应用昆虫学报 *Chinese Journal of Applied Entomology* 2016, 53(3): 456−462. DOI: 10.7679/j.issn.2095−1353.2016.060

水稻与茶树害虫化学生态调控专栏

水稻螟虫神经肽 PBAN 及其受体序列的生物信息学分析*

常菊花[1**] 何月平[2***]

(1. 长江大学生命科学学院，荆州 434025；2. 华中农业大学植物科学技术学院，武汉 430070)

摘 要 **【目的】** 性信息素合成激活肽（PBAN）是控制昆虫产生性信息素的激素，本文旨在分析水稻螟虫神经肽 PBAN 及其受体的序列。**【方法】** 通过 tBlastn 同源检索从水稻螟虫基因组和转录组数据库中鉴定水稻螟虫 PBAN 神经肽及其受体序列，在此基础上进行序列比对及系统发生分析。**【结果】** 发现二化螟 *Chilo suppressalis*、三化螟 *Tryporyza incertulas* 和大螟 *Sesamia inferens* 的 PBAN 成熟肽序列均含有 33 个氨基酸残基，其 C 端五肽序列完全相同，3 种水稻螟虫 PBAN 多肽相似度为 54.55%~63.64%；发现二化螟 PBAN 受体 3 个异构体全长氨基酸序列（PBANR-A、PBANR-B 和 PBANR-C），均含有 7 个跨膜区域。**【结论】** 进化树分析发现不同昆虫 PBAN 神经肽及其受体存在一定的保守性和多样性，并且在进化树上的位置几乎与昆虫系统发育分类一致，推测 PBAN 神经肽和 PBAN 受体在昆虫系统进化过程中可能存在协同进化现象。本研究为水稻螟虫 PBAN 神经肽及其受体的结构和功能分析提供基础。

关键词 水稻螟虫，性信息素合成激活肽，神经肽受体，进化树分析

Bioinformatic analysis of PBAN and its receptor proteins in rice stem borers

CHANG Ju-Hua[1**] HE Yue-Ping[2***]

(1. College of Life Science, Yangtze University, Jingzhou 434025, China; 2. College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract **[Objectives]** To determine the amino acid sequences of pheromone biosynthesis activating neuropeptide (PBAN), a hormone that controls the synthesis of insect sex pheromones, and its receptor proteins, in rice stem borers. **[Methods]** We used tBlastn searching of the rice pest genome and transcriptome databases to predict sequences of PBAN and its receptors in rice stem borers after which sequences were aligned and a phylogenetic tree constructed. **[Results]** The mature peptide sequences of PBAN in the rice stem borers, *Chilo suppressalis*, *Tryporyza incertulas* and *Sesamia inferens*, contain 33 amino acid residues, and have the same five peptide sequences in the C-terminal. The similarity of PBAN polypeptides in these three insects was 54.55%-63.64%. The sequences of three isoforms of the PBAN receptor (PBANR-A, PBANR-B and PBANR-C) in *C. suppressalis* were predicted from the *C. suppressalis* transcriptome database. All three isoforms contain seven transmembrane regions. **[Conclusion]** Phylogenetic analysis based on between-species variation in PBAN confirms the established taxonomic relationships among rice stem borer species. The phylogenetic relationships between the PBANs of different rice stem borers, or their receptors, are almost identical to the established phylogenetic relationships between these insects, suggesting co-evolution between insect PBAN, and its receptors, during the process of insect evolution. This study provides a basis for analyzing the function of PBAN, and its receptors, in rice stem borers.

