



蜕皮激素和有效霉素对粘虫几丁质合成酶 B 基因表达的影响*

王晓曦** 赵桂莹 杨 航 张雅男 樊 东***

(东北农业大学农学院, 哈尔滨 150030)

摘要 【目的】克隆粘虫 *Mythimna separata* 几丁质合成酶 B 基因的全长 cDNA 序列, 研究该基因的时空表达特性, 分析蜕皮激素 (20-hydroxy ecdysone, 20 E) 和有效霉素 (Validamycin) 对该基因表达水平的影响。【方法】本试验通过高通量测序法获得粘虫几丁质合成酶 B 基因的 cDNA 全长序列, 利用 RT-qPCR 技术分析粘虫几丁质合成酶 B 基因在不同发育阶段和不同组织的特异性表达及蜕皮激素和有效霉素对其表达的影响。【结果】基因 cDNA 全长 4 617 bp, 包含一个完整开放阅读框, 编码 1 个 1 538 个氨基酸组成的多肽, 分子量为 175.629 ku, 理论等电点为 5.96, 包含 17 个跨膜螺旋, 4 个几丁质合成酶的标签序列 CATMWHET, DGD, EDR 和 QRRRW 及 1 个催化结构域。该基因命名为 *MsCHSB*, GenBank 登录号为 KY348776。氨基酸序列比对表明, 该基因与其他昆虫的几丁质合成酶 B 基因同源性高于 52%, 其中与蓓带夜蛾 *Mamestra configurata* 和棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 的几丁质合成酶 B 基因同源性最高, 分别为 92% 和 83%。RT-qPCR 技术表明粘虫在不同发育阶段和组织中均有 mRNA 的特异性表达, 其中 3 龄第 1 天和中肠中 *MsCHSB* 基因相对表达量最高。注射 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 浓度的蜕皮激素 6 h 和 12 h 后, 表现为对该基因的诱导效应, 与对照组差异显著; 有效霉素处理后该基因相对表达量均被显著抑制, 其中注射 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 浓度的有效霉素 48 h 后, 抑制作用最为明显。【结论】本试验得到了一条新的粘虫几丁质合成酶 B 基因 cDNA 序列全长。蜕皮激素对 *MsCHSB* 基因的表达有一定的诱导作用, 有效霉素对 *MsCHSB* 基因的表达有一定的抑制作用, 该结果为进一步研究昆虫几丁质合成酶 B 打下了基础。

关键词 粘虫; 几丁质合成酶 B; 克隆; 蜕皮激素; 有效霉素; 表达

Effect of ecdysone and validamycin on chitin synthase B gene expression in *Mythimna separata*

WANG Xiao-Xi** ZHAO Gui-Ying YANG Hang ZHANG Ya-Nan FAN Dong***

(Agronomy College, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract [Objectives] To obtain the full-length cDNA sequence of the *Mythimna separata* chitin synthase B (CHSB) gene, and investigate the effect of 20 E and validamycin on the mRNA expression levels of this gene in different developmental stages and tissues. [Methods] A full-length cDNA sequence of the *M. separata* CHSB gene was obtained by high-throughput sequencing and its mRNA expression levels in different developmental stages and tissues quantified with RT-qPCR. mRNA expression levels after treatment with 20 E and validamycin were also measured with RT-qPCR. [Results] The cDNA sequence of the *M. separata* CHSB gene is 4 617 bp with an open reading frame encoding a polypeptide of 1 538 amino acids, an estimated molecular mass of 175.629 ku, and an estimated pI of 5.96. It has 17 transmembrane helices, 4 tag sequences (CHS, CATMWHET, DGD, EDR and QRRRW), and one putative catalytic domain. Its cDNA sequence was designated

*资助项目 Supported projects: 黑龙江省自然科学基金项目 (C201415)

**第一作者 First author, E-mail: 2323458775@qq.com

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

收稿日期 Received: 2018-09-26; 接受日期 Accepted: 2018-12-03

MsCHSB and has been deposited in GenBank (accession No. KY348776). Sequencing indicated > 52% shared identity between *MsCHSB* and CHSB from other insect species, and 92% and 83% similarity with *Mamestra configurata* and *Helicoverpa armigera* CHSB. Real-time PCR indicated that *MsCHSB* mRNA transcripts were expressed in all developmental stages and in tissues but were most highly expressed in the early 3rd larval instar and in the midgut. *MsCHSB* expression was significantly higher than that of the control group 6 h and 12 h after treatment with 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ of 20 E. The relative expression of *MsCHSB* after validamycin treatment was significantly lower than in the control group, and this was most apparent 48 h after treatment with 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ validamycin. [Conclusion] A novel CHSB cDNA sequence was obtained from *M. separata*. The expression of *MsCHSB* was increased by 20 E and inhibited by validamycin. These results provided a foundation for further research on the biological function of CHSB in insects.

Key words *Mythimna separata*; chitin synthase B; cloning; 20-hydroxy ecdysone; validamycin; expression

粘虫 *Mythimna separate* (Walker) 属鳞翅目 Lepidoptera 夜蛾科 Noctuidae。具有多食性、迁飞性和暴食性的特性, 主要为害禾谷科作物, 大爆发时幼虫会迅速取食光叶片, 造成严重危害, 甚至绝收。长期大量的以化学农药防治粘虫, 使其抗药性增强, 如何合理有效地防治粘虫成为目前植保工作的主要任务(江幸福等, 2014; 王双全等, 2018)。

几丁质是 β -(1,4)-N-乙酰基-D-葡萄糖胺 (GlcNAc) 的线性聚合物, 存在于昆虫表皮, 气管和中肠围食膜上。它起着保护昆虫免受外来入侵微生物和消化食物的关键作用(Merzendorfer, 2006)。昆虫几丁质的合成共有 8 个酶参与, 起始于生成海藻糖的海藻糖酶 (Trehalase), 终止于合成几丁质的几丁质合成酶 (Candy and Kilby, 1962)。

