

悬铃木方翅网蝽触角气味结合蛋白基因鉴定

杨海博, 胡镇杰, 李定旭, 朱品红, 董钧锋*

(河南科技大学林学院, 河南洛阳 471000)

摘要:【目的】悬铃木方翅网蝽 *Corythucha ciliata* 是专性危害悬铃木属 *Platanus* 植物的外来入侵害虫, 本研究旨在获得该害虫触角中气味结合蛋白(OBPs)基因信息, 以期寻求有效控制害虫的嗅觉分子靶标。【方法】利用 Illumina HiSeq™ 4000 高通量测序技术对悬铃木方翅网蝽雌雄成虫触角进行转录组测序并对测序结果进行生物信息学分析; 通过实时荧光定量 PCR(qPCR)方法, 分析 OBP 基因在悬铃木方翅网蝽雌雄成虫触角中的表达模式。【结果】对悬铃木方翅网蝽雌雄成虫触角 6 个样品的转录组测序, 共获得 40.87 Gb clean reads, 各样品的序列长度均达到 6.31 Gb。转录组数据分析共鉴定出 26 个推测的悬铃木方翅网蝽 OBP 基因, 其编码蛋白中 24 个(CcilOBP1–24)属于 Classic OBPs, CcilOBP25/26 属于 Plus-C OBPs; 与半翅目其他昆虫相关 OBPs 系统发育分析表明, 大部分 CcilOBPs 形成独立一簇, 少数与其他半翅目昆虫 OBPs 直系同源。qPCR 分析显示, 有 11 个 OBP 基因在雌雄成虫触角中表达量差异显著, 其中有 9 个 OBP 基因(CcilOBP5/6/9/10/17/18/21/24/25)在雄成虫触角中显著高表达, 有 2 个 OBP 基因(CcilOBP14/16)在雌成虫触角中显著高表达。【结论】本研究获得了悬铃木方翅网蝽成虫触角气味结合蛋白基因信息, 研究结果为生物控制该害虫提供了重要基础数据和候选分子靶标。

关键词: 悬铃木方翅网蝽; 触角转录组; 高通量测序; 气味结合蛋白; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2018)10-1121-11

Identification of odorant binding protein genes in antennae of *Corythucha ciliata* (Hemiptera: Tingidae)

YANG Hai-Bo, HU Zhen-Jie, LI Ding-Xu, ZHU Pin-Hong, DONG Jun-Feng* (Forestry College, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471000, China)

Abstract: 【Aim】The sycamore lace bug, *Corythucha ciliata* (Hemiptera: Tingidae), is an invasive and specific forestry pest of *Platanus* spp. The objective of this study is to obtain the gene information of odorant binding proteins (OBPs) in *C. ciliata* antennae and to seek effective olfactory molecular targets for pest control. 【Methods】The antennal transcriptomes of male and female adults of *C. ciliata* were sequenced using Illumina HiSeq™ 4000 platform and subjected to bioinformatics analysis. The expression patterns of OBP genes in female and male antennae of *C. ciliata* adults were analyzed by real-time quantitative PCR (qPCR). 【Results】In total, 40.87 Gb clean reads were obtained from six samples of male and female antennal transcripts of *C. ciliata* adults, the sequences of all of the samples are more than 6.31 Gb in length. By further screening and identification, we obtained 26 putative OBP genes from *C. ciliata*, whose encoded proteins correspond to 24 Classic OBPs (CcilOBP1–24) and 2 Plus-C OBPs (CcilOBP25/26). Phylogenetic analysis of OBPs from *C. ciliata* (CcilOBPs) and other closely related Hemiptera species revealed that most CcilOBPs form a unique cluster, and a few form ortholog groups

基金项目: 河南科技大学博士启动基金(13480048); 河南省科技攻关项目(182102110255)

作者简介: 杨海博, 男, 1986年2月生, 河南安阳人, 博士, 讲师, 研究方向为农业昆虫与害虫防治, E-mail: hbyang@haust.edu.cn

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: junfengdong@haust.edu.cn

收稿日期 Received: 2018-02-06; 接受日期 Accepted: 2018-08-02

with OBPs from other hemipterous insects. qPCR analysis showed that there were significant differences in the expression levels of 11 OBP genes in the antennae of male and female adults, including 9 OBP genes (*CcilOBP5/6/9/10/17/18/21/24/25*) highly expressed in the male antennae, and 2 OBP genes (*CcilOBP14/16*) highly expressed in the female antennae. 【Conclusion】 This study acquired the molecular information of OBP genes from *C. ciliata* adult antennae. The results provide valuable basic data and candidate molecular targets for biological control of *C. ciliata*.

Key words: *Corythucha ciliata*; antennal transcriptome; high-throughput sequencing; odorant binding protein; real-time quantitative PCR

悬铃木方翅网蝽 *Corythucha ciliata* (Say) 属半翅目网蝽科, 是一种外来入侵昆虫, 主要危害悬铃木属 *Platanus* 植物, 包括一球悬铃木 *P. occidentalis*、二球悬铃木 *P. acerifolia* 和三球悬铃木 *P. orientalis*。该害虫主要以成虫和若虫聚集在叶背吸食汁液危害, 并传播多种病毒病 (Prado, 1990), 导致被害树木叶片枯黄提早脱落、树势衰弱甚至死亡 (Maceljski, 1986; Halbert and Meekef, 1998; Öszi *et al.*, 2006), 严重影响园林绿化景观。最近研究发现, 该虫还可叮咬吸食人类血液, 影响人类正常生活和身体健康 (Arezki *et al.*, 2015)。悬铃木方翅网蝽原产于北美中东部, 随后在欧洲迅速蔓延 (Maceljski, 1986; Prado, 1990; Picker and Griffiths, 2015)。目前, 该虫在国内至少 12 省 26 市猖獗为害, 并呈继续传播扩散态势 (李传仁等, 2007; 鞠瑞亭和李博, 2010; 虞国跃等, 2014; Yang *et al.*, 2017; 付宁宁等, 2017)。2007 年国家林业局已将悬铃木方翅网蝽列入“林业危险性有害生物名单” (王福莲等, 2008)。目前防治悬铃木方翅网蝽主要依赖化学农药。但由于该虫主要发生在城市道路和住宅区附近的悬铃木上, 使用化学农药不仅对人类健康造成极大的安全隐患 (Halbert and Meekef, 1998), 而且容易导致害虫产生抗药性 (Öszi *et al.*, 2006), 因此, 亟需开发经济有效、环境友好的新型防治技术。

嗅觉系统对昆虫的生存和繁衍至关重要 (Field *et al.*, 2000), 昆虫能够通过识别环境中的挥发性化合物来完成如寄主定位、寻找配偶、选择产卵场所、躲避天敌等行为 (Breer *et al.*, 1994; Field *et al.*, 2000; Benton *et al.*, 2009; Kaissling, 2009)。昆虫识别气味过程涉及到多种嗅觉相关蛋白, 包括气味结合蛋白 (odorant binding proteins, OBPs)、化学感受蛋白 (chemosensory proteins, CSPs)、气味受体 (odorant receptors, ORs)、离子型受体 (ionotropic receptors, IRs)、气味降解酶 (odorant degrading enzymes, ODEs) 和感觉神经元膜蛋白 (sensory

