# 柑橘木虱速激肽相关肽基因 Dc-TRP 克隆及表达分析<sup>\*</sup>

宾淑英<sup>\*\*</sup> 康 聪 莫斯维 舒本水 吴仲真 林进添<sup>\*\*\*</sup> (仲恺农业工程学院,广州 510225)

**摘 要 【目的】**昆虫速激肽相关肽 (Tachykinin-related peptides, TRPs)属于肽类神经递质,参与调控 昆虫生长、发育、变态、繁殖等多种生命活动。本文旨在探究柑橘木虱 *Diaphorina citri* 速激肽相关肽 (*Dc-TRP*)基因序列信息,进一步分析其在不同发育时期及成虫不同组织中的表达情况。**【方法】**本文 克隆得到柑橘木虱速激肽相关肽全长序列,并根据核苷酸系列进行系列分析及结构预测。利用 RT-qPCR 对柑橘木虱不同发育时期及成虫不同组织部位 *Dc-TRP* 的表达情况进行分析。**【结果】**(1)*Dc-TRP* 编码 区全长 600 bp,预测编码 199 个氨基酸,具有多个保守区域。(2)时空表达结果表明 *Dc-TRP* 在各发育时 期和组织均有表达,其中各发育历期表达差异不明显,而组织中表达差异显著且头部表达最高。**【结论】** *Dc-TRP* 在柑橘木虱不同发育时期表达无显著性差异,但在成虫不同组织中差异显著。以上实验结果具有 一定的生物学意义,为进一步研究 *Dc-TRP* 的生理功能提供一定的理论基础。

关键词 柑橘木虱, Dc-TRP, 基因克隆, 荧光定量 PCR

# Cloning and expression of a Tachykinin-related peptide in *Diaphorina citri*

BIN Shu-Ying<sup>\*\*</sup> KANG Cong MO Si-Wei SHU Ben-Shui WU Zhong-Zhen LIN Jin-Tian<sup>\*\*\*</sup>

(Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China)

**Abstract [Objectives]** Tachykinin-related peptides (TRPs) are peptide neurotransmitters involved in multiple life processes. We investigated the sequence information of a tachykinin-related peptide, *Dc-TRP*, in *Diaphorina citri* Kuwayama, and further analyzed the mRNA expression levels of *Dc-TRP* in different developmental stages and adult tissues. **[Methods]** The full-length sequence of *Dc-TRP* was cloned from *D. citri*, and serial analysis and structure prediction were performed based on its nucleotide sequence. In addition, RT-qPCR was used to analyze the expression of *Dc-TRP* in different development stages and adult tissues. **[Results]** (1) The full-length of the *Dc-TRP* coding sequence obtained was 600 bp and is predicted to encode 199 amino acids with a variety of conserved regions. (2) *Dc-TRP* was expressed in all developmental stages, expression was significantly higher in the head than in other adult tissues. **[Conclusion]** *Dc-TRP* was not differentially expressed in different developmental stages of *D. citri* but its expression was significantly higher in head than in other adult tissues. **[Conclusion]** *Dc-TRP* was not differentially expressed in different developmental stages of *D. citri* but its expression was significantly higher in head than in other adult tissues. **[Conclusion]** *Dc-TRP* was not differentially expressed in different developmental stages of *D. citri* but its expression was significantly higher in head than in other adult tissues. **[Conclusion]** *Dc-TRP* was not differentially expressed in different developmental stages of *D. citri* but its expression was significantly higher in head than in other adult tissues. Our results provide a basis for further study of the physiological functions of *Dc-TRP*.

Key words Diaphorina citri Kuwayama, Dc-TRP, gene cloning, RT-qPCR

<sup>\*</sup>资助项目 Supported projects:产学研协同创新重大科研专项(201704020199);广州市民生科技攻关计划(201803020009);广州 市科技计划项目(C1630551000041)和广州市亚热带果树重大疫情控制重点实验室项目(201805010008)

<sup>\*\*</sup>第一作者 First author, E-mail: binsuying@163.com

<sup>\*\*\*</sup>通讯作者 Corresponding author, E-mail: linjtian@163.com

收稿日期 Received: 2018-05-10, 接受日期 Accepted: 2018-07-23

柑橘木虱 Diaphorina citri Kuwayama 属半翅 目 Hemiptera 木虱科 Psyllidae 昆虫, 广泛分布于 世界各地,主要危害柑橘、九里香等近20种芸 香科植物(López-Collado et al., 2013; Shimwela et al., 2016)。该虫通过刺吸式口器吸取植物嫩 梢及嫩芽汁液,造成植物萎蔫、枯死或影响植物 生长发育(Teck et al., 2011; Alves et al., 2014)。 同时柑橘木虱是柑橘毁灭性病害-柑橘黄龙病 (Citrus Huanglongbing)的主要传播媒介,严重 制约着我国乃至世界柑橘产业的发展(Lee et al., 2015)。目前柑橘木虱防治主要以化学防 治为主,常用的化学农药包括吡虫啉、高效氯氰 菊酯等。但长期使用化学农药导致柑橘木虱对多 种化学农药产生严重的抗药性(Kanga et al., 2016),同时农药在柑橘果实上的残留危害人类 健康。因此,寻找新的农药靶标并设计开发新型 柑橘木虱防控药剂已成为目前柑橘木虱防控及 抗性治理的新思路。

