麦长管蚜唾液蛋白 *C002* 的基因克隆与 RNA 干扰研究*

李雪峰[1**] 范 佳[2] 孙永伟[1] 王根平[1] 陈红梅[1] 闫 婷[1] 杜文明[1] 夏兰琴[1***]

（1. 中国农业科学院作物科学研究所/国家农作物基因与改良重大科学工程，北京 100081；
2. 中国农业科学院植物保护研究所，北京 100193）

摘 要 **【目的】** 蚜虫唾液相关蛋白 C002 是一种水溶性唾液蛋白，在蚜虫取食过程中发挥着重要作用。本研究探讨了蚜虫唾液相关蛋白基因 *C002* 在麦长管蚜 *Sitobion avenae*（F.）取食过程中的作用和功能。**【方法】** 根据豌豆蚜基因 *C002* 序列，同源克隆了麦长管蚜 *C002* 基因，并应用荧光定量 PCR 和 RNA 干扰（RNAi）技术分别对该基因的表达规律和功能进行了研究。**【结果】** 结果表明：麦长管蚜 *C002* 基因 cDNA 开放阅读框长 663 bp，编码 220 个氨基酸，命名为 *SvC002*。转录水平的表达时序分析发现，*SvC002* 在蚜虫各个时期都有表达，在 2 龄若蚜时期表达量最高。dsRNA 饲喂结果显示，麦长管蚜取食 ds*C002* 4 d 和 6 d 后，*C002* 基因的表达量分别下降 54%和 69%，差异极显著（$P<0.01$），麦长管蚜存活率较对照组下降了 32.2%和 53.3%。将饲喂 ds*C002* 的麦长管蚜接种到感蚜小麦（北京 837），蚜虫在短时期内出现大量死亡现象，第 6 天和第 8 天存活率分别为 44.4%和 35.6%，低于对照组并达到极显著水平。**【结论】** *C002* 基因在麦长管蚜的取食行为中发挥着重要作用，可以作为麦长管蚜防治的潜在 RNAi 靶标基因。

关键词 麦长管蚜，蚜虫唾液蛋白，C002，RNA 干扰，荧光定量 PCR

Cloning and RNA interference analysis of the *Sitobion avenae* salivary protein *C002* gene

LI Xue-Feng[1**] FAN Jia[2] SUN Yong-Wei[1] WANG Gen-Ping[1] CHEN Hong-Mei[1]
YAN Ting[1] DU Wen-Ming[1] XIA Lan-Qin[1***]

(1. Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences/National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement, Beijing 100081,China; 2. Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract **[Objectives]** To study the function of the *C002* salivary protein gene in the aphid *Sitobion avenae* (F.). **[Methods]** A *C002* gene was cloned based on the *C002* gene of *A. pisum*. Real-time quantitative PCR and RNAi experiments were then conducted to explore the expression patterns and the function of this gene. **[Results]** Bioinformatics analysis shows that the cloned sequence contained a 663 bp open reading frame encoding a protein of 220 amino acid residues. It was therefore named *SaC002*. Transcripts of *SaC002* were detected in all stages of *S. avenae*, and its expression reached the highest level in 2nd instar nymphs. RNAi analysis revealed that *S. avenae* fed with dsC002 were disturbed, and that the expression levels of *C002* decreased by 54% and 69% after continuous feeding for 4 d and 6 d, respectively; significantly lower than in the control group ($P<0.01$). Larval survival rates decreased by 32.2% and 53.3% compared to the control group after continuous feeding for 4 d and 6 d. When *S. avenae* were fed aphid-susceptible wheat (Beijing 837) after feeding on dsC002 for 4 d, its survival rate decreased rapidly within a short time. On day 6 and 8, the survival rate dropped to 44.4% and 35.6%, respectively,

* 资助项目：国家自然科学基金（31371702）；国家转基因生物新品种培育重大专项（2014ZX08002-001B）
**E-mail: lixuefeng_1987@126.com
***通讯作者，E-mail: xialanqin@caas.cn
收稿日期：2014-10-13，接受日期：2014-10-28

significantly lower than that of the control group. **[Conclusion]** The results indicate that silencing the *C002* gene can be lethal to aphids feeding on specific host plants. *SaC002* may serve as a potential target gene for controlling *S. avenae.*

Key words *Sitobion avenae*, aphid saliva protein, *C002*, RNA interference, real-time quantitative PCR

