



褐飞虱 E3 泛素连接酶基因 *NIHECTD2* 的克隆和功能分析

罗 怡, 郭莹莹, 熊振泽, 宋 阳, 刘一鹏, 俞晓平, 申屠旭萍*

(中国计量大学生命科学学院, 浙江省生物计量及检验检疫技术重点实验室, 杭州 310018)

摘要:【目的】探明褐飞虱 *Nilaparvata lugens* E3 泛素连接酶基因 *NIHECTD2* 的分子特性、表达模式及生物学功能。【方法】基于褐飞虱转录组数据, PCR 克隆 *NIHECTD2* 全长 cDNA 序列并进行生物信息学分析; 利用 qRT-PCR 检测 *NIHECTD2* 在卵、1–5 龄若虫、初羽化 24 h 内雌成虫和 1–5 日龄雌成虫中及 3 日龄雌成虫头、胸、腹、肠道和卵巢中的表达量; 初羽化褐飞虱雌成虫单头注射 0.05 μ L ds*NIHECTD2* (5 000 ng/ μ L), 利用 qRT-PCR 检测 RNAi 后 24, 48 和 72 h 时 *NIHECTD2* 的表达量, 并检测褐飞虱血淋巴中类酵母共生菌 (yeast-like symbiont, YLS) 的数量、褐飞虱雌成虫存活率、单雌产卵量和卵孵化率。【结果】克隆获得了褐飞虱 *NIHECTD2* 基因全长 cDNA 序列 (GenBank 登录号: XM_039427060.1), 其开放阅读框长 2 850 bp; *NIHECTD2* 编码 950 个氨基酸, 无信号肽, 包含 1 个具有泛素连接酶 (E3) 亚类的 C 端催化结构域。系统发育分析表明, *NIHECTD2* 与半翅目其他昆虫 *HECTD2s* 聚为一支, 与烟粉虱 *Bemisia tabaci* *HECTD2* 亲缘关系最为接近。qRT-PCR 结果显示, *NIHECTD2* 具有明显的时空表达特异性, 在褐飞虱 3 日龄雌成虫腹中的表达量最高。RNAi 结果显示, 与注射 ds*GFP* 对照比较, 注射 ds*NIHECTD2* 能够显著抑制 *NIHECTD2* 的表达量, 使褐飞虱血淋巴中的 YLS 数量极显著下降, 导致褐飞虱雌成虫存活率、单雌产卵量及卵孵化率极显著下降。【结论】*NIHECTD2* 与褐飞虱体内 YLS 释放到血淋巴这一过程紧密相关, 并在褐飞虱的生长发育及繁殖过程中发挥重要作用, 可作为褐飞虱防控的潜在靶标。

关键词: 褐飞虱; *NIHECTD2*; 类酵母共生菌; RNA 干扰; 基因功能

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2023)07-0992-07

Cloning and functional analysis of the E3 ubiquitin ligase gene *NIHECTD2* in *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae)

LUO Yi, GUO Ying-Ying, XIONG Zhen-Ze, SONG Yang, LIU Yi-Peng, YU Xiao-Ping, SHENTU Xu-Ping* (Zhejiang Provincial Key Laboratory of Biometrology and Inspection & Quarantine, College of Life Science, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: 【Aim】 To explore the molecular characteristics, expression patterns and biological function of the E3 ubiquitin ligase gene *NIHECTD2* of *Nilaparvata lugens*. 【Methods】 Based on the transcriptome data of *N. lugens*, the full-length cDNA sequence of *NIHECTD2* was cloned by PCR and bioinformatically analyzed. qRT-PCR was used to detect the expression levels of *NIHECTD2* in the egg, 1st–5th instar nymphs, female adult newly emerged within 24 h and 1–5-day-old female adults, and the head, thorax, abdomen, gut and ovary of the 3-day-old female adult of *N. lugens*. A single newly emerged female adult

基金项目: 国家自然科学基金区域联合基金项目 (U21A20223, 3164001); 浙江省重点研发计划项目 (2022C02047, 2019C02015); 浙江省“三农九方”科技协作计划项目 (2023SNJF034)

作者简介: 罗怡, 女, 1997年5月生, 浙江台州人, 硕士研究生, 研究方向为生物防治, E-mail: 1906470429@qq.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: stxp@cjlu.edu.cn

