褐飞虱化学感受蛋白基因克隆与信号肽活性鉴定

刘 傲 郭倩汝 史韵竹 王满囷*

（华中农业大学植物科学技术学院，武汉 430070）

摘要：为科学利用化学感受蛋白（chemosensory protein，CSP）绿色防控褐飞虱*Nilaparvata lugens*，采用同源序列比对和基因克隆对褐飞虱CSP基因进行鉴定，利用基因组分析其CSP基因簇，通过酵母信号肽分泌验证系统验证褐飞虱CSP信号肽的活性。结果显示，共克隆了15个褐飞虱CSP基因，其中有4个CSP基因为新鉴定到的；共发现了2个CSP基因簇，均位于褐飞虱2号染色体上；14个CSP的N末端序列有较强的信号肽分泌活性，其中11个活性序列与SignalP-4.1预测的序列一致，另外3个CSP的活性序列比SignalP-4.1预测的序列长。

关键词：褐飞虱；化学感受蛋白；基因克隆；基因簇；信号肽活性

Cloning of chemosensory protein genes and identification of signal peptide activity in brown planthopper *Nilaparvata lugens*

Liu Ao Guo Qianru Shi Yunzhu Wang Manqun*

（College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei Province, China）

Abstract: To develop green prevention and control methods against brown planthopper *Nilaparvata lugens* based on chemosensory proteins (CSPs), the CSP genes were identified with homologous sequence alignment and gene cloning. The CSP gene clusters were analyzed with its genome, and the signal peptide activities of CSPs were verified with yeast signal peptide secretion verification system. The results showed that a total of 15 CSP genes were cloned from *Nilaparvata lugens*, of which four were newly identified. Two CSP gene clusters were identified, and both were located on chromosome 2. The N-terminal sequences of 14 CSPs showed strong signal peptide secretion activity, 11 of which were consistent with SignalP-4.1 prediction sequences, and the other three were longer than prediction.

Key words: *Nilaparvata lugens*; chemosensory protein; gene cloning; gene cluster; signal peptide activity

褐飞虱*Nilaparvata lugens*属半翅目飞虱科，是一种单食性昆虫，只能在水稻和普通野生稻上取食和繁殖，是水稻生成中最重要的害虫之一（Bottrell & Schoenly，2012）。褐飞虱群集于水稻基部，通过吸食韧皮部汁液和产卵刺伤茎叶组织直接为害水稻，同时通过传播草状矮化病和齿叶矮缩病等水稻病毒病和加重水稻纹枯病等病害间接为害水稻（Cheng et al.，2013）。褐飞虱具有迁飞性，易暴发成灾（程家安和祝增荣，2006），对不同杀虫剂（Zhang et al.，2016；2017；Wu et al.，2018）、施氮量（卢文才等，2020）和水稻品种（何帅洁等，2021）等因素均有极好的适应能力，这给褐飞虱的防控增加了困难。褐飞虱极好的适应能力可能与其复杂的化学感受系统相关，这种复杂的化学感受系统有助于其寄主定位、求偶和寻找产卵位点等（Gadenne et al.，2016），而化学感受蛋白（chemosensory protein，CSP）被认为是化学感受系统的重要组成部分（Pelosi et al.，2014；Brito et al.，2016），深入研究褐飞虱CSP的功能，基于此开发新的防治策略对于绿色防控褐飞虱具有重要意义。

基金项目：国家重点研发计划（2021YFD1401100）

* 通信作者（Author for correspondence），E-mail：mqwang@mail.hzau.edu.cn

收稿日期：2021-05-15

CSP为小分子量可溶性蛋白，在昆虫触角和下颚须等化学感受部位合成后被分泌到淋巴液中，并携带挥发物或信息素等疏水性物质到化学感受器的神经元中，进而引发下游的行为反应，因此CSP在昆虫感知外部环境的过程中发挥着重要作用（Pelosi et al.，2014；Pentzold et al.，2017；张玉等，2019）。当受到环境等因素胁迫时，生物体通过细胞产生内质网应激来调控分泌蛋白的分泌（Klein et al.，2006）。CSP被认为是典型的分泌蛋白，且与环境感知相关，昆虫可能通过调控CSP分泌来适应环境变化。当前判断CSP是否分泌主要利用在线预测工具SignalP预测其信号肽，但预测到的信号肽是否有分泌活性尚不清楚，因而需要其他手段进行验证。关于褐飞虱CSP的研究较多，如周文武（2013）基于第1代褐飞虱基因组数据预测褐飞虱有17个CSP基因和1个由4个CSP基因组成的基因簇；通过对褐飞虱头部和触角进行转录组测序和基因克隆，11个CSP基因被鉴定（Xu et al.，2009；Yang et al.，2014；Zhou et al.，2014）；Waris et al.（2018；2020a，b）研究结果表明CSP3、CSP8、CSP10分别与2-十三烷酮、橙花叔醇、顺式-3-己烯乙酸酯等水稻挥发物有结合能力，且这些挥发物对褐飞虱有引诱或趋避作用，因此研究CSP对于防控褐飞虱具有重要意义，但目前关于褐飞虱CSP的研究还不够全面和深入。

为全面了解褐飞虱CSP的功能，本研究拟通过基因克隆和同源序列比对发现褐飞虱新的CSP基因，对其进行基因组序列分析，并采用酵母信号肽分泌验证系统对预测的褐飞虱CSP信号肽分泌活性进行验证，以期为利用化学感受系统绿色防控褐飞虱提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株和载体：缺陷酵母菌株YTK12、酵母信号肽分泌验证载体pSUC2和阳性对照载体pSUC2-avr1b均由华中农业大学黄俊斌课题组提供；褐飞虱cDNA，华中农业大学昆虫化学生态学实验室保存。

