

褐飞虱 *Yellow* 基因的克隆及功能

王 博, 姚 云, 徐泽炜, 林欣大

(中国计量学院生命科学学院, 杭州 310018)

摘要: 【目的】克隆褐飞虱 (*Nilaparvata lugens*) *Yellow* 基因 (*NIYellow*), 研究该基因在褐飞虱不同发育时期和不同组织中的表达谱, 通过 RNA 干扰沉默 *NIYellow* 了解其功能。【方法】使用网络版 primer3 设计引物克隆 *NIYellow*, 将得到的 cDNA 序列翻译为氨基酸序列后, 与 GenBank 数据库中其他物种的 *Yellow* 序列进行同源比对, 并构建系统发育树。采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术, 研究褐飞虱胚胎、1-5 龄若虫以及成虫期 *NIYellow* 的相对表达量, 并检测该基因在雌、雄成虫头、胸、腹、足、翅、卵巢和睾丸等组织中的相对表达量。向褐飞虱 5 龄若虫体内注射 0.4 μg 针对 *NIYellow* 的双链 RNA, 待羽化为成虫后观察表型。【结果】克隆得到 *NIYellow* ORF 序列, 通过序列比对发现它与豌豆蚜 (*Acyrtosiphon pisum*) *Yellow* 的氨基酸序列同源性最高 (98%), 但与黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*)、家蚕 (*Bombyx mori*) 等物种的氨基酸序列同源性较低。系统发育树分析显示它与豌豆蚜的亲缘关系最近。qRT-PCR 显示 *NIYellow* 在胚胎期表达水平具有波动性, 其中第 1、3、4 和 5 天中的表达量低于其他时段的表达量。此外, *NIYellow* 在 3 龄和 5 龄若虫期表达量高于其他若虫期 ($P < 0.05$); 该基因在雄虫头、胸、翅、足、中肠和睾丸中均有表达, 但前 4 个组织中表达量相对较高 ($P < 0.05$); 而在雌虫中, 该基因只在头、胸、翅、足中表达。另外, 该基因在短翅成虫中表达水平显著高于长翅成虫 ($P < 0.05$), 并且在短翅成虫当中, 雄虫中的表达量高于雌虫并达到显著水平 ($P < 0.05$)。采用 RNA 干扰技术沉默 *NIYellow* 后, 褐飞虱成虫整体体色变黄, 胸、腹和足颜色变化尤其明显。【结论】初步推测 *NIYellow* 的功能是参与外表皮色素沉积, 改变体色。

关键词: 褐飞虱; 黄体基因; 基因表达谱; RNA 干扰

Molecular Cloning and Function of the *Yellow* Gene from *Nilaparvata lugens*

WANG Bo, YAO Yun, XU Ze-wei, LIN Xin-da

(College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018)

Abstract: 【Objective】The objectives of this study are to clone *NIYellow* from the brown planthopper (*Nilaparvata lugens*), explore the expression profiles during the development in adults and in different tissues, then study its function through RNA interference. 【Method】Primers were designed by online version of primer 3 software and *NIYellow* was cloned, then the nucleotide sequence was translated into amino acid sequence. The alignment of amino acids residues was conducted using *N. lugens Yellow* and others searched from GenBank. Also a Neighbor-Joining method was used to construct a phylogenetic tree. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was applied to measure the relative expression levels of *N. lugens* at different developmental stages (embryo, 1st-5th instar nymphs and adult) and in different tissues (head, thorax, abdomen, leg, wing, midgut, ovary, and testis). *NIYellow* dsRNA at 0.4 μg was injected into 5th instar nymphs and the adult phenotypes were observed. 【Result】The *NIYellow* was cloned, and through sequence alignment it was found that the *NIYellow* was more similar to the *ApYellow* (98%), but it was less conserved when compared with that of *Drosophila melanogaster* and *Bombyx mori*. Phylogenetic analysis showed that it clustered with

收稿日期: 2015-02-16; 接受日期: 2015-05-12

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31471771)

联系方式: 王博, E-mail: 824419396@qq.com. 通信作者林欣大, E-mail: linxinda@cjl.u.edu.cn

Acyrtosiphon pisum, too. *NIYellow*'s expression was variable in the embryo, the expression level in 1st, 3rd, 4th and 5th day were lower than other days. Furthermore, its expression levels were higher in 3rd and 5th instar nymph than others ($P < 0.05$). Tissue-specific expression analysis elucidated that *NIYellow* expressed in all tissues including head, thorax, abdomen, leg, wing, midgut and testis in male, but the first four tissues had higher expression level ($P < 0.05$). On the contrary, *NIYellow* was only expressed in head, thorax, leg, and wing in female. Furthermore, its expression level in short wing adult was higher than that of long wing adult ($P < 0.05$). Also in short wing adults, male's expression level was higher than female ($P < 0.05$). Using RNA interference to knock down the *NIYellow* expression, it was found that the color of the whole body turned into yellow, especially in thorax, abdomen and legs. 【Conclusion】 *NIYellow* might involved in insect pigmentation and change of the body colour.