蚜虫是小麦主要害虫之一，通过直接或间接的作用危害小麦的产量和品质（Özder，2002）。麦长管蚜 *Sitobion avenae*（F.）是危害小麦生产的主要害虫，是我国大多麦区麦蚜的优势种。麦长管蚜为害前期主要集中在小麦叶片的正面，后期集中在麦穗，刺吸汁液，致受害植株生长缓慢，分蘖减少，千粒重下降（仵均祥，2002）。麦长管蚜具有根据环境条件和生物因素灵活调整翅型发育的特点，除直接危害小麦外，还可产生有翅型个体通过季节性迁飞传播病毒病，对小麦生产造成更大的危害（张向才等，1985；程登发等，2002；刘向东等，2004）。20 世纪末以来，随着全球气候变暖，农田耕作制度等因素变化，麦蚜的繁殖能力和适应性显著增强，蚜虫危害日趋严重（Awmack and Harrington，2000）。当前，农药防治是治理麦蚜的重要手段之一，但农药的过量使用不仅造成了严重的生态污染，还对人畜健康带来威胁。培育抗虫小麦品种是防止蚜虫危害的最有效途径，但现有小麦种质资源中缺乏有效的抗蚜基因，抗性机制亦不明确，常规小麦抗虫育种难以奏效（张彦等，2012）。与传统育种相比，植物基因工程方法克服了不同物种间基因交流的限制，扩大了潜在有效基因的筛选范围，而且还使多基因转化与表达成为了可能（Yu *et al.*，2014）。因此，发掘、筛选新型抗蚜基因、培育转基因抗蚜小麦，将是一种有效的抗蚜育种策略（Yu *et al.*，2012）。

蚜虫的唾液在蚜虫口针刺入和吸食植株组织营养液过程中起重要作用。蚜虫唾液可以分为凝胶唾液和水溶性唾液，凝胶唾液主要是保护口针在刺入过程中免受机械和化学物质的伤害；水溶性唾液成分复杂，主要是抑制或诱导植物的防御系统和帮助消化植物营养物质（Miles，1999）。因此，唾液蛋白目前已经成为研究蚜虫-植物互作的热点。目前已发现了多酚氧化酶（Anna *et al.*，1998）、氧化还原酶（Mile，1964；Miles and Peng，1989）、钙结合蛋白（Tjallingii，2006；Will and van Bel，2006）等在蚜虫取食过程中起重要作用的蛋白。

C002 是一种重要的水溶性唾液蛋白，主要在蚜虫唾液腺中表达，同时在豌豆蚜的肠道中发现有少量表达（Mutti *et al.*，2006）。Pitino 等（2011）让桃蚜 *Myzus persicae* 分别取食转 ds*MpC002* 基因的烟草和拟南芥，发现供试桃蚜产仔数目明显减少，体内 *MPC002* 基因的表达量降低了 60%。目前 C002 蛋白已经在桃蚜和豌豆蚜 *Acyrthosiphon pisum* 中得到分离和克隆（Harmel *et al.*，2008；Carolan *et al.*，2009）。同时，有研究发现在接种豌豆蚜的蚕豆植株体内也检测到了 C002 蛋白（Mutti *et al.*，2008）。因此，C002 蛋白在蚜虫-植物互作中发挥着重要作用。

RNA 干扰（RNA interference，RNAi）是由双链 RNA（dsRNA）诱导的基因沉默（Fire *et al.*，1998）。其大致过程如下：进入细胞的 dsRNA 被 Dicer 酶（植物中 DCL1）切割产生碱基长度为 21~25 bp 的 siRNA，这些 siRNAs 的一条链与 RNA 沉默复合物结合（RNA-induced silencing complex，RISC）并指导靶 mRNA 的降解，从而抑制和下调靶标基因表达（Carl and Phillip，2004）。近几年来，根据 RNAi 的原理，通过饲喂和注射 dsRNA 的方法沉默靶标基因，已经被广泛应用于昆虫基因功能的鉴定和分析中（杨中侠等，2008；Zhang *et al.*，2013）。

我们实验室在体外饲喂实验中发现，麦长管蚜饲喂 *C002* 基因的 dsRNA 后，可导致其死亡并且死亡率随饲喂时间的增加而逐步提高（Zhang *et al.*，2013），初步表明用 RNAi 的方法沉默关键靶标基因可以达到防治蚜虫的目的。本文拟在实验室前期研究基础上，通过桃蚜和豌豆蚜的保

守序列序列，进行基因的克隆及相关的生物信息学分析；利用实时荧光定量 PCR 技术的方法分析麦长管蚜 *C002* 基因在不同发育时期的表达规律；采用体外饲喂目的基因的 dsRNA 方法，明确麦长管蚜 *C002* 的生物学功能。本研究目的在于为麦长管蚜的综合防治和进一步通过植物介导的 RNAi 创制抗蚜转基因小麦新种质奠定基础。

1　材料与方法

1.1　供试虫源

中国农业科学院植物保护研究所陈巨莲研究员提供麦长管蚜种群，在人工气候箱中用北京 837 小麦苗饲养繁殖，温度（20±2）℃，湿度 60%~80%，光周期 L∶D=14∶10。

1.2　主要试剂和仪器

本研究所有引物及 DNA 测序都是由北京华大基因完成。常用的 *Taq* 酶等购自宝生物工程（大连）有限公司或北京全式金公司，RNA 相关试剂，T 载体，qRT-PCR 试剂盒等购自全式金公司。T7 Quick High Yield RNA Synthesis Kit 购自 NEB 公司。RNA 纯化试剂盒购自 QIAGEN 公司。所用 GFP 质粒由本实验室保存。