培养基：酵母色氨酸合成缺陷型（synthetic dropout medium-tryptophan，SD-T）液体培养基，北京酷来搏生物科技有限公司；SD-T液体培养基中加入2%琼脂即为SD-T固体培养基；酵母蛋白胨葡萄糖腺嘌呤（yeast peptone dextrose adenine，YPDA）液体培养基成分为2%蛋白胨、1%酵母提取物、2%葡萄糖和0.012%腺嘌呤；YPDA液体培养基中加入2%琼脂即为YPDA固体培养基。

试剂与仪器：大肠杆菌*Escherichia coli*感受态细胞DH5α，北京擎科生物科技有限公司；CV21-Zero Background pTOPO-TA Cloning Kit克隆载体试剂盒，北京艾德莱生物科技有限公司；2×Hieff™ PCR Master Mix，翌圣生物科技（上海）股份有限公司；E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit胶回收试剂盒和Plasmid Mini Kit I D6943质粒提取试剂盒，美国Omega Bio-Tek公司；限制性内切酶*Eco*R I和*Xho* I，美国New England Biolabs公司；ClonExpress II One Step Cloning Kit同源重组试剂盒，南京诺唯赞生物科技股份有限公司；Yeastmaker™ Yeast Transformation System 2酵母转化试剂盒，宝日医生物技术（北京）有限公司；其余试剂均为国产分析纯。T100 PCR仪，美国Bio-Rad公司；5418高速离心机，德国Eppendorf公司；ZDP-2080恒温培养箱，上海智城分析仪器制造有限公司；DYCP-31E水平核酸电泳仪，北京六一生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 褐飞虱CSP基因的克隆与基因组分析

利用BLAST工具（https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi）对已知的11个褐飞虱CSP基因序列及其编码蛋白质序列进行同源性比对，以搜索可能未鉴定的CSP基因。根据候选基因LOC111045660、LOC111045661、LOC111047069、LOC111047204和LOC111060335的基因序列，使用SnapGene 4.2.4软件分别设计上下游基因扩增引物45660-F（5′-ATGCGAGCGTCGATGTTTCT-3′）/45660-R（5′-TCACTGACCCTTGCTGTCGTC-3′）、45661-F（5′-ATGATGCATCAGATGATAGTCGTCG-3′）/45661-R（5′-TCACTGACCCTTGCTGTCGTCT-3′）、47069-F（5′-ATGATGCATCAAGTAATTGTCGCTT-3′）/47069-R（5′-TCACCTCCTTCCTTGGCTCTTG-3′）、47204-F（5′-ATGCAGTTGGCTCTGTTTTGTTTG-3′）/47204-R（5′-TTAAGCCTTCGTGAACTTGGGTGC-3′）和60335-F（5′-ATGAGCAATTATATTATCAAATGTGTTCTG-3′）/60335-R（5′-ATGAGCAATTATATTATCAAATGTGTTCTG-3′），所有引物均委托武汉天一辉远生物科技有限公司合成。根据已鉴定的褐飞虱CSP基因*CSP1~CSP11*的基因序列分别设计上下游基因扩增引物CSP1-F（5′-ATGTTCAAGAACGTCCTCCTCG-3′）/CSP1-R（5′-TTAGACCTTGATGCCTCGCTTG-3′）、CSP2-F（5′-ATGTCCAAGTTGCCCGTGA-

C-3′)/CSP2-R(5′-TCAGTCAAGCTTGATGCCTTT-CA-3′)、CSP3-F(5′-ATGAAGTTCTTGTGTGTCA-CAATTTTT-3′)/CSP3-R(5′-CTAGACCTTGGCTGG-GAAGCC-3′)、CSP4-F(5′-ATGTTTCTGATCGCA-GTTTGGG-3′)/CSP4-R(5′-TTATCGTATTGAAGT-TGAGTTGGAGC-3′)、CSP5-F(5′-ATGAGGTGCC-TTCTGCTGGTT-3′)/CSP5-R(5′-TCAGTCAAGTTT-CAAGTTCTTCCTCT-3′)、CSP6-F(5′-ATGTTGTG-GGCTGCAAGGTT-3′)/CSP6-R(5′-TTAGTCGGTG-CCGGAAAGG-3′)、CSP7-F(5′-ATGATTCAAAGT-ACGCAAACATTCATTTCG-3′)/CSP7-R(5′-TCAG-TTTCCATATTTCTTGATTAGTTTCT-3′)、CSP8-F(5′-ATGTCGTCGACTATGTTGGTTTTT-3′)/CSP8-R(5′-CTAGACGCTGTAGCCTCTCTTGTCA-3′)、CSP9-F(5′-ATGAAGTCTCAGCAGCTGTTAGTCTC-3′)/CSP9-R(5′-TCATGAGGCAGGCCTACTCTCG-3′)、CSP10-F(5′-ATGAGCGAAGTACTTGTTACGAGT-TT-3′)/CSP10-R(5′-TTAGTCATCAGAATCCATGA-ACGC-3′)和CSP11-F(5′-ATGAAGAGCATTATTC-TGCTGGTATT-3′)/CSP11-R(5′-TCAAATTTGATA-TTCCTTCTCGTATTT-3′)进行PCR扩增。50 μL PCR扩增体系:模板cDNA 2 μL、10 μmol/L上下游引物各2 μL、ddH_2O 19 μL、2×Hieff™ PCR Master Mix 25 μL。PCR反应程序:94 ℃预变性4 min;94 ℃变性30 s,55 ℃退火30 s,72 ℃延伸40 s,33个循环;72 ℃再延伸10 min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳后,使用E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit胶回收试剂盒进行回收纯化。胶回收产物使用CV21-Zero Background pTOPO-TA Cloning Kit克隆载体试剂盒进行连接。连接产物转化至大肠杆菌感受态细胞DH5α中,阳性克隆送至武汉天一辉远生物科技有限公司测序。用DNAMAN 6.0.3软件对所有褐飞虱CSP氨基酸序列进行同源性比对,以确定新鉴定的CSP的保守性。根据基因组注释信息在基因组上对新鉴定的褐飞虱CSP基因进行标记,进一步将位于同一染色体上的褐飞虱CSP基因的外显子、内含子和相对位置进行标记,以判断是否形成基因簇。