neuron membrane proteins, SNMPs) (Leal, 2013; Pelosi *et al.*, 2014), 最近研究发现在昆虫中存在 C2 型尼曼-皮克蛋白 (Niemann-Pick type C2 protein, NPC2) 也具有结合化学信息物的功能 (Zhu *et al.*, 2018)。其中 OBPs 是一类小分子量 (约 135 ~ 220 个氨基酸) 酸性可溶性蛋白, 广泛存在于昆虫触角淋巴液中。尽管不同种类昆虫 OBPs 序列相似性较低, 但大多数 OBPs 含有 6 个高度保守的半胱氨酸 (Cys) 残基, 形成 3 个交叉二硫键稳定其结构 (Zhou, 2010)。根据保守 Cys 残基的数量, OBPs 至少可分为 5 种类型: 经典 OBPs (Classic OBPs) (含有 6 个保守 Cys 残基)、Minus-C OBPs (缺少第 2 “C2” 和第 5 “C5” 位 Cys)、Plus-C OBPs (增加了 2 个 Cys 并在第 6 位 Cys “C6” 后紧接着 1 个脯氨酸 “P”)、二聚体 OBPs (dimer OBPs) (含有两组“经典 OBPs 半胱氨酸残基”) 和非典型 OBPs (atypical OBPs) (含有 9 ~ 10 个 Cys 残基并有很长的羧基端) (Zhou *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2009; Zhou, 2010; Leal, 2013; Tsitsanou *et al.*, 2013)。在鳞翅目、双翅目等昆虫中, 常将 Classic OBPs 分为性信息素结合蛋白 (pheromone binding protein, PBP), 普通气味结合蛋白 (general odorant binding protein, GOBP) 和触角结合蛋白 (antennal binding protein, ABPx) 3 类; PBPs 又分为 PBP1, PBP2 和 PBPs; GOBPs 又分为 GOBP1 和 GOBP2; ABPx 亚家族基因高度分化, 种类差异较大 (Li *et al.*, 2015)。OBPs 选择性结合环境中疏水性气味分子, 运输其穿过极性淋巴液并到达嗅觉感受神经元树突膜周围, 完成嗅觉传递的第一步 (Vogt *et al.*, 1991)。因此, OBPs 在昆虫嗅觉识别中发挥着重要作用。对昆虫 OBPs 基因的鉴定可为害虫防治提供新思路和新途径。

目前, 对半翅目昆虫 OBPs 的研究以盲蝽科为主, 如研究者陆续在绿盲蝽 *Apolygus lucorum* 中发现 38 个 OBPs (Hua *et al.*, 2012; Ji *et al.*, 2013; Yuan *et al.*, 2015), 在美国牧草盲蝽 *Lygus lineolaris* 中发

现 32 个 OBPs (Hull *et al.*, 2014), 在苜蓿盲蝽 *Adelphocoris lineolatus* 中发现 14 个 OBPs (Gu *et al.*, 2011), 在中黑盲蝽 *Adelphocoris suturalis* 中发现 16 个 OBPs (Cui *et al.*, 2016), 在薇甘菊颈盲蝽 *Pachypeltis micranthus* 中发现 9 个 OBPs (Liu *et al.*, 2017), 在黑肩绿盲蝽 *Cyrtorhinus lividipennis* 中发现 10 个 OBPs (Wang *et al.*, 2017); 在卫生害虫锥蝽 *Rhodnius prolixus* 中发现 17 个 OBPs (Oliveira *et al.*, 2017); 对蚜虫和飞虱的 OBPs 也进行了相关研究 (Zhou JJ *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2012; Gu *et al.*, 2013; He and He, 2014; Zhou SS *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2017)。对网蝽科嗅觉相关蛋白的研究却有限 (Li *et al.*, 2016), 付宁宁等 (2017) 对悬铃木方翅网蝽化学感受蛋白 CSP1 的结构及其所结合的寄主挥发物进行了分析, 发现 CSP1 与反式- β -石竹烯稳定结合, 研究结果为筛选悬铃木方翅网蝽引诱剂提供了参考。

目前, 悬铃木方翅网蝽 OBPs 基因信息尚未见报道, 本研究利用 Illumina Hiseq™ 4000 高通量测序技术对悬铃木方翅网蝽成虫触角进行转录组测序, 旨在获得参与悬铃木方翅网蝽嗅觉传递过程中 OBPs 基因信息, 并与一些近缘物种的 OBPs 基因进行系统进化树分析, 为今后利用基因靶标控制林木害虫提供参考和借鉴。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

悬铃木方翅网蝽采自河南洛阳河南科技大学校园内二球悬铃木叶片上, 带回室内置于人工气候箱中, 在温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 相对湿度 $60\% \pm 10\%$, 光周期 16L: 8D 条件下用悬铃木叶片饲养 1 代后用于实验。挑取羽化 3 d 未交配的雌雄成虫为试验用虫, 分别将雌雄成虫触角剪下并立即放入液氮中保存, 每 500 对触角为 1 个重复, 雌雄各设 3 次生物学重复。

1.2 总 RNA 的提取与检测

采用 RNAiso™ Plus 试剂盒分别提取 1.1 节各样品的总 RNA, 1% 的琼脂糖凝胶电泳对总 RNA 质量检测; 分别用 NanoDrop 2000 (IMPLEN, CA, 美国)、Qubit 2.0 (Life Technologies, CA, 美国) 和 Agilent 2100 (Agilent Technologies, CA, 美国) 检测总 RNA 样品的纯度、浓度和完整性。

1.3 cDNA 文库构建与测序

文库构建使用 NEBNext® Ultra™ RNA Library

Prep Kit (NEB, 美国) 试剂盒进行。检测合格的总 RNA 样品, 用带有 Oligo (dT) 的磁珠对 mRNA 进行富集, 然后加入 fragmentation buffer 将 mRNA 进行随机打断, 以 mRNA 为模板构建测序文库, 文库构建后, 采用 Qubit 2.0, Agilent 2100 和 qPCR 方法对文库检测, 以保证文库质量。最后用 Illumina Hiseq™ 4000 测序平台进行测序。cDNA 文库的构建和测序由北京百迈客生物科技有限公司完成。

1.4 转录本的拼接和组装

对测序得到的 raw reads 经过去掉接头、Ploy-N 和低质量读数获得 clean reads, 同时对 Q30 (clean data 质量值大于或等于 30 的碱基比例) 和 GC 含量及重复序列水平进行计算。采用 Trinity 对 clean reads 进行拼接组装获得高质量的 unigenes。为使转录结果更完整, 本研究测序样品采用合并组装的方式 (间接增加测序深度), 以有利于后续分析。

1.5 Unigene 的功能注释

使用 BLAST 程序将 unigene 序列与下列数据库比对, BLAST 比对阈值为 $E\text{-value} < 1e-5$, 获得基因的功能注释信息。数据库分别为: NCBI 蛋白数据库 (NCBI non-redundant protein sequences, Nr); 蛋白家族 (protein family, Pfam); 蛋白质直系同源簇数据库 (clusters of orthologous groups of proteins, KOG/COG); Swiss-Prot 数据库 (a manually annotated and reviewed protein sequence database); 京都基因与基因组百科全书 (KEGG ortholog database, KO); 基因本体论 (Gene Ontology, GO)。

1.6 OBP 相关基因分析

根据注释获得的悬铃木方翅网蝽候选 OBP 氨基酸序列, 在 NCBI 数据库进行序列相似性 BLAST 比对。并搜集已完成基因组序列测序和已公开发表的常见半翅目昆虫 OBP 基因的氨基酸序列, 参考 NCBI 上 BLAST 比对结果, 结合 Xu 等 (2009) 和 Zhou (2010) 设定的鉴定半翅目 Classic OBPs 和 Plus-C OBPs 氨基酸序列通式, 鉴定悬铃木方翅网蝽 OBP 基因。使用 MEGA 7.0 的邻接法 (neighbor-joining method), 以 bootstrap = 1 000 构建进化树, 使用 FigTree v. 1.4.3 软件对进化树进行编辑; 使用 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 寻找 OBP 基因的开放阅读框 (ORF); 使用 Expasy (<http://web.expasy.org/protparam/>) 和 SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 对氨基酸序列的等电点、分子量和信号肽进行分析; 用 DNAMAN 7.0 软件进行序列对比。

1.7 基因表达水平及统计分析

以拼接得到的转录组作为参考序列,将每个样品的 clean reads 往参考序列上做 mapping,使用 RSEM(Li and Dewey, 2011)得到每个样品比对到每个基因上的 read count,并对其进行 FPKM (fragments per kilobase of transcript per million fragments sequenced)转换(Trapnell *et al.*, 2010),据此分析基因的表达水平。

利用 qPCR 检测 *CcilOBPs* 在雌雄成虫触角中的表达量。按照 1.2 节样品制备方法(Trizol 法)制备 qPCR 验证试验样品。荧光定量 PCR 所需特异性引物由 Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)进行设计(表 1),以 β -actin (GenBank 登录号: KX108734)为内参基因。PCR 反应体系: IQ™ SYBR® Green Supermix 10 μ L, 正反引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, cDNA 模板 1 μ L, ddH₂O 7 μ L。PCR 反应程序: 95°C 预变性 10 min; 95°C 变性 30 s, 55°C 退火并延伸 30 s, 40 个循环;接着在 65 ~ 95°C 进行溶解曲线分析,每个样品进行 3 次重复。反应结束后采集 Ct 值,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量(Livak and Schmittgen, 2001)。

