



桉树枝瘿姬小蜂气味结合蛋白基因 OBP_s 的 克隆及表达分析

谢金婷, 李俊珏, 周乐明, 刘 雅, 宾贵辉, 杨振德*, 周 静*

(广西大学林学院, 南宁 530004)

摘要: 为明确桉树枝瘿姬小蜂 *Leptocybe invasa* 的嗅觉感受机制, 本研究利用克隆技术从桉树枝瘿姬小蜂中成功克隆 7 个 *Lin*vOBPs 基因: *Lin*vOBP2、*Lin*vOBP5、*Lin*vOBP7、*Lin*vOBP9、*Lin*vOBP11、*Lin*vOBP18、*Lin*vOBP23。利用生物信息学软件分析 7 个基因序列编码蛋白的理化特性和结构特征; 构建进化树分析桉树枝瘿姬小蜂 OBP_s 及其它昆虫 OBP_s 的进化关系; 通过实时荧光定量 PCR 技术分析在不同挥发物处理下 OBP_s 基因表达情况。结果表明, 7 个 *Lin*vOBPs 基因长度约 400 bp, 含有 6 个保守的半胱氨酸, 序列 N 端具有信号肽切割位点, 在二级结构预测中均含有大量的 α -螺旋结构, 有利于疏水结合腔的形成, 能够促进其与气味分子的结合。桉树枝瘿姬小蜂的 *Lin*vOBPs 与白蛾周氏啮小蜂 *Chouioia cunea* 的 *Cc*OBPs 聚在同一分支, 亲缘性很高, 推测二者可能具有相似的功能。不同 *Lin*vOBPs 对于不同挥发物的响应存在显著差异, 特定挥发物对 *Lin*vOBPs 表达的调控作用, 尤其是对伞花烃、桉叶油醇、右旋萜二烯能够上调多个 *Lin*vOBPs 的表达量。7 个 *Lin*vOBPs 基因均在识别寄主桉树过程中发挥重要作用, 其中, *Lin*vOBPs 对伞花烃、桉叶油醇、右旋萜二烯的识别有利于揭示桉树枝瘿姬小蜂特异性识别寄主桉树的分子机制。

关键词: 桉树枝瘿姬小蜂; 气味结合蛋白; 植物挥发物; 基因克隆; 寄主识别

中图分类号: Q963

文献标识码: A

Cloning and expression analysis of seven odour binding protein genes from *Leptocybe invasa*

XIE Jin-Ting, LI Jun-Jue, ZHOU Le-Ming, LIU Ya, BIN Gui-Hui, YANG Zhen-De*, ZHOU Jing*
(College of Forestry, Guangxi University, Nanning 530004, China)

Abstract: In order to understand the olfactory perception mechanism of *Leptocybe invasa*, seven odour binding protein genes, named *Lin*vOBP2, *Lin*vOBP5, *Lin*vOBP7, *Lin*vOBP9, *Lin*vOBP11, *Lin*vOBP18, *Lin*vOBP23 were successfully cloned from *L. invasa*. The bioinformatics software was used to analyze the physical and chemical characteristics and structural characteristics of the proteins encoded by the seven genes, and the phylogenetic relationships of OBP_s and other insect

基金项目: 国家自然科学基金 (32360390, 31971664); 广西自然科学基金 (2018GXNSFDA281004, 2018GXNSFAA294008)

作者简介: 谢金婷, 女, 硕士研究生, 研究方向为森林保护, E-mail: xiejt333@163.com

*共同通讯作者 Author for correspondence: 杨振德, 男, 博士, 教授, 研究方向为森林保护, E-mail: dzyang68@126.com; 周静, 女, 硕士, 研究方向为森林保护, E-mail: 1070685442@qq.com

收稿日期 Received: 2023-09-12; 修回日期 Revision received: 2024-05-08; 接受日期 Accepted: 2024-05-09

OBP_s were analyzed. Real-time quantitative PCR was used to analyze the expression of OBP_s gene under different volatiles treatment. The results showed that the 7 *Lin*vOBPs genes were about 400 bp in length and contained 6 conserved L-Cysteine. The N-terminal of the 7 *Lin*vOBPs contained signal peptide cleavage sites and a large number of α -helices in secondary structure prediction, it was beneficial to the formation of hydrophobic binding cavity, and can promote its binding with odor molecules. The *Lin*vOBPs of *L. invasa* and the *Cc*OBPs of *Chouioia cunea* were clustered in the same branch and had high affinity. There were significant differences in the response of different *Lin*vOBPs to different volatiles. The regulation of certain volatiles on *Lin*vOBPs expression, especially for para-cymene, eucalyptol and d-terpenediene, could up-regulate the expression of multiple *Lin*vOBPs. All the seven *Lin*vOBPs genes play an important role in the recognition of host eucalyptus. Among them, the recognition of para-cymene, eucalyptol and d-terpenediene by *Lin*vOBPs is helpful to reveal the molecular mechanism of the specific recognition of host eucalyptus by *L. invasa*.

