



刘伟娇, 张肖丽, 高雪珂, 朱香镇, 王丽, 姬继超, 雒珺瑜, 崔金杰, 李东阳, 张开心. 5个棉蚜组织蛋白酶B基因克隆及在不同寄主专化型中的表达分析 [J]. 环境昆虫学报, 2022, 44 (4): 946–955.

5个棉蚜组织蛋白酶B基因克隆及在不同寄主专化型中的表达分析

刘伟娇, 张肖丽, 高雪珂, 朱香镇, 王丽, 姬继超, 雒珺瑜,
崔金杰, 李东阳*, 张开心*

(中国农业科学院棉花研究所, 棉花生物学国家重点实验室, 河南安阳 455000)

摘要: 昆虫组织蛋白酶B在昆虫代谢中发挥着重要作用。本研究从棉蚜 *Aphis gossypii* Glover 的转录组数据库中挑选 *Cath B* 并克隆得到全长 cDNA 序列, 使用 qRT-PCR 分析这些基因在不同寄主专化型棉蚜不同龄期中的相对表达量。通过分析棉蚜体内 5 个高表达组织蛋白酶 B 基因不同发育阶段的表达谱, 比较了不同专化型棉蚜在寄主转换之后的表达差异。研究发现, 这 5 个基因在不同龄期不同寄主上均表达。棉花型棉蚜在棉花寄主上不同基因间的表达各不相同。黄瓜型棉蚜在黄瓜 *Cucumis sativus* L. 上 *AgCb-1*、*AgCb-2*、*AgCb-3* 基因均在成蚜时期表达量相对较高, *AgCb-4*、*AgCb-5* 基因表达量则与之相反。分别将棉花型棉蚜和黄瓜型棉蚜转接到西葫芦 *Cucurbita pepo* L. 上后, 棉花型棉蚜 *AgCb-1*、*AgCb-4* 基因和黄瓜型棉蚜 *AgCb-1*、*AgCb-2*、*AgCb-3* 基因均在成蚜不同时期的表达量显著大于转接前。结果表明: *AgCb-1*、*AgCb-2*、*AgCb-3*、*AgCb-4*、*AgCb-5* 基因表达量伴随着棉蚜的生长发育以及寄主的转换, 表现出不同的差异。说明组织蛋白酶在棉蚜对寄主植物的适应性过程中可能发挥作用。

关键词: 棉蚜; 组织蛋白酶 B; 发育阶段; 寄主专化型; 表达谱

中图分类号: Q968.1; S433

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2022) 04-946-10

Clone and expression analysis of five cathepsin B genes in different host-specific types of *Aphis gossypii* Glover

LIU Wei-Jiao, ZHANG Xiao-Li, GAO Xue-Ke, ZHU Xiang-Zhen, WANG Li, JI Ji-Chao, LUO Jun-Yu, CUI Jin-Jie, LI Dong-Yang*, ZHANG Kai-Xin* (Laboratory of Cotton Biology, Cotton Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Anyang 455000, Henan Province, China)

Abstract: Cathepsin B plays an important role in insect metabolism. In this study, Cathepsin B was selected from the transcriptome database of *Aphis gossypii* Glover and cloned into full-length cDNA sequences. The relative expression levels of these genes in different host specific types of *A. gossypii* at different instars were analyzed by qRT-PCR. The expression profiles of five highly expressed Cathepsin B genes in *A. gossypii* at different developmental stages were analyzed to compare the expression of different specific types of *A. gossypii* after host conversion. All the five genes were expressed in different instars and different hosts. The expression of different genes in cotton host was different. The expression levels of *AgCb-1*, *AgCb-2* and *AgCb-3* in the cucumber type were relatively high in the adult stage, while the

基金项目: 中国农业科学院科技创新工程

作者简介: 刘伟娇, 女, 1995年生, 河北石家庄人, 硕士研究生, 研究方向为农业昆虫与害虫防治, E-mail: 2569815710@qq.com

* 通讯作者 Author for correspondence: 张开心, 男, 硕士, 助理研究员, 研究方向为作物害虫防控及转基因植物安全评价, E-mail: zhangkaixin@caas.cn; 李东阳, 男, 硕士, 研究实习员, 研究方向为农业害虫防治, E-mail: hzaulidongyang@163.com

收稿日期 Received: 2021-04-26; 接受日期 Accepted: 2021-06-24

expression levels of *AgCb-4* and *AgCb-5* were opposite. *A. gossypii* of cotton type and cucumber type were transferred to *Cucurbita pepo* L., respectively. The expression levels of *AgCb-1* and *AgCb-4* genes of cotton type and *AgCb-1*, *AgCb-2* and *AgCb-3* genes of cucumber type were significantly higher in different periods than before transfer. The results showed that the expression levels of *AgCb-1*, *AgCb-2*, *AgCb-3*, *AgCb-4* and *AgCb-5* were different with the growth and development of *A. gossypii* and the conversion of host plants. This suggested that *Cath B* may play a role in the adaptation of cotton aphid to host plants.

Key words: *Aphis gossypii*; Cathepsin B; developmental stage; host specialization; expression profile

棉蚜 *Aphis gossypii* Glover 是一种世界性害虫 (王丽等, 2015), 是最具破坏性的害虫之一。在长期的自然选择过程中, 棉蚜为适应生存条件进化出了不同的适应能力, 形成了不同的寄主专化型 (陈文胜等, 1997)。研究表明, 棉蚜种群在不同寄主上分化, 在世界各地已经发现了多种寄主专化型, 例如棉花型、瓜型或其他型 (Adriaan *et al.*, 1994; 刘向东等, 2002)。但在我国主要是棉花型和瓜型棉蚜的分化 (孟玲等, 1998), 并且还发现将两者进行相互转接后, 均表现出存活率显著下降, 不能建立种群的现象 (孟玲和李保平, 2001)。此外, 还发现西葫芦 *Cucurbita pepo* L. 寄主可改变棉蚜的寄主专化性, 并对棉花型棉蚜以及瓜型棉蚜的寄主利用、寄主选择和定位以及外部形态的数值特征产生不同程度的影响 (吴蔚, 2013)。有研究发现西葫芦也可以作为中间寄主形成棉蚜在不同寄主植物间的相互转移通道 (郑彩玲等, 2007)。