神经肽属于多肽类生物活性物质,主要由神 经系统合成,参与调控生命体的发育、行为、繁 殖和取食等诸多生理过程(李向梅等,2012; Al-Alkawi et al., 2016)。 速激肽 Tachykinin 是普 遍存在于无脊椎动物和哺乳动物等多种生物的 一大类多功能神经肽 ,主要分布于中枢神经系统 和胃肠道(Nässel, 1999)。在无脊椎动物中速 激肽家族基因根据蛋白结构可分为两大类:一类 是包含类似于脊椎动物速激肽C末端FXGLa(a 代表 C 末端酰胺化)保守结构域的无脊椎动物 速激肽 ;另一类则是包含 C 末端 FXG/AXRa (第 3 位氨基酸残基长为甘氨酸 Gly) 模块的速激肽 相关肽 (Nagai-Okatani et al., 2016)。速激肽相 关肽一般以神经递质和神经调节剂的形式存在, 在外周组织作为自分泌 ,旁分泌和内分泌调节因 子进行表达 (Satake et al., 2013; Haddad et al., 2018)

昆虫 TRPs 最初作为肌肉营养肽在东亚飞蝗 Locusta migratoria 中枢神经系统中得到鉴定,根 据结构又分为 5 种不同的亚型,之后陆续在其他 昆虫物种中发现新的亚型(Schoofs et al., 1990)。

昆虫 TRPs 同样广泛分布于中枢神经系统和肠道 组织。此外在埃及伊蚊 Aedes aegypti 中发现一种 TRPs sialokinins 只存在于唾液腺中(Champagne and Ribeiro, 1994; Zhao et al., 2017)。昆虫 TRPs 作为脊椎动物速激肽直系同源物参与调控昆虫 肌肉收缩、嗅觉、行为、激素调控、重要物质代 谢等不同生理过程 (Gui et al., 2017)。作为肌 肉营养肽,昆虫TRPs刺激昆虫组织的肌肉收缩。 在东亚飞蝗 L. migratoria 及蟑螂 Leucophae maderae 中 TRPs 被证实参与刺激后肠肌肉收缩 (Winther et al., 1998; Kwok et al., 1999)。而 东亚飞蝗 TRPs 同样能够刺激输卵管收缩增加, 且二者呈剂量依赖关系 ( Nässel *et al.*, 1995 )。 昆虫 TRPs 的另一大功能是调控昆虫的嗅觉感 知。通过 RNAi 技术干扰黑腹果蝇 Drosophila melanogaster Dm-TRP 的表达会导致其对气味的 敏感性降低,从而导致昆虫的行为发生改变 (Winther et al., 2006)。 桔小实蝇 Bactrocera dorsalis 中利用 dsRNA 对 Bd-TRP 进行干扰后会 导致其对乙酸乙酯的触角电生理反应及敏感性 显著降低 (Gui et al., 2017)。此外美洲大蠊 Periplaneta americana 和果蝇 D. melanogaster 养 分能够上调中肠内分泌细胞分泌 TRPs,进而调 控肠道淀粉酶、蛋白酶和脂肪酶等消化酶活性及 脂质代谢 (Song et al., 2014; Mikani, 2016)。 综上可知, TRPs 在昆虫生长发育等生命过程中 具有重要作用,而进一步深入探究昆虫 TRPs 基 因信息和功能可为以其作为农药作用新靶标提 供理论基础。

本论文以柑橘木虱为研究对象,从转录组数 据中挖掘出速激肽相关肽基因 Dc-TRP 序列。利 用 PCR 技术对 Dc-TRP 进行克隆并送测序验证, 采用多种生物信息学软件对 Dc-TRP 结构及功能 进行预测分析。同时利用荧光定量 PCR 技术对 柑橘木虱不同发育时期及成虫各个组织中 Dc-TRP 表达情况进行分析,推测 Dc-TRP 在柑橘木 虱生长发育过程中的作用,为进一步深入研究速 激肽相关肽基因功能及设计以 Dc-TRP 为靶标的 新型柑橘木虱防控药剂提供一定的理论依据。

