

doi:10.3969/j.issn.1002-2481.2024.02.12

莲草直胸跳甲 3 个气味结合蛋白基因的克隆与表达分析

皇甫鸿雁, 付淑慧, 贾 栋, 王苑馨, 胡 军, 马瑞燕

(山西农业大学 植物保护学院, 山西 太谷 030801)

摘要: 气味结合蛋白昆虫嗅觉通讯过程中的重要蛋白质, 参与昆虫气味识别的第一步反应, 在昆虫觅食、聚集、求偶和寻找产卵场所等活动中起重要作用。为明确莲草直胸跳甲 (*Agasicles hygrophila*) 气味结合蛋白基因 (*OBP*) 表达特征, 初步了解其功能, 对 3 个 *OBP* 基因进行了克隆与生物信息学分析, 并通过实时荧光定量 PCR 分析了它们在不同组织中的相对表达量。结果显示, *AhygOBP27*、*AhygOBP32* 与 *AhygOBP44* 的开放阅读框分别为 351、408、423 bp, 其编码的蛋白质是分子量较小的酸性可溶性蛋白质。其中, *AhygOBP27* 主要在雌雄虫的触角、头、足、翅中表达; *AhygOBP32* 主要在雌雄虫的触角、足、翅以及雄虫的头中表达; *AhygOBP44* 主要在雌雄虫的触角、头、足中表达。这 3 个基因在雌雄成虫触角中的表达水平均显著高于其他组织, 其中 *AhygOBP27* 与 *AhygOBP44* 在雌性触角中的表达水平显著高于雄性; *AhygOBP32* 在雄性触角中的表达水平显著高于雌性。推测这 3 个基因在莲草直胸跳甲嗅觉识别过程中起重要作用, *AhygOBP27* 和 *AhygOBP44* 可能与识别寄主植物挥发物和寻找产卵地相关, *AhygOBP32* 可能参与雄虫识别雌虫释放的性信息素。

关键词: 喜旱莲子草; 莲草直胸跳甲; 气味结合蛋白; 基因克隆; 组织表达

中图分类号: S476.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-2481(2024)02-0089-08

Cloning and Expression Analysis of three Odorant Binding Protein Genes in *Agasicles hygrophila*

HUANGFU Hongyan, FU Shuhui, JIA Dong, WANG Yuanxin, HU Jun, MA Ruiyan

(College of Plant Protection, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract: Odorant binding protein (OBP) is an important protein in the process of insect olfactory communication. OBPs are involved in the first step of insect odor recognition, and play an important role in insect activities such as foraging, aggregation, courtship, and looking for spawning places. In order to determine the expression characteristics of *OBP* genes in *Agasicles hygrophila* and to preliminarily understand its functions, in this study, three *OBP* genes were cloned and analyzed using bioinformatics. The relative expression levels of *OBPs* in different tissues were analyzed by quantitative real-time PCR. The results showed that the open reading frame of *AhygOBP27*, *AhygOBP32*, and *AhygOBP44* were 351, 408, 423 bp, respectively. The proteins encoded by the three OBPs were acidic soluble proteins with small molecular weight. *AhygOBP27* was mainly expressed in the antennae, head, feet and wings of both sexes. *AhygOBP32* was expressed in antennae, head, leg and wings of the male and in antennae, feet and wings of the female. *AhygOBP44* was expressed in the antennae, heads and feet of both sexes. The expression levels of above three genes in the antennae of male and female were significantly higher than that of other tissues. The expression level of *AhygOBP27* and *AhygOBP44* in female antennae were significantly higher than that in male antennae, and the expression level of *AhygOBP32* in the antennae of males was significantly higher than that of females. The three genes might play an important role in the olfactory recognition of *Agasicles hygrophila*, *AhygOBP27*, and *AhygOBP44* might be related to the recognition of host plant volatiles and the search for spawning ground; *AhygOBP32* might be involved in the recognition of sex pheromone emitted by females.

Key words: *Alternanthera philoxeroides*; *Agasicles hygrophila*; odorant-binding protein; gene cloning; tissue expression

喜旱莲子草 (*Alternanthera philoxeroides*) 是一种全球范围内的恶性入侵杂草^[1], 其生长迅速, 有极强的繁殖力和生态适应性, 会对入侵地的生态环境

造成严重影响^[2]。19 世纪末, 喜旱莲子草侵入到我国后迅速蔓延传播, 已成为我国分布最广、危害最为严重的杂草之一, 且目前分布范围仍在扩大^[3]。

收稿日期: 2023-04-12

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31570436); 山西农业大学省部共建有机旱作农业国家重点实验室自主研发项目 (202003-4)

作者简介: 皇甫鸿雁 (1997-), 女, 山西大同人, 在读硕士, 研究方向: 生物安全与生物防治。

通信作者: 马瑞燕 (1968-), 女, 山西晋中人, 教授, 主要从事生物安全与生物防治、昆虫生态与害虫综合治理等研究工作。

为了有效遏制喜旱莲子草,受其侵害的国家均采取过各种措施,而利用其专食性天敌莲草直胸跳甲是目前最有效的防治方法^[4]。

莲草直胸跳甲(*Agasicles hygrophila*)原产于南美洲,先后被多个国家引进用于防治喜旱莲子草^[5-6]。我国于1986年首次引进后,对其进行了一系列的寄主专一性测定实验^[7-8],认为其安全可靠,可在我国大量推广用于防治喜旱莲子草。研究表明,莲草直胸跳甲是利用喜旱莲子草的主要挥发物与非寄主植物挥发物的特异性比例来寻找定位寄主植物^[9],嗅觉在莲草直胸跳甲识别喜旱莲子草的过程中起到了至关重要的作用。