目前发现几丁质合成酶有几丁质合成酶 A (CHSA) 和几丁质合成酶 B (CHSB) 两类, CHSB 也称为 CHS2 (EC 2.4.1.16), 负责合成中肠上皮细胞的围食膜几丁质并在其中特异性表达 (Merzendorfer, 2006)。CHSA 和 CHSB 两个酶的结构相似, 均是分子量在 160-180 ku 的大型跨膜蛋白 (Tellam et al., 2000), 昆虫 CHS 有 14-17 个跨膜螺旋特征和 3 个共同结构域 A, B 和 C, 结构域 A 在 CHS 的 N 端, 物种之间氨基酸序列相似性最低; 结构域 B 在 CHS 的中段, 是高度保守的蛋白质催化中心, 物种之间氨基酸序列相似性较高, 有 4 个标签序列 CATMWHXT, DXD, EDR 和 QRRRW; 结构域 C 在 CHS 的 C 端, 物种之间氨基酸序列差异性较高 (Merzendorfer,

2006; 陆建良等, 2008; Qu et al., 2011)。

昆虫的生长发育取决于几丁质, 调控 CHSB 的表达来防治害虫会有一定成效 (Arakane et al., 2005; Tian et al., 2009), 如抑制 CHSB 的活性会使昆虫饥饿导致死亡 (Chaudhari et al., 2015)。几丁质不存在于植物和脊椎动物中, 所以它的合成已被用作开发生物防治剂的靶标, 除虫脲是最早的这类化合物, 如苯甲酰基苯基脲等, 具有不同活性谱的苯甲酰基苯基脲被广泛用于害虫防治 (Doucet and Retnakaran, 2016)。目前已知黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (Gagou et al., 2002), 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* (Arakane et al., 2004), 烟草天蛾 *Manduca sexta* (Hogenkamp et al., 2005), 甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* (Kumar et al., 2008), 家蚕 *Bombyx mori* (孔令斐, 2010), 亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* (Qu et al., 2011), 冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* (Zhang et al., 2012), 东方果蝇 *Bactrocera dorsalis* (Li et al., 2013), 飞蝗 *Locusta migratoria* (刘晓健等, 2014), 稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis* (余海中等, 2015), 致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus* (赵文静等, 2016), 马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* (Shi et al., 2016) 梨小食心虫 *Grapholitha molesta* (杨静等, 2017) 等 10 余种昆虫的 CHSB 基因被克隆出来。

蜕皮激素 20 E 诱导昆虫的蜕皮和变态 (Truman and Riddiford, 2002), 保幼激素 (Juvenile hormone, JH) 则阻止蜕皮激素引起的变态, 使幼虫蜕皮后仍维持幼虫状态, 它们是昆虫变态最主要的激素。昆虫的生长发育是由 20 E 和 JH 相互协同完成的 (Jindra et al., 2013)。昆虫体内

保幼激素水平较高时,昆虫幼虫只会从一个龄期发育到下一个龄期,而不会进入下一个虫态;昆虫体内保幼激素水平下降且蜕皮激素上升时,全变态昆虫的幼虫才能发育为蛹(Truman and Riddiford, 1999)。蜕皮激素 20 E 通过影响几丁质酶的合成影响昆虫生长发育。

有效霉素(Validamycin)又名井冈霉素(Jinganmycin),不仅抗菌,还可以杀虫。向 2 龄烟草菱纹夜蛾 *Prodenia litura* 幼虫体内注射有效霉素,导致其全部死亡且形态异常(申屠旭萍等, 2005)。向 5 龄第 1 天稻褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 幼虫注射不同浓度的有效霉素使海藻糖酶活性降低(Tang *et al.*, 2017)。昆虫几丁质生物合成途径中,海藻糖酶作为第一个关键途径,几丁质合成酶作为最后一个关键途径,本试验研究有效霉素是否会抑制 *MsCHSB*,使其相对表达量降低,为今后以生物技术防治粘虫提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

供试粘虫幼虫采自东北农业大学向阳实习基地的玉米植株,幼虫在生化培养箱内饲养,喂食新鲜的玉米叶子,条件为温度(25±1),湿度 60%-70%,光:暗=14:10。羽化成成虫后,在养虫笼中饲养,喂食 5%的蜂蜜水,待成虫产卵;成虫产卵后在同样条件下培养箱内孵化,幼虫用新鲜玉米叶饲喂到不同龄期用于试验。

1.2 试验仪器和试剂

试验中主要用到的仪器:美国 Hettich 公司

的低温冷冻离心机(UNIVERSAL16R 型);购自北京六一仪器厂的电泳仪(DYY-6C 型);美国 GENE 公司的凝胶成像系统 Alphamager EP; Thermo Fisher 公司的 PCR 仪(SimpliAmp 型);Bio-Red 公司的荧光定量 PCR 扩增仪(Chromo4TM 型)等。

试验中主要用到的试剂:Invitrogen 公司的 Trizol[®] reagent;Biotium 公司的 GelGreen Nucleic Acid Gel Stain;全式金生物技术有限公司的 DMSO 和反转录试剂盒;生工生物工程股份有限公司的 20-Hydroxyecdysone;上海源叶科技有限公司的 Validamycin;TaKaRa 公司的 DNA 胶回收试剂盒等。

1.3 粘虫几丁质合成酶 B 基因全长克隆

通过安诺优达公司测序,得到的粘虫转录组序列,通过数据库筛选获得一条 CHS 基因,经 NCBI 上 Blast 确定后属于 CHSB 基因,定名为 *MsCHSB*。设计该基因 5'端和 3'端的引物 Ms-F 和 Ms-R(表 1),对获得的 *MsCHSB* cDNA 序列进行验证。PCR 程序如下:94 预变性 5 min; 94 变性 30 s,60 退火 30 s,72 延伸 30 s, 30 个循环;72 充分延伸 10 min。用琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物,胶回收,测序。测序的结果与数据库得到的结果比对,确定该序列 cDNA 的全长序列。

1.4 氨基酸序列分析

ExPASy 网站(<http://ca.expasy.org/tools/>)的 Compute pI/Mw 在线推导氨基酸序列的分子量和理论等电点;Signal P 4.1 Server 进行信号肽的预测;NCBI-Blast(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

