



舒本水, 邹燕, 张婉莹, 冯杰, 吴仲真, 林进添. 亚致死浓度吡虫啉和毒死蜱对柑橘木虱成虫组织蛋白酶基因表达的影响 [J]. 环境昆虫学报, 2022, 44 (4): 1027-1036.

## 亚致死浓度吡虫啉和毒死蜱对柑橘木虱成虫组织蛋白酶基因表达的影响

舒本水, 邹燕, 张婉莹, 冯杰, 吴仲真, 林进添\*

(仲恺农业工程学院/广州市亚热带果树重大疫情控制重点实验室, 广州 510225)

**摘要:** 昆虫组织蛋白酶属于多功能酶系, 在昆虫生命活动中具有重要作用, 但昆虫组织蛋白酶对化学农药的响应却鲜有报道。吡虫啉和毒死蜱是目前防治柑橘木虱 *Diaphorina citri* 常用的化学药剂。本研究旨在探究吡虫啉和毒死蜱亚致死浓度处理对柑橘木虱成虫组织蛋白酶基因表达的影响。本研究基于柑橘木虱的转录组数据库, 同时结合 NCBI 数据库, 通过 Blast 比对鉴定得到 8 个柑橘木虱组织蛋白酶基因, 序列分析得出其均属于半胱氨酸蛋白酶家族且含有保守的组氨酸活性位点。研究采用浸叶法处理得到经吡虫啉和毒死蜱处理 24 h 对柑橘木虱成虫的致死中浓度  $LC_{50}$  分别为 97.88 mg/L 和 47.94 mg/L。采用荧光定量 PCR (qPCR) 分析这两种药剂亚致死浓度 ( $LC_{20}$  和  $LC_{50}$ ) 胁迫下柑橘木虱成虫组织蛋白酶基因表达水平变化。结果表明吡虫啉胁迫显著下调柑橘木虱 *DcCath-B*, *DcCath-F*, *DcCath-L* 和 *DcCath-LI* 基因表达量; 毒死蜱  $LC_{20}$  浓度胁迫显著下调柑橘木虱 *DcCath-B*, *DcCath-L* 和 *DcCath-W* 基因表达量,  $LC_{50}$  浓度胁迫下仅 *DcCath-B* 表达量显著下调, 其他基因表达无明显差异。以上结果表明吡虫啉和毒死蜱亚致死浓度胁迫下, 柑橘木虱成虫下调表达体内部分组织蛋白酶基因以响应此逆境。本研究为探索亚致死浓度吡虫啉和毒死蜱对柑橘木虱的毒理机制提供了一定的理论依据。

**关键词:** 柑橘木虱; 组织蛋白酶; 吡虫啉; 毒死蜱; 亚致死浓度; 基因表达量

中图分类号: Q963; S433

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2022) 04-1027-10

### Effects of sublethal doses of imidacloprid and chlorpyrifos on the expression profiles of cathepsins in *Diaphorina citri* Kuwayama

SHU Ben-Shui, ZOU Yan, ZHANG Wan-Ying, FENG Jie, WU Zhong-Zhen, LIN Jin-Tian\* (Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou City Key Laboratory of Subtropical Fruit Tree Pest and Disease Outbreak Control, Guangzhou 510225, China)

**Abstract:** Insect cathepsins are multifunctional enzymes that play important roles in insect life activities. However, the response of cathepsins in insects to pesticides has rarely been reported. By blasting against the transcriptome data and searching the NCBI database, eight *Diaphorina citri* cathepsin genes with conserved histidine active sites were identified in this study. The  $LC_{50}$  values of imidacloprid and chlorpyrifos against the adults of *D. citri* for 24 h were 47.94 mg/L and 97.88 mg/L, respectively. The qPCR results showed that the imidacloprid treatments at the concentrations of  $LC_{20}$  and  $LC_{50}$  significantly down-regulated the expressions of *DcCath-B*, *DcCath-F*, *DcCath-L*, and *DcCath-LI*. mRNA expression levels of *DcCath-B*, *DcCath-L*, and *DcCath-W* were significantly down-regulated in adults with

基金项目: 广东省科技计划项目 (2016B02020009); 广州市民生科技攻关计划项目 (201704020190, 201803020009); 广东省教育厅特色创新项目 (2019KTSCX063); 广州市亚热带果树重大疫情控制重点实验室项目 (201805010008)

作者简介: 舒本水, 男, 1991 年生, 博士, 讲师, 主要研究方向为昆虫毒理学, E-mail: shubenshui@126.com

\* 通讯作者 Author for correspondence: 林进添, 博士, 教授, 主要研究方向为昆虫生理生化, E-mail: linjintian@163.com

收稿日期 Received: 2021-04-12; 接受日期 Accepted: 2021-05-31

chlorpyrifos treatment at the concentration of LC<sub>20</sub>. After treated with chlorpyrifos at the concentration of LC<sub>50</sub>, the expression level of *DcCath-B* was significantly down-regulated, while the other seven cathepsin genes were changed with no significance. The results showed that some cathepsins of *D. citri* down-regulated the mRNA expression in response to sublethal concentration treatments of imidacloprid and chlorpyrifos. This study provided a theoretical basis for exploring the toxicological mechanism of imidacloprid and chlorpyrifos on *D. citri*.

**Key words:** *Diaphorina citri*; cathepsin; imidacloprid; chlorpyrifos; sublethal concentration; gene expression level

柑橘木虱 *Diaphorina citri* Kuwayama 属于半翅目 Hemiptera 木虱科 Psyllidae 昆虫, 是一种全球性的重要柑橘害虫。其为害柑橘的方式多种多样, 其中最主要的为害方式是作为韧皮部杆菌属类细菌-柑橘黄龙病菌 *Candidatus liberibacter* spp. 的传播媒介, 引起柑橘黄龙病 (Huanglongbing) 在柑橘植株间的传播与流行, 对柑橘产业造成巨大的经济损失 (Bové, 2006)。柑橘木虱高龄若虫及成虫取食带毒植株韧皮部汁液后均能获取黄龙病菌, 且病原菌能够在柑橘木虱体内进行繁殖 (Arp *et al.*, 2016; 江宏燕等, 2018)。成虫带毒后转株为害时将黄龙病菌通过口针注入健康植株韧皮部, 导致病菌在植株间传播 (陈梦瑶等, 2019; 王飞凤等, 2020)。黄龙病菌侵染植物后初期树冠新梢叶片出现黄化、斑驳等症状, 随后植物生长势衰退, 水果品质下降, 产量锐减, 寿命缩短, 最终整株死亡 (Kishk *et al.*, 2017; 乌天宇等, 2020)。此外, 柑橘木虱还能通过直接取食植物韧皮部汁液造成植物营养丢失; 排泄蜜露于植物叶片诱发霉菌生长及阻碍植物光合作用等方式影响柑橘的正常生长发育 (舒本水等, 2020)。由于尚未发现针对柑橘黄龙病菌特效药, 因此通过控制柑橘木虱种群数量以减缓黄龙病的传播是当前全球范围内防治柑橘黄龙病最主要的方法之一 (Grafton-Cardwell *et al.*, 2013)。而目前控制柑橘木虱数量发生最为直接有效的方法是化学防治。生产上最常用的化学杀虫剂包括有机磷类、新烟碱类、氨基甲酸酯类、拟除虫菊酯类、阿维菌素类及一些生物源农药 (田发军等, 2018)。在杀虫剂的施用过程中, 除直接杀死靶标害虫外, 由于害虫个体接触药剂剂量的差异、时间推移及环境因素引起的农药降解导致部分存活个体表现出亚致死效应, 其在生长发育、繁殖以及抗药性等方面均会发生显著变化 (宋亮等, 2003; 李志雄等, 2020)。在农药亚致死浓度胁迫下, 害虫常通过调控自身的生理

