



# 绿盲蝽八个普通气味受体基因的克隆及功能鉴定

李彬, 张赛, 王晨蕊, 王桂荣\*, 刘杨\*

(中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193)

**摘要:**【目的】本研究旨在克隆绿盲蝽 *Apolygus lucorum* 的气味受体基因,明确这些气味受体基因在绿盲蝽成虫不同组织中的表达水平及对主要寄主植物挥发物的电生理反应,为揭示绿盲蝽对寄主植物的识别机制提供理论基础。【方法】在绿盲蝽成虫触角转录组测序与分析的基础上,通过PCR技术克隆得到8个具有完整ORF的气味受体基因序列。用qPCR研究这8个基因在雌雄成虫不同组织(触角、无触角的头、胸、腹、足和翅)中的表达水平。然后通过爪蟾卵母细胞体外表达结合双电极电压钳技术测试这些气味受体对56种气味化合物的电生理反应。【结果】克隆得到了绿盲蝽8个气味受体基因 *AlucOR9*, *AlucOR16*, *AlucOR38*, *AlucOR53*, *AlucOR55*, *AlucOR56*, *AlucOR57* 和 *AlucOR58* 的cDNA全长序列(GenBank登录号: MN905538 - MN905545)。这些气味受体含有7个跨膜结构域,且N末端位于胞内,C末端位于胞外,符合昆虫气味受体的典型特征。qPCR结果表明,这8个气味受体基因均在绿盲蝽成虫触角中高表达,而在其他组织中低表达,其中除 *AlucOR38* 外的其他7个气味受体基因在雌雄成虫触角间存在显著的表达差异。双电极电压钳记录结果显示, *AlucOR57* 对其中15种气味化合物(苯甲醛、氧化石竹烯、庚醛、反-2-己烯醛、乙酸苯甲酯、桃金娘烯醛、4-乙基苯甲醛、乙酸壬酯、四氢芳樟醇、十三烷、反-3-己烯醇、2-丙烯酸丁酯、丙酸丁酯、乙酸辛酯和乙酸戊酯)有反应,其余7个气味受体对测试的全部气味化合物均无反应。【结论】*AlucOR57* 对测试的一些气味化合物有反应,推测其在绿盲蝽的寄主识别过程中发挥重要作用;其他7个气味受体对测试气味化合物均无反应,其功能有待进一步研究。

**关键词:** 绿盲蝽; 触角; 气味受体; 电生理反应; qPCR; 双电极电压钳

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2020)09-1048-11

## Cloning and functional characterization of eight odorant receptor genes in *Apolygus lucorum* (Hemiptera: Miridae)

LI Bin, ZHANG Sai, WANG Chen-Rui, WANG Gui-Rong\*, LIU Yang\* (State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

**Abstract:** 【Aim】 This study aims to clone odorant receptor (OR) genes in *Apolygus lucorum* and to assay their expression levels in different adult tissues and their electrophysiological responses to host plant volatiles, so as to provide the theoretical basis for understanding the mechanism of host plant recognition in *A. lucorum*. 【Methods】 Based on the sequencing and analysis of the antennal transcriptome of *A. lucorum*, the full-length sequences of eight OR genes with intact ORF were cloned by PCR. The expression levels of these genes in different adult tissues (antenna, head without antenna, thorax, abdomen, leg and wing) were detected by using qPCR. The electrophysiological responses of these ORs to 56 odor compounds were tested in *Xenopus* oocytes as a heterologous expression system using two-electrode voltage clamp recording. 【Results】 The full-length cDNA sequences of 8 OR genes *AlucOR9*,

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0200400); 国家自然科学基金项目(31672095)

作者简介: 李彬,男,1994年6月生,河北保定人,硕士研究生,研究方向为昆虫生理生化, E-mail: 939022173@qq.com

\* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: wangguirong@caas.cn; yangliu@ippcaas.cn

收稿日期 Received: 2020-01-11; 接受日期 Accepted: 2020-03-13

*AlucOR16*, *AlucOR38*, *AlucOR53*, *AlucOR55*, *AlucOR56*, *AlucOR57* and *AlucOR58* ( GenBank accession no. : MN905538 – MN905545 ) of *A. lucorum* were cloned. These ORs contain seven transmembrane domains, with the intracellular N-terminus and extracellular C-terminus, consistent with the typical characteristics of insect ORs. The qPCR results showed that all the eight OR genes were highly expressed in adult antennae and lowly expressed in all the other tissues of *A. lucorum*. Moreover, the expression of the other seven OR genes except *AlucOR38* in the antennae showed significant differences between male and female. The results of two-electrode voltage clamp recording showed that only *AlucOR57* responded to 15 odor compounds [ benzaldehyde, ( - )-caryophyllene oxide, heptanal, ( *E* )-2-hexenal, benzyl acetate, ( 1*R* )-( - )-myrtenal, 4-ethylbenzaldehyde, nonyl acetate, 3,7-dimethyl-3-octanol, tridecane, ( *E* )-3-hexenol, butyl acrylate, butyl propionate, octyl acetate and amyl acetate ], while the other seven ORs did not respond to all the odor compounds tested. 【 Conclusion 】 *AlucOR57* responds to partial odor compounds tested, suggesting that it might be involved in the recognition of host plant volatiles in *A. lucorum*. The other seven ORs fail to respond to all the tested odor compounds, and their functions need further study.

**Key words:** *Apolygus lucorum*; antennae; odorant receptor; electrophysiological response; qPCR; two-electrode voltage clamp

绿盲蝽 *Apolygus lucorum* 是我国黄河流域和长江流域为害棉花的优势盲蝽种类,具有包括棉花、玉米、葡萄、枣、蔬菜等农作物在内的 200 多种寄主植物,对我国农业生产造成了严重的破坏。自 1997 年转 Bt 基因抗虫棉在我国商业化种植以来,化学农药使用量大幅度减少,一方面增加了天敌昆虫的种类和数量,加强了部分害虫的自然调控作用,有效地控制了棉蚜的种群发展 (Lu *et al.*, 2012),另一方面天敌控制作用较差的害虫如绿盲蝽上升为主要害虫 (Lu *et al.*, 2010)。绿盲蝽种群的暴发还波及到其他寄主作物,近年来在各类果树、茶树等其他作物上为害也十分严重。虽然近年间人们致力于利用生态学 and 生物防治等手段对绿盲蝽进行综合防治,但由于绿盲蝽具有寄主范围广、寄主转换行为、高迁移性等独特的生物学特性,造成这些防治措施并没有达到最佳效果 (Lu and Wu, 2011)。目前我国对绿盲蝽的防控还主要依赖化学农药,如何绿色防治绿盲蝽仍然是我国农业生产面临的重要科学问题。