1.3　总 RNA 提取以及第一链 cDNA 的合成

采集麦长管蚜 1~4 龄若虫各 25 头，无翅成蚜和有翅成蚜各 15 头，采样后立即用液氮冻存，放入－80℃冰箱备用，用 TRIzol 法分离提取总 RNA，使用 Nanodrop 2000（Thermo）和琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 提取的纯度和完整性。根据 TransScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 反转录试剂盒说明，合成第一链 cDNA，贮存于－20℃冰箱备用。

1.4　麦长管蚜 *C002* 的全长 cDNA 克隆

根据转录组测序结果，以及豌豆蚜和桃蚜保守序列，应用 Primer Primer5.0 软件设计引物（表 1），对序列进行扩增，扩增体系为 50 μL，其中包括 2 μL 引物（10 μmol/L），5 μL 10×Buffer（含 Mg^{2+}），2 μL cDNA 模板，4 μL dNTPs Mixture（2.5 mmol/L），0.5 μL *rTaq* 酶(5 U/μL)，加 ddH_2O 补齐到 50 μL。PCR 反应条件：94 °C 预

表 1　用于基因克隆、实时荧光定量 PCR 和 dsRNA 合成的引物
Table 1　Primers used for gene cloning, real-time PCR and the synthesis of dsRNA

引物用途 Use of primers	序列（5′-3′） Primer sequence	退火温度（℃） Annealing temperature
cDNA 克隆 cDNA cloning	C002F：CTCGTCGTGTATCCAGTGCGATAGC	58
	C002R：GTATGGACAAGCTTATTAAAAACGTCG	
荧光定量 PCR Real-time PCR	ActinF：CGGTTCAAAAACCCAAACCAG	58
	ActinR：TGGTGATGATTCCCGTGTTC	
	qC002F:CCGACAAATTCAAAGAGACGAAGAC	58
	qC002R: AGAAACTTCCAAACTTATTCACGGC	
dsRNA 合成 dsRNA synthesis	T7C002F:TAATACGACTCACTATAGGCGACAAATTCAAAGAGACGAAGAC	50
	T7C002R:TAATACGACTCACTATAGGAGAAACTTCCAAACTTATTCACGGC	
	T7GFPF: TAATACGACTCACTATAGGGCGGGAACTACAAGACACG	50
	T7GFPR: TAATACGACTCACTATAGGGCTTTGGAAAGGGCAGATT	

下划线处为 T_7 启动子。T_7 RNA polymerase promoter is underlined.

变性 5 min；94 °C 变性 30 s，58 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 40 s，30 循环；72 °C 延伸 10 min。PCR 扩增产物用 1%琼脂糖凝胶电泳，胶回收纯化目的片段，然后将目的片段连接到 Teasy 载体上，通过热激转化法，将连接产物导入 Trans5α 大肠杆菌感受态细胞。复苏 1 h 后，涂于 LB+Kan 的板平板上，倒置于 37℃，过夜培养。随机挑取 10 个单菌落于含 Kan 的 LB 液体中培养，PCR 检测确定阳性菌落，菌液送至北京六合华大基因科技有限公司测序，测序结果用 DNAMAN 比对，获取 cDNA 序列全长。

1.5 序列分析及进化树构建

利用 DNAMAN 软件对测序结果进行比对拼接，利用 ORF finder(http://www.ncbi.nlm.gov/gorf/gorf.html)在线软件对拼接序列进行预测，找到序列的开放阅读框，同时使用 NCBI Blastx 在线软件进行氨基酸序列比对分析，使用 SignalP4.1（http://www.cbs.dtu.dk/service/Signal-4.1）在线软件预测是否存在信号肽，使用 DNAMAN 软件分析预测蛋白分子量和等电点。

1.6 麦长管蚜 *C002* 的基因表达分析

采用荧光定量 PCR 技术检测 *C002* 基因在麦长管蚜 1~4 龄若蚜，无翅成蚜和有翅成蚜体内的表达变化动态，将反转录 cDNA 产物稀释 5 倍，作为实时荧光定量 PCR 模板。用 Primer 5.0 软件设计引物，以 *Actin* 基因作为内参基因，对实时荧光定量 PCR 得到的数据采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行分析，以麦长管蚜有翅成蚜作为参照，比较麦长管蚜 *C002* 基因在不同发育时期的表达量。荧光定量采用 20 μL 体系：引物（10 μmol/L）各 0.4 μL，SuperMix 10 μL，Passive Reference Dye 0.4 μL，cDNA 模板 1 μL 加 ddH_2O 补齐到 20 μL。PCR 采用两步法进行：50°C 孵育 2 min，94°C 前预热 10 min，94°C 预热 5 s，58°C 退火 31 s，40 次循环。

1.7 麦长管蚜 *C002* dsRNA 的合成

根据获得的麦长管蚜 *C002* 基因序列和绿色荧光蛋白 *GFP*（登录号：AF234298）序列，用 Primer 5.0 软件设计引物，在特异引物的 5′端加上 T7 启动子（TAATACGACTCACTATA），用于干扰片段 ds*C002* 位于 *C002* 的 383~648 bp，ds*GFP* 位于 *GFP* 的 292~611 bp。体外转录体系为：模板 1~2 μg，20×Ribonucleotide Solution Mix 2 μL，20×HMW Mix 2 μL，10×Transcription Buffer 4 μL，T7 RNA Polymerase（500 untis/μL）2 μL，RNase-Free ddH_2O 补齐到 40 μL，42℃孵育过夜。