Key words rice stem borers, PBAN, neuropeptide receptor, phylogenetic tree

*资助项目 Supported projects：公益性行业(农业)科研专项(201403030)

**第一作者 First author，E-mail：Juhua1756@163.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：heyp@mail.hzau.edu.cn

收稿日期 Received：2016-04-19，接受日期 Accepted：2016-04-30

昆虫性信息素是昆虫释放到体外用来吸引异性的信息素。利用昆虫性信息素是有效监测和防治多种害虫的重要方法之一，具有灵敏度高、选择性强及不造成环境污染等许多优点，在害虫绿色防控方面具有极大的潜力。性信息素合成激活肽 (Pheromone biosynthesis activating neuropeptide，PBAN）是在昆虫中发现的一类促进性信息素腺体合成和释放性信息素的重要神经肽。1989 年，首次从谷实夜蛾 *Helicoverpa zea* 中分离纯化出 PBAN（Raina *et al.*，1989），随后又分别从不同种类昆虫中发现和纯化出多种 PBAN 分子，此类神经肽多数是由 33 个氨基酸组成，有较高的同源性，在 C 末端有一个相同的五肽序列（FSPRL-NH_2），该序列是维持 PBAN 促性信息素生物合成活性所必须具备的最小片段，改变或缺少一个氨基酸，将明显降低其生物学活性（Nagasawa *et al.*，1994）。PBAN 由昆虫咽下神经节分泌，通过心侧体释放到血淋巴，直接作用于性信息素腺体细胞膜上的受体，刺激信息素的产生，或者通过腹神经索（VNC）运输到腹末端神经节，然后再起作用。近年来国内外对神经肽 PBAN 对性信息素合成调控机制进行了大量而深入的研究，不但从细胞和分子水平上更深入地揭示了 PBAN 对性信息素产生机制的精确调控作用；同时也为更好地根据性信息素合成调控机制来有效控制害虫提供了理论指导，具有非常重要的理论意义和应用价值。

水稻螟虫是我国水稻的重要害虫，是制约我国水稻产业发展的重要因素之一。水稻螟虫的防控目前仍离不开化学防治，但是害虫抗药性问题和农药环境安全问题已引起高度重视。例如高毒有机磷农药被全面停用、高生态风险品种氟虫腈在水田被禁用、水稻螟虫对常用杀虫剂产生较高水平抗性（He *et al.*，2013）。因此，目前针对水稻螟虫的防治，在提倡和强调“预防为主”、“绿色防控”和“农药减量防控”等综合治理方针理念的同时，迫切需要开发出对环境友好、高选择性的防虫技术或产品。

昆虫神经肽是在昆虫生长发育过程中必不可少的多肽类调控因子。基于昆虫神经肽信号途径，有可能挖掘出可作为害虫防治的新型杀虫靶标（Verlinden *et al.*，2014）。昆虫神经肽具有多样性和特异性，有些神经肽只在昆虫或节肢动物中发现，例如 PBAN。这些神经肽的特异性和多样性给基于神经肽的高选择性杀虫靶标或分子的研发带来可能。鉴于目前尚无有关水稻螟虫 PBAN 的任何报道，本文基于现有水稻螟虫基因组和转录组数据库，根据已报道的昆虫 PBAN 神经肽及其受体序列，通过同源检索来查找水稻螟虫 PBAN 神经肽及其受体的序列，并构建进化树进行分析，为水稻螟虫 PBAN 神经肽及其受体的结构和功能分析提供理论基础。

1　材料与方法

1.1　昆虫神经肽 PBAN 及其受体氨基酸序列的查找

将已报道的谷实夜蛾 *H. zea* 等鳞翅目昆虫 PBAN 神经肽前体（前体肽）及 PBAN 神经肽受体的氨基酸序列作为参照，在二化螟基因组和转录组数据库（ChiloDB，http://ento.njau.edu.cn/ChiloDB/）和水稻害虫转录组数据库（http://rptdb.hzau.edu.cn/）中采用 tBlastn 查找水稻螟虫可能的 PBAN 及其受体基因序列。采用 ExPASy 网站的翻译工具（http://web.expasy.org/translate/）对前体基因序列进行翻译，并手工逐一核对活性肽序列的同源性。

另外，在 NCBI 数据库（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/）、昆虫基因组和转录组资源库（http://www.insect-genome.com/）中采用 tBlastn 查找其它昆虫可能的 PBAN 前体基因序列，用于多序列比对和进化树构建。

