



硫激肽及其受体调控褐飞虱取食行为

郭迪^{1,2}, 张素^{1,2}, 李剑^{1,2}, 高聪芬^{1,2}, 吴顺凡^{1,2,3,*}

(1. 南京农业大学植物保护学院, 南京 210095; 2. 绿色农药创制与应用技术国家地方联合工程研究中心, 南京 210095;
3. 南京农业大学三亚研究院, 三亚 572025)

摘要:【目的】明确硫激肽(sulfakinin, SK)及硫激肽受体(sulfakinin receptor, SKR)在褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 取食行为中的作用。【方法】PCR克隆褐飞虱硫激肽基因 *Nlsk* 及其受体基因 *Nlskr* cDNA全长序列并进行生物信息学分析;利用qRT-PCR检测 *Nlsk* 及 *Nlskr* 在褐飞虱不同发育阶段(卵、1-5龄若虫、雄成虫和雌成虫)和雌成虫不同组织(头、触角、翅、口针、足、肠道和马氏管)中的表达量;褐飞虱3龄若虫注射 ds*Nlskr* 进行基因沉默,qRT-PCR检测4龄若虫中 *Nlskr* 的表达量,测定4龄若虫的取食量;基于已构建的 *Nlskr* RNAi 后的4龄若虫转录组数据库进行差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)的GO和KEGG分析以及取食相关基因的qRT-PCR验证。【结果】PCR克隆得到了褐飞虱 *Nlsk* (GenBank登录号: AB817281)及 *Nlskr* (GenBank登录号: BAO01059.1)的cDNA全长序列。序列比对结果显示,褐飞虱 NISK 成熟肽具有与其他物种保守的C端 FMRamide 型多肽结构。NISKR 与其他昆虫同源受体存在高度保守的跨膜结构域。qRT-PCR检测结果表明, *Nlsk* 与 *Nlskr* 在卵和1龄若虫中高表达,两基因均主要在头部表达, *Nlskr* 还在褐飞虱口针中高表达。RNAi 沉默 *Nlskr* 可显著提高褐飞虱4龄若虫的取食量;基于转录组数据 DEGs 的GO和KEGG分析结果表明, RNAi 沉默 *Nlskr* 可显著影响褐飞虱嗅觉、味觉、能量代谢以及取食相关神经肽及受体基因的表达;取食相关基因的qRT-PCR验证结果表明,沉默 *Nlskr* 降低 *NI7tmOR*, *NIOAR-3R*, *NIUH-FAF* 和 *NITRP-161A* 的表达量,而提高 *NIGr64f*, *NIUE-E2* 和 *NITHR* 的表达量。【结论】本研究明确了硫激肽及其受体参与调控褐飞虱取食行为,为害虫取食行为抑制剂研发提供了潜在靶点。

关键词: 褐飞虱; 硫激肽; 硫激肽受体; 转录组; 取食行为

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2023)03-0277-15

Sulfakinin and its receptor regulate the feeding behavior of *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae)

GUO Di^{1,2}, ZHANG Su^{1,2}, LI Jian^{1,2}, GAO Cong-Fen^{1,2}, WU Shun-Fan^{1,2,3,*} (1. College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. State & Local Joint Engineering Research Center of Green Pesticide Invention and Application, Nanjing 210095, China; 3. Sanya Institute of Nanjing Agricultural University, Sanya 572025, China)

Abstract: 【Aim】To clarify the function of sulfakinin (SK) and sulfakinin receptor (SKR) in the feeding behavior of *Nilaparvata lugens*. 【Methods】The full-length cDNA sequences of sulfakinin gene *Nlsk* and sulfakinin receptor gene *Nlskr* of *N. lugens* were cloned by PCR and subjected to bioinformatical analysis. The expression levels of *Nlsk* and *Nlskr* in different developmental stages (egg, 1st-5th instar nymphs, and male and female adults) and different tissues (head, antenna, wing, proboscis, leg, gut and Malpighian tubules) of the female adult of *N. lugens* were analyzed by qRT-PCR. The 3rd instar

基金项目: 国家自然科学基金优秀青年科学基金项目(32022011); 国家自然科学基金面上项目(31772205)

作者简介: 郭迪, 男, 1996年4月生, 吉林公主岭人, 博士研究生, 研究方向为昆虫生殖行为学, E-mail: 15754368850@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: wusf@njau.edu.cn

收稿日期 Received: 2022-06-28; 接受日期 Accepted: 2022-09-29

nymphs of *N. lugens* were injected with ds*Nlskr* for gene silencing and the expression level of *Nlskr* in the 4th instar nymph was detected by qRT-PCR. The food intake of the 4th instar nymph after the *Nlskr* silencing was measured. GO and KEGG analyses of differentially expressed genes (DEGs) and qRT-PCR verification of feeding-related genes based on the previously constructed transcriptome database of the 4th instar nymphs after RNAi of *Nlskr* were performed. 【Results】 The full-length cDNA sequences of *Nlsk* (GenBank accession number: AB817281) and *Nlskr* (GenBank accession number: BAO01059.1) of *N. lugens* were cloned by PCR. Sequence alignment results showed that the NISK mature peptide of *N. lugens* has a C-terminal FMRFamide polypeptide structure that is conserved with other species. NISK has a highly conserved transmembrane domain with homologous receptors of other insects. The results of qRT-PCR showed that *Nlsk* and *Nlskr* were highly expressed in the egg and 1st instar nymph, and mainly in the head. *Nlskr* was also highly expressed in the proboscis of *N. lugens*. Silencing *Nlskr* significantly increased the food intake of the 4th instar nymphs of *N. lugens*. Based on transcriptome data, GO and KEGG analysis result of DEGs showed that silencing of *Nlskr* by RNAi significantly affected the expression of the olfactory, gustation, energy metabolism, and feeding-related neuropeptides and receptor genes. The qRT-PCR verification results of feeding-related genes showed that silencing *Nlskr* decreased the expression levels of *NI7tmOR*, *NIOAR-3R*, *NIUH-FAF* and *NITRP-161A*, and increased the expression levels of *NIGr64f*, *NIUE-E2* and *NITHR*. 【Conclusion】 This study reveals that sulfakinin and its receptor are involved in regulating the feeding behavior of *N. lugens*, providing a potential target for the development of pest insect feeding behavior inhibitors.

Key words: *Nilaparvata lugens*; sulfakinin; sulfakinin receptor; transcriptome; feeding behavior

硫激肽(sulfakinin, SK)首先在蟑螂 *Rhyarobia maderae* 的头部被分离出来(Nachman *et al.*, 1986a, 1986b),随后在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 中也发现了 SK 基因,可编码两条序列保守的多肽 SKI 和 SK II 以及一条序列相似性较低的 SK0 成熟肽(Nichols *et al.*, 1988; Nichols, 1992)。目前为止,硫激肽在双翅目昆虫黑腹果蝇(Verleyen *et al.*, 2004; Audsley *et al.*, 2011; Zoephel *et al.*, 2012)、鞘翅目昆虫赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* (Li *et al.*, 2008; Weaver and Audsley, 2008)、直翅目昆虫沙漠蝗 *Schistocerca gregaria* 和飞蝗 *Locusta migratoria* (Clynen and Schoofs, 2009)和半翅目昆虫长红猎蝽 *Rhodnius prolixus* (Ons *et al.*, 2009)中均有发现。研究表明注射硫激肽可以显著抑制沙漠蝗取食(Wei *et al.*, 2000)。对于德国小蠊 *Blattella germanica*、赤拟谷盗和东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis* 的取食行为,硫激肽也有一定的抑制作用(Maestro *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2013; Zels *et al.*, 2015)。利用 RNAi 技术沉默双斑蟋 *Gryllus bimaculatus* 硫激肽基因后,可引起其取食量增加。除了影响昆虫取食行为(Meyering-Vos and Müller, 2007),有研究表明硫激肽在果蝇先天行为,如好斗和求偶行为中也扮演重要角色(Williams *et al.*, 2014; Agrawal

2020; Wu *et al.*, 2020)。

硫激肽主要通过作用于硫激肽受体(sulfakinin receptor, SKR)发挥作用,硫激肽受体属于 G 蛋白偶联受体(G-protein coupled receptors, GPCRs)家族成员,在昆虫中,GPCRs 参与调节昆虫的多种重要生理过程和行为反应,包括繁殖、渗透压调节、生长和发育等(Audsley and Down, 2015)。因此,昆虫 GPCRs 被认为是开发下一代杀虫剂的理想靶点。目前,在黑腹果蝇及赤拟谷盗中鉴定到两个硫激肽受体并分别被命名为 DSK-R1 和 DSK-R2(Brody and Cravchik, 2000; Hewes and Taghert, 2001)以及 TcSK-R1 和 TcSK-R2,且沉默赤拟谷盗硫激肽受体基因可提高幼虫取食量,赤拟谷盗两个硫激肽受体均在神经系统高表达(Yu *et al.*, 2013; Yu and Smaghe, 2014)。另外,在对鳞翅目昆虫家蚕 *Bombyx mori* 基因组进行分析时,仅发现 1 个硫激肽受体,被命名为 A9,对其功能还未做进一步研究(Mita *et al.*, 2004)。药理学研究结果表明,与非硫激化硫激肽相比,硫激化的硫激肽激活赤拟谷盗硫激肽受体 TcSK-R1 和 TcSK-R2 的效力更强(高 1 000 ~ 10 000 倍)(Yu *et al.*, 2015)。在长红猎蝽中也同样证明了内源的两个硫激肽 Rhopr-SK-1 和 Rhopr-SK-2 可以分别特异性激活其两个硫激肽受体