不同寄主专化型蚜虫进化出了不同的寄主适应能力。在外部形态上表现为两种专化型棉蚜的触角在第三节长度、口针长度、头部宽度、腹管长度、退节长度、前足长度、中足长度以及后足长度等 7 个生态部位的长度有差异 (麦麦提艾则孜·穆合塔尔和王东, 2020)。有研究表明, 棉花型棉蚜对接触刺激的反应比瓜型棉蚜敏感, 两寄主型棉蚜对寄主的选择能力表现为瓜型棉蚜显著强于棉花型棉蚜 (刘向东等, 2004)。在生理生化上表现也不尽相同, 寄主专化型蚜虫在不同寄主植物上表现出了不同的适应性, 研究发现在花椒 *Zanthoxylum bungeanum* Maxim.、木槿 *Hibiscus syriacus* L.、石榴 *Punica granatum* L.、冬青 *Ilex chinensis* Sims、棉花 *Gossypium* spp. 上的棉蚜, 其中棉花上棉蚜种群中具有较高的 α -NA 酯酶活力的个体多于其它 4 种寄主植物上棉蚜 (谢佳燕等, 2007)。让不同抗性程度的棉蚜取食棉花、木槿和

南瓜 *Cucurbita moschata* (Duch. ex Lam.) Duch. ex Poiret 3 种寄主作物, 取食木槿各品系棉蚜的乙酰胆碱酯酶对甲胺磷敏感性均有所下降, 并且在不同处理之间棉蚜 AChE 的酶学特性 (K_m 值和 V_{max}) 也发生了不同程度的改变, 究其原因可能是寄主作物体内的次生物质对靶标酶乙酰胆碱酯酶存在不同程度的诱导作用, 致使其酶学特性发生改变 (李飞等, 2002)。在分子水平上, 发现 *COO2* 基因在棉花型棉蚜和黄瓜型棉蚜中表达水平不同 (任柯昱等, 2018)。而瓜型棉蚜体内原生共生菌 *Buchnera* 种群密度和菌胞数量都显著高于棉花型棉蚜, 并且通过转录组测序发现, *P450* 基因 *CYP302a1*、*CYP6a14*、*CYP4c1*、*CYP6a2* 和消化酶基因 *CL1593-1*、*CL382-1H*、*CL1471-2* 在黄瓜型棉蚜中表达量也显著高于棉花型棉蚜 (张元臣, 2016)。

组织蛋白酶 (Cathepsin, Cath B) 是主要存在于溶酶体中一种胞内蛋白酶, 它的存在对有机体的生命活动至关重要。而到目前为止从组织蛋白酶 A 到 Z 都早已有报道。Cath B 是一类半胱氨酸类蛋白酶, 属于木瓜蛋白酶家族 (刘任强等, 2015)。广泛存在于细菌 Bacteria、病毒、原生动物 Protozoa、植物、昆虫和哺乳动物中。并且在胚胎发育的过程中, 该酶参与了胚胎发育中卵黄蛋白的降解, 为胚胎发育提供必要的营养物质氨基酸 (罗梅等, 2012)。由此可见该蛋白的缺失会影响昆虫的正常代谢, 甚至导致死亡。营养物质分解代谢在昆虫胚胎发育早期是其主要的生物化学过程之一, 探索在寄主转化中这一时期卵内蛋白酶活性, 可以判定不同寄主对蚜虫专化型的影响。因此, 研究 *Cath B* 基因具有重要意义。

本文基于棉蚜转录组数据中的相关信息, 克隆获得了 5 个高表达 *Cath B* 基因的全长序列, 分别命名为 *AgCb-1* ~ *5* (GenBank 登录号: MW819782-6), 并对 5 个基因进行了序列和进化树分析; 同时分

析了棉花型和黄瓜型两种寄主专化型棉蚜的这 5 个基因在分别在棉花、黄瓜以及中间寄主西葫芦上不同发育阶段中的表达特性, 比较了两种不同寄主专化型棉蚜在 3 种寄主中的表达差异, 为进一步研究棉蚜寄主专化型形成的分子机理提供了重要信息。

1 材料与方法

1.1 供试植物

试验所采用的棉花品种为中棉所 49, 由中国农业科学院棉花种质资源中期库提供; 黄瓜品种为新津优一号, 购买于宁阳县金鑫种子销售中心; 西葫芦品种为极早优美, 购于市场。植物在人工气候室内种植, 设定条件: 温度 $26 \pm 1^\circ\text{C}$, 相对湿度 70% ~ 80%, 光周期 L:D = 16:8。

1.2 供试棉蚜

供试验所用的棉花型棉蚜和黄瓜型棉蚜分别采自中国农业科学院棉花研究所东场试验田 ($114^\circ 42' \text{E}$, $36^\circ 11' \text{N}$) 的棉花和黄瓜植株上, 通过分子鉴定技术鉴定其专化型 (Zhang *et al.*, 2018), 鉴定后的棉蚜单头饲养于温度为 $26 \pm 1^\circ\text{C}$, 相对湿度为 70% ~ 80%, 光周期 L:D = 16:8 的人工气候箱内, 最终获得遗传背景一致的品系。

1.3 试验处理

将黄瓜型棉蚜和棉花型棉蚜的成蚜分别转接到离体的黄瓜叶、棉花叶上, 将叶片的梗部插入 1.8% 琼脂的保湿培养皿中, 盖上盖子后置于人工气候室中, 24 h 后移除成蚜, 留下若蚜在叶片上生长。每隔 2 d 更换一次新鲜叶片以保证蚜虫的正常生长发育。连续收集棉花型棉蚜和黄瓜型棉蚜分别在不同寄主上 1、2、3、4 龄的若蚜和 1、3、5、7 日龄的成蚜。每个时期收集 20 头作为一个处理, 共 3 个重复。将收集的样品储存在 -80°C 备用。再将棉花型棉蚜和黄瓜型棉蚜的成蚜分别接于离体的西葫芦叶片上, 收样处理方法同上。

1.4 棉蚜总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

棉蚜的总 RNA 的提取步骤按照 TRIzol 试剂 (Ambion 公司) 说明书进行。使用 NanoDrop 2000C 型微量分光光度计及琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 浓度、纯度及其完整性。利用 TaKaRa 公司的 PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time)

