

青杨天牛触角味觉受体基因的鉴定

王佳同¹, 张健², 程彬², 王寅亮¹, 陈琪¹, 任炳忠¹

(1. 东北师范大学生命科学学院, 吉林长春 130024; 2. 吉林省林业科学研究院, 吉林长春 130033)

摘要 [目的] 鉴定青杨天牛(*Saperda populnea*)触角味觉受体基因的种类。[方法] 根据青杨天牛触角总RNA的转录组测序结果, 结合生物信息学分析方法对其味觉基因进行鉴定, 并采用RT-PCR技术测定味觉受体基因在不同组织中的表达量。[结果] 共鉴定出青杨天牛味觉受体基因11种, 其中4种全长味觉受体基因(*SpopGR1*、*SpopGR3*、*SpopGR4*、*SpopGR5*)在青杨天牛雌雄触角均有表达, 除*SpopGR5*, 另外3个基因均在足表达, *SpopGR1*和*SpopGR4*在雌触角、雄触角、头、胸、腹、足和翅这7个部位均有表达, 但表达量偏低。[结论] 通过与果蝇味觉受体基因建树分析, 推测*SpopGR7*、*SpopGR9*、*SpopGR10*可能属于苦味受体家族, 行使对苦味的感知功能。该研究有助于在分子水平上加深对昆虫味觉感知系统的理解, 为以后采用化学生态手段对青杨天牛进行调控提供依据。

关键词 青杨天牛; 味觉受体; 序列分析

中图分类号 S763.38 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)13-0111-03

Identification of *Saperda populnea* Antennal Gustatory Receptor GeneWANG Jia-tong¹, ZHANG Jian², CHENG Bin² et al (1. School of Life Sciences, Northeast Normal University, Changchun, Jilin 130024; 2. Jilin City Academy of Forestry, Changchun, Jilin 130033)

Abstract [Objective] To identify the types of gustatory receptor genes of *Saperda populnea*. [Method] To identify the types of gustatory receptor genes based on the transcriptomes information of total RNA of antennae of *S. populnea* connected with bioinformatics analysis method. Expressions of gustatory receptors of *S. populnea* were measured with RT-PCR technique. [Result] 11 types of gustatory receptor genes of *S. populnea* were identified. The result showed that four complete length of gustatory receptor genes (*SpopGR1*, *SpopGR3*, *SpopGR4* and *SpopGR5*) were all expressed in antennae and three genes were expressed in leg except *SpopGR5*. *SpopGR1* and *SpopGR4* were lowly expressed in female antennae, male antennae, head, chest, abdomen, leg and wing. [Conclusion] Phylogenetic analysis of gustatory receptor genes indicated that *SpopGR7*, *SpopGR9*, *SpopGR10* may perform the function of bitter taste. This research can promote the understanding of insect gustatory system and establishes a foundation for controlling of *S. populnea* by chemical ecology measures.

Key words *Saperda populnea*; Gustatory receptors; Sequence analysis

昆虫具有专一的化学感受系统, 能够感知环境的各种刺激从而指导它们的行为, 通过化学线索, 昆虫可以定位食物、寻找配偶、躲避捕食者和毒素、与同伴交流等^[1-2]。多种嗅觉蛋白参与昆虫将化学信号转化为电信号的这一过程中, 其中嗅觉受体(olfactory receptor, OR)和味觉受体(gustatory receptor, GR)发挥着关键作用^[3-5]。虽然味觉受体在感受化学刺激和调节昆虫行为等方面发挥着重要作用, 但截至目前对味觉感受分子机制的研究相对较少。昆虫的味觉感器(gustatory sensillum)主要分布在触角、下唇须、下颏须、舌、咽、内唇、足的跗节和产卵器等部位, 味觉感器内分布着大量味觉神经轴突, 这些轴突具有感受不同化学信号刺激的功能, 当昆虫的味觉感器感受到外界的刺激物质后, 味觉感器内的味觉受体可以将化学信号转换为电信号, 通过神经轴突传送到昆虫脑的中枢神经系统(central nervous system, CNS), 中枢神经系统输出调控行为的指令, 使昆虫产生各种相应的行为反应^[6-8]。

