



白背飞虱海藻糖合成酶基因的表达特性 及其在糖代谢调控中的作用

张道伟¹, 邱玲玉², 康奎¹, 余亚娅³, 曾伯平¹, 陈静³, 唐斌^{1,2,*}

(1. 遵义师范学院生物与农业科技学院, 贵州遵义, 563006; 2. 杭州师范大学生命与环境科学学院, 杭州 310036;
3. 遵义医科大学基础医学院, 贵州遵义 563006)

摘要:【目的】昆虫中海藻糖主要通过海藻糖合成酶(trehalose-6-phosphate synthase, TPS)在脂肪体中合成,当昆虫受极端环境胁迫时 TPS 能够诱导海藻糖累积从而起到保护作用。本研究旨在分析白背飞虱 *Sogatella furcifera* 两个 TPS 基因的发育和组织表达模式及其对糖类物质代谢调控功能,探究 TPS 基因在白背飞虱生长发育中的具体作用。【方法】基于实验室前期获得的两个海藻糖合成酶基因 *SfTPS1* 和 *SfTPS2* 片段序列,在本实验中也进行了基因克隆和测序筛选,比对两者确定了白背飞虱两个 TPS 基因序列。并通过 MEGA 7.0 软件构建基于氨基酸序列的白背飞虱与其他昆虫 TPS 的系统发育树。利用 qRT-PCR 技术检测这两个基因在白背飞虱不同发育阶段(4 龄第 1 天若虫至 3 日龄成虫)和成虫不同组织(头、足、翅、中肠、脂肪体、表皮和马氏管)中的表达情况。合成这两个基因的 dsRNA,并注射到白背飞虱 5 龄第 1 天若虫中进行 RNAi。在 RNAi 48 和 72 h 后检测白背飞虱海藻糖酶基因 *TRE1-1*, *TRE1-2* 和 *TRE2* 的表达变化,海藻糖、葡萄糖和总糖原含量以及海藻糖酶活性。【结果】克隆获得白背飞虱 *SfTPS1* 和 *SfTPS2*, ORF 分别为 2 424 和 2 115 bp, 编码氨基酸数目分别为 807 个和 704 个,预测蛋白质分子量分别为 90.37 和 80.56 kD,等电点分别为 6.08 和 6.10。而且白背飞虱 2 个 TPS 氨基酸序列与褐飞虱 *Nilaparvata lugens* TPS1 和 TPS2 的一致性最高。发育阶段表达模式表明,白背飞虱 TPS 基因 *SfTPS1* 和 *SfTPS2* 在 4 龄若虫到成虫阶段都有表达;组织表达模式表明,*SfTPS1* 和 *SfTPS2* 在成虫马氏管、中肠和表皮中的表达较为显著。当 *SfTPS1* 被 RNAi 后,*TRE1-1* 和 *TRE2* 的表达水平与对照组(dsGFP 注射组)相比分别为略有上升和显著升高,*TRE1-2* 的相对表达水平在 *SfTPS1* 被 RNAi 48 h 后显著上升而在 72 h 后显著下降;可溶性海藻糖酶活性无显著变化,膜结合型海藻糖酶活性显著增加;白背飞虱 5 龄若虫体内海藻糖、葡萄糖和总糖原含量显著上升。*TRE1-2* 和 *TRE2* 基因的表达水平在 *SfTPS2* 被 RNAi 48 h 后显著升高,而在 72 h 后两基因的表达水平却显著下降;*TRE1-1* 基因的表达水平在注射 ds*SfTPS2* 48 和 72 h 后均显著上升。可溶性海藻糖酶活性在 *SfTPS2* 被 RNAi 48 h 后显著下降,72 h 后显著上升;膜结合型海藻糖酶活性在 *SfTPS2* 被 RNAi 72 h 后显著增加。白背飞虱 5 龄若虫体内葡萄糖含量在 *SfTPS2* 基因 RNAi 48 h 后显著减少,但在 72 h 后海藻糖、葡萄糖和总糖原含量显著上升。【结论】通过调节白背飞虱体内 TPS 基因的表达影响 *TRE1-1*, *TRE1-2* 及 *TRE2* 基因的表达水平,进而调控体内海藻糖的含量,该结果为后期采用 TPS 为靶标基因用于害虫防治提供理论依据。

关键词: 白背飞虱; 海藻糖合成酶; 海藻糖代谢; RNA 干扰; qRT-PCR

中图分类号: Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2019)10-1117-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(31672081); 贵州省科学技术基金(黔科合 JZ 字[2014]2014 号)

作者简介: 张道伟, 男, 1981 年生, 河南南阳人, 博士, 教授, 研究方向为昆虫分子生物学及害虫生物防治, E-mail: zhangdw1000@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: thzm611@163.com

收稿日期 Received: 2019-05-15; 接受日期 Accepted: 2019-06-26

Expression characteristics of trehalose-6-phosphate synthase genes and their roles in the regulation of carbohydrate metabolism in *Sogatella furcifera* (Hemiptera: Delphacidae)

ZHANG Dao-Wei¹, QIU Ling-Yu², KANG Kui¹, YU Ya-Ya³, ZENG Bo-Ping¹, CHEN Jing³, TANG Bin^{1,2,*} (1. College of Biology and Agriculture, Zunyi Normal University, Zunyi, Guizhou 563006, China; 2. College of Life and Environmental Science, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, China; 3. College of Basic Medical Science, Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou 563006, China)

Abstract: [Aim] Trehalose in insects is mainly synthesized in the fat body by trehalose-6-phosphate synthase (TPS), which can induce trehalose accumulation and thus plays a protective role when insects are under extreme environmental stress. This study aims to analyze the developmental and tissue expression patterns of two *TPS* genes in *Sogatella furcifera*, and their roles in the regulation of carbohydrate metabolism, so as to explore the specific roles of *TPS* genes in the growth and development of *S. furcifera*. [Methods] Based on the partial sequences of two trehalose synthase genes, *SfTPS1* and *SfTPS2*, obtained in the early stage of the laboratory, gene cloning and sequencing were also carried out in this experiment. The two *TPS* gene sequences of the *S. furcifera* were determined by comparison. The phylogenetic tree based on the amino acid sequences of *SfTPS* and *TPS* proteins from other insect species was constructed by MEGA 7.0 software. The expression profiles of these two *TPS* genes in different developmental stages (from the day 1 4th instar nymph to 3 day-old adult), and different adult tissues (head, leg, wing, midgut, fat body, epidermis and Malpighian tubules) of *S. furcifera* were detected by qRT-PCR. The double-stranded RNA (dsRNA) of the two genes were synthesized and injected into the day 1 5th instar nymphs of *S. furcifera* for the RNAi. At 48 and 72 h after RNAi, the changes in expression levels of trehalase genes *TRE1-1*, *TRE1-2* and *TRE2*, the contents of trehalose, glucose and total glycogen, and the trehalase activity were determined. [Results] The ORFs of *SfTPS1* and *SfTPS2* are 2 424 and 2 115 bp in length, respectively, and the numbers of encoded amino acids are 807 and 704, respectively. The predicted protein molecular weights are 90.37 and 80.56 kD, respectively, and the isoelectric points are 6.08 and 6.10, respectively. Moreover, the two *TPS* amino acid sequences of *S. furcifera* show the highest identities with *Nilaparvata lugens* *TPS1* and *TPS2*. Developmental expression profiles revealed that *SfTPS1* and *SfTPS2* were expressed from the 4th instar nymphal stage to the adult stage, and tissue expression profiles revealed that the two genes showed significantly higher expression levels in Malpighian tubules, midgut and epidermis of *S. furcifera* adults. After RNAi of *SfTPS1*, the expression levels of *TRE1-1* and *TRE2* in the RNAi group increased slightly and significantly, respectively, as compared with those of the control group (ds*GFP* injection group), and the relative expression level of *TRE1-2* increased significantly at 48 h and decreased significantly at 72 h after RNAi. The soluble trehalase activity did not change significantly, and the membrane-bound trehalase activity increased significantly, while the contents of trehalose, glucose and total glycogen in the 5th instar nymphs of *S. furcifera* increased significantly. After RNAi of *SfTPS2*, the expression levels of *TRE1-2* and *TRE2* in the RNAi group increased significantly at 48 h, while declined significantly at 72 h. And the expression level of *TRE1-1* increased significantly at 48 and 72 h as compared to those of the control group. The soluble trehalase activity decreased significantly at 48 h and increased significantly at 72 h as compared to those of the control group after RNAi. The membrane-bound trehalase activity increased significantly at 72 h after RNAi of *SfTPS2*. In addition, the glucose content reduced significantly at 48 h after RNAi of *SfTPS2*, but the contents of trehalose, glucose and total glycogen in the 5th instar nymphs of *S. furcifera* increased significantly at 72 h after RNAi. [Conclusion] The expression

levels of *TRE1-1*, *TRE1-2* and *TRE2* are affected and thus the trehalose content is regulated by regulating the expression of *TPS* genes *in vivo* in *S. furcifera*. The results provide a theoretical basis for later application of *TPS* as the target gene for pest control.

