOR10* in different tissues of *Glyphodes caesalis* adults

图中数据为平均数±标准差。柱上不同小写字母表示经Duncan氏新复极差法检验差异显著($P < 0.05$)。Data in the figure are mean±SD. Different letters on the bars indicate significant difference by Duncan's new multiple range test ($P < 0.05$).

3 讨论

昆虫OR是一种疏水性膜蛋白,在嗅觉神经元树突膜上特异性表达,且含量非常低,一般由300~400个氨基酸组成,含有7个 α -螺旋的跨膜结构域,每个由19~26个氨基酸构成,第6和第7跨膜结构域的序列较为保守,形成3个胞外环(1个潜在的二硫键是由第1个和第2个胞外环上高度保守的半胱氨酸形成)和3个胞内环(有7个潜在的磷酸化位点),N端没有信号肽,但有1个保守的糖基化位点,昆虫OR不属于G蛋白偶联受体,其N端在细胞膜内,C端在细胞膜外,呈反向拓扑结构(Benton et al., 2006; 杜亚丽等, 2017; Fleischer et al., 2018)。黄翅绢丝野螟 *GcaeOR10* 基因ORF序列全长为1 200 bp,编码399个氨基酸残基,属于稳定的疏水性蛋白,无信号肽,含有7个跨膜结构域,且N端位于细胞膜内,C端位于细胞膜外,符合昆虫OR的典型特征。蛋白质磷酸化在信号转导、转录调控、细胞分裂和凋亡等的调控中起着重要作用(Seok, 2021),本研究预测到黄翅绢丝野螟 *GcaeOR10* 蛋白质序列含有26个潜在的磷酸化位点,这些位点的存在可能与嗅觉识别中的信号转导过程相关。

序列比对结果显示,黄翅绢丝野螟 *GcaeOR10* 与其他鳞翅目螟蛾科昆虫OR有较高的序列一致

性,与桑螟 *GpylOR17* 的一致性达88.22%,它们可能是直系同源基因。一般可以通过与同源基因进行系统发育分析来预测基因功能(Wang et al., 2021),如Liu et al. (2013)研究发现,不同功能的OR可以被聚集到不同的分支中,如具有相似功能的玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 性信息素受体聚集在一起(Liu et al., 2018);双委夜蛾 *Athetis dissimilis* 中4个功能不同的 *AdisOR1*、*AdisOR6*、*AdisOR11* 和 *AdisOR14* 分别聚集到4个大分支中(Liu et al., 2019)。本研究系统进化分析结果显示,桑螟 *GpylOR17*、松蛀螟 *CpinOR39*、*CpinOR36*、桃蛀螟 *CpunOR36* 和黄翅绢丝野螟 *GcaeOR10* 这5个螟蛾科的OR聚类在1个分支中,它们可能具有相似的功能。

昆虫的大多数OR主要在触角中表达,一般具有性别偏好性,有些则在触角和其他部位表达(Liu et al., 2014; 陈丽慧等, 2019)。OR的功能一般与其表达模式相呼应,通常认为在雌成虫触角中高表达的OR可能参与寻找寄主、产卵的行为过程,与识别寄主植物挥发物有关,如在棉铃虫齿唇姬蜂 *Camponotus chlorideae* 雌成虫触角中特异性表达的 *CchlOR62* 对挥发物顺-茉莉酮有反应(Sun et al., 2019);黏虫 *Mythimna separata* 雌成虫触角中高表达的 *MsepOR13* 可以识别多种植物挥发物组分(Zhang KP et al., 2019);在雌雄成虫触角中的表达量无显著差异的OR可能参与寄主定位等雌雄成虫共有的行为活动,如在斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 雌雄成虫触角中的表达量无显著差异的 *SlitOR12* 对寄主挥发物 β -紫罗兰酮有反应(Zhang et al., 2017);而在雄成虫触角中高表达的OR可能参与寻找配偶、交配的行为过程,与雄成虫感知性信息素有关,如在双委夜蛾雄成虫触角中特异性表达的 *AdisOR1* 对性信息素(顺)9-十四烯醇和(顺)9,(反)12-十四碳二烯醇有反应,而 *AdisOR14* 对(顺)9,(反)12-十四碳二烯醇有反应(Liu et al., 2019);在绿盲蝽 *Apolygus lucorum* 雄成虫触角中高表达的 *AlucOR4* 可识别主要性信息素丁酸己酯和(反)2-己烯基丁酸酯(An et al., 2020)。本研究结果表明,黄翅绢丝野螟 *GcaeOR10* 在雄成虫触角中显著高表达,推测其主要参与黄翅绢丝野螟对性信息素的识别。