反应结束后，琼脂糖凝胶电泳检测反应产物，然后，加入核酸酶消化单链 RNA 和残留的 DNA，用 MinElute PCR Cleaning Kit 试剂盒纯化反应产物，操作过程参看试剂盒说明书，用无 RNA 酶 ddH_2O 溶解 dsRNA，用 Nanodrop 200(Thermo)进行定量，并保存于－20℃备用。

1.8 饲喂法进行 RNAi

采用王晖等（2012）饲育器和人工饲料的配方对麦长管蚜进行 dsRNA 人工饲喂，每个饲育器放入 15 头有翅成蚜，一端用双层纱布封住，把 Parafilm 膜拉至最薄封住另一端，然后用移液器添加 50 μL 人工饲料（dsRNA 终浓度为 7.5 ng/μL）再用另一 Parafilm 膜将人工饲料封在两层膜之间。每两天更换一次人工饲料，并统计麦长管蚜的存活率，同时，于饲喂后 2、4、6、8 d，分别随机取 10 头麦长管蚜提取 RNA，反转录为 cDNA 并稀释 5 倍，－20°C 保存备用。用于检测目的基因的干扰效果。

1.9 *C002* 基因沉默后麦长管蚜接种到小麦上的存活率

取饲喂 4 d ds*C002* 的麦长管蚜，分别接种于小麦北京 837 和全纯人工饲料上，饲喂 8 d，以检测 *C002* 沉默后对麦长管蚜的影响。

2　结果与分析

2.1　麦长管蚜 *C002* 的 cDNA 全长克隆及序列信息分析

以麦长管蚜的 cDNA 为模板，依据桃蚜和豌豆蚜 *C002* 的保守序列设计引物进行扩增测序，获得了片段大小为 723 bp，经 ORF finder 分析表明，cDNA 全长中含有一个 663 bp 的 ORF，编码 220 个氨基酸，预测分子量为 24.767 ku，理论等电点为 8.05，SignalP4.1 预测蛋白信号肽为 23 个氨基酸（图 1）。

使用 MEGA5.0 软件，采用邻近法对包括麦长管蚜在内的 8 种蚜虫唾液蛋白 *C002* 基因编码的氨基酸序列构建了系统发育树。系统进化树分析表明，麦长管蚜与桃蚜和豌豆蚜亲缘关系较近，与其它蚜虫亲缘关系较远，属于不同的分支（图 2）。

2.2　麦长管蚜 *C002* 基因在不同发育时期的表达分析

荧光定量 PCR 对麦长管蚜在不同生长发育期 *C002* 基因的表达量进行比较，数据显示 *C002* 基因在蚜虫的各个龄期都有表达，在 2 龄若虫时表达量达到最高（图 3）。

2.3　饲喂 *C002* dsRNA 对麦长管蚜存活率的影响

用含有终浓度为 7.5 ng/μL ds*GFP* 和 ds*C002* 的全纯人工饲料分别作为非靶标对照组和试验组，全纯人工饲料作为空白对照组（CK），分别统计麦长管蚜在取食 2、4、6、8 d 的存活率。统计结果分析表明，空白对照组和非靶标对照组 ds*GFP* 之间基本一致，不存在差异，试验组 ds*C002*，在饲喂 4 d 时达到显著水平（P<0.05），在 6 d，8 d 达到极显著水平（P<0.01）（图 4）。由此可以推测，麦长管蚜取食 ds*C002* 会影响其存活率。

```
1      CGTCGTGTATCCAGTGCGATAGCGATAATTTACAACATGGGAAGTTACAAATTATACGTA
                                              M  G  S  Y  K  L  Y  V
61     GCCGTCATGGCAATAGCCATAGCTGTAGTACAGGAAGCTAGTTGCGGTAGTCCGTCTGAC
        A  V  M  A  I  A  I  A  V  V  Q  E  A  S  C  G  S  P  S  D
121    GATGAACCGTACGATGAGCAGGAAGAAGCGTCTGTCGAATCACAGATGGAGCACCGTCAG
        D  E  P  Y  D  E  Q  E  E  A  S  V  E  S  Q  M  E  H  R  Q
181    TGCGAGGAATACAAATCGAAGATTTGGGACAAAGCATTTAGTAACCCGGCGGCTATGCAG
        C  E  E  Y  K  S  K  I  W  D  K  A  F  S  N  P  A  A  M  Q
241    TTGATGGCACTAACGTTTAATACAGGTAAAGAATTAGGCTCCGACGAAGTGTGCTCGGAC
        L  M  A  L  T  F  N  T  G  K  E  L  G  S  D  E  V  C  S  D
301    ACAACGCGGGCCATTATTAACTTCGTCGATGTGATGGCTACCAGCCAGAACGCCCATTAC
        T  T  R  A  I  I  N  F  V  D  V  M  A  T  S  Q  N  A  H  Y
361    TCGTTGGGTATGATGAACAAGATGCTGGCGTTCATCGTGAGGGAGGTGAACACGACGTCC
        S  L  G  M  M  N  K  M  L  A  F  I  V  R  E  V  N  T  T  S
421    GACAAATTCAAAGAGACGAAGACGGTTTTCGAACGCATCGCGAAAACTCCAGAGATCCGA
        D  K  F  K  E  T  K  T  V  F  E  R  I  A  K  T  P  E  I  R
481    GACTATATCAAGCACACGACCGCCCGGTCCGTCGACTTGCTCAAGGAGCCCGTGATTAGA
        D  Y  I  K  H  T  T  A  R  S  V  D  L  L  K  E  P  V  I  R
541    GGCCGACTGTTCAAAGTGGTGAAAGCCTTCGAGAGTCTGTTAAAACCGTCCGAAAACGAG
        G  R  L  F  K  V  V  K  A  F  E  S  L  L  K  P  S  E  N  E
601    CAATTGGTCAAGCAGAGGTTTAAGGGGCTAGCCAGTTCTCCCTCCAAGATGGCTATGGGA
        Q  L  V  K  Q  R  F  K  G  L  A  S  S  P  S  K  M  A  M  G
661    GCCGTGAATAAGTTTGGAAGTTTCTTTCGACGTTTTTAA
        A  V  N  K  F  G  S  F  F  R  R  F  *
```

