

莲草直胸跳甲短神经肽 F 受体基因 *sNPFR* 的克隆及表达分析

王 康, 赵雪莹, 霍 楠, 胡 军, 王苑馨, 杨 军, 贾 栋

(山西农业大学 植物保护学院, 山西 太谷 030801)

摘 要: 为明确莲草直胸跳甲 (*Agasicles hygrophila*) 短神经肽 F 受体 *AhsNPFR* 功能及其表达特点, 为探索莲草直胸跳甲生防作用奠定理论基础, 利用 PCR 技术克隆鉴定莲草直胸跳甲 *AhsNPFR* 基因并进行生物信息学分析, 通过实时荧光定量 PCR 技术分析其在莲草直胸跳甲不同发育时期和组织中的时空表达谱。结果表明, 克隆获得基因 *AhsNPFR* 全长 1 669 bp, 开放阅读框 1 257 bp, 编码 418 个氨基酸; 预测其蛋白质分子质量为 48.11 ku, 理论等电点为 8.21, *AhsNPFR* 具有 7 个典型保守跨膜结构域, 属于 GPCRs 家族, 系统进化树分析表明, 其与玉米根萤叶甲 *Diabrotica virgifera virgifera* *sNPFR* 亲缘关系最近。 *AhsNPFR* 基因在不同发育阶段均有表达, 在 1 龄幼虫中的表达量最高, 是卵中表达量的 9.06 倍; 在卵中表达量最低; 雌成虫的表达量显著高于雄成虫。 *AhsNPFR* 基因在不同组织中均有表达, 在 3 龄幼虫后肠中显著高表达, 是脂肪体表达量的 12.21 倍; 在雌雄成虫后肠显著高表达, 并在所有组织中均没有雌雄表达差异。

关键词: 莲草直胸跳甲; 短神经肽 F 受体基因 *sNPFR*; 基因克隆; 发育时期表达; 组织表达

中图分类号: S476.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-2481(2024)01-0137-08

Cloning and Expression Profiling of Short Neuropeptide F Receptor Gene *sNPFR* in *Agasicles hygrophila*

WANG Kang, ZHAO Xueying, HUO Nan, HU Jun, WANG Yuanxin, YANG Jun, JIA Dong

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

Abstract: To explore the function and expression characteristics of the short neuropeptide receptor *AhsNPFR* in *Agasicles hygrophila*, and to lay a theoretical foundation for exploring the biological control role of *Agasicles hygrophila*, in this study, the *AhsNPFR* gene was cloned using PCR technology and analyzed with bioinformatics software. The spatiotemporal expression profiles of *AhsNPFR* across different developmental stages and tissues were investigated by quantitative real-time PCR (qPCR). The results showed that the complete sequence of 1 669 bp was obtained, which was found to contain a 1 257 bp open reading frame (ORF), encoding 418 amino acids. The predicted molecular weight was 48.11 ku and the theoretical isoelectric point (pI) was 8.21. *AhsNPFR* had 7 typical conserved transmembrane domains and belonged to the GPCRs family. Phylogenetic tree analysis showed that *AhsNPFR* was closely related to *Diabrotica virgifera virgifera* *sNPFR*. *AhsNPFR* gene was expressed throughout the developmental stages tested with the highest expression levels at the first instar larva which was 9.06 times higher than those eggs, the stage with the lowest expression level. The expression level in female adult was significantly higher than that in male adult. The *AhsNPFR* gene was expressed in different tissues and was significantly highly expressed in the hindgut of the 3rd instar larvae, which was 12.21 times higher than those fat body. The *AhsNPFR* gene was significantly highly expressed in the hindgut of male and female adults, with no difference expression between the sexes across all tissues.

Key words: *Agasicles hygrophila*; short neuropeptide F receptor gene *sNPFR*; gene cloning; developmental stage expression; tissue expression

神经肽是一类重要的信号分子, 在昆虫的生长发育、繁殖和行为等多种生物学过程中发挥重要调

节作用^[1]。昆虫神经肽作为配体通过与同源的 G 蛋白偶联受体 (G protein-coupled receptors, GPCRs)

收稿日期: 2023-03-01

基金项目: 山西省自然科学基金项目 (20210302123386); 山西省高等学校科技创新项目 (2021L142); 国家重点研发计划项目 (2021YFD1400200); 山西省科技创新人才团队专项 (202304051001006)

作者简介: 王 康 (1995-), 男, 山西阳泉人, 在读硕士, 研究方向: 生物安全与生物防治。

通信作者: 贾 栋 (1980-), 男, 山西朔州人, 教授, 主要从事外来种生态适应与风险评估等研究工作。

相互作用介导其生物学功能^[2]。短神经肽 F(short neuropeptide F, sNPF)是最初通过神经肽 F(neuropeptide F, NPF)C 末端抗体在马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* 和沙漠蝗虫 *Schistocerca gregaria* 中鉴定得到的一类 NPF 短肽^[3-4],这些 NPF 短肽仅由 8~10 个氨基酸组成,而不是无脊椎动物 NPF 典型的 36~40 个氨基酸^[5],基于其羧基末端的 RLRF 酰胺序列类似于无脊椎动物的 NPF 的 RPRF 基序^[6],因此,命名为 sNPF。