反转录试剂盒将上述不同棉蚜的 RNA 反转录成单链 cDNA。

1.5 棉蚜 *Cath B* 基因的克隆

根据本实验室所建立的苗蚜和伏蚜转录组数据库信息 (Zhao *et al.*, 2013) 中选出表达量相对较高的棉蚜 5 个 *Cath B* 基因, 运用 Primer Premier 5.0 软件设计验证引物。AgCb-1 上游引物 5'-TATTTCAACAATGGTTAGAGTGT-3', 下游引物 5'-TGGATTATACCGTAAGTTAGGTA-3'; AgCb-2 上游引物 5'-TGAGAAGGATATTAATTTATCATTAT-3', 下游引物 5'-GAGTCCATCGGAATCGTC-3'; AgCb-3 上游引物 5'-AATATTTTCGCATGACCGCTT-3', 下游引物 5'-CATTGAGGAAAAAGCGATGATA-3'; AgCb-4 上游引物 5'-ACTGGTACACCAGCAGTTGTA-3', 下游引物 5'-AACTAAAATTACAATACAGCAACA-3'; AgCb-5 上游引物 5'-GTTGGCGTTTCAGAAGTCA-3', 下游引物 5'-ATCTCATCCGGTCAATCAAC-3'。PCR 反应后将扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 切胶回收并纯化, 按照 pEASY-T3 Cloning Kit 试剂盒 (全式金) 的说明书将其连接到 pEASY-T3 载体上, 再将其转化至 Trans1-T1 Phage Resistant 化学感受态细胞, 挑取单克隆进行测序。

1.6 生物信息学分析

运用网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 预测基因的 OFR (Open reading frame)。运用在线软件 ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>) 分析蛋白质的理化性质。运用网站 (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) 分析蛋白质的结构域和保守位点, 利用软件 MEGA 7 以邻接法 (Neighbor-joining method, NJ) 构建系统发育树, 各分支置信度经由 bootstrap 法 1 000 次循环检验。

1.7 荧光定量 PCR

使用 Beacon Designer 7 软件设计荧光定量引物, 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。将 cDNA 模板稀释成 5 个浓度梯度, 进行标准曲线的制作, 并计算各引物的扩增效率 (表 1)。内参基因选取棉蚜的甘油三磷酸脱氢酶 GAPDH (GenBank 登录号: KP676380.1)。荧光定量 PCR 反应使用 GoTaq qPCR Master Mix (Promega 公司) 试剂盒进行。反应体系为 qPCR MasterMix 10 μL 、cDNA 模板 1.0 μL 、上下游引物各 0.8 μL 、无核酸酶水 7.4 μL , 混匀离心, 放入荧光定量 PCR 仪

中扩增。反应条件为 95℃ 变性 2 min; 接着进行 40 个循环, 条件为 95℃ 15 s、60℃ 1 min。定量 PCR 仪器为 Eppendorf 公司的 Mastercycler ep realplex 荧光定量 PCR 仪。表达量的计算根据 Ct 值采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因的相对表达水平, 不同寄主型蚜虫各个不同龄期的 *Cath B* 基因的相对表达水平均表达为棉花型 1 龄若蚜 *AgCb* 基因 (设为

1 倍) 的相对倍数。

1.8 数据统计

运用 SPSS 软件对棉蚜在不同寄主上的基因表达量进行数据统计和单因素方差分析 (Duncan's), 差异显著性程度设为 $P < 0.05$ 。采用 GraphPad Prism 8.0 软件绘图。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物
Table 1 Primers used for real-time quantitative PCR

基因 Gene	引物序列 Primer sequence (5'-3')	扩增效率 (%) Amplification efficiency	相关系数 (R^2) Correlation coefficient
<i>AgCb-1</i>	F-CGGATGTAATGGTGGTTAT R-CCTCGCTGGATTGTAAAT	107	0.962
<i>AgCb-2</i>	F-TGTGCCCGTGATAAAATTC R-CTAATGTCTTGTGGTGATGA	96	0.999
<i>AgCb-3</i>	F-GACTATAACTACATACAACAGGAT R-GTAAGGCGATACCGAGTA	82	0.989
<i>AgCb-4</i>	F-GGCACTCTGTATGGTTCA R-ATGTACACGGTGGTTATCC	98	0.997
<i>AgCb-5</i>	F-TTGGTATCTGGTGGTGAA R-TATGTTCCCTTGATGATTGTCTT	110	0.994

2 结果与分析

2.1 棉蚜 5 个 *Cath B* 基因克隆和序列特征分析

根据棉蚜转录组数据, 通过基因克隆方法得到的 5 个 *Cath B* 基因的全长 cDNA 序列 (表 2), 分别命名为 *AgCb-1*、*AgCb-2* 和 *AgCb-3*、*AgCb-4*、

AgCb-5, 并对其相应的氨基酸序列特征进行分析比较。结果表明, *Cath B* 基因在 N 端结构差异性较大, 但是在 C 端却有较高的同源性, 并且还有两个结构域 Propeptide_C1 和 Peptidase_C1A_CathepsinB 和 Gln、Cys、His、Asn 4 个催化残基和 S2 特异性亚基, 都有着较高的保守性 (图 1)。

表 2 组织蛋白酶 B 基因家族基本信息分析
Table 2 Basic information of the Cathepsin B family

Gene ID	ORF (bp)	Gene location	Domain	Relative molecular mass (kDa)	pI
<i>AgCb-1</i>	720	89 - 234 24 - 62	Peptidase_C1 superfamily Propeptide_C1	27.38	6.64
<i>AgCb-2</i>	981	67 - 319	Peptidase_C1A_CathepsinB	36.62	6.87
<i>AgCb-3</i>	1 002	85 - 327 24 - 62	Peptidase_C1A_CathepsinB Propeptide_C1	37.65	8.73
<i>AgCb-4</i>	1 011	89 - 335 24 - 62	Peptidase_C1A_CathepsinB Propeptide_C1	38.37	5.69
<i>AgCb-5</i>	981	78 - 323	Peptidase_C1A_CathepsinB	36.80	7.41

