

DOI:10.12171/j.1000-1522.20210184

舞毒蛾 *LdOR2* 基因克隆及对 CO₂ 胁迫下的行为反应

王建国¹ 王建军² 曹传旺^{1,3} 孙丽丽¹

(1. 东北林业大学林学院, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 辽宁省林业科学研究院(辽宁省森林保护重点实验室), 辽宁 沈阳 110032;
3. 东北林业大学森林生态系统可持续经营教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要:【目的】本文克隆了舞毒蛾的气味受体基因 *LdOR2*, 并阐明该基因在舞毒蛾各发育期和组织中的表达特征及其对 CO₂ 浓度胁迫下的行为响应, 为进一步研究气候变化下舞毒蛾的嗅觉反应机制提供理论依据。【方法】通过转录组文库筛选克隆出 *LdOR2* 基因, 利用生物信息学分析其基因特性, 通过实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)技术检测 *LdOR2* 基因在不同发育阶段和组织以及不同 CO₂ 浓度(397、550 和 750 μL/L)下的表达水平, 并利用 RNA 干扰(RNAi)技术研究不同 CO₂ 浓度下 *LdOR2* 基因沉默后舞毒蛾的行为学反应。【结果】舞毒蛾 *LdOR2* 基因开放阅读框(ORF)为 1 203 bp, 编码 400 个氨基酸, 蛋白分子量为 45.76 kDa, 理论等电点为 8.22; 进化树分析结果表明, 舞毒蛾 *LdOR2* 与黏虫 *MsepOR24* 和双委夜蛾 *AdisOR21* 亲缘关系较近, 并聚为一类; RT-qPCR 结果显示, *LdOR2* 在舞毒蛾各发育阶段均有表达, 在雌蛹中表达量最高, 雄成虫中表达量最低; 在雌、雄成虫不同组织中, 雌、雄触角中表达量显著高于其它组织($P < 0.05$), 但雌、雄触角间的表达量差异不明显。高 CO₂ 浓度下 *LdOR2* 基因表达量降低, 其中, 550 μL/L 和 750 μL/L 条件下雌虫触角中其表达量与对照组相比分别下降 21% 和 29%($P < 0.05$), 雄虫触角中其表达量与对照组相比分别下降了 43% 和 7%($P < 0.05$)。 *LdOR2* 基因沉默后, 舞毒蛾雌、雄成虫对丁香酚和顺-3-己烯-1-醇的趋向性减弱, 而在高浓度 CO₂ 处理条件下, 舞毒蛾沉默体对 7 种挥发物的反应率均有所下降。【结论】舞毒蛾 *LdOR2* 在其气味识别过程中发挥重要作用, CO₂ 浓度变化通过调节舞毒蛾 *LdOR2* 基因的表达进而影响其对气味的敏感性。

关键词: 舞毒蛾; *LdOR2*; 克隆表达; CO₂ 浓度; 气味受体; RNA 干扰; 行为反应

中图分类号: S763.3 文献标志码: A 文章编号: 1000-1522(2021)09-0101-10

引文格式: 王建国, 王建军, 曹传旺, 等. 舞毒蛾 *LdOR2* 基因克隆及对 CO₂ 胁迫下的行为反应 [J]. 北京林业大学学报, 2021, 43(9): 101-110. Wang Jianguo, Wang Jianjun, Cao Chuanwang, et al. Cloning of *LdOR2* gene in *Lymantria dispar* and its behavioral response to CO₂ stress [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2021, 43(9): 101-110.

Cloning of *LdOR2* gene in *Lymantria dispar* and its behavioral response to CO₂ stress

Wang Jianguo¹ Wang Jianjun² Cao Chuanwang^{1,3} Sun Lili¹

(1. School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China;

2. Liaoning Academy of Forest Science (Key Laboratory of Forest Protection of Liaoning Province),
Shenyang 110032, Liaoning, China;

3. Key Laboratory of Sustainable Forest Ecosystem Management of Ministry of Education, Northeast
Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China)

Abstract: [Objective] In this study, we cloned the odorant receptor gene (*LdOR2*) and determined the expression levels of this gene in developmental stages and different tissues of the *Lymantria dispar* and its behavioral response to CO₂ stress. The results will provide a theoretical basis for clarifying the olfactory response mechanism of the *L. dispar* under climate change. [Method] The *LdOR2* gene was cloned through

收稿日期: 2021-05-14 修回日期: 2021-06-07

基金项目: “十三五”国家重点研发计划(2018YFC1200400)。

第一作者: 王建国。主要研究方向: 昆虫生理生化与分子毒理学。Email: 1977756072@qq.com 地址: 150040 黑龙江省哈尔滨市香坊区和兴路 26 号东北林业大学林学院。

责任作者: 孙丽丽, 副教授。主要研究方向: 昆虫生理生化与分子毒理学。Email: sunlilifufu@126.com 地址: 同上。

本刊网址: <http://j.bjfu.edu.cn>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

transcriptome library screening, and its characteristics were analyzed by bioinformatics. The expression levels of *LdOR2* gene in different developmental stages and tissues as well as in different CO₂ concentrations (397, 550 and 750 μL/L) were determined by real-time fluorescence quantitative PCR technology. In addition, RNA interference (RNAi) technology was used to study the behavioral responses of *L. dispar* adults silenced by *LdOR2* at different CO₂ concentrations. [Result] The open reading frame (ORF) of *LdOR2* gene in *L. dispar* was 1 203 bp, encoding 400 amino acids. The molecular mass of the *LdOR2* protein was 45.76 kDa and the theoretical isoelectric point was 8.22. The phylogenetic tree showed that the *LdOR2* in *L. dispar* was closely related to *MsepOR24* *Mythimna separata* and *AdisOR21* in *Athetis dissimilis*, and clustered into one group. RT-qPCR results showed that *LdOR2* was expressed at all developmental stages of the *L. dispar*, with the highest expression level in female pupae and the lowest expression levels in male adults. In different tissues of female and male adults, the expression levels in antennae were significantly higher than those in other tissues ($P < 0.05$), but showed no difference between the antennae of female and male. The expression of *LdOR2* gene decreased under high CO₂ concentration. Compared with the control group, the expression of female antennae under 550 μL/L and 750 μL/L conditions decreased by 21% and 29% ($P < 0.05$), respectively, and the expression levels of antennae of male *L. dispar* adults decreased by 43% and 7% ($P < 0.05$). After *LdOR2* gene silencing, the tendency of female and male *L. dispar* adults to eugenol and *cis*-3-hexene-1-ol was weakened, while the response rates of the *L. dispar* silencers to seven volatiles decreased under high CO₂ concentration. [Conclusion] *LdOR2* plays an important role in the odor recognition of *L. dispar*. The sensitivity of *L. dispar* to odor was affected by the expression levels of *LdOR2* gene regulated by the changes of CO₂ concentration.

