



主持人: 缪卫国

# 普通大蓟马 *MuRhodopsin* 基因的全长克隆及生物信息学分析

金海峰<sup>1,2</sup>, 王朝政<sup>3</sup>, 侯清芳<sup>1,2</sup>, 咸利民<sup>1,2</sup>, 张华剑<sup>1,2</sup>, 吴少英<sup>1,2</sup>

(1. 海南大学 三亚南繁研究院, 三亚 572025; 2. 海南大学 植物保护学院, 海口 570228;  
3. 海口海关技术中心, 海口 570311)

**摘要:** 为了解蓟马害虫视蛋白分子结构及特征, 根据普通大蓟马 (*Megalurothrips usitatus*) 转录组信息克隆获得了视紫红质 *MuRhodopsin* 的基因 cDNA 全长, 并利用 DNAMAN 9.0 和 SWISSMODEL 等软件对视紫红质 *MuRhodopsin* 的基因进行序列同源性比对并构建基因系统进化树, 分析理化性质及结合域特点, 并对该蛋白进行结构预测。结果表明: 该基因全长 1 140 bp, 共编码 380 个氨基酸, 相对分子质量为 42.73 kDa, 理论等电点为 8.47。序列比对以及同源性分析结果表明, *MuRhodopsin* 为横纹视紫红质 (rhabdomeric opsins, r-opsins) 与西花蓟马 (*Frankliniella occidentalis*) 及棕榈蓟马 (*Thrips palmi*) 具有高度同源性。结构域分析表明该蛋白具有 7 个跨膜结构域, 包含了 1 个 G 蛋白偶联受体家族区域, 隶属于 G 蛋白偶联受体家族; 具有 6 个 N-豆蔻酰化位点, 3 个 N-糖基化位点, 3 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点, 4 个蛋白激酶 C 磷酸化位点; 其第 322 位氨基酸—赖氨酸(K) 为与发色团(视黄醛)的重要结合位点, 具有典型的视蛋白能够激活 IP<sub>3</sub>/Ca<sup>2+</sup> 信号通路引起光依赖的去极化反应。

**关键词:** 普通大蓟马; *Rhodopsin* 基因; 视蛋白; 序列分析; 结构预测

**中图分类号:** S433.89 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-7054(2023)06-0651-09

金海峰, 王朝政, 侯清芳, 等. 普通大蓟马 *MuRhodopsin* 基因的全长克隆及生物信息学分析 [J]. 热带生物学报, 2023, 14(6): 651-659. doi: 10.15886/j.cnki.rdsxb.20220105

昆虫的颜色视觉是其接受外界信息的主要途径之一。昆虫视觉系统能够接收并对范围内特定波长光做出反应, 除了接收直射光源外, 还包括反射光源及偏振光源, 从而提高对颜色和空间辨别能力<sup>[1]</sup>。自 19 世纪 80 年代发现昆虫视觉对紫外光具有敏感性后, 发现包括蜜蜂 (*Apoidea*)、蝴蝶 (*Papilionoidea*)、果蝇 (*Drosophilidae*) 和蛾类 (*Hepialidae*) 等多种昆虫具有良好的紫外视觉能力, 它们可以利用颜色、对比度和光偏振角度等特性调控昆虫的定向搜寻、觅食、种内交流和昼夜节律等行为, 这对于其生长发育和生态适应性具有重要意义<sup>[2]</sup>。昆虫视觉形成过程中的关键因子-敏

感视蛋白可协同其他视蛋白调控昆虫的颜色视觉, 也可独立介导特定波长趋性行为。视觉视蛋白是动物接收光的关键蛋白质, 先前研究表明昆虫视蛋白分为 3 个主要分支: 紫外线敏感短波长 (SW) 视蛋白、蓝光敏感的中波长 (MW) 视蛋白以及长波长 (LW) 视蛋白, 其中光谱敏感变化范围从蓝紫色至绿色再到红色 (果蝇中的 Rh2), 迄今为止调查的大多数昆虫都至少存在其中一种视蛋白<sup>[3-5]</sup>。视紫红质 (Rhodopsin) 是由视蛋白 (opsin) 和视黄醛 (11-顺式视网膜色素基团) 组成结合蛋白, 为介导光信号转导通路最重要的 G 蛋白偶联受体。其中, 视蛋白 296 位赖氨酸 (K296) 残基与

收稿日期: 2022-09-25 修回日期: 2022-10-25

基金项目: 三亚崖州湾科技城管理局资助项目 (SYND-2021-21, HNF202202); 海南省重大科技计划项目 (ZDKJ2021007)

第一作者: 金海峰 (1998-), 男, 海南大学植物保护学院 2020 级硕士研究生. E-mail: mrjinhaifeng@163.com

通信作者: 张华剑 (1989-), 男, 博士, 讲师. 研究方向: 昆虫免疫调控方向. E-mail: 991752504@qq.com;