# 1 材料与方法

#### 1.1 材料

1.1.1 供试昆虫 柑橘木虱由仲恺农业工程学院广东省生物入侵预警与控制工程技术研究中心人工培养,寄主植物采用九里香。室内饲养条件为:(26±1),相对湿度为75%,光周期为12L:12 D。

**1.1.2** 试剂 RNA 提取试剂盒 RNeasy Plus Micro Kit 试剂盒购于 QIAGEN 公司, 克隆载体 pMD 19-T vector, DNA 聚合酶 *LA* Taq, 反转录试 剂盒 PrimeScript<sup>TM</sup> II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 以及定量反转录试剂盒 PrimeScript<sup>TM</sup> RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)均购于 TAKARA 公司, DH5α 购于北京 天根科技有限公司; LighCycler®480 SYBR Green I为 Roche 公司产品。

# 1.2 样品收集

根据柑橘木虱不同发育时期挑选一定数量 的 1-5 龄若虫及雌雄成虫置于 1.5 mL 离心管中, 液氮冻存。组织取样步骤如下:低温麻醉处理柑 橘木虱后利用解剖针和解剖镜对木虱头部,胸部 (不去翅),腹部(含有内脏),肠道组织4个部 位进行解剖,雌雄头部各 75 个,雌雄胸部各 25 个,雌雄腹部各 25 个,雌雄肠道组织各 125 个, 每个样品 3 次重复,一边解剖一边放于装有液氮 的 1.5 mL 离心管,液氮冻存至 RNA 提取。

# 1.3 柑橘木虱 RNA 提取及反转录

根据 RNeasy Plus Micro Kit 试剂盒说明书进 行柑橘木虱样品总 RNA 提取,样品总 RNA 采 用 1.5%的琼脂糖凝胶检测其完整性,微量紫外 分光光度计(Nanodrop-100)检测其浓度。按照 反转录试剂盒 PrimeScript<sup>™</sup> II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 操作说明,以Oligo (dT)引物合 成第一链 cDNA,根据 PrimeScript<sup>™</sup> RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)说明 书合成定量 cDNA 模板。上述步骤合成的 cDNA - 20 保存以备后续基因克隆及 RT-qPCR 实验 使用。

# 1.4 Dc-TRP 基因克隆及序列分析

1.4.1 引物设计及合成 通过柑橘木虱转录组 数据,本研究鉴定得到一个 *Dc-TRP* 基因全长序 列。根据基因序列设计一对特异引物 *Dc-TRP*-F 和 *Dc-TRP*-R 对 *Dc-TRP* 编码区进行克隆。同时 根据 *Dc-TRP* 及 *Dc-Actin*1 序列设计定量引物, 分别命名为 q*Dc-TRP*-F/q*Dc-TRP*-R 和 q*Dc-Act*1-F/q*Dc-Act*1-R 进行 *Dc-TRP* 表达量定量分析。所 有引物均由上海生物工程公司合成。

表 1 本研究使用的引物 Table 1 The primers used in this study

引物名称 Primer	引物序列 Primer sequence
Dc-TRP-F	ATGAACTTCCTGTGGTTGG
Dc-TRP-R	TCAGTTGTCTGCCGAGTG
q <i>Dc-TRP-</i> F	TGAACTTCCTGTGGTTGGGA
qDc-TRP-R	GCGCTCGTTTGGATTCGTAG
q <i>Dc-Act1-</i> F	TGTGACGAAGAAGTTGCTGC
qDc-Act1-R	TGGGGTATTTCAGGGTCAGG

1.4.2 PCR 扩增、电泳检测及测序 以柑橘木 虱第一链 cDNA 为模板进行 Dc-TRP 基因编码区 克隆。反应体系如下: 10×LA Taq 聚合酶反应缓 冲液 (含 Mg<sup>2+</sup>) 5 μL, Dc-TRP-F 和 Dc-TRP-R 1 µL, dNTP (2.5 mmol/L) 2 µL, cDNA 模板 1 µL, LA Taq DNA 聚合酶 0.5 µL, 加 ddH2O 补 足 50 µL ,震荡混匀 ,简短离心后进行 PCR 反应。 反应程序为:94 变性 3 min;94 30 s ,56 30 s , 72 45 s 30 个循环;最后 72 10 min ; ∞。PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检 16 测。对疑是目的条带进行胶回收后与克隆载体 pMD 19-T 连接。连接产物转化至大肠杆菌 DH5a, 氨苄青霉素筛选后挑选阳性克隆子进行 扩大培养并送上海生物工程公司进行测序。 1.4.3 序列分析及结构预测 利用 DNAman6