Key words: *Lymantria dispar*; *LdOR2*; cloning and expression; CO₂ concentration; odorant receptor; RNA interference; behavioral response

全球气候变暖已经引起世界范围内的关注, 据 IPCC 报道, CO₂ 浓度在 2005 年间达到 397 μL/L, 并预测在 21 世纪中叶将达到约 550 μL/L, 21 世纪末将达到约 800 μL/L^[1]。大气 CO₂ 浓度的不断升高会直接或间接影响森林生态系统, 同时昆虫对 CO₂ 的浓度变化也极其敏感^[2]。昆虫的嗅觉识别过程需要多种蛋白的共同参与, 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)、离子受体(inotropic receptors, IRs)、感觉神经元膜蛋白(sensory neuron membrane proteins, SNMPs)和气味降解酶(odor degrading enzymes, ODEs)^[3]。昆虫的气味受体能够识别气味分子, 并能将小分子化学信号转变为电信号^[4]。在昆虫对外界气味识别的过程中, 气味受体对气味分子的专一性识别, 使其成为嗅觉系统的关键^[5]。气味受体分为两类: 一种是非典型受体(odorant receptor co-receptor, Orco), 在物种之间高度保守; 另一种是传统气味受体(conventional odorant receptors, ORx), 在物种间高度分化^[6]。继首次在黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)中成功克隆出第一个气味受体 OR 基因后^[7], 目前已经在不同种类的昆虫中鉴定出了大量的 OR 基因, 例如: 冈比亚按蚊(*Anopheles gambiae*)中鉴定到 79 个 ORs 基因^[8],

家蚕(*Bombyx mori*)中有 64 个 ORs 基因^[9]。

舞毒蛾(*Lymantria dispar*)是一种世界性林业食叶害虫, 能够危害多种寄主植物^[10]。嗅觉系统在昆虫与外界化学信息交流的过程中起到了关键的作用, 因此, 对舞毒蛾嗅觉系统的深入研究是防治其危害的一个突破点。在气候变暖的前提下研究 CO₂ 浓度升高对昆虫嗅觉系统的响应, 更具有现实意义。目前舞毒蛾嗅觉相关基因的研究主要集中在 OBPs、CSPs 等基因的克隆及对这些基因的表达分析^[11], 而对于普通气味受体(ORs)的研究比较少。前期我们在舞毒蛾转录组文库中筛选获得 4 条 OR 基因(OR1~OR4), 并测定了 CO₂ 胁迫对 4 个 OR 基因表达的影响, 结果发现 *LdOR2* 基因随 CO₂ 浓度(397、550 和 750 μL/L)的升高, 转录水平显著抑制下调(未发表)。本文在此基础上克隆获得 *LdOR2* 基因, 进行基因序列分析及表达分析。通过 RNA 干扰(RNAi)技术探索不同 CO₂ 浓度对舞毒蛾 *LdOR2* 基因表达的影响, 为探讨高浓度 CO₂ 下舞毒蛾种群适应性提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫与处理

舞毒蛾卵和人工饲料购于中国林业科学研究院

森林生态环境与保护研究所, 卵在 10% 甲醛溶液中浸泡 1 h, 用清水反复冲洗干净后放入光周期 14L:10D、温度(25 ± 1)℃、湿度(70 ± 5)% 的 CO₂ 人工气候培养箱中饲养。CO₂ 浓度分别设置为 550 和 750 μL/L, 对照组为正常大气 CO₂ 浓度(397 μL/L)。

1.2 *LdOR2* 基因克隆与分析

采用 RNeasy Mini 动物组织总 RNA 提取试剂盒, 提取各龄期总 RNA, 由深圳华大基因科技有限公司进行转录组文库构建及测序。获得的 Unigenes 进行 Blastx 和 Blastn 分析, 根据功能注释结果选择具有完整 ORF 的 *OR* 基因, 设计引物用于 RT-qPCR 验证, 测序验证获得 *LdOR2* 基因序列。利用表 1 中软件及程序对 *LdOR2* 进行生物信息学分析。

1.3 实时荧光定量 RT-qPCR

提取舞毒蛾各发育阶段(卵、幼虫、雄蛹、雌蛹、雄成虫、雌成虫)以及雌、雄成虫各组织(头、触角、胸、腹、足)RNA。用 DNaseI(Promega)去除总 RNA 中的 DNA, 测定其质量浓度, 取 0.5 μg RNA 用于 cDNA 合成, 按照 PimeScript™ RT reagent Kit(Takara)合成 cDNA。反应条件: 42 °C 60 min, 85 °C 5 s, 16 °C 10 min。将 cDNA 稀释 10 倍备用。内参基因(*Actin*、*TUB* 和 *EF1α*)和 *LdOR2* 基因的引物序列见表 2。反

应体系为: 2 × SYBR premix Ex Taq 酶 10 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, 稀释后的 cDNA 2 μL, 去离子水补足至 20 μL。反应条件: 94 °C 30 s; 94 °C 12 s, 58 °C 45 s, 72 °C 40 s, 81 °C 1 s, 循环数为 45, 每个样品重复 3 次, 用 2^{-ΔΔCt} 方法进行基因相对表达水平分析^[12]。

1.4 RNA 干扰

根据已获得的 *LdOR2* 基因序列, 设计引物, 引物序列见表 2, PCR 扩增目的基因片段。参照 MEGAscript RNAi Kit 试剂盒(Ambion)说明合成 dsRNA, 用于进行 *LdOR2* 基因沉默。电泳检测 dsRNA 完整性, 将 dsRNA 稀释至 1 000 ng/μL, 冻存于 -80 °C 待用。

不同 CO₂ 浓度处理组(550 和 750 μL/L)和对照组(397 μL/L)舞毒蛾卵期饲养至蛹期, 分别选取同一天化蛹的大小一致的舞毒蛾蛹, 微量注射 1.0 μg dsRNA 至蛹的腹面, 饲养至羽化。注射雌、雄蛹各 40 头, 以 dsRed 为对照, 每个处理重复 3 次。取注射后舞毒蛾触角进行总 RNA 提取, 反转录成 cDNA, 用来检测 RNAi 后基因的沉默效率。

1.5 不同 CO₂ 浓度下干扰后的行为学反应

通过 Y 型嗅觉仪来测定舞毒蛾成虫对 7 种寄主

表 1 舞毒蛾 *LdOR2* 基因特性分析生物信息学软件

Tab. 1 Bioinformatics software for gene characteristics analysis of *LdOR2* in *Lymantria dispar*

项目 Item	软件 Software
开放读码框 Open reading frame	ORF finder http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf.html
分子量及理论等电点 Molecular mass and theoretical isoelectric point	ProtParam http://au.expasy.org/tools/protparam.html
信号肽序列检测 Signal peptide sequence detection	SignalP4.1 Server http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP
保守区预测 Conservative prediction	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi
同源性分析 Homology analysis	Blast http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
多序列比对 Multiple sequence alignment	Clustalx (1.83)
系统发育树构建 Phylogenetic tree construction	MEGA (5.1)

