

褐飞虱锚定蛋白基因 *NIGPI* 的 克隆及功能分析*

熊振泽** 张 诺 宋 阳 申屠旭萍*** 俞晓平

(中国计量大学生命科学学院, 浙江省生物计量及检验检疫技术重点实验室, 杭州 310018)

摘 要 【目的】为探明褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 锚定蛋白基因 *NIGPI* 的表达模式和生物学功能。【方法】基于褐飞虱转录组数据, 利用 PCR 技术克隆 *NIGPI* 全长 cDNA 序列; 利用生物信息学手段分析其核酸和蛋白质序列特征; 通过 qRT-PCR 技术检测其时空表达规律; 利用 RNAi 技术探明 *NIGPI* 的生物学功能。【结果】克隆获得了褐飞虱 *NIGPI* cDNA 序列全长(GenBank 登录号: XM_022342741.2), *NIGPI* 的 ORF 共有 813 个核苷酸, 编码 270 个氨基酸, 预测的分子量约为 27 kD, 预测的等电点为 4.84。该基因具有信号肽 (Sec/SPI), 且信号肽的剪切位点位于第 19 号和第 20 号氨基酸之间。该基因包含 1 个具有 GltG 蛋白的结构域, 共有 44 个磷酸化修饰位点。系统进化树分析表明, *NIGPI* 与灰飞虱 *Laodelphax striatellus* 的亲缘关系最为接近, 且在昆虫中的表达高度保守。qRT-PCR 分析表明, *NIGPI* 基因具有明显的时空特异性, *NIGPI* 在卵期至初羽化基本不表达, 羽化 24 h 后表达水平开始显著增加, 羽化后 72 h 基因表达水平显著高于其它龄期。*NIGPI* 在胸部、腹部、卵巢和肠道内的表达水平无显著差异 ($P > 0.05$), 但均显著高于头部 ($P < 0.05$)。RNAi 分析结果显示: *NIGPI* 干扰后褐飞虱血淋巴中的类酵母共生菌 (Yeast-like symbiont, YLS) 数量显著下降, 在注射 24、48 和 72 h 后, 干扰组 YLS 数量比对照组分别减少了 72.4%、68.2% 和 72.3%。*NIGPI* 干扰后褐飞虱死亡率显著上升, 干扰组到第 10 天褐飞虱全部死亡, 而对照组则在第 16 天全部死亡。*NIGPI* 干扰后的产卵量及孵化率均显著下降, 对照组的褐飞虱产卵量最高为 300 颗, 最低为 80 颗, 未孵化的卵数量小于 18 颗, 平均孵化率大于 90%; 而处理组褐飞虱的产卵量最高为 56 颗, 未孵化的卵数量大于 15 颗, 平均孵化率小于 20%。【结论】*NIGPI* 对褐飞虱体内 YLS 释放至血淋巴这一过程紧密相关, 并在褐飞虱的生长发育及繁殖过程中发挥重要作用, 可作为褐飞虱防控的潜在靶标。

关键词 褐飞虱; *NIGPI*; 类酵母共生菌; 基因功能

Cloning and functional analysis of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål) anchor protein gene (*NIGPI*)

XIONG Zhen-Ze** ZHANG Nuo SONG Yang SHENTU Xu-Ping*** YU Xiao-Ping

(Zhejiang Provincial Key Laboratory of Biometrology and Inspection & Quarantine, College of Life Science,
China Jiliang University, Hangzhou 310018, China)

Abstract [Objectives] To elucidate the expression pattern and biological function of anchor protein gene (*NIGPI*) from the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål). [Methods] Based on transcriptome data, the full-length cDNA of the *NIGPI* gene was cloned with PCR and its nucleic acid and protein sequence characteristics were analyzed with bioinformatics. qRT-PCR was then used to detect the gene's temporal and spatial expression patterns and its biological functions were determined using RNAi. [Results] The full-length cDNA sequence of *NIGPI* (GenBank Accession Number:

*资助项目 Supported projects: 浙江省“领雁”计划项目 (2022C02047); 浙江省重点研发计划项目 (2019C02015); 国家自然科学基金区域发展联合基金重点支持项目(U21A20223); 中国计量大学科研标志性发展专项 (2020YW27)