1.2.2 pSUC2载体的构建

使用在线预测工具SignalP-4.1(www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)对褐飞虱CSP的信号肽进行预测。根据预测的褐飞虱CSP1~CSP15信号肽设计上下游同源重组扩增引物pSUC2-CSP1-F(5′-cggaattt-taattaagaattcATGTTCAAGAACGTCCTCCTCG-3′)/pSUC2-CSP1-R(5′-cactatagggagaacctcgagGGCGCT-GACCACAGCCAC-3′)、pSUC2-CSP2-F(5′-cggaattt-taattaagaattcATGTCCAAGTTGCCCGTGAC-3′)/pSUC2-CSP2-R(5′-cactatagggagaacctcgagGCAGTC-GACCGAGAAGACGG-3′)/pSUC2-CSP3-F(5′-cgg-aattttaattaagaattcATGAAGTTCTTGTGTGTCACAA-TTTTT-3′)/pSUC2-CSP3-R(5′-cactatagggagaacctc-gagTCCAAACGCGACCACAATCA-3′)、pSUC2-CSP4-F(5′-cggaattttaattaagaattcATGTTTCTGATCG-CAGTTTGGG-3′)/ pSUC2-CSP4-R(5′-cactatagggaa-gaacctcgagACCCCAAGGGAGGCGCCG-3′)、pSUC2-CSP5-F(5′-cggaattttaattaagaattcATGAGGT-GCCTTCTGCTGGTT-3′)/pSUC2-CSP5-R(5′-cacta-tagggagaacctcgagGGCGTGACAGACAGCGACC-3′)、pSUC2-CSP6-F(5′-cggaattttaattaagaattcATGTTGTG-GGCTGCAAGGTT-3′)/pSUC2-CSP6-R(5′-cactatag-ggagaacctcgagGGACCAAACCTGGAGAACGC-3′)、pSUC2-CSP7-F(5′-cggaattttaattaagaattcATGATTCA-AAGTACGCAAACATTCA-3′)/pSUC2-CSP7-R(5′-cactatagggagaacctcgagAGCCGACGCCATTGACAA-3′)、pSUC2-CSP8-F(5′-cggaattttaattaagaattcATGTC-GTCGACTATGTTGGTTTTT-3′)/pSUC2-CSP8-R(5′-cactatagggagaacctcgagAGCCAGCACTGCCGAAA-AG-3′)、pSUC2-CSP9-F(5′-cggaattttaattaagaattcAT-GAAGTCTCAGCAGCTGTTAGTCTC-3′)/pSUC2-CSP9-R(5′-cactatagggagaacctcgagGGCGTTGGCTG-AAGGCGC-3′)、pSUC2-CSP10-F(5′-cggaattttaatta-agaattcATGAGCGAAGTACTTGTTACGAGTTT-3′)/pSUC2-CSP10-R(5′-cactatagggagaacctcgagTCCTG-ATCCCAACTCACTGCA-3′)、pSUC2-CSP11-F(5′-cggaattttaattaagaattcATGAAGAGCATTATTCTGCT -GGTATT-3′)/pSUC2-CSP11-R(5′-cactatagggagaacct-cgagGGCCCGGCACCGGTACAC-3′)、pSUC2-CSP12-F(5′-cggaattttaattaagaattcATGATGCATCAG-ATGATAGTCGTCG-3′)/pSUC2-CSP12-R(5′-cac-tatagggagaacctcgagCGAGCAGGCTAGCTCCACAC-3′)、pSUC2-CSP13-F(5′-cggaattttaattaagaattcATGAT-GCATCAAGTAATTGTCGCT-3′)/pSUC2-CSP13-R(5′-cactataggagaacctcgagTGCGCAGATCAACTGCGTAC-3′)、pSUC2-CSP14-F(5′-cggaattttaattaagaattcATG-CAGTTGGCTCTGTTTTGTTT-3′)/pSUC2-CSP14-R(5′-cactatagggagaacctcgagTGCTGAAGCTGCCACC-ACC-3′)、pSUC2-CSP15-F(5′-cggaattttaattaagaattc-ATGAGCAATTATATTATAATGTTTCTG-3′)/pSUC2-CSP15-R(5′-cactatagggagaacctcgagTGCAAGACAC-

AAGCTCACACTTACA-3′)(下划线部分为同源臂)进行PCR扩增，以构建重组pSUC2载体。以1.2.1测序正确的菌液为模板进行PCR扩增。50 μL PCR扩增体系：模板菌液2 μL、10 μmol/L上下游引物各2 μL、ddH_2O 19 μL、2×Hieff™ PCR Master Mix 25 μL。PCR反应程序：94 ℃预变性4 min；94 ℃变性30 s，55 ℃退火30 s，72 ℃延伸6 s，33个循环；72 ℃再延伸10 min。使用*Eco*R I和*Xho* I限制性内切酶对pSUC2载体进行双酶切。PCR产物和酶切产物经1%琼脂糖凝胶电泳后，使用E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit胶回收试剂盒回收纯化。使用Clon-Express II One Step Cloning Kit同源重组试剂盒进行重组连接。连接产物转化至大肠杆菌感受态细胞DH5α中，筛选出阳性克隆并送至武汉天一辉远生物科技有限公司进行测序。