收稿日期 Received: 2023-02-17; 接受日期 Accepted: 2023-04-06

of *N. lugens* was injected with 0.05 μL ds*NIHECTD2* (5 000 ng/ μL) and the expression level of *NIHECTD2* was detected by qRT-PCR at 24, 48, and 72 h after RNAi, and the number of yeast-like symbionts (YLSs) in the hemolymph, survival rate of the female adult of *N. lugens*, number of eggs laid per female and egg hatching rate were also detected. 【Results】 The full-length cDNA sequence of *NIHECTD2* (GenBank accession number: XM_039427060.1) was successfully cloned from *N. lugens*. The open reading frame (ORF) of *NIHECTD2* is 2 850 bp in length and encodes 950 amino acids. *NIHECTD2* has no signal peptide and contains a C-terminal catalytic domain with a subclass ubiquitin ligase (E3). Phylogenetic analysis indicated that *NIHECTD2* was clustered together with other hemipteran HECTD2s, and had the highest homology with HECTD2 of *Bemisia tabaci*. The qRT-PCR results showed that *NIHECTD2* had obvious spatiotemporal expression specificity, with the highest expression level in the abdomen of the 3-day-old female adult of *N. lugens*. The RNAi results showed that compared with the control (injected with ds*GFP*), injection of ds*NIHECTD2* significantly inhibited the expression level of *NIHECTD2* and extremely significantly decreased the number of YLSs in the hemolymph of *N. lugens*, which led to an extremely significant decrease in the survival rate of female adult, number of eggs laid per female and egg hatching rate of *N. lugens*. 【Conclusion】 *NIHECTD2* is closely related to the process of YLS release to hemolymph in *N. lugens*, plays an important role in the growth, development and reproduction of *N. lugens*, and can be used as a potential target for the control of *N. lugens*.

Key words: *Nilaparvata lugens*; *NIHECTD2*; yeast-like symbiont; RNA interference; gene function

褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 隶属于半翅目 (Hemiptera) 飞虱科 (Delphacidae), 是亚洲大部分水稻种植地区的首要害虫 (廖世纯等, 2011; 林拥军等, 2011; Win *et al.*, 2011)。褐飞虱对水稻的危害主要表现在两方面: 首先通过取食和产卵造成水稻机械损伤 (Huang *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2022), 其次表现在传播和诱发水稻病害 (吕进等, 2013)。化学防治一直以来是控制褐飞虱的主要手段, 但长期、大量和持续不合理使用化学杀虫剂, 不仅严重污染了环境, 同时使得褐飞虱对多种杀虫剂产生抗性 (Liao *et al.*, 2021)。因此, 寻找新的绿色防控技术用于控制褐飞虱种群数量显得尤为重要。

类酵母共生菌 (yeast-like symbiont, YLS) 是褐飞虱体内的优势共生菌群 (张珏锋等, 2009; 唐明等, 2014), 研究表明, 褐飞虱体内 YLS 数量的减少会导致褐飞虱的生长受阻、发育延迟以及存活率、羽化率和繁殖率等均下降 (Xue *et al.*, 2014; Shentu *et al.*, 2019; Ju *et al.*, 2020)。因此, YLS 有望成为防治褐飞虱的新靶标, 探究 YLS 在褐飞虱体内垂直传递的过程有利于为褐飞虱防治提供新思路 (Yukuhiro *et al.*, 2014)。前期实验研究表明, 褐飞虱初羽化雌成虫血淋巴中仅存在少量 YLS, 而在羽化后 72 h 雌成虫血淋巴中则存在大量 YLS (未发表)。为探明 YLS 从脂肪体释放到血淋巴这一过程

的影响因素和调控机制, 我们对褐飞虱初羽化雌成虫 (YLS 开始释放时间点) 和羽化后 72 h 时雌成虫 (YLS 大量释放时期) 的脂肪体进行转录组测序分析, 发现 E3 泛素连接酶基因 *NIHECTD2* 表达量在 YLS 释放过程中存在显著差异。泛素蛋白酶体系统 (ubiquitin-proteasome system, UPS) 是真核生物重要的翻译后修饰机制, 对细胞周期、转录调控、DNA 修复以及信号转导等生物过程均具有重要的调控作用 (Xia *et al.*, 2013; Ho *et al.*, 2015), 同时也是最有效的特异降解蛋白质的途径之一 (Dreher and Callis, 2007), 而 E3 连接酶是该过程中泛素分子对靶蛋白进行特异性识别最关键的一类酶 (Zhou and Zeng, 2017), 负责识别特定靶标蛋白的赖氨酸, 将泛素转移到底物蛋白并使之泛素化降解 (Qin *et al.*, 2019)。根据 E3 结构域和作用方式, E3 泛素连接酶可分为 3 类: 包含 RING 结构域的 E3、包含 HECT 结构域的 E3 以及包含 RBR 结构域的 E3 (Cruz *et al.*, 2022)。HECT 类 E3 结构域是双叶的, 包含一个 N-lobe 和 C-lobe, N-lobe 与 E2-Ub 中间体共价结合, C-lobe 中的半胱氨酸结合位点对泛素转移至底物至关重要, C-lobe 的后 60 个氨基酸是检测泛素链特异性所必需的 (Daniela and Sharad, 2009; Metzger *et al.*, 2012)。HECT 类 E3 氨基端结构域具有多态性, 这些结构域可能促进底物-蛋白质相互作用 (Patra

et al., 2013; Irene *et al.*, 2018)。

本研究克隆鉴定了褐飞虱 E3 泛素连接酶基因 *NIHECTD2*, 对其核苷酸序列和蛋白序列进行生物信息学分析, 同时利用 qRT-PCR 检测其在褐飞虱不同发育阶段和不同组织中的表达量, 分析其时空表达规律, 并进一步分析 *NIHECTD2* 表达量下调对褐飞虱生物学功能的影响, 以期对褐飞虱防治提供新的方向及理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