吴少英 (1980-), 女, 博士, 教授. 研究方向: 昆虫毒理与生理生化. E-mail: wswywy6000@hainanu.edu.cn

11-顺式视网膜色素基团通过 Schiff 共价键链接,在光子的刺激下,11-顺式视黄醛转变成全反式视黄醛,视蛋白构象也随之发生改变,呈活化状态。再次吸收光子后, Schiff 键被水解,视蛋白上的全反式视黄醛解离, K296 和 E113 形成的盐桥限制了脱辅基视蛋白分子构象,呈现非活化状态<sup>[6]</sup>。Rhodopsin 不仅参与视觉形象及昼夜节律调节,还与抗药性、迁飞等行为有关<sup>[7-9]</sup>。目前,已知模式昆虫黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)中含有 7 种 RH 视蛋白,是果蝇识别不同颜色的主要载体,存在于不同光感受器中,不同视紫红质对特定波长光质敏感性不同,除了与发色团构型及结合位点外,还与视蛋白氨基酸序列有关,氨基酸序列改变可能会导致改变吸收的光谱波长范围及敏感性<sup>[10-12]</sup>。Rh1 作为黑腹果蝇中主要存在的 Rhodopsin 类型,也是研究最广泛的一种。主要表达在 R1-R6 感光细胞中<sup>[13-14]</sup>。R7 细胞中表达的 Rh3 和 Rh4 对紫外光敏感<sup>[15-16]</sup>。对蓝光和绿光敏感的 Rh5 和 Rh6 则表达在 R8 细胞中<sup>[17-19]</sup>。并且 Rh3/Rh5 以及 Rh4/Rh6 总是对应地分布在一个小眼上下排列的 R7 和 R8 之中<sup>[20]</sup>。在果蝇头顶部的 3 个单眼中发现对紫光敏感的 Rh2<sup>[21-23]</sup>;在燕尾蝶(*Papilio glaucus*)中证实存在 6 个视蛋白(PglRh1-6)其中 PglRh5 和 PglRh6 是从蝴蝶克隆的第一个 UV 和蓝色视蛋白同系物;在西花蓟马和棕榈蓟马中也至少存在 7 种视蛋白<sup>[24-25]</sup>;视蛋白在完全变态昆虫中已经有较深入的研究包括膜翅目<sup>[26]</sup>、双翅目<sup>[23]</sup>、鳞翅目<sup>[27]</sup>和鞘翅目<sup>[28]</sup>,以及一些甲壳类动物<sup>[29-30]</sup>、节肢类动物(*Branchiopoda*、*Ostracoda*)<sup>[31-33]</sup>和 3 种螯肢动物<sup>[34-35]</sup>也有相关报道。

普通大蓟马为缨翅目蓟马科重要植食性害虫,主要分布于我国华南、华中大部分地区<sup>[36-38]</sup>,通常隐匿于花中,锉吸植物组织汁液,给豆科、禾本科等农作物外观品质及产量造成较大影响<sup>[39-42]</sup>。在海南,普通大蓟马已然成为豇豆为主的豆科作物上“头号害虫”,豇豆(*Vigna unguiculata*)作为“南菜北运”重要的瓜菜品种,事关冬季海南菜农的经济收入、北运消费者的身心健康及地方政府绿色农产品产业体系发展。目前,对普通大蓟马危害主要依靠化学防治策略,但高繁殖力及短世代周期增长了其对农药的抗性,据报道,

2013—2017 年,海南不同地区抗性监测普通大蓟马对新烟碱、菊酯类等其他杀虫剂抗性增长迅速,97% 高效氯氰菊酯由  $86.81 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  增长到  $290.88 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ <sup>[43-44]</sup>。研究发现,田间悬挂蓝色黏虫板对普通大蓟马具有较高的防控效果,其对 470 nm 波长蓝光趋性较高,但相关分子机制尚不明确<sup>[45-46]</sup>。因此本研究拟通过克隆普通大蓟马的 *Rhodopsin* 基因全长序列,对该基因序列进行分子生物学信息分析,旨在为研究普通大蓟马视蛋白分子功能及开发田间绿色光控技术奠定实验基础。

## 1 材料与方法

**1.1 供试昆虫** 供试的普通大蓟马于 2022 年 11 月采自于海南省三亚市崖州区坝头基地豇豆作物花中,利用细毛笔挑取成虫,转移至组培瓶制作的饲养罐中,利用新鲜的豇豆进行饲喂,在培养箱进行继代饲养。饲养条件设置为:温度为  $(26 \pm 1)^\circ\text{C}$ ,湿度为  $70\% \pm 5\%$ ,光周期为 14 L:10D。将含有卵的豇豆转移至新的养虫罐中,标记为下一代,连续饲养 10 代后进行后续实验。

**1.2 试剂** Trizol<sup>®</sup> Reagent 购自于美国 Ambion 公司;反转录试剂盒(PrimeScript<sup>™</sup> II 1st Strand cDNA Synthesis Kit)、DNA Marker(DL2000 DNA Marker)购自于日本 TaKaRa 公司;PCR 扩增试剂盒(Green Taq Mix (with ddH<sub>2</sub>O))、连接转化试剂盒( $5\times\text{Ta}/\text{Blunt Zero Cloning Mix}$ )购自于南京诺唯赞生物科技股份有限公司;PCR 纯化回收试剂盒、质粒纯化回收试剂盒购自于美国 Omega Bio-Tek 公司;核酸染料(SuperRed/GelRed)购自于北京天根生化科技有限公司,Stbl-2 感受态细胞购自于上海唯地生物技术有限公司,其余试剂均为国产分析级。

**1.3 普通大蓟马 *Rhodopsin* 基因的克隆** 挑取同代刚羽化、大小相同、活动敏捷的普通大蓟马雌成虫 20 头,于液氮罐中迅速冷却后置于冰上充分匀浆,利用 Trizol<sup>®</sup> Reagent 提取总 RNA,测定 RNA 的吸光度,并计算 A260/A280 值及浓度;以获得的普通大蓟马总 RNA 为模板,反转录试剂盒 PrimeScript<sup>™</sup> II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录为 cDNA;根据普通大蓟马转录组测序数据,检索 *Rhodopsin* 基因通过 ncbi 网站比对结果,根据 CDS 区域设计引物(表 1),以反转录的

cDNA 为模板, 利用 *Green Taq Mix* 进行 PCR 扩增目的基因, 反应体系如下: cDNA 模板 3  $\mu\text{L}$ 、引物对各 2  $\mu\text{L}$ 、ddH<sub>2</sub>O 18  $\mu\text{L}$ 、*Green Taq Mix* 25  $\mu\text{L}$ 、总体积为 50  $\mu\text{L}$ 。反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  预热 3 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 58.6  $^{\circ}\text{C}$  15 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 扩增 35 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  5 min 延伸后产物在 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。取 2  $\mu\text{L}$  PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳 (110V, 25min), 观察目的条带。将 PCR 产物利用 PCR 纯化回收试剂盒 *Cycle Pure Kit* 进行纯化回收, 取 1  $\mu\text{L}$  回收产物进行浓度和纯度的测试, -20  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。利用链接转化试剂盒 *5 $\times$ Ta/Blunt Zero Cloning Mix* 将纯化回收产物连接至 T 载体获得重组质粒后, 转入到 *Stb1-2* 感受态细胞中, 使用含 10  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  氨苄卡那霉素的 LA 固体培养基进行培养。挑取阳性单克隆菌落, 经菌液 PCR 后通过琼脂糖凝胶电泳筛选出阳性克隆后提取重组质粒, 送至北京擎科生物有限公司进行测序。

