



褐飞虱核受体基因 *NIE75* 的分子特性和功能分析

李凯龙*, 王鑫, 马明勇, 彭兆普, 陈昂, 陈武瑛,
罗香文, 刘勇, 张德咏

(湖南省农业科学院植物保护研究所, 长沙 410125)

摘要:【目的】蜕皮激素通过信号级联反应调节昆虫的蜕皮和变态过程,而核受体基因 *E75* 是信号通路的早期响应基因。本研究旨在分析褐飞虱 *Nilaparvata lugens* *NIE75* 的分子特性及生物学功能,为褐飞虱的防治和新农药的开发提供新分子靶标。【方法】本研究基于序列比对和同源检索以及褐飞虱转录组数据获得 *NIE75* 的 cDNA 序列,并利用 RT-PCR 和 RACE 技术对其进行 cDNA 克隆;利用生物信息学软件预测分析 *NIE75* 编码蛋白的结构特性;利用 MEGA5.0 邻接法(neighbor-joining, NJ)构建系统进化树。利用 RT-qPCR 检测 *NIE75* 及其转录本在褐飞虱不同发育阶段(卵、1-5龄若虫和成虫)、5龄若虫不同组织(头、胸、腹、表皮、翅芽、脂肪体、中肠和足)中和3龄若虫被注射 0.2 μg/头 20-羟基蜕皮激素(20-hydroxyecdysone, 20E)后的表达谱。通过注射法进行 RNAi 敲降褐飞虱3龄若虫 20E 合成关键基因 *NICYP314A1* 后,利用 RT-qPCR 检测3龄若虫中 *NIE75* 的表达量;通过注射法进行 RNAi 下调3和5龄若虫 *NIE75* 及3龄若虫中其转录本的表达后,利用 RT-qPCR 检测3龄若虫中 *NIE75* 及其转录本的表达量,观察敲降 *NIE75* 对褐飞虱3和5龄若虫蜕皮和变态的影响,分析 *NIE75* 的5个转录本的相互调控关系。【结果】克隆获得褐飞虱 *NIE75* 的5个转录本,分别命名为 *NIE75A*, *NIE75B*, *NIE75C*, *NIE75D* 和 *NIE75E* (GenBank 登录号分别为 ON086330, ON086331, ON086332, ON086333 和 ON086334),其编码蛋白均具有典型的核受体保守结构域;系统进化分析发现其与人体虱 *Pediculus humanus corporis* 和德国小蠊 *Blattella germanica* 的 *E75* 蛋白聚在一起。RT-qPCR 结果显示, *NIE75* 基因5个转录本具有不同的发育和组织表达特性; *NIE75A* 和 *NIE75D* 的表达量在褐飞虱各发育阶段均较低, *NIE75A*, *NIE75B* 和 *NIE75C* 的表达动态与 *NIE75* 一致, *NIE75D* 在4龄和5龄蜕皮前表达量增至最高,而 *NIE75E* 在成虫中的表达量最高; *NIE75* 5个转录本在5龄若虫各个组织中均有表达,但 *NIE75B*, *NIE75C*, *NIE75D* 和 *NIE75E* 在足中高表达,而 *NIE75A* 在脂肪体中高表达。20E 诱导后4和8h时,处理组 *NIE75* 的表达量较对应的对照组分别上调了4.7和5.0倍,而 RNAi 干扰褐飞虱 *NICYP314A1* 后48h时处理组 *NIE75* 的表达量较对照组(注射 dsGFP)极显著下调了47.8%; RNAi 结果表明在3龄若虫中注射 ds*NIE75* 后导致褐飞虱蜕皮困难,出现畸形虫体;在5龄若虫中注射 ds*NIE75* 导致褐飞虱变态终止,出现畸形虫体;3和5龄若虫注射 ds*NIE75* 均无法完成蜕皮过程并最终100%死亡。只有对5个转录本均干扰后才出现畸形表型,而对单一转录本干扰后则不出现畸形表型,说明 *NIE75* 基因5个转录本之间存在着复杂的调控关系。【结论】褐飞虱中 *NIE75* 基因具有5个转录本,具有不同的发育和组织表达特性;RNAi 结果表明, *NIE75* 基因5个转录本存在明显的功能冗余现象, *NIE75* 基因在褐飞虱蜕皮过程发挥重要作用。

关键词: 褐飞虱;核受体; *NIE75*; 转录本; RNAi; 蜕皮

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2023)02-0138-12

Molecular characteristics and functional analysis of nuclear receptor gene *NIE75* in *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae)

基金项目: 国家重点研发计划项目(2021YFD1401100); 国家自然科学基金项目(32102210); 湖南省农业科技创新资金项目(2022CX06)

作者简介: 李凯龙, 男, 1988年3月生, 湖南洪江人, 博士, 高级工程师, 研究方向为昆虫生理及分子生物学, E-mail: lannuolk@foxmail.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: lannuolk@foxmail.com

收稿日期 Received: 2022-03-27; 接受日期 Accepted: 2022-06-28

LI Kai-Long*, WANG Xin, MA Ming-Yong, PENG Zhao-Pu, CHEN Ang, CHEN Wu-Ying, LUO Xiang-Wen, LIU Yong, ZHANG De-Yong (Institute of Plant Protection, Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410125, China)

Abstract: 【Aim】 Ecdysone regulates the molting and metamorphosis processes of insects through signaling cascade, and the nuclear receptor gene *E75* is an early response gene of the signaling pathway. The objective of this study is to analyze the molecular characteristics and biological function of *NIE75* in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, so as to provide new molecular target for the management of *N. lugens* and development of new pesticides. 【Methods】 The cDNA sequence of *NIE75* was obtained based on sequence alignment, homology search and *N. lugens* transcriptome data, and cloned by RT-PCR and RACE technologies. The structure characteristics of the protein encoded by *NIE75* were predicted using bioinformatics software, and the phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method of MEGA 5.0. The expression profiles of *NIE75* and its transcripts in different developmental stages (egg, 1st – 5th instar nymphs and adult), different tissues (head, thorax, abdomen, cuticle, wing bud, fat body, midgut and leg) of the 5th instar nymph, and the 3rd instar nymph of *N. lugens* after injection of 0.2 μg /individual of 20-hydroxyecdysone (20E) were detected by RT-qPCR. After knockdown of *NICYP314A1* in the 3rd instar nymph by RNAi via dsRNA injection, the expression level of *NIE75* in the 3rd instar nymphs was detected by RT-qPCR. After downregulating the expression of *NIE75* in the 3rd and 5th instar nymphs and its transcripts in the 3rd instar nymphs by RNAi via dsRNA injection, the expression levels of *NIE75* in the 3rd instar nymphs were detected by RT-qPCR, the effects of knockdown of *NIE75* on the molting and metamorphosis of the 3rd and 5th instar nymphs of *N. lugens* were observed, and the regulatory relationships of five transcripts of *NIE75* were analyzed. 【Results】 Five *NIE75* transcripts *NIE75A*, *NIE75B*, *NIE75C*, *NIE75D* and *NIE75E* (GenBank accession numbers are ON086330, ON086331, ON086332, ON086333 and ON086334, respectively) of *N. lugens* were cloned, and their encoded proteins all have typical nuclear receptor conserved domains. Phylogenetic analysis revealed that *NIE75A* – *E* clustered with the *E75* proteins of *Pediculus humanus corporis* and *Blattella germanica*. RT-qPCR results showed that five *NIE75* transcripts had different developmental and tissue expression characteristics. The expression levels of *NIE75A* and *NIE75D* in various developmental stages of *N. lugens* were low, the expression dynamics of *NIE75A*, *NIE75B* and *NIE75C* were consistent with that of *NIE75* and the expression level of *NIE75D* increased to the highest level before the molting of both the 4th and 5th instar nymphs, while the expression levels of *NIE75E* in adults were the highest. The five *NIE75* transcripts were expressed in various tissues of the 5th instar nymphs, with *NIE75B*, *NIE75C*, *NIE75D* and *NIE75E* highly expressed in the leg, and *NIE75A* highly expressed in the fat body. The expression levels of *NIE75* in treatment groups significantly increased by 4.7 and 5.0 times, respectively, at 4 and 8 h after 20E induction, as compared to those in the corresponding control groups. The expression level of *NIE75* in treatment group was extremely significantly down-regulated by 47.8% at 48 h after RNAi of *NICYP314A1*, as compared with that in the control group (injected with ds*GFP*). RNAi results showed that injection of ds*NIE75* into the 3rd instar nymphs resulted in the failure of molting and phenotypic defects, while injection of ds*NIE75* into the 5th instar nymphs resulted in the failure of metamorphosis and phenotypic defects, and the 3rd and 5th instar nymphs injected with ds*NIE75* could not complete the molting process and eventually died 100%. The phenotypic defects appeared only when all the five transcripts of *NIE75* were knocked down, but did not appear when a single transcript was knocked down, suggesting that there is a complex regulatory relationship between the five transcripts. 【Conclusion】 There are five *NIE75* transcripts in *N. lugens*, with different developmental and tissue expression characteristics. RNAi results suggest that five *NIE75* transcripts have obvious functional redundancy and *NIE75* plays an important role in the molting of *N. lugens*.

