茶园抗性与敏感种群茶小绿叶蝉的 iTRAQ 蛋白质组学分析*

李良德** 刘丰静 李慧玲 李金玉 王定锋***

（福建省农业科学院茶叶研究所，福州 350012）

摘 要 **【目的】** 本研究旨在通过同位素标记相对和绝对定量（iTRAQ）技术，探索茶园中抗性种群（常规用药管理）与敏感种群（荒废未作管理）茶小绿叶蝉 *Empoasca flavescens* 之间的蛋白质组学差异，为后续茶小绿叶蝉的抗药性治理奠定理论基础。**【方法】** 采用随机多点的方式采集茶小绿叶蝉，利用蛋白纯化试剂盒对总蛋白进行提取与定量。通过 iTRAQ 标记试剂盒对总蛋白进行酶解与标记。通过高 pH-RPLC 与 RPLC-MS 技术对多肽进行分离与鉴定。通过 GO 分析（Gene ontology）方法，对差异蛋白的分子功能、生物过程和细胞位置进行分析。通过 KEGG Pathway 网站，对差异蛋白代谢通路进行注释。通过 STRING-DB 数据库，对差异蛋白的互作网络进行分析。最后，对差异显著的抗性相关蛋白酶进行了分析整理。**【结果】** 总蛋白提取结果显示，敏感与抗性种群的总蛋白含量分别为 728.23 μg 和 1 261.17 μg。抗性与敏感种群之间，共有 1 399 个蛋白发生了明显变化。其中，上调与下调达到 1.5 倍以上的分别为 101 个和 218 个。GO 分析结果显示，这 319 个差异蛋白具有离子结合蛋白、组成核糖体和氧化还原酶等功能，主要参与蛋白翻译、物质运输和小分子代谢过程，主要分布于细胞内膜、细胞质、核糖体和细胞核。KEGG 分析结果显示，319 个差异蛋白主要参与碳代谢、核糖体代谢和吞噬作用通路。STRING 分析结果显示，319 个差异蛋白通过多种路径相互调控。抗性相关蛋白酶整理结果显示，共有 3 个谷胱甘肽-*S*-转移酶（GSTs）、2 个细胞色素 P450 氧化酶（P450）、2 个超氧化物歧化酶（SOD）和 2 个过氧化物酶（POD）发生了明显变化。**【结论】** 抗性与敏感种群茶小绿叶蝉蛋白组差异明显，差异蛋白具有多种分子功能，分布于细胞各个位置，抗性种群对药剂的解毒酶活性多数强于敏感种群。

关键词 茶小绿叶蝉；抗性种群；敏感种群；蛋白质组学；解毒酶

iTRAQ proteomic analysis of insecticide resistant, and sensitive, populations of *Empoasca flavescens* (Hemiptera: Cicadellidae) from tea plantations

LI Liang-De** LIU Feng-Jing LI Hui-Ling LI Jin-Yu WANG Ding-Feng***

(Tea Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350012, China)

Abstract **[Objectives]** To use iTRAQ (isobaric tags for relative and absolute quantification) techniques to investigate proteomic differences between resistant (conventional drug management), and sensitive (unmanaged), *Empoasca flavescens* populations in tea plantations, thereby providing a theoretical foundation for managing resistance in this pest. **[Methods]** *E. flavescens* were collected in tea plantations using both random and multi-point sampling methods. Proteins were extracted and quantified with a protein purification kit, then enzymatically digested and labeled with an iTRAQ labeling kit. Peptides were isolated using high pH-RPLC and identified with RPLC-MS. The molecular function, biological processes, and cell locations of differentially expressed proteins were analyzed using the GO ontology (Gene ontology) method. Metabolic pathways were

*资助项目 Supported projects：福建省农业科学院科技创新团队（CXTD2021001-3）；省属公益类科研院所专项（2021R1101）

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

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：wangdf2022@163.com

收稿日期 Received：2021-07-17；接受日期 Accepted：2021-12-26

annotated using the KEGG pathway website. The interaction network of differentially expressed proteins was analyzed with the String-DB database. Finally, significantly different resistance-related enzyme proteins were further analyzed and sorted. **[Results]** A total of 728.23 μg proteins were extracted from sensitive populations and 1 261.17 μg from resistant populations. A total of 1 399 proteins differed significantly between resistant and sensitive populations. Of these, 101 were up-regulated and 218 were down-regulated more than 1.5 times. GO analysis indicates that 319 differentially expressed proteins were mainly involved in ion-binding, and in the composition of ribosomes and oxidoreductase. These proteins mainly function in protein translation, material transport and small molecule metabolic processes, and are distributed in the intracellular membrane, cytoplasm, ribosomes and nucleus, respectively. KEGG analysis indicates that the 319 differentially expressed proteins were mainly involved in the carbon and ribosomal metabolism, and the phagocytosis pathway. The results of STRING analysis indicate that the 319 differentially proteins regulated each other via multiple pathways. Analysis of resistance-related protein enzymes revealed that three glutathione *S*-transferase (GSTs), two cytochrome P450 oxidase (P450), two superoxide dismutase (SOD) and two peroxide dismutase (POD) were significantly different in sensitive and resistant populations. **[Conclusion]** Resistant and sensitive populations of *E. flavescens* have significant proteomic differences. Differentially expressed proteins have a variety of molecular functions and are widely distributed in different cell types. Detoxification enzyme activity was stronger in the resistant population than in the sensitive one.

Key words *Empoasca flavescens*; resistant population; sensitive population; proteomics; detoxification enzyme

茶小绿叶蝉 *Empoasca flavescens* 属半翅目（Hemiptera）叶蝉科（Cicadellidae）昆虫，是中国、日本、越南和印度尼西亚等国家和地区茶园中的头号害虫。该虫通过刺吸茶树嫩叶，导致叶片卷曲、枯萎和坏死（李慧玲等，2016；林美珍等，2021），对茶叶产量和质量造成严重影响，可造成每年高达 33%的经济损失（陈李林等，2019）。化学农药因具有使用方便、经济成本低和见效快等特点，已在茶园控制茶小绿叶蝉中得到普遍应用。然而，化学杀虫剂的持续不合理使用，不仅使靶标生物产生抗药性，同时也杀死了大量非靶标生物（李良德等，2016）。如前期报道茶小绿叶蝉在福建不同地区的抗药性已很严重（庄家祥等，2009，李建宇等，2015；Qi *et al.*，2015）。

抗药性的发展带来了诸多负面影响，特别是欧盟制定了茶叶中农药最大残留限量（Maximum residue limits，MRLs）的标准（陈宗懋，2001），严重阻碍了中国茶叶出口市场的发展。因此，必须全面了解茶小绿叶蝉的抗药性机制，寻找新的化学或非化学防治策略，以更好地防治该虫。到目前为止，多数昆虫的抗药性机理已了解的比较透彻，大致由 3 种原因造成。第一是穿透抗性，即昆虫的表皮穿透力降低，导致昆虫对杀虫剂的吸收和渗透速度变慢，延缓了对杀虫剂的吸收与到靶标部位的时间；第二是代谢抗性，即昆虫的代谢解毒酶增强，增加了对杀虫剂的降解能力（Bass *et al.*，2014）。其中，多功能氧化酶（Multifunctional oxidase）、谷胱甘肽-*S*-转移酶（Glutathione *S*-transferase）和酯酶（Esterase）是产生代谢抗性的主要解毒酶（王芹芹等，2017；王京等，2021）；第三是靶标抗性，即药剂对靶标的敏感性降低，如电压门控钠离子通道（Voltage-gated sodium channel）基因的突变，导致杀虫剂对靶标的活性下降（陈斌等，2015；吴少英等，2021）。