Key words: *Leptocybe invasa*; odor binding protein; plant volatiles; gene cloning; recognition of host

桉树枝瘿姬小蜂 *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle 是一种重要的入侵性致瘿害虫, 隶属于膜翅目 Hymenoptera 姬小蜂科 Eulophidae, 通过在桉树幼嫩部位产卵形成虫瘿, 影响桉树的生长与发育, 给桉树产业造成巨大的经济损失 (Huang *et al.*, 2018)。桉树枝瘿姬小蜂原本活动于澳大利亚, 于 2000 年扩散至以色列, 2004 年被 Mendel 记录为一个新种 (Mendel *et al.*, 2004), 后传播到世界各地, 包括欧洲地中海地区、非洲、亚洲和南美洲等地 (Dittrich *et al.*, 2012)。2007 年, 在我国广西壮族自治区东兴市首次发现该害虫 (吴耀军等, 2009)。桉树枝瘿姬小蜂可危害赤桉 *Eucalyptus camaldulensis*、邓恩桉 *Eucalyptus dunnii*、窿缘桉 *Eucalyptus exserta*、巨桉 *Eucalyptus grandis*、柳叶桉 *Eucalyptus saligna*、细叶桉 *Eucalyptus tereticornis* 等多个品种, 其中巨园桉 *Eucalyptus grandis*×*Eucalyptus tereticornis* DH 201-2 无性系为受害严重的高度易感品种 (Nyeko *et al.*, 2007; Quang *et al.*, 2009; 武海卫等, 2009)。

气味结合蛋白 (Odorant-binding proteins, OBPs) 属于一类小分子水溶性蛋白, 存在于昆虫嗅觉感受器淋巴液中, 参与了对环境中气味分子的识别、结合和运输, 在昆虫整个嗅觉系统识别气味分子过程中发挥着重要作用 (Pelosi *et al.*, 2014)。根据其氨基酸序列中保守半胱氨酸的数目以及位置, 气味结合蛋白可分为 Classic OBPs、dimer OBPs、Plus-C OBPs、Minus-C OBPs 及 Atypical OBPs 5 个亚类 (Song *et al.*, 2018)。Classic OBPs 是指大多数具有 6 个保守的半胱氨酸残基, 可以形成 3 个二硫键的气味结合蛋白, 而膜翅目的 Classic OBPs 结构通式一般为: C1-X23-35-C2-X3-C3-X27-45-C4-X7-14-C5-X8-C6 (C 为半胱氨酸缩写, X 表示其它非保守半胱氨酸的氨基酸残基) (Xu *et al.*, 2009)。昆虫主要依靠其高度敏感的嗅觉系统探测和定位寄主植物, 而气味结合蛋白与气味分子的特异性结合, 使得昆虫被挥发物影响从而产生相应的行为和反应 (Sun *et al.*, 2018; Baldwin *et al.*, 2021)。

自 2007 年国内首次发现了桉树枝瘿姬小蜂以来, 陆续有学者对其展开了研究, 国内外

研究报道主要集中于桉树枝瘿姬小蜂的生物学特性（黄梦伊等，2020）、体内微生物（寇冀蒙等，2020）及天敌（Huang *et al.*, 2018）等方面。但是针对桉树枝瘿姬小蜂嗅觉蛋白的研究尚未见报道。本文利用克隆技术成功获得桉树枝瘿姬小蜂头部高表达的 7 个 *LimvOBPs* 基因正确的全长序列，探究 *LimvOBPs* 的序列信息及其关键挥发物处理下的表达特性，为明确桉树枝瘿姬小蜂特异性识别寄主植物的分子机制和防治该害虫提供新的思路。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

供试昆虫桉树枝瘿姬小蜂雌虫采集于广西大学教学实习基地苗圃内种植的 1~2 年生巨园桉 DH 201-2，采集当天刚羽化的桉树枝瘿姬小蜂雌虫，完全浸泡于 RNA 样本保存液中，4℃过夜，保存于-20℃冰箱中。供试挥发物利用动态顶空吸附法采集寄主植物巨园桉 DH 201-2 的组成型挥发物。

1.2 材料处理

采集当天刚羽化的桉树枝瘿姬小蜂雌虫，饥饿处理 6 h 后放入 50 mL 玻璃瓶（实验前用无水乙醇清洗后烘干）内，在瓶口包上单面带孔的气体采集袋（带孔面朝向玻璃瓶内，保证实验正常进行的同时不污染味源），用标准化合物配制成浓度为 1 μg/μL 的单一挥发物（桉叶油醇、甲基戊酮醇、萘品烯、对伞花烃、α-蒎烯、右旋萘二烯）和混合挥发物（桉叶油醇：萘品烯：甲基戊酮醇：对伞花烃=19：5：2：2），用移液枪吸取 10 μL 上述挥发物到烘干后的定性滤纸（2 cm×1 cm）上设置为实验组，挥发 2 s 后放入带孔的气体采集袋中，使挥发物通过孔隙充满整个玻璃瓶，对照组则直接放入烘干后的定性滤纸。每组共处理 160 头雌虫，设置 3 个重复，持续处理 6 h，每头雌虫只测试 1 次。

1.3 桉树枝瘿姬小蜂头部总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

选取 TRIzol 法并结合试剂盒 RNeasy® Plus Mini Kit，在超净工作台中提取雌虫头部总 RNA。参考试剂盒 TransScript® One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 说明书反转录为 cDNA。

1.4 PCR 引物设计和基因克隆

参考前期课题组实验的桉树枝瘿姬小蜂雌虫头部转录组测序注释结果（周静，2023），根据注释为 *OBPs* 基因的 TPM 均值大小，筛选 TPM 均值最高且序列完整的 7 个基因（*OBP2*、*OBP5*、*OBP7*、*OBP9*、*OBP11*、*OBP18*、*OBP23*），利用 Primer Premier 6 设计引物（表 1）。PCR 反应体系（25 μL）：T3 Super PCR Mix 22 μL，上游引物（10 μM）0.4 μL，下游引物（10 μM）0.4 μL，模板 cDNA 1 μL，ddH₂O 8.2 μL。反应条件：98℃预变性 2 min，98℃变性 10 s，51~56℃退火 15 s，72℃延伸 20 s，35 个循环，4℃保存。测序比对成功的 PCR 产物利用 OMEGA 的 Gel&PCR Clean UP Kit D2000 试剂盒进行切胶回收与纯化，经由 pEASY®-T1 Cloning Kit 试剂盒克隆于 Peasy-T1 载体，导入大肠杆菌（*Escherichia coli*）Trans1-T1 感受态细胞，在含有氨苄的 LB 固体培养基上进行涂板，37℃过夜培养，菌液进

