



核受体基因 *SfUSP* 调控白背飞虱蜕皮发育

周 操^{1, #}, 龚明富^{2, #}, 杨熙彬², 杨 洪^{2, *}, 龙贵云²,
贾泽艳², 曾庆会², 金道超²

(1. 重庆师范大学昆虫与分子生物学研究所, 媒介昆虫重庆市重点实验室, 重庆 401331;

2. 贵州大学昆虫研究所, 贵州山地农业病虫害重点实验室, 农业部贵阳作物有害生物科学观测试验站, 贵阳 550025)

摘要:【目的】为探究核受体超气门蛋白 (ultraspiracle protein, USP) 在白背飞虱 *Sogatella furcifera* 若虫蜕皮发育过程中的功能及其与几丁质合成和降解之间的调控关系。【方法】基于白背飞虱基因组数据, 结合 RT-PCR 克隆 *SfUSP* 全长 cDNA 序列; 利用 RT-qPCR 测定白背飞虱不同发育阶段 (1–5 龄若虫、5 龄若虫蜕皮前、5 龄若虫蜕皮中和雌成虫)、5 龄若虫组织 (头、体壁、脂肪体、肠道和足)、雌成虫组织 (体壁、翅、脂肪体、足和卵巢) 以及 100 ng/头 20E 处理后 5 龄第 1 天若虫中 *SfUSP* 的表达量; 通过显微注射 dsRNA 靶向沉默 5 龄第 1 天若虫的 *SfUSP* 后, 计算若虫存活率, 观察若虫致死表型, 利用 RT-qPCR 测定几丁质合成和降解通路关键基因的表达量。【结果】克隆获得了白背飞虱 *SfUSP* (GenBank 登录号: ON209396) 的全长 cDNA 序列, 其开放阅读框长 1 263 bp, 编码 420 个氨基酸, *SfUSP* 蛋白预测分子量为 47.27 kD, 理论等电点为 7.18。序列分析结果表明, *SfUSP* 含有核受体家族所具备的 5 个保守结构域, 并且 DNA 结合域 (DNA-binding domain, DBD) 和配体结合域 (ligand-binding domain, LBD) 高度保守。发育阶段表达谱表明, *SfUSP* 在 1 龄若虫、5 龄若虫蜕皮前以及雌成虫中高表达; 组织表达谱显示, *SfUSP* 在 5 龄若虫头、体壁、脂肪体和肠道中的表达量较高; 在雌成虫翅、足和体壁中的表达量较高。显微注射 100 ng/头 20E 后 12 h 时, 5 龄若虫中 *SfUSP* 的表达量显著高于对照组的。靶向沉默 *SfUSP* 表达后, 与注射 dsGFP 的对照组相比, 显著降低了白背飞虱的若虫存活率, 显微注射 dsRNA 6 d 时若虫存活率仅为对照组的 18.01%, 其中不能成功蜕皮个体占 51.46%; 显著抑制了几丁质合成通路关键基因 *SfCHS1*, *SfCHS1a*, *SfUAP*, *SfGFAT* 和几丁质降解通路关键基因 *SfChit7*, *SfNAG1*, *SfNAG2*, *SfCDA1*, *SfCDA2* 和 *SfCDA4* 的表达量, 但是显著提高了 *SfG6PI* 和 *SfChit10* 的表达量。【结论】*SfUSP* 是白背飞虱生长发育过程中的关键基因, 能够影响几丁质的合成与降解, 进而调控白背飞虱的蜕皮发育。

关键词: 白背飞虱; 超气门蛋白; 蜕皮激素; 几丁质合成与降解; 蜕皮

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2023)05-0609-10

Nuclear receptor gene *SfUSP* regulates the molting development of the white-backed planthopper, *Sogatella furcifera* (Hemiptera: Delphacidae)

ZHOU Cao^{1, #}, GONG Ming-Fu^{2, #}, YANG Xi-Bin², YANG Hong^{2, *}, LONG Gui-Yun², JIA Ze-Yan², ZENG Qing-Hui², JIN Dao-Chao² (1. Chongqing Key Laboratory of Vector Insects, Institute of Entomology and Molecular Biology, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China;

基金项目: 重庆市自然科学基金面上项目 (cstc2021jcyj-msxmX0235); 重庆师范大学基金项目 (21XLB010); 国家自然科学基金地区基金项目 (31960537)

作者简介: 周操, 男, 1991 年 2 月生, 重庆开州人, 讲师, 研究方向为有害生物综合防治, E-mail: zhouc@cqu.edu.cn; 龚明富, 男, 1997 年 12 月生, 贵州兴义人, 硕士研究生, 研究方向为农业昆虫与害虫防治, E-mail: gongmingfu2019@126.com

共同第一作者 Authors with equal contribution

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

收稿日期 Received: 2022-08-30; 接受日期 Accepted: 2022-10-12

2. Guizhou Provincial Key Laboratory for Agricultural Pest Management of the Mountainous Region, Scientific Observing and Experimental Station of Crop Pests in Guiyang, Ministry of Agriculture, Institute of Entomology, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: 【Aim】To explore the function of nuclear receptor ultraspiracle protein (USP) in the molting development of *Sogatella furcifera* nymph and its regulatory relationship with chitin synthesis and degradation. 【Methods】Based on the genome data of *S. furcifera*, the full-length cDNA sequence of *SfUSP* was amplified by RT-PCR. The expression levels of *SfUSP* in different developmental stages (1st–5th instar nymphs, 5th instar nymph prior to ecdysis, 5th instar nymph during ecdysis and female adult), tissues (head, integument, fat body, gut and leg) of the 5th instar nymph, female adult tissues (integument, wing, fat body, leg and ovary) and the day-1 5th instar nymph of *S. furcifera* after treatment with 100 ng/individual of 20E were detected by RT-qPCR. After the targeted silencing of *SfUSP* by microinjection of dsRNA into the day-1 5th instar nymph, the nymphal survival rate was calculated, the lethal phenotype of nymphs was observed and the expression levels of the key genes in chitin synthesis and degradation pathways were determined by RT-qPCR. 【Results】The full-length cDNA sequence of *SfUSP* (GenBank accession number: ON209396) of *S. furcifera* was obtained by cloning, with an open reading frame of 1 263 bp in length, encoding 420 amino acids. The predicted molecular weight of *SfUSP* is 47.27 kD with the theoretical isoelectric point of 7.18. Sequence analysis result showed that *SfUSP* contains five conserved domains of nuclear receptor family, and DNA-binding domain (DBD) and ligand-binding domain (LBD) are highly conserved. The developmental stage expression profiles showed that *SfUSP* was highly expressed in the 1st instar nymph, and the 5th instar nymphs prior to ecdysis and female adult. The tissue expression profiles showed that *SfUSP* was expressed highly in the head, integument, fat body and gut of the 5th instar nymphs, and in the wing, leg and integument of the female adult. In addition, at 12 h after microinjection of 20E (100 ng/individual), the expression level of *SfUSP* in the 5th instar nymph was significantly increased as compared with that in the control group. After targeted silencing of *SfUSP* expression, the nymphal survival rate of *S. furcifera* was significantly reduced compared with the control group (injected with ds*GFP*) and only 18.01% of that of the control group at 6 d after microinjection of dsRNA, with 51.46% individuals unable to molt successfully. In addition, after targeted silencing of *SfUSP* expression, the expression levels of the key genes *SfCHS1*, *SfCHS1a*, *SfUAP* and *SfGFAT* in chitin synthesis pathways and *SfCht7*, *SfNAG1*, *SfNAG2*, *SfCDA1*, *SfCDA2* and *SfCDA4* in chitin degradation pathways were significantly inhibited, but those of *SfG6PI* and *SfCht10* were significantly increased as compared with those in the control group microinjected with ds*GFP*. 【Conclusion】*SfUSP* is a key gene in the growth and development of *S. furcifera*, which can affect the synthesis and degradation of chitin, and then regulates the ecdysis development of *S. furcifera*.

