

Met 和 Kr-h1 基因在褐飞虱变态发育中的功能分析

姚云, 王博, 蒋建茹, 林欣大*

(中国计量学院生命科学学院, 杭州 310018)

摘要:【目的】保幼激素受体 Methoprene-tolerant (Met) 控制保幼激素信号传导途径中重要下游转录因子 Krüppel-homolog 1 (Kr-h1) 的表达, 调控昆虫的变态发育。本研究旨在探究褐飞虱 *Nilaparvata lugens* Met 基因与 Kr-h1 在褐飞虱变态发育中的功能。【方法】利用 PCR 技术扩增 *NlMet* 基因的 ORF 序列。通过 RNA 干扰技术分别或同时沉默褐飞虱若虫的 *NlMet* 和 *NlKr-h1* 基因, 进一步研究其功能。【结果】克隆得到 *NlMet*, 其开放阅读框包含 1 185 bp, 编码 395 个氨基酸, 包括 bHLH, PAS-A, PAS-B 和 PAC 4 个结构域; 其中 PAS-B 和 PAC 保守性较高, 而 bHLH 和 PAS-A 保守性相对较低。采用 RNA 干扰技术沉默 *NlMet* 和 *NlKr-h1* 基因后发现, 单独对 4 龄若虫 *NlKr-h1* 基因干扰后, 若虫阶段及初羽化雌虫和雄虫死亡率均显著上升 ($P < 0.05$); 对 5 龄若虫 *NlKr-h1* 基因干扰后只有若虫死亡率上升 ($P < 0.05$), 单独对 *NlMet* 基因干扰后死亡率没有显著变化 ($P > 0.05$); 二者共同沉默后的死亡率同单独对 *NlKr-h1* 沉默时类似。此外, 我们还发现单独对 4 龄若虫 *NlKr-h1* 干扰后在雌虫中出现了生殖器畸形, 虽然 *NlMet* 干扰并未出现生殖器发育畸形现象, 但二者共同干扰后, 在若虫、初羽化雌雄成虫中畸形比例均显著增加 ($P < 0.05$)。【结论】*NlMet* 与下游转录因子 *NlKr-h1* 对褐飞虱变态发育起到重要作用, 影响若虫到成虫的变态和外生殖器的发育。本研究有助于揭示 *NlMet* 和 *NlKr-h1* 在昆虫变态发育中的重要作用。

关键词: 褐飞虱; 变态; 保幼激素受体基因; 保幼激素信号途径; RNA 干扰

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2015)11-1151-09

Function of Methoprene-tolerant and Krüppel-homolog 1 genes in metamorphosis in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae)

YAO Yun, WANG Bo, JIANG Jian-Ru, LIN Xin-Da* (College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China)

Abstract:【Aim】The receptor of juvenile hormone (JH), methoprene-tolerant (Met), activates Krüppel-homolog 1 (Kr-h1), a key transcription factor in JH signaling pathway. Met plays a crucial role in insect metamorphosis. The aim of this study is to explore the functions of *NlMet* and *NlKr-h1* in metamorphosis in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*.【Methods】An opening reading frame (ORF) of *NlMet* was cloned from *N. lugens* by PCR. The mRNA expression levels of *NlMet* and/or *NlKr-h1* were down-regulated by RNAi, and the effects of RNAi on metamorphosis and external genital morphology were observed.【Results】The open reading frame of *NlMet* is 1 185 bp in length, encoding 395 amino acids. The *NlMet* protein contains four domains, *i. e.*, bHLH, PAS-A, PAS-B and PAC. PAS-B and PAC are highly conserved, whereas the other two show relative lower similarities. By disruption of *NlMet* and *NlKr-h1* expression singly or both in the same time by RNAi in *N. lugens*, we found that down-regulating *NlKr-h1* in the 4th instar nymphs significantly increased the mortality of nymphs and the newly emerged male and female adults ($P < 0.05$). After interference of *NlKr-h1* in the 5th instar nymphs, only the mortality of nymphs significantly increased ($P < 0.05$), while after interference of *NlMet* in the 5th instar nymphs, the mortality of nymphs had no significant change ($P > 0.05$). After interference of both genes,

基金项目: 国家自然科学基金项目(31471771); 浙江省自然科学基金项目(LY14C140002)

作者简介: 姚云, 女, 1990年1月生, 北京人, 硕士, 研究方向为生物化学与分子生物学, E-mail: tianzhen824@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: linxinda@cjl.u.edu.cn

收稿日期 Received: 2015-03-13; 接受日期 Accepted: 2015-05-28

the change tendency of mortality was similar to that after interference of *NIKr-h1*. Furthermore, we found that *NIKr-h1* RNAi caused abnormality in female external genitalia. Although we found no visible abnormality of the external genitalia after inference with *NIMet*, the abnormality rate of the external genitalia increased significantly when both genes were silenced. 【Conclusion】 *NIMet* cooperates with the downstream transcription factor and has an important role in both metamorphosis and external genitalia development of *N. lugens*. Our study helps to understand the function of the *NIMet* and *NIKr-h1* genes in metamorphosis of *N. lugens*.

Key words: *Nilaparvata lugens*; metamorphosis; juvenile hormone receptor; JH signaling pathway, RNA interference

昆虫具有两种不同类型的生长发育形式:半变态和完全变态。前者包括蝗虫和蟑螂等,其幼虫(又称为“若虫”)与成虫的形态相似。后者包括果蝇和蜜蜂等,其幼虫与成虫的形态差别很大,整个发育过程中要经历卵、幼虫、蛹和成虫 4 个阶段(Kristensen, 1999)。无论是半变态还是完全变态昆虫,它们在发育过程中都依赖保幼激素的调控(Gilbert *et al.*, 2000)。保幼激素是咽侧体分泌的一类倍半萜烯激素,它能调控昆虫包括变态发育、蜕皮、季节性滞育以及刺激雌性成虫卵黄形成等一系列重要的生理过程(Nijhout, 1994; Minakuchi *et al.*, 2008; Jindra *et al.*, 2013)。

