



点蜂缘蝽铁蛋白基因功能分析*

闫箫天** 李俊敏 孙宗涛 张传溪 陈剑平 黄海剑***

(宁波大学植物病毒学研究所, 宁波 315211)

摘要 【目的】铁蛋白 (Ferritin) 在维持生物铁稳态中起着重要作用。通过分析点蜂缘蝽 *Riptortus pedestris* 铁蛋白基因, 揭示其对点蜂缘蝽的生物学影响, 为进一步探究铁蛋白功能以及点蜂缘蝽防治提供参考。【方法】利用转录组和基因组数据鉴定点蜂缘蝽铁蛋白基因; 通过转录组测序分析铁蛋白基因在不同龄期和不同组织的表达水平; 对点蜂缘蝽若虫分别注射铁蛋白基因 dsRNA 进行基因沉默。【结果】本研究鉴定到了 3 个点蜂缘蝽铁蛋白基因, 分别是铁蛋白重链亚基 (RpFer1)、铁蛋白轻链亚基 (RpFer2) 和体铁蛋白 (Rpsoma-Fer)。3 种铁蛋白基因在各个龄期均有表达, RpFer1 和 RpFer2 的表达随昆虫蜕皮呈周期性变化, 而 Rpsoma-Fer 的表达与昆虫蜕皮无明显相关性。组织特异性分析表明, 3 种铁蛋白在肠道、肌肉以及表皮组织中表达较高, 而在唾液腺、精巢、卵巢的表达较低。RNA 干扰结果表明, 抑制 RpFer1 和 RpFer2 会导致点蜂缘蝽若虫蜕皮受阻, 进而表现出高致死率, 但抑制 Rpsoma-Fer 没有出现明显的表型变化。【结论】铁蛋白 RpFer1 和 RpFer2 在点蜂缘蝽的发育过程中不可或缺, 可能在蜕皮过程中起重要作用, 未来可以将其作为 RNA 干扰技术防治点蜂缘蝽的靶基因。

关键词 点蜂缘蝽; 防治; 铁蛋白; RNA 干扰

Functional analysis of ferritin genes in *Riptortus pedestris*

YAN Xiao-Tian** LI Jun-Min SUN Zong-Tao ZHANG Chuan-Xi
CHEN Jian-Ping HUANG Hai-Jian***

(Institute of Plant Virology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract 【Objectives】To characterize the function of ferritin genes, which play an essential role in maintaining iron homeostasis, in *Riptortus pedestris*, thereby providing a theoretical foundation for the control of this pest. 【Methods】Homologous ferritin genes were identified by sequence analysis from *R. pedestris* transcriptomic and genomic data and RNA-seq used to detect the expression patterns of three ferritin genes in different developmental stages and tissues. Third instar nymphs were injected with ferritin dsRNAs and subsequent phenotypic changes observed. 【Results】Three ferritin genes, including ferritin heavy chain (RpFer1), ferritin light chain (RpFer2) and soma-Fer (Rpsoma-Fer), were identified. All three genes were expressed at all developmental stages examined, but differed in their expression patterns in different stages. The expression patterns of RpFer1 and RpFer2 were correlated with molting, whereas that of Rpsoma-Fer was not. All three genes were highly expressed in the intestine, muscle, and cuticle but less expressed in the salivary gland, testis, and ovary. Suppression of RpFer1 or RpFer2 was lethal to *R. pedestris* nymphs because it inhibited molting. However, we did not detect any phenotypic changes after treatment with dsRpsoma-Fer. 【Conclusion】Both RpFer1 and RpFer2 play an essential role in the molting process and are therefore essential for normal *R. pedestris* development. Consequently these two genes are potential targets for *R. pedestris* control.

Key words *Riptortus pedestris*; pest control; ferritin; RNA interference

*资助项目 Supported projects: 宁波市公益类科技计划 (2021S012); 转基因生物新品种培育重大专项 (2019ZX08004-004)

**第一作者 First author, E-mail: yanxiaotian2009@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: huanghaijian@nbu.edu.cn

收稿日期 Received: 2021-07-07; 接受日期 Accepted: 2022-01-03

点蜂缘蝽 *Riptortus pedestris*, 属半翅目, 缘蝽科, 蜂缘蝽属, 是大豆田间常见的刺吸式害虫。点蜂缘蝽地理分布广泛, 且寄主多样, 常见的豆科、禾本科及葫芦科等作物均是其寄主, 但主要寄主是大豆 (Mainali *et al.*, 2014)。点蜂缘蝽通过刺吸式口器持续刺吸植株和种子汁液来获取养分, 导致大豆植株的发育不良甚至死亡, 且受到侵害的大豆种子也往往无法正常发育, 最终导致大豆的减产 (Bae *et al.*, 2014)。近年来, 点蜂缘蝽严重威胁着我国黄淮海流域的大豆生产 (李文敬等, 2020)。

铁作为许多细胞过程中的辅因子是所有生物生长发育所必须的, 铁元素的动态平衡是诸多生理功能稳定进行的基础 (Aisen *et al.*, 2001)。铁蛋白通过其氧化、储存以及转运功能在维持生物体铁平衡的过程中起着重要作用 (Liu and Theil, 2005; Shen *et al.*, 2021)。昆虫铁蛋白一般具有分泌的属性 (Nichol and Locke, 1990)。在结构上, 昆虫铁蛋白和哺乳动物铁蛋白结构相似, 由两个不同的亚基组成。两个亚基和脊椎动物铁蛋白亚基相似: 重链同源亚基 (Fer1HCH) 具有由氨基酸残基组成的铁氧化酶中心, 可以将二价铁氧化为三价铁, 并且具有铁的生物矿化功能; 轻链同源亚基 (Fer2LCH) 则具有能够诱导三价铁的成核中心。除了分泌铁蛋白重链同源亚基和轻链同源亚基, 昆虫中还含有另一种体铁蛋白 (Soma ferritin)。体铁蛋白最初在蜗牛中被报道和命名 (Von Darl *et al.*, 1994), 后续在昆虫、软体动物、环节动物和贝类中都有相继报道。体铁蛋白基因的 5'非翻译区具有一个与脊椎动物铁蛋白重链同源亚基高度同源的铁反应原件 (IRE), 并且都具有铁氧化酶中心 (Huang *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2003; Durand *et al.*, 2004)。

