研究论文

# 柑橘全爪螨脂肪酸结合蛋白基因克隆及对饥饿胁迫的响应*

张宵菁** 孔新研 杨 翠 刘雯琪 袁咏艺 邹志文 夏 斌 辛天蓉***

（南昌大学生命科学学院，南昌 330031）

**摘 要 【目的】** 脂肪酸在昆虫的生长发育和繁殖中起着重要的作用，而脂肪酸结合蛋白（Fatty acid binding protein，FABP）主要参与机体脂肪酸的特异性结合和转运等。本研究旨在克隆柑橘全爪螨 *Panonychus citri* 脂肪酸结合蛋白基因，并分析其对饥饿胁迫的响应。**【方法】** 运用 RT-PCR 结合 cDNA 末端快速扩增（RACE）技术克隆获得柑橘全爪螨脂肪酸结合蛋白基因全长并分析其序列特征，采用实时荧光定量 PCR 技术检测了该基因在柑橘全爪螨生长发育不同阶段的表达量差异；将柑橘全爪螨雌成螨在不同饥饿胁迫处理后，统计其存活率、产卵量、卵孵化率、每雌每日产卵量以及 *PcFABP* 基因的相对表达量。**【结果】** 柑橘全爪螨 *PcFABP* 基因的 cDNA 全长为 907 bp，包括 119 bp 的 5′非编码区，402 bp 的开放阅读框（ORF）以及 387 bp 的 3′非编码区，编码 133 个氨基酸。氨基酸序列分析表明，*PcFABP* 基因与二斑叶螨 *Tetranychus urticae* 的同源性最高，与其他蛛形纲的相似性为 50%左右。*PcFABP* 在柑橘全爪螨不同的生长发育阶段（卵、幼螨、前若螨、后若螨、雌成螨、雄成螨）均表达，在卵、幼螨和后若螨中的表达量较高，前若螨和成螨中表达量较低。与饲喂 24 和 48 h 相比，柑橘全爪螨雌成螨饥饿处理 24 和 48 h、先饥饿 24 h 后复饲 24 h、先饲喂 24 h 后饥饿 24 h 后，其存活率和产卵量均显著降低（$P<0.05$）；饥饿胁迫处理后柑橘全爪螨雌成螨产卵后卵的孵化率与对照组相比并未达到显著差异（$P>0.05$）。此外，对 *PcFABP* 基因的表达分析显示先饥饿 24 h 在复饲 24 h 的相对表达量最高，饥饿 48 h 的相对表达量最低。**【结论】** *PcFABP* 基因可能参与柑橘全爪螨的生长发育，并且柑橘全爪螨可能通过调控 *PcFABP* 基因的表达来对饥饿胁迫进行响应。

**关键词** 柑橘全爪螨；脂肪酸结合蛋白；基因表达；饥饿胁迫

# Cloning the *Panonychus citri* fatty acid binding protein gene, and the response of this gene under food deprivation

ZHANG Xiao-Jing** KONG Xin-Yan YANG Cui LIU Wen-Qi
YUAN Yong-Yi ZOU Zhi-Wen XIA Bin XIN Tian-Rong***

(College of Life Science, Nanchang University, Nanchang 330031, China)

**Abstract [Objectives]** To clone the *Panonychus citri* fatty acid binding protein gene and analyze its response to food deprivation. **[Methods]** The full-length cDNA sequence of the *PcFABP* gene was, for the first time, cloned using RT-PCR in combination with RACE technology. The relative expression levels of the *PcFABP* gene in different developmental stages of *P. citri* were examined using RT-qPCR. In addition, the survival rate, oviposition, hatch rate, fecundity (eggs/female/day) and the expression of the gene, were measured after a period of food deprivation. **[Results]** The results demonstrate that the full-length

*资助项目 Supported projects：江西省自然科学基金项目（20224BAB205015）；国家自然科学基金项目（31760621，31860601）；江西省重点研发计划项目（20212BBF63042，20203BBF63041）

**第一作者 First author，E-mail：1983632414@qq.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：xintianrong@ncu.edu.cn

收稿日期 Received：2023-01-13；接受日期 Accepted：2023-09-02

cDNA sequence of *PcFABP* is 907 bp long, including 119 bp 5′-UTRs, 402 bp ORFss, and 387 bp 3′-UTR, and encodes a deduced protein of 133 amino acids. Amino acid sequence alignment suggests that the *P. citri* FABP gene is most homologous to the *Tetranychus urticae* FABP gene, and has a similarity to the *PcFABP* genes of other arachnids of about 50%. The *PcFABP* gene was expressed in all developmental stages of *P. citri*, but expression in the egg, larva and deutonymph were significantly higher than in other developmental stages. The survival and oviposition rates of *P. citri* females were significantly lower than those of the control group after being deprived of food for 24 h and 48 h. Allowing females to feed for 24 h after 24 h of food deprivation, or depriving them of food for 24h after allowing them to feed for 24 h, also significantly reduced female survival and oviposition rates relative to the control group. The hatching rate of the eggs laid by females subject to food deprivation was not, however, significantly different from that of the control group. The relative expression of the *PcFABP* gene was highest in females that fed for 24 h after being deprived of food for 24 h, and lowest in those that were deprived of food for 48 h. **[Conclusion]** *PcFABP* may play an important role in the growth and development of *P. citri*, and may also be involved in the response of this species to food stress.