目前已有利用保幼激素类似物作为杀虫剂控制农业害虫的范例,如烯虫酯、双氧威和吡丙醚等(Slama, 1971)等。然而,保幼激素信号传导的分子机理依然不是很明确(Riddiford, 2012)。Methoprene-tolerant (*Met*)被认为是保幼激素的受体(Wilson and Fabian, 1986)。该受体蛋白最初在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 中被发现,它能以高度的亲和性与保幼激素相结合(Miura *et al.*, 2005),然后激活下游转录因子 Krüppel-homolog1 (*Kr-h1*),最终影响昆虫幼虫期生长发育及相关形态的改变(Minakuchi *et al.*, 2009)。*NIMet* 属于 bHLH-PAS 家族成员,它在昆虫生理和发育过程中,处于基因表达网络中的重要调节部位(Kewley *et al.*, 2004)。以往研究赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 时发现,*Met* 的沉默能引发幼虫过早地向蛹期发育(Konopova and Jindra, 2007);RNA 干扰始红蝽 *Pyrhocoris apterus* *Met* 也发现了类似现象(Smykal *et al.*, 2014)。*Kr-h1* 是含有 C₂ 和 H₂ 锌指结构的转录因子,它在昆虫胚胎和早期若虫期表达活跃,参与调控胚胎发育、维持幼虫性状(Schuh *et al.*, 1986; Minakuchi *et al.*, 2011)

褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 是一种重要的迁飞性水稻害虫,它属于半变态昆虫(Bertuso *et al.*,

2002)。了解其保幼激素信号传导途径在变态发育中的作用及其机理,可以为利用激素类似物进行害虫防治提供理论依据。在本研究中,我们以褐飞虱为研究对象,通过克隆 *Met* 基因,并采用 RNA 干扰技术,干扰 *NIMet* 和 *NIKr-h1* 基因的表达,从而揭示 *NIMet* 和 *NIKr-1* 以及二者在褐飞虱变态发育过程中的协同作用。

1 材料和方法

1.1 试虫

褐飞虱虫源由浙江大学昆虫科学研究所祝增荣教授提供,饲养于温室水稻中,饲养温度为 25℃,相对湿度 60%,光照周期为 16L:8D。用于实验的试虫已在温室中繁殖 20 代以上。

1.2 主要试剂及仪器

RNA 提取试剂盒 Trizol (TaKaRa)。反转录试剂盒 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis (Roche); PrimeScript RT-PCR 试剂盒 (TaKaRa); RNA Production System-T7 试剂盒 (RiboMAX™ Large Scale, Promeg)。注射仪器: Narishige Injection System (MN-151, Narishige)。实验所用的引物及测序均由上海桑尼生物公司完成。

1.3 褐飞虱 *NIMet* 基因的克隆及蛋白结构域分析

1.3.1 总 RNA 提取及 cDNA 的合成: 取饲养在实验室的雌雄褐飞虱成虫(长翅雌虫和雄虫、短翅雌虫和雄虫各 2 头)进行混合提取,参照 RNAiso™ Plus 说明书,利用苯酚-氯仿抽提和异丙醇沉淀的方法提取总 RNA,将提取的总 RNA 溶于 DEPC 处理水后使用 Nanodrop 1000 测定核酸浓度。参照 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis 试剂盒合成 cDNA。

1.3.2 褐飞虱 *NIMet* 基因的克隆: 根据褐飞虱转录组数据并采用 Primer3 Online (<http://www.simgene.com/Primer3>)设计引物(Xue *et al.*, 2010),将 PCR 扩增的目的基因纯化后连接在 pMD18-T 载体上,之后

将连接产物转化至 DH5 α 感受态细胞,接种在含氨苄霉素 (Ampicillin) 的 LB 培养基中,过夜培养后挑取阳性克隆并测序。*NlMet* 基因克隆引物见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Sequences of primers

引物名称 Primer name	引物序列(5' - 3') Primer sequences
MetF	ACATGTTGGCTGCTCAACTG
MetR	GCAAAGCCTCGTACTCTTGG
MetI7F	TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACCAACCAG CAGATGAACCTCA
MetI7R	TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACGCAAAGC CTCCTACTCTTGG
KrhI7F	TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACGTGGGGT TCAGTCTGAGGA
KrhI7R	TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACCACTCGA ACACACACCGGAG
GFPT75	TAATACGACTCACTATAGGGAGATTTGTATAGTTC ATCCATGCCATGT
GFPT73	TAATACGACTCACTATAGGGAGAATGAGTAAAGG AGAAGAACITTTTCA
KrhQF	TGATGAGGCACACGATGACT
KrhQR	ATGGAAGGCCACATCAAGAG
MetQF	GGTGCTAAACGGATTGGAAA
MetQR	CATCGTCAGCCAACCTCGATA

1.3.3 蛋白结构域分析: 利用 Editseq 和 MegaAlign 软件 (DNASTAR, Lasergene Inc.) 将测序的褐飞虱 *NlMet* 基因 cDNA 序列翻译为氨基酸序列并与 NCBI 数据 (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 中已知 5 个物种的同源 *Met* 氨基酸序列进行比对,并按照 4 个结构域进行分类。

1.4 褐飞虱 *NlMet* 基因 RNA 干扰实验

已有研究表明,对 *NlKr-h1* 基因沉默,会降低褐飞虱的存活率并引起雌雄成虫外生殖器发育畸形 (Jin *et al.*, 2014),因此在本研究中我们分别对褐飞虱 4 龄和 5 龄若虫的 *NlMet* 和 *NlKr-h1* 2 个基因共同进行沉默。首先以连接有 *NlMet* 基因和 *NlKr-h1* 基因 (GenBank 登录号: KF414525) 的 pMD18-T 载体为模板,设计引物扩增长度约为 500 bp 的片段用于 dsRNA 的合成,扩增引物见表 1。利用 pMD18-T-*GFP* 作为模板,以 GFPT7 为引物 (表 1) 扩增片段,用以合成 *GFP* dsRNA。采用 RNA Production System-T7 试剂盒合成 *NlMet* dsRNA, *NlKr-h1* dsRNA 和 *GFP* dsRNA。挑取 4 龄和 5 龄若虫各 751 和 632 头分别注射 0.2 μg 的 *NlMet* dsRNA、0.2 μg 的 *NlKr-h1* dsRNA 和 *NlMet* 与 *Nlkr-h1* 等量混合的 dsRNA;对照组则注射等量 *GFP* dsRNA。此外还分