行阳性克隆检测，用试剂盒 Plasmid Extraction Mini Kit 提取质粒，1%琼脂糖凝胶电泳进行检测，将条带单一明亮的质粒送至北京擎科生物科技（南宁）有限公司进行测序。根据测序结果与 *OBPs* 基因序列进行 blast 比对，从而获得正确的序列。

表 1 克隆引物信息

Table 1 Clone primer information

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	退火温度 (°C) Annealing temperature	产物长度 (bp) Product length
OBP2F	GGATATTGTAGGCGACGAA	51	458
OBP2R	TGTCTCTATCCAAGCACTA		
OBP5F	TGCAGTGCTCACGGGAAA	55	511
OBP5R	GGTGC GCGAGGATAGTAA		
OBP7F	GCGAAGTACGAATTCATTC	55	473
OBP7R	CCGATAGTGCAAGTCAGTTG		
OBP9F	CATGAAGACCATCGCCATT	55	382
OBP9R	ACTTTAGATTCTCGGTTGG		
OBP11F	CACTAAGCGTGGACCTTGATAG	56	522
OBP11R	AGGCGACAAGTAATTGCGATT		
OBP18F	CTGTCCGACTTGCGTATTCTT	54.7	487
OBP18R	TGCTAATGTCTTCGAGGAGGA		
OBP23F	AAGCCAGCCGCAACTTT	55	465
OBP23R	AGAGATTACGCATGAAGAGGTT		

1.5 实时荧光定量 PCR

以处理的雌虫为材料，进行 RNA 提取和反转录，qRT-PCR 的引物信息见表 2。反应体系（20 μ L）：Genious 2X SYBR Green Fast qPCR Mix 10 μ L，上游引物（10 μ M）0.4 μ L，下游引物（10 μ M）0.4 μ L，cDNA 1 μ L，ddH₂O 8.2 μ L。反应条件：预变性 94°C 30 s，循环反应 45 个：94°C 5 s，60°C 30 s。以 *β -actin* 为内参，每个样品重复点样 4 次，测定溶解曲线的反应条件：65~94°C，每增加 0.5°C 保持 5 s。

表 2 qRT-PCR 引物信息

Table 2 qRT-PCR primer information

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
β -actin-F	CTACTGTACCACTCCGTCGC
β -actin-R	GGTCATTGGAAGTGGAGGCA
yg-LinvOBP2F	AGAGGCTGTGGTGCTTGAC
yg-LinvOBP2R	CGGTCTCGCAACTGTCCTT
yg-LinvOBP5F	TTGGTGGAAGGAACTAAAGC
yg-LinvOBP5R	TCATCAACATACTCATCGGG
yg-LinvOBP7F	GCTCTCTTTGCGGTATTG
yg-LinvOBP7R	CAATCCAAATTCCTGCTTGG
yg-LinvOBP9F	TAAGGATCTGATCAAGACGTG
yg-LinvOBP9R	GTCTTAAGGTTGTCCTCAA
yg-LinvOBP11F	AGGAGTGCCTAAAGAATAC
yg-LinvOBP11R	GTCCAGTCAGATTTTGCAC
yg-LinvOBP18F	AGTTGGGATAACTGAAGCTC
yg-LinvOBP18R	TTTATCCTCAGTGTGTCG
yg-LinvOBP23F	GTCGCTGTCGCCTATTGTC
yg-LinvOBP23R	TTATCGTTCCATCCGCTAACAT

1.6 数据处理

用 NCBI 在线工具 Open Reading Frame Finder 查询 *OBPs* 基因的 ORF 区域, 使用 SignalP 6.0 对信号肽序列进行预测, expasy (https://web.expasy.org/compute_pi) 预测目的基因的相对分子质量和理论等电点, ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 分析 *OBPs* 克隆序列所包含的氨基酸种类及组成情况; SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=nps%20_sopma.html) 预测蛋白的二级结构; 使用 NCBI 在线工具 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 预测蛋白的保守结构域; SnapGene 6.0.2 将 7 条 *OBPs* 与白蛾周氏啮小蜂 *Chouioia cunea* 的 5 条 *OBPs* 进行同源性比对; 利用 MEGA 11.0 软件的最大似然法 (Maximum likelihood), 设置 Bootstrap 为 1 000, 将 7 条桉树枝瘿姬小蜂 *OBPs* 的氨基酸序列与其它 3 种膜翅目昆虫的 *OBPs* 的氨基酸序列, 其中包括 33 条白蛾周氏啮小蜂 *OBPs*, 14 条丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis* 的 *OBPs* 和 39 条丽蚜小蜂 *Encarsia formosa* 的 *OBPs* 构建系统进化树; qRT-PCR 检测数据, 根据溶解曲线检验数据的可靠性, 记录各 β -actin 基因的 Ct 值, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算基因的表达量; 使用 IBM SPSS Statistics 26.0 对实验数据进行统计与分析, 使用 Origin 2018 进行绘图。