Key words: *Nilaparvata lugens*; *Yellow*; gene expression profile; RNA interference

0 引言

【研究意义】昆虫体色分化受到多种因素影响, 但有关体色分化的机理, 尤其是遗传基因控制下体色分化的研究依然很少。过去曾有报道称 *Yellow* 基因的表达产物参与果蝇表皮着色^[1], 本研究选择水稻上重要迁飞性害虫——褐飞虱作为研究对象, 探究该基因是否影响褐飞虱体表颜色的改变, 可为今后利用该基因作为转基因的标记等应用提供理论依据。【前人研究进展】在昆虫中, 体色差异现象非常普遍^[2], 比如散居型东亚飞蝗 (*Locusta migratoria manilensis*) 体色为淡绿色, 而群居型体色为深褐色^[3]; 桃蚜 (*Myzus persicae*) 则有黄绿、绿、褐和赤褐 4 种颜色类型^[4]。昆虫的体色受到多种因素的影响, 例如外界光周期和温度等^[5]。体色改变是昆虫对环境的一种适应, 它对昆虫躲避天敌、抗辐射、抗氧化等方面都具有重要意义^[6-7]。褐飞虱 (*Nilaparvata lugens*) 繁殖力强, 危害性大, 对环境适应性也强, 并且能通过传播病毒影响水稻产量^[8-9]。最近褐飞虱基因组测序的完成, 为研究者了解褐飞虱的生长发育、取食特性和迁飞机理等提供了理论依据^[10]。然而针对褐飞虱体色表型差异的研究却很少。野生型褐飞虱常具有不同体色, 大致可分为深色型和浅色型两类, 这种不同是由于昆虫体内色素细胞的运动和色素沉积引起的^[11]。已有研究表明黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 中存在大量控制体色的基因^[12], 其中黄体基因 (*Yellow*) 编码的蛋白对于正常果蝇的色素沉积非常重要。在 *Yellow* 基因突变体果蝇中, 由于体表黑色素的下降, 导致果蝇体表颜色偏黄^[13]。该基因的改变对果蝇表型的进化至关重要。【本研究切入点】目前, 有关 *Yellow* 的研究较少且主要集中在果蝇上, 由于褐飞虱体色变异的现象也很常见, 并且这种变异存在于自然状态下的野生型当中, 而这种现象在果蝇的自然种群中尚未发现, 因此选择褐飞虱作为研究对象探究 *Yellow* 的功能。【拟解

决的关键问题】对褐飞虱黄体基因 (*NIYellow*) 进行克隆和序列分析, 并利用 qRT-PCR 确定该基因时空表达特征, 通过 RNA 干扰技术沉默该基因后观察褐飞虱体色特征, 进一步探究 *NIYellow* 的功能。

1 材料与方法

试验于 2014 年 8—12 月在中国计量学院生命科学学院完成。

1.1 供试昆虫

供试褐飞虱为笔者实验室饲养种群。饲养温度为 25℃, 光周期为 14 h : 10 h (L : D)。

1.2 RNA 提取及 cDNA 合成

取不同龄期褐飞虱混合后, 参照 RNAiso™ Plus (TaKaRa) 说明书通过苯酚-氯仿抽提和异丙醇沉淀, 提取褐飞虱总 RNA。参照 PrimeScript RT-PCR Kit (TaKaRa) 合成 cDNA。该反应采用 20 μL 反应体系, 具体包括 1 μg 总 RNA, 1 μL PrimeScript™ 酶混合物, 1 μL Oligo dT 引物 (浓度为 50 μmol·L⁻¹), 4 μL 5 × PrimeScript™ 缓冲液, 加去离子水至总体积 20 μL。反应条件为 37℃ 水浴 25 min, 85℃ 水浴 5 s 终止反应。

1.3 基因的克隆和测序

根据褐飞虱转录组数据设计引物, 利用 PCR 扩增目的基因后连接于 PMD-18T 载体 (TaKaRa), 转入感受态大肠杆菌后, 挑取阳性克隆并测序 (桑尼生物公司)。*NIYellow* 克隆引物为 YellowF: ACA CGT GTA GTT GAT TGA AG 和 YellowR: CTT TCC TGT ACT CTG CAA TA。

1.4 序列比对与系统发育树构建

采用 Editseq 和 MegaAlign 软件 (DNASTAR, Lasergene Inc.) 将测序得到的 *NIYellow* cDNA 序列翻译为氨基酸序列后与 GenBank 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) 中已知的其他昆虫 *Yellow* 同源氨基酸进行比对 (采用 Jotun Hein 算法), 通过

MEGA 5.0 软件构建系统发育树, 系统发育树 (Neighbor-Joining tree) 构建采用 Neighbor-Joining 法, bootstrap 值为 1 000^[14]。

1.5 RNA 提取及实时定量 PCR

提取褐飞虱不同发育虫态 (卵、1—5 龄若虫、短翅及长翅型的雌性和雄性成虫) 虫体和成虫不同组织 (头、胸、翅、足、中肠、卵巢、睾丸) 的总 RNA。每一发育龄态或组织设置 3 个独立重复。参照 RNAisoTM Plus (TaKaRa) 说明书提取褐飞虱总 RNA, 使用 Nanodrop 1000 测定 RNA 浓度。参照 PrimeScript RT-PCR 试剂盒 (TaKaRa) 合成 cDNA。设计产物大小为 130 bp 的 *NIYellow* 引物用于 qRT-PCR。引物序列为 YellowQF: TTAGATTGAAGCACTCCGATT; YellowQR: GTGACGTCATCGTTGGATCT。选取褐飞虱 RPS11 作为看家基因, 引物序列为 RPS11F: CCGATCGTGTGGCGTTGAAGGG; RPS11R: ATGGCCGACATTCTTCCAGGTCC^[15]。qRT-PCR 反应中每个样品设 3 个重复, 每个 PCR 反应体系为 20 μ L, 其中包括 SYBR Premix ExTaq (2 \times) 10 μ L, 上下游引物 (10 μ mol \cdot L⁻¹) 各 0.4 μ L, cDNA 模板 2 μ L, DEPC 处理水 7.2 μ L。采用两步法 qRT-PCR 扩增程序, 预变性: 94 $^{\circ}$ C 1 min, 1 个循环; qRT-PCR 反应: 94 $^{\circ}$ C 15 s, 58 $^{\circ}$ C 40 s, 45 个循环。所有数据采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 方法进行分析^[16]。