气味结合蛋白(Odorant binding proteins,OBPs)是一类存在于昆虫嗅觉感受器淋巴液中的小分子球状蛋白^[10]。当外界气味分子进入触角感器后,首先与淋巴液中的OBPs结合形成复合体,随后到达嗅觉神经元,激活神经元树突膜上的气味受体,使化学信号转变为电信号,并刺激神经,指导昆虫作出相应反应^[11]。因此,OBPs与气味分子结合是昆虫嗅觉识别的第一步反应^[12]。

1981年,首个OBP家族成员在多音天蚕 *Antheraea polyphemus* 雄蛾的触角中被鉴定出来,OBPs也被认为只在昆虫的触角中特异性表达^[13]。后来发现,OBPs不仅在触角中表达,在除触角以外的其他组织中也有表达,这可能与行使不同的功能有关^[14]。如二化螟 *Chilo suppressalis* *CsupOBP8* 主要在成虫触角中表达,可识别 β -紫罗酮、橙花叔醇、法尼醇和二己酮等多种寄主植物挥发物^[15];麦长管蚜(*Sitobion avenae* Save)的OBP3在足部高表达,暗示着其具有某种特殊的嗅觉功能^[16];中华蜜蜂(*Apis cerana cerana* Acer)的OBP19在口器中表达量较高,推测它们与味觉识别相关^[17]。近年来,随着分子生物技术不断发展,越来越多的研究通过对昆虫的OBP基因进行表达分析以探究其功能,其中,包括鞘翅目^[18]、鳞翅目^[19]、膜翅目^[20]、半翅目^[21]、直翅目^[22]、缨翅目^[23]等中的近100种昆虫。

莲草直胸跳甲作为防治恶性入侵杂草喜旱莲子草的专食性天敌昆虫,嗅觉在其定位识别寄主植物的过程中起到了关键性的作用。因此,本试验拟探究莲草直胸跳甲基于OBPs所介导的嗅觉识别机制。课题组前期通过对莲草直胸跳甲触角转录组测序鉴定得到36个Minus-C OBPs和11个Classic OBPs^[24],但这些基因在其嗅觉识别过程中行使的具体功能还有待研究。基于此,本试验从鉴

定筛选出的Classic OBPs中选取了具有完整开放阅读框的*AhygOBP27*、*AhygOBP32*与*AhygOBP44*进行克隆和序列分析,并明确它们在雌雄成虫不同组织中的表达模式,为探究OBP基因在莲草直胸跳甲的嗅觉识别过程中的功能,进一步防治喜旱莲子草奠定分子基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试虫源来自华南农业大学,后长期饲养于山西农业大学生物安全与生物防治实验室人工气候箱,培养条件为:温度(25±1)°C,光周期L:D=14 h:10 h,相对湿度85%±5%。

1.2 试验方法

1.2.1 莲草直胸跳甲RNA的提取与cDNA合成 收集莲草直胸跳甲雌雄成虫触角、头、胸、腹、足、翅6个组织,每个样品设置3个重复。将切取的组织在液氮中研磨成粉,利用TRIzol试剂(Takara,中国)提取总RNA;取1 μg总RNA作为模板,用Reverse Transcriptase M-MLV(RNase H-)反转录试剂盒(Takara,中国)合成cDNA第1链,保存在-20 °C备用。

1.2.2 莲草直胸跳甲气味结合蛋白基因的克隆

利用Primer Premier 5.0软件设计克隆引物(表1),以1.2.1合成的莲草直胸雌虫触角cDNA为模板,利用2×Taq PCR Master(Tiangen,中国)进行全长序列扩增。PCR反应体系为20 μL:2×Taq PCR Master 10 μL,cDNA 1 μL,上下游引物(10 μM)各0.8 μL,ddH₂O 7.4 μL。PCR反应条件为:95 °C预变性3 min;95 °C变性25 s,50 °C退火30 s,72 °C延伸2 min,32个循环;72 °C彻底延伸6 min。产物通过琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒(Biomed,中国)进行回收后连接到pMD™20-T载体(Takara,中国)上,转入DH5α感受态细胞(Takara,中国)中培养。挑选单菌落进行PCR验证,将条带正确的菌液送至上海生工进行测序。

1.2.3 莲草直胸跳甲气味结合蛋白的生物信息学分析 使用NCBI的ORF Finder(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder>)预测目的基因的开放阅读框。利用ExpASy-ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam/>)对两种气味结合蛋白的理化性质进行预测。采用DNAMAN 9.0对气味结合蛋白的氨基酸序列进行多序列比对,MEGA 7.0中的邻接法(Neighbor-joining, NJ)构建系统发育树,boot-

strap 重复 1 000 次^[25]。

1.2.4 莲草直胸跳甲气味结合蛋白基因的组织表达分析 以 1.2.1 合成 cDNA 为模板,通过 BeaconDesign 7.0 设计荧光定量 PCR 引物(表 1)。核糖体蛋白 L13 基因(Ribosomal Protein L13, RP, 基因登录号:OQ187814.1)作为内参基因,使用 SYBR Green Realtime PCR Master Mix(东洋纺生物科技)对莲草直胸跳甲雌雄成虫各组织进行荧光定量