2 结果与分析

2.1 桉树枝瘿姬小蜂 *LinvOBPs* 的克隆

根据表达量高低、ORF 的完整性以及是否具有信号肽筛选出 7 条 *OBPs* 基因, 分别命名为 *LinvOBP2* (Genbank 登录号为 OQ443056)、*LinvOBP5* (Genbank 登录号为 OQ443057)、*LinvOBP7* (Genbank 登录号为 OQ443058)、*LinvOBP9* (Genbank 登录号为 OQ443059)、*LinvOBP11* (Genbank 登录号为 OQ443060)、*LinvOBP18* (Genbank 登录号为 OQ443061) 和 *LinvOBP23* (Genbank 登录号为 OQ443062)。这 7 条 *LinvOBPs* 基因开放阅读框长度均 400 bp 左右, 单菌落 PCR 扩增后使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测得到相应的目的条带 (见图 1)。根据公司测序结果分析可知, *LinvOBP2* 基因全长 458 bp, *LinvOBP5* 基因全长 511 bp, *LinvOBP7* 基因全长 473 bp, *LinvOBP9* 基因全长 382 bp, *LinvOBP11* 基因全长 522 bp, *LinvOBP18* 基因全长 487 bp, *LinvOBP23* 基因全长 465 bp。

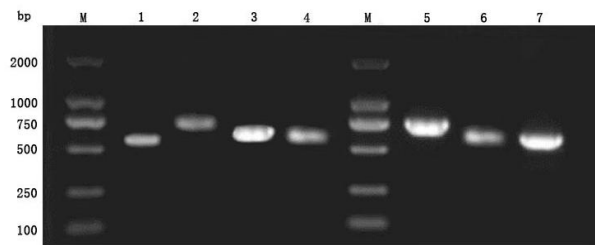


图 1 *LinvOBPs* 基因克隆结果

Fig. 1 Gene cloning results of *LinvOBPs*

注: M, DNA Marker DL2000; 1, *LinvOBP2*; 2, *LinvOBP5*; 3, *LinvOBP7*; 4, *LinvOBP9*; 5, *LinvOBP11*; 6, *LinvOBP18*; 7, *LinvOBP23*。

2.2 桉树枝瘿姬小蜂 *LinvOBPs* 的序列分析

克隆得到的 7 条 *LinvOBPs* 基因都具有完整的开放阅读框，开放阅读框的长度在 400 bp 左右，*LinvOBP2*、*LinvOBP5*、*LinvOBP7*、*LinvOBP9*、*LinvOBP11*、*LinvOBP18*、*LinvOBP23* 开放阅读框的长度分别为 408、435、396、378、396、411 和 414 bp，编码 125~137 个氨基酸，均含有大量的丙氨酸（ALA）、赖氨酸（LYS）、缬氨酸（VAL）。7 条 *LinvOBPs* 均具有气味结合蛋白的典型结构，包含 6 个保守半胱氨酸位点，预测分子量大小在 14~16 kDa，N 端均有一段由约 15~25 个氨基酸残基组成的信号肽序列，负责引导气味结合蛋白。等电点在 5~9，蛋白脂肪指数在 70~106，*LinvOBP18*、*LinvOBP23* 不稳定指数大于 40，蛋白不稳定，*LinvOBP2*、*LinvOBP5*、*LinvOBP7*、*LinvOBP9*、*LinvOBP11* 不稳定指数均小于 40，蛋白较稳定。*LinvOBP2*、*LinvOBP5*、*LinvOBP32* 基因编码蛋白的平均亲水性小于零，为疏水性蛋白，而 *LinvOBP27*、*LinvOBP9*、*LinvOBP11*、*LinvOBP11* 基因编码蛋白的平均亲水性大于零，为亲水性蛋白。二级结构预测结果表明（表 3），7 条 *LinvOBPs* 的二级结构类型相似，均含有大量的 α -螺旋、无规卷曲和少量的延伸链及 β -转角，对蛋白的结构起支撑作用。

表 3 *LinvOBPs* 的二级结构预测

Table 3 Secondary structure prediction of *LinvOBPs*

基因 Gene	二级结构及含量 (%)			
	Secondary structure and content			
	α -螺旋 α -Helix	无规卷曲 Random coil	延伸链 Sheet	β -转角 β -Turn
<i>LinvOBP2</i>	65.19	22.22	6.67	5.93
<i>LinvOBP5</i>	64.58	25.00	6.25	4.17
<i>LinvOBP7</i>	63.36	24.43	3.82	8.40
<i>LinvOBP9</i>	69.60	24.80	-	5.60
<i>LinvOBP11</i>	64.12	23.66	4.58	7.63
<i>LinvOBP18</i>	66.18	24.26	5.88	3.68
<i>LinvOBP23</i>	64.96	21.17	5.11	8.76

2.3 系统发育分析

将桉树枝瘿姬小蜂的 7 条 *LinvOBPs* 氨基酸序列与周氏啮小蜂的 5 条 *CcOBPs* 进行同源性比较，发现其均具有气味结合蛋白的典型特征，7 条 *LinvOBPs* 都含有 6 个保守的半胱氨酸（图 2），结构通式为“C1-X23-29-C2-X3-C3-X26-40-C4-X8-11-C5-X4-8-C6”。将桉树枝瘿姬小蜂的 7 条 *LinvOBPs* 氨基酸序列和 86 条同源性较高的膜翅目昆虫 *OBPs* 氨基酸序列（33 条白蛾周氏啮小蜂 *CcOBPs*、14 条丽蝇蛹集金小蜂 *NvitOBPs* 和 39 条丽蚜小蜂 *EfOBPs*）一起构建系统进化树。结果如图 3，桉树枝瘿姬小蜂 *LinvOBPs* 与白蛾周氏啮小蜂 *CcOBPs* 的亲缘关系最近，*LinvOBP2* 和 *CcOBP9* 聚为紧密的一支，*LinvOBP5* 和 *CcOBP32*、*LinvOBP7* 和 *CcOBP14* 分别聚为紧密的一支，*LinvOBP9* 和 *CcOBP1* 具有很高的近源性，*LinvOBP11* 与 *CcOBP29* 亲缘关系较近，*LinvOBP18* 和 *CcOBP24* 亲缘关系近，*LinvOBP23* 和 *CcOBP33* 亲缘关系近，推测桉树枝瘿姬小蜂的 *LinvOBPs* 与白蛾周氏啮小蜂 *CcOBPs* 可能具有相似的功能。