推导基因编码蛋白质的氨基酸序列、相对分子量 等理化性质。采用在线软件 SignalP 4.1 Server (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)对柑橘 木虱 TRP 信号肽进行预测。利用 BlastP (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)进行氨 基酸同源性分析,查找并下载已知的其他物种速 激肽相关肽同源序列。利用在线软件 Multiple sequence alignment by florence corpet (http:// multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html) 对选取的部分昆虫 TRPs 进行多重序列比对,分 析昆虫 TRPs 氨基酸结构的保守区域。采用软件 MEGA6 中 ClustalW 对 TRPs 氨基酸序列进行比 对,然后利用最大似然法中 Botstrap 方法及 Poisson 模型进行1000次重复构建系统发育树, 所有参数设置为默认,所构建的进化树采用 MEGA6进行编辑和可视化。

#### 1.5 Dc-TRP 基因时空表达分析

以 PrimeScript<sup>™</sup> RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect real time) 对柑橘木虱不同发育 时期及成虫不同组织总 RNA 进行定量反转录。 以合成的 cDNA 为模板进行 *Dc-TRP* 基因时空表 达分析。反应体系为 LighCycler®480 SYBR Green I 10 µL, q*Dc-TRP*-F/q*Dc-TRP*-R 和 q*Dc*-*Act1*-F/q*Dc-Act1*-R 各 0.8 µL, cDNA 1 µL, 加 ddH<sub>2</sub>O 补足 20 μL,震荡混匀,简短离心后进行
RT-qPCR 反应。反应条件为:95 变性 3 min;
95 10 s,60 10 s,72 10 s 45 个循环;
最后熔解曲线步骤为 95 5 s,65 1 min,
40 30 s。采用 2<sup>-ΔΔCt</sup>法对 *Dc-TRP* 基因时空表
达情况进行分析。

#### 1.6 数据统计及分析

本文采用 SPSS 软件单因素 ANOVA 及 Duncan's 多重检验法(DMRT 法)进行差异显 著性分析(P<0.05)。

# 2 结果与分析

#### 2.1 Dc-TRP 基因克隆及序列分析

根据柑橘木虱转录组数据信息,本实验成功 鉴定得到 *Dc-TRP* 基因全长序列。结果表明 *Dc-TRP* 全长2 244 bp,对编码区特异引物扩增 得到的 PCR 产物进行测序发现其序列与预测的 编码区序列基本一致,长度为 600 bp,预测编码 199 个氨基酸。SignalP 4.1 Server 分析结果预测 第 1-20 位氨基酸为蛋白的信号肽区域(图1)。

	×	2	-	2				-		-			-					5		
121	GAC	TTT	GAC	TAC	GAC	TCA	GGT	TTC	TAT	TAT	GAC	AAG	CGA	GTG	ccc	ATG	GGA	TTT	GCA	.GGT
41	D	F	D	Y	D	s	G	F	Y	Y	D	K	R	v	Ρ	М	G	F	A	G
181	1 GTAAGAGGAAAGAAGTTATCGGATGACTATTCTTCATTCTACGAATCCAAACGAGCGCCT																			
61	v	R	G	K	K	L	S	D	D	Y	s	S	F	Y	E	S	K	R	Α	Ρ
241	TCI	CGG	AGC	TTC	TTC	GCT	GTC	AAA	.GGG	AAG	CGG	GAA	CTG	CIC	ACG	CCA	GAC	TTG	TCC	AGT
81	S	R	S	F	F	A	v	K	G	K	R	Ε	L	L	Т	Ρ	D	L	S	S
301	CIC	CTG	GAT	GAC	ATT	CAA	GTC	CCG	GAC	ATG	GAC	AAG	CGG	GCC	CCG	GCC	AGA	TTT	TTC	GGC
101	L	L	D	D	I	Q	v	Ρ	D	М	D	K	R	A	Ρ	A	R	F	F	G
361	ATG	CGG	GGC	AAG	מממ	GGC	CCG	TCG	TCG	CAG	AGC	ттс	ттт	GGT	ATG	CGG	GGC	AAG	AAG	GAT
121	М	R	G	K	K	G	P	S	S	Q	S	F	F	G	М	R	G	K	K	D
421	тас	сът	стс	GVP	ccs	тас	тсс	тат	тст	7C7	GCG		тас	тсс	сат	сът	·~~T	тсъ	~22	стт
141	Y	D	L	E	.000	Y	W	Y	S	R	A	G	Y	S	D	D	L	S	Q	L
401	<b></b>							~~~		~~~			~~~	~~~			<b>~ * *</b>		<b>T</b> (7)	<b>C T</b>
481	L	N	UD.	L	AAC	A.	P.J.J.	D	ACA T	P	ACI T	G	R	A A	K	RUGA	D	V	S	D
							-	-	-	-	-	-					-		-	-
541	ATG	CTT	ACG	GCT	TAA	TCT	CIC	GGC	CTG	TCT	TCG	CCT	TCA	CAG	CAC	TCG	GCA	GAC	AAC	TGA
181	М	L	Т	Α	Ν	S	L	G	L	s	S	Ρ	s	Q	H	S	Α	D	N	*
	L.	ছা 1	,	<b>)</b> _ /	трі	D 丿	Ē	伯を	1 IV	(中)	FII T	<b>なせ</b>	<del>7.1</del> 1	<del></del>	5复	甘雨	於弓	카기		
	Ľ	1 I	1	<i>i</i> c- <i>i</i>		至		=1HJ 14	-10-	ידו	フリン	×Я	V.1 /	<u>-7</u> 🖞	っろし	ب <del>ح</del> ة	収门	וילי		
Fig. 1	Tł	1e (	)RI	F re	gio	n o	f D	c-T	RP	ano	d th	le d	edu	ice	d ai	min	lo a	cid	seq	uence