表 1 试验所用引物

Table 1 Primers in the experiment

引物名称 Primer names	序列 Sequences (5'-3')	引物用途 Usage of primers
Ms-F Ms-R	GAAGAAGCGGAGCCATTGAA CGTCCCTGGGTATGTCGGTA	<i>MsCHSB</i> 基因 cDNA 全长鉴定 Full-length cDNA identification of <i>MsCHSB</i>
CHSB-F CHSB-R GCCGACAAAGT [^]	TCCTTGCTGTTTCTGCCCAA GCCGACAAAGTTTTCCACC	荧光定量引物 Primers of RT-qPCR
β-actin-F β-actin-R	CCAACGGCATCCACGAGACCA TCGGCGATACCAGGGTACAT	内参基因的引物 Primers of internal reference gene

BLAST)搜索其他昆虫 CHSB 氨基酸同源序列, DNAMAN7.0 和 Clustalx 进行同源性比较, MEGA7.0 进行系统进化分析; SMART 网站 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)分析基因的结构域; NetNGlyc 网站 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)分析糖基化位点。

1.5 不同发育阶段和不同组织 *MsCHSB* 的表达

1.5.1 底物模板的制备 Trizol 法提取粘虫 RNA,不同发育阶段选择同一批 1-5 龄第 1 天和最后一天及 6 龄第 1 天的幼虫,预蛹期,蛹期第 1 天和最后一天及成虫期的样本,用液氮迅速冷冻虫体后放于 -80°C 冰箱备用,每个龄期重复 3 次;不同组织选择 5 龄第 2 天幼虫前肠,中肠,后肠,唾腺,脂肪体,马氏管和体壁的本,在 RNA 保存液中解剖和放置,解剖完成后立即提取 RNA,重复 3 次,每次 10 只。用分光光度计测 RNA 浓度,按照相对定量方法和反转录试剂盒的说明,反转录成 cDNA,存于 -20°C 冰箱备用。

1.5.2 RT-qPCR 和结果分析 荧光定量每板每个底物平行处理 3 个孔,重复 3 次。RT-qPCR 的程序如下: 95°C 预变性 3 min; 95°C 变性 10 s, 60°C 退火 30 s, 39 个循环。数据用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行计算,软件 SPSS Statistics 22 Duncan's 多重比较法分析显著性差异 ($P>0.05$)。

1.6 蜕皮激素对 *MsCHSB* 表达的诱导

选择 4 龄第 2 天的粘虫幼虫,注射 $4\ \mu\text{L}$ 的 DMSO 作为对照, $4\ \mu\text{L}$ 的浓度分别为 2.5、5、10 和 $20\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的 20 E 作为处理。每组 30 只,重复 3 次。6、12、24、48 和 96 h 后对对照和不同浓度的处理进行取样,提取 RNA,重复 3 次。反转录和荧光定量过程同 1.5。

1.7 有效霉素对 *MsCHSB* 表达的抑制

1.7.1 相对表达量的测定 选择 4 龄第 2 天的粘虫幼虫,注射 $4\ \mu\text{L}$ 的清水作为对照, $4\ \mu\text{L}$ 的浓度分别为 2.5、5、10、20 和 $40\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的有效霉素作为处理,每组 30 只,重复 3 次。24 h 和 48 h 后对对照和不同浓度的处理进行取样,提取

RNA,重复 3 次。反转录和荧光定量过程同 1.5。

1.7.2 中肠几丁质含量的测定 测定方法按照 (Tang *et al.*, 2017) 进行,并做适当改进。取注射 24 h 和 48 h 后的样本,每个浓度 15 只进行测定,重复 3 次。取各样本的中肠在 50°C 烘箱中 4 d,磨成粉末称重(滤纸也在烘箱中处理 4 d 以除去水分,并称重记为 W_1)。用 50 mL 4 M HCl 溶液 75°C 水浴下处理粉末 2 h,过滤并用蒸馏水将残余物彻底冲洗,将滤液用 50 mL 4 M NaOH 溶液 150°C 处理 20 h。将混合物过滤并用蒸馏水反复洗涤,最终,样品在 60°C 烘箱中干燥 24 h,称量滤纸加几丁质的干重记为 W_2 。粘虫中肠几丁质的含量: $W=W_2-W_1$ 。

2 结果与分析

2.1 cDNA 序列全长和序列分析

粘虫几丁质合成酶 B 基因的全长 cDNA 序列及推导的氨基酸序列见图 1。

MsCHSB 基因 cDNA 序列全长 4 617 bp,包含一个完整的开放阅读框,编码 1 个 1 538 个氨基酸组成的多肽,分子量为 381.605 ku,理论等电点为 4.73。预测分析该基因的氨基酸序列有 17 个跨膜螺旋区,说明该酶是跨膜蛋白,N-末端位于细胞膜内。有 4 个 N-糖基化位点,说明该酶可能会被糖基化。该基因分为 3 个结构域:有 10 个跨膜螺旋的 N 端 (1-561),有 7 个跨膜螺旋的 C 端 (947-1 538),及高度保守的催化结构域 (562-946)。有 4 个几丁质合成酶的标签序列: CATMWHET, DGD, EDR 和 QRRRW。说明推导的氨基酸序列正确,属于几丁质合成酶。

2.2 序列比对和系统进化分析

MEGA 邻近法进行聚类分析(图 2)表明,粘虫 CHSB 与同属鳞翅目夜蛾科、螟蛾科、天蛾科、蚕蛾科、凤蝶科和菜蛾科的昆虫 CHSB 聚类于同一分支;与直翅目、双翅目、鞘翅目的昆虫分属不同分支,符合形态分类标准。粘虫 CHSB 与蓓带夜蛾 CHSB 和棉铃虫 CHSB 的同源性分别达到了 92%和 83%,亲缘关系较近;与马铃薯甲虫 CHSB 和赤拟谷盗 CHSB 亲缘关系较远。