PCR,荧光定量仪器为 ABI7500(美国赛默飞世尔科技公司)。试验设置 3 次生物学重复与 3 次技术重复。反应体系为 20 μ L:2 \times SYBR Mix 10 μ L,上下游引物(10 μ mol/L)各 0.8 μ L, cDNA 1 μ L, ddH₂O 7.4 μ L。qPCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 40 个循环;72 $^{\circ}$ C 彻底延伸 10 min。60~95 $^{\circ}$ C 进行熔解曲线分析。

表 1 PCR 引物信息
Tab.1 Primer information of PCR

基因名称 Gene name	上游引物(5'-3') Forward primer(5'-3')	下游引物(5'-3') Reverse primer(5'-3')	产物长度/bp Product size	用途 Purpose
AhygOBP27	TTTATTTCATTGTACCGCAGA	ATTAGTCCTCACACTCGTCC	373	基因克隆
AhygOBP32	TTCCTATTTTTGAAGTGATAAA	TCTTTATATTTTATTAAGGCTGC	453	基因克隆
AhygOBP44	AAATGGCATATCTACAATTTCGC	AACAACCTCTCCATGATCGTCT	446	基因克隆
AhygOBP27	GTGCTGTTCATCAACCTGG	GCAGCCATATCCAAGCACTC	138	荧光定量 PCR
AhygOBP32	TGCAAGAGAAGGAATTACGGA	ACGCCATCACTACTCATCCA	129	荧光定量 PCR
AhygOBP44	ACATAAAAGCCATGGAAGAGGC	GGTACCCCAAATGAAGACA	164	荧光定量 PCR
RP	CGAGTAGTTTGTGCCTGGA	AAGCGTGTGTTGGTGATTT	126	内参基因

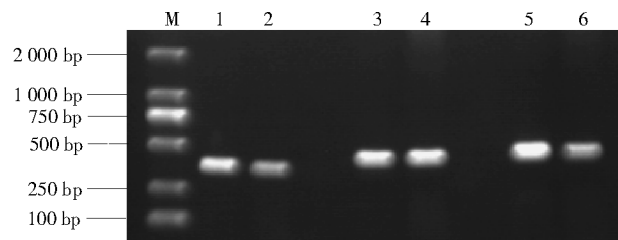
1.3 数据分析

以 OBP 在雄虫胸部的表达量为基准,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 OBP 基因在其它组织中的相对表达量。利用 SPSS 22.0 对 OBP 基因表达量数据进行统计分析,采用 Tukey 法对雌、雄虫在不同组织的相对表达量差异进行显著性分析,采用 *t* 检验对同一组织在雌、雄虫中的相对表达量差异进行显著性分析($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 莲草直胸跳甲气味结合蛋白的克隆

扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,得到与目的片段大小一致的条带(图 1)。随后进行克隆测序,测序结果显示, AhygOBP27 ORF 长 351 bp, 编码 116 个氨基酸; AhygOBP32 ORF 长 408 bp, 编码 135 个氨基酸; AhygOBP44 ORF 长 423 bp, 编码 140 个氨基酸, 登录号分别为 ON260784.1、ON260785.1 和 OQ606235.1。



M. DL2000 标准分子量; 泳道 1, 2. AhygOBP27; 泳道 3, 4. AhygOBP32; 泳道 5, 6. AhygOBP44
M. DL2000 standard molecular weight; Lane 1, 2. AhygOBP27; Lane 3, 4. AhygOBP32; Lane 5, 6. AhygOBP44

图 1 莲草直胸跳甲三个气味结合蛋白基因 PCR 产物电泳结果
Fig.1 Electrophoresis of PCR product of three odorant binding protein genes of *Agasicles hygrophila*

2.2 莲草直胸跳甲气味结合蛋白的理化性质分析

理化性质预测结果显示(表 2), 3 个 OBP 基因所编码的蛋白分子量较小, 等电点(pI)小于 7, 酸性氨基酸数目多于碱性氨基酸, 属于酸性蛋白质; 疏水/亲水性数值小于零, 表现为亲水性。因此, 3 个 OBP 都属于分子量较小的酸性可溶性蛋白, 与昆虫气味结合蛋白的特征相符合。