1.2.3　褐飞虱CSP信号肽活性验证

YTK12酵母菌株是一种蔗糖酶缺陷型酵母菌株，不能分解培养基中的蔗糖，pSUC2载体上有一个编码蔗糖酶的基因，当插入到蔗糖酶N段的序列具有分泌活性时，则可使YTK12酵母分泌蔗糖酶，因此酵母信号肽分泌验证系统常被用来筛选分泌蛋白或检测信号肽活性(Jacobs et al.，1997；李重阳等，2019；彭军波等，2020)。蔗糖酶能将蔗糖分解为葡萄糖和果糖，具有还原性的葡萄糖和果糖能将无色的2，3，5-三苯基氯化四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazoliumc，TTC)还原成不溶于水的红色氯化三苯基四氮唑，而不具有还原性的蔗糖不能将无色的TTC还原成不溶于水的红色氯化三苯基四氮唑，因此TTC能检测信号肽的活性。

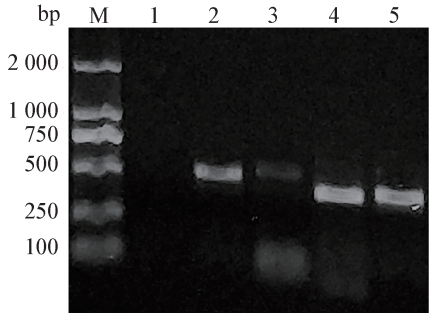
使用Plasmid Mini Kit I D6943质粒提取试剂盒提取1.2.2构建好的载体、载体pSUC2-avr1b(阳性对照)和空载体pSUC2(阴性对照)的质粒。使用Yeastmaker™ Yeast Transformation System 2酵母转化试剂盒将提取好的质粒分别转化至YTK12酵母中，然后涂布到SD-T固体培养基上筛选阳性转化子。自SD-T固体培养基上挑选阳性转化子单菌落至3 mL SD-T液体培养基中，30 ℃摇培36 h，以YPDA液体培养基中培养的YTK12酵母为空白对照。取上述培养的1.5 mL酵母菌液于12 000 r/min下离心10 s，ddH_2O洗涤2次，用750 μL ddH_2O悬浮，向酵母悬浮液中加10 mmol/L醋酸-醋酸钠缓冲液(pH为4.7)250 μL和10%蔗糖溶液500 μL，37 ℃孵育10 min，12 000 r/min离心10 s，取500 μL上清液，加入0.1% TTC(用1 mol/L NaOH稀释)4.5 mL，反应颜色由无色变为红色至深红紫色则呈阳性，表明信号肽有活性，反之则无活性。

为排除预测不准确导致的TTC显色弱或阴性的结果，将出现这种现象的褐飞虱CSP的N端30个氨基酸的DNA序列克隆至pSUC2载体上，再进行TTC显色鉴定。上游同源重组引物同第1次信号肽活性鉴定，设计下游重组引物pSUC2-CSP4-30AA-R(5′-cactatagggagaacctcgagCTGCTGGGCGGCCAC-CCC-3′)、pSUC2-CSP6-30AA-R(5′-cactatagggagaa-cctcgagGTCAGTGTATTTTTCATCAGCTGGG3-3′)、pSUC2-CSP8-30AA-R(5′-cactatagggagaacctcgagGT-CGTACTTGGTCGTGTACTTATCG3-3′)和pSUC2-CSP11-30AA-R(5′-cactatagggagaacctcgagCCAGGA-CGTGGGGTATGATG-3′)(下划线部分为同源臂)进行PCR扩增，以构建重组pSUC2载体，方法同1.2.2。对重组的pSUC2载体再次进行信号肽活性鉴定，方法同上。

2　结果与分析

2.1　褐飞虱CSP基因克隆鉴定

通过BLAST比对共筛选得到LOC111045660、LOC111045661、LOC111047069、LOC111047204和LOC111060335五个候选基因。通过PCR鉴定(图1)与克隆测序，后四者均为真基因，分别命名为*CSP12*、*CSP13*、*CSP14*和*CSP15*基因，GenBank登录号分别为MZ703612、MZ703613、MZ703614和MZ703615。基因组序列分析结果显示LOC111045660是由于基因组的错误拼接注释所产生的。

