

柑橘木虱速激肽相关肽基因 *Dc-TRP* 克隆及表达分析*

宾淑英** 康 聪 莫斯维 舒本水 吴仲真 林进添***

(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, 并根据核苷酸序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** KANG Cong MO Si-Wei SHU Ben-Shui
WU Zhong-Zhen LIN Jin-Tian***

(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 and adult tissues. Although there was no significant difference in expression among 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. 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

*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)

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

***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、高效氯氟菊酯等。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 *Leucophaea 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* 进行干扰后会对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: 12D。

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™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 以及定量反转录试剂盒 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 均购于 TAKARA 公司, DH5 α 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™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 操作说明, 以 Oligo (dT) 引物合成第一链 cDNA, 根据 PrimeScript™ 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

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-Actin1* 序列设计定量引物, 分别命名为 *qDc-TRP-F/qDc-TRP-R* 和 *qDc-Act1-F/qDc-Act1-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
<i>Dc-TRP-F</i>	ATGAACCTTCCTGTGGTTGG
<i>Dc-TRP-R</i>	TCAGTTGTCTGCCGAGTG
<i>qDc-TRP-F</i>	TGAACCTTCCTGTGGTTGGGA
<i>qDc-TRP-R</i>	GCGCTCGTTTGGATTCGTAG
<i>qDc-Act1-F</i>	TGTGACGAAGAAGTTGCTGC
<i>qDc-Act1-R</i>	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: $10 \times$ LA Taq 聚合酶反应缓冲液 (含 Mg^{2+}) 5 μ L, *Dc-TRP-F* 和 *Dc-TRP-R* 1 μ L, dNTP (2.5 mmol/L) 2 μ L, cDNA 模板 1 μ L, LA Taq DNA 聚合酶 0.5 μ L, 加 ddH₂O 补足 50 μ L, 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; 16 ∞ 。PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。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 DH5 α , 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 1 000 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™ 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 μ L, q*Dc-TRP*-F/q*Dc-TRP*-R 和 q*Dc-Act1*-F/q*Dc-Act1*-R 各 0.8 μ L, cDNA 1 μ L, 加

ddH₂O 补足 20 μ L, 震荡混匀, 简短离心后进行 RT-qPCR 反应。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 变性 3 min; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 10 s, 72 $^{\circ}$ C 10 s 45 个循环; 最后熔解曲线步骤为 95 $^{\circ}$ C 5 s, 65 $^{\circ}$ C 1 min, 40 $^{\circ}$ C 30 s。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 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)。

```

1  ATGAAGTTCCTGTGGTGGGATGCTTGTGGCTCGCTACTGTCAICAGTGTGACGTCACTC
1  M N F L W L G C L W L A T V I S V T S S

61  CAGGACACAGACAAGCGGGCGCCAAACCGAACGCTTTTGCCGCCATGCGAGGCAAGAAA
21  Q D T D K R A P K P N A F A A M R G K K

121  GACTTTGACTACGACTCAGTTTCTATTATGACAAGCGAGTGCCCATGGGATTTGCAGGT
41  D F D Y D S G F Y Y D K R V P M G F A G

181  GTAAGAGGAAAGAAGTTATCGGATGACTATTCTTCAITCTACGAATCCAAACGAGCGCTT
61  V R G K K L S D D Y S S F Y E S K R A P

241  TCTCGGAGCTTCTTCGCTGTCAAAGGGAAGCGGGAAGTGTCTACGCCAGACTTGTCCAGT
81  S R S F F A V K G K R E L L T P D L S S

301  CTCCTGGATGACATTCAAGTCCCGGACATGGACAAGCGGGCCCCGGCCAGATTTTTCGGC
101  L L D D I Q V P D M D K R A P A R F F G

361  ATGCGGGGCAAGAAAGGCCCGTGTGCGCAGAGCTTCTTTGGTATGCGGGGCAAGAAGGAT
121  M R G K K G P S S Q S F F G M R G K K D

421  TACGATCTGGAACCGTACTGGTATTCTAGAGCGGGGTACTCGGATGATCTTTCACAACCTT
141  Y D L E P Y W Y S R A G Y S D D L S Q L

481  CTGAACGTGTGAACGCCCGAGACACCCCACTGGTGTGAGCGAAGCGAGATGTTTCAGAT
161  L N V L N A P D T P T G R A K R D V S D

541  ATGCTTACGGCTAATTCTCTCGGCCTGTCTTCGCTTACAGCACTCGGCAGACAACCTGA
181  M L T A N S L G L S S P S Q H S A D N *