Key words: *Nilaparvata lugens*; nuclear receptor; *NIE75* transcripts; RNAi; molting

蜕皮激素信号通路在蜕皮动物的生长发育过程中起着重要的作用,通过调节昆虫的蜕皮和变态过程,从而阻碍其正常生长和发育过程,导致蜕皮失败、生长受阻、发育畸形,甚至死亡。20-羟基蜕皮激素(20-hydroxyecdysone, 20E)通过与蜕皮激素受体(ecdysone receptor, EcR)和超气门蛋白(ultraspiracle protein, USP)的异二聚体结合,然后通过识别靶基因启动子中的 EcRE 区域来调控下游初级和次级应答基因的表达,从而激活蜕皮激素级联反应,参与昆虫的胚胎发育、变态发育、生长、蜕皮和繁殖等生理活动(赵小凡等, 2010; 周树堂等, 2012)。E75 是一种核受体基因,属于 NR1 亚家族,是蜕皮激素信号传导通路的早期响应基因(King-Jones and Thummel, 2005)。研究表明,E75 在调控果蝇 *Drosophila* 蜕皮激素合成及蜕皮激素信号通路中起到了重要作用,且存在功能不同的转录本(Bialecki *et al.*, 2002)。除果蝇之外,E75 的同源基因在埃及伊蚊 *Aedes aegypti* (Pierceall *et al.*, 1999)、家蚕 *Bombyx mori* (Li *et al.*, 2015)、意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* (Paul *et al.*, 2006)、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* (Xu *et al.*, 2010) 和马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* (Guo *et al.*, 2016) 等完全变态昆虫和德国小蠊 *Blattella germanica* (Mané-Padrós *et al.*, 2008) 和飞蝗 *Locusta migratoria* (刘晓健等, 2020) 等半变态昆虫中也有报道。

褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 是典型的半变态昆虫,一生经历卵、若虫和成虫 3 个阶段,其中若虫期分 5 个龄期,每个龄期之间的转变是通过若虫-若虫蜕皮完成的,而若虫-成虫的转变是通过变态蜕皮完成的,变态后成为性成熟的成虫具有繁殖能力(Li *et al.*, 2018)。关于褐飞虱 20E 合成及表皮生长相关的研究较多(Li *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2022),但是关于褐飞虱蜕皮激素级联反应的研究较少,其研究对揭示褐飞虱蜕皮和变态机理和筛选害虫防治作用靶标具有重要意义。本研究以褐飞虱为研究对象,通过克隆、同源比对和进化分析鉴定参与褐飞虱蜕皮激素级联的初级响应基因 *NIE75* 的可变剪接体,在此基础上研究其时空表达谱,并进一步分析 *NIE75* 的表达量下调对褐飞虱生长发育的影响,以期丰富蜕皮激素调控昆虫蜕皮的理论体系,为基于 RNAi 的害虫控制提供新的靶标基因。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

褐飞虱采自浙江省杭州市富阳区中国水稻所基

地稻田,在室内室温条件下饲养于感虫水稻 *Oryza sativa* 品种 TN1 上 2 代以上,饲养条件:温度(27 ± 1) °C,相对湿度 80% ± 10%,光周期 14L: 10D。取适龄若虫或成虫供试。

1.2 总 RNA 的提取和 cDNA 第 1 链合成

收集 1.1 节正常饲养条件下褐飞虱卵(100 枚)、1-3 龄若虫(各 150 头)、4 龄第 1-3 天若虫(各 90 头)、5 龄第 1-4 天若虫和 0-2 日龄成虫(各 60 头)不同发育时期试虫样品,另选取 200 头 5 龄若虫并在解剖镜下分离头、胸、腹、表皮、翅芽、脂肪体、中肠和足置于 1.5 mL Eppendorf 管。以上每处理设置随机分成 3 个生物学重复。所有样品用液氮速冻后置于 -80 °C 冰箱保存备用。褐飞虱总 RNA 的提取采用 Qiagen 公司生产的总 RNA 提取试剂盒(RNeasy Mini Kit, Qiagen, Valencia, 加拿大),提取方法参照试剂盒说明书。利用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳和分光光度计(Nano-Drop1000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Rockford, 美国)检测所提取 RNA 的完整性和浓度。cDNA 第 1 链的合成采用 Toyobo 公司的反转录试剂盒(ReverTra Ace qPCR RT Kit, Toyobo Co. LTD, Osaka, 日本),RNA 模板量为 1 μg,以 Oligo dT 和随机引物为合成引物。

1.3 基因检索、克隆与序列分析

根据黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 和德国小蠊 E75 基因的序列检索褐飞虱转录组,得到褐飞虱候选 E75 基因 cDNA 序列。利用 Primer Premier 5.0 设计引物(表 1)对其进行 RT-PCR 克隆。以褐飞虱各龄期混合 cDNA 模板进行 PCR 扩增,反应体系:10 × ExTaq Buffer 2.5 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 2.0 μL, 正反向引物(10 mmol/L) 各 1.0 μL, ExTaq 酶 0.125 μL, cDNA 模板 1.0 μL, 双蒸水 17.375 μL。反应程序:94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 38 个循环; 72 °C 延伸 10 min。扩增产物回收纯化后送于上海英骏生物技术有限公司进行双端测序。5' 和 3' RACE 文库的构建、反应体系及程序参照 SMARTer RACE 说明书(Clontech, 美国)进行。

测序结果和序列组装通过 DNASTAR Lasergene 软件包(<http://www.dnastar.com/>)完成。利用 NCBI 网上 ORF 查找工具 ORF Finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)查找基因开放阅读框,利用网上 ExPASy 翻译软件进行翻译预测氨基酸序列(<http://web.expasy.org/translate/>),利用

表 1 引物信息
Table 1 Primer information

引物 Primers	正向序列(5' - 3') Forward sequences	反向序列(5' - 3') Reverse sequences	扩增产物长度(bp) Amplicon size	用途 Purpose
NIE75	CTCACGATCGCAGGAGAAGG	AGGACTCTCCATCAGCGACT	1 543	RT-PCR
NIE75-RACE	TTGGGGTTCAGTGGACAAGCCAGAGT	CCCCGCCTCTCTACGACCAACTCT		RACE
qNIE75	ACTTCTCAAAGCCGGTGTCT	GTTGTGGATCGACTCCCTTT	121	
qNIE75-A	ATGGTCATGGAACCTTCGTGAAT	CTTGGTGCACGGTCTGTAAT	162	
qNIE75-B	TGAGTCCGAGGGCTGTGATA	TGGAATCCAGACGCCTTGTC	147	
qNIE75-C	TGTTTGCACCTCAGACGATGA	CTGGCAACAAGACGAAAACAC	117	
qNIE75-D	AGCTTGGTGTGGCGTGC	GCACTGGGAGCTTTTTCAGC	106	RT-qPCR
qNIE75-E	TGGGAGAAGAGTTACCAATTTTGA	CTCCTGCGATCGTGAGTTGG	146	
qNICyp314a1	TTGTTGCTCAGCCATCTTTC	TGCTGGGAATGTCGTATTGT	102	
qNIRPS11	CCGATCGTGTGGCGTTGAAGGG	ATGGCCGACATTTCCAGGTCC	159	
qNIRPS15	TAAAAATGGCAGACGAAGAGCCAA	TTCCACGGTTGAAACGCTGCG	150	
T7-dsNICYP314A1	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u> TGTTTTCGCTGGCCACATTC	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u> CACGTTTCGCCTTGTTCGTT	460	
T7-dsNIE75	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u> AAAGCTCGACTCACCCAGTG	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u> AGGACTCTCCATCAGCGACT	448	
T7-dsNIE75-A	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u> ACATGGGGCGGAGCTCTGA	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u> ACGAAGTTCCATGACCATGTT	189	
T7-dsNIE75-B	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u> GCCTACCGTATCGGCTTGTG	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u> CCTTATCACAGCCCTCGGAC	298	RNAi
T7-dsNIE75-C	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u> TCCAGTCTTGAATCGGTCC	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u> GTGCACGAGTCCAAATCACC	496	
T7-dsNIE75-D	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u> TGAAAAAGCTCCAG	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u> CATCAAGTACCGTTACGAGTTTTAT	301	
T7-dsNIE75-E	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u> AGTGTATGTCGGTCGCAACC	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u> TGGTAACCTTCTCCGATGACTG	399	
T7-dsGFP	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u> CCTGAAGTTCATCTGCACCAC	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u> TGATGCCGTCTTCTGCTTGT	356	