植物挥发物在植物与昆虫的通讯作用中发挥了关键作用,可以调控昆虫的多种行为,如引起昆虫对寄主植物的定向选择,引导昆虫寻找合适的产卵场所,影响昆虫的交配行为等 (杜家纬, 2001)。昆虫对寄主植物的定向选择是植物与昆虫相互依存关系中最重要行为之一。昆虫通过自身的视觉器官、味觉器官、触觉器官和嗅觉器官等各种感觉系统不断收集来自植物的各种信息,从形状、颜色、大小、化学性质、形态结构等方面对植物进行综合评价,最后

做出寄主选择 (陆宴辉等, 2008)。在昆虫诸多的感觉系统中灵敏的嗅觉系统发挥了决定作用。昆虫主要通过通过对寄主植物挥发的气味分子的识别来对寄主植物识别和定位。因此,准确了解昆虫对寄主植物挥发物的识别机制不仅可以在理论上阐明昆虫嗅觉识别高度特异性的分子和神经基础,在应用上还可以开发昆虫行为调控剂用于害虫的绿色防控。

昆虫的嗅觉识别是一个复杂的过程,在外周神经水平上主要通过分布在触角上嗅觉感器中的一系列蛋白参与来完成,这些蛋白包括气味受体 (odorant receptor, OR)、气味结合蛋白 (odorant binding protein, OBP)、离子型受体 (ionotropic receptor, IR)、化学感受蛋白 (chemosensory protein, CSP)、感觉神经元膜蛋白 (sensory neuron membrane protein, SNMP)、尼曼匹克 C2 蛋白 (Niemann-Pick proteins of class C2, NPC2) 和气味降解酶 (odorant degrading enzyme, ODE) (Rutzler and Zwiebel, 2005; de Bruyne and Baker, 2008; Sato and Touhara, 2008; Zhu *et al.*, 2018),其中气味受体发挥了核心作用。目前已知的昆虫气味受体分为 2 类:第 1 类为在不同昆虫间高度保守且广泛表达的非典型受体 (olfactory receptor co-receptor, Orco);第 2 类为种间高度变异的传统气味受体 (conventional odorant receptor, Orx) (Mombaerts, 1999; Benton *et al.*, 2006)。Orx 不单独对气味分子起识别作用,而是与 Orco 形成异源多聚体 (Butterwick *et al.*, 2018),共同将环境中的小分子化学信号转变为电信号,使嗅觉

神经元产生动作电位,最终引起昆虫作出相应的行为活动(Larsson *et al.*, 2004)。自1999年首次从黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 中鉴定出昆虫气味受体以来,伴随着一些模式昆虫基因组数据的公布,一系列昆虫气味受体基因家族被鉴定出来。包括从果蝇基因组中鉴定出62个气味受体基因(Clyne *et al.*, 1999; Gao and Chess, 1999; Vosshall *et al.*, 1999)。在家蚕 *Bombyx mori* 中鉴定出48个气味受体基因(Sakurai *et al.*, 2004; Nakagawa *et al.*, 2005; Wanner *et al.*, 2007)。随着气味受体基因陆续被鉴定,研究者们已经从分子和细胞层面展开对昆虫气味受体功能的一系列研究。

研究绿盲蝽的气味受体,有利于我们从分子层面深入了解绿盲蝽对寄主植物的嗅觉识别机制,为研制高效的引诱剂或驱避剂提供理论依据并开辟新途径。在实验室前期工作中,已通过绿盲蝽成虫触角转录组测序和生物信息学分析获得多条绿盲蝽气味受体基因序列。本研究中我们筛选并克隆了其中8个绿盲蝽气味受体基因,并对其表达模式和功能进行了研究,为研究绿盲蝽对寄主植物的识别机制提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试昆虫与组织收集

实验所用的绿盲蝽采自中国农业科学院廊坊试验基地,在中国农业科学院植物保护研究所实验室中使用新鲜四季豆 *Phaseolus vulgaris* 和鲜食玉米 *Zea mays* 在塑料盒内进行人工饲养。饲养温度为  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ ,相对湿度为60%~70%,光周期为16L:8D。收集羽化3 d的绿盲蝽雌雄成虫触角、头(无触角)、胸、腹、足和翅6种组织,用液氮迅速冷冻,储存于 $-70^\circ\text{C}$ 冰箱内备用。以相同方式收集3组不同批次的昆虫各组织样品。

### 1.2 RNA提取与cDNA的合成

使用Trizol试剂(Invitrogen,美国)按照说明书提取1.1节3组不同批次绿盲蝽雌雄成虫6种组织(触角、无触角的头、胸、腹、足和翅)的总RNA。每组触角、头(无触角)、胸、腹、足和翅的总RNA分别取自100, 50, 20, 20, 80和80头羽化3 d的绿盲蝽成虫。提取的总RNA通过NanoDrop 2000(NanoDrop Products,美国)来检测浓度和1.0%的琼脂糖凝胶电泳来检测质量。取2  $\mu\text{g}$  各个组织的RNA,以Oligo dT为引物,合成cDNA第1链,实验

操作依照First Strand cDNA Synthesis Kit(Thermo Scientific,美国)使用手册。此cDNA用作PCR和实时定量PCR(qPCR)的模板。

### 1.3 引物设计

基于实验室前期对绿盲蝽成虫触角转录组的测序和分析,我们选择具有完整开放阅读框的 *AlucOR9*, *AlucOR16*, *AlucOR38*, *AlucOR53*, *AlucOR55*, *AlucOR56*, *AlucOR57* 和 *AlucOR58* 进行基因克隆和功能验证。在qPCR实验中,选用绿盲蝽的持家基因 *AlucActin*(GenBank登录号:KU188517.1)为内参基因(张志翔等,2016)。使用Primer Premier 5.0软件设计基因克隆和qPCR引物,全部引物信息见表1。所有引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