图 1 麦长管蚜 *C002* cDNA 序列及其编码的氨基酸序列

Fig. 1 The cDNA sequence of *C002* in *Sitobion avenae* and its putative amino acide sequence

箭头所指为信号肽切割位点，前面 23 个氨基酸推测是信号肽。

Arrow indicates the signal peptide cleavage site, the first 23 amino acids is supposed to be a signal peptide.

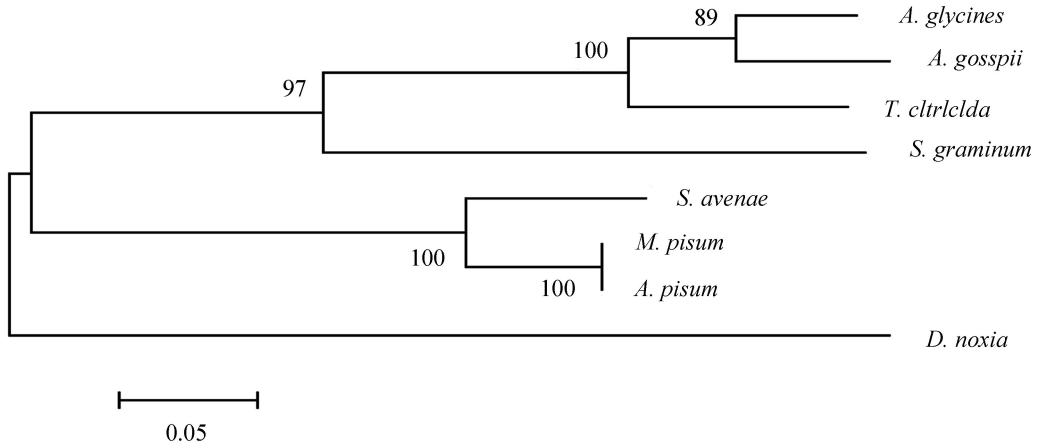

图 2 麦长管蚜及其它蚜虫唾液蛋白 C002 的进化树

Fig. 2 Phylogenetic relationship of the saliva protein C002 of *Sitobion avenae* with these of other agriculturally important aphid species

棉蚜 *A.gosspii*（gb|AHX71991.1|）；大豆蚜 *A.glycines*（gb|AEV66513.3|）；豌豆蚜 *A. pisum*（ref|XP_001948258.2|）；俄罗斯蚜 *D.noxia*（gb|AEP03182.1|）；桃蚜 *M. persicae*（ref|XP_001948358.1|）；麦二叉蚜 *S.graminum*（KC977563）；桔蚜 *T.citricida*；麦长管蚜 *S.avenae*。图中分支节点上的数字表示 1 000 次自检举得到的 Bootstrap 值；比例尺表示每个位点的碱基替换数。

Data in the figure on the branch node indicate the Bootstap test values of 1 000 replicates. The bar represents the estimated number of substiutions at each amino acid locus.

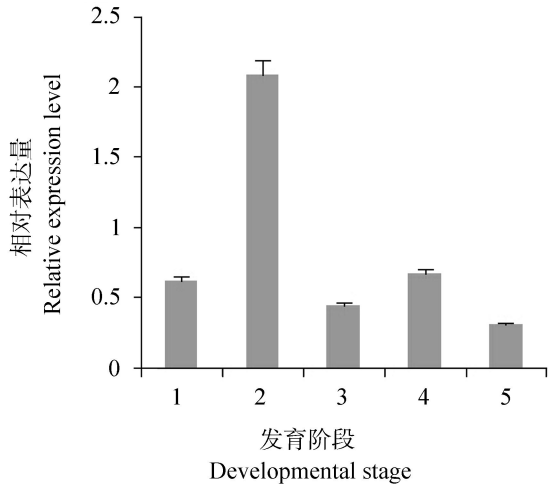

图 3 麦长管蚜不同发育时期唾液蛋白基因 *C002* 的表达水平

Fig. 3 Relative expression levels of *C002* at different developmental stages of *Sitobion avenae*

1. 1 龄若蚜 1st instar nymph; 2. 2 龄若蚜 2nd instar nymph; 3. 3 龄若蚜 3rd instar nymph; 4. 4 龄若蚜 4th instar nymph; 5. 成蚜 Adult.