Key words: *Sogatella furcifera*; trehalose-6-phosphate synthase; trehalose metabolism; RNA interference; qRT-PCR

海藻糖是一种非还原性二糖,广泛存在于自然界中,其包含3种化学异构体[(α , α), (β , β) 和 (α , β)]。目前,至少在不同生物体中发现5种不同的海藻糖合成途径(Avonce *et al.*, 2006),而在昆虫中,海藻糖则主要通过TPS/TPP合成途径,即由海藻糖合成酶(trehalose-6-phosphate synthase, TPS)和海藻糖磷酸化酶(trehalose-6-phosphate phosphatase, TPP)共同完成(Shukla *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2017)。1832年,Wigger从黑麦的麦角病菌的抽提液中初次发现海藻糖,随后,在各种各样的生物中被发现,特别是在昆虫和其他无脊椎动物中(Richards *et al.*, 2002; Chen and Haddad, 2004)。尽管海藻糖酶在小肠、消化系统和其他各种器官中都有报道,但海藻糖合成途径在高等动物(哺乳动物)或脊椎动物中尚未发现(Asano, 2003; 于彩虹等, 2008)。昆虫的海藻糖在昆虫的能量代谢、应激等活动中起着关键的作用,研究发现昆虫血淋巴中糖类的主要成分是海藻糖,海藻糖性质稳定,还能对生物体或生物大分子起着良好的非特异性保护作用(吴世雄, 2016)。当细胞在极端或者不良环境时细胞内会合成大量的海藻糖,当胁迫去除后,海藻糖就会被分解消耗(Tabata *et al.*, 2018),可帮助多种生命体抵抗极端的或是不良的环境压力而长久生存(Tetreau *et al.*, 2015; Sajid *et al.*, 2018),从而保护生命体原有的形态结构;海藻糖是昆虫的关键抗逆物质,也是昆虫生长与发育的重要能量来源(Shi *et al.*, 2016),在早期便有实验发现海藻糖可以经海藻糖酶水解产生葡萄糖,用于提供能量(Arguelles, 2000)。海藻糖酶(trehalase, TRE)以两种形式存在于昆虫体内:第1种是可溶性海藻糖酶(TRE1),其分解昆虫细胞内存在的海藻糖;第2种是膜结合型海藻糖酶(TRE2),它的主要作用是将食物中的海藻糖进行水解,从而使得肌肉和中肠的运动行为有充足的能量供应(Mitsumasu *et al.*, 2005)。已有研究证实,在昆虫飞行和能量需求活动中海藻糖作为能量来源,满足昆虫飞行时肌肉和其他组织的需要,并不断在脂肪体内合成(Tang *et al.*, 2008; Kern *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2014; Shukla *et al.*, 2015)。

目前,已经克隆到超过40种昆虫的海藻糖合成酶基因,如黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*、家蚕 *Bombyx mori*、甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*、东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis* 等昆虫(Tang *et al.*, 2010; 张道伟等, 2012; 陈静和张道伟, 2015; Xiong *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2018)。另有研究表明,通过RNAi技术干扰褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 及甜菜夜蛾体内的TPS基因,导致褐飞虱若虫及甜菜夜蛾幼虫出现较高的死亡率(Chen *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2010)。昆虫体内的TPS和TPP与酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 和大肠杆菌 *Escherichia coli* 海藻糖合成途径中的OtsA和OtsB相对应,其蛋白序列均有较高的保守性(唐斌等, 2014, 2018)。在果蝇中克隆得到了第一个昆虫TPS基因(Chen *et al.*, 2002; Chen and Haddad, 2004),并且研究发现诱导TPS1基因的表达可提高果蝇对缺氧的耐受性(Chen *et al.*, 2002),这说明TPS在海藻糖合成以及昆虫的发育过程中都起着关键性作用,但是其发挥的具体功能或者说在通路的调控机制并不明确,有待进一步研究。

本研究首先检测海藻糖合成酶基因在白背飞虱 *Sogatella furcifera* 不同发育阶段和组织中的表达情况,再进一步采用成熟的RNA干扰技术,研究TPS基因在白背飞虱糖代谢过程中行使的功能,有助于为TPS基因是否具备作为害虫控制的靶标的潜力提供评估依据,为白背飞虱等水稻害虫的生物农药的开发提供新思路。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

供试白背飞虱 *S. furcifera* 源自中国水稻研究所,饲养于遵义师范学院及杭州师范大学的人工气候室中,饲养温度为 $26 \pm 1^\circ\text{C}$,相对湿度为 $70\% \pm 5\%$,光周期为 16L:8D。白背飞虱饲养在TN1水稻上,分别收集4龄第1-3天、5龄第1-3天、1-3日龄成虫以及羽化后7d内成虫的头、足、翅、中肠、脂肪

体、表皮和马氏管 7 种不同组织用于实验。每组实验均设置 3 个生物学重复。

1.2 总 RNA 抽提及 cDNA 合成

采用 Trizol 法抽提 1.1 节收集的样品进行总 RNA 抽提,具体实验方法参考 Transzol Up Plus RNA Kit 说明书。

根据试剂盒说明书合成 cDNA 第 1 链。取模板总 RNA (50 ng ~ 5 μ g), 1 μ L Anchored Olig(dT)₁₈ Primer (10.5 μ g/ μ L) 于 0.2 mL 的离心管中, RNA-free Water 补齐 10 μ L, 混匀, 在 65 $^{\circ}$ C 水浴 5 min; 将离心管取出, 冰上放置 2 min; 再加入 1 μ L gDNA Remover, 10 μ L 2 \times ES Reaction Mix, 1 μ L EasyScript[®] RT/RI Enzyme Mix, 混匀, 42 $^{\circ}$ C 水浴 15 min, 85 $^{\circ}$ C 热激 5 s, -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.3 白背飞虱 TPS 基因序列克隆和进化分析

从白背飞虱转录组测序结果中找到 TPS 基因序列, 筛选得到 *SfTPS1* 和 *SfTPS2* 的片段序列, 从两

端设计引物(表 1), 以步骤 1.2 节合成的白背飞虱若虫 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 反应体系: 10 \times Ex Taq Buffer 2.5 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 2.0 μ L, 上下游引物 (10 pmol/L) 各 1.0 μ L, Ex Taq 0.2 μ L, 模板 cDNA 1.0 μ L, 并用无菌水补足至 25 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 40 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。利用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 回收带有可能正确条带的凝胶, 连接至 pMD-19T 克隆载体, 转化入大肠杆菌, 涂布, 挑选菌落进行 PCR 鉴定, 将可能正确的菌落送至公司测序, 将测序结果与转录组数据库中鉴定出的 TPS 基因片段进行序列比对, 确定所得转录组序列无误后用于后续分析实验。基于正确的转录组数据, 将白背飞虱 TPS 氨基酸序列在 GenBank 中进行 Blast 比对, 选出同源性较高的序列, 用 MEGA 7.0 构建系统进化树。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物 Primer	上游引物(5'-3') Forward primer	下游引物(5'-3') Reverse primer	产物长度(bp) Product length	用途 Purpose
SfTPS1	ATGATTGATAATCCTGACACTG	TTATCGTTTGGTATCTGACGG	2 424	cDNA 全长克隆
SfTPS2	ATGCCTGACAGAGCAGTGTTTC	CTAATATTTAGCCATAACTGG	2 115	Cloning of full-length cDNA
dsSfTPS1	CCCCTTGTGCTGAGAAATA	CAAGGTGGGAATGGAATG	473	RNAi
dsSfTPS1-T7	T7-CCCCTTGTGCTGAGAAATA	T7-CAAGGTGGGAATGGAATG	523	
dsSfTPS2	CGCATAGACCGCAACAAC	TCGCAACGGAGTAACCAG	459	
dsSfTPS2-T7	T7-CGCATAGACCGCAACAAC	T7-TCGCAACGGAGTAACCAG	509	
dsGFP	AAGGGCGAGGAGCTGTTACCCG	CAGCAGGACCATGTGATCGCGC	688	qRT-PCR
dsGFP-T7	T7-AAGGGCGAGGAGCTGTTACCCG	T7-CAGCAGGACCATGTGATCGCGC	738	
Q-SfTPS1	CCGATTGCTACATCTACG	GACAAACTCTTTCGCCACTAA	123	
Q-SfTPS2	GATGCTGAGGGCAAAGAC	TGTGGAAGCCGACAAAGT	226	
Q-SfTRE1-1	CTGAGAACTCCCAACATAACA	AAATCATCAACGGGCACA	184	qRT-PCR
Q-SfTRE1-2	GGCAGCAATGACTTTGTC	GCCGTACTGTAGACCGTGT	112	
Q-SfTRE2	TCTTCCACCAACTGTCA	CAGTCTTGAGGCTCGTAGTC	258	
Q-18S rRNA	GCCCCGTAATCGGAATGAGT	GACAAGACGTCCCGCAAAAC	205	

T7 序列 T7 sequence: GGATCCTAATACGACTCACTATAGG.