**第一作者 First author, E-mail: 2631043488@qq.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: stxp@cjlu.edu.cn

收稿日期 Received: 2022-06-07; 接受日期 Accepted: 2022-08-05

XM_022342741.2) was cloned and obtained. The ORF contained 813 nucleotides encoding 270 amino acids with a predicted molecular weight of about 27 kD and a predicted isoelectric point of 4.84. The gene has a signal peptide (Sec/SPI), the spline site of which is located between amino acids 19 and 20. This gene contains a GltG protein domain, with a total of 44 phosphorylation modification sites. A phylogenetic tree indicates that *NIGPI* is most closely related to the homologous gene of *Laodelphax striatellus*, and that anchor protein genes are highly conserved in insects. qRT-PCR indicates that the *NIGPI* gene displays obvious temporal and spatial specificity. The gene *NIGPI* was hardly expressed from the egg stage to the beginning of emergence, its expression level only increasing significantly in 1-day-old female adults. Maximum expression level was recorded in 72 h-old female adults, which was significantly higher than that in other age groups. There was no significant difference of *NIGPI* expression in the thorax, abdomen, ovary and intestine, but the expression level in these organs was significantly higher than in the head. The number of YLS in the interference group 24, 48 and 72 h after RNAi treatment decreased by 72.4%, 68.2% and 72.3%, respectively, relative to the control group. *NIGPI* knockdown significantly increased *N. lugens* mortality; all *N. lugens* in the interference group died on the 10th day after treatment, while those in the control group survived until the 16th day. Knockdown also significantly decreased the number of eggs laid and the hatching rate. In the control group, the number of eggs laid ranged from 80 to 300 and the average hatching rate was > 90%. However, in the treatment group, the maximum number of eggs laid was 56 and the average hatching rate was < 20%. [Conclusion] *NIGPI* is closely related to the release of YLS from the fat body to the hemolymph and plays an important role in the growth, development and reproduction of the brown planthopper. The *NIGPI* gene is therefore a potential target for controlling this pest.

Key words brown planthopper; *NIGPI*; yeast-like symbionts; gene function

褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (Stål) 隶属于半翅目 Hemiptera 飞虱科 Delphacidae, 是为害我国水稻的重要害虫 (Xue *et al.*, 2010)。褐飞虱不仅通过刺吸水稻韧皮部吸食汁液, 而且在水稻叶鞘中央产卵造成机械损伤 (Horgan *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2022), 同时能传播多种病毒性病害 (Huang *et al.*, 2017), 造成我国粮食大面积欠收和减产 (陆剑飞和黄国洋, 2006)。如何安全和有效防治褐飞虱是当前褐飞虱防控工作中一个亟待解决的瓶颈问题, 也是保证国家粮食安全的关键所在。

褐飞虱腹部脂肪体中存在大量的类酵母共生菌 (Yeast-like symbiont, YLS) (Cheng and Hou, 2001), 它们参与褐飞虱的固醇类物质代谢、氨基酸供给及氮素循环等生物进程, 对褐飞虱的生长发育、繁殖和致害性变异等都发挥重要作用 (Xue *et al.*, 2014; Shentu *et al.*, 2016)。因此, YLS 有望成为褐飞虱防治的新靶标。对 YLS 在褐飞虱体内垂直传递过程的深入研究有利于为褐飞虱防治提供新的思路 (Yukuhiro *et al.*, 2014)。我们前期研究表明, 初羽化雌虫的血淋巴中能检测到少量的 YLS, 而羽化 72 h 雌虫血

淋巴中则存在大量的 YLS。为探明 YLS 从脂肪体释放到血淋巴这一过程的影响因素和调控机制, 进一步对初羽化雌虫 (YLS 开始释放时间点) 和羽化 72 h 雌虫 (YLS 大量释放时期) 的脂肪体进行了转录组测序分析, 发现锚定蛋白基因 *NIGPI* 表达在 YLS 释放过程中存在显著差异 (待发表)。

糖磷脂酰肌醇 (Glycolphosphatidylinositol, GPI) 锚定蛋白是通过 C 端共价结合 GPI 而锚定在膜上的蛋白质, Ferguson 等 (1988) 在布氏锥虫 *Brucei variant* 体内成功分离到首个 GPI 分子并进行鉴定。GPI 是一种结构复杂的糖脂类化合物, 已确证的 GPI 结构有 50 余个, 广泛存在于真核生物中。许多低等或高等真核生物体内的膜表面蛋白及糖蛋白的 C-末端以共价键的形式与 GPI 结合 (Kinoshita and Fujita, 2016), 形成 GPI 锚定蛋白并锚定于细胞质膜上 (Garner *et al.*, 2007), 实质上 GPI 蛋白的出现是一种蛋白翻译后修饰的行为 (Brown and Waneck, 1992)。GPI 锚定蛋白主要锚定于细胞质膜的脂筏上 (Denny *et al.*, 2001), 当 GPI 锚定蛋白大量合成并锚定于质膜后, 它们会自发地形成 GPI 锚定