图中数据为平均值±标准误（*N*=3）。

Data in the figure are mean±SE from three independent experiments.

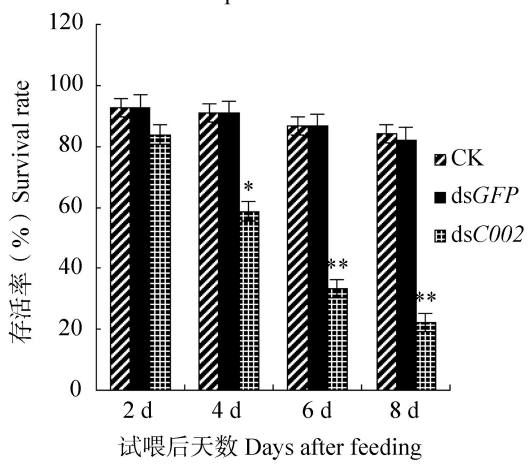

图 4 麦长管蚜取食 ds*C002* 对存活率的影响

Fig. 4 Survival rate of *Sitobion avenae* after feeding ds*C002*

图中数据为平均值±标准误（N=3，n=15）；*和**分别表示统计分析存在显著差异（P<0.05, One-way ANOVA）和极显著差异（P<0.01, One-way ANOVA）。下图同。

Data in the figure are mean±SE from three independent experiment with 15 *S.avenae*; * indicates significant difference at 0.05 level (P<0.05, One-way ANOVA) ; ** indicates extremely significant difference at 0.01 level (P<0.01, One-way ANOVA). The same below.

2.4　饲喂 ds*C002* 对麦长管蚜 *C002* 基因表达水平的影响

分别取非靶标对照组和试验组 0、2、4、6、8 d 麦长管蚜，通过实时荧光定量 PCR 分析在取食 ds*C002* 后，蚜虫 *C002* 基因表达量随天数的变化情况。结果表明，饲喂 4 d 时表达量下降了，差异达到极显著水平（图 5）。

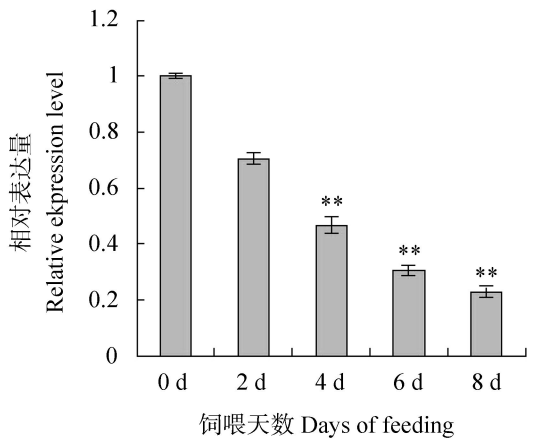

图 5　麦长管蚜取食 dsRNA 后 *C002* 相对表达量

Fig. 5　Relative expression levels of *C002* from *Sitobion avenae* after feeding with dsRNA at different time point

2.5　饲喂 *C002* 基因 dsRNA 后的麦长管蚜取食和存活情况

取饲喂 4 d ds*C002* 的麦长管蚜分别接种到小麦和全纯人工饲料上，统计麦长管蚜的存活率。结果表明，*C002* 基因沉默后，麦长管蚜接种到感蚜小麦（北京 837）后，蚜虫在短时期内出现大量死亡现象，第 6 天和第 8 天存活率分别为 44.4%和 35.6%，极显著低于对照组（表 2）。

3　讨论

本研究首次克隆了麦长管蚜唾液蛋白相关基因 *C002* 的 cDNA 序列，预测该基因编码的氨基酸序列 N 端 1~23 氨基酸为信号肽，推测其可能是一种外分泌蛋白，这与唾液蛋白在细胞外发挥作用的特征相一致。本研究通过对 *C002* 基因的时序表达模式分析发现，该基因在麦长管蚜发育各时期均有表达。从麦长管蚜 1 龄若蚜开始增长，到 2 龄时达到最高，随后表达量下降。2 龄若蚜期表达量最高，表明 2 龄若蚜期为利用 RNA 干扰进行功能研究的最佳时期。