Rhopr-SKR-1 和 Rhopr-SKR-2 (Bloom *et al.*, 2019)。转录组学分析已被用来研究沉默或突变某一基因后对昆虫其他基因的影响,成为基因功能研究的重要工具之一。但对硫激肽受体基因沉默后昆虫转录组学分析还未见报道,实验室前期研究了沉默硫激肽基因后与沉默前褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 的差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs),发现硫激肽可调控味觉受体基因表达,并进而影响甜味感受 (Guo *et al.*, 2021),本研究将着重分析硫激肽受体基因沉默后,对褐飞虱 DEGs 的影响。

褐飞虱是一种刺吸式口器害虫,属于半翅目 (Hemiptera) 飞虱科 (Delphacidae),其主要通过刺吸水稻的液态营养物质造成直接为害,还可传播两种病毒,即水稻草状矮缩病毒 (rice grassy stunt virus, RGSV) 和水稻齿叶矮缩病毒 (rice ragged stunt virus, RRSV),而导致水稻严重减产 (Hibino, 1996; 程遐年等, 2003)。褐飞虱具有极高的内禀增长率和环境适应性,很容易暴发成灾 (程家安和祝增荣, 2006)。褐飞虱具有远距离迁飞习性,广泛分布于东亚、南亚、东南亚、太平洋岛屿等地区 (程遐年等, 1979)。长期以来,化学防治一直是控制褐飞虱为害的有效途径,但长期、大量、不科学地使用化学农药,已经造成其对多种杀虫剂产生了不同程度的抗性 (王彦华等, 2009; Wu *et al.*, 2018),因此在生产上亟需开发新型作用靶标的杀虫剂。本研究对褐飞虱硫激肽及其受体的基因结构、表达模式以及调节取食行为的生理功能等进行了研究,发现了硫激肽及其受体在调控褐飞虱取食行为方面发挥重要作用,研究结果可为新型昆虫取食行为抑制剂研发提供帮助。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

褐飞虱敏感品系在室内用 TN1 籼稻稻苗饲养于培养箱中。饲养条件:温度 (27 ± 1) °C,相对湿度 70% ± 10%,光周期 16L: 8D。

1.2 总 RNA 提取及 cDNA 合成

收集不同发育阶段褐飞虱 (卵、1-5 龄若虫、短翅雄成虫、长翅雄成虫、短翅雌成虫和长翅雌成虫),每个处理设置 3 个生物学重复。取羽化后 3 d 的雌成虫于冰上解剖获得头、触角、翅、口针、足、肠道和马氏管等组织,每个处理设置 3 个生物学重复,样品经液氮速冻后置于 -80 °C 冰箱待用。使用

TRIzol (Invitrogen 公司)法提取以上样品的总 RNA,使用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 浓度和纯度。按照 HiFiScript cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒 (上海浦迪) 进行反转录,分别取 1 μg 各样品总 RNA 进行反转录,合成的 cDNA 模板置于 -20 °C 保存备用。

1.3 褐飞虱 SK 及 SKR 基因克隆

使用 NCBI 数据库和 BLAST 程序对褐飞虱及其他昆虫已知的 SK 及 SKR 的数据进行序列比对和分析,用 EditSeq 预测开放阅读框 (ORF)。利用 NCBI 在线引物设计工具 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) 设计引物,引物序列见表 1。以褐飞虱成虫总 RNA 反转录获得的 cDNA 为模板,PCR 扩增褐飞虱 *sk* 及 *skr* 的 cDNA 全长序列,PCR 反应体系 (50 μL): cDNA 模板 1 μL,上下游引物 (10 μmol/L) 各 1 μL, Vazyme 公司的高保真酶 2 × Phanta Max Master Mix 25 μL, ddH₂O 22 μL。PCR 反应程序: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 15 s, 57 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 30 s, 72 °C 彻底延伸 5 min, 30 个循环。反应完成后用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,检测到目的条带后,用 PCR 产物纯化试剂盒对 PCR 产物进行纯化回收,将纯化后的目的片段连接至 pClone007 Versatile Simple Vector Mix (北京擎科生物技术有限公司) 载体并转化入大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α 感受态细胞,挑取单一菌落进行 PCR 鉴定,最后将扩大培养的菌液送至北京擎科生物技术有限公司测序。

1.4 褐飞虱 SK 及 SKR 序列分析

将预测的褐飞虱 SK 及 SKR 氨基酸序列在 SignalP 4. 1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 进行信号肽预测;在 Motif Scan (https://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan#GRAPHIC) 进行特征结构分析。通过 TMHMM v2. 0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 预测蛋白质的跨膜片段和拓扑结构 (Krogh *et al.*, 2001)。使用 Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>) 对全氨基酸序列进行多重比对。使用 MEGA X 软件 (Kumar *et al.*, 2016) 比对氨基酸序列,通过最大似然法 (maximum likelihood) 重复运行 1 000 次构建系统发育树。

1.5 褐飞虱 *sk* 及 *skr* 的表达分析

以 1.2 节合成的 cDNA 为模板,选择表达水平稳定的褐飞虱 18S rRNA 基因作为内参基因 (Xu *et al.*, 2015)。RT-PCR 扩增体系按照康为世纪公司

表 1 引物信息
Table 1 Primer information

引物 Primers	引物序列 Primer sequences (5' - 3')	用途 Use
NISK-comp-F	GAACTCTGGAAGATCAGGCCA	基因克隆 Gene cloning
NISK-comp-R	CTCTACACCTAGCGACATTTGG	
NISKR-comp-F	GGTCGTGCCATGTCCAGTC	
NISKR-comp-R	ACCGGTATTTGGTGGAAAGGA	
NISKR-F	TCGCCTCATCCATTCCTAC	qPCR
NISKR-R	TGGGGAGCATAGTGACGAAG	
NIOAR-3R-F	CGCCGATATTTTTGGGCTGG	
NIOAR-3R-R	CAGAACGAGACACAGCAGCA	
NIDSK-F	ACTGTCAGCGTTTTCTGCT	
NIDSK-R	CAGGATGACCGGAAGTGAGG	
NIGR64f-F	TTCGGCACATCTACTGCTGG	
NIGR64f-R	ACGCCATAGAGTGGCATGAG	
NITHR-F	GTTGGAAGGTCGTGTGCTTT	
NITHR-R	ACAAGATGTGTCATGTTCCGA	
NI7 tm OR-F	TGTTTTTCTCCACCTACTGTCT	
NI7 tm OR -R	CCTCCCAGAAACGAAAAAGTG	
NIUH-FAF-F	CGTGCCACTGTCTCCAATA	
NIUH-FAF-R	TAAGATCGACGAGCCATCCG	
NITRP-161A-F	GGAAACTGCAAAGGTGACTGC	
NITRP-161A-R	AGGGCAAAGTCTATCAGCCA	
NIUE-E2-F	GCTTCGGCTTTCCTTCCAAC	
NIUE-E2-R	GGCGGCAGTCCACTTATCTT	
N18 sR-F	CGCTACTACCGATTGAA	
N18 sR-R	GGAAACCTTGTACGACTT	
T7-Nlskr-F	TAATACGACTCACTATAGGGG GCTCGTGGAAAGCTGCAGAT	RNAi
T7-Nlskr-R	TAATACGACTCACTATAGGGT GCCAGCAGCTCGATGAGTAAG	
T7-gfp-F	TAATACGACTCACTATAGGGG AAGGGCGAGGAGCTGTTACCCG	
T7-gfp-R	TAATACGACTCACTATAGGGG CAGCAGGACCATGTGATCGCCG	

加粗序列表示 T7 启动子序列。Sequences in bold indicate T7 promoter sequences.

UltraSYBR Mixture (With ROX) 操作说明配制, 反应体系 (20 μ L): 2 \times UltraSYBR Mixture 10 μ L, cDNA 模板 2 μ L, 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L, ddH₂O 6 μ L。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 40 个循环。使用 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪进行 PCR 扩增并记录不同处理扩增 Ct 值, 每个处理 3 个以上生物学重复。

1.6 褐飞虱 *skr* 的 RNAi

根据 1.3 节克隆的褐飞虱 *Nlskr* 以及 *gfp* 序列设计 dsRNA 引物 (表 1), 按照 Ambion 公司的 MEGAscript T7 Kit 试剂盒说明书合成 *Nlskr* 和 *gfp* 的 dsRNA, 然后稀释至 5 000 ng/ μ L, 4 $^{\circ}$ C 条件下 12 000 r/min 离心 5 min 以将杂质沉淀, 避免注射针的堵塞, 吸取上清至新的 RNase-free 的 EP 管, 然后放置于 -70 $^{\circ}$ C 备用。

选取褐飞虱 3 龄若虫, 用 CO₂ 麻醉 10 s 左右,

然后使用细毛刷将褐飞虱依次排列于琼脂板的胶槽中, 保持褐飞虱正面朝上, 向其中足基部柔软的位置注射 *Nlskr* 和 *gfp* 的 dsRNA, 每头褐飞虱注射 dsRNA 300 ng (约 60 nL), 注射完成的褐飞虱用毛刷轻柔地从胶槽中取出并放置于事先做好的养虫瓶中, 并用纱网封口。每个基因的 dsRNA 注射 100 头, 以注射 *gfp* 基因 dsRNA 的褐飞虱作为对照组。3 d 后试虫 RNA 沉默效率达到最高, 虫龄到达 4 龄, 利用 qRT-PCR 检测 *Nlskr* 的表达量, 分析沉默效率, qRT-PCR 方法同 1.5 节。