表 1 普通大蓟马 *Rhodopsin* 基因克隆引物

引物名称	引物序列 (5'-3')
F- <i>Rhodopsin</i>	ATGTCACCTGCTACACGAGCCT
R- <i>Rhodopsin</i>	TGCCTTCTCCGTGGTCACA

**1.4 普通大蓟马 *Rhodopsin* 基因的序列分析** 将测序所得核苷酸序列在 NCBI 网站进行 Blast 结果比对, 挑取同源性较高其他昆虫物种的视蛋白基因, 利用 DNAMAN 9.0 和 MEGA 4.0 软件进行序列同源性比对并用邻接法 (neighbor-joining method, NJ) 构建系统进化树; 利用 ProtParam (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) 预测其分子量及稳定性等理化特性; 利用 Tmhmm (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) 进行跨膜区分析; 利用在线软件 ScanProsite (<https://prosite.expasy.org/scanprosite>) 预测视蛋白 *Rhodopsin* 的结构域分布和功能位点, 利用在线软件 SOPMA (<https://prabi.ibcp.fr/html/site/web/home>) 对 *Rhodopsin* 基因的氨基酸序列的二级结构预测, 利用 SWISSMODEL (<https://swissmodel.expasy.org>) 对该蛋白的三级结构进行预测。

## 2 结果与分析

**2.1 普通大蓟马 *MuRhodopsin* 基因的序列分析** 根据全长引物的 PCR 结果, PCR 扩增获得

*MuRhodopsin* 的全长 cDNA (图 1)。*MuRhodopsin* 基因全长 1140 bp (不含终止密码子), 共编码 380 个氨基酸, 其中 G+C 含量为 52.63%, A+T 含量为 47.37%。推测该基因的蛋白相对分子质量为 42733.3 Da, 理论等电点为 8.47, 体外半衰期为 30 h, 不稳定系数为 28.38, 正电荷氨基酸残基 (Arg+Lys) 有 20 个, 负电荷氨基酸残基 (Asp+Glu) 有 24 个, 总平均亲水性为 0.42, 脂肪系数为 90.87。

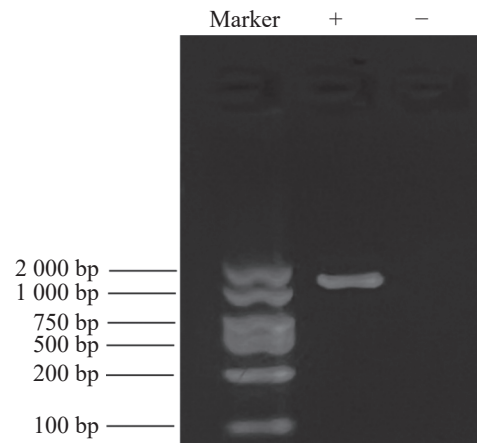


图 1 普通大蓟马 *Rhodopsin* 基因的 RT-PCR 产物电泳检测  
Marker: DL 2 000 DNA marker; Rhodopsin: 普通大蓟马 *Rhodopsin* 基因 PCR 产物

**2.2 普通大蓟马 *MuRhodopsin* 基因序列同源性分析** 氨基酸序列比对结果表明普通大蓟马 *MuRhodopsin* 与棕榈蓟马 (XP\_034238557.1) 及西花蓟马 (XP\_026285526.1) *Rhodopsin* 具有较高相似度, 分别为 96.33% 和 94.07%, 其中高度保守区域占 91.6%, 相似区域占 5%, 不相同氨基酸位点为第 29、131、178、181、356 氨基酸位 (图 2)。多重序列比对及系统进化树同源性分析表明普通大蓟马 *MuRhodopsin* 与棕榈蓟马与西花蓟马 *Rhodopsin* 蛋白聚为一支三, 说明 *Rhodopsin* 在昆虫属的分类阶元上具有高度保守性 (图 3)。

### 2.3 普通大蓟马 *Rhodopsin* 蛋白生物信息学分析

普通大蓟马 *Rhodopsin* 蛋白序列二级结构预测结果表明, *Rhodopsin* 蛋白中  $\alpha$  螺旋约占 42.89%, 延伸链约占 20%,  $\beta$  折叠约占 2.89%, 随机卷曲结构约占 34.21% (图 4)。蛋白跨膜区分析预测结果表明该视蛋白在第 54~79、90~112、128~149、169~189、217~238、280~300、313~334 氨基酸位具有 7 个跨膜结构域, 其中包括 4 个由膜外向膜内的跨膜区 (56~79、128~149、217~238、315~334 氨基酸位), 其余 3 个跨膜区为由膜内向