用 SPSS 20.0 (IBM, 美国)软件对目标基因在不同性别触角中的表达量(mean \pm SE)进行单因素方差分析(One-way ANOVA),然后进行 LSD 检验。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物

Table 1 qPCR primer

基因 Gene	正向引物(5' - 3') Forward primer	反向引物(5' - 3') Reverse primer
<i>OBP1</i>	GTCACCGAAGATCAAGTGGGA	ACGCAAGAGACATAACACATCAC
<i>OBP2</i>	CCTGCTGCAATGCGTCTATC	TGAGCCAGACACTGCTGAAC
<i>OBP3</i>	AACGGCGGCTFTGTTTAAGG	TTTTCTAGCACCGCCTCGAT
<i>OBP4</i>	CGAGAGCGGTGGAATFGAGT	ACACTTGAGCTTTCCGTCGT
<i>OBP5</i>	TGCATGGGTGCAGTTGGTAA	TGCTGGGGCAGTTCAAGAAA
<i>OBP6</i>	GCACCTTGTTTCCTCGCTTG	TAGCCAGTTCCTGCGTTT
<i>OBP7</i>	CAACGAGTGTGTCGGCAAAC	ACGTCATCCACAAGATTCCCT
<i>OBP8</i>	TACGCAATGACGAGACAGCA	ACACTGCACGTTACGATCTTCT
<i>OBP9</i>	GACAGCTTTTGTGACGCCGA	CGTCGGTTTTTGGTTGACAGG
<i>OBP10</i>	GCTCTCGCCGTAATGAAGGA	TTTCATCGGCCAAATCGCAC
<i>OBP11</i>	GCAGCTAAGAAGGCCGAAA	TCGTCAAGATGCCAACCCATT
<i>OBP12</i>	TGCCAAAACGAGTGGTGC	TGCACTCGTCCGCTTCATTT
<i>OBP13</i>	CGCAAAAAGGTTTGAGGCA	GCGCCACTTTAATTCTGTGG
<i>OBP14</i>	GTTGACGTCATGTATCCGCC	CGCATTGGCAAACCACTATGA
<i>OBP15</i>	GCCGTCATTGTCGTGTTTG	GAGAGTCGCTTTTCTGGGG
<i>OBP16</i>	TGGCTCTCAAAGTAGCGGAC	CTGATCCCACGTCAGTTCCA
<i>OBP17</i>	TGGAGTGTACGGAAGTTGT	TFCCCGTGACAAACGAGACA
<i>OBP18</i>	CATGCGTCGCCAGAGATT	GAAAATTCCGGCTCGCTTCGT
<i>OBP19</i>	CTAAAGCCGCCGACGAAATG	AGGAATGGCTTGGTTGCTCA
<i>OBP20</i>	AGTGCCATCGGGTTGTTAG	GCCCTTTCACATTTATCGCCC
<i>OBP21</i>	ACCGACGTAAAGACGTAGA	TCATAGCCCGGTCACACTT
<i>OBP22</i>	ACGGTGATTGTGAGTTGCT	TATCCCTCGTCAAACCGTCCG
<i>OBP23</i>	CGCTCAAGGGCATGAATGTT	ACACTACAGGACGTAGCGACT
<i>OBP24</i>	CAGTTGACGGGTGCTGGAA	ACTCAGCGTTTTCGGCTACT
<i>OBP25</i>	CGTGACCAGTCCGTTTGGGA	GCCGTCGAGCAAGTAAGGAA
<i>OBP26</i>	GTGCATGAGCCGCTACTTCA	ATCTGGTGAGCCAACACCTC
β -actin	GGGTATGGAATCTTGCGGTATC	TGTTGGCGTACAGGTCTTTC

2 结果

2.1 悬铃木方翅网蝽成虫触角转录组的测序和组装

采用 Illumina 测序平台对悬铃木方翅网蝽成虫

触角转录组进行测序,每个样本生成超过 6.31 Gb 的高质量数据。GC 含量在 43.65% ~ 47.32% 之间。每个样本 Q30 均大于 87.28% (表 2)。

利用 Trinity 软件进行序列组装,共获得 113 958 个转录本, N50 和平均长度分别为 3 004 bp 和 1 631

表 2 悬铃木方翅网蝽成虫触角转录组测序数据评估统计

Table 2 Summary of sequencing data of antennal transcriptome of *Corythucha ciliata* adults

样品编号 Sample no.	原始 Reads 数 Number of raw reads	高质量 Reads 数 Number of clean reads	数据大小(Gb) Size of clean bases	GC (%)	Q30 (%)
♀ 1	22 081 035	21 838 144	6.53	46.07	88.11
♀ 2	25 065 669	24 792 453	7.42	44.56	88.39
♀ 3	21 850 418	21 555 437	6.45	43.69	88.31
♂ 1	21 365 512	21 100 580	6.31	43.65	87.42
♂ 2	22 947 006	22 719 831	6.79	45.27	87.28
♂ 3	24 885 020	24 656 078	7.37	47.32	88.64

Q30: 质量值 ≥ 30 的碱基所占百分比 Percentages of bases with the quality value ≥ 30 .

bp。对转录本进一步组装分析,获得 65 943 条 unigenes, N50 和平均长度分别为 1 809 bp 和 1 036 bp。转录组长度分布显示,大于 1 000 bp 的 unigenes 有 19 408 条,占全部 unigenes 的 29.43%。

2.2 悬铃木方翅网蝽 OBP 基因鉴定

通过对悬铃木方翅网蝽成虫触角转录组的 BlastX 比对分析,共鉴定出 26 个 OBP 基因,依次被命名为 *CcilOBP1* - 26, GenBank 登录号为 MG820708 - MG820733。*CcilOBPs* 氨基酸序列在 100 ~ 199 aa 之间,分子量 11.47 ~ 22.21 kD;信号肽预测显示, *CcilOBP1*, *CcilOBP10*, *CcilOBP12*, *CcilOBP16* 和 *CcilOBP23* 无信号肽,其他 *CcilOBPs* 均含信号肽(表 3)。序列比对显示 15 个 *CcilOBPs* 序列(*CcilOBP2*, 6, 9 - 13, 16 - 17, 19 - 23, 26)与其他昆虫同源序列一致性较高($\geq 50\%$),其中 *CcilOBP23* 与帝王蝶 *Danaus plexippus* OBP1 序列一致性最高(76%),其次为 *CcilOBP2* 与黑肩绿盲蝽 OBP1(序列一致性达 74%),接着依次分别为, *CcilOBP22* 与沙棘木蠹蛾 *Eogystia hippophaecolus* OBP1(73%),*CcilOBP11* 和 *CcilOBP20* 分别与苹果银蛾 *Argyresthia conjugella* OBP4/5(71%),以及 *CcilOBP16* 与菜粉蝶 *Pieris rapae* OBP72-like(71%)(表 3)。

通过氨基酸序列比对(图 1)发现,26 个 *CcilOBPs* 分两种类型, *CcilOBP1* - 24 属于 Classic OBPs,序列结构中含有 6 个保守 Cys 残基,基本符合半翅目 Classic OBPs 模式“C1-X₂₂₋₃₂-C2-X₃-C3-X₃₆₋₄₆-C4-X₈₋₁₄-C5-X₈-C6”(Xu *et al.*, 2009); *CcilOBP25/26* 属于 Plus-C OBPs,序列结构中除含有 6 个保守 Cys 外,又多了 3 个 Cys 保守位点(C4a, C6a 和 C6b),并在 C6 后紧接着 1 个保守脯氨酸(P)残基,基本符合“C1-X₈₋₄₁-C2-X₃-C3-X₃₉₋₄₇-C4-X₁₇₋₂₉-C4a-X₉-C5-X₈-C6-P-X₉₋₁₁-C6a-X₉₋₁₀-C6b”(Zhou, 2010)。

