

褐飞虱化学感受蛋白 NlugCSP6 在发育繁殖和翅形成中的作用*

高浩力** 邹建政 林栩敏 张慧慧 刘泽文***

(南京农业大学植物保护学院, 南京 210095)

摘 要 【目的】化学感受蛋白 (Chemosensory proteins, CSPs) 的非化学感受功能在昆虫生长发育与繁殖中发挥重要作用, 但褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (Stål) CSP 的非化学感受功能的研究较少。本文旨在探究在褐飞虱表皮和卵巢中高表达的 *NlugCSP6* 基因潜在的非化学感受功能。【方法】利用 RT-qPCR 技术检测 *NlugCSP6* 基因在褐飞虱不同发育阶段和不同组织中的表达量。利用 RNAi 技术, 结合表型观察以及交配产卵的行为学实验, 探究 *NlugCSP6* 蛋白在褐飞虱生存、翅发育和交配繁殖中的作用。【结果】*NlugCSP6* 基因在褐飞虱各个发育阶段均有表达, 在成虫表皮表达量最高, 其次是卵巢。利用 RNAi 降低 *NlugCSP6* 的表达后, 褐飞虱若虫的生存率下降, 且从第 6 天开始与对照 (dseGFP 处理) 的生存率存在显著差异; 此外, 成虫产卵量减少, 单雌产卵量下降 22%; 成虫翅发育不正常, 包括畸形和不能有效闭合两种类型, 其中雌成虫主要表现为畸形翅, 雄成虫表现为翅不能有效闭合。【结论】褐飞虱 *NlugCSP6* 在表皮中的高表达, 参与若虫发育、成虫翅发育过程, 干扰该基因导致若虫死亡、翅发育不正常; 在卵巢中高表达与成虫产卵密切相关, 干扰该基因导致产卵量显著下降。以上结果表明, *NlugCSP6* 蛋白的生理功能与其编码基因特异的组织表达谱相一致, 在褐飞虱发育与生殖中起到重要作用。

关键词 褐飞虱; 化学感受蛋白; *NlugCSP6*; 发育; 产卵; 翅发育

Roles of the chemosensory protein NlugCSP6 gene in the development, reproduction and wing formation of *Nilaparvata lugens*

GAO Hao-Li** ZOU Jian-Zheng LIN Xu-Min ZHANG Hui-Hui LIU Ze-Wen***

(College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract 【Objectives】To investigate the potential non-chemosensory functions of *NlugCSP6*, a chemosensory protein (CSP) gene with high expression levels in the epidermis and ovary of *Nilaparvata lugens* (Stål). 【Methods】The development and tissue expression profile of *NlugCSP6* were determined using RT-qPCR, and the role of *NlugCSP6* in nymph development, reproduction and wing formation investigated using RNAi. 【Results】*NlugCSP6* was expressed in all developmental stages with the highest expression in the epidermis, followed by the ovary. Knockdown of *NlugCSP6* significantly decreased nymph survival and reduced egg production aid by 22%. Knockdown also caused abnormal wing development; deformed female wings and ineffective wing closure in males. 【Conclusion】The *NlugCSP6* gene is highly expressed in the epidermis, and is essential for normal nymph development and wing formation in *N. lugens*. Its relatively high expression in the ovary suggests that the *NlugCSP6* gene is also important for female reproduction. These results indicate that the role of the *NlugCSP6* gene in the development and reproduction of *N. lugens* is consistent with its degree of expression in different tissues.

Key words *Nilaparvata lugens*; chemosensory proteins; *NlugCSP6*; development; reproduction; wing development

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金重点项目 (31830075)

**第一作者 First author, E-mail: 2019202060@njau.edu.cn

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: liuzewen@njau.edu.cn

收稿日期 Received: 2022-06-09; 接受日期 Accepted: 2022-08-19

在昆虫中,灵敏的化学感受系统对于昆虫的发育、生理功能和行为至关重要,例如搜寻配偶、发现天敌、宿主定位和种间交流(Robertson, 2019)。化学信息素和环境气味的运输是由气味结合蛋白(Odorant-binding proteins, OBPs)和化学感受蛋白(Chemosensory proteins, CSPs)完成的。第一个CSP最初在黑腹果蝇*Drosophila melanogaster*中被发现,并命名为OS-D(McKenna *et al.*, 1994)。CSP的长度约为100-120个氨基酸残基,含有4个保守的半胱氨酸位点(Angeli *et al.*, 1999)。CSP主要由 α -螺旋片段组成,其结构通过连接相邻半胱氨酸的两个二硫键被进一步稳定(Angeli *et al.*, 1999; Lartigue *et al.*, 2002)。

CSP在行使化学感受功能时通常位于触角、口器、足及其它化学感受相关的组织器官中(Liu *et al.*, 2016)。然而,昆虫非化学感受组织器官中也检测到了CSP的存在,例如信息素腺体、脂肪体、肠道和生殖器官等(Pelosi *et al.*, 2018)。CSPs在昆虫非化学感受的相关功能涉及发育、繁殖、信息素传递和抗药性等(Pelosi *et al.*, 2018)。例如,一个10 ku大小的CSP在美洲大蠊*Periplaneta americana*的再生足中显著增加(Nomura *et al.*, 1992),沉默意大利蜜蜂*Apis mellifera*的CSP5导致胚胎发育停止(Maleszka *et al.*, 2007),意大利蜜蜂的Amel-CSP2在哺育蜂和采集蜂显示出不同的空间表达水平(王宇飞等, 2018),SexiCSP3对甜菜夜蛾*Spodoptera exigua*雌虫的繁殖和生存发挥重要作用(Gong *et al.*, 2012),Si-CSP9参与了红火蚁*Solenopsis invicta*3龄幼虫的蜕皮(Cheng *et al.*, 2015)。在桃蚜中,化学感受蛋白Mp10触发植物防御反应,从而降低蚜虫的繁殖力(Bos *et al.*, 2010)。此外,还发现CSP参与调节昼夜周期(Claridge-Chang *et al.*, 2001)和免疫反应(Levy *et al.*, 2004)。这些研究证实了CSPs蛋白质家族在昆虫功能的多样性,并与其特异的组织表达谱相一致。