供试褐飞虱虫源采自浙江省生物计量及检验检疫技术重点实验室人工气候室, 在室内室温条件下以 TN1 感虫水稻连续多代不喷药饲养。褐飞虱饲养条件: 温度 (26 ± 1) °C, 相对湿度 $80\% \pm 10\%$, 光周期 16L:8D。收集褐飞虱卵、1-5 龄若虫、初羽化 24 h 内雌成虫、1-5 日龄雌成虫, 及 3 日龄雌成虫头、胸、腹、肠道和卵巢, 各样本共收集 3 次独立样品, 其中卵约 300 粒, 1-2 龄若虫分别 50 头, 3-4 龄若虫分别 40 头, 5 龄若虫 30 头, 初羽 24 h 内雌成虫和 1-5 日龄雌成虫 20 头, 不同组织样本取自 100 头褐飞虱 3 日龄雌成虫, 置于 -80 °C 冰箱等待使用。

1.2 总 RNA 提取和 cDNA 合成

使用 RNA 提取试剂盒 (MiniBEST Universal RNA Extraction Kit) 提取 1.1 节中收集的褐飞虱不同样品的总 RNA。总 RNA 质量和浓度经微量分光光度计 NanoDropND-2000 (ThermoScientific, 美国) 检测。取 1 μg 总 RNA 合成 cDNA, 实验操作依照第 1 链 cDNA 合成试剂盒 (PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit) 使用手册合成的 cDNA。

1.3 *NIHECTD2* 的克隆及测序

基于褐飞虱转录组数据, 并结合褐飞虱全基因组信息, 获得 *NIHECTD2* 的 cDNA 全长序列 (GenBank 登录号: XM_039427060.1), 利用 Primer Premier 5 软件设计引物 (表 1), 以褐飞虱 (整虫) cDNA 为模板扩增 *NIHECTD2* 的全长 cDNA 序列。PCR 反应体系: ExTaq 酶 10 μL , 上下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 1 μL , cDNA 模板 1 μL , 用 ddH₂O 补充体积至 20 μL 。PCR 扩增程序: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 31 个循环; 72 °C 10 min。获得的 PCR 产物通过 2% 琼脂糖凝胶电泳检测回收, 并将回收所得 DNA 样本送

至上海生工生物公司测序分析。

1.4 *NIHECTD2* 的生物学分析

利用 NCBI ORFfinder 网站预测 ORF (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder>); 通过 NCBI BLAST 翻译 CDS 序列 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>); 在 Signal 信号肽网站预测 *NIHECTD2* 编码蛋白有无信号肽结构 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>); 利用 CBS Prediction Servers 预测和分析 *NIHECTD2* 编码氨基酸序列磷酸化位点 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>); 通过 CDD Analysis 对 *NIHECTD2* 编码氨基酸序列保守结构域进行分析 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>); 使用 MEGA-6 软件以邻接法 (neighbor-joining) 法构建系统发育树, 1 000 次重复。

1.5 *NIHECTD2* 的时空表达量检测

根据 1.3 节克隆的 *NIHECTD2* 全长 cDNA 序列, 利用 Primer Premier 5 软件设计引物, 以 *Actin* 为内参基因 (表 1), 以 1.1 节中收集的褐飞虱不同发育阶段和 3 日龄雌成虫组织样本 cDNA 为模板, 利用 qRT-PCR 检测 *NIHECTD2* 在褐飞虱不同发育阶段和不同组织中的表达量。qRT-PCR 反应体系: cDNA 1 μL , SYBR® PremixExTaq™ II 5 μL , 上下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.2 μL , 用 ddH₂O 补充体积至 10 μL 。扩增程序: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火及延伸 30 s, 40 个循环, 每组设置 3 次生物学重复及 3 次技术重复。

1.6 RNA 干扰

基于 *NIHECTD2* 和 *GFP* 的 cDNA 序列, 委托生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行 dsRNA 引物合成 (表 1), 严格参照 MEGAscript® RNAiKit 说明书进行 ds*NIHECTD2* 和 ds*GFP* 的合成。dsRNA 经 NanoDropND-2000 和 1% 琼脂糖凝胶电泳检测合格后, 将浓度用 ddH₂O 稀释至 5 000 ng/ μL 用于 RNAi 实验。将褐飞虱初羽化雌成虫置于体视显微镜下, 使用显微注射仪在褐飞虱胸部第 2-3 足之间的部位缓慢注射 0.05 μL dsRNA。完成注射后 2 h 剔除机械性死亡试虫并将活虫转移至温网室进行饲养。设置 3 个平行实验, 以注射 ds*NIHECTD2* 的褐飞虱为实验组, 注射 ds*GFP* 为对照组, 每组各 50 头试虫, 收集注射后 24, 48 和 72 h 时的褐飞虱样本, 检测其体内 *NIHECTD2* 的表达量, 观察并计算血淋巴中 YLS 的数量, 同时计算褐飞虱 RNAi 后 1-17 d 时的雌成虫存活率、单雌产卵量及卵孵化率。