除了参与铁的吸收、转运和细胞铁解毒, 昆虫体内的铁蛋白还参与多种生理过程。如烟粉虱 *Bemisia tabaci* 在进食过程中通过分泌铁蛋白抑制宿主过氧化氢产生的氧化信号 (Su *et al.*, 2019); 埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 的铁蛋白参与铁由肠道运输至卵巢的过程, 抑制铁蛋白显著削弱埃及伊蚊的繁殖能力 (Geiser *et al.*, 2019); 家蝇 *Musca domestica* 的铁蛋白在细菌感染等胁迫下

诱导表达, 在昆虫免疫以及氧化还原平衡中起着关键作用 (Cao *et al.*, 2020); 家蚕铁蛋白重链同源物能够抑制细菌生长, 可能参与昆虫抵抗病原体感染过程 (Otho *et al.*, 2016)。目前铁蛋白在宿主免疫中的作用越来越受到关注, 对昆虫铁蛋白生理作用的揭示, 提示我们可以通过干扰铁代谢途径来降低害虫繁殖力, 减少种群并削弱农业危害, 为农业害虫的防治提供新的防控策略。但是, 目前有关点蜂缘蝽铁蛋白的研究仍未见报道。本研究对点蜂缘蝽基因组进行功能注释鉴定铁蛋白基因, 并通过 RNA 干扰 (RNAi) 抑制基因表达, 分析铁蛋白基因对点蜂缘蝽的影响, 旨在为点蜂缘蝽铁蛋白功能的揭示奠定基础, 也为点蜂缘蝽新防治策略的制定提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

2019 年, 实验所用的点蜂缘蝽采自安徽省宿州市, 带回室内, 采用品种为皖豆 28 的大豆苗长期饲养于人工气候室中。饲养环境温度为 $(26 \pm 1)^\circ\text{C}$, 相对湿度为 $50\% \pm 5\%$, 光周期为 16L : 8D。

1.2 铁蛋白基因鉴定和表达量分析

从功能注释结果初步筛选得到可能的铁蛋白基因。同时, 为避免注释的不完整, 使用已报道的褐飞虱 *Nilaparvata lugens*、温带臭虫 *Cimex lectularius*、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 3 种昆虫的铁蛋白序列比对点蜂缘蝽转录组数据 (tBLASTN, $E\text{-value} = 1.0 \times 10^{-5}$)。筛选得到的假定铁蛋白基因通过 BLAST 与 NCBI nr 库比对进行验证。同时, 利用本实验室已有的点蜂缘蝽 37 个不同发育阶段 (卵期 0-6 d, 1 龄 0-36 h, 2 龄 0-60 h, 3 龄 0-60 h, 4 龄 0-72 h, 5 龄 0-96 h, 雌雄成虫 0-6 d) 和 7 个不同组织样品 (表皮, 脂肪体, 肠道, 肌肉, 唾液腺, 精巢和卵巢) 的转录组数据 (Huang *et al.*, 2020), 分析 3 种点蜂缘蝽铁蛋白基因的表达模式。

1.3 基因序列分析和系统发育树构建

使用 Transdecoder 预测转录本 CDS, 获得 3

种铁蛋白氨基酸序列和内含子-外显子结构。保守结构域和信号肽通过 InterProScan 进行预测。为研究点蜂缘蝽 3 种铁蛋白的进化关系, 挑选 NCBI nr 数据库中 44 条昆虫铁蛋白氨基酸序列 (表 1) 进行了系统发育分析。使用 mafft 进行多重序列比对, Gblocks 提取氨基酸序列保守位点, 并通过 Modeltest-ng 检验最佳模型, 最后使用 iqTREE 构建极大似然树, 进行 1 000 次自展检验。

表 1 进化树分析使用的基因序列信息
Table1 Gene sequences used in the phylogenetic tree analysis

基因家族 Family	物种 Species	登录号 Accession number
铁蛋白重链亚基 Ferritin-heavy	蔬菜花斑虫 <i>Leptinotarsa decemlineata</i>	AAP57194
	赤拟谷盗 <i>Tribolium castaneum</i>	XP_967058
	埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>	AAK15638
	冈比亚按蚊 <i>Anopheles gambiae</i>	EAA08169
	桔小实蝇 <i>Bactrocera dorsalis</i>	AIA23786
	黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>	NP_001263104
	刺舌蝇 <i>Glossina morsitans</i>	ABC48949
	温带臭虫 <i>Cimex lectularius</i>	XP_014255155
	黄蜂 <i>Asobara tabida</i>	CAZ04924
	欧洲熊蜂 <i>Bombus terrestris</i>	XP_012167824
	佛罗里达弓背蚊 <i>Camponotus floridanus</i>	XP_011266939
	跳镰猛蚁 <i>Harpegnathos saltator</i>	XP_011148153
	红火蚁 <i>Solenopsis invicta</i>	XP_011160667
	巴西白斑弄蝶 <i>Calpodethia ethlius</i>	AAD50239
	烟草天蛾 <i>Manduca sexta</i>	AAK39636
	蓖麻蚕 <i>Samia ricini</i>	ATD12167
	粉纹夜蛾 <i>Trichoplusia ni</i>	XP_026744300
	人体虱 <i>Pediculus humanus corporis</i>	EEB12465
铁蛋白轻链亚基 Ferritin-light	褐飞虱 <i>Nilaparvata lugens</i>	MN931788.1
	赤拟谷盗 <i>Tribolium castaneum</i>	XP_966312
	埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>	XP_001648938
	冈比亚按蚊 <i>Anopheles gambiae</i>	XP_001237468
	桔小实蝇 <i>Bactrocera dorsalis</i>	AIA23787
	黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>	NP_001263106
	刺舌蝇 <i>Glossina morsitans</i>	AAL65406
	温带臭虫 <i>Cimex lectularius</i>	XP_014255153
	黄蜂 <i>Asobara tabida</i>	CAZ04925
	红火蚁 <i>Solenopsis invicta</i>	XP_011160664
	巴西白斑弄蝶 <i>Calpodethia ethlius</i>	AAD50240
	烟草天蛾 <i>Manduca sexta</i>	AAF44717
	蓖麻蚕 <i>Samia ricini</i>	QED22038
	粉纹夜蛾 <i>Trichoplusia ni</i>	XP_026744299
	人体虱 <i>Pediculus humanus corporis</i>	XP_002432696
	褐飞虱 <i>Nilaparvata lugens</i>	MN931789.1