DNAman6 分析结果预测 Dc-TRP 蛋白前体分子 量为 22.278 ku,等电点为 9.333。比较 15 种昆 虫 TRP 氨基酸序列发现柑橘木虱速激肽前体中 4 个成熟的速激肽均含有保守的五肽核心结构, 分别为 PNAFAAMR (位于第 29-37 位氨基酸) VPMGFAGVR(位于第 53-62 位氨基酸)、
APARFFGMR(位于第 113-122 位氨基酸)、
GPSSQSFFGMR(位于第 125-136)(图 2)。以
上结果进一步证实昆虫 TRPs 关键结构区域在不
同昆虫的进化保守性。



图 2 Dc-TRP 与其他物种 TRP 氨基酸多重序列比对结果

#### Fig. 2 Comparison of multiple sequence alignments between Dc-TRP and TRP amino acids in other species

红色及蓝色部分序列为保守区域。The sequences of the red and blue parts indicate the conservative regions. 用于多重序 列比对的 TRP 氨基酸序列物种来源及 GeneBank 登录号如下 GeneBank accession numbers of TRP from different species are listed as followed: Dc-TRP: 柑橘木虱 *Diaphorina citri*, At-TRP: 蜂巢小甲虫 *Aethina tumida* (XP\_019880636.1), Nv-TRP: 大红葬甲 *Nicrophorus vespilloides* (XP\_017775699.1), Tc-TRP: 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* (KYB25859.1), Ot-TRP: 蜣螂 *Onthophagus taurus* (XP\_022916850.1), Bg-TRP: 德国小蠊 *Blattella germanica* (PSN47497.1), Rm-TRP: 马德拉蜚蠊 *Rhyparobia maderae* (AAX11211.2), Cs-TRP: 白蚁 *Cryptotermes secundus* (XP\_023706646.1), Pd-TRP: 造 纸胡蜂 *Polistes dominula* (XP\_015171358.1), Cc-TRP: 麦茎蜂 *Cephus cinctus* (XP\_015609310.1), Hh-TRP: 茶翅蝽 *Halyomorpha halys* (XP\_024216981.1), Ps-TRP: 小珀蝽象 *Plautia stali* (BAV78830.1), Rp-TRP: 长红猎蝽 *Rhodnius prolixus* (ACS45389.1), Pp-TRP: 猎蝽 *Pristhesancus plagipennis* (ATU82949.1), Cl-TRP: 温带臭虫 *Cimex lectularius* (XP\_014240732.1).

#### 2.2 Dc-TRP 系统进化树分析

为进一步证实柑橘木虱 Dc-TRP 与其他昆虫 速激肽相关肽的亲缘关系远近及保守性,将预测 的氨基酸序列在 NCBI 中进行 Blastp 比对,结果 表明 Dc-TRP 与鞘翅目、半翅目等昆虫 TRP 氨基 酸序列具有较高的一致性。在 Blastp 比对结果中 下载 25 条已知的不同昆虫物种 TRP 氨基酸序 列,并与 Dc-TRP 氨基酸序列一起采用 MEGA6 进行系统进化树分析,首先对 TRPs 氨基酸序列 进行 ClustalW 比对,然后根据比对结果采用最 大似然法中 Botstrap 方法以及 Poisson 模型进行 1 000 次重复构建系统发育树。结果如图 3 所示, 来源于不同目的昆虫 TRPs 进化树基本遵循现有



# 图 3 基于氨基酸序列构建的 Dc-TRP 与其他物种 TRP 系统进化树

Fig. 3 The phylogenetic tree constructed based on amino acid sequence of Dc-TRP and other species TRP