1.7 褐飞虱取食量的测定

为了研究基因沉默对褐飞虱取食行为的影响, 将 1.6 节注射了 ds*Nlskr* 和 ds*gfp* 后 3 d 的 10 头 4 龄若虫分别放入长 9 cm、直径 2 cm 的塑料容器中, 饥饿 5 h, 确保褐飞虱在实验前均处于饥饿状态, 加入 200 μ L 人工饲料取食 24 h, 人工饲料配方参见

Fu 等(2001), 并设置只含有液体饲料的空白对照, 以测定挥发损失, 公式: 饲料挥发量 = 24 h 前饲料重量 - 24 h 后饲料重量。使用万分之一天平统计加入处理后的褐飞虱取食前后液体饲料重量的差异, 用饲料挥发量来矫正测定结果, 公式: 褐飞虱取食量 = 24 h 前食物重量 - 24 h 后食物重量 - 饲料挥发量。最终以此计算药物注射或基因沉默对褐飞虱取食的影响公式: 取食量 (%) = (ds*Nlskr* 处理的褐飞虱取食量/ds*gfp* 处理的褐飞虱取食量) × 100, 记录褐飞虱不同处理的取食量, 每个实验至少重复 4 次以上。

1.8 RNAi 后褐飞虱转录组数据分析和 qRT-PCR 验证

为了揭示 *Nlskr* 控制取食行为的分子机制, 对注射 ds*Nlskr* 沉默 *Nlskr* 后的褐飞虱 4 龄若虫进行了转录组分析。基于前期研究已构建的注射了 ds*Nlskr* 或 ds*gfp* 的褐飞虱 4 龄若虫转录组数据库, 其中, ds*Nlskr* 处理组转录组登录号为 PRJNA868188, SRR21011515 (ds*Nlskr*-1), SRR21011514 (ds*Nlskr*-2), SRR21011513 (ds*Nlskr*-3) 和 SRR21011512 (ds*Nlskr*-4); ds*gfp* 对照组转录组登录号为 PRJNA657327, SRR12460896 (ds*gfp*-1), SRR12460892 (ds*gfp*-2), SRR12460891 (ds*gfp*-3) 和 SRR12460890 (ds*gfp*-4), ds*gfp* 对照组转录组测序数据已报道 (Guo *et al.*, 2021), 但未与 *Nlskr* 基因沉默的 4 龄若虫转录组数据做比较分析。采用 clusterProfiler 软件对注射了 ds*Nlskr* 处理组和 ds*gfp* 对照组之间的 DEGs 进行 GO 功能注释和 KEGG 通路富集分析 (Reimand *et al.*, 2007)。通过定位到基因组区域或外显子区的测序序列的计数来估计基因的表达水平。利用 Pearson 方法 (Filloux *et al.*, 2014), 基于全基因组 FPKM (fragments per kilobase million) 值评估计算各处理组生物学重复之间的组内及组间样本的相关性系数, 绘制成热图。利用 DEseq 方法筛选 DEGs (Tarazona *et al.*, 2011), 以 $|\log_2 \text{fold change}| > 1$ 和 $P < 0.05$ 为筛选 DEGs 的条件。

结合 GO 数据库 DEGs 注释结果, 通过 qRT-PCR 验证取食相关的 7 个基因 (*NI7tmOR*, *NIOAR-3R*, *NIUH-FAF*, *NITRP-161A*, *NIGr64f*, *NITHR* 和 *NIUE-E2*) 的表达水平, 选择表达水平稳定的褐飞虱 18S rRNA 基因作为内参基因 (Xu *et al.*, 2015), 引物序列见表 1 所示, 以测序返回的 4 龄若虫 cDNA 样品为模板进行 qRT-PCR 验证, qPCR 方法同 1.5 节。

1.9 数据分析

采用相对定量 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行基因表达量数据分析 (Livak and Schmittgen, 2001)。数据均使用 GraphPad Prism 7.0 Software (GraphPad Software, 美国) 数据处理统计软件进行统计分析。采用非配对 *t* 检验确定两组正态分布数据之间的差异显著水平, 采用单因素方差分析并利用 Tukey 氏法多重比较进行差异显著性分析。

2 结果

2.1 *Nlsk* 和 *Nlskr* 的克隆及序列

克隆得到褐飞虱 *Nlsk* (GenBank 登录号: AB817281) cDNA 全长序列, *Nlsk* 编码两个成熟多肽, NISK1 [SDDY (SO3) GHMRFamide] 和 NISK2 [GEADDKFDDY (SO3) GHMRFamide]。NISK 的 N 端的第 1 - 27 位氨基酸为信号肽结构, 蛋白裂解位点在 NISK 丙氨酸和天冬酰胺之间。两个神经肽序列 (NISK1 和 NISK2) 都有 1 个 C 端甘氨酸残基, 这是一个潜在的翻译后酰胺化底物。与其他昆虫的 SKs 类似, NISK1 和 NISK2 都含有 1 个酪氨酸残基, 在成熟的神经肽中, 该残基可以被硫酸化。此外, NISK1 中 N 端谷氨酰胺残基 (Q) 是潜在的 N 端焦谷氨酰胺化 (pQ) 底物。蛋白特征结构预测表明 NISK 的 C 端第 108 - 113 和第 126 - 131 位氨基酸 (YGHMRF) 具有典型的 FMRFamide 型多肽结构。

系统发育树显示, 脊椎动物门、线虫门、节肢动物门的 SK 成熟肽各自聚在一起, 褐飞虱 NISK1 同 NISK2 与其他昆虫 SK 成熟肽聚为一支类 (图 1)。由此可见, 昆虫的 SK 基因经翻译后修饰通常生成两段长短不一的成熟肽, 而在线虫中会出现生成 3 段成熟肽的现象。从不同物种的成熟肽序列对比中可以看出, SK 的进化非常保守。对比于线虫, 昆虫 SK 与脊椎动物的 CCK/Gastrin 拥有更为接近的蛋白结构。结果表明, 褐飞虱 NISK 同其他昆虫 SK 共享一个保守 YGHM/LRF-NH2 六肽结构。

获得了褐飞虱硫激肽受体基因 *Nlskr* (GenBank 登录号: BAO01059.1) 的 cDNA 全长序列, 其编码的蛋白具有 G 蛋白偶联受体 (GPCRs) 的典型特征, 即 7 个跨膜结构域 (TM1 - TM7)、3 个胞外环、3 个胞内环、胞内 C 端和胞外 N 端 (图 2), 也存在其他昆虫 SKR 预测和证实的磷酸化位点、糖基化位点、棕榈酰化位点以及配体结合位点等保守的结构域。多重序列对比分析发现, 褐飞虱 NISKR 跨膜域的保

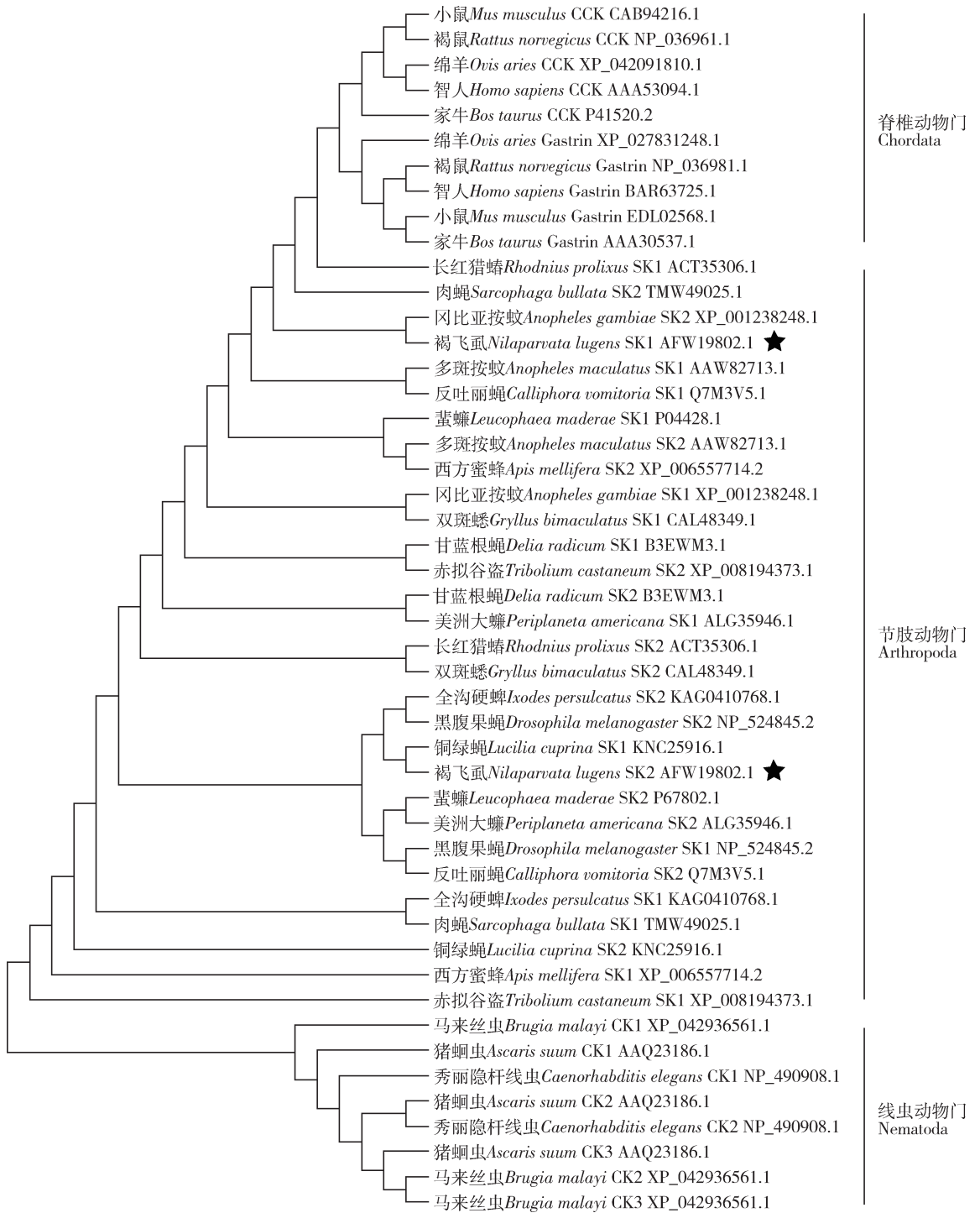


图 1 最大似然法构建的基于氨基酸序列的褐飞虱及其他物种的 SK 及类似物系统发育树(1 000 次重复)