表 2 本文所用引物序列

Tab. 2 Primer sequences used in this study

基因 Gene	正向引物序列(5'—3') Forward primer sequence (5'—3')	反向引物序列(5'—3') Reverse primer sequence (5'—3')	序列片段大小 Sequence fragment length/bp	引物用途 Primer usage
dsOR2	TAATACGACTCACTATAGGGGAG GCGATGATCGAAACTTGC	TAATACGACTCACTATAGGGGCG GACACAATCATAGTCACCA	534	dsRNA 合成
dsRed	TAATACGACTCACTATAGGG GAGAACGTCATCACCGAGTT	TAATACGACTCACTATAGGG GATGGTGTAGTCCTCGTTGT	658	dsRNA synthesis
<i>LdOR2</i>	GAGTTTCGCCGTCAGTCACA	CACGCGCATGAACCGTAAAC	201	实时荧光定量 Real time fluorescent quantitation
<i>Actin</i>	AGAAGCACTTGCGGTGGACAAT	ACCTGTACGCCAACACTGTGCAT	252	
<i>TUB</i>	AATGCAAGAAAGCCTTGCCT	ATGAAGGAGGTCGACGAGCAA	235	
<i>EF1α</i>	TTTGCCTTCCTTGCCTCAACA	TGTAAGCAGCTGATCGTGGGT	223	

注: dsOR2 是 *LdOR2* 基因的双链 RNA; dsRed 是对照基因的双链 RNA。Notes: dsOR2 is double-stranded RNA of the *LdOR2*; dsRed is double-stranded RNA of the control gene.

植物杨树(*Populus spp.*)体内主要挥发物的行为反应^[13-18]。试验中测试的化合物见表3,浓度为 $10^2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ (依据课题组前期舞毒蛾成虫电生理和Y型管试验筛选出的7种化合物最佳反应浓度,数据未发表),对照为液体石蜡。Y型嗅觉仪主臂长度为30 cm,而两侧臂长度为20 cm,玻璃管的内直径为7 cm。两侧臂分别连接样品瓶、加湿瓶及活性炭管,用微量移液器取 $10 \mu\text{L}$ 样品滴于滤纸条上,将其放入其一样品瓶中,取滴有相同体积石蜡的滤纸条放入另一样品瓶内。打开大气采样仪持续进气30 s后释放舞毒蛾成虫,计时3 min,当试虫在某一侧臂超过5 cm,并持续在该侧臂停留超过1 min,则记为该试虫对位于

表3 试验中所使用的气味源

Tab. 3 List of odors used in the experiments

化合物名称 Compound name	CAS登录号 CAS registry No.	纯度 Purity/%
丁香酚 Eugenol	97-53-0	99.0
水杨醛 Salicylaldehyde	90-02-8	99.0
苯甲醛 Benzaldehyde	100-52-7	98.0
反式石竹烯 <i>trans</i> -caryophyllene	87-44-5	80.0
邻苯二甲酸二异丁酯 Dibutyl phthalate	84-66-2	99.0
顺-3-己烯-1-醇 <i>cis</i> -3-hexen-1-ol	928-96-1	98.0
α -蒎烯 α -pinene	80-56-8	98.0

该侧臂的气味源做出了选择。若该试虫在接入的3 min内不作出选择,则记为该试虫无反应,并结束试验。每一气味源测试3组,每组测试30头。每组测试5头后,调换两侧臂位置,每完成一组的测试后需要用丙酮和蒸馏水将管内壁冲洗干净,在烘箱中烘干备用。

1.6 数据统计和分析

采用Excel2007计算表达量数据,运用SPSS17.0(SPSS Inc, USA)统计软件进行ANOVA分析,使用OriginPro8.5软件进行数据统计和绘图。

2 结果与分析

2.1 *LdOR2* 基因克隆和进化树分析

通过舞毒蛾转录组数据的分析和RT-qPCR验证获得*LdOR2*基因开放阅读框序列,*LdOR2*基因ORF长为1 203 bp,编码400个氨基酸。蛋白分子量为45.76 kDa,理论等电点为8.22,为碱性蛋白,跨膜结构分析结果显示*LdOR2*蛋白具有6个跨膜螺旋结构,BLASTP对*LdOR2*蛋白保守区预测结果表明,该蛋白属于昆虫气味受体家族的7tm-6跨膜受体结构。

通过BLASTP多序列比对,选择与舞毒蛾OR序列相似程度高的14种昆虫的23个OR序列进行进化树分析(图1)。进化树分析结果表明:*LdOR2*与黏虫(*Mythimna separata*)QNS36221.1、浅灰色夜

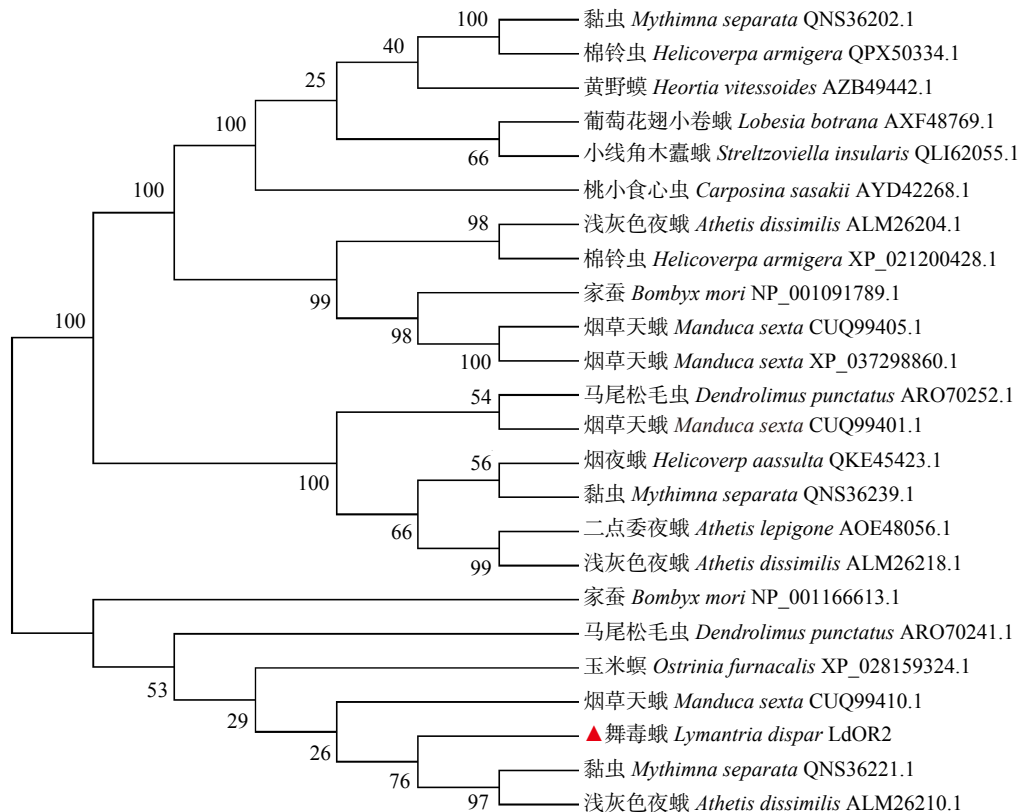


图1 14种昆虫OR蛋白系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic analysis of OR proteins from 14 insects