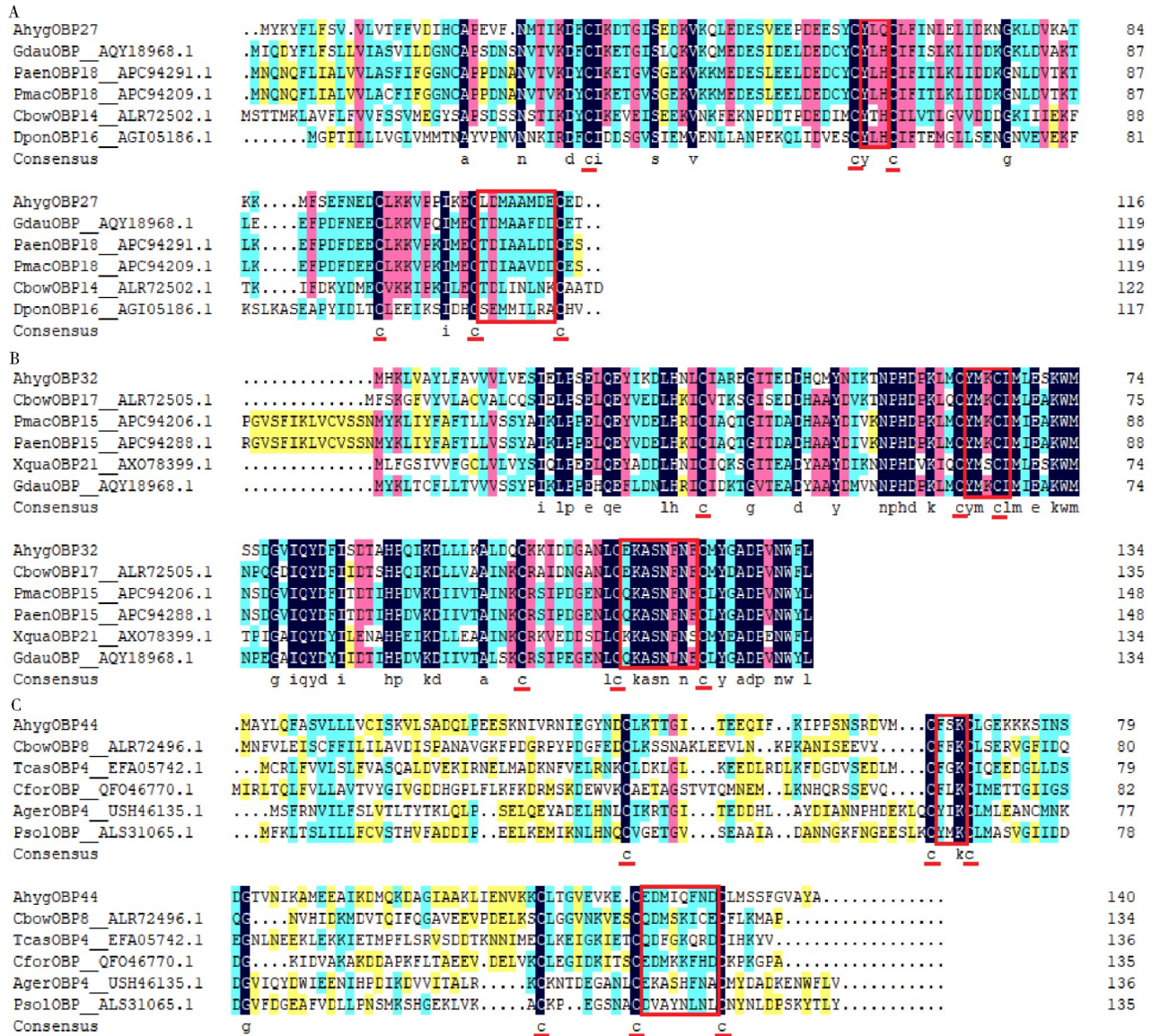
表 2 莲草直胸跳甲气味结合蛋白理化性质
Tab.2 Physicochemical property of odorant binding protein of *Agasicles hygrophila*

蛋白名称 Protein name	分子式 Molecular formula	分子量/ku Molecular weight	等电点 pI	酸性氨基酸 Acidic amino acid	碱性氨基酸 Alkaline amino acid	疏水/亲水性 Hydrophobicity/ hydrophilicity
AhygOBP27	C ₁₀₆₅ H ₁₇₈₁ N ₃₅₁ O ₄₄₇ S ₆₄	11.07	4.25	25	12	-0.502
AhygOBP32	C ₁₂₇₂ H ₂₁₃₈ N ₄₀₈ O ₅₃₄ S ₆₂	13.68	4.77	19	11	-0.325
AhygOBP44	C ₁₂₉₅ H ₂₁₆₉ N ₄₂₃ O ₅₄₁ S ₅₉	13.29	4.92	20	16	-0.366

2.3 莲草直胸跳甲气味结合蛋白的序列分析

序列比对结果显示(图2),3个OBP的氨基酸序列中均含有6个半胱氨酸残基,且第2、3个半胱氨酸残基之间有3个其他氨基酸,第5、6个半胱氨酸残基之间有8个其他氨基酸,具有Classical OBPs亚家族蛋白的典型特征。其中AhygOBP27与沙葱萤叶甲 *Galeruca daurica* GdauOBP的氨基酸序列一致性最高,达66.7%,与榆蓝叶甲 *Pyrrhalta*

aenescens PaenOBP18的氨基酸序列一致性次之,为55.8%;AhygOBP32与大猿叶甲 *Colaphellus bowringi* CbowOBP17的氨基酸序列一致性高达74.6%,其次就是与榆蓝叶甲 *Pyrrhalta aenescens* PaenOBP15序列一致性达68.6%;AhygOBP44与大猿叶甲 *Colaphellus bowringi* CbowOBP8和赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* TcasOBP4的氨基酸序列一致性分别为30.23%和27.78%。



A.AhygOBP27;B.AhygOBP32;C.AhygOBP44。横线标注为保守位点上的半胱氨酸;蛋白来源物种如下:榆蓝叶甲;榆黄叶甲;大猿叶甲;中欧山松大小蠹;咖啡天字脊虎天牛;沙葱萤叶甲;赤拟谷盗;甘薯象;桑天牛;扶桑绵粉蚧

The horizontal line was labeled as the cysteine in the conservative site; and the protein source species was as follows:The horizontal lines indicated the conserved sites with cysteines:*Pyrrhalta aenescens*(PaenOBP15; PaenOBP18); *Pyrrhalta maculicollis*(PmacOBP15; PmacOBP18); *Colaphellus bowringi*(CbowOBP8; CbowOBP14; CbowOBP17); *Dendroctonus ponderosae*(DponOBP16); *Xylotrechus quadripes*(XquaOBP21); *Galeruca daurica*(GdauOBP); *Tribolium castaneum*(TcasOBP4); *Cylas formicarius*(CforOBP); *Apriona germarii*(AgerOBP4); *Phenacoccus solenopsis*(Pso1OBP)