1.6 RNA 干扰试验

利用 PCR 扩增一段产物大小为 500 bp 左右的片段用于合成 *NIYellow* dsRNA (双链 double-stranded RNA), 扩增引物为 YellowT7F: TAATACGACTCAC TATAGGGAGACCACAATCTTTCACGCTGATGGAC; YellowT7R: TAATACGACTCACTATAGGGAGAC CACCCTCTTGAACAGAGGCAGAG。以 PMD18T-GFP (连接有绿色荧光蛋白基因的载体) 为模板, 加入引物 GFPT75: TAATACGACTCACTATAGGGAG ATTTGTATAGTTCATCCATGCCATGT 和 GFPT73: TAATACGACTCACTATAGGGAGAATGAGTAAAG GAGAAGAAGCTTTTCA 进行 PCR 扩增, 用以合成 *GFP* dsRNA。采用 RNA Production System-T7 试剂盒 (RiboMAXTM Large Scale, Promega) 合成 dsRNA。使用 Nanodrop 1000 核酸浓度测定仪测定产物浓度为 2.072 μ g \cdot μ L⁻¹, 加入 DEPC 处理水稀释至 2 μ g \cdot μ L⁻¹。选取褐飞虱 5 龄若虫, 在胸部节间膜注射 0.4 μ g 的 *NIYellow* dsRNA, 对照组则注射等量的 *GFP* dsRNA。注射后的褐飞虱若虫饲养于水稻中, 待褐飞虱若虫羽

化后 12 h 内观察体色并拍照。为了确定 dsRNA 注射后的基因干扰水平, 选取 *NIYellow* dsRNA (简称为 ds*NIYellow*) 和对照组 *GFP* dsRNA (简称为 ds*GFP*) 注射 3 日后的试虫, 采用 1.5 方法利用 qRT-PCR 检测 *NIYellow* 的表达水平。

1.7 拍照及数据分析

采用 Nikon 体式显微镜 (SMZ745T) 对基因干扰的褐飞虱及对照组进行拍照, 拍照图片采用 Adobe Photoshop CS4 进行处理。利用 SPSS 20.0 数据分析软件, 采用单因素 ANOVA 方差分析比较 *NIYellow* 的时空表达水平; 采用独立方差 *t* 检验比较 *NIYellow* 在 ds*NIYellow* 和 ds*GFP* 注射后的褐飞虱中的表达水平。

2 结果

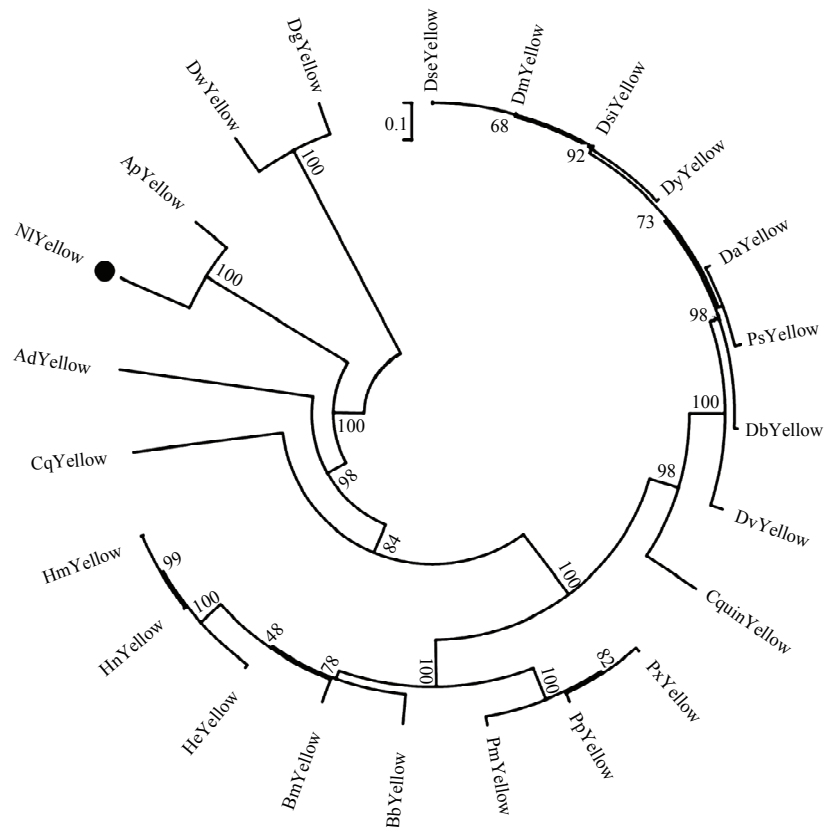
2.1 序列分析

克隆得到的 *NIYellow* (序列号 GenBank: KP789022) ORF 包含 1 263 bp。在 NCBI 上将翻译的 *NIYellow* 氨基酸序列进行 blast 比对发现它与豌豆蚜 (*Acyrtosiphon pisum*) 的 Yellow 序列相似度达到 98%。选取来自其他物种的 22 个 Yellow 序列与褐飞虱 Yellow 序列共同构建系统发育树 (图 1)。从进化树中同样发现褐飞虱和豌豆蚜进化关系较近且聚在同一分支; 而果蝇属的物种聚在另一支。在同源比对中 (图 2), 将褐飞虱与其他 6 个物种进行同源比对, 结果同样表明褐飞虱与豌豆蚜序列同源性较高, 而与果蝇、家蚕 (*Bombyx mori*) 等模式生物的 Yellow 同源性较低。