2.3 悬铃木方翅网蝽 OBP 进化分析

通过对悬铃木方翅网蝽 *CcilOBPs* 与其他 8 种已知的半翅目昆虫(绿盲蝽、苜蓿盲蝽、美国牧草盲蝽、中黑盲蝽、棉蚜 *Aphis gossypii*、葡萄根瘤蚜 *Daktulosphaira vitifoliae*、褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 和白背飞虱 *Sogatella furcifera*) 共 164 个 OBPs 氨基酸序列进行系统发育分析(图 2)。进化树分为 3 个分支, *CcilOBP25/26* 与其他半翅目昆虫的 40 个 Plus-C OBPs 聚类在一支, *CcilOBP1* - 24 分散在其他两个分支上, *CcilOBPs* 与其他半翅目昆虫 OBPs 同源性较低,大部分 *CcilOBPs* 集中在一个分支上,如 *CcilOBP1/14*, *CcilOBP3/4*, *CcilOBP5/20*, *CcilOBP8/10*, *CcilOBP11/19/16/23*, *CcilOBP12/13/15/22*, 表明这些 *CcilOBPs* 可能是悬铃木方翅网蝽的特征基因,与感受其生存环境中某些特定的气味化合物分子相关。

2.4 悬铃木方翅网蝽 OBP 基因表达量分析

在悬铃木方翅网蝽雌雄成虫触角中, *CcilOBP10* 和 *CcilOBP6* 在雄性成虫触角中 FPKM 值大于 1 000, *CcilOBP3/18/21/25/26* FPKM 值介于 100 ~ 1 000, 其他 *CcilOBPs* 的 FPKM 值较低(表 4); *CcilOBP5/10/21/24* 在雄性触角中显著高表达。通过荧光定量 PCR 检测发现,在鉴定的 26 个 OBP 基因中,有 11 个 OBP 基因在雌雄触角中表达量差异显著,其中有 9 个 OBP 基因(*CcilOBP5/6/9/10/17/18/21/24/25*)在雄性触角中显著高表达,有 2 个 OBP 基因(*CcilOBP14/16*) 在雌性触角中显著高表达(表 4)。

3 讨论

本研究利用 Illumina HiSeq™ 4000 高通量测序

表 3 悬铃木方翅网蝽成虫触角 OBP 基因列表

Table 3 List of OBP genes in *Corythucha ciliata* adult antennae

基因 Gene	GenBank 登录号 GenBank accession no.	蛋白长度 Protein length (aa)	分子量 Molecular weight (kD)	等电点 Isoelectric point	信号肽 Signal peptide (aa)	基因注释 Gene annotation	物种 Species	蛋白登录号 Protein ID	得分 Score	E 值 E-value	一致性 Identity (%)
<i>CciloBP1</i>	MG820708	100	11.47	5.55	无 None	OBP7	家蚕 <i>Bombyx mori</i>	CAS90131	94.4	2e-22	42
<i>CciloBP2</i>	MG820709	181	20.15	5.63	1-19	OBP1	黑肩绿盲蝽 <i>Cyrtorhinus lividipennis</i>	ARJ35766	247	5e-81	74
<i>CciloBP3</i>	MG820710	138	15.33	6.08	1-19	GOBP69a	茧蜂 <i>Diachasma alloeum</i>	XP_015125081	62.4	1e-09	36
<i>CciloBP4</i>	MG820711	147	16.19	4.86	1-24	OBP14	沙棘木蠹蛾 <i>Egystia hippophaecolus</i>	AOG12869	103	4e-25	37
<i>CciloBP5</i>	MG820712	147	16.85	4.54	1-18	OBP1	薇甘菊颈盲蝽 <i>Pachypeltis micranthus</i>	ARO46430	65.9	9e-11	32
<i>CciloBP6</i>	MG820713	171	18.50	9.03	1-19	OBP30	美国牧草盲蝽 <i>Lygus lineolari</i>	AHF71061	227	2e-73	63
<i>CciloBP7</i>	MG820714	151	17.03	8.60	1-21	OBP17	苜蓿盲蝽 <i>Adelphocoris lineolatus</i>	AMD02857	106	6e-27	40
<i>CciloBP8</i>	MG820715	147	16.30	8.67	1-15	OBP1	苜蓿盲蝽 <i>Adelphocoris lineolatus</i>	ACZ58027	126	1e-34	45
<i>CciloBP9</i>	MG820716	152	17.24	4.91	1-22	OBP19d-like	玉带凤蝶 <i>Papilio polytes</i>	XP_013136188	199	7e-63	59
<i>CciloBP10</i>	MG820717	143	15.97	5.82	无 None	OBP19d-like	温带臭虫 <i>Cimex lectularius</i>	XP_014239601	146	3e-42	58
<i>CciloBP11</i>	MG820718	138	15.84	8.12	1-17	OBP4	苹果银蛾 <i>Argyresthia conjugella</i>	AFD34175	217	1e-70	71
<i>CciloBP12</i>	MG820719	138	15.76	4.83	无 None	PBP1	沙棘木蠹蛾 <i>Egystia hippophaecolus</i>	AOG12880	193	8e-61	61
<i>CciloBP13</i>	MG820720	167	19.49	5.43	1-24	PBP2	核桃举肢蛾 <i>Atrijuglans hetaohei</i>	AKA27976	211	2e-67	57
<i>CciloBP14</i>	MG820721	146	16.78	5.02	1-20	OBP7	家蚕 <i>Bombyx mori</i>	CAS90131	105	6e-26	36
<i>CciloBP15</i>	MG820722	171	19.81	5.20	1-24	OBP84a	柑橘凤蝶 <i>Papilio xuthus</i>	XP_013167600	108	9e-28	46
<i>CciloBP16</i>	MG820723	121	14.14	8.48	无 None	OBP72-like	菜粉蝶 <i>Pieris rapae</i>	XP_022112385	194	7e-62	71
<i>CciloBP17</i>	MG820724	141	16.05	5.47	1-21	OBP24	锥猎蝽 <i>Triatoma brasiliensis</i>	SAI59039	190	8e-60	63
<i>CciloBP18</i>	MG820725	147	16.18	8.64	1-22	OBP3	苜蓿盲蝽 <i>Adelphocoris lineolatus</i>	ACZ58029	76.3	1e-14	34
<i>CciloBP19</i>	MG820726	144	16.40	8.46	1-23	OBP5	沙棘木蠹蛾 <i>Egystia hippophaecolus</i>	AOG12858	217	2e-70	68
<i>CciloBP20</i>	MG820727	141	16.12	4.68	1-18	OBP5	苹果银蛾 <i>Argyresthia conjugella</i>	AFD34173	216	6e-70	71
<i>CciloBP21</i>	MG820728	135	14.88	4.33	1-17	OBP15	锥猎蝽 <i>Triatoma brasiliensis</i>	SAI59031	151	1e-44	53
<i>CciloBP22</i>	MG820729	163	18.51	5.03	1-21	GOBP2	沙棘木蠹蛾 <i>Egystia hippophaecolus</i>	AOG12862	248	5e-82	73
<i>CciloBP23</i>	MG820730	117	13.72	8.82	无 None	OBP1	帝王蝶 <i>Danaus plexippus</i>	OWR42849	184	3e-58	76
<i>CciloBP24</i>	MG820731	183	20.58	4.84	1-19	OBP11	扶桑绵粉蚧 <i>Phenacoccus solenopsis</i>	ALS31061	59.3	6e-08	33
<i>CciloBP25</i>	MG820732	195	22.21	6.52	1-20	OBP14	苜蓿盲蝽 <i>Adelphocoris lineolatus</i>	ACZ58086	90.1	1e-19	43
<i>CciloBP26</i>	MG820733	199	21.89	9.04	1-18	OBP3	黑肩绿盲蝽 <i>Cyrtorhinus lividipennis</i>	ARJ35768	194	2e-59	53