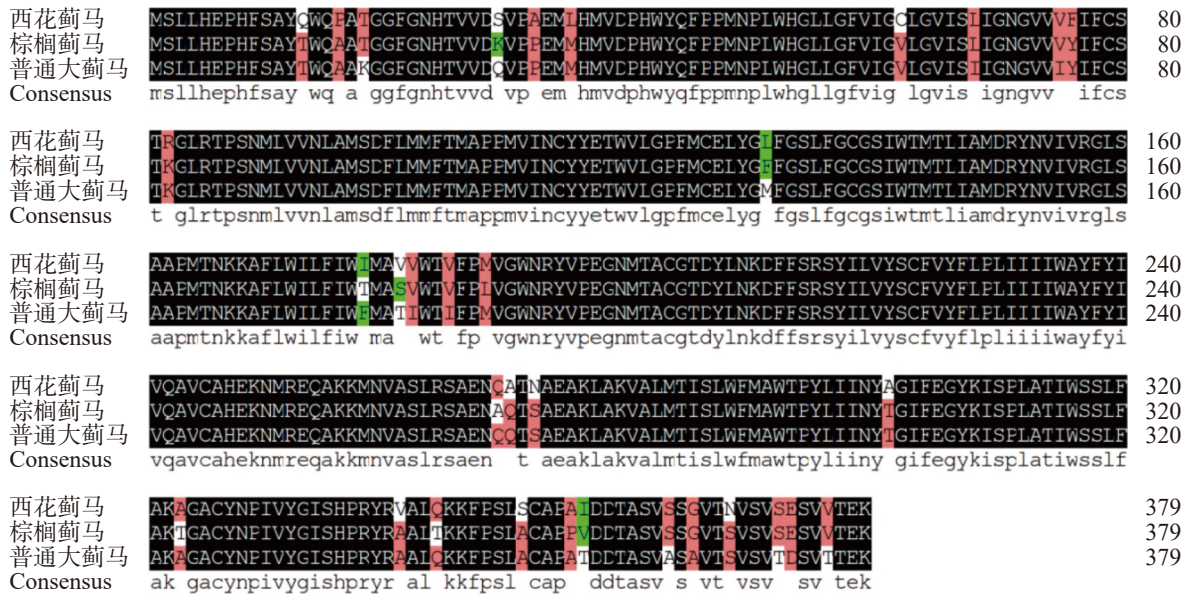


图2 缨翅目不同蓟马 Rhodopsin 氨基酸序列比对  
 黑色区域为高度保守区域(100%),红色区域为相似区域(≥50%),绿色为不相似区域。

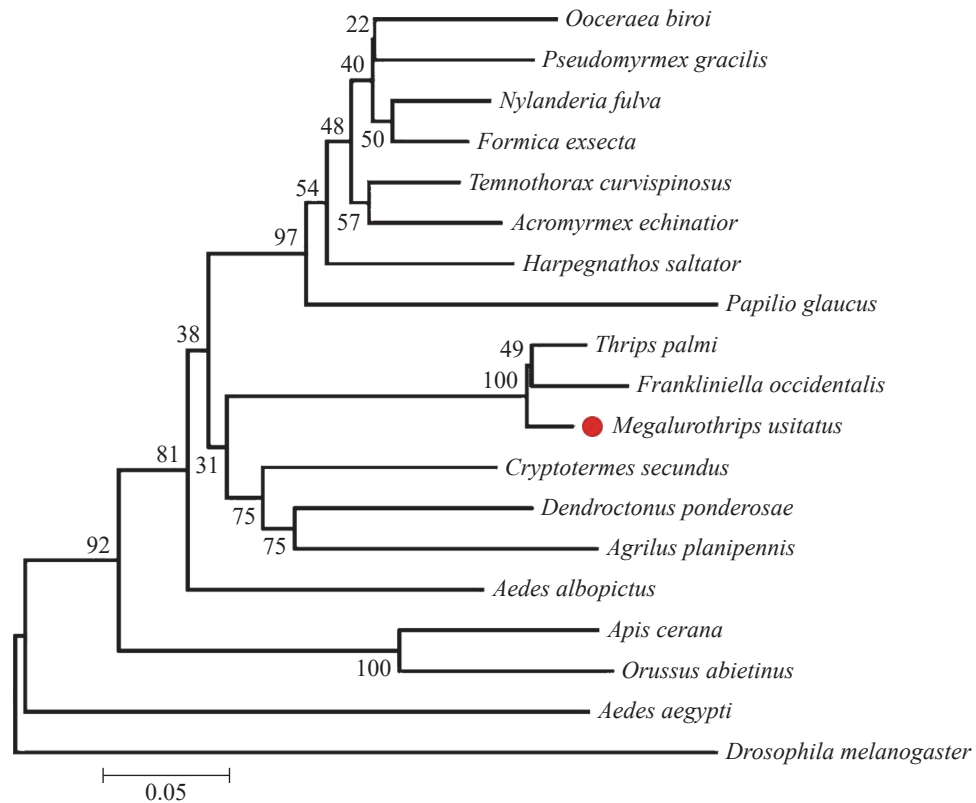


图3 不同昆虫的 Rhodopsin 蛋白序列生物进化分析

膜外(图5)。ScanProsite对Rhodopsin蛋白对功能位点分析发现,其包含了1个G蛋白偶联受体区域(70~332氨基酸位点),6个N-豆蔻酰化位点(19~24、130~135、133~138、139~144、198~203、302~307氨基酸位点),3个N-糖基化位点(23~26、199~202、299~302氨基酸位点),3个

酪蛋白激酶II磷酸化位点(25~28、271~274、370~373氨基酸位点),4个蛋白激酶C磷酸化位点(80~82、165~167、262~264、377~379氨基酸位点)以及视色素结合位点(316~332氨基酸位点),说明Rhodopsin属于典型的G蛋白偶联受体(图6)。利用SWISSMODEL对Rhodopsin蛋白

进行蛋白结构预测, 该模型的构建基于 6i9k.1.A (2.10 Å) 为模板进行完成, 分析序列相似性为 56.29%, 模型质量评估值为  $0.82 \pm 0.05$ , 定性模型能量分析值为  $-4.02$ , 说明该预测结构模型符合拉马钱德兰图模型评估合理性(图 7)。

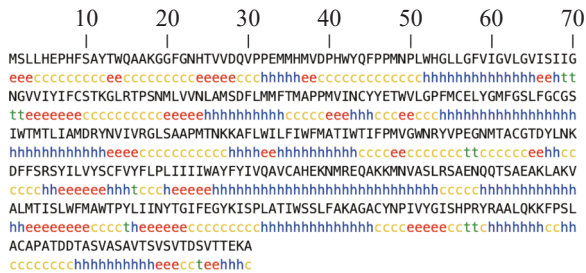


图 4 普通大蓟马 *Rhodopsin* 蛋白二级结构预测  
h.  $\alpha$  螺旋; e. 延伸链; t.  $\beta$  转角; c. 随机卷曲。