表 1 引物信息
Table 1 Primer information

引物 Primers	引物序列(5' - 3') Primer sequences	用途 Use
NIHECTD2-F	CCTGATGGGTTTGCCGTAT	克隆
NIHECTD2-R	ACTTCCGGTCGTGAAAAGCA	Cloning
qNIHECTD2-F	CTGCTACCGGAAGTTGCTCT	qRT-PCR
qNIHECTD2-R	CATGATCTCGCCAGATGGG	
qActin-F	GATGAGGCCAGTCAAAGAG	
qActin-R	GTCATCTTCTCACGGTTGGC	
dsNIHECTD2-F	GGATCCTAATACGACTCACTATACTGATGGGTTTGCCGTAT	RNAi
dsNIHECTD2-R	GGATCCTAATACGACTCACTATAACTTCCGGTCGTGAAAAGCA	
dsGFP-F	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGATACGTGCAGGAGAGGAC	
dsGFP-R	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGCAGATTGTCTGGACAGG	

1.7 数据分析

利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 *NIHECTD2* 的相对表达量 (Livak and Schmittgen, 2001)。实验数据采用平均值 \pm 标准误差来表示, 利用 DPS 软件进行数据处理及分析。采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) *t* 检验进行差异显著性检验, 利用 GraphPadPrism7.0 绘制作图。多重比较是基于方差分析的基础上数据两两对比差异性, 也是用 DPS7.05 软件进行分析的。

2 结果

2.1 *NIHECTD2* 的克隆及序列

克隆和测序得到褐飞虱 *NIHECTD2* 的 cDNA 全长序列与 NCBI 中登录号为 XM_039427060.1 的序

列完全一致, 其开放阅读框长 2 850 bp, 编码 950 个氨基酸, 预测分子量为 235 516.90 D, 等电点为 4.84。该基因编码氨基酸序列无信号肽, 包含 1 个具有泛素连接酶 (E3) 亚类的 C 端催化结构域, 其中有 74 个磷酸化修饰位点、38 个丝氨酸修饰位点 (S)、27 个苏氨酸修饰位点 (T)、9 个酪氨酸修饰位点 (Y) 及 2 个 N-糖基化 (N) 修饰位点。系统发育分析显示 (图 1), *NIHECTD2* 与烟粉虱 *Bemisia tabaci* *HECTD2* 蛋白序列一致性最高, 亲缘关系最为接近, 与所有半翅目昆虫 *HECTD2* 在 NJ 树上聚为一支。表明 *HECTD2* 基因的核心结构域在不同昆虫中是高度保守的, 暗示着 *HECTD2* 在不同昆虫中的核心功能可能类似, 且具有重要的生物学功能。

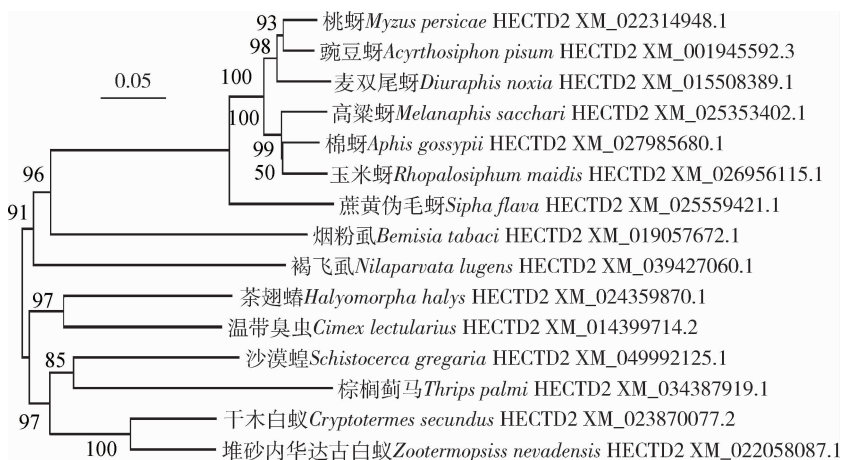


图 1 邻接法构建的基于氨基酸序列的褐飞虱和其他昆虫 *HECTD2* 的系统发育树 (1 000 次重复)

Fig. 1 Phylogenetic tree of *HECTD2* of *Nilaparvata lugens* and other insects constructed by neighbor-joining method based on amino acid sequence (1 000 replicates)

2.2 *NIHECTD2* 的时空表达模式

qRT-PCR 检测结果表明, 在褐飞虱的各发育阶段中, *NIHECTD2* 的表达量在 3 日龄雌成虫中达到

最高, 且随着发育历期的延长无明显变化 (图 2: A); *NIHECTD2* 在褐飞虱 3 日龄雌成虫不同组织中均有表达, 其在腹中的表达量最高 (图 2: B)。