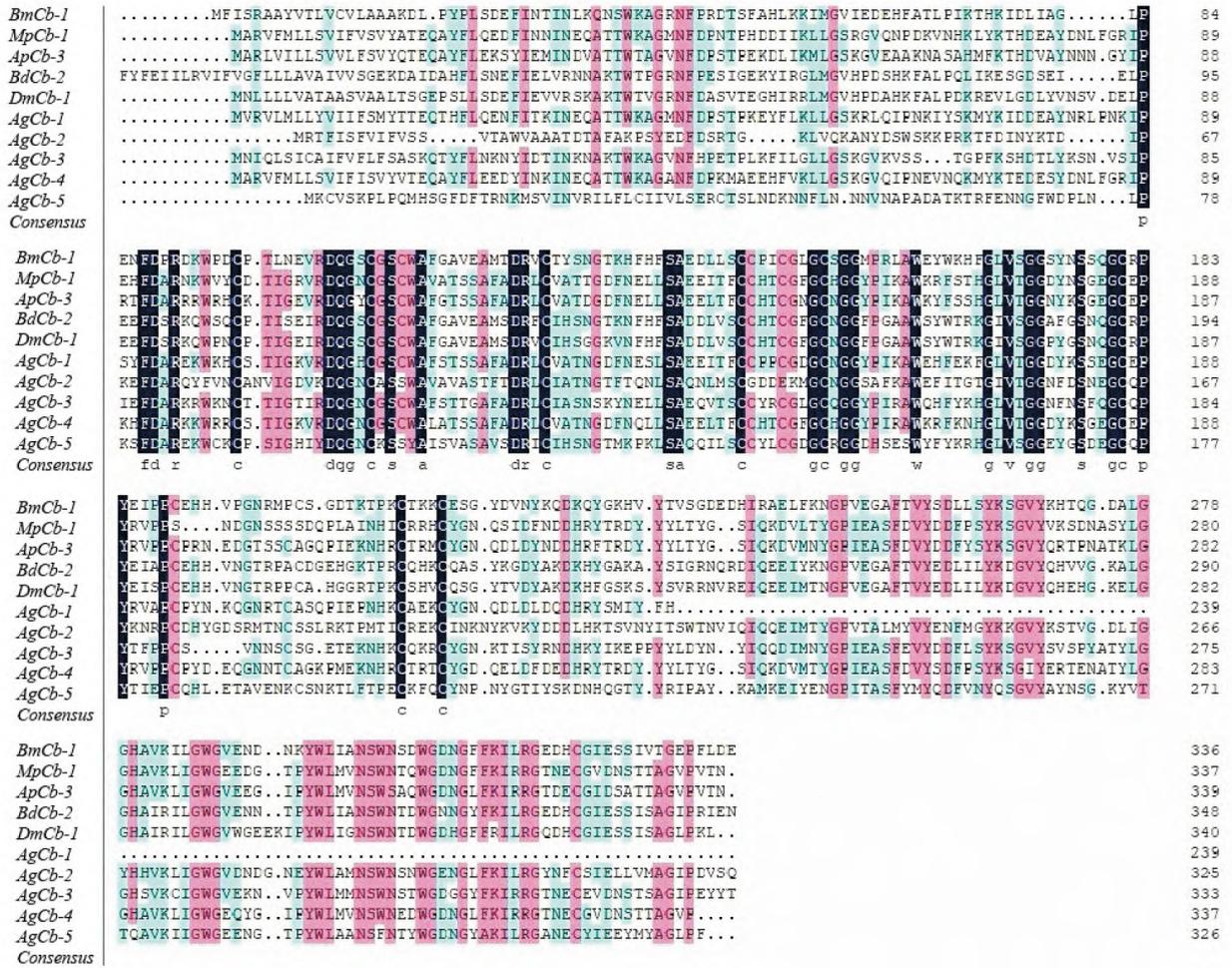


图1 棉蚜 *Cath B* 基因与其他昆虫 *Cath B* 氨基酸序列多重比较

Fig. 1 Multiple comparison of amino acid sequences between *Cath B* gene and *Cath B* gene of other insects

注: *AgCb-1*, 棉蚜 *Aphis gossypii*, MW819782; *AgCb-2*, 棉蚜 *Aphis gossypii*, MW819783; *AgCb-3*, 棉蚜 *Aphis gossypii*, MW819784; *AgCb-4*, 棉蚜 *Aphis gossypii*, MW819785; *AgCb-5*, 棉蚜 *Aphis gossypii*, MW819786; *BmCb-1*, 家蚕 *Bombyx mori*, BAB40804.1; *MpCb-1*, 桃蚜 *Myzus persicae*, DAA06115.1; *ApCb-3*, 豌豆长管蚜 *Acyrtosiphon pisum*, XP_029341239.1; *BdCb-2*, 桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis*, JAC57277.1; *DmCb-1*, 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*, NP_001259536.2.

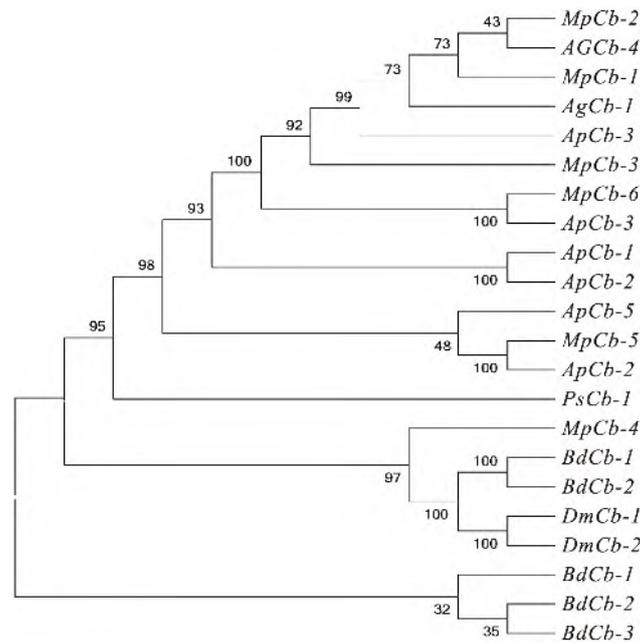
将这 5 个棉蚜的 *Cath B* 基因与其它昆虫的 *Cath B* 基因的氨基酸序列以邻接法构建了进化树, 结果显示, 棉蚜的 *Cath B* 基因与蚜科 Aphididae 桃蚜 *Myzus persicae* Sulzer 的关系最近, 与其它昆虫的同源性较低, 分属不同支, 与家蚕 *Bombyx mori* Linnaeus 的关系最远 (图 2)。