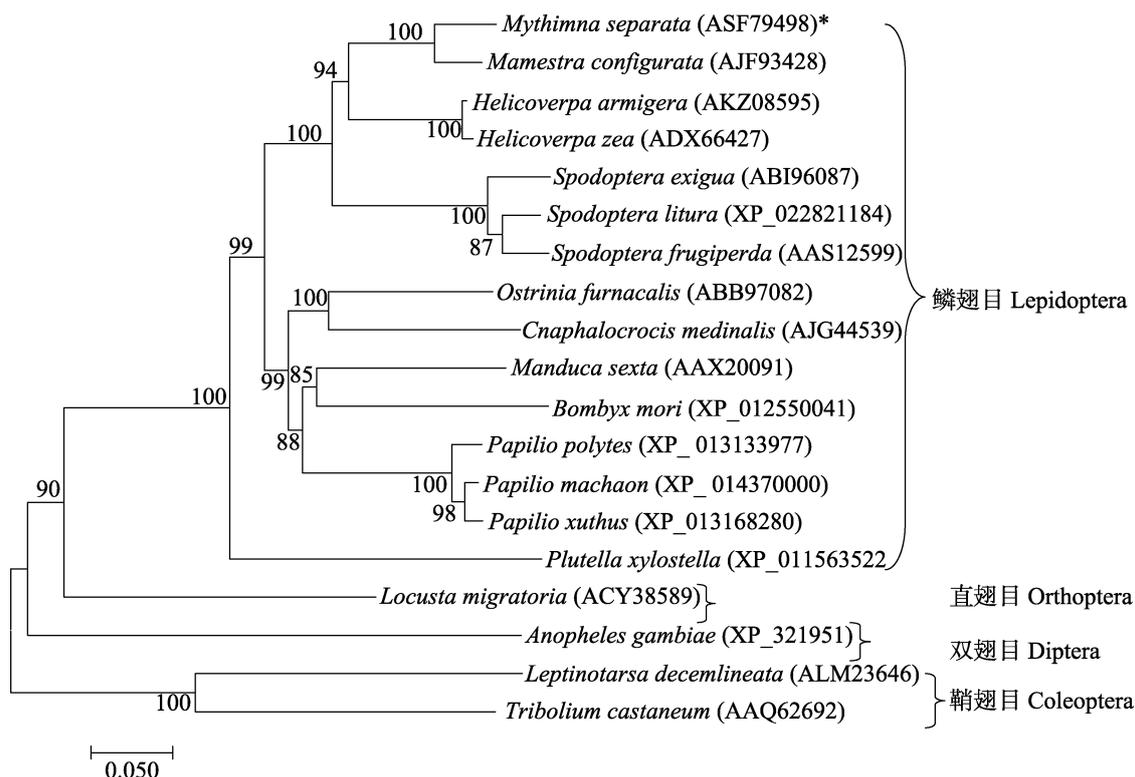


图 2 利用邻近法构建的昆虫 CHSB 氨基酸序列系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of CHSB based on amino acid sequence in insects by using Neighbor-Joining method

节点上数字代表自展值。Bootstrap support values of NJ tree are indicated above the lines. 粘虫 *Mythimna separata* (ASF79498); 蓀带夜蛾 *Mamestra configurata* (AJF93428); 棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (AKZ08595); 斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* (XP_022821184); 甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* (ABI96087); 草地夜蛾 *Spodoptera frugiperda* (AAS12599); 烟草天蛾 *Manduca sexta* (AAX20091); 金凤蝶 *Papilio machaon* (XP_014370000); 柑橘凤蝶 *Papilio xuthus* (XP_013168280); 亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* (ABB97082); 玉带凤蝶 *Papilio polytes* (XP_013133977); 稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis* (AJG44539); 家蚕 *Bombyx mori* (XP_012550041); 小菜蛾 *Plutella xylostella* (XP_011563522); 美洲棉铃虫 *Helicoverpa zea* (ADX66427); 东亚飞蝗 *Locusta migratoria* (ACY38589); 冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* (XP_321951); 赤拟古盗 *Tribolium castaneum* (AAQ62692); 马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* (ALM23646).

可见, 昆虫的 CHSB 同源性与物种的亲缘关系基本一致。

2.3 不同发育阶段和组织 MsCHSB 的表达差异

不同发育阶段 mRNA 表达结果显示 *MsCHSB* 基因在不同发育阶段均有表达。除了 5 龄的第一天和最后一天差异不显著, 1-4 龄, 6 龄和蛹期第一天的基因表达量明显高于各自龄期的最后一天, 且差异显著, 分别是最后一天表达量的 1.7 倍、1.2 倍、2.2 倍、2.0 倍、1.2 倍和 4.7 倍。1 龄最后一天的表达量最低, 3 龄第一天和蛹期第一天的表达量最高, 分别是 1 龄最后一天的 9.4 倍和 8.2 倍。

MsCHSB 基因在不同组织中均有表达, 且在 0.05 水平上中肠与其他组织具有显著性差异。*MsCHSB* 基因在体壁表达量最低, 在中肠的表达量最高, 为体壁的 50.2 倍。前肠、后肠、马氏管、唾腺和脂肪体的表达量分别是体壁的 22.1 倍、16.4 倍、3.4 倍、2.7 倍和 1.2 倍。

2.4 蜕皮激素对 *MsCHSB* 相对表达的影响

相较注射 DMSO, 注射 2.5、5、10 和 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 20 E 的 4 龄粘虫蜕皮时间分别提早了 0.3、1.2、3.5 和 2 h。注射 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的 20 E 6 h 和 12 h 后, *MsCHSB* 基因的表达量升高, 与对照差异显著, 表现为对该基因的诱导作用; 注射其他浓度 20 E

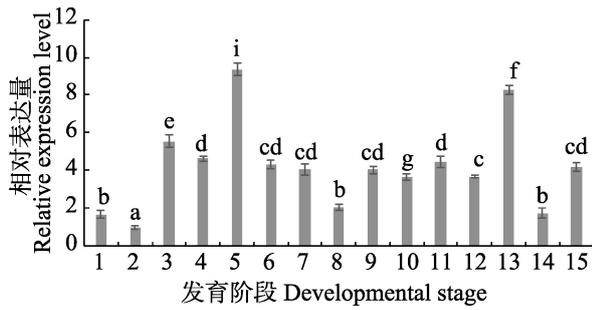


图3 不同发育阶段 *MsCHSB* 相对表达量
Fig. 3 Relative expression of *MsCHSB* mRNA at different developmental stages

误差线上不同的小写字母代表在 0.05 水平上 *MsCHSB* 表达的显著性差异 (Duncan's 多重比较法) 下同。

Lower-case letters over error bars indicate the significant differences in *MsCHSB* expression at the 0.05 level by Duncan's multiple-range test. The same below.