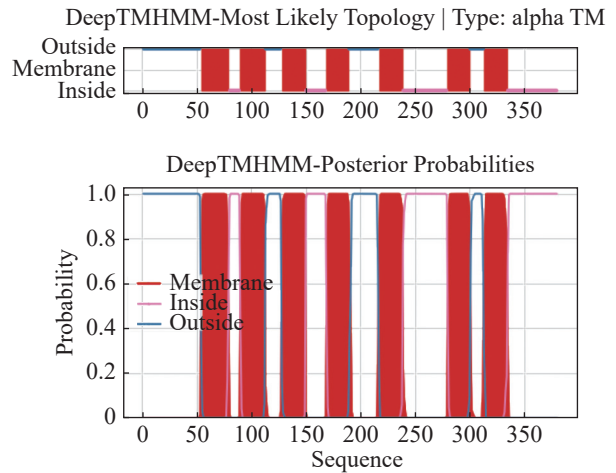


图 5 普通大蓟马 *Rhodopsin* 蛋白跨膜结构分析  
Membrane 红色矩形表示跨膜结构区域; Inside 红色线段表示膜外结构; 而蓝色线段是位于膜内的结构。

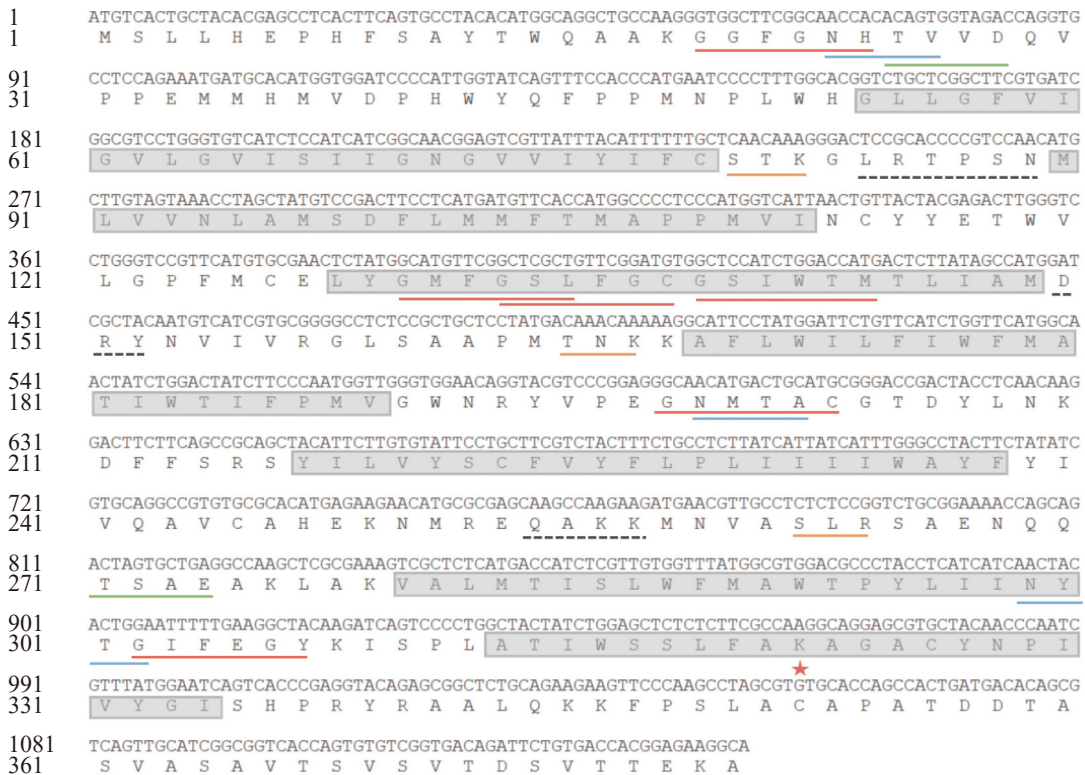


图 6 普通大蓟马 *Rhodopsin* mRNA 全长及氨基酸序列

灰色阴影区域为 7 个跨膜拓扑结构区域 (54 ~ 79、90 ~ 112、128 ~ 149、169 ~ 189、217 ~ 238、280 ~ 300、313 ~ 334 氨基酸位); 红色下划线区域为 6 个 N-豆蔻酰化位点 (19 ~ 24、130 ~ 135、133 ~ 138、139 ~ 144、198 ~ 203、302 ~ 307 氨基酸位点); 蓝色下划线区域为 3 个 N-糖基化位点 (23 ~ 26、199 ~ 202、299 ~ 302 氨基酸位点); 绿色

下划线区域 3 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点 (25 ~ 28、271 ~ 274、370 ~ 373 氨基酸位点), 黄色下划线区域 4 个蛋白激酶 C 磷酸化位点 (80 ~ 82、165 ~ 167、262 ~ 264、377 ~ 379 氨基酸位点); 黑色虚线为昆虫视蛋白 motif 位点 (84 ~ 89、149 ~ 152、254 ~ 257 氨基酸位点); 红色五角星为视蛋白与视黄醛结合位点 (322 氨基酸位点)。

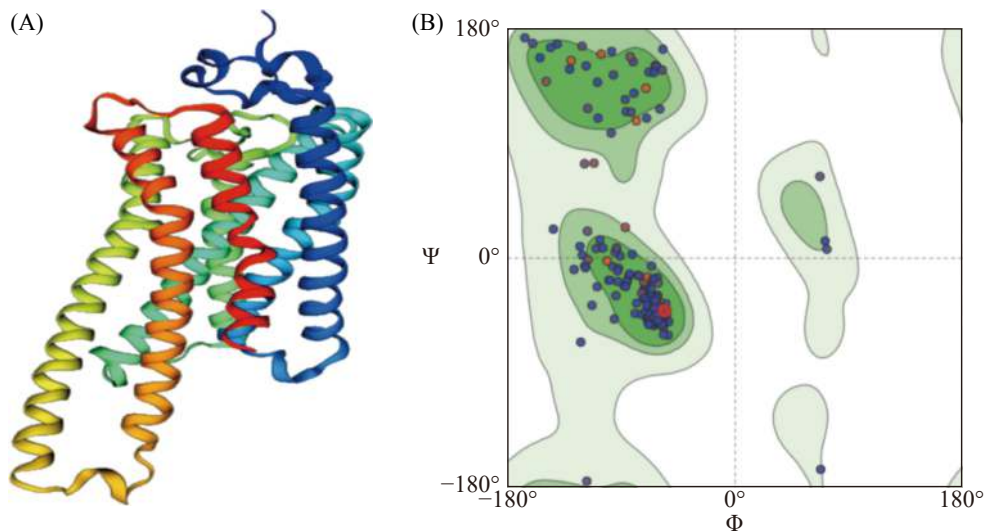


图7 普通大蓟马视蛋白 *Rhodopsin* 基因三级结构模型预测(A)及模型拉马钱德兰图(B)