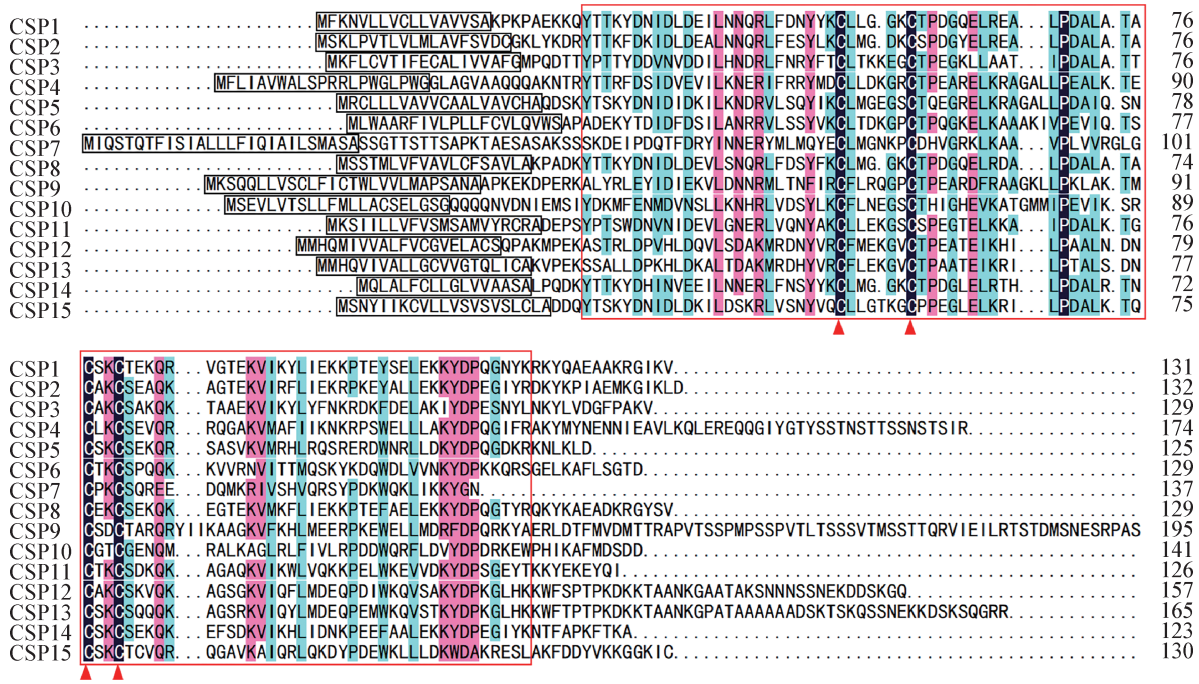


M：Marker；1~5：LOC111045660、LOC111045661、LOC111047069、LOC111047204和LOC111060335基因的PCR扩增产物。M: Marker; 1−5: PCR products of LOC111045660, LOC111045661, LOC111047069, LOC111047204 and LOC111060335, respectively.

图1　褐飞虱CSP候选基因的PCR扩增产物

Fig. 1　PCR products of CSP candidate genes of *Nilaparvata lugens*

通过对克隆获得的所有褐飞虱CSP氨基酸序列进行同源性比对发现，CSP12、CSP13、CSP14和CSP15与其他CSP一样，均有4个保守的半胱氨酸，并在OS-D结构域高度同源（图2），因此确定这4个基因属于CSP家族。



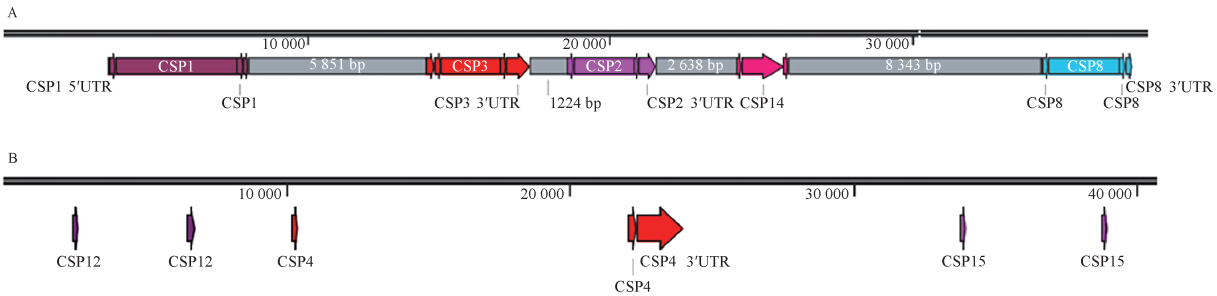
黑色背景表示氨基酸完全一致，粉色和蓝色背景表示氨基酸性质具有高相似性，且粉色所示相似性较蓝色所示相似性更高。红色三角表示保守的半胱氨酸；红色矩形框表示OS-D结构域；黑色矩形框表示预测到的信号肽。Dark background indicates that the amino acids are identical; the pink and blue backgrounds indicate high similarity in the amino acid properties have, and the pink background indicates a higher similarity than the blue. The red triangle represents conserved cysteine; red rectangle represents the OS-D domain; dark rectangle represents the predicted signal peptide.

图2 褐飞虱CSP氨基酸序列比对与信号肽预测

Fig. 2 Amino acid sequence alignment and prediction of signal peptides of CSPs from *Nilaparvata lugens*

2.2 褐飞虱CSP基因基因组序列分析

基因组序列分析发现，*CSP1*、*CSP2*、*CSP3*、*CSP8*和*CSP14*基因组成了一个相对紧凑的基因簇（图3-A），*CSP4*、*CSP12*和*CSP15*基因组成了一个相对松散的基因簇（图3-B），根据第2代褐飞虱基因组测序数据，这2个基因簇均定位于2号染色体上。