续表 1 (Table 1 continued)		
基因家族 Family	物种 Species	登录号 Accession number
体铁蛋白 Soma-ferritin	蔬菜花斑虫 <i>Leptinotarsa decemlineata</i>	AAP57194
	赤拟谷盗 <i>Tribolium castaneum</i>	XP_967058
	桔小实蝇 <i>Bactrocera dorsalis</i>	AAK15638
	黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>	EAA08169
	温带臭虫 <i>Cimex lectularius</i>	AIA23786
	西方蜜蜂 <i>Apis mellifera</i>	NP_001263104
	欧洲熊蜂 <i>Bombus terrestris</i>	ABC48949
	佛罗里达弓背蚁 <i>Camponotus floridanus</i>	XP_014255155
	跳镰猛蚁 <i>Harpegnathos saltator</i>	CAZ04924
	红火蚁 <i>Solenopsis invicta</i>	XP_012167824
	褐飞虱 <i>Nilaparvata lugens</i>	MN931790.1

1.4 RNA 提取和 cDNA 合成

点蜂缘蝽经液氮冷冻后通过MP震荡破碎仪破碎。使用 Trizol RNA 提取试剂盒 (Thermo Fisher Scientific) 获得总 RNA, 并分别利用 NanoDrop 和琼脂糖凝胶 (上海翌圣生物科技有限公司) 电泳检测 RNA 的含量和完整性。获得的 RNA 使用 HiScript II Q Select RT SuperMix for qPCR 反转录试剂盒 (Vazyme) 合成 cDNA。

1.5 RNAi 和存活率统计

以点蜂缘蝽 cDNA 为模板使用 Phanta 高保真扩增酶 (Vazyme) 分别扩增 RpFer1, RpFer2, Rpsoma-Fer (表 2)。PCR 反应体系: 2 × Phanta® Max Buffer 25 μL, F/R Primer Mix 2 μL, cDNA 2 μL, dNTP Mix 1 μL, Phanta® Max Super-Fidelity

DNA Polymerase 1 μL, 无菌水 17 μL。PCR 反应程序: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 35 个循环; 72 °C 彻底延伸 5 min。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 割胶回收后使用胶回收试剂盒 (Omega BIO-TEK) 对 PCR 产物进行纯化。纯化 DNA 模板使用 T7 High Yield Transcription Kit (Vazyme) 合成 3 种 dsRNA, 反应体系: 10 × Reaction Buffer 2 μL, ATP Solution 2 μL, GTP Solution 2 μL, UTP Solution 2 μL, CTP Solution 2 μL, DNA 模板 8 μL, T7 RNA Polymerase Mix 2 μL。反应程序: 37 °C 孵育 16 h; 反应体系加入 1 μL DNase I, 37 °C 孵育 15 min。

挑选 3 龄点蜂缘蝽若虫, CO₂ 麻醉后使用显微注射仪分别注射 3 种 dsRNA 进行 RNAi, 绿色荧光蛋白基因 (GFP) 双链 RNA 作为对照组。每组注射至少 30 只若虫, 每种处理重复 3 次。

表 2 引物信息
Table 2 Primers information

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	引物用途 Primer usage
RpFer1-S	TAATACGACTCACTATAGGGTTGTGACAGCAGATAATGGAGG	双链 RNA 合成 Double stranded RNA synthesis
RpFer1-AS	TAATACGACTCACTATAGGGTAGAACCCCATTTTGTCTGAC	
RpFer2-S	TAATACGACTCACTATAGGGCTTTTGACCTTCGGCATGGTTG	
RpFer2-AS	TAATACGACTCACTATAGGGTCTCTAATTTGTTTCGTGTGC	
Rpsoma-Fer-S	TAATACGACTCACTATAGGGATGGCACAAAGTCAAGTTCGTC	
Rpsoma-Fer-AS	TAATACGACTCACTATAGGGGAAGACTTGAGCTCTTTGTCTGAGG	

注射后 48 h 开始统计若虫存活率，用 Log-rank 检验（SPSS 19.0）比较组间存活率的差异。

2 结果与分析

2.1 点蜂缘蝽铁蛋白基因序列和进化分析

从点蜂缘蝽转录组中鉴定到 3 个同源基因，分别命名为 *RpFer1*、*RpFer2* 和 *Rpsoma-Fer*，并后续进行了克隆和测序验证（GenBank 登录号：MZ367596，MZ367597，MZ367598）（图 1：A）。其中，*RpFer1* 基因全长 16 971 bp，包含 5 个外显子，编码 226 个氨基酸；*RpFer2* 基因全长 7 840 bp，包含 6 个外显子，编码 223 个氨基酸；*Rpsoma-Fer* 全长 3 069 bp，包含 3 个外显子，编

码 173 个氨基酸（图 1：B）。InterProScan 保守结构域预测结果表明，3 种推测的铁蛋白都包含铁蛋白功能域且 *RpFer1* 和 *RpFer2* 含有信号肽，表明它们是一类分泌型铁蛋白，与已报道的其它昆虫的铁蛋白一致（图 1：A）。