**Key words** *Panonychus citri*; fatty acid binding protein; gene expression; starvation stress

脂肪酸作为动物机体中一种主要的能量来源，在调节细胞稳态、维持细胞正常的新陈代谢等方面具有非常重要的功能（Storch and McDermott, 2009；Duah *et al.*，2023）。当遇到饥饿和外界环境压力时，生物体内能量稳态的失衡会产生不利影响（Sokolova *et al.*，2012），而激素通过激活脂肪细胞中的脂肪酶，将甘油三酯转变为脂肪酸从而为机体提供能量。研究发现细胞内存在一些特殊的蛋白质协助脂肪酸运输，其中脂肪酸结合蛋白（Fatty acid binding protein，FABP）对于脂肪酸的运输及其转运具有非常重要的意义（Storch and McDermott，2009）。脂肪酸结合蛋白广泛存在于各种生物包括脊椎动物和无脊椎动物中，是位于细胞质中的脂质结合蛋白家族成员，在长链脂肪酸的摄取、转运及新陈代谢等方面发挥重要作用（Ho *et al.*，2020；Ye *et al*，2022)。脂肪酸结合蛋白通过与多种配体结合使脂肪酸的溶解度增加，促进脂肪酸从细胞膜转运至细胞器中进行 β-氧化以及甘油三酯和磷脂合成，从而释放出大量能量供机体使用。

脂肪酸在昆虫的生长发育和繁殖中发挥着非常重要的作用。FABP 通过促进疏水性脂肪酸的吸收、运输和代谢进而保证其正常的生理活动(Amiri *et al.*，2018)。在棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 中，2-十三烷酮处理饲料饲喂棉铃虫 15h 后， *HaFABP1* 在中肠内的表达量与对照相比显著提高，推测 *HaFABP1* 与棉铃虫的生长发育有关，并且有可能参与昆虫的解毒过程（任苏伟等，2019）；将非洲沙漠蝗 *Schistocerca gregaria* 飞行肌中的 FABP 沉默后，与对照组相比，FABP 消耗殆尽的飞蝗飞行时间缩短，表明 FABP 在体内是骨骼肌能量代谢的必要元素（Sanjeeva *et al.*，2019）；在果蝇中，敲除 FABP 基因后，神经元发育受到影响，导致存活率降低，表明 *dFABP* 参与了果蝇神经系统中控制行为的各种组织和大脑功能的发育（Jang *et al.*，2022）；对黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的研究也显示当 RNA 干扰 *DmFABP* 后甲壳素含量降低，导致翅膀发育异常和角质层表面不均匀，幼虫致死率增加，其表达揭示了 FABP 在几丁质合成中的重要作用，并可能参与自身的生长发育（Chen *et al.*，2022）；此外，*HvFABP* 沉默显著抑制了 *HvFABP* 的表达，导致发育延迟或致死表型，并显著降低生存率，表明 *HvFABP* 在黄野螟 *Heortia vitessoides* 蜕皮过程中起关键作用（Ye *et al.*，2022）；研究还发现蜜蜂暴露在膳食脂肪酸中，在转录起始水平上调了 *AccFABP* 的表达，暗示 *AccFABP* 可能参与了脂肪体的脂质代谢，这对蜜蜂 *Apis cerana cerana* 的生长发育至关重要（Yu *et al.*，2013）。尽管 FABP 基因通过促进脂肪酸吸收、运输和代谢的机制已被广泛研究，但关于 FABP 基因在螨虫中如何通过脂质代谢进而影响其生长发育还所知甚少。

柑橘全爪螨 *Panonychus citri*，又名柑橘红蜘蛛，属蛛形纲 Arachnida 蜱螨目 Acarina 叶螨科 Tetranychidae 全爪螨属 *Panonychus*（张振等，

2017），是重要的农业害螨，在我国各柑橘产区均有分布；其繁殖能力强，世代交替明显，在部分柑橘产区全年发生，主要以成螨和若螨刺吸柑橘叶片以及果实汁液，从而对柑橘产量和品质造成严重影响（徐南昌等，2003）。当前由于气候异常和化学药剂不当使用，柑橘根群生长环境恶化，柑橘根系和枝叶长时间遭受低温冻害和土壤营养不平衡的破坏（温桂章, 2011），导致柑橘树黄化日益严重，使柑橘全爪螨可能面临饥饿的胁迫。脂质作为储存能量的重要来源，其新陈代谢对于生长、发育及繁殖等至关重要，而卵母细胞中脂质和卵黄原蛋白的充足供应对于生殖更是具有重要的意义（Tufail and Takeda，2008；Chen *et al.*，2022）。目前尚未见到关于柑橘全爪螨FABP 基因的分子特性及其对饥饿胁迫响应的报道。因此，本研究对柑橘全爪螨脂肪酸结合蛋白基因进行克隆、测序和生物信息学分析；在此基础上，采用实时荧光定量 PCR 技术研究 FABP 基因在柑橘全爪螨不同生长发育阶段的表达模式；对柑橘全爪螨雌成螨进行饥饿处理后，测定其存活率、产卵量、卵的孵化率以及 FABP 基因表达量的变化。本研究将为后期研究柑橘全爪螨脂肪酸结合蛋白的功能以及探讨饥饿胁迫下柑橘全爪螨适应性机制提供理论基础。

# 1 材料与方法

## 1.1 供试螨源

柑橘全爪螨采于江西省南昌市南昌大学生物园柑橘树，置于温度（26±1）℃，RH（相对湿度）75%左右，以及光周期 14L∶10D 的人工气候箱中饲养。

## 1.2 主要试剂和仪器

Eastep® Super 总 RNA 提取试剂盒、DH5α 大肠杆菌购自上海普洛麦格生物产品有限公司，FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒和聚合酶 2xTaq MasterMix 购自天根生化科技有限公司，SMARTer® RACE 5′/3′试剂盒和 DNA Marker 购自 TaKaRa 公司，DNA 凝胶回收试剂盒购自上海生工生物工程技术服务有限公司，荧光定量 PCR 仪为 CFX96$^{TM}$ Real-Time System (BIO-RAD)。

## 1.3 实验方法

**1.3.1 总 RNA 提取和 cDNA 合成** 总 RNA 提取采用 Eastep®Super 总 RNA 提取试剂盒（Promega，USA），按照操作步骤进行。NanoDrop 2000 超微量分光光度计（Thermo Fisher, USA）测定 RNA 浓度并通过 1%琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。使用 FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒将总 RNA 反转录为 cDNA，随后将其保存在 - 20 ℃冰箱中用于后续实验。

**1.3.2 实验引物的设计** 在本实验室已经测得的柑橘全爪螨转录组数据库中搜索脂肪酸结合蛋白的核苷酸序列，经 NCBI 中的 BLAST 比对确定序列为 FABP 基因后，采用 Premier 5.0 软件设计引物,于生工生物技术公司（上海）进行合成。引物序列见表 1。