### 1.4 基因克隆

以绿盲蝽触角cDNA为模板,利用基因克隆特异性引物扩增 *AlucOR9*, *AlucOR16*, *AlucOR38*, *AlucOR53*, *AlucOR55*, *AlucOR56*, *AlucOR57*, *AlucOR58* 以及 *AlucOrco*(GenBank登录号:MN657161)的完整开放阅读框序列。PCR反应体系:2  $\times$  PrimeStar Mix 12.5  $\mu\text{L}$ (含  $\text{Mg}^{2+}$ ),正反向引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各1  $\mu\text{L}$ ,加水至25  $\mu\text{L}$ 。在震荡器上混匀,短暂离心,放入PCR仪中进行扩增。其反应条件:98  $^\circ\text{C}$  预变性3 min;98  $^\circ\text{C}$  变性10 s,55  $^\circ\text{C}$  退火15 s,72  $^\circ\text{C}$  延伸90 s,35个循环;最后72  $^\circ\text{C}$  延伸10 min。PCR扩增产物通过1.0%琼脂糖凝胶电泳检测并将条带进行胶回收。将回收后的PCR产物连接到pEASY-Blunt克隆载体(全式金生物技术有限公司,北京)上,然后转入Trans-I-T1感受态细胞(全式金生物技术有限公司,北京)内,进行测序(华大基因,北京)。

### 1.5 序列分析

使用EXPASY(Expert Protein Analysis System)(<http://www.expasy.org>)的Translate tool(<http://web.expasy.org/translate>)将8条气味受体基因核苷酸序列翻译成氨基酸序列。使用TOPCONS(<http://topcons.net>)进行跨膜结构域预测。使用DNAMAN(<http://www.lynnon.com>)软件将 *AlucOR9*, *AlucOR16*, *AlucOR38*, *AlucOR53*, *AlucOR55*, *AlucOR56*, *AlucOR57* 和 *AlucOR58* 的氨基酸序列进行比对。

### 1.6 qPCR检测

利用qPCR检测 *AlucOR9*, *AlucOR16*, *AlucOR38*, *AlucOR53*, *AlucOR55*, *AlucOR56*, *AlucOR57* 和 *AlucOR58* 的表达水平。采用2  $\times$  Go Taq qPCR Master

表 1 本研究所用引物信息  
Table 1 Information of primers used in this study

引物 Primers	引物序列(5' - 3') Primer sequences	用途 Purpose	
AlucOR9-F	ATGGGCTTTTCAAGTTGGAT	基因克隆 Gene cloning	
AlucOR9-R	TTATTTTCCAATTTAGCCGAT		
AlucOR16-F	ATGAGTGGAGACATCAGTCGTTTC		
AlucOR16-R	TTACTTCTGTTTGTGGCCTG		
AlucOR38-F	ATGCTGCTGTGCTGGAAGAAG		
AlucOR38-R	TCAGTTGATGGCTCTCAGCATG		
AlucOR53-F	ATGGGAACATCTACGCTTGGTG		
AlucOR53-R	TTAGCCGTCCATCAACTTCAG		
AlucOR55-F	ATGGACATCCTTCACTACTCTGATC		
AlucOR55-R	TCACTCCGTAGTGGTGAGACCT		
AlucOR56-F	ATGGTTGAAGATCTAACGGTTAAAG		
AlucOR56-R	TCATACCAGTTTTTTGTAAGAGAGTG		
AlucOR57-F	ATGGCGGAGGATGATTATACG		
AlucOR57-R	TCATACCATTTCACTCAAGATACTG		
AlucOR58-F	ATGGCTCCTCAAGTTAATTTGTT		
AlucOR58-R	TTACGTATTTTCCATCAACTTCAG		
AlucOrco-F	ATGCAGAAAGTGAAGATGCAC		
AlucOrco-R	TTATTTGAGCTGCACCAACAC		
AlucOR9-EF	TCAGGGCCCGCCACCATGGGCTTTTCAAGTTGGAT		表达载体构建 Expression vector construction
AlucOR9-ER	TCAGCGGCCGCTTATTTTCCAATTTAGCCGAT		
AlucOR16-EF	TCAGGGCCCGCCACCATGACTGGAGACATCAGTCGTTT		
AlucOR16-ER	TCAGCGGCCGCTTACTTCTGTTTGTGGCCTG		
AlucOR38-EF	TCAGGGCCCGCCACCATGCTGCTGTGCTGGAAGAAG		
AlucOR38-ER	TCAGCGGCCGCTCAGTTGATGGCTCTCAGCA		
AlucOR53-EF	TCAGGGCCCGCCACCATGGGAACATCTACGCTTGGTG		
AlucOR53-ER	TCAGCGGCCGCTTAGCCGTCCATCAACTTCAG		
AlucOR55-EF	TCAGGGCCCACTAGTATGGACATCTTCACTACTCTGATC		
AlucOR55-ER	TCAGCGGCCGCTCACTCCGTAGTGGTGAGACCT		
AlucOR56-EF	TCAGGGCCCGCCACCATGGTTGAAGATCTAACGGTTAAAG		
AlucOR56-ER	TCAGCGGCCGCTCATACCAGTTTTTTGTAAGAGAGTG		
AlucOR57-EF	TCAGGGCCCGCCACCATGGCGGAGGATGATTATACG		
AlucOR57-ER	TCAGCGGCCGCTCATACCATTTCACTCAAGATACTG		
AlucOR58-EF	TCAGGGCCCGCCACCATGGCTCCTCAAGTTAATTTGTT		
AlucOR58-ER	TCAGCGGCCGCTTACGTATTTTCCATCAACTTCAG		
AlucOrco-EF	TCAGGGCCCGCCACCATGCAGAAAGTGAAGATGCAC		
AlucOrco-ER	TCAGCGGCCGCTTATTTGAGCTGCACCAACAC		
AlucOR9-qF	TCCGGCACCTGTAACATTGTTCC	qPCR	
AlucOR9-qR	TGCCCCACATACACATTGAAGA		
AlucOR16-qF	GCAGTTCTCTTCGCAGCTGATGA		
AlucOR16-qR	TCCAGCGATATGTTCTCCGTACA		
AlucOR38-qF	TCGACGAGCTGATGGACCTGATA		
AlucOR38-qR	TTGAGGCGAGCGAAGTGAACAAT		
AlucOR53-qF	CGAGGTGTACATGCCGTTGAGA		
AlucOR53-qR	GATGGTGCCGATGAAAGTGTTC		
AlucOR55-qF	ACAAATTGGTACGAAGCGGACCT		
AlucOR55-qR	GCTGCCTCTACGAATGTCTCCAG		
AlucOR56-qF	CTGGCCATTGGATAGGAGCAGTG		
AlucOR56-qR	AGACATCCCTACTGATCCGTGCA		
AlucOR57-qF	TCTTGGGAGATGGATGAAAACGCG		
AlucOR57-qR	ATGCGGCCAAAAGTACCACTGTAG		
AlucOR58-qF	ACATGCTGCTCAAGTTGGATCA		
AlucOR58-qR	ACGATAACATGGCCACACAAGCA		

下划线序列GGGCC和CGGCCG分别为*Apa* I和*Not* I的酶切位点。Underlined sequences GGGCC and CGGCCG are the restriction sites of *Apa* I and *Not* I, respectively.