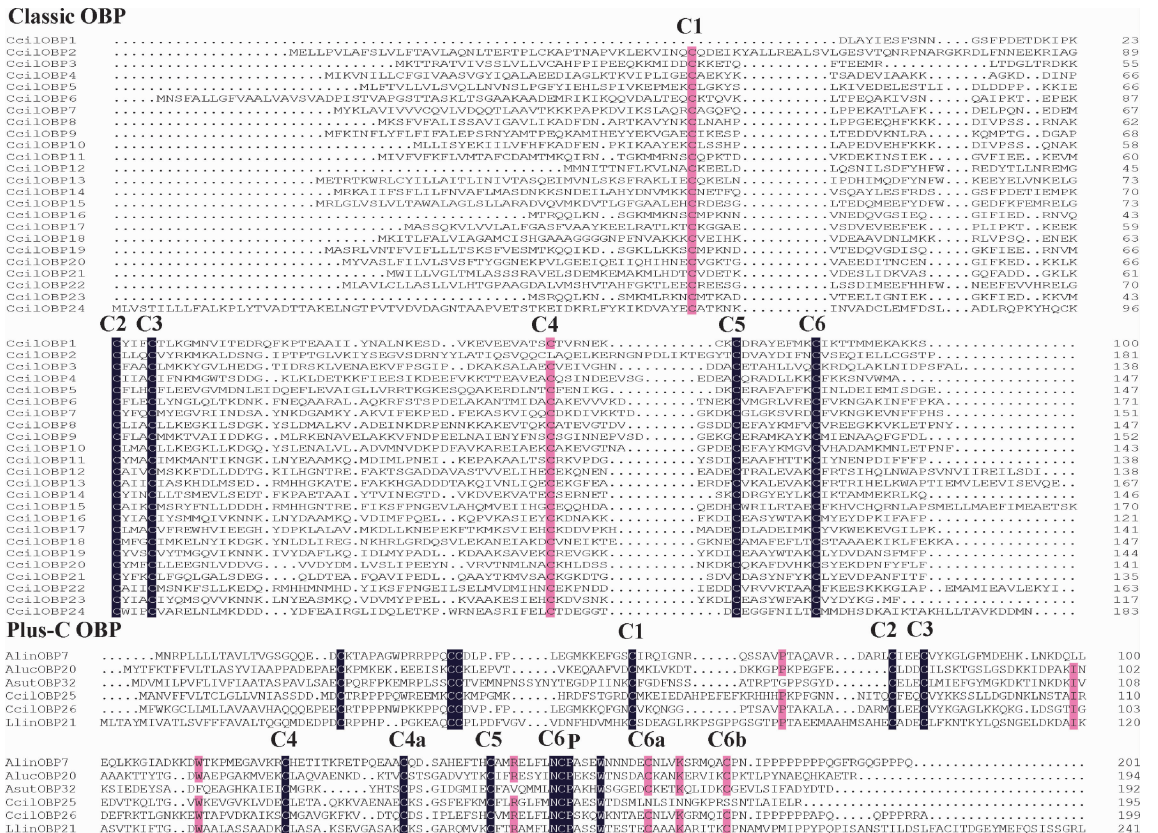


图1 悬铃木方翅网蝽与其他昆虫 OBPs 氨基酸序列比对

Fig. 1 Amino acid sequence alignment of OBPs from *Corythucha ciliata* and other insects

OBPs 来源物种及 GenBank 登录号 Origin species of OBPs and their GenBank accession numbers; AlinOBP7: 苜蓿盲蝽 *Adelphocoris lineolantus*, GQ477028; AlucOBP20: 绿盲蝽 *Apolygus lucorum*, KT281928; AsutOBP32: 中黑盲蝽 *Adelphocoris suturalis*, KT347581; LlinOBP21: 美国牧草盲蝽 *Lygus lineolaris*, KF240758. CcilOBP1 - 24 属于 Classic OBPs, CcilOBP25/26 属于 Plus-C OBPs。保守半胱氨酸位点和脯氨酸位点分别用 C1 - C6 和 P 标示在序列上方; 100% 和 $\geq 75\%$ 一致性的氨基酸序列分别用蓝色和红色标示。CcilOBP1 - 24 belong to Classic OBPs and CcilOBP25/26 belong to Plus-C OBPs. Conserved cysteine and proline sites are labeled with C1 - C6 and P above the sequence, respectively; blue and red shades denote the amino acid sequence with the identity of 100% and $\geq 75\%$, respectively.

技术对悬铃木方翅网蝽雌成虫触角进行转录组测序, 根据 OBPs 序列中保守半胱氨酸残基的特征, 并与其他已知 OBPs 序列进行比对, 共鉴定出 26 个 OBPs 基因。截至目前, 共有 20 多种半翅目昆虫的 OBPs 基因得到发掘和验证, 大多集中在盲蝽科、蚜科和飞虱科等类群中, 在网蝽科中尚无报道。悬铃木方翅网蝽成虫触角转录组测序结果为其他网蝽及半翅目昆虫的 OBPs 基因提供了重要数据参考。与双翅目昆虫中的 OBPs 数量 (40 ~ 60) 相比, 半翅目昆虫的 OBPs 数量较少 (Vieira and Rozas, 2011)。如在绿盲蝽、美国牧草盲蝽、茶翅蚜 *Halyomorpha picus*、小长蝽 *Nysius ericae*、中黑盲蝽、豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum*、苜蓿盲蝽、黑肩绿盲蝽、褐飞虱、白背飞虱、薇甘菊颈盲蝽、棉蚜、点蜂缘蝽 *Riptortus pedestris* 和葡萄根蚜中分别鉴定到 38, 32, 30, 28, 16, 15, 14, 10, 10, 12, 9, 9, 6 和 6 种 OBPs (Zhou JJ *et al.*, 2010; Gu *et al.*, 2013; He and He,

2014; Hull *et al.*, 2014; Zhou SS *et al.*, 2014; Yuan *et al.*, 2015; Cui *et al.*, 2016; Paula *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2017; 宋月芹等, 2017; Wang *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2017)。OBP 基因多在成虫触角中表达, 但在其他虫态或组织中也检测到部分 OBP 基因表达, 因此在悬铃木方翅网蝽其他虫态或组织中可能存在尚未被鉴定的 OBP 基因。另外, 基因测序深度与广度、不同的测序技术对 OBP 基因的发掘也有影响, 表达序列标签 (expressed sequence tags, ESTs) 的限制也会导致一些 OBP 基因不能被及时发掘 (Gu *et al.*, 2011)。就目前的研究结果来看, 悬铃木方翅网蝽 OBPs 分为 Classic OBPs (CcilOBP1 - 24) 和 Plus-C OBPs (CcilOBP25/26) 两类。迄今尚未在半翅目昆虫中发现 Minus-C OBPs。Minus-C OBPs 更多地存在于较为原始的昆虫中, 而 Classic OBPs 和 Plus-C OBPs 更多地存在于较为进化的物种中, 昆虫 OBP 基因向