**1.3.3 FABP 基因的克隆** 收集 3 日龄柑橘全爪螨雌成螨，按照 1.3.1 方法提取总 RNA 后反转录合成 cDNA 第一链模板。PCR 扩增体系（50 μL）：2 μL cDNA 模板，2 μL 上下游引物（引物浓度为 10 μmol/L）；25 μL 2×Taq PCRMaster MixII，$ddH_2O$ 补足到 50 μL。PCR 扩增条件：94 ℃预变性 3 min，94 ℃变性 30 s, 57 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 1 min，循环 36 次，72 ℃延伸 10 min。经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后，将纯化后的 PCR 产物连接至 pGEM-T Easy 载体，并将其转化至 DH5α 大肠杆菌中，随后涂布于含有 Amp 的 LB 平板培养基上，于 37 ℃下培养过夜。挑选单一白色菌落接种到含有 $Amp^+$的液体培养基中，37 ℃ 下 200×g 振荡培养 6-8 h 后进行菌液 PCR，将 PCR 产物是单一条带的阳性菌液送公司双向测序。

## 1.4 FABP 基因的 mRNA 表达

将 3 日龄柑橘全爪螨雌成螨挑于叶碟上产卵，24 h 后移走雌成螨。待卵发育至 3 日龄，用毛笔在显微镜下轻轻挑取约 800 只卵；剩下的卵继续发育并孵化成幼螨；同样方法收集同步发育的前若螨、后若螨、雌成螨和雄成螨。

以柑橘全爪螨雌成螨 cDNA 为模板，GAPDH（登录号：HM582445.1）和 ELF1α（登录号：LOC100037748）为内参基因，引物序列见表 1。荧光定量 PCR 反应体系（20 μL）：1 μL cDNA 模板，0.8 μL 上下游引物（引物浓度为 10μmol/L）和 TB Green I 10 μL 和 $ddH_2O$ 6.6 μL。反应条件参照试剂盒说明书进行：94 ℃预变性 3 min，94℃变性 30 s，57 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 1 min，循环 36 次，72 ℃延伸 10 min，最后在 65-95 ℃对所有反应进行熔解曲线分析。各处理组分别设 3 个独立的生物学重复和 3 个技术重复。

**表 1　本研究所用引物信息**

**Table 1　Information of primers used in this study**

| 引物用途<br>Primer usages | 引物名称<br>Primer names | 引物序列（5′–3′）<br>Primer sequences (5′–3′) | 产物长度（bp）<br>Product length (bp) |
|---|---|---|---|
| ORF 克隆<br>ORF cloing | FABP-F1 | ACTGTTGGCGCATTGAAACC | 402 |
| | FABP-R1 | TGGCGGTAACTTCACCACAT | |
| 5′ RACE | FABP-F2 | ATTTGGTCTCGGAGGTTTTG | 192 |
| | FABP-R2 | CGCTTGAGACAAATGAATAT | |
| 3′ RACE | FABP-F3 | GAAGCAGCAAAGTGAGC | 309 |
| | FABP-R3 | TGAAGTTACCGCCACTC | |
| RT-qPCR | FABP-F4 | GAGAAACGTATGGATGGGGTAA | 169 |
| | FABP-R4 | TGTAGATTCGAGTGGCGGTAA | |
| | GAPDH-F | CTTTGGCCAAGGTCATCAAT | 159 |
| | GAPDH-R | CGGTAGCGGCAGGTATAATG | |
| | ELF1α-F | GGCACTTCGTCTTCCACTTC | 194 |
| | ELF1α-R | CCAACCGTGAAAAGATGACC | |

### 1.5　饥饿处理

将 3 日龄柑橘全爪螨雌成螨进行不同的饥饿胁迫处理：（1）F24：饲喂 24 h；（2）F48：饲喂 48 h；（3）S24：饥饿 24 h；（4）S48：饥饿 48 h；（5）F24S24：先饲喂 24 h 后饥饿 24 h；（6）S24F24：先饥饿 24 h 后饲喂 24 h。其中饥饿处理时，将 3 日龄的柑橘全爪螨雌成螨挑于小盒中，经过 24 h 饥饿处理后，收集一部分雌成螨作为 S24 的模板；将剩余一部分重新置于叶碟上，24 h 后挑走雌成螨，将其作为 S24F24 的模板；同样的方法收集 F24、F48、S48、F24S24 处理组。处理结束后，以 F24、F48 作为对照组，按照 1.3.1 的方法提取总 RNA 后反转录合成 cDNA 第一链模板。以饥饿胁迫处理后柑橘全爪螨雌成螨的 cDNA 为模板，GAPDH（登录号：HM582445.1）和 ELF1α（登录号：LOC100037748）为内参基因，引物序列见表 1，荧光定量反应体系同 1.4。试验组和对照组各设 3 个独立的生物重复和 3 个技术重复。

### 1.6　基因序列的生物信息学分析及数据的统计分析

利用 SeqMan 软件对序列结果进行拼接得到柑橘全爪螨脂肪酸结合蛋白的全长 cDNA 序列，并通过 NCBI 中的 BLAST 进行核苷酸和氨基酸序列的同源性比对分析。采用 ORF Finder（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html）在线软件确定其完整的编码序列以及起始、终止密码子。运用 DNAMAN 7.0 软件对序列进行编辑并推导其氨基酸序列。使用 ExPASy-ProtParam tool（https://web.expasy.org/protparam/）对蛋白质理化性质进行分析，例如 ExPASy-ProtScale（http://web.expasy.org/protscale/）、SignalP 4.1 Server、NetNGlyc 1.0

Server、TMHMM Server v. 2.0（http: //www. cbs. dtu.dk/services/TMHMM/）、NetPhos 3.1 Server（http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/）分别对氨基酸的疏水性、信号肽、N-糖基化位点、跨膜区、磷酸化位点进行分析。使用 ClustalW1.8 软件，将氨基酸序列进行多重序列比较，并采用邻接法（Neighbor-joining，NJ 法）基于 FABP 与其他物种的氨基酸序列构建系统发育树。

采用 SPSS 20.0 软件对数据进行统计分析 (IBM Corporation, USA)。使用单因素方差分析（ANOVA）和 Duncan's 检验对柑橘全爪螨不同饥饿处理下的存活率、产卵量、孵化率、每雌每日产卵量进行统计；采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法对柑橘全爪螨不同发育阶段及饥饿胁迫处理下 FABP 基因的相对表达量进行分析。数据结果使用 GraphPad Prism 7.0 软件进行统计和绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 柑橘全爪螨 FABP 基因 cDNA 序列、推导的蛋白序列组成及理化特性预测