Mix (Promega, 美国) 在实时荧光定量 PCR 仪 iCycler iQ2 (Bio-Rad, 美国) 上进行 qPCR。反应体系:  $2 \times$  Go Taq qPCR Master Mix  $10 \mu\text{L}$ , 上下游引物 ( $10 \mu\text{mol/L}$ ) 各  $0.5 \mu\text{L}$ ,  $1.2$  节合成的 cDNA 模板  $1 \mu\text{L}$ , RNase-free Water  $8 \mu\text{L}$ 。反应条件:  $95^\circ\text{C}$  预变性  $2 \text{ min}$ ;  $95^\circ\text{C}$  变性  $15 \text{ s}$ ,  $60^\circ\text{C}$  退火  $1 \text{ min}$ ,  $40$  个循环。所有样品均使用独立的 RNA 进行 3 次重复, 内参基因 *AlucActin*。通过  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  值法来比较各个基因不同组织的相对表达量, 计算公式如下:  $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{目标基因}} - \text{Ct}_{\text{内参基因}}$ ;  $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{样品}} - \Delta\text{Ct}_{\text{参照物}}$ 。得到的 3 套模板的  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  值作图, 并比较基因的相对表达量。

### 1.7 表达载体构建和 cRNA 合成

将测序结果正确的各 *AlucOR* 基因经 *Apa I* 和 *Not I* 双酶切后, 亚克隆到表达载体 pT7Ts 上 (体系为  $6 \mu\text{L}$  双酶切后的基因片段,  $1 \mu\text{L}$   $10 \times$  T4 Ligase

Buffer,  $2 \mu\text{L}$  双酶切过的 pT7Ts 载体和  $1 \mu\text{L}$  T4 Ligase, 连接条件为  $22^\circ\text{C}$  保持  $2 \text{ h}$ ), 连接体系转入 Trans-1-T1 感受态细胞 (全式金生物技术有限公司, 北京) 内。过夜培养后, 挑取 8 个阳性克隆进行菌液 PCR 验证, 然后测序。验证正确的重组质粒, 使用 *Sma I* 进行单酶切质粒线性化, 利用 mMESAGE mMACHINET7 (Ambion, 美国) 进行 cRNA 的合成。

### 1.8 气味化合物

实验中共使用 56 种气味化合物, 均来自百灵威和 Sigma-Aldrich 公司 (纯度  $\geq 95\%$ ), 见表 2。实验所用气味化合物首先用 DMSO 配制成  $1 \text{ mol/L}$  的储备液, 存储在  $-20^\circ\text{C}$  冰箱中备用。实验前, 使用  $1 \times$  Ringer ( $96 \text{ mmol/L NaCl}$ ,  $2 \text{ mmol/L KCl}$ ,  $5 \text{ mmol/L MgCl}_2$ ,  $0.8 \text{ mmol/L CaCl}_2$  和  $5 \text{ mmol/L HEPES}$ , pH 7.6) 溶液稀释到浓度为  $10^{-4} \text{ mol/L}$ 。为确保实验结果的准确, 每次实验所用气味化合物均是现用现配。

表 2 本研究所用气味化合物  
Table 2 Odor compounds used in this study

气味标样 Ligands	来源 Source	CAS 号 CAS accession no.	气味标样 Ligands	来源 Source	CAS 号 CAS accession no.
(3E)-4,8-二甲基-1,3,7-壬三烯	百灵威	19945-61-0	乙酸叶醇酯	Sigma	3681-71-8
(3E)-4,8-Dimethyl-1,3,7-nonatriene	J&K Scientific		(Z)-3-Hexenyl acetate	Sigma	68917-75-9
(3E,7E)-4,8,12-三甲基十三-1,3,7,11-四烯	百灵威	62235-06-7	水杨酸甲酯	Sigma	68917-75-9
(3E,7E)-4,8,12-Trimethyl trideca-1,3,7,11-tetraene	J&K Scientific		Methyl salicylate	Sigma	68917-75-9
二甲基二硫醚	Sigma	624-92-0	$\beta$ -紫罗兰酮	Sigma	79-77-6
Dmethyl disulfide			$\beta$ -Ionone	Sigma	79-77-6
$\alpha$ -蒎烯	Sigma	80-56-8	十二醛	Sigma	112-54-9
$\alpha$ -Pinene			Dodecanal	Sigma	112-54-9
苯乙醛	Sigma	122-78-1	1-庚醇	Sigma	111-70-6
Phenylacetaldehyde			1-Heptanol	Sigma	111-70-6
苯乙酮	Sigma	98-86-2	己酸己酯	Sigma	6378-65-0
Acetopenone			Hexyl hexanoate	Sigma	6378-65-0
$\alpha$ -松油烯	Sigma	99-86-5	辛醛	Sigma	124-13-0
$\alpha$ -Terpinene			Octanal	Sigma	124-13-0
丁酸辛酯	Sigma	110-39-4	2-己酮	Sigma	591-78-6
Octyl butyrate			2-Hexanone	Sigma	591-78-6
芳樟醇	Sigma	78-70-6	(E)-乙酸-2-己烯-1-醇酯	Sigma	2497-18-9
Linalool			(E)-2-Hexenyl acetate	Sigma	2497-18-9
月桂烯	Sigma	123-35-3	己酸乙酯	Sigma	123-66-0
Myrcene			Ethyl hexanoate	Sigma	123-66-0
茉莉酸甲酯	Sigma	1211-29-6	苯甲酸甲酯	Sigma	93-58-3
Methyl jasmonate			Methyl benzoate	Sigma	93-58-3
罗勒烯	Sigma	13877-91-3	苾烯	Sigma	79-92-5
Ocimene			Camphene	Sigma	79-92-5
香叶醇	Sigma	106-24-1	香茅醛	Sigma	106-23-0
Geraniol			( $\pm$ )-Citronellal	Sigma	106-23-0