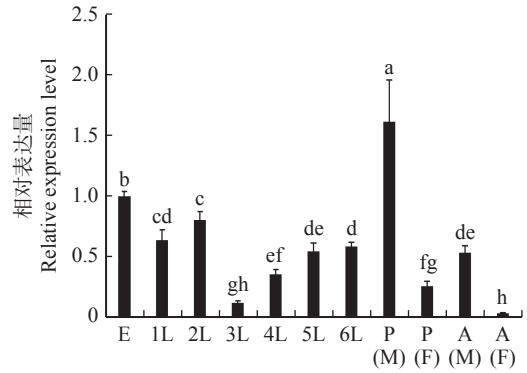
蛾 (*Athetis dissimilis*) ALM26210.1 亲缘关系较近并聚为一类。其中 *LdOR2* 与黏虫 QNS36221.1 同源性最高, 为 72.10%。

2.2 *LdOR2* 基因发育和组织特异性

LdOR2 在舞毒蛾各发育阶段均有表达(图 2)。以卵期基因表达量为对照, *LdOR2* 基因在舞毒蛾雌蛹期的表达量最高, 为对照组的 1.61 倍, 其余龄期均低于对照组; 雄成虫表达量最低, 仅为对照组的 3.62%; 在不同组织表达模式中, 以头部的表达量为对照, *LdOR2* 在舞毒蛾成虫各组织中均有表达, 且均在触角中高表达。 *LdOR2* 基因在雌成虫触角中表达水平为头部的 29.76 倍(图 3A); 在雄成虫触角中 *LdOR2* 基因表达水平为头部的 1.50 倍(图 3B)。

2.3 CO₂ 浓度处理下舞毒蛾触角 *LdOR2* 表达

为了进一步明确 CO₂ 浓度变化对 *LdOR2* 基因表达水平的影响, 采用 RT-qPCR 技术分析 397 μL/L (大气浓度)、550 μL/L 和 750 μL/LCO₂ 浓度下舞毒蛾触角中 *LdOR2* 基因表达水平(图 4)。高 CO₂ 浓度下舞毒蛾雌虫触角中 *LdOR2* 表达量与对照组相比分别下降 21% 和 29%($P < 0.05$); 舞毒蛾雄虫触角

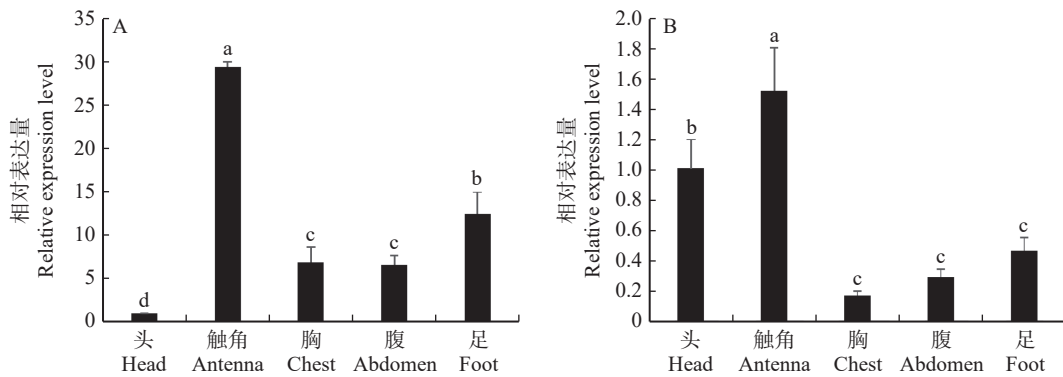


E 表示卵期; 1L~6L 表示 1~6 龄幼虫; P(F) 和 P(M) 分别表示雌蛹和雄蛹; A(F) 和 A(M) 分别表示雌成虫和雄成虫。不同小写字母表示发育的不同阶段基因表达差异显著性 ($P < 0.05$)。下同。E indicates egg stage; 1L - 6L indicate 1st to 6th instar larvae; P(F) and P(M) indicate female and male pupae; A(F) and A(M) indicate female and male adult. Different lowercase letters indicate significant differences in gene expression at different developmental stages of development ($P < 0.05$). The same below.

图 2 舞毒蛾发育阶段 *LdOR2* 基因表达量

Fig. 2 Expression level of *LdOR2* gene among different developmental stages in *L. dispar*

中 *LdOR2* 与对照组相比分别下降了 43% 和 7% ($P < 0.05$)。



A. 雌成虫; B. 雄成虫。A, female adult; B, male adult.

图 3 舞毒蛾不同成虫组织 *LdOR2* 基因表达量

Fig. 3 Expression level of *LdOR2* gene among different developmental tissues in *L. dispar* adults

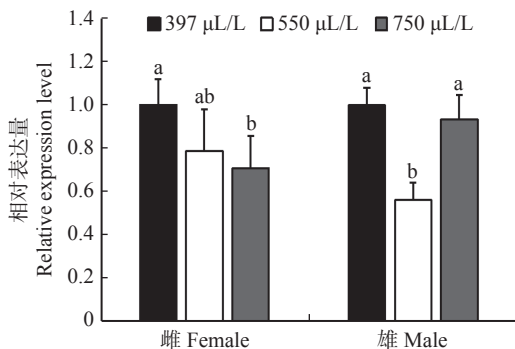
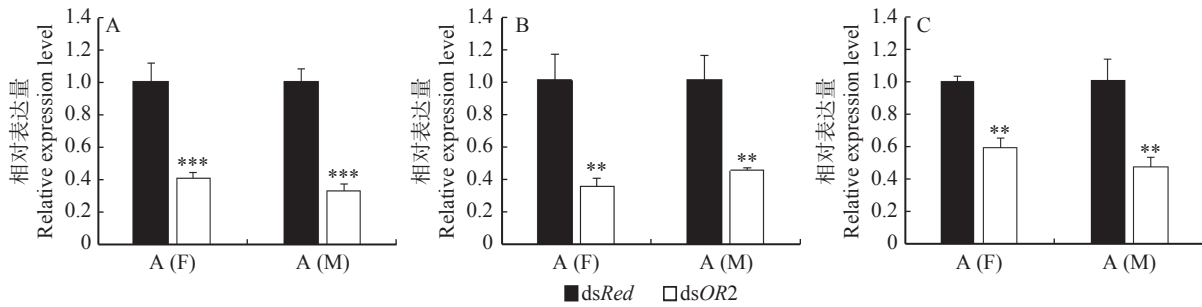