青杨天牛(*Saperda populnea*)是我国北方地区杨树人工林的重要钻蛀性害虫, 主要为害银白杨、毛白杨、加杨等杨树品种。其幼虫蛀食枝干形成纺锤状虫瘿, 阻碍养分的正常运输使枝梢干枯, 影响成材; 如果幼树的干髓处被为害, 整株树都会死亡^[9]。笔者通过对青杨天牛的转录组数据进行筛选,

共鉴定出11种味觉受体基因, 从分子水平上填补了青杨天牛味觉受体研究的不足, 以期为以后采用化学生态手段调控青杨天牛的实践提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫 于2016年4—6月分别在吉林省西部地区松原市乾安县和白城市镇赉县的杨树被害林中剪取60~80 cm的天牛虫瘿带回实验室内, 外部罩上60目的纱网, 置于室内封闭保存, 待成虫羽化后采集备用。

1.2 青杨天牛触角RNA的转录组测序 试验试剂与仪器: DEPC水、Trizol、三氯甲烷、异丙醇、乙醇、无核酸酶水、离心柱(Qiagen QIAshredder)、尖嘴镊、眼科剪、离心管、研磨棒、移液枪用枪头、移液枪、离心管架、NanoDrop分光光度计、台式高速冷冻微量离心机(广州利桥仪器有限公司)、超净工作台(上海博讯实业有限公司)。

RNA提取与检验: 取经-20℃冰冻10 min的青杨天牛触角12只(雌雄成虫各3头), 用DEPC处理过的眼科剪及尖嘴镊仔细地从小触角基部将触角分离, 将取下的触角放入装有900 μL Trizol的1.5 mL离心管中, 进行反复研磨。总RNA提取按照试剂盒(Qiagen)说明进行。使用NanoDrop分光光度计检测RNA浓度并胶检确认, 寄送样品进行转录组测序。

1.3 味觉受体基因的鉴定 前人研究结果表明, 昆虫的味觉受体各基因家族之间的氨基酸序列同源性仅为8%~12%, 且在生物体各组织部位内的表达量极低, 给昆虫味觉受体基因的鉴定带来了较大的困难^[10]。目前, 较为公认的昆虫味觉受体基因的鉴定方法主要是通过判别基因的C-

基金项目 林业公益性行业科研专项(201404413); 吉林省公益性科研院所基本科研业务费项目(GY-2018-10)。**作者简介** 王佳同(1992—), 女, 吉林双辽人, 硕士研究生, 研究方向: 昆虫学。**收稿日期** 2018-01-24; **修回日期** 2018-01-30

末端是否具有 motif 保守序列及 7 个跨膜结构域的特征来进行鉴定。

该研究通过转录组测序结合生物信息学方法,从青杨天牛转录组数据结果中筛选到味觉受体基因,通过在 NCBI 数据库中进一步进行 BLAST 同源性比对,对编码氨基酸序列的跨膜区进行预测并判断昆虫味觉受体基因 C-末端是否具有 1 个保守序列等方法,最终鉴定味觉受体基因。

1.4 味觉受体基因在各组织中的表达分析 试验试剂与仪器:移液枪、移液枪用枪头、反转录试剂盒(TransGen Biotech)、无核酸酶水、PCRmix。

分别提取青杨天牛成虫雄性触角、雌性触角、头、胸、腹、足以及翅的总 RNA 并反转录获得 cDNA 链。采用 RT-PCR 方法:每个反应以不同组织的 200 ng cDNA 为模板。反应条件为 94 °C 90 s;94 °C 30 s,52 °C 30 s,68 °C 1 min,33 个循环;最后 68 °C 延伸 7 min。将产物上电泳槽并检胶,与 Marker 比较对照大小。