1.4 qRT-PCR 检测白背飞虱 TPS 基因表达

利用 SYBR PrimeScript[™] RT Master Mix 试剂盒 (TaKaRa) 对 TPS 基因在白背飞虱不同发育阶段和不同组织中的表达进行 qRT-PCR 检测, 以 18S rRNA 作为内参基因, 引物序列见表 1。反应体系 (20 μ L): SYBR Green I 10 μ L, 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L, 1.2 节合成的 cDNA 模板 2 μ L, ddH₂O 6 μ L。PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 延伸 20 s, 40 个循环; 熔解曲线,

95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min; 40 $^{\circ}$ C 30 s, 每次反应后绘制溶解曲线, 保证无非特异性扩增。各样品进行 3 次技术重复测定。

1.5 RNA 干扰白背飞虱 TPS 基因

1.5.1 dsRNA 的合成与注射: 以 1.3 节克隆测序结果正确的序列的质粒 DNA 为模板, 根据 T7 Ribomax[™] Express RNAi System 试剂盒的说明书合成目标基因和 GFP 基因(对照)的双链 RNA。利用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测 dsRNA 的完整性, 并

通过微量核酸蛋白浓度测定仪(NanoDrop 2000)测定合成浓度, dsRNA 存于 -80°C 备用。以 5 龄第 1 天若虫为试验用虫, 采用 Oil-type Microinjector IM-31 型显微注射仪(NARISHIGE 公司, 日本)于足基节和后足节之间的胸部注射 dsRNA, 注射量均约为 50 ng/头 dsRNA(dsGFP, dsSfTPS1 和 dsSfTPS2), 于注射后 48 和 72 h 取样, 每个注射组设 3 个生物学重复。样品用液氮速冻后存于 -80°C 冰箱备用。

1.5.2 白背飞虱海藻糖酶基因表达量检测:以注射处理后的 5 龄第 1 天若虫为实验对象, 进行 qRT-PCR 检测 *TRE1-1*, *TRE1-2* 及 *TRE2* 基因的表达量, 实验方法同 1.4 节, 引物信息见表 1。

1.5.3 蛋白质浓度测定:取 1.5.1 节显微注射获得的白背飞虱加入 PBS 充分研磨至小颗粒后, 进行超声破碎。 4°C $3\ 000\text{ g}$ 离心 20 min, 取 $350\ \mu\text{L}$ 上清 4°C $20\ 800\text{ g}$ 超离心 60 min, 超离心沉淀用 $300\ \mu\text{L}$ PBS 悬浮。超离心上清、超离心沉淀 PBS 悬浮液都需要检测蛋白浓度。实验用浓度为 5 mg/mL 的蛋白标准品稀释相应倍数用于绘制标准曲线, 依据 BCA 蛋白定量试剂盒说明书进行蛋白质浓度测定。测定的总蛋白浓度用于海藻糖、葡萄糖、总糖原含量及海藻糖酶活性的计算。

1.5.4 海藻糖酶活性测定:取 1.5.1 节显微注射获得的白背飞虱加入 PBS 充分研磨至小颗粒后, 进行超声破碎。 4°C $3\ 000\text{ g}$ 离心 20 min, 取 $350\ \mu\text{L}$ 上清 4°C $20\ 800\text{ g}$ 超离心 60 min, 分别取超离心上清(或沉淀 PBS 悬浮液)、 40 mmol/L 海藻糖溶液、PBS 以 4:5:11 的比例(v/v)混匀, 37°C 水浴 1 h 后迅速沸水浴 5 min; 随后用 1 mg/mL 的葡萄糖标准液梯度稀释制备标准曲线; 取 $50\ \mu\text{L}$ 水浴后获得的上清液和 2 倍体积的葡萄糖分析试剂混匀, 37°C 温育 30 min, 2 N 硫酸停止反应后在 540 nm 处检测吸光度(Yang *et al.*, 2017)。其中, 超离心上清液用于测定可溶性海藻糖酶活性, 超离心剩余沉淀的悬浮液用于测定膜结合型海藻糖酶活性, 测定方法相同。

1.5.5 海藻糖含量测定:利用蒽酮法(Tang *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017), 将 40 mmol/L 的海藻糖溶液进行梯度稀释以制作标准曲线; 取 1.5.1 节显微注射获得的白背飞虱加入 PBS 充分研磨至小颗粒后, 进行超声破碎。 4°C $3\ 000\text{ g}$ 离心 20 min, 取 $10\ \mu\text{L}$ 上清液样品或标准液与等体积 1% 硫酸混合, 90°C 水浴 10 min, 冰浴 3 min; 再加 $10\ \mu\text{L}$ 30% 氢氧化钾溶液, 90°C 水浴 10 min, 冰浴 3 min; 随后向 EP 管中加入 $200\ \mu\text{L}$ 显影剂, 90°C 水浴

反应 10 min, 冰上冷却, 检测 630 nm 处吸光度。

1.5.6 葡萄糖含量和总糖原含量测定(Zhang *et al.*, 2017):取 1.5.1 节显微注射获得的白背飞虱加入 PBS 充分研磨至小颗粒后, 进行超声破碎。 4°C $3\ 000\text{ g}$ 离心 20 min, 取 $100\ \mu\text{L}$ 上清液样品和 $20\ \mu\text{L}$ 0.1 U/L 淀粉转葡萄糖苷酶混匀后水浴(40°C) 4 h; 将 1 mg/mL 的葡萄糖标准液梯度稀释后加入 96 孔板的标准品孔中, 再加入 $50\ \mu\text{L}$ 水浴后获得的样品; 最后取 2 倍葡萄糖分析试剂, 37°C 孵育 30 min; 用 2 N 硫酸终止反应后检测 540 nm 处吸光度, 分别获得葡萄糖含量和总糖原含量。

1.6 数据分析

实验材料每组样品有 3 个生物重复, 且每个样品同时进行 3 个技术重复, 因此共包含 9 个重复; 依据 qRT-PCR 检测结果应用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法(Livak and Schmittgen, 2001)计算基因相对表达量。运用 IBM SPSS Statistics 20 软件进行差异性分析, 基因相对表达量采用单因素方差分析, 并进行 Turkey 氏显著性检验, 最后利用 SigmaPlot 10.0 软件和 Excel 绘制图表。

2 结果

2.1 白背飞虱 TPS 氨基酸序列的进化分析

克隆获得白背飞虱 *SfTPS1* 和 *SfTPS2*, ORF 分别为 2 424 和 2 115 bp, 编码氨基酸数目分别为 807 和 704 个, 预测蛋白质分子量分别为 90.37 和 80.56 kD, 等电点分别为 6.08 和 6.10。进化分析结果显示(图 1), 白背飞虱 *SfTPS1* 氨基酸序列与褐飞虱 *TPS1* 的一致性最高(96.03%), 其次是与豌豆长管蚜 *Acyrtosiphon pisum* *TPS1* (81.18%) 和烟粉虱 *Bemisia tabaci* *TPS1* (77.96%)。白背飞虱 *SfTPS2* 氨基酸序列与褐飞虱 *TPS2* 序列一致性最高(98.04%), 其次是与茶翅蜡 *Halyomorpha halys* *TPS2* (81.90%) 和温带臭虫 *Cimex lectularius* *TPS2* (81.05%)。这反映了 TPS 蛋白序列在几种昆虫间亲缘性关系的远近。

2.2 *SfTPS1* 和 *SfTPS2* 基因在白背飞虱不同发育阶段的表达

qRT-PCR 结果显示, *SfTPS1* 和 *SfTPS2* 基因在白背飞虱 4 龄若虫阶段及成虫阶段的表达模式相似, 相对表达量先升后降, 在 4 龄第 2 天若虫和 2 日龄成虫中的表达量相对较高(图 2)。其中 *SfTPS1* 基因在 4 龄第 2 天若虫和 2 日龄成虫中表达量最