与大多数神经肽信号系统相同,sNPF 也是通过激活其特异性短神经肽 F 受体(short neuropeptide F receptor, sNPFR),进而引发细胞信号传导机制发挥系列功能^[7]。sNPFR 首次在黑腹果蝇中发现^[8],随后在红火蚁 *Solenopsis invicta* 和冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 中相继克隆出来^[9-10]。sNPF 信号系统在昆虫的昼夜节律^[11]、生长发育^[12]、寄主定位^[13-14]、取食等生理过程中发挥重要作用,尤其在昆虫取食中的调控作用引起相关研究者的广泛关注。在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 中,*DmsNPF* 及其受体 *DmsNPFR* 的表达能促进取食量增加及体型增大,相反 RNA 干扰二者的功能后果蝇的取食量减少且体型变小^[15-16]。华山松大小蠹 *Dendroctonus armandi* 中敲除 *DasNPF* 及其受体 *DasNPFR* 后,幼虫和雌雄成虫的取食量均减少^[17]。与上述昆虫相反,在沙漠飞蝗 *S. gregaria* 中,*SgsNPF* 及其受体 *SgsNPFR* 的敲除反而会导致取食量增加^[18-19]。大量研究表明,昆虫头部和肠道是 sNPFR 的主要表达部位,但在其他组织部位如中枢神经系统(central nervous system, CNS)、触角、脂肪体、马氏管等也都有表达^[10,17,20],关于 sNPFR 的表达部位目前还没有明确结论。

莲草直胸跳甲 *Agasicles hygrophila* 是世界恶性杂草喜旱莲子草 *Alternanthera philoxeroides* 的专食性天敌昆虫^[21-23]。本研究拟基于神经肽 sNPF 信号系统与昆虫的寄主定位及取食密切相关的特性,克隆鉴定莲草直胸跳甲 sNPF 信号系统的 sNPFR 基因,检测其不同发育阶段及组织的表达模式,旨在为后续深入研究莲草直胸跳甲专一性定位寄主与取食的分子调控机制提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试莲草直胸跳甲采自华南农业大学,后饲养于山西农业大学生物安全与生物防治实验室养虫

室。饲养条件为:温度(25±1)℃,相对湿度为 85%±5%,光周期 14L:10D。幼虫饲养于玻璃培养皿(直径 15 cm,高 2.5 cm),成虫饲养于养虫罐(直径 12 cm,高 17 cm)。

喜旱莲子草采自浙江省玉环县,现种植于太谷区山西农业大学生物安全与生物防治基地。

1.2 试验方法

1.2.1 昆虫样品收集 基因克隆样品为莲草直胸跳甲不同发育阶段的混合样本。各发育阶段的取样分别为:1 日龄卵,1 日龄的 1、2、3 龄幼虫,1 日龄蛹和雌雄成虫。其中,3 龄幼虫组织的取样为:头、前肠、中肠、后肠、马氏管、脂肪体;雌雄成虫取样为:触角、头、前肠、中肠、后肠、马氏管、脂肪体。以上样本均 3 次生物学重复,液氮速冻,-80℃冰箱保存备用。

1.2.2 RNA 的提取与 cDNA 合成 总 RNA 使用 Trizol 试剂(TaKaRa,大连)提取,通过超微量蛋白核酸分析仪(BioDrop, Cambridge, UK)测定浓度,1%琼脂糖凝胶电泳检测质量。以 1 μg RNA 为模板,采用 HiScript® III 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper)试剂盒(Vazyme,南京)的步骤合成 cDNA 第 1 链,-20℃备用。

1.2.3 *AhsNPFR* 的克隆鉴定与序列分析 基于课题组的莲草直胸跳甲转录组数据^[24],利用 Primer 5.0 设计目的基因的扩增引物(表 1),以 1.2.2 合成 cDNA 为模板,利用 Phanta® Max Super-Fidelity DNA Polymerase 试剂盒(Vazyme,南京)进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为:2×Phanta Max Buffer 10 μL,引物 *AhsNPFR*-F/*AhsNPFR*-R 各 0.8 μL,1×cDNA 1 μL,Phanta MAX Super-Fidelity DNA polymerase 0.5 μL,dNTP Mix 0.4 μL,加 ddH₂O 至 20 μL。PCR 反应条件为:95℃预变性 3 min;95℃变性 15 s,48℃退火 15 s,72℃延伸 2 min,35 个循环;彻底延伸 5 min。PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测,通过 M5 Gel Extraction Kit(Mei5bio, Beijing, China)进行回收,连接于 pEASY®-Blunt3 Cloning Vector(Trans Gen Biotech,北京),转入 TOP10 感受态细胞(ANGYUBIO,上海),菌液送上海生工生物工程有限公司测序。

利用 NCBI ORF(Open Reading Frame)(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder>)预测 *AhsNPFR* 基因的开放阅读框, DNAMAN 进行多序列比对, ExPASy-ProtParam (<http://web.expasy.org/prot-param/>)预测等电点及蛋白质分子量大小, DeepTMHMM (<https://dtu.biolib.com/DeepTMHMM>)

预测跨膜结构域,InterPro(<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/>)预测保守结构域与蛋白家族。通过MEGA 7.0采用邻接法构建系统发育树,重复1 000次。

1.2.4 *AhsNPFR* 基因的表达模式分析 以1.2.2合成cDNA为qPCR模板,通过BeaconDesign 7.0设计*AhsNPFR* 特异性引物,以18S核糖体蛋白(*RPS18*)^[25]作为不同发育阶段和不同组织处理的内参基因进行实时荧光定量PCR(表1)。qPCR所

使用的仪器为ABI7500(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)。反应体系为:2×ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 10 μL,上下游引物各0.8 μL,10×cDNA 1 μL,加ddH₂O至20 μL。qPCR反应条件为:95℃预变性3 min;95℃变性10 s,55℃退火30 s,72℃延伸30 s,40个循环。不同发育阶段和各组织样品分别设置3次生物学重复和3次技术重复。