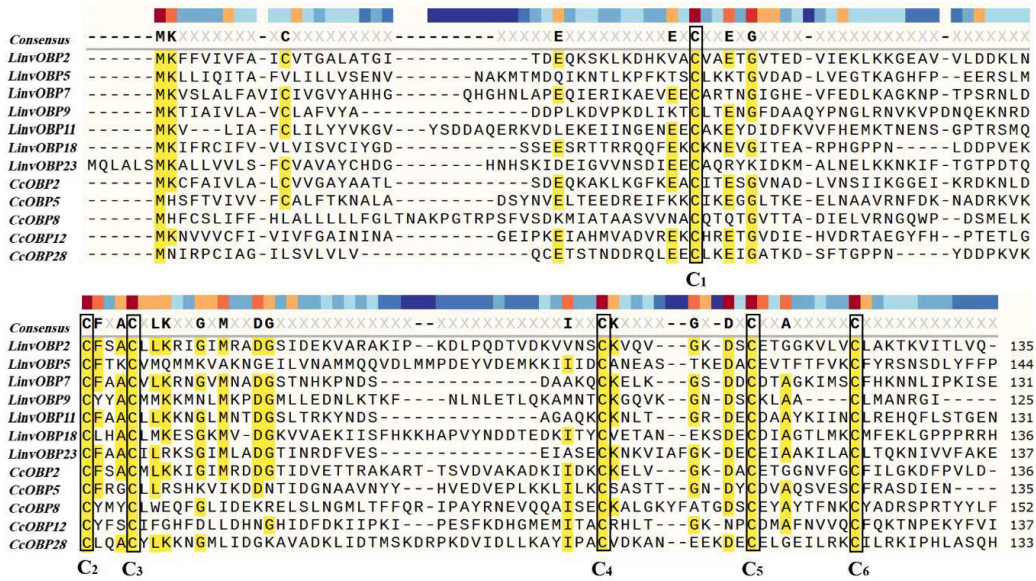


图2 桉树枝瘿姬小蜂 *LinvOBPs* 与周氏啮小蜂 *CcOBPs* 的同源性比较

Fig. 2 Similarity alignment among *LinvOBPs* of *Leptocybe invasa* and *CcOBPs* of *Chouioia cunea*

注: C1~C6, 6个保守的半胱氨酸。Note: C1-C6, Six conserved cysteines.



图3 桉树枝瘿姬小蜂与其它3种膜翅目昆虫 *OBPs* 的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of the *OBPs* of *Leptocybe invasa* and three other hymenopteran insects

注: Cc, 白蛾周氏啮小蜂; Nvit, 丽蝇蛹集金小蜂; Ef, 丽蚜小蜂。Note: Cc, *Chouioia cunea*; Nvit, *Nasonia vitripennis*; Ef, *Encarsia formosa*.

2.4 不同挥发物处理后 *LinvOBPs* 表达量的变化

经不同挥发物诱导处理后, 各个基因的表达量在不同处理间存在显著差异, 结果见图4所示。析分空白对照组数据可知, *LinvOBP2* 经右旋萜二烯、对伞花烃、桉叶油醇、 α -蒎烯、甲基戊酮醇处理与空白处理存在显著差异, 经诱导处理后相对表达量上调, 蒎烯诱、混合诱

导处理与空白处理没有显著差异; *LinOBP5* 经对伞花烃诱导处理与空白处理存在显著差异, 经诱导处理后相对表达量上调, 桉叶油醇诱导处理与空白处理没有显著差异, 其余经 α -蒎烯、甲基戊酮醇、右旋萜二烯、萜品烯和混合与空白处理存在显著差异, 且诱导处理后相对表达量下调; *LinOBP7* 经甲基戊酮醇、对伞花烃、右旋萜二烯、桉叶油醇、 α -蒎烯诱导处理与空白处理存在显著差异, 诱导处理后相对表达量上调, 萜品烯和混合与空白处理没有显著差异; *LinOBP9* 经对伞花烃、右旋萜二烯、桉叶油醇诱导处理与空白处理存在显著差异, 诱导处理后相对表达量上调, 甲基戊酮醇、 α -蒎烯、萜品烯、混合与空白处理没有显著差异; *LinOBP11* 经对伞花烃诱导处理与空白处理存在显著差异, 诱导处理后相对表达量上调, 其余处理与空白处理没有显著差异; *LinOBP18* 经甲基戊酮醇、对伞花烃、桉叶油醇、萜品烯和右旋萜二烯诱导处理与空白处理存在显著差异, 诱导处理后相对表达量上调, α -蒎烯、混合与空白处理没有显著差异; *LinOBP23* 经对伞花烃、桉叶油醇诱导处理与空白处理存在显著差异, 诱导处理后相对表达量上调, 其余处理与空白处理没有显著差异。整体上看, 经对伞花烃诱导处理的 7 个 *LinOBPs* 相对表达量上调; 经桉叶油醇诱导处理后除 *LinOBP2* 相对表达量出现下调, 其余 *LinOBPs* 相对表达量上调; 经右旋萜二烯处理后除 *LinOBP2*、*LinOBP23* 相对表达量出现下调, 其余 *LinOBPs* 相对表达量上调。与空白对照相比, *LinOBP7* 经 7 个诱导处理后相对表达量都是上调。