2.2 5 个棉蚜 *Cath B* 基因在不同寄主上的表达分析

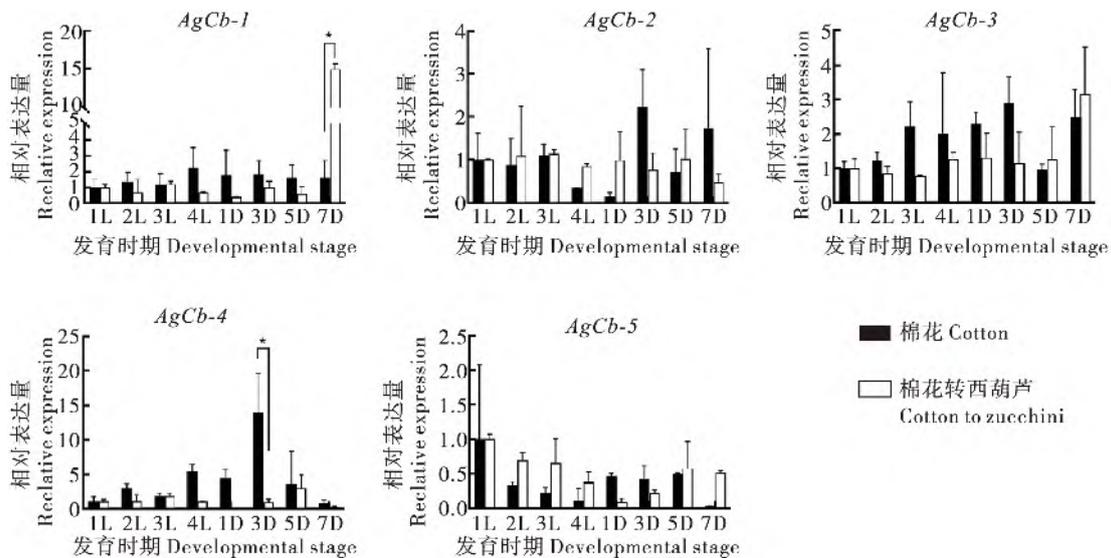
2.2.1 棉花型棉蚜 5 个 *Cath B* 基因在不同寄主上的表达分析

利用荧光定量 PCR 技术检测了 5 个 *Cath B* 基因在棉花寄主和转接西葫芦寄主上若蚜不同龄期和成蚜不同日龄的相对表达量, 结果发现, *AgCb-1* 基

因在棉花上不同时期的相对表达量无明显变化; 而棉蚜转接到西葫芦上后, 除 7 日成蚜外, 其它时期相对表达量均有所下降, 并且 7 日成蚜表达量增加了 5 倍, 具有显著差异 ($P < 0.05$) (图 3)。
AgCb-2 基因除 3 日成蚜和 7 日成蚜在西葫芦上的相对表达量降低外, 其它时期均表现为西葫芦高于棉花。而 *AgCb-3* 基因基本与之相反, 5 日成蚜与 7 日成蚜的基因表达量相比较于在棉花上有所增加, 差异不显著 ($P < 0.05$)。
AgCb-4 基因在两个寄主上的相对表达量均具有先上升再下降的趋势, 并且在棉花上 3 日成蚜时期达到最高值, 而从棉花转接到西葫芦上后表现为在 4 龄若蚜达到最高值, 并且在 3 日成蚜时期在两种寄主上的相

图2 棉蚜 *Cath B* 与其它物种的进化关系Fig. 2 Phylogenetic relatedness of *Aphis gossypii**Cath B* with other species

注: 进化树使用邻接法构建, 各分支置信度经由 1 000 次 Bootstrap 检验。Bm, 家蚕; Mp, 桃蚜; Ap, 豌豆长管蚜; Ps, 扶桑绵粉蚧; Bd, 桔小实蝇; Dm, 黑腹果蝇; Ag, 棉蚜。Note: The tree was constructed by using neighbor-joining method. Bootstrap support values were based on 1000 replicates. Bm, *Bombyx mori*; Mp, *Myzus persicae*; Ap, *Acyrtosiphon pisum*; Ps, *Phenacoccus solenopsis*; Bd, *Bactrocera dorsalis*; Dm, *Drosophila melanogaster*; Ag, *Aphis gossypii*.

图3 *AgCb-1*、*AgCb-2*、*AgCb-3*、*AgCb-4*、*AgCb-5* 在棉花和棉花转西葫芦上的相对表达量Fig. 3 Relative expression of *AgCb-1*, *AgCb-2*, *AgCb-3*, *AgCb-4* and *AgCb-5* on cotton and cotton-to-zucchini

注: 1 L, 1 龄若蚜; 2 L, 2 龄若蚜; 3 L, 3 龄若蚜; 4 L, 4 龄若蚜; 1 D, 1 日龄成蚜; 3 D, 3 日龄成蚜; 5 D, 5 日龄成蚜; 7 D, 7 日龄成蚜。柱上标有* 代表基因表达量的差异显著 (ANOVA, $P < 0.05$)。Note: 1 L, 1st instar nymph; 2 L, 2nd instar nymph; 3 L, 3rd instar nymph; 4 L, 4th instar nymph; 1 D, 1st adult; 3 D, 3rd adult; 5 D, 5th adult; 7 D, 7th adult. The * on the column indicated significant differences in gene expression. (ANOVA, $P < 0.05$).

对表达量有显著差异 ($P < 0.05$)。 *AgCb-5* 基因在两种寄主上的相对表达量除 7 日成蚜时期均表现为先下降再上升的趋势, 并且相对表达量的最高值都在 1 龄若蚜时期。 7 日成蚜时期在棉花上的相对表达量接近 0。而在转接到西葫芦上后这一时期相对表达量出现大幅度回升, 但差异不显著 ($P < 0.05$)。

2.2.2 黄瓜型棉蚜 5 个 *Cath B* 基因在不同寄主上的表达分析

5 个 *Cath B* 基因在黄瓜寄主和黄瓜转接西葫芦寄主上若蚜不同龄期和成蚜不同日龄的相对表达量结果发现: *AgCb-1*、*AgCb-2* 和 *AgCb-3* 在黄瓜上的基因表达量基本一致, 均表现为先上升、下降、又回升的趋势, 并且 *AgCb-1*、*AgCb-2* 均在

5 日成蚜时期和 7 日成蚜时期分别达到最低值和最高值。在两种寄主上对比发现, *AgCb-1* 和 *AgCb-2* 分别在 3 龄若蚜和 3 日成蚜时期后, 相对表达量差异显著 ($P < 0.05$)。而 *AgCb-3* 在在黄瓜寄主上表现为在 3 日成蚜时期达到最高值, 但转接到西葫芦上后基因的相对表达量均表现为成蚜时期高于若蚜时期, 并且在两种寄主之间进行比较发现只在 3 日成蚜时期差异显著 ($P < 0.05$), 并且黄瓜上的相对表达量是转接到西葫芦上的 2 倍。 *AgCb-4* 和 *AgCb-5* 在两寄主上的表达量均在 1 龄若蚜时期达到最高, 3 龄若蚜时期表现最低, 且差异显著 ($P < 0.05$), 但在两种寄主同一时期的相对表达量却并无显著差异。不同的是, 3 龄若蚜之后, *AgCb-4* 的相对表达量明显上升 (图 4)。