系统发育分析结果表明，3 种铁蛋白分别被聚类至不同的分支（图 2），其中 *RpFer1* 与其它昆虫铁蛋白重链亚基（FerH）聚集，*RpFer2* 与铁蛋白轻链亚基（FerL）聚集，*Rpsoma-Fer* 与其它体铁蛋白聚集。在系统发育树中，*RpFer2* 和 *Rpsoma-Fer* 分别与温带臭虫铁蛋白轻链亚基、体铁蛋白亲缘关系最近，并且自举值大于 75，但 *RpFer1* 却与温带臭虫铁蛋白重链亚基亲缘关系较远，推测昆虫 3 种铁蛋白的进化并不同步。

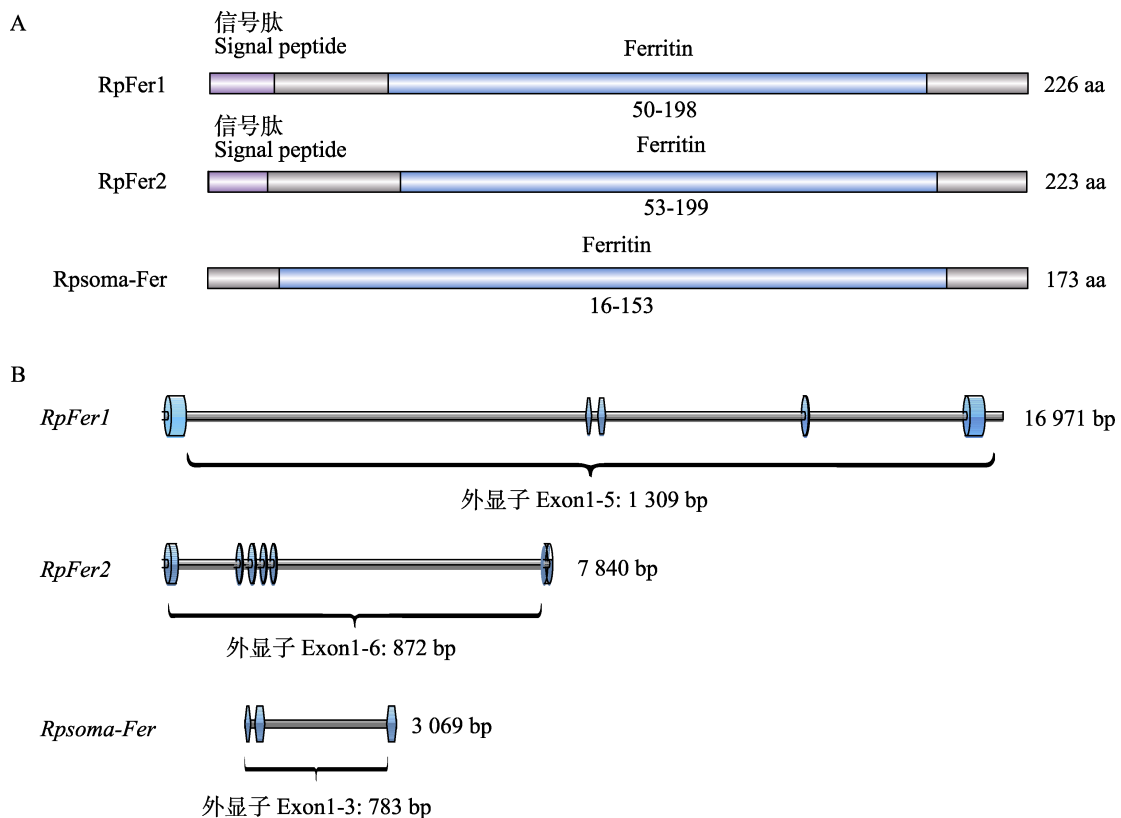


图 1 点蜂缘蝽铁蛋白序列分析结果

Fig. 1 Bioinformatics analysis of ferritin in *Riptortus pedestris*

A. 点蜂缘蝽铁蛋白保守结构域预测结果；B. 点蜂缘蝽铁蛋白基因内含子-外显子结构。
A. Domain architectures of ferritin in *R. pedestris*; B. Exon-intron organization of ferritin in *R. pedestris*.