1.5 味觉受体 SpopGRs 系统发育树的构建 为确定

SpopGRs 与其他类群昆虫味觉受体 *GRs* 之间的进化关系,选取鞘翅目昆虫中已经鉴定出的几种昆虫味觉受体家族的核苷酸序列与在青杨天牛中筛选到味觉受体基因序列构建系统发育进化树,选取序列包括赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*)、中欧山松大小蠹(*Dendroctonus ponderosae*)、云杉八齿小蠹(*Ips typographus*)、铜绿丽金龟(*Anomala corpulenta*)、榆黄叶甲(*Pyrrhalta maculicollis*)、榆蓝叶甲(*Pyrrhalta aenescens*)在内共 6 种昆虫的味觉受体基因总计 162 条序列,并对 *SpopGRs* 分别进行命名。再将 11 种 *SpopGRs* 与黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)的 68 个味觉受体基因序列构建系统发育进化树,对 *SpopGRs* 基因的功能表达进行分析。系统发育进化树的构建均采用 MEGA 6.0 软件。

2 结果与分析

2.1 青杨天牛触角转录组数据 经组装后共得到 122 579 条 Transcript 和 87 984 条 Unigene, Transcript 与 Unigene 的 N50 分别为 1 123 和 575, 组装完整性较高。组装结果见表 1。

表 1 组装结果统计

Table 1 Statistical results of transcriptome sequencing and assembly

长度区间 Length range//bp	Contig	Transcript	Unigene
0 ~ 300	472 894 (99.15%)	61 208(49.93%)	53 523(60.83%)
301 ~ 500	18 099 (0.42%)	24 033(19.61%)	16 763(19.05%)
501 ~ 1 000	9 916 (0.23%)	17 681(14.42%)	9 594(10.90%)
1 001 ~ 2 000	5 773 (0.13%)	12 258(10.00%)	5 612(6.38%)
> 2 000	3 037 (0.07%)	7 399(6.04%)	2 492(2.83%)
总数 Total number	4 311 719	122 579	87 984
总长度 Total length//bp	219 919 077	77 847 666	41 476 443
N50 长度 N50 length//bp	48	1 123	575
平均长度 Mean length//bp	51.004 97	635.081 6	471.408 9

2.2 青杨天牛味觉受体基因的鉴定及序列分析 利用已有的青杨天牛转录组数据库,共获得 11 个青杨天牛味觉受体基因核苷酸序列(表 2)。

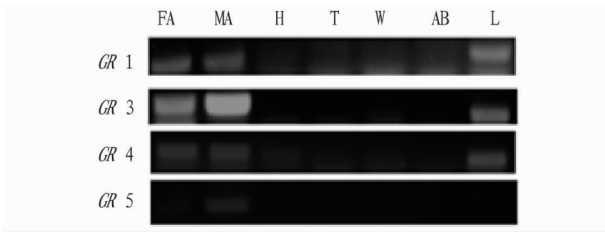
2.3 味觉受体表达量分析 利用 RT-PCR 获得了成虫不

同组织(包括雄触角、雌触角、头、胸、腹、足、翅)4 种全长味觉受体的特异性表达情况。4 种基因在青杨天牛雌雄触角均有表达,除 *SpopGR5*, 另外 3 个基因均在足部表达, *SpopGR1* 和 *SpopGR4* 在这 7 个部位均有表达,但表达量偏低(图 1)。