下划线表示 T7 RNA 聚合酶启动子序列 TAATACGACTCACTATAGG。The T7 RNA polymerase promoter sequence TAATACGACTCACTATAGG is underlined.

gov/cdd/) 和 EMBL 在线软件 SMART(http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1) 对氨基酸序列保守结构域进行预测, 所得氨基酸序列通过 NCBI 网上 BLAST 程序 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 与 GenBank 中的 nr 库进行同源性搜索, 并用 ClustalX2 (Larkin *et al.*, 2007) 与其他昆虫同源序列进行多序列比对, 采用邻接法 (neighbor-joining method) 在 MEGA5.0 软件中 (Tamura *et al.*, 2011) 完成系统发育树的构建, 各分支重复检验次数均为 1 000 次。

1.4 *NIE75* 及其转录本的时空表达谱

RT-qPCR 检测采用 Toyobo 公司的 SYBR Green Mix 试剂盒, 以 1.2 节合成的褐飞虱不同发育阶段和 5 龄若虫不同组织的 cDNA 为模板, 以 *NIRPS11* 和 *NIRPS15* 为内参基因 (Yuan *et al.*, 2014), 引物序

列见表 1。反应体系 (20.0 μ L): ddH₂O 6.4 μ L, 酶预混液 10 μ L, 正反向引物 (10.0 μ mol/L) 各 0.8 μ L, cDNA 2.0 μ L。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火及延伸 35 s, 45 个循环, 每个样品进行 3 次技术重复。

1.5 20E 诱导后 *NIE75* 表达量的测定

配制 10% 的乙醇并将 20E (Sigma) 稀释至浓度为 5 μ mol/L 保存备用, 参考 Zhou 等 (2020) 的方法测定 *NIE75* 对 20E 诱导的响应。挑取褐飞虱 3 龄若虫每头注射 0.2 μ g 20E (Sigma), 以注射等体积的 10% 乙醇作为对照, 分别在注射后 4, 8 和 12 h 提取 RNA, 并反转录为 cDNA。每个时间点的对照和处理均设置 5 个生物学重复, 10 头试虫为 1 个生物学重复, 共计 50 头试虫。采用 RT-qPCR 检测 *NIE75* 在对照和 20E 处理的各时间点的表达量, 方法同 1.4 节。

1.6 RNAi 实验

基于作者前期研究(李凯龙等, 2017), 选取 20E 合成关键基因 *NICYP314A1* 进行 RNAi 实验, 采用 Ambion 试剂盒 (MEGAscript T7High Yield Transcription Kit, Austin, 美国) 进行 *NICYP314A1* 和 *GFP*(对照) dsRNA 的体外转录合成, 浓度调整为 $4.0 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, 相关引物序列见表 1。挑取 3 龄若虫通过显微注射仪注射 ds*NICYP314A1* (25 nL/头), 同时注射等体积的 ds*GFP* 作为对照。注射后 48 h 时取活虫提取 RNA, 并反转录为 cDNA。对照和注射 ds*NICYP314A1* 组均设置 5 个生物学重复, 10 头试虫为 1 个生物学重复, 共计 50 头试虫。采用 RT-qPCR 检测 *NICYP314A1* 和 *NIE75* 的表达量, 方法同 1.4 节。

采用 Ambion 试剂盒 (MEGAscript T7 High Yield Transcription Kit, Austin, 美国) 进行 *NIE75* 及其 5 个转录本和 *GFP*(对照) dsRNA 的体外转录合成, 浓度调整为 $4.0 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, 相关引物序列见表 1。通过显微注射仪将 ds*NIE75* 和 ds*GFP* 注射至褐飞虱 3 龄若虫 (25 nL/头) 和 5 龄若虫 (100 nL/头) 体内 (Xu *et al.*, 2015), 5 个转录本的 dsRNA 分别注射至褐飞虱 3 龄若虫 (25 nL/头)。注射后 1 d, 移除死亡的虫体, 随后逐日观察试虫的存活情况、若虫发育情况及表型, 计算 3 龄若虫存活率, 并在基恩士公司的超景深三维显微系统 VHX-6000 下拍摄 3 龄和 5 龄若虫表型图片。每处理设置 5 个重复, 每重复 25 头褐飞虱若虫, 于注射后第 4 天随机取 3 个重复, 每个重复取 5~10 头用于提取总 RNA 并反转录成 cDNA, 利用 RT-qPCR 检测 *NIE75* 及其转录本的表达量, 方法同 1.4 节。

1.7 数据分析

基因的相对表达量计算采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法 (Livak and Schmittgen, 2001)。数据分析采用 DPS 数据处理系统 (Tang and Zhang, 2013), 其中两个处理间数据采用 *t* 检验进行比较, 两个以上处理间数据采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 或双因素方差分析 (two-way ANOVA), 并采用 Duncan 氏新复极差法进行多重比较。

2 结果

2.1 褐飞虱 *NIE75* 基因的克隆与系统发育

在褐飞虱体内克隆得到了 5 个 *NIE75* 的转录本。根据其氨基酸结构与德国小蠊 5 个转录本比较 (Mané-Padrós *et al.*, 2008), 分别命名为 *NIE75A*、*NIE75B*、*NIE75C*、*NIE75D* 和 *NIE75E* (GenBank 登录号分别为 ON086330, ON086331, ON086332, ON086333 和 ON086334), 其开放阅读框分别长 2 292, 2 385, 2 445, 2 049 和 2 103 bp, 分别编码 763, 794, 814, 682 和 700 个氨基酸。*NIE75* 属于 NR_DBD_like 超家族和 NR_LBD 超家族, 具有核受体特有的 DNA 结合位点和配体结合位点, 均具有 NR2 家族核受体的 5 个保守结构域: 基因特异性激活结构域 (A/B domain)、DNA 结合结构域 (DNA binding domain, DBD)、铰链结构域 (hinge domain)、配体结合域 (ligand-binding domain, LBD) 和可变的 C 端结构域 (C-terminal domain)。这 5 个转录本编码的蛋白均具有 NR_LBD_ERB 结构域, 但只有 *NIE75A*、*NIE75B* 和 *NIE75C* 具有 NR_DBD_ERB 结构域, 且 5 者在 A/B 特异性结构域存在差异 (图 1)。DBD 和 LBD 结构域与黑腹果蝇、埃及伊蚊、疲倦库蚊 *Culex quinquefasciatus*、西方蜜蜂、蝇蛹金小蜂 *Nasonia vitripennis*、家蚕、赤拟谷盗、马铃薯甲虫、德国小蠊、人体虱 *Pediculus humanus corporis* 和豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum* 的 E75 蛋白相应结构域高度一致 (图 1), 进化分析发现其与人体虱和德国小蠊的 E75 蛋白序列聚在一起 (图 2)。

2.2 褐飞虱 *NIE75* 基因及其转录本的时空表达谱

NIE75 在褐飞虱 1 龄若虫期和 5 龄若虫后期的表达量较高, 而 5 个转录本在褐飞虱若虫期的表达量不一致, 其中 *NIE75A* 和 *NIE75D* 的表达量较低, *NIE75C* 的表达量最高, *NIE75B* 和 *NIE75E* 的表达量居中。*NIE75A*、*NIE75B* 和 *NIE75C* 的表达动态与 *NIE75* 一致, 在 1 龄若虫期和 5 龄若虫后期的表达量较高, 而 *NIE75D* 在 4 和 5 龄蜕皮前表达量增至最高, *NIE75E* 在成虫中的表达量最高, 表明 5 个转录本可能在不同龄期发挥作用, 共同完成 *NIE75* 的功能 (图 3)。

在头、胸和腹 3 种组织中, *NIE75* 和 5 个转录本在胸中的表达量最高。在其他 5 种组织中, *NIE75* 在足中表达量最高, 其次是在脂肪体中, 在翅芽中表达量最低; *NIE75B*、*NIE75C*、*NIE75D* 和 *NIE75E* 也都是足中表达量最高; *NIE75A* 在脂肪体中的表达量最高, 在中肠中次之, 在翅芽中表达量最低, 表明 5 个转录本在不同组织中的表达模式也有差异 (图 4)。