图 4 不同 CO₂ 浓度下舞毒蛾触角 *LdOR2* 基因表达量

Fig. 4 Expression levels of *LdOR2* in *L. dispar* antenna under different CO₂ concentrations

2.4 不同 CO₂ 浓度处理下舞毒蛾 *LdOR2* 沉默体行为学分析

注射 dsOR2 能显著抑制舞毒蛾 *LdOR2* 的表达(图 5), 在 397 μL/LCO₂ 浓度下, 注射 dsOR2 的处理组雌雄成虫 *LdOR2* 基因的相对表达量比对照组分别显著下降了 58.00% 和 67.00% ($P < 0.01$)。在 550 μL/L CO₂ 浓度处理下, 注射 dsOR2 的雌雄成虫中 *LdOR2* 基因的相对表达量与对照组相比, 分别显著下降了 63.00% 和 54.00% ($P < 0.01$)。在 750 μL/LCO₂ 浓度处理下, 注射 dsOR2 的雌雄成虫中 *LdOR2* 基因的相对表达量比对照组显著下降了 40.00% 和 52.00% ($P < 0.01$)。



A. 397 $\mu\text{L/LCO}_2$ 浓度下沉默效率; B. 550 $\mu\text{L/LCO}_2$ 浓度下沉默效率; C. 750 $\mu\text{L/LCO}_2$ 浓度下沉默效率; 星号表示处理组 *dsOR2* 和对照组 *dsRed* 基因表达量显著性差异 (** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; t 检验)。A, silencing efficiency at 397 $\mu\text{L/LCO}_2$ concentration; B, silencing efficiency at 550 $\mu\text{L/LCO}_2$ concentration; C, silencing efficiency at 750 $\mu\text{L/LCO}_2$ concentration; asterisk indicates significant difference in gene expression between treatment group and control group (** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; t -test).

图5 不同 CO₂ 浓度处理下舞毒蛾 *LdOR2* 基因沉默效率

Fig. 5 Silencing efficiency of *LdOR2* gene in *L. dispar* under different CO₂ concentrations

注射 *dsOR2* 的舞毒蛾雌虫与对照组相比,对丁香酚、顺-3-己烯-1-醇和 α -蒎烯的趋向性明显减弱;注射 *dsOR2* 的舞毒蛾雄虫与对照组相比,对丁香酚、石竹烯和顺-3-己烯-1-醇的趋向性减弱,注射 *dsOR2* 的舞毒蛾对其他挥发物与对照组无显著性差异。与对照 CO₂ 相比,550 和 750 $\mu\text{L/LCO}_2$ 下舞毒蛾雌雄成虫对 7 种挥发性物质的反应率明显降低(图 6 和图 7)。