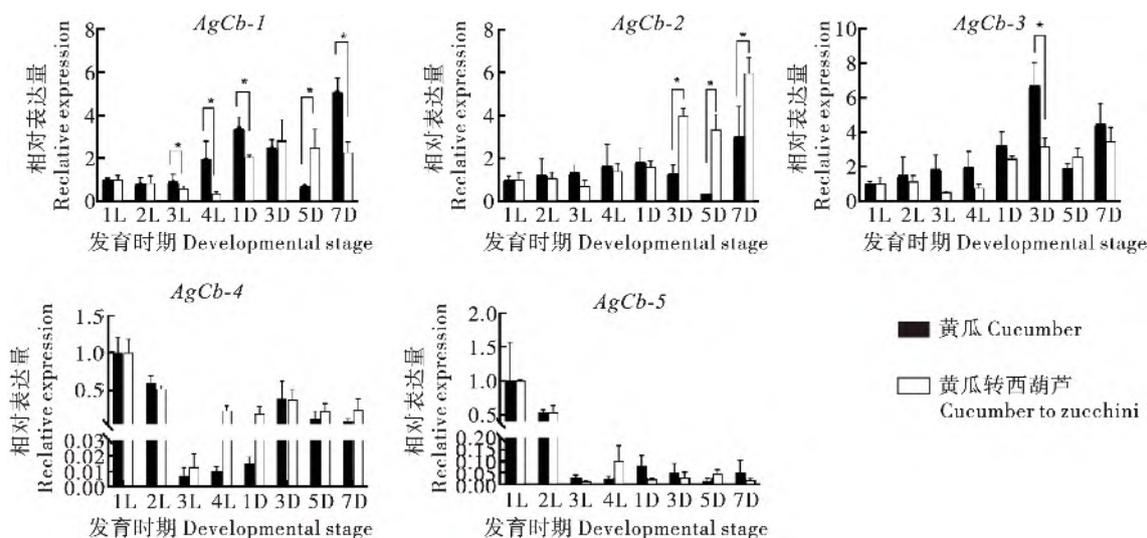


图 4 *AgCb-1*、*AgCb-2*、*AgCb-3*、*AgCb-4*、*AgCb-5* 在黄瓜和黄瓜转西葫芦上的相对表达量

Fig. 4 Relative expression of *AgCb-1*, *AgCb-2*, *AgCb-3*, *AgCb-4* and *AgCb-5* in cucumber and cucumber-to-zucchini

注: 1 L, 1 龄若蚜; 2 L, 2 龄若蚜; 3 L, 3 龄若蚜; 4 L, 4 龄若蚜; 1 D, 1 日龄成蚜; 3 D, 3 日龄成蚜; 5 D, 5 日龄成蚜; 7 D, 7 日龄成蚜。柱上标有* 代表基因表达量的差异显著 (ANOVA, $P < 0.05$)。Note: 1 L, 1st instar nymph; 2 L, 2nd instar nymph; 3 L, 3rd instar nymph; 4 L, 4th instar nymph; 1 D, 1st adult; 3 D, 3rd adult; 5 D, 5th adult; 7 D, 7th adult. The * on the column indicated significant differences in gene expression. (ANOVA, $P < 0.05$).

3 结论与讨论

棉蚜作为世界性棉花害虫, 其相关的研究一直广受关注。而组织蛋白酶 B 在昆虫代谢过程中发挥着重要作用。据研究显示组织蛋白酶 B 参与生命活动中许多生理、病理性反应。可以被巯基试剂抑制, 可以降解血红蛋白、血清蛋白、卵黄磷蛋白、层粘蛋白和 IV 型胶原等细胞外基质成

分, 从而破坏一系列组织屏障。在医学方面有研究显示, 恶性肿瘤和癌症的诊断及治疗中组织蛋白酶 B 有望成为新的热点。研究发现 *CB* 基因可抑制肝癌细胞的迁移 (吕晓丹等, 2018)。此外, 组织蛋白酶 B 抑制剂 CA-074Me 可通过抑制其表达, 减轻小鼠的心肌损害, 提高感染小鼠的存活率 (于小华等, 2005)。而在昆虫方面, 大多数研究对象为棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (杨晓梅, 2005)、烟叶蛾 *Helicoverpa assulta* (赵艳艳等,

2008)、扶桑绵粉蚧 *Phenacoccus solenopsis* (罗梅等, 2012)、家蚕 (蔡翔云, 2014) 等昆虫。杨晓梅等 (2005) 从棉铃虫卵中鉴定并纯化出了棉铃虫组织蛋白酶 B, 并证实该酶参与了棉铃虫胚胎发育过程中卵黄蛋白水解等生命活动。有研究还发现, 淡色库蚊体内也存在组织蛋白酶 B, 并且参与了卵细胞的降解 (Uchida *et al.*, 2001)。埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 雌性成虫在卵子发生过程中随着卵黄沉积, 脂肪体会产生一种半胱氨酸组织蛋白酶 B (Cho *et al.*, 1999)。

本研究从棉蚜的转录组数据库中获得 5 个高表达的 *CathB* 基因 *AgCb-1*、*AgCb-2*、*AgCb-3*、*AgCb-4* 和 *AgCb-5*, 通过系统进化树的分析结果可得知: 棉蚜的 *Cath B* 基因与蚜科昆虫的同源性较高, 而与其它昆虫在进化树上分属不同分支, 说明棉蚜的 *Cath B* 基因功能与其它昆虫产生了一定分化。本研究还发现 5 个 *Cath B* 基因在两种寄主专化型棉蚜的不同发育时期均有表达。但每个基因的表达都各有各的特点, 例如棉花型棉蚜在棉花寄主上 *AgCb-1*、*AgCb-3*、*AgCb-5* 基因不同时期的表达量并没有显著的差异。而 *AgCb-2*、*AgCb-4* 基因的表达趋势均为先升高再下降, 且均在 3 日龄成蚜达到最大值, 并且与其它时期有显著差异。黄瓜型棉蚜在黄瓜上 *AgCb-1*、*AgCb-2*、*AgCb-3* 的表达趋势为先升高再下降再升高, 分别再 7 日和 3 日成蚜达到最高值。而 *AgCb-4* 和 *AgCb-5* 都表现为在 1 龄若蚜达到最高值。其中 *AgCb-1* 先表现为下降趋势, 在 3 日成蚜达到第二个峰值。而 *AgCb-5* 则表现为持续降低的趋势; 这也与杨晓梅 (2005) 在棉铃虫中的研究有所不同。分别将棉花型棉蚜和黄瓜型棉蚜转接到中间寄主西葫芦上后, 棉花型棉蚜 *AgCb-1*、*AgCb-4* 基因分别在 7 日龄或 3 日龄成蚜时期显著升高, 而其它基因则无显著差异。黄瓜型棉蚜 *AgCb-1* 基因除 5 日龄成蚜转接后表达量显著升高外, 3 龄若蚜之后的时期均转接前大于转接后。而 *AgCb-2*、*AgCb-3* 基因在 3 日龄或 3 日龄之后表达量转接后大于转接前。