1.2　神经肽成熟肽预测

利用在线程序 SignalP 4.1（http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/）进行神经肽前体序列的信号肽预测，PBAN 前体肽的切割位点根据 Veenstra（2000）提供的信息以及与已知鳞翅目昆虫 PBAN 神经肽前体加工程序和成熟肽的同源性进行预测。

1.3 神经肽受体的跨膜螺旋结构分析

利用 CBS 中的 TMHMM Server（http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/）程序对 PBAN 神经肽受体的氨基酸序列进行跨膜结构预测。

1.4 多重序列比对和系统进化树构建

利用 EMBL-EBI 在线程序 ClustalW2（http://www. ebi.ac.uk/Tools/msa/ clustalw2/）对蛋白序列进行多序列比对分析，利用 BioEdit 软件输出。使用 MEGA5 软件中的邻接法（Neighbor-Joining）对蛋白序列构建系统进化树。其中，程序的重复次数（Number of bootstrap replications）设为 1 000，替换方法（Substitution method）选择 p-distance，空缺数据的处理方法（Gap data treatment）选择 95% Partial deletion，其他参数采用默认设置。

2 结果与分析

2.1 水稻螟虫 PBAN 神经肽序列预测及分析

在 NCBI 数据库查找到二化螟的 PBAN 神经肽前体序列（NCBI 登录号：gi|946724924），该基因 mRNA 全长 CDS 序列长度为 851 bp，编码 196 个氨基酸（图 1）。二化螟 PBAN 前体肽含有 22 个氨基酸的信号肽，可编码 5 个多肽，它们都属于 FXPRL 家族，分别为 PBAN 成熟肽（33 个氨基酸）、滞育激素（Diapause hormone，DH，27 个氨基酸）、α-SGNP（7 个氨基酸）、β-SGNP（21 个氨基酸）和 γ-SGNP（9 个氨基酸）。

根据二化螟 PBAN 前体肽氨基酸序列，在水稻害虫转录组数据库（http://rptdb.hzau.edu.cn/）中进行 tBlastn 检索，预测到三化螟和大螟的可能 PBAN 前体肽序列（编号分别为 TI43027 和 SI11093），在编码的氨基酸序列中均发现了具有 33 个氨基酸的 PBAN 成熟肽序列（图 1）。3 种水稻螟虫的 PBAN 成熟肽的 C 端五肽序列完全相同（-FSPRL-NH2）。

利用 MEGA5 的邻接法对已知或预测的 43 种完全变态类昆虫的 PBAN 前体肽氨基酸序列进行多序列比对，并构建系统进化树（图 2）。发现鳞翅目和双翅目 PBAN 前体肽在一个进化分支上，鞘翅目和膜翅目 PBAN 前体肽在另一个进化分支上。其中二化螟与另两种螟蛾科昆虫豆野螟 *Maruca vitrata* 和竹蠹虫 *Omphisa fuscidentalis* 在进化树上相邻。由于预测的三化螟和大螟 PBAN 前体肽氨基酸序列不是全长序列，所以未进行进化树构建。

将 3 种水稻螟虫的 PBAN 成熟肽序列与已知或预测的 20 种鳞翅目昆虫 PBAN 成熟肽序列进行多序列比对和进化树分析（图 3），发现鳞翅目昆虫 PBAN 除了 C 端五肽非常保守之外，其它大部分氨基酸残基存在较高多样性。其中夜蛾科 *Noctuidae* 的 PBAN 非常保守，73.5%（25/34）的肽段氨基酸残基完全一致；而螟蛾科 *Crambidae* 的 PBAN 多肽相似度很低，仅 21.6%（8/37）的氨基酸残基相同。二化螟和三化螟的 PBAN 多肽与螟蛾科的豆野螟 *M. vitrata* 和竹蠹虫 *O. fuscidentalis* 的 PBAN 多肽相邻，而大螟