2.3 20E 诱导及 *NICYP314A1* RNAi 后 *NIE75* 的表达量变化

RT-qPCR 结果显示, 与对照组 (注射 10% 乙醇) 相比, *NIE75* 在 20E (0.2 μg/头) 诱导后 4 和 8 天

RT-qPCR 结果显示, 与对照组 (注射 10% 乙醇) 相比, *NIE75* 在 20E (0.2 μg/头) 诱导后 4 和 8 天

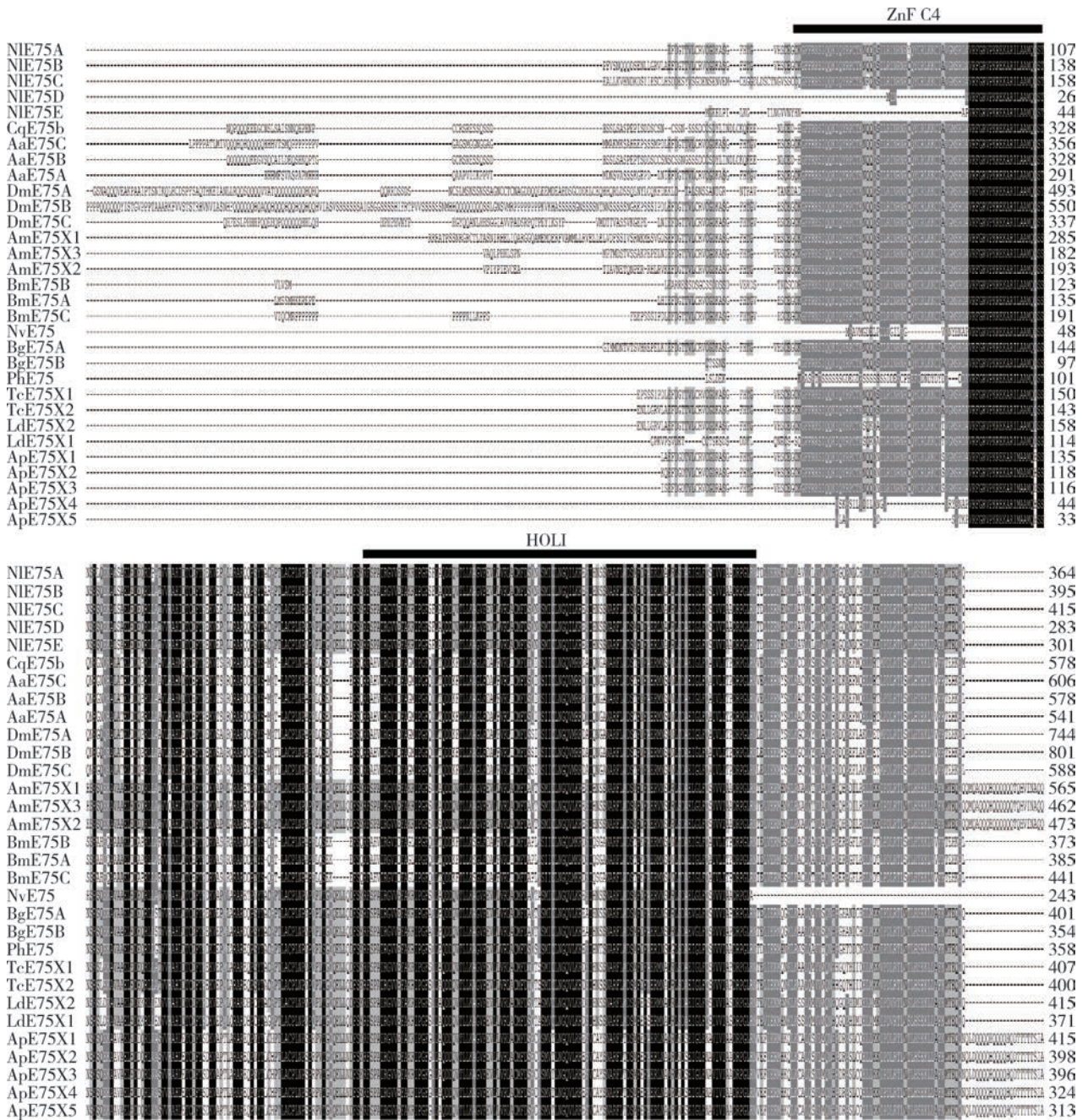


图 1 褐飞虱 *NIE75* 与其他昆虫同源蛋白氨基酸序列比对

Fig. 1 Amino acid sequence alignment of *NIE75* of *Nilaparvata lugens* and homologous proteins from other insects

蛋白来源物种及 GenBank 登录号 Origin species of proteins and their GenBank accession numbers; NIE75A – E: 褐飞虱 *N. lugens*, ON086330 – ON086334; CqE75b: 致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus*, XP_001849917.1; AaE75C: 埃及伊蚊 *Aedes aegypti*, CAL36975.1; AaE75B: 埃及伊蚊 *Aedes aegypti*, CAL36974.1; AaE75A: 埃及伊蚊 *Aedes aegypti*, CAL36973.1; DmE75A: 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*, NP_524133.2; DmE75B: 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*, NP_730321.1; DmE75C: 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*, NP_730322.1; AmE75X1: 西方蜜蜂 *Apis mellifera*, XP_006564380.1; AmE75X2: 西方蜜蜂 *Apis mellifera*, XP_006564381.1; AmE75X3: 西方蜜蜂 *Apis mellifera*, XP_006564382.1; BmE75B: 家蚕 *Bombyx mori*, NP_001106080.1; BmE75A: 家蚕 *Bombyx mori*, NP_001106079.1; BmE75C: 家蚕 *Bombyx mori*, NP_001037042.1; NvE75: 丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis*, XP_008204671.1; BgE75A: 德国小蠊 *Blattella germanica*, CAJ87513.1; BgE75B: 德国小蠊 *Blattella germanica*, CAJ87514.1; PhE75: 人体虱 *Pediculus humanus*, XP_002426029.1; TeE75X1: 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*, XP_008197843.1; TeE75X2: 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*, XP_008197844.1; LdE75X2: 马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata*, AKN56578.1; LdE75X1: 马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata*, AKN56577.1; ApE75X1: 豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum*, XP_008180288.1; ApE75X2: 豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum*, XP_008180289.1; ApE75X3: 豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum*, XP_008180290.1; ApE75X4: 豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum*, XP_008180291.1; ApE75X5: 豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum*, XP_008180292.1. 图 2 同。The same for Fig. 2. ZnF_C4: Cys4 (C4) 锌指结构域 Cys4 (C4) zinc finger domain; HOLI: 配体结合结构域 Ligand-binding domain.