生化反应等策略进行响应 (张莉娅等, 2021)。

组织蛋白酶 (Cathepsins) 是一类存在于溶酶体中的胞内蛋白酶, 最初以酶原的形式在核糖体合成, 随后被铁转运蛋白转移至内质网和高尔基体并通过糖基化和磷酸化形成甘露糖-6-磷酸蛋白, 然后被溶酶体上的甘露糖-6-磷酸特异性受体识别, 转运至溶酶体中, 在酸性环境下水解成为具有活性的成熟组织蛋白酶 (潘光照, 2018)。根据活性中心氨基酸残基可将组织蛋白酶分为 3 大类: 半胱氨酸蛋白酶 (包括组织蛋白酶 B、F、H、L、K、O、S、T、V、X 和 W), 天冬氨酸蛋白酶 (组织蛋白酶 D 和 E) 以及丝氨酸蛋白酶 (组织蛋白酶 A 和 G) (Sun *et al.*, 2018)。目前在多种昆虫中已鉴定出不同种类的组织蛋白酶, 进一步功能分析发现组织蛋白酶属于多功能蛋白酶系, 在昆虫蛋白降解、生长发育及响应不利刺激等多个生理过程中具有重要作用 (Saikhedkar *et al.*, 2015)。例如: 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 组织蛋白酶 B 在胚胎发育过程中参与卵黄蛋白的降解; 而组织蛋白酶 L 可能参与食物蛋白消化 (Medina *et al.*, 1988; Matsumoto *et al.*, 1995)。棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 组织蛋白酶 HaCat L 被证实通过裂解激活 Ha-caspase-1 促进中肠细胞凋亡, 进而参与棉铃虫变态发育过程幼虫中肠降解以及蛹和成虫中肠重建 (Yang *et al.*, 2017)。家蚕 *Bombyx mori* 化蛹过程中蜕皮激素 20E 上调组织蛋白酶 BmCatB, BmCatD, BmCatL1 和 BmCatL2 的表达, 加速脂肪体的破坏 (Guo *et al.*, 2018)。家蚕和柞蚕 *Antheraea pernyi* 组织蛋白酶 O 参与对大肠杆菌 *Escherichia coli* 的应激反应, 推测其在两种昆虫的先天免疫系统中具有重要作用 (Zhang *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2017)。

目前柑橘木虱中已鉴定出多种组织蛋白酶, 如 *DcCath-B*, *DcCath-L*, *DcCath-L1* 和 *DcCath-O* 等。时空表达分析结果表明 *DcCath B* 在若虫、成

虫期及肠道组织中高表达, 推测其可能具有消化功能 (Ferrara *et al.*, 2015)。而 *DcCath-L* 和 *DcCath-O* 同样被证实在中肠组织中高表达。采用热杀死的两种细菌 (大肠杆菌和金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*) 及黄龙病菌 *CLas* 侵染木虱后 *DcCath-L* 和 *DcCath-O* 基因表达量显著上调, 推测两种组织蛋白酶可能参与柑橘木虱免疫反应 (Yu *et al.*, 2019)。*DcCath-L1* 在卵中的表达量高于若虫和成虫, 推测其可能参与胚胎发育。进一步研究发现 4 种重组的柑橘半胱氨酸蛋白酶抑制剂中 *CsinCPI-2* 对 *DcCath-L1* 活性抑制效果最强 (Ferrara *et al.*, 2020)。吡虫啉和毒死蜱是柑橘园中应用较广的杀虫剂, 目前尚未报道吡虫啉和毒死蜱对柑橘木虱组织蛋白酶的影响相关研究。为明确农药亚致死浓度对柑橘木虱组织蛋白酶基因的影响, 本研究选用吡虫啉和毒死蜱作为供试药剂, 通过生物活性测定方法得到两种药剂的亚致死浓度, 结合转录组和 NCBI 数据库鉴定得到柑橘木虱组织蛋白酶家族基因, 荧光定量 PCR 比较分析两种药剂亚致死浓度对柑橘木虱多种组织蛋白酶基因转录水平表达量的影响, 为进一步探究昆虫组织蛋白酶基因功能提供一定的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试柑橘木虱成虫

本实验使用的柑橘木虱成虫为实验室饲养种群, 以九里香 *Murraya exotica* 植株为其寄主植物进行长期饲养并未接触化学药剂, 饲养条件: 温度  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , 相对湿度  $65\% \pm 5\%$ , 光周期 12 h: 12 h。

### 1.2 供试试剂及主要仪器

吡虫啉原药来源于佛山盈辉作物科学有限公司; 毒死蜱原药 (97%) 来源于浙江东风化工有限公司; RNAiso plus 购于 TaKaRa 公司; 逆转录试剂盒 FastKing RT Kit (With gDNase) 购于天根生化科技 (北京) 有限公司; 荧光定量 PCR SuperMix 购于 TransGen Biotech 公司; 人工气候箱购于上海莫托斯科学仪器有限公司, 荧光定量 PCR 仪购于 Roche 公司。

### 1.3 室内毒力测定

将两种原药采用丙酮进行溶解, 用含有 0.05% Triton X-100 的无菌水分别稀释为 6 个浓度梯度 (25, 50, 100, 150, 200 和 250 mg/L)。取新鲜的九里香枝条洗净后侵入药液中 10 s 后取出,

室温晾干 1 h。将晾干的九里香枝条固定于 9 cm 培养皿中, 采用吸水的棉花保湿并置于直径约 10 cm, 高 7.3 cm 的圆形塑料盒中。然后再每盒接入 50 头柑橘木虱成虫, 每个浓度进行 3 次重复。24 h 后体视镜下检查成虫死亡情况, 毛笔轻触虫体无活动则视为死亡。采用 Probit 软件进行毒力曲线构建并计算  $LC_{20}$  和  $LC_{50}$  值。

### 1.4 亚致死浓度处理柑橘木虱成虫

具体处理方法同步骤 1.3。采用吡虫啉和毒死蜱  $LC_{20}$  和  $LC_{50}$  浓度处理柑橘木虱成虫 24 h, 以含有 0.05% Triton X-100 的无菌水处理的九里香枝条饲喂的柑橘木虱成虫作为对照。处理 24 h 后收集存活的成虫至新的离心管中, 液氮速冻后置于  $-80^\circ\text{C}$  保存备用。