```

图 1 *Dc-TRP* 基因编码区序列及其对应的氨基酸序列

Fig. 1 The ORF region of *Dc-TRP* and the deduced amino acid sequence

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。

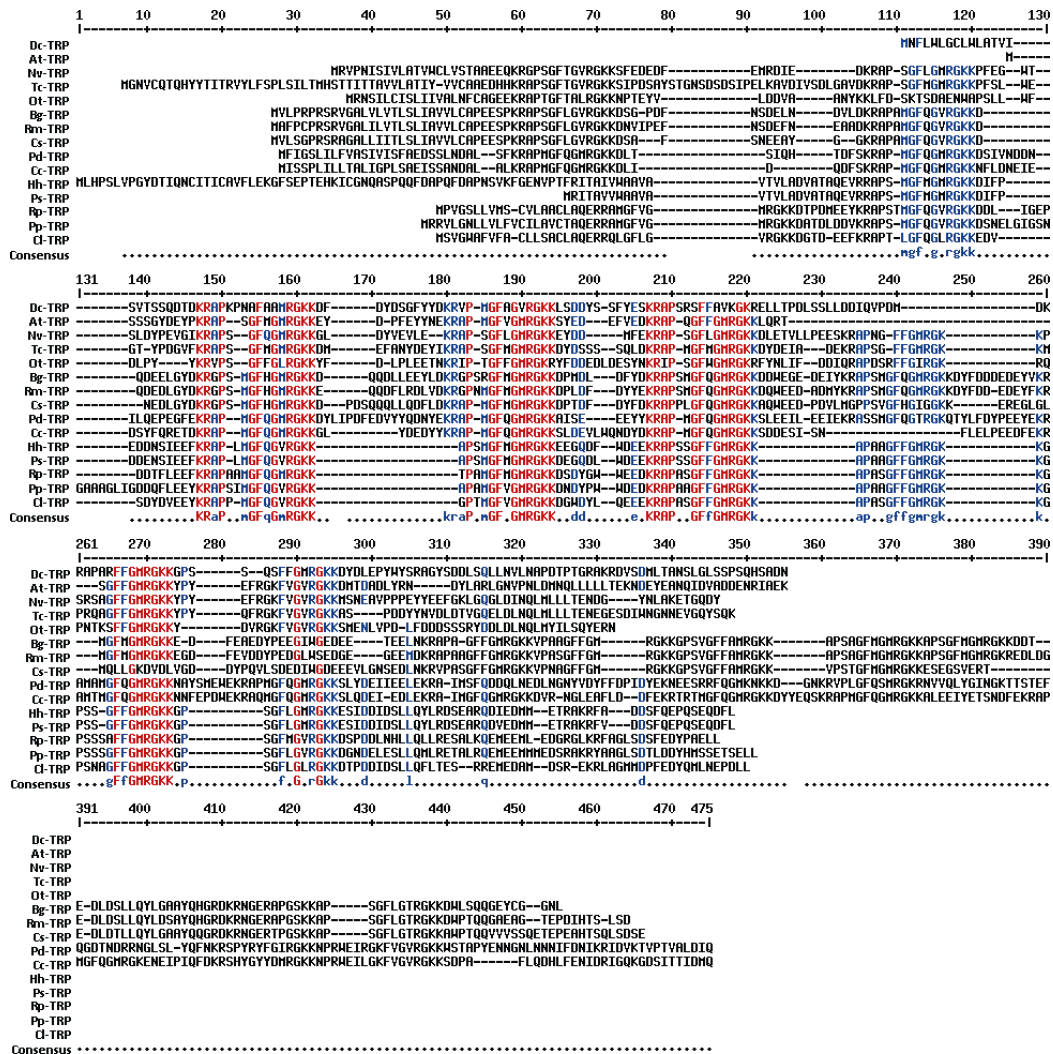


图 2 Dc-TRP 与其他物种 TRP 氨基酸多重序列比对结果

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: 蛻螂 *Onthophagus taurus* (XP_022916850.1), Bg-TRP: 德国小蠊 *Blattella germanica* (PSN47497.1), Rm-TRP: 马拉拉蜚蠊 *Rhyarobia 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: 茶翅蛾 *Halyomorpha halys* (XP_024216981.1), Ps-TRP: 小珀蜡象 *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