导致茶小绿叶蝉抗药性研究发展缓慢的原因有多种。其一，茶小绿叶蝉的虫体较小易躲藏、善于爬行、跳跃及易逃脱，导致室外茶园不易捕捉（李良德等，2016）；其二，到目前，针对叶蝉科昆虫，特别是茶小绿叶蝉，暂无成熟可用的人工饲料，室内无法大量人工繁殖；其三，茶产业规模和产值较小，研究茶小绿叶蝉抗药性机理的人员较少。因而，有必要从分子手段，系统地开展茶小绿叶蝉的抗药性蛋白质组学研究。

iTRAQ（Isobaric tags for relative and absolute quantification）技术是一种公认的蛋白质组学高通量分析方法，已在小菜蛾 *Plutella xylostella*（Han *et al.*，2013）、褐飞虱 *Nilaparvata lugens*（Zhai *et al.*，2015）和家蚕 *Bombyx mori*（Dong

et al.，2017）等得到广泛应用。基于此，本研究对福建安溪和武夷山茶区的茶小绿叶蝉进行了田间生测，发现两茶区小绿叶蝉对联苯菊酯的抗性倍数为 16.81 倍和 15.72 倍，对溴氰菊酯的抗性倍数为 11.20 倍和 8.89 倍，对高效氯氟氰菊酯的抗性倍数为 7.69 倍和 10.13 倍，对溴虫腈的抗性倍数为 3.44 倍和 5.56 倍，对唑虫酰胺的抗性倍数为 3.27 倍和 3.45 倍，表明茶小绿叶蝉的抗药性已很严重（李良德等，2020）。本研究进一步利用 iTRAQ 技术对抗性与敏感种群进行了蛋白质组学分析，以期为今后的抗性治理奠定理论基础。

1　材料与方法

1.1　供试虫源的采集

茶小绿叶蝉敏感品系种群采集自近 20 年未做管理的荒废茶园，位于福建省福安市（Fu-An，FA）松罗乡王家茶场（经度 119°78′，纬度 26°95′）（图 1：绿色位置）和福建省柘荣县（Zhe-Rong，ZR）鸳鸯头草场附近茶园（经度 119°89′，纬度 27°52′）（图 1：黄色位置）。抗性品系种群采集自茶农常规用药管理的茶园，位于福建省安溪县（An-Xi，AX）八马茶叶有限公司茶园（经度 118°18′，纬度 25°06′）（图 1：蓝色位置）和福建省武夷山市（Wu-Yi-Shan，WYS）永生茶叶有限公司茶园（经度 117°93′，纬度 27°64′）（图 1：橙色位置）。

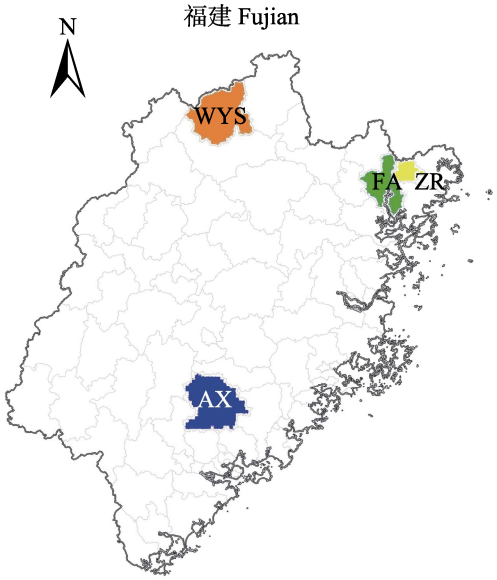

图 1　不同种群茶小绿叶蝉的不同采集地

Fig. 1　Different populations of *Empoasca flavescens* were collected from different places

缩写字母 WYS, FA, ZR 和 AN 分别代表武夷山、福安、柘荣和安溪。

The abbreviations WYS, FA, ZR and AN stand for Wuyi Mountain, Fu'an, Zherong and Anxi, respectively.

叶蝉的采集方法：首先，在茶行之间铺上长 2.0 m，宽 1.0 m 的塑料薄膜，轻轻拍打两边茶梢使叶蝉掉落至地面薄膜上；然后，通过改进的粉尘采样器将叶蝉吸入放有茶梢的 50 mL 离心管内。将采集的活体叶蝉带回室内，用液氮快速冷却后用干冰寄至广东省广州市辉骏生物科技股份有限公司，蛋白质组学试验所需试剂和仪器均由该公司提供。本研究茶小绿叶蝉均为 3 龄若虫，4 个地区均采用随机多点的方式进行采集，每地区所采虫口量约 3 000 头（约 0.50 g）。最后，将 FA 与 ZR 种群进行混合，为相对敏感品系样品（将其命名为 Sen-Ef-Mix），将 WYS 与 AN 种群进行混合，为抗性品系样品（将其命名为 Res-Ef-Mix）。

1.2　主要试剂及仪器

2D Clean up Kit 蛋白纯化试剂盒（货号：80-6484-51）和 BCA 定量试剂盒（货号：QPBCA）购自 Sigma 公司；蛋白标记 iTRAQ Reagents-8plex Kit 试剂盒（货号：4381664）购自美国 ABI 公司；丙酮（货号：Sep-64）、三乙基碳酸氢铵缓冲液 TEAB（货号：T418）、氢氧化钠（货号：306576）和甲酸铵（货号：516961）等购自美国 Sigma 公司；10 K 超滤管（货号：OD010C33）、胰酶（货号：V5280）、乙腈 CAN（货号：A998-4）和甲酸（货号：14265）等购自美国 Fisher 公司。

超声仪（型号：LTD-JY96-IIN）为宁波新芝生物科技股份有限公司生产；冷冻离心机（型号：湘仪 H2050R）为上海沪粤名科技有限公司生产；分光光度计（型号：765Pc）为上海光谱仪器有限公司生产；高效液相色谱（型号：Dionex Ultimate3000）、Q Exactive 质谱仪和 Concentrator Plus 真空离心浓缩机为美国 Thermo 公司生产。

1.3 总蛋白的提取及蛋白定量

首先，通过液氮将研钵进行预冷，将两个样品加入研钵中，加入液氮迅速研磨至粉末为止。紧接着，在研钵中加入 200 μL 裂解液 RIPA（配方：50 mmol·L^{-1} Tris-HCl、150 mmol·L^{-1} NaCl、1% SDS、0.1% Trionx-100 和 1% SDC），待充分溶解后进行超声处理（开/关各 0.8 s，20 W，每次震荡 10 下后进行冷却，共重复 6 次），而后于冷冻离心机（12 000 r/min，20 min）中破碎核酸后收集上清液。按照蛋白纯化试剂盒的操作说明，对样品蛋白进一步纯化，测定总体积后，用于下一步定量分析。

总蛋白的定量，参照 BCA 蛋白定量试剂盒说明书，分别取 1、2、4、6、8 和 10 μg 的牛血清白蛋白（Bovine serum albumin，BSA），575 nm 处测定样品吸光值，制作成标准曲线。最后，根据每个样品的平均吸光值，参照标准曲线，计算出每个样品的蛋白浓度，再根据每样品的蛋白浓度及提取的总体积计算出对应的蛋白总量。

1.4 样品蛋白酶切及 iTRAQ 试剂标记

取敏感和抗性种群样品各 200 μL，按照 iTRAQ 标记试剂盒（8-plex iTRAQ）的使用说明，对两个种群样品进行酶解操作。步骤如下：（1）加入 4 μL Reducing Reagent，60 ℃反应 1 h。加入 2 μL Cysteine-Blocking Reagent，室温 10 min。分别用 70%乙醇和纯水润洗后，12 000 g 离心 20 min，弃掉滤液；（2）加入 100 μL 0.25 mol·L^{-1} TEAB，12 000 r/min 离心 20 min，弃掉底部废液。更换新的收集管，加入胰蛋白酶 37 ℃静置 12 h，而后再次补加胰酶，反应 4 h，低温真空抽干。