别选取了 55 头 4 龄及 78 头 5 龄若虫分别注射 0.4 μg *NlMet* dsRNA。注射后的褐飞虱饲养于水稻中,观察其发育状况并统计成活率和外生殖器畸形情况。若虫持续蜕皮状态达 3 h 以上,用毛笔触及足和触角等附肢,完全不动即判定为死亡。外生殖器畸形的判断参照《中国稻区常见飞虱原色图鉴》(丁锦华等, 2012)。每组实验设立 3 个生物学重复。采用 Nikon 体式显微镜 (SMZ745T) 对基因沉默后的雌雄褐飞虱生殖器及蜕皮过程中死亡的虫体进行拍照,拍照后的图片采用 Adobe Photoshop CS4 进行处理。

为了确定 dsRNA 注射后基因沉默水平,我们选取 *NlMet* (*NlKr-h1*) dsRNA 和 *GFP* dsRNA 注射后第 1, 3, 5 和 7 天的虫体,每 10 头虫为一组,利用荧光定量 PCR 检测 *NlMet* 和 *NlKr-h1* 基因的表达水平。设计约 120 bp 的片段用于 *NlMet* 和 *NlKr-h1* 基因的定量检测,qPCR 引物见表 1。实时荧光定量 PCR 设立 3 个重复。每个反应体系包括 SYBR Premix ExTaq(2 \times) 10 μL ,正向引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 0.4 μL ,反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 0.4 μL ,cDNA 2 μL ,dH₂O 7.2 μL 。采用两步法 qPCR 扩增程序,第一步预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min;第二步 PCR 反应共 40 个循环,每一个循环包括 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min,58 $^{\circ}\text{C}$ 40 s。定量数据采用 2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} 方法进行分析 (Livak and Schmittgen, 2001)。

1.5 数据分析

应用 SPSS18.0 数据分析软件,采用独立方差 *t* 检验比较 *Met* 和 *Kr-h1* 基因在干扰组和对照组褐飞虱中的表达水平。

2 结果

2.1 褐飞虱 *Met* 蛋白结构域分析

克隆 *NlMet* (GenBank 登录号: KP797880) 后,将所得核苷酸编码序列翻译为氨基酸序列,结合以往对赤拟谷盗 *Met* 基因的报道我们发现,褐飞虱 *Met* 蛋白也包含 4 个典型的结构域,它们分别是 bHLH, PAS-A, PAS-B 和 PAC。bHLH 表现出典型的 DNA 结合结构域特征。PAS 结构域则存在于许多信号蛋白中并常被用作信号感受结构域。PAC 基序则常出现在 C-末端并协助 PAS 结构域的折叠。在 bHLH 结构域中,氨基酸 K, N 和 T 最保守,而褐飞虱中的 D, L, P 和 S 相对保守 (图 1: A); 在 PAS-A 中,褐飞虱氨基酸序列与其他几个物种相比,同源性较低 (图 1: B); 在 PAS-B 和 PAC 结构域中,保守氨基酸数量最多 (图 1: C 和 D)。

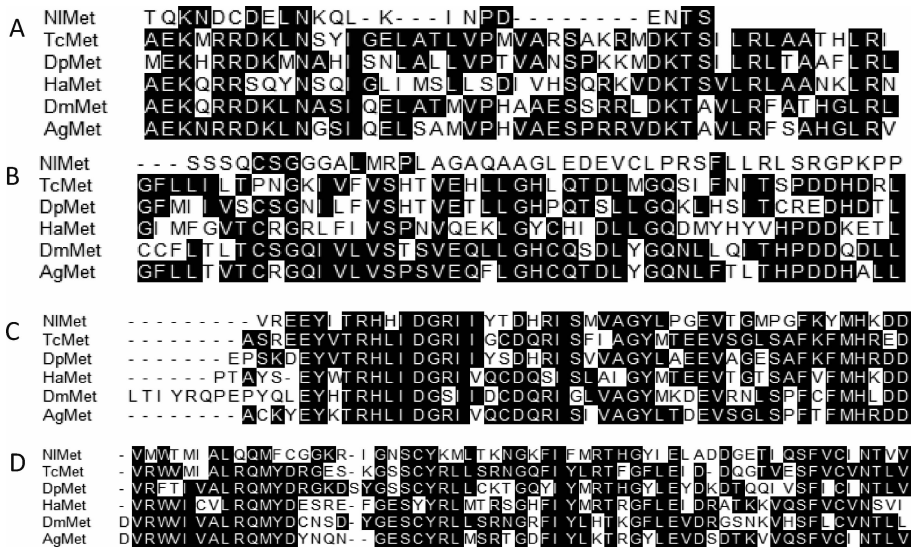


图 1 褐飞虱 *NIMet* 与其他 4 个物种同源 *Met* 蛋白的氨基酸序列比对

Fig. 1 Alignment of the amino acid sequences of *Nilaparvata lugens* *Met* and homologues from other four species

A: bHLH; B: PAS-A; C: PAS-B; D: PAC. *Met* 来源昆虫及其 GenBank 登录号 Source insects of *Met* proteins and their GenBank accession numbers; Nl: 褐飞虱 *Nilaparvata lugens*; Dp: 斑翅甲蠊 *Diptera punctate* (AIM47235.1); Tc: 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* (NP_001092812.1); Dm: 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (NP_511126.2); Ha: 棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (AHX26585.1); Ag: 冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* (ABC18327.1).