褐飞虱*Nilaparvata lugens*(Stål)(Hemiptera: Delphacidae)是最重要的水稻害虫之一(Bao

et al., 2019)。褐飞虱在取食时将口针刺入水稻组织,然后深入韧皮部,从汁液中吸收营养物质(Wang *et al.*, 2008)。同时,还可间接传播水稻病毒,造成严重的产量和经济损失(Settle *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2008)。褐飞虱成虫具有长短翅型分化的翅二型现象,长翅型褐飞虱具有飞行能力,有利于其寻找合适的生存环境,短翅型褐飞虱失去了飞行能力,但拥有更强的繁殖能力(Yang *et al.*, 2014)。在褐飞虱中共鉴定出11个CSP基因(Zhou *et al.*, 2014),并对部分CSPs(NlugCSP3、NlugCSP7、NlugCSP8和NlugCSP10)进行了功能分析(Yang *et al.*, 2014; Waris *et al.*, 2018, 2020a, 2020b)。此外,在褐飞虱唾液腺蛋白的研究中,N132(NlugCSP1)的表达导致本氏烟的矮化表型(Rao *et al.*, 2019)。在稻飞虱的CSPs中只有少数成员在触角高表达,参与嗅觉感受功能,但对其余大部分CSP功能还知之甚少(杨贵琴等, 2021)。本文利用RT-qPCR测定了NlugCSP6在褐飞虱各组织和发育阶段的表达水平,结合RNAi技术和行为学观察等方法分析了该蛋白在褐飞虱若虫发育、翅发育和繁殖中的潜在功能,丰富了对昆虫CSPs非化感功能的认识。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

供试的褐飞虱于1995年采自浙江杭州,带回实验室用新鲜水稻幼苗长期饲养,未接触任何杀虫剂。饲养温度为(27±1)℃,相对湿度为70%±10%,光暗周期比为16L:8D。

1.2 供试试剂

RNAlater购自ThermoFisher公司,Trizol试剂购自Invitrogen公司,反转录试剂PrimeScript RT Reagent Kit和荧光定量试剂TB Green Premix Ex Taq II Kit购自TaKaRa公司,凝胶回收试剂盒购自北京庄盟国际生物基因科技公司,用于dsRNA合成的T7 RiboMAXTM Express RNAi System购自Promega公司。

1.3 序列生物信息学分析

使用在线软件 ExPASy-ProtParam tool 预测蛋白的基本理化性质, 使用在线软件 SignalP5.0 预测蛋白信号肽; 使用本地软件 Blast 2.7.1 将 *NlugCSP6* 开放阅读框 (Open reading frame, ORF) 序列比对到褐飞虱染色体水平基因组。

1.4 总 RNA 提取和 RT-qPCR

收集褐飞虱卵、1-5 龄若虫和雌雄成虫, 检测 *NlugCSP6* 在不同发育阶段的相对转录表达。解剖 5 龄若虫的肠道、脂肪体和表皮。采集褐飞虱雌成虫的唾液腺和卵巢。采集褐飞虱雄成虫的唾液腺和精巢。在 1×PBS 中解剖各个组织样本, 并立即放入 RNAlater 中。根据说明书, 使用 Trizol 试剂从每个样品中提取总 RNA。1 μg RNA 用于合成 cDNA。根据说明书, 使用 PrimeScript RT 试剂盒 (TaKaRa) 去除基因组 DNA 并合成 cDNA。分别通过连续稀释得到的溶解曲线和标准曲线验证引物的特异性和效率。选择 18s 核糖体 RNA (*18s*, GenBank 登录号 JN662398.1) 和 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因 (*GAPDH*, GenBank 登录号: KU058667.1) 作为组织表达谱分析的

参考基因。选择肌动蛋白基因 (β -actin, GenBank 登录号 EU179848.1) 和 *GAPDH* 作为其它 qPCR 实验的内参基因。用于所有检测基因的 qPCR 引物在表 1 中提供。根据说明书, 在 QuantStudio Real-Time PCR System (Applied Biosystems) 上使用 TB Green Premix Ex Taq II Kit (TaKaRa) 进行反应。数据来自 3 个独立的生物学重复。

1.5 RNAi

通过 PCR 分别扩增一个 378 bp 的 *NlugCSP6* 片段和一个 451 bp 的增强型基因绿色荧光蛋白 (*eGFP*) 片段, 引物包括 T7 启动子序列 (表 1)。根据说明书, 使用 T7 RiboMAXTM Express RNAi system 将 PCR 产物用于体外合成 dsRNA。3 龄若虫用二氧化碳麻醉, 然后放在琼脂凝胶板上进行显微注射。如前所述 (Liu *et al.*, 2010), 使用 Nanoliter-2010 以低速将 20 nL 浓度为 3 g/L 的 dsRNA 通过玻璃针显微注射到前胸和中胸之间的结膜中。注射 dseGFP 作为对照。在注射 dsRNA 3 d 后, 收集整虫进行总 RNA 提取, 并使用 qPCR 测定 RNAi 效果。对于 5 龄若虫, 以相同方式注射 50 nL dsRNA, 并用羽化后 3 d 的成虫分析注射 dsRNA 后基因沉默效率。

表 1 本实验中所用引物
Table 1 Primers used in this study

基因 Genes	引物序列 Primer sequence	用途 Purpose
<i>NlActin</i> -qF	CTGGACTTCGAGCAGGAAATGGC	荧光定量 PCR qRT-PCR
<i>NlActin</i> -qR	AGGAAGGCTGGAACAGGGCTTCT	荧光定量 PCR qRT-PCR
<i>NlGAPDH</i> -qF	GTGATGTGAAAGCCGAAGGAAACT	荧光定量 PCR qRT-PCR
<i>NlGAPDH</i> -qR	GGTCGACTCCACGATGTATTGCG	荧光定量 PCR qRT-PCR
<i>Nl18s</i> -qF	GTAACCCGCTGAACCTCCT	荧光定量 PCR qRT-PCR
<i>Nl18s</i> -qR	TCCGAAGACCTCACTAAATC	荧光定量 PCR qRT-PCR
<i>NlugCSP6</i> -qF	TCAAATGCCTCACCGATAA	荧光定量 PCR qRT-PCR
<i>NlugCSP6</i> -qR	CTTCTTCTGTTGGGGACTG	荧光定量 PCR qRT-PCR
<i>NlugCSP6</i> -dsF	taatacgactcactatagggATGTTGTGGGCTGCAAGGTTC	dsRNA 合成 RNAi
<i>NlugCSP6</i> -dsR	taatacgactcactatagggTGTCTGCCGAAAGGAAAGC	dsRNA 合成 RNAi
<i>eGFP</i> -dsF	taatacgactcactatagggGATGCCACCTACGGCAAGCTGA	dsRNA 合成 RNAi
<i>eGFP</i> -dsF	taatacgactcactatagggTGTCTGCTGGTAGTGGTCGGCGA	dsRNA 合成 RNAi