两个种群样品的 iTRAQ 试剂标记，步骤如下：（1）取出 - 20 ℃冰箱保存的 8 标 iTRAQ 试剂盒，室温放置 10 min 后，将内部试剂低速离心至管底，分别向每管试剂中加入 150 μL 异丙醇，进行涡旋振荡，而后再次离心至管底；（2）分别取 100 μg 的两个种群的酶解产物，分别加入 iTRAQ 试剂，涡旋振荡 10 下，低速离心样品至管底，室温反应 2 h 后，加入 100 μL 超纯水终止反应，真空冷冻后，进行离心干燥。最后，分别获得敏感种群和抗性种群的标记样品，冷冻保存备用。

1.5 第一维高 pH-RP 液相分离

采用高性能液相色谱仪对获得的样品通过 C_{18} 液相色谱柱（Gemini-NX C_{18}，3′ m, 110′ a，2× 150 mm）进行预分离。步骤如下：（1）将 iTRAQ 标记的样品重悬在 100 μL 的甲酸铵缓冲液 A（20 mmol·L^{-1} NH_4HCO_2，pH10）中，并用乙腈-甲酸铵缓冲液 B（20% 20 mmol·L^{-1} NH_4HCO_2 与 80% acetonitrile, pH 10）进行溶解；（2）以 0.2 mL/min 的流速，按照不同的线性梯度：0-10%缓冲液 B，5 min；10%-20%缓冲液 B，10 min；20%-45%缓冲液 B，15 min；45%-90%缓冲液 B，15 min，对蛋白多肽进行洗脱；（3）色谱仪的紫外检测波长为 214/280 nm，根据峰型和时间共收取各个组分，对收取的样品与 50%三氟乙酸（Trifluoroacetic acid，TFA）进行混合，真空干燥后进行下一步分析。

1.6 第二维反相液质联用 RPLC-MS 分析

采用 0.1%甲酸（Formic acid，FA）与 2%乙腈（Acetonitrile，CAN）溶解液对样品蛋白进行溶解，充分涡旋振荡后进行冷冻离心（13 500 r/min，4 ℃，20 min）。而后将上清液转移至上样管中，进行液相质谱鉴定。蛋白肽的分离采用的液相色谱系统，该体系配备 C_{18} 反相柱（2 μm，100 Å），系统内的流动相 A 为 0.1% FA，流动相 B 为 0.1% FA 与 80% CAN，流速为 300 nL/min，每个组分的分析时间为 65 min。

样品分离后的肽段直接进入质谱仪进行在线检测，一级质谱在质荷比（m/z）为 200 处的分辨率为 70 000，并动态的选择质荷比（350-1 800）中最丰富的前体离子进行高能碰撞裂解，再选择系统内自动增益控制（Automatic gain control，AGC）的方法，对目标值进行确定。二级质谱在质荷比（m/z）为 200 处的分辨率为 17 500，常规碰撞能量（Normalized collision energy，NCE）为 30 eV。

1.7　蛋白生物信息学分析网站

差异蛋白的基础数据分析使用的是 Protein Pilot™ 5.0 软件（设置 Unused≥1.3，去除检索结果中以“RRRRR”开头的记录，选取 AVG≥1.5 为上调蛋白，AVG≤0.67 为下调蛋白）；差异蛋白功能注释和分类中，GO 注释所用的网站为 http://www.ebi.ac.uk/QuickGO/，GO 分类所用的网站为 http://www.geneontology.org，GO 富集分析所用的网站为 http://www.geneontology.org/；差异蛋白 KEGG Pathway 分析中所用的网站网址为 http://www.genome.jp/kegg/（该网站是分析蛋白信号通路的经典数据库）；STRING 数据库蛋白相互作用网络分析所用的网站为 https://string-db.org/；最后，通过 uniprot.org 网站分析了抗性相关蛋白酶的分子量。

2　结果与分析

2.1　总蛋白的提取及定量

通过田间采集，获得了相对敏感品系的茶小绿叶蝉混合样 Sen-Ef-Mix 和抗性品系的混合样 Res-Ef-Mix。蛋白纯化后获得 Sen-Ef-Mix 与 Res-Ef-Mix 的总体积为 191.60 μL 和 295.64 μL。蛋白定量结果显示，牛血清蛋白的标准曲线为 $y = 63.072x - 5.863$。以牛血清标准曲线换算获得 Sen-Ef-Mix 与 Res-Ef-Mix 两组蛋白的浓度为 3.800 μg/μL 和 4.266 ug/μL。最后，换算获得 Sen-Ef-Mix 与 Res-Ef-Mix 两组蛋白的总含量为 728.23 μg 和 1 261.17 μg（表 1）。该定量结果表明，两组样品蛋白皆大于 200 μg，可用满足 iTRAQ 蛋白组学的分析鉴定。

表 1　两组茶小绿叶蝉样品的总蛋白定量

Table 1　Total protein quantification of two groups *Empoasca flavescens*

蛋白来源 Protein sources	蛋白体积（μg/μL） Protein volume (μg/μL)	定量标准曲线 Quantitative standard curve	蛋白浓度（μg/μL） Protein concentration (μg/μL)	总蛋白（μg） Total protein (μg)
敏感组 Sensitive group	191.60	y=63.072x - 5.863	3.800	728.23
抗性组 Resistant group	295.64	y=63.072x - 5.863	4.266	1 261.17

2.2　差异蛋白统计分析

利用蛋白组学 Protein Pilot™软件，分析了 Sen-Ef-Mix 与 Res-Ef-Mix 两组叶蝉之间的蛋白组学信息。结果表明，在可信度（Credibility value）达 95%的蛋白中，共有 1 399 个蛋白发生了变化。其中，分子量在 50 ku 以下、50-100 ku、100-150 ku、150-200 ku 和超过 200 ku 的蛋白分别为 675、438、159、42 和 85 个（图 2：A）。等电点在小于 4.5、4.5-7.0 以及大于 7.0 的分别占了 1.29%、60.69%和 38.27%（图 2：B）。

这些蛋白中含有 1-5、6-10、11-15、16-20、21-25、26-30 和 30 个以上多肽的蛋白分别有 1 180、118、26、20、10、8 和 37 个（图 3：A）。将这些差异蛋白的多肽长度进行分析，肽段长度（氨基酸数）在小于 5、6-10、10-15、15-20、20-25 和超过 25 的分别为 326、3 149、2 698、741、115 和 23 个（图 3：B）。

紧接着，对这 1 399 个差异蛋白的差异倍数进行详细分析。结果表明，相比 Sen-Ef-Mix 组的小绿叶蝉，Res-Ef-Mix 组共有 101 个蛋白的表达倍数增加了 1.5 倍以上。其中，表达倍数增加 1.5-2.0、2.0-2.5、2.5-3.0、3.0-5.0 和大于 5.0 倍的个数分别为 61、16、9、8 和 6 个；另外，共有 218 个蛋白的表达倍数下调了 1.5 倍以上，表达倍数下降 1.5-2.0、2.0-2.5、2.5-3.0、3.0-5.0 和大于 5.0 倍的个数分别为 90、47、28、36 和 16 个（表 2）。

2.3　生物信息学分析

2.3.1　GO 蛋白功能注释和分类　由表 2 统计结果可知，Sen-Ef-Mix 与 Res-Ef-Mix 相比，共有 101 个蛋白表达上升了 1.5 倍，以及 218 个蛋白下调了 1.5 倍。为进一步给予这 319 个蛋白准确的命名和描述，本研究采用 GO 分析（Gene ontology）方法，从蛋白的分子功能（Molecular