本研究对黄翅绢丝野螟 *GcaeOR10* 基因进行了鉴定和分析,并检测了其在不同组织中的表达情况,该基因编码蛋白质具有OR的典型特征,推测其主要参与黄翅绢丝野螟对性信息素的识别,可为该虫嗅觉分子机制和其他OR的研究提供参考依据。目

前对于 *GcaeOR10* 的研究结果尚不能阐释其具体执行的功能, 还需通过基因沉默或过表达、电生理和行为学研究等进行验证。

参 考 文 献 (References)

- An X, Khashaveh A, Liu DF, Xiao Y, Wang Q, Wang SN, Geng T, Gu SH, Zhang YJ. 2020. Functional characterization of one sex pheromone receptor (AlucOR4) in *Apolygus lucorum* (Meyer-Dür). *Journal of Insect Physiology*, 120: 103986
- Benton R, Sachse S, Michnick SW, Vosshall LB. 2006. Atypical membrane topology and heteromeric function of *Drosophila* odorant receptors *in vivo*. *PLoS Biology*, 4(2): e20
- Chen LH, Li MM, Chen XL, Wu JX, Xu XL. 2019. Cloning and expression profiling of general odorant receptor gene *GmolOR20* in the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae). *Acta Entomologica Sinica*, 62(4): 418–427 (in Chinese) [陈丽慧, 李梅梅, 陈秀琳, 仵均祥, 许向利. 2019. 梨小食心虫普通气味受体基因 *GmolOR20* 的克隆及表达分析. *昆虫学报*, 62(4): 418–427]
- Chen LH, Tian K, Wang GR, Xu XL, He KH, Liu W, Wu JX. 2020. The general odorant receptor *GmolOR9* from *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) is mainly tuned to eight host-plant volatiles. *Insect Science*, 27(6): 1233–1243
- Du LX, Liu Y, Zhang J, Gao XW, Wang B, Wang GR. 2018. Identification and characterization of chemosensory genes in the antennal transcriptome of *Spodoptera exigua*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics & Proteomics*, 27: 54–65
- Du YL, Wang SJ, Zhao HT, Pan JF, Yang S, Guo LN, Xu K, Jiang YS. 2017. Cloning and temporal-spatial expression profiling of the odorant receptor gene *AcerOR113* in the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana*. *Acta Entomologica Sinica*, 60(5): 533–543 (in Chinese) [杜亚丽, 王树杰, 赵慧婷, 潘建芳, 杨爽, 郭丽娜, 徐凯, 姜玉锁. 2017. 中华蜜蜂气味受体基因 *AcerOR113* 的克隆与时空表达分析. *昆虫学报*, 60(5): 533–543]
- Fleischer J, Pregitzer P, Breer H, Krieger J. 2018. Access to the odor world: olfactory receptors and their role for signal transduction in insects. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(3): 485–508
- Jia XJ, Wang HX, Yan ZG, Zhang MZ, Wei CH, Qin XC, Ji WR, Falabella P, Du YL. 2016. Antennal transcriptome and differential expression of olfactory genes in the yellow peach moth, *Conogethes punctiferalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Scientific Reports*, 6: 29067
- Jing DP, Zhang TT, Bai SX, He KL, Sivaprasath P, Luan JB, Wang ZY. 2020. Sexual-biased gene expression of olfactory-related genes in the antennae of *Conogethes pinicolalis* (Lepidoptera: Crambidae). *BMC Genomics*, 21(1): 244
- Kallekkattil S, Krishnamoorthy A, Shreevihar S, Venkatesha MG. 2019a. First report of a hymenopteran parasitoid complex on jackfruit shoot and fruit borer *Diaphania caesalis* (Lepidoptera: Crambidae) from India. *Biocontrol Science and Technology*, 29(11): 1037–1052