1.6 褐飞虱生存率检测

为了检测注射 dseGFP、ds*NlugCSP6* 和未注射的褐飞虱的生存率, 将注射后的褐飞虱放置在

水稻幼苗上饲养 24 h, 存活的褐飞虱用来进行下一步观察。用自制的吸虫装置将活力相对一致的若虫转移到含有新鲜稻苗的塑料杯中, 用纱布封口。每个处理设置 3 个生物学重复, 每个生物学

重复 15 头褐飞虱。每天记录存活的褐飞虱若虫的数量。

1.7 翅形态观察及翅后缘与内缘夹角的角度测量

将注射 *dseGFP* 或 *dsNlugCSP6* 的 3 龄褐飞虱饲养在新鲜的水稻幼苗上, 每个重复 40 头。将每天新羽化的褐飞虱转移到新的水稻幼苗上, 第 2 天进行拍照记录。

褐飞虱的翅大致呈矩形, 由前缘、外缘、后缘和内缘组成。以短翅雄成虫的左翅为研究对象, 利用 AutoCAD 绘制辅助线, 并测量后缘与内缘的夹角 θ 。每个处理进行 15 次生物学重复。

1.8 交配行为观察

交配行为的观察参考 Wang 等 (2020) 的方法, 稍作修改。将羽化后 4 d 的雄成虫和雌成虫各 1 只放置在一个装有单个稻茎的玻璃管 (直径: 1 cm; 高: 8 cm) 中。10 对褐飞虱为一组, 拍摄记录 40 min 的交配过程, 重复 3 次。褐飞虱的交配过程包括腹部振动、跟随、定位、振翅、尝试交配、交配、终止交配和离开 8 个步骤。将褐飞虱放入装置开始至交配开始这段时间定义为交配前的时间, 将交配开始至离开的时间段定义为交配过程所用时间。通过观察录像, 统计交配前时间和交配过程所用时间。

1.9 繁殖力测定

将羽化 24 h 内的一头雌成虫 (5 龄注射 *dsNlugCSP6* 或 *dseGFP*) 和一头雄成虫 (未注射) 放入装有 5 根水稻幼苗的玻璃管中, 每 4 d 将其转移到新装置中。每个装置在取出成虫后 10 d 记录孵化的褐飞虱若虫数量。在光学显微镜下解剖水稻以计算未孵化卵的数量。最终统计羽化后 12 d 内总的产卵数 (孵化数加上稻秆中的卵数), 每个处理设置 12 个生物学重复。

2 结果与分析

2.1 *NlugCSP6* 的序列特征

NlugCSP6 (GenBank 登录号为 MF278724.1) 开放阅读框长度为 381 bp, 位于 2 号染色体上,

由 3 个外显子组成 (图 1: A)。*NlugCSP6* 编码 126 个氨基酸, 预测蛋白分子量为 14.4 ku, 等电点 (pI) 为 9.24, 偏碱性。*NlugCSP* 氨基酸序列包含保守的 4 个半胱氨酸位点, 前 21 个氨基酸被预测为信号肽 (图 1: B)。

2.2 *NlugCSP6* 的时空表达

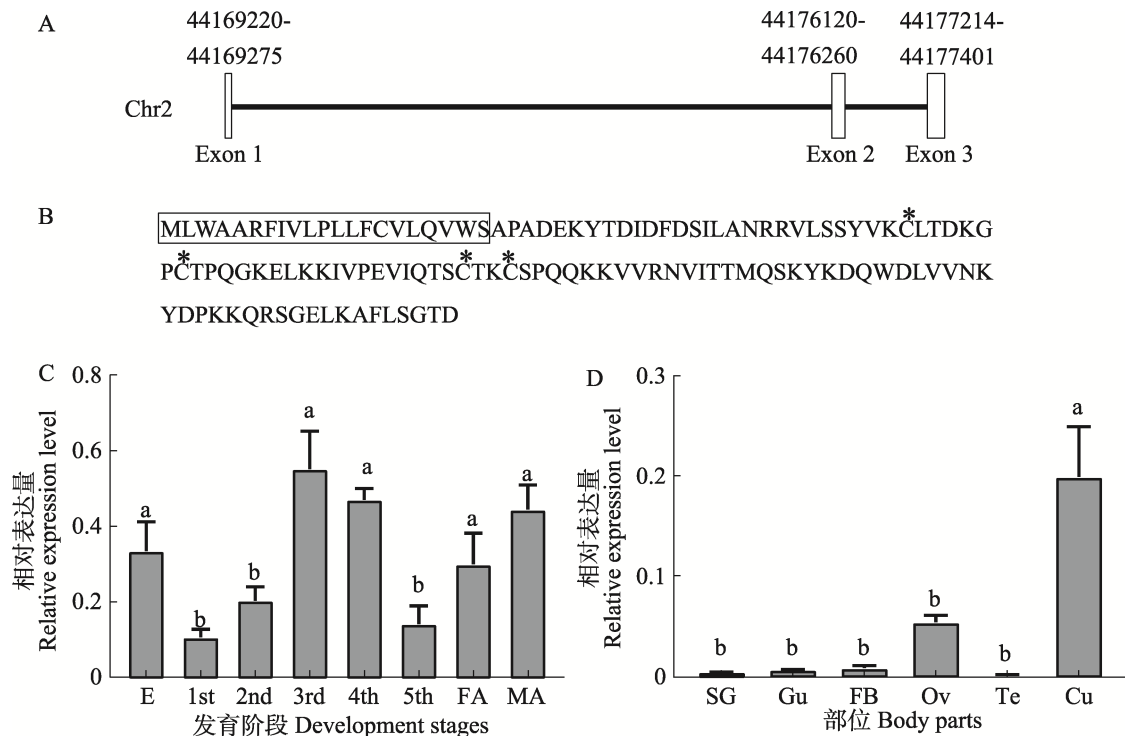
在褐飞虱不同龄期和不同组织, 对 *NlugCSP6* 基因表达量进行了定量分析。结果表明, *NlugCSP6* 基因在各个龄期均有表达, 包括卵、1-5 龄若虫和成虫 (图 1: C)。组织表达谱 (5 龄若虫的肠道、脂肪体和表皮, 雌雄成虫唾液腺, 雌成虫卵巢, 雄成虫精巢) 显示表皮组织中 *NlugCSP6* 表达量最高, 其次是卵巢 (图 1: D)。