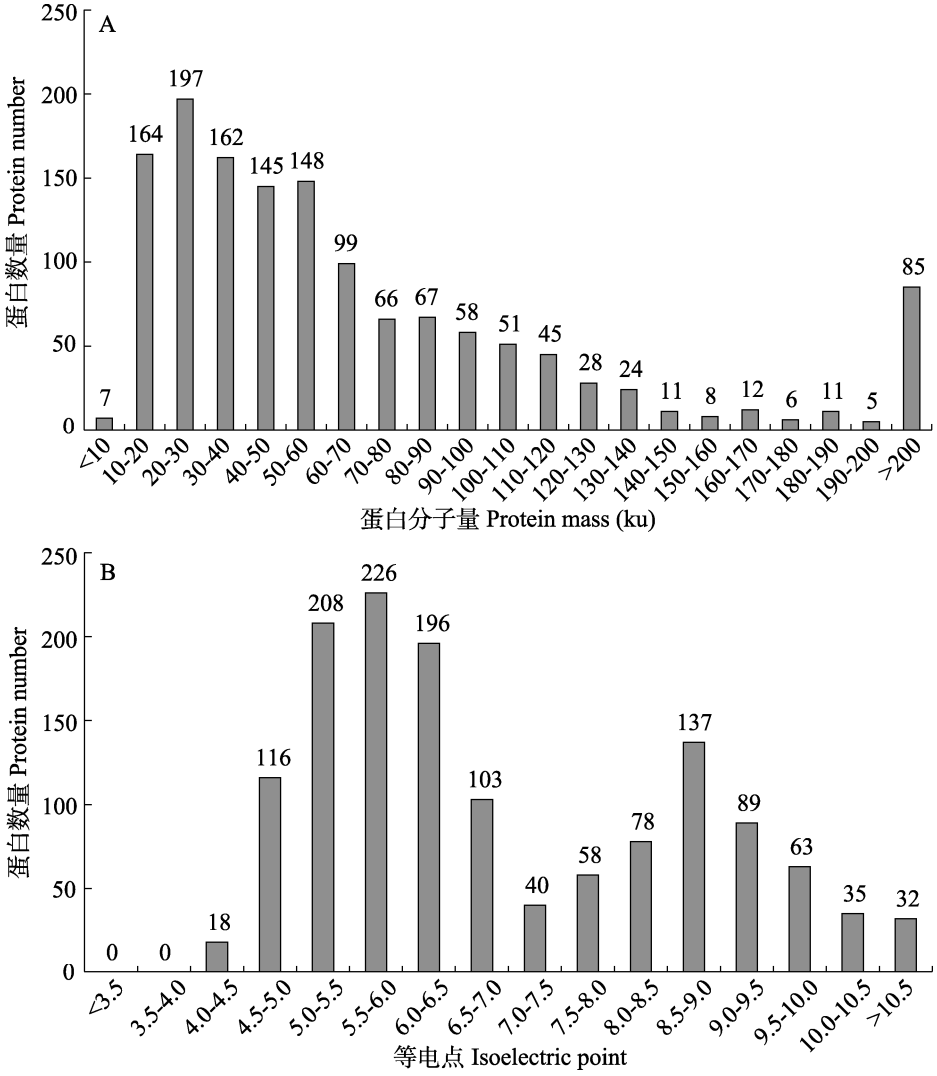

图 2　两组茶小绿叶蝉的蛋白分子量和等电点分析

Fig. 2　Protein mass and theoretical isoelectric point analysis of two groups *Empoasca flavescens*

A. 蛋白分子量；B. 理论等电点。

A. Protein mass; B. Theoretical isoelectric point.

function）、参与的生物学途径（Biological process）和蛋白在细胞中的位置（Cellular component），共三个角度做了进一步分析。

分子功能分析结果显示，这 319 个蛋白中具有离子结合蛋白（Ion binding protein）、组成核糖体（Structural constituent of ribosome）、氧化还原酶（Oxidoreductase）、结构分子活性（Structural molecule activity）、细胞骨架结合蛋白（Cytoskeletal binding protein）、肽酶活力（Peptidase activity）、蛋白酶激酶（Protease kinase）、跨膜转运（Transmembrane transport）、DNA 结合蛋白（DNA binding protein）和腺苷三磷酸酶活性（ATPase activity）功能的，分别有 92、21、20、13、11、11、11、11、10 和 10 个（图 4）。

生物过程分析结果显示，319 个蛋白中参与蛋白翻译（Protein translation）、物质运输（Material transportation）、小分子代谢（Small molecule metabolism）、分解代谢（Catabolism）、细胞氮化合物代谢（Cellular nitrogen compound metabolism）、碳水化合物代谢（Carbohydrate metabolism）、细胞蛋白修饰（Cellular protein modification）、前体代谢物和能量的产生

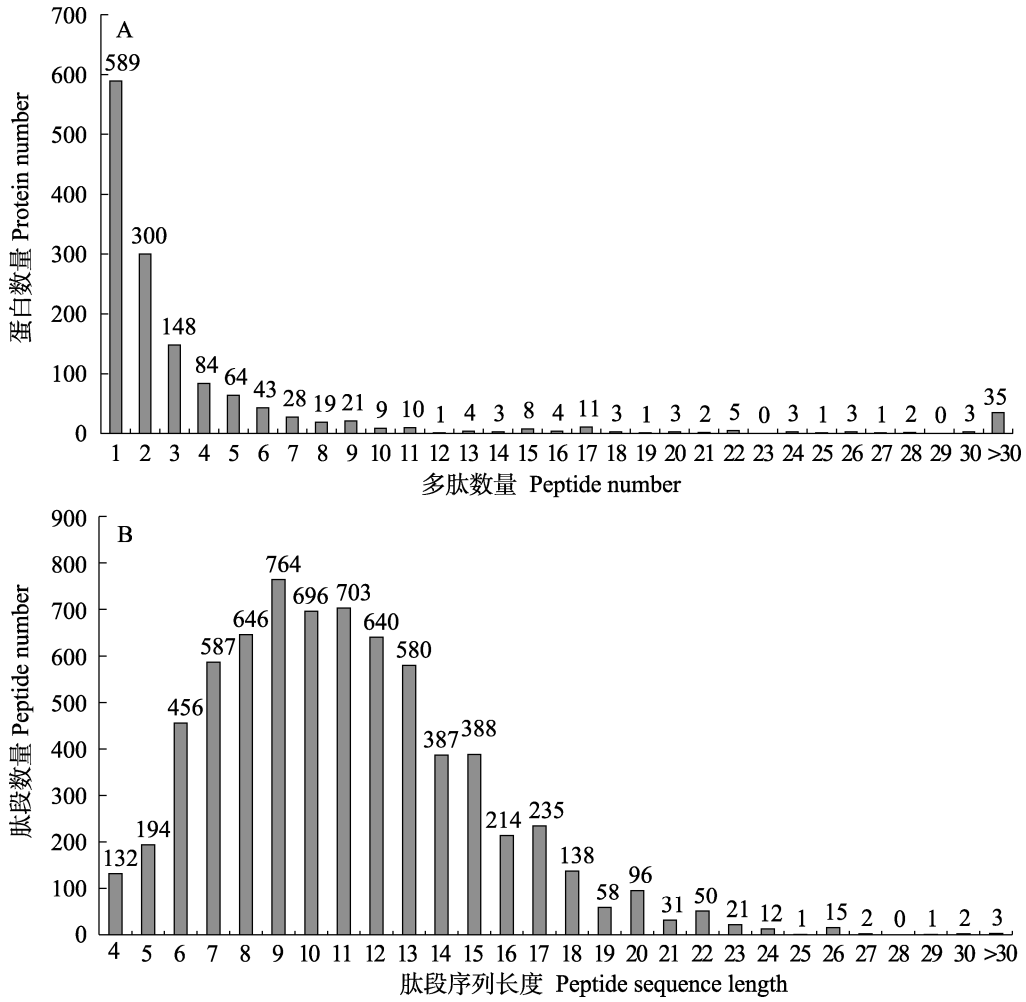

图 3　两组茶小绿叶蝉的多肽数量和肽段序列长度分析

Fig. 3　Peptide number and peptide sequence length analysis of two groups *Empoasca flavescens*