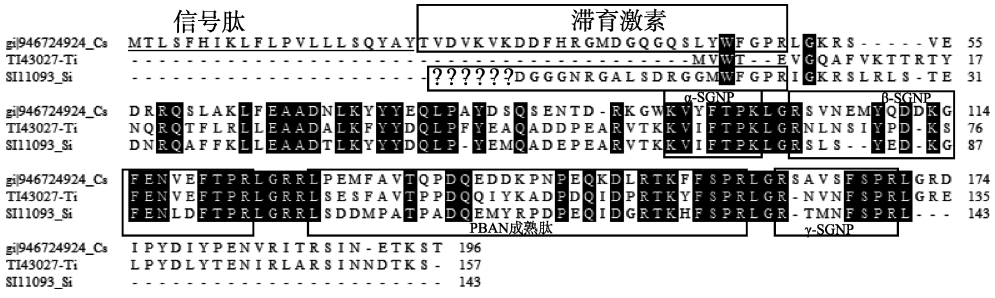

图 1 预测的 3 种水稻螟虫 PBAN 前体肽氨基酸序列

Fig. 1 The amino acid sequences of the predicted PBAN precursors of three rice stem borers

加下划线氨基酸残基为信号肽，加文本框的氨基酸残基为成熟肽。Cs：二化螟；Ti：三化螟；Si：大螟。

The amino acid residues sequence with the underline is signal peptide, and those in textboxes are mature peptides. Cs: *Chilo suppressalis*; Ti: *Tryporyza incertulas*; Si: *Sesamia inferens*.