构建系统进化树的 TRPs cDNA 序列物种来源及 GeneBank 登录号如下: GeneBank accession numbers of TRP from different species are listed as followed: 猎蝽 Pristhesancus plagipennis (ATU82949.1), 温带臭虫 Cimex lectularius (XP\_014240732.1), 长红锥蝽 Rhodnius prolixus (ACS45389.1), 茶翅蝽 Halyomorpha halys (XP\_024216981.1), 白蚁 Cryptotermes secundus (XP\_023706646.1), 美洲大蠊 Periplaneta americana (AAX11212.1), 德国小蠊 Blattella germanica (PSN47497.1), 马德拉蟑螂 Rhyparobia maderae (AAX11211.2), 烟粉虱 Bemisia tabaci (XP\_018901297.1), 白蜡窄吉丁 Agrilus planipennis (XP\_018322098.1), 大红葬甲 Nicrophorus vespilloides (XP\_01775699.1), 赤拟谷盗 Tribolium castaneum (KYB25859.1), 斜纹夜蛾 Spodoptera litura (XP\_022815495.1), 棉铃虫 Helicoverpa armigera (XP\_021187277.1), 丛林斜眼褐蝶 Bicyclus anynana (XP\_023934555.1), 埃及伊蚊 Aedes aegypti (XP\_001652135.2), 红头松树叶蜂 Neodiprion lecontei (XP\_015517006.1), 黄翅菜叶蜂 Athalia rosae (XP\_012261999.1), 麦茎蜂 Cephus cinctus (XP\_024947750.1), 寄生蜂 Orussus abietinus (XP\_012286731.1), 胡蜂 Diachasma alloeum (XP\_015108478.1), 简里山潜蝇茧蜂 Fopius arisanus (XP\_011313683.1), 回条蜂 Habropoda laboriosa (KOC70401.1), 造纸胡蜂 Polistes dominula (XP\_015171358.1), 胡蜂 Polistes canadensis (XP\_014600043.1).

的昆虫纲系统发育关系图 (许再福,2009)。其 中来源于同一个目的昆虫 TRPs 聚成一支,如鳞 翅目纹夜蛾 S. litura,棉铃虫 H. armigera,丛林 斜眼褐蝶 B. anynana 聚成独立的一支。此外膜翅 目的多种蜂类也聚成一类。进一步分析发现柑橘 木虱 Dc-TRP 与蜚蠊目马德拉蟑螂 R. maderae TRPs 亲缘关系最近,然后与蜚蠊目及半翅目等 其他昆虫聚在一起形成大的分支。

## 2.3 Dc-TRP 基因时空表达分析

以 Dc-Act1 作为内参,根据 2<sup>-ΔΔCt</sup>法对柑橘



木虱不同发育时期和不同组织中 *Dc-TRP* mRNA 水平表达量进行分析。结果如图 4 所示,*Dc-TRP* 在柑橘木虱各个发育时期均有表达,但各个发育 时期表达量差异不显著;在雌雄成虫中 mRNA 水平表达量也不存在显著性差异。*Dc-TRP* 在成 虫各个组织(包括头、胸、腹部以及肠道组织)中 均有表达,且各个组织之间 *Dc-TRP* 表达量存在 一定的差异。其中头部 *Dc-TRP* 表达量最高,且 与其他 3 个组织相比差异极显著;腹部与肠道 组织中 *Dc-TRP* 表达量较低且两者相比差异不 显著。



图 4 Dc-TRP 在柑橘木虱不同发育时期、不同组织中的 mRNA 水平表达情况 Fig. 4 The relative mRNA expression levels of Dc-TRP in different developmental stages and different tissues of Diaphorina citri

A. Dc-TRP 在柑橘木虱不同发育时期的 mRNA 水平表达情况;

B. Dc-TRP 在柑橘木虱成虫不同组织的 mRNA 水平表达情况。

A. The relative mRNA expression levels of *Dc-TRP* in different developmental stages of *D. citri*; B. The relative mRNA expression levels of *Dc-TRP* in different tissues of *D. citri*.

1,2,3,4,5分别代表1至5龄若虫,M代表雄虫,F代表雌虫,H,T,A和G分别代表头、胸、腹和肠道组织。

图中数据为平均值±标准误;柱上标有不同的字母表示差异显著(P<0.05, DMRT法)。

1, 2, 3, 4, and 5 represent one to five instar nymphs, M represents males, and F represents females. H, T, A, and G represent head, chest, abdomen, and intestinal tissue, respectively. Data are mean ± SE. Histograms with different lowercase letters indicate significant difference by Duncan's multiple range test at 0.05 level.