### 3 讨论

许多昆虫依靠视觉线索寻找合适的寄主植物作为食物和产卵地点。植食性昆虫正确定位寄主对其种群发展极其重要,首先植物可为成虫提供不同的营养价值,为其繁殖及栖息提供前提保障。因其无法长距离飞行寻找食物,就缨翅目而言,虽然个体较小,但其仍然具备为数众多的复眼,说明其具备有高效的视觉系统,在较短的距离上,颜色和其他视觉则发挥更重要的作用<sup>[47]</sup>。不同蓟马物种对应不同颜色的寄主表现出不同颜色趋性,例如食草蓟马 *Limothrips denticornis* 和 *Stenothrips graminum* 被证实对绿色敏感<sup>[48]</sup>。大量研究也已经证实蓟马对黄色(570~590 nm)、蓝色(420~470 nm)和紫外线(小于400 nm)等波长敏感<sup>[48]</sup>,对特定波长光的敏感特异性是由视蛋白决定的,具有特定吸收光谱的视蛋白通过视蛋白与发色团结合形成视色素——视紫红质(Rhodopsin)<sup>[17]</sup>。由于发色团单一,通常为视黄醇氧化后的视黄醛异构体衍生物,视蛋白分子生物特点对其特定光谱敏感类型及生物学功能特点具有决定性作用。西花蓟马和棕榈蓟马中已经发现至少存在7种视蛋白<sup>[49]</sup>,包含3个长波光视蛋白(LWS-opsin)基因和2个短波光视蛋白(SWS-opsin)视蛋白基因,SWS-UV和SWS-B。其中SWS-UV视蛋白在90位(相对于牛视紫红质)具有保守的赖氨酸残基,是节肢动物视蛋白对紫外光(UV)敏感的特异突变位点<sup>[50]</sup>。

通过克隆出普通大蓟马 *Rhodopsin* 基因全长序列(ORF),发现共编码380个氨基酸,具有7个跨膜螺旋结构,包含G蛋白偶联受体区域及相关功能位点区域,具有视蛋白基因一般特性,与缨翅目其他2种蓟马 *Rhodopsin* 氨基酸序具有高度保守性,包含氨基酸长度一致,其保守区域占90%以上,包含5个不相同氨基酸位点,利用分子系统进化树分析3种蓟马的 *Rhodopsin* 基因高度同源,说明蓟马类害虫视紫红质存在一定进化差异,从而对应光谱敏感性及功能可能存在影响;其余同目或同科其他物种昆虫也具有同一进化分支,白纹伊蚊与其他蚊子、小地老虎与其他鳞翅目昆虫的UV-opsin基因序列比对及进化分析也具有较高的同源性<sup>[7,51]</sup>,表明视蛋白基因在同种物种同源性较高,在不同昆虫物种间进化较为保守。在昆虫视蛋白氨基酸序列存在着相关保守基序,包括最为常见的LRTPXN序列,在普通大蓟马 *Rhodopsin* 中LRTPSN位于84~89位氨基酸,在白纹伊蚊中的UV-opsin位于86~91位,都位于domain 1与domain 2之间<sup>[51]</sup>;其余的DRY、QAKK基序分别位于普通大蓟马 *Rhodopsin* 的149~152位、254~257位。其中DRY与QAKK在与G蛋白受体结合并受其活化调控具有重要作用<sup>[5]</sup>。位于普通大蓟马 *Rhodopsin* 的第322位氨基酸——赖氨酸(K)为与发色团(视黄醛)的重要结合位点,不同昆虫视蛋白结合位点位置不同,例如,白纹伊蚊及小地老虎的UV-opsin位于325位,但都基本位于第七跨膜区内,视蛋白与发色团结合区域的差异会对形成

的结合蛋白—视紫红质分子功能及对吸收光谱波长敏感性存在影响<sup>[2, 7, 51-52]</sup>。

视蛋白作为视觉系统中重要蛋白分子, 不仅参与图像形成、光感定位等相关视觉反应, 还对节律调控、繁殖及抗药性的产生等发挥作用<sup>[53-54]</sup>。本研究通过克隆普通大蓟马 *Rhodopsin* 的基因及分析, 仅了解其基本序列特征等相关生物学信息, 下一步应利用视网膜电位技术(ERG)、基因表达量分析、复眼荧光染色电镜观察等技术手段验证及明确该视蛋白光谱敏感性范围。能够为后续解析该视蛋白视觉分子机制形成特征及挖掘其非视觉分子功能提供一定的数据支撑。