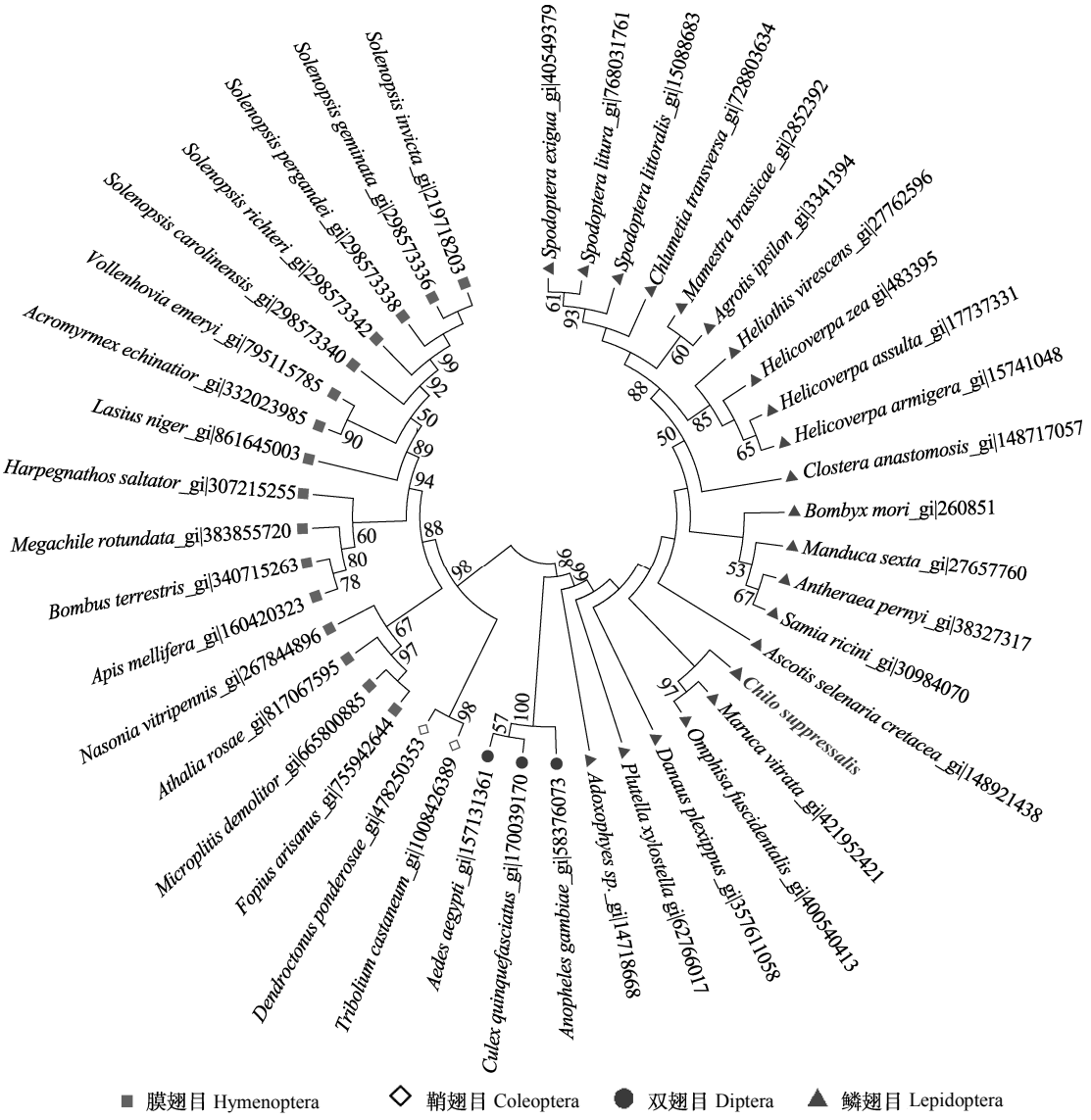

图 2　昆虫 **PBAN** 前体肽序列的系统进化树构建

Fig. 2　The phylogenetic tree of the insect PBAN precursor proteins

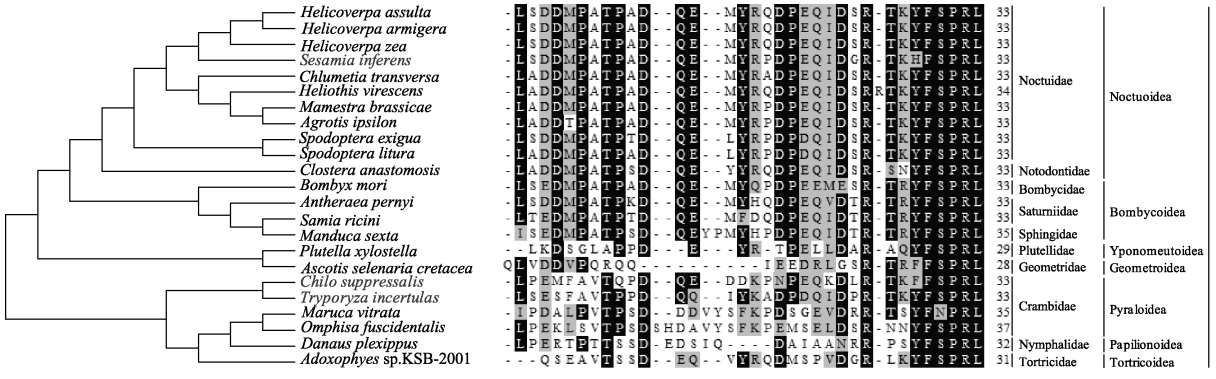

图 3　鳞翅目昆虫 **PBAN** 成熟肽序列比对和进化树分析

Fig. 3　Alignment and evolutionary relationships of PBAN amino acid sequences from Lepidoptera insects

PBAN 多肽在夜蛾科昆虫进化分支上。3 种水稻螟虫 PBAN 多肽相似度为 54.55%~63.64%。

2.2 二化螟神经肽 PBAN 受体序列分析

在 NCBI 数据库中查找到二化螟神经肽 PBAN 受体的两个异构体的全长氨基酸序列(NCBI 登录号分别为 gi|948562258 和 gi|948562256)，分别编码 346 和 472 个氨基酸。另外根据二化螟这两个异构体序列和其它鳞翅目昆虫（如玉米螟）的 PBAN 受体序列，在二化螟基因组和转录组数据库(ChiloDB，http://ento. njau.edu.cn/ChiloDB/)中进行 tBlastn 查找，预测出第 3 个异构体的全长序列（415 个氨基酸），命名为 isoform C。利用 TMHMM 程序进行预测，发现二化螟 PBAN 神经肽受体 3 种异构体均含有 7 个跨膜区域（图 4)。