1: 1 龄第 1 天; 2: 1 龄最后一天; 3: 2 龄第 1 天; 4: 2 龄最后一天; 5: 3 龄第 1 天; 6: 3 龄最后一天; 7: 4 龄第 1 天; 8: 4 龄最后一天; 9: 5 龄第 1 天; 10: 5 龄最后一天; 11: 6 龄第 1 天; 12: 预蛹; 13: 蛹期第 1 天; 14: 蛹期最后一天; 15: 成虫期。

1: 1st instar larvae on the first day; 2: 1st instar larvae on the last day; 3: 2nd instar larvae on the first day; 4: 2nd instar larvae on the last day; 5: 3rd instar larvae on the first day; 6: 3rd instar larvae on the last day; 7: 4th instar larvae on the first day; 8: 4th instar larvae on the last day; 9: 5th instar larvae on the first day; 10: 5th instar larvae on the last day; 11: 6th instar larvae on the first day; 12: Prepupae; 13: Pupae on the first day; 14: Pupae on the last day; 15: Adults.

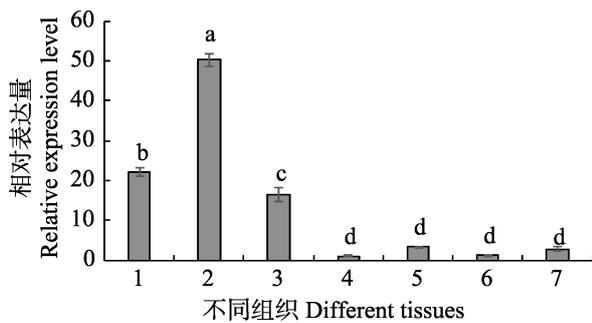


图4 不同组织 *MsCHSB* 相对表达量
Fig. 4 Relative expression of *MsCHSB* mRNA in different tissues

1: 前肠; 2: 中肠; 3: 后肠; 4: 体壁; 5: 马氏管; 6: 脂肪体; 7: 唾液腺。

1: Foregut; 2: Midgut; 3: Hindgut; 4: Body wall; 5: Malpighian tubules; 6: Fat bodies; 7: Salivary glands.

不同时间后, 该基因的表达量均降低, 与对照差

异显著, 表现为对该基因的抑制作用。基因的表达量 48 h 下降后 96 h 再次升高; 注射 20 E 浓度为 2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 和 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 时, 基因的表达量在 6-48 h 逐渐降低, 96 h 又升高; 注射 20 E 浓度为 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 时, 基因的表达量在 6-12 h 升高, 24 h 后逐渐降低; 注射 20 E 浓度为 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 时, 基因的表达量在 6-96 h 逐渐降低。

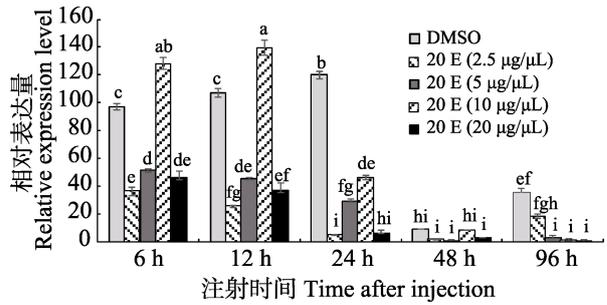


图5 蜕皮激素处理下 *MsCHSB* 相对表达量
Fig. 5 Relative expression of *MsCHSB* mRNA at different concentrations of 20E

2.5 有效霉素诱导下 *MsCHSB* 的表达和中肠几丁质含量变化

MsCHSB 基因在注射不同浓度有效霉素 24 h 和 48 h 后均有表达, 24 h 和 48 h 各处理浓度下的相对表达量与对照组具有显著性差异。24 h 和 48 h 注射 0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 有效霉素的相对表达量最高, 从 0、2.5、5、10 到 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 相对表达量逐渐降低, 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 时相对表达量有一定回升, 但差异不显著; 注射 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 有效霉素 24 h 和 48 h 后, 基因的相对表达量最低, 相比对照组下降了 95.2% 和 96.4%。

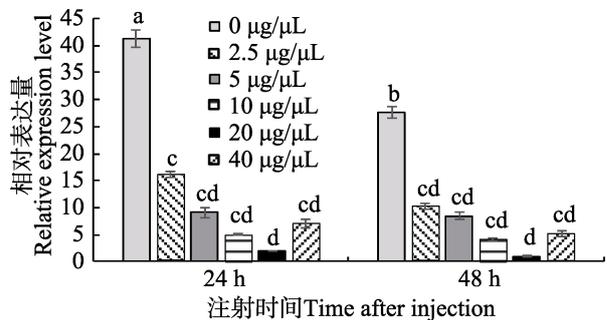


图6 有效霉素诱导下 *MsCHSB* 相对表达量
Fig. 6 Relative expression of *MsCHSB* mRNA at different concentrations of validamycin

有效霉素诱导 *MsCHSB* 基因的表达后, 中

肠中的几丁质含量没有显著性变化, 诱导 24 h 后的几丁质含量普遍高于诱导 48 h 的几丁质含量。注射浓度从 0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 到 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 时, 随着几丁质合成酶 B 基因表达量逐渐下降至最低点, 几丁质的含量也逐渐减少至最低; 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 时, 随着几丁质合成酶 B 基因表达的上调, 几丁质的含量也有一定的增加。可见, 粘虫发育过程中, *MsCHSB* 表达水平和中肠几丁质含量呈正相关关系。

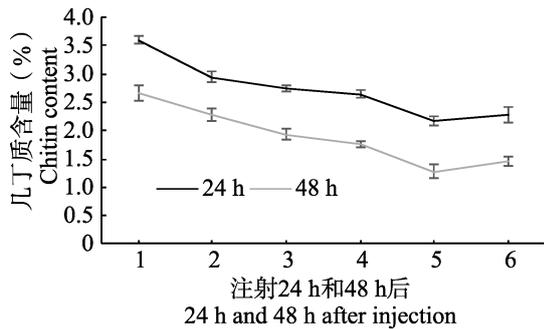


图 7 有效霉素诱导后中肠几丁质含量

Fig. 7 Chitin content in midgut at different concentrations of validamycin

1: 0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; 2: 2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; 3: 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; 4: 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; 5: 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; 6: 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