续表 2 Table 2 continued

气味标样 Ligands	来源 Source	CAS 号 CAS accession no.	气味标样 Ligands	来源 Source	CAS 号 CAS accession no.
$\beta$ -石竹烯 $\beta$ -Caryophyllene	Sigma	87-44-5	苯甲醛 Benzaldehyde	Sigma	100-52-7
丁酸戊酯 Pentyl butyrate	Sigma	540-18-1	氧化石竹烯 (-)-Caryophyllene oxide	Sigma	1139-30-6
(-)- $\beta$ -蒎烯 $\beta$ -Pinene	Sigma	18172-67-3	庚醛 Heptanal	Sigma	111-71-7
乙酸正辛酯 n-Octyl acetate	Sigma	112-14-1	反-2-己烯醛 (E)-2-Hexenal	Sigma	6728-26-3
$\alpha$ -石竹烯 $\alpha$ -Caryophyllene	Sigma	6753-98-6	乙酸苯甲酯 Benzyl acetate	Sigma	140-11-4
丁酸乙酯 Ethyl butyrate	Sigma	105-54-4	桃金娘烯醛 (1R)-(-)-Myrtenal	Sigma	18486-69-6
间二甲苯 m-Xylene	Sigma	108-38-3	4-乙基苯甲醛 4-Ethylbenzaldehyde	Sigma	4748-78-1
甲基庚烯酮 6-Methyl-5-hepten-2-one	Sigma	110-93-0	乙酸壬酯 Nonyl acetate	Sigma	143-13-5
$\gamma$ -蒎品烯 $\gamma$ -Terpinene	Sigma	99-85-4	四氢芳樟醇 3,7-Dimethyl-3-octanol	Sigma	78-69-3
乙酸芳樟酯 Linalyl acetate	Sigma	115-95-7	十三烷 Tridecane	Sigma	629-50-5
乙酸庚酯 Heptyl acetate	Sigma	112-06-1	反-3-己烯醇 (E)-3-Hexenol	Sigma	928-97-2
甲酸丁酯 Butyl formate	Sigma	592-84-7	2-丙烯酸丁酯 Butyl acrylate	Sigma	141-32-2
丁酸庚酯 Heptyl butyrate	Sigma	5870-93-9	丙酸丁酯 Butyl propionate	Sigma	590-01-2
乙酸己酯 Hexyl acetate	Sigma	142-92-7	乙酸辛酯 Octyl acetate	Sigma	112-14-1
丁酸丁酯 Butyl butyrate	Sigma	109-21-7	乙酸戊酯 Amyl acetate	Sigma	628-63-7

## 1.9 爪蟾卵母细胞表达结合双电极电压钳记录

爪蟾卵母细胞表达和双电极电压钳记录方法参照前人的使用方法 (Lu *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2010)。将合成好的浓度为 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  的 *AlucOR* 和 *AlucOrco* cRNA 各 1  $\mu\text{L}$  混匀到一起, 按照每个细胞注射 27.6 nL 的量注射到健康且成熟的爪蟾卵母细胞中。将注射好的爪蟾卵母细胞放在培养液 (1  $\times$  Ringer, 5% 马血清, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  四环素, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  链霉素和 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  丙酮酸钠) 中以 18 $^{\circ}\text{C}$  恒温培养 3 d。然后用 OC-725C 双电极电压钳 (Warner, 美国) 记录爪蟾卵母细胞对不同气味挥发物刺激的反应。通过数模转化器 Digidata 1440A 和软件 pCLAMP 10.2 (Axon, 美国) 获取和分析具体的数据。

## 1.10 数据分析

基因表达量结果以平均值  $\pm$  标准差表示, 雌雄各组织之间表达量的差异采用 SAS 软件 LSD 检验进行多重比较, 利用 one-way ANOVA 的统计方法进行统计分析, 显著性水平  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 绿盲蝽气味受体基因的克隆和序列分析

根据实验室前期对绿盲蝽成虫触角转录组测序分析所得的结果, 设计特异性克隆引物, 克隆得到 *AlucOR9*, *AlucOR16*, *AlucOR38*, *AlucOR53*, *AlucOR55*, *AlucOR56*, *AlucOR57* 和 *AlucOR58* 的 cDNA 全长序列 (GenBank 登录号: MN905538 – MN905545)。这

8 个气味受体基因的开放阅读框全长范围在 1 131 ~ 1 312 bp, 编码 376 ~ 437 个氨基酸。利用 TOPCONS 预测发现 8 个气味受体均具有 7 个跨膜

结构域, N 末端位于细胞膜内, C 末端位于细胞膜外 (图 1)。通过序列比对发现这 8 个气味受体基因的氨基酸序列一致性在 11.63% ~ 64.23%。



图 1 绿盲蝽 ORs 氨基酸序列的比对和跨膜区域的预测

Fig. 1 Sequence alignment and transmembrane domain prediction of ORs from *Apolygus lucorum*

保守的氨基酸位点加框, 预测出的 7 个跨膜结构域 (TM1 - TM7) 用黑实线画出。The conserved amino acid sites are shown in the frame. Seven transmembrane domains (TM1 - TM7) were indicated by solid lines.

### 2.2 8 个气味受体基因在绿盲蝽雌雄成虫不同组织中的表达谱

利用 qPCR 方法检测 8 个气味受体基因在绿盲蝽雌、雄成虫不同组织的转录水平。结果表明, 这 8

个气味受体基因均在成虫触角中高表达; 除 *AlucOR38* 外, 其他 7 个气味受体基因在雌成虫触角中的表达量显著高于在雄成虫中的 ( $P < 0.05$ ) (图 2)。