Key words: *Sogatella furcifera*; ultraspiracle protein; molting hormone; chitin synthesis and degradation; ecdysis

昆虫的蜕皮与变态发育主要是由蜕皮激素和保幼激素共同调控 (Dubrovsky, 2005), 除此之外, 蜕皮激素在昆虫先天免疫和繁殖等众多生理活动中同样具有重要的调控作用 (Han *et al.*, 2020; 张乃元等, 2021; Li *et al.*, 2022)。在昆虫蜕皮过程中, 20-羟基蜕皮酮 (20-hydroxyecdysone, 20E) 通过与蜕皮激素受体 (ecdysteroid receptor, EcR) 和超气门蛋白 (ultraspiracle protein, USP) 形成的异源二聚物受体

结合, 激活 *E75*, *E93*, *FTZ-F1*, *E74* 和 *HR3* 等下游转录因子, 进而调控昆虫蜕皮和变态等生理活动 (柳鹏飞等, 2021)。

USP 是视黄素 X 受体 (retinoid X receptor, RXR) 的同源物, 在许多昆虫中具有两种 USP 亚型, 例如: 烟草天蛾 *Manduca sexta* (Jindra *et al.*, 1997)、埃及伊蚊 *Aedes aegypti* (Wang *et al.*, 2000)、伸展摇蚊 *Chironomus tentans* (Vögli *et al.*, 1996) 和拟谷

盗 *Tribolium castaneum* (Tan and Palli, 2008) 和草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* (Giraud et al., 2013) 等。*USP* 作为昆虫生长发育、变态及繁殖等生理过程级联调控的关键基因,在蜕皮激素诱导的级联反应中发挥着重要作用。在赤拟谷盗中研究发现, RNAi 沉默 *TcUSPA* 和 *TcUSPB* 的共同区域,导致幼虫-蛹变态过程中发育缺陷死亡 (Tan and Palli, 2008); RNAi 沉默麦长管蚜 *Sitobion avenae SaUSP* 后显著降低了蚜虫的存活率和繁殖力 (Yan et al., 2016); 另外, RNAi 沉默舞毒蛾 *Lymantria dispar LdUSP* 后,导致 3 龄幼虫发育延缓和幼虫死亡率显著增加 (Wen et al., 2020)。

白背飞虱 *Sogatella furcifera* 是一种典型的 r-对策害虫,且具有远距离迁飞习性,易暴发成灾 (弓少龙和侯茂林, 2017)。同时,白背飞虱是南方水稻矮缩病毒的主要传播媒介,严重威胁水稻的产量和品质 (张彤和周国辉, 2017)。目前,对于该虫的防治主要是依靠化学防治,但由于杀虫剂大量和不合理使用,导致白背飞虱对多种杀虫剂产生了严重的抗性 (Ali et al., 2019; Ruan et al., 2021; 张帅, 2021)。*USP* 作为昆虫蜕皮激素信号通路传导中的关键转录因子,在昆虫蜕皮和变态等生理过程中发挥着重要作用,可作为潜在的害虫防治靶标。本研究基于已公布的白背飞虱基因组数据,围绕白背飞虱蜕皮激素信号通路核受体基因 *SfUSP* 在其蜕皮发育过程中的调控作用及其对几丁质合成和降解关键基因的调控模式这一关键科学问题,利用 RT-qPCR 技术解析 *SfUSP* 在不同发育阶段、5 龄若虫不同组织和 20E 诱导下的表达模式,并通过 RNAi 技术分析 *SfUSP* 在白背飞虱生长发育过程中的功能,以及沉默 *SfUSP* 后对几丁质合成和降解通路关键基因表达水平的影响。该研究结果不仅能明确 *SfUSP* 在白背飞虱蜕皮发育过程中的功能,还进一步明确 *SfUSP* 与几丁质合成和降解之间的调控关系,为基于 RNAi 害虫防治新的靶标基因的筛选提供参考。

1 材料与方 法

1.1 供试昆虫

本研究所使用白背飞虱均为室内敏感种群 (周操等, 2022),使用 TN1 水稻于室内温度 (25 ± 1) °C、相对湿度 70% ± 5% 和光周期 16L:8D 条件下饲养。

1.2 总 RNA 的提取及 cDNA 第 1 链的合成

将收集的白背飞虱样品使用 HP Total RNA Kit 按照陈春旭等 (2019) 的方法,以无水乙醇为溶

试剂盒 (Omega, 美国) 提取总 RNA (Zhou et al., 2021), 并使用 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa, 日本) 试剂盒合成 cDNA 第 1 链 (Zhou et al., 2021)。

1.3 *SfUSP* 克隆

使用 BioEdit 软件 (<https://www.softpedia.com/get/Science-CAD/BioEdit.shtml>) 构建白背飞虱本地基因组数据库,以褐飞虱 *Nilaparvata lugens NUSP* 序列为模板进行查找,初步获得白背飞虱 *SfUSP* 基因序列,通过 Primer Premier 6.0 软件设计引物 (表 1),并使用 2 × Taq PCR StarMix with Loading Dye 试剂 (GenStar, 北京) 以 RT-PCR 法对基因组中获得的序列进行验证。PCR 反应采用体系 (25 μL): cDNA 模板 1 μL, StarMix 12.5 μL, 上下游引物 (10 μmol/L) 各 1 μL, ddH₂O 9.5 μL。反应程序: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 2 °C 延伸 2 min, 共 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经电泳检测合格后采用 EasyPure® Quick Gel Extraction Kit (全式金生物, 北京) 试剂盒对目的条带进行回收与纯化,将得到的目的条带进行 TA 克隆,并将克隆后的产物送往公司进行测序。

1.4 序列分析

首先利用 ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 分析 *SfUSP* 开放阅读框; 运用 DNAMAN 推导其编码氨基酸序列并进行多重序列比对分析; 通过 Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) 和 SMART 在线网站 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 预测其编码蛋白保守结构域; 使用 ProtParam 对蛋白质的理化性质进行预测。采用 MEGA6.0 软件中的邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构建系统发育树,设定 bootstrap 值为 1 000 次检验。

1.5 RT-qPCR 测定

将初羽化的白背飞虱雌成虫和雄成虫配对,并采用试管法进行饲养,每 2 d 更换 1 次水稻苗。收集 1 龄、2 龄 1–2 d、3 龄 1–3 d、4 龄 1–3 d 和 5 龄 1–3 d 若虫及 5 龄若虫蜕皮前 (5 龄 4 d)、5 龄若虫蜕皮中、初羽化 0–10 min 成虫 (蜕皮后) 和羽化 1–4 d 雌成虫。每个样品包含 15~40 头白背飞虱,作为 1 个生物学重复。收集 150 头白背飞虱 5 龄若虫在 PBS 中解剖头、体壁、脂肪体、肠道和足,作为 1 个生物学重复。在雌成虫羽化 5 d 后 (未交配) 收集 100 头,在 PBS 中解剖体壁、翅、脂肪体、足和卵巢,作为 1 个生物学重复。