2.3 *NlugCSP6* 对褐飞虱生存率的影响

本实验中, 利用 RNAi 技术沉默 *NlugCSP6* 基因测试了该基因对褐飞虱生存的影响。对褐飞虱 3 龄若虫注射 *dsRNA*, 可以有效地抑制了靶基因 *NlugCSP6* 的表达, 干扰效率为 99.7% (图 2: A)。降低 *NlugCSP6* 的表达对褐飞虱的存活有负面影响。*dsNlugCSP6* 处理的褐飞虱生存率在 10 d 内稳步下降至 35.3%, 从第 6 天开始, 均显著低于 *dseGFP* 处理和未处理的对照 ($P < 0.05$) (图 2: B)。

2.4 *NlugCSP6* 对褐飞虱翅发育的影响

对 3 龄褐飞虱进行 *NlugCSP6* 基因沉默, 并在羽化后第 2 天观察翅的发育情况。与注射 *dseGFP* 的对照相比, 注射 *dsNlugCSP6* 的所有褐飞虱的翅都不能正常闭合 (图 3)。这些不能正常闭合的翅被分为畸形翅和未闭合翅 (无明显畸形)。注射 *dsNlugCSP6* 的雌成虫畸形翅比例显著高于对照组 ($P=0.0043$) (图 4: A); 相反, 雄成虫未闭合翅的比例显著高于对照组 ($P=0.0002$) (图 4: B)。由于对照组和处理组的短翅型成虫比例高、且性别比例无显著差异 (*dseGFP*: $P=0.1347$; *dsNlugCSP6*: $P=0.1589$) (图 4: C, D), 因此本研究选择了短翅型雄成虫来观察未闭合翅的情况。通过测量翅后缘和内缘之间的角度 θ (图 4: E) 发现, 注射 *dsNlugCSP6*

图 1 *NlugCSP6* 序列特征与发育和组织表达谱Fig. 1 *NlugCSP6* sequence characterization and developmental and tissue expression profiles

A. *NlugCSP6* 在染色体的位置; B. *NlugCSP6* 的氨基酸序列; C. 不同发育阶段中的 *NlugCSP6* 相对表达水平;

D. 不同组织中的 *NlugCSP6* 相对表达水平。

方框表示预测的信号肽, *表示保守的 4 个半胱氨酸。图中数据为平均值±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)。

E: 卵; 1st: 1 龄若虫; 2nd: 2 龄若虫; 3rd: 3 龄若虫; 4th: 4 龄若虫; 5th: 5 龄若虫; FA: 雌成虫;

MA: 雄成虫; SG: 唾液腺; Gu: 肠道; FB: 脂肪体; Ov: 卵巢; Te: 精巢; Cu: 表皮。

A. Chromosomal location of *NlugCSP6*; B. *NlugCSP6* amino acid sequence; C. Relative expression level of *NlugCSP6* at different development stages; D. Relative expression level of *NlugCSP6* in different tissues.

The predicted signal peptide is shown in the box, * indicates the conserved four cysteines. Data are mean $\pm$ SE.

Histograms with different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$, Tukey's test).

E: Egg; 1st: First-instar nymph; 2nd: Second-instar nymph; 3rd: Third-instar nymph; 4th: Four-instar nymph; 5th: Five-instar nymph; FA: Female adult; MA: Male adult; SG: Salivary gland; Gu: Gut; FB: Fat body; Ov: Ovary; Te: Testis; Cu: Cuticle.

的褐飞虱翅的 θ 角度平均为 120.9° , 注射 dseGFP 的褐飞虱的翅的 θ 角度平均为 128.8° (图 4: F), 两者存在显著差异 ($P < 0.0001$)。

2.5 *NlugCSP6* 对褐飞虱交配行为和繁殖力的影响

为了研究 *NlugCSP6* 对褐飞虱繁殖力的潜在作用, 对 5 龄若虫进行了 RNAi, 并在羽化第 2 天检测干扰效率为 98.6% (图 5: A)。在交配行为实验中, 注射 ds*NlugCSP6* 的 30 对褐飞虱中有 21 对完成交配, 注射 dseGFP 的 30 对中有 19 对完成交配。本研究记录了褐飞虱在交配前和交

配过程所需的时间, 处理组和对照组无显著差异 (交配前时间: $P = 0.1243$; 交配过程所需时间: $P = 0.6041$) (图 5: B, C)。在繁殖力实验中, 处理组 12 d 内产卵总数与对照组相比, 下降了 22.0% (图 5: D)。

3 讨论

目前, 关于昆虫 CSPs 广泛的组织表达模式和多种非化学感受功能已有相关报道, 但是褐飞虱 CSPs 的非化学感受功能我们还知之甚少。在本研究结果表明, *NlugCSP6* 在包括卵期的所有