表 2 青杨天牛触角味觉受体基因的鉴定

Table 2 GR genes identified in *S. populnea* antenna

基因名称 Gene name	Unigene ID	长度 Length//bp	开放阅读框 ORF//aa	地位 Status	数据库注释 Database annotation
<i>SpopGR1</i>	46566.graph_c0	2 237	479	Complete ORF	<i>AgamGR7</i>
<i>SpopGR2</i>	63639.graph_c0	225	47	3'lost	<i>TcasGR86</i>
<i>SpopGR3</i>	46844.graph_c1	1 450	394	Complete ORF	<i>MaltGR1</i>
<i>SpopGR4</i>	50167.graph_c0	1 029	285	Complete ORF	<i>TcasGR85</i>
<i>SpopGR5</i>	48312.graph_c0	1 488	375	Complete ORF	<i>TcasGR102</i>
<i>SpopGR6</i>	25556.graph_c0	478	83	3'lost	<i>TcasGR102</i>
<i>SpopGR7</i>	82958.graph_c0	267	38	3'lost	<i>TcasGR89</i>
<i>SpopGR8</i>	41128.graph_c0	710	140	3'lost	<i>TcasGR154</i>
<i>SpopGR9</i>	4629.graph_c0	396	98	3'lost	<i>TcasGR159</i>
<i>SpopGR10</i>	61165.graph_c0	497	146	3'lost	<i>TcasGR160</i>
<i>SpopGR11</i>	38466.graph_c0	1 199	363	3'lost	<i>TcasGR166</i>



注:FA 为雌触角;MA 为雄触角;H 为头;T 为胸;W 为翅;AB 为腹;L 为足

Note:FA was female antennae; MA was male antennae; H was head; T was chest; W was wing; AB was abdomen; L was legs

图 1 4 个全长味觉受体基因在雌触角、雄触角、头、胸、翅、腹、足中的表达量

Fig.1 Expression profiles of four kinds of *SpopGRs* in adult female antennae, male antennae, head, chest, wing, abdomen and legs

2.4 味觉受体 *SpopGRs* 系统发育树的构建 将转录组测序获得的青杨天牛味觉基因序列与已知的 6 种鞘翅目昆虫味觉受体基因序列通过 BLAST 程序进行同源性比对,共获得 11 个青杨天牛味觉受体基因核苷酸序列。由系统发育树可以得出 11 个 *SpopGRs* 与其他类群昆虫间的进化关系,发现 *SpopGRs* 与赤拟谷盗的 *TcasGRs* 具有很高的同源性(图 2)。根据与赤拟谷盗的同源性,将青杨天牛味觉基因命名为 *SpopGR1 ~ SpopGR11*。

通过将已知的黑腹果蝇味觉受体^[11]的 52 个序列与该研究鉴定出的 11 个青杨天牛味觉受体序列构建系统发育进化树,*SpopGR7* 与苦味受体的 *DmelGR32a* 聚在一起,*SpopGR9* 与 *SpopGR10* 同源,与编码苦味受体的 *DmelGR33a* 聚在一起(图 3)。