表 1 本研究所用引物
Table 1 Primers used in this study

基因 Genes	引物 Primers	引物序列(5' - 3') Primer sequences	用途 Purpose	
<i>SfUSP</i>	USP-F1	ATGGCGAAGGTCATGGTGT	RT-PCR	
	USP-R1	TGTGGAAACTGCTGGTTGATTC		
	USP-F2	CAAGAGGACAGTGAGGAAAGAC		
	USP-R2	AAGTTTGTGTATGCGTTAGGG		
<i>SfUSP</i>	Y-USP-F	AGTCGCCGTTGAAATGAAGC	RT-qPCR	
	Y-USP-R	GGTAGGGTGAAGTGGCTGACTG		
<i>SfRPL9</i>	Y-RPL9-F	GGGCGAGAAGTACATCCGTAGG		
	Y-RPL9-R	GCGGCTGATCGTGAGACATCTT		
<i>SfNAG1</i>	Y-NAG1-F	GCGACGAGGTCCAGTTCAAGTG		
	Y-NAG1-R	GCCTGCGGTGATTGTTGGT		
<i>SfNAG2</i>	Y-NAG2-F	CGGTCATACGGCCATCACTCAA		
	Y-NAG2-R	GCAGTTCGCTCCACATTCAGTT		
<i>SfUSP</i>	i-USP-F	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> TCAAGAGGACAGTGAGGAA		RNAi
	i-USP-R	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> GAACGCCGCTATCAGAAG		
<i>GFP</i>	GFP-F	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> GCCAACACTTGCTACTACTT		
	GFP-R	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> GGACTATTTGTGTGATAATGGTCTG		

下划线序列表示 T7 启动子序列。Underlined sequence indicates the T7 promoter sequence.

剂配制浓度为 1 000 ng/ μ L 的 20E 溶液,采用显微注射法对白背飞虱 5 龄第 1 天若虫进行注射,每头试虫注射量为 100 ng,以注射等体积的乙醇为对照组,分别收集注射后 6, 9 和 12 h 的白背飞虱样品 8 ~ 10 头,迅速置于液氮速冻后放至 -80°C 保存待用。

所有的样品均设置 3 个生物学重复,以 FastStart Essential DNA Green Master 试剂盒,通过 RT-qPCR 法对 *SfUSP* 的表达量进行测定,以 *SfRPL9* 为内参基因。反应体系:上下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, FastStart Essential DNA Green Master 10 μ L, cDNA 模板 1 μ L, ddH₂O 8 μ L。反应程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 退火并延伸 30 s, 40 个循环;60 ~ 95 $^{\circ}\text{C}$ 生成熔解曲线。每个样品进行 3 次技术重复。

1.6 RNAi

使用 Primer Premier 6.0 软件设计 *SfUSP* 和 *GFP*(GenBank 登录号:CAA58789)的 dsRNA 引物(表 1),并通过 E-RNAi (<http://www.dkfz.de/signaling/e-rnai3/>)检测 dsRNA 合成引物靶标区域,通过 NCBI Blast 比对合成 dsRNA 的靶标区域,确定与其他基因是否具有较高的同源性,从而降低目的基因沉默过程中脱靶的概率。使用 TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit 试剂盒(Thermo, 美国)

参照其说明书合成和纯化 dsRNA,通过 NanoDrop 2000 (Thermo, 美国)测定纯化后的 dsRNA 浓度,并将其稀释至 1 000 ng/ μ L 备用。

参照周操等(2022)的方法,选取 5 龄第 1 天若虫进行显微注射 dsRNA。每头试虫注射 0.1 μ L ds*SfUSP*,同时以注射等体积 ds*GFP* 作为对照。每个处理注射 30 头,设置 5 个生物学重复,注射完成后,将试虫放入人工气候箱中正常饲养(饲养条件同 1.1 节),每天观察 1 次死亡情况,其中第 1 天死亡的虫体被认为是由于机械损伤造成的死亡,忽略不计,在注射后第 2 天开始统计若虫存活率,连续观察 6 d,并将死亡的虫体挑出拍照记录表型情况,最后统计若虫存活率,观察若虫致死表型。同时,注射 dsRNA 后 48 和 72 h 时,随机挑取实验组和对照组存活虫体 6 ~ 10 头,利用 RT-qPCR 测定靶标基因表达量(方法同 1.5 节),分析干扰效率。

1.7 RT-qPCR 测定 *SfUSP* RNAi 后几丁质合成和降解通路关键基因表达量

显微注射 dsRNA 后 72 h 时,随机挑取实验组和对照组存活虫体 6 ~ 10 头,每个处理设置 3 个生物学重复,采用 RT-qPCR 法测定白背飞虱几丁质合成通路关键基因 *SfTre1*, *SfTre2*, *SfG6PI*, *SfGFAT*, *SfRACM*, *SfUAR*, *SfCHS1*, *SfCHS10* 和几丁质降解通

路关键基因,包括几丁质降解酶系中的几丁质酶基因 *SfCht5*, *SfCht10* 和 *SfCht7*,几丁质脱乙酰基酶基因 *SfCDA1*, *SfCDA2* 和 *SfCDA4*,几丁质乙酰己糖胺酶基因 *SfNAG1* 和 *SfNAG2* 的表达量。参照已报道的上述基因引物(王召, 2019; Yang *et al.*, 2021a, 2021b)进行 RT-qPCR (方法同 1.5 节),*SfNAG1* 和 *SfNAG2* 的引物见表 1。

1.8 数据分析

RT-qPCR 结果通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行基因相对表达量计算,并用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,数据以平均值 \pm 标准误表示。*SfUSP* 在不同发育阶段和不同组织表达量的差异显著性使用 Tukey 氏 HSD 法进行多重比较分析;其余数据使用独立样本 *t* 检验进行差异显著性分析。

2 结果

2.1 *SfUSP* 基因克隆与序列

基于白背飞虱基因组中所获得的白背飞虱 *USP*

的 cDNA 序列,并通过 RT-PCR 技术对其进行验证后,经 NCBI 网站进行同源比对分析,确定其为蜕皮激素信号通路核受体超气门蛋白(USP)基因,将其命名为 *SfUSP* (GenBank 登录号: ON209396)。*SfUSP* 的 ORF 序列长 1 263 bp,编码 420 个氨基酸,预测分子量为 47.27 kD,理论等电点为 7.18。保守结构域分析发现,*SfUSP* 具有核受体家族所具备的 5 个保守结构域,并且在 DNA 结合域(DNA-binding domain, DBD)中包含两个锌指区域(图 1)。序列的多重比对结果显示白背飞虱 *SfUSP* 氨基酸序列与其他昆虫的 USP 序列具有较高的一致性,尤其是 DBD 和配体结合域(ligand-binding domain, LBD)具有高度的保守性(图 1)。系统发育树显示,白背飞虱 *SfUSP* 氨基酸序列与同为稻飞虱的灰飞虱 *Laodelphax striatellus* 和褐飞虱聚集在同一个分支上,具有较近的亲缘关系,然后再与温带臭虫 *Cimex lectularius* 形成半翅目分支(图 2),进一步证明 USP 在昆虫进化上高度保守。