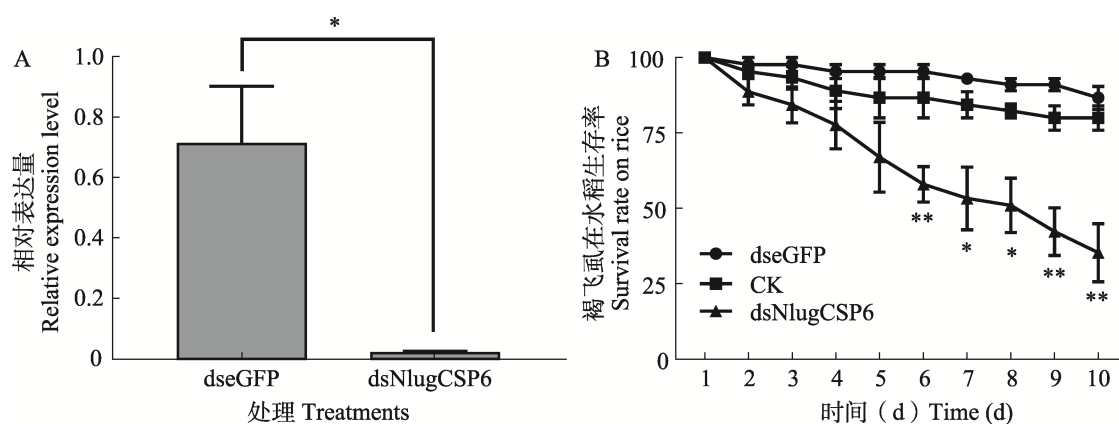
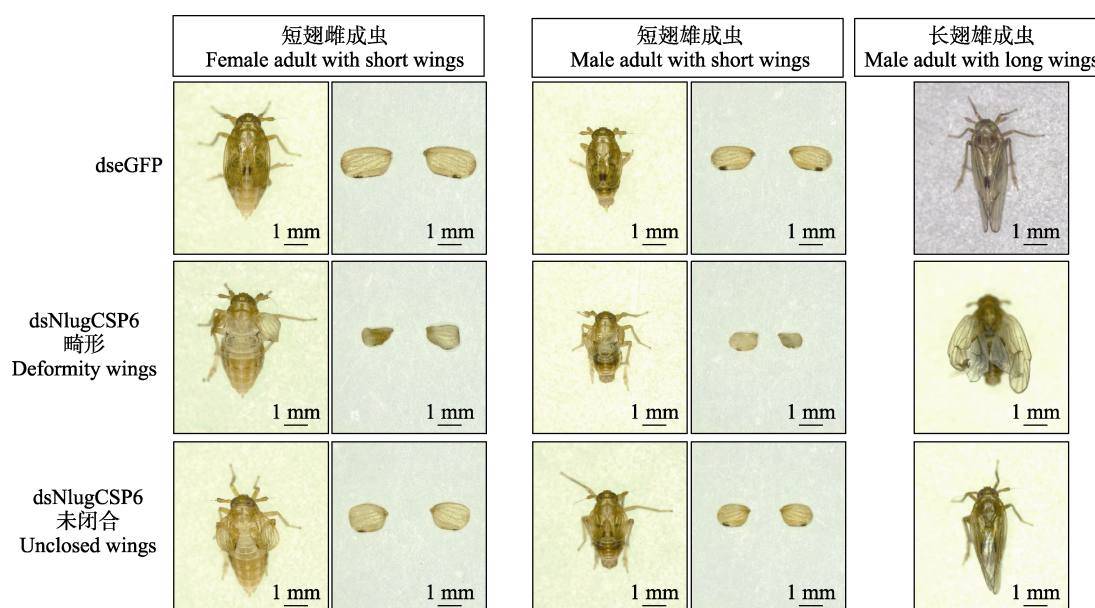


图 2 褐飞虱干扰效率检测和生存率分析

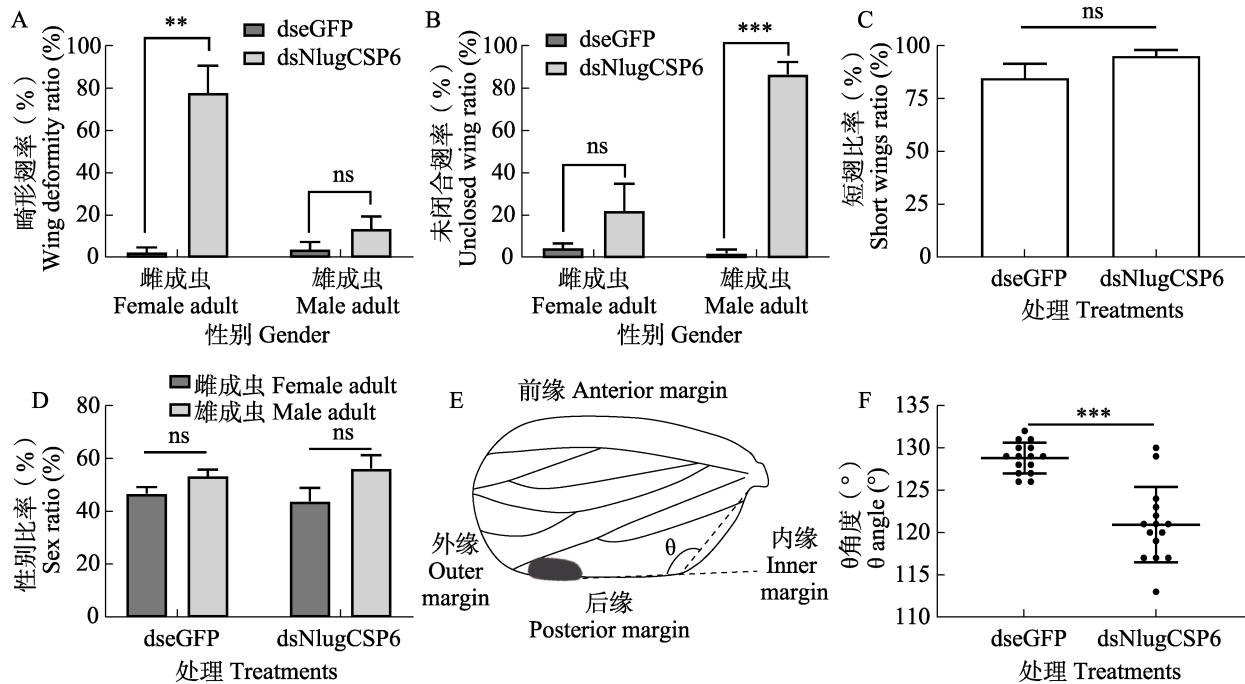
Fig. 2 Detection of RNA interference efficiency and survival analysis of brown planthopper