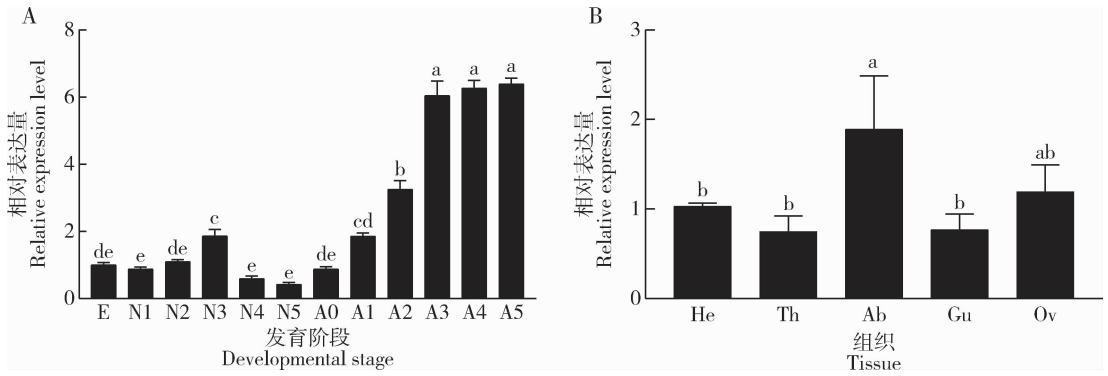


图2 *NIHECTD2* 在褐飞虱不同发育阶段(A)及3日龄雌成虫不同组织中(B)的相对表达量

Fig. 2 Relative expression levels of *NIHECTD2* in different developmental stages (A) and tissues of the 3-day-old female adult (B) of *Nilaparvata lugens*

E: 卵 Egg; N1-5: 分别为1-5龄若虫 1st-5th instar nymphs, respectively; A0: 初羽化24 h内雌成虫 Female adults newly emerged within 24 h; A1-5: 分别为1-5日龄雌成虫 1-5-day-old female adults, respectively; He: 头 Head; Th: 胸 Thorax; Ab: 腹 Abdomen; Gu: 肠道 Gut; Ov: 卵巢 Ovary. 图中数据为平均值 ± 标准误; 柱上不同字母代表差异显著 ($P < 0.05$; 单因素方差分析, t 检验)。Data in the figure are mean ± SE. Different letters above bars indicate significant difference ($P < 0.05$; one-way ANOVA, t -test).

2.3 *NIHECTD2* 的干扰效果

相比对照(注射 *dsGFP*), 注射 *dsNIHECTD2* 后 24, 48 和 72 h 时褐飞虱雌成虫体内 *NIHECTD2* 表

达量分别极显著下降了 76.45%, 61.21% 和 64.57% ($P < 0.01$) (图 3: A); 血淋巴中 YLSs 数量分别显著降低了 59.95%, 65.80% 和 65.76% ($P <$

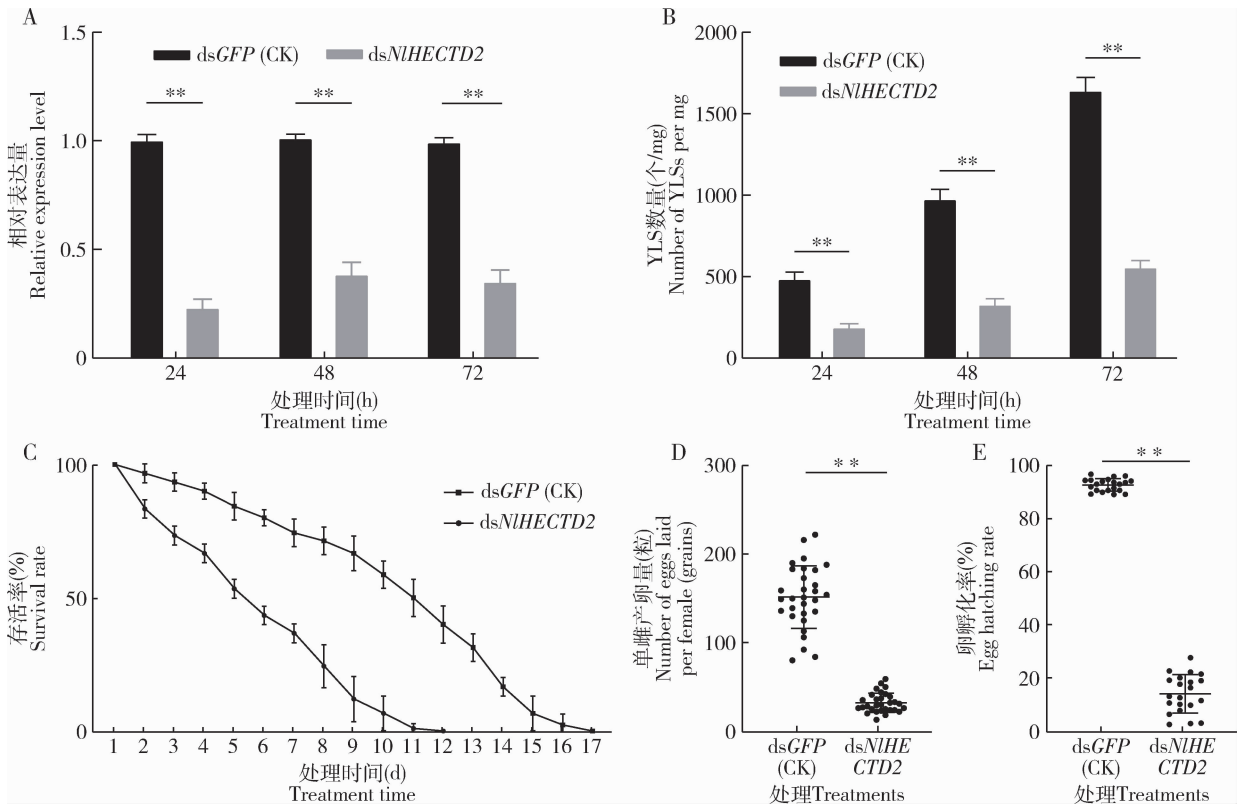


图3 RNA 干扰初羽化褐飞虱雌成虫后体内 *NIHECTD2* 的表达量(A)、血淋巴中类酵母共生菌(YLSs)数量(B)、存活率(C)、单雌产卵量(D)及卵孵化率(E)