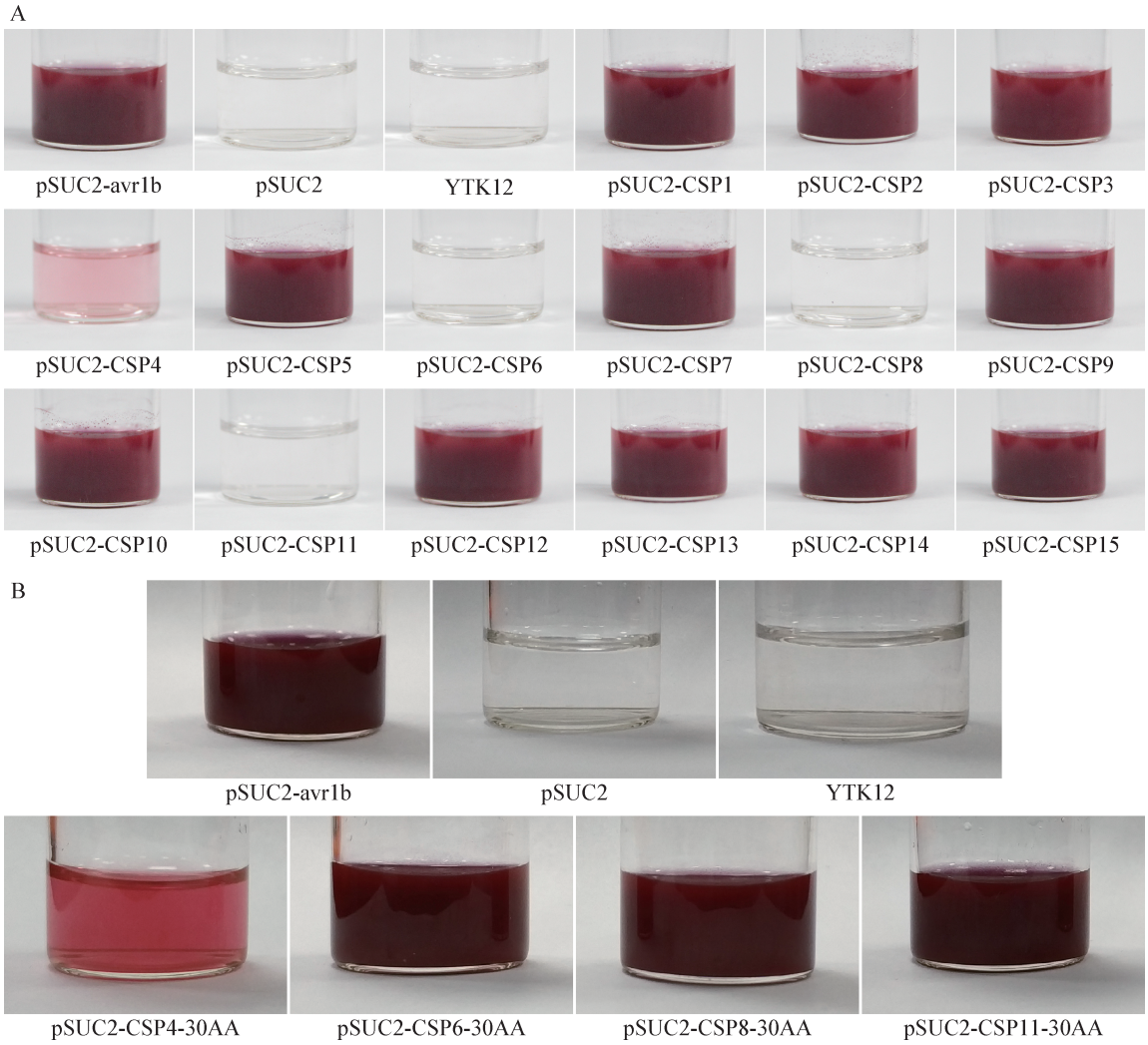
A：*CSP1*、*CSP2*、*CSP3*、*CSP8*和*CSP14*基因组成一个相对紧凑的基因簇。B：*CSP4*、*CSP12*和*CSP15*基因组成一个相对松散的基因簇。箭头表示各基因的外显子或UTR，不同颜色矩形框表示各基因内含子或基因之间的非编码序列。A: *CSP1*, *CSP2*, *CSP3*, *CSP8* and *CSP14* constitute a relatively compact gene cluster. B: *CSP4*, *CSP12* and *CSP15* constitute a relatively loose gene cluster. The arrows represent the exon or UTR of each gene, and the colored rectangular boxes represent the intron or non-coding sequence between genes.

图3 褐飞虱CSP基因基因组序列分析

Fig. 3 Genome sequencing analysis of CSP genes from *Nilaparvata lugens*

2.3　褐飞虱CSP信号肽分泌活性

SignalP-4.1预测结果显示，所有褐飞虱CSP均有信号肽（图2）。与对照相比，pSUC2-CSP4载体只显示微弱的红色，表明其信号肽的分泌活性较弱，pSUC2-CSP6、pSUC2-CSP8和pSUC2-CSP11载体未显色，与阴性对照和空白对照一致，表明其信号肽无分泌活性；其他CSP载体与阳性对照表现一致，均呈红色至深红紫色，表明其信号肽的分泌活性均较强（图4-A）。与对照相比，pSUC2-CSP4-30AA载体只显示微弱的红色，表明其分泌活性较弱，但pSUC2-CSP6-30AA、pSUC2-CSP8-30AA和pSUC2-CSP11-30AA载体与阳性对照表现一致，呈红色至深红紫色，表明其信号肽分泌活性较强（图4-B）。pSUC2-CSP6-30AA、pSUC2-CSP8-30AA和pSUC2-CSP11-30AA载体分别较载体pSUC2-CSP6、pSUC2-CSP8和pSUC2-CSP11的颜色更深，表明其信号肽较预测的信号肽更长。



pSUC2-avr1b：载体（阳性对照）；pSUC2：空载体（阴性对照）；YTK12：酵母（空白对照）；pSUC2-CSP1~pSUC2-CSP15：15个CSP信号肽pSUC2载体。pSUC2-CSP4-30AA、pSUC2-CSP6-30AA、pSUC2-CSP8-30AA和pSUC2-CSP11-30AA分别为CSP4、CSP6、CSP8和CSP11的N端前30个氨基酸的pSUC2载体。pSUC2-avr1b: Carrier (positive control); pSUC2: empty carrier (negative control); YTK12: yeast (blank control); pSUC2-CSP1–pSUC2-CSP15: pSUC2 carrier of each CSP signal peptide, respectively. pSUC2-CSP4-30AA, pSUC2-CSP6-30AA, pSUC2-CSP8-30AA and pSUC2-CSP11-30AA: pSUC2 carrier of the first 30 amino acids at the n-terminal of CSP4, CSP6, CSP8 and CSP11, respectively.