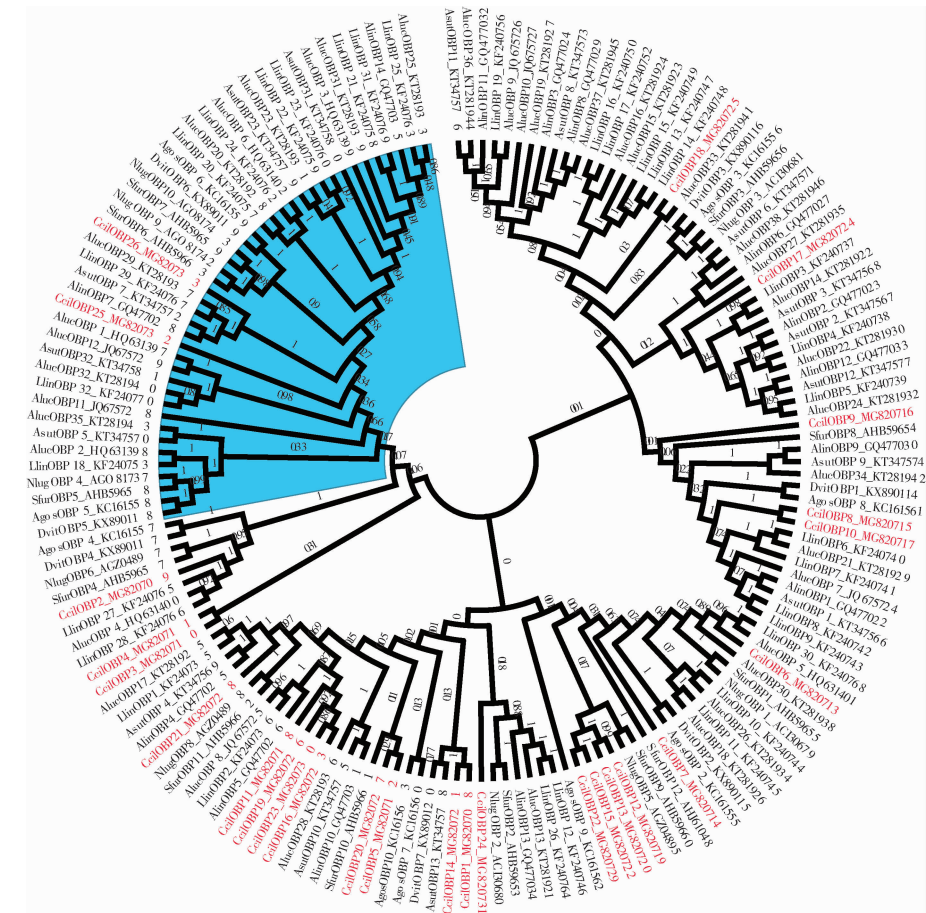


图2 悬铃木方翅网蝽与其他半翅目昆虫 164 个气味结合蛋白的进化树

Fig. 2 Phylogenetic relationship of 164 odorant binding proteins (OBPs) from *Corythucha ciliata* and other hemipteran species. OBPs 来源物种 Origin species of OBPs: 悬铃木方翅网蝽 *Corythucha ciliata* (*CcilOBP*) (红色字体 Marked in red); 绿盲蝽 *Apolysgus lucorum* (*AlucOBP*); 苜蓿盲蝽 *Adelphocoris lineolatus* (*AlinOBP*); 中黑盲蝽 *Adelphocoris suturalis* (*AsutOBP*); 美国牧草盲蝽 *Lygus lineolaris* (*LlinOBP*); 棉蚜 *Aphis gossypii* (*AgosOBP*); 葡萄根瘤蚜 *Daktulosphaira vitifoliae* (*DvitOBP*); 褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (*NlugOBP*); 白背飞虱 *Sogatella furcifera* (*SfurOBP*). 蓝色区域为 Plus-C 气味结合蛋白。使用 MEGA7.0 构建 NJ 系统发育树, Bootstrap 值设为 1 000. The region in blue color is Plus-C OBPs. The NJ phylogenetic tree was constructed using MEGA 7.0, and the bootstrap value was set to 1 000.

着更多保守的 Cys 残基的方向进化,有助于形成更多的二硫键来维持蛋白的空间结构,有利于蛋白与气味分子特异性识别 (Vieira and Rozas, 2011)。对半翅目昆虫中感受性信息素和寄主挥发物的分子机制研究较少,哪些基因执行 PBP 或 GOBP 的功能还不清楚,因此,对悬铃木方翅网蝽 Classic OBPs 不能进行更进一步的分类。通过对半翅目昆虫已知 OBPs 的统计,Plus-C OBPs 所占总 OBPs 比例较低 (37.50% 以下)。并且 Plus-C OBPs 通常在嗅觉组织中表达量较低 (Zhou *et al.*, 2004; Pelletier and Leal, 2011)。然而,悬铃木方翅网蝽两个 Plus-C OBPs 基因 (*CcilOBP25/26*) 在触角中的表达丰度较高,分别排在第 4 和第 6 位 (表 4),该现象也在其他昆虫中出现,如致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus* 的 Plus-C *CquiOBP + C1* 基因在触角中表达量排第 4 (Pelletier and Leal, 2011),冈比亚按蚊 *Anopheles*

gambiae 中 Plus-C *Agam48* 在雌虫触角中第 2 高表达 (Biessmann *et al.*, 2005)。推测悬铃木方翅网蝽两个 Plus-C OBPs 基因 (*CcilOBP25/26*) 可能具有嗅觉功能,还需进一步试验验证。

悬铃木方翅网蝽与 8 种半翅目昆虫共 164 个 OBPs 的系统发育分析结果表明,大部分 *CcilOBP* 基因聚类分布较为集中,如 *CcilOBP11/19/16/23*, *CcilOBP12/13/15/22* 聚在一支,说明悬铃木方翅网蝽 OBPs 基因分化较小,这些差异和独有的基因可能与该虫生境中特有的化学物质有关,并与其寄主专一特性紧密相关。还有少部分 *CcilOBP* 基因与其他半翅目昆虫 OBPs 基因是直系同源基因,如 *CcilOBP6* 与 *AlucOBP5* 和 *LlinOBP30* 聚合在一支。有研究表明,有直系同源的物种的 OBP 基因如果表达谱相似,其功能也相似。比如,棉铃虫和烟青虫中的 *OBP10* 不仅在触角中表达,在雄蛾精液中也

表 4 qPCR 检测的悬铃木方翅网蝽 OBP 基因在雌雄成虫触角中的相对表达量

Table 4 Relative expression levels of OBP genes in male and female antennae of *Corythucha ciliata* adults detected by qPCR

基因 Gene	FPKM 值 FPKM value		P 值 P-value	相对表达量 Relative expression level		P 值 P-value
	♀	♂		♀	♂	
<i>CcilOBP1</i>	0.28 ± 0.15	0.16 ± 0.09	0.516	5.69 ± 0.90	4.21 ± 1.75	0.493
<i>CcilOBP2</i>	3.55 ± 1.14	3.44 ± 0.59	0.934	33.85 ± 6.38	30.34 ± 4.73	0.681
<i>CcilOBP3</i>	98.64 ± 45.25	133.62 ± 16.62	0.508	324.89 ± 60.75	379.06 ± 146.57	0.750
<i>CcilOBP4</i>	2.54 ± 0.45	2.72 ± 0.55	0.819	14.18 ± 1.59	14.88 ± 0.89	0.720
<i>CcilOBP5</i>	3.45 ± 0.93	69.34 ± 10.30	0.003	4.13 ± 1.67	20.99 ± 1.16	0.001
<i>CcilOBP6</i>	705.49 ± 206.82	1 238.29 ± 234.67	0.164	262.53 ± 6.70	520.48 ± 89.08	0.045
<i>CcilOBP7</i>	0.25 ± 0.15	0.45 ± 0.14	0.374	6.25 ± 2.00	7.32 ± 2.24	0.741
<i>CcilOBP8</i>	0.21 ± 0.04	1.06 ± 0.39	0.095	16.65 ± 2.63	23.00 ± 2.82	0.175
<i>CcilOBP9</i>	0.17 ± 0.10	0.55 ± 0.20	0.164	21.53 ± 2.77	103.13 ± 5.06	0.000
<i>CcilOBP10</i>	253.58 ± 81.37	1 346.23 ± 206.76	0.008	2.64 ± 0.33	177.88 ± 4.79	0.000
<i>CcilOBP11</i>	0.24 ± 0.13	0.31 ± 0.17	0.758	9.21 ± 1.49	14.74 ± 2.44	0.125
<i>CcilOBP12</i>	1.05 ± 0.08	0.99 ± 0.16	0.758	30.18 ± 2.78	22.14 ± 1.90	0.075
<i>CcilOBP13</i>	4.58 ± 0.81	3.77 ± 0.34	0.408	32.25 ± 2.25	28.72 ± 5.80	0.600
<i>CcilOBP14</i>	0.77 ± 0.59	0.38 ± 0.02	0.539	59.54 ± 3.63	20.43 ± 2.85	0.001
<i>CcilOBP15</i>	5.04 ± 0.74	4.71 ± 0.70	0.760	6.80 ± 1.43	6.17 ± 2.10	0.817
<i>CcilOBP16</i>	0.47 ± 0.19	0.22 ± 0.07	0.274	25.33 ± 2.03	9.89 ± 1.10	0.002
<i>CcilOBP17</i>	2.79 ± 0.38	5.07 ± 1.16	0.136	0.87 ± 0.09	25.67 ± 2.04	0.048
<i>CcilOBP18</i>	61.78 ± 9.74	275.00 ± 82.98	0.063	97.97 ± 2.93	314.99 ± 71.43	0.039
<i>CcilOBP19</i>	1.11 ± 0.05	0.96 ± 0.37	0.708	10.73 ± 2.45	10.10 ± 2.40	0.863
<i>CcilOBP20</i>	2.05 ± 0.51	1.96 ± 0.39	0.891	22.06 ± 2.72	20.49 ± 2.70	0.703
<i>CcilOBP21</i>	86.23 ± 21.48	593.57 ± 106.43	0.009	19.18 ± 3.31	95.00 ± 2.52	0.000
<i>CcilOBP22</i>	11.08 ± 2.01	11.58 ± 0.88	0.830	3.53 ± 0.22	4.32 ± 0.88	0.436
<i>CcilOBP23</i>	0.31 ± 0.18	0.12 ± 0.12	0.417	5.88 ± 2.51	8.73 ± 1.53	0.387
<i>CcilOBP24</i>	1.51 ± 0.45	73.23 ± 18.18	0.017	6.69 ± 1.44	15.11 ± 1.88	0.024
<i>CcilOBP25</i>	216.18 ± 65.56	481.96 ± 117.81	0.120	72.74 ± 3.25	192.22 ± 3.86	0.000
<i>CcilOBP26</i>	156.44 ± 51.86	151.42 ± 20.39	0.933	1 430.23 ± 110.63	1 324.80 ± 87.71	0.497

雌雄间基因表达量差异显著 (LSD 检验, $P < 0.05$) 用粗体字显示。Significant difference in gene expression levels between male and female (LSD test, $P < 0.05$) is shown in bold.