图2 莲草直胸跳甲与其他昆虫气味结合蛋白氨基酸序列比对
 Fig.2 Alignment of the amino acid sequence of the odor-binding proteins in *Agasicles hygrophila* and other insects

2.4 莲草直胸跳甲气味结合蛋白的进化分析

通过对莲草直胸跳甲3个OBP与其他24种昆

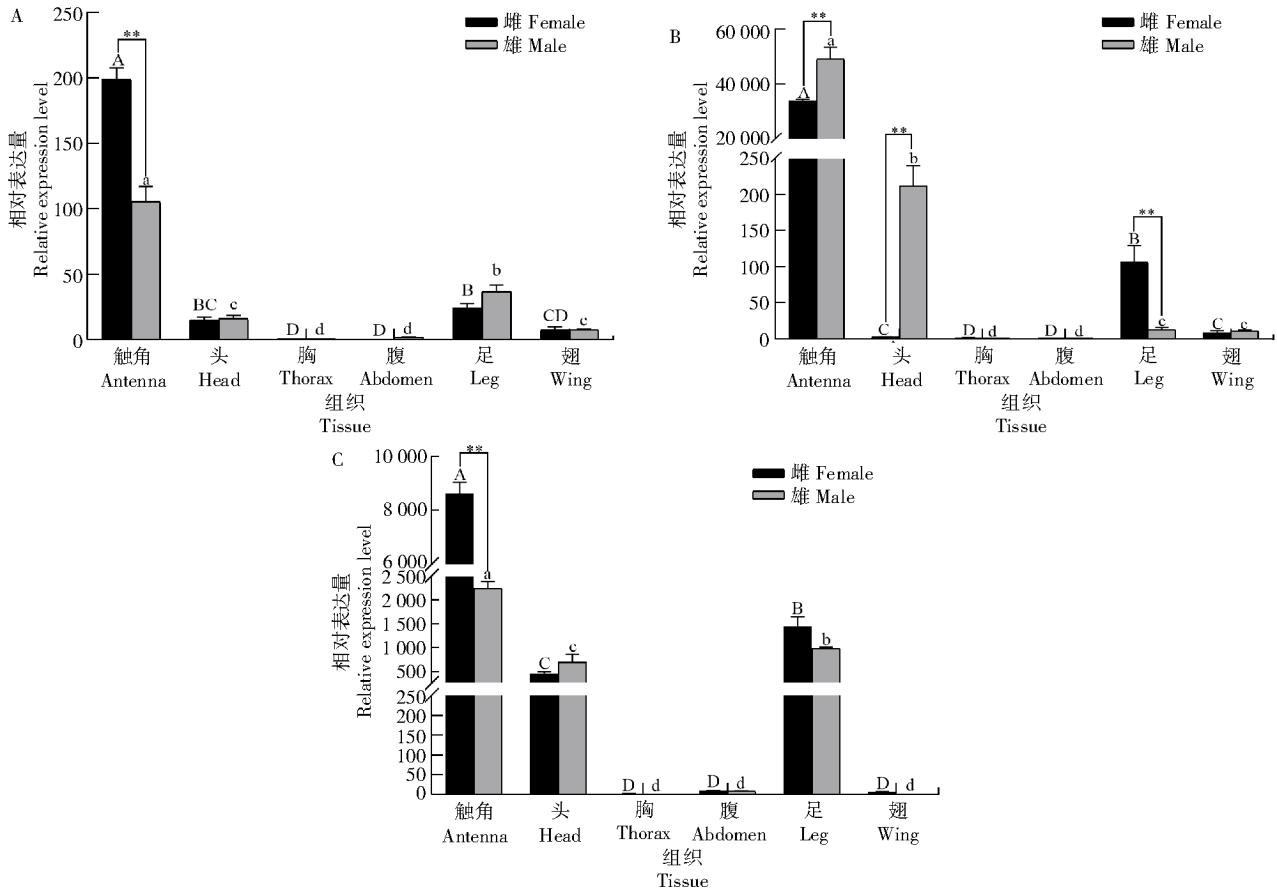
虫OBP相应氨基酸序列进行系统进化分析,结果显示(图3),AhygOBP27与沙葱萤叶甲 *Galeruca*

在触角中的相对表达量也显著高于足和翅 ($P < 0.05$)。此外, *AhygOBP32* 在雄虫触角中的相对表达量极显著高于雌虫 ($P < 0.01$)。

AhygOBP44 在雌雄成虫各组织中表达规律一致, 从高到低依次为触角、足、头、腹、翅、胸(图 4-C)。在雌虫中, *AhygOBP44* 在触角中的表达量分别是头、胸、腹、足、翅的 19.14 倍、3 987.23 倍、957.17 倍、5.91 倍和 1 338.24 倍; 在雄虫中, *AhygOBP44* 在触

角中的表达量分别是头、胸、腹、足、翅的 3.24 倍、2 002.32 倍、296.17 倍、2.38 倍和 3 492.53 倍。此外, *AhygOBP44* 在雌虫触角中的相对表达量极显著高于雄虫触角 ($P < 0.01$), 约为雄虫触角的 3.83 倍。

因此, 莲草直胸跳甲这 3 个 *OBP* 基因均在雌雄成虫的触角中高表达, 且 *AhygOBP27* 与 *AhygOBP44* 更偏向于在雌虫中表达, *AhygOBP32* 更偏向于在雄虫中表达。