Fig. 1 Phylogenetic tree of SK and analogs of *Nilaparvata lugens* and other species constructed by maximum likelihood method based on amino acid sequence (1 000 replicates)

守性均大于非跨膜域,并且跨膜域 TM5 与跨膜域 TM6 间的胞内 3 环是最长的(图 2)。

进化树显示,褐飞虱 NISKR 与其他昆虫的 SKR 聚集在一起,且与致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus* SKR 的亲缘关系更近(图 3)。有趣的是,搜索褐飞虱基因组发现,与其他昆虫,如果蝇和赤拟谷盗中存

在两个 SKR 基因不同,在褐飞虱体内仅存在 1 个 SKR 基因,因 SK 与昆虫取食行为密切相关,褐飞虱刺吸水稻的取食方式,可能是导致其存在 1 个 SKR 的原因。

2.2 褐飞虱 *Nlsk* 和 *Nlskr* 的时空表达谱

采用 RT-PCR 检测了褐飞虱 *Nlsk* 和 *Nlskr* 在褐

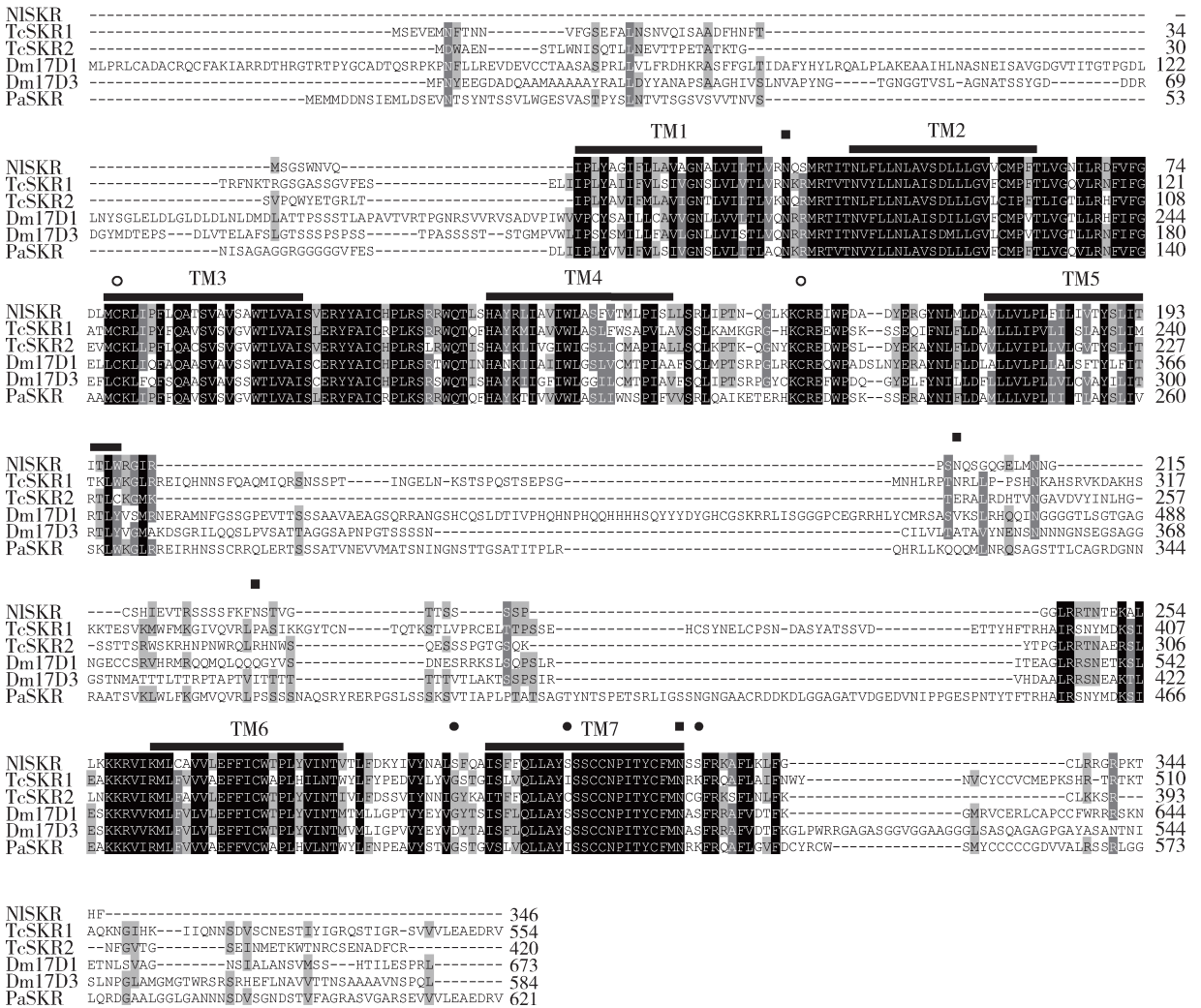


图2 褐飞虱 NISKR 与其他昆虫同源蛋白氨基酸序列比对

Fig. 2 Amino acid sequence alignment of NISKR of *Nilaparvata lugens* and orthologous proteins from other insects

蛋白来源物种和 GenBank 登录号 Protein origin species and GenBank accession numbers; NISKR: 褐飞虱 *Nilaparvata lugens*, BAO01059. 1; TcSKR1: 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*, AGK29938; TcSKR2: 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*, XP_972750; Dm17D1: 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*, NP_001097021. 1; Dm17D3: 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*, NP_001097023; PaSKR: 美洲大蠊 *Periplaneta americana*, AAX56942. TM1 - 7: 分别表示推导的 7 个跨膜结构域 Putative seven transmembrane domains, respectively. 空圈表示两个保守的半胱氨酸残基 (C78 和 C156) 之间可能形成的二硫键;可能的 PKC 磷酸化位点和可能的 N-糖基化位点分别用实心圆和实心框表示。Potential disulfide bond, which can be formed between two conserved cysteine residues (C78 and C156), are labelled with empty circles. Potential PKC phosphorylation sites and potential N-glycosylation sites are indicated by filled circles and filled box, respectively.

飞虱不同发育阶段及雌成虫不同组织中的相对表达量。结果显示,在不同发育阶段, *Nlsk* 和 *Nlskr* 在卵和 1 龄若虫中高表达,且随着龄期增加若虫中表达量逐步降低,两基因在雄成虫中表达量均高于雌成虫的(图 4: A, C);在雌成虫不同组织中, *Nlsk* 和 *Nlskr* 均在头部高表达(图 4: B, D),有趣的是 *Nlskr* 基因还在口针、翅和触角中高表达(图 4: D),预示着褐飞虱硫酰胺可能参与调控嗅觉和味觉等外周感觉。

2.3 沉默 *Nlskr* 对褐飞虱取食量的影响

qRT-PCR 结果显示,与 *dsgfp* 对照组比, *Nlskr* RNAi 后显著降低了 4 龄若虫中 *Nlskr* 的表达量。

($P < 0.01$) (图 5: A)。取食实验表明,注射 *dsNlskr* 的褐飞虱 4 龄若虫取食量比注射 *dsgfp* 的对照组多 1 倍左右,差异显著($P < 0.01$) (图 5: B)。这些结果表明,沉默 *Nlskr* 造成褐飞虱取食量增加,推测 *Nlskr* 在褐飞虱体内可能发挥抑制取食的作用。

2.4 沉默 *Nlskr* 后褐飞虱 4 龄若虫转录组中 DEGs 和取食相关基因表达谱

结果显示注射 *dsNlskr* 和 *dsgfp* 两组内各重复间转录组数据相关性分别为 0.895 ~ 0.935 和 0.862 ~ 0.916。注射 *dsNlskr* 与注射 *dsgfp* 的对照组相比有 496 个 DEGs,其中 122 个上调表达,174 个下调表达。