- Kallekkattil S, Krishnamoorthy A, Venkatesha MG. 2019b. Biology and seasonal incidence of the jack shoot and fruit borer, *Diaphania caesalis* (Walker) (Lepidoptera: Crambidae). *International Journal of Tropical Insect Science*, 39(3): 235–241
- Leal WS. 2013. Odorant reception in insects: roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes. *Annual Review of Entomology*, 58: 373–391
- Li GW, Du J, Li YP, Wu JX. 2015. Identification of putative olfactory genes from the oriental fruit moth *Grapholita molesta* via an antennal transcriptome analysis. *PLoS ONE*, 10(11): e0142193
- Li QL, Zhao JL, Tian JH, Wang YX, Zhang JP, Yang SY. 2020. Gene cloning, bioinformatic analysis and tissue-specific expression of the atypical odorant receptor in *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae). *Journal of Plant Protection*, 47(6): 1219–1227 (in Chinese) [李秋霖, 赵吉兰, 田嘉慧, 王源秀, 张金平, 杨世勇. 2020. 茶翅蝽非典型气味受体基因的克隆及其生物信息学特征和组织特异性表达分析. *植物保护学报*, 47(6): 1219–1227]
- Li RT, Huang LQ, Dong JF, Wang CZ. 2020. A moth odorant receptor highly expressed in the ovipositor is involved in detecting host-plant volatiles. *eLife*, 9: e53706
- Liu CC, Liu Y, Guo MB, Cao DP, Dong SL, Wang GR. 2014. Narrow tuning of an odorant receptor to plant volatiles in *Spodoptera exigua* (Hübner). *Insect Molecular Biology*, 23(4): 487–496
- Liu NC, Zhang J, Wang GR, Liu Y, Yan SC. 2014. Cloning and tissue expression analysis of general odorant receptor genes *HarmOR9* and *HarmOR29* in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomologica Sinica*, 57(5): 522–529 (in Chinese) [刘宁灿, 张进, 王桂荣, 刘杨, 严善春. 2014. 棉铃虫普通气味受体基因 *HarmOR9* 和 *HarmOR29* 的克隆和组织表达分析. *昆虫学报*, 57(5): 522–529]
- Liu S, Zhang YR, Zhou WW, Liang QM, Yuan X, Cheng JA, Zhu ZR, Gong ZJ. 2013. Identification and characterization of two sensory neuron membrane proteins from *Cnaphalocrocis medinalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 82(1): 29–42
- Liu W, Jiang XC, Cao S, Yang B, Wang GR. 2018. Functional studies of sex pheromone receptors in Asian corn borer *Ostrinia furnacalis*. *Frontiers in Physiology*, 9: 591
- Liu XL, Sun SJ, Khuhro SA, Elzaki MEA, Yan Q, Dong SL. 2019. Functional characterization of pheromone receptors in the moth *Athetis dissimilis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 158: 69–76
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4): 402–408
- Meng QQ, Sun SW, Wang Z, Gao SF, Gou YF, Liu AQ. 2021. Selection of reference genes for qPCR in *Diaphania caesalis* under temperature and pesticide stress. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 42(1): 188–197 (in Chinese) [孟倩倩, 孙世伟, 王政, 高圣风, 苟亚峰, 刘爱勤. 2021. 温度和药剂胁迫下黄翅绢野螟实时荧光定量PCR内参基因筛选. *热带作物学报*, 42(1): 188–