柑橘全爪螨脂肪酸结合蛋白基因（FABP）的 cDNA 序列全长为 907 bp，GenBank 登录号为 OQ143769。对 FABP 基因进行序列分析（图 1），发现其开放阅读框（ORF）为 402 bp，编码 133 个氨基酸，5′端非编码区长 119 bp，3′端非编码区长 387 bp，起始密码子为 ATG，终止密码子为 TAG，推导蛋白质分子式为 $C_{665}H_{1058}N_{170}O_{212}S_6$，分子量为 15 kD，理论等电点为 5.65，其中包含带正电荷的氨基酸残基 20 个和带负电荷的氨基酸残基 21 个。此外利用 SMART 软件对柑橘全爪螨 FABP 基因编码的蛋白质进行结构域预测，推测存在 2 个结构域：Lipocalin 7 和 Lipocalin。

```
1    AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACATGGGATTCAATTTGCAATTCTCTCTCAAATAGTT
61   ATTCTTTTGTGTTCTACTGTCAATTGTTAATTAACTTCTTTTTCTTGA
1    ATGGCTGAATTCGCTGGTGAATATTCATTTGTCTCAAGCGAAAATTTCGATGAATTTTTA
1     M  A  E  F  A  G  E  Y  S  F  V  S  S  E  N  F  D  E  F  L
61   AAGGCTTTAGGTCTTAATTTTCTTCTACGAAAAACTGTTGGCGCATTGAAACCAACATTC
21    K  A  L  G  L  N  F  L  L  R  K  T  V  G  A  L  K  P  T  F
121  ATCATAAAGGTCGACGATGATGGAACCATCACCTTTAAATCAATATCAACATTCAAAACC
41    I  I  K  V  D  D  D  G  T  I  T  F  K  S  I  S  T  F  K  T
181  TCCGAGACCAAATTCAAATTAAACGAAGAGTTTGAAGAGAAACGTATGGATGGGGTAACT
61    S  E  T  K  F  K  L  N  E  E  F  E  E  K  R  M  D  G  V  T
241  TGTAAGAGCACCGTCACCCAAGAAGGTAACAAGTTGATCCAGAAGCAGCAAAGTGAGCCT
81    C  K  S  T  V  T  Q  E  G  N  K  L  I  Q  K  Q  Q  S  E  P
301  CCGGCTGAAATTACTCGTGAATTCAACGGGGATGAGATGAAAATTACTTGTACATGTGGT
101   P  A  E  I  T  R  E  F  N  G  D  E  M  K  I  T  C  T  C  G
361  GAAGTTACCGCCACTCGAATCTACAAAAAATCCTCCAAGTAGAACGAAACTTATTGGAAAA
121   E  V  T  A  T  R  I  Y  K  K  S  S  K  *
421  AGATAAACAGCGATTAAATTAAAACAGTTCTAAGGCCGTATGCATACAATTAAATTTAATCA
481  AATCAATAATCAATCTCGTAATCAATTATAATCTGTGTAATCCTGTTTATCCAAACGATTAT
541  CTTTTTTCTCTCTTTCTCAAAACAAAATGAAAAATCAATTAATTTTCTTGAGCTTTTGTTAA
601  GATCAAATTCGTGTTCAGTTTAAAATCTAATTGTATTGTCCAAGAAATACGCACATCTTCTT
661  CCCTAATCCCTGATTCGTTTCGTGATGAACATTCCCCTGAAATCTGCTGAAGTGCTAATAAA
72   AAGCTCAGTCTTTATGTGGCCAAACTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

**图 1 柑橘全爪螨脂肪酸结合蛋白（FABP）全长 cDNA 序列及其氨基酸序列**

**Fig. 1 Full-length cDNA sequence and amino acid sequence of FABP genes from *Panonychus citri***

起始密码子（ATG）和终止密码子（TAG）用蓝色双下划线标注；加尾信号序列（AATAA）用红色字体标注，其中包含 118 bp 的 5′端非编码区（ATG 前）和 387 bp 的 3′端非编码区（TAG 后）。

The starting codon (ATG) and the stop codon (TAG) were marked with blue double underlined; and the putative polyadenylation signal (AATAA) were marked with red, and contained a 5-terminal non coding region of 118 bp and a 3-terminalnon coding region of 387 bp.

结构域 Lipocalin 7 由 132 个氨基酸组成，无跨膜螺旋结构；结构域 Lipocalin 包含 127 个氨基酸。

### 2.2　同源序列比对及构建系统发育树

采用 BLAST 对柑橘全爪螨及其近缘物种进行同源性比对分析，从 NCBI 中下载其他物种 FABP 基因的氨基酸序列（表 2）。将柑橘全爪螨 FABP 基因编码的蛋白质序列与其他近缘物种的氨基酸序列进行同源性比对分析。结果（图 2）发现柑橘全爪螨 FABP 基因与二斑叶螨 *Tetranychus urticae* 的 FABP 基因的氨基酸序列相似度高达 85.71%，与斑络新妇 *Nephila pilipes* 的同源性比对为 54.62%；而与其他蛛形纲的相似性为 50%左右。使用 ClustalW1.8 软件对氨基酸序列进行多重序列比较，采用邻接法基于 FABP 基因与其他物种的氨基酸序列构建系统发育树，结果显示柑橘全爪螨 FABP 基因与蛛形纲聚为一支，与同属于叶螨科的二斑叶螨亲缘关系最近，与昆虫纲和哺乳纲的亲缘关系较远（图 3）。