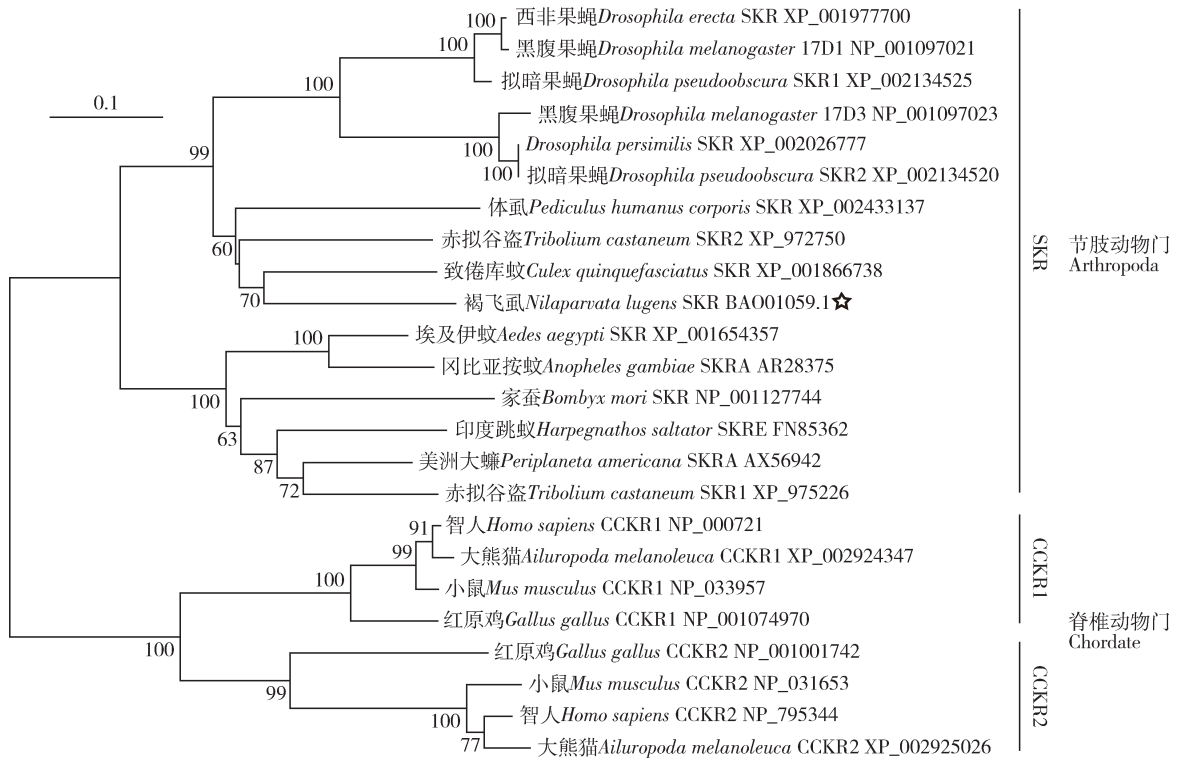


图3 最大似然法构建的基于氨基酸序列的褐飞虱及其他物种 SKR 和 CCKR 的系统发育树(1 000 次重复)
 Fig. 3 Phylogenetic tree of SKR and CCKR from *Nilaparvata lugens* and other species constructed by maximum likelihood method based on amino acid sequence (1 000 replicates)

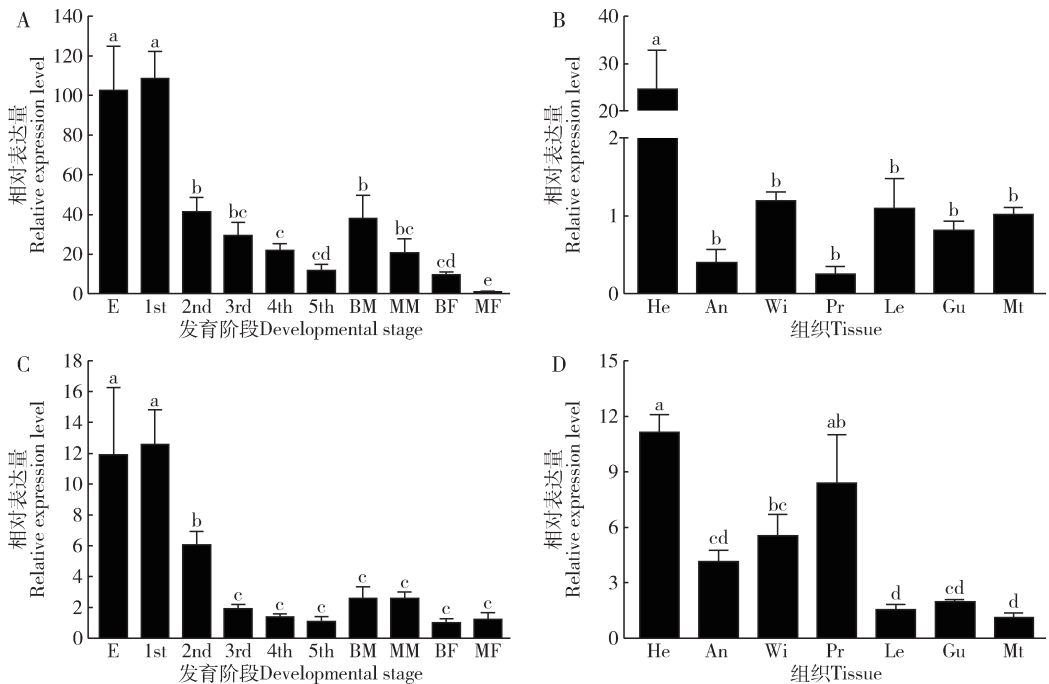


图4 褐飞虱 *Nlsk* (A, B) 和 *Nlskr* (C, D) 在不同发育阶段 (A, C) 和雌成虫不同组织中 (B, D) 的表达量
 Fig. 4 Expression levels of *Nlsk* (A, B) and *Nlskr* (C, D) in different developmental stages (A, C) and tissues of female adult (B, D) of *Nilaparvata lugens*

E: 卵 Egg; 1st-5th: 分别表示 1-5 龄若虫 1st-5th instar nymphs, respectively; BM: 短翅雄成虫 Brachypterous male adult; MM: 长翅雄成虫 Macropterous male adult; BF: 短翅雌成虫 Brachypterous female adult; MF: 长翅雌成虫 Macropterous female adult; He: 头 Head; An: 触角 Antenna; Wi: 翅 Wing; Pr: 口针 Proboscis; Le: 足 Leg; Gu: 肠道 Gut; Mt: 马氏管 Malpighian tubules. 图中数据为平均值 ± 标准差; 柱上不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$, 单因素方差分析后 Tukey 氏多重比较)。Data in the figure are mean ± SD. Different letters above bars indicate significant difference ($P < 0.05$, one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons).

Downloaded from <https://cabidigitallibrary.org> by 128.175.230.110, on 06/25/24.
 Subject to the CABI Digital Library Terms & Conditions, available at <https://cabidigitallibrary.org/terms-and-conditions>

111048196) 的表达; 抑制 3 个味觉受体基因(基因 ID 分别为 111050852, 111053804 和 novel. 761) 的表达, 促进 3 个味觉受体基因(基因 ID 分别为 111056166, novel. 3885 和 111045484) 的表达; 促进 1 个能量代谢相关基因(基因 ID: 111055281) 的表

达; 抑制 1 个章鱼胺受体(基因 ID: 111054132) 和 2 个神经肽受体基因(基因 ID: 111049101 和 111054016) 的表达, 促进 1 个神经肽受体基因(基因 ID: 111060417) 的表达(表 2)。

表 2 RNAi 沉默 *Nlskr* 后褐飞虱 4 龄若虫转录组中取食相关基因的表达谱
Table 2 Expression profiles of feeding-related genes in the 4th instar nymphal transcriptome of *Nilaparvata lugens* after the *Nlskr* silencing by RNAi

分类 Classification	基因 ID Gene ID	基因描述 Gene description	FPKM		Log ₂ fold change
			<i>dsNlskr</i>	<i>dsgfp</i>	<i>dsNlskr</i> vs <i>dsgfp</i>
嗅觉受体相关 基因 Olfactory receptor-related genes	111052348	Odorant receptor 19b	0.87999	0	2.27175
	111056742	Odorant receptor 23a-like	0.22741	1.82157	-2.57009
	111048321	Odorant receptor Or2-like	1.65915	4.54916	-1.53112
	111058658	Odorant receptor 43a-like	0.22741	0.95742	-1.66862
	111057103	Odorant receptor 83a-like	10.48733	5.35231	1.03485
	111044749	Odorant receptor coreceptor	3.16190	7.04728	-1.16253
	111048196	Odorant receptor 63a-like	1.59190	0	3.17744
	novel. 2732	7tm odorant receptor	2.37885	5.46041	-1.16241
味觉受体相关 基因 Gustatory receptor-related genes	111062841	Odorant receptor 22c-like	0	0.76446	-2.05599
	111056166	Gustatory receptor for sugar taste 43a-like	1.81152	1.31717	0.45490
	111045484	Gustatory receptor for sugar taste 64f-like	6.51873	4.64143	0.47832
	111050852	Gustatory receptor 28a	0.92522	2.21379	-1.23247
	novel. 3885	Trehalose receptor	4.23817	0.44778	3.14836
糖代谢相关基因 Glycometabolism- related genes	111053804	Gustatory receptor 28b	0.45483	0.77185	-0.71044
	novel. 761	7tm chemosensory receptor	0.22741	2.36469	-2.95617
	111055281	Alpha-1, 6-mannosyl-glycoprotein 2-beta-N-acetylglucosaminyltransferase-like	1.62303	0	3.21129
	111045068	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit 1-like	84.30618	116.47831	-0.47113
取食相关神经肽 及其受体基因 Feeding-related neuropeptides and their receptor genes	novel. 3457	Trehalase	7.01506	9.44769	-0.48293
	111064228	Trehalose-6-phosphate synthase-like	55.32070	73.44114	-0.40579
	111047610	Drosulfakinins-like	17.91027	26.69087	-0.55600
	111054016	Neuropeptide Y receptor type 1-like	0.22741	0.70260	-1.22844
	111050037	Neuropeptide FF receptor 2-like	2.73674	1.94118	0.48512
	111060417	Neuropeptide F receptor-like	4.69190	2.41830	0.99350
	111059420	Nachykinin-like peptides receptor 86C	6.90737	4.09301	0.72180
	111059976	Nachykinin-like peptides receptor 99D	0.44704	0.70260	-0.54194
	111049101	Neuropeptide SIFamide receptor-like	0.67834	1.39686	-1.00341
	111054132	Octopamine receptor beta-3R-like	0	4.21460	-4.49439
	111045524	Octopamine receptor Oamb-like	1.93959	2.93628	-0.56554
其他基因 Other genes	111058913	Octopamine receptor Oamb-like	0.32045	0.51909	-0.66028
	111056765	Tyramine/octopamine receptor-like	10.24367	12.72045	-0.31996
	111047531	Neuropeptide CCHamide-1 receptor-like	2.11679	3.17236	-0.57263
	111056107	Insulin-like receptor	19.18793	22.39910	-0.24202
	111060743	Ubiquitin-conjugating enzyme E2-20 kDa-like	1.65915	0	3.19526
	111063588	Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase FAF-X	0.46651	17.30265	-5.11394
	111046847	Transmembrane protein 161A-like	2.84144	3.98828	-0.49727

FPKM: Fragments per kilobase million.