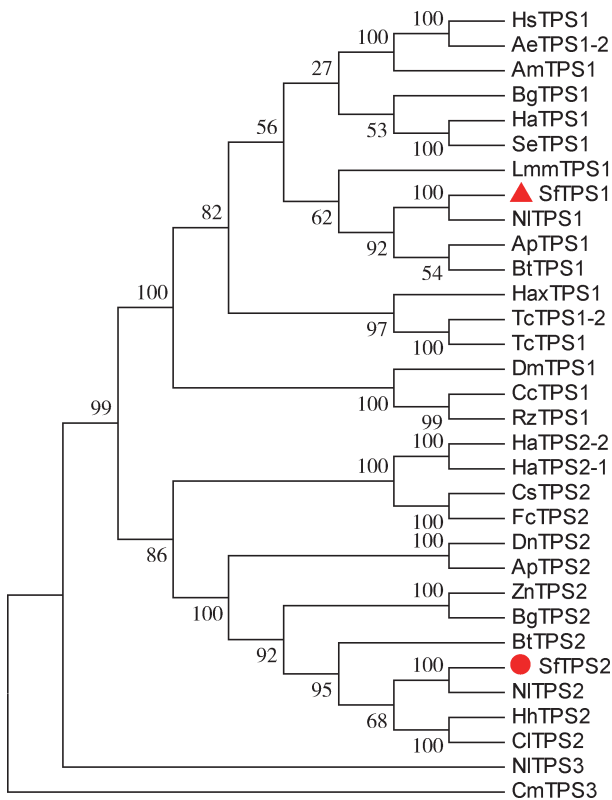


图1 基于氨基酸序列构建的白背飞虱 *SftPS1* 与其他昆虫 TPS 的系统发育树 (邻接法, 1 000 次重复)

Fig. 1 Phylogenetic tree of *SftPS1* of *Sogatella furcifera* and TPS proteins from other insect species based on the amino acid sequence (neighbor-joining method, 1 000 replicates)

TPS 蛋白来源物种及其 GenBank 登录号 Source species of TPS proteins and their GenBank accession numbers: AeTPS1-2: 切叶蚁 *Acromyrmex echinator*, EGI63676; AmTPS1: 西方蜜蜂 *Apis mellifera*, XM 003249185; ApTPS1: 豌豆长管蚜 *Acyrtosiphon pisum*, XM001945488; ApTPS2: 豌豆长管蚜 *A. pisum*, XM001943581; BgTPS1: 德国小蠊 *Blattella germanica*, KR052014; BgTPS2: 德国小蠊 *B. germanica*, KR052013; BtTPS1: 烟粉虱 *Bemisia tabaci*, XM019060419; BtTPS2: 烟粉虱 *B. tabaci*, XM019042711; CcTPS1: 地中海实蝇 *Ceratitis capitata*, XM004536149; CITPS2: 温带臭虫 *Cimex lectularius*, XM_014406509; CmTPS3: 摇蚊 *Clunio marinus*, CRK87178; CsTPS2: 蓝蟹 *Callinectes sapidus*, EU679406; DmTPS1: 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*, NM134983; DnTPS1: 俄罗斯斯麦蚜 *Diuraphis noxia*, XM015509558; FcTPS2: 中国对虾 *Fenneropenaeus chinensis*, EU555435; HaTPS1: 棉铃虫 *Helicoverpa armigera*, XM021345571; HaxTPS1: 异色瓢虫 *Harmonia axyridis*, FJ501960; HaTPS2-1: 端足虫 *Hyalella azteca*, XM018152306; HaTPS2-2: 端足虫 *H. azteca*, XM018152305; HhTPS2: 茶翅蝽 *Halyomorpha halys*, XM014424102; HsTPS1: 印度跳蚁 *Harpegnathos saltator*, XM011140877; LmmTPS1: 东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis*, EU131894; NITPS1: 褐飞虱 *Nilaparvata lugens*, GQ397450; NITPS2: 褐飞虱 *N. lugens*, KU556826; NITPS3: 褐飞虱 *N. lugens*, KU556827; RzTPS1: *Rhagoletis zephyria*, XM017623324; SeTPS1: 甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*, EF051258; SftPS1: 白背飞虱 *S. furcifera*, JQ743627; SftPS2: 白背飞虱 *S. furcifera*, MN179278; TcTPS1: 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*, XM970683; TcTPS1-2: 赤拟谷盗 *T. castaneum*, EFA02222; ZnTPS2: 内华达古白蚁 *Zootermopsis nevadensis*, KDR19655.

高,而在 4 龄第 3 天若虫和 3 日龄成虫中表达量最低(图 2: A)。*SftPS2* 基因则在 5 龄第 3 天若虫中表达量最高,而在 4 龄第 3 天若虫中几乎无表达(图 2: B)。

2.3 *SftPS1* 和 *SftPS2* 基因在白背飞虱成虫不同组织中的表达

检测发现 *SftPS1* 和 *SftPS2* 主要在羽化后 7 d 内成虫的中肠、表皮和马氏管中表达。*SftPS1* 基因在马氏管中的相对表达量最高,其次是在中肠中,在脂肪体和表皮中的相对表达水平较低,在头、足、翅中的相对表达量最低(图 3: A)。而 *SftPS2* 基因在组织中的表达模式与 *SftPS1* 有所不同,其在表皮中的表达量最高,其次是在中肠中,在其余组织中的表达水平均较低,尤其是在翅中几乎不表达(图 3: B)。

2.4 *SftPS1* 和 *SftPS2* 被 RNAi 后白背飞虱 5 龄若虫海藻糖酶基因 mRNA 水平表达变化

实验结果发现,与注射 dsGFP 的对照组相比,干扰 *SftPS1* 基因 48 h 后,白背飞虱 *TRE1-2* 和 *TRE2* 基因的相对表达水平显著上调($P < 0.05$) (图 4: B, C),而 *TRE1-1* 基因的相对表达水平无显著变化($P > 0.05$) (图 4: A);干扰 *SftPS1* 基因 72 h 后,*TRE2* 基因的表达水平仍为显著上调($P < 0.05$) (图 4: C),*TRE1-1* 基因与对照组相比略为上升但无显著差异($P > 0.05$) (图 4: A),而 *TRE1-2* 基因的相对表达水平与对照组相比显著下调($P < 0.05$) (图 4: B)。干扰 *SftPS2* 基因 48 h 后,白背飞虱 *TRE1-1*, *TRE1-2* 及 *TRE2* 基因的相对表达量变化情况一致,与对照组相比显著上升($P < 0.05$) (图 4);72 h 后 *TRE1-2* 和 *TRE2* 基因的相对表达量显著下降($P < 0.05$) (图 4: B, C),而 *TRE1-1* 基因的相对表达量在干扰 *SftPS2* 72 h 后仍显著上升($P < 0.05$) (图 4: A)。

2.5 *SftPS1* 和 *SftPS2* 基因被 RNAi 后白背飞虱 5 龄若虫海藻糖酶活性的变化

从图 5(A) 中可以看出,与注射 dsGFP 的对照组相比,干扰 *SftPS1* 基因 48 h 或 72 h 后,白背飞虱体内可溶性海藻糖酶活性无显著变化($P > 0.05$);而干扰 *SftPS2* 基因后白背飞虱体内可溶性海藻糖酶活性先降后升,在干扰 48 h 后显著下降($P < 0.05$),干扰 72 h 后又显著上升($P < 0.05$)。膜结合型海藻糖酶在干扰 *SftPS1* 基因 48 h 或 72 h 后酶活力水平显著上升($P < 0.05$);干扰 *SftPS2* 基因 48 h 后,膜结合型海藻糖酶的活性水平没有显著变化($P > 0.05$),在干扰 *SftPS2* 基因 72 h 后酶活性水平显著上升($P < 0.05$) (图 5: B)。

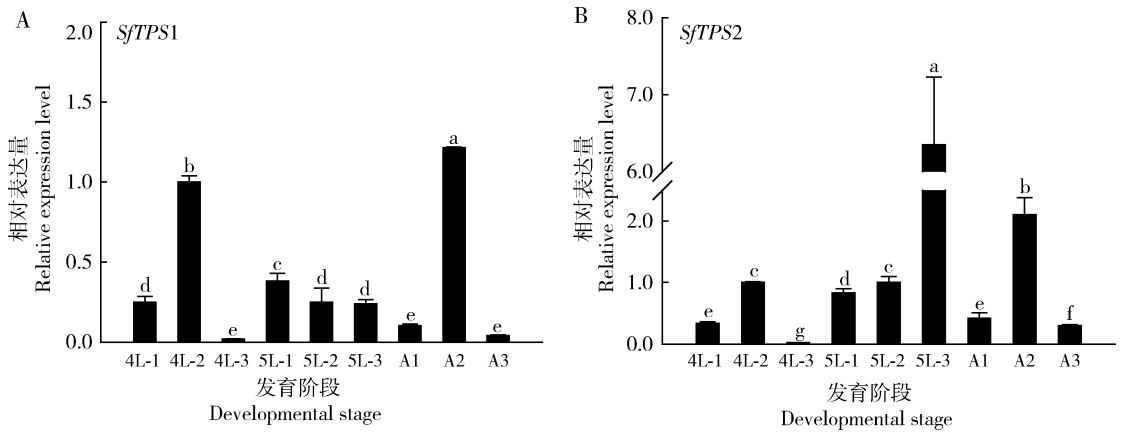


图2 白背飞虱不同发育时期 *SfTPS1* (A) 和 *SfTPS2* (B) 的相对表达量

Fig. 2 Relative expression levels of *SfTPS1* (A) and *SfTPS2* (B) in different developmental stages of *Sogatella furcifera*