2.2 RNA 干扰对褐飞虱生长发育与表型的影响

2.2.1 RNA 干扰对褐飞虱存活率的影响:

为了研究 *NIMet* 在褐飞虱生长发育过程中所起的作用,通过 RNA 干扰技术,对褐飞虱 4 龄和 5 龄若虫注射 dsRNA 来观察并统计后续存活率。荧光定量 PCR 检测基因沉默水平显示:4 龄若虫注射 ds*NIMet* 和 ds*NlKr-h1* 后,在注射后的第 1, 3 和 5 天内与之对应的基因下降至原来表达量的 10% ~ 20% 不等,在第 7 天干扰效率有所降低,但与对照组相比表达量仍下降了 50% 左右。当对 5 龄若虫进行干扰后发现, *NIMet* 的表达量在第 1 天并没有下降,但 *NIMet* 在第 3, 5 和 7 天表达水平为对照组的 20% ~ 40%, 对 5 龄若虫 *NlKr-h1* 干扰后发现表达水平降低到原来的 10% ~ 50% 之间(图 2: A, B)。另外分别检测了 *NIMet* 和 *NlKr-h1* 双干扰若虫中以上 2 个基因的表达水平,结果表明对 4 龄若虫来说, *NIMet* 的表达水平只有对照组的 20% ~ 50%。除第 7 天以外,其余时间段 *NlKr-h1* 表达量均为原来的 30% 左右。对 5 龄若虫来说, *NIMet* 和 *NlKr-h1* 的表达量在第 3 和 5 天是原来的 20% ~ 50%, 但在第 1 和 7 天没有发现干扰效果(图 2: C, D)。

最后我们还检测了注射 ds*NIMet* 后 *NlKr-h1* 基因的表达量。结果表明 4 龄若虫注射 *NIMet* 后 *NlKr-h1* 表达量下降至原来的 10% ~ 50%, 但注射 5 龄若虫后,在第 3, 5 和 7 天表达量虽下降,但只有第 3 和 5 天达到显著差异($P < 0.05$)(图 2: E)。

对沉默后的褐飞虱个体观察发现,在整个发育过程的不同阶段中均存在蜕皮死亡现象(图 3: C ~ F)。统计发现,单独对 4 龄和 5 龄若虫注射 0.2 μg 的 ds*NIMet* 后,若虫、初羽化雌虫和初羽化雄虫总体存活率较对照而言没有影响;将 ds*NIMet* 的注射量增至 0.4 μg 后,4 龄和 5 龄若虫以及 4 龄初羽化雄虫死亡率显著上升($P < 0.05$)(表 2, 图 4)。单独对 4 龄若虫 *NlKr-h1* 基因沉默后,若虫、初羽化雄虫和初羽化雌虫死亡率显著上升($P < 0.05$)(表 2, 图 4),相反对 5 龄若虫 *NlKr-h1* 基因沉默后,只有若虫的死亡率显著上升($P < 0.05$)。有意思的是,对 4 龄和 5 龄若虫以上 2 个基因同时沉默后,若虫的死亡率显著上升($P < 0.05$)并达到了最高水平,并且初羽化成虫中也有较高的死亡率(表 2, 图 4)。统计分析表明,除干扰 4 龄若虫 *NlKr-h1* 基因后雄虫的死亡率高于雌虫($P < 0.01$)外,其他干扰条件下并没有发现雌雄死亡率具有差别。另发现不同类型的虫体在蜕皮死亡时状态和死亡率也存在着关系。如褐飞虱在若虫期向成虫期蜕皮的过程中,属于蜕皮的早期阶段,死亡率最高(图 3: C)。图 3(D ~ F) 分别表示褐飞虱成虫蜕皮死亡的不同状态,图 3(D)中褐飞虱头和胸部已完成蜕皮,图 3(E)中褐飞虱蜕皮进一步增加,可以看到翅膀的展开,其中处在以上两个蜕皮状态死亡率较高;图 3(F)中褐飞虱蜕皮进入尾声,即只有在腿部还未完全蜕皮,此时死亡率最低。