A. *AhygOBP27* 在莲草直胸跳甲不同组织中的相对表达量; B. *AhygOBP32* 在莲草直胸跳甲不同组织中的相对表达量; C. *AhygOBP44* 在莲草直胸跳甲不同组织中的相对表达量。同一组织中各基因在雌雄间的相对表达量差异显著性用星号表示 (*, $P < 0.05$, ** $P < 0.01$); 不同大写字母表示各基因在雌虫不同组织间的相对表达量具有显著差异 ($P < 0.05$); 不同小写字母表示各基因在雄虫不同组织间的相对表达量具有显著差异 ($P < 0.05$)

A. The relative expression level of *AhygOBP27* in different tissue of *Agasicles hygrophila*; B. The relative expression level of *AhygOBP32* in different tissue of *Agasicles hygrophila*; C. The relative expression level of *AhygOBP44* in different tissue of *Agasicles hygrophila*. The significant difference of relative expression levels of each gene in the same tissue between male and female was indicated by asterisk (*, $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). Different capital letters indicated that the relative expression of each gene was significantly different in different tissues of female ($P < 0.05$); Different lower case letters indicated that the relative expression of each gene was significantly different in different tissues of male ($P < 0.05$)

图 4 莲草直胸跳甲 3 个气味结合蛋白基因在成虫不同组织中的相对表达量

Fig.4 The relative expression levels of odorant binding proteins genes of *Agasicles hygrophila* in different tissues adults

3 结论与讨论

在昆虫嗅觉感知过程中, *OBPs* 作为最先发挥功能的关键组分, 与环境中的脂溶性气味分子相互作用, 并将其转运至化学受体神经元, 激活树突膜表面分布的嗅觉受体, 是嗅觉系统正常运行的必须蛋白^[26]。根据昆虫 *OBPs* 序列中保守氨基酸的数

量可分为 Classical *OBPs*、Minus-C *OBPs*、Dimer *OBPs* 和 Plus-C *OBPs*^[27]。研究表明, 昆虫 *OBPs* 会朝着产生更多二硫键, 空间结构更复杂的方向进化, 以适应感受特殊气味物质的嗅觉需求^[28], 因此, 与 Minus-C *OBPs* 相比 Classic *OBPs* 更多地存在于较为进化的物种中^[29]。本试验基于莲草直胸跳甲触角转录组数据, 从中选取了 3 个具有完整开放

阅读框的 Classic OBPs 进行克隆和生物信息学分析。进化分析结果显示,这3个OBP都与叶甲科的昆虫OBP序列一致性较高,在进化关系上更加同源,可能行使相似功能。叶甲科中与AhygOBP27和AhygOBP44聚为同一大支的沙葱萤叶甲GdauOBP15在雌性寻找寄主植物中发挥更重要的作用^[30],花绒寄甲DhelOBP21参与了识别植物挥发物 β -蒎烯^[31];与AhygOBP32聚为同一支的GdauOBP20被证实参与定位寄主植物^[32]。因此,推测AhygOBP27与AhygOBP44可能起识别寄主挥发物的作用,AhygOBP32与定位寄主植物相关。

触角是昆虫重要的化学感受器官之一,在嗅觉感受中行使重要功能。在触角中特异性或高表达的气味结合蛋白一般都与嗅觉识别相关,如苜蓿盲蝽(*Adelphocoris lineolatus*)几乎只在触角中表达的*AlinOBP1*参与了感知性信息素的过程^[33];薇甘菊颈盲蝽(*Pachypeltis micranthus PmicOBP4*)在触角中高表达,其在嗅觉系统中发挥着重要作用^[34]。本研究中,莲草直胸跳甲3个OBP基因在雌雄成虫触角中的表达量显著高于其他组织,推测它们在莲草直胸跳甲的嗅觉识别过程中发挥重要作用。此外,在头、胸、腹、足和翅等其他部位中表达的OBP可能参与感知味觉配体或其他代谢过程,如黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster DmelOBP49*)在成虫头部高度表达,参与了对苦味剂的识别^[35];绿盲蝽(*Apolygus lucorum*)在足中高表达的*AlucOBP38*参与了对寄主次级代谢产物的识别^[36]。这3个OBP基因在头、足和翅中也有表达,因此,推测它们可能具有上述功能。

当然,OBP在雌雄成虫中也存在差异表达,这与其在生命活动中行使不同的功能密切相关。例如,黄胫小车蝗(*Oedaleus infernalis Saussure*)在雄虫头部高表达的*OinfOBP2*与发觉和辨别性信息素有关^[35];梨小食心虫(*Grapholita molesta*)在雌虫触角中高表达的*GmolOBP3*与寻找寄主植物和雌虫产卵地相关^[36]。本研究中,*AhygOBP27*与*AhygOBP44*在雌虫触角中的表达水平显著高于雄虫,*AhygOBP32*在雄虫触角和头部中的表达水平显著高于雌虫。因此,推测*AhygOBP27*与*AhygOBP44*可能与识别寄主植物挥发物和寻找产卵点相关,*AhygOBP32*可能参与感受雌虫信息素、寻找配偶等生命活动。本试验通过对莲草直胸跳甲3个OBP基因进行克隆、系统进化和组织表达分析,初步了解它们在莲草直胸跳甲嗅觉识别过程中

发挥的作用,为提高喜旱莲子草的防治效率提供了新思路。后续还会利用RNA干扰、荧光竞争试验等技术进一步验证它们的功能。

参考文献:

- [1] JULIEN M H, SKARRATT B, MAYWALD G F, et al. Potential geographical distribution of alligator weed and its biological control by *Agasicles hygrophila*[J]. Journal of Aquatic Plant Management, 1995, 33(1): 55-60.
- [2] 张丽苗, 谭雪, 董智, 等. 喜旱莲子草入侵对三峡库区重庆主城区河岸带植物多样性的影响[J]. 草业学报, 2022, 31(9): 13-25. ZHANG L M, TAN X, DONG Z, et al. Effects of *Alternanthera philoxeroides* invasion on plant diversity in the riparian zones of downtown Chongqing in the Three Gorges Reservoir area[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2022, 31(9): 13-25.
- [3] BUCKINGHAM G R. Biological control of alligator weed, *Alternanthera philoxeroides*, the world's first aquatic weed success story[J]. Castanea, 1996, 61(3): 232-243.
- [4] 王韧, 王远, 张格成, 等. 空心莲子草叶(虫甲)的寄主专一性测验[J]. 生物防治通报, 1988, 4(1): 14-17. WANG R, WANG Y, ZHANG G C, et al. Host specificity tests for *agasicles hygrophila* (col.: Chrysomelidae), a biological control agent of alligatorweed[J]. Chinese Journal of Biological Control, 1988, 4(1): 14-17.
- [5] 吴珍泉, 蔡元呈, 郭振铎, 等. 空心莲子草叶甲寄主专一性测验[J]. 华东昆虫学报, 1994, 3(2): 98-100. WU Z Q, CAI Y C, GUO Z X, et al. Host specificity tests for *Agasicles hygrophila* (col.: chrysomelidae), a biological control agent of alligator weed[J]. Entomological Journal of East China, 1994, 3(2): 98-100.
- [6] 赵龙, 陆俊姣, 马瑞燕. 莲草直胸跳甲对几种经济植物的取食安全性[J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2010, 30(5): 416-418. ZHAO L L, LU J J, MA R Y. Feeding safety of *Alligator weed flea beetle (Agasicles hygrophila)* in different economic plants [J]. Journal of Shanxi Agricultural University (Natural Science Edition), 2010, 30(5): 416-418.
- [7] LI N, LI S, GE J, et al. Manipulating two olfactory cues causes a biological control beetle to shift to non-target plant species[J]. Journal of Ecology, 2017, 105(6): 1534-1546.
- [8] PELOSI P, IOVINELLA I, ZHU J, et al. Beyond chemoreception: diverse tasks of soluble olfactory proteins in insects[J]. Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society, 2018, 93(1): 184-200.
- [9] HALLEM E A, DAHANUKAR A, CARLSON J R. Insect odor and taste receptors[J]. Annual Review of Entomology, 2006, 51: 113-135.
- [10] 司品法, 周琼, 崔中翌. 柑橘大实蝇气味结合蛋白基因BminOBP25的克隆、原核表达及组织表达分析[J]. 昆虫学报, 2018, 61(5): 537-545. SI P F, ZHOU Q, CUI Z Y. Cloning, prokaryotic expression and tissue expression profiling of an odorant binding protein gene BminOBP25 from *Bactrocera minax* (Diptera: Tephritidae)[J]. Acta Entomologica Sinica, 2018, 61(5): 537-545.
- [11] VOGT R G, RIDDIFORD L M. Pheromone binding and inactivation by moth antennae[J]. Nature, 1981, 293: 161-163.
- [12] GU S H, ZHOU J J, WANG G R, et al. Sex pheromone recognition and immunolocalization of three pheromone binding pro-