A. *NlugCSP6* 干扰效率检测; B. 注射 dsRNA 后统计褐飞虱若虫的生存率。数据为平均值±标准误。*表示存在显著差异 ($P < 0.05$, Student's *t*-检验);**表示存在极显著差异 ($P < 0.01$, Student's *t*-检验)A. Interference efficiency detection of *NlugCSP6*; B. The survival rates of BPHs after dsRNA injection were monitored daily.Data are mean±SE. * indicates significant differences ($P < 0.05$, Student's *t*-test);** indicates extremely significant differences ($P < 0.01$, Student's *t*-test).图 3 *NlugCSP6* RNAi 后畸形翅和未闭合翅形态的观察Fig. 3 Observation of deformity wings and unclosed wings following RNAi against *NlugCSP6*

龄期中均有表达,且在表皮和卵巢中表达量最高,通过 RNAi 进一步研究发现 *NlugCSP6* 在褐飞虱生存、繁殖以及翅的正常发育中发挥了重要作用,生理功能与组织特异性表达相一致。

通过 *NlugCSP6* 基因的 RNAi,褐飞虱的生存率在 10 d 内逐渐降低,若虫死亡主要表现为蜕皮失败和虫体萎缩,此外降低 *NlugCSP6* 的表

达还导致了成虫翅的不正常发育。组织表达谱显示了 *NlugCSP6* 基因在表皮中高表达,推测 *NlugCSP6* 基因对褐飞虱表皮形成和翅的正常发育至关重要。*NlugCSP6* 在表皮中的功能可能与表皮形成过程中物质的转运有关,因为表皮是碳氢化合物运输途径的主要目标组织 (Schal *et al.*, 1998)。在烟粉虱 *Bemisia tabaci* 中已经证明

图4 干扰 *NlugCSP6* 后褐飞虱翅发育表型分析Fig. 4 The wing development phenotypes in the PHs following RNAi against *NlugCSP6*

A. *NlugCSP6* RNAi 处理对翅畸形的影响; B. *NlugCSP6* RNAi 处理对翅不能闭合的影响; C. 对照组和处理组短翅型褐飞虱的比率; D. 对照组和处理组褐飞虱性别比率; E. 短翅雄成虫左翅 θ 角测量示意图; F. θ 角度的量化 ($n=15$)。

数据为平均值 $\pm$ 标准误, **表示存在显著差异 ($P<0.01$, Student's t -检验); ***表示存在极显著差异

($P<0.001$, Student's t -检验); ns: 没有差异显著性。

A. Effects of RNAi against *NlugCSP6* on wings deformity; B. Effects of RNAi against *NlugCSP6* on wings failure to close;

C. Short wing ratio of BPH in control and treatment groups; D. Sex ratio of BPH in control and treatment groups;

E. Schematic diagram of left wing for the θ angle measurement; F. Quantization of θ angles ($n=15$). Data are mean $\pm$ SE.

** indicates significant differences ($P<0.01$, Student's t -test); *** indicates extremely significant differences ($P<0.001$, Student's t -test); ns indicates no significance.

BtabCSP1 和亚油酸有很强的结合亲和力 (Liu *et al.*, 2016)。亚油酸几乎存在于大多数昆虫的所有组织,参与脂质代谢和脂肪酸合成。亚油酸对信息素合成、激素合成、昆虫组织发育以及免疫发挥重要功能 (Tillman *et al.*, 1999)。因此 *NlugCSP6* 也可能在褐飞虱体内与亚油酸等长链脂肪酸结合,从而在其生长发育过程中发挥重要作用。此外,干扰红火蚁 *Solenopsis invicta* 3 龄幼虫的 *Si-CSP9* 后,表皮不能正常脱落, *Si-CSP9* 可能与 PKA (Protein kinase DC2) 一起参与涉及了 hedgehog 信号通路,从而影响 3 龄幼虫发育网络 (Cheng *et al.*, 2015)。Hedgehog 信号通路在包括幼虫体节和成虫附肢等多个发育过程中起关键作用。因此, *NlugCSP6* 是否也通过和 PKA 一同参与 hedgehog 信号通路影响昆虫发

育还有待进一步研究。

NlugCSP6 在卵巢中也有比较高的表达,其表达水平是除表皮之外的其它组织的 6.3 倍以上。在发育表达谱中, *NlugCSP6* 在卵期的表达水平甚至显著高于部分若虫期。这些结果暗示 *NlugCSP6* 可能在交配、生殖和胚胎发育中发挥重要作用。褐飞虱的交配过程包括腹部振动、跟随、定位、振翅、尝试交配、交配、终止交配和离开 8 个步骤 (Wang *et al.*, 2020)。本研究以交配和离开为节点,统计交配前的时间和交配过程所用的时间,结果显示 2 个时间段处理和对照无显著差异。因此我们推断 *NlugCSP6* 可能不会影响交配行为,例如成虫之间的定位和通过化学感受功能的求偶。在繁殖力实验中,干扰 *NlugCSP6* 导致产卵量的减少,表明 *NlugCSP6* 可能参与卵