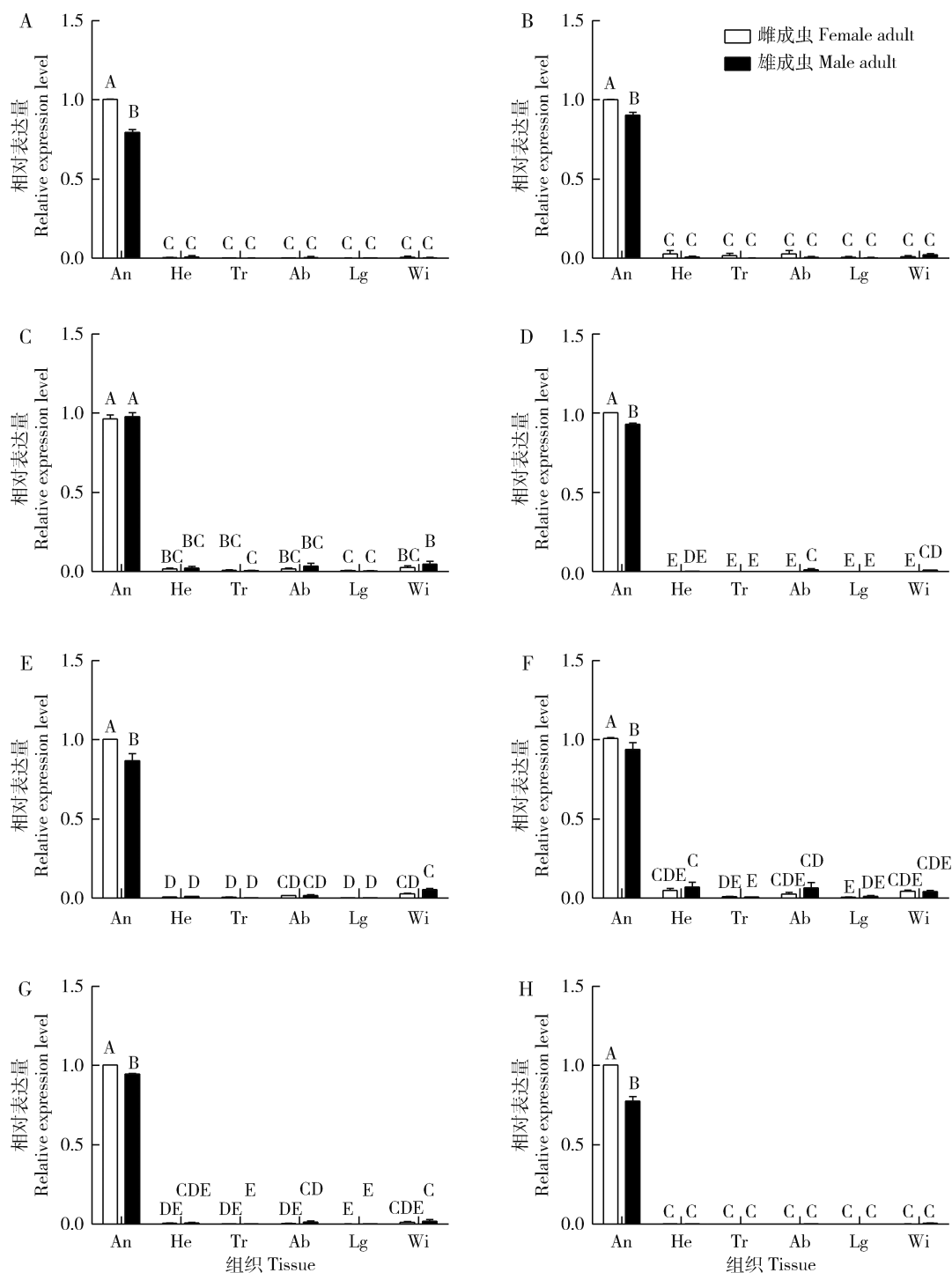


图 2 8 个绿盲蝽气味受体基因在成虫组织中的表达谱

Fig. 2 Expression profiles of eight AlucOR genes in different adult tissues of *Apolygus lucorum*

A: *AlucOR9*; B: *AlucOR16*; C: *AlucOR38*; D: *AlucOR53*; E: *AlucOR55*; F: *AlucOR56*; G: *AlucOR57*; H: *AlucOR58*. An: 触角 Antennae; He: 无触角的头 Head without antenna; Tr: 胸 Thorax; Ab: 腹 Abdomen; Lg: 足 Leg; Wi: 翅 Wing. 图中数据为平均值  $\pm$  标准差; 柱上不同大写字母表示各组织中的基因表达量在雌雄之间差异显著 (one-way ANOVA, LSD 检验,  $P < 0.05$ )。Data in the figure are mean  $\pm$  SD. Different capital letters above bars indicate significant difference in the gene expression level in different tissues between female and male by LSD test of one-way ANOVA ( $P < 0.05$ ).

### 2.3 8 个绿盲蝽气味受体的功能分析

在爪蟾卵母细胞中分别将 8 个 AlucOR 分别与

AlucOrco 进行共表达, 用双电极电压钳系统记录 AlucOR/AlucOrco 对共计 56 种测试气味化合物的



电生理反应。电压钳记录结果显示, AlucOR57/AlucOrco 对其中 15 种气味化合物(苯甲醛、氧化石竹烯、庚醛、反-2-己烯醛、乙酸苯甲酯、桃金娘烯醛、4-乙基苯甲醛、乙酸壬酯、四氢芳樟醇、十三烷、反-3-

己烯醇、2-丙烯酸丁酯、丙酸丁酯、乙酸辛酯和乙酸戊酯)有反应(图 3), 对其余的气味化合物无反应; 其他 7 个绿盲蝽气味受体对 56 种测试气味化合物均无反应。

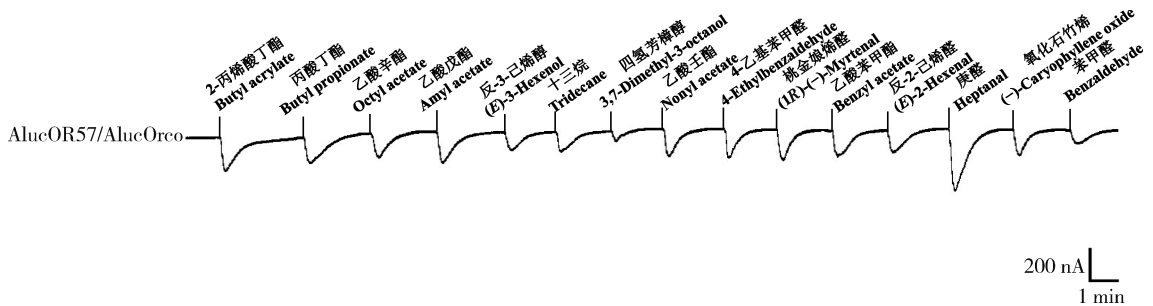


图 3 双电极电压钳记录的爪蟾卵母细胞共表达 AlucOR57/AlucOrco 对不同气味化合物的反应

Fig. 3 Responses of *Xenopus* oocytes with co-expressed AlucOR57/AlucOrco to stimulation with different odor compounds by two-electrode voltage clamp recording