A. 多肽数量；B. 肽段序列长度。

A. Peptide number; B. Peptide sequence length.

表 2　两组茶小绿叶蝉差异表达蛋白的差异倍数分析

Table 2　Multiple analysis of differentially expressed proteins in two groups of *Empoasca flavescens*

表达类型 Expression type	表达倍数 Expression ratio	蛋白个数 Protein number
上升表达 Up regulation	1.5-2.0	61
	2.0-2.5	16
	2.5-3.0	9
	3.0-5.0	8
	>5.0	6
下调表达 Down regulation	1.5-2.0	90
	2.0-2.5	47
	2.5-3.0	28
	3.0-5.0	36
	>5.0	16

（Generation of precursor metabolites and energy）、信号转导（Signal transduction）和生物合成（Biosynthesis）过程的，分别有 28、28、27、21、19、18、17、14 和 14 个（图 5）。

最后，分析了这 319 个蛋白在细胞中的组成，结果显示参与细胞内膜（Intracellular membrane）、细胞质（Cytoplasm）、蛋白质复合体（Protein complex）、核糖体（Ribosome）、细胞骨架（Cytoskeleton）、细胞核（Nucleus）、线粒体（Mitochondrion）、细胞外膜（Extracellular membrane）、内质网（Endoplasmic reticulum）和染色体（Chromosome）组成的，分别有 39、26、24、22、16、10、4、3、3 和 2 个（图 6）。

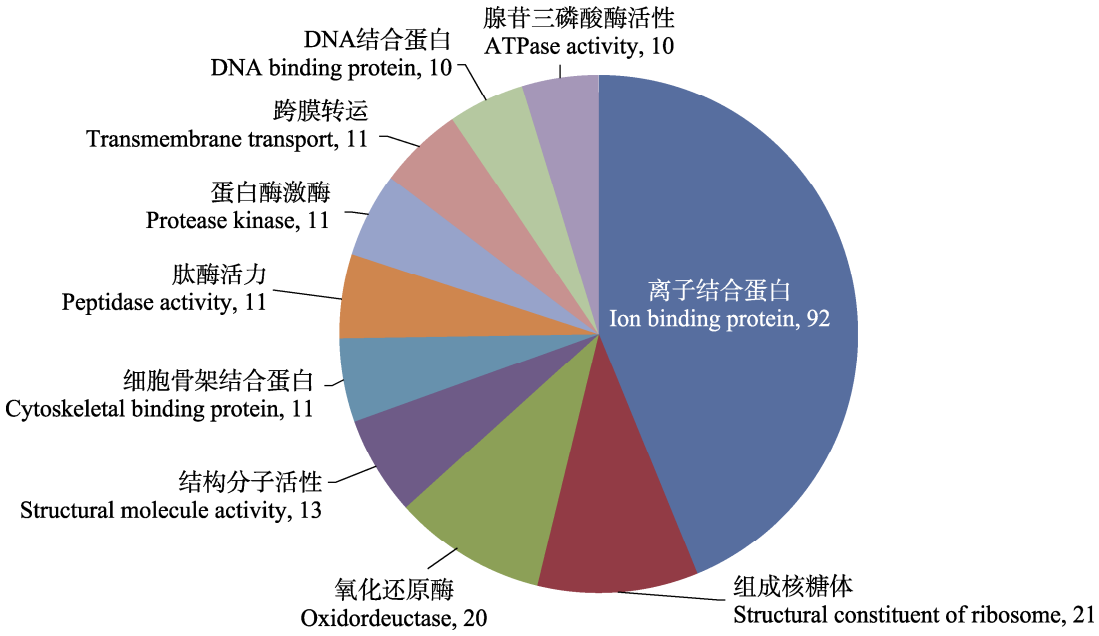

图 4　两组茶小绿叶蝉差异蛋白的分子功能分析

Fig. 4　Molecular function analysis of different proteins in two groups of *Empoasca flavescens*

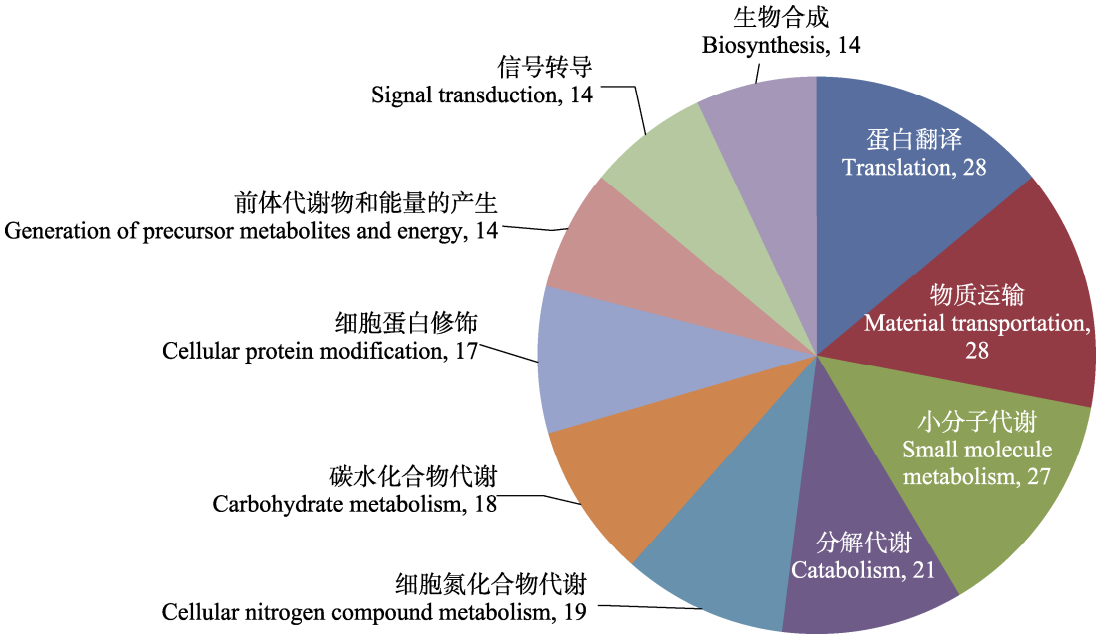

图 5　两组茶小绿叶蝉差异蛋白参与的生物学途径分析

Fig. 5　Biological process analysis of different proteins in two groups of *Empoasca flavescens*

2.3.2　KEGG Pathway 代谢通路注释　为进一步明确差异蛋白参与了哪些重要的生化代谢和信号转导途径，利用 KEGG 数据库对上述 319 个上调/下调蛋白做了进一步分析。结果显示，共有 11 个通路富集 3 个以上的差异蛋白。其中，参与碳代谢（Carbon metabolism）、核糖体代谢（Ribosome metabolism）、吞噬作用（Phagosome）、RNA 运输（RNA transport）、氨基酸的生物合成（Biosynthesis of amino acids）、氧化磷酸化（Oxidative phosphorylation）、柠檬酸循环