表1 基因克隆及qPCR引物信息
Tab.1 Primer information of gene cloning and qPCR

引物 Primer	引物序列(5'—3') Primer sequence(5'—3')	产物长度/bp Product size	用途 Purpose
<i>AhsNPFR</i> -F <i>AhsNPFR</i> -R	GGCAGTAAACCGAGACCTTTCGACCT TTCACCTACTATAAAACAACGTTGCT	1 669	基因克隆 Gene cloning
q <i>AhsNPFR</i> -F q <i>AhsNPFR</i> -R	ATATTATGGTGCCATCTGTTG GGTCTTCCTCAGTTATCAGT	81	qPCR
q <i>RPS18</i> -F q <i>RPS18</i> -R	ACAAAATCCCCGACTGGTTC ATGGGCACGGATCTTCTTCA	131	qPCR

1.3 数据分析

qPCR相对表达量数据采用2^{-ΔΔCt}^[26]法进行分析,使用SPSS 26.0软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA),Tukey's HSD进行多重比较差异分析,差异显著性标准为P<0.05。所得结果采用平均值±标准误表示,柱状图均由GraphPad Prism 8绘制。

2 结果与分析

2.1 *AhsNPFR*基因克隆鉴定

克隆获得了1个短神经肽受体基因,产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测,得到与预期长度一致的目的片段(图1),其开放阅读框ORF长1 257 bp,编码418个氨基酸(图2),命名为*AhsNPFR*(Gen-Bank登录号为OQ550102)。

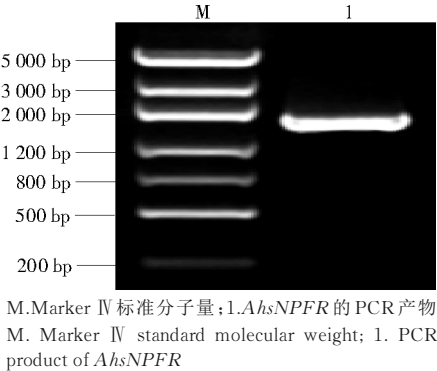
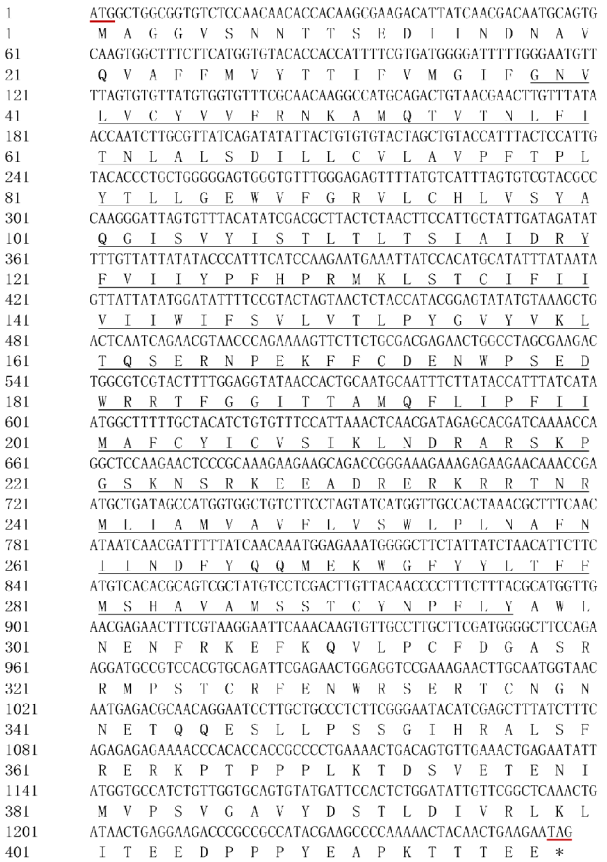


图1 莲草直胸跳甲*AhsNPFR*基因PCR电泳产物
Fig.1 Electrophoresis of PCR product of the *AhsNPFR* gene of *A. hygrophila*