4L-1-3: 分别为4龄第1-3天若虫 Day 1-3 4th instar nymph, respectively; 5L-1-3: 分别为5龄第1-3天若虫 Day 1-3 5th instar nymph, respectively; A1-3: 分别为1-3日龄成虫 1-3-day old adult, respectively. 图中数据为平均值 \pm 标准误, 不同发育阶段的基因表达量以白背飞虱4龄2d若虫体内的表达量为基准; 柱上不同小写字母表示不同发育阶段间基因表达差异显著 ($P < 0.05$, Duncan氏多重比较检验法)。Data in the figure are mean \pm SE. The relative expression levels of genes in different developmental stages are normalized to that in the day 2 4th instar nymph. Different lowercase letters above bars indicate significant differences in gene expression level among different developmental stages ($P < 0.05$, Duncan's multiple range test).

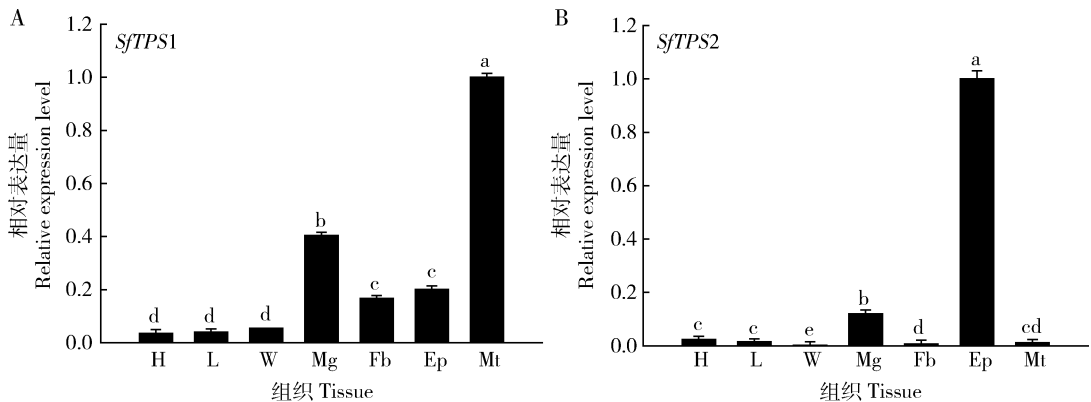


图3 *SfTPS1* (A) 和 *SfTPS2* (B) 在白背飞虱羽化后7d内成虫不同组织中的相对表达量

Fig. 3 Relative expression levels of *SfTPS1* (A) and *SfTPS2* (B) in different adult tissues of *Sogatella furcifera* within 7 d after emergence

H: 头 Head; L: 足 Leg; W: 翅 Wing; Mg: 中肠 Midgut; Fb: 脂肪体 Fat body; Ep: 表皮 Epidermis; Mt: 马氏管 Malpighian tubules. 图中数据为平均值 \pm 标准误, 不同组织中的 *SfTPS1* 基因表达量以成虫马氏管中的表达量为基准, *SfTPS2* 基因的表达量以成虫表皮中的表达量为基准; 柱上不同小写字母表示不同组织间基因表达差异显著 ($P < 0.05$, Duncan氏多重比较检验法)。Data in the figure are mean \pm SE. The relative expression levels of *SfTPS1* in different tissues are normalized to that in adult Malpighian tubules, and the relative expression levels of *SfTPS2* in different tissues are normalized to that in adult epidermis. Different lowercase letters above bars indicate significant differences in gene expression level among different tissues ($P < 0.05$, Duncan's multiple range test).

2.6 *SfTPS1* 和 *SfTPS2* 基因被 RNAi 后白背飞虱5龄若虫海藻糖、葡萄糖和总糖原的含量变化

与对照组(注射 dsGFP)相比, 单独干扰 *SfTPS1* 基因48 h或72 h后白背飞虱体内海藻糖含量、总糖原含量以及葡萄糖含量均显著上升 ($P < 0.05$) (图6)。干扰 *SfTPS2* 基因48 h后海藻糖、总糖原含量与对照组相比无显著变化 ($P > 0.05$), 而干扰72 h

后海藻糖以及总糖原含量显著上升 ($P < 0.05$) (图6: A, B); 干扰 *SfTPS2* 基因48 h后葡萄糖含量与对照组相比显著降低 ($P < 0.05$), 在干扰72 h后却表现为显著上升 ($P < 0.05$) (图6: C)。

3 讨论

海藻糖素有昆虫“血糖”之称, 在维持生命体正

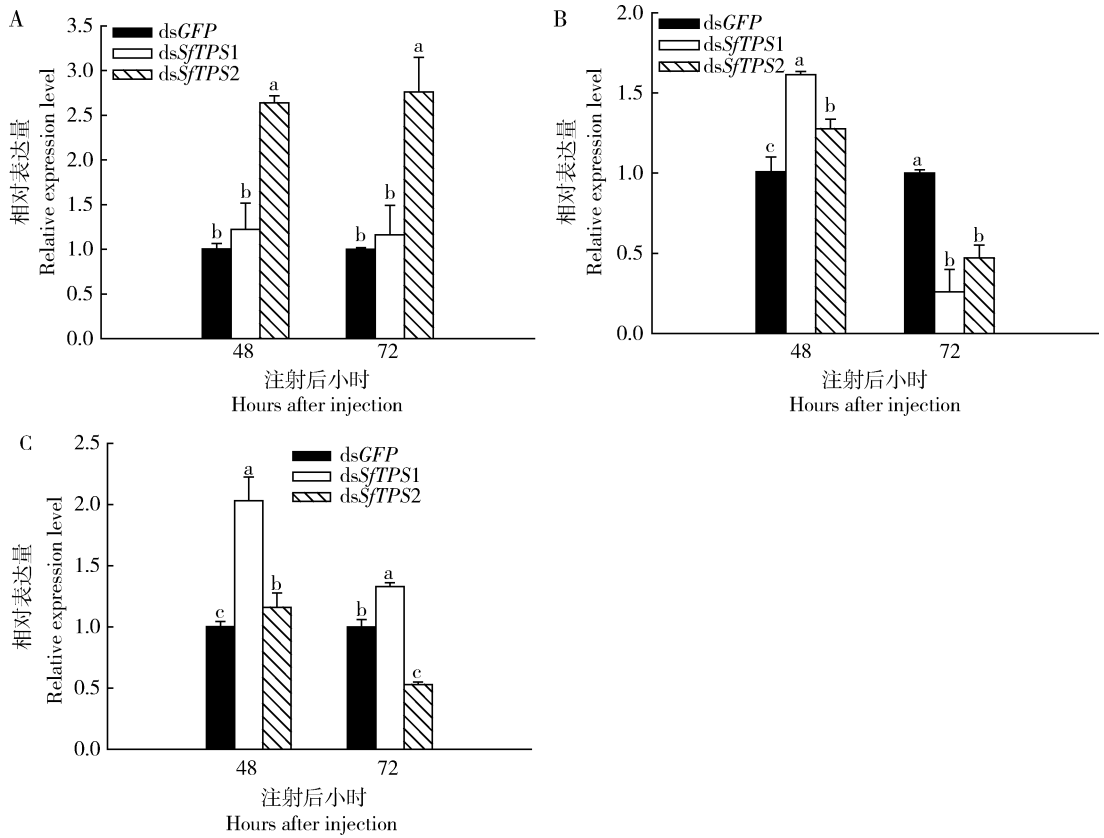


图4 *SfTPS1* 和 *SfTPS2* RNAi 后白背飞虱 5 龄若虫海藻糖酶基因的相对表达量

Fig. 4 Relative expression levels of trehalase genes in the 5th instar nymphs of *Sogatella furcifera* after RNAi of *SfTPS1* and *SfTPS2* A; *TRE1-1*; B; *TRE1-2*; C; *TRE2*. 图中数据为平均值 \pm 标准误, 以 dsGFP 注射组的表达量为基准; 柱上不同小写字母表示不同处理组间基因表达量差异显著 ($P < 0.05$, Duncan 氏多重比较检验法)。Data in the figure are mean \pm SE. The relative expression levels of genes are normalized to that of the dsGFP injection group. Different lowercase letters above bars indicate significant difference in gene expression level among different treatment groups ($P < 0.05$, Duncan's multiple range test).