### 1.5 柑橘木虱组织蛋白酶基因鉴定及序列分析

通过 NCBI 数据库进行柑橘木虱组织蛋白酶基因搜索, 同时对柑橘木虱转录组数据进行 Blast 比对, 鉴定出柑橘木虱组织蛋白酶基因。采用 DNAMAN 软件对鉴定得到的柑橘木虱组织蛋白酶基因蛋白序列进行比对分析。

### 1.6 RNA 提取及 cDNA 合成

将 1.4 中收集的成虫采用组织研磨器进行研磨后加入 RNAiso plus 试剂进行裂解, 然后根据 RNA 提取说明书进行柑橘木虱成虫总 RNA 提取。采用 Nano-100 超微量分光光度计 (ALLSHENG 公司) 测定各个样品总 RNA 纯度和浓度。选取等量的总 RNA, 采用 FastKing RT Kit (With gDNase) 进行反转录。在 PCR 管中配制基因组 DNA 去除体系混合液:  $5 \times \text{gDNA Buffer } 2.0 \mu\text{L}$ , 总 RNA  $2.0 \mu\text{g}$ , 加 RNase-Free  $\text{ddH}_2\text{O}$  补足  $10.0 \mu\text{L}$ 。42 $^\circ\text{C}$  孵育 2 min 后冰上放置。然后配制反转录反应体系混合液:  $10 \times \text{King RT Buffer } 2.0 \mu\text{L}$ , FastKing RT Enzyme  $1.0 \mu\text{L}$ , Mix FQ-RT Primer Mix  $2.0 \mu\text{L}$ , 加 RNase-Free  $\text{ddH}_2\text{O}$  补足  $10.0 \mu\text{L}$ 。混匀后将反转录反应体系混合液加入基因组 DNA 去除体系混合液中混匀, 置于 PCR 仪中 42 $^\circ\text{C}$ , 15 min, 95 $^\circ\text{C}$ , 3 min 孵育。合成的 cDNA 置于  $-20^\circ\text{C}$  保存。

### 1.7 荧光定量 PCR

根据所得的 8 个柑橘木虱组织蛋白酶核苷酸序列设计荧光定量 PCR 引物并送英潍捷基 (上海) 贸易有限公司进行合成。具体引物序列详见表 1。以上述合成的 cDNA 稀释 5 倍作为模板进行荧光定量 PCR 反应。于 384 微孔 PCR 板上配置  $10.0 \mu\text{L}$  反应体系: TransStart Tip Green qPCR SuperMix

5.0  $\mu\text{L}$ , cDNA 1.0  $\mu\text{L}$ , 基因上下游引物各 0.5  $\mu\text{L}$ , 加 ddH<sub>2</sub>O 补足 10.0  $\mu\text{L}$ , 混匀并简短离心后置于荧光定量 PCR 仪进行反应。每个 cDNA 模板设置 3 个技术重复。反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$  变性 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$  10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$  10 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  10 s 循环 45 次; 最后

熔解曲线范围为 65 $^{\circ}\text{C}$  ~ 95 $^{\circ}\text{C}$ 。选取柑橘木虱 *EF1 $\alpha$*  (XM\_008479903.1) 和 *RPL13* (DQ675552.1) 作为内参基因对荧光定量 PCR 结果进行校正, 采用 2<sup>- $\Delta\Delta\text{Ct}$</sup>  法分析两种化学药剂亚致死浓度胁迫下柑橘木虱成虫 8 种组织蛋白酶转录水平变化。

表 1 本研究所用的引物序列信息

Table 1 Sequence information of primers used in this study

基因名 Gene name	GenBank 登录号 GenBank accession no.	引物序列 (5'-3') Primer sequence	
<i>Cathepsin B</i>	NM_001329180.1	F: CGGTTTGTTCGGTATCGTTGG	R: TGATCCTCGTCTGATTTCGTCC
<i>Cathepsin F</i>	XM_008486371.3	F: GTTTTCCTTCTATGCGGTGTTG	R: CGTGCTTCTTATGTCCGTCCT
<i>Cathepsin L</i>	XM_008481794.3	F: TTTTCATCTTTTATGCTGGTGGG	R: GGGTGGCATAGGTTTTGTGTGT
<i>Cathepsin LI</i>	XM_008486370.3	F: GTTTTCCTTCTATGCGGTGTTG	R: CGTGCTTCTTATGTCCGTCCT
<i>Cathepsin K</i>	XM_008486369.2	F: GAATGTGCCAAACAGTGTAGCG	R: CCGTTGAAATGCAGGAAGTCT
<i>Cathepsin O</i>	XM_008481895.3	F: GTGGCGTTGATAGCGTTGTG	R: CGGGAGATTGGCGGTTTT
<i>Cathepsin H</i>	-	F: AAATACCATCCGCAACCTCC	R: TTCGCCCTTCTCTCCCAT
<i>Cathepsin W</i>	XM_008488035.2	F: TTTGGACCAGGTTGACATTTTG	R: TGCAGTGAGAAGGTGGGGAG
<i>EF1<math>\alpha</math></i>	XM_008479903.1	F: GTGCCTGATTGAAGCTCTCG	R: GCATCTCGACGGATTTCACC
<i>RPL13A</i>	DQ675552.1	F: CACAAGTTGGACCGTGGTG	R: CCTCGTGTGAAATTCTGCC

## 1.8 数据分析

试验数据以“平均值  $\pm$  标准误 (SE)”表示。采用 SPSS 17.0 软件对组织蛋白酶表达量数据进行单因素方差分析, 多重检验法 (DMRT 法) 进行差异显著性分析 ( $P < 0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 吡虫啉和毒死蜱对柑橘木虱成虫的亚致死浓度测定

室内毒力测试结果表明, 吡虫啉对柑橘木虱成虫 24 h 的 LC<sub>20</sub> 和 LC<sub>50</sub> 值分别为 14.19 mg/L 和 97.88 mg/L; 毒死蜱对柑橘木虱成虫的 LC<sub>20</sub> 和 LC<sub>50</sub> 值分别为 3.73 mg/L 和 47.94 mg/L (表 2)。

### 2.2 柑橘木虱组织蛋白酶氨基酸序列比对及发育进化分析

通过 Blast 比对, 本研究于柑橘木虱成虫转录组及 NCBI 数据库中得到 8 个组织蛋白酶基因, 分别为 *DcCath-B*, *DcCath-F*, *DcCath-H*, *DcCath-K*, *DcCath-L*, *DcCath-LI*, *DcCath-O* 和 *DcCath-W*, 均属于半胱氨酸蛋白酶。其中 *DcCath-H* 来源于柑橘木虱转录组数据, 其他 7 个基因来源于 NCBI 数据

库。序列分析发现 7 个组织蛋白酶基因均包含完整的编码区, 仅 *DcCath-W* 为部分序列。氨基酸序列比对结果表明 *DcCath-B*, *DcCath-F*, *DcCath-H*, *DcCath-K*, *DcCath-L*, *DcCath-LI* 及 *DcCath-O* 均含有不同长度的信号肽。同时 7 种组织蛋白酶均含有保守的组氨酸活性位点, 且 Cys-His-Asn (C-H-N) 催化三联体的氨基酸残基在所有的组织蛋白酶中均高度保守 (图 1)。