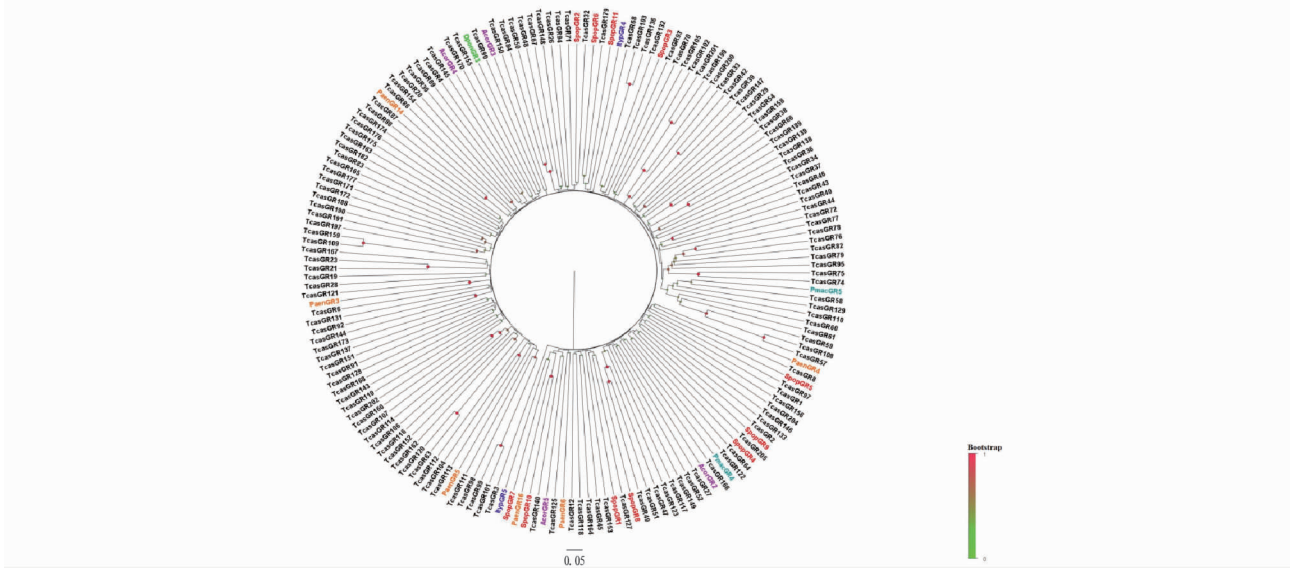


图 2 味觉受体 *SpopGRs* 与其他 6 种鞘翅目昆虫 *GRs* 构建系统发育树

Fig.2 Phylogenetic relationships between *SpopGRs* and *GRs* of other 6 species of Coleoptera

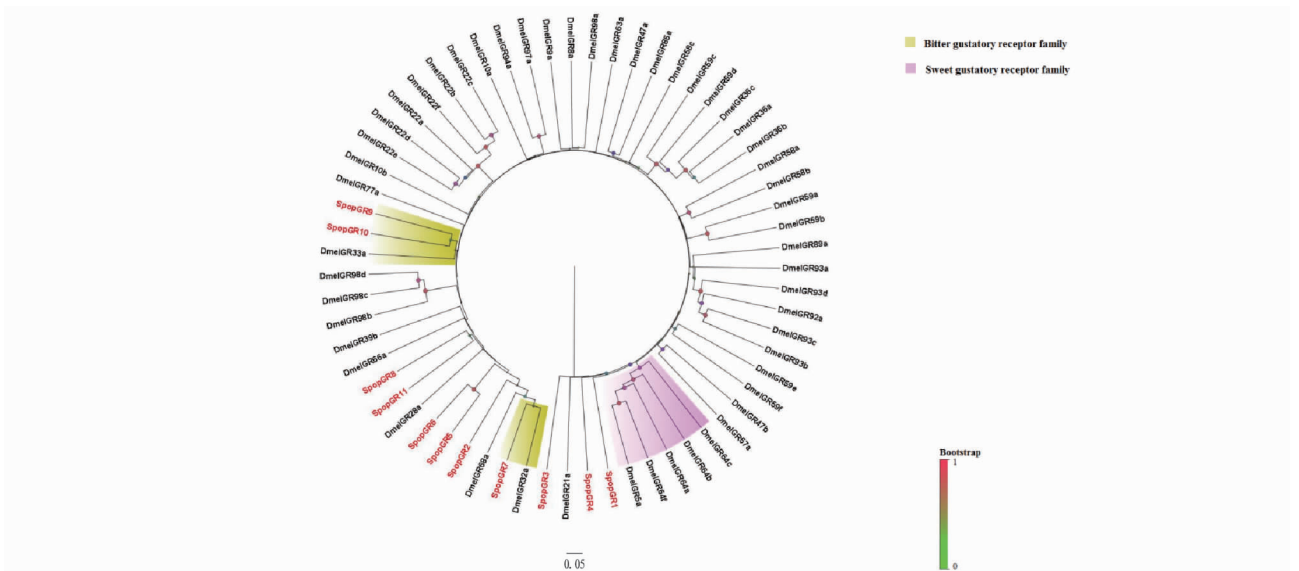


图 3 *SpopGRs*11 种味觉受体与黑腹果蝇 52 种 *GRs* 构建系统发育树

Fig.3 Phylogenetic relationships between 11 types of *SpopGRs* and 52 types of *DmelGRs*