### 3 讨论

本研究克隆得到了 8 个绿盲蝽气味受体的完整 ORF 序列, 序列分析的结果显示这 8 个气味受体具有昆虫气味受体典型的结构特征 (Benton *et al.*, 2006; Leal, 2013)。序列比对的结果显示绿盲蝽 8 个气味受体的氨基酸序列一致性非常低, 这一结果符合昆虫气味受体序列高度特异性的特征, 也与我们以前关于绿盲蝽气味受体的研究结果一致, 暗示绿盲蝽的不同气味受体在功能上也可能存在较大差异 (Yan *et al.*, 2015)。

气味受体的功能与其表达模式具有密切的联系 (Krieger *et al.*, 2002; Legeai *et al.*, 2011), 因此不同气味受体在组织表达模式上存在很大差异。性信息素受体一般在雄虫触角内高表达或特异性表达, 而普通气味受体的表达模式则变化很大。一些气味受体可能在雌虫触角上高表达或特异表达, 例如家蚕的 BmOR19, BmOR30, BmOR45 和 BmOR47 都在雌虫触角中高表达, 且能识别芳樟醇、苯甲酸、2-苯乙醇和苯甲醛等植物挥发物, 推测其可能参与雌虫对产卵场所的选择 (Anderson *et al.*, 2009)。很多气味受体在雌雄成虫触角间具有相同的表达水平, 如苜蓿盲蝽 *Adelphocoris lineolatus* 的 AlinOR8 在雌雄成虫触角中均高表达, 且对 7 种酯类、芳香族和醇类化合物有反应, 因此推测其可能参与寄主植物的选择 (严曙玮, 2015)。某些气味受体还在触角之外的其他组织中表达。qPCR 结果(图 2)显示 8 个绿盲蝽

气味受体基因均在触角中高表达, 暗示它们参与了绿盲蝽的嗅觉识别过程; 而不同气味受体基因在雌雄触角中的表达存在明显不同, 虽然 8 个气味受体基因在雌雄触角中的表达量都很高, 但其中 7 个气味受体基因在雌虫触角中表达量均高于雄虫触角中的, 暗示它们可能在雌虫的嗅觉感受中发挥重要的作用。

利用爪蟾卵母细胞异源表达结合双电极电压钳记录系统, 我们检测了 8 个绿盲蝽气味受体对 56 种气味化合物的反应。结果显示只有 AlucOR57 对 15 种气味化合物(苯甲醛、氧化石竹烯、庚醛、反-2-己烯醛、乙酸苯甲酯、桃金娘烯醛、4-乙基苯甲醛、乙酸壬酯、四氢芳樟醇、十三烷、反-3-己烯醇、2-丙烯酸丁酯、丙酸丁酯、乙酸辛酯和乙酸戊酯)有反应, 而其余 7 个气味受体对这 56 种气味化合物均无反应(图 3)。AlucOR57 可以识别的 15 种气味化合物组分包括多种已知的绿盲蝽寄主植物挥发物, 如潘洪生 (2013) 从绿盲蝽寄主植物的花期挥发物中鉴定出了 2-丙烯酸丁酯和丙酸丁酯, 这两种化合物可以激活绿盲蝽雌雄成虫触角的电生理反应。2-丙烯酸丁酯和丙酸丁酯混合物(3:1)在田间对绿盲蝽显示出很好的诱集效果(潘洪生等, 2014)。而对于绿盲蝽的近缘物种中黑盲蝽 *Adelphocoris suturalis*、苜蓿盲蝽和三点盲蝽 *Adelphocoris fasciaticollis*, 2-丙烯酸丁酯和丙酸丁酯也有显著的吸引作用 (修春丽, 2014)。AlucOR57 对多种植物挥发物均有反应, 我们推测该受体可能参与绿盲蝽对寄主植物的识别和定位。但以上推测仍需要进一步的 RNAi 或基因敲

除实验进行体内功能和行为学实验验证。

除 AlucOR57 以外, 我们检测的其他 7 个绿盲蝽气味受体对检测的 56 种气味化合物均无反应(图 3), 这可能是由于我们检测的气味数量较少, 这 7 个气味受体的配体不在检测的范围之中。此外, 在昆虫体内气味受体对气味分子的识别还需要其他蛋白包括气味结合蛋白、化学感受蛋白、感觉神经元膜蛋白以及 NPC2 蛋白的参与, 而我们在进行体外功能检测时并未加入这些蛋白, 可能影响到气味受体发挥其正常的功能。这几个受体的具体功能如何, 仍需后续试验进行验证。

根据本研究的结果, 我们推测 AlucOR57 在绿盲蝽对寄主植物识别过程中发挥了重要功能, 对此气味受体的研究有助于我们进一步了解绿盲蝽识别寄主植物的分子机制, 为研发高效环保的绿盲蝽行为调控剂提供理论指导, 为绿盲蝽的综合防治提供新思路和新方法。