蛋白簇 (Kooyman and Byrne, 1998)。GPI 锚定蛋白簇的大小和多寡与细胞的类型以及细胞的外环境有关 (Sangiorgio *et al.*, 2004; Maeda and Kinoshita, 2011; Lebreton *et al.*, 2018)。至今已有 250 余种真核生物的膜蛋白被阐明通过 GPI 锚定的方式与质膜相连 (Saha *et al.*, 2016; Klem, 2021)。GPI 锚定蛋白在哺乳动物中的功能主要有激活免疫反应、促进精子的发生和发育以及参与细胞间或细胞与环境之间的信号传导作用等 (Reeves *et al.*, 2012; Müller, 2018; Roller *et al.*, 2020)。但 GPI 锚定蛋白在褐飞虱等昆虫中的作用尚未明确。

为了探明 GPI 锚定蛋白在褐飞虱中的功能, 尤其是在 YLS 从脂肪体释放到血淋巴这一过程中所起的作用, 本研究克隆了褐飞虱 GPI 锚定蛋白基因 (*NIGPI*), 并对其 cDNA 序列进行生物学分析以及时空表达模式分析, 进而通过 RNAi 技术对 *NIGPI* 进行功能初探, 探明 *NIGPI* 在褐飞虱 YLS 释放过程中的作用, 为褐飞虱防治提供新的方向及理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

供试的褐飞虱饲养于浙江省生物计量及检验检疫技术重点实验室人工气候室内, 以 TN1 敏感品系水稻苗连续饲养, 饲养条件为: 温度 (26±1) °C, 湿度: 70%-80%, 光周期 16L : 8D。

1.2 实验试剂

RNA 提取试剂盒 MiniBEST Universal RNA Extraction Kit、第一链 cDNA 合成试剂盒 PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit、*Taq* 酶、胶回收试剂盒 MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0 及荧光定量 PCR 所需试剂 SYBR® Premix Ex *Taq*™ II 均购于宝日医生物技术(北京)有限公司; dsRNA (double-stranded RNA) 合成试剂盒 MEGAscript® RNAi Kit 购于美国 Invitrogen 公司; 引物合成和测序均由杭州有康生物技术有限公司完成。

1.3 *NIGPI* 基因的克隆及测序

基于本实验室已有的褐飞虱转录组数据, 结合褐飞虱全基因组信息 (Xue *et al.*, 2010), 得到 *NIGPI* cDNA 全长序列 (NCBI 登录号: XM_022342741.2)。对 *NIGPI* 进行克隆验证, 首先采用 RNA 提取试剂盒提取褐飞虱成虫总 RNA, 质量和浓度经微量分光光度计 NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific, 美国) 检测合格后, 利用反转录试剂盒合成第一链 cDNA, 以此为模板进行 PCR 扩增。PCR 扩增引物序列如表 1。PCR 反应体系: Ex *Taq* 酶 25 μL, 上下游引物 (10 μmol/L) 各 1 μL (表 1), cDNA 模板 1 μL, 用 ddH₂O 补充体积至 50 μL。PCR 扩增程序: 预变性 95 °C, 5 min; 变性 95 °C, 30 s; 退火 55 °C, 30 s; 延伸 72 °C, 90 s; 30 个循环; 72 °C, 10 min。获得的 PCR 产物通过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 割取有目的条带的胶块, 利用凝胶回收试剂盒进行纯化回收, 将回收所得的 DNA 样本送至公司测序分析。

1.4 *NIGPI* 基因生物学分析

使用 NCBI orffinder 预测 ORF (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder>); NCBI BLAST 翻译 CDs 序列 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>); SignalP 信号肽预测软件预测 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>); CBS prediction servers 预测和分析氨基酸磷酸化位点 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>); 使用 CDD analysis 对氨基酸保守结构域进行分析 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>); 用 MEGA-X 软件, 使用 Neighbor-Joining 法分析绘制系统发育树。

1.5 *NIGPI* 的时空表达模式分析

分别收集卵、1-5 龄的若虫、初羽后 1-5 d 的雌虫作为不同发育历期褐飞虱样品, 分别提取羽化 72 h 褐飞虱雌虫头部、胸部、腹部及卵巢和肠道的总 RNA, 进行反转录合成 cDNA 作为模板, 用于 qRT-PCR 反应 (Wan *et al.*, 2017)。qRT-PCR 反应体系: cDNA 2 μL、SYBR® Premix Ex *Taq*™ II 10 μL、上下游引物 (10 μmol/L) 各 1 μL (表 1),

用 ddH₂O 补充体积至 20 μL。扩增程序: 预变性 94 °C, 30 s; 变性 94 °C, 5 s; 退火及延伸 60 °C, 30 s, 40 个循环, 每组 3 个重复。