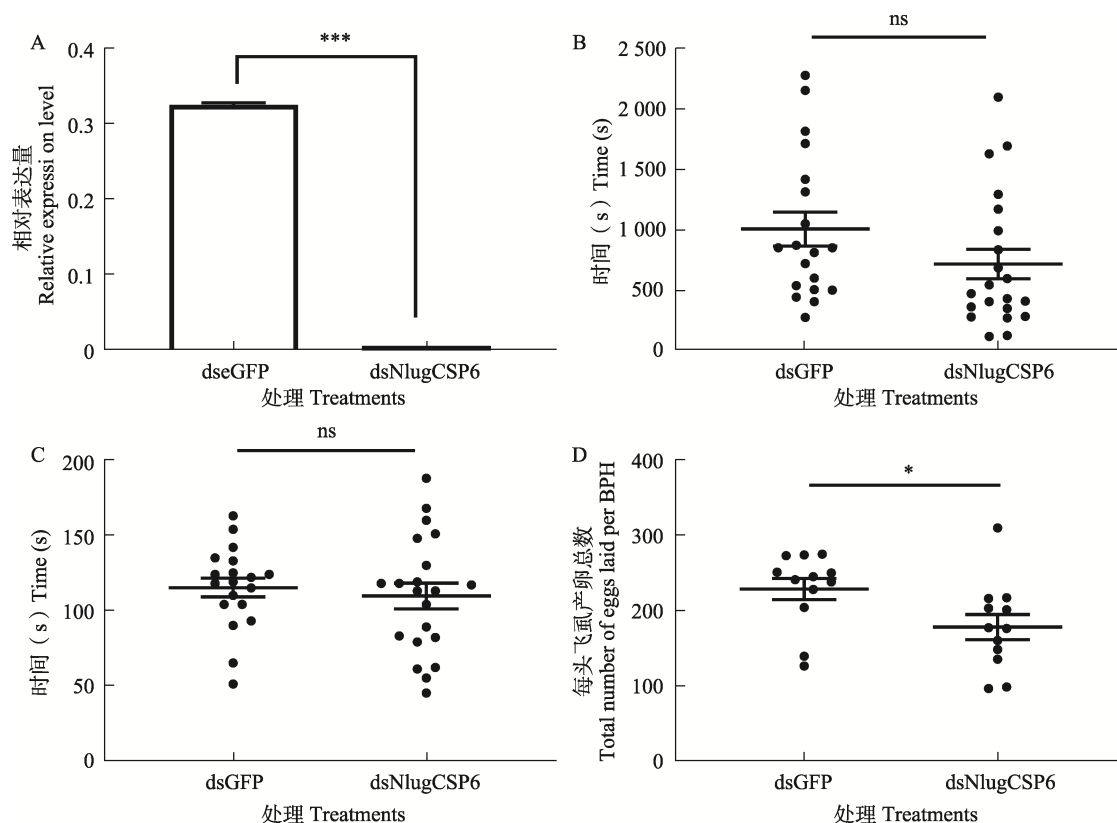


图5 褐飞虱干扰效率检测及交配行为和繁殖力测定

Fig. 5 Detection of RNAi efficiency of brown planthopper and effects of RNAi against NlugCSP6 on the mating behavior and fecundity

A. 羽化后 2 d 检测 NlugCSP6 mRNA 水平; B. 交配前所用时间; C. 交配过程所用时间; D. 单头雌成虫在 12 d 内产卵总数 ($n=12$)。数据为平均值 $\pm$ 标准误。*表示存在显著差异 ($P < 0.05$, Student's t -检验);

***表示存在极显著差异 ($P < 0.001$, Student's t -检验); ns: 没有差异显著性。

A. NlugCSP6 mRNA levels were detected in two days after eclosion; B. The time spent before mating; C. The time spent in the mating process; D. Total eggs number by a female in 12 days ($n=12$). BPH: Brown planthopper. Data are mean $\pm$ SE. * indicates significant differences ($P < 0.05$, Student's t -test); *** indicates extremely significant differences ($P < 0.001$, Student's t -test); ns indicates no significance.

巢发育、卵子发生或胚胎发育。在其它昆虫物种中也报道了类似的现象。例如, 在甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 中, 与注射 DEPC 水和未注射对照相比, 降低雌成虫 *SexiCSP3* 分别产生了 68.3%和 71.4%的抑制产卵现象 (Gong *et al.*, 2012)。在意大利蜜蜂 *Apis mellifera* 中, 用 dsRNA 抑制 *CSP5* 在胚胎的表达会导致胚胎发育异常和无法孵化 (Maleszka *et al.*, 2007)。CSPs 是直接和相关蛋白结合, 还是作为载体运输活性物质如激素、脂肪酸等参与生殖和胚胎发育, 还需要进一步的研究。

综上所述, 本文结果表明, NlugCSP6 在褐飞虱的发育繁殖和翅发育中发挥重要作用。

NlugCSP6 具有昆虫 CSPs 的保守基序, 暗示可能会保持对一些化合物的结合亲和力, 如长链脂肪酸、化学信息素和化学农药等, 如果开发新化合物扰乱 NlugCSP6 的生理功能, 可以达到若虫致死、繁殖下降的目标, 成为褐飞虱防控的一个潜在分子靶标。

参考文献 (References)

- Angeli S, Ceron F, Scaloni A, Monti M, Monteforti G, Minnocci A, Petacchi R, Pelosi P, 1999. Purification, structural characterization, cloning and immunocytochemical localization of chemoreception proteins from *Schistocerca gregaria*. *European Journal of Biochemistry*, 262(3): 745–754.