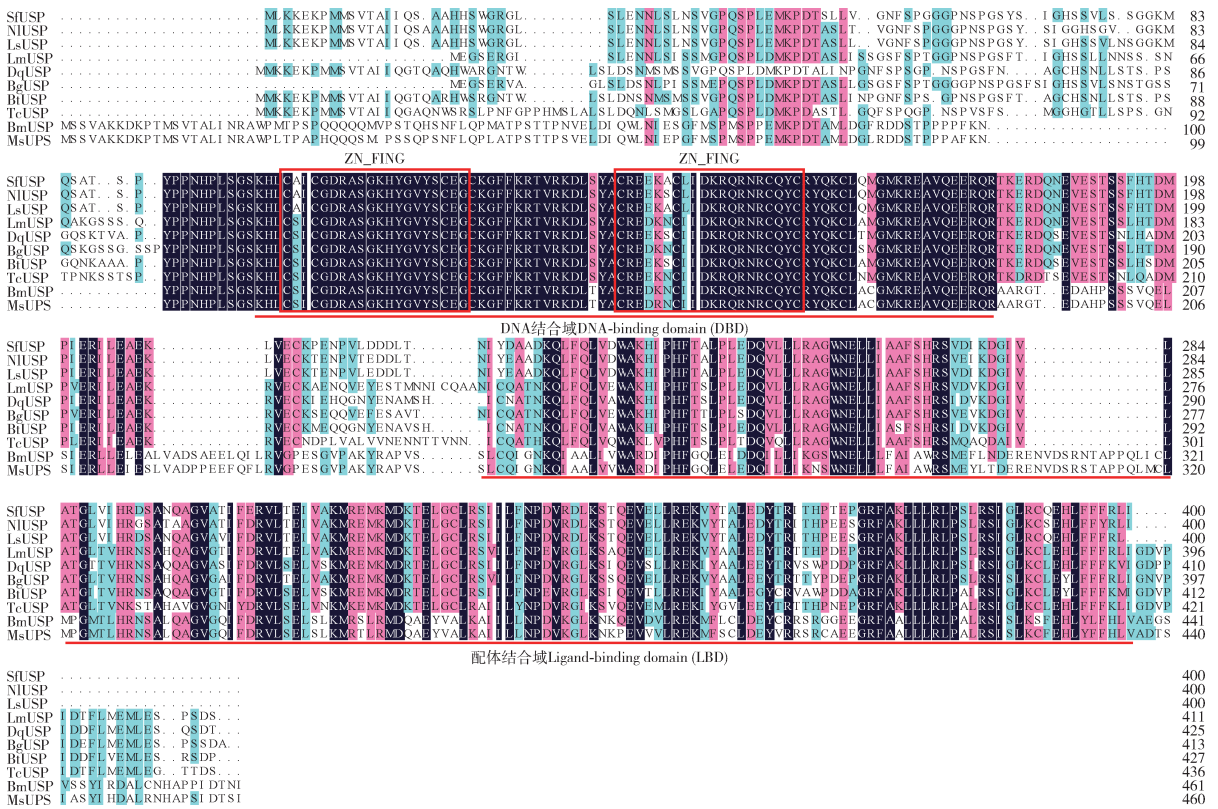


图 1 USPs 氨基酸序列比对

Fig. 1 Amino acid sequence alignment of USPs

蛋白来源物种和 GenBank 登录号 Protein origin species and GenBank accession numbers; SfUSP: 白背飞虱 *Sogatella furcifera*, ON209396; NIUSP: 褐飞虱 *Nilaparvata lugens*, AOY34794.1; LsUSP: 灰飞虱 *Laodelphax striatellus*, RZF38004.1; LmUSP: 飞蝗 *Locusta migratoria*, AAQ55293.1; DqUSP: 方头恐猛蝗 *Dinoponera quadricipes*, XP_014489099.1; BgUSP: 德国小蠊 *Blattella germanica*, CAH69897.1; BtUSP: 欧洲熊蜂 *Bombus terrestris*, XP_003397991.1; TeUSP: 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*, XP_008192984.1; BmUSP: 家蚕 *Bombyx mori*, XP_012548309.1; MsUSP: 烟草天蛾 *Manduca sexta*, XP_030036661.1. 红色下划线分别表示 DBD 和 LBD,红色方框表示锌指结构域(ZN_FING). DBD and LBD are highlighted by red lines. Red box indicates zinc finger domain (ZN_FING).

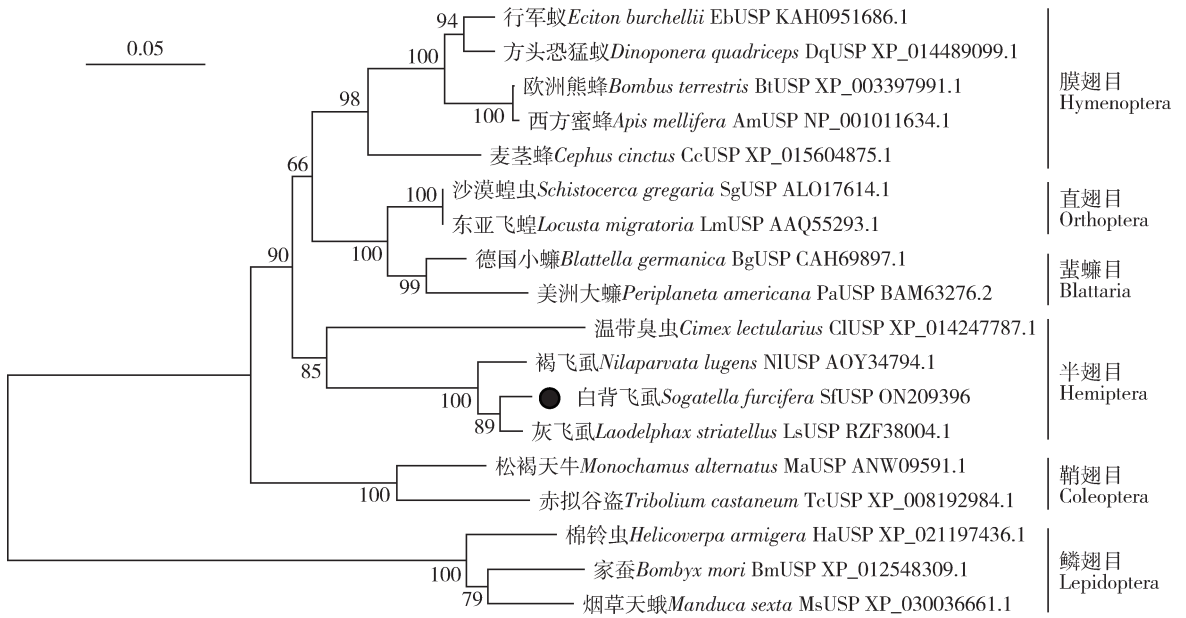


图2 邻接法构建的基于氨基酸序列的白背飞虱 SfUSP 和其他昆虫 USPs 的系统发育树(1 000 次重复)

Fig. 2 Phylogenetic tree of SfUSP from *Sogatella furcifera* and USPs from other insects constructed by neighbor-joining method based on amino acid sequence (1 000 replicates)

2.2 SfUSP 时空表达及 20E 调控模式

不同发育阶段表达谱表明(图 3: A), *SfUSP* 在白背飞虱 5 龄若虫蜕皮前(5 龄 4 d) 出现一个表达高峰期, 但是开始蜕皮后, 其表达量急剧降低, 等蜕皮完成到雌成虫其表达量再次升高; 除此之外, 在 1 龄若虫阶段也具有较高的表达量。不同组织中表达谱表明(图 3: B), *SfUSP* 在白背飞虱 5 龄若虫和雌成虫的各个组织均有表达, 但表达模式存在一定的差异, *SfUSP* 在 5 龄若虫头、体壁、脂肪体和肠道中的表达量较高, 在足中的表达量较低; 在雌成虫翅中表达量较高, 在足中表达量次之, 然后是在体壁中的, 在脂肪体和卵巢中表达量较低。另外, 注射 20E 后 12 h 时, 5 龄若虫 *SfUSP* 的表达量较注射等体积乙醇的对照组的显著升高 ($P < 0.01$), 为对照组的 1.42 倍。