1.6 RNA 干扰 *NIGPI* 对褐飞虱 YLS 释放及生长发育繁殖的影响

基于 *NIGPI* 和绿色荧光蛋白 *GFP* (对照) 基因的 cDNA 序列, 设计 dsRNA 合成引物 (表 1), 参照 MEGAscript® RNAi Kit 说明书进行 ds*NIGPI* 和 ds*GFP* 的合成。经 NanoDrop ND-2000 和 1.5% 琼脂糖凝胶电泳对 dsRNA 检测合格后, 用 ddH₂O 稀释至 5 000 μg/L 用于后续注射。将初羽雌虫置于显微镜下, 使用微量注射仪在褐飞虱中胸及后胸之间的部位缓慢注射 50 nL dsRNA。注射后将褐飞虱转移至温网室进行饲

养。以注射 ds*NIGPI* 的褐飞虱为实验组, 注射 ds*GFP* 为对照组。设置 3 个平行实验, 每组 50 头试虫, 将干扰后的褐飞虱样本单独饲养, 收集注射后 24、48 和 72 h 的样本, 分别检测体内 *NIGPI* 的表达水平, 采用血细胞计数板法统计血淋巴中 YLS 的数量, 统计褐飞虱的存活率、产卵量及孵化率。

1.7 数据分析

以褐飞虱 *Actin* 基因为内参, 用 2^{-ΔΔCt} 法计算 *NIGPI* 的相对表达量。实验结果采用平均值±标准误表示, 数据处理与分析通过 DPS 7.05 软件进行。利用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 进行差异显著性检验, 用 GraphPad Prism Software 8.0 绘制作图。

表 1 本研究所用引物
Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')	用途 Use of purpose
<i>NIGPI</i> -F	AACCGTACATATCCTGCAAACA	cDNA 克隆 cDNA cloning
<i>NIGPI</i> -R	CACAACATTGGTGAGGCATACT	
q <i>NIGPI</i> -F	GCAGACTGTGGCTCCAACAACC	实时定量 PCR 分析 qRT-PCR analysis
q <i>NIGPI</i> -R	TGGTCCGCAGGTGGTGATGG	
q <i>Actin</i> -F	GATGAGGCGCAGTCAAAGAG	
q <i>Actin</i> -R	GTCATCTTCTCACGGTTGGC	
ds <i>NIGPI</i> -F	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGCAACCATCACCTGCGGACC	dsRNA 合成 dsRNA synthesis
ds <i>NIGPI</i> -R	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGCAGCAGCATGGGGAGGAGGAAGA	
ds <i>GFP</i> -F	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGATACGTGCAGGAGAGGAC	
ds <i>GFP</i> -R	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGCAGATTGTGTGGACAGG	

2 结果与分析

2.1 *NIGPI* 基因克隆及生物学分析

通过 BLAST 比对褐飞虱全基因组序列信息, 本研究克隆所得 *NIGPI* 基因的 cDNA 序列与 GenBank 中登录号为 XM_022342741.2 的序列完全一致。*NIGPI* 基因的 ORF 共有 813 个核苷酸, 编码 270 个氨基酸, 预测的分子量约为 27 kD, 预测的等电点为 4.84。该基因具有信号肽 (Sec/SPI), 且信号肽的剪切位点位于第 19 号和第 20 号氨基酸之间, 且包含 1 个具有 GltG 蛋

白的结构域。共有 44 个磷酸化修饰位点, 包括 28 个丝氨酸修饰位点 (S), 8 个苏氨酸修饰位点 (T), 8 个酪氨酸修饰位点 (Y), 无 N-糖基化 (N) 修饰位点 (图 1)。