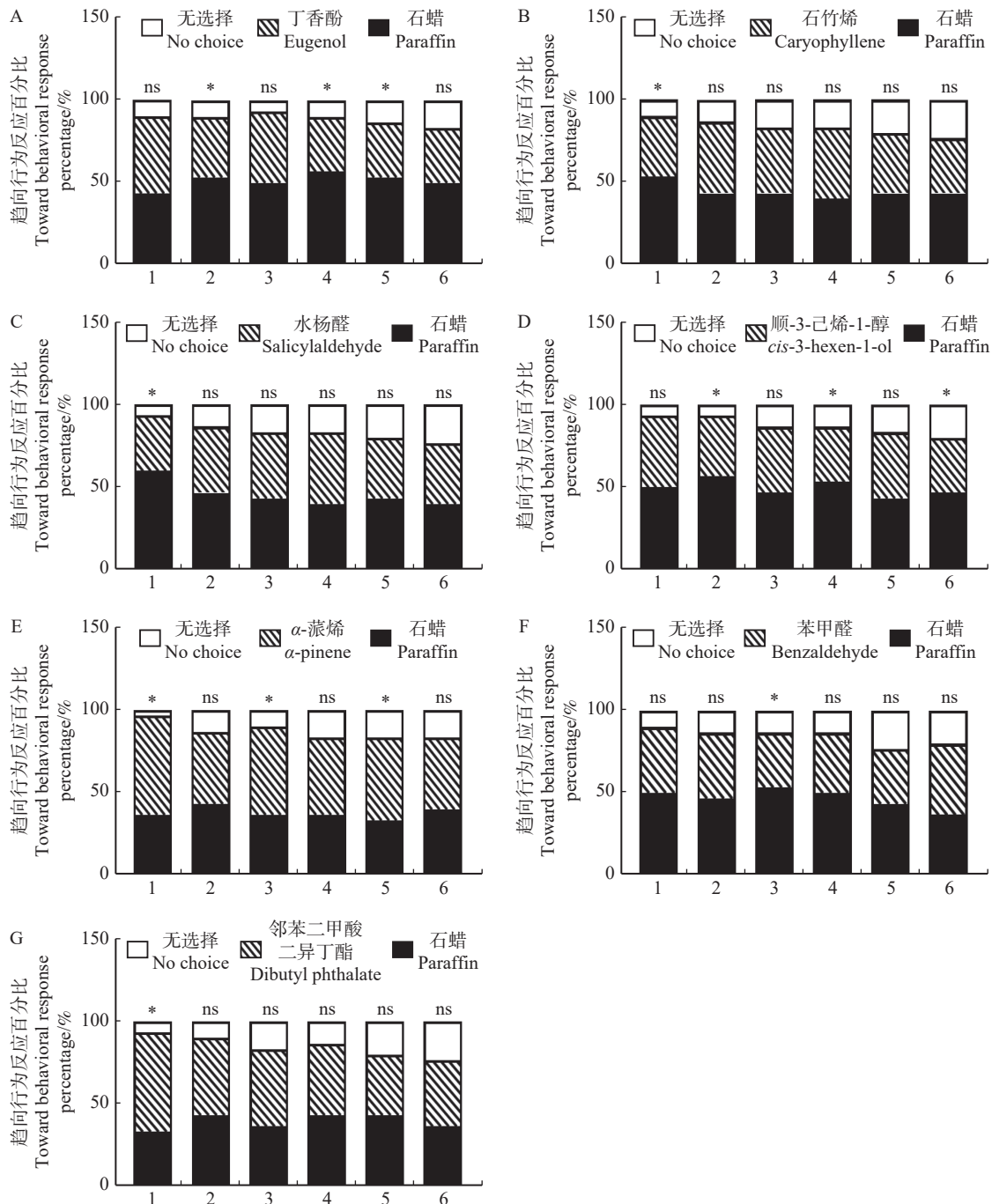
3 结论与讨论

在昆虫嗅觉系统信号识别过程中,气味受体(ORs)发挥着关键的作用^[19]。昆虫 ORs 与 G 蛋白偶联受体结构相似,但其 N 末端位于细胞膜内侧,C 末端位于细胞膜外。舞毒蛾 *LdOR2* 基因编码的氨基酸序列分析结果表明,其含有 6 个跨膜结构,该结果也与棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*) *HarmOR9*、小菜蛾 (*Plutella xylostella*) *PxylOR18* 和中华蜜蜂 (*Apis cerana cerana*) *AcerOR113* 的结果相似^[20-22],该结果也印证了 Bengtsson 等^[23]提出的昆虫气味受体可能有 4~8 个跨膜结构的推测。由此推断 *LdOR2* 符合昆虫气味受体的结构特征。进化树分析表明,舞毒蛾气味受体与夜蛾科 (Noctuidae) 昆虫气味受体氨基酸序列同源性高,*LdOR2* 与黏虫 QNS36221.1 和浅灰色夜蛾 ALM26210.1 亲缘关系近而聚为一类,其中与黏虫 QNS36221.1 同源性最高,为 72.10%。

气味受体的功能与其表达模式紧密相关^[24],不同气味受体的表达模式存在差异^[25]。本研究舞毒蛾 *LdOR2* 基因在雌、雄成虫触角中的表达量显著高于其他组织,这与甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*) 和棉铃虫^[26-27]的表达模式类似。气味受体在感觉神经元中发挥作用,而触角作为重要的传感器,其上分布着大量感觉神经元^[28]。因此, *LdOR2* 在触角中高表达符合

气味受体的表达模式,同时 *LdOR2* 在雌、雄触角中的表达无显著差异性,这表明其蛋白产物属于普通气味受体。除在触角中高表达外, *LdOR2* 在其他组织中均有表达,这与多音天蚕蛾 (*Antheraea polyphemus*) 和斜纹夜蛾 (*Spodoptera litura*) 表达模式类似^[29-30]。同时验证了普通气味受体具有较大差异的功能分化。此外,在舞毒蛾整个发育阶段均能检测出 *LdOR2* 的表达,推测 *LdOR2* 可能具有嗅觉感受以外的其他功能。

在全球气候变化的环境下,昆虫对 CO₂ 浓度变化的响应极其敏感。前人研究表明,在高 CO₂ 浓度下饲养的棉蚜 (*Aphis gossypii*) 对植物挥发物的响应更强,对棉苗的趋向性更强^[31]。高 CO₂ 浓度下埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*) 对刺激气味源的反应时间更长,影响其寻找寄主的行为活动^[32]。本文研究表明,高 CO₂ 浓度下舞毒蛾对 7 种挥发物的反应率均有所下降,说明 CO₂ 浓度变化能够影响舞毒蛾对气味的敏感性,影响舞毒蛾的嗅觉反应。CO₂ 浓度变化对昆虫生长发育等表型变化影响的研究较多,而昆虫对这种变化响应的分子机制研究较少。舞毒蛾触角中 *LdOR2* 基因的表达在高 CO₂ 浓度下被显著抑制,但其在雌、雄触角中受抑制的程度不同。利用 RNAi 技术结合电生理反应或行为学反应研究昆虫的嗅觉相关基因,能够准确有效地探究目的基因的功能。Liu 等^[33]通过注射 siRNA 抑制 *ORCO* 基因的表达,导致白纹伊蚊 (*Aedes albopictus*) 对寄主偏好性显著降低。Zhou 等^[34]通过注射 siRNA 干扰绿盲蝽 (*Apolygus lucorum*) *AlucORCO* 基因,绿盲蝽对丁酸-反-2-己烯酯的反应显著降低。沉默 *LdOR2* 的舞毒蛾雌、雄成虫对丁香酚和顺-3-己烯-1-醇的趋向性减弱,说明 *LdOR2* 基因可能是识别丁香酚和顺-3-己烯-1-醇气味分子的重要基因,而沉默 *LdOR2* 基因后,舞毒蛾雌虫对 α -蒎烯的趋向性明显减弱,但在雄成虫中未