### 参考文献:

- [1] HU K G, REICHERT H, STARK W S. Electrophysiological characterization of *Drosophila* ocelli [J]. *Journal of Comparative Physiology A*, 1987, 126(1): 15 - 24.
- [2] BRISCOE A D. Six opsins from the butterfly *Papilio glaucus*: molecular phylogenetic evidence for paralogous origins of red-sensitive visual pigments in insects [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2000, 51(2): 110 - 121.
- [3] BRISCOE A D, BYBEE S M, BERNARD G D, et al. Positive selection of a duplicated UV-sensitive visual pigment coincides with wing pigment evolution in *Heliconius* butterflies [J]. *PNAS*, 2010, 107(8): 3628 - 3633.
- [4] FEUDA R, MARLÉTAZ F, BENTLEY M A, et al. Conservation, duplication, and divergence of five opsin genes in insect evolution [J]. *Genome Biol Evol*, 2016, 8(3): 579 - 587.
- [5] 段云, 吴仁海, 苗进, 等. 昆虫视蛋白的研究进展[J]. *植物保护*, 2020, 46(1): 93 - 100.
- [6] BUCZYLSKO J, SAARI J C, CROUCH R K, et al. Mechanisms of opsin activation [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(34): 20621 - 20630.
- [7] 闫硕, 张青文, 熊晓菲, 等. 小地老虎 UV 视蛋白基因的克隆及序列分析[J]. *动物学杂志*, 2012, 47(1): 1 - 8.
- [8] NI J D, BAIK L S, HOLMES T C, et al. A rhodopsin in the brain functions in circadian photoentrainment in *Drosophila* [J]. *Nature*, 2017, 545(7654): 340 - 344.
- [9] 高正辉, 王婉强, 朱芬. 昆虫的视蛋白基因研究进展[J]. *华中昆虫研究*, 2019(1): 18 - 25.
- [10] LYTHGOE J N. The ecology of vision[M]. Oxford: Clarendon Press, 1979.
- [11] FRENTIU F D, BERNARD G D, SISON-MANGUS M P, et al. Gene duplication is an evolutionary mechanism for expanding spectral diversity in the long-wavelength photopigments of butterflies [J]. *Mol Biol Evol*, 2007, 24(9): 2016 - 2028.
- [12] BEHNIA R, DESPLAN C. Visual circuits in flies: beginning to see the whole picture [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2015, 34: 125 - 132.
- [13] O'TOUSA J E, BAEHR W, MARTIN R L, et al. The *Drosophila ninaE* gene encodes an opsin [J]. *Cell*, 1985, 40(4): 839 - 850.
- [14] ZUKER C S, MONTELL C, JONES K, et al. A rhodopsin gene expressed in photoreceptor cell R7 of the *Drosophila* eye: homologies with other signal-transducing molecules [J]. *J Neurosci*, 1987, 7(5): 1550 - 1557.
- [15] FRYXELL K J, MEYEROWITZ E M. An opsin gene that is expressed only in the R7 photoreceptor cell of *Drosophila* [J]. *EMBO J*, 1987, 6(2): 443 - 451.
- [16] FORTINI M E, RUBIN G M. Analysis of cis-acting requirements of the *Rh3* and *Rh4* genes reveals a bipartite organization to rhodopsin promoters in *Drosophila melanogaster* [J]. *Genes & Development*, 1990, 4(3): 444 - 463.
- [17] CHOU W H, HALL K J, WILSON D B, et al. Identification of a novel *Drosophila* opsin reveals specific patterning of the R7 and R8 photoreceptor cells [J]. *Neuron*, 1996, 17(6): 1101 - 1115.
- [18] SALCEDO E, HUBER A, HENRICH S, et al. Blue-and green-absorbing visual pigments of *Drosophila*: ectopic expression and physiological characterization of the R8 photoreceptor cell-specific Rh5 and Rh6 rhodopsins [J]. *J Neurosci*, 1999, 9(24): 10716 - 10726.
- [19] PAPATSENKO D, SHENG G, DESPLAN C. A new rhodopsin in R8 photoreceptors of *Drosophila*: evidence for coordinate expression with Rh3 in R7 cells [J]. *Development*, 1997, 124(9): 1665 - 1673.
- [20] FRANCESCHINI N, KIRSCHFELD K, MINKE B. Fluorescence of photoreceptor cells observed *in vivo* [J]. *Science*, 1981, 213(4513): 1264 - 1267.
- [21] COWMAN A F, ZUKER C S, RUBIN G M. An opsin gene expressed in only one photoreceptor cell type of the *Drosophila* eye [J]. *Cell*, 1986, 44(5): 705 - 710.
- [22] FEILER R, HARRIS W A, KIRSCHFELD K, et al. Targeted misexpression of a *Drosophila* opsin gene leads to altered visual function [J]. *Nature*, 1988, 333(6175): 737 - 741.
- [23] POLLOCK J A, BENZER S. Transcript localization of four opsin genes in the three visual organs of *Drosophila*; RH2 is ocellus specific [J]. *Nature*, 1988, 333(6175): 779 - 782.
- [24] GUO S K, CAO L J, SONG W, et al. Chromosome-level assembly of the melon thrips genome yields insights into evolution of a sap-sucking lifestyle and pesticide resistance [J]. *Mol Ecol Resour*, 2020, 20(4): 1110 - 1125.
- [25] ROTENBERG D, BAUMANN A A, BEN-MAHMOUD S, et al. Genome-enabled insights into the biology of thrips as crop pests [J]. *BMC Biol*, 2020, 18(1): 169.