3 讨论

几丁质合成酶是昆虫合成几丁质途径中的关键酶, 研究它对于开发生物农药防治农业害虫具有重要意义。本试验首次通过转录组测序得到了 *MsCHSB* 基因的 cDNA 序列全长。 *MsCHSB* 开放阅读框为 4 617 bp 编码 1 538 个氨基酸。 *MsCHSB* 与其他昆虫的 CHSB 有一致的特征性结构(余海中等, 2015; 杨静等, 2017), Blast 搜索获得的与该序列同源性高的序列均为昆虫 CHSB 基因, 以上结果均表明所得基因是粘虫 CHSB 基因的 cDNA 序列。

不同发育阶段的表达模式研究表明, *MsCHSB* 在 3 龄第一天有最高表达, 而同是鳞翅目的甜菜夜蛾 *SeCHSB* (Kumar *et al.*, 2008) 和亚洲玉米螟 *OfCHSB* (Qu *et al.*, 2011) 在 5 龄有最高表达, 赤拟古盗 *TcCHS2* 在老熟幼虫和成虫阶段表达量高(Arakane *et al.*, 2004), 致倦库蚊 *CqCHS2*

(赵文静等, 2016) 和东方果蝇 *BdCHSB* (Li *et al.*, 2013) 在成虫期有最高表达量。不同种类昆虫不同阶段表达量的不同可能与虫体内不同的激素代谢过程有关。

不同组织的表达模式研究表明, 东方果蝇 *BdCHSB* (Li *et al.*, 2013), 家蚕 *BmCHSB* (Zhuo *et al.*, 2013), 稻纵卷叶螟 *CmCHSB* (余海中等, 2015), 马铃薯甲虫幼虫 *LdCHSB* (Shi *et al.*, 2016) 和甜菜夜蛾 *SeCHSB* (Kim *et al.*, 2017) 均在中肠有最高表达, *MsCHSB* 在中肠中也有最高表达, 与其他昆虫试验结果相一致。

昆虫幼虫进食期更多以 JH 存在, 相邻龄期间的蜕皮主要受 20 E 调控 (Riddiford *et al.*, 2003), *MsCHSB* 基因在注射不同浓度 20 E 的各个阶段均有表达, 注射 2.5、5 和 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的 20 E 经过 6、12、24、48 和 96 h 后, 均未表现出诱导效应; 注射 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的 20 E 6 h 和 12 h 后 *MsCHSB* 表达高于对照, 表现出显著的诱导效应。基因在幼虫蜕皮结束和新蜕皮时基因的表达量升高, 发育历期变短, 表明 *MsCHSB* 基因的表达与昆虫蜕皮有关。向 4 龄第 2 天粘虫幼虫注射 20 E 时, 并没有使基因表达上调, 推测是因为 48 h 和 96 h 时粘虫正处在 4 龄到 5 龄的新蜕皮阶段和 5 龄刚蜕皮完成到 6 龄阶段。与本试验研究结果相似的, 在对家蚕 *BmCHSB* 研究中, 基因的表达不仅是受外源蜕皮激素单一调控, 也取决于内源激素的相对水平。向 4 龄蜕皮 2 h 后的家蚕注射 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的 20 E 经过 3、12、24 和 48 h 后, 均未表现出诱导效应; 注射 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的 20 E 6 h 后 *BmCHSB* 表达高于对照, 表现出显著的诱导效应。4 龄和 5 龄刚蜕皮后的低 20 E 和高 JH 内源激素环境中, 外源激素具有很强的上调 CHSB 基因表达的作用; 即将预蛹幼虫的高 20 E、低 JH 内源激素环境中, 外源激素的这种上调作用微弱 (Zhuo *et al.*, 2013)。向 3 龄果蝇幼虫喂食一种前体蜕皮激素 Ecdysone (E) 可加速果蝇变态, 导致变态期间致死率升高且身长变小, 而 20 E 对幼虫几乎没有影响。向 E 中添加保幼激素类似物 (JHA) 阻碍它们早熟, 使身长回复近正常 (Ono, 2014)。外源 20 E 和 JH 协同作用下如何调控 *MsCHSB*

表达,有待进一步研究。

有效霉素作为一种安全的生物农药,可以被动物肠道内微生物分解成井冈胺和葡萄糖,井冈胺不为肠道吸收,而被排到体外(徐利剑等,2015);具有抑制真菌和昆虫的海藻糖酶活性,使海藻糖不能分解成葡萄糖(Muller *et al.*, 1995)。本试验在 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 有效霉素 24 h 和 48 h 的诱导下 *MsCHSB* 基因表达量最低,分别相比对照下降了 95.2% 和 96.4%,几丁质含量下降了 39.8% 和 51.9%,说明有效霉素对 *MsCHSB* 基因的表达有明显的抑制作用,是直接对 *CHSB* 基因产生了诱导,还是通过对 *Tre* 基因的抑制无法产生海藻糖,使几丁质合成通路受阻,间接产生了抑制效应暂时还无法得知,需要后续研究得以论证。有研究向褐飞虱 *NICHS1* 注射有效霉素 48 h 后,不仅蜕皮和翅的发育受到影响,几丁质含量随着有效霉素浓度的升高而下降,10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 时基因的表达量下降了约 80%,几丁质含量最低约占 8%(Tang *et al.*, 2017),与本试验得到了相近的结论,两试验几丁质含量的差异在于本试验提取中肠几丁质,而褐飞虱的几丁质来自体壁。也有有效霉素作为药剂处理的研究,姜义平实验室发现有效霉素抑制白背飞虱生殖(姜义平,2016);200 mg/L 有效霉素喷洒水稻叶片处理使灰飞虱单雌产卵量降低到 47.3%,体长和腹部产卵瓣明显变小(吴优等,2016)。目前已有的研究都是有效霉素对半翅目飞虱科的褐飞虱 *NICHSA* 的抑制作用及对灰飞虱和白背飞虱生殖的抑制,本试验发现有效霉素同样能对鳞翅目夜蛾科的粘虫 *MsCHSB* 基因产生抑制作用。本试验只检测了有效霉素处理后对 *MsCHSB* 基因表达的影响和中肠几丁质含量的变化,而昆虫的生长发育和各项生理生化指标也可能受到一定的影响,相关的研究和数据正在进行中。若该设想成立,增加了有效霉素防治虫害的应用范围,为有效霉素与其他杀虫剂混配来提高防治粘虫的效果提供依据。