- 197]
- Meng QQ, Wang Z, Tan LH, Sang LW, Wu G, Sun SW, Liu AQ. 2017. Observation of antenna sensilla of *Diaphania caesalis* Walker with scanning electron microscope. Chinese Journal of Tropical Crops, 38(7): 1323-1327 (in Chinese) [孟倩倩, 王政, 谭乐和, 桑利伟, 吴刚, 孙世伟, 刘爱勤. 2017. 黄翅绢丝野螟触角感器的扫描电镜观察. 热带作物学报, 38(7): 1323-1327]
- Mridha SH. 2006. Biology, pest status and management jackfruit borer, *Diaphania caesalis* Walker. Master thesis. Dhaka: Sher-e-Bangla Agricultural University
- Seok SH. 2021. Structural insights into protein regulation by phosphorylation and substrate recognition of protein kinases/phosphatases. Life, 11(9): 957
- Sun YL, Dong JF, Ning C, Ding PP, Huang LQ, Sun JG, Wang CZ. 2019. An odorant receptor mediates the attractiveness of *cis*-jasmone to *Campoletis chloridae*, the endoparasitoid of *Helicoverpa armigera*. Insect Molecular Biology, 28(1): 23-34
- Venthur H, Zhou JJ. 2018. Odorant receptors and odorant-binding proteins as insect pest control targets: a comparative analysis. Frontiers in Physiology, 9: 1163
- Wang Q, Xiao Y, An XK, Shan S, Adel K, Gu SH, Zhang YH, Zhang YJ. 2021. Functional characterization of a candidate sex pheromone receptor AlinOR33 involved in the chemoreception of *Adelphocoris lineolatus*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 69(24): 6769-6778
- Wang Z, Meng QQ, Tan LH, Sang LW, Sun SW, Liu AQ. 2017. Sex determination of pupae and adults of *Diaphania caesalis* (Walker). Journal of Environmental Entomology, 39(5): 1185-1190 (in Chinese) [王政, 孟倩倩, 谭乐和, 桑利伟, 孙世伟, 刘爱勤. 2017. 黄翅绢丝野螟蛹和成虫雌雄形态的快速鉴定. 环境昆虫学报, 39(5): 1185-1190]
- Wang Z, Meng QQ, Zhu X, Sun SW, Liu AQ, Gao SF, Gou YF. 2020. Identification and evaluation of reference genes for normalization of gene expression in developmental stages, sexes, and tissues of *Diaphania caesalis* (Lepidoptera, Pyralidae). Journal of Insect Science, 20(1): 6
- Wang Z, Zhang SH, Yang CJ, Meng QQ, Sun SW, Gao SF, Liu AQ, Yang J. 2020. Biological characteristics and field population dynamics of the jackfruit borer, *Diaphania caesalis* (Lepidoptera: Pyralidae). Acta Entomologica Sinica, 63(1): 63-72 (in Chinese) [王政, 张绍华, 杨陈军, 孟倩倩, 孙世伟, 高圣风, 刘爱勤, 杨婧. 2020. 黄翅绢丝野螟生物学特性及田间种群动态. 昆虫学报, 63(1): 63-72]
- Wu WW, Qiao HL, Hao EH, Gao CY, Shi J, Lu PF. 2020. Identification and expression patterns of olfactory receptor co-receptor *SnocOrco* in *Sirex noctilio* (Hymenoptera: Siricidae), an invasive insect pest. Journal of Plant Protection, 47(5): 1088-1098 (in Chinese) [吴伟伟, 乔海莉, 郝恩华, 高慈元, 石娟, 陆鹏飞. 2020. 入侵害虫松树蜂嗅觉共受体 *SnocOrco* 基因的鉴定及其表达模式分析. 植物保护学报, 47(5): 1088-1098]
- Xing Y, Thanasirungkul W, Adeel MM, Yu J, Aslam A, Chi DF. 2021. Identification and analysis of olfactory genes in *Dioryctria abietella* based on the antennal transcriptome. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics Proteomics, 38: 100814
- Yang SY, Cao DP, Wang GR, Liu Y. 2017. Identification of genes involved in chemoreception in *Plutella xylostella* by antennal transcriptome analysis. Scientific Reports, 7(1): 11941
- Zhang KP, Feng YL, Du LX, Gao SS, Yan H, Li K, Liu NN, Wu JX, Wang GR. 2019. Functional analysis of MsepOR13 in the oriental armyworm *Mythimna separata* (Walker). Frontiers in Physiology, 10: 367
- Zhang QH, Wu ZN, Zhou JJ, Du YJ. 2017. Molecular and functional characterization of a candidate sex pheromone receptor OR1 in *Spodoptera litura*. Insect Science, 24(4): 543-558
- Zhang YN, Du LX, Xu JW, Wang B, Zhang XQ, Yan Q, Wang GR. 2019. Functional characterization of four sex pheromone receptors in the newly discovered maize pest *Athetis lepigone*. Journal of Insect Physiology, 113: 59-66

(责任编辑:李美娟)