Fig. 3 Expression level of *NIHECTD2* (A), number of yeast-like symbionts (YLSs) in hemolymph (B), survival rate (C), number of eggs laid per female (D) and egg hatching rate (E) in the newly emerged female adult of *Nilaparvata lugens* after RNA interference

图中数据为平均值 ± 标准误; 柱上双星号代表差异极显著 ($P < 0.01$; 单因素方差分析 t 检验)。Data in the figure are mean ± SE. Double asterisks above bars indicate extremely significant difference ($P < 0.05$; one-way ANOVA, t -test).

0.01)(图 3: B),表明干扰 *dsNIHECTD2* 后,会影响 YLS 的释放,并且干扰效率在不同时间不受影响。存活率检测结果表明(图 3: C),对照组(注射 *dsGFP*)褐飞虱雌成虫存活率下降斜率较小,存活曲线趋势较为平缓,注射后 17 d 时存活率为 0,即样本全部死亡,实验组(注射 *dsNIHECTD2*)褐飞虱雌成虫存活率下降较快,存活曲线趋势较陡,且注射后 12 d 时样本全部死亡,说明干扰 *NIHECTD2* 不利于褐飞虱的正常生长发育。单雌产卵量(图 3: D)和卵孵化率(图 3: E)检测结果表明,对照组(注射 *dsGFP*)褐飞虱单雌产卵量最高为 221 粒,未孵化卵数量小于 25 粒,平均卵孵化率大于 90%;而实验组(注射 *dsNIHECTD2*)褐飞虱单雌产卵量最高为 58 粒,未孵化卵数量最高为 47 粒,平均卵孵化率小于 20%,与对照组相比具有极显著差异性($P < 0.01$)。

3 讨论

本研究克隆鉴定了一个褐飞虱 HECT 类 E3 泛素连接酶基因 *NIHECTD2*,并对其序列特征以及表达模式进行分析,初步解析了该基因对褐飞虱体内 YLS 释放过程及褐飞虱生长发育的影响。

董婷婷(2022)在研究 HECT 类 E3 泛素连接酶基因 *NEDD4* 在中国卤虫 *Artemia sinica* 滞育解除后早期胚胎发育过程中的作用机制中,检测了 *As-NEDD4* 在转录水平及蛋白水平的表达模式,发现蛋白水平在 15 h 时达到峰值,转录水平在 20 h 时达到峰值,其表达模式同中国卤虫滞育解除后胚胎发育的重要阶段十分契合。相似的是,本研究中 *NIHECTD2* 在褐飞虱体内表达同样具有明显的时空特异性,*HECTD2* 表达量在褐飞虱雌成虫期显著高于卵期和若虫期的(图 2: A),在所有发育阶段中,3 日龄成虫期时其表达量最高,且随着发育阶段无明显变化。同时检测到 3 日龄成虫期后相比于初羽化褐飞虱成虫,血淋巴中 YLS 数目大幅上升(未发表),表明 *HECTD2* 表达模式同褐飞虱羽化 72 h 后进入产卵期阶段十分契合。对褐飞虱 3 日龄雌成虫的不同组织中 *NIHECTD2* 表达量的分析结果表明,*NIHECTD2* 在腹中的表达量最高,这与 YLS 主要聚集在褐飞虱雌虫腹部脂肪体情况相一致。

昆虫体内的 YLS 传递主要是经卵传播的垂直传递,在生长、发育和繁殖中起重要作用(Lee and Hou, 1987; 吕仲贤等 2001; Shentu *et al.*, 2019)。

白旭等(2009)采用血球计数法并结合显微摄像系

统,研究灰飞虱雌虫体内 YLS 的数量动态及与卵巢发育和产卵量之间的相互关系,发现产卵量与灰飞虱体内 YLS 数量存在显著的正相关,表明 YLS 的存在有利于灰飞虱卵子发育和成熟。本研究利用 RNAi 技术对 *NIHECTD2* 进行了沉默,与对照组相比,沉默 *NIHECTD2* 后的褐飞虱血淋巴中 YLS 数目极显著减少(图 3: B),且褐飞虱存活率、单雌产卵量及孵化率也极显著降低(图 3: C-E)。同样唐耀华等(2016)的研究也表明,通过 RNAi 技术干扰 *His2* 和 *His6* 影响褐飞虱体内 YLS 的数目,最终也会影响褐飞虱的存活、发育等。因此,推测 *HECTD2* 影响 YLS 从脂肪体释放到血淋巴的过程,从而导致卵母细胞内的 YLS 数量减少。因此,推测 *HECTD2* 影响 YLS 从脂肪体释放到血淋巴的过程,从而导致卵母细胞内的 YLS 数量减少,破坏褐飞虱与类酵母共生菌之间的微生态,从而导致褐飞虱生存能力及繁殖能力下降。YLS 与褐飞虱体戚与共,以 YLS 作为防治切入点是阻碍褐飞虱正常生长发育繁殖并阻止其继续为害的一种有效途径。而 *NIHECTD2* 在维持褐飞虱正常的生存及生理过程中发挥着重要作用,可以将其作为应用 RNAi 技术防控褐飞虱的潜在靶标。