目前有许多研究利用 RNA 干扰技术(RNA interference, RNAi)来抑制 *CHSB* 的表达,获得了一定成效。沉默飞蝗的 *LMCHS2*,使飞蝗中肠围食膜的完整性被破坏,中肠和胃盲囊长度缩

短,对食物的消化吸收困难,最终因饥饿而死亡,死亡率高达 78%(刘晓健等,2014);干扰 3 龄家蚕幼虫 *BmCHSB* 的表达,大部分不蜕皮和不正常蜕皮(Zhuo *et al.*, 2013)。RNA 干扰赤拟谷盗的膜结合海藻糖酶基因(*Tre-2*),对 *CHSB* 有较大的影响,影响中肠几丁质的合成,使中肠中的几丁质含量降低了 25%(Chen *et al.*, 2010)。喂食 2 龄和 4 龄马铃薯甲虫幼虫细菌表达的 *dsCHSB*,幼虫进食量减少、生长缓慢,且中肠中几丁质含量降低(Shi *et al.*, 2016)。后续可以从干扰 *MsCHSB* 基因的角度进行研究,为今后的生物技术防治粘虫提供新的思路。

参考文献 (References)

- Arakane Y, Hogenkamp DG, Zhu YC, Kramer KJ, Specht CA, Beeman RW, Kanost MR, Muthukrishnan S, 2004. Characterization of two chitin synthase genes of the red flour beetle, *Tribolium castaneum* and alternate exon usage in one of the genes during development. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34(3): 291–304.
- Arakane Y, Muthukrishnan S, Kramer KJ, Specht CA, Tomoyasu Y, Lorenzen MD, Kanost M, Beeman RW, 2005. The *Tribolium chitin synthase* genes *TcCHS1* and *TcCHS2* are specialized for synthesis of epidermal cuticle and midgut peritrophic matrix. *Insect Molecular Biology*, 14(5): 453–463.
- Candy DJ, Kilby BA, 1962. Studies on chitin synthesis in the desert locust. *Journal of Experimental Biology*, 39(1): 129–140.
- Chaudhari SS, Noh MY, Moussian B, Specht CA, Kramer KJ, Beeman RW, Arakane Y, Muthukrishnan S, 2015. Knickkopf and retroactive proteins are required for formation of laminar serosal procuticle during embryonic development of *Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 60(3): 1–6.
- Chen J, Tang B, Chen HX, Yao Q, Huang XF, Chen J, Zhang DW, Zhang WQ, 2010. Different functions of the insect soluble and membrane-bound trehalase genes in chitin biosynthesis revealed by RNA interference. *PLoS ONE*, 5(4): e10133.
- Doucet D, Retnakaran A, 2016. Targeting Cuticular Components for Pest Management. Vol. 10. Berlin: Springer International Publishing. 369–407.
- Gagou ME, Kapsetaki M, Turberg A, Kafetzopoulos D, 2002. Stage-specific expression of the chitin synthase *DmeChSA* and *DmeChSB* genes during the onset of *Drosophila metamorphosis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(2): 141–146.

- Hogenkamp DG, Arakane Y, Zimoch L, Merzendorfer H, Kramer KJ, Beeman RW, Kanost MR, Specht CA, Muthukrishnan S, 2005. Chitin synthase genes in *Manduca sexta*: characterization of a gut-specific transcript and differential tissue expression of alternately spliced mRNAs during development. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(6): 529–540.
- Jiang XF, Zhang L, Cheng YX, Luo LZ, 2014. Novel features, occurrence trends and economic impact of the oriental armyworm, *Mythimna separata* (Walker) in China. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 51(6): 1444–1449. [江幸福, 张蕾, 程云霞, 罗礼智, 2014. 我国粘虫发生危害新特点及趋势分析. 应用昆虫学报, 51(6): 1444–1449.]
- Jiang YP, 2016. The molecular mechanisms of jinggangmycin stimulated the reproduction of *Nilaparvata lugens* (Stal) but suppressed the reproduction of *Sogatella furcifera* (Horváth). Doctoral dissertation. Yangzhou: Yangzhou University. [姜义平, 2016. 井冈霉素刺激褐飞虱生殖, 抑制白背飞虱生殖的分子机制. 硕士学位论文. 扬州: 扬州大学.]
- Jindra M, Palli SR, Riddiford LM, 2013. The juvenile hormone signaling pathway in insect development. *Annual Review of Entomology*, 58(1): 181–204.
- Kim HS, Noh S, Park Y, 2017. Enhancement of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac and Cry1Ca toxicity against *Spodoptera exigua* (Hübner) by suppression of a chitin synthase B gene in midgut. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 20(1): 199–205.
- Kong LF, 2010. Study on gene expression and function of chitinase and chitin synthase in the silkworm, *Bombyx mori*. Doctoral dissertation. Suzhou: Soochow University. [孔令斐, 2010. 家蚕几丁质酶与几丁质合成酶的基因表达与功能研究. 硕士学位论文. 苏州: 苏州大学.]
- Kumar NS, Tang B, Chen XF, Tian HG, Zhang WQ, 2008. Molecular cloning, expression pattern and comparative analysis of chitin synthase gene B in *Spodoptera exigua*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 149(3): 447–453.
- Li C, Yang WJ, Lin C, Xu KK, Wang JJ, 2013. Molecular cloning, characterization and mRNA expression of a Chitin synthase 2 gene from the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). *International Journal of Molecular Sciences*, 14(8): 17055–17072.
- Liu XJ, Cui M, Li DQ, 2014. Expression, function and regulation of chitin synthase 2 Gene in *Locusta migratoria*. *Scientia Agricultura Sinica*, 47(7): 1330–1340. [刘晓健, 崔森, 李大琪, 2014. 飞蝗几丁质合成酶 2 基因的表达特性、功能及调控. 中国农业科学, 47(7): 1330–1340.]
- Lu JL, Lin C, Yang XL, Zheng XQ, Liang YR, 2008. Characteristics prediction of insect chitin synthase. *Journal of Zhejiang University (Agric. & Life Sci.)*, 34(5): 491–501. [陆建良, 林晨, 杨晓丽, 郑新强, 梁月荣, 2008. 昆虫几丁质合成酶特性预测. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 34(5): 491–501.]
- Merzendorfer H, 2006. Insect chitin synthases: A review. *Journal of Comparative Physiology B*, 176(1): 1–5.
- Muller J, Boller T, Wiemken A, 1995. Effects of validamycin A, a potent trehalase inhibitor and phytohormones on trehalose metabolism in roots and root nodules of soybean and cowpe. *Planta*, 97(2): 362–368.
- Ono H, 2014. Ecdysone differentially regulates metamorphic timing relative to 20-hydroxyecdysone by antagonizing juvenile hormone in *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology*, 391(1): 32–42.
- Qu MB, Liu T, Yang J, Yang Q, 2011. The gene, expression pattern and subcellular localization of chitin synthase B from the insect *Ostrinia furnacalis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 404(1): 302–307.
- Riddiford LM, Hiruma K, Zhou X, Nelson CA, 2003. Insights into the molecular basis of the hormonal control of molting and metamorphosis from *Manduca sexta* and *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33(12): 1327–1338.
- Shentu XP, Zheng YG, Yu XP, 2005. Development and utilization of Jinggangmycin and its decomposition products. *Chinese Journal of Antibiotics*, 26(6): 275–278. [申屠旭萍, 郑裕国, 俞晓平, 2005. 井冈霉素及其分解产物的开发利用. 国外医药抗生素分册, 26(6): 275–278.]
- Shi JF, Mu LL, Chen X, Guo WC, Li GQ, 2016. RNA interference of chitin synthase genes inhibits chitin biosynthesis and affects larval performance in *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *International Journal of Biological Sciences*, 12(11): 1319–1331.
- Tang B, Yang MM, Shen QD, Xu YX, Wang HJ, Wang SG, 2017. Suppressing the activity of trehalase with validamycin disrupts the trehalose and chitin biosynthesis pathways in the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 137(4): 81–90.
- Tellam RL, Vuocolo T, Johnson SE, Jarmey J, Pearson RDL, 2000. Insect chitin synthase. *European Journal of Biochemistry*, 267(19): 6025–6042.