**表 2　本研究中使用的登录号和物种名**

**Table 2　The accession numbers and species used in this study**

| 物种名 Species name | GeneBank 登录号 GeneBank accession number. | 物种名 Species name | GeneBank 登录号 GeneBank accession number. |
|---|---|---|---|
| 柑橘全爪螨 *Panonychus citri* | OQ143769 | 横纹金蛛 *Argiope bruennichi* | KAF8794233.1 |
| 二斑叶螨 *Tetranychus urticae* | XP_015783412.1 | 沙漠蝗 *Schistocerca gregaria* | AH010557.2 |
| 斑络新妇 *Nephila pilipes* | JX846593 | 麦蛾柔茧蜂 *Habrobracon hebetor* | MG733027.1 |
| 大腹圆蛛 *Araneus ventricosus* | GBM71330.1 | 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* | NM_001032008.2 |
| 穴居狼蛛 *Lycosa singoriensis* | ABX75508.1 | 沟鼠 *Rattus norvegicus* | AF144090.2 |
| 灌丛隆头蛛 *Stegodyphus dumicola* | XP_035231446 | 牛 *Bos taurus* | DQ174319.1 |
| 大木林蛛 *Trichonephila clavipes* | GFW41837.1 | 欧亚野猪 *Sus scrofa* | EF619344.1 |
| 棒络新妇 *Trichonephila clavata* | GFQ97569.1 | | |

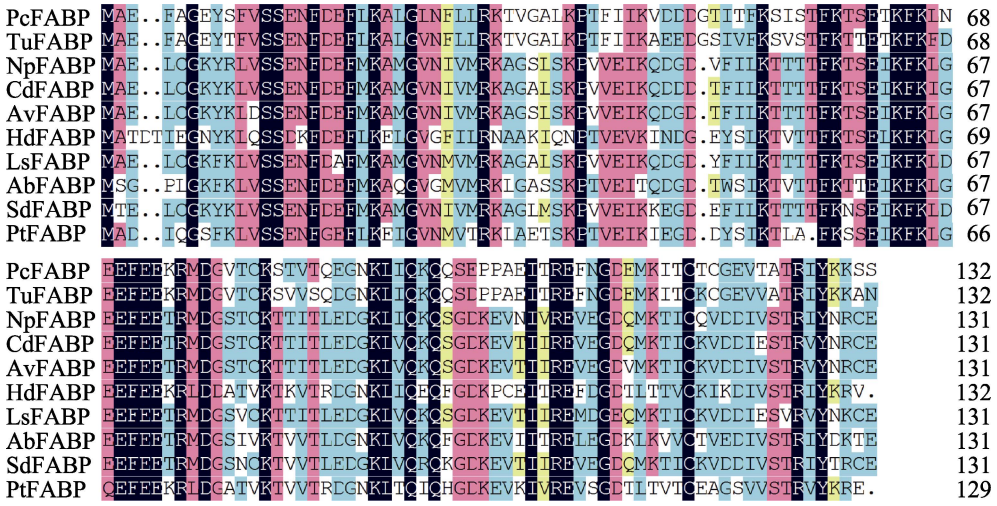


**图 2　柑橘全爪螨 *PcFABP* 氨基酸序列与其他物种氨基酸序列的比对**

**Fig. 2　Multiple alignments of *PcFABP* amino acid sequences of *Panonychus citri* and other species**

蓝色代表 100%序列一致性，红色代表≥75%序列一致性，绿色代表≥50%序列一致性，黄色代表≥33%序列一致性。

Blue represents 100% identity, red represents≥75% identity, green represents≥50% identity and yellow represents≥33% identity.

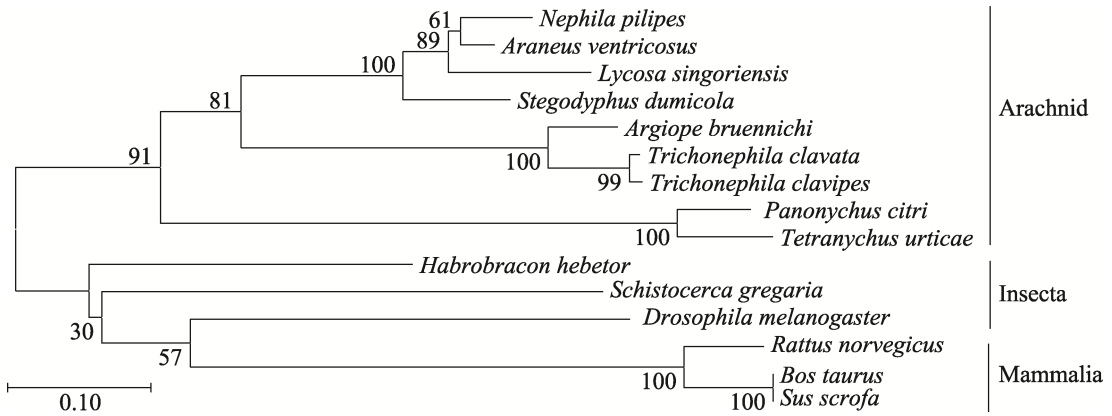


**图 3　以邻接法构建柑橘全爪螨 *PcFABP* 与其相关 FABP 的系统发育树**

**Fig. 3　Phylogenetic tree of *Panonychus citri PcFABP* and other related FABPs with using neighbor-joining method**

## 2.3　柑橘全爪螨不同发育阶段 FABP 基因的表达分析

通过 RT-qPCR 技术分析 FABP 基因在柑橘全爪螨不同发育阶段的表达，结果（图 4）表明，FABP 基因在柑橘全爪螨生长发育不同阶段（卵、幼螨、前若螨、后若螨、雌成螨和雄成螨）均表达，但相对表达量不同。FABP 基因在卵中表达量最高，幼螨和后若螨的相对表达量较高，前若螨和成螨的相对表达量较低（图 4）。

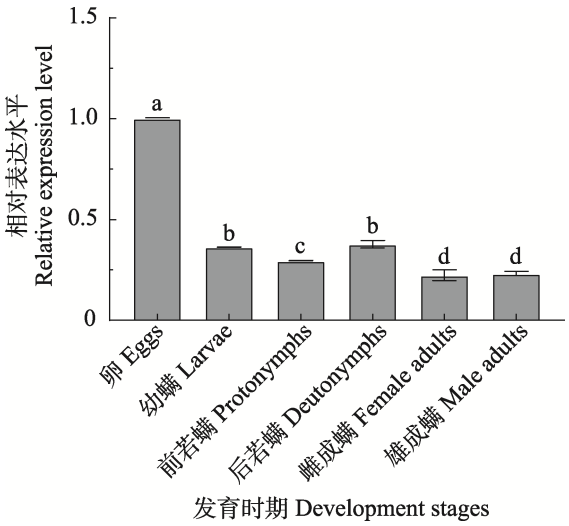


**图 4　FABP 基因在柑橘全爪螨生长发育不同阶段的相对表达水平**

**Fig. 4　Relative expression level of FABP gene during different developmental stages of *Panonychus citri***

所有数据均来自 3 个独立的生物重复，柱上标有不同小写字母代表不同发育阶段之间的相对表达量差异显著（$P<0.05$）。

All data were from three independent biological replicates. Different lowercase letters on the column represent significant differences in relative expression levels between different developmental stages.

## 2.4　饥饿处理

**2.4.1　饥饿胁迫处理对柑橘全爪螨生长发育和繁殖的影响**　以 F24 和 F48 为对照，柑橘全爪螨雌成螨饥饿胁迫处理后，其存活率与对照组相比显著下调（$P<0.05$），其中 S24 与 F24 相比，存活率约为对照的 0.6 倍；S48 与 F48 相比，存活率为对照的 0.59 倍；S24F24 的存活率约为 F48 的 0.24 倍；F24S24 的存活率与对照相比，约为 F48 的 0.24 倍（图 5）

柑橘全爪螨雌成螨饥饿胁迫处理后产卵量显著降低（图 6）。以 F24 和 F48 为对照，其产卵量与对照组相比显著下调（$P<0.05$），其中 S48 的产卵量下调最为明显，约为 S24 的 0.72 倍；S24F24 的产卵量约为 F48 的 0.83 倍；而 F24S24 的产卵量与对照相比，约为对照的 0.61 倍。

统计柑橘全爪螨雌成螨每雌每日产卵量，结果（图 7）表明，饥饿胁迫处理后 S48 前两天几乎不产卵，然后产卵量逐渐增加；S24、F24S24 为刚开始产卵较少，然后慢慢增加；S24F24 在前两天产卵量显著高于对照组（$P<0.05$），随着天数的增加呈现逐渐下降的趋势。饥饿胁迫处理后柑橘全爪螨雌成螨产卵后的卵孵化率与对照相比并未达到显著差异（图 8）（$P>0.05$）。