2.2 褐飞虱发育过程中 *NIYellow* 的时空表达

研究 *NIYellow* 在褐飞虱不同发育时期的表达差异时发现, *NIYellow* 在 3 龄和 5 龄若虫期表达较高, 而在 1 龄、2 龄和 4 龄阶段, 基因的表达水平显著下降 ($P < 0.05$, 图 3-A)。在胚胎发育的整个历程中 *NIYellow* 的表达量具有一定波动性, 其中第 1、3、4 和 5 天中的表达量低于其他时段的表达量 (图 3-B)。当褐飞虱发育为成虫后, 长翅型 *NIYellow* 的表达量显著低于短翅型 ($P < 0.05$), 并且短翅型中雄虫基因的表达水平显著高于雌虫 ($P < 0.05$)。

研究 *NIYellow* 在不同组织中的表达差异时发现, 雌虫头、翅和足中表达量较高, 胸部表达量较低, 在中肠和卵巢中不表达。然而对于雄虫来说, *NIYellow* 在各部位中均有表达, 但头、胸、翅和足中的表达量尤其高 (图 3-C)。



Ad: *Anopheles darlingi* (ETN63373.1); Ap: *Acyrtosiphon pisum* (XP_001948479.1); Bb: *Biston betularia* (ADF43215.1); Bm: *Bombyx mori* (ABC96700.2); Cq: *Culex quinquefasciatus* (EDS44956.1); Cq: *Culex quinquefasciatus* (XP_001869281.1); Da: *Drosophila ananassae* (EDV34693.1); Db: *Drosophila biarmipes* (AAW32907.1); Dg: *Deinococcus gobiensis* (WP_014683965.1); Dm: *Drosophila melanogaster* (AAF45497.1); Ds: *Drosophila subobscura* (CAA74207.1); Dse: *Drosophila sechellia* (EDW43693.1); Dsi: *Drosophila simulans* (EDX16352.1); Dv: *Drosophila virilis* (EDW66362.1); Dw: *Deinococcus wulumuqiensis* (WP_017869432.1); Dy: *Drosophila yakuba* (EDX00775.1); He: *Heliconius erato* (ADX87341.1); Hm: *Heliconius melpomene* (ADX87342.1); Hn: *Heliconius numata* (ADX87343.1); NI: *Nilaparvata lugens* (KP789022); Pm: *Papilio machaon* (BAJ07589.1); Pp: *Papilio polytes* (BAJ07595.10); Px: *Papilio xuthus* (BAF73474.1)

图 1 褐飞虱与其他昆虫 Yellow 蛋白的系统发育进化分析

Fig. 1 Phylogenetic analysis of Yellow protein from *N. lugens* and other insects