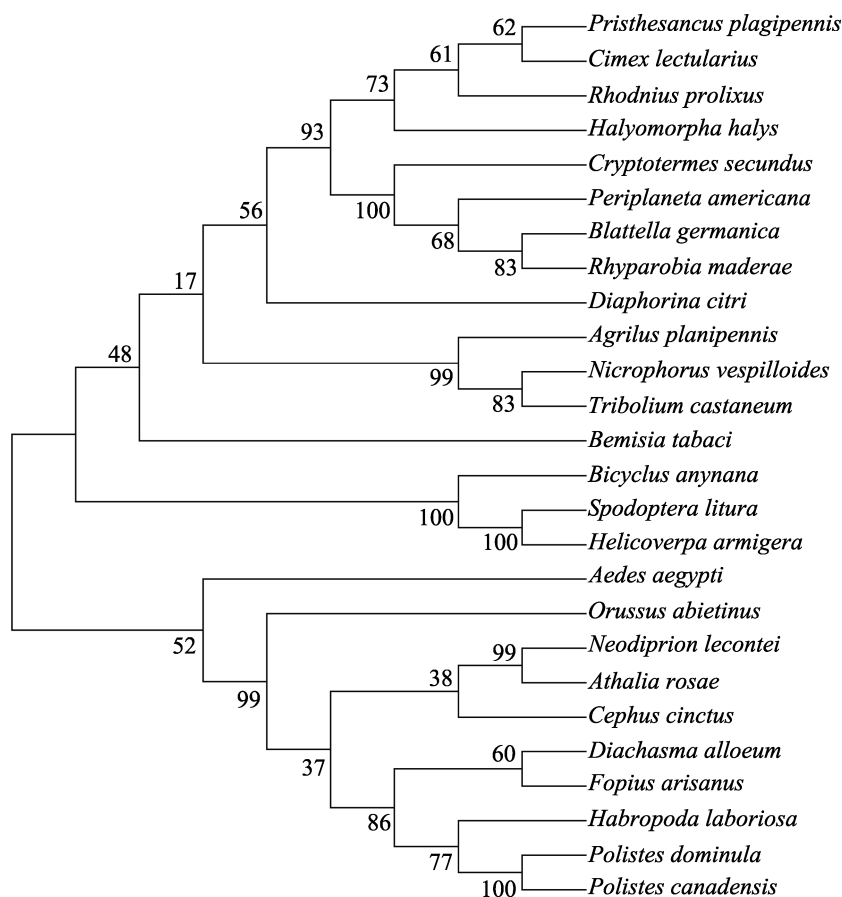


图 3 基于氨基酸序列构建的 *Dc-TRP* 与其他物种 TRP 系统进化树

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_017775699.1), 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), 阿里山潜蝇茧蜂 *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 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 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。

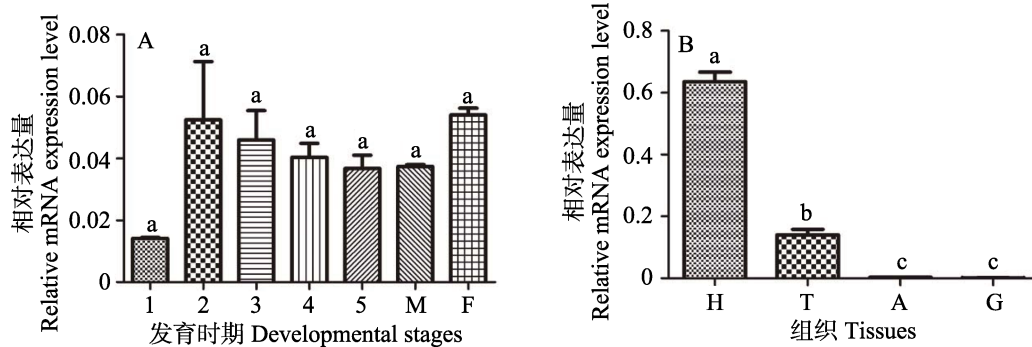


图 4 *Dc-TRP* 在柑橘木虱不同发育时期、不同组织中的 mRNA 水平表达情况

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 $\pm$ 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; 马德拉蜚蠊 *L. maderae* 则有 10 个速激肽成熟肽(李向梅等, 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, 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(Nassel, 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, Nassel 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, Dirksen H, Vullings HG, Cantera R, 1995. Evidence that locust tachykinin I is involved in release of adipokinetic hormone from locust *Corpora cardiaca*. *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. Locust tachykinin 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 *C. 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* tachykinin-related 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.