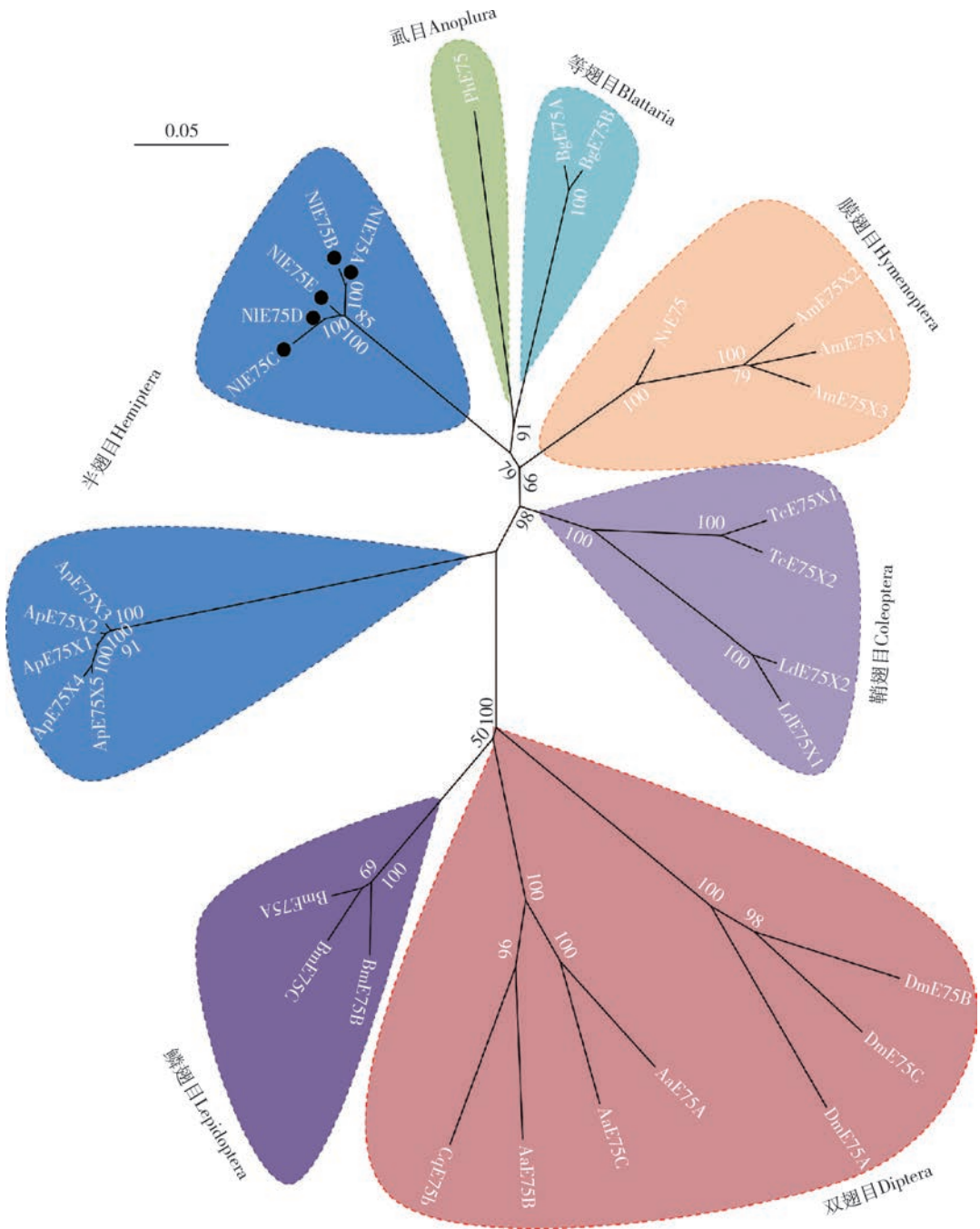


图2 邻接法构建的基于氨基酸序列的褐飞虱与其他昆虫 E75s 系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of E75s of *Nilaparvata lugens* and other insects constructed by neighbor-joining method based on amino acid sequence

进化树节点数字代表自展 1 000 次重复检验百分比值,且图中只显示大于 50% 的自展检验百分比。The numerals on the node of the phylogenetic tree represent the bootstrap values of 1 000 replicates and only the bootstrap values above 50% are shown on each node of the tree.

时表达量分别极显著上调了 4.7, 5.0 和 1.9 倍 ($P < 0.01$) (图 5: A); 注射 ds*NICYP314A1* 后 48 h 时与注射 ds*GFP* 的对照相比, *NICYP314A1* 的表达量极显著下降了 84.6% ($P < 0.01$), *NIE75* 的表达量亦被抑制, 与对照组 (注射 ds*GFP*) 相比其表达量极显著下调了 47.8% ($P < 0.01$) (图 5: B)。

2.4 基于 RNAi 的 *NIE75* 生物学功能

注射 ds*NIE75* 3 龄若虫的存活率在注射后 3 d 开始较注射 ds*GFP* 对照组显著下降 ($P < 0.05$), 且存活率随着注射时间的延长迅速下降, 注射后 7 d 时的存活率仅为 8.3%, 而相应时间点对照组的存活率为 93.3%, 二者差异极显著 ($P < 0.01$) (图 6:

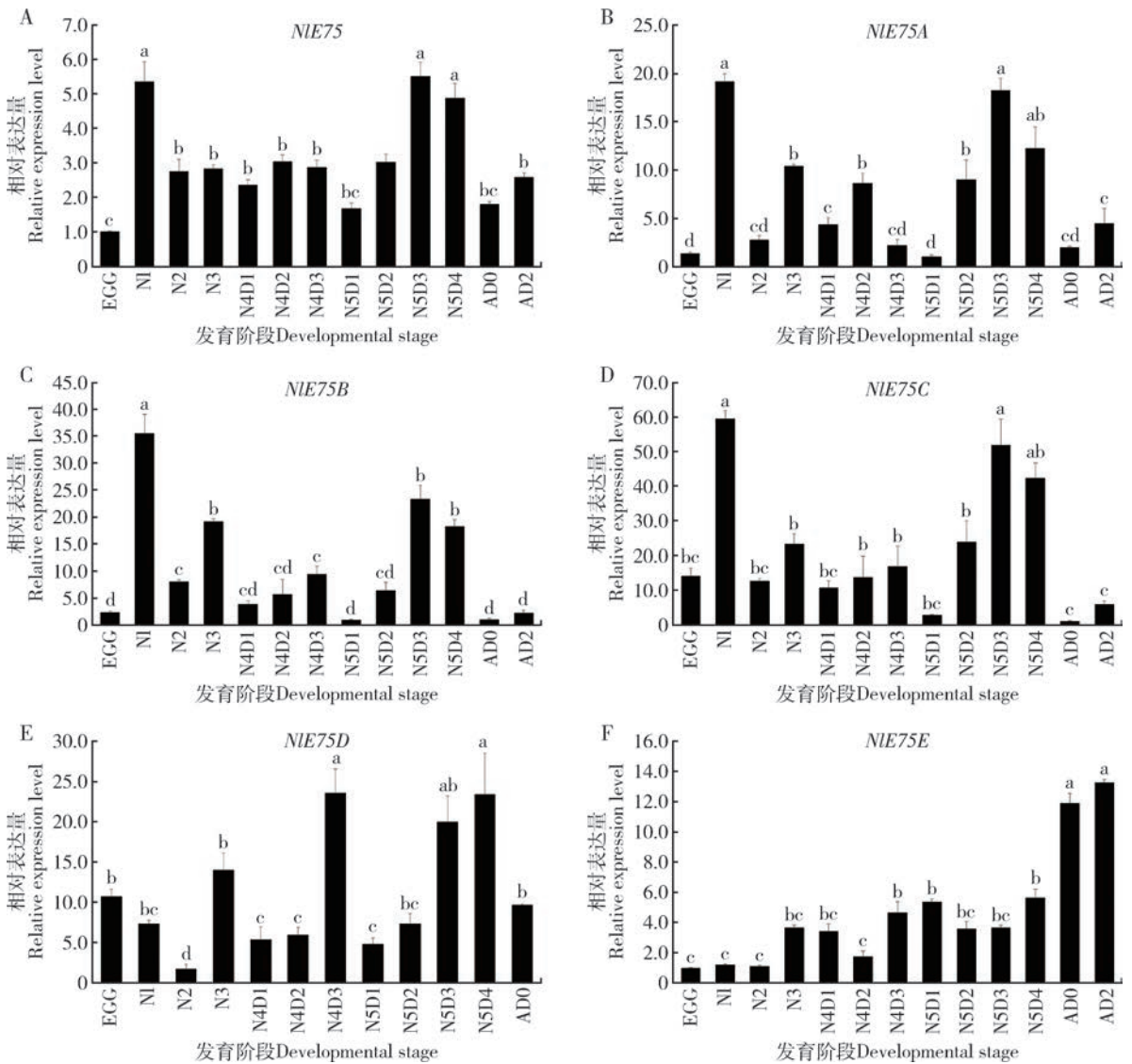


图3 褐飞虱 *NIE75* 及其不同转录本在不同发育阶段的相对表达量

Fig. 3 Relative expression levels of *NIE75* and its different transcripts in *Nilaparvata lugens* at different developmental stages

A; *NIE75*; B; *NIE75A*; C; *NIE75B*; D; *NIE75C*; E; *NIE75D*; F; *NIE75E*. EGG: 卵 Egg; N1-3: 分别为1-3龄若虫 1st-3rd instar nymphs, respectively; N4D1-3: 分别为4龄第1-3天若虫 Day-1-3 4th instar nymphs, respectively; N5D1-4: 分别为5龄第1-4天若虫 Day-1-4 5th instar nymphs, respectively; AD0-2: 分别为0-2日龄成虫 0-2-day-old adults, respectively. 图中数据为平均值 \pm 标准误; 柱上不同字母表示不同样本间基因表达量差异显著 ($P < 0.05$, Duncan 氏新复极差法)。图4同。Data in the figure are mean \pm SE. Different letters above bars indicate significant difference in the gene expression level among different samples ($P < 0.05$, Duncan's multiple range test). The same for Fig. 4.