红色下划线部分为起始密码子,红色下划线“*”部分为终止密码子;黑色下划线部分为7个保守跨膜结构域

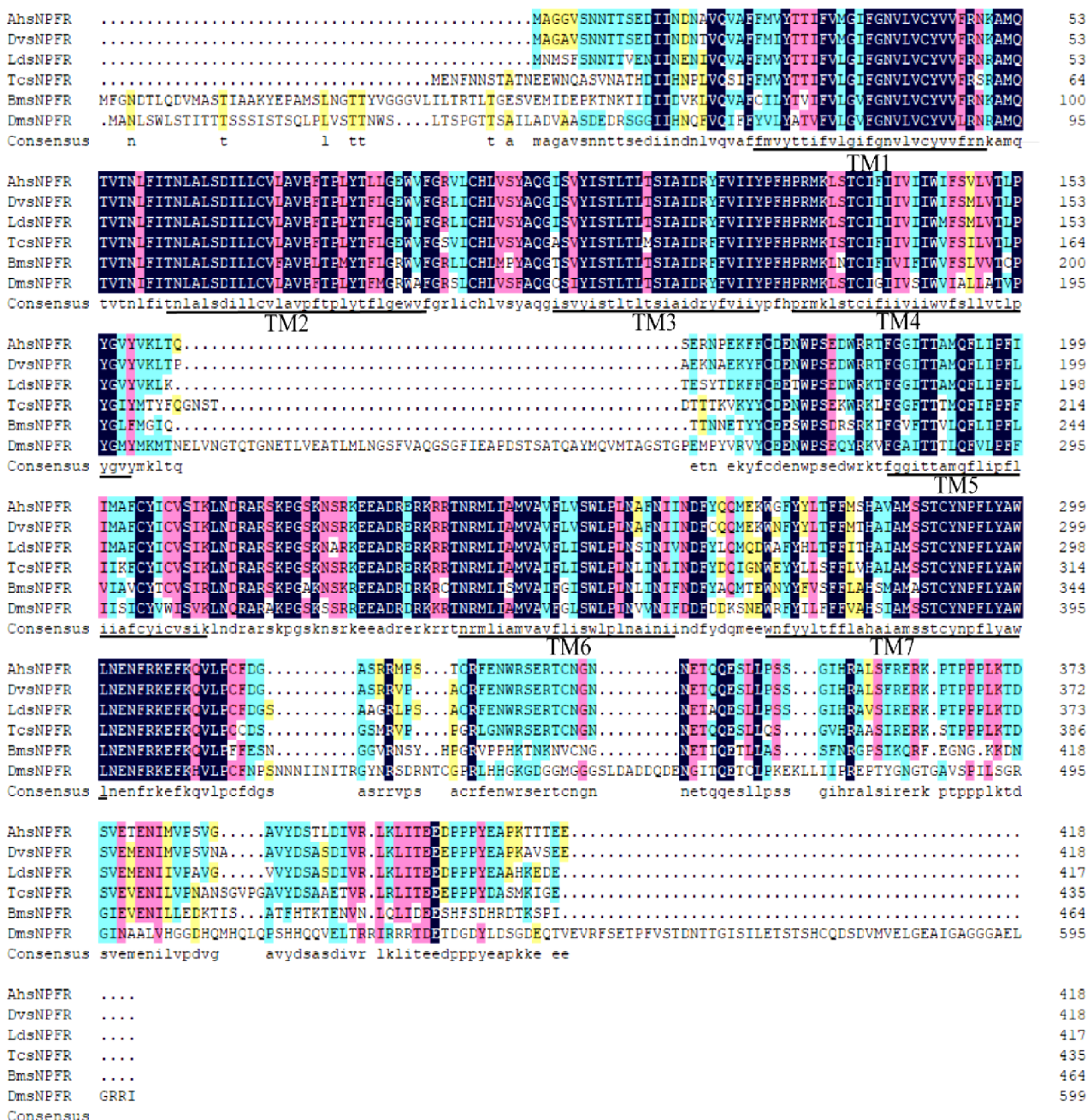
The red underlined sections were the start codon, the red underlined “*” sections were the stop codon; the black underlined part was 7 conserved transmembrane domains

图2 莲草直胸跳甲*AhsNPFR*基因的开放阅读框及其编码氨基酸序列
Fig.2 Open reading frame and its encoded amino acid sequence of *A. hygrophila AhsNPFR* gene

2.2 序列与系统发育分析

莲草直胸跳甲 AhsNPFR 蛋白质分子质量为 48.11 ku, 等电点(pI)为 8.21; 结构域预测显示, 在 38—297 位氨基酸残基之间具有 GPCRs 家族的保守结构域, 属于 GPCRs 家族; 多序列比对结果(图 3)显示, 莲草直胸跳甲 AhsNPFR 氨基酸序列与其他 5 种鞘翅目昆虫的 sNPFR 序列相似性最高,

为 72.15%~87.22%, 其中, 与玉米根萤叶甲 *Diabrotica virgifera virgifera* 相似性最高(87.22%), 与鳞翅目昆虫家蚕 *Bombyx mori* 相似性次之(52.34%), 与双翅目昆虫黑腹果蝇 *D. melanogaster* 相似性最低(38.83%)。根据与其他昆虫 sNPFR 共有的 7 个典型保守跨膜结构域, 克隆序列应该为 AhsNPFR 基因。