2.3 RNA 干扰导致褐飞虱表型发生变化

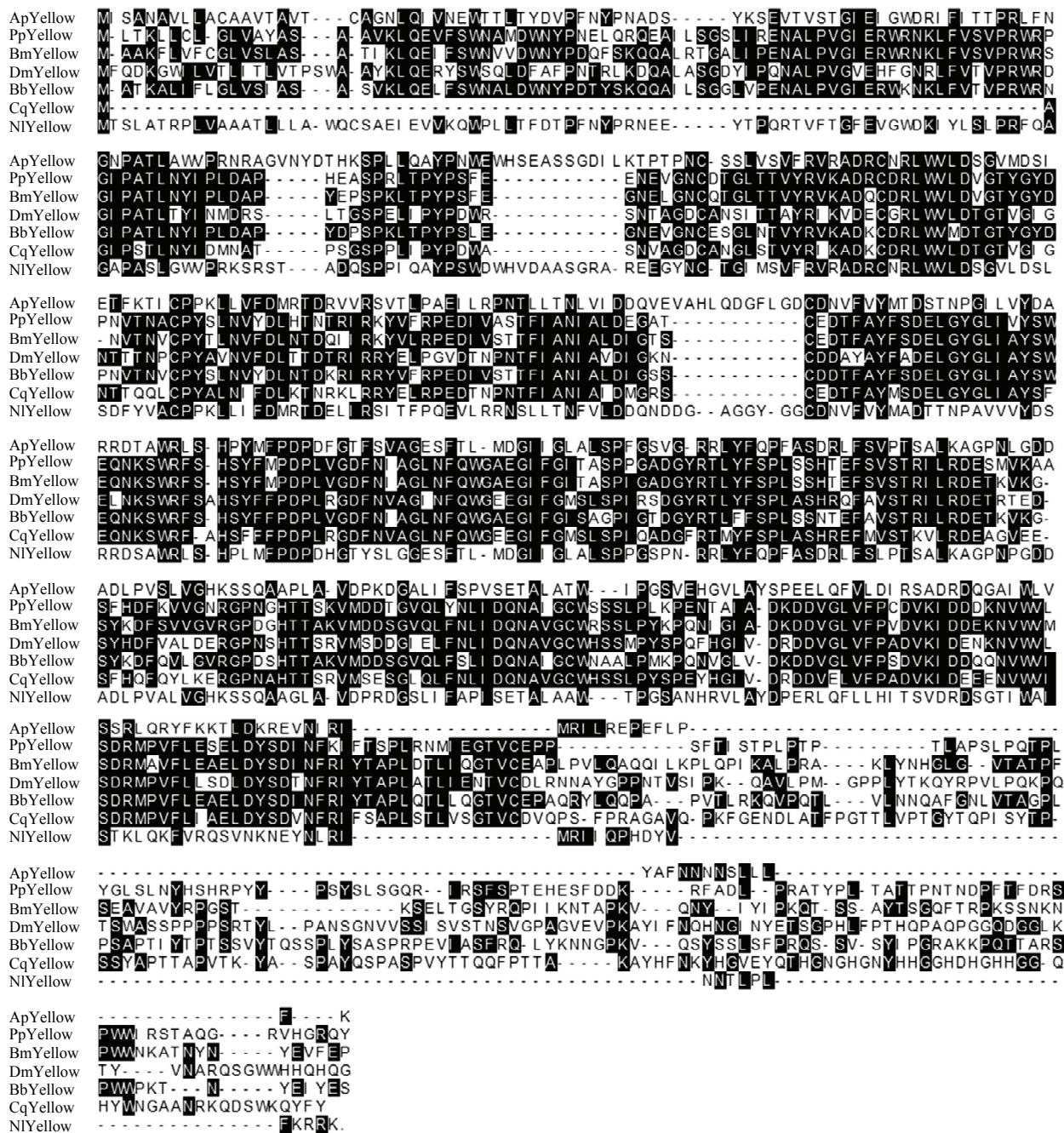
为了进一步研究 *NIYellow* 在褐飞虱发育过程中所起的作用, 采用 RNA 干扰技术对褐飞虱若虫注射 *dsNIYellow* 来观察成虫表型的变化。褐飞虱分为深色型和浅色型两种, 注射 *dsNIYellow* 发现深色型和浅色型体色之间的差别变小, 并且两种色型的成虫体色均出现一定程度的变黄, 形成有别于野生型浅色型和深色型的第 3 种体色类型 (图 4)。统计结果显示, 在共注射的 129 只 5 龄若虫中, 总存活 94 只, 且 94 只成虫体色均发生改变, 即干扰成功率为 100%。对褐飞虱胸、腹、复眼和足进一步观察发现, 经 *dsNIYellow* 干扰后, 它们的颜色与对照组相比, 黄色均有不同程度的加深, 并且这种变化在胸部和足上尤

其明显, 但复眼变化并不明显 (图 5)。

利用 qRT-PCR 检测 *NIYellow* 沉默水平, 结果表明注射 *dsNIYellow* 3 d 后, 成虫 *NIYellow* 的表达水平下降至对照组的 10% 左右 ($P < 0.01$, 图 6)。

3 讨论

研究表明, 黑色素对果蝇正常生长发育很重要, 它能协助果蝇身体表皮硬化^[17]。*Yellow* 可能通过 cAMP 途径结合在周围细胞黑皮素 1 受体 (MC1R) 调节黑化作用, 从而改变昆虫的体色^[18-20]。在黑色素的产生过程中 *Yellow* 蛋白必不可少^[21-22]。虽然果蝇中对于 *Yellow* 引起虫体体色改变的研究已很透彻, 但 *Yellow* 在褐飞虱中的功能还不明确。此外褐飞虱在自



Ap: *Acyrtosiphon pisum* (XP_001948479.1); Bb: *Biston betularia* (ADF43215.1); Bm: *Bombyx mori* (ABC96700.2); Cq: *Culex quinquefasciatus* (XP_001869281.1); Dm: *Drosophila melanogaster* (AAF45497.1); Pp: *Papilio polytes* (BAJ07589.1); Ni: *Nilaparvata lugens* (KP789022)