有表达, 具有相同的功能, 参与运输产卵驱避剂 1-dodecene (Sun *et al.*, 2012)。在本研究中, 与其他半翅目昆虫 OBP 基因有直系同源的 *CcilOBPs*, 如果有着相似的表达谱, 这些同源基因是否有相同或者相似的功能需要进一步研究。

通常基因表达谱可以揭示基因潜在的生物学功能 (Hull *et al.*, 2014)。FPKM 值的高低可以反映出基因在 cDNA 文库中的丰富程度。在半翅目中, 大多数 OBP 基因在触角中高表达, 如有 21 个美国牧草盲蝽 OBP 基因, 12 个苜蓿盲蝽 OBP 基因, 5 个棉蚜 OBP 基因, 6 个褐飞虱 OBP 基因和 3 个白背飞虱 OBP 基因都在触角中高表达 (Gu *et al.*, 2011, 2013; He and He, 2014; Hull *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2014)。在悬铃木方翅网蝽成虫触角 OBP 基因中, 有 7 个 *CcilOBPs* 的 FPKM 值 > 100 (表 4), 这些

在触角中高表达的 OBP 基因可能与嗅觉有关。此外, *CcilOBPs* 基因表达量呈现出一定的性别偏好, 大多数 *CcilOBPs* 基因在雄性触角中高表达, 其中有 9 个 OBP 基因 (*CcilOBP5/6/9/10/17/18/21/24/25*) 在雄触角中显著高表达, 这可能与感受识别性信息素和求偶行为有关。虽然大部分 OBP 存在昆虫触角中, 被称作触角特定蛋白 (antennal-specific protein, LAP) (Dickens *et al.*, 1995), 但是, 越来越多的 OBP 被发现在其他组织中也有表达, 如头部、口器、足、翅、胸部和腹部等 (Gu *et al.*, 2011; He and He, 2014; Hull *et al.*, 2014), 在不同的器官组织中可能发挥着不同的功能。因此, 对悬铃木方翅网蝽 OBP 基因在其他组织中的表达和功能需要进一步研究。

悬铃木方翅网蝽成虫通过嗅觉识别寄主挥发物

和性信息素等信号来进行寄主定位和交配等行为, 气味结合蛋白发挥着重要作用。高表达于雄虫触角的 OBP 基因对性信息素的识别很重要, 而在雌虫触角中高表达的 OBP 基因可能参与识别寄主植物释放的挥发性物质, 对寄主定位和选择产卵场所发挥作用。因此, 深入研究悬铃木方翅网蝽嗅觉识别的分子机制, 将为高效、特异性的昆虫行为调节剂研发提供理论基础。此外, 通过悬铃木方翅网蝽转录组分析, 能够发现更多具备特异性、高效性、安全性的昆虫防治靶标, 为无公害防治园林害虫提供更多科学依据。

参考文献 (References)

- Arezki I, Valérie A, Olivier C, Rémy D, 2015. Dermatitis caused by blood-sucking *Corythucha ciliata*. *JAMA Dermatol.*, 151(8): 909 – 910.
- Benton R, Vannice KS, Gomezdiáz C, Vosshall LB, 2009. Variant ionotropic glutamate receptors as chemosensory receptors in *Drosophila*. *Cell*, 136(1): 149 – 162.
- Biessmann H, Nguyen QK, Le D, Walter MF, 2005. Microarray-based survey of a subset of putative olfactory genes in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Insect Mol. Biol.*, 14(6): 575 – 589.
- Breer H, Raming K, Krieger J, 1994. Signal recognition and transduction in olfactory neurons. *Biochem. Biophys. Acta*, 1224(2): 277 – 287.
- Cui HH, Gu SH, Zhu XQ, Wei Y, Liu HW, Khalid HD, Guo YY, Zhang YJ, 2016. Odorant-binding and chemosensory proteins identified in the antennal transcriptome of *Adelphocoris suturalis* Jakovlev. *Comp. Biochem. Physiol. D*, 24: 139 – 145.
- Dickens JC, Callahan FE, Wergin WP, Erbe EF, 1995. Olfaction in a hemimetabolous insect: antennal-specific protein in adult *Lygus lineolaris* (Heteroptera: Miridae). *J. Insect Physiol.*, 41(10): 857 – 867.
- Field LM, Pickett JA, Wadhams LJ, 2000. Molecular studies in insect olfaction. *Insect Mol. Biol.*, 9(6): 545 – 551.
- Fu NN, Liu J, Qu C, Wang R, Xu YH, Luo C, Li FQ, 2017. Analysis of *Corythucha ciliata* CeilCSP1 structure and prediction of its binding to host-plant volatiles. *Sci. Silv. Sin.*, 53(10): 109 – 117. [付宁宁, 刘佳, 渠成, 王然, 许奕华, 罗晨, 李峰奇, 2017. 悬铃木方翅网蝽化学感受蛋白 CeilCSP1 的结构及其结合寄主挥发物的预测分析. *林业科学*, 53(10): 109 – 117]
- Gu SH, Wang SP, Zhang XY, Wu KM, Guo YY, Zhou JJ, Zhang YJ, 2011. Identification and tissue distribution of odorant binding protein genes in the lucerne plant bug *Adelphocoris lineolatus* (Goeze). *Insect Biochem. Mol.*, 41(4): 254 – 263.
- Gu SH, Wu KM, Guo YY, Field LM, Pickett JA, Zhang YJ, Zhou JJ, 2013. Identification and expression profiling of odorant binding proteins and chemosensory proteins between two wingless morphs and a winged morph of the cotton aphid *Aphis gossypii* Glover. *PLoS ONE*, 8(9): e73524.
- Halbert SE, Meekef JR, 1998. The sycamore lace bug, *Corythucha ciliata* (Say) (Hemiptera: Tingidae). Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry. *Entomol. Circ.*, 387: 1 – 2.
- He M, He P, 2014. Molecular characterization, expression profiling, and binding properties of odorant binding protein genes in the whitebacked planthopper, *Sogatella furcifera*. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 174(1): 1 – 8.
- Hua JF, Zhang S, Cui JJ, Wang DJ, Wang CY, Luo JY, Lv LM, 2012. Identification and binding characterization of three odorant binding proteins and one chemosensory protein from *Apolygus lucorum* (Meyer-Dur). *J. Chem. Ecol.*, 38(9): 1163 – 1170.
- Hull JJ, Perera OP, Snodgrass GL, 2014. Cloning and expression profiling of odorant-binding proteins in the tarnished plant bug, *Lygus lineolaris*. *Insect Mol. Biol.*, 23(1): 78 – 97.
- Ji P, Gu SH, Liu JT, Zhu XQ, Guo YY, Zhou JJ, Zhang YJ, 2013. Identification and expression profile analysis of odorant-binding protein genes in *Apolygus lucorum* (Hemiptera: Miridae). *Appl. Entomol. Zool.*, 48(3): 301 – 311.
- Ju RT, Li B, 2010. Sycamore lace bug, *Corythucha ciliata*, an invasive alien pest rapidly spreading in urban China. *Biodivers. Sci.*, 18(6): 638 – 646. [鞠瑞亭, 李博, 2010. 悬铃木方翅网蝽: 一种正在迅速扩张的城市外来入侵害虫. *生物多样性*, 18(6): 638 – 646]
- Kaissling KE, 2009. Olfactory perireceptor and receptor events in moths: a kinetic model revised. *J. Comp. Physiol. A*, 195(10): 895 – 922.
- Leal WS, 2013. Odorant reception in insects; roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes. *Annu. Rev. Entomol.*, 58(1): 373 – 391.
- Li B, Dewey CN, 2011. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinform.*, 12(1): 93 – 99.
- Li CR, Xia WS, Wang FL, 2007. First records of *Corythucha ciliata* (Say) in China (Hemiptera, Tingidae). *Acta Zootaxon. Sin.*, 32(4): 944 – 946. [李传仁, 夏文胜, 王福莲, 2007. 悬铃木方翅网蝽在中国的首次发现. *动物分类学报*, 32(4): 944 – 946]
- Li FQ, Wang R, Qu C, Fu NN, Luo C, Xu YH, 2016. Sequencing and characterization of the invasive sycamore lace bug *Corythucha ciliata* (Hemiptera: Tingidae) transcriptome. *PLoS ONE*, 11(8): e160609.
- Li GW, Du J, Li YP, Wu JX, 2015. Identification of putative olfactory genes from the oriental fruit moth *Grapholita molesta* via an antennal transcriptome analysis. *PLoS ONE*, 10(11): e0142193.
- Liu NY, Zhu JY, Ji M, Yang B, Ze SZ, 2017. Chemosensory genes from *Pachypeltis micranthus*, a natural enemy of the climbing hemp vine. *J. Asia-Pac. Entomol.*, 20(2): 655 – 664.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, 25(4): 402 – 408.
- Maceljski M, 1986. Current status of *Corythucha ciliata* in Europe. *EPPO Bull.*, 16(4): 621 – 624.
- Oliveira DS, Brito NF, Nogueira FCS, Moreira MF, Leal WS, Soares