# 3 讨论

作为一类保守的多功能神经肽,速激肽参与 调节多种生理功能。研究表明速激肽在不同的物 种间具有高度保守性,其中无脊椎动物动物中发 现的大部分速激肽均含有保守的五肽结构 (FXGYR)(李向梅等,2012)。目前速激肽分 子在黑腹果蝇 D. melanogaster、马德拉蜚蠊 L. maderae、非洲蝗虫 Locusta migratoria、反吐丽 蝇 Calliphora vomitoria、草潭库蚊 Culex salinarius、埃及伊蚊 A. aegypti、长红猎蝽 R. prolixus、家蚕 Bombyx mori、桔小实蝇 B. dorsalis 及烟芽夜蛾 Heliothis virescens 等多种昆虫均得 到鉴定(Satake et al. 2013; Nagai-Okatani et al., 2016;Gui et al., 2017;Zhao et al., 2017; Haddad et al., 2018)。根据昆虫速激肽氨基酸序列分析 发现其五肽序列与无脊椎动物五肽结构基本一 致,同时也存在一定的差异,大部分昆虫速激肽 五肽序列为 FXGX(X为 M/V)R。本文中通过 速激肽相关肽基因序列分析得到 4 个速激肽成 熟肽,序列分析发现4个速激肽中有3个速激肽 成熟肽的五肽结构与昆虫速激肽五肽结构基本 一致。同时本研究鉴定得到一个激肽成熟肽为 PNAFAAMR,其五肽结构与其他昆虫速激肽存 在一定差异,但基本保持高度保守性。对不同昆 虫速激肽进行分析发现不同物种间速激肽成熟 肽的数目存在一定的差异,例如黑腹果蝇 D. melanogaster 中发现6个速激肽成熟肽;长红 猎蝽 R. prolixus 中鉴定出7个速激肽成熟肽;长红 猎蝽 R. prolixus 中鉴定出7个速激肽成熟肽;马 德拉蜚蠊 L. maderae则有10个速激肽成熟肽;马 德拉蜚蠊 L. maderae则有10个速激肽成熟肽;马 何梅等,2012;Haddad et al.,2018)。而本研究 中柑橘木虱仅鉴定出4个速激肽成熟肽。不同物 种间的速激肽数目差异可能物种进化有关,同时 也可能存在其他速激肽分子未被挖掘。

研究表明昆虫速激肽作为重要的调节信号 激活特异的 G 蛋白偶联受体调控昆虫的各种生 理过程,包括生长发育、繁殖、行为等(Altstein and Nassel, 2010)。本文通过荧光定量 PCR 检 测不同发育时期 Dc-TRP mRNA 水平表达量情 况,结果表明 Dc-TRP 在柑橘木虱整个发育时期 均有表达,推测 Dc-TRP 的存在保障柑橘木虱的 正常生长发育。进一步组织定位分析表明昆虫速 激肽相关肽广泛分布于中枢神经系统和/或肠道 中(Nässel, 1999; Van Loy et al., 2010)。本研 究通过荧光定量 PCR 检测柑橘木虱不同组织 Dc-TRP 表达情况分析发现 Dc-TRP 在头部表达 量最高,其次在胸部也有较高的表达,而在腹部 及肠道组织中表达量较低。推测 Dc-TRP 可能在 柑橘木虱中枢神经系统中起着重要作用,而 Dc-TRP 在柑橘木虱成虫胸部特异表达有待进一 步研究。本研究通过克隆得到柑橘木虱速激肽相 关肽基因 Dc-TRP,同时利用荧光定量 PCR 技术 对 Dc-TRP 进行时空表达分析,初步揭示柑橘木 虱 Dc-TRP 基本信息,为进一步深入研究 Dc-TRP 基因功能及挖掘农药作用新靶标 ,应对柑橘木虱 抗药性问题提供一定的理论依据。

#### 参考文献 (References)

Al-Alkawi H, Lange AB, Orchard I, 2017. Cloning, localization, and

physiological effects of sulfakinin in the kissing bug, *Rhodnius* prolixus. Peptides, 98: 15-22.