2.2 点蜂缘蝽铁蛋白基因时空表达分析

分析 3 个铁蛋白基因在点蜂缘蝽不同龄期、

不同组织的表达水平，结果显示 3 个铁蛋白基因在点蜂缘蝽各个龄期和组织均有表达。其中，*RpFer1* 在卵的初期相对表达量最低，且表达随

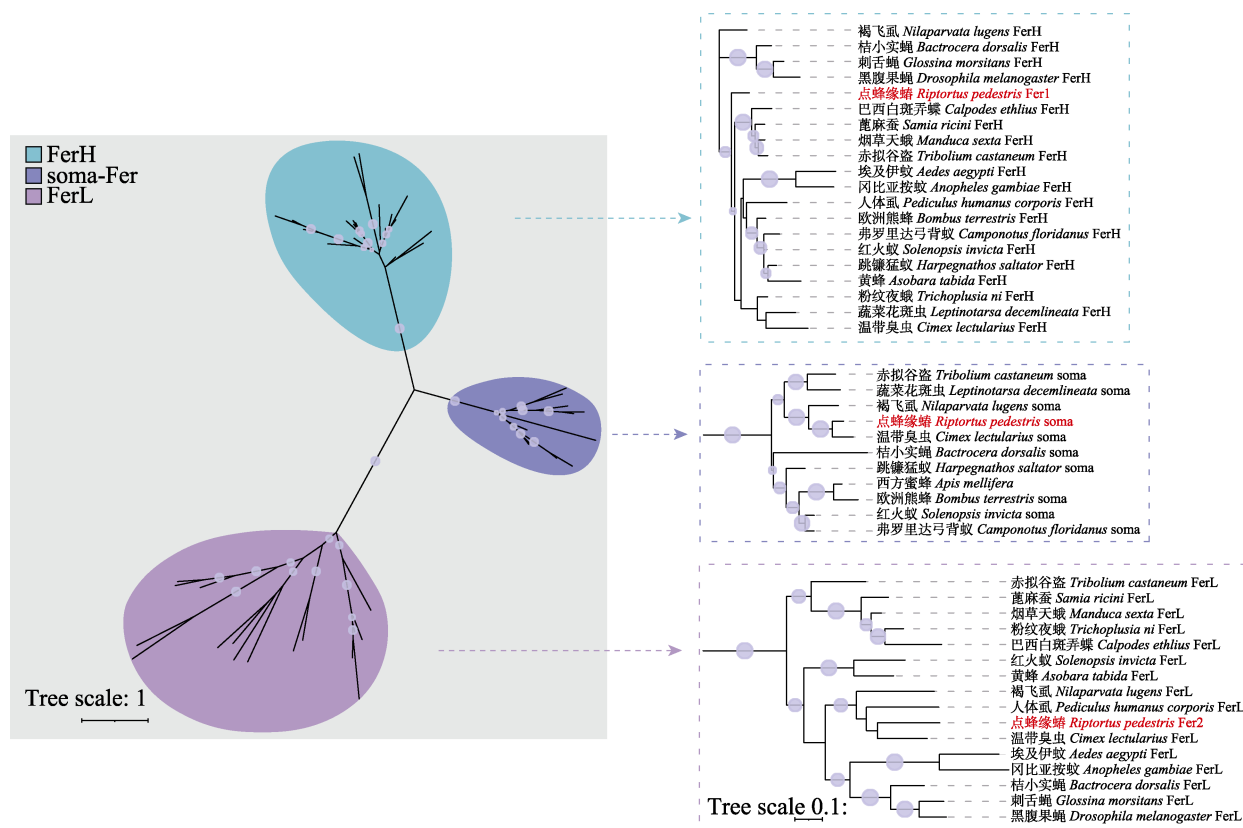


图 2 RpFer1、RpFer2 和 Rpsoma-Fer 与其它昆虫铁蛋白成员的系统发育关系

Fig. 2 Phylogenetic relationship of RpFer1, RpFer2 and Rpsoma-Fer with other ferritins

系统进化树使用 iqtree 软件通过极大似然法构建; 自展值大于 50% 的分支用蓝色

实心圆圈标记, 较大的圆圈表示较大自展值。

Phylogenetic tree is generated by iqtree software with maximum likelihood method. Nodes with bootstrap values >50% are marked with solid blue circles, and the larger circles indicate higher bootstrap values.

昆虫蜕皮呈周期性变化, 即在各龄期蜕皮前后的表达量最高, 而在各龄期的中期表达量最低。RpFer2 在卵期的表达模式与 RpFer1 相似。然而, RpFer2 在 3-5 龄期间的表达模式与 RpFer1 存在较大差异, 其相对表达量的峰值出现在各龄期的中期。Rpsoma-Fer 的表达水平随卵的发育呈递减趋势, 即在卵的初期相对表达量最高, 而在卵发育至第 6 天表达量最低。此外, Rpsoma-Fer 的表达未随昆虫蜕皮呈明显的周期性变化(图 3:A)。

3 种铁蛋白基因在各组织的表达模式分析结果表明, RpFer1、RpFer2、Rpsoma-Fer 在肠道、肌肉和表皮中的表达量均高于唾液腺、精巢、卵巢等其它组织(图 3:B)。其中, Rpsoma-Fer 在点蜂缘蝽肠道特异表达; RpFer2 在肠道中的表达高于其他组织, 但未表现出特异性; 而 RpFer1 在肌肉中的表达量高于肠道。

2.3 铁蛋白基因功能分析

利用 RNAi 技术分别对点蜂缘蝽 3 种铁蛋白基因进行沉默。结果表明, 与注射 dsGFP 相比, 注射 dsRpFer1 和 dsRpFer2 的若虫均表现出高致死率。注射 dsRpFer1 后第 4 天, 点蜂缘蝽死亡率显著高于对照组 ($P < 0.05$), 并在注射后第 12 天点蜂缘蝽的死亡率达到 95% (图 4:A)。dsRpFer2 处理的点蜂缘蝽在注射后第 3 天出现死亡率上升, 第 12 天的若虫死亡率为 90%, 远高于对照组 (图 4:B)。此外, dsRpFer1 和 dsRpFer2 处理后的点蜂缘蝽表现出相似的死亡表型 (图 4:D), 分别有 52.5% 和 48.9% 的若虫在蜕皮期死亡 (图 4:E)。dsRpsoma-Fer 处理的点蜂缘蝽若虫未表现出明显的致死现象 (图 4:C), 在注射处理后第 12 天的死亡率与对照组相