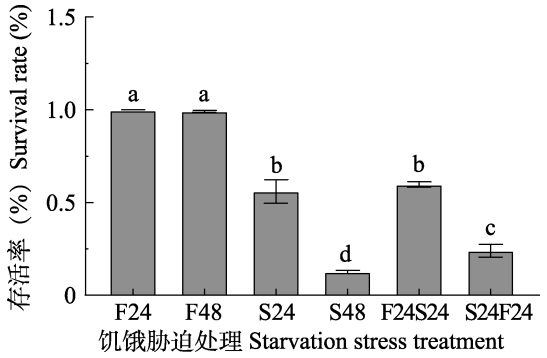


**图 5　饥饿胁迫处理下柑橘全爪螨雌成螨的存活率**

**Fig. 5　Survival rate of *Panonychus citri* females adult under starvation stress**

F24：饲喂 24 h；F48：饲喂 48 h；S24：饥饿 24 h；S48：饥饿 48 h；F24S24：先饲喂 24 h 后饥饿 24 h；S24F24：先饥饿 24 h 后饲喂 24 h。下图同。

F24: The feeding for 24 h treatment；F48: The feeding for 48 h treatment；S24：The starvation for 24 h treatment; S48:The starvation for 48 h treatment; S24F24: The feeding for 24 h after starvation for 24 h treatment; F24S24: The starvation for 24 h after feeding for 24 h treatment. The same as below.

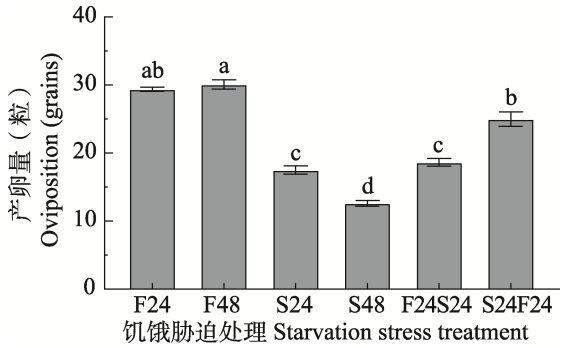


**图 6　饥饿胁迫处理下柑橘全爪螨雌成螨的产卵量**

**Fig. 6　Oviposition of *Panonychus citri* females adults under starvation stress**

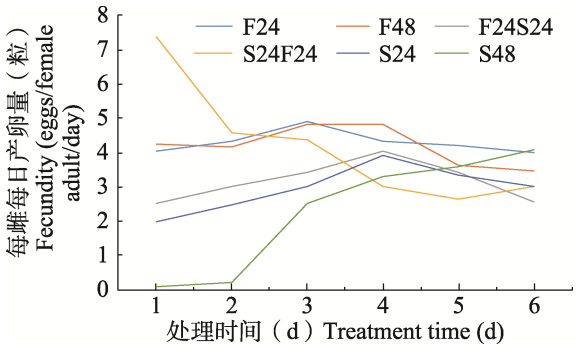


**图 7　饥饿胁迫处理下柑橘全爪螨雌成螨的每雌每日产卵量**

**Fig. 7　Fecundity (eggs/female adult/day) of *Panonychus citri* females adults under starvation stress**

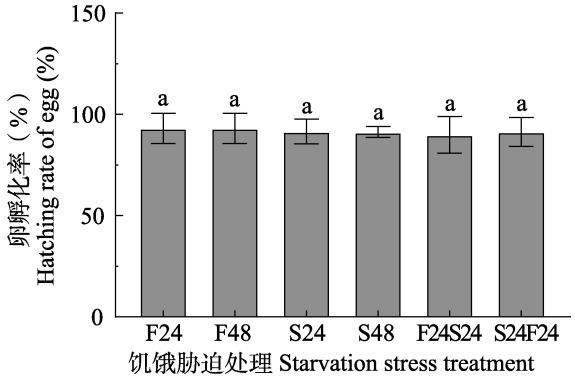


**图 8　饥饿胁迫处理下柑橘全爪螨雌成螨产卵后卵的孵化率**

**Fig. 8　Egg hatching rate of *Panonychus citri* females adults under starvation stress**

**2.4.2　饥饿和复饲后柑橘全爪螨 FABP 基因的表达分析**　采用 RT-qPCR 技术对柑橘全爪螨雌成螨不同饥饿胁迫处理后 FABP 基因的相对表达量进行分析。结果表明柑橘全爪螨雌成螨饥饿 24 和 48 h 后，其体内 FABP 基因的表达量与对照相比显著下降（$P<0.05$），其中 S24 的表达量约为 F24 的 0.42 倍；S48 的表达量约为 F48 的 0.12 倍；先饥饿 24 h 在复饲 24 h （S24F24）后体内 FABP 基因的相对表达量与对照相比显著上调，约为 F48 的 2.3 倍；而先饲养后饥饿（F24S24）FABP 基因的相对表达量与对照相比显著降低，约为 F48 的 0.68 倍（图 9）。

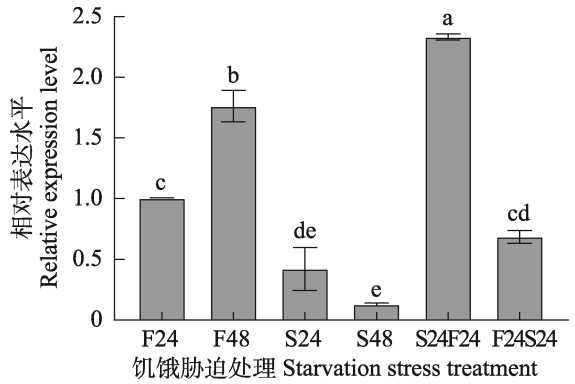


**图 9　柑橘全爪螨雌成螨饥饿和复饲后 FABP 基因的表达分析**

**Fig. 9　Expression analysis of FABP gene after starvation and refeeding of *Panonychus citri* females adults**

## 3　分析与讨论

脂肪酸作为脂肪体和脂肪组织的重要组成

部分，对生物的生长发育具有非常重要的意义，FABP 通过参与脂肪酸的摄取、转运等环节，调节脂质代谢进而促进脂肪酸的氧化功能及磷脂、甘油三酯代谢，从而为机体提供大量能量（Ye *et al.*，2022)。本研究根据实验室已经测得的柑橘全爪螨转录组数据库，采用 RT-PCR 结合 RACE 技术克隆获得柑橘全爪螨脂肪酸结合蛋白基因的全长序列。FABP 基因全长 907 bp，包含 402 bp 的开放阅读框（ORF）及编码由 133 个氨基酸组成的蛋白质。对柑橘全爪螨 FABP 基因结构域的预测显示该基因包含 2 个结构域：Lipocalin 7 和 Lipocalin。其中结构域 Lipocalin 7、Lipocalin 的序列与其他昆虫中的 FABP 基因相同的区域具有较高的保守型。此外，基于 FABP 与其他物种的氨基酸序列构建系统发育分析表明，柑橘全爪螨中 FABP 基因与同属于叶螨科的二斑叶螨亲缘关系最近。

近年来由于外界环境急剧变化，柑橘根系和枝叶长时间遭受低温冻害及化肥、农药的不正当伤害，使柑橘根系的生态环境遭到恶化，土壤环境严重失衡、柑橘树黄化日益严重（汪学富等，2009），饥饿胁迫对生物生长发育等生理变化机制逐渐成为研究热点。本研究中，柑橘全爪螨经过饥饿胁迫处理（F24、F48、S24、S48、F24S24、S24F24）后 S24F24 处理组 FABP 基因的相对表达量与对照相比显著增加，而 S48 处理组与对照相比，FABP 基因的相对表达量显著降低，这一结果与斜纹夜蛾中饥饿促进 *SlFABP2* 蛋白的表达结果一致（Huang *et al.*，2012），因此推测在不同的饥饿胁迫下，柑橘全爪螨可能通过增强 FABP 基因的表达来参与进食活动，进而影响食物中脂质的吸收与利用。摄食期间，柑橘全爪螨从食物中获取大量营养物质，并储存在组织中用于自身的生长发育。在此期间，胰岛素信号通路上调，促进糖酵解的产生。然而，由于三羧酸循环(TCA)受到抑制，由 TCA 的产物通过脂肪酸合成途径合成脂肪酸，而 FABP 通过参与脂肪酸的摄取、转运等环节调节脂质代谢，从而为生长发育提供充足的能量（Hagopian and Munday，1997）。