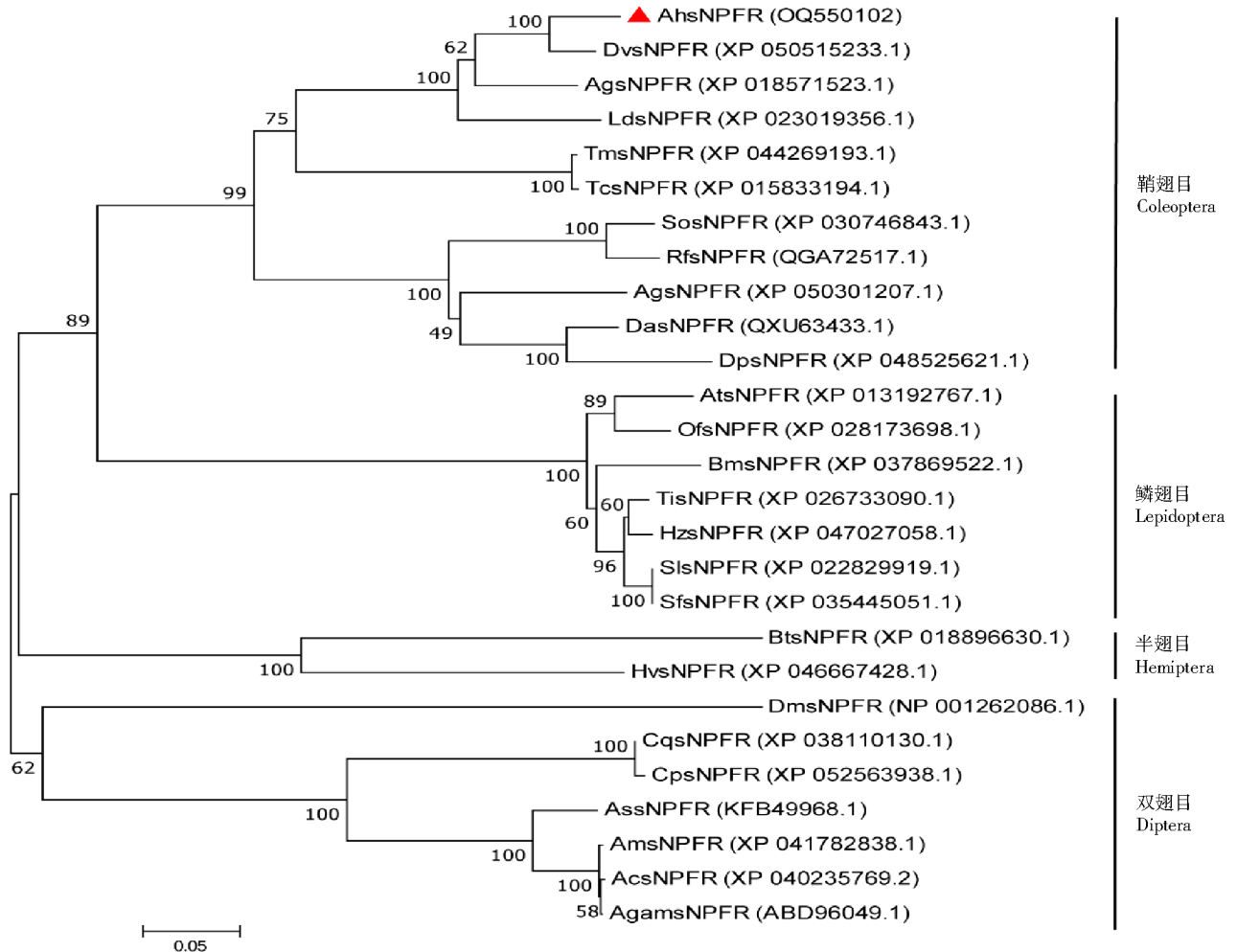
sNPFR 蛋白来源物种及 GenBank 登录号: 莲草直胸跳甲 AhsNPFR(OQ550102); 玉米根萤叶甲 DvsNPFR(XP_050515233.1); 马铃薯甲虫 Ld-sNPFR(XP_023019356.1); 赤拟谷盗 TcsNPFR(XP_015833194.1); 家蚕 BmsNPFR(XP_037869522.1); 黑腹果蝇 DmsNPFR(NP_001262086.1)

Origin species of sNPFR proteins and their accession numbers: *Agasicles hygrophila* AhsNPFR(OQ550102); *Diabrotica virgifera virgifera* DvsNPFR(XP_050515233.1); *Leptinotarsa decemlineata* LdsNPFR(XP_023019356.1); *Tribolium castaneum* TcsNPFR(XP_015833194.1); *Bombyx mori* BmsNPFR(XP_037869522.1); *Drosophila melanogaster* DmsNPFR(NP_001262086.1)

图 3 莲草直胸跳甲与其他昆虫 sNPFR 氨基酸序列比对
Fig.3 Amino acid sequence alignment of *A. hygrophila* and other insects sNPFR

将莲草直胸跳甲 *sNPFR* 氨基酸序列与鞘翅目、鳞翅目、双翅目和半翅目等其他 26 种昆虫进行多序列比对,构建系统发育树,结果如图 4 所示,莲草直胸跳甲 *AhsNPFR* 与其他鞘翅目昆虫聚为一

支;其中与玉米根萤叶甲 *DvsNPFR*、光肩星天牛 *AgsNPFR* 和马铃薯甲虫 *LdsNPFR* 亲缘关系较近;其他目昆虫也能分别聚类,符合分类学关系。



sNPFR 蛋白来源:莲草直胸跳甲(*AhsNPFR*);玉米根萤叶甲(*DvsNPFR*);光肩星天牛(*AgsNPFR*);马铃薯甲虫(*LdsNPFR*);黑拟谷盗(*TmsNPFR*);赤拟谷盗(*TcsNPFR*);米象(*SosNPFR*);红棕象甲(*RfsNPFR*);墨西哥棉铃象甲(*AgsNPFR*);华山松大小蠹(*DasNPFR*);中欧山松大小蠹(*DpsNPFR*);脐橙螟蛾(*AtsNPFR*);亚洲玉米螟(*OfsNPFR*);家蚕(*BmsNPFR*);粉纹夜蛾(*TnsNPFR*);棉铃虫(*HzsNPFR*);斜纹夜蛾(*SlsNPFR*);草地贪夜蛾(*SfsNPFR*);烟粉虱(*BtsNPFR*);草翅叶蝉(*HvsNPFR*);黑腹果蝇(*DmsNPFR*);致倦库蚊(*CgsNPFR*);淡色库蚊(*CpsNPFR*);中华按蚊(*AssNPFR*);姆鲁斯按蚊(*AmsNPFR*);科鲁兹按蚊(*AcsNPFR*);冈比亚按蚊(*AgmsNPFR*)