### 2.3 吡虫啉亚致死浓度对柑橘木虱成虫组织蛋白酶表达量的影响

吡虫啉 LC<sub>20</sub> 和 LC<sub>50</sub> 浓度处理柑橘木虱成虫 24 h 后检测 8 种组织蛋白酶转录水平表达量变化。吡虫啉亚致死浓度胁迫后, 柑橘木虱成虫 4 种组织蛋白酶 *DcCath-H*, *DcCath-K*, *DcCath-O* 和 *DcCath-W* 基因表达水平无显著变化; 而 *DcCath-B*, *DcCath-F*, *DcCath-L* 和 *DcCath-LI* 基因表达量显著降低。其中 LC<sub>20</sub> 处理 24 h 后 *DcCath-B*, *DcCath-L* 和 *DcCath-LI* 表达量分别下调 72.64%, 18.67% 和 13.53%。LC<sub>50</sub> 浓度处理柑橘木虱成虫 24 h 后 *DcCath-B*, *DcCath-F*, *DcCath-L* 和 *DcCath-LI* 表达量分别下调 64.65%, 36.84%, 15.27% 和 37.59% (图 2)。

表 2 吡虫啉和毒死蜱对柑橘木虱成虫的室内毒力测定结果  
Table 2 Toxicity of imidacloprid and chlorpyrifos against *Diaphorina citri* adults

农药 Pesticide	回归线性拟合方程 Regression linear fitting equation	LC <sub>50</sub> ( mg/L)	LC <sub>20</sub> ( mg/L)	相关系数 R <sup>2</sup> Correlation index
吡虫啉 Imidacloprid	$Y = 1.0034 X + 3.0026$	97.88	14.19	0.9888
毒死蜱 Chlorpyrifos	$Y = 0.7588 X + 3.7246$	47.94	3.73	0.9847

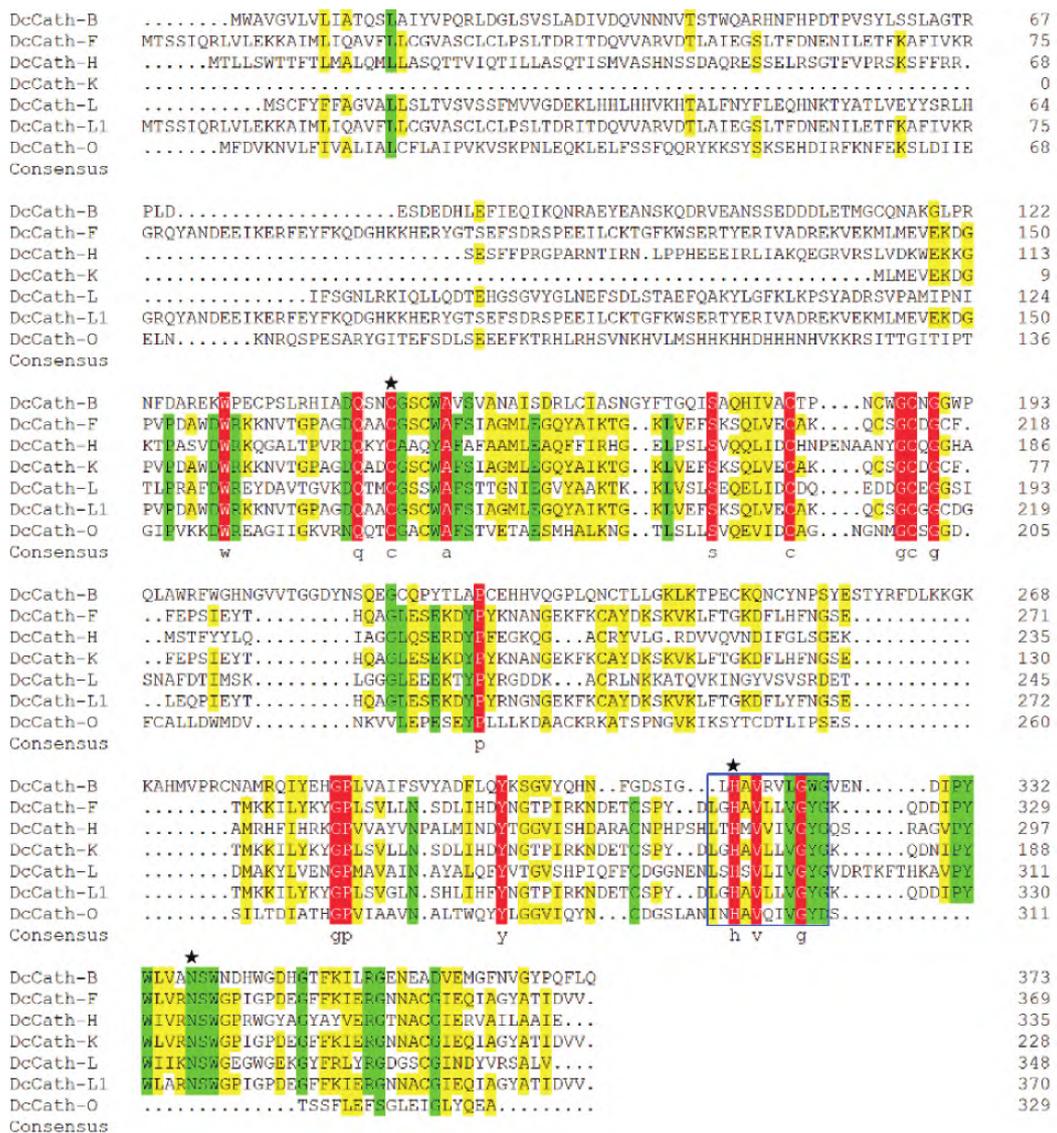


图 1 柑橘木虱 7 种组织蛋白酶氨基酸序列比对

Fig. 1 Amino acid sequence alignment of 7 cathepsins identified from *Diaphorina citri*

注: 蓝色框区域为组氨酸活性位点, 星号表示 Cys-His-Asn (C-H-N) 催化三联体的氨基酸残基。红色氨基酸残基表示该氨基酸完全保守; 绿色表示高度保守, 黄色表示中度保守。Note: Blue box area was the histidine active site, the amino acid residues of the Cys-His-Asn catalytic triad were indicated by asterisks (★). Red amino acid residues indicated that the amino acid was completely conserved; green meant highly conserved, and yellow meant moderately conserved.