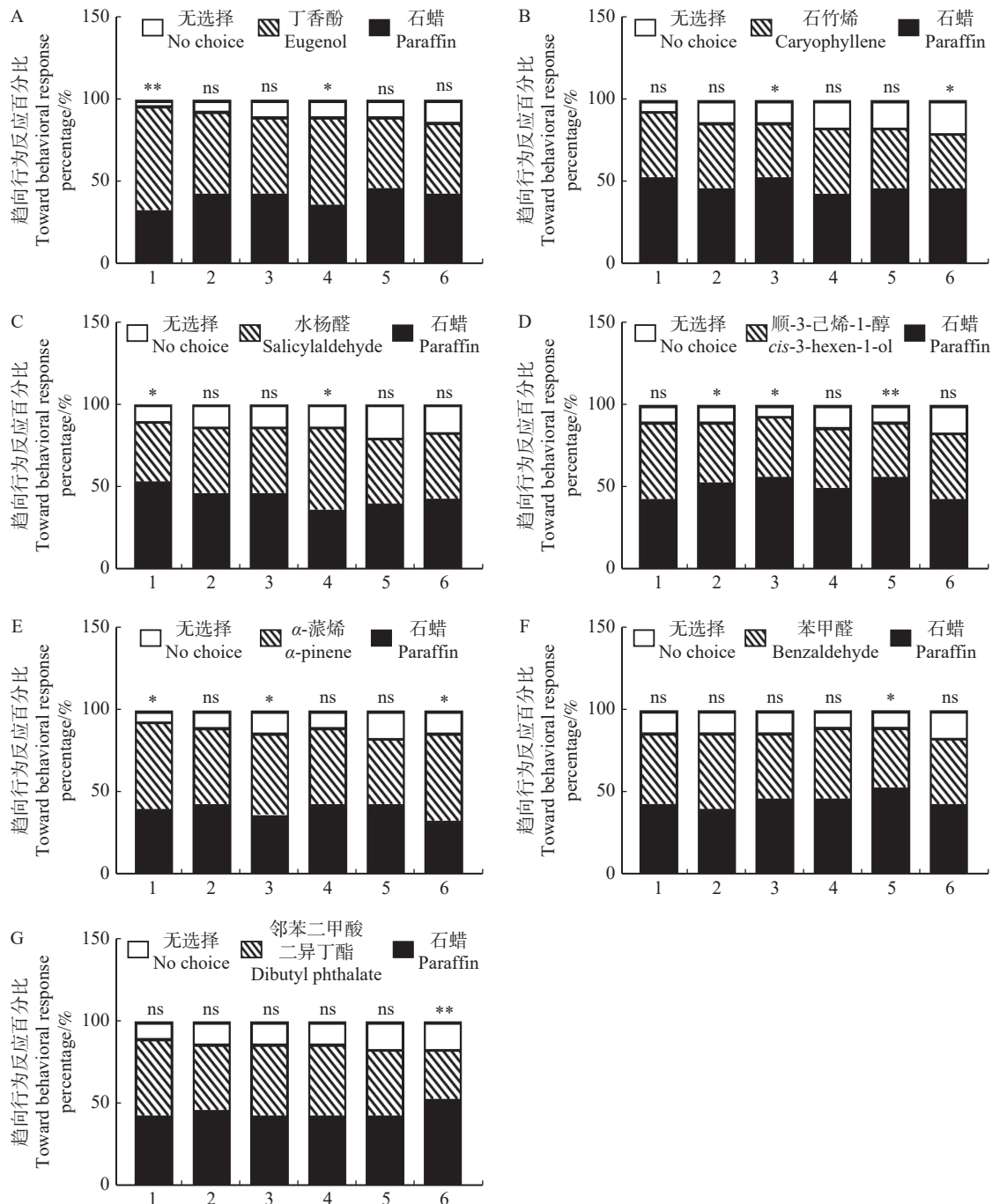
A. 丁香酚; B. 石竹烯; C. 水杨醛; D. 顺-3-己烯-1-醇; E. α -蒎烯; F. 苯甲醛; G. 邻苯二甲酸二异丁酯; 1. 397 $\mu\text{L}/\text{LCO}_2$ 浓度注射 *dsRed*; 2. 397 $\mu\text{L}/\text{LCO}_2$ 浓度注射 *dsOR2*; 3. 550 $\mu\text{L}/\text{LCO}_2$ 浓度注射 *dsRed*; 4. 550 $\mu\text{L}/\text{LCO}_2$ 浓度注射 *dsOR2*; 5. 750 $\mu\text{L}/\text{LCO}_2$ 浓度注射 *dsRed*; 6. 750 $\mu\text{L}/\text{LCO}_2$ 浓度注射 *dsOR2*; 星号表示对照组(石蜡)与处理组挥发物差异显著(* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; t 检验)。下同。A, eugenol; B, caryophyllene; C, salicylaldehyde; D, *cis*-3-hexen-1-ol; E, α -pinene; F, benzaldehyde; G, dibutyl phthalate; 1, injection *dsRed* at a concentration of 397 $\mu\text{L}/\text{LCO}_2$; 2, injection *dsOR2* at a concentration of 397 $\mu\text{L}/\text{LCO}_2$; 3, injection *dsRed* at a concentration of 550 $\mu\text{L}/\text{LCO}_2$; 4, injection *dsOR2* at a concentration of 550 $\mu\text{L}/\text{LCO}_2$; 5, injection *dsRed* at a concentration of 750 $\mu\text{L}/\text{LCO}_2$; 6, injection *dsOR2* at a concentration of 750 $\mu\text{L}/\text{LCO}_2$; asterisk indicates a significant difference in volatiles between the control group (paraffin) and the treatment group (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; t -test). The same below.

图 6 不同 CO₂ 浓度舞毒蛾 *LdOR2* 基因沉默体雌成虫行为反应

Fig. 6 Behavioral responses of female *L. dispar* adults with *LdOR2* gene silencing under different CO₂ concentrations

表现出明显规律, *LdOR2* 基因在识别 α -蒎烯是否具有性别差异还有待进一步研究。不同 CO₂ 浓度下 *LdOR2* 基因沉默对气味的趋性变化不同, 可能是由于高 CO₂ 浓度下 *LdOR2* 基因的表达量受到抑制,

LdOR2 基因表达水平下降可能影响嗅觉系统的传递效率, 进而影响舞毒蛾对气味分子的敏感性。本文为深入研究舞毒蛾的嗅觉机制及舞毒蛾在全球气候变化下的适应性提供了理论基础。

图7 不同CO₂浓度下舞毒蛾LdOR2基因沉默体雄虫行为学反应Fig. 7 Behavioral responses of male *L. dispar* adults with *LdOR2* gene silencing under different CO₂ concentrations

参 考 文 献

- [1] Raupach M R, Marland G, Ciais P, et al. Global and regional drivers of accelerating CO₂ emissions[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 1704(24): 10288–10293.
- [2] 戈峰, 陈法军. 大气CO₂浓度增加对昆虫的影响[J]. *生态学报*, 2006, 26(3): 935–944.
- Ge F, Chen F J. Impacts of elevated CO₂ on insects[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(3): 935–944.
- [3] Leal W S. Odorant reception in insects: roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes[J]. *Annual Review of Entomology*, 2013, 58(1): 373–391.
- [4] Leal W S, Chen A M, Ishida Y, et al. Kinetics and molecular properties of pheromone binding and release[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(15): 5386–5391.
- [5] Benton R. On the origin of smell: odorant receptors in insects[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2006, 63(14): 1579–1585.
- [6] Larsson M C, Domingos A I, Jones W D, et al. *Or83b* encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction[J]. *Neuron*, 2004, 43(5): 703–714.
- [7] Clyne P J, Warr C G, Freeman M R, et al. A novel family of