脂质作为生物体内储存能量的主要形式，在繁殖过程中，脂质储备的积累和调动能力对于生物的生长发育尤为重要(Hansen *et al.*，2013)；本研究中，饥饿胁迫处理后柑橘全爪螨 S24、S48 产卵量与对照相比显著降低，这可能是因为脂肪酸作为卵母细胞中的能量提供者（Dunning *et al.*，2014），对卵泡产生以及卵母细胞成熟有重要的影响。饥饿胁迫处理后，脂质和 FABP 含量显著减少，生物体内脂质含量及其相关代谢酶的变化进一步影响卵母细胞的成熟及产卵量（Liu *et al.*，2022），从而导致产卵量显著降低。对柑橘全爪螨经过饥饿胁迫后每雌每日产卵量的统计中，S48 处理组在前两天几乎不产卵，而后随着天数的增加逐渐产卵与对照持平；而 S24F24 实验组饥饿胁迫处理后产卵量在前两天显著高于对照组，随着天数的增加慢慢与对照组持平，可能是因为饥饿胁迫处理后，S24F24 处理组脂肪酸含量显著增加。脂肪酸结合蛋白（FABP）作为细胞内脂肪酸的载体蛋白（Ye *et al.*，2022），在脂肪酸的吸收、转运及代谢等方面具有非常重要的作用(蒋金津等，2009)。脂肪酸及脂质代谢产物的变化为卵母细胞的成熟及胚胎发育提供了充足的能量（Liu *et al.*，2022），维持了生物体内的能量稳态，所以在前两天柑橘全爪螨的每雌每日产卵量与对照相比显著增加；而 S48 实验组当食物资源被剥夺时，脂质代谢失衡（Stucki *et al.*，2019），柑橘全爪螨通过部署较低的免疫防御降低机体内的代谢活性减少能量消耗，从而降低生殖能力帮助自身度过艰难时期（Rion and Kawecki，2007）。

综上所述，本研究成功克隆了柑橘全爪螨脂肪酸结合蛋白 FABP 基因全长，并对其在饥饿胁迫下的响应进行了研究。柑橘全爪螨对饥饿胁迫的响应可能通过 FABP 基因的表达调控进而参与脂质的吸收与利用，从而影响自身的生长发育。本研究将为后续研究 FABP 基因的生理功能的探究提供基础，并有助于进一步理解柑橘全爪螨当面临外界环境变化时的适应机制。

## 参考文献 (References)

Amiri M, Yousefnia S, Forootan FS, Peymani M, Ghaedi K, Esfahani

MHN, 2018. Diverse roles of fatty acid binding proteins (FABPs) in development and pathogenesis of cancers. *Gene*, 676: 171–183.

Chen JQ, Zou X, Zhu WX, Duan YW, Merzendorfer H, Zhao ZG, Yang Q, 2022. Fatty acid binding protein is required for chitin biosynthesis in the wing of *Drosophila melanogaster*, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 149: 103845.

Duah M, Zhang KX, Liang YW, Ayarick VA, Xu KL, Pan D, 2023. Immune regulation of poly unsaturated fatty acids and free fatty acid receptor 4. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 112: 109222.

Dunning KR, Russell DL, Robker RL, 2014. Lipids and oocyte developmental competence: The role of fatty acids and β-oxidation. *Reproduction*, 148(1): R15–R27.

Hagopian K, Munday MR, 1997. The role of pyruvate dehydrogenase, phosphofructo-1-kinase and acetyl-CoA carboxylase in the regulation of fatty acid synthesis in the lactating rat mammary gland during the starved to re-fed transition. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1336(3): 474–484.

Hansen M, Flatt T, Aguilaniu H, 2013. Reproduction, fat metabolism, and life span: What is the connection? *Cell Metabolism*, 17(1): 10–19.

Ho SS, Keenan JI, Day AS, 2020. The role of gastrointestinal-related fatty acid-binding proteins as biomarkers in gastrointestinal diseases. *Digestive Diseases and Sciences*, 65(2): 376–390.

Huang ZQ, Zhou DH, Gao GP, Zheng SC, Feng QL, Liu L, 2012. Cloning and characterization of a midgut-specific fatty acid binding protein in *Spodoptera litura*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 79(1): 1–17.

Jang S, Choi B, Lim C, Lee B, Cho KS, 2022. Roles of *Drosophila* fatty acid-binding protein in development and behavior. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 599: 87–92.

Jiang JJ, Chen LX, Zou ZD, 2009. Research progress of fatty acid binding protein. *Animal Husbandry and Feed Science*, 30(2): 6–8. [蒋金津, 陈立祥, 邹增丁, 2009. 脂肪酸结合蛋白的研究进展. 畜牧与饲料科学, 30(2): 6–8.]