- teins in the black cutworm moth *Agrotis ipsilon*[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2013, 43(3):237-251.
- [13] YANG K, LIU Y, NIU D J, et al. Identification of novel odorant binding protein genes and functional characterization of OBP8 in *Chilo suppressalis*(Walker)[J]. Gene, 2016, 591(2):425-432.
- [14] ZHONG T, YIN J, DENG S S, et al. Fluorescence competition assay for the assessment of green leaf volatiles and trans- β -farnesene bound to three odorant-binding proteins in the wheat aphid *Sitobion avenae*(Fabricius)[J]. Journal of Insect Physiology, 2012, 58(6):771-781.
- [15] 马秀梅, 杜亚丽, 刘晋佳, 等. 中华蜜蜂 OBP19 的克隆与时空表达分析[J]. 环境昆虫学报, 2022, 44(2):391-401.
MA X M, DU Y L, LIU J J, et al. Cloning and spatiotemporal expression analysis of OBP19 from *Apis cerana cerana*[J]. Journal of Environmental Entomology, 2022, 44(2):391-401.
- [16] TANG Q F, SHEN C, ZHANG Y, et al. Antennal transcriptome analysis of the maize weevil *Sitophilus zeamais*: identification and tissue expression profiling of candidate odorant-binding protein genes[J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 2019, 101(1):e21542.
- [17] SONG Y Q, SONG Z Y, DONG J F, et al. Identification and comparative expression analysis of odorant-binding proteins in the reproductive system and antennae of *Athetis dissimilis*[J]. Scientific Reports, 2021, 11:13941.
- [18] ZHOU Y N, XIE S, CHEN J N, et al. Expression and functional characterization of odorant-binding protein genes in the endoparasitic wasp *Cotesia vestalis*[J]. Insect Science, 2021, 28(5):1354-1368.
- [19] WANG L, BI Y D, LIU M, et al. Identification and expression profiles analysis of odorant-binding proteins in soybean aphid, *Aphis glycines*(Hemiptera: Aphididae)[J]. Insect Science, 2020, 27(5):1019-1030.
- [20] JIANG Q Y, WANG W X, ZHANG Z D, et al. Binding specificity of locust odorant binding protein and its key binding site for initial recognition of alcohols[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2009, 39(7):440-447.
- [21] 张治科, 虎花, 马荣. 西花蓟马 FoccOBP3 的分子克隆、序列分析及表达特征[J]. 中国生物防治学报, 2021, 37(3):495-507.
ZHANG Z K, HU H, MA R. Cloning, sequence analysis and expression characteristics of FoccOBP3 in western flower *Thrips frankliniella occidentalis*[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2021, 37(3):495-507.
- [22] 胡军, 付丽, 张彬, 等. 莲草直胸跳甲气味结合蛋白鉴定及其在触角中的表达分析[J]. 植物保护学报, 2019, 46(4):849-859.
HU J, FU L, ZHANG B, et al. Identification of odorant-binding proteins and their expression in the antennae of alligator weed flea beetle *Agasicles hygrophila*[J]. Journal of Plant Protection, 2019, 46(4):849-859.
- [23] 杜亚丽, 徐凯, 赵慧婷, 等. 昆虫气味结合蛋白的研究进展[J]. 昆虫学报, 2020, 63(3):365-380.
DU Y L, XU K, ZHAO H T, et al. Research progress in odorant binding proteins of insects[J]. Acta Entomologica Sinica, 2020, 63(3):365-380.
- [24] FAN J, FRANCIS F, LIU Y, et al. An overview of odorant-binding protein functions in insect peripheral olfactory reception[J]. Genetics and Molecular Research, 2011, 10(4):3056-3069.
- [25] 张焯达, 王星, 王丽萍, 等. 辣椒 WOX 转录因子家族的鉴定、进化与表达分析[J]. 河南农业科学, 2023, 52(5):130-141.
ZHANG Y D, WANG X, WANG L P, et al. Identification, evolution and expression analysis of WOX Gene family in *Cap-sicum annum*[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2023, 52(5):130-141.
- [26] VIEIRA F G, ROZAS J. Comparative genomics of the odorant-binding and chemosensory protein gene families across the Arthropoda: origin and evolutionary history of the chemosensory system[J]. Genome Biology and Evolution, 2011, 3:476-490.
- [27] 李广伟, 陈秀琳, 尚天翠, 等. 光肩星天牛气味结合蛋白 AglaOBP1 的克隆、表达及结合特性[J]. 环境昆虫学报, 2017, 39(4):919-929.
LI G W, CHEN X L, SHANG T C, et al. Cloning, expression, and binding properties of odorant binding protein 1 from *Anoplophora glabripennis* Motschulsky(Coleoptera: Cerambycidae)[J]. Journal of Environmental Entomology, 2017, 39(4):919-929.
- [28] LI L, ZHANG W B, SHAN Y M, et al. Functional characterization of olfactory proteins involved in chemoreception of *Galeruca daurica*[J]. Frontiers in Physiology, 2021, 12:678698.
- [29] 李振东. 花绒寄甲 DhelOBP21 嗅觉功能及其寄主松褐天牛 MaltOBP19 转录调控分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2019.
LI Z D. Analysis of olfactory function of DhelOBP21 in *Dastarcus helophoroides* and transcriptional regulatory mechanism of MaltOBP19 in *Monochamus alternatus*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2019.
- [30] 李玲, 谭瑶, 周晓榕, 等. 沙葱蚱叶甲气味结合蛋白 GdauOBP20 的基因克隆、原核表达及其结合特性[J]. 中国农业科学, 2019, 52(20):3705-3712.
LI L, TAN Y, ZHOU X R, et al. Molecular cloning, prokaryotic expression and binding characterization of odorant binding protein gdau OBP20 in *Galeruca daurica*[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2019, 52(20):3705-3712.
- [31] 谷少华, 张雪莹, 张永军, 等. 苜蓿盲蝽气味结合蛋白基因 AlinOBP1 的克隆及表达谱分析[J]. 昆虫学报, 2010, 53(5):487-496.
GU S H, ZHANG X Y, ZHANG Y J, et al. Cloning and expression pattern analysis of an odorant binding protein gene Alin-OBP1 in the lucerne plant bug, *Adelphocoris lineolatus* (Goeze)(Hemiptera: Miridae)[J]. Acta Entomologica Sinica, 2010, 53(5):487-496.
- [32] LIU N Y, ZHU J Y, JI M, et al. Chemosensory genes from *Pachy-peltis micranthus*, a natural enemy of the climbing hemp vine[J]. Journal of Asia-Pacific Entomology, 2017, 20(2):655-664.
- [33] JEONG Y T, SHIM J, OH S R, et al. An odorant-binding protein required for suppression of sweet taste by bitter chemicals[J]. Neuron, 2013, 79(4):725-737.
- [34] YUAN H B, DING Y X, GU S H, et al. Molecular characterization and expression profiling of odorant-binding proteins in *Apolygus lucorum*[J]. PLoS One, 2015, 10(10):e0140562.
- [35] ZHANG Y, TAN Y, ZHOU X R, et al. A whole-body transcriptome analysis and expression profiling of odorant binding protein genes in *Oedaleus infernalis*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology. Part D, Genomics & Proteomics, 2018, 28:134-141.
- [36] 宋月芹, 解幸承, 董钧锋, 等. 梨小食心虫气味结合蛋白 GmolOBP3 的 cDNA 克隆、表达谱及结合特性分析[J]. 昆虫学报, 2014, 57(3):274-285.
SONG Y Q, XIE X C, DONG J F, et al. cDNA cloning, expression profiling and binding properties of odorant binding protein GmolOBP3 in the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae)[J]. Acta Entomologica Sinica, 2014, 57(3):274-285.