2.2 *NIGPI* 蛋白的序列比对及进化关系

将 *NIGPI* 的 BLAST 比对结果通过 MEGA X 软件采用 Neighbor-Joining 法构建系统进化树, 结果显示 *NIGPI* 与灰飞虱的亲缘关系最为接近, 在 NJ 树上聚为一支, 其核心结构域在不同昆虫中是高度保守的 (图 2)。说明 *NIGPI* 在不同昆虫中其核心功能可能是类似的, 且 *NIGPI* 存在重

```

1 ATGAAGGCTGTCGCCGCCCTGGCTTTTTCTACGCTGTGATCCAGCTGTACAGCTGCTGCA
1 M K A V A A L G F F Y A V I Q L S A A A
61 TGCTGTCCACCACCAAGCTGTGCCCATCATGTAGCCAGCCCCACAGCCAATCTACATC
21 C C P P P S C A P S C S P A P Q P I Y I
121 TCGGCTCCAGCTCCAGCTCCAGTCTGCTCTGCTCCAGCCCCACAGCCAATCTACATCTCT
41 S A P A P A P V C S A P A P Q P I Y I S
181 GCCCAGCTCCAGCTCCAGTCTGCTCTGCCCAGCTCCACAGCCAATCTACATCTCTGCC
61 A P A P A P V C S A P A P Q P I Y I S A
241 CCAGCTCCAGCTCCAGTCTGCTCTGCCCAGCCCCACAGCCAATCTACATCTCCGCCCA
81 P A P A P V C S A P A P Q P I Y I S A P
301 TCTTGCTCTCCAGCCCCAGCCCCATCTGCTCTGCCCAGCCCCACAGCCAATCTACATC
101 S C S P A P A P S C S A P A P Q P I Y I
361 TCTGCTCCAGCTCCAGTCTGCTCTGCTCCAGCTCCAGCTCCAGCCGAGACTGTGGCTCC
121 S A P A P A C S A P A P A P A A D C G S
421 AACAACCAGGTTGAGACCATCTACTTCACCGAGGAGTGCACCCACGCACCCGTCCTGTG
141 N N Q V E T I Y F T E E C T P R T R P L
481 GAGATCGACATCCAGGAGTTCGGAACCCGCCAACCATCACCACCTGCGGACCACACCCA
161 E I D I Q E F G T R P T I T T C G P H P
541 CCACCAATCCAGTTCGAGACTGTCCACAGTACTCCGCTCCAGTGTCTTCTACTCTGCT
181 P P I Q F E T V P Q Y S A P A A S Y S A
601 CCAGCTGCCTCCTACTCTGCTCCAGCCAGTCTACACCTACTTCCCATCTCCATCC
201 P A A S Y S A P A Q S Y T Y S S P S P S
661 TACTTACTCCTCTGCCTCCTCTTCTCCTGCTCTGCTCCATCCAGAAGATCGTGATC
221 Y S Y S S A S S S C S A P S Q K I V I
721 TCCGCTGGATCCAGCTGCTCTCCAGCTCCAGTCGCTCCATCCTGCTCCAGACCCCAATC
241 S A G S S C S P A P V A P S C S S T P I
781 TACATCTTCTCCTCCTCCCATGCTGCTGCTAA
261 Y I S S S S P C C C *
    
```

图 1 NIGPI 的 cDNA 序列及其编码氨基酸序列

Fig. 1 cDNA sequence of NIGPI and its coding amino acid sequence

图中左侧数字表示核苷酸及氨基酸的位置，图中加黑框字母表示预测的丝氨酸 (S)、苏氨酸 (T) 和酪氨酸 (Y) 磷酸化修饰位点，黑色下划线表示基因的保守结构域，*表示终止密码子。

The numbers on the left of the figure indicate the positions of nucleotides and amino acids. Black box letters in the figure indicate the predicted serine the predicted phosphorylation modification sites of serine (S), threonine (T), and tyrosine (Y). The black underline indicates the conserved domain of the gene, and * indicates the stop codon.

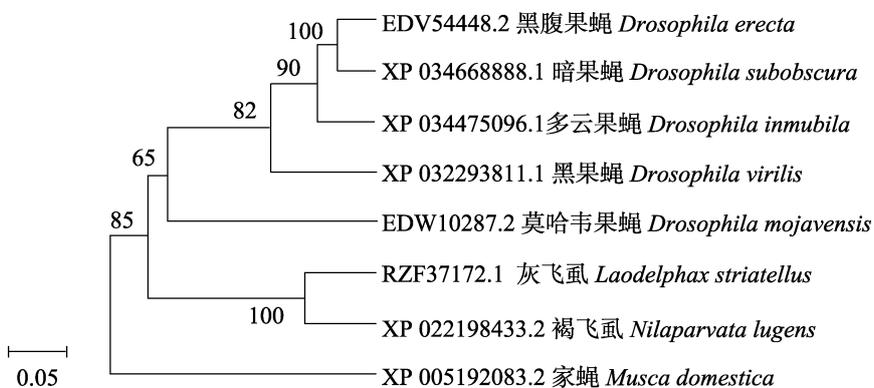


图 2 基于邻接法构建的褐飞虱和其他昆虫 NIGPI 系统发育树 (1 000 次重复)

Fig. 2 Phylogenetic tree of NIGPI in brown planthopper and other insects by Neighbor-Joining method (1 000 replicates)

要的生物学功能。

2.3 *NIGPI* 基因时空表达模式

通过 qRT-PCR 技术研究了 *NIGPI* 的时空表达模式, 结果表明: *NIGPI* 在卵期到初羽化阶段基本不表达, 羽化 1 d 后表达水平开始显著增加, 且羽化 1、2 和 3 d 的 *NIGPI* 基因表达水平存在