2.5 取食相关基因的验证

qRT-PCR 验证结果表明,与转录组分析结果(图 7: A)一致,沉默 *Nlskr* 确实可降低 *NI7tmOR*,

NIOAR-3R, *NIUH-FAF* 和 *NITRP-161A* 的表达,而提高 *NIGr64f*, *NIUE-E2* 和 *NITHR* 的表达(图 7: B - H)。

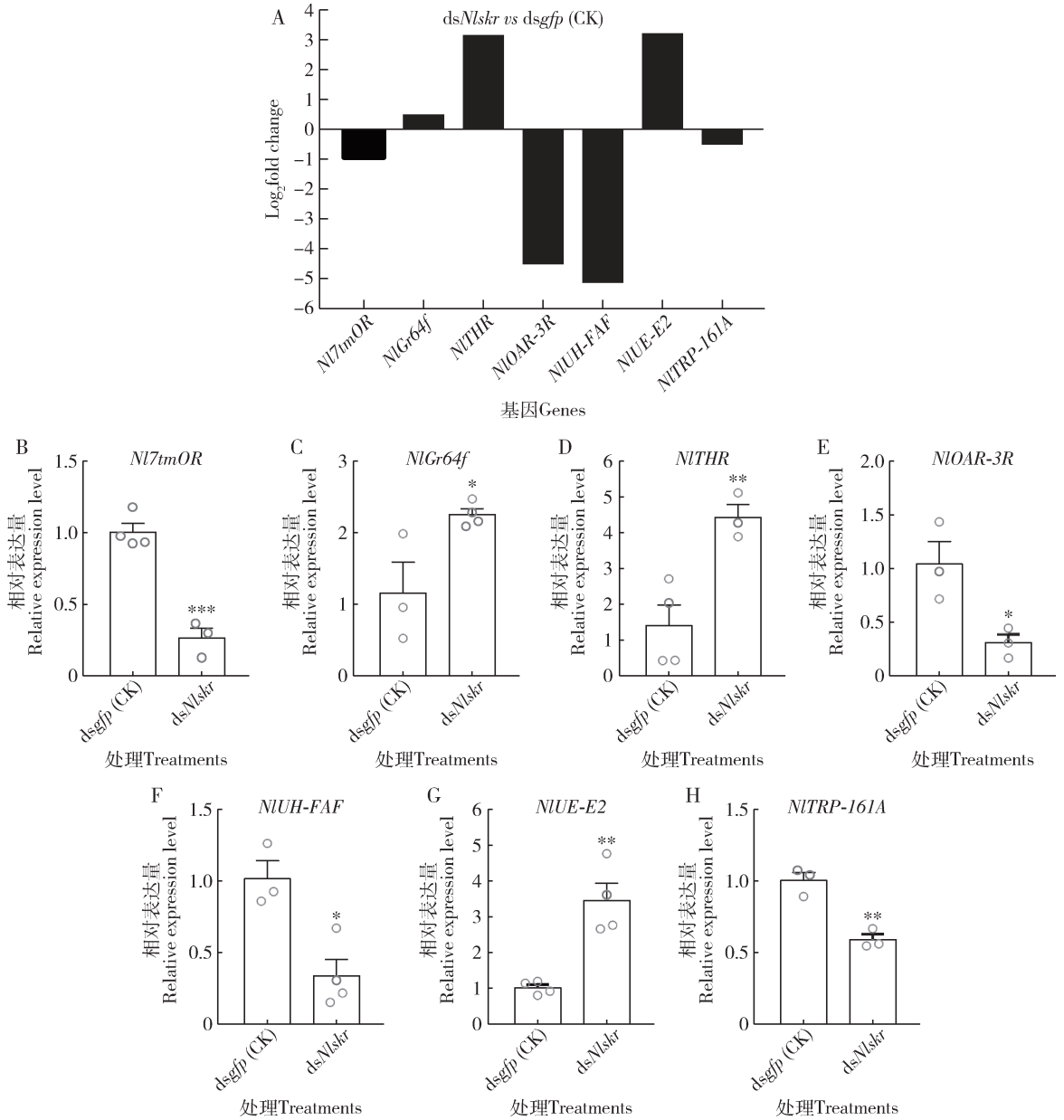


图 7 dsNlskr 和 dsgefj 处理组间褐飞虱 4 龄若虫转录组中取食相关差异表达基因的 RNA-seq 测序数据(A)和 qRT-PCR 验证结果(B - H)

Fig. 7 Verification of RNA-seq data (A) of differentially expressed genes related to feeding between the transcriptomes of dsNlskr and dsgefj treatment groups of the 4th instar nymph of *Nilaparvata lugens* by qRT-PCR (B - H)

3 讨论

本研究克隆了褐飞虱硫激肽及其受体基因的 cDNA 全长序列,对其基因结构和序列特征进行了分析,发现 NISK 可编码两个成熟肽,NISKR 是典型

的 GPCR。qRT-PCR 结果表明褐飞虱硫激肽及其受体基因主要表达在卵、1 龄若虫和雄成虫以及雌成虫的头部中(图 4)。通过 RNAi 沉默褐飞虱硫激肽受体基因可显著提高褐飞虱的取食量(图 5)。通过转录组测序分析比较,发现沉默褐飞虱硫激肽受体基因能够显著影响嗅觉、味觉以及与取食相关的

经肽及其受体基因的表达(图7;表2),研究结果可为进一步解析硫激肽受体如何参与调控褐飞虱取食行为提供帮助。

通过对褐飞虱 NISK 氨基酸序列进行特征结构预测, NISK 与其他昆虫的 SK 同源肽具有类似的信号肽结构。这与 NISK 的分泌特性相符合,已有研究表明昆虫 SK 在脑中 IPCs 分泌细胞产生并分泌到胞外发挥生理功能(Nichols *et al.*, 1988; East *et al.*, 1997; Söderberg *et al.*, 2012)。褐飞虱 NISK 的 C 端第 108 - 113 和第 126 - 131 位氨基酸具有典型的 FMRFamide 型多肽结构,此结构具有脊椎动物胃泌素/胆囊收缩素家族的特征结构(Johnsen, 1998),是昆虫硫激肽与脊椎动物与胃泌素/胆囊收缩素同源的主要证据。序列比对结果显示,不同物种的 SK 同源肽序列相似度不高,但是不同物种之间存在高度保守的 FMRFamide 型多肽结构。大多数昆虫硫激肽氨基酸经加工修饰后生成两段成熟肽 SK1 和 SK2(Schoofs and Nachman, 2006)。进化树显示,脊椎动物、昆虫以及线虫 SK 同源肽各自聚类,褐飞虱 NISK 成熟肽与其他昆虫的同源蛋白聚在一起,具有较近的进化关系(图1)。将已报道的 48 条来自不同物种的 SK/CCK 同源蛋白进行序列比较,结果发现脊椎动物、线虫及昆虫的 SK/CCK 具有保守的六肽结构 YGHM/LRF-NH2 和完全相同的碳端甘氨酸修饰。相比较线虫,昆虫与哺乳动物的成熟 SK/CCK 具有更为相似的进化方式,其保守结构具有更小的差异,因此昆虫 SK1/SK2 分别与脊椎动物 CCK/Gastrin 相对应。昆虫 SK 极度保守,褐飞虱 SK1 与多种昆虫同源蛋白,如黑腹果蝇和冈比亚按蚊具有完全相同的六肽结构。酪氨酸(Y)的作用至关重要,在绝大多数昆虫中,酪氨酸(Y)的前端被 D 或者 DD/DG 修饰,而随后紧接着通常是 1 个 R 或者 G,酪氨酸需要被硫酸化是影响成熟肽活性的关键因素。也是该神经肽被命名为硫激肽的原因。酪氨酸易于被硫酸化,在多种昆虫中报道硫酸化或者非硫酸化的成熟肽具有不同的生理功能或者对其受体具有不同的药理学激动效应(Zels *et al.*, 2014)。对于某些神经肽来说,酪氨酸硫酸化是其是否具有活性的关键。例如,CCK 的活性取决于酪氨酸残基的硫酸化,有研究报道硫酸化 CCK 的活性是非硫酸化 CCK 的 260 倍(Brand *et al.*, 1984)。

在昆虫中,不同昆虫所鉴定到 SKR 个数不同,果蝇和赤拟谷盗中鉴别到两个 SKR (Brody and Cravchik, 2000; Yu *et al.*, 2013, 2014),而褐飞虱