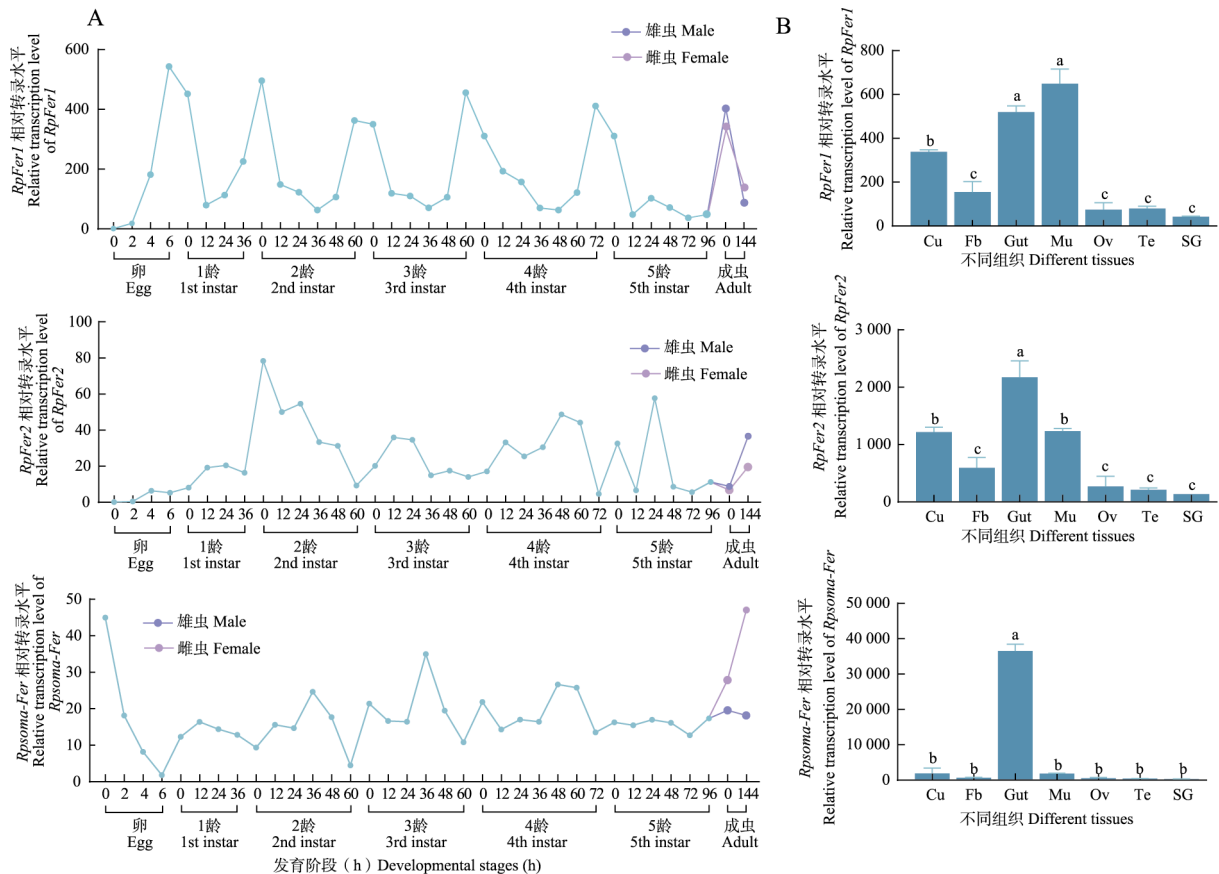


图3 点蜂缘蝽铁蛋白基因时空表达模式

Fig. 3 Temporospatial expression patterns of *Riptortus pedestris* ferritin genes

A. 点蜂缘蝽铁蛋白基因时间表达模式；B. 点蜂缘蝽铁蛋白基因不同组织中的空间表达模式。Cu：表皮；FB：脂肪体；Gut：肠道；Mu：肌肉；Ov：卵巢；Te：精巢；SG：唾液腺。图中数据为平均值±标准误，柱上标有不同小写字母表示点蜂缘蝽铁蛋白基因的相对表达量差异显著（ $P < 0.05$, Tukey 检验）。

A. Temporal expression patterns of *R. pedestris* ferritin genes; B. Spatial expression patterns of *R. pedestris* ferritin genes in different tissues. Cu: Cuticle; FB: Fat body; Mu: Muscle; Ov: Ovary; Te: Testis; SG: Salivary gland.

Data in the figure are mean $\pm$ SE. Data represent relative mRNA levels of *R. pedestris* ferritin genes, histograms with different letters indicate significant differential expression level ($P < 0.05$, Tukey test).

比无显著差异，且未观察到明显的表型变化（图4：D）。以上结果表明，*RpFer1* 和 *RpFer2* 在点蜂缘蝽生长发育过程中发挥重要作用，可能是未来基于 RNAi 防治点蜂缘蝽的潜在靶标。

3 讨论

昆虫铁蛋白作为分泌蛋白由血淋巴系统循环到不同组织（Nichol and Locke, 1990）。目前的研究表明，所有昆虫组织都会产生铁蛋白，但其表达水平和表达模式在物种间存在差异（Pham and Winzerling, 2010）。如果蝇 *Drosophila melanogaster* 铁蛋白广泛分布于肠道、血淋巴和

卵巢，其血淋巴中的铁蛋白含量高于其他组织（Georgieva et al., 2002）。燕尾蝶 *Swallowtail butterfly* 的 *PxFerHCH* 在所有组织均有表达，但在脂肪体的表达最高（Lu et al., 2019）。本研究从大豆点蜂缘蝽基因组和转录组中鉴定到了 2 个分泌型铁蛋白和 1 个体铁蛋白。3 种铁蛋白均含有铁蛋白功能域，且 *RpFer1* 和 *RpFer2* 编码分泌型铁蛋白亚基，是典型的昆虫分泌型铁蛋白，推测它们与其它昆虫分泌型铁蛋白在铁稳态的维持中发挥相似的功能。本研究结果表明，点蜂缘蝽中的 3 种铁蛋白基因均在肠道中有较高表达量，推测肠道铁蛋白的高表达可能在铁的吸