2.3 SfUSP RNAi 后对白背飞虱生长发育的影响

根据 *SfUSP* 在白背飞虱不同发育阶段的表达模式, 选择 5 龄第 1 天若虫进行 RNAi 实验。RT-qPCR 检测结果表明, 在显微注射 ds*SfUSP* 后 48 和 72 h 时, 靶标基因的表达量与注射 ds*GFP* 的对照组比较分别显著下调了 76.59% ($P < 0.05$) 和 73.18% ($P < 0.01$), 表明 *SfUSP* 已被成功沉默(图 4: A)。

沉默 *SfUSP* 后, 与注射 ds*GFP* 的对照组比, 导致白背飞虱若虫出现了明显的致死现象, 显著降低了白背飞虱的若虫存活率 ($P < 0.01$), 处理 2 和 3 d

时的若虫存活率分别为 81.51% 和 70.55%; 到 6 d 时存活率仅为 16.68%, 而对照组存活率为 93.24% (图 4: B)。进一步观察发现, 其致死原因主要是不能成功蜕皮(占 51.46%), 其致死表型大致可分为两类, P1: 虫体旧表皮开裂, 但未全部蜕去或旧表皮在尾部形成拖尾等蜕皮失败表型(27.90%); P2: 旧表皮并未开裂, 在蜕皮阶段死亡或身体细长的表型(23.56%) (图 4: C)。除此之外, 在羽化后其死亡率也显著高于对照组。

2.4 SfUSP RNAi 后对几丁质合成和降解通路关键基因表达量的影响

靶向沉默 *SfUSP* 后, 与显微注射 ds*GFP* 的对照组比较, 几丁质合成通路关键基因 *SfCHS1* 的表达量显著降低 ($P < 0.05$), *SfCHS1a*, *SfGFAT* 和 *SfUAP* 的表达量极显著降低 ($P < 0.01$), 而 *SfTre1*, *SfTre2* 和 *SfPAGM* 的表达量无显著变化 ($P > 0.05$), 但 *SfG6PI* 的表达量极显著提高 ($P < 0.01$) (图 5); 几丁质降解通路关键基因 *SfCDA1* 和 *SfCDA4* 的表达量也显著降低 ($P < 0.05$), *SfCh7*, *SfNAG1*, *SfNAG2* 和 *SfCDA2* 的表达量极显著降低 ($P < 0.01$), *SfCh5* 的表达量无显著变化 ($P > 0.05$), 但 *SfCh10* 的表达量极显著提高 ($P < 0.01$) (图 5)。

3 讨论

在本研究获得了白背飞虱蜕皮激素信号传导

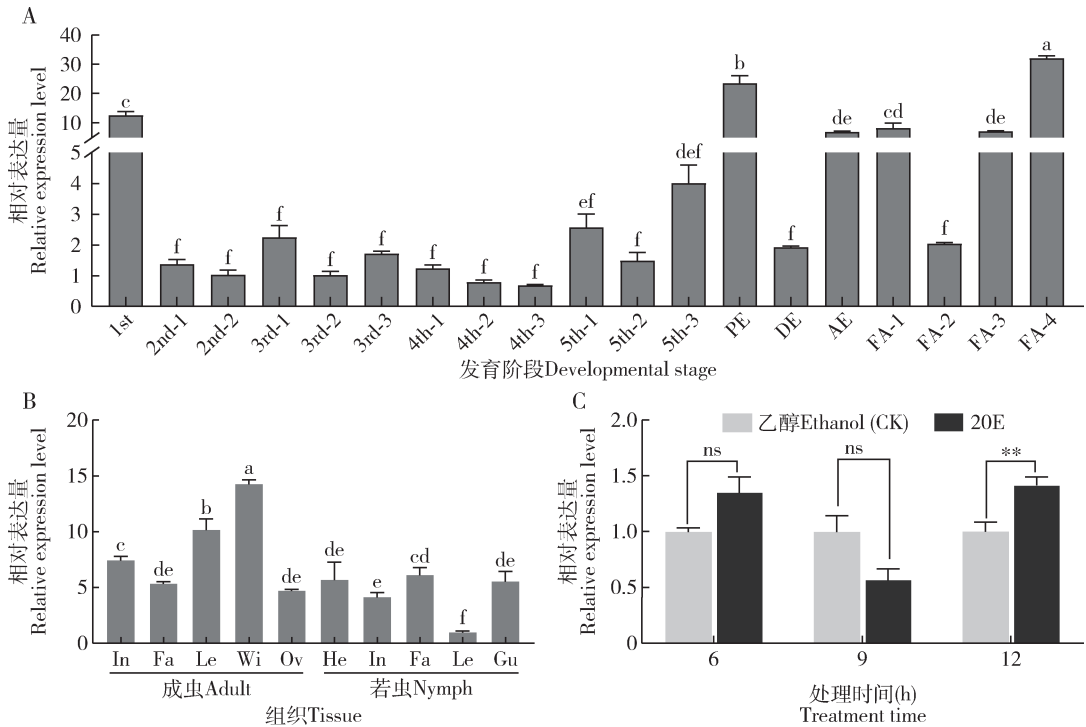


图3 *SfUSP* 在白背飞虱不同发育阶段(A)、雌成虫和5龄若虫不同组织(B)和100 ng/头20E处理下5龄若虫(C)中的表达量

Fig. 3 Expression levels of *SfUSP* in different developmental stages (A), different tissues of the female adult and 5th instar nymph (B), and the 5th instar nymph treated with 100 ng/individual 20E (C) of *Sogatella furcifera*

1st: 1龄若虫 1st instar nymph; 2nd-1-2: 分别为2龄1-2 d若虫 Day 1-2 of the 2nd instar nymphs, respectively; 3rd-1-3: 分别为3龄1-3 d若虫 Day 1-3 of the 3rd instar nymphs, respectively; 4th-1-3: 分别为4龄1-3 d若虫 Day 1-3 of the 4th instar nymphs, respectively; 5th-1-3: 分别为5龄1-3 d若虫 Day 1-3 of the 5th instar nymphs, respectively; PE: 5龄若虫蜕皮前(5龄4 d若虫) 5th instar nymph prior to ecdysis (day 4 of the 5th instar nymph); DE: 5龄若虫蜕皮中 5th instar nymph during ecdysis; AE: 蜕皮后(初羽化0-10 min成虫) After ecdysis (newly emerged adult at 0-10 min); FA-1-4: 分别为羽化后1-4 d雌成虫 Day 1-4 after emergence of female adults, respectively. He: 头 Head; In: 体壁 Integument; Fa: 脂肪体 Fat body; Le: 足 Leg; Wi: 翅 Wing; Gu: 肠道 Gut; Ov: 卵巢 Ovary. 图中数据为平均值±标准误;柱上不同小写字母表示不同处理间基因表达量差异显著($P < 0.05$, Tukey氏HSD);柱上符号代表与对照组比较差异显著性($^{ns}P > 0.05$; $^*P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$)(t 检验). Data in the figure are mean \pm SE. Different lowercase letters above bars indicate significant differences in the gene expression level among different treatments ($P < 0.05$, Tukey's HSD). Significant differences compared to control group are indicated by symbols above bars ($^{ns}P > 0.05$; $^*P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$)(t -test). 下图同. The same for the following figures.