中只鉴定到 1 个 SKR。聚类分析结果显示(图3),4 种脊椎动物 CCKR1 型受体和 CCKR2 型受体分别聚在一起,CCKR1 和 CCKR2 存在明显的区分。但是昆虫 SKR 的在聚类上很难区分开来。这说明 CCKR 和 SKR 尽管是两类同源的受体,但是进化方式不完全相同,据报道脊椎动物的两个 cck 受体基因 *cckr1* 和 *cckr2* 位于不同染色体上(Staljanssens *et al.*, 2011),而果蝇 *skr* 基因 *dskr1* 和 *dskr2* 位于同一染色体上。在聚类树上我们可以看出褐飞虱 SKR 与其他昆虫 SKR 聚在一起,且与致倦库蚊 SKR 具有最近的进化关系(图3)。有报道表明蚜虫没有 SK 和 SKR,这可能与其特殊的取食或生殖方式有关,关于蚜虫 SK 及其 SKR 缺失以及为何褐飞虱体内仅存在 1 个 SKR 的原因还有待进一步研究(Nässel and Wu, 2022)。

利用 qRT-PCR 对褐飞虱 *Nlsk* 及 *Nlskr* 进行表达模式分析(图4),在若虫不同龄期及成虫各个发育阶段均能够检测到其表达。*Nlskr* 的表达模式与 *Nlsk* 在若虫不同龄期及成虫各个发育阶段在卵期表达模式类似,在卵和 1 龄若虫中表达量最高,在 2 - 5 龄若虫中逐渐降低,羽化为成虫后,雄成虫中的表达量高于雌成虫中的,且短翅雌成虫中 *Nlskr* 的表达量最低(图4: A, C);考虑到 SK 和 SKR 主要是参与昆虫饱腹信号感知抑制昆虫取食行为,而褐飞虱在低龄阶段取食量要明显低于高龄若虫,且雌成虫因繁殖需求等生理因素取食量也明显高于雄成虫,这也许是何高龄若虫以及雌成虫中硫激肽及其受体基因低表达的原因。在雌成虫不同组织中,*Nlsk* 与 *Nlskr* 都在褐飞虱头部中表达量最高,这与其主要在神经系统发挥重要功能有关,另外,*Nlsk* 在翅、足、马氏管和肠道中表达量依次降低,在口针和触角中也能检测到其表达,但表达水平远低于其他组织中的(图4: B, D)。对比 *sk* 在长红猎蝽中的表达模式,*sk* 同样在头部和咽下神经节(suboesophageal ganglion, SOG)中高表达(Al-Alkawi *et al.*, 2017)。有趣的是,褐飞虱 *Nlskr* 在口针、翅、触角中表达量相对较高,在足、肠道和马氏管中表达量较低(图4: D)。我们的前期研究结果也发现黑腹果蝇的口器和前足跗节上也有硫激肽受体表达,且影响果蝇的甜味感知(Guo *et al.*, 2021)。因此,褐飞虱硫激肽也可能从脑中分泌后,进一步作用于口针、翅或触角上的硫激肽受体,进而影响褐飞虱的取食、运动或嗅觉功能。

与对照相比,沉默褐飞虱硫激肽受体基因 *Nlskr* 后可以导致褐飞虱的取食量增加(图5, B)与前人

的结果一致, 赤拟谷盗 *skr* 基因沉默后, 亦可显著增加幼虫的取食量 (Yu *et al.*, 2013)。这些研究表明 SKR 是 SK 信号通路调节取食的关键一环, 并且 SKR 在调控昆虫取食行为的功能上具有保守性。SK 可以显著影响黑腹果蝇幼虫对 BuOH 的气味偏好 (Nichols *et al.*, 2008), 本研究发现沉默 *skr* 能引起多个嗅觉相关基因 (基因 ID 分别为 111052348, 111056742, 111048321, novel. 2732, 111058658, 111062841, 111048196, 111044749 和 111057103 等) 的差异表达 (表 2), 推测在褐飞虱中 NISKR 可能参与调控这些嗅觉结合蛋白及受体的表达, 进而影响褐飞虱对气味的反应, 从而调控褐飞虱取食行为。Inagaki 等 (2014) 研究发现黑腹果蝇中神经肽 NPF 提高甜味受体 Gr5a 的灵敏度, 而 sNPF 可降低苦味受体 Gr66a 的敏感性, 本研究根据差异表达基因功能注释结果, 发现沉默褐飞虱硫激肽受体基因能够影响 6 个味觉受体相关基因 (基因 ID 分别为 111050852, 111053804, novel. 761, 111056166, 111045484 和 novel. 3885) 的差异表达 (表 2), 由此推断 NISKR 亦可能通过调节味觉神经元的敏感性, 导致褐飞虱的取食量降低。Slocinska 等 (2015) 在大粉甲虫 *Zophobas atratus* 中发现注射 Zopat-SK-1 会造成海藻糖浓度增加, 与之结果类似, 本研究发现沉默褐飞虱硫激肽受体基因可导致海藻糖酶基因 (*Nltrehalase*) 表达量下降, 推测褐飞虱 NISKR 可能促进海藻糖酶的表达, 造成海藻糖浓度增加。黄粉虫 *Tenebrio molitor* 的脂肪体组织中, 硫激肽可引起不同程度的脂肪酸含量变化 (Slocińska *et al.*, 2019)。MGAT2 (α -1, 6-mannosyl-glycoprotein 2-beta-N-acetylglucosaminyltransferase-like) 是脂肪吸收过程的关键酶之一, 在哺乳动物小鼠 *Mus musculus* 中研究发现, 抑制 MGAT2 表达对能量代谢具有关键的作用, 可减缓能量消耗速度, 并且 MGAT2 具有抑制由脂肪诱导的肠肽释放和脂肪摄入的功能 (Nelson *et al.*, 2014; Mochida *et al.*, 2020)。转录组数据发现沉默 *Nlskr* 基因促进 MGAT2 表达, 推测硫激肽可通过调控褐飞虱体内能量代谢过程进而抑制褐飞虱的取食行为。

褐飞虱主要通过直接取食水稻汁液造成受害, 而我们对其取食行为的调节机制所知甚少。本研究中明确了褐飞虱硫激肽 NISK 及其受体 NISKR 参与调控褐飞虱取食行为, 未来或可针对褐飞虱硫激肽受体信号通路设计特异的取食行为抑制剂用于该类害虫的防治。

参考文献 (References)

- Agrawal P, Kao D, Chung P, Looger LL, 2020. The neuropeptide Drosulfakinin regulates social isolation-induced aggression in *Drosophila*. *J. Exp. Biol.*, 223(Pt 2): jeb207407.
- Al-Alkawi H, Lange AB, Orchard I, 2017. Cloning, localization, and physiological effects of sulfakinin in the kissing bug, *Rhodnius prolixus*. *Peptides*, 98: 15–22.
- Audsley N, Down RE, 2015. G protein coupled receptors as targets for next generation pesticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 67: 27–37.
- Audsley N, Matthews HJ, Down RE, Weaver RJ, 2011. Neuropeptides associated with the central nervous system of the cabbage root fly, *Delia radicum* (L.). *Peptides*, 32(3): 434–440.
- Bloom M, Lange AB, Orchard I, 2019. Identification, functional characterization, and pharmacological analysis of two sulfakinin receptors in the medically-important insect *Rhodnius prolixus*. *Sci. Rep.*, 9(1): 13437.
- Brand SJ, Andersen BN, Rehfeld JF, 1984. Complete tyrosine-O-sulphation of gastrin in neonatal rat pancreas. *Nature*, 309(5967): 456–458.
- Brody T, Cravchik A, 2000. *Drosophila melanogaster* G protein-coupled receptors. *J. Cell Biol.*, 150(2): F83–F88.
- Cheng J, Zhu ZR, 2006. Analysis on the key factors causing the outbreak of brown planthopper in Yangtze Area, China in 2005. *Plant Prot.*, 32(4): 1–4. [程家安, 祝增荣, 2006. 2005 年长江流域稻区褐飞虱暴发成灾原因分析. 植物保护, 32(4): 1–4]
- Cheng X, Chen R, Xi X, Yang L, Zhu Z, Wu J, Qian R, Yang J, 1979. Study on migration of rice brown planthopper. *Acta Entomol. Sin.*, 22: 1–21. [程遐年, 陈若麓, 习学, 杨联民, 朱子龙, 吴进才, 钱仁贵, 杨金生, 1979. 稻褐飞虱迁飞规律的研究. 昆虫学报, 22(1): 1–21]
- Cheng X, Wu J, Ma F, 2003. Study and Control of Brown Planthopper. China Agriculture Press, Beijing. 255–258. [程遐年, 吴进才, 马飞, 2003. 褐飞虱研究与防治. 北京: 中国农业出版社. 255–258]
- Clynen E, Schoofs L, 2009. Peptidomic survey of the locust neuroendocrine system. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 39(8): 491–507.
- East PD, Hales DF, Cooper PD, 1997. Distribution of sulfakinin-like peptides in the central and sympathetic nervous system of the American cockroach, *Periplaneta americana* (L.) and the field cricket, *Teleogryllus commodus* (Walker). *Tissue Cell*, 29(3): 347–354.
- Filloux C, Cédric M, Romain P, Lionel F, Christophe K, Dominique R, Abderrahman M, Daniel P, 2014. An integrative method to normalize RNA-Seq data. *BMC Bioinform.*, 15: 188.
- Fu Q, Zhang Z, Hu C, Lai F, Sun Z, 2001. A chemically defined diet enables continuous rearing of the brown planthopper, *Nilaparvata*