Origin species of *sNPFR* proteins: *Agasicles hygrophila*(*AhsNPFR*); *Diabrotica virgifera*(*DvsNPFR*); *Anoplophora glabripennis*(*AgsNPFR*); *Leptinotarsa decemlineata*(*LdsNPFR*); *Tribolium madens*(*TmsNPFR*); *Tribolium castaneum*(*TcsNPFR*); *Sitophilus oryzae*(*SosNPFR*); *Rhynchophorus ferrugineus*(*RfsNPFR*); *Anthonomus grandis*(*AgsNPFR*); *Dendroctonus armandi*(*DasNPFR*); *Dendroctonus ponderosae*(*DpsNPFR*); *Amyeloides transitella* (*AtsNPFR*); *Ostrinia furnacalis* (*OfsNPFR*); *Bombyx mori*(*BmsNPFR*); *Trichoplusia ni*(*TnsNPFR*); *Helicoverpa zea* (*HzsNPFR*); *Spodoptera litura*(*SlsNPFR*); *Spodoptera frugiperda*(*SfsNPFR*); *Bemisia tabaci* (*BtsNPFR*); *Homalodisca vitripennis*(*HvsNPFR*); *Drosophila melanogaster*(*DmsNPFR*); *Culex quinquefasciatus*(*CgsNPFR*); *Culex pipiens pallens*(*CpsNPFR*); *Anopheles sinensis*(*AssNPFR*); *Anopheles merus*(*AmsNPFR*); *Anopheles coluzzii*(*AcsNPFR*); *Anopheles gambiae*(*AgmsNPFR*)

图 4 莲草直胸跳甲与其他昆虫 *sNPFR* 序列的系统进化树
Fig.4 Phylogenetic tree of *sNPFR* sequences of *A. hygrophila* and other insects

2.3 *AhsNPFR* 基因在莲草直胸跳甲不同发育阶段的表达模式

通过 qPCR 分析了 *AhsNPFR* 基因在莲草直胸跳甲不同发育阶段内的表达水平。结果表明, *AhsNPFR* 基因在莲草直胸跳甲各发育阶段均有表达,其中幼虫期(1~3 龄幼虫)和成虫期(雌雄成虫)

的表达量均显著高于卵期和蛹期($P < 0.05$),1、3 龄幼虫表达量显著高于 2 龄幼虫,雌成虫表达量显著高于雄成虫($P < 0.05$)。 *AhsNPFR* 在 1~3 龄幼虫、蛹、雌、雄成虫的相对表达量分别是卵期 *AhsNPFR* 表达量的 9.05 倍、6.16 倍、8.03 倍、3.20 倍、8.84 倍和 5.55 倍(图 5)。

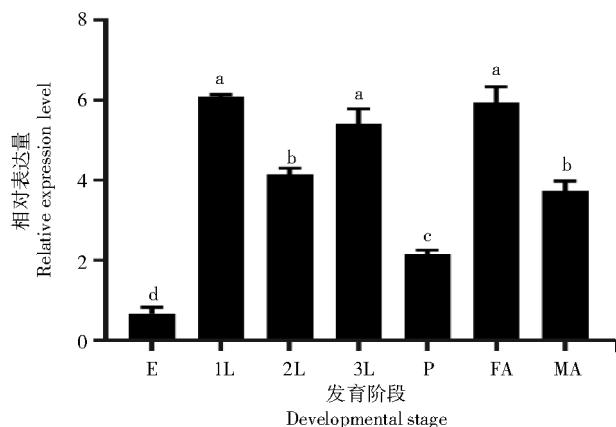


图5 *AhsNPFR*在莲草直胸跳甲不同发育阶段的相对表达量
Fig.5 The relative expression levels of *AhsNPFR* in different developmental stages of *A. hygrophila*

2.4 *AhsNPFR*基因在莲草直胸跳甲不同组织的表达模式

通过qPCR分析了*AhsNPFR*基因在莲草直胸跳甲3龄幼虫不同组织的表达水平,结果表明(图6),*AhsNPFR*基因在3龄幼虫各组织均有表达,其后肠的表达量最高,显著高于其他组织,是脂肪体表达量的12.21倍($P < 0.05$);在头、前肠、中肠和马氏管的表达量间没有显著差异($P > 0.05$);在脂肪体的表达量最低。

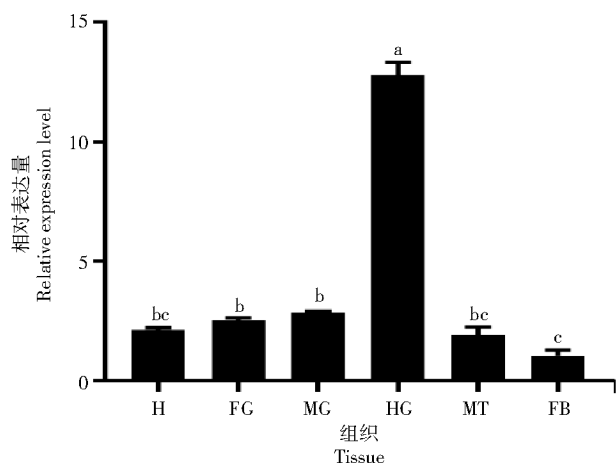


图6 *AhsNPFR*在莲草直胸跳甲3龄幼虫不同组织的相对表达量
Fig.6 The relative expression of *AhsNPFR* in different tissues of the third instar larva of *A. hygrophila*

通过qPCR分析了*AhsNPFR*基因在莲草直胸跳甲雌雄成虫不同组织的表达水平,结果表明(图7),*AhsNPFR*基因在莲草直胸跳甲雌雄成虫各个组织均有表达,且表达模式相似,后肠的表达量均显著高于其他组织($P < 0.05$);触角、头、前肠、中肠、马氏管、脂肪体的表达量没有显著差异,雌雄成虫相同组织中表达量差异不显著($P > 0.05$)。