程中的关键基因——超气门蛋白(USP)基因 *SfUSP*。保守结构域分析发现, *SfUSP* 含有典型核受体基因的5个保守结构域,即A/B域(转录激活域)、C域(DBD)、D域(铰链域)、E域(LBD)和F域。进一步多序列比对发现, DBD和LBD在不同物种间高度保守(图1),这与其他昆虫中的研究结果(林曼婷等, 2022)一致,预示着该基因在进化过程中结构和功能上的高度保守性。

不同发育阶段表达结果表明(图3), *SfUSP* 的各个发育阶段均有表达,并且在5龄若虫蜕皮前达到最高水平(图3)。在梨小食心虫 *Grapholita molesta* 中也发现 *GmUSP* 在蜕皮前具有较高的转录水平(Cao et al., 2015)。同样, *LdUSP-1* 在舞毒蛾3龄幼虫蜕皮前也具有最高的转录水平(Wen et al., 2020)。这些结果进一步暗示着, USP除了在

龄幼虫蜕皮前也具有最高的转录水平(Wen et al., 2020)。这些结果暗示着 *USP* 在昆虫蜕皮过程中具有重要作用。此外, *SfUSP* 在白背飞虱雌成虫体内同样具有较高的转录水平,暗示其可能也参与了白背飞虱的生殖调控过程,这与太平洋折翅蠅 *Diploptera punctata* 和麦长管蚜中沉默 *USP* 后显著抑制雌虫繁殖力的结果(Hult et al., 2015; Yan et al., 2016)一致。不同组织中的表达谱发现, *SfUSP* 在白背飞虱各个组织中均有表达。先前的研究也发现, *USP* 在昆虫的中枢神经系统、绛色细胞、中肠、精巢、精囊、雄性附腺、射精管、卵巢、脂肪体、触角、触角神经叶、腿部、胸部及腹等组织中均有表达(杨栋梁等, 2014)。这些结果进一步暗示着, USP除了在

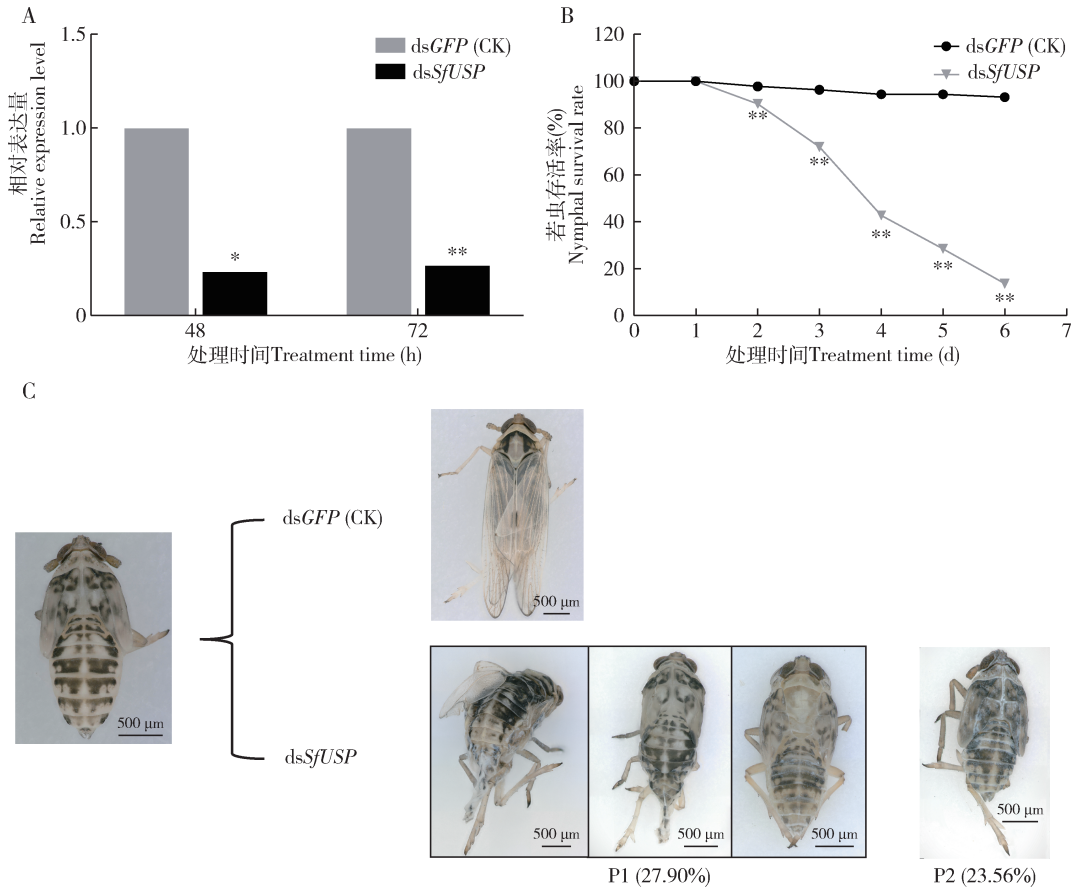


图4 白背飞虱5龄若虫显微注射 ds*SfUSP* 后 *SfUSP* 的表达量(A), 若虫存活率(B)和若虫致死表型(C)

Fig. 4 Expression level of *SfUSP* (A), nymphal survival rate (B) and nymphal lethal phenotype (C) of *Sogatella furcifera* after microinjection of ds*SfUSP* into the 5th instar nymph

P1: 27.90% 的虫体旧表皮开裂, 但未全部蜕去, 或在尾部形成拖尾等蜕皮失败表型 The old cuticle of 27.90% individuals split open, but it did not completely molt, or the old cuticle accumulated at the end of the abdomen without shedding; P2: 23.56% 的旧表皮并未开裂, 在蜕皮阶段死亡或身体细长的表型 The old cuticle of 23.56% individuals did not rupture, and died during the ecdysis stage or had a slender body.

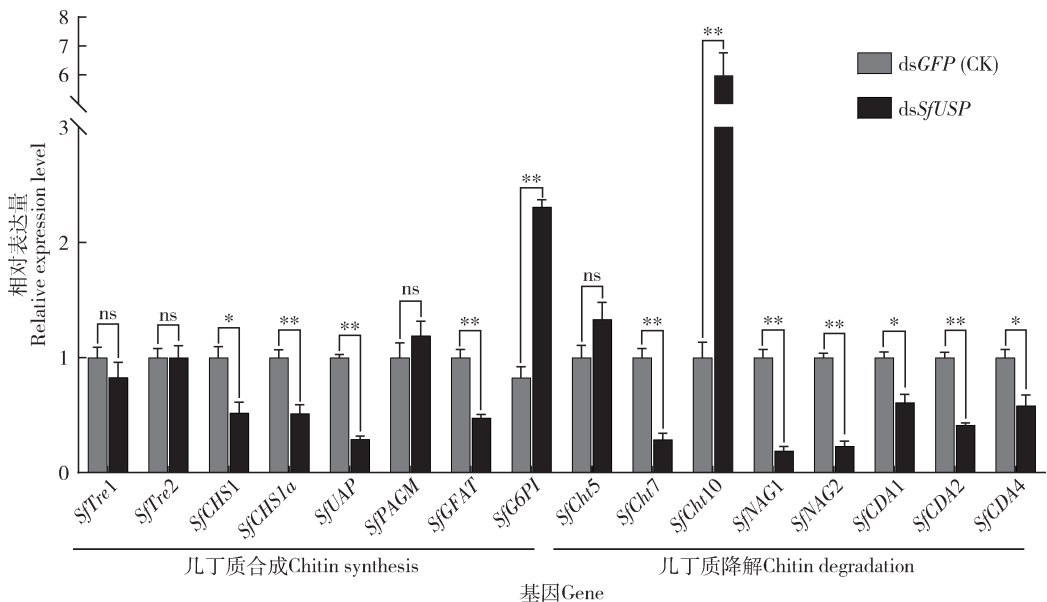


图5 白背飞虱5龄若虫显微注射 ds*SfUSP* 后 72 h 时几丁质合成和降解通路关键基因的表达量

Fig. 5 Expression levels of the key genes in chitin synthesis and degradation pathways at 72 h after microinjection

of ds*SfUSP* into the 5th instar nymph of *Sogatella furcifera*

Downloaded from <https://cabidigitallibrary.org> by 128.175.230.110, on 06/25/24.