图4　15个褐飞虱CSP信号肽pSUC2载体（A）及CSP4、CSP6、CSP8和CSP11 N端前30个氨基酸pSUC2载体（B）的TTC显色反应

Fig. 4　TTC color reactions of pSUC2 carriers of 15 *Nilaparvata lugens* CSP signal peptides (A) and the first 30 amino acids at the N-terminal of CSP4, CSP6, CSP8 and CSP11 (B)

3 讨论

本研究新鉴定了4个褐飞虱CSP基因，使被鉴定的褐飞虱CSP基因数量达到了15个，并发现了2个CSP基因簇。褐飞虱CSP基因数量与同为半翅目的昆虫的CSP基因数量相比表现出一定的扩张性，如桃蚜 *Myzus persicae* 的CSP基因数量为9个（Wang et al.，2019），柑橘木虱 *Diaphorina citri* 的CSP基因数量为12个（Zhang et al.，2020）；褐飞虱CSP基因数量与双翅目昆虫的CSP基因数量相比扩张性表现得更明显，如韭菜迟眼蕈蚊 *Bradysia odoriphaga* 的CSP基因数量为5个（Zhao et al.，2018），黑带食蚜蝇 *Episyrphus balteatus* 的CSP基因数量为6个（Jia et al.，2020）；褐飞虱CSP基因数量与鳞翅目昆虫的CSP基因数量接近，如菜粉蝶 *Pieris rapae* 的CSP基因数量为21个（Li et al.，2020）。同一基因簇上的基因一般属于同一祖先基因的扩增产物（Hurst et al.，2004），因此褐飞虱2个CSP基因簇的发现可在一定程度上解释褐飞虱CSP基因数目扩张的原因。

本研究借鉴植物–病原菌互作研究中验证真菌等病原物效应子信号肽分泌活性的酵母信号肽分泌验证系统（Jacobs et al.，1997；李重阳等，2019；彭军波等，2020），对褐飞虱CSP的信号肽分泌活性进行了验证，证明褐飞虱CSP的信号肽均具有分泌活性。酵母信号肽分泌验证试验表明在线预测软件SignalP-4.1的准确率可以达到80%，但前者不能给出具体的信号肽区域，需要后续的截短试验来证明具体的信号肽序列。本研究虽然通过基因组数据分析发现了部分褐飞虱CSP基因在基因组上的关系，但其功能与调控之间的关系还有待后续研究。本研究在一定程度上证明了褐飞虱CSP是分泌蛋白，但想要确定其在虫体内是否分泌至血淋巴或其他细胞组织，还需要免疫定位等方面的研究。

参 考 文 献（References）

Bottrell DG, Schoenly KG. 2012. Resurrecting the ghost of green revolutions past: the brown planthopper as a recurring threat to high-yielding rice production in tropical Asia. Journal of Asia-Pacific Entomology, 15(1): 122–140

Brito NF, Moreira MF, Melo ACA. 2016. A look inside odorant-binding proteins in insect chemoreception. Journal of Insect Physiology, 95: 51–65

Cheng JA, Zhu ZR. 2006. Analysis on the key factors causing the outbreak of brown planthopper in Yangtze Area, China in 2005. Plant Protection, 32(4): 1–4 (in Chinese) [程家安, 祝增荣. 2006. 2005年长江流域稻区褐飞虱暴发成灾原因分析. 植物保护, 32(4): 1–4]

Cheng XY, Zhu LL, He GC. 2013. Towards understanding of molecular interactions between rice and the brown planthopper. Molecular Plant, 6(3): 621–634

Gadenne C, Barrozo RB, Anton S. 2016. Plasticity in insect olfaction: to smell or not to smell? Annual Review of Entomology, 61: 317–333

He SJ, Xiao NW, Zheng XX, Zhao MH, Li XM, Yang FL, Wu G. 2021. The life history parameters and population dynamics of brown planthopper *Nilaparvata lugens* feeding on different rice varieties in central China. Journal of Plant Protection, 48(2): 357–366 (in Chinese) [何帅洁, 肖能文, 郑晓旭, 赵慕华, 李雪梅, 杨凤连, 吴刚. 2021. 褐飞虱在华中地区不同主栽水稻品种上的生活史和种群动态. 植物保护学报, 48(2): 357–366]

Hurst LD, Pál C, Lercher MJ. 2004. The evolutionary dynamics of eukaryotic gene order. Nature Reviews Genetics, 5(4): 299–310

Jacobs KA, Collins-Racie LA, Colbert M, Duckett M, Golden-Fleet M, Kelleher K, Kriz R, LaVallie ER, Merberg D, Spaulding V, et al. 1997. A genetic selection for isolating cDNAs encoding secreted proteins. Gene, 198(1/2): 289–296

Jia HR, Niu LL, Sun YF, Liu YQ, Wu KM. 2020. Odorant binding proteins and chemosensory proteins in *Episyrphus balteatus* (Diptera: Syrphidae): molecular cloning, expression profiling, and gene evolution. Journal of Insect Science, 20(4): 15

Klein EM, Mascheroni L, Pompa A, Ragni L, Weimar T, Lilley KS, Dupree P, Vitale A. 2006. Plant endoplasmin supports the protein secretory pathway and has a role in proliferating tissues. The Plant Journal, 48(5): 657–673

Li CY, Wang YF, Lin Y, Luo CX, Yin WX. 2019. Functional identifiation of Six1-like effector UvSix1-1 in *Ustilaginoidea virens*. Acta Phytopathologica Sinica, 49(1): 27–34 (in Chinese) [李重阳, 王毓富, 林杨, 罗朝喜, 阴伟晓. 2019. 稻曲病菌Six1类效应蛋白UvSix1-1的功能研究. 植物病理学报, 49(1): 27–34]