- Tian HG, Peng H, Yao Q, Chen HX, Xie Q, Tang B, Zhang WQ, 2009. Developmental control of a lepidopteran pest *Spodoptera exigua* by ingestion of bacteria expressing dsRNA of a non-midgut gene. *PLoS ONE*, 4(7): e6225.
- Truman JW, Riddiford LM, 1999. The origins of insect metamorphosis. *Nature*, 401(6752): 447–452.
- Truman JW, Riddiford LM, 2002. Insect developmental hormones and their mechanism of action. *Hormones Brain and Behavior*, 2: 841–873.
- Wang SQ, Yang QB, Li YB, Qin TL, Han XR, 2018. Study on the effect of six pesticides on *Mythimna separata*. *Modern Agricultural Science and Technology*, (9): 145–148. [王双全, 杨全宝, 李彦兵, 秦天琳, 韩晓荣, 2018. 6 种药剂对玉米粘虫的防效研究. *现代农业科技*, (9): 145–148.]
- Wu Y, 2016. Inverse effect of fungicides on reproduction of the vector insect the small brown planthopper (SBPH), *Laodelphax striatellus* (Fallen), and its mechanism. Doctoral dissertation. Yangzhou: Yangzhou University. [吴优, 2016. 两种杀菌剂对灰飞虱生殖的反向效应及机制. 硕士学位论文. 扬州: 扬州大学.]
- Xu LJ, Zhao W, Cao C, Wang J, Wang Q, Wang QG, 2015. Research progress of Jinggangmycin. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, (22):191–198. [徐利剑, 赵维, 曹聪, 王健, 王茜, 王庆贵, 2015. 井冈霉素的研究进展. *中国农学通报*, (22): 191–198.]
- Yang J, Yu Q, Gao Y, Liu ZF, Shi GC, Zhang PJ, Fan RJ, 2017. Molecular cloning, sequence analysis and expression of the chitin synthase 2 gene in the oriental fruit moth *Grapholitha molesta* (Busck). *Chinese Journal of Applied Entomology*, 54(3): 407–416. [杨静, 庾琴, 高越, 刘中芳, 史高川, 张鹏九, 范仁俊, 2017. 梨小食心虫几丁质合成酶 2 基因的克隆与表达研究. *应用昆虫学报*, 54(3): 407–416.]
- Yu HZ, Huang KH, Wang WL, Liu MH, Yang X, Zhang Y, Xu JP, 2015. Identification and expression analysis of chitin synthase and related enzymes in the chitin biosynthetic pathway genes of *Cnaphalocrocis medinalis*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 52(5): 1181–1194. [余海中, 黄克慧, 汪婉玲, 刘明辉, 杨鑫, 张彦, 徐家萍, 2015. 稻纵卷叶螟几丁质合成酶及合成通路相关酶基因的鉴定及表达分析. *应用昆虫学报*, 52(5): 1181–1194.]
- Zhang X, Zhang J, Park Y, Zhu KY, 2012. Identification and characterization of two chitin synthase genes in African malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 42(9): 674–682.
- Zhao WJ, Zhang CL, Zhai SZ, 2016. Expression and analysis of chitin synthase gene *CqCHS1* and *CqCHS2* in *Culex quinquefasciatus*. *Genomics and Applied Biology*, 35(9): 2317–2323. [赵文静, 张春林, 翟素珍, 2016. 致倦库蚊几丁质合成酶基因 *CqCHS1* 和 *CqCHS2* 的表达与分析. *基因组学与应用生物学*, 35(9): 2317–2323.]
- Zhuo WW, Chu F, Kong LF, Tao H, Sima YH, Xu SQ, 2013. Chitin synthase B: a midgut-specific gene induced by insect hormones and involved in food intake in *Bombyx mori* larvae. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 85(1): 36–47.