- divergent seven-transmembrane proteins: candidate odorant receptors in *Drosophila*[J]. *Neuron*, 1999, 22(2): 327–338.
- [8] Hill C A, Fox A N, Pitts R J, et al. G protein-coupled receptors in *Anopheles gambiae*[J]. *Science*, 2002, 298: 176–178.
- [9] Xia Q, Zhou Z, Lu C, et al. A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*)[J]. *Science*, 2004, 306: 1937–1940.
- [10] 周正朝, 上官周平. 红豆草与土壤氮含量对大气二氧化碳浓度升高的响应[J]. *应用生态学报*, 2006, 17(11): 2175–2178.
- Zhou Z C, Shangguan Z P. Responses of *Onobrychis viciaefolia* scop and soil nitrogen contents to elevated atmospheric CO₂ concentration[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2006, 17(11): 2175–2178.
- [11] 李欣悦. CO₂ 浓度变化对“舞毒蛾-LdNPV”系统影响[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2019.
- Li X Y. Effects of CO₂ concentration change on “*Lymantria dispar*-LdNPV” system[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2019.
- [12] Pfaffl M W, Horgan G W, Dempfle L. Relative expression software tool (Rest) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR[J]. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30(9): e36.
- [13] 李黄开媚. 三种植物挥发物组分鉴定及对粘虫的引诱作用研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2017.
- Li-Huang K M. Identification and study on three plant volatile compounds of attracting *Mythimna separata* (Walker)[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2017.
- [14] 凌娜, 唐进根, 殷玉生, 等. 分月扇舟蛾成虫对黑杨挥发物的触角电位反应[J]. *江苏农业学报*, 2014, 30(3): 514–519.
- Ling N, Tang J G, Yin Y S, et al. Electroantennogram response of *Clostera anastomosis* adult volatile of *Populus nigra*[J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2014, 30(3): 514–519.
- [15] 邢亚, 迟德富, 宇佳, 等. 杨干象对 12 种植物挥发物的电生理及行为反应[J]. *林业科学*, 2017, 53(6): 159–167.
- Xing Y, Chi D F, Yu J, et al. EAG and behavioral responses of *Cryptorrhynchus lapathi* (Coleoptera: Curculionidae) to twelve plant volatiles[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2017, 53(6): 159–167.
- [16] 王紫薇, 徐华潮, 张妮妮, 等. 光肩星天牛对寄主的选择及主要寄主挥发物的化学成分分析[J]. *浙江农林大学学报*, 2016, 33(4): 558–563.
- Wang Z W, Xu H C, Zhang W W, et al. *Anoplophora glabripennis* host-plant selection with main host-plant volatile chemical component analysis[J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2016, 33(4): 558–563.
- [17] 程立超, 迟德富. 10 种杨属植物树皮挥发油的化学成分分析[J]. *林业科学研究*, 2007, 20(2): 267–271.
- Cheng L C, Chi D F. Chemical constituents of essential oil from bark of ten species of *Populus*[J]. *Forest Research*, 2007, 20(2): 267–271.
- [18] 唐进根, 凌娜, 杨晓军. 固相微萃取—气相色谱/质谱测定杨树叶片的挥发性物质[J]. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 2010, 39(2): 150–153.
- Tang J G, Ling N, Yang X J. Analysis of volatile constituents from poplar leaves by gas chromatography/mass spectrometry with solid-phase microextraction[J]. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*, 2010, 39(2): 150–153.
- [19] de Bruyne M, Baker T C. Odor detection in insects: volatile codes[J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2008, 34(7): 882–897.
- [20] 刘宁灿, 张进, 王桂荣, 等. 棉铃虫普通气味受体基因 *HarmOR9* 和 *HarmOR29* 的克隆和组织表达分析[J]. *昆虫学报*, 2014, 57(5): 522–529.
- Liu N C, Zhang J, Wang G R, et al. Cloning and tissue expression analysis of general odorant receptor genes *HarmOR9* and *HarmOR29* in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae)[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2014, 57(5): 522–529.
- [21] 孔畅仪, 王桂荣, 刘杨, 等. 小菜蛾三个普通气味受体基因的克隆及表达谱[J]. *中国农业科学*, 2014, 47(9): 1735–1742.
- Kong C Y, Wang G R, Liu Y, et al. Gene cloning and expression analysis of three odorant receptors in the diamondback moth (*Plutella xylostella*)[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2014, 47(9): 1735–1742.
- [22] 杜亚丽, 王树杰, 赵慧婷, 等. 中华蜜蜂气味受体基因 *AcerOR113* 的克隆与时空表达分析[J]. *昆虫学报*, 2017, 60(5): 533–543.
- Du Y L, Wang S J, Zhao H T, et al. Cloning and temporal-spatial expression profiling of the odorant receptor gene *AcerOR113* in the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana*[J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2017, 60(5): 533–543.
- [23] Bengtsson J M, Trona F, Montagné N, et al. Putative chemosensory receptors of the codling moth, *Cydia pomonella*, identified by antennal transcriptome analysis[J/OL]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e31620 [2012–02–20]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031620>.
- [24] Legeai F, Malpel S, Montagné N, et al. An expressed sequence tag collection from the male antennae of the Noctuid moth *Spodoptera littoralis*: a resource for olfactory and pheromone detection research[J]. *BMC Genomics*, 2011, 12(1): 1–18.
- [25] 巩中军, 周文武, 祝增荣, 等. 昆虫嗅觉受体的研究进展[J]. *昆虫学报*, 2008, 51(7): 761–768.
- Gong Z J, Zhou W W, Zhu Z R, et al. Advances in the studies of insect olfactory receptors[J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2008, 51(7): 761–768.
- [26] 张帅, 张永军, 苏宏华, 等. 棉铃虫气味受体的克隆与组织特异性表达[J]. *昆虫学报*, 2009, 52(7): 728–735.
- Zhang S, Zhang Y J, Su H H, et al. Cloning and tissue-specific expression of olfactory receptors in *Helicoverpa armigera*

- (Hübner)[J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2009, 52(7): 728–735.
- [27] 张逸凡, 修伟明, 杨殿林, 等. 甜菜夜蛾非典型嗅觉受体基因 *OR2* 的组织特异性和时空表达[J]. *中国农学通报*, 2011, 27(7): 231–235.
- Zhang Y F, Xiu W M, Yang D L, et al. Tissue-specific expression and temporal and spatial expression of atypical odorant receptor gene *OR2* in *Spodoptera exigua* (Hübner)[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2011, 27(7): 231–235.
- [28] 王桂荣, 郭予元, 吴孔明. 棉铃虫触角感器的超微结构观察[J]. *中国农业科学*, 2002(12): 1479–1482, 1584–1586.
- Wang G R, Guo Y Y, Wu K M. Observation on the ultrastructures of antennal sensilla in *Helicoverpa armigera*[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2002(12): 1479–1482, 1584–1586.
- [29] Forstner M, Breer H, Krieger J. A receptor and binding protein interplay in the detection of a distinct pheromone component in the silkworm *Antheraea polyphemus*[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2009, 5(7): 745–757.
- [30] Zhang J, Liu C C, Yan S W, et al. An odorant receptor from the common cutworm (*Spodoptera litura*) exclusively tuned to the important plant volatile *cis*-3-Hexenyl acetate[J]. *Insect Molecular Biology*, 2013, 22(4): 424–432.
- [31] Dai Y, Wang M F, Jiang S L, et al. Host-selection behavior and physiological mechanisms of the cotton aphid, *Aphis gossypii*, in response to rising atmospheric carbon dioxide levels[J]. *Journal of Insect Physiology*, 2018, 109: 149–156.
- [32] Majeed S, Hill S R, Ignell R. Impact of elevated CO₂ background levels on the host-seeking behaviour of *Aedes aegypti*[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2014, 217(4): 598–604.
- [33] Liu H, Liu T, Xie L, et al. Functional analysis of orco and odorant receptors in odor recognition in *Aedes albopictus*[J]. *Parasites & Vectors*, 2016, 9(1): 1–10.
- [34] Zhou Y L, Zhu X Q, Gu S H, et al. Silencing in *Apolygus lucorum* of the olfactory coreceptor orco gene by RNA interference induces EAG response declining to two putative semiochemicals[J]. *Journal of Insect Physiology*, 2014, 60: 31–39.

(责任编辑 范娟 赵田芸
责任编辑 张真)