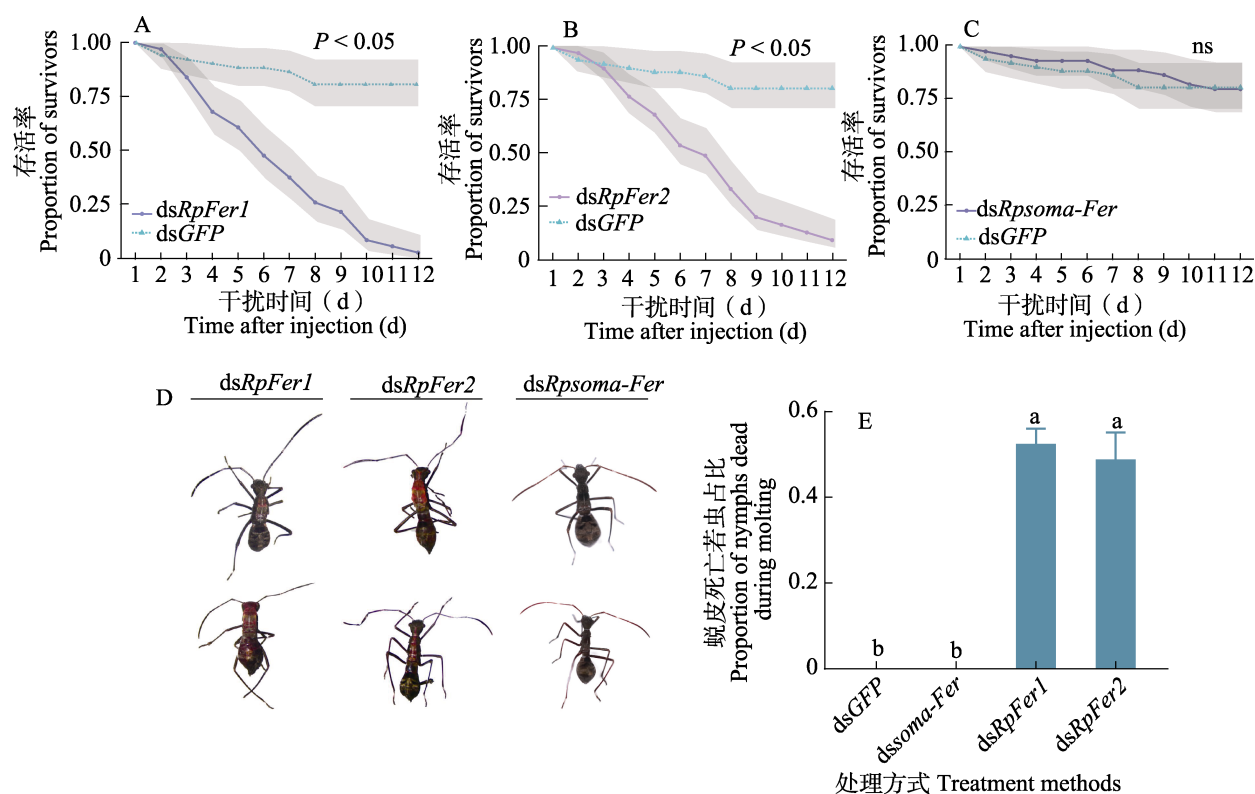


图 4 RNA 干扰对点蜂缘蝽存活率和表型的影响

Fig. 4 Effects of dsRNA interference on the survival and phenotype of *Riptortus pedestris*

A. 注射 *dsRpFer1* 对点蜂缘蝽存活率的影响; B. 注射 *dsRpFer2* 对点蜂缘蝽存活率的影响; C. 注射 *dsRpsoma-Fer* 对点蜂缘蝽存活率的影响; D. dsRNA 处理对点蜂缘蝽表型的影响, 以注射 *dsGFP* 的点蜂缘蝽作为对照; E. dsRNA 处理后, 若虫蜕皮期死亡个体占比。

浅色阴影表示 95% 的置信区间, $P < 0.05$ 表示存活率存在显著差异 (log-rank 检验),

ns 表示存活率不存在显著差异; 图中数据为平均值 $\pm$ 标准误,

柱上标有不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$, Tukey 检验)。

A. The influence of *dsRpFer1* on survivalship of *R. pedestris*; B. The influence of *dsRpFer2* on survivalship of *R. pedestris*; C. The influence of *dsRpsoma-Fer* on survivalship of *R. pedestris*; D. The influence of dsRNA treatment on the phenotype of *R. pedestris*, *R. pedestris* treated with *dsGFP* was used as a negative control; E. The proportion of dead nymphs in molting stage treated with dsRNA. Light shades indicate 95% confidence intervals; $P < 0.05$ indicates significantly different survival distributions between treatment according to the log-rank tests; ns indicates no significantly different survival distributions between treatments. Data in the figure are mean $\pm$ SE, histograms with different letters indicate significant differences ($P < 0.05$, Tukey test).

收、转运和解毒有关。除了肠道, *RpFer1* 和 *RpFer2* 在肌肉组织和表皮中也表现出高表达, 提示铁蛋白在点蜂缘蝽肌肉和表皮发育过程中可能有着重要作用。

本研究发现抑制 *RpFer1* 和 *RpFer2* 能够引起点蜂缘蝽高致死率。结合 *RpFer1* 和 *RpFer2* 在点蜂缘蝽表皮高表达以及表达量随昆虫蜕皮呈周期性变化, 推测铁蛋白可能参与点蜂缘蝽蜕皮过程。棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 的多铜氧化酶

-1 (Multicopper oxidase-1, MCO1) 参与昆虫蜕皮过程的铁稳态维持, 其表达水平受蜕皮相关激素的负调控, 敲除 *HaMCO1* 显著降低转铁蛋白和铁蛋白基因的表达, 进而影响昆虫的蜕皮 (Liu *et al.*, 2015)。烟草天蛾 *Manduca sexta* 的蜕皮液中存在转铁蛋白, 而褪皮液对昆虫蜕皮又具有重要的保护以及调控作用 (Zhang *et al.*, 2014)。干扰点蜂缘蝽 *RpFer1* 和 *RpFer2* 后, 约 52.5% 和 48.9% 的若虫无法顺利蜕皮进入下一龄期 (图

4), 说明铁稳态的维持在昆虫蜕皮过程在发挥重要作用。此外, 铁蛋白基因的突变或缺失可能影响昆虫的免疫功能。如蓖麻蚕 *Samia cynthia ricini* 的铁蛋白能够结合金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、绿脓杆菌 *Pseudomonas aeruginosa* 等多种细菌, 其表达水平受细菌诱导 (Yang *et al.*, 2020); 家蝇的铁蛋白有助于昆虫抵御细菌的感染, 敲除后显著降低了细菌感染后幼虫的存活率 (Cao *et al.*, 2020)。点蜂缘蝽体内含有 *Burkholderia* 和 *Serratia* 等多种细菌 (Takeshita and Kikuchi, 2017), 铁蛋白对其共生微生物的影响有待进一步探究。

综上, 点蜂缘蝽 3 种铁蛋白都具有铁蛋白功能域, 这与已报道昆虫铁蛋白具有相似特征; *RpFer1* 和 *RpFer2* 的表达量随若虫蜕皮呈周期性变化, 抑制这 2 个基因的表达将导致点蜂缘蝽若虫在蜕皮过程中死亡, 说明 *RpFer1* 和 *RpFer2* 在点蜂缘蝽的发育过程中不可或缺, 并且可能参与蜕皮过程, 可作为点蜂缘蝽防治的潜在靶标。*Rpsoma-Fer* 的表达与昆虫蜕皮无明显相关性, 且 *Rpsoma-Fer* 在点蜂缘蝽肠道特异表达, 推测 *Rpsoma-Fer* 可能参与维持昆虫肠道细胞的铁稳态。然而, 抑制 *Rpsoma-Fer* 基因表达未观察到明显的表型变化, 其在昆虫中的作用有待进一步研究。