显著差异 ($P < 0.05$), 羽化后 3 d 基因表达水平达到最高, 后随着发育历期的延长 *NIGPI* 基因的表达水平显著下降, 但羽化 4 d 和 5 d 表达水平无显著性差异 ($P > 0.05$)。羽化 3 d 的褐飞虱不同组织中, 胸部、腹部、卵巢和肠道内 *NIGPI* 基因的表达水平无显著差异 ($P > 0.05$), 但均显著高于头部的表达 ($P < 0.05$) (图 3)。

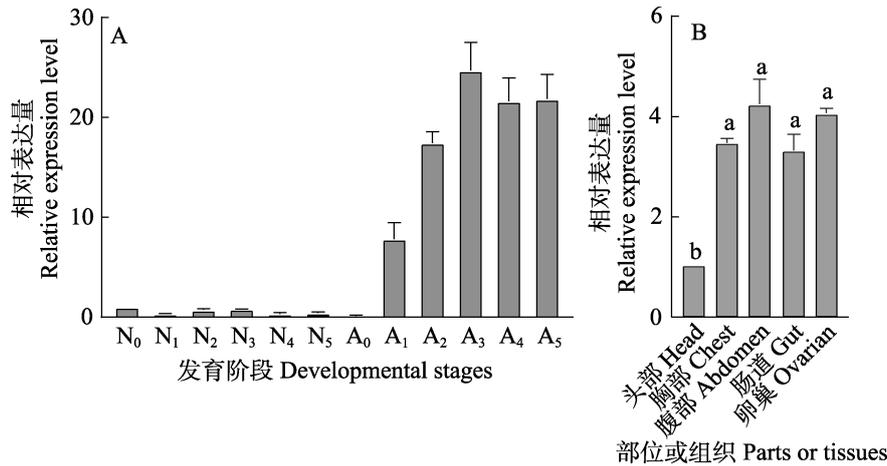


图 3 *NIGPI* 在褐飞虱不同发育历期及不同部位/组织间的相对表达量

Fig. 3 Relative expression of *NIGPI* in different developmental stages and parts/tissues of brown planthopper

A. 褐飞虱不同发育历期 *NIGPI* 表达水平; B. 褐飞虱不同部位/组织 *NIGPI* 表达水平。

A. Expression levels of *NIGPI* in different developmental periods of brown planthopper;

B. Expression levels of *NIGPI* in different parts/tissues of brown planthopper.

N₀: 褐飞虱卵期, N₁-N₅: 褐飞虱 1-5 龄若虫; A₀: 初羽化雌虫; A₁-A₅: 羽化后 1-5 d 的雌虫。褐飞虱不同部位/组织的基因表达水平中, 所收集样本为正常生长发育至羽化后 3 d 的雌虫组织。柱上标有不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$, 数据处理采用单因素方差分析的方式通过 DPS 7.05 软件进行)。

N₀: The egg stage of brown planthopper; N₁-N₅: The 1st to 5th instar nymphs; A₀: The beginning of eclosion; A₁-A₅: Females 1-5 d after eclosion. Among the gene expression levels of different parts/tissues of brown planthopper, the collected samples were female tissues from normal growth and development to 3 days after emergence. Histograms with the different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$, one-way ANOVA with DPS 7.05 software).

2.4 *NIGPI* 基因的干扰效率

褐飞虱体内 *NIGPI* 的干扰效率检测结果如图 4 所示, 处理后不同时间, 实验组与对照组 *NIGPI* 基因表达均存在极显著差异 ($P < 0.01$), 实验组 *NIGPI* 基因表达情况比对照组显著下降, 注射 24、48 和 72 h 后较对照组分别下降了 82.74%、78.14%和 68.60%。

2.5 RNA 干扰 *NIGPI* 对褐飞虱 YLS 释放及生长发育繁殖的影响

对于干扰 *NIGPI* 后 24、48 和 72 h 的褐飞虱血

淋巴中的 YLS 数量进行统计, 结果如图 5 所示。对照组中血淋巴内 YLS 数量随着处理时间的延长显著增加 ($P < 0.05$), 且注射后 72 h YLS 数量达到最高。而实验组中血淋巴内 YLS 数量显著低于对照组 ($P < 0.05$), 在注射 24、48 和 72 h 后, YLS 数量分别减少了 72.4%、68.2%和 72.3%。

对 RNA 干扰后褐飞虱存活率进行统计, 结果如图 6 所示。对照组的褐飞虱存活率下降斜率较小, 存活曲线趋势较为平缓, 注射后 16 日存活率为 0, 即样本全部死亡。实验组的褐飞虱存活率下降较快, 存活曲线趋势较陡, 且注射后