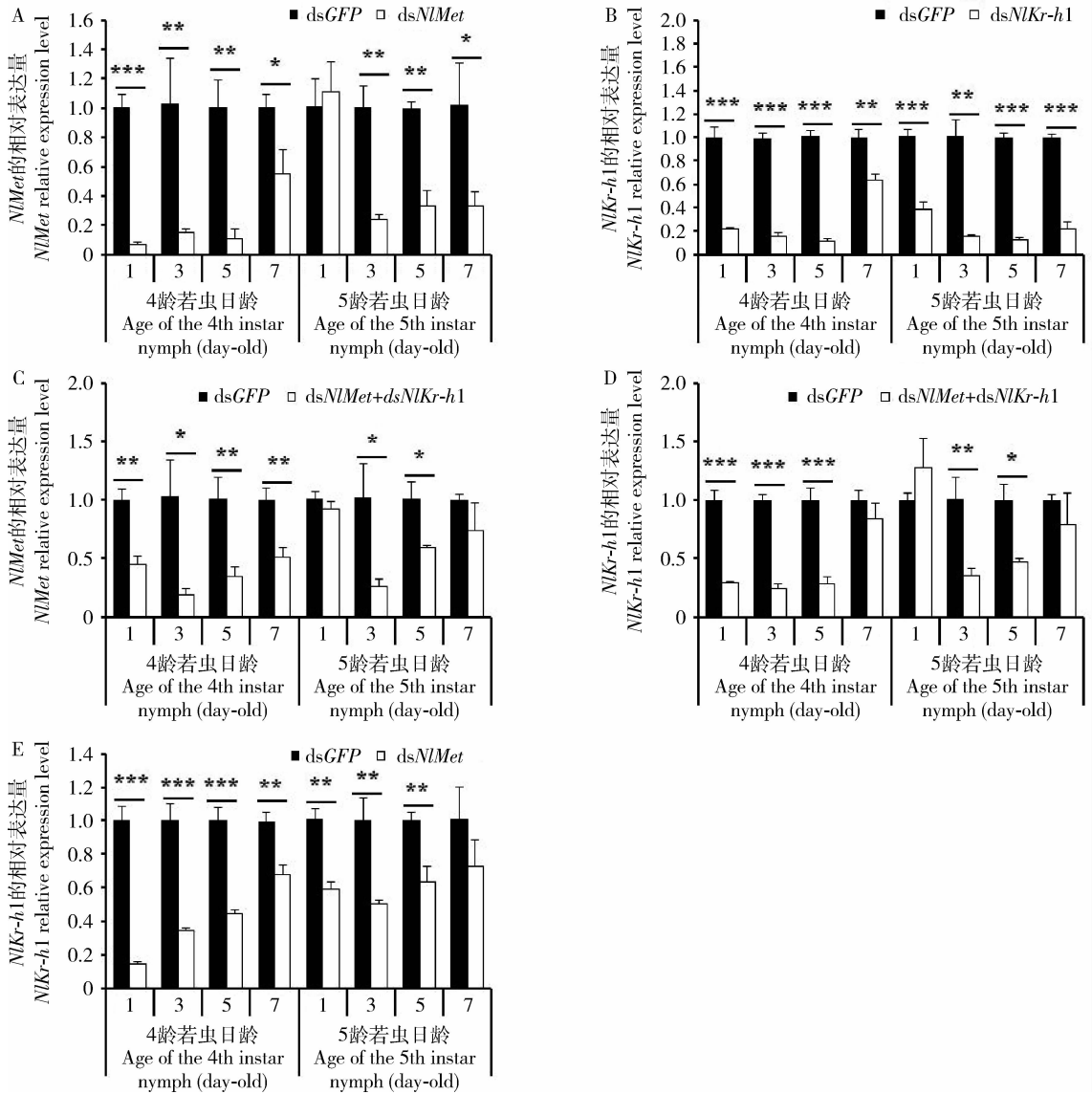


图2 褐飞虱4龄和5龄若虫注射 *dsNlMet/NlKr-h1* 后的 *NlMet* 与 *NlKr-h1* 的相对表达水平

Fig. 2 Relative expression of *NlMet* and *NlKr-h1* in the 4th and 5th instar nymphs of *Nilaparvata lugens* after injection of *dsNlKr-h1*, *dsNlMet* or both, respectively

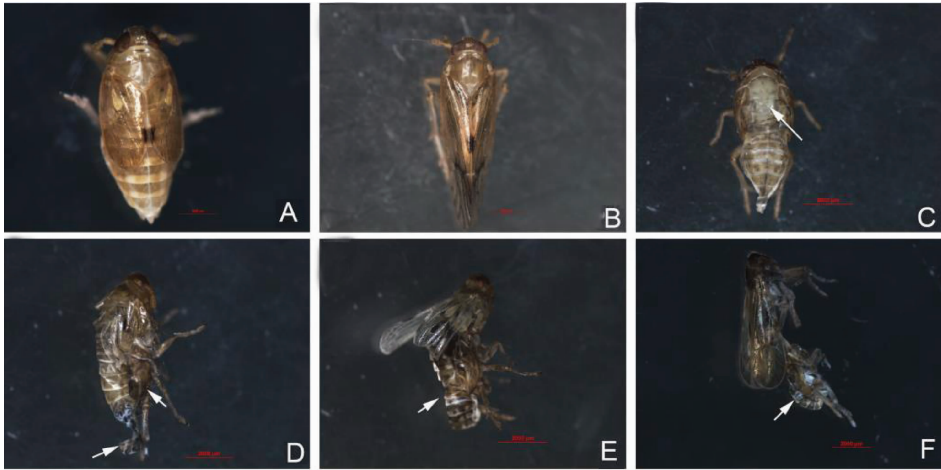
星号表示处理与对照 (*dsGFP*) 相比差异显著 (*t* 检验)。Asterisks show significant difference between the treatment and the control (*dsGFP*) (*t* test). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

表2 RNA干扰对褐飞虱存活的影响

Table 2 Effect of RNA interference on the survival of *Nilaparvata lugens*

注射 dsRNA 时的若虫龄期 Nymphal stage when injecting dsRNA	dsRNA	试虫总数 Total of tested individuals	死亡率 Mortality (%)		
			若虫 Nymphs	雌成虫 Female adults	雄成虫 Male adults
4 龄 4th instar	<i>dsGFP</i>	254	1.57	0	0
	<i>dsNlMet</i>	167	1.20	0.60	0
	<i>dsNlMet'</i>	55	30.78	0	2.23
	<i>dsNlMet</i> + <i>dsNlKr-h1</i>	188	15.96	1.60	1.60
	<i>dsNlKr-h1</i>	142	13.38	2.82	7.75
5 龄 5th instar	<i>dsGFP</i>	234	7.26	0	0
	<i>dsNlMet</i>	59	0	0	0
	<i>dsNlMet'</i>	78	12.70	0	0
	<i>dsNlMet</i> + <i>dsNlKr-h1</i>	97	24.74	1.03	1.03
	<i>dsNlKr-h1</i>	242	4.55	0.41	0

dsNlMet 和 *dsNlMet'* 分别表示注射 0.2 和 0.4 μg ; 表3 同。 *dsNlMet* and *dsNlMet'* represents injecting 0.2 and 0.4 μg , respectively. The same for Table 3.

图3 *NlMet/NlKr-h1* 基因沉默后褐飞虱蜕皮的表型Fig. 3 Molting phenotype of *Nilaparvata lugens* after silence of *NlMet/NlKr-h1*

A: 野生短翅型褐飞虱 Wild-type short winged *N. lugens*; B: 野生长翅型褐飞虱 Wild-type long winged *N. lugens*; C: *NlMet* 基因沉默后褐飞虱若虫阶段蜕皮过程中死亡 Death during the nymphal eclosion after ds*NlMet* injection; D - F: 分别为 *NlMet* 基因沉默后短翅雌性成虫、短翅雄性成虫和长翅雄性成虫蜕皮过程中死亡的代表性图片 Death during eclosion of the short winged female (D), short winged male (E) and long winged male adults (F) after ds*NlMet* interference. C 图中箭头指蜕皮后若虫暴露出的背部; D - F 图中箭头指蜕。The arrow in Fig. C refers to the nymphal dorsal side after molting, while those in Figs. D - F refer to exuviae.