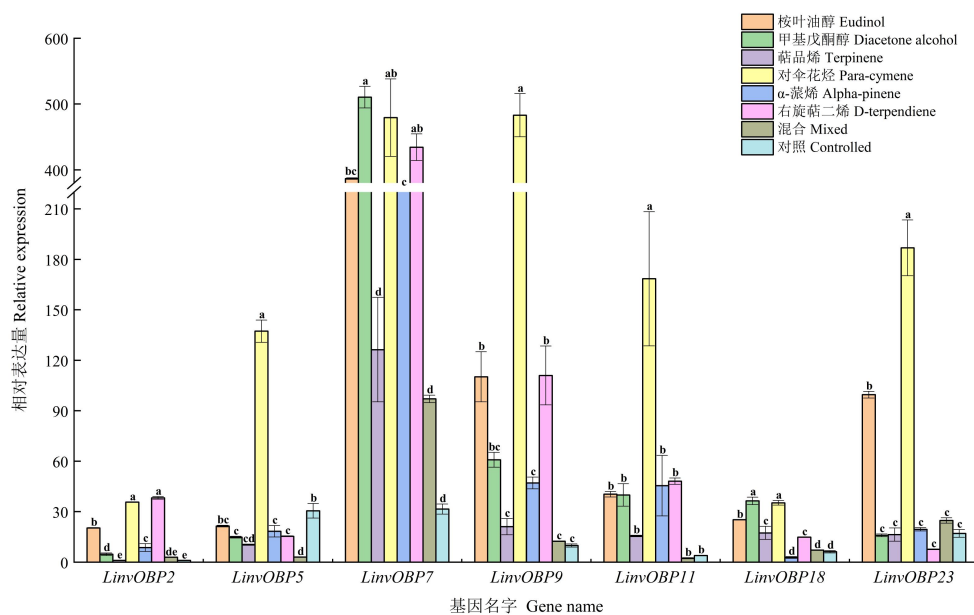


图 4 不同处理后 *LinOBPs* 的相对表达量

Fig. 4 Relative expression of *LinOBPs* after different treatments

注: 数据为平均值 \pm 标准误 (n=3)。柱上不同小写字母代表不同处理下同一基因的相对表达量存在显著差异 ($P < 0.05$)。Note: Values were mean \pm SE of three replications. Different lowercase letters on the column represented significant differences in the relative expression of the same gene under different treatments ($P < 0.05$).

3 结论与讨论

不同昆虫气味结合蛋白的结构具有相似性, 一般长度约 400 bp, 含有 6 个保守的半胱氨

酸，序列 N 端具有信号肽切割位点，相对分子质量较小，等电点较低（Wang *et al.*, 2020; 李良斌等, 2023）。本研究克隆得到 7 个 *Lin*vOBPs 正确的全长序列，属于 Classic OBPs，与已经报道的昆虫 OBPs 基因具有相同的特点（Hull *et al.*, 2014; Missbach *et al.*, 2015）。

在触角内高度表达的 OBPs 基因能够在性信息素和挥发物小分子的识别过程中发挥重要作用。如桃小食心虫 *Carposina sasakii* 触角内高度表达的 5 个 *Csas*OBPs 基因在交配期时的表达量远远超过其他部位（李凯旋等, 2022）。在梨小食心虫 *Grapholitha molesta* 雌成虫触角内高度表达的 *GmolOBP14* 基因的功能主要与识别寄主植物、定位产卵场所有关，而与信息素的识别无关（陈秀琳等, 2018）。小菜蛾 *Plutella xylostella* 雄虫触角中高度表达的气味结合蛋白基因 *PxylOBP31* 主要参与寻求配偶及定位寄主植物环节（覃江梅等, 2016）。甘蔗黄螟 *Chilo infuscatellus* 触角转录组中高度表达的 3 个 *PBPs*（*CinfPBP1*、*CinfPBP2* 和 *CinfPBP3*）和 2 个 *GOBPs*（*CinfGOBP1* 和 *CinfGOBP2*），分别与性信息素和甘蔗 *Saccharum officinarum* 挥发物表现出很强的亲和力（Liu *et al.*, 2020）。在系统发育分析中，桉树枝瘿姬小蜂的 *Lin*vOBPs 与白蛾周氏啮小蜂的 *Cc*OBPs 显示出较近的亲缘关系。这种关系可能反映了两种昆虫在生态位、食性或其他生物学特性上的相似性。此外，通过构建系统进化树，我们可以推测 *Lin*vOBPs 与 *Cc*OBPs 可能具有相似的功能，比如参与识别特定的气味分子，进而在寻找食物、配偶或寄主等行为中发挥关键作用。其中与 *Lin*vOBP9 聚在一起的 *CcOBP1* 被报道在寻找寄主美国白蛾 *Hyphantria cunea* 过程中发挥重要作用，*CcOBP1* 能够与美国白蛾蛹的挥发物很好地结合，并产生相应的驱避效应（相芳伟等, 2018）。故推测 *Lin*vOBP9 的功能也与寄主识别有关，但具体作用还需进一步验证。