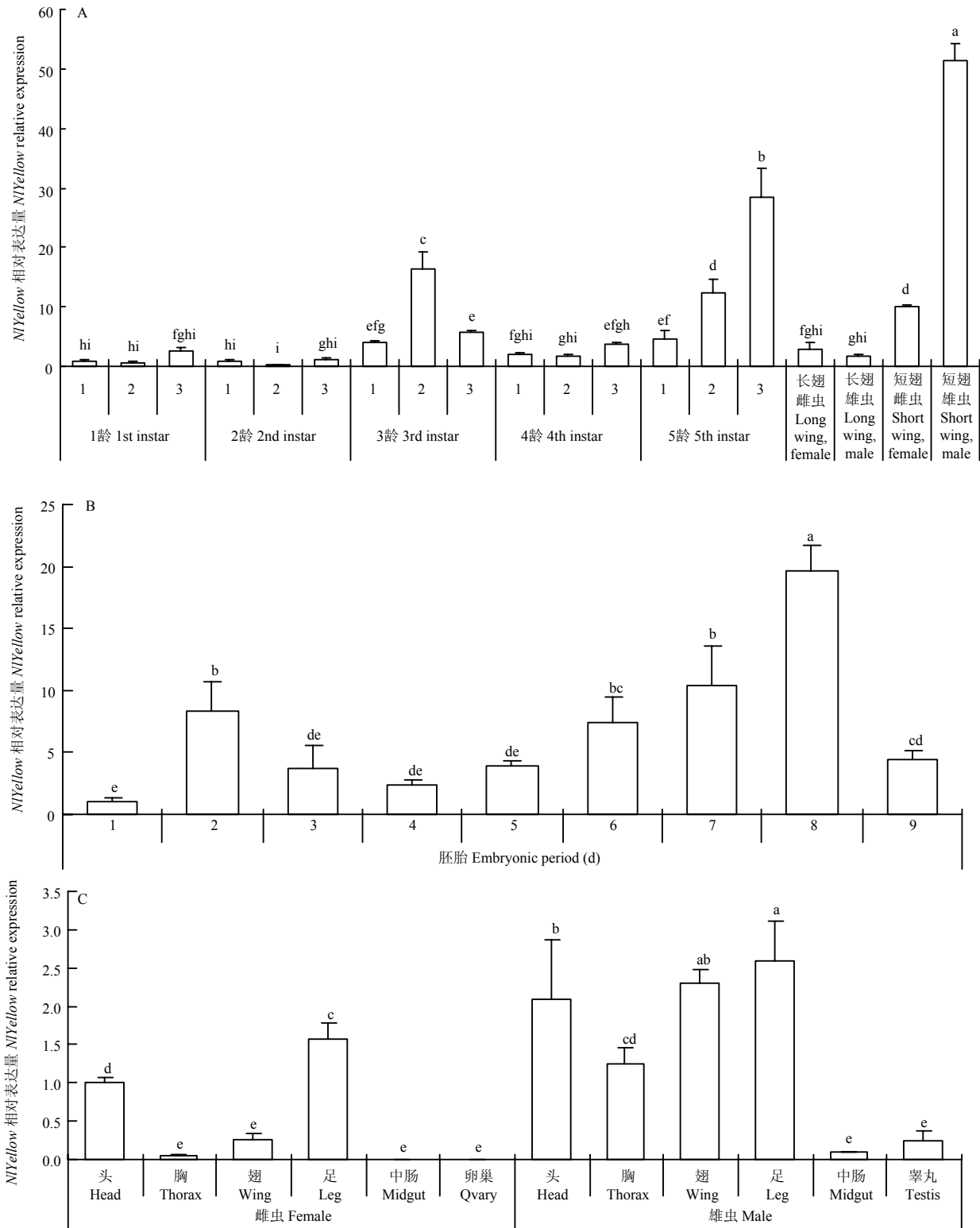
图 2 褐飞虱与其他物种 Yellow 氨基酸序列比对

Fig. 2 Alignment of amino acid residues of Yellow from *N. lugens* and other insects

然状态下具有体色多样性的特征，而这种现象在果蝇中并没有被发现。*Yellow* 是否会参与色素沉积和影响体色改变依然未知，因此选择褐飞虱作为对象，来进一步研究它的功能。

在本研究中，笔者通过注射双链 RNA 对 *NIYellow*

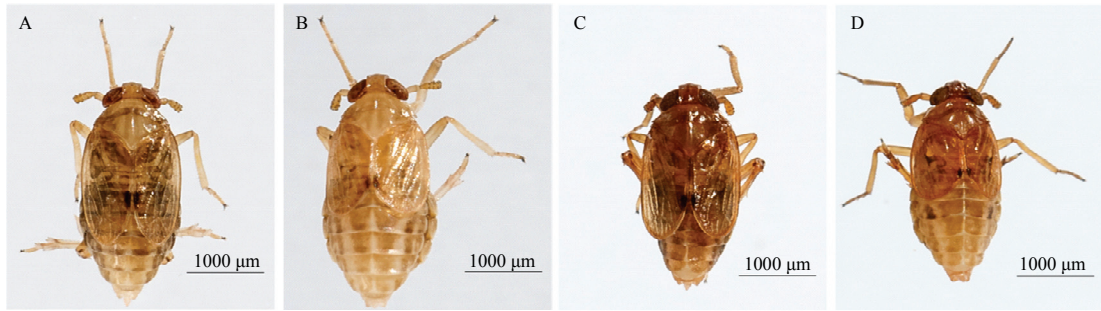
进行沉默，成功降低了 *NIYellow* 的表达量 ($P < 0.05$) 并出现了预测的表型。然而褐飞虱的发育历期较长，在不同发育阶段如 3 龄若虫期或卵期对其进行分别干扰来研究若虫体色的变化也很重要。在今后研究中也可以通过以直接饲喂双链 RNA 的方式对 *NIYellow* 基



A: *NIYellow* 在 1—5 龄若虫期和成虫期的表达水平 The relative expression of *NIYellow* at 1st-5th instar nymph and adults; B: *NIYellow* 在胚胎发育不同时期的表达水平 The relative expression of *NIYellow* at different developmental stages in embryonic period; C: *NIYellow* 在雌、雄个体不同部位的表达水平 Expression of *NIYellow* in different adult tissues