Subject to the CABI Digital Library Terms & Conditions, available at <https://cabidigitallibrary.org/terms-and-conditions>

昆虫的蜕皮发育过程中具有重要功能外,在其他的生理过程中同样具有重要作用,例如:昆虫先天免疫和繁殖等 (Han *et al.*, 2020; 张乃元等, 2021; Li *et al.*, 2022)。

USP 能够和蜕皮激素受体 EcR 相结合形成异源二聚体共同介导 20E 信号的转导。在本研究中发现,20E 处理白背飞虱 5 龄若虫后能够显著诱导 *SfUSP* 的转录水平。粘虫 *Mythimna separata* 的研究中也发现,20E 处理能够显著提高性信息素腺体中 20E 初级响应基因 (*ECR-A*, *ECR-B*, *USP*, *E74*, *E75*, *E93* 和 *Broad*) 的转录水平 (张亚玲, 2020); 20E 处理后,能够显著诱导家蚕中、后部丝腺中 *BmEcR* 和 *BmUSP* 的表达量 (刘云垒等, 2016)。这些结果表明,20E 能够诱导其初级响应基因——*USP* 的转录水平,进而传递 20E 信号。另外,在进一步的研究中发现,当沉默赤拟谷盗 *TcUSP* 的表达后,导致幼虫到蛹期变态不能正常完成,造成发育缺陷 (Tan and Palli, 2008)。梨小食心虫 *GmUSP* 的沉默,也导致了变态期间死亡率的增加和蛹期的延长 (Cao *et al.*, 2015)。同样,在麦长管蚜、舞毒蛾的研究中也得到了同样的结果 (Yan *et al.*, 2016; Wen *et al.*, 2020)。在本研究中也发现, RNAi 沉默 *SfUSP* 的表达后,若虫-成虫转变过程中不能正常蜕皮,导致若虫死亡率显著增加 (图 4)。这些结果表明, *USP* 是昆虫变态、蜕皮过程中的关键基因。

先前对白背飞虱几丁质合成、降解通路的研究发现,沉默几丁质合成、降解通路关键基因后,均会导致昆虫蜕皮失败和死亡 (王召, 2019; Yang *et al.*, 2021a, 2021b),其致死表型与沉默 *SfUSP* 后的表型相似。那么 *SfUSP* 被沉默后产生的表型是否与白背飞虱几丁质合成和降解有关呢? 进一步研究发现,沉默 *SfUSP* 之后,几丁质合成通路基因 *SfCHS1*, *SfCHS1a*, *SfUAP*, *SfGFAT* 和几丁质降解通路基因 *SfCht7*, *SfNAG1*, *SfNAG2*, *SfCDA1*, *SfCDA2* 和 *SfCDA4* 的表达水平显著下调 (图 5)。在飞蝗 *Locusta migratoria* 的研究中也发现,沉默蜕皮激素信号转导相关基因 *LmHR3*, *LmHR39* 和 *LmHR4* 后,其几丁质合成、降解通路中的关键基因的转录水平显著下调 (Zhao *et al.*, 2018, 2019; Liu *et al.*, 2022)。这些结果表明,蜕皮激素信号通路能够直接或间接调控昆虫几丁质合成和降解的关键基因的表达来控制昆虫的蜕皮,但对于其具体的调控机制还有待进一步研究。

参考文献 (References)

- Ali E, Mao KK, Liao X, Jin RH, Li JH, 2019. Cross-resistance and biochemical characterization of buprofezin resistance in the white-backed planthopper, *Sogatella furcifera* (Horvath). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 158: 47–53.
- Cao JJ, Liu YC, Yang YH, Zhang HJ, Li Z, Yang QP, Zhang SD, Zhang QW, Liu XX, 2015. Molecular characterization and functional analysis of the ultraspiracle (*USP*) in the oriental fruit moth *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Olethreutidae). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 190: 54–62.
- Chen CX, Xu KK, Yang H, Zhao F, Yan Y, Hu DM, Yang WJ, 2019. Cloning of two clip-domain serine protease genes and their expression in response to exogenous hormone and immune challenge in *Lasioderma serricornis* (Coleoptera: Anobiidae). *Acta Entomol. Sin.*, 62(5): 535–546. [陈春旭, 许抗抗, 杨洪, 赵凤, 严毅, 胡大鸣, 杨文佳, 2019. 烟草甲 clip 丝氨酸蛋白酶基因的克隆及其对外源激素和免疫胁迫的表达响应. 昆虫学报, 62(5): 535–546]
- Dubrovsky EB, 2005. Hormonal cross talk in insect development. *Trends Endocrinol. Metab.*, 16(1): 6–11.
- Giraud M, Audant P, Feyereisen R, Le Goff G, 2013. Nuclear receptors HR96 and ultraspiracle from the fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*), developmental expression and induction by xenobiotics. *J. Insect Physiol.*, 59(5): 560–568.
- Gong SL, Hou ML, 2017. Research progress on rice varietal resistance to the brown planthopper and white-backed planthopper. *Plant Prot.*, 43(1): 15–23. [弓少龙, 侯茂林, 2017. 水稻对褐飞虱和白背飞虱的抗性及其机制研究进展. 植物保护, 43(1): 15–23]
- Han PF, Gong QT, Fan JQ, Zhang M, Abbas M, Zhu WY, Deng SF, Xing SP, Zhang JZ, 2020. 20-Hydroxyecdysone regulates the prophenoloxidase cascade to immunize *Metarhizium anisopliae* in *Locusta migratoria*. *Pest Manag. Sci.*, 76(9): 3149–3158.
- Hult EF, Huang J, Marchal E, Lam J, Tobe SS, 2015. RXR/USP and EcR are critical for the regulation of reproduction and the control of JH biosynthesis in *Diploptera punctata*. *J. Insect Physiol.*, 80: 48–60.
- Jindra M, Huang JY, Malone F, Asahina M, Riddiford LM, 1997. Identification and mRNA developmental profiles of two ultraspiracle isoforms in the epidermis and wings of *Manduca sexta*. *Insect Mol. Biol.*, 6(1): 41–53.
- Li JY, Liu J, Chi BJ, Chen P, Liu YJ, 2022. 20E and MAPK signal pathway involved in the effect of reproduction caused by cyantraniliprole in *Bactrocera dorsalis* Hendel (Diptera: Tephritidae). *Pest Manag. Sci.*, 78(1): 63–72.
- Lin MT, Lu JH, Wang Y, Yuan DJ, 2022. Insect ecdysone-mediated molting and metamorphosis development. *Chem. Life*, 42(1): 63–70. [林曼婷, 陆俊鸿, 王岩, 元冬娟, 2022. 昆虫蜕皮激素介导的蜕皮和变态发育. 生命的化学, 42(1): 63–70]
- Liu PF, Wang WW, Ling XF, Lu Q, Zhang JW, Wang W, Chen H,