有关棉蚜寄主专化性的讨论, 长期以来一直广受关注, 但是关于分子水平上尤其是组织蛋白酶 B 的研究却鲜有报道。植物次生化合物对棉蚜寄主专化的影响推测黄瓜、棉花以及西葫芦叶片内的次生化合物种类及含量的差异可能影响不同

专化型棉蚜的寄主选择 (王丽等, 2015)。棉蚜唾液腺蛋白 *armet* 基因在不同专化型棉蚜转接试验的作用, 表明该基因分别在成蚜和若蚜中发挥了不同作用 (任柯昱等, 2018)。棉蚜根据不同的繁殖方式可以将生活史划分为夏季以孤雌蚜繁殖、秋季产生性蚜产卵越冬的全周期型和以孤雌胎生蚜越冬的不全周期型、产雄性蚜的不全周期型以及会产生有性世代但仍进行孤雌生殖的中间型 (晁文娣等, 2019)。本试验的棉蚜为孤雌胎生蚜; 而前人所研究的多为卵生昆虫, 有研究表明在蚜虫胎生卵母细胞和胚胎中没有或者很少有卵黄。而组织蛋白酶 B 主要是参与卵黄蛋白降解, 调节昆虫的胚胎发育, 进而影响在寄主植物上的适应性。De Barro 提出, 蚜虫对寄主植物形成的专化性可能是寄主条件的长期选择, 发生遗传物质的改变, 进而导致代谢酶的变化, 最终形成寄主专化型 (De Barro *et al.*, 1995)。再结合本试验不同专化型棉蚜在不同寄主上的基因表达量分析, 发现 *Cath B* 基因确实在棉蚜的寄主转换中存在作用, 推测组织蛋白酶 B 不仅能对卵生昆虫的生殖有调节作用, 对胎生棉蚜尤其是在寄主转换中也具有一定的调节作用, 但其具体功能还需进一步研究和验证。

参考文献 (References)

- Adriaan GJ, Tigges WT, Vpwf De. Host races of *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae) on cucumber and chrysanthemum [J]. *Environmental Entomology*, 1994, 5: 1235 - 1240.
- Berquin IM, Sloane BF. Cathepsin B expression in human tumors [J]. *Springer US*, 1996, 389: 281 - 294.
- Broeders S, Hubre I, Grohmann L, *et al.* Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2014, 37 (2): 115 - 126.
- Cai XY. Functional Analysis of the Core Regulatory Elements of Cathepsin B Gene Promoter in *Bombyx mori* [D]. Zhenjiang: Jiangsu University of Science and Technology Master Thesis, 2014. [蔡翔云. 家蚕组织蛋白酶 B 基因启动子核心调控元件的分析 [D]. 镇江: 江苏科技大学硕士论文, 2014]
- Cao D, Liu Y, Walker WB, *et al.* Molecular characterization of the *Aphis gossypii* factory receptor gene families [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9: e101187.
- Chao WD, Lv ZZ, Zhao L, *et al.* Research progress on life history types and overwintering hosts of *Aphis gossypii* [J]. *Arid Zone Research*, 2019, 36 (6): 1537 - 1549. [晁文娣, 吕昭智, 赵莉, 等. 棉蚜生活史类型及其越冬寄主研究进展 [J]. 干旱区研究, 2019,