界处设标识物,提示游人不得进入,避免人为活动带来的对森林资源的干扰^[10]。

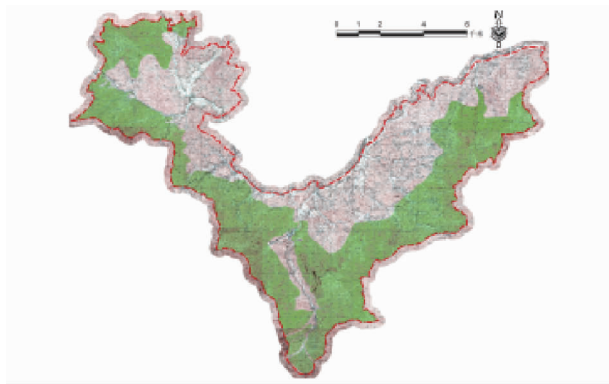


图 4 生态保育区

Fig. 4 Ecological conservation zone

3 结论

对国家森林公园的规划程序与内容进行简略概括,系统地研究了天堂寨的自然环境以及森林风景资源特点。在保护森林资源的前提下,融合功能与景观并存的理念,对天堂寨国家森林公园自然资源与人文资源进行了合理的利用。将森林公园内部划分为 3 个功能区,通过规划将各个功能区