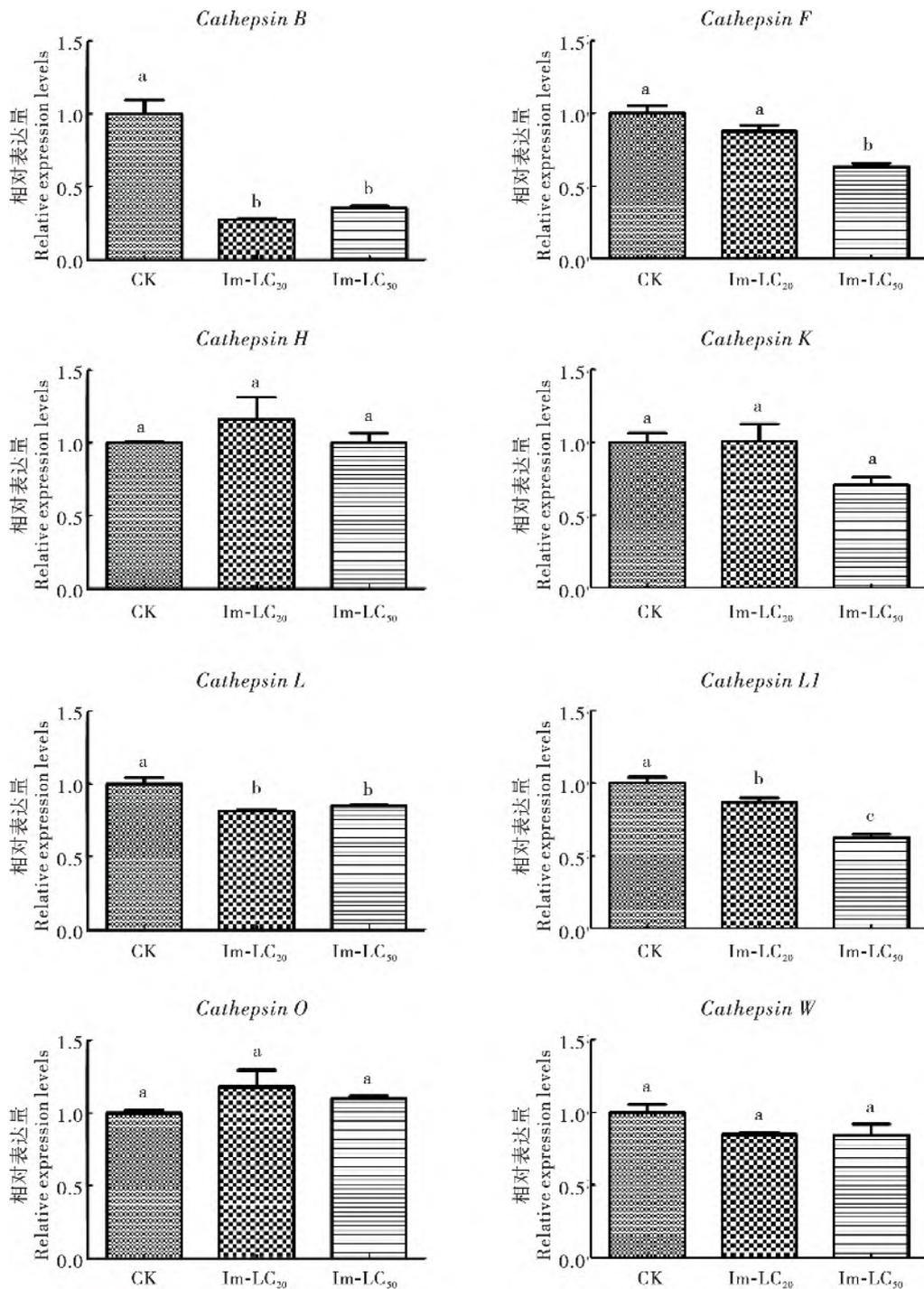


图2 吡虫啉亚致死浓度对柑橘木虱成虫组织蛋白酶基因表达水平的影响

Fig. 2 Effect of imidacloprid with sublethal concentration treatments on the mRNA expression level of eight cathepsins in *Diaphorina citri* adults

注: CK, 对照组; Im-LC<sub>20</sub>, 吡虫啉 LC<sub>20</sub> 浓度处理组; Im-LC<sub>50</sub>, 吡虫啉 LC<sub>50</sub> 浓度处理组。Note: CK, Control group; Im-LC<sub>20</sub>, Imidacloprid treatment group under LC<sub>20</sub> concentration; Im-LC<sub>50</sub>, Imidacloprid treatment group under LC<sub>50</sub> concentration.

#### 2.4 毒死蜱亚致死浓度对柑橘木虱成虫组织蛋白酶表达量的影响

毒死蜱 LC<sub>20</sub> 和 LC<sub>50</sub> 浓度处理柑橘木虱成虫

24 h 后对 8 种组织蛋白酶 mRNA 水平表达量变化进行检测。毒死蜱亚致死浓度对柑橘木虱成虫 5 种组织蛋白酶 *DcCath-F*, *DcCath-H*, *DcCath-K*,

*DcCath-L1* 和 *DcCath-O* 基因水平表达量无显著影响; 而 *DcCath-B*, *DcCath-L* 和 *DcCath-W* 基因表达量显著下调。其中  $LC_{20}$  处理 24 h 后 *DcCath-B*, *DcCath-L* 和 *DcCath-W* mRNA 水平表达量分别下调

73.47%, 24.23% 和 34.37%。 $LC_{50}$  浓度处理柑橘木虱成虫 24 h 后 *DcCath-B* 表达量下调 69.51% (图 3)。