- 36(1): 111–116.
- Guo D, Zhang YJ, Zhang S, Li J, Guo C, Pan YF, Zhang N, Liu CX, Jia YL, Li CY, Ma JY, Nässel DR, Gao CF, Wu SF, 2021. Cholecystokinin-like peptide mediates satiety by inhibiting sugar attraction. *PLoS Genet.*, 17(8): e1009724.
- Hewes RS, Taghert PH, 2001. Neuropeptides and neuropeptide receptors in the *Drosophila melanogaster* genome. *Genome Res.*, 11(6): 1126–1142.
- Hibino H, 1996. Biology and epidemiology of rice viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 34: 249–274.
- Inagaki HK, Panse KM, Anderson DJ, 2014. Independent, reciprocal neuromodulatory control of sweet and bitter taste sensitivity during starvation in *Drosophila*. *Neuron*, 84(4): 806–820.
- Johnsen AH, 1998. Phylogeny of the cholecystokinin/gastrin family. *Front. Neuroendocrinol.*, 19(2): 73–99.
- Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL, 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *J. Mol. Biol.*, 305(3): 567–580.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K, 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.*, 33(7): 1870–1874.
- Li B, Predel R, Neupert S, Hauser F, Tanaka Y, Cazzamali G, Williamson M, Arakane Y, Verleyen P, Schoofs L, Schachtner J, Gimmelikhuijzen CJ, Park Y, 2008. Genomics, transcriptomics, and peptidomics of neuropeptides and protein hormones in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Genome Res.*, 18(1): 113–122.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25(4): 402–408.
- Maestro JL, Aguilar R, Pascual N, Valero ML, Piulachs MD, Andreu D, Navarro I, Bellés X, 2001. Screening of antifeedant activity in brain extracts led to the identification of sulfakinin as a satiety promoter in the German cockroach. Are arthropod sulfakinins homologous to vertebrate gastrins-cholecystokinins? *Eur. J. Biochem.*, 268(22): 5824–5830.
- Meyering-Vos M, Müller A, 2007. RNA interference suggests sulfakinins as satiety effectors in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *J. Insect Physiol.*, 53(8): 840–848.
- Mita K, Kasahara M, Sasaki S, Nagayasu Y, Yamada T, Kanamori H, Namiki N, Kitagawa M, Yamashita H, Yasukochi Y, Kadono-Okuda K, Yamamoto K, Ajimura M, Ravikumar G, Shimomura M, Nagamura Y, Shin IT, Abe H, Shimada T, Morishita S, Sasaki T, 2004. The genome sequence of silkworm, *Bombyx mori*. *DNA Res.*, 11(1): 27–35.
- Mochida T, Take K, Maki T, Nakakariya M, Adachi R, Sato K, Kitazaki T, Takekawa S, 2020. Inhibition of MGAT2 modulates fat-induced gut peptide release and fat intake in normal mice and ameliorates obesity and diabetes in ob/ob mice fed on a high-fat diet. *FEBS Open Bio.*, 10(3): 316–326.
- Nachman RJ, Holman GM, Cook BJ, Haddon WF, Ling N, 1986a. Leucosulfakinin-II, a blocked sulfated insect neuropeptide with homology to cholecystokinin and gastrin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 140(1): 357–364.
- Nachman RJ, Holman GM, Haddon WF, Ling N, 1986b. Leucosulfakinin, a sulfated insect neuropeptide with homology to gastrin and cholecystokinin. *Science*, 234(4772): 71–73.
- Nässel DR, Wu SF, 2022. Cholecystokinin/sulfakinin peptide signaling: Conserved roles at the intersection between feeding, mating and aggression. *Cell Mol. Life Sci.*, 79(3): 188–188.
- Nelson DW, Gao Y, Yen MI, Yen CLE, 2014. Intestine-specific deletion of acyl-CoA: Monoacylglycerol acyltransferase (MGAT) 2 protects mice from diet-induced obesity and glucose intolerance. *J. Biol. Chem.*, 289(25): 17338–17349.
- Nichols R, 1992. Isolation and expression of the *Drosophila* drosulfakinin neural peptide gene product, DSK-I. *Mol. Cell. Neurosci.*, 3(4): 342–347.
- Nichols R, Egle JP, Langan NR, Palmer GC, 2008. The different effects of structurally related sulfakinins on *Drosophila melanogaster* odor preference and locomotion suggest involvement of distinct mechanisms. *Peptides*, 29(12): 2128–2135.
- Nichols R, Schneuwly SA, Dixon JE, 1988. Identification and characterization of a *Drosophila* homologue to the vertebrate neuropeptide cholecystokinin. *J. Biol. Chem.*, 263(25): 12167–12170.
- Ons S, Richter F, Urlaub H, Pomar RR, 2009. The neuropeptidome of *Rhodnius prolixus* brain. *Proteomics*, 9(3): 788–792.
- Reimand J, Kull M, Peterson H, Hansen J, Vilo J, 2007. g: Profiler-A web-based toolset for functional profiling of gene lists from large-scale experiments. *Nucleic Acids Res.*, 35 (Web Server issue): W193–W200.
- Schoofs L, Nachman RJ, 2006. Sulfakinins, Handbook of Biologically Active Peptides. Elsevier, Amsterdam. 183–187.
- Słocińska M, Marciniak P, Jarmuszkiewicz W, Rosinski G, 2015. New metabolic activity of the nonsulfated sulfakinin Zopat-SK-1 in the insect fat body. *Peptides*, 68: 157–163.
- Słocińska M, Kuczer M, Gołębowski M, 2019. Sulfakinin signalling influences fatty acid levels and composition in *Tenebrio molitor* beetle. *Protein Pept. Lett.*, 26(12): 949–958.
- Söderberg JAE, Carlsson MA, Nässel DR, 2012. Insulin-producing cells in the *Drosophila* brain also express satiety-inducing cholecystokinin-like peptide, drosulfakinin. *Front. Endocrinol.*, 3: 109.
- Staljanjens D, Azari EK, Christiaens O, Beaufays J, Lins L, Van Camp J, Smagghe G, 2011. The CCK(-like) receptor in the animal kingdom: Functions, evolution and structures. *Peptides*, 32(3): 607–619.
- Tarazona S, García-Alcalde F, Dopazo J, Ferrer A, Conesa A, 2011. Differential expression in RNA-seq: A matter of depth. *Genome Res.*, 21(12): 2213–2223.
- Verleyen P, Huybrechts J, Sas F, Clynen E, Baggerman G, De Loof A, Schoofs L, 2004. Neuropeptidomics of the grey flesh fly, *Neobellieria bullata*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 316(3): 763–770.

- CX, Chen LP, 2009. Current status of insecticide resistance in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Chin. Bull. Entomol.*, 46(4): 518–524. [王彦华, 王强, 沈晋良, 吴声敢, 俞瑞鲜, 赵学平, 苍涛, 吴长兴, 陈丽萍, 2009. 褐飞虱抗药性研究现状. 昆虫知识, 46(4): 518–524]
- Weaver RJ, Audsley N, 2008. Neuropeptides of the beetle, *Tenebrio molitor* identified using MALDI-TOF mass spectrometry and deduced sequences from the *Tribolium castaneum* genome. *Peptides*, 29(2): 168–178.
- Wei Z, Baggerman G, Nachman RJ, Goldsworthy G, Verhaert P, De Loof A, Schoofs L, 2000. Sulfakinins reduce food intake in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *J. Insect Physiol.*, 46(9): 1259–1265.
- Williams MJ, Goergen P, Rajendran J, Klockars A, Kasagiannis A, Fredriksson R, Schiöth HB, 2014. Regulation of aggression by obesity-linked genes *TfAP-2* and *Twz* through octopamine signaling in *Drosophila*. *Genetics*, 196(1): 349–362.
- Wu F, Deng B, Xiao N, Wang T, Li Y, Wang R, Shi K, Luo DG, Rao Y, Zhou C, 2020. A neuropeptide regulates fighting behavior in *Drosophila melanogaster*. *eLife*, 9: e54229.
- Wu SF, Zeng B, Zheng C, Mu XC, Zhang Y, Hu J, Zhang S, Gao CF, Shen JL, 2018. The evolution of insecticide resistance in the brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål) of China in the period 2012–2016. *Sci. Rep.*, 8(1): 4586.
- Xu HJ, Xue J, Lu B, Zhang XC, Zhuo JC, He SF, Ma XF, Jiang YQ, Fan HW, Xu JY, Ye YX, Pan PL, Li Q, Bao YY, Nijhout HF, Zhang CX, 2015. Two insulin receptors determine alternative wing morphs in planthoppers. *Nature*, 519(7544): 464–467.
- Yu N, Nachman RJ, Smagghe G, 2013. Characterization of sulfakinin and sulfakinin receptor and their roles in food intake in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 188: 196–203.
- Yu N, Smagghe G, 2014. Characterization of sulfakinin receptor 2 and its role in food intake in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Peptides*, 53: 232–237.
- Yu N, Swevers L, Nachman RJ, Smagghe G, 2014. Development of cell-based bioassay with Sf9 cells expressing TcSKR1 and TcSKR2 and differential activation by sulfated and non-sulfated SK peptides. *Peptides*, 53: 238–242.
- Yu N, Zotti MJ, Scheys F, Braz ASK, Penna PHC, Nachman RJ, Smagghe G, 2015. Flexibility and extracellular opening determine the interaction between ligands and insect sulfakinin receptors. *Sci. Rep.*, 5: 12627.
- Zels S, Dillen S, Crabbé K, Spit J, Nachman RJ, Vanden Broeck J, 2015. Sulfakinin is an important regulator of digestive processes in the migratory locust, *Locusta migratoria*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 61: 8–16.
- Zels S, Verlinden H, Dillen S, Vleugels R, Nachman RJ, Vanden Broeck J, 2014. Signaling properties and pharmacological analysis of two sulfakinin receptors from the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *PLoS ONE*, 9(4): e94502.
- Zoepfel J, Reiher W, Rexer KH, Kahnt J, Wegener C, 2012. Peptidomics of the agriculturally damaging larval stage of the cabbage root fly *Delia radicum* (Diptera: Anthomyiidae). *PLoS ONE*, 7(7): e41543.

(责任编辑: 马丽萍)