图 3 褐飞虱 *NIYellow* 的时空表达

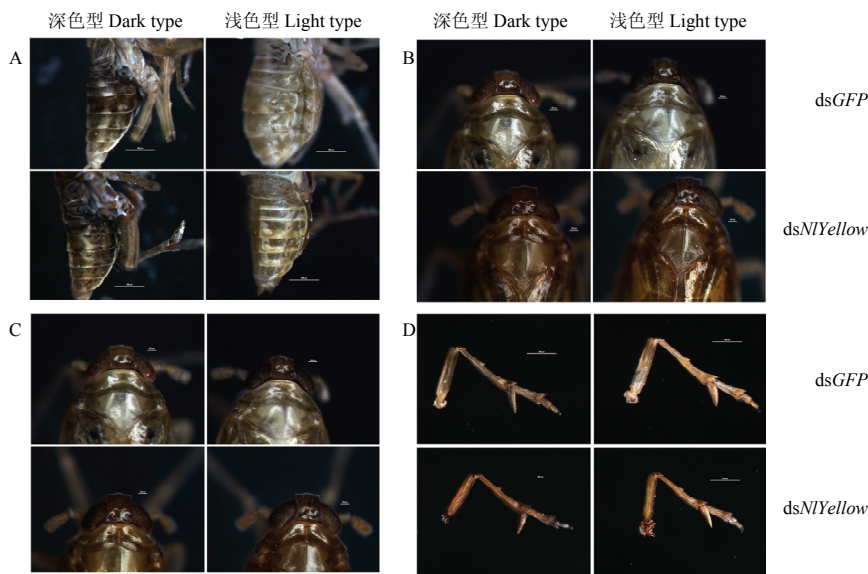
Fig. 3 Spatial-temporal expression of the *NIYellow* in *N. lugens*



A: 对照组深色型 Dark type of CK; B: 对照组浅色型 Light type of CK; C: 处理组深色型 Dark type of treatment group; D: 处理组浅色型 Light type of treatment group

图 4 *NIYellow* 基因干扰下褐飞虱体色的改变

Fig. 4 Body colour change in adult *N. lugens* following gene interference of *NIYellow*



A: 腹部 Abdomen; B: 复眼 Compound eye; C: 前胸背板和中胸背板 Pronotum and mesonotum; D: 足 Leg

图 5 *NIYellow* 基因干扰导致褐飞虱不同部位体色的改变

Fig. 5 Colour change in different body parts of adult *N. lugens* following gene interference of *NIYellow*

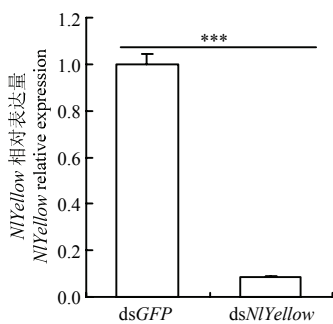


图 6 dsRNA 干扰后 *NIYellow* 表达水平

Fig. 6 The expression of *NIYellow* after RNA interference

因干扰，虽然饲喂的干扰效率可能较低但对虫体没有机械损伤。

经 qRT-PCR 分析 *NIYellow* 的时空表达，结果表明它在褐飞虱胚胎、部分若虫时期和成虫期表达量均较高，这反映出该基因在褐飞虱整个发育历程中都起着重要作用。陈慧卿^[11]研究表明褐飞虱在发育到 3 龄若虫后色型差异最明显，而 qRT-PCR 显示 3 龄若虫 *NIYellow* 表达量迅速上升，二者结论相符，进一步说明 *NIYellow* 对于引起褐飞虱体色的改变发挥重要的作用。但由于褐飞虱若虫和成虫分属于两个完全不同的时期，在体色和形态方面也有很大的差别，因此当褐

飞虱进入若虫向成虫过渡时段, 即 5 龄若虫期时, *NIYellow* 表达量急剧上升, 色素合成量增大, 为进入成虫期并形成具有成虫特异性体色特征做准备。对于褐飞虱成虫, 笔者发现在短翅型中 *NIYellow* 表达量显著高于长翅型的 ($P < 0.05$), 这也许是由于两类褐飞虱自身特征决定的。众所周知, 褐飞虱是一种迁飞性昆虫, 长翅型善于迁飞进入适宜的环境当中, 而短翅型迁飞能力差^[23], 因此它对同一区域下多变环境 (如温度和光照) 的适应能力就需要加强, 上文提及体色的改变是为了适应环境, 因此短翅型 *NIYellow* 表达量较高。另显示短翅型雄虫中的表达量高于雌虫 ($P < 0.05$), 推测可能是由于 *NIYellow* 在雄虫中还发挥其他作用, 但这需要进一步研究。在检测该基因的组织表达特征时发现, *NIYellow* 主要对褐飞虱暴露在环境中的外部组织发挥作用, 而中肠、卵巢和睾丸由于处在身体内部, 外界诸如光照、温度等因素对其影响较小, 色泽的改变可能不是很重要, 因此基因的表达水平较低甚至不表达。后续通过 RNA 干扰来观察褐飞虱体色的试验中, 也进一步表明 *NIYellow* 对虫体复眼、胸、翅、足等外部组织中色素的积累发挥着重要作用, 并且这种积累在腹部、胸部和足中尤其明显。

Yellow 对于生物体色素沉积具有重要作用, 它的表达会影响到生物体色的改变, 而这种改变也易于观察。因此, 在构建转基因生物时, 可以将其作为选择性标记基因, 更加利于后续的筛选工作。此外, 已有研究表明 *Yellow* 能促进雄性果蝇的求偶行为^[24-25], 这种功能似乎和控制昆虫体色的变化没有直接关系, 它的这种功能在雄性褐飞虱的求偶行为中是否也发挥着重要作用, 还需要进一步研究。

4 结论

从褐飞虱中克隆得到 *NIYellow*, 并对其进行生物信息学分析, 序列比对和进化树分析表明该基因在不同物种间具有保守性。通过 qRT-PCR 发现其在褐飞虱胚胎、3 龄和 5 龄若虫期以及成虫期表达量较高。在头、胸、翅和足中表达量较高, 并且短翅型褐飞虱 *NIYellow* 表达量比长翅型高。RNA 干扰 5 龄若虫后, 观察发育后的褐飞虱成虫发现干扰后的虫体与对照组相比体色偏黄, 形成有别于深色型和浅色型的第 3 种体色类型。因此初步推测 *NIYellow* 功能是协助褐飞虱体内色素沉积, 改变外表皮体色。