近年来，RNAi 技术作为反向遗传学工具被广泛应用在植物、昆虫、线虫等研究中。在蚜虫中，RNAi 技术已经应用于豌豆蚜（Mutti *et al.*，2006）、桃蚜（Pitino *et al.*，2010）、麦长管蚜（Zhang *et al.*，2013）和麦二叉蚜（Zhang *et al.*，2014）等蚜虫的 RNAi 靶标基因鉴定和基因功能分析。唾液蛋白在蚜虫取食中发挥着重要作用。本研究体外饲喂 ds*C002*，利用 RNAi 技术干扰 *C002* 基因的表达，通过统计麦长管蚜存活率、基因表达特性、基因沉默后取食情况来衡量干扰效果，结果发现，持续饲喂 ds*C002* 4 d 和 6 d 后，基因表达量分别下降了 54%和 69%，达到了极显著水平。*C002* 基因沉默后，麦长管蚜在小麦上的存活受到了较大的影响。Mutti 等（2008）通过刺吸电位图谱技术（EPG）研究取食 dsRNA

表 2　饲喂 *C002* 基因 dsRNA 后麦长管蚜在小麦植株上的存活率

Table 2　Survival rate of *Sitobion avenae* on wheat plants at different time point after feeding the artificial diet added with ds*C002*

食物来源 Food sources	存活率 Survival rate (%)			
	2 d	4 d	6 d	8 d
全纯人工饲料 Pure artifical diet	93.3±6.67Aa	84.4±3.85Aa	77.8±3.86Aa	75.6±3.85Aa

感蚜小麦植株 Wheat plant	80.0±3.85Aa	55.6±3.85Bb	44.4±6.67Bb	35.6±3.85Bb

表中数据为平均值±SE，数据后标有不同小写或大写字母表示经检验差异显著差异（P<0.05）和极显著差异（P<0.01）。
Data in the table are mean±SE, and following by different lowcase letters indicate significantly different at 0.05 level, while following by different uppercase letters indicate significantly different at 0.01 level.

后，豌豆蚜在植物上的取食行为，发现豌豆蚜 *C002* 基因沉默后，蚜虫不能穿刺筛管细胞，或者在筛管细胞中停留时间很短，说明 C002 蛋白同样在豌豆蚜取食中发挥着重要作用。因此，C002 蛋白同源类似物在不同蚜虫的取食行为中均发挥着重要作用。

随着昆虫 RNAi 通路研究的深入和靶标基因快速识别技术的迅速发展，RNA 干扰技术为害虫的综合防治提供了新的思路（Zhang *et al.*，2013；Zhu，2013）。目前，利用植物介导的 RNAi 技术已分别成功获得抗棉铃虫转基因棉花、玉米根螟和抗褐飞虱水稻（Baum *et al.*，2007; Mao *et al.*，2007；Zha *et al.*，2011）。因此，随着越来越多的蚜虫关键 RNAi 靶标基因的鉴定，有望通过植物介导的 RNA 干扰，获得抗蚜转基因小麦新种质。

参考文献 (References)

Anna UW, Freddy T, Anthony F,Dixon G, Bogumil L, 1998. Phenol oxidising enzymes in the grain aphid's saliva. *Entomologia Experimentalis et Applicata* , 86(2): 197–203.

Awmack CS, Harrington R, 2000. Elevated CO_2 affects the interactions between aphid pests and host plant flowering. *Agricultural and Forest Entomology*, 2(1): 57–61.

Baum JA, Bogaert T, Clinton W, Heck GR, Feldmann P, Ilagan, Roberts J, 2007. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature Biotechnology*, 25(11): 1322–1326.

Carl DV, Phillip AS, 2004. The RNAi revolution. *Nature*, 430(6996): 161–164.

Carolan JC, Fitzroy CI, Ashton PD, Douglas AE, Wilkinson TL, 2009. The secreted salivary proteome of the pea aphid *Acyrthosiphon pisum* characterised by mass spectrometry. *Proteomics*, 9(9): 2457–2467.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC, 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. *Nature*, 391(6669): 806–811.

Harmel N, Létocart E, Cherqui A, Giordanengo P, Mazzucchelli G, Guillonneau F, Francis F, 2008. Identification of aphid salivary proteins: a proteomic investigation of *Myzus persicae*. *Insect Molecular Biology*, 17(2): 165–174.

Mao YB, Cai WJ, Wang JW, Hong GJ, Tao XY, Wang LJ, Chen XY. 2007. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nature Biotechnology*, 25(11): 1307–1313.

Miles PW, 1999. Aphid saliva. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 74(01): 41–85

Miles PW, 1964. Studies on the salivary physiology of plant bugs: Oxidative activity in the salivary apparatus and saliva. *Journal of Insect Physiology* ,10(1): 121–129.

Miles PW, Peng Z, 1989. Studies on the salivary physiology of plant bugs: Detoxification of phytochemicals by the salivary peroxidase of aphids. *Journal of Insect Physiology*, 35(11): 865–872.

Mutti NS, Louis J, Pappan LK, Pappan K, Begum K, Chen MS, Park YS, Dittmer N, Marshell J, Reese JC, Reeck GR, 2008. A protein from the salivary glands of the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*, is essential in feeding on a host plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(29): 9965–9969.

Mutti NS, Park Y, Reese JC, Reeck GR, 2006. RNAi knockdown of a salivary transcript leading to lethality in the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*. *Journal of Insect Scienc*e, 6(38): 1–7.

Özder N, 2002. Development and fecundity of *Sitobion avenae* on some wheat cultivars under laboratory conditions. *Phytoparasitica*, 30(4): 434–436.