### 参考文献 (References)

- Anderson AR, Wanner KW, Trowell SC, Warr CG, Jaquin-Joly E, Zaggti P, Robertson H, Newcomb RD, 2009. Molecular basis of female-specific odorant responses in *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 39(3): 189–197.
- Benton R, Sachse S, Michnick SW, Vosshall LB, 2006. Atypical membrane topology and heteromeric function of *Drosophila* odorant receptors in vivo. *PLoS Biol.*, 4(2): e20.
- Butterwick JA, Marmol JD, Kim KH, Kahlson MA, Rogow JA, Walz T, Ruta V, 2018. Cryo-EM structure of the insect olfactory receptor Orco. *Nature*, 560(7719): 447–452.
- Clyne PJ, Warr CG, Freeman MR, Lessing D, Kim J, Carlson JR, 1999. A novel family of divergent seven-transmembrane proteins; candidate odorant receptors in *Drosophila*. *Neuron*, 22(2): 327–338.
- De Bruyne M, Baker TC, 2008. Odor detection in insects: volatile codes. *J. Chem. Ecol.*, 34(7): 882–897.
- Du JW, 2001. Plant-insect chemical communication and its behavior control. *Acta Phytophysiol. Sin.*, 27(3): 193–200. [杜家纬, 2001. 植物-昆虫间的化学通讯及其行为控制. 植物生理学报, 27(3): 193–200]
- Gao Q, Chess A, 1999. Identification of candidate *Drosophila* olfactory receptors from genomic DNA sequence. *Genomics*, 60(1): 31–39.
- Krieger J, Raming K, Dewer YME, Bette S, Conzelmann S, Breer H, 2002. A divergent gene family encoding candidate olfactory receptors of the moth *Heliothis virescens*. *Eur. J. Neurosci.*, 16(4): 619–628.
- Larsson MC, Domingos AI, Jones WD, Chiappe ME, Amrein H, Vosshall LB, 2004. *Or83b* encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction. *Neuron*, 43(5): 703–714.
- Leal WS, 2013. Odorant reception in insects: roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes. *Annu. Rev. Entomol.*, 58: 373–391.
- Legeai F, Malpel S, Montagné N, Monsemper C, Cousserans F, Merlin C, Francois MC, Maibèche-Coisné M, Gavory F, Poulain J, Jacquin-Joly E, 2011. An expressed sequence tag collection from the male antennae of the noctuid moth *Spodoptera littoralis*: a resource for olfactory and pheromone detection research. *BMC Genomics*, 12: 86.
- Lu TK, Qiu YT, Wang GR, Kwon JY, Rutzler M, Kwon HW, Pitts RJ, van Loon JJ, Takken W, Carlson JR, Zwiebel LJ, 2007. Odor coding in the maxillary palp of the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae*. *Curr. Biol.*, 17(18): 1533–1544.
- Lu YH, Wu KM, 2011. Mirid bugs in China: pest status and management strategies. *Outlooks Pest Manag.*, 22(6): 248–252.
- Lu YH, Wu KM, Jiang YY, Guo YY, Desneux N, 2012. Widespread adoption of Bt cotton and insecticide decrease promotes biocontrol services. *Nature*, 487(7407): 362–365.
- Lu YH, Wu KM, Jiang YY, Xia B, Li P, Feng HQ, Wyckhuys KAG, Guo YY, 2010. Mirid bug outbreaks in multiple crops correlated with wide-scale adoption of Bt cotton in China. *Science*, 328(5982): 1151–1154.
- Lu YH, Zhang YJ, Wu KM, 2008. Host-plant selection mechanisms and behavioral manipulation strategies of phytophagous insects. *Acta Ecol. Sin.*, 28(10): 5113–5122. [陆宴辉, 张永军, 吴孔明, 2008. 植食性昆虫的寄主选择机理及行为调控策略. 生态学报, 28(10): 5113–5122]
- Mombaerts P, 1999. Molecular biology of odorant receptors in vertebrates. *Annu. Rev. Neurosci.*, 22: 487–509.
- Nakagawa T, Sakurai T, Nishioka T, Touhara K, 2005. Insect sex-pheromone signals mediated by specific combinations of olfactory receptors. *Science*, 307(5715): 1638–1642.
- Pan HS, 2013. Chemical Communication Mechanism between *Apolygus lucorum* (Meyer-Dür) and Its Fall Host Plants of *Artemisia* Spp. PhD Dissertation, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing. [潘洪生, 2013. 绿盲蝽与秋季蒿类寄主的化学通讯机制. 北京: 中国农业科学院博士学位论文]
- Pan HS, Lu YH, Wu KM, 2014. *Apolygus lucorum* adult botanical attractant composition and application. China Patent: CN103734130A. [潘洪生, 陆宴辉, 吴孔明, 2014. 绿盲蝽成虫的植物源引诱剂组合物及其应用. 中国专利: CN103734130A]
- Rutzler M, Zwiebel LJ, 2005. Molecular biology of insect olfaction: recent progress and conceptual models. *J. Comp. Physiol. A*, 191(9): 777–790.
- Sakurai T, Nakagawa T, Mitsuno H, Mori H, Endo Y, Tanoue S, Yasukochi Y, Touhara K, Nishioka T, 2004. Identification and functional characterization of a sex pheromone receptor in the silkworm, *Bombyx mori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(47): 16653–16658.
- Sato K, Touhara K, 2008. Insect olfaction: receptors, signal transduction, and behavior. *Results Probl. Cell. Differ.*, 47: 121–

138.

- Vosshall LB, Amrein H, Morozov PS, Rzhetsky A, Axel R, 1999. A spatial map of olfactory receptor expression in the *Drosophila* antenna. *Cell*, 96(5): 725–736.
- Wang GR, Carey AF, Carlson JR, Zwiebel LJ, 2010. Molecular basis of odor coding in the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107(9): 4418–4423.
- Wanner KW, Anderson AR, Trowell SC, Theilmann DA, Robertson HM, Newcomb RD, 2007. Female-biased expression of odourant receptor genes in the adult antennae of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Mol. Biol.*, 16(1): 107–119.
- Xiu CL, 2014. Olfactory Identifying Mechanisms of *Adelphocoris suturalis*, *Adelphocoris lineolatus* and *Adelphocoris fasciaticollis* (Hemiptera: Miridae) to Host Plant Volatiles. MSc Thesis, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu. [修春丽, 2014. 中黑盲蝽, 苜蓿盲蝽与三点盲蝽对寄主植物挥发物的嗅觉识别机制. 江苏扬州: 扬州大学硕士学位论文]
- Yan SW, 2015. Gene Cloning and Functional Characterization of Olfactory Receptors in *Apolygus lucorum* and *Adelphocoris linedatus*. PhD Dissertation, Nanjing Agricultural University, Nanjing. [严曙玮, 2015. 绿盲蝽与苜蓿盲蝽气味受体基因的克隆和功能鉴定. 南京: 南京农业大学博士学位论文]
- Yan SW, Zhang J, Liu Y, Li GQ, Wang GR, 2015. An olfactory receptor from *Apolygus lucorum* (Meyer-Dur) mainly tuned to volatiles from flowering host plants. *J. Insect Physiol.*, 79: 36–41.
- Zhang ZX, Zhang MP, Wang GR, Liu Y, 2016. Cloning and characterization of an odorant receptor gene *AlucOR40* in *Apolygus lucorum* (Hemiptera: Miridae). *Acta Entomol. Sin.*, 59(6): 592–601. [张志翔, 张美萍, 王桂荣, 刘杨, 2016. 绿盲蝽气味受体基因 *AlucOR40* 的克隆及功能研究. 昆虫学报, 59(6): 592–601]
- Zhu J, Guo MB, Ban LP, Song LM, Liu Y, Pelosi P, Wang GR, 2018. Niemann-Pick C2 proteins; a new function for an old family. *Front. Physiol.*, 9: 52.

(责任编辑: 马丽萍)