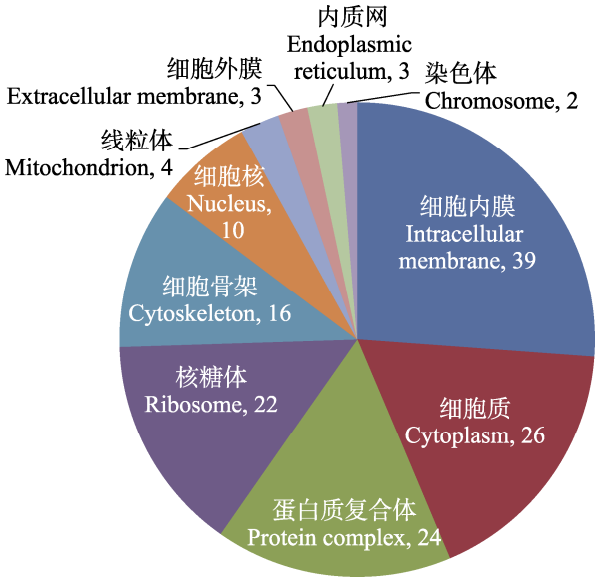

图 6　两组茶小绿叶蝉差异蛋白在细胞中的组成分析

Fig. 6　Cellular component analysis of different proteins in two groups of *Empoasca flavescens*

（Citrate cycle）、内吞作用（Endocytosis）、糖酵解（Glycolysis）、内质网蛋白质加工（Protein processing in endoplasmic reticulum）和 RNA 降解（RNA degradation）通路的，分别有 27、19、6、6、6、5、4、4、4、3 和 3 个（表 3）。

2.3.3　蛋白相互作用 STRING 网络分析　为进一步了解差异蛋白之间是否存在相互作用与联系，利用生物信息 STRING 数据库（STRING-DB），对上述 319 个差异蛋白进行比对分析，构建了两组差异蛋白的互作网络（图 7）。由图 7 可知，共有 100 个左右差异蛋白存在功能关联，蛋白与蛋白之间通过多种路径相互调控，并有 25 个核糖体蛋白联系紧密（图 7：右下角）。另外，边缘有部分节点蛋白未有网线相连，但与整体网络存在互作关系。

2.4　抗性相关蛋白酶分析

为进一步了解多年施药管理茶园中茶小绿叶蝉潜在的抗性机制，结合上述差异蛋白的表达量、分子功能、代谢通路和网络通路，对抗性相关的蛋白酶进行了整理与分析。结果表明：共有 3 个谷胱甘肽-*S*-转移酶（GSTs）发生了变化，其中 GSTs-1 与 GSTs-2 分别上升了 4.52 倍与 4.28 倍，GSTs-3 下调了 2.84 倍；共有 2 个细胞色素 P450 氧化酶（P450）发生了变化，P450-1 与 P450-2 分别上升了 4.11 倍与 3.88 倍；共有 2 个超氧化物歧化酶（SOD）发生了变化，其中 SOD-1 上升了 3.82 倍，SOD-2 下降了 2.75 倍；共有 2 个过氧化物酶（POD）发生了变化，其中 POD-1 下降了 3.29 倍，POD-2 上升了 2.12 倍（表 4）。

表 3　差异蛋白 KEGG 信号通路富集表达分析

Table 3　Enrichment expression analysis of differential proteins in KEGG pathway

KEGG 通路号 KEGG pathways	通路名 Pathway name	蛋白数 Protein quantity
dme01200	碳代谢 Carbon metabolism	27
dme03010	核糖体代谢 Ribosome metabolism	19
dme04145	吞噬作用 Phagosome	6
dme03013	RNA 运输 RNA transport	6
dme01230	氨基酸的生物合成 Biosynthesis of amino acids	6
dme00190	氧化磷酸化 Oxidative phosphorylation	5
dme00020	柠檬酸循环 Citrate cycle (TCA cycle)	4
dme04144	内吞作用 Endocytosis	4
dme00010	糖酵解 Glycolysis	4
dme04141	内质网蛋白质加工 Protein processing in endoplasmic reticulum	3
dme03018	RNA 降解 RNA degradation	3

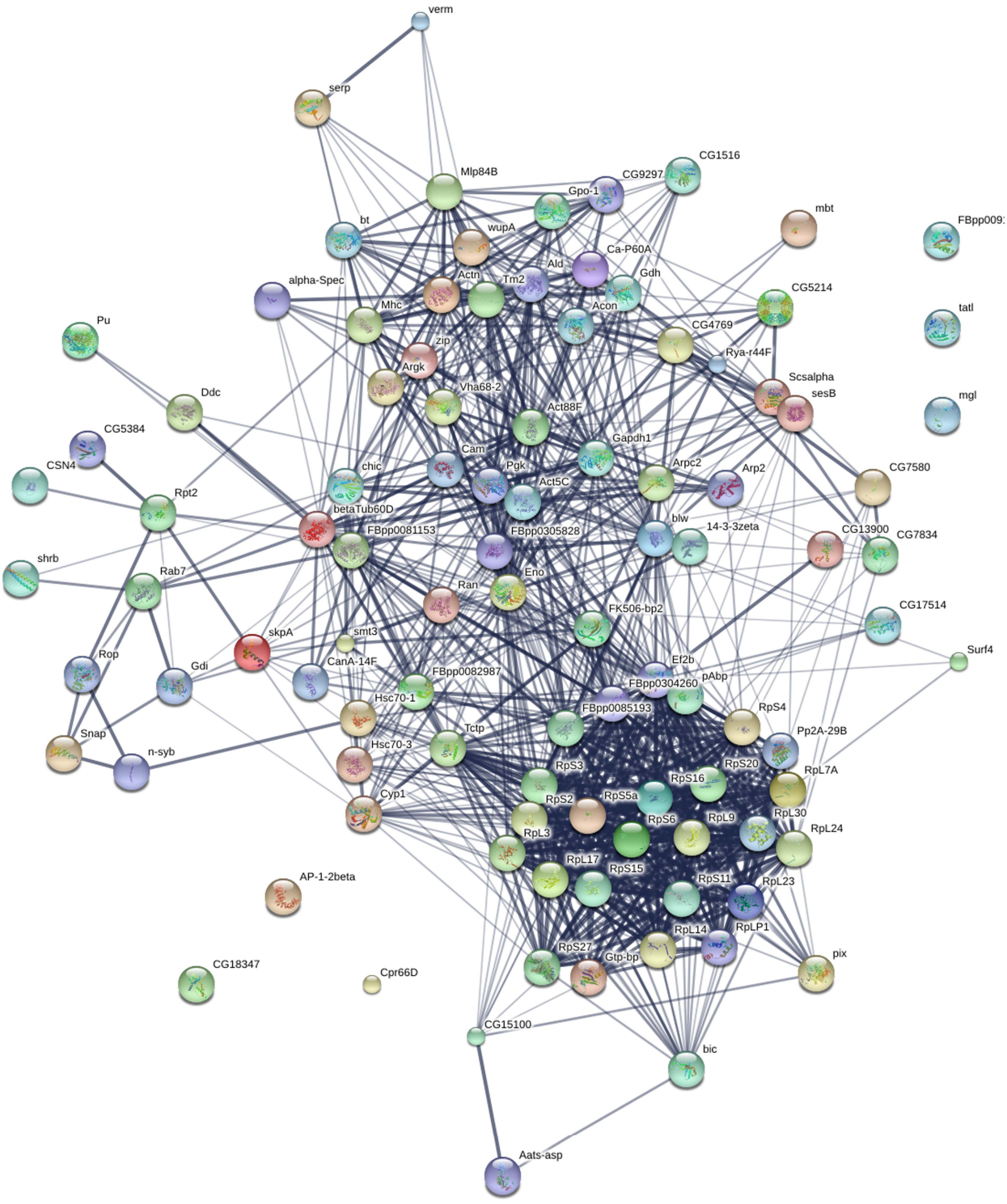

图 7　两组茶小绿叶蝉差异蛋白的 STRING 网络分析

Fig. 7　STRING network analysis of different proteins in two groups of *Empoasca flavescens*

网络节点代表蛋白质，不同颜色线条表示不同类型证据。红线、绿线、蓝线、紫线、黄线、浅蓝色和黑线，分别代表融合证据、邻近证据、同现证据、实验证据、文本挖掘证据、数据库证据和共表达证据。

Network nodes represent proteins, different colored lines represent different types of evidences. The line color of red, green, blue, purple, yellow, light blue and black represents the fusion evidence, neighborhood evidence, coocurrence evidence, experimental evidence, text mining evidence, database evidence and coexpression evidence, respectively.