气味结合蛋白的功能具有多样性，基因表达量的变化与其功能息息相关，如云斑天牛 *Batocera lineolata* 取食寄主后，触角内 7 个 OBPs 和 3 个 CSPs 的表达量均高于未取食时，并且表达量的变化在不同寄主条件下存在差异，说明这 10 个嗅觉相关基因参与云斑天牛的寄主选择行为（杨洋等, 2017）。但是，OBPs 不仅能参与识别寄主植物，还能在昆虫生长发育过程中发挥重要作用。桃蛀果蛾 *Carposina sasakii* Matsumura 的 *OBP4* 和 *OBP17* 基因在交尾前后基因表达量发生明显变化，说明 *OBP4* 和 *OBP17* 基因的功能与调节桃蛀果蛾的发育状态有关（胡晓雯, 2018）。中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 触角内的 4 个 *AcNPC2* 蛋白在低温胁迫下表达量明显升高，故推测 *AcNPC2s* 的功能与中华蜜蜂的低温适应性有关（张莉, 2022）。不同挥发物处理对 *Lin*vOBPs 表达量的影响是本研究的一个重要方面。实验结果表明，不同 *Lin*vOBPs 对于不同挥发物的响应存在显著差异。一些挥发物能够显著上调 *Lin*vOBPs 的表达量，而另一些则可能导致表达量下调或无显著差异。这种差异可能与挥发物的种类、浓度以及处理时间等因素相关。*Lin*vOBP7 经 7 个诱导处理后相对表达量都是上调，推测 *Lin*vOBP7 的功能与寄主识别有关。值得注意的是，对伞花烃、桉叶油醇、右旋萜二烯处理能够上调多个 *Lin*vOBPs 的表达量，这提示对伞花烃、桉叶油醇、右旋萜二烯可能是桉树枝瘿姬小蜂的一种重要识别信号。7 个 *Lin*vOBPs 基因均在识别寄主桉树过程中发挥

重要作用, *Lin*vOBPs 对对伞花烃、桉叶油醇、右旋萜二烯的识别有利于揭示桉树枝瘿姬小蜂特异性识别寄主桉树的分子机制。未来的研究可以进一步探索 *Lin*vOBPs 与特定挥发物之间的相互作用机制, 以及这些机制如何影响桉树枝瘿姬小蜂的生物学特性, 从而为昆虫防治和生态调控提供新的思路和策略。

参考文献 (References)

- Baldwin SR, Mohapatra P, Nagalla M, *et al.* Identification and characterization of *CYPs* induced in the *Drosophila* antenna by exposure to a plant odorant [J]. *Scientific Reports*, 2021, 11 (1): 20530.
- Chen XL, Su L, Chen LH, *et al.* Molecular cloning, expression profile and binding characteristics of Minus-C odorant-binding protein from *Crapholita molesta* [J]. *Acta Entomology Sinica*, 2018, 61 (7): 771-783. [陈秀琳, 苏丽, 陈丽慧, 等. 梨小食心虫 Minus-C 气味结合蛋白的分子克隆、表达谱及结合特性分析 [J]. 昆虫学报, 2018, 61 (7): 771-783]
- Dittrich-Schröder G, Wingfield MJ, Hurley BP, *et al.* Diversity in Eucalyptus susceptibility to the gall-forming wasp *Leptocybe invasa* [J]. *Agricultural and Forest Entomology*, 2012, 14 (4): 419-427.
- Hu XW. Differential Expression of Olfactory-Related Genes in Different Developmental Stages of the Fruit Moth, *Carposina sasakii* Matsumura [D]. Jinzhong: Shanxi Agricultural University, 2018. [胡晓雯. 桃蛀果蛾成虫不同发育时期嗅觉相关基因差异表达研究 [D]. 晋中: 山西农业大学, 2018]
- Huang MY, Zhao JQ, Shi J. Based on Maxent prediction of the occurrence trend of *Leptocybe invasa* in China [J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2020, 42 (11): 64-71. [黄梦伊, 赵佳强, 石娟. 基于 MaxEnt 对桉树枝瘿姬小蜂在中国发生趋势的预测 [J]. 北京林业大学学报, 2020, 42 (11): 64-71]
- Huang ZY, Li J, Lu W, *et al.* Parasitoids of the eucalyptus gall wasp *Leptocybe spp.*: A global review [J]. *Environmental Science and Pollution research International*, 2018, 25 (30): 29983-29995.
- Hull JJ, Perera OP, Snodgrass GL. Cloning and expression profiling of odorant-binding proteins in the tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* [J]. *Insect Molecular Biology*, 2014, 23 (1): 78-97.
- Kou JM, Liu FH, Liu YP, *et al.* The role of associated bacteria in overcoming the resistance of invasive *Leptocybe invasa* to Eucalyptus [J]. *Journal of Biosafety*, 2020, 29 (1): 31-38. [寇冀蒙, 刘芳华, 刘一澎, 等. 伴生细菌在入侵种桉树枝瘿姬小蜂克服桉树抗性中的作用 [J]. 生物安全学报, 2020, 29 (1): 31-38]
- Li KX, Li YY, Wang SJ, *et al.* Cloning and expression of odour-binding protein gene in adult stage of *Carposina sasakii* [J]. *Acta Entomology Sinica*, 2022, 65 (11): 1426-1436. [李凯旋, 李艳艳, 王树娟, 等. 桃小食心虫成虫期高表达气味结合蛋白基因的克隆与表达谱分析 [J]. 昆虫学报, 2022, 65 (11): 1426-1436]
- Li LB, Wu LX, Xu YJ, *et al.* Molecular characterization and function of the odorant binding protein gene *ATOBP1* in *Aethina tumida* [J]. *Acta Entomology Sinica*, 2023, 66 (1): 19-26. [李良斌, 武丽仙, 许雅静, 等. 蜂巢小甲虫气味结合蛋白基因 *AtOBP1* 的分子特性及功能研究 [J]. 昆虫学报, 2023, 66 (1): 19-26]
- Liu YY, Hu YW, Bi J, *et al.* Odorant-binding proteins involved in sex pheromone and hostplant recognition of the sugarcane borer *Chilo infuscatellus* (Lepidoptera: Crambidae) [J]. *Pest Management Science*, 2020, 76 (12): 4064-4076.
- Mendel Z, Protasov A, Fisher N, *et al.* Taxonomy and biology of *Leptocybe invasa* gen. sp. n. (Hymenoptera: Eulophidae), an invasive gall inducer on Eucalyptus [J]. *Australian Journal of Entomology*, 2004, 43 (2): 101-113.
- Missbach C, Vogel H, Hansson BS, *et al.* Identification of odorant binding proteins and chemosensory proteins in antennal transcriptomes of the jumping Bristletail *Lepismachilis y-signata* and the firebrat *Thermobia domestica*: Evidence for an independent OBP-OR origin [J]. *Chemical Senses*, 2015, 40 (9): 615-626.
- Nyeko P, Mutitu EK, Day RK. Farmers' knowledge, perceptions and management of the gall-forming wasp, *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae), on Eucalyptus species in Uganda [J]. *International Journal of Pest Management*, 2007, 53 (2): 111-119.
- Pelosi P, Iovinella I, Felicioli A, *et al.* Soluble proteins of chemical communication: An overview across arthropods [J]. *Frontiers in Physiology*, 2014, 5: 320.
- Pham QT, Bernard D, Treena IB. Susceptibility of 18 eucalypt species to the gall wasp *Leptocybe invasa* in the nursery and young; plantations in Vietnam [J]. *ScienceAsia*, 2009, 35 (2): 113-117.
- Qin JM, Cai LJ, Zheng LS, *et al.* Identification and characterization of the antennal binding protein *PxyIOBP31* of *Plutella xylostella* [J]. *Acta Entomology Sinica*, 2018, 61 (7): 771-783. [覃江梅, 蔡立君, 郑丽双, 等. 小菜蛾触角结合蛋白 *PxyIOBP31* 的鉴定与结合特性分析 [J]. 昆虫学报, 2016, 59 (8): 812-822]
- Quang TP, Dell B, Isobel BT. Susceptibility of 18 eucalypt species to the gall wasp *Leptocybe invasa* in the nursery and young; plantations in Vietnam [J]. *ScienceAsia*, 2009, 35 (2): 113-117.