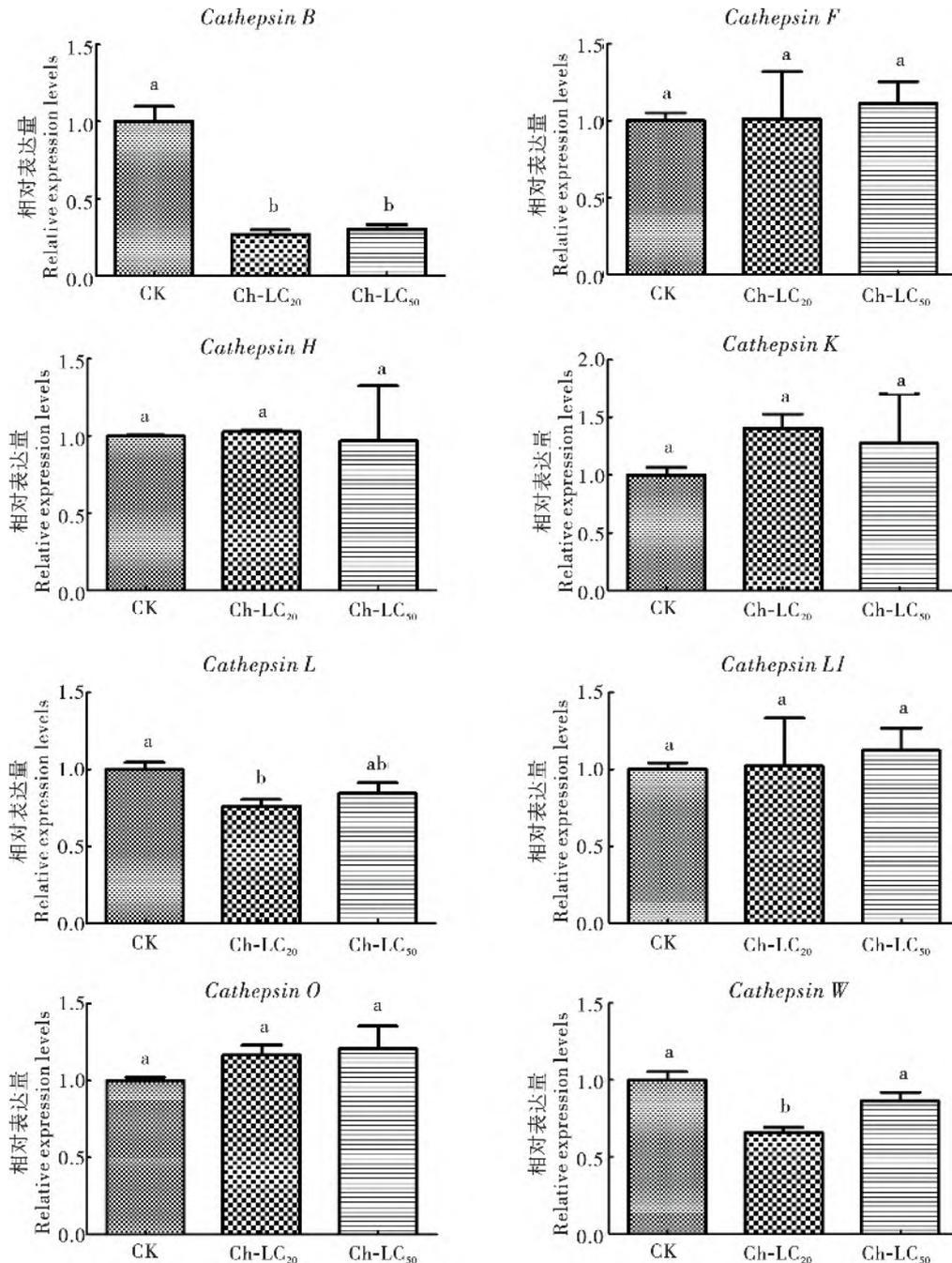


图 3 毒死蜱亚致死浓度对柑橘木虱成虫组织蛋白酶基因转录水平的影响

Fig. 3 Effect of chlorpyrifos with sublethal concentration treatments on the mRNA expression level of eight cathepsins in *Diaphorina citri* adults

注: CK, 对照组; Ch-LC<sub>20</sub>, 毒死蜱  $LC_{20}$  浓度处理组; Ch-LC<sub>50</sub>, 毒死蜱  $LC_{50}$  浓度处理组。Note: CK, Control group; Ch-LC<sub>20</sub>, Chlorpyrifos treatment group under  $LC_{20}$  concentration; I Ch-LC<sub>50</sub>, Chlorpyrifos treatment group under  $LC_{50}$  concentration.

### 3 结论与讨论

柑橘木虱是柑橘黄龙病的主要传播媒介, 其种群扩散对柑橘产业的发展造成严重威胁。目前化学防治是防治柑橘木虱的主要手段之一 (曹旭等, 2020)。有机磷类、拟除虫菊酯类、新烟碱类等广谱性杀虫剂以及应用于滴灌及树干施用的杀虫剂是目前田间防控柑橘木虱的常用药剂 (Liu *et al.*, 2020)。本研究采用新烟碱类杀虫剂吡虫啉和有机磷类杀虫剂毒死蜱对柑橘木虱成虫进行毒力测定, 结果表明吡虫啉对柑橘木虱成虫的室内毒力较毒死蜱差, 可能与药剂作用方式及调查统计时间较短 (24 h) 有关。

组织蛋白酶是生命有机体溶酶体中重要的水解酶系, 在哺乳动物和人中的研究较为透彻, 但到目前为止仅有少数昆虫组织蛋白酶基因得到充分鉴定。例如: 通过对家蚕 SilkDB 数据库进行筛选, 共鉴定得到 13 条组织蛋白酶基因, 进一步分析结果表明这些基因分别属于 *Cath-B*, *Cath-F*, *Cath-L*, *Cath-K* 和 *Cath-O* 5 种组织蛋白酶基因类型 (李懿等, 2015)。通过转录组测序结合克隆方法在二化螟 *Chilo suppressalis* 中鉴定得到 8 个组织蛋白酶基因, 序列分析发现其分别属于 *Cath-B*, *Cath-F*, *Cath-L* 和 *Cath-O* 基因类型 (Ge *et al.*, 2014)。Martynov *et al.* (2015) 通过基因组结合转录组分析在黄粉虫 *Tenebrio molitor* 和赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 中分别鉴定得到 29 和 25 个组织蛋白酶基因, 其中黄粉虫组织蛋白酶基因分属于 *Cath-B*, *Cath-F*, *Cath-L* 和 *Cath-O*, 而在赤拟谷盗中除上述 4 种类型基因外还鉴定得到 1 个 *Cath-K* 基因 (Martynov *et al.*, 2015)。目前柑橘木虱中已报道的组织蛋白酶基因仅有 4 种, 分别为 *DcCath-B*, *DcCath-L*, *DcCath-L1* 和 *DcCath-O*。本研究通过 NCBI 数据库搜索及转录组数据 Blast 比对共得到 8 个柑橘木虱组织蛋白酶基因, 其中具有完整编码区的 7 个蛋白均含有保守的 Cys-His-Asn (C-H-N) 催化三联体的氨基酸残基以保证功能的保守性。这为后续进一步深入探究柑橘木虱组织蛋白酶信息及功能, 并以其作为农药新靶标提供理论基础。研究发现组织蛋白酶在昆虫生长发育、消化、繁殖、变态及免疫防御等生命过程中发挥重要作用 (Saikhedkar *et al.*, 2015)。通过 RNAi 等技术抑制或干扰组织蛋白酶基因的表达导

致昆虫生长发育异常及死亡等现象发生。例如家蚕中沉默 *BmCath-B* 或 *BmCath-D* 均会导致变态过程中的化蛹延迟或异常 (Gui *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2010)。甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 5 龄幼虫经 dsRNA-*ScCath-D* 处理后化蛹出现异常且死亡率高达 25% (Kang *et al.*, 2017)。植物介导的 RNAi 对桃蚜 *Myzus persicae* 组织蛋白酶基因 *MpCath-L* 进行沉默后桃蚜成虫死亡率达到 80%, 同时成虫繁殖率显著降低且若虫发育延缓 (Rauf *et al.*, 2019)。在后期的防治中, 可通过 RNAi 等技术对柑橘木虱各组织蛋白酶基因进行人为的干预, 通过抑制其活性来改变柑橘木虱的生长发育等生理过程, 进而达到防治效果。