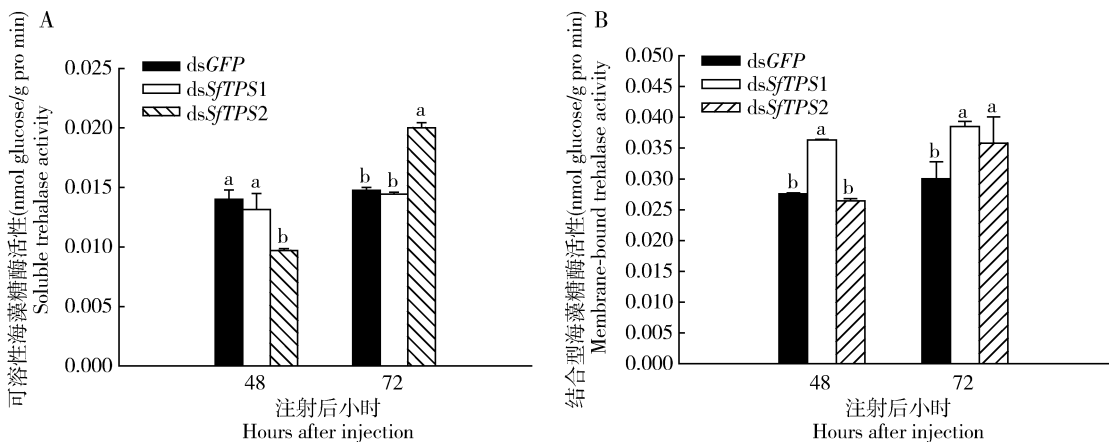


图5 *SfTPS1* 和 *SfTPS2* RNAi 后白背飞虱 5 龄若虫体内可溶性海藻糖酶(A)和膜结合型海藻糖酶(B)活性

Fig. 5 Enzyme activities of soluble trehalase (A) and membrane-bound trehalase (B) in the 5th instar nymphs of *Sogatella furcifera* after RNAi of *SfTPS1* and *SfTPS2*

图中数据为平均值 \pm 标准误; 柱上不同小写字母表示不同处理组间酶活性差异显著 ($P < 0.05$, Duncan 氏多重比较检验法)。Data in the figure are mean \pm SE. Different lowercase letters above bars indicate significant difference in enzyme activity among different treatment groups ($P < 0.05$, Duncan's multiple range test).

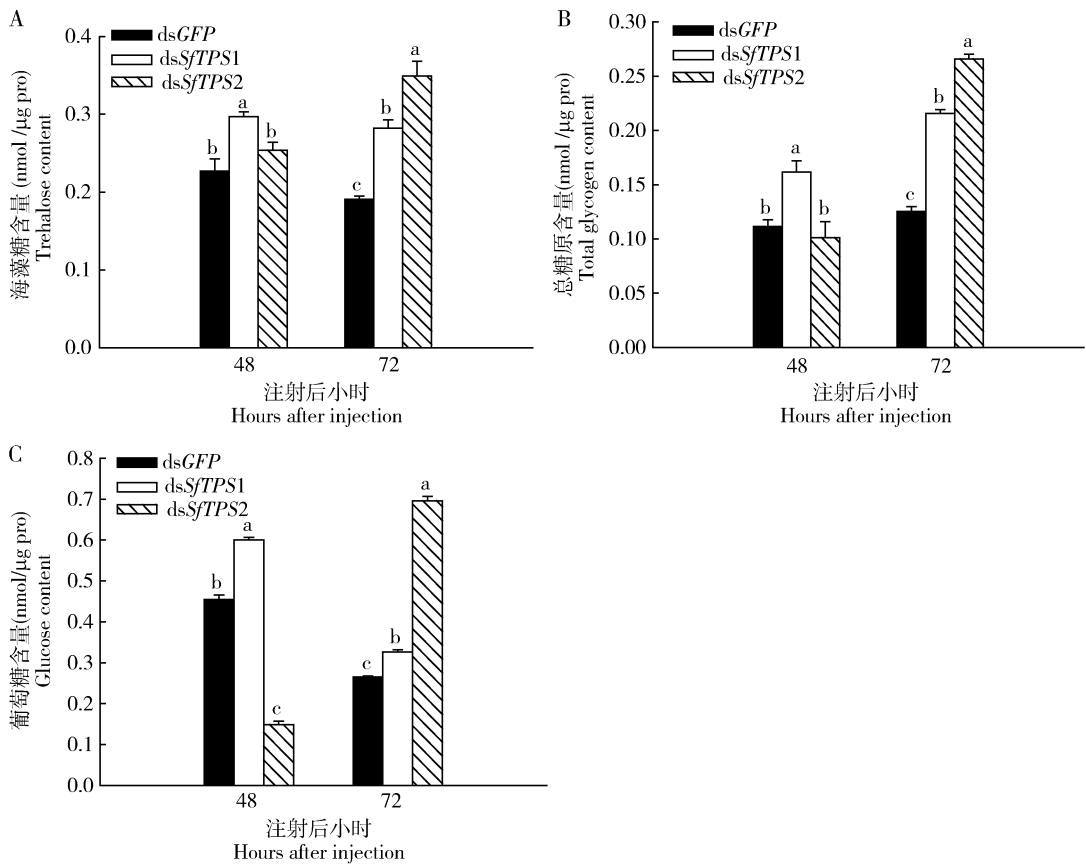


图6 *SfTPS1* 和 *SfTPS2* RNAi 后白背飞虱 5 龄若虫体内海藻糖 (A)、总糖原 (B) 和葡萄糖 (C) 含量的变化
Fig. 6 Changes in contents of trehalose (A), total glycogen (B) and glucose (C) in the 5th instar nymphs of *Sogatella furcifera* after RNAi of *SfTPS1* and *SfTPS2*

图中数据为平均值 \pm 标准误; 柱上不同小写字母表示不同处理组间糖含量差异显著 ($P < 0.05$, Duncan 氏多重比较检验法)。Data in the figure are mean \pm SE. Different lowercase letters above bars indicate significant differences in carbohydrate content among different treatment groups ($P < 0.05$, Duncan's multiple range test).

常的生理活动及能量代谢中有着重要的作用。海藻糖不仅是昆虫活动的能量来源, 在昆虫的滞育研究中发现, 在昆虫的滞育期, 海藻糖含量显著上升, 进行累积以保护滞育阶段不受不利环境条件的影响; 而一旦滞育打破后, 海藻糖含量迅速开始下降, 降低到正常水平 (Guo *et al.*, 2015; Lin and Xu, 2016)。海藻糖合成酶是参与海藻糖合成的关键酶, *TPS* 基因通过控制其表达量来调控体内海藻糖含量 (唐斌等, 2014)。白背飞虱为一种不完全变态昆虫, 研究发现 *SfTPS1* 在蜕皮前表达量下降, 蜕皮后表达量上升 (图 2: A); 而 *SfTPS2* 基因的表达量在 5 龄若虫到成虫时期的蜕皮前表达量上升, 蜕皮后表达量先降后升 (图 2: B)。这些结果表明, 白背飞虱蜕皮前 *TPS* 基因的表达量显著降低, 一般在 4 龄第 2 天若虫时基因的表达量较高, 原因可能是 *SfTPS1* 和 *SfTPS2* 发挥的功能存在差异。对于 *SfTPS1*, 前期表达量的增加积累了足够多的海藻糖, 因此在后期蜕

皮前 1 d 基因的表达量下降; 5 龄第 3 天若虫正好是羽化前期, *SfTPS2* 在该时间内的表达量达到最大值, 海藻糖可能在此时积累较多, 用于羽化; 昆虫在蜕皮的过程中需要先消耗大量的海藻糖, 在蜕皮完成初期开始迅速累积海藻糖, 用于蜕皮过程中的能量消耗, 并维持体内海藻糖含量的平衡, 曾有报道提出蓝蟹 *Callinectes sapidus* 血淋巴中的 *TPS* 在预蜕皮期及蜕皮前期有较高的相对表达量, 同样在果蝇中发现其幼虫阶段体内含有较高的海藻糖含量, 在预蛹阶段海藻糖含量达到最高, 但在蛹期迅速回落 (Matsuda *et al.*, 2015)。另外, 组织分布检测中发现, *TPS* 基因在白背飞虱中肠、表皮和马氏管中表达较高 (图 3), 其中 *SfTPS1* 基因在马氏管和中肠中的表达量较高 (图 3: A); *SfTPS2* 基因在表皮和中肠中的表达量较高 (图 3: B), 有研究发现蝗虫的 *TPS* 基因在肠中的表达量较高 (Cui and Xia, 2009), 在德国小蠹中 *TPS2* 与玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 中 *TPS*