A); 注射后 8 d 时 *NIE75* 干扰试虫全部死亡。注射 ds*NIE75* 的 3 龄若虫体内 *NIE75* 的表达量较注射 ds*GFP* 的对照组出现极显著下调 ($P < 0.01$) (图 6: B)。表型观察发现, 在 3 龄若虫注射 ds*NIE75* 后蜕皮困难, 出现畸形虫体, 死亡虫体表现出个头小、“蜂腰”(身体明显拉长, 头部和胸部连接处变细) 表型(占死亡虫体比例为 94.4%); 在 5 龄若虫注射 ds*NIE75* 后出现死亡, 死亡虫体表现出背板表皮裂开(仅出现此表型死亡虫体占死亡虫体比例为 71.2%)、表皮裂开并出现“蜂腰”(此表型死亡虫体

占死亡虫体比例为 26.3%) 表型, 在饲养容器中未发现蜕下来的蜕, 说明试虫蜕皮未完成即死亡(图 6: C)。3 和 5 龄若虫注射 ds*NIE75* 均无法完成蜕皮过程并最终 100% 死亡。

为了研究 *NIE75* 基因不同转录本的功能特性, 本研究 *NIE75* 不同转录本进行共有片段干扰和特异片段干扰, 结果表明: *NIE75* 共有片段干扰能降低所有转录本的表达量, 且出现蜕皮异常表型(图 6: C), 对单一转录本干扰后不出现异常表型; 5 个转录本特异片段的干扰均能下调各自靶基因的表达量,

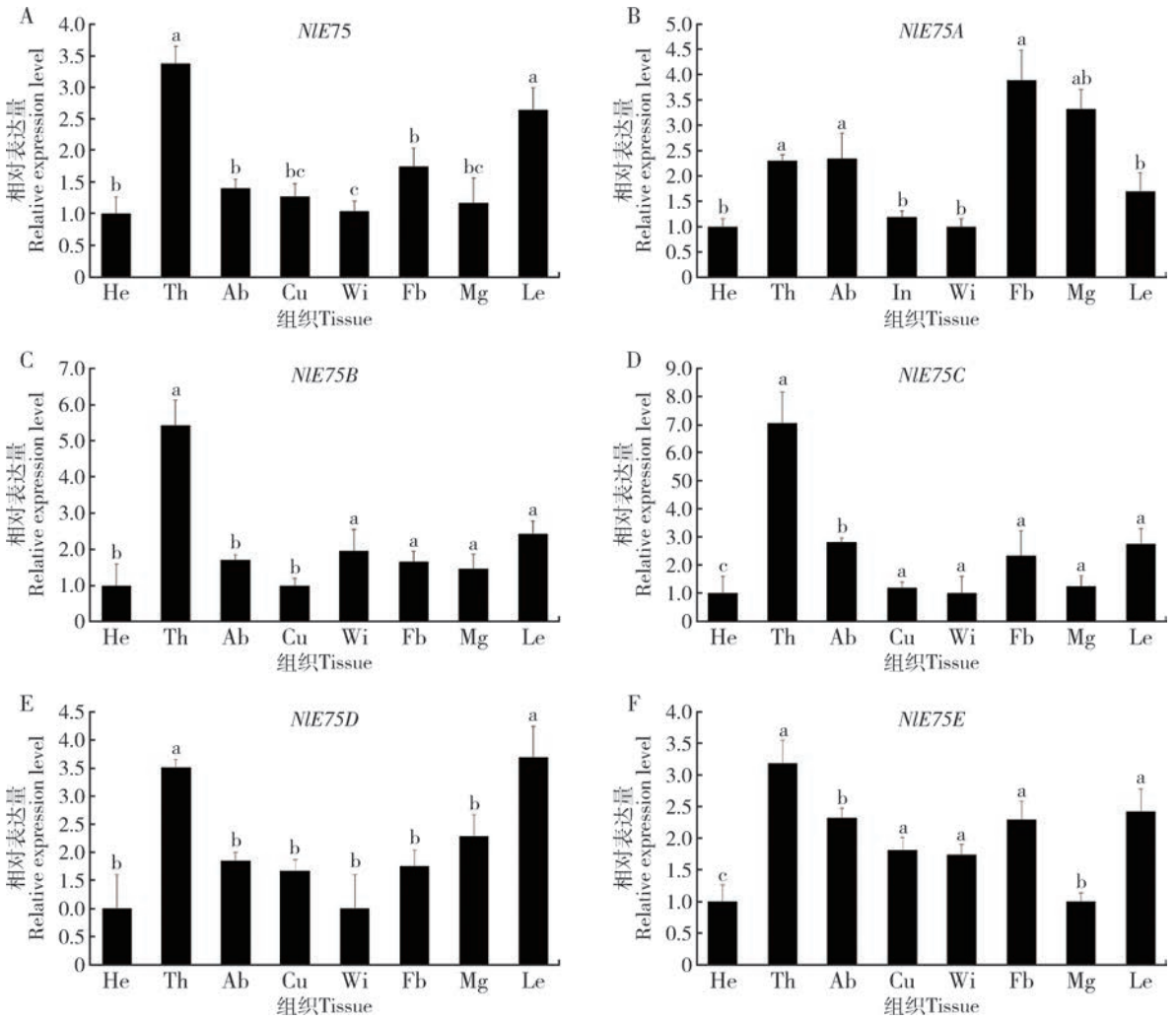


图4 褐飞虱 *NIE75* 及其转录本在 5 龄若虫不同组织中的相对表达量
 Fig. 4 Relative expression levels of *NIE75* and its different transcripts in different tissues of the 5th instar nymphs of *Nilaparvata lugens*

A: *NIE75*; B: *NIE75A*; C: *NIE75B*; D: *NIE75C*; E: *NIE75D*; F: *NIE75E*. He: 头 Head; Th: 胸 Thorax; Ab: 腹 Abdomen; Cu: 表皮 Cuticle; Wi: 翅芽 Wing bud; Fb: 脂肪体 Fat body; Mg: 中肠 Midgut; Le: 足 Leg.

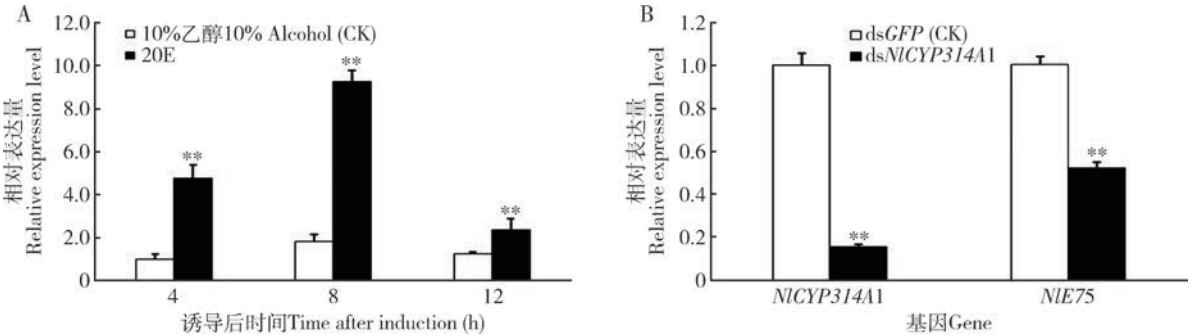


图5 20E 诱导 (A) 及 20E 生物合成关键基因 *NICYP314A1* RNAi 后 48 h 时 (B) 褐飞虱 3 龄若虫中 *NIE75* 的相对表达量
 Fig. 5 Relative expression levels of *NIE75* in the 3rd instar nymphs of *Nilaparvata lugens* after 20E induction (A) and at 48 h after RNAi of the key gene *NICYP314A1* in 20E biosynthesis (B)

20E 诱导实验中, 处理组每若虫注射 0.2 μg 20E, 对照组 (CK) 注射同体积 10% 乙醇。图中数据为平均值 ± 标准误; 柱上单星号和双星号分别表示经 t 测验差异显著 ($P < 0.05$) 和极显著 ($P < 0.01$)。图 6 和 7 同。In 20E induction experiment, each nymph in treatment group was injected with 0.2 μg 20E, and that in the control group (CK) was injected with 10% alcohol of the same volume. Data in the figure are mean ± SE. Single asterisk and double asterisk above bars indicate significant difference ($P < 0.05$) and extremely significant difference ($P < 0.01$), respectively, by t-test. The same for Figs. 6 and 7.