表 4　两组茶小绿叶蝉的抗性相关蛋白酶分析

Table 4　Resistance-related protein enzymes analyzed from two groups of *Empoasca flavescens*

酶类 Enzymes type	登入号 Accession no.	蛋白名 Protein names	蛋白分子量（ku） Protein mass (ku)	上调/下调表达倍数 Ratio of up/Down expression
谷胱甘肽-*S*-转移酶 Glutathione *S*-transferase	A0A146LKY7	GSTs-1	24.85	4.52 ↑
	A0A1B6H3F7	GSTs-2	22.45	4.28 ↑
	A0A1B6JW55	GSTs-3	53.54	2.84 ↓
P450 氧化酶 Cytochrome P450 oxidase	A0A0D6A1C6	P450-1	57.90	4.11 ↑
	E0VCY6	P450-2	77.21	3.88 ↑
超氧化物歧化酶 Superoxide dismutase	A0A1B6KIM9	SOD-1	24.06	3.82 ↑
	V5G5W5	SOD-2	21.29	2.75 ↓
过氧化物酶 Peroxide dismutase	E0VMN9	POD-1	22.88	3.29 ↓
	A0A0N0BH15	POD-2	17.42	2.12 ↑

↑代表蛋白上调表达，↓代表蛋白下调表达。

↑ represents protein up-regulated expression, ↓ represents protein down- regulated expression.

3　讨论

我国茶小绿叶蝉的抗药性已很严重，深入了解该虫的抗药性机理具有重要的意义。然而，在茶园防治该虫过程中，所使用的农药种类较多，造成该虫对多种药剂产生抗性（Qi *et al.*, 2015），采用蛋白质组学技术对抗性种群进行分析，有助于深层次揭示该虫的抗药性机理。

昆虫在农药中毒过程中包含 3 个动力学反应水平，即表皮组织的穿透、内部组织的代谢和对终靶标的分子作用（陈斌等，2015）。任何对这 3 个反应水平的改变都会降低药剂对靶标的亲和力，导致昆虫对药剂产生抗药性（王京等，2021；吴少英等，2021）。其中，药剂对表皮的穿透影响较小，解毒酶代谢能力的增强是导致昆虫产生抗药性的最主要原因（邱星辉等，2014；任娜娜等，2015）。昆虫的代谢解毒酶主要集中在三大家族，即谷胱甘肽-*S*-转移酶、细胞色素 P450 氧化酶系和非专一性酯酶（ESTs），三大酶系主要通过酶量过表达，再经过氧化还原反应与水解作用，将杀虫剂转变为易溶于水的极性分子，并将其排出体外（朱江和邱星辉，2021）。

谷胱甘肽-*S*-转移酶（GSTs）是一类多功能解毒酶系，该酶系主要通过降低杀虫剂对虫体的氧化应激损伤，参与菊酯类、有机磷和有机氯等杀虫剂抗性形成（李良德等，2020）。本研究发现，抗性种群茶小绿叶蝉共有 3 个谷胱甘肽-*S*-转移酶（GSTs）发生了显著变化，特别是 GSTs-1 上升了 5.75 倍，这与李建宇等（2016）报道的结果相符。另外，GSTs-4 下降了 2.84 倍，可能参与了家族蛋白的负反馈调节作用。细胞色素 P450 氧化酶系（P450），是昆虫体内参与多种内源性化合物与外源性杀虫剂的主要解毒酶系，目前已知的昆虫 P450 包含 6 大家族，P450 酶活性和含量的改变是导致昆虫对菊酯类和有机氯等农药产生抗性的主要原因（邱星辉等，2014；朱江和邱星辉，2021）。本研究发现，抗性种群茶小绿叶蝉的两个 P450 蛋白酶均明显上升，与李建宇等（2016）报道的结果相符。

本研究发现，抗性种群茶小绿叶蝉的抗氧化酶系统中，超氧化物歧化酶 SOD-1 上升显著，这一结果与石敏等（2019）有关家蚕幼虫经乐果处理后的研究结果相符。而抗性种群茶小绿叶蝉的过氧化物酶 POD-1 上升显著，与周利琳等（2009）在甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 报道的结果相符。综上，本研究通过 iTRAQ 技术，对比了常规管理茶园与荒废茶园小绿叶蝉的蛋白组

学，发现抗性种群的 GSTs、P450、SOD 和 POD 酶活多数强于敏感种群，暗示抗性种群对农药的抵抗能力强于敏感种群。

参考文献 (References)

Bass C, Puinean AM, Zimmer CT, Denholm I, Field LM, Foster SP, 2014. The evolution of insecticide resistance in the peach potato aphid, *Myzus persicae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 51(8): 41–51.

Chen B, Xian JP, Qiao L, Zhou Y, 2015. Research progress in sodium channel gene mutations and their association with insecticide resistance of insects. *Acta Entomologica Sinca*, 58(10): 1116–1125. [陈斌, 鲜鹏杰, 乔梁, 周勇, 2015. 昆虫钠离子通道基因突变及其与杀虫剂抗性关系的研究进展. 昆虫学报, 58(10): 1116–1125.]

Chen LL, Chen P, Wang Y, Ma X, Lin JK, Zhao ZH, 2019. Cover crops mediate abundance and egg density of tea green leafhopper (Hemiptera: Cicadellidae) in a tea plantation. *Journal of Plant Protection*, 46(5): 989–996. [陈李林, 陈平, 王优, 马旭, 林金科, 赵紫华, 2019. 茶园间作功能植物对茶小绿叶蝉的调控作用. 植物保护学报, 46(5): 989–996.]

Chen ZM, 2001. The progress and prospect on the investigation in the field of pesticide residue in China tea. *China Tea*, 23(1): 3–4. [陈宗懋, 2001. 我国茶叶中农药残留的研究进展与展望. 中国茶叶, 23(1): 3–4.]

Dong WT, Xiao LF, Hu JJ, Zhao XX, Liu JX, 2017. iTRAQ proteomic analysis of the interactions between *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus and silkworm. *Journal of Proteomics*, 166(17): 138–145.

Han PF, Jin FL, Dong XL, Fan JQ, Qiu BL, Ren SX, 2013. Transcript and protein profiling analysis of the destruxin a-induced response in larvae of *Plutella xylostella*. *PLoS ONE*, 8(4): e60771.

Li HL, Lin NQ, Guo JX, Wang SJ, Wang QS, Zeng MS, Wu GY, 2016. Effects on small green leafhopper and its natural enemy mymarid in tea plantations with intercropping of green manure plants. *Chinese Journal of Biological Control*, 32(1): 50–54. [李慧玲, 林乃铨, 郭剑雄, 王水金, 王庆森, 曾明森, 吴光远, 2016. 茶园间作绿肥对假眼小绿叶蝉及其天敌缨小蜂的影响. 中国生物防治学报, 32(1): 50–54.]