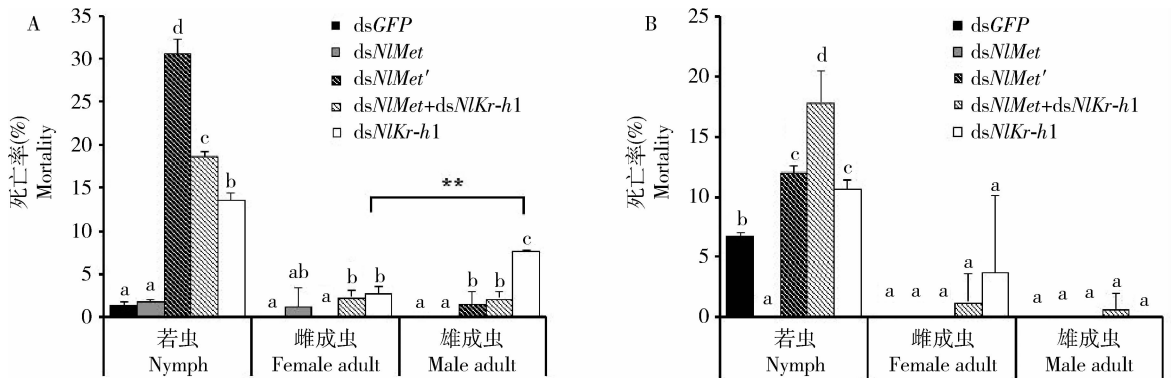


图4 RNA 干扰对褐飞虱存活的影响

Fig. 4 Effect of RNA interference on the survival of *Nilaparvata lugens*

A: 4 龄若虫时注射 dsRNA (Injecting dsRNA at the 4th instar nymphal stage); B: 5 龄若虫时注射 dsRNA (Injecting dsRNA at the 5th instar nymphal stage). ds*NlMet*: 注射 0.2 μg 双链 RNA (Injecting 0.2 μg *NlMet* dsRNA); ds*NlMet'*: 注射 0.4 μg *NlMet* 双链 RNA (Injecting 0.4 μg *NlMet* dsRNA). 柱上不同字母表示不同 dsRNA 处理间差异显著 (Duncan 氏新复极差法). Different letters above bars show significant difference between different dsRNA treatments (Duncan's multiple range test). 图 6 同 The same for Fig. 6.

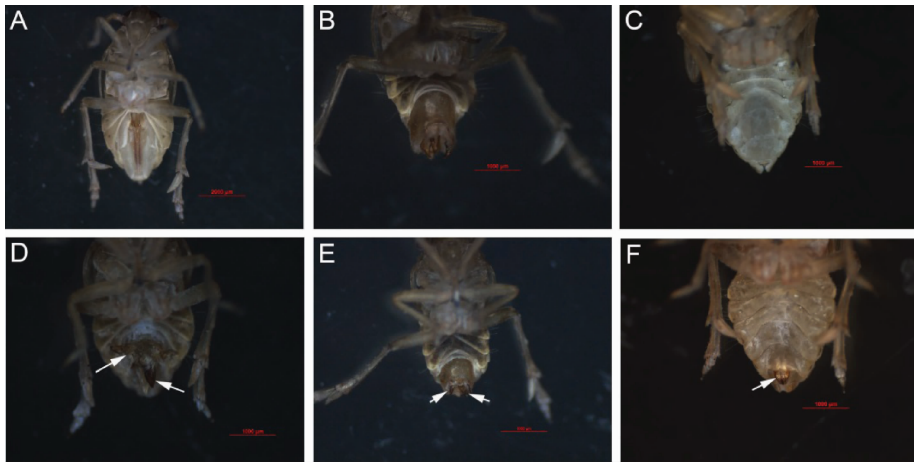
2.2.2 RNA 干扰对褐飞虱外生殖器的影响: 保幼激素在调控褐飞虱若虫生长发育和形态形成的过程中,推测它会影响到外生殖器的发育。在对 *NlMet* 和 *NlKr-h1* 沉默后观察发现,褐飞虱部分雌雄成虫和若虫生殖器出现了畸形(图 5)。以下为外生殖器畸形代表性图片,如在雌虫中,产卵器变短,第 1 载瓣片发育不正常(图 5: D);雄虫的阳基侧突则出现了不对称现象(图 5: E)。通常褐飞虱在若虫期不会出现生殖器的外露,然而沉默后的畸形个体生殖器过早出现(图 5: F)。我们发现,单独注射 0.2 μg ds*NlMet* 对 *NlMet* 基因沉默并不会引起干扰后成虫

生殖器畸形,当注射量增加至 0.4 μg 后依然没有观察到外生殖器畸形现象。然而对 4 龄若虫 *NlKr-h1* 基因沉默后,雌性外生殖器畸形比例显著上升($P < 0.05$),其畸形比例为 10.31% (表 3)。在 4 龄若虫期对 2 个基因共同沉默后,在若虫、雌性和雄性成虫中均出现了 3.05%、13.74% 和 8.4% 不等比例的外生殖器畸形个体(表 3),统计分析显示只有雌性和雄虫外生殖器畸形比例上升并达到了显著水平($P < 0.05$)(表 3,图 6)。对 5 龄若虫的 2 个基因共同沉默后,只有雌性个体生殖器畸形比例显著上升($P < 0.05$),其畸形比例为 15.38% (表 3,图 6)。

表 3 RNA 干扰对褐飞虱外生殖器的影响

Table 3 Effect of RNA interference on the external genitalia of *Nilaparvata lugens*

注射 dsRNA 时的若虫龄期 Nymphal instars when injecting dsRNA	dsRNA	试虫总数 Total of tested individuals	外生殖器畸形率 Abnormality rate of external genitalia (%)		
			若虫 Nymph	雌成虫 Female adult	雄成虫 Male adult
4 龄 4th instar	dsGFP	174	0	0	0
	dsNlMet	129	0	0	0
	dsNlMet'	30	0	0	0
	dsNlMet + dsNlKr-h1	131	3.05	13.74	8.40
	dsNlKr-h1	97	0	10.31	0
5 龄 5th instar	dsGFP	158	0	0	0
	dsNlMet	59	0	0	0
	dsNlMet'	62	0	0	0
	dsNlMet + dsNlKr-h1	52	0	15.38	0
	dsNlKr-h1	161	0	0	0