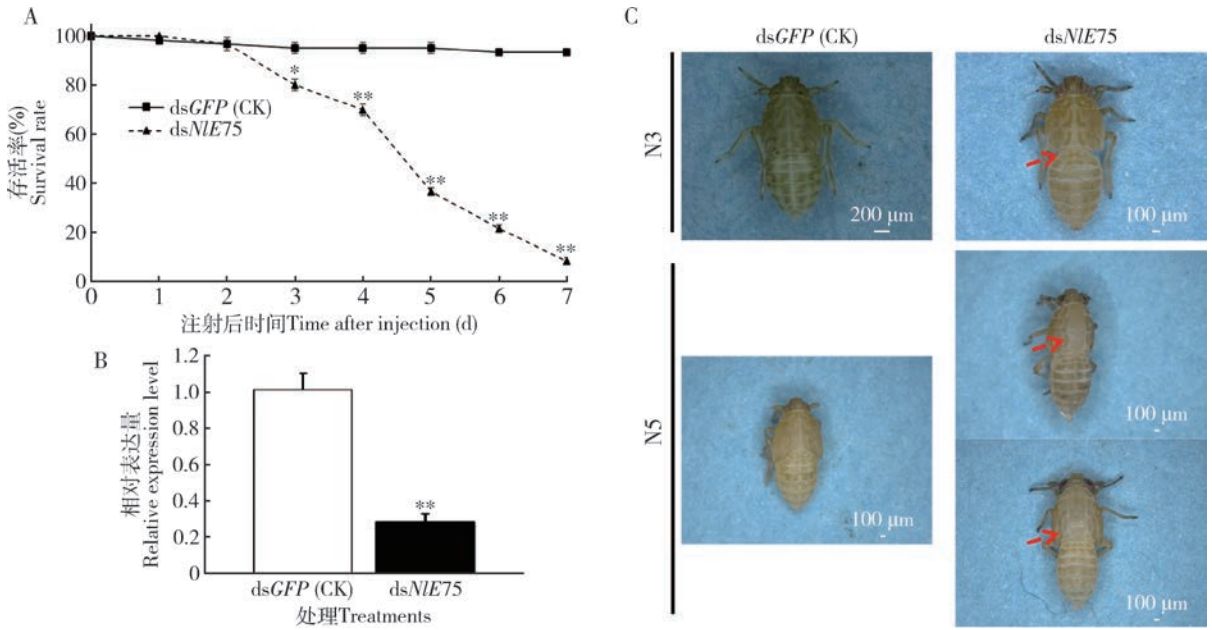


图6 *NIE75* RNAi 后褐飞虱 3 龄若虫存活率(A)和 *NIE75* 的表达量(B)及 3 龄(N3)和 5 龄(N5)若虫表型(C)

Fig. 6 Survival rate (A) and expression level of *NIE75* (B) of the 3rd instar nymphs, and phenotypes (C) of the 3rd (N3) and 5th (N5) instar nymphs of *Nilaparvata lugens* after RNAi of *NIE75*

图中红色箭头为表型异常位置。The red arrows in the figure are the locations of phenotypic abnormalities.

且还会出现其他转录本上调的现象,其中 *NIE75A* 干扰后 *NIE75D* 出现了上调,*NIE75B* 干扰后 *NIE75C* 出现了上调,*NIE75C* 干扰后 *NIE75B* 出现了上调,*NIE75D* 干扰后 *NIE75A* 出现了上调,*NIE75E* 干扰后 *NIE75D* 出现了上调,这说明 *NIE75A* 和 *NIE75D* 存在相互抑制,*NIE75B* 和 *NIE75C* 存在相互抑制,而 *NIE75E* 能抑制 *NIE75D*,所以最终没有可见异常表型出现。结果表明 *NIE75* 存在明显的功能冗余现象,且 5 个转录本存在复杂的相互调控关系(图 7),这一结果与德国小蠊(Mané-Padrós *et al.*, 2008)和东亚飞蝗(刘晓健等, 2020)中的结果类似。

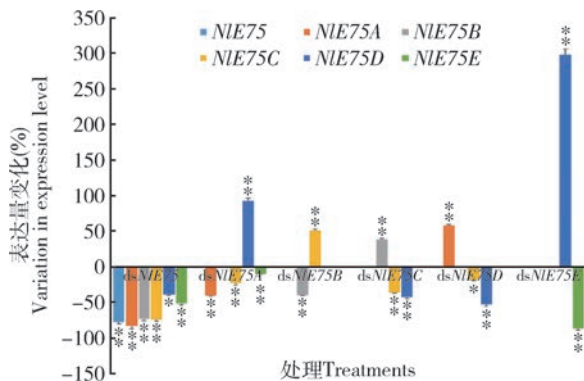


图7 定量检测褐飞虱 3 龄若虫 *NIE75* 及其 5 个转录本 RNAi 后的表达量

Fig. 7 Quantitative detection of the expression levels of *NIE75* and its five transcripts after RNAi in

3 讨论

本研究基于褐飞虱转录组数据库和 RACE 技术获得了 5 个 *NIE75* 的转录本,根据其结构特征分别命名为 *NIE75A*, *NIE75B*, *NIE75C*, *NIE75D* 和 *NIE75E*。在全变态昆虫黑腹果蝇(Bialecki *et al.*, 2002)、家蚕(Li *et al.*, 2015)、赤拟谷盗(Parthasarathy *et al.*, 2008)、马铃薯甲虫(Guo *et al.*, 2016)和半变态昆虫东亚飞蝗(刘晓健等, 2020)、德国小蠊(Mané-Padrós *et al.*, 2008)等昆虫中也发现 *E75* 具有多个转录本,如马铃薯甲虫中有 3 个 *E75* 转录本,黑腹果蝇有 4 个 *E75* 转录本,东亚飞蝗有 3 个 *E75* 转录本,德国小蠊有 5 个 *E75* 转录本。*E75* 的 5 个转录本其编码蛋白具有典型的核受体结构域:一个非依赖配体的激活结构域(A/B 结构域)、DNA 结合域(DBD, C 结构域)、铰链结构域(D 结构域)、配体结合域(LBD, E 结构域)和 F 结构域(King-Jones and Thummel, 2005);褐飞虱 *NIE75A*, *NIE75B*, *NIE75C*, *NIE75D* 和 *NIE75E* 中的 A/B 结构域氨基酸数量不同,*NIE75D* 和 *NIE75E* 没有 DBD 结构域,说明 A/B 结构域在核受体不同转录本之间高度可变,是同一个基因的不同剪切方式,而 D 结构域和 E 结构域可能发挥着不同的功能。德国小蠊 5 个转录本编码的氨基酸也是 A/B 结构域氨基酸数量不同,

而只有 *BgE75D* 没有 DBD 结构域 (Mané-Padrós *et al.*, 2008)。

褐飞虱 5 个 *NIE75* 转录本的表达模式有一定差别,且其表达量也不一致。家蚕和东亚飞蝗中不同转录本也表现出不同的发育表达模式 (Li *et al.*, 2015; 刘晓健等, 2020),而在马铃薯甲虫中,3 个 *E75* 转录本具有相似的发育表达特性 (Guo *et al.*, 2016),表明不同昆虫 *E75* 转录本在各龄期可能发挥着不同的功能,从而共同完成 *E75* 的功能。*NIE75B*, *NIE75C* 和 *NIE75D* 转录本在 4 龄和 5 龄蜕皮前表达量较高,可能参与了蜕皮过程,而 *NIE75E* 在成虫中的表达量最高,其可能参与了成虫的繁殖过程。

褐飞虱体内注射 20E 诱导后 4 和 8 h *NIE75* 均显著上调 (图 5: A),而沉默 20E 合成关键基因 *NICYP314A1* (李凯龙等, 2017) 后 *NIE75* 表达显著下调 (图 5: B),推测 *NIE75* 的表达受 20E 的调控。类似结果在其他昆虫中也有报道,如家蚕 *E75* 在 mRNA 和蛋白水平均表现出对 20E 的响应 (Li *et al.*, 2015);在马铃薯甲虫中体内注射 20E 可诱导 *LdE75A* 和 *LdE75B* 表达 (Guo *et al.*, 2016);在德国小蠊体外组织培养的脂肪体中加入 20E 后可诱导 *BgE75* 的 4 个转录本 (*BgE75A*, *BgE75B*, *BgE75C* 和 *BgE75E*) 表达 (Mané-Padrós *et al.*, 2008);东亚飞蝗若虫注射 20E 可诱导 *LmE75* 的表达 (刘晓健等, 2020)。