另外, 作为一类多功能酶系, 昆虫组织蛋白酶同样参与昆虫对外界压力的响应 (Saikhedkar *et al.*, 2015; 吴凡等, 2017)。研究表明高温胁迫诱导昆虫组织蛋白酶上调表达。例如, 家蚕 5 龄幼虫高温 (28℃) 处理后化蛹过程明显快于对照组 (23℃), northern blot 结果表明高温处理组 *Bm-Cath-D* 表达量显著高于对照组, 推测 *Bm-Cath-D* 在高温胁迫下对家蚕加速化蛹过程具有重要作用 (Kim *et al.*, 2011)。柑橘木虱成虫受高温 (40℃) 胁迫时组织蛋白酶 *DcCath-B*, *DcCath-F*, *DcCath-L* 转录水平同样显著上调表达 (Shu *et al.*, 2020)。此外, 昆虫组织蛋白酶在病毒侵染昆虫过程中具有重要作用。登革热病毒 (DENV) 侵染埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 过程中, 唾液腺和中肠 *AaCath-L* 的表达量与登革热病毒 DENV2 效价呈负相关, 而在埃及伊蚊 3 个品系 (Cali-S, Cali-MIB 及 Rockefeller) 中采用 dsRNA 干扰 *AaCath-B* 的表达则能够显著降低 DENV2 侵入的埃及伊蚊比例 (Caicedo *et al.*, 2019; Oliveira *et al.*, 2020)。再者, 昆虫组织蛋白酶参与昆虫对杀虫剂的响应。例如苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* Berliner (*Bt*) 亚致死浓度处理松墨天牛 *Monochamus alternatus* Hope 20 h 后组织蛋白酶基因 *MaCath-L* 下调表达 (Lin *et al.*, 2016)。进一步研究发现 *Bt* 产生的 Cry 毒素通过促进桃蚜组织蛋白酶 *MpCath-B* 的活性发挥毒性 (Zhao *et al.*, 2020)。而印楝素 A 饲喂桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis* 7 d 中肠组织蛋白酶基因 *BdCath-D*, *BdCath-F* 和 *BdCath-L* 则显著上调表达, 推测 3 种组织蛋白酶可能在印楝素诱导桔小实蝇中肠组织细胞凋亡中发挥重要作用 (Zhao *et al.*, 2019)。本研究通过室内毒力测定得到吡虫啉和毒死蜱对

柑橘木虱成虫的亚致死浓度  $LC_{20}$  和  $LC_{50}$ , 并采用荧光定量 PCR 技术检测组织蛋白酶在亚致死浓度下 mRNA 表达水平的变化。结果表明部分组织蛋白酶基因在吡虫啉和毒死蜱亚致死浓度胁迫下转录水平表达量显著下调, 其中 *DcCath-B* 转录水平表达量受亚致死浓度吡虫啉和毒死蜱影响最大, 推测两种药剂可能扮演 *DcCath-B* 抑制剂调控组织蛋白酶的变化, 从而发挥对柑橘木虱成虫的毒性。

综上, 本研究通过转录组数据及 NCBI 数据库鉴定出 8 种柑橘木虱组织蛋白酶基因, 为设计以组织蛋白酶为新作用靶标的柑橘木虱防控新型农药创制提供相应的序列信息。同时本研究从转录水平探究了亚致死浓度吡虫啉和毒死蜱胁迫对柑橘木虱成虫组织蛋白酶基因表达的影响。以上研究结果为探究亚致死浓度吡虫啉和毒死蜱对柑橘木虱的毒理机制提供一定的理论基础。具体柑橘木虱组织蛋白酶在柑橘木虱响应亚致死浓度吡虫啉和毒死蜱过程中的功能仍需进一步研究。

### 参考文献 (References)

- Arp AP, Hunter WB, Pelz-Stelinski KS. Annotation of the Asian citrus psyllid genome reveals a reduced innate immune system [J]. *Frontiers in Physiology*, 2016, 7: 570.
- Bové JM. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus [J]. *Journal of Plant Pathology*, 2006, 88 (1): 7-37.
- Caicedo PA, Serrato IM, Sim S, et al. Immune response-related genes associated to blocking midgut dengue virus infection in *Aedes aegypti* strains that differ in susceptibility [J]. *Insect Science*, 2019, 26 (4): 635-648.
- Cao X, Liu X, Huang LY, et al. Review of the behavioral responses of *Diaphorina citri* to olfactory, visual and pheromonal cues, and prospects for the application of such cues to the control of this pest [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2020, 57 (6): 1261-1269. [曹旭, 刘秀, 黄琳雅, 等. 柑橘木虱趋性行为及其应用展望 [J]. 应用昆虫学报, 2020, 57 (6): 1261-1269]
- Chen MY, Cao Z, He K, et al. Differential expression analysis and validation of lncRNA between Asian citrus psyllid and *Candidatus liberibacter asiaticus* interaction [J]. *Journal of Plant Protection*, 2019, 46 (6): 1252-1261. [陈梦瑶, 曹征鸿, 贺康, 等. lncRNA 在柑橘木虱与黄龙病病原菌互作中的差异表达分析及验证 [J]. 植物保护学报, 2019, 46 (6): 1252-1261]
- Ferrara TF, Schneider VK, Kishi LT, et al. Characterization of a recombinant cathepsin B-like cysteine peptidase from *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae): A putative target for control of citrus huanglongbing [J]. *PLoS ONE*, 2015, 10 (12): e0145132.
- Ferrara TFS, Schneider VK, Lima PS, et al. Gene expression studies and molecular characterization of a cathepsin L-like from the Asian citrus psyllid *Diaphorina citri*, vector of huanglongbing [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 158: 375-383.
- Ge ZY, Wan PJ, Li GQ, et al. Characterization of cysteine protease-like genes in the striped rice stem borer, *Chilo suppressalis* [J]. *Genome*, 2014, 57 (2): 79-88.
- Grafton-Cardwell EE, Stelinski LL, Stansly PA. Biology and management of Asian citrus psyllid, vector of the huanglongbing pathogens [J]. *Annual Review of Entomology*, 2013, 58: 413-432.
- Gui ZZ, Lee KS, Kim BY, et al. Functional role of aspartic proteinase cathepsin D in insect metamorphosis [J]. *BMC Developmental Biology*, 2006, 6: 49.
- Guo SY, Wu WM, Li SY, et al. 20-hydroxyecdysone-upregulated proteases involved in *Bombyx* larval fat body destruction [J]. *Insect Molecular Biology*, 2018, 27 (6): 724-238.
- Jiang HY, Wu FN, Wang YJ, et al. Research advances on the origin, distribution and dispersal of the Asian citrus psyllid (*Diaphorina citri* Kuwayama) [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2018, 40 (5): 1014-1020. [江宏燕, 吴丰年, 王妍晶, 等. 亚洲柑橘木虱的起源、分布和扩散能力研究进展 [J]. 环境昆虫学报, 2018, 40 (5): 1014-1020]
- Kang TH, Jin RH, Zhang YH, et al. Functional characterization of the aspartic proteinase cathepsin D in the beet armyworm (*Spodoptera exigua*) [J]. *Gene*, 2017, 617: 1-7.
- Kim BY, Lee KS, Sohn MR, et al. *Bombyx mori* cathepsin D expression is induced by high temperature and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure [J]. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 2011, 14 (3): 285-288.
- Kishk A, Hijaz F, Anber HAI, et al. RNA interference of acetylcholinesterase in the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, increases its susceptibility to carbamate and organophosphate insecticides [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2017, 143: 81-89.
- Li Y, Zhou XY, Li ZL, et al. Identification and expression pattern of cathepsin family in silkworm (*Bombyx mori*) [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2015, 31 (12): 1728-1740. [李懿, 周小英, 黎治浪, 等. 家蚕组织蛋白酶基因家族的鉴定及表达特征分析 [J]. 生物工程学报, 2015, 31 (12): 1728-1740]
- Li ZX, Wei YD, Cao W, et al. Effects of matrine and veratrine sublethal doses on growth, development and reproduction of cotton aphids [J]. *Agrochemicals*, 2020, 59 (12): 880-884. [李志雄, 魏引弟, 曹巍, 等. 苦参碱和藜芦碱亚致死剂量对棉花蚜虫生长发育及繁殖的影响 [J]. 农药, 2020, 59 (12): 880-884]
- Lin T, Cai ZL, Wu HJ, et al. Changes in midgut gene expression following *Bacillus thuringiensis* (Bacillales: Bacillaceae) infection in *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) [J]. *Florida Entomologist*, 2016, 99 (1): 60-66.
- Liu XQ, Jiang HB, Liu Y, et al. Odorant binding protein 2 reduces imidacloprid susceptibility of *Diaphorina citri* [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2020, 168: 104642.
- Martynov AG, Elpidina EN, Perkin L, et al. Functional analysis of Cl