参考文献 (References)

- Bai X, Dong SZ, Bian YL, Yu XP, Chen JM, 2009. The relationships between yeast-like symbiotes and ovarian development and reproduction of the small brown planthopper, *Laodelphax striatellus*. *Acta Phytology Sin.*, 36(5): 421–425. [白旭, 董胜张, 边亚琳, 俞晓平, 陈建明, 2009. 类酵母共生菌与灰飞虱卵巢发育和产卵量的关系. 植物保护学报, 36(5): 421–425]
- Cruz WDA, Chen ZY, Bullock AN, Yamada KM, 2022. Ubiquitin ligases: Guardians of mammalian development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 23(5): 350–367.
- Daniela R, Sharad K, 2009. Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 10: 398–409.
- Dong TT, 2022. The Expression and Function of *As-NEDD4* in the Restart of Diapause Embryos Restart of *Artemia* in China. MSc Thesis, Liaoning Normal University, Dalian. [董婷婷, 2022. *AsNEDD4* 在中国卤虫滞育胚胎重启中表达及功能研究. 大连: 辽宁师范大学硕士学位论文]
- Dreher K, Callis J, 2007. Ubiquitin, hormones and biotic stress in plants. *Ann. Bot.*, 99(5): 787–822.
- Ho SR, Lee YJ, Lin WC, 2015. Regulation of RNF144A E3 ubiquitin ligase activity by self-association through its transmembrane domain. *J. Biol. Chem.*, 290(38): 23026–23038.
- Huang HJ, Liu CW, Zhou X, Zhang CX, Bao YY, 2017. A