联系为一个有机的整体,使得生态效益最优化。通过合理的森林公园规划指导,以期对传统森林公园规划的弊端做出改善,更好地迎合市场的生态旅游需求,做到保护与开发并举。

参考文献

- [1] 王然,张丽云,徐宁,等. 木兰围场国家森林公园生态旅游规划[J]. 湖北农业科学,2013,52(11):2687-2691.
 - [2] 耿松涛,李丽,张成琳. 森林生态旅游发展模式研究:以海南尖峰岭国家森林公园为例[J]. 林业资源管理,2017(5):129-134.
 - [3] 国家林业局. 国家林业局关于进一步加强国家级森林公园管理的通知[A/OL]. (2018-01-19)[2018-01-20]. <http://www.forestry.gov.cn/main/4818/content-1069202.html>.
 - [4] 徐莹,周祥. 基于多因子生态容量与 GIS 技术的森林公园总体规划方法改进:以流溪河国家森林公园总体规划为例[J]. 中国园林,2016(10):68-72.
 - [5] 吴保华. 简析森林公园总体规划的重要性[J]. 安徽林业,2009(2):30-31.
 - [6] 钟毅. 绵阳涪城凤凰山森林公园生态旅游资源评价与开发对策[D]. 雅安:四川农业大学,2014.
 - [7] 杜方明,赵怀琼. 天堂寨国家森林公园旅游环境承载力研究[J]. 合肥工业大学学报(社会科学版),2008,22(3):5-10.
 - [8] 杜方明,赵怀琼,陈乃富,等. 天堂寨国家森林公园旅游资源评价[J]. 皖西学院学报,2004,20(5):118-121,125.
 - [9] 李彩红,管华. 皖西天堂寨国家森林公园生态旅游开发的 SWOT 分析[J]. 皖西学院学报,2012,28(2):84-87.
 - [10] 陈戈,夏正楷,俞晖. 森林公园的概念、类型与功能[J]. 林业资源管理,2001(3):41-45.
-
- (上接第 113 页)
- ### 3 结论与讨论
- 笔者从青杨天牛触角转录组数据共鉴定出 11 个味觉受体基因,此外,可能还有一些没能鉴定到的味觉受体基因存在,主要原因在于味觉受体基因在味觉器官的表达水平过低^[12]。通过 RT-PCR 对 4 个全长的味觉受体基因进行组织表达情况的鉴定,味觉受体基因均在触角中表达,说明青杨天牛的触角可能是其探测味觉的重要器官。
- 在果蝇体内已经鉴定出 54 个味觉受体,主要参与编码苦味、甜味及二氧化碳受体蛋白。其中 *DmelGR64* 和 *DmelGR5a* 编码甜味受体蛋白,用于检测葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、麦芽糖醇、水苏糖以及棉子糖等^[11,13-14]。*DmelGR32a*、*DmelGR33a* 和 *DmelGR66a* 参与编码苦味受体蛋白,用于检测奎宁、洛贝林和咖啡因等。通过系统发育树可知 *SpopGR7* 与苦味受体的 *DmelGR32a* 聚在一起,*SpopGR9* 与 *SpopGR10* 同源,与编码苦味受体的 *DmelGR33a* 聚在一起,推测 *SpopGR7*、*SpopGR9* 和 *SpopGR10* 都属于苦味受体家族的成员,参与行使苦味感知功能。
- 昆虫的味觉在指导昆虫活动中起到重要作用,但人们对味觉的研究重点依然只停留在已获得基因组的昆虫上。青杨天牛是一种重要的林业害虫,通过深入了解其味觉受体基因的功能,为以后采用高效、低毒、无公害的化学生态调控提供理论基础。
- ### 参考文献
- [1] CANDE J,PRUDHOMME B,GOMPEL N. Smells like evolution: The role of chemoreceptor evolution in behavioral change[J]. Current opinion in neurobiology,2013,23(1):152-158.
 - [2] KAUPP U B. Olfactory signalling in vertebrates and insects: Differences and commonalities[J]. Nature reviews neuroscience,2010,11(3):188-200.
 - [3] DUNIPACE L,MEISTER S,MCNEALY C,et al. Spatially restricted expression of candidate taste receptors in the *Drosophila* gustatory system[J]. Current biology,2001,11(11):822-835.
 - [4] JONES W D,CAYIRLIOGLU P,KADOW I G,et al. Two chemosensory receptors together mediate carbon dioxide detection in *Drosophila* [J]. Nature,2007,445(7123):86-90.
 - [5] NEI M,NHIMURA Y,NOZAWA M. The evolution of animal chemosensory receptor gene repertoires: Roles of chance and necessity[J]. Nature reviews genetics,2008,9(12):951-963.
 - [6] WANNER K W,ROBERTSON H M. The gustatory receptor family in the silkworm moth *Bombyx mori* is characterized by a large expansion of a single lineage of putative bitter receptors[J]. Insect molecular biology,2008,17(6):621-629.
 - [7] LEAL W S. Odorant reception in insects: Roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes[J]. Annual review of entomology,2012,58(1):373-463.
 - [8] HILL C A,FOX A N,PITTS R J,et al. G protein-coupled receptors in *Anopheles gambiae*[J]. Science,2002,298(5591):176-178.
 - [9] 萧刚柔. 中国森林昆虫[M]. 北京:中国林业出版社,1992:499-500.
 - [10] SCHOONHOVEN L M,VAN LOON J J A,DICKE M. Insect-plant biology[M]. Oxford:Oxford University Press,2005:183-189.
 - [11] DAHANUKAR A,LEI Y T,KWON J Y,et al. Two *Gr* genes underlie sugar reception in *Drosophila*[J]. Neuron,2007,56(3):503-516.
 - [12] DUNIPACE L,MEISTER S,MCNEALY C,et al. Spatially restricted expression of candidate taste receptors in the *Drosophila* gustatory system[J]. Current biology,2001,11(11):822-835.
 - [13] JIAO Y C,MOON S J,MONTELL C. A *Drosophila* gustatory receptor required for the responses to sucrose, glucose, and maltose identified by mRNA tagging[J]. Proceedings of the national academy of sciences,2007,104(35):14110-14115.
 - [14] SLONE J,DANIELS J,AMREIN H. Sugar receptors in *Drosophila* [J]. Current biology,2007,17(20):1809-1816.