图 5 *Met/Kr-h1* 基因沉默后褐飞虱外生殖器的表型Fig. 5 Phenotype of external genitalia of *Nilaparvata lugens* after silence of *NlMet*

A - C: 分别为正常野生型雌成虫、雄成虫和若虫外生殖器 Normal external genitalia of female adults, male adults and nymphs, respectively; D - F: 分别为畸形雌成虫、雄成虫和若虫的畸形外生殖器 Deformed external genitalia of female adults, male adults and nymphs, respectively. D 图箭头指雌虫产卵器变短; E 图箭头指雄虫抱握器的阳基侧突不对称现象; F 图箭头所示为若虫提早形成类似外生殖器的结构。The arrows in Fig. D indicate short female ovipositor compared to the control (Fig. A), those in Fig. E indicate asymmetric male clasper paramere, and those in Fig. F indicate that the nymph have formed the structure similar to external genitalia.

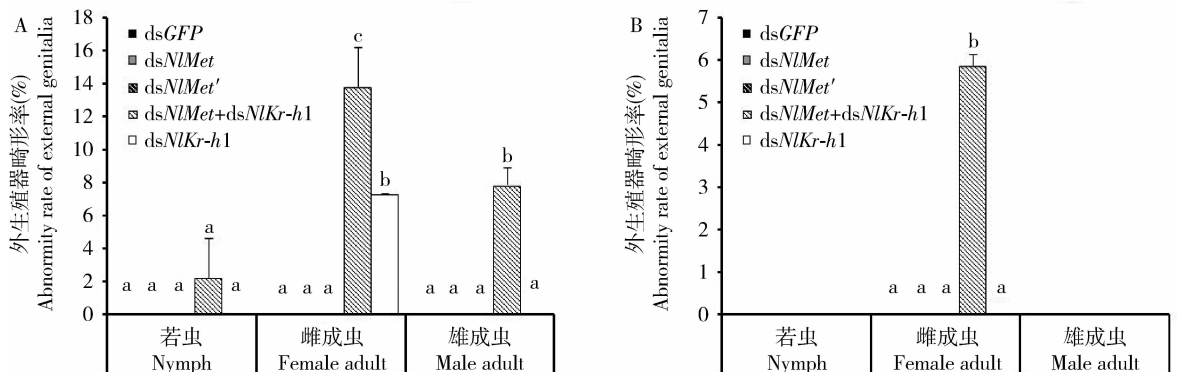


图 6 RNA 干扰对褐飞虱外生殖器的影响

Fig. 6 Effect of RNA interference on the external genitalia of *Nilaparvata lugens*

A: 4 龄若虫时注射 dsRNA (Injecting dsRNA at the 4th instar nymphal stage); B: 5 龄若虫时注射 dsRNA (Injecting dsRNA at the 5th instar nymphal stage).

3 讨论

在本研究中,我们从褐飞虱中成功克隆了 *NIMet* 基因。将该基因的氨基酸序列与果蝇、赤拟谷盗等物种的 *NIMet* 序列进行比对,发现它们存在相对保守区域。褐飞虱 *NIMet* 基因的编码蛋白也存在 4 个结构域,它们分别为 bHLH, PAS-A, PAS-B 和 PAC,这与先前的研究结果是相符的 (Konopova and Jindra, 2007)。

在保幼激素信号传导途径中,咽侧体分泌的保幼激素首先与受体蛋白 Met 结合形成受体复合物后,才能激活转录因子 *Kr-h1*,从而调控昆虫的生长发育。因此我们在研究 *NIMet* 功能时,选择对 *NIMet* 和 *NIKrh-1* 分别进行沉默,另将它们共同沉默,目的是为了更进一步探究保幼激素信号途径的阻断对褐飞虱的影响;在研究中发现单独沉默 *NIMet* 并没有引起褐飞虱外生殖器的畸形,单独沉默 *NIKrh-1* 也仅仅在小部分雌性个体中发现了外生殖器的畸形。然而将二者同时沉默后,在若虫以及雌雄成虫个体中,均发现高比例外生殖器畸形个体。以往有研究发现保幼激素在大锥蝽 *Panstrongylus megistus* 最后一次蜕皮过程中对于外生殖器的发育具有重要作用 (Oliveira Filho *et al.*, 1981)。因此推测 *NIKrh-1* 和 *NIMet* 作为保幼激素信号途径中的应答基因,它们的表达对褐飞虱外生殖器发育是极其重要的。由于 RNA 干扰并不能完全抑制其基因的表达,因此单独对 *NIMet* 或者是 *NIKrh-1* 的沉默后,产生畸形外生殖器比例的个体极少。同时干扰 *NIMet* 和 *NIKrh-1* 具有两方面的生物学效应。首先 *NIMet* 干扰会显著影响 *NIKrh-1* 表达,其次直接对 *NIKrh-1* 干扰会再一次影响 *NIKrh-1* 的表达量,最后对 *NIMet* 干扰也会引起保幼激素的信号传导出现障碍。因此同时干扰使得出现畸形外生殖器个体的比例大大增加。单独对 *NIKrh-1* 沉默后的畸形比例高于单独对 *NIMet* 的沉默,这可能是因为在保幼激素信号途径中 *NIKrh-1* 对于生殖器的形成作用较 *NIMet* 更为重要和关键。为了验证这个观点,我们对褐飞虱注射 0.4 μL ds*NIMet* 观察其死亡率和生殖器畸形,结果表明若虫死亡率显著上升 ($P < 0.05$),这说明 *NIMet* 干扰存在剂量效应,但它对生殖器的形成较 *NIKrh-1* 的确并不重要和关键。保幼激素对褐飞虱若虫起抑制变态的作用,*NIMet* 和 *NIKrh-1* 作为信号传导的一部分也发挥类似作用,因此在 4 龄幼虫期干扰 *NIMet* 和