Li JY, Shi MZ, Fu JW, Wang T, Zhang ZK, 2016. Activities of the detoxifying enzymes and synergism in the bifenthrin-resistant and susceptible strains of tea leafhopper, *Empoasca vitis*. *Journal of Tea Science*, 36(3): 323–329. [李建宇, 史梦竹, 傅建炜, 王婷, 张志康, 2016. 茶假眼小绿叶蝉抗联苯菊酯品系和敏感品系解毒酶活性及增效作用研究. 茶叶科学, 36(3): 323–329.]

Li JY, Shi MZ, Fu JW, You, Zheng LZ, Lin T, Yang XW, 2015. Monitoring and regional differentiations on insecticide-resistance of *Empoasca vitis*. *Fujian journal of Agricultural Sciences*, 30(10): 989–992. [李建宇, 史梦竹, 傅建炜, 游泳, 郑丽祯, 林涛, 杨小完, 2015. 茶假眼小绿叶蝉的抗性监测及不同地区的敏感性差异. 福建农业学报, 30(10): 989–992.]

Li LD, Liu FJ, Wang DF, Wu GY, 2020. Effects of bifenthrin and indoxacarb on the midgut cell structure and hemolymph detoxification enzyme of *Ectropis oblique* Prout (Lepidoptera: Geometridae). *Chinese Journal of Applied Entomology*, 57(3): 667–675. [李良德, 刘丰静, 王定锋, 吴光远, 2020. 联苯菊酯与茚虫威对茶尺蠖中肠细胞结构及血淋巴解毒酶的影响. 应用昆虫学报, 57(3): 667–675.]

Li LD, Wang DF, Li HL, Zhang H, Zeng MS, Wu GY, 2016. A rapid method for determining insecticide-resistance of *Empoasca flavescens* (Homoptera: cicadellidae). *Acta Tea Sinica*, 57(1): 49–54. [李良德, 王定峰, 李慧玲, 张辉, 曾明森, 吴光远, 2016. 一种茶园小绿叶蝉抗药性快速检测方法的研究. 茶叶学报, 57(1): 49–54.]

Li LD, Wang DF, Wu GY, Zeng MS, 2020. Insecticide resistance on five common pesticides of *Empoasca flavescens* in Fujian tea growing areas. *Acta Tea Sinica*, 61(3): 133–137. [李良德, 王定锋, 吴光远, 曾明森, 2020. 福建省 3 个地区茶小绿叶蝉对 5 种常用农药的抗药性比较. 茶叶学报, 61(3): 133–137.]

Lin MZ, Yang G, Wang ZY, You MS, 2021. Brochosome detachment facilitates *Empoasca onukii* (Hemiptera: Cicadellidae) adults escaping from spider web. *Acta Entomologica Sinica*, 64(2): 213–222. [林美珍, 杨广, 王珍燕, 尤民生, 2021. 网粒体脱落有助于茶小绿叶蝉成虫逃离蜘蛛网. 昆虫学报, 64(2): 213–222.]

Qi W, Yu HY, Niu CD, Yao R, Wu SF, Chen Z, Gao CF, 2015. Comparison of insecticide susceptibilities of *Empoasca vitis* (Hemiptera: Cicadellidae) from three main tea-growing regions in China. *Insecticide Resistance and Resistance Management*, 108(3): 1251–1259.

Qiu XH, 2014. Molecular mechanisms of insecticide resistance mediated by cytochrome P450s in insects. *Acta Entomologica Sinca*, 57(4): 477–482. [邱星辉, 2014. 细胞色素 P450 介导的昆虫抗药性的分子机制. 昆虫学报, 57(4): 477– 482.]

Ren NN, Xie M, You YC, Li JY, Chen WJ, Cheng XM, You MS,

2015. Fipronil-resistance mediated by carboxylesterases in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Acta Entomologica Sinca*, 58(3): 288–296. [任娜娜, 谢苗, 尤燕春, 李建玉, 陈伟军, 程学敏, 尤民生, 2015. 羧酸酯酶介导的小菜蛾对氟虫腈的抗性. 昆虫学报, 58(3): 288–296.]

Shi M, Li GN, Zheng X, Liu FD, Zhao S, Cai M, Zhu Y, 2019. Effects of dimethoate on the gonads and oxidative stress response in the silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Entomologica Sinica*, 62(10): 1186–1196. [石敏, 李冠楠, 郑茜, 刘凤丹, 赵珊, 蔡苗, 朱勇, 2019. 乐果对家蚕生殖腺及氧化应激的影响. 昆虫学报, 62(10): 1186–1196.]

Wang J, He BQ, Hua DK, Zhang K, Yuan JJ, Zheng XB, Xu BY, Zhang YJ, Wu QJ, 2021. Identification of GABA receptor genes and the role of FoRDL in spinosad resistance in *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). *Acta Entomologica Sinica*, 64(8): 943–955. [王京, 何秉青, 华登科, 张坤, 袁江江, 郑晓斌, 徐宝云, 张友军, 吴青君, 2021. 西花蓟马 GABA 受体基因鉴定及 FoRDL 在多杀霉素抗性中的作用. 昆虫学报, 64(8): 943–955.]

Wang QQ, Cui L, Wang QY, Yang HY, Rui CH, 2017. Mechanisms of resistance to indoxacarb in (Lepidoptera: Noctuidae): The synergistic effects of PBO, DEF and DEM and the activities of detoxification enzymes. *Acta Entomologica Sinca*, 60(8): 912–919. [王芹芹, 崔丽, 王奇渊, 杨宏宇, 芮昌辉, 2017. 棉铃虫对茚虫威的抗性机理: PBO, DEF 和 DEM 的增效作用及解毒酶活性. 昆虫学报, 60(8): 912–919.]

Wu SY, Duan WB, Li F, Yang L, Wang H, Wang LK, 2021. Research progress of insect sodium channels. *Acta Entomologica Sinica*, 64(7): 862–874. [吴少英, 段文波, 李芬, 杨磊, 王颢, 王力奎, 2021. 昆虫钠离子通道的研究进展. 昆虫学报, 64(7): 862–874.]

Zhai YF, Sun ZX, Zhang JQ, Kang K, Chen J, Zhang WQ, 2015. Activation of the TOR signalling pathway by glutamine regulates insect fecundity. *Scientific Reports*, 5: 10694.

Zhuang JX, Fu JW, Su QQ, Li JY, Zhang ZX, 2009. The regional diversity of resistance of tea green leafhopper, *Empoasca vitis* (GÖthe), to insecticides in fujian province. *Journal of Tea Science*, 29(2): 154–158. [庄家祥, 傅建炜, 苏庆泉, 李建宇, 占志雄, 2009. 福建省茶小绿叶蝉抗药性的地区差异. 茶叶科学, 29(2): 154–158.]

Zhou LL, Si SY, Wang ZX, Wang Y, Liu XM, 2009. Biochemical mechanisms of beet armyworm (*Spodoptera exigua*) resistance to tebufenozide. *Acta Entomologica Sinica*, 52(4): 386–394. [周利琳, 司升云, 汪钟信, 望勇, 刘小明, 2009. 甜菜夜蛾对虫酰肼抗性的生化机制. 昆虫学报, 52(4): 386–394.]

Zhu J, Qiu XH, 2021. Molecular mechanisms of expression regulation of insect cytochrome P450 genes involved in insecticide resistance. *Acta Entomologica Sinica*, 64(1): 109–120. [朱江, 邱星辉, 2019. 昆虫抗药性相关细胞色素 P450 基因的表达调控机制. 昆虫学报, 64(1): 109–120.]