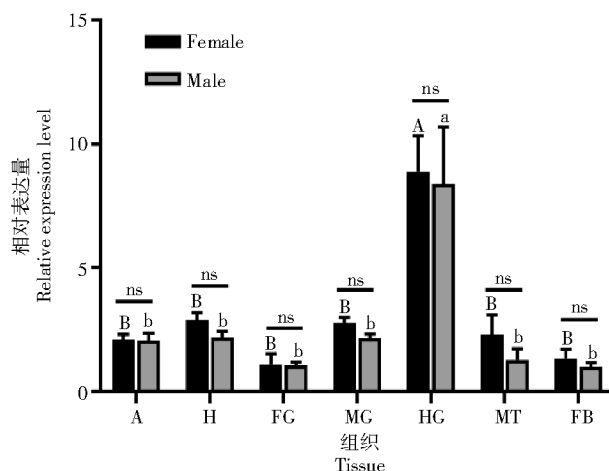


图7 *AhsNPFR*在莲草直胸跳甲成虫不同组织的相对表达量
Fig.7 The relative expression level of *AhsNPFR* in different tissues of *A. hygrophila* adult

3 结论与讨论

本研究克隆了莲草直胸跳甲*sNPFR*基因全序列,其开放阅读框编码418个氨基酸残基,具有GPCRs家族的保守结构域。目前,已鉴定的节肢动物短神经肽受体*sNPFR*均属于GPCRs家族^[18],主要典型特征为含有7个跨膜结构域。本研究结果显示,莲草直胸跳甲*AhsNPFR*也含有7个跨膜结构域,并且与其它昆虫*sNPFR*的保守结构域高度保守。系统发育分析也表明该基因可用于物种的进化关系研究。

莲草直胸跳甲*AhsNPFR*基因在幼虫和成虫期的表达量显著高于卵和蛹期,1龄幼虫表达量最高。有研究表明,在豌豆蚜*Acyrtosiphon pisum*中,*ApsNPFR*在若虫和成虫中都有表达,且1龄若虫表达量最高,敲除*ApsNPFR*后,刺探电位图谱

(EPG)结果显示,豌豆蚜 *A. pisum* 刺吸植物的次数和刺吸时间显著减少^[27]。在黑腹果蝇中,*DmsNPFR* 的过表达导致取食量增加^[16]。由此可见,*sNPFR* 在调控昆虫取食中发挥重要功能作用,莲草直胸跳甲是喜旱莲子草的专食性天敌昆虫,我们推测,*AhsNPFR* 也可能与莲草直胸跳甲取食密切相关,但其功能还需后续基因干扰及行为试验验证。另外发现,莲草直胸跳甲雌成虫 *AhsNPFR* 表达量显著高于雄成虫,相关结果在其它文献未见报道,推测可能为莲草直胸跳甲雌成虫取食量高于雄成虫的重要分子基础。

AhsNPFR 基因在莲草直胸跳甲 3 龄幼虫和雌雄成虫后肠中显著高表达。有研究表明,在华山松大小蠹 *D. armandi* 中,*DasNPFR* 基因在头和中肠组织中显著高表达,功能验证表明其主要与取食相关^[17]。在橘小实蝇 *Bactrocera dorsalis* 中,*BdsNPFR* 在触角和中枢神经系统显著高表达,通过 CRISPR/Cas9 敲除 *BdsNPFR*,发现该虫定位寄主能力变弱;EAG 反应中,对 3 种气味物质的电生理反应均显著降低^[28]。家蚕 *B. mori* *sNPF* 的 3 个同源受体(BNGR-A7、BNGR-A10 和 BNGR-A11)在不同组织中表达模式不同,其中 *BNGR-A7* 仅在成虫头部高表达,*BNGR-A10* 在幼虫和蛹的马氏管中高表达,而在成虫马氏管中表达量较低,*BNGR-A11* 在幼虫和成虫的马氏管、中肠和精巢中表达量较高,而在蛹期的卵巢中相对表达量较高^[20]。由此可见,短神经肽受体 *sNPFR* 在不同昆虫的调控模式可能不同。本研究中检测了 *AhsNPFR* 基因在莲草直胸跳甲触角、头、前肠、中肠、后肠、马氏管和脂肪体的表达情况,但仍有不足。有文献报道,*sNPFR* 在昆虫中枢神经系统中显著高表达^[27],由于技术原因,没有检测 *AhsNPFR* 在中枢神经系统 CNS 中的表达情况。

本研究克隆鉴定了莲草直胸跳甲 *AhsNPFR* 基因,明确了 *AhsNPFR* 基因在莲草直胸跳甲不同发育时期和不同组织的表达模式,为进一步解析短神经肽受体 *AhsNPFR* 调控莲草直胸跳甲的取食调控机制奠定依据,也为莲草直胸跳甲生防世界恶性杂草喜旱莲子草提供一些新的思路。

参考文献:

- [1] ALTSTEIN M, NÄSSEL D R. Neuropeptide signaling in insects[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2010, 692:155-165.
- [2] HEWES R S, TAGHERT P H. Neuropeptides and neuropeptide receptors in the *Drosophila melanogaster* genome[J]. *Genome Research*, 2001, 11(6):1126-1142.
- [3] SPITTAELS K, VERHAERT P, SHAW C, et al. Insect neuropeptide F (NPF)-related peptides: isolation from Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) brain[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1996, 26(4):375-382.
- [4] SCHOOF L, CLYNEN E, CERSTIAENS A, et al. Newly discovered functions for some myotropic neuropeptides in locusts [J]. *Peptides*, 2001, 22(2):219-227.
- [5] NÄSSEL D R, WEGENER C. A comparative review of short and long neuropeptide F signaling in invertebrates: any similarities to vertebrate neuropeptide Y signaling? [J]. *Peptides*, 2011, 32(6):1335-1355.
- [6] MAULE A G, SHAW C, HALTON D W, et al. Neuropeptide F (*Moniezia expansa*): localization and characterization using specific antisera[J]. *Parasitology*, 1992, 105 (Pt 3):505-512.
- [7] 栗洪飞. 短神经肽 F 受体 (*sNPFR*) 参与调控桔小实蝇觅食和取食行为[D]. 重庆:西南大学, 2022.
- [8] LI H F. The short neuropeptide F receptor (*sNPFR*) involved in regulating foraging and feeding behaviors in the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis* (Hendel) [D]. Chongqing: Southwest University, 2022.
- [9] MERTENS I, MEEUSEN T, HUYBRECHTS R, et al. Characterization of the short neuropeptide F receptor from *Drosophila melanogaster* [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, 297(5):1140-1148.
- [10] GARCZYNSKI S F, CRIM J W, BROWN M R. Characterization and expression of the short neuropeptide F receptor in the African malaria mosquito, *Anopheles gambiae* [J]. *Peptides*, 2007, 28(1):109-118.
- [11] CHEN M E, PIETRANTONIO P V. The short neuropeptide F-like receptor from the red imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae) [J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2006, 61(4):195-208.
- [12] JOHARD H A D, YOISHII T, DIRCKSEN H, et al. Peptidergic clock neurons in *Drosophila*: ion transport peptide and short neuropeptide F in subsets of dorsal and ventral lateral neurons [J]. *The Journal of Comparative Neurology*, 2009, 516(1):59-73.
- [13] 李梅梅. 黏虫种群遗传结构与神经肽 F 及其受体基因功能研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2022.
- [14] LI M M. Study on genetic structure and neuropeptide F and its receptor gene function of armyworm population [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2022.
- [15] JIANG H B, GUI S H, XU L, et al. The short neuropeptide F modulates olfactory sensitivity of *Bactrocera dorsalis* upon starvation [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2017, 99:78-85.
- [16] ROOT C M, KO K I, JAFARI A, et al. Presynaptic facilitation by neuropeptide signaling mediates odor-driven food search [J]. *Cell*, 2011, 145(1):133-144.
- [17] LEE K S, YOU K H, CHOO J K, et al. *Drosophila* short neuropeptide F regulates food intake and body size [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(49):50781-50789.
- [18] LEE K S, KWON O Y, LEE J H, et al. *Drosophila* short neu-

- ropeptide F signalling regulates growth by ERK-mediated insulin signalling[J]. *Nature Cell Biology*, 2008, 10:468-475.
- [17] LIU B, FU D Y, NING H, et al. Identification of the short neuropeptide F and short neuropeptide F receptor genes and their roles of food intake in *Dendroctonus armandi*[J]. *Insects*, 2021, 12(9):844.
- [18] DILLEN S, ZELS S, VERLINDEN H, et al. Functional characterization of the short neuropeptide F receptor in the desert locust, *Schistocerca gregaria*[J]. *PLoS One*, 2013, 8 (1) : e53604.
- [19] DILLEN S, VERDONCK R, ZELS S, et al. Identification of the short neuropeptide F precursor in the desert locust: evidence for an inhibitory role of sNPF in the control of feeding[J]. *Peptides*, 2014, 53:134-139.
- [20] MA Q, CAO Z, YU Y N, et al. *Bombyx* neuropeptide G protein-coupled receptor A7 is the third cognate receptor for short neuropeptide F from silkworm[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2017, 292(50):20599-20612.
- [21] 贾栋, 赵龙龙, 王森, 等. 莲草直胸跳甲 Hsp70 蛋白的生物信息学分析[J]. *山西农业科学*, 2015, 43(4):397-400.
- JIA D, ZHAO L L, WANG S, et al. Bioinformatic analysis of *Agasicles hygrophila* Hsp70[J]. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2015, 43(4):397-400.
- [22] 马瑞燕. 空心莲子草天敌:莲草直胸跳甲引进中国后的生态适应性研究[D]. 北京:中国农业科学院, 2001.
- MA R Y. Ecological adaptation of the introduced biocontrol agent, *Agasicles hygrophila*, for alligatorweed, *Alternanthera philoxeroides*, in china[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2001.
- [23] 余国梁, 李政, 李健, 等. 喜旱莲子草生物防治研究进展[J]. *湖南生态科学学报*, 2020, 7(4):62-67.
- YU G L, LI Z, LI J, et al. Research progress on biological control of *Alternanthera philoxeroides*[J]. *Journal of Hunan Ecological Science*, 2020, 7(4):62-67.
- [24] JIA D, WANG Y X, LIU Y H, et al. SMRT sequencing of full-length transcriptome of flea beetle *Agasicles hygrophila* (Selman and Vogt)[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8:2197.
- [25] 贾栋, 纪周瑜, 刘艳红, 等. 莲草直胸跳甲不同发育阶段内参基因的筛选与验证[J]. *山西农业大学学报(自然科学版)*, 2020, 40(4):53-58.
- JIA D, JI Z Y, LIU Y H, et al. Screening and validation of internal reference genes in different developmental stages of *Agasicles hygrophila*[J]. *Journal of Shanxi Agricultural University (Natural Science Edition)*, 2020, 40(4):53-58.
- [26] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4):402-408.
- [27] AMIR M B, SHI Y, CAO H H, et al. Short neuropeptide F and its receptor regulate feeding behavior in pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*)[J]. *Insects*, 2022, 13(3):282.
- [28] LI H F, HUANG X Y, YANG Y H, et al. The short neuropeptide F receptor regulates olfaction-mediated foraging behavior in the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis* (Hendel) [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2022, 140:103697.