- MR, Melo ACA, 2017. Proteomic analysis of the kissing bug *Rhodnius prolixus* antenna. *J. Insect Physiol.*, 100: 108–118.
- Öszi B, Ladányi M, Hufnagel L, 2006. Population dynamics of the sycamore lace bug (*Corythucha ciliata*, Say, Heteroptera: Tingidae) in Hungary. *Appl. Ecol. Env. Res.*, 4(1): 135–150.
- Paula DP, Togawa RC, Costa MMC, Grynberg P, Martins NF, Andow DA, 2016. Identification and expression profile of odorant-binding proteins in *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae). *Insect Mol. Biol.*, 25(5): 580–594.
- Pelletier J, Leal WS, 2011. Characterization of olfactory genes in the antennae of the Southern house mosquito, *Culex quinquefasciatus*. *J. Insect Physiol.*, 57(7): 915–929.
- Pelosi P, Iovinella I, Felicioli A, Dani FR, 2014. Soluble proteins of chemical communication: an overview across arthropods. *Front. Physiol.*, 5: 320.
- Picker C, Griffiths MD, 2015. Sycamore tree lace bug (*Corythucha ciliata* Say) (Hemiptera: Tingidae) reaches Africa. *Afr. Entomol.*, 23(1): 247–249.
- Prado CE, 1990. Presencia en Chile de *Corythucha ciliata* (Say) (Hemiptera: Heteroptera: Tingidae). *Rev. Chilena Ent.*, 18: 53–55.
- Song YQ, Dong JF, Chen QX, Hu ZJ, Sun HZ, 2017. Analysis of the antennal transcriptome and chemoreception-related genes of the bean bug, *Riptortus pedestris* (Hemiptera: Alydidae). *Acta Entomol. Sin.*, 60(10): 1120–1128. [宋月芹, 董钧锋, 陈庆霄, 胡振杰, 孙会忠, 2017. 点蜂缘蝽触角转录组及化学感受相关基因的分析. *昆虫学报*, 60(10): 1120–1128]
- Sun YL, Huang LQ, Pelosi P, Wang CZ, 2012. Expression in antennae and reproductive organs suggests a dual role of an odorant-binding protein in two sibling *Helicoverpa* species. *PLoS ONE*, 7(1): e30040.
- Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, Van BMJ, Salzberg SL, Wold BJ, Pachter L, 2010. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat. Biotechnol.*, 28(5): 511–515.
- Tsitsanou KE, Drakou CE, Thireou T, Gruber AV, Kythreoti K, Azem A, Fessas D, Eliopoulos E, Iatrou K, Zographos SE, 2013. The crystal and solution studies of the “Plus-C” odorant binding protein 48 from *Anopheles gambiae*: control of binding specificity through 3D domain-swapping. *J. Biol. Chem.*, 288(46): 33427–33438.
- Vieira FG, Rozas J, 2011. Comparative genomics of the odorant-binding and chemosensory protein gene families across the Arthropoda: origin and evolutionary history of the chemosensory system. *Genome Biol. Evol.*, 3(1): 476–490.
- Vogt RG, Rybczynski R, Lerner MR, 1991. Molecular cloning and sequencing of general odorant-binding proteins GOBP1 and GOBP2 from the tobacco hawk moth *Manduca sexta*: comparisons with other insect OBPs and their signal peptides. *J. Neurosci.*, 11(10): 2972–2984.
- Wang FL, Wan FH, Li CR, Liu WX, 2008. Advance in biological characteristics and control techniques of the new invasive sycamore lace bug (*Corythucha ciliata*). *Sci. Silv. Sin.*, 44(6): 137–142. [王福莲, 万方浩, 李传仁, 刘万学, 2008. 新入侵物种悬铃木方翅网蝽的生物学特性与防治技术研究进展. *林业科学*, 44(6): 137–142]
- Wang GY, Zhu MF, Jiang YD, Zhou WW, Liu S, Heong KL, Cheng JA, Zhu ZR, 2017. Identification of candidate odorant-binding protein and chemosensory protein genes in *Cyrtorhinus lividipennis* (Hemiptera: Miridae), a key predator of the rice planthoppers in Asia. *Environ. Entomol.*, 46(3): 654–662.
- 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(1): 632.
- Yang WY, Tang XT, Ju RT, Zhang Y, Du YZ, 2017. The population genetic structure of *Corythucha ciliata* (Say) (Hemiptera: Tingidae) provides insights into its distribution and invasiveness. *Sci. Rep.*, 7(1): 635.
- Yu GY, Wang H, Zhu XQ, Feng SK, Lu XL, 2014. The first discovery of the sycamore lace bug *Corythucha ciliata* in Beijing, China. *Plant Prot.*, 40(5): 200–202. [虞国跃, 王合, 朱晓清, 冯术快, 卢绪利, 2014. 北京发现悬铃木方翅网蝽为害. *植物保护*, 40(5): 200–202]
- Yuan HB, Ding YX, Gu SH, Sun L, Zhu XQ, Liu HW, Dhiloo KH, Zhang YJ, Guo YY, 2015. Molecular characterization and expression profiling of odorant-binding proteins in *Apolygus lucorum*. *PLoS ONE*, 10(10): e0140562.
- Zhang YN, Zhu XY, Zhang Q, Yin CY, Dong ZP, Zou LH, Deng DG, Sun L, Li XM, 2016. *De novo* assembly and characterization of antennal transcriptome reveal chemosensory system in *Nysius ericae*. *J. Asia-Pac. Entomol.*, 19(4): 1077–1087.
- Zhao JJ, Zhang Y, Fan DS, Feng JN, 2017. Identification and expression profiling of odorant-binding proteins and chemosensory proteins of *Daktulosphaira vitifoliae* (Hemiptera: Phylloxeridae). *J. Econ. Entomol.*, 110(4): 1813–1820.
- Zhou JJ, 2010. Odorant-binding proteins in insects. *Vitam. Horm.*, 83: 241–272.
- Zhou JJ, Huang W, Zhang GA, Pickett JA, Field LM, 2004. “Plus-C” odorant-binding protein genes in two *Drosophila* species and the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Gene*, 327(1): 117–129.
- Zhou JJ, Vieira FG, He XL, Smadia C, Liu R, Rozas J, Field LM, 2010. Genome annotation and comparative analysis of the odorant-binding proteins and chemosensory proteins in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Insect Mol. Biol.*, 19(Suppl. 2): 113–122.
- Zhou SS, Sun Z, Ma WH, Wang MQ, 2014. *De novo* analysis of the *Nilaparvata lugens* (Stål) antenna transcriptome and expression patterns of olfactory genes. *Comp. Biochem. Physiol. D*, 9(1): 31–39.
- 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.