- [26] VELARDE R A, SAUER C D, WALDEN K K O, et al. Pteropsin: a vertebrate-like non-visual opsin expressed in the honey bee brain [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2005, 35(12): 1367 – 1377.
- [27] WAKAKUWA M, STAVENGA D G, ARIKAWA K. Spectral organization of ommatidia in flower-visiting insects [J]. *Photochemistry and Photobiology*, 2007, 83(1): 27 – 34.
- [28] JACKOWASKA M, BAO R, LIU Z, et al. Genomic and gene regulatory signatures of cryptozoic adaptation: Loss of blue sensitive photoreceptors through expansion of long wavelength-opsin expression in the red flour beetle *Tribolium castaneum* [J]. *Frontiers in Zoology*, 2007, 4: 24.
- [29] COLBOURNE J K, PFRENDER M E, GILBERT D, et al. The ecoresponsive genome of *Daphnia pulex* [J]. *Science*, 2011, 331(6017): 555 – 561.
- [30] KASHIYAMA K, SEKI T, NUMATA H, et al. Molecular characterization of visual pigments in *Branchiopoda* and the evolution of opsins in *Arthropoda* [J]. *Mol Biol Evol*, 2009, 26(2): 299 – 311.
- [31] OAKLEY T H, HUBER D R. Differential expression of duplicated opsin genes in two eye types of ostracod crustaceans [J]. *J Mol Evol*, 2004, 59(2): 239 – 249.
- [32] PORTER M L, BOK M J, ROBINSON P R, et al. Molecular diversity of visual pigments in *Stomatopoda* (Crustacea) [J]. *Vis Neurosci*, 2009, 26(3): 255 – 265.
- [33] RAJKUMAR P, ROLLMANN S M, COOK T A, et al. Molecular evidence for color discrimination in the Atlantic sand fiddler crab, *Uca pugilator* [J]. *J Exp Biol*, 2010, 213(Pt24): 4240 – 4248.
- [34] SMITH W C, MILAM A H, DUGGER D, et al. A splice variant of arrestin. Molecular cloning and localization in bovine retina [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(22): 15407 – 15410.
- [35] KOYANAGI M, NANATA T, KATO H, et al. Molecular evolution of arthropod color vision deduced from multiple opsin genes of jumping spiders [J]. *J Mol Evol*, 2008, 66(2): 130 – 137.
- [36] 唐良德, 韩云, 吴建辉, 等. 豆大蓟马室内对不同颜色及光波的趋性反应 [J]. *植物保护*, 2015, 41(6): 169 – 172.
- [37] 郑建武. 中国蓟马族的分类研究 (缨翅目: 蓟马科) [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019.
- [38] 杨波, 王晓双, 周镇, 等. 不同化蛹基质对普通大蓟马蛹期、羽化率及性比的影响 [J]. *华南农业大学学报*, 2019, 40(4): 47 – 51.
- [39] 范咏梅, 童晓立, 高良举, 等. 普通大蓟马在海南豇豆上的空间分布型 [J]. *环境昆虫学报*, 2013, 35(6): 737 – 743.
- [40] 唐良德, 赵海燕, 付步礼, 等. 海南普通大蓟马抗药性监测及对 6 种杀虫剂的敏感性 [J]. *环境昆虫学报*, 2018, 40(5): 1175 – 1181.
- [41] 黄伟康, 孔祥义, 柯用春, 等. 普通大蓟马的研究进展 [J]. *中国蔬菜*, 2018(2): 21 – 27.
- [42] 杨磊, 邵雨, 李芬, 等. 缨翅目害虫蓟马生物防治的研究进展 [J]. *中国生物防治学报*, 2021, 37(3): 393 – 405.
- [43] 潘雪莲, 杨磊, 金海峰, 等. 豆大蓟马在海南发生及防治的研究进展 [J]. *热带生物学报*, 2021, 12(4): 508 – 513.
- [44] FU B L, TAO M, XUE H, et al. Spinetoram resistance drives interspecific competition between *Megalurothrips usitatus* and *Frankliniella intonsa* [J]. *Pest Management Science*, 2022, 78(6): 2129 – 2140.
- [45] 邱海燕, 刘奎, 李鹏, 等. 黄、蓝色板对豆大蓟马的诱集效果比较 [J]. *中国园艺文摘*, 2015, 31(1): 50 – 52.
- [46] 闫凯莉, 唐良德, 吴建辉. 普通大蓟马对不同颜色的趋性及日节律调查 [J]. *应用昆虫学报*, 2017, 54(4): 639 – 645.
- [47] REN X, WU S, XING Z, et al. Behavioral responses of western flower thrips (*Frankliniella occidentalis*) to visual and olfactory cues at short distances [J]. *Insects*, 2020, 11(3): 177.
- [48] LOPEZ-REYES K, ARMSTRONG K F, VAN TOL R W H M, et al. Colour vision in thrips (Thysanoptera) [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2022, 377(1862): 20210282.
- [49] HENZE M J, OAKLEY T H. The Dynamic evolutionary history of *Pancrustacean* eyes and opsins [J]. *Integr Comp Biol*, 2015, 55(5): 830 – 842.
- [50] CRONIN T W, BOK M J. Photoreception and vision in the ultraviolet [J]. *J Exp Biol*, 2016, 219(Pt18): 2790 – 2801.
- [51] BORST A. *Drosophila's* view on insect vision [J]. *Curr Biol*, 2009, 19(1): R36 – R47.
- [52] KOMADA S, KAMAE Y, KOYANAGI M, et al. Green-sensitive opsin is the photoreceptor for photic entrainment of an insect circadian clock [J]. *Zoological Letters*, 2015, 1: 11.
- [53] 杨小凡, 魏国树, 马爱红, 等. 昆虫紫外视觉研究进展 [J]. *植物保护学报*, 2022, 49(1): 131 – 145.
- [54] PORTER M L, BLASIC J R, BOK M J, et al. Shedding new light on opsin evolution [J]. *Proc Biol Sci*, 2012, 279(1726): 3 – 14.



## Cloning and bioinformatics analysis of *MuRhodopsin* gene in *Megalurothrips usitatus*

JIN Haifeng<sup>1,2</sup>, WANG Chaozheng<sup>3</sup>, HOU Qingfang<sup>1,2</sup>, XIAN Limin<sup>1,2</sup>,  
ZHANG Huajian<sup>1,2</sup>, WU Shaoying<sup>1,2</sup>

(1. Sanya Nanfan Research Institute, Hainan University, Sanya, Hainan 572025, China; 2. School of Plant Protection, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 3. Technology Center of Haikou Customs District, Haikou, Hainan 570311, China)

**Abstract:** It is of important basic data significance to understand the molecular structure and characteristics of opsin of *Megalurothrips usitatus* pest by cloning Rhodopsin gene of *M. usitatus* for further analysis of light environment differences. The full-length gene of the rhodopsin, *MuRhodopsin*, was cloned based on the transcriptome information of thrips. The sequence homology was compared using DNAMAN 9.0 and SWISSMODEL software, and the phylogenetic tree was constructed. The full-length *MuRhodopsin* gene was 1 140 bp, encoding 380 amino acids, with a relative molecular weight of 42.73 kDa and a theoretical isoelectric point of 8.47. Sequence alignment and homology analysis showed that *MuRhodopsin* was rhabdomeric opsins (r-opsins) with high homology with that of *Frankliniella occidentalis* and *Thrips palmi*. The domain analysis showed that the protein had 7 transmembrane domains, including 1 G protein-coupled receptor family region, belonging to the G protein-coupled receptor family, and contained 6 N- cardamoylation sites, 3 N-glycosylation sites, 3 casein kinase II phosphorylation sites, and 4 protein kinase C phosphorylation sites. The 322nd amino acid lysine (K) of the protein is an important binding site to chromophore (retinal), which is a typical opsin that can activate the IP3/Ca<sup>2+</sup> signaling pathway and cause light-dependent depolarization reaction. The structure and function of *Rhodopsin* in *M. usitatus* were elucidated, providing a theoretical basis for further study of its visual pathway.

**Keywords:** *Megalurothrips usitatus*; *Rhodopsin* gene; opsin; sequence analysis; prediction of structure

(责任编辑: 潘学峰)