- Altstein M, Nassel DR, 2010. Neuropeptide signaling in insects. Advances in Experimental Medicine and Biology, 692: 155–165.
- Alves GR, Diniz AJF, Parra JRP, 2014. Biology of the huanglongbing vector *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) on different host plants. *Journal of Economic Entomology*, 107(2): 691–696.
- Champagne DE, Ribeiro JM, 1994. Sialokinin I and II: Vasodilatory tachykinins from the yellow fever mosquito Aedes aegypti. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 91(1): 138–142.
- Gui SH, Jiang HB, Xu L, Pei YX, Liu XQ, Smagghe G, Wang JJ, 2017. Role of a tachykinin-related peptide and its receptor in modulating the olfactory sensitivity in the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 80: 71–78.
- Haddad ANS, Defferrari MS, Hana S, Szeto SG, Lange AB, 2018. Expression and functional characterization of tachykinin-related peptides in the blood-feeding bug, *Rhodnius prolixus. Peptides*, 99: 247–254.
- Kanga LH, Eason J, Haseeb M, Qureshi J, Stansly P, 2016. Monitoring for insecticide resistance in Asian citrus psyllid (Hemiptera: Psyllidae) populations in Florida. *Journal of Economic Entomology*, 109(2): 832–836.
- Kwok R, Nässel DR, Lange AB, Orchard I, 1999. Locusta tachykinin isoforms in the locust: distribution and quantification in the central nervous system and action on the oviduct muscle. *Peptides*, 20(6): 687–694.
- Lee JA, Halbert SE, Dawson W, Robertson CJ, Keesling JE, Singer BH, 2015. Asymptomatic spread of huanglongbing and implications for disease control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(24): 7605–7610.
- Li XM, He XB, Zhu CG, Zhou NM, Zhang GZ, 2012. Research advances of tachykinin-related peptides and receptors in insect. *Science of Sericulture*, 38(3): 546–555. [李向梅,何小柏,朱成 钢,周耐明,张国政, 2012. 昆虫速激肽相关肽及其受体的研 究进展. 蚕业科学, 38(3): 546–555.]
- López-Collado J, Isabel López-Arroyo J, Robles-García PL, Márquez-Santos M, 2013. Geographic distribution of habitat, development, and population growth rates of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, in Mexico. *Journal of Insect Science*, 13(1): 114.
- Mikani A, 2016. Tachykinin stimulation effects on amylase, protease

and lipase activities in midgut of American cockroach, *Periplaneta americana* (Blattodea: blattidae). *Journal of Entomological Society of Iran*, 36(2): 81–88.

- Nagai-Okatani C, Nagasawa H, Nagata S, 2016. Tachykinin-related peptides share a g protein-coupled receptor with ion transport peptide-like in the silkworm *Bombyx mori. PLoS ONE*, 11(6): e0156501.
- Nässel DR, 1999. Tachykinin-related peptides in invertebrates: a review. *Peptides*, 20(1): 141–158.
- Nässel DR, Passier PC, Elekes K, Dircksen H, Vullings HG, Cantera R, 1995. Evidence that locustatachykinin I is involved in release of adipokinetic hormone from locust *Corpora cardiac. Regulatory Peptides*, 57(3): 297–310.
- Satake H, Aoyama M, Sekiguchi T, Kawada T, 2013. Insight into molecular and functional diversity of tachykinins and their receptors. *Protein and Peptide Letters*, 20(6): 615–627.
- Schoofs L, Holman GM, Hayes TK, Kochansky JP, Nachman RJ, De Loof A, 1990. Locustatachykinin III and IV: two additional insect neuropeptides with homology to peptides of the vertebrate tachykinin family. *Regulatory Peptides*, 31(3): 199–212.
- Shimwela MM, Narouei-Khandan HA, Halbert SE, Keremane ML, Minsavage GV, Timilsina S, Massawe DP, Jones JB, van Bruggen AHC, 2016. First occurrence of *Diaphorina citri* in East Africa, characterization of the *Ca*. Liberibacter species causing huanglongbing (HLB) in Tanzania, and potential further spread of *D. citri* and HLB in Africa and Europe. *European Journal of*

Plant Pathology, 146(2): 349-368.

- Song W, Veenstra JA, Perrimon N, 2014. Control of lipid metabolism by tachykinin in Drosophila. *Cell Reports*, 9(1): 40–47.
- Teck SLC, Fatimah A, Beattie A, Heng RKJ, King WS, 2011. Influence of host plant species and flush growth stage on the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. *American Journal of Agricultural & Biological Science*, 6(4): 536–543.
- Van Loy T, Vandersmissen HP, Poels J, Van Hiel MB, Verlinden H, Vanden Broeck J, 2010. Tachykinin-related peptides and their receptors in invertebrates: A current view. *Peptides*, 31(3): 520–524.
- Winther AM, Acebes A, Ferrús A, 2006. Tachykinin-related peptides modulate odor perception and locomotor activity in Drosophila. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 31(3): 399–406.
- Winther AM, Muren JE, Lundquist CT, Osborne RH, Nässel DR, 1998. Characterization of actions of Leucophaea tachykininrelated peptides (LemTRPs) and proctolin on cockroach hindgut contractions. *Peptides*, 19(3): 445–458.
- Xu ZF, 2009. General Entomology. Beijing: Science Publishing House Press. 221. [许再福, 2009. 普通昆虫学. 北京: 科学出 版社. 221.]
- Zhao XC, Xie GY, Berg BG, Schachtner J, Homberg U, 2017. Distribution of tachykinin-related peptides in the brain of the tobacco budworm *Heliothis virescens*. *Journal of Comparative Neurology*, 525(18): 3918–3934.