- family cysteine peptidases in the larval gut of *Tenebrio molitor* and *Tribolium castaneum* [J]. *BMC Genomics*, 2015, 16 (1): 75.
- Matsumoto L, Watanabe H, Abe K, et al. Putative digestive cysteine proteinase from *Drosophila melanogaster* is predominantly expressed in the embryonic and larval midgut [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1995, 227 (1-2): 582-587.
- Medina M, Leon P, Vallejo CG. *Drosophila* cathepsin-B-like proteinase—a suggested role in yolk degradation [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1988, 263 (2): 355-363.
- Oliveira FAA, Buri MV, Rodríguez BL, et al. The first characterization of a cystatin and a cathepsin L-like peptidase from *Aedes aegypti* and their possible role in DENV infection by the modulation of apoptosis [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 146: 141-149.
- Pan GZ. Identification and Functional Analysis of Cathepsin L in Silkworm (*Bombyx mori*) [D]. Chongqing: Southwest University Master Thesis, 2018. [潘光照. 家蚕 Cathepsin L 的鉴定及功能初探 [D]. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2018]
- Rauf I, Asif M, Amin I, et al. Silencing cathepsin L expression reduces *Myzus persicae* protein content and the nutritional value as prey for *Coccinella septempunctata* [J]. *Insect Molecular Biology*, 2019, 28 (6): 785-797.
- Saikhedkar N, Summanwar A, Joshi R, et al. Cathepsins of lepidopteran insects: Aspects and prospects [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2015, 64: 51-59.
- Shu B, Wu Y, Qu M, et al. Comparative transcriptomic analyses revealed genes and pathways responsive to heat stress in *Diaphorina citri* [J]. *Gene*, 2020, 727: 144246.
- Shu BS, Wu ZZ, Cui Y, et al. Honeydew excretion mechanisms in the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae): Progress and prospects [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2020, 63 (2): 235-244. [舒本水, 吴仲真, 崔扬, 等. 柑橘木虱蜜露排泄机制: 进展与展望 [J]. 昆虫学报, 2020, 63 (2): 235-244]
- Song L, Zhang JM, Lv YB. Sublethal effects of indoxacarb and beta-cypermethrin on *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2013, 56 (5): 521-529. [宋亮, 章金明, 吕要斌. 茚虫威和高效氯氟菊酯对小菜蛾的亚致死效应 [J]. 昆虫学报, 2013, 56 (5): 521-529]
- Sun YX, Tang L, Wang P, et al. Cathepsin L-like protease can regulate the process of metamorphosis and fat body dissociation in *Antheraea pernyi* [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2018, 78: 114-123.
- Sun YX, Zhu BJ, Tang L, et al. Cathepsin O is involved in the innate immune response and metamorphosis of *Antheraea pernyi* [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2017, 150: 6-14.
- Tian FJ, Liu JL, Zeng XN. Progress in research on insecticide resistance in the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2018, 55 (4): 565-573. [田发军, 刘家莉, 曾鑫年. 柑橘木虱抗药性研究进展 [J]. 应用昆虫学报, 2018, 55 (4): 565-573]
- Wang FF, Wang Y, Chen YC, et al. Phototaxis of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) to LED lights [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2020, 42 (1): 187-192. [王飞凤, 王也, 陈雨晨, 等. 柑橘木虱成虫趋光行为反应 [J]. 环境昆虫学报, 2020, 42 (1): 187-192]
- Wang GH, Liu C, Xia QY, et al. Cathepsin B protease is required for metamorphosis in silkworm, *Bombyx mori* [J]. *Insect Science*, 2008, 15 (3): 201-208.
- Wu F, Li DC, Hao Y, et al. Research progress on cysteine protease of *Bombyx mori* [J]. *Science of Sericulture*, 2017, 43 (2): 336-340. [吴凡, 李德臣, 郝瑜, 等. 家蚕半胱氨酸蛋白酶的研究进展 [J]. 蚕业科学, 2017, 43 (2): 336-340]
- Wu TY, Zhang XY, George ACB, et al. Comparison of feeding behaviors and pathogen acquisition rates of adults and the 5<sup>th</sup> instar nymphs of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) on huanglongbing-infected citrus plants [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2020, 63 (2): 166-173. [乌天宇, 张旭颖, George ACB, 等. 亚洲柑橘木虱成虫和 5 龄若虫在感染黄龙病的柑橘上的取食行为及获菌效率比较 [J]. 昆虫学报, 2020, 63 (2): 166-173]
- Yang C, Lin XW, Xu WH. Cathepsin L participates in the remodeling of the midgut through dissociation of midgut cells and activation of apoptosis via caspase-1 [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2017, 82: 21-30.
- Yu HZ, Huang YL, Li NY, et al. Potential roles of two cathepsin genes, *DcCath-L* and *DcCath-O* in the innate immune response of *Diaphorina citri* [J]. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 2019, 22 (4): 1060-1069.
- Zhang K, Su J, Chen S, et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of cathepsin O in silkworm *Bombyx mori* related to bacterial response [J]. *Molecular Immunology*, 2015, 66 (2): 409-417.
- Zhang LY, Ruan CC, Hou ZG, et al. Effects on the energy substances of *Myzus persicae* by the sublethal concentration of sulfoxafloer [J]. *Agrochemicals*, 2021, 60 (1): 28-31. [张莉娅, 阮长春, 侯志广, 等. 亚致死浓度氟啶虫胺腈对桃蚜体内能量物质的影响 [J]. 农药, 2021, 60 (1): 28-31]
- Zhao T, Lai D, Zhou Y, et al. Azadirachtin A inhibits the growth and development of *Bactrocera dorsalis* larvae by releasing cathepsin in the midgut [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 183: 109512.
- Zhao XD, Zhang BW, Fu LJ, et al. Possible insecticidal mechanism of Cry41-related toxin against *Myzus persicae* by enhancing cathepsin B activity [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68 (16): 4607-4615.