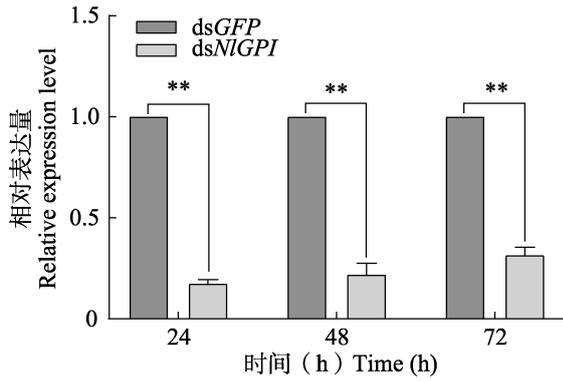


图 4 RNA 干扰后褐飞虱体内 *NIGPI* 基因的表达水平
Fig. 4 *NIGPI* gene expression in brown planthopper after RNA interference

**表示干扰后相同时间不同处理间存在显著性差异 ($P < 0.01$, 数据处理采用单因素方差分析的方式通过 DPS 7.05 软件进行)。

** indicates that there are significant differences among different treatments at the same time after interference ($P < 0.01$, one-way ANOVA with DPS 7.05 software).

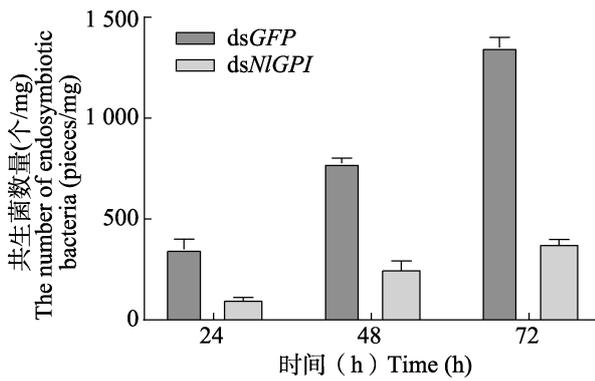


图 5 RNA 干扰后不同时期褐飞虱体内类酵母共生菌的数量

Fig. 5 YLS quantity of brown planthopper at different periods after RNA interference

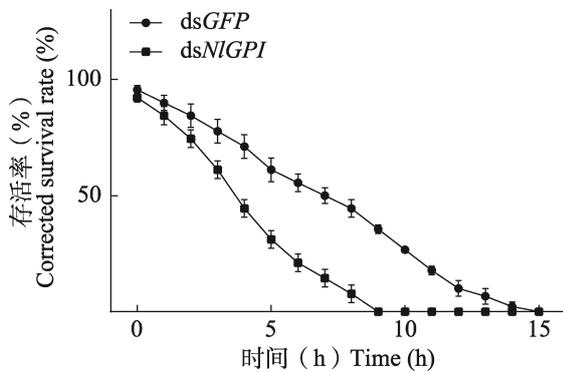


图 6 RNA 干扰后褐飞虱的存活率

Fig. 6 Growth and survival curve of brown planthopper after RNA interference

10 日样本全部死亡, 说明干扰 *NIGPI* 表达不利于褐飞虱的正常生长发育。

对 RNA 干扰后褐飞虱的产卵量及孵化情况进行统计, 结果如图 7 所示。对照组的褐飞虱产卵量最高为 300 颗, 最低为 80 颗, 未孵化的卵数量小于 18 颗, 平均孵化率大于 90%; 而处理组褐飞虱的产卵量最高为 56 颗, 未孵化的卵数量大于 15 颗, 平均孵化率小于 20%, 与对照组对比差异显著 ($P < 0.05$), 说明 RNA 干扰对褐飞虱的产卵及孵化等生理过程造成了较大的负向影响。

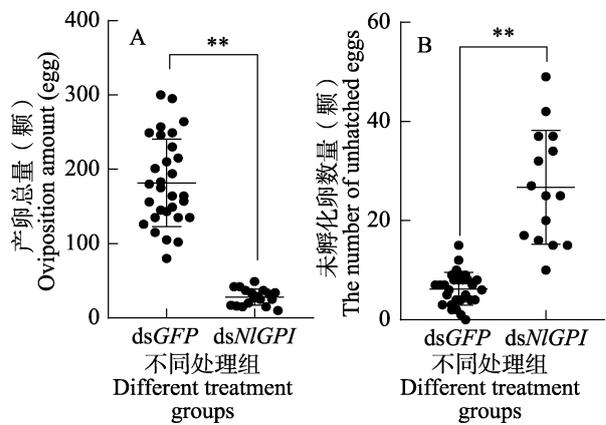


图 7 *NIGPI* RNA 干扰对褐飞虱产卵量和孵化率的影响

Fig. 7 Effects of *NIGPI* RNA interference on eggs and hatching rate of brown planthopper

A. RNA 干扰后褐飞虱产卵量; B. RNA 干扰后未孵化卵数量。误差区间以平均值±标准差显示, **代表显著性差异 ($P < 0.01$, 数据处理采用单因素方差分析的方式通过 DPS 7.05 软件进行)。

A. Total number of egg after RNA interference; B. Number of unhatched eggs after RNA interference. Error intervals are shown as mean \pm standard deviation, and ** represents significant differences ($P < 0.01$, one-way ANOVA with DPS 7.05 software).