利用 MEGA5 的邻接法对已知或预测的 48 种完全变态类昆虫 Pyrokinin/PBAN 神经肽受体家族的氨基酸序列进行多序列比对，并构建系统进化树（图 5)。发现鳞翅目 PBAN 受体和双翅目 Pyrokinin 受体在一个进化分支上，鞘翅目和膜翅目 Pyrokinin 受体在另一个进化分支上。其中二化螟 *C. suppressalis* 与玉米螟 *Ostrinia nubilalis* 的 PBAN受体序列在进化树上相邻，二化螟PBANR-A 和玉米螟 PBANR-A 序列相似度为 79.53%。

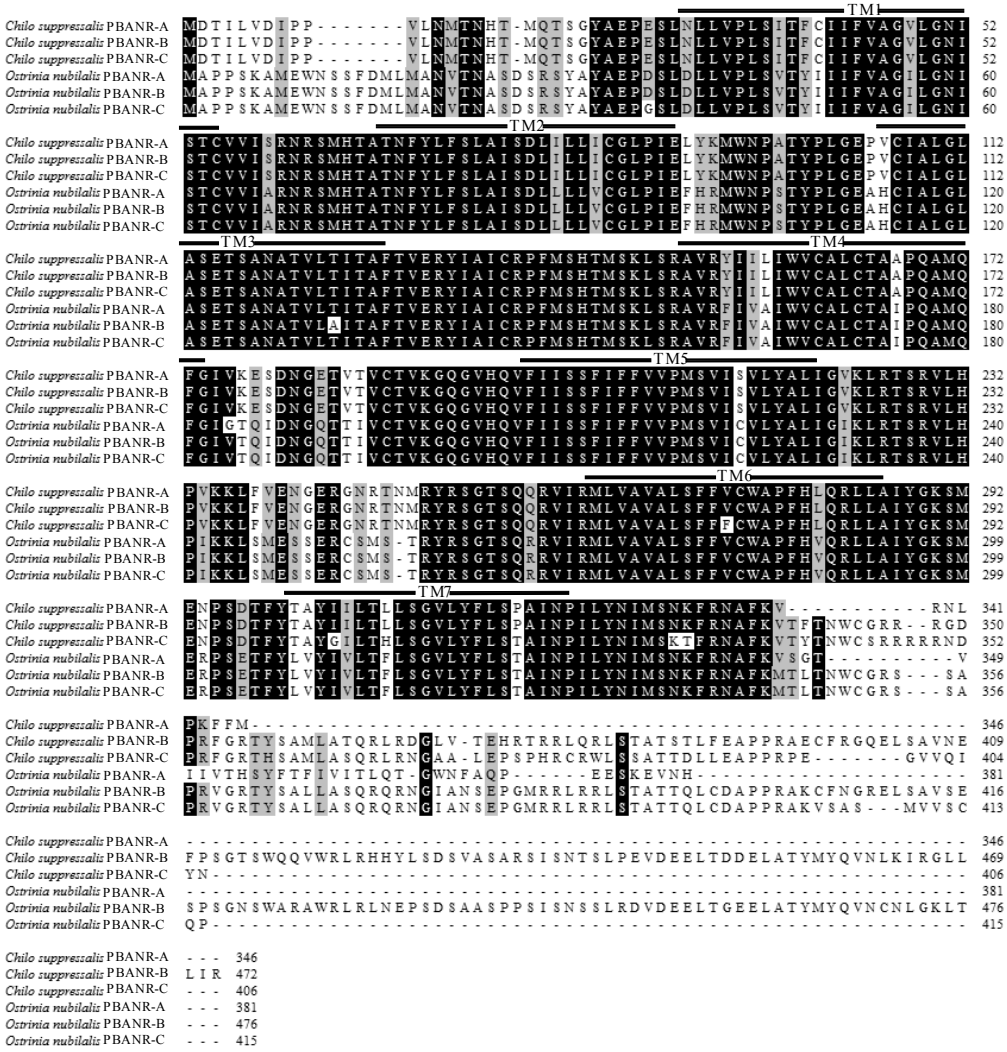

图 4 二化螟和玉米螟 **PBAN** 受体氨基酸序列比对

Fig. 4 Alignment of amino acid sequences of PBAN receptors from *Chilo suppressalis* and *Ostrinia nubilalis*

TM1~TM7 表示 7 个跨膜区域。

TM1-TM7 mean seven transmembrane regions.