- in its insect vector. *Virus Res.*, 229: 48–56.
- Irene S, Campos L, Rivas S, 2018. Roles of E3 ubiquitin-ligases in nuclear protein homeostasis during plant stress responses. *Front. Plant Sci.*, 9: 139.
- Ju JF, Bing XL, Zhao DS, Guo Y, Xi ZY, Hoffmann AA, Zhang KJ, Huang HJ, Gong JT, Zhang X, Hong XY, 2020. *Wolbachia* supplement biotin and riboflavin to enhance reproduction in planthoppers. *ISME J.*, 14(3): 676–687.
- Lee YH, Hou RF, 1987. Physiological roles of a yeast-like symbiote in reproduction and embryonic development of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål). *J. Insect Physiol.*, 33(11): 851–860.
- Liao SC, Wang FY, Li LF, 2011. The control strategy of *Nilaparvata lugens*. *Chin. Agric. Sci. Bull.*, 27(7): 240–244. [廖世纯, 王凤英, 黎柳锋, 2011. 水稻褐飞虱防控策略. 中国农学通报, 27(7): 240–244]
- Liao X, Xu PF, Gong PP, Wan H, Li JH, 2021. Current susceptibilities of brown planthopper *Nilaparvata lugens* to triflumezopyrim and other frequently used insecticides in China. *Insect Sci.*, 28(1): 115–126.
- Lin YJ, Hua HX, He YQ, Yang CJ, Zhai BP, Shen JL, Zhang KJ, Xue XF, Fu Q, Luo J, Lou YG, Zhu ZR, Tang QY, Lv ZX, Xu HX, Zheng XS, Huang FK, Peng ZP, He GC, Chen RZ, Guo HF, Chen QZ, Wan BL, Lv L, Lin HF, Liu F, Xiao HX, Hou ML, Yao YJ, 2011. Progress in research on the integrated management of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål) in China. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 48(5): 1194–1201. [林拥军, 华红霞, 何予卿, 杨长举, 翟保平, 沈晋良, 张开军, 薛晓峰, 傅强, 罗举, 娄永根, 祝增荣, 唐启义, 吕仲贤, 徐红星, 郑许松, 黄凤宽, 彭兆谱, 何光存, 陈荣智, 郭慧芳, 陈其志, 万丙良, 吕亮, 林华峰, 刘芳, 肖汉祥, 侯茂林, 姚英娟, 2011. 水稻褐飞虱综合治理研究与示范: 农业公益性行业专项“水稻褐飞虱综合防控技术研究”进展. 应用昆虫学报, 48(5): 1194–1201]
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method. *Methods*, 25(4): 402–408.
- Lv J, Zhu ZR, Lou YG, Cheng JA, 2013. Review of research into outbreaks and management of rice planthoppers. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 50(3): 565–574. [吕进, 祝增荣, 娄永根, 程家安, 2013. 稻飞虱灾变和治理研究透析. 应用昆虫学报, 50(3): 565–574]
- Lv ZX, Yu XP, Chen JM, Zheng XS, Xu HX, 2001. The effect of endosymbiote on the development and reproduction of brown planthopper(Stål). *J. Plant Prot.*, 28(3): 193–197. [吕仲贤, 俞晓平, 陈建明, 郑许松, 徐红星, 2001. 共生菌对褐飞虱生长发育和生殖的影响. 植物保护学报, 28(3): 193–197]
- Metzger MB, Hristova VA, Weissman AM, 2012. HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance. *J. Cell Sci.*, 125(Pt 3): 531–537.
- Patra B, Pattanaik S, Yuan L, 2013. Ubiquitin protein ligase 3 mediates the proteasomal degradation of GLABROUS 3 and ENHANCER OF GLABROUS 3, regulators of trichome development and flavonoid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J.*, 74(3): 435–447.
- Qin T, Liu SM, Zhang ZN, Zhang ZN, Sun LQ, He X, Lindsey K, Zhu LF, Zhang XL, 2019. GhCyP3 improves the resistance of cotton to *Verticillium dahliae* by inhibiting the E3 ubiquitin ligase activity of GhPUB17. *Plant Mol. Biol.*, 99(4/5): 379–393.
- Shentu XP, Wang XL, Xiao Y, Yu XP, 2019. Effects of fungicide propiconazole on the yeast-like symbiotes in brown planthopper (BPH, *Nilaparvata lugens* Stål) and its role in controlling BPH infestation. *Front. Physiol.*, 10: 89.
- Tang M, Xu XR, Hong K, Yi Y, 2014. Distribution of bacterial symbionts in brown planthopper. *Guizhou Agric. Sci.*, 42(2): 89–91, 94. [唐明, 徐小蓉, 洪鲲, 乙引, 2014. 褐飞虱体内细菌型共生菌的分布. 贵州农业科学, 42(2): 89–91, 94]
- Tang YH, Wan PJ, Hao PY, Fu Q, Yu XP, 2016. Roles of two genes involved in histidine biosynthetic pathway in yeast-like symbiont in development of *Nilaparvata lugens* (Stål). *Chin. J. Rice Sci.*, 30(4): 406–416. [唐耀华, 万品俊, 郝培应, 傅强, 俞晓平, 2016. 酵母共生菌中两个组氨酸合成基因在褐飞虱发育中的作用. 中国水稻科学, 30(4): 406–416]
- Win SS, Muhamad R, Ahmad ZAM, Adam NA, 2011. Population fluctuations of brown plant hopper *Nilaparvata lugens* Stal. and white backed plant hopper *Sogatella furcifera* Horvath on rice. *J. Entomol.*, 8(2): 183–190.
- Xia ZL, Su XH, Liu JJ, Wang MP, 2013. The RING-H2 finger gene 1 (*RHF1*) encodes an E3 ubiquitin ligase and participates in drought stress response in *Nicotiana tabacum*. *Genetica*, 141(1): 11–21.
- Xu WY, Fang XD, Cao Q, Gao Q, Gao DM, Qiao JH, Zang Y, Xie L, Ding ZH, Yang YZ, Wang Y, Wang XB, 2022. A cytorhabdovirus-based expression vector in *Nilaparvata lugens*, *Laodelphax striatellus*, and *Sogatella furcifera*. *Insect Biochem Mol. Biol.*, 140: 103703.
- Xue J, Zhou X, Zhang CX, Yu LL, Fan HW, Wang Z, Xu HJ, Xi Y, Zhu ZR, Zhou WW, Pan PL, Li BL, Colbourne JK, Noda H, Suetsugu Y, Kobayashi T, Zheng Y, Liu SL, Zhang R, Liu Y, Luo YD, Fang DM, Chen Y, Zhan DL, Lv XD, Cai Y, Wang ZB, Huang HJ, Cheng RL, Zhang XC, Lou YH, Yu B, Zhuo JC, Ye YX, Zhang WQ, Shen ZC, Yang HM, Wang J, Bao YY, Cheng JA, 2014. Genomes of the rice pest brown planthopper and its endosymbionts reveal complex complementary contributions for host adaptation. *Genome Biol.*, 15(12): 521.
- Yukuhiro F, Miyoshi T, Noda H, 2014. Actin-mediated transovarial transmission of a yeastlike symbiont in the brown planthopper. *J. Insect Physiol.*, 60: 111–117.
- Zhang JF, Chen JM, Chen FJ, Zheng XS, Chen LZ, Yu XP, 2009. The isolation of yeast-like-symbiotes in the brown planthopper and the sequences analysis of its 26S rDNA. *J. Chin. Agric. Sci.*, 42(6): 2211–2216. [张珏锋, 陈建明, 陈法军, 郑许松, 陈列忠, 俞晓平, 2009. 褐飞虱内共生菌的分离及其26S rDNA部分序列分析. 中国农业科学, 42(6): 2211–2216]
- Zhou BJ, Zeng LR, 2017. Conventional and unconventional ubiquitination in plant immunity. *Mol. Plant. Pathol.*, 18(9): 1313–1330.