- 36 (6): 1537–1549]
- Chen WS, Gu DJ, Li W, *et al.* Study on host specialization of *Myzus persicae* [J]. *South China Agric. Univ.*, 1997, 18 (4): 57–61. [陈文胜, 古德就, 李卫, 等. 烟蚜寄主专化性的研究 [J]. 华南农业大学学报, 1997, 18 (4): 57–61]
- Cho WL, Tsao SM, Hays AR, *et al.* Mosquito Cathepsin B-like protease involved in embryonic degradation of vitellin is produced as a latent extraovarian precursor [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274 (19): 13311–13321.
- De Barro PJ, Sherratt TN, Carvalho GR, *et al.* Geographic and microgeographic genetic differentiation in two aphid species over southern England using the multilocus (GATA) 4 probe [J]. *Molecular Ecology*, 1995, 4 (3): 375–82.
- Du XJ, Shao HL, Shao DD, *et al.* Expression and purification of procathepsin B from *Helicoverpa armigera* in *Escherichia coli* [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2004, 12 (2): 162–166. [杜欣军, 邵红莲, 邵丁丁, 等. 棉铃虫组织蛋白酶 B 酶原在大肠杆菌中的表达及纯化 [J]. 农业生物技术学报, 2004, 12 (2): 162–166]
- Li F, Han ZJ, Wu ZF. Comparison of esterase and acetylcholinesterase of cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover reared on different host plants [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*. 2002, 25 (2): 57–60. [李飞, 韩召军, 吴智锋. 取食不同寄主棉蚜的羧酸酯酶和乙酰胆碱酯酶特性比较 [J]. 南京农业大学学报, 2002, 25 (2): 57–60]
- Li ZQ, Zhang S, Luo JY, *et al.* Ecological adaptation analysis of the cotton aphid *Aphis gossypii* in different phenotypes by transcriptome comparison [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8 (12): e83180.
- Liu RQ, Cai JP, Wang M. Cloning, expression and activity of Cathepsin B in *Eimeria tenella* [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2015, 46 (10): 1838–1843. [刘任强, 蔡建平, 汪明. 柔嫩艾美耳球虫 Cathepsin B 基因的克隆表达及活性研究 [J]. 畜牧兽医学报, 2015, 46 (10): 1838–1843]
- Liu XD, Zhai BP, Zhang XX, *et al.* Differentiation in morphometrics and ecological adaptability of cotton and cucumber biotypes of the cotton aphid, *Aphis gossypii* [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2004, 47 (6): 768–773. [刘向东, 翟保平, 张孝羲, 等. 棉花型和瓜型棉蚜形态和生态适应力的分化 [J]. 昆虫学报, 2004, 47 (6): 768–773]
- Liu XD, Zhang LJ, Zhang XX, *et al.* Studies on cotton aphid *Aphis gossypii* selectivity to host and its host-type [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2002, 22 (8): 1281–1285. [刘向东, 张立建, 张孝羲, 等. 棉蚜对寄主的选择及寄主专化型研究 [J]. 生态学报, 2002, 22 (8): 1281–1285]
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_t} method [J]. *Methods*, 2001, 25: 402–408.
- Luo M, Dong ZY, Bin SY, *et al.* Molecular cloning, prokaryotic expression and expression at different developmental stages of Cathepsin B gene in mealybug *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae) [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2012, 55 (3): 276–283. [罗梅, 董章勇, 宾淑英, 等. 扶桑绵粉蚧组织蛋白酶 B 基因的克隆、原核表达和不同发育阶段表达分析 [J]. 昆虫学报, 2012, 55 (3): 276–283]
- Lv XD, Xiang JQ, Shi QQ, *et al.* Effect of small interfering RNA silencing urokinase-type plasminogen activator receptor and Cathepsin B genes on migration of hepatocellular carcinoma cells and its mechanism [J]. *Guangxi Medical Journal*, 2018, 40 (10): 1186–1191 [吕晓丹, 香基峤, 石清清, 等. 小干扰 RNA 沉默尿激酶型纤溶酶原激活物受体和组织蛋白酶 B 基因对肝癌细胞迁移的影响及其机制 [J]. 广西医学, 2018, 40 (10): 1186–1191]
- Meng L, Li BP, Dong YC. A morphometric analysis on the food-preference forms of cotton aphids in Xinjiang [J]. *Chinese Bulletin of Entomology*, 1998, 35 (6): 326–330. [孟玲, 李保平, 董英才. 新疆棉蚜食物专化型的形态测量分析 [J]. 昆虫知识, 1998, 35 (6): 326–330]
- Meng L, Li BP. Researches on biotypes of cotton aphids in Xinjiang [J]. *Cotton Science*, 2001, 13 (1): 30–35. [孟玲, 李保平. 新疆棉蚜生物型的研究 [J]. 棉花学报, 2001, 13 (1): 30–35]
- Muhetaer mmtazz, Wang D. Advances in host specialization and chemical control of cotton aphid *Aphis gossypii* [J]. *Xinjiang Agricultural Science and Technology*, 2020, 3: 41–44. [麦提艾则孜·穆合塔尔, 王东. 棉蚜的寄主专化型与化学防控研究进展 [J]. 新疆农业科技, 2020, 3: 41–44]
- Ren KY, Zhang S, Luo JY, *et al.* Clone and expression analysis of salivary gland protein C002 in different host-specific types of *Aphis gossypii* Glover [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2018, 40 (3): 617–623. [任柯昱, 张帅, 雒珺瑜, 等. 棉蚜唾液蛋白 C002 基因克隆及在棉蚜不同寄主专化型中的表达分析 [J]. 环境昆虫学报, 2018, 40 (3): 617–623]
- Schreuder HA, Liesum A, Kroll K, *et al.* Crystal structure of Cathepsin A, a novel target for the treatment of cardiovascular diseases [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2014, 445: 451–456.
- Uchida K, Ohmori D, Ueno T, *et al.* Preoviposition activation of cathepsin-like proteinases in degenerating ovarian follicles of the mosquito *Culex pipiens pallens* [J]. *Developmental Biology*, 2001, 237 (1): 68–78.
- Wang GF, Peng DL, Sun JH, *et al.* Cloning and sequence analysis of a new Cathepsin L-like cysteine proteinase gene (Dd-epl-1) from *ditylenchus destructor* [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2011, 27 (1): 60–68. [王高峰, 彭德良, 孙建华, 等. 马铃薯腐烂茎线虫 L 型半胱氨酸蛋白酶新基因 (Dd-epl-1) 的克隆与序列分析 [J]. 生物工程学报, 2011, 27 (1): 60–68]
- Wang L, Zhang S, Luo JY, *et al.* Host biotypes of cotton aphid *Aphis gossypii* Glover and preliminary analysis of the formation mechanism in anyang region of China [J]. *Cotton Science*, 2015, 27 (4): 372–378. [王丽, 张帅, 雒珺瑜, 等. 安阳棉蚜寄主专化型及

- 其形成机制初步分析 [J]. 棉花学报, 2015, 27 (4): 372 - 378]
- Wu W. Effects of Zucchini *Cucurbita zucchini* L. on the Host-Specialization of Cotton Melon Aphid, *Aphis gossypii* Glover [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University Master Thesis, 2013. [吴蔚. 西葫芦寄主对棉蚜寄主专化性的影响 [D]. 南京: 南京农业大学硕士论文, 2013]
- Xie JY, He FQ, Li M, et al. Effects of host plants on the esterase activity of cotton aphid and its sensitivity to insecticides [J]. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 2007, 30 (6): 72 - 76. [谢佳燕, 何凤琴, 李梅, 等. 不同寄主植物对棉蚜酯酶活性及杀虫剂敏感性的影响 [J]. 河北农业大学学报, 2007, 30 (6): 72 - 76]
- Xu XH, Zhang XG, Wang SJ, et al. Effects of Cathepsin B inhibitor CA_074Me on viral myocarditis in mice [J]. *Journal of Clinical Pediatrics*, 2005, 23 (1): 52 - 54, 59. [于小华, 张新刚, 王时俊, 等. 组织蛋白酶 B 抑制剂 CA - 074Me 对小鼠病毒性心肌炎的干预作用 [J]. 临床儿科杂志, 2005, 23 (1): 52 - 54, 59]
- Yang XM. Studies on the Expression and Function of Cathepsin B during Ontogeny of *Armigera* [D]. Jinan: Shandong University Doctoral Thesis, 2005. [杨晓梅. 棉铃虫个体发育过程中组织蛋白酶 B 的表达及功能研究 [D]. 济南: 山东大学博士论文, 2005]
- Zhang S, Luo JY, Wang L, et al. The biotypes and host shifts of cotton-melon aphids *Aphis gossypii* in northern China [J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2018, 17 (9): 2066 - 2073.
- Zhang YC. Regulation Mechanism of Population Density of Primary Symbiotic Bacteria *Buchnera aphidicola* in Cotton Aphid [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University Doctoral Thesis, 2016. [张元臣. 棉蚜体内原生共生菌 *Buchnera aphidicola* 种群密度的调控机制 [D]. 南京: 南京农业大学博士论文, 2016]
- Zhao YY, Liu JB, Luo MH, et al. Cloning, sequence analysis and prokaryotic expression of cathepsin B gene from *Helicoverpa assulta* [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2008, 51 (11): 1121 - 1128. [赵艳艳, 刘建兵, 罗梅浩, 等. 烟夜蛾组织蛋白酶 B 酶原基因的克隆, 序列分析和原核表达 [J]. 昆虫学报, 2008, 51 (11): 1121 - 1128]
- Zheng CL, Liu XD, Zhai BP. The fitness of host biotypes of the cotton aphid *Aphis gossypii* Glover to host plants and their reciprocal transfer pathways [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27 (5): 1879 - 1886. [郑彩玲, 刘向东, 翟保平. 棉花型和黄瓜型棉蚜 *Aphis gossypii* Glover 的寄主适应性及转移通道 [J]. 生态学报, 2007, 27 (5): 1879 - 1886]