- Song YQ, Sun HZ, Du J. Identification and tissue distribution of chemosensory protein and odorant binding protein genes in *Tropidothorax elegans* Distant (Hemiptera: Lygaeidae) [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8 (1): 1-9.
- Sun JS, Xiao S, Carlson JR. The diverse small proteins called odorant-binding proteins [J]. *Open Biology*, 2018, 8 (12): 180208.
- Wang R, Hu Y, Wei P, *et al.* Molecular and functional characterization of one odorantbinding protein gene *OBP3* in *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) [J]. *Journal of Economic Entomology*, 2020, 113 (1): 299-305.
- Wu HW, Jia XY, Huang HH, *et al.* Studies on the resistance of five species of eucalyptus to *Leptocybe invasa* [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2009, 31 (2): 132-136. [武海卫, 贾薪玉, 黄焕华, 等. 五种桉树对桉树枝瘿姬小蜂的抗性研究 [J]. 环境昆虫学报, 2009, 31 (2): 132-136]
- Wu YJ, Jiang XJ, Li DW *et al.* An important invasive forest pest, *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Ichneumonidae), has been found in our country [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2009, 45 (7): 161-163, 182-183. [吴耀军, 蒋学建, 李德伟, 等. 我国发现 1 种重要的林业外来入侵害虫——桉树枝瘿姬小蜂 (膜翅目: 姬小蜂科) [J]. 林业科学, 2009, 45 (7): 161-163, 182-183]
- Xiang WF, Li M, lin YP, *et al.* Molecular pairing of odour-binding protein *OBP1* and host volatiles in *Chouioia cunea* [J]. *Journal of Biosafety*, 2018, 27 (3): 193-199. [相伟芳, 李敏, 林艳平, 等. 白蛾周氏啮小蜂气味结合蛋白 *OBP1* 与寄主挥发物的分子对接研究 [J]. 生物安全学报, 2018, 27 (3): 193-199]
- Xu YL, He P, Zhang L, *et al.* Large-scale identification of odorant-binding proteins and chemosensory proteins from expressed sequence tags in insects [J]. *BMC Genomics*, 2009, 10 (1): 632.
- Yang Y. Difference Analysis of Host Selectivity and Olfactory Gene Expression in the Supplementary Nutrition of *Batocera lineolata* [D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2017. [杨洋. 云斑天牛补充营养的寄主选择性与嗅觉基因表达差异分析 [D]. 成都: 四川农业大学, 2017]
- Zhang L, Zhang N, Jiang HQ, *et al.* Cloning and expression pattern analysis of *NPC2* gene family in *Apis cerana cerana* [J]. *Chinese Agricultural Science*, 2022, 55 (12): 2461-2471. [张莉, 张楠, 江虎强, 等. 中华蜜蜂 *NPC2* 基因家族克隆及表达模式分析 [J]. 中国农业科学, 2022, 55 (12): 2461-2471]
- Zhou J. Identification and Binding Characteristics of Odour-Binding Proteins of *Leptocybe invasa* [D]. Nanning: Guangxi University, 2023. [周静. 桉树枝瘿姬小蜂气味结合蛋白的鉴定与结合特性研究 [D]. 南宁: 广西大学, 2023]