References

- [1] Geyer P K, Green M M, Corces V G. Tissue-specific transcriptional enhancers may act in *trans* on the gene located in the homologous chromosome: the molecular basis of transvection in *Drosophila*. *The EMBO Journal*, 1990, 9(7): 2247-2256.
- [2] 程茂高, 乔卿梅, 原国辉. 昆虫体色分化研究进展. *昆虫知识*, 2005, 42(5): 502-505.
Cheng M G, Qiao Q M, Yuan G H. Progress of the research on body-color diversity in insects. *Chinese Bulletin of Entomology*, 2005, 42(5): 502-505. (in Chinese)
- [3] Tanaka S. Endocrine mechanisms controlling body-color polymorphism in locusts. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2001, 47(3): 139-149.
- [4] 赵惠燕, 张改生, 汪世泽, 王玉梅, 巴桑普赤. 棉蚜体色变化的生态遗传学研究. *昆虫学报*, 1993, 36(3): 282-289.
Zhao H Y, Zhang G S, Wang S Z, Wang Y M, Basang P C. An eco-genetical study of body colour in cotton aphids (*Aphis gossypii*). *Acta Entomologica Sinica*, 1993, 36(3): 282-289. (in Chinese)
- [5] 李超, 谢宝瑜. 光周期与温度的联合作用对棉铃虫种群滞育的影响. *昆虫知识*, 1981, 18(2): 58-61.
Li C, Xie B Y. Photoperiod and temperature impact on cotton bollworm populations of diapause. *Chinese Bulletin of Entomology*, 1981, 18(2): 58-61. (in Chinese)
- [6] Wittkopp P J, Beldade P. Development and evolution of insect pigmentation: genetic mechanisms and the potential consequences of pleiotropy. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2009, 20(1): 65-71.
- [7] Valmalette J C, Dombrovsky A, Brat P, Mertz C, Capovilla M, Robichon A. Light-induced electron transfer and ATP synthesis in a carotene synthesizing insect. *Scientific Reports*, 2012, 2: 579.
- [8] Wu W J, Wang Y, Huang H J, Bao Y Y, Zhang C X. Ecdysone receptor controls wing morphogenesis and melanization during rice planthopper metamorphosis. *Journal of Insect Physiology*, 2012, 58(3): 420-426.
- [9] Nakashima N, Noda H. Nonpathogenic *Nilaparvata lugens* reovirus is transmitted to the brown planthopper through rice plant. *Virology*, 1995, 207(1): 303-307.
- [10] Xue J, Zhou X, Zhang C X, Yu L L, Fan H W, Wang Z, Cheng J A. Genomes of the rice pest brown planthopper and its endosymbionts reveal complex complementary contributions for host adaptation. *Genome Biology*, 2014, 15(12): 521.
- [11] 陈慧卿. 褐飞虱体色分化的初步研究[D]. 广州: 中山大学, 2005.
Chen H Q. Primary study of body colour differentiation in

- Nilaparvata lugens*[D]. Guangzhou: Sun Yat-sen University, 2005. (in Chinese)
- [12] Gompel N, Carroll S B. Genetic mechanisms and constraints governing the evolution of correlated traits in drosophilid flies. *Nature*, 2003, 424(6951): 931-935.
- [13] Wittkopp P J, Vaccaro K, Carroll S B. Evolution of *yellow* gene regulation and pigmentation in *Drosophila*. *Current Biology*, 2002, 12(18): 1547-1556.
- [14] Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [15] Yuan M, Lu Y, Zhu X, Wan H, Shakeel M, Zhan S, Li J. Selection and evaluation of potential reference genes for gene expression analysis in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae) using reverse-transcription quantitative PCR. *PLoS One*, 2014, 9(1): e86503.
- [16] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [17] Nappi A J, Christensen B M. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: applications to insect innate immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 35: 443-459.
- [18] Drapeau M D. A novel hypothesis on the biochemical role of the *Drosophila* Yellow protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 311(1): 1-3.
- [19] Busca R, Ballotti R. Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment Cell Research*, 2000, 13(2): 60-69.
- [20] Ferguson L C, Green J, SurrIDGE A, Jiggins C D. Evolution of the insect *yellow* gene family. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(1): 257-272.
- [21] Wittkopp P J, True J R, Carroll S B. Reciprocal functions of the *Drosophila* yellow and ebony proteins in the development and evolution of pigment patterns. *Development*, 2002, 129(8): 1849-1858.
- [22] Riedel F, Vorkel D, Eaton S. Megalin-dependent yellow endocytosis restricts melanization in the *Drosophila* cuticle. *Development*, 2011, 138(1): 149-158.
- [23] Ayoade O, Morooka S, Tojo S. Enhancement of short wing formation and ovarian growth in the genetically defined macropterous strain of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Journal of Insect Physiology*, 1999, 45(1): 93-100.
- [24] Drapeau M D, Radovic A, Wittkopp P J, Long A D. A gene necessary for normal male courtship, *yellow*, acts downstream of *fruitless* in the *Drosophila melanogaster* larval brain. *Journal of Neurobiology*, 2003, 55(1): 53-72.
- [25] Drapeau M D, Cyran S A, Viering M M, Geyer P K, Long A D. A cis-regulatory sequence within the *yellow* locus of *Drosophila melanogaster* required for normal male mating success. *Genetics*, 2006, 172(2): 1009-1030.

(责任编辑 岳梅)