图 5　昆虫 Pyrokinin/PBAN 神经肽受体家族蛋白序列的系统进化树构建

Fig. 5　The phylogenetic tree of the insect Pyrokinin/PBAN receptor family proteins

根据二化螟 PBAN 受体序列在水稻害虫转录组数据库中进行 TBLASTN，未能成功预测出三化螟或大螟 PBAN 受体的全长序列，只发现一些小片段相似度较高。因此本文未对三化螟和大螟的 PBAN 神经肽受体序列进行分析。

3　讨论

由于神经肽在昆虫体内含量很低，因此昆虫神经肽分离工作进展迟缓，随着结构鉴定技术和肽分离技术的发展，鉴定的神经肽数目大大增加。目前，基因组学的发展和生物信息分析技术突飞猛进，为神经肽基因快速筛查奠定了良好的基础。本文通过在 NCBI 数据库和转录组数据库中搜索，成功查找或预测出二化螟 PBAN 前体肽和受体的全长序列，以及二化螟、三化螟和大螟 PBAN 的成熟肽序列。PBAN 是控制昆虫产生性信息素的激素，是某一物种在长期的进化过程中适应环境及自然选择的进化产物，因此研究 PBAN 及其受体的进化对于物种间的进化具有一定的参考价值。通过水稻螟虫和其它昆虫的 PBAN 前体肽、成熟肽及受体的序列比对和进化树分析，发现无论昆虫 PBAN 前体肽和成熟肽，

还是昆虫 PBAN 受体在进化树上位置几乎与昆虫系统发育分类一致，例如二化螟 PBAN 神经肽及其受体序列与其它螟蛾科昆虫 PBAN 及其受体序列亲缘关系较近，大螟 PBAN 成熟肽序列与其它夜蛾科昆虫 PBAN 成熟肽序列亲缘关系较近。推测 PBAN 神经肽和 PBAN 受体在昆虫系统进化过程中可能存在协同进化现象。在协同进化中不同物种呈现出 PBAN 及其受体的保守性及变异性，给基于 PBAN 及其受体的高选择性绿色防控分子的开发带来可能。

PBAN 在进化上具有一定的保守性及变异性（Raina *et al.*，1989）。Nagasawa 等（1994）的研究表明，PBAN C 端的 5 个氨基酸 FXPRL 是家蚕 PBAN 的活性中心，改变或缺少一个氨基酸，生物活性大为降低；反之，N 端减少或改变多个氨基酸，生物活性虽有下降，但下降很少。本文结果表明鳞翅目昆虫 PBAN 除了 C 端五肽非常保守之外，其它大部分氨基酸残基存在较高多样性，夜蛾科之间较保守，而螟蛾科等多样性高。水稻螟虫等鳞翅目昆虫 PBAN 具有的保守性和多样性，为开发高选择性、强专一性或广谱性的 PBAN 类似物用于害虫绿色防控提供了很好的思路（Nachman，2014）。