Pitino M, Coleman AD, Maffei ME, Ridout CJ, Hogenhout SA, 2011. Silencing of aphid genes by dsRNA feeding from plants. *PLoS ONE*, 6(10): e25709.

Tjallingii WF, 2006. Salivary secretions by aphids interacting with proteins of phloem wound responses. *J. Exp. Bot.,* 57(4) : 739–745.

Will T, van Bel AJE, 2006. Physical and chemical interactions between aphids and plants. *J. Exp. Bot.*, 57(4): 729–735.

Xu L, Duan X, Lv Y, Zhang X, Nie Z, Xie C, Liang RQ, 2014 . Silencing of an aphid carboxylesterase gene by use of plant-mediated RNAi impairs *Sitobion avenae* tolerance of phoxim insecticides. *Transgenic Research*, 23(2): 389–396.

Yu XD, Pickett J, Ma YZ, Bruce T, Napier J, Jones HD, Xia LQ,

2012. Metabolic engineering of plant-derived (E)-β-farnesene synthase genes for a novel type of aphid-resistant genetically modified crop plants. *J. Integr. Plant Biol.*, 54(5): 282–299.

Yu XD, Wang GP, Huang SL, Ma YZ, Xia LQ, 2014. Engineering plants for aphid resistance: current status and future perspectives . *Theor. Appl. Genet*., 127(10): 2065–2083.

Zha W, Peng X, Chen R, Du B, Zhu L, He G, 2011. Knockdown of midgut genes by dsRNA-transgenic plant-mediated RNA interference in the hemipteran insect *Nilaparvata lugens*. *PLoS ONE*, 6(5): e20504.

Zhang M, Zhou Y, Wang H, Huw Jones,Gao Q,Wang DH, Zhang YJ, Ma YZ, Xia LQ, 2013.Identifying potential RNAi targets in grain aphid (*Sitobion avenae* F.) based on transcriptome profiling of its alimentary canal after feeding on wheat plants. *BMC Genomics*, 14(1): 560.

Zhang Y, Fan J, Chen JL, Sun JR,Cheng DF, 2014. Cloning and RNA interference analysis of the salivary protein C002 gene in *Schizaphis graminum*. *Scientia Agricultura Sinica*, Doi:10.1061/S2095-3119(14)60822-4.

Zhu KY, 2013. RNA interference: A powerful tool in entomological research and a novel approach for insect pest management. *Insect Science*, 20(1): 1–3.

程登发, 田喆, 李红梅, 孙京瑞, 陈巨莲, 2002. 温度和湿度对麦长管蚜飞行能力的影响. 昆虫学报, 45(1): 80–85. [Cheng DF, Tian Z, Li HM, Sun JR, Chen JL, 2002. Influence of temperatureand humidity on the flight capacity of sitobion avena e. *Acta Entomologica Sinica*, 45(1): 80-85.]

刘向东, 翟保平, 张孝羲, 2004. 蚜虫迁飞的研究进展. 昆虫知识 , 41(4): 301-307. [Liu XD, Zhai BP, Zhang XY, 2004. Advance in the studies of migration of aphids. *Chinese Bulletin of Entomology*, 41(4): 301-307.]

王晖, 张珉, 张小红, 夏兰琴, 2012. 利用 RNAi 技术沉默麦长管蚜与桃蚜细胞色素 P450. 中国农业科学, 45(17): 3463–3472. [Wang H, Zhang M, Zhang XH, Xia LQ, 2012. Silencing of cytochrome P450 in sitobion avenae and myzus persicae through RNA interference. *Chinese Academy of Agricultural Sciences*, 45(17): 3463-3472.]

仵均祥，2002. 农业昆虫学. 北京：中国农业出版社. 76–78

杨中侠,文礼章, 吴青君, 王少丽, 徐宝云, 张友军, 2008. RNAi 技术在昆虫功能基因研究中的应用进展. 昆虫学报, 51(10): 1077 – 1082. [Yang ZX, Wen LZ, Wu QJ, Wang LS, Xu BY, Zhang YJ, 2008. Application of RNA interference in studying gene functions in insects. *Acta Entomologica Sinica*, 51(10): 1077-1082.]

张向才, 周广和, 史明, 方建中, 赵争平, 李淑华, 董庆周, 魏凯, 1985. 麦蚜远距离迁飞和传毒规律的研究. 植物保护学报, 12(1): 9–15. [Zhang XC, Zhou GH, Shi M, Fang JZ, Zhao ZP, Li SH, Dong QZ, Wei K, 1985. Studies on the long-distance migration of and cirus transmission by the aphid Sitobion avenae (F.). Journal of Plant Protection, 12(1): 9–15]

张彦, 喻修道, 唐克轩, 夏兰琴, 2012. 用基因枪法获得转异天南星基因 *aha* 抗蚜虫小麦. 作物学报, 38(8): 1538–1543. [Zhang Y, Yu XD, Tang KX, Xia LQ, 2012. Generation of aphid resistant transgenic wheat with aha from arisaema heterophyllum by particle bombardment. *Acta Agronomica Sinica*, 38(8): 538-1543.]