对 *NIE75* 及其 5 个转录本进行共有片段干扰和特异性片段干扰结果表明 *NIE75* 不同转录本存在明显的功能冗余现象 (图 7),且转录本之间存在着复杂的调控关系,而在黑腹果蝇和德国小蠊中也存在类似现象。黑腹果蝇的 *DmE75B* 基因突变体一切正常,该转录本在果蝇体内不发挥功能 (Bialecki *et al.*, 2002);德国小蠊不同转录本 RNAi 均能下调各自靶基因的表达量,但其他转录本会上调,最终没有 *E75* 干扰的表型出现 (Mané-Padrós *et al.*, 2008)。对 *E75* 公共区域 (共有的外显子区域) 进行干扰后,3 龄若虫注射 *dsNIE75* 处理组死亡虫体出现个头小、蜂腰 (身体明显拉长,头部和胸部连接处变细) 表型,5 龄若虫注射 *dsNIE75* 处理组死亡虫体出现背板表皮裂开、蜂腰表型,死亡虫为未完成蜕皮即死亡 (图 6: C)。而其他昆虫中的研究表明,飞蝗 *E75* 基因干扰后出现发育延迟现象,死亡率可达 100% (刘晓健等, 2020);赤拟谷盗在幼虫阶段沉默 *TcE75* 后,也会出现蜕皮前死亡和蜕皮中死亡 (X

al., 2010);德国小蠊和马铃薯甲虫中沉默 *E75* 后,个体出现不能变态蜕皮而最终死亡 (Mané-Padrós *et al.*, 2008, Guo *et al.*, 2016);最近还发现 *E75* 通过调控酪氨酸羟化酶和表皮蛋白 CPR27 基因的表达参与了赤拟谷盗成虫表皮的形成 (Sapin *et al.*, 2020)。这些研究说明, *E75* 基因沉默后可能会导致蜕皮激素级联反应受阻,从而导致蜕皮过程未启动或蜕皮过程中发生级联反应失败而出现畸形虫并死亡。

综上所述,本研究基于褐飞虱转录组数据,鉴定获得了褐飞虱 *NIE75* 基因 5 个转录本。这 5 个转录本编码蛋白均具有典型的核受体结构域,仅在 A/B 结构域有差异。*NIE75* 的 5 个转录本具有不同的组织和发育表达特性。体内 20E 诱导及 *NICYP314A1* RNAi 结果表明, *NIE75* 受 20E 信号通路调控。通过 RNAi 的功能分析发现, *NIE75* 存在明显的功能冗余现象,且不同转录本之间存在复杂的调控关系,沉默 *NIE75* 后褐飞虱出现蜕皮受阻而死亡,沉默后第 8 天死亡率可达 100%。结果提示褐飞虱 *E75* 基因参与了褐飞虱蜕皮过程的调控,同样也为蜕皮激素级联反应基因在褐飞虱防治方面的潜在应用提供了理论依据。

参考文献 (References)

- Bialecki M, Shilton A, Fichtenberg C, Segraves WA, Thummel CS, 2002. Loss of the ecdysteroid-inducible *E75A* orphan nuclear receptor uncouples molting from metamorphosis in *Drosophila*. *Dev. Cell.*, 3(2): 209–220.
- Guo WC, Liu XP, Fu KY, Shi JF, Lü FG, Li GQ, 2016. Nuclear receptor ecdysone-induced protein 75 is required for larval–pupal metamorphosis in the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Insect Mol. Biol.*, 25(1): 44–57.
- King-Jones K, Thummel CS, 2005. Nuclear receptors – A perspective from *Drosophila*. *Nat. Rev. Genet.*, 6(4): 311–323.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG, 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21): 2947–2948.
- Li K, Guo EE, Hossain MS, Li QR, Cao Y, Tian L, Deng XJ, Li S, 2015. *Bombyx E75* isoforms display stage- and tissue-specific responses to 20-hydroxyecdysone. *Sci. Rep.*, 5: 12114.
- Li KL, Fu Q, Wang WX, Lai FX, Wan PJ, 2017. Molecular cloning and functional characterization of Halloween genes involved in ecdysteroid biosynthesis in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae). *Acta Entomol. Sin.*, 60(10): 1129–1140. [李凯龙, 傅强, 王渭霞, 赖凤香, 万品俊, 2017. 褐飞虱蜕皮激素合成相关 Halloween 基因的克隆及功能分析. *昆虫学报*, 60(10): 1129–1140.]

- 昆虫学报, 60(10): 1129 – 1140]
- Li KL, Yuan SY, Nanda S, Wang WX, Lai FX, Fu Q, Wan PJ, 2018. The roles of E93 and Kr-h1 in metamorphosis of *Nilaparvata lugens*. *Front Physiol.*, 9: 1677.
- Liu XJ, Guo J, Zhang XY, Ma EB, Zhang JZ, 2020. Molecular characteristics and function analysis of nuclear receptor gene *LmE75* in *Locusta migratoria*. *Sci. Agric. Sin.*, 53(11): 2219 – 2231. [刘晓健, 郭俊, 张学尧, 马恩波, 张建珍, 2020. 飞蝗核受体基因 *LmE75* 的分子特性和功能分析. 中国农业科学, 53(11): 2219 – 2231]
- 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.
- Mané-Padrós D, Cruz J, Vilaplana L, Pascual N, Bellés X, Martín D, 2008. The nuclear hormone receptor BgE75 links molting and developmental progression in the direct-developing insect *Blattella germanica*. *Dev. Biol.*, 315(1): 147 – 160.
- Parthasarathy R, Tan A, Bai H, Palli SR, 2008. Transcription factor broad suppresses precocious development of adult structures during larval – pupal metamorphosis in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Mech. Dev.*, 125(3 – 4): 299 – 313.
- Paul RK, Takeuchi H, Kubo T, 2006. Expression of two ecdysteroid-regulated genes, *Broad-Complex* and *E75*, in the brain and ovary of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Zool. Sci.*, 23(12): 1085 – 1092.
- Pierceall WE, Li C, Biran A, Miura K, Raikhel AS, Segraves WA, 1999. E75 expression in mosquito ovary and fat body suggests reiterative use of ecdysone-regulated hierarchies in development and reproduction. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 150(1 – 2): 73 – 89.
- Sapin GD, Tomoda K, Tanaka S, Shinoda T, Miura K, Minakuchi C, 2020. Involvement of the transcription factor *E75* in adult cuticular formation in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 126: 103450.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S, 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 28(10): 2731 – 2739.
- Tang QY, Zhang CX, 2013. Data Processing System (DPS) software with experimental design, statistical analysis and data mining developed for use in entomological research. *Insect Sci.*, 20(2): 254 – 260.
- Xu JJ, Tan AJ, Palli SR, 2010. The function of nuclear receptors in regulation of female reproduction and embryogenesis in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *J. Insect Physiol.*, 56(10): 1471 – 1480.
- Xu HJ, Zhang CX, Xue J, Ye YX, Jiang YQ, Zhuo JC, Huang HJ, Cheng RL, 2015. Efficient RNAi of rice planthoppers using microinjection. *Protoc. Exch.*, 12(4): DOI: 10.1038/protex.2015.005.
- Yang Q, De Schutter K, Chen P, Van Damme EJM, Smagghe G, 2022. RNAi of the N-glycosylation-related genes confirms their importance in insect development and α -1,6-fucosyltransferase plays a role in the ecdysis event for the hemimetabolous pest insect *Nilaparvata lugens*. *Insect Sci.*, 29(1): 91 – 99.
- Yuan M, Lu YH, Zhu X, Wan H, Shakeel M, Zhan S, Jin BR, Li JH, 2014. Selection and evaluation of potential reference genes for gene expression analysis in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae) using reverse-transcription quantitative PCR. *PLoS ONE*, 9(1): e86503.
- Zhao XF, 2010. Progress in insect molting hormone signaling transduction pathways. *Chin. Bull. Life Sci.*, 22(12): 1208 – 1214. [赵小凡, 2010. 昆虫蜕皮激素信号转导途径研究进展. 生命科学, 22(12): 1208 – 1214]
- Zhou ST, Guo W, Song JS, 2012. Hormone and gene regulation of insect metamorphosis. *Bull. Biol.*, 47(9): 1 – 6. [周树堂, 郭伟, 宋佳晟, 2012. 昆虫变态的激素与基因调控. 生物学通报, 47(9): 1 – 6]
- Zhou X, Ye YZ, Ogihara MH, Takeshima M, Fujinaga D, Liu CW, Zhu Z, Kataoka H, Bao YY, 2020. Functional analysis of ecdysteroid biosynthetic enzymes of the rice planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 123: 103428.

(责任编辑: 马丽萍)