与 PBAN 结合的受体已经证明是 G 蛋白偶联受体（GPCR）家族成员（Rafaeli and Gileadi，1996）。目前已在多种鳞翅目昆虫中都发现了这种受体，如家蚕 *Bombyx mori*（Hull *et al.*，2004）、小菜蛾 *Plutella xylostella*（Lee and Boo，2005）、谷实夜蛾 *Helicoverpa zea*（Choi *et al.*，2006）、海灰翅夜蛾 *Spodoptera littoralis*（Zheng *et al.*，2007）、玉米螟 *O. nubilalis*（Nusawardani *et al.*，2013）等。PBAN 受体也具有非常高的保守性，例如棉铃虫和烟青虫 PBAN 受体 mRNA 序列的同一性高达 98%（Rafaeli *et al.*，2007），又如本文中二化螟 PBANR-A 和玉米螟 PBANR-A 氨基酸序列的相似度为 79.53%。PBAN 受体的鉴定及功能研究为基于 PBAN 受体开发肽类或非肽类 PBAN 合成激活剂或抑制剂提供基础。本文通过对水稻螟虫 PBAN 神经肽及其受体序列的查找预测及进化树分析，为水稻螟虫 PBAN 调控性信息素合成和产生的机制研究提供基础，也为绿色防控水稻螟虫的新型高选择性杀虫靶标或分子的开发提供思路。

参考文献 (References)

Choi MY, Jurenka RA, 2006. Role of extracellular ca^{2+} and calcium channel activated by a g protein-coupled receptor regulating pheromone production in *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of the Entomological Society of Amer*ica, 99(5): 905–909.

He Y, Zhang J, Gao C, Su J, Chen J, Shen J, 2013. Regression analysis of dynamics of insecticide resistance in field populations of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae) during 2002–2011 in China. *Journal of Economic Entomology*, 106(4): 1832–1837.

Hull JJ, Ohnishi A, Moto K, Kawasaki Y, Kurata R, Suzuki MG, Matsumoto S, 2004. Cloning and characterization of the pheromone biosynthesis activating neuropeptide receptor from the silkmoth, *Bombyx mori*. Significance of the carboxyl terminus in receptor internalization. *Journal of Biological Chemistry*, 279(49): 51500–51507.

Lee DW, Boo KS, 2005. Molecular characterization of Pheromone biosynthesis activating neuropeptide from the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *Peptides*, 26(12): 2404–2411.

Nachman RJ, 2014. Peptidomics applied: A new strategy for development of selective antagonists/agonists of insect pyrokinin (FXPRLamide) family using a novel conformational-mimetic motif. *EuPA Open Proteomics*, 3:138–142.

Nagasawa H, Kuniyoshi H, Arima R, Kawano T, Ando T, Suzuki A, 1994. Structure and activity of *Bombyx* PBAN. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 25(4): 261–270.

Nusawardani T, Kroemer JA, Choi MY, Jurenka RA, 2013. Identification and characterization of the pyrokinin/pheromone biosynthesis activating neuropeptide family of G protein-coupled receptors from *Ostrinia nubilalis*. *Insect Molecular Biology*, 22(3): 331–340.

Rafaeli A, Bober R, Becker L, 2007. Spatial distribution and differential expression of the PBAN receptor in tissues of adult *Helicoverpa* spp. (Lepidoptera: Noctuidae). *Insect Molecular Biology*, 16(3): 287–293.

Rafaeli A, Gileadi C, 1996. Down regulation of Pheromone biosynthesis: cellular mechanisms of Pheromonostatic responses. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 26(8/9): 797–807.

Raina AK, Jaffe H, Kempe TG, Kiem P, Blacher RW, Fales HM, Riley CT, Klun JA, Ridgway RL, Hayes DK, 1989. Identification of a neuropeptide hormone that regulates sex pheromone production in female moths. *Scie*nce, 244(4906): 796–798.

Veenstra J, 2000. Mono- and dibasic proteolytic cleavage sites in insect neuroendocrine peptide precursors. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 43(2): 49–63.

Verlinden H, Vleugels R, Zels S, Dillen S, Lenaerts C, Crabbé K, Spit J, VandenBroeck J, 2014. Receptors for neuronal or endocrine signalling molecules as potential targets for the control of insect pests. *Advances in Insect Physiology*, 46(4): 167–303.

Zheng L, Lytle C, Njauw C, 2007. Cloning and characterization of the pheromone biosynthesis activating neuropeptide receptor gene in *Spodoptera littoralis* larvae. *Gene*, 393(1): 20–30.