基因在脂肪体中的表达最高,其次是在表皮中的表达水平(陈静和张道伟, 2015),这些结果表明海藻糖可能在这些组织中合成。在甜菜夜蛾中,*TPS* 不仅在脂肪体和卵巢中表达(Tang *et al.*, 2010),而且还在中肠、血淋巴和腿部肌肉中表达(Chen *et al.*, 2010)。这些结果说明 *SfTPS1* 和 *SfTPS2* 基因的功能可能不同;*SfTPS2* 基因对于几丁质代谢具有调控作用,有相似的研究表明,褐飞虱的 *TPS1* 和 *TPS2* 基因都能通过调控几丁质代谢来控制几丁质含量从而控制蜕皮(赵丽娜, 2014)。

目前,越来越多的科学家开始研究 *TPS* 基因与海藻糖含量的关系,研究发现在注射 *TPS1* 和 *TPS2* 的 dsRNA 后 72 h,赤拟谷盗体内海藻糖含量显著下降,葡萄糖含量略有增加(Chen *et al.*, 2018),这个结果与抑制柑橘大实蝇 *TPS* 基因表达的结果相似,柑橘大实蝇的 *TPS* 基因表达被抑制后,海藻糖显著减少,葡萄糖显著增加(Xiong *et al.*, 2016)。在我们的研究中,白背飞虱体内的 *SfTPS1* 基因被 RNAi 后,海藻糖含量、葡萄糖含量及总糖原含量均显著上升(图 6),同样的研究中分别干扰褐飞虱 *TPS1* 和 *TPS2* 基因后,海藻糖含量增加(Yang *et al.*, 2017)。这些研究结果存在不一致,可能与不同昆虫中 *TPS* 基因的个数与具体的潜在功能有关,如某些昆虫中仅包含一个 *TPS* 基因,那么该基因表达被沉默后,海藻糖能合成,因此海藻糖含量下降(Xiong *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2018);而含有多个 *TPS* 基因的物种中,某一个 *TPS* 基因表达被沉默后,其余基因存在补偿功能,因此海藻糖反而有可能上升。正如在 *TPS* 氨基酸序列对比中发现,白背飞虱 *TPS* 序列与褐飞虱的 *TPS* 序列一致性最高,归在同一支(图 1),因此在功能上可能也是相似的。干扰 *SfTPS2* 基因 48 h 后海藻糖含量略有上升,葡萄糖含量显著下降,72 h 后 3 种糖含量均显著上升(图 6),这些结果表明在抑制 *TPS* 基因表达后,为了维持体内糖含量的平衡及对外界刺激的保护,通过降低海藻糖分解成葡萄糖来提高体内海藻糖的含量。该结果与在蓝蟹中类似,当注射脂多糖(lipopolysaccharide, LPS),即模仿病原体感染后,蓝蟹通过动态调节 *TPS* 的表达和 *TPS* 酶活性,调节细胞在 LPS 刺激下的生理生化适应水平,此时蓝蟹体内的海藻糖与对照相比均显著上升(Chung, 2008)。

与注射 dsGFP 的对照组相比,干扰 *TPS1* 基因后,白背飞虱 5 龄若虫体内膜结合型海藻糖酶活性显著上升(图 5: B),与 *TRE2* 基因的表达量相一致

(图 4: C),而可溶性海藻糖酶活性在干扰 *SfTPS1* 48 h 或 72 h 后无显著变化(图 5: A),*TRE1-1* 的相对表达水平无显著差异(图 4: A),但是 *TRE1-2* 的相对表达水平在干扰 48 h 后显著上升,在 72 h 后显著下降(图 4: B)。*TRE1-1*, *TRE1-2* 及 *TRE2* 的相对表达水平在注射 ds*SfTPS2* 48 h 后上升或显著上升,*TRE1-1* 在 72 h 后相对表达水平仍显著高于对照组(图 4: A),但是 *TRE1-2* 和 *TRE2* 基因的相对表达水平却显著低于对照组(图 4: B, C);可溶性海藻糖酶活性在干扰 *SfTPS2* 48 h 后显著下降,而在 72 h 后显著上升(图 5: A),膜结合型海藻糖酶活性在干扰 *SfTPS2* 48 h 后无显著变化,在 72 h 后显著上升(图 5: B)。这些结果显示 *TRE1-1* 对可溶性海藻糖酶活性的控制中起主导作用,此外,不同的海藻糖酶基因之间存在着表达差异,可能是互相之间存在着补偿效应或者反馈调节机制(赵丽娜, 2014),具体机制需进一步研究。但在褐飞虱中,分别干扰 *TPS1* 和 *TPS2* 基因后,可溶性海藻糖酶活性和膜结合型海藻糖酶活性下降(Yang *et al.*, 2017)。目前,已经在德国小蠊、赤拟谷盗和水稻干尖线虫 *Aphelenchoides besseyi* 中发现有 2 个 *TPS* 基因(Goyal *et al.*, 2005; Kormish *et al.*, 2005; 陈静和张道伟, 2015; 唐斌等, 2019),在褐飞虱和猪蛔虫 *Ascaris suum* 中发现 3 个 *TPS* 基因(Tang *et al.*, 2018),而我们研究发现白背飞虱中有 2 个 *TPS* 基因,当分别被 RNAi 后,对海藻糖代谢相关基因及酶活性的影响各异,也许还存在着其他的 *TPS* 基因未被发掘。

不同发育阶段表达及组织表达结果表明白背飞虱体内这两个 *TPS* 基因可能行使的功能不同,海藻糖合成酶在海藻糖合成过程中起到关键作用,注射 ds*SfTPS1* 和 ds*SfTPS2* 后,能够通过海藻糖酶调控海藻糖代谢,影响体内海藻糖含量,这些结果为研究 *TPS* 基因在海藻糖合成途径中调功能提供了依据,为深入研究其是否有作为害虫防治靶标提供数据支撑。

参考文献 (References)

- Arguelles JC, 2000. Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis. *Arch. Microbiol.*, 174(4): 217 – 224.
- Asano N, 2003. Glycosidase inhibitors: update and perspectives on practical use. *Glycobiology*, 13(10): 93 – 104.
- Avonce N, Mendoza-Vargas A, Morett E, Iturriaga G, 2006. Insights on the evolution of trehalose biosynthesis. *BMC Evol. Biol.*, 6: 109.
- Chen J, Zhang DW, 2015. Molecular cloning, tissue distribution and