- molting hormone-mediated metamorphosis. *Genomics Appl. Biol.*, 40 (Z1): 2054–2062. [柳鹏飞, 王伟伟, 凌晓霏, 陆沁, 张金稳, 汪伟, 陈航, 2021. 保幼激素和蜕皮激素调控昆虫变态发育机制的进展. 基因组学与应用生物学, 40(Z1): 2054–2062]
- Liu XJ, Li J, Sun YW, Liang XY, Zhang R, Zhao XM, Zhang M, Zhang JZ, 2022. A nuclear receptor HR4 is essential for the formation of epidermal cuticle in the migratory locust, *Locusta migratoria*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 143: 103740.
- Liu YL, Du J, Zhao XM, Su LY, Wei ZG, Li B, Yu XH, Shen WD, 2016. Induced expression pattern of ecdysone receptor and ultraspiracle genes and identification of core conserved region of ecdysone-responsive element in *Bombyx mori*. *Sci. Seric.*, 42(3): 425–431. [刘云垒, 杜杰, 赵晓明, 苏琳璞, 卫正国, 李兵, 虞晓华, 沈卫德, 2016. 家蚕蜕皮激素受体和超气门蛋白基因的诱导表达模式及蜕皮激素响应元件核心保守区的识别. 蚕业科学, 42(3): 425–431]
- Ruan YW, Wang XG, Xiang X, Xu X, Guo YQ, Liu YH, Yin Y, Wu YQ, Cheng QH, Gong CW, Zhang YM, Hasnain A, Shen LT, Jiang CX, Jiang SR, 2021. Status of insecticide resistance and biochemical characterization of chlorpyrifos resistance in *Sogatella furcifera* (Hemiptera: Delphacidae) in Sichuan Province, China. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 171: 104723.
- Tan A, Palli SR, 2008. Ecdysone receptor isoforms play distinct roles in controlling molting and metamorphosis in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 291(1–2): 42–49.
- Vöggtli M, Imhof MO, Brown NE, Rauch P, Spindler-Barth M, Lezzi M, Henrich VC, 1999. Functional characterization of two *Ultraspiracle* forms (CtUSP-1 and CtUSP-2) from *Chironomus tentans*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 29(10): 931–942.
- Wang SF, Li C, Zhu J, Miura K, Miksicek RJ, Raikhel AS, 2000. Differential expression and regulation by 20-hydroxyecdysone of mosquito ultraspiracle isoforms. *Dev. Biol.*, 218(1): 99–113.
- Wang Z, 2019. Characterization and Functional Analysis of the Genes Involved in Chitin Synthesis Pathway in the White-backed Planthopper, *Sogatella furcifera* (Horváth) (Hemiptera: Delphacidae). PhD Dissertation, Guizhou University, Guiyang. [王召, 2019. 白背飞虱几丁质合成通路基因的克隆及功能研究. 贵阳: 贵州大学博士学位论文]
- Wen RR, Zhao QQ, Wang BY, Ma Y, Ma L, 2020. Molecular characterization and functional analysis of USP-1 by RNA interference in the Asian gypsy moth *Lymantria dispar*. *J. For. Res.*, 31(5): 1923–1931.
- Yan T, Chen HM, Sun YW, Yu XD, Xia LQ, 2016. RNA interference of the ecdysone receptor genes *EcR* and *USP* in grain aphid (*Sitobion avenae* F.) affects its survival and fecundity upon feeding on wheat plants. *Int. J. Mol. Sci.*, 17(12): 2098.
- Yang DL, Hao J, Wang YN, Xi GS, 2014. Research progress of ecdysone in adult insects. *Chin. Bull. Life Sci.*, 26(8): 874–881. [杨栋梁, 郝婧, 王彦男, 奚耕思, 2014. 昆虫成虫蜕皮激素研究进展. 生命科学, 26(8): 874–881]
- Yang XB, Zhou C, Gong MF, Yang H, Long GY, Jin DC, 2021a. Identification and RNAi-based functional analysis of four chitin deacetylase genes in *Sogatella furcifera* (Hemiptera: Delphacidae). *J. Insect Sci.*, 21(4): 9.
- Yang XB, Zhou C, Long GY, Yang H, Chen C, Jin DC, 2021b. Characterization and functional analysis of chitinase family genes involved in nymph-adult transition of *Sogatella furcifera*. *Insect Sci.*, 28(4): 901–916.
- Zhang NY, Zhang L, Cheng YX, Zhang BQ, Jiang XF, 2021. Effects of molting hormone on humoral immunity of the black *Mythimna separata* (Walker) larvae infected by *Beauveria bassiana*. *Plant Prot.*, 47(4): 102–106, 112. [张乃元, 张蕾, 程云霞, 张宝琴, 江幸福, 2021. 蜕皮激素对黑化黏虫体液免疫的影响. 植物保护, 47(4): 102–106, 112]
- Zhang S, 2021. 2020 national agricultural pest resistance monitoring results and scientific drug recommendations. *China Plant Prot.*, 41(2): 71–78. [张师, 2021. 2020年全国农业有害生物抗药性监测结果及科学用药建议. 中国植保导刊, 41(2): 71–78]
- Zhang T, Zhou GH, 2017. Advances in the researches on the southern rice black-streaked dwarf disease. *J. Plant Prot.*, 44(6): 896–904. [张彤, 周国辉, 2017. 南方水稻黑条矮缩病研究进展. 植物保护学报, 44(6): 896–904]
- Zhang YL, 2020. Effects of Supplementary Nutrition on Sex pheromone Biosynthesis in *Mythimna separata*. PhD Dissertation, Henan Agricultural University, Zhengzhou. [张亚玲, 2020. 补充营养对粘虫性信息素生物合成的影响. 郑州: 河南农业大学博士学位论文]
- Zhao XM, Qin ZY, Liu WM, Liu XJ, Moussian B, Ma EB, Li S, Zhang JZ, 2018. Nuclear receptor HR3 controls locust molt by regulating chitin synthesis and degradation genes of *Locusta migratoria*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 92: 1–11.
- Zhao XM, Qin ZY, Zhang J, Yang Y, Jia P, Yang Q, Ma EB, Zhang JZ, 2019. Nuclear receptor hormone receptor 39 is required for locust moulting by regulating the chitinase and carboxypeptidase genes. *Insect Mol. Biol.*, 28(4): 537–549.
- Zhou C, Yang XB, Gong MF, Yang H, Long GY, Jia ZY, Zeng QH, Jin DC, 2022. Functional analysis of *SfHMGR* in reproduction regulation of the white-backed planthopper, *Sogatella furcifera* (Hemiptera: Delphacidae). *Acta Entomol. Sin.*, 65(1): 10–20. [周操, 杨熙彬, 龚明富, 杨洪, 龙贵云, 贾泽艳, 曾庆会, 金道超, 2022. *SfHMGR* 在白背飞虱生殖调控中的功能分析. 昆虫学报, 65(1): 10–20]
- Zhou C, Yang XB, Yang H, Gong MF, Long GY, Jin DC, 2021. Role of *SfJHAMT* and *SfFAMeT* in the reproductive regulation of *Sogatella furcifera* and its expression under insecticide stress. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 173: 104779.

(责任编辑: 马丽萍)