参考文献 (References)

- Aisen P, Enns C, Wessling-Resnick M, 2001. Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 33(10): 940–959.
- Bae SD, Kim HJ, Mainali BP, 2014. Infestation of *Riptortus pedestris* (Fabricius) decreases the nutritional quality and germination potential of soybean seeds. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 17(3): 477–481.
- Cao X, Li Y, Li S, Tang T, Liu F, 2020. Two ferritin genes (MdFerH and MdFerL) are involved in iron homeostasis, antioxidation and immune defense in housefly *Musca domestica*. *Journal of Insect Physiology*, 124: 104073.
- Durand JP, Goudard F, Pieri J, Escoubas JM, Schreiber N, Cadoret JP, 2004. *Crassostrea gigas* ferritin: cDNA sequence analysis for two heavy chain type subunits and protein purification. *Gene*, 338(2): 187–195.
- Geiser DL, Thai TN, Love MB, Winzerling JJ, 2019. Iron and ferritin deposition in the ovarian tissues of the yellow fever mosquito (Diptera: Culicidae). *Journal of Insect Science*, 19(5): 11.
- Georgieva T, Dunkov B, Dimov S, Ralchev K, Law J, 2002. *Drosophila melanogaster* ferritin: cDNA encoding a light chain homologue, temporal and tissue specific expression of both subunit types. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(3): 295–302.
- Huang HJ, Ye YX, Ye ZX, Yan XT, Wang X, Wei ZY, Chen JP, Li JM, Sun ZT, Zhang CX, 2020. Chromosome-level genome assembly of the bean bug *Riptortus pedestris*. *Molecular Ecology Resources*, 21(7): 2423–2436.
- Huang TS, Law JH, SöDerhäll K, 1996. Purification and cDNA cloning of ferritin from the hepatopancreas of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *European Journal of Biochemistry*, 236(2): 450–456.
- Li WJ, Gao Y, Hu YL, Li S, Bi R, Zhang JP, Shi SS, 2020. Effects of the *Riptortus pedestris* on staygreen syndrome and yield of soybean. *Soybean Science*, 39(1): 116–122. [李文敬, 高宇, 胡英露, 李昇, 毕锐, 张金平, 史树森, 2020. 点蜂缘蝽为害对大豆植株“症青”发生及产量损失的影响. 大豆科学, 39(1): 116–122.]
- Liu X, Sun C, Liu X, Yin X, Wang B, Du M, An S, 2015. Multicopper oxidase-1 is required for iron homeostasis in malpighian tubules of *Helicoverpa armigera*. *Scientific Reports*, 5(1): 1–12.
- Liu X, Theil EC, 2005. Ferritins: Dynamic management of biological iron and oxygen chemistry. *Accounts of Chemical Research*, 38(3): 167–175.
- Lu ZJ, Xie YX, Yu HZ, Toufeeq S, Wang J, Huang YL, Li NY, Ouyang ZG, 2019. Identification and functional analysis of an iron-binding protein, ferritin heavy chain subunit, from the swallowtail butterfly, *Papilio xuthus*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 102(1): e21592.
- Mainali BP, Kim HJ, Yoon YN, Oh IS, Bae SD, 2014. Evaluation of different leguminous seeds as food sources for the bean bug *Riptortus pedestris*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 17(2): 115–117.
- Nichol H, Locke M, 1990. The localization of ferritin in insects.

- Tissue and Cell*, 22(6): 767–777.
- Otho SA, Chen K, Zhang Y, Wang P, Lu Z, 2016. Silkworm ferritin I heavy chain homolog is involved in defense against bacterial infection through regulation of haemolymph iron homeostasis. *Developmental & Comparative Immunology*, 55: 152–158.
- Pham DQD, Winzerling JJ, 2010. Insect ferritins: Typical or atypical? *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*, 1800(8): 824–833.
- Shen Y, Chen YZ, Zhang CX, 2021. RNAi - mediated silencing of ferritin genes in the brown planthopper *Nilaparvata lugens* affects survival, growth and female fecundity. *Pest Management Science*, 77(1): 365–377.
- Su Q, Peng Z, Tong H, Xie W, Wang S, Wu Q, Zhang J, Li C, Zhang Y, 2019. A salivary ferritin in the whitefly suppresses plant defenses and facilitates host exploitation. *Journal of Experimental Botany*, 70(12): 3343–3355.
- Takeshita K, Kikuchi Y, 2017. *Riptortus pedestris* and Burkholderia symbiont: An ideal model system for insect-microbe symbiotic associations. *Research in Microbiology*, 168(3): 175–187.
- Von Darl M, Harrison PM, Bottke W, 1994. cDNA cloning and deduced amino acid sequence of two ferritins: Soma ferritin and yolk ferritin, from the snail *Lymnaea stagnalis* L. *European Journal of Biochemistry*, 222(2): 353–366.
- Yang LA, Wang J, Toufeeq S, Zhu LB, Zhang SZ, You LL, Hu P, Yu HZ, Zhao K, Xu X, 2020. Identification of FerLCH, isolation of ferritin and functional analysis related to interaction with pathogens in Eri - silkworm, *Samia cynthia ricini*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 104(1): e21659.
- Zhang J, Lu A, Kong L, Zhang Q, Ling E, 2014. Functional analysis of insect molting fluid proteins on the protection and regulation of ecdysis. *Journal of Biological Chemistry*, 289(52): 35891–35906.
- Zhang Y, Meng Q, Jiang T, Wang H, Xie L, Zhang R, 2003. A novel ferritin subunit involved in shell formation from the pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 135(1): 43–54.