- temperature-induced expression of two trehalose-6-phosphate synthase genes in *Blattella germanica* (Blattodea; Blattellidae). *Acta Entomol. Sin.*, 58(10): 1046 – 1053. [陈静, 张道伟, 2015. 德国小蠊两个海藻糖合成酶基因的克隆、组织分布及温度诱导表达分析. 昆虫学报, 58(10): 1046 – 1053]
- Chen J, Zhang DW, Yao Q, Zhang JQ, Dong XL, Tian HG, Chen J, Zhang WQ, 2010. Feeding-based RNA interference of a trehalose phosphate synthase gene in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect Mol. Biol.*, 19(6): 777 – 786.
- Chen Q, Haddad GG, 2004. Role of trehalose phosphate synthase and trehalose during hypoxia: from flies to mammals. *J. Exp. Biol.*, 207(Pt 18): 3125 – 3129.
- Chen Q, Ma E, Behar KL, Xu T, Haddad GG, 2002. Role of trehalose phosphate synthase in anoxia tolerance and development in *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.*, 277(5): 3274 – 3279.
- Chen QW, Jin S, Zhang L, Shen QD, Wei P, Wei CM, Wang SG, Tang B, 2018. Regulatory functions of trehalose-6-phosphate synthase in the chitin biosynthesis pathway in *Tribolium castaneum* (Coleoptera; Tenebrionidae) revealed by RNA interference. *Bull. Entomol. Res.*, 108(3): 388 – 399.
- Chung JS, 2008. A trehalose 6-phosphate synthase gene of the hemocytes of the blue crab, *Callinectes sapidus*: cloning, the expression, its enzyme activity and relationship to hemolymph trehalose levels. *Saline Systems*, 4: 18.
- Cui SY, Xia YX, 2009. Isolation and characterization of the trehalose-6-phosphate synthase gene from *Locusta migratoria manilensis*. *Insect Sci.*, 16(4): 287 – 295.
- Gao Y, Jiang Y, Liu Q, Wang R, Liu X, Liu B, 2014. Enzymatic and regulatory properties of the trehalose-6-phosphate synthase from the thermoacidophilic archaeon *Thermoplasma acidophilum*. *Biochimie*, 101(1): 215 – 220.
- Goyal K, Browne JA, Burnell AM, Tunnacliffe A, 2005. Dehydration-induced *tps* gene transcripts from an anhydrobiotic nematode contain novel spliced leaders and encode atypical GT-20 family proteins. *Biochimie*, 87(6): 565 – 574.
- Guo Q, Hao YJ, Li Y, Zhang YJ, Ren S, Si FL, Chen B, 2015. Gene cloning, characterization and expression and enzymatic activities related to trehalose metabolism during diapause of the onion maggot *Delia antiqua* (Diptera; Anthomyiidae). *Gene*, 565(1): 106 – 115.
- Kern C, Wolf C, Bender F, Berger M, Noack S, Schmalz S, Ilg T, 2012. Trehalose-6-phosphate synthase from the cat flea *Ctenocephalides felis* and *Drosophila melanogaster*: gene identification, cloning, heterologous functional expression and identification of inhibitors by high throughput screening. *Insect Mol. Biol.*, 21(4): 456 – 471.
- Kormish JD, McGhee JD, 2005. The *C. elegans* lethal gut-obstructed *gog-1* gene is trehalose-6-phosphate phosphatase. *Dev. Biol.*, 287(1): 35 – 47.
- Lin XW, Xu WH, 2016. Hexokinase is a key regulator of energy metabolism and ROS activity in insect lifespan extension. *Aging*, 8(2): 245 – 258.
- 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.
- Matsuda H, Yamada T, Yoshida M, Nishimura T, 2015. Flies without trehalose. *J. Biol. Chem.*, 290(2): 1244 – 1255.
- Mitsumasa K, Azuma M, Niimi T, Yamashita O, Yaginuma T, 2005. Membrane-penetrating trehalase from silkworm *Bombyx mori*. Molecular cloning and localization in larval midgut. *Insect Mol. Biol.*, 14(5): 501 – 508.
- Richards AB, Krakowka S, Dexter LB, Schmid H, Wolterbeek APM, Waalkens-Berendsen DH, Shigoyuki A, Kurimoto M, 2002. Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. *Food Chem. Toxicol.*, 40(7): 871 – 898.
- Sajid MA, Shahzad SA, Hussain F, Skene WG, Khah ZA, Yar M, 2018. Synthetic modifications of chitin and chitosan as multipurpose biopolymers: a review. *Synth. Commun.*, 48(15): 1893 – 1908.
- Shi JF, Xu QY, Sun QK, Meng QW, Mu LL, Guo WC, Li GQ, 2016. Physiological roles of trehalose in *Leptinotarsa* larvae revealed by RNA interference of trehalose-6-phosphate synthase and trehalase genes. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 77(1): 52 – 68.
- Shukla E, Thorat LJ, Nath BB, Gaikwad SM, 2015. Insect trehalase: physiological significance and potential applications. *Glycobiology*, 25(4): 357 – 367.
- Tabata E, Kashimura A, Kikuchi A, Masuda H, Miyahara R, Hiruma Y, Wakita S, Ohno M, Sakaguchi M, Sugahara Y, Matoska V, Bauer OP, Oyama F, 2018. Chitin digestibility is dependent on feeding behaviors, which determine acidic chitinase mRNA levels in mammalian and poultry stomachs. *Sci. Rep.*, 8(1): 1461.
- Tang B, Chen J, Yao Q, Pan ZQ, Xu WH, Wang SG, Zhang WQ, 2010. Characterization of a trehalose-6-phosphate synthase gene from *Spodoptera exigua* and its function identification through RNA interference. *J. Insect Physiol.*, 56(7): 813 – 821.
- Tang B, Chen XF, Liu Y, Tian HG, Liu J, Hu J, Xu WH, Zhang WQ, 2008. Characterization and expression patterns of a membrane-bound trehalase from *Spodoptera exigua*. *BMC Mol. Biol.*, 9(1): 51.
- Tang B, Shen QD, Zeng BP, Xiao ZJ, Qiu LY, Pan BY, Li K, Zhang DW, 2019. The characteristics, developmental expression and RNAi effect analysis of a novel trehalose-6-phosphate synthase in *Nilaparvata lugens*. *Sci. Agr. Sin.*, 52(3): 66 – 477. [唐斌, 沈祺达, 曾伯平, 肖仲久, 邱玲玉, 潘碧莹, 李昆, 张道伟, 2019. 褐飞虱一个新的海藻糖合成酶基因的特性、发育表达及 RNAi 效果分析. 中国农业科学, 52(3): 66 – 477]
- Tang B, Wang S, Wang SG, Wang HJ, Zhang JY, Cui SY, 2018. Invertebrate trehalose-6-phosphate synthase gene: genetic architecture, biochemistry, physiological function, and potential applications. *Front. Physiol.*, 9(1): 30 – 42.
- Tang B, Xu QY, Zhao LN, Wang SG, Zhang F, 2014. Progress in research on the characteristics and functions of trehalose and the *TPS* gene in insects. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 51(6): 1397 – 1405. [唐斌, 徐青叶, 赵丽娜, 王世贵, 张帆, 2014. 昆虫海藻糖及其合成酶基因的特性与功能研究进展. 应用昆虫学报, 51(6):

- 1397 – 1405]
- Tang B, Yang MM, Shen QD, Xu YX, Wang HJ, Wang SG, 2017. Suppressing the activity of trehalase with validamycin disrupts the trehalose and chitin biosynthesis pathways in the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 137(1): 81 – 90.
- Tang B, Zhang L, Xiong XP, Wang HJ, Wang SG, 2018. Advances in trehalose metabolism and its regulation of insect chitin synthesis. *Sci. Agr. Sin.*, 51(4): 697 – 707. [唐斌, 张露, 熊旭萍, 汪慧娟, 王世贵, 2018. 海藻糖代谢及其调控昆虫几丁质合成研究进展. *中国农业科学*, 51(4): 697 – 707]
- Tetreau G, Cao X, Chen YR, Muthukrishnan S, Jiang H, Blissard GW, Kanost MR, Wang P, 2015. Overview of chitin metabolism enzymes in *Manduca sexta*: identification, domain organization, phylogenetic analysis and gene expression. *Insect Biochem. Mol.*, 62(1): 114 – 126.
- Wu SX, 2016. Heterogeneous Expression of *Sulfolobus acidocaldarius* MTSase and MTHase and Its Application. MSc Thesis, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu. [吴世雄, 2016. 嗜酸热硫化叶菌 MTSase 和 MTHase 的异源表达及应用. 江苏无锡: 江南大学硕士学位论文]
- Xiong KC, Wang J, Li JH, Deng YQ, Pu P, Fan H, Liu YH, 2016. RNA interference of a trehalose-6-phosphate synthase gene reveals its role during larval-pupal metamorphosis in *Bactrocera minax* (Diptera: Tephritidae). *J. Insect Physiol.*, 91 – 92: 84 – 92.
- Yang MM, Zhao LN, Shen QD, Xie GQ, Wang SG, Tang B, 2017. Knockdown of two trehalose-6-phosphate synthases severely affects chitin metabolism gene expression in the brown planthopper *Nilaparvata lugens*. *Pest Manag. Sci.*, 73(1): 206 – 216.
- Yu CH, Lu D, Lin RH, Wang XJ, Jiang H, Zhao F, 2008. Trehalose – the blood sugar in insects. *Chin Bull. Entomol.*, 45(5): 832 – 837. [于彩虹, 卢丹, 林荣华, 王晓军, 姜辉, 赵飞, 2008. 海藻糖——昆虫的血糖. *昆虫知识*, 45(5): 832 – 837]
- Zhang DW, Chen J, Guo YS, 2012. Cloning and sequence analysis of trehalose phosphate synthase gene from *Sogatella furcifera*. *Heilongjiang Agric. Sci.*, (5): 14 – 19. [张道伟, 陈静, 郭玉双, 2012. 白背飞虱海藻糖合成酶基因的克隆及序列分析. *黑龙江农业科学*, (5): 14 – 19]
- Zhang L, Qiu LY, Yang HL, Wang HJ, Zhou M, Wang SG, Tang B, 2017. Study on the effect of wing bud chitin metabolism and its developmental network genes in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, by knockdown of *TRE* gene. *Front. Physiol.*, 8(1): 750 – 762.
- Zhao LN, 2014. Regulating Effects of *Trehalase* and *TPS* on the Key Genes in the Pathway of Trehalose Metabolic in *Nilaparvata lugens*. MSc Thesis, Hangzhou Normal University, Hangzhou. [赵丽娜, 2014. 海藻糖酶和海藻糖合成酶基因对褐飞虱海藻糖代谢途径关键基因的调控研究. 杭州: 杭州师范大学硕士学位论文]

(责任编辑: 马丽萍)