Li MY, Jiang XY, Liu XY, Huang YJ, Li SG, Liu S. 2020. Genome-wide analysis of chemosensory protein genes in the small white butterfly *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae). Journal of Asia-Pacific Entomology, 23(3): 772–780

Lu WC, Ma LJ, Zhang H, Hang XN, He L, Liao DX. 2020. Effects of nitrogen application rate on the control efficiency of buprofezin against the brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Stål). Journal of Plant Protection, 47(1): 213–214 (in Chinese) [卢文才, 马连杰, 张慧, 杭晓宁, 何林, 廖敦秀. 2020. 施氮量对噻嗪酮防治褐飞虱效果的影响. 植物保护学报, 47(1): 213–214]

Pelosi P, Iovinella I, Felicioli A, Dani FR. 2014. Soluble proteins of chemical communication: an overview across arthropods. Frontiers in Physiology, 5: 320

Peng JB, Li XH, Zhang W, Liu M, Xing QK, Yan JY. 2020. Identification of the signal peptide and enzymatic activity analysis of the endo-β-1, 4-glucanase LtEg1 of fungal pathogen *Lasiodiplodia theobromae*. Journal of Plant Protection, 47(1): 119–126 (in Chinese) [彭军波, 李兴红, 张玮, 刘梅, 邢启凯, 燕继晔. 2020. 可可毛色二孢β-1,4-葡聚糖内切酶LtEg1信号肽的鉴定及其酶

活性分析. 植物保护学报, 47(1): 119−126]

Pentzold S, Burse A, Boland W. 2017. Contact chemosensation of phytochemicals by insect herbivores. Natural Product Reports, 34 (5): 478−483

Wang Q, Zhou JJ, Liu JT, Huang GZ, Xu WY, Zhang Q, Chen JL, Zhang YJ, Li XC, Gu SH. 2019. Integrative transcriptomic and genomic analysis of odorant binding proteins and chemosensory proteins in aphids. Insect Molecular Biology, 28(1): 1−22

Waris MI, Younas A, Adeel MM, Duan SG, Quershi SR, Kaleem Ullah RM, Wang MQ. 2020a. The role of chemosensory protein 10 in the detection of behaviorally active compounds in brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. Insect Science, 27(3): 531−544

Waris MI, Younas A, Ameen A, Rasool F, Wang MQ. 2020b. Expression profiles and biochemical analysis of chemosensory protein 3 from *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae). Journal of Chemical Ecology, 46(4): 363−377

Waris MI, Younas A, Ul Qamar MT, Hao L, Ameen A, Ali S, Abdelnabby HE, Zeng FF, Wang MQ. 2018. Silencing of chemosensory protein gene NlugCSP8 by RNAi induces declining behavioral responses of *Nilaparvata lugens*. Frontiers in Physiology, 9: 379

Wu SF, Zeng B, Zheng C, Mu XC, Zhang Y, Hu J, Zhang S, Gao CF, Shen JL. 2018. The evolution of insecticide resistance in the brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål) of China in the period 2012—2016. Scientific Reports, 8: 4586

Xu YL, He P, Zhang L, Fang SQ, Dong SL, Zhang YJ, Li F. 2009. Large-scale identification of odorant-binding proteins and chemosensory proteins from expressed sequence tags in insects. BMC Genomics, 10: 632

Yang K, He P, Dong SL. 2014. Different expression profiles suggest functional differentiation among chemosensory proteins in *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae). Journal of Insect Science, 14: 270

Zhang H, Chen JL, Lin JH, Lin JT, Wu ZZ. 2020. Odorant-binding proteins and chemosensory proteins potentially involved in host plant recognition in the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. Pest Management Science, 76(8): 2609−2618

Zhang XL, Liao X, Mao KK, Yang P, Li DY, Alia E, Wan H, Li JH. 2017. The role of detoxifying enzymes in field-evolved resistance to nitenpyram in the brown planthopper *Nilaparvata lugens* in China. Crop Protection, 94: 106−114

Zhang XL, Liao X, Mao KK, Zhang KX, Wan H, Li JH. 2016. Insecticide resistance monitoring and correlation analysis of insecticides in field populations of the brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Stål) in China 2012—2014. Pesticide Biochemistry and Physiology, 132: 13-20

Zhang Y, Yang B, Wang GR. 2019. Research progress of soluble proteins on chemosensationin insects. Journal of Environmental Entomology, 41(2): 229−240 (in Chinese) [张玉, 杨斌, 王桂荣. 2019. 昆虫嗅觉相关可溶性蛋白的研究进展. 环境昆虫学报, 41(2): 229−240]

Zhao Y, Ding J, Zhang Z, Liu F, Zhou C, Mu W. 2018. Sex- and tissue-specific expression profiles of odorant binding protein and chemosensory protein genes in *Bradysia odoriphaga* (Diptera: Sciaridae). Frontiers in Physiology, 9: 107

Zhou SS, Sun Z, Ma WH, Chen W, Wang MQ. 2014. De novo analysis of the *Nilaparvata lugens* (Stål) antenna transcriptome and expression patterns of olfactory genes. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics, 9: 31−39

Zhou WW. 2013. Molecular analysis of chemosensory system and metabolic enzymes of rice planthoppers. PhD thesis. Hangzhou: Zhejiang University (in Chinese) [周文武. 2013. 稻飞虱化合物感觉系统和代谢酶的分子解析. 博士学位论文. 杭州: 浙江大学]

（责任编辑：张俊芳）