- Bao YY, Zhang CX, 2019. Recent advances in molecular biology research of a rice pest, the brown planthopper. *Journal of Integrative Agriculture*, 18(4): 716–728.
- Bos JI, Prince D, Pitino M, Maffei ME, Win J, Hogenhout SA, 2010. A functional genomics approach identifies candidate effectors from the aphid species *Myzus persicae* (green peach aphid). *PLoS Genetics*, 6(11): e1001216.
- Cheng DF, Lu YY, Zeng L, Liang GW, He XF, 2015. Si-CSP9 regulates the integument and moulting process of larvae in the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*. *Scientific Reports*, 5: 9245.
- Claridge-Chang A, Wijnen H, Naef F, Boothroyd C, Rajewsky N, Young MW, 2001. Circadian regulation of gene expression systems in the *Drosophila* head. *Neuron*, 32(4): 657–671.
- Gong L, Luo Q, Rizwan-ul-Haq M, Hu MY, 2012. Cloning and characterization of three chemosensory proteins from *Spodoptera exigua* and effects of gene silencing on female survival and reproduction. *Bulletin of Entomological Research*, 102(5): 600–609.
- Lartigue A, Campanacci V, Roussel A, Larsson AM, Jones TA, Tegoni M, Cambillau C, 2002. X-ray structure and ligand binding study of a moth chemosensory protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(35): 32094–32098.
- Levy F, Bulet P, Ehret-Sabatier L, 2004. Proteomic analysis of the systemic immune response of *Drosophila*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 3(2): 156–166.
- Liu GX, Ma HM, Xie HY, Xuan N, Guo X, Fan ZX, Rajashekar B, Arnaud P, Offmann B, Picimbon JF, 2016. Biotype characterization, developmental profiling, insecticide response and binding property of *Bemisia tabaci* chemosensory proteins: Role of CSP in insect defense. *PLoS ONE*, 11(5): e0154706.
- Liu SH, Ding ZP, Zhang CW, Yang BJ, Liu ZW, 2010. Gene knockdown by intro-thoracic injection of double-stranded RNA in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40(9): 666–671.
- Maleszka J, Forêt S, Saint R, Maleszka R, 2007. RNAi-induced phenotypes suggest a novel role for a chemosensory protein CSP5 in the development of embryonic integument in the honeybee (*Apis mellifera*). *Development Genes and Evolution*, 217(3): 189–196.
- McKenna MP, Hekmat-Scafe DS, Gaines P, Carlson JR, 1994. Putative *Drosophila* pheromone-binding proteins expressed in a subregion of the olfactory system. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(23): 16340–16347.
- Nomura A, Kawasaki K, Kubo T, Natori S, 1992. Purification and localization of p10, a novel protein that increases in nymphal regenerating legs of *Periplaneta americana* (American cockroach). *The International Journal of Developmental Biology*, 36(3): 391–398.
- Pelosi P, Iovinella I, Zhu J, Wang G, Dani FR, 2018. Beyond chemoreception: Diverse tasks of soluble olfactory proteins in insects. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 93(1): 184–200.
- Rao WW, Zheng XH, Liu BF, Guo Q, Guo JP, Wu Y, Shangguan XX, Wang HY, Wu D, Wang ZZ, Hu L, Xu CX, Jiang WH, Huang J, Shi SJ, He GC, 2019. Secretome analysis and in planta expression of salivary proteins identify candidate effectors from the brown planthopper *Nilaparvata lugens*. *Molecular Plant-microbe Interactions*, 32(2): 227–239.
- Robertson HM, 2019. Molecular evolution of the major arthropod chemoreceptor gene families. *Annual Review of Entomology*, 64: 227–242.
- Schal C, Sevala VL, Young HP, Bachmann JAS, 1998. Sites of synthesis and transport pathways of insect hydrocarbons: Cuticle and ovary as target tissues. *Integrative and Comparative Biology*, 38(2): 382–393.
- Settle WH, Ariawan H, Astuti ET, Cahyana W, Hakim AL, Hindayana D, Lestari AS, 1996. Managing tropical rice pests through conservation of generalist natural enemies and alternative prey. *Ecology*, 77(7): 1975–1988.
- Tillman JA, Seybold SJ, Jurenka RA, Blomquist GJ, 1999. Insect pheromones—an overview of biosynthesis and endocrine regulation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29(6): 481–514.
- Wang LX, Zhang YC, Tao S, Guo D, Zhang Y, Jia YL, Zhang S, Zheng C, Khan D, Gao CF, Wu SF, 2020. Pymetrozine inhibits reproductive behavior of brown planthopper *Nilaparvata lugens* and fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 165: 104548.
- Wang YC, Tang M, Hao PY, Yang ZF, Zhu LL, He GC, 2008. Penetration into rice tissues by brown planthopper and fine structure of the salivary sheaths. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 129(3): 295–307.
- Wang YF, Shi TF, Qi L, Liu F, Zhu YJ, Hou C, Yu LS, 2018. Spatiotemporal expression levels of three chemosensory proteins in adult *Apis mellifera ligustica* workers. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 55(1): 71–78. [王宇飞, 施腾飞, 齐磊, 刘芳, 朱玉洁, 侯超, 余林生, 2018. 三种化学感应蛋白在成年蜜蜂工蜂中的时空表达水平. 应用昆虫学报, 55(1): 71–78.]
- Waris MI, Younas A, Adeel MM, Duan SG, Quershi SR, Kaleem Ullah RM, Wang MQ, 2020. The role of chemosensory protein

- 10 in the detection of behaviorally active compounds in brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect Science*, 27(3): 531–544.
- Waris MI, Younas A, Ameen A, Rasool F, Wang MQ, 2020. Expression profiles and biochemical analysis of chemosensory protein 3 from *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae). *Journal of Chemical Ecology*, 46(4): 363–377.
- Waris MI, Younas A, Ul Qamar MT, Hao L, Ameen A, Ali S, Abdelnabby HE, Zeng FF, Wang MQ, 2018. Silencing of chemosensory protein gene NlugCSP8 by RNAi induces declining behavioral responses of *Nilaparvata lugens*. *Frontiers in Physiology*, 9: 379.
- Yang GQ, Wang Q, Zhang QL, Liu K, Ran HN, Ma YF, Dong SL, He P, 2021. Review of research on the olfactory genes of rice planthoppers. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 58(4): 783–794. [杨贵琴, 王琴, 张秋良, 刘坤, 冉会奴, 马云峰, 董双林, 贺鹏, 2021. 稻飞虱嗅觉相关基因及功能的研究进展. *应用昆虫学报*, 58(4): 783–794.]
- Yang K, He P, Dong SL, 2014. Different expression profiles suggest functional differentiation among chemosensory proteins in *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae). *Journal of Insect Science*, 14(1): 270.
- Zhou SS, Sun Z, Ma WH, Chen W, Wang MQ, 2014. De novo analysis of the *Nilaparvata lugens* (Stål) antenna transcriptome and expression patterns of olfactory genes. *Comparative Biochemistry and Physiology D-Genomics & Proteomics*, 9: 31–39.



封面介绍

锤肋跷螭 *Yemma exilis* Horváth

锤肋跷 (qiāo) 螭是半翅目 (Hemiptera) 跷螭科 (Berytidae) 昆虫。跷螭是一种身体、触角和足都很细长的昆虫, 体型小 (一般 10 mm 以下), 善飞行, 很像大蚊子, 因足细长很像“蚊子踩高跷”。锤肋跷螭是我国北方广大地区常见的种类之一, 尤其在构树叶片上最为常见。本期封面照片于 2020 年 7 月 2 日拍摄于北京市昌平区沙河水库。

(张润志, 中国科学院动物研究所)