NIKrh-1 能够导致早熟成虫和生殖器畸形比例的增加;有研究显示在家蚕中 5 龄幼虫后期保幼激素分泌下降,此时它发挥的功能也降低 (李志清, 2009)。因此推测褐飞虱可能也在 5 龄若虫期保幼激素滴度下降或缺失,*NIMet* 和 *NIKrh-1* 不能发挥其应有功能,此时干扰 *NIMet* 和 *NIKrh-1* 不会有在 4 龄若虫期干扰的表型明显,另外研究褐飞虱不同蜕皮状态与死亡率的关系时发现,越处在蜕皮早期死亡率越高;相反当进入蜕皮末期时 (图 3: F),褐飞虱由于其他部分已经完成了蜕皮,生长发育也相对完善,故死亡率最低。值得注意的是,在本研究中我们没有发现初羽化雌虫这一状态的褐飞虱死亡的现象,这也许是因为该类型褐飞虱尤其依赖保幼激素对其生长发育的调控,当对该信号途径进行干扰阻断后,其在若虫期就已经死亡。

我们的研究表明 *NIMet* 和 *NIKrh-1* 在保幼激素信号途径中至关重要。尤其对褐飞虱的正常生长发育和外生殖器的形成起到决定性作用,这也为研发一种新型的化学物质从而通过抑制褐飞虱的生殖来控制其种群数量提供了理论依据。因此,本研究不但对保幼激素信号途径做了进一步的探究,还为利用保幼激素类似物进行褐飞虱生物防治提供了新思路。

参考文献 (References)

- Bertuso AG, Morooka S, Tojo S, 2002. Sensitive periods for wing development and precocious metamorphosis after precocene treatment of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *J. Insect Physiol.*, 48 (2): 221–229.
- Ding JH, Hu CL, Fu Q, He JC, Xie MC, 2012. A Colour Atlas of Commonly Encountered Delphacids in China Rice Regions. Zhejiang Science and Technology Press, Beijing. 16–17. [丁锦华, 胡春林, 傅强, 何佳春, 谢茂成, 2012. 中国稻区常见飞虱原色图鉴. 北京: 浙江科学技术出版社. 16–17]
- Gilbert LI, Granger NA, Roe RM, 2000. The juvenile hormones: historical facts and speculations on future research directions. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 30: 617–644.
- Jin MN, Xue J, Yao Y, Lin XD, 2014. Molecular characterization and functional analysis of *Krüppel-homolog 1* (*Kr-h1*) in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål). *J. Integr. Agric.*, 13(9): 1972–1981.
- Jindra M, Palli SR, Riddiford LM, 2013. The juvenile hormone signaling pathway in insect development. *Annu. Rev. Entomol.*, 58: 181–204.
- Kewley RJ, Whitelaw ML, Chapman-Smith A, 2004. The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 36(2): 189–204.

- Konopova B, Jindra M, 2007. Juvenile hormone resistance gene *Methoprene-tolerant* controls entry into metamorphosis in the beetle *Tribolium castaneum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104 (25): 10488 – 10493.
- Kristensen NP, 1999. Phylogeny of endopterygote insects, the most successful lineage of living organisms. *Eur. J. Entomol.*, 96: 237 – 254.
- Li ZQ, 2009. Identification, Cloning and Functional Analysis of *BmMet*, a *Methoprene-tolerant* Gene in the Silkworm, *Bombyx mori*. MSc Thesis, Southwest University, Chongqing. [李志清, 2009. 家蚕 *BmMet* 基因的鉴定、克隆及功能分析. 重庆: 西南大学硕士学位论文]
- 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.
- Minakuchi C, Namiki T, Shinoda T, 2009. *Krüppel* homolog 1, an early juvenile hormone response gene downstream of *Methoprene-tolerant*, mediates its anti-metamorphic action in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Dev. Biol.*, 325: 341 – 350.
- Minakuchi C, Tanaka M, Miura K, Tanaka T, 2011. Developmental profile and hormonal regulation of the transcription factors *broad* and *Krüppel* homolog 1 in hemimetabolous thrips. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 41(2): 125 – 134.
- Minakuchi C, Zhou X, Riddiford LM, 2008. *Krüppel* homolog 1 (*Kr-h1*) mediates juvenile hormone action during metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. *Mechanisms of Development*, 125(1): 91 – 105.
- Miura K, Oda M, Makita S, Chinzei Y, 2005. Characterization of the *Drosophila Methoprene-tolerant* gene product. Juvenile hormone binding and ligand-dependent gene regulation. *FEBS J.*, 272: 1169 – 1178.
- Nijhout HF, 1994. *Insect Hormones*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey. 267 pp.
- Oliveira Filho AM, Pinchin R, Jurberg J, Rangel EF, 1981. Alterations in the morphology of the external genitalia of *Panstrongylus megistus* (Burm, 1835), caused by treatment with a juvenile hormone analogue (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Revista Brasileira de Biologia*, 41(1–2): 41 – 49.
- Riddiford LM, 2012. How does juvenile hormone control insect metamorphosis and reproduction. *General and Comparative Endocrinology*, 179(3): 477 – 484.
- Schuh R, Aicher W, Gaul U, Côte S, Preiss A, Maier D, Seifert E, Nauber U, Schröder C, Kemler R, Jäckle H, 1986. A conserved family of nuclear proteins containing structural elements of the finger protein encoded by *Krüppel*, a *Drosophila* segmentation gene. *Cell*, 47(6): 1025 – 1032.
- Slama K, 1971. Insect juvenile hormone analogues. *Annual Review of Biochemistry*, 40(1): 1079 – 1102.
- Smykal V, Bajgar A, Provaznik J, Fexova S, Buricova M, Takaki K, Hodkova M, Jindra M, Dolezel D, 2014. Juvenile hormone signaling during reproduction and development of the linden bug, *Pyrrhocoris apterus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 45: 69 – 76.
- Wilson TG, Fabian J, 1986. A *Drosophila melanogaster* mutant resistant to a chemical analog of juvenile hormone. *Dev. Biol.*, 118: 190 – 201.

(责任编辑: 袁德成)