Liu T, Qu JX, Tian MY, Yang R, Song XL, Li R,Yan J, Qiao J, 2022. Lipid metabolic process involved in oocyte maturation during folliculogenesis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10: 806890.

Rion S, Kawecki TJ, 2007. Evolutionary biology of starvation resistance: What we have learned from *Drosophila*. *Journal of Evolutionary Biology*, 20(5): 1655–1664.

Ren SW, Zhao J, Liu N, Nigati D, Liu XN, 2019. Cloning and expression of fatty acid binding protein of *Helicoverpa armigera*. *Journal of Plant Protection*, 46(3): 522–529. [任苏伟, 赵洁, 刘宁, 尼加提·迪里木拉提, 刘小宁, 2019. 棉铃虫脂肪酸结合蛋白的克隆与表达. 植物保护学报, 46(3): 522–529.]

Sanjeeva R, David Q, Ahmed SA, Jutta RH, Norbert HH, 2019. Effects of FABP knockdown on flight performance of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *The Journal of Experimental Biology*, 222(21): jeb203455.

Sokolova IM, Frederich M, Bagwe R, Lannig G, Sukhotin AA, 2012. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Marine Environmental Research*, 79: 1–15.

Storch J, McDermott L, 2009. Structural and functional analysis of fatty acid-binding proteins. *Journal of Lipid Research*, 50: S126–S131.

Stucki D, Freitak D, Bos N, Sundström L, 2019. Stress responses upon starvation and exposure to bacteria in the ant *Formica exsecta*. *PeerJ*, 7: e6428.

Tufail M, Takeda M, 2008. Molecular characteristics of insect vitellogenins. *Journal of Insect Physiology*, 54(12): 1447–1458.

Wang XF, 2009. Biological characteristics of citrus red mites and corresponding measures to control. *Shaanxi Forest Science and Technology*, 2009(3): 86–87. [汪学富, 2009. 柑桔红蜘蛛生物学特性及防治对策. 陕西林业科技, 2009(3): 86–87.]

Wen GZ, 2011. Technical measures to restore citrus yellowing tree. *Fruit Growers'Friend*, 2011(6): 38. [温桂章, 2011. 恢复柑橘黄化树的技术措施. 果农之友, 2011(6): 38.]

Xu NC, Lang GL, Liu LF, 2003. Occurrence regularity and control measures of *Panonychus citri*. *Plant Protection Technology and Extension*, 23(9): 22–23. [徐南昌, 郎国良, 刘立峰, 2003. 柑橘全爪螨发生规律及防治措施. 植保技术与推广, 23(9): 22–23.]

Ye QY, Li ZX, Chen QL, Sun MX, Yin ML, Lin T, 2022. Fatty acid-binding protein gene is indispensable for molting process in *Heortia vitessoides* (Lepidoptera: Crambidae). *Journal of Integrative Agriculture*, 22(2): 495–504.

Yu XL, Kang MJ, Liu L, Guo XQ, Xu BH, 2013. Identification and expression analysis of a putative fatty acidbinding protein gene in the asian honeybee, *Apis cerana cerana*. *Journal of Insect Science*, 13(101): 1–14.

Zhang Z, Feng HD, Qin GM, Cui P, 2017. Advances in pesticide control of *Panonychus citri*. *Agriculture and Technology*, 37(12): 64–65. [张振, 封海东, 秦光明, 崔鹏, 2017. 柑橘全爪螨药剂防治研究进展. 农业与技术, 37(12): 64–65.]