3 讨论

褐飞虱脂肪体和肠道内存在大量共生菌, 这些共生菌与褐飞虱相互依存相互影响, 作为褐飞虱腹部脂肪体内主要的共生菌 YLS, 目前已有很多研究报道。然而 YLS 在褐飞虱体内垂直传递过程的具体机制尚不明确, 哪些基因参与垂直传递过程及关键基因在垂直传递中所发挥的作用

均未明确。在前期研究中我们探明了 YLS 在血淋巴中的动态分布, 表明初羽化及羽化后 72 h 分别是 YLS 开始释放到血淋巴和大量释放的时间点, 因此我们选取这两个时间点对褐飞虱脂肪体转录组分析并得到了差异基因。本研究进一步对褐飞虱体内 YLS 释放过程中的差异基因 *NIGPI* 进行克隆和鉴定, 分析其序列特征和表达模式, 并初步解析了其在褐飞虱 YLS 释放过程中的功能以及对褐飞虱生长发育的影响。

本研究克隆所得 *NIGPI* 基因的 cDNA 序列与 GenBank 中登录号为 XM_022342741.2 的序列完全一致。*NIGPI* 基因的 ORF 包含 1 个具有 GltG 蛋白的结构域, 通过结构域功能分析我们初步推测 *NIGPI* 基因在褐飞虱体内具有结合作用。相关研究表明, GPI 锚定蛋白会在细胞质膜处通过结合形成一种特殊的脂筏结构域, 这种结构会参与质膜上的信号传导作用, 控制细胞信号事件并参与质膜的分选作用 (Lakhan *et al.*, 2009)。而在垂直传递过程中, YLS 首先聚集在合胞体当中, 随后向外迁移到合胞体封闭的细胞外层, 最终通过胞吐作用释放到血淋巴中 (Cheng and Hou, 2001), 这一过程也与细胞质膜结构息息相关, 因此 *NIGPI* 可能通过对质膜的调控从而影响 YLS 从脂肪体释放到血淋巴这一过程。

系统进化树结果表明, *NIGPI* 基因的核心结构域在不同昆虫中是高度保守的, 说明 *NIGPI* 在不同昆虫中其核心功能可能是类似的, 且 *NIGPI* 可能存在重要的生物学功能。而 *NIGPI* 与灰飞虱的亲缘关系最为接近, 在 NJ 树上聚为一支, 但对 *NIGPI* 在褐飞虱及灰飞虱体内的具体功能以及调控机制暂无相关研究报道, 本研究首次对 *NIGPI* 在褐飞虱体内的功能进行研究。

NIGPI 在褐飞虱体内的表达具有明显的时空特异性。*NIGPI* 的表达水平因褐飞虱发育阶段不同而呈现显著差异: *NIGPI* 在卵期至初羽化基本不表达, 羽化 24 h 后表达水平开始显著增加, 羽化后 72 h 基因表达水平达到最高, 后随着发育历期延长表达水平显著下降。前期对褐飞虱血淋巴内 YLS 数量的观察研究发现, 初羽雌虫血淋巴内 YLS 数量几乎为 0, 此时 *NIGPI* 基本不

表达; 羽化后 72 h 雌虫血淋巴内 YLS 数量达到最大, 此时 *NIGPI* 表达水平达到最高。由此推测 *NIGPI* 极可能在 YLS 的释放过程中发挥重要作用。而 *NIGPI* 在不同组织间也存在的特异性表达, 在头部的表达水平显著低于其他部位或组织, 具体原因还需要进一步研究。

本研究显示, YLS 的释放受 *NIGPI* 影响。通过抑制 *NIGPI* 的表达, 褐飞虱血淋巴内的 YLS 数量显著降低, 且存活率、产卵率及孵化率也显著降低。推断 *NIGPI* 沉默后, 血淋巴中的 YLS 数量显著下降, 也就是 YLS 从脂肪体释放到血淋巴的过程受到影响, 从而导致卵母细胞内的 YLS 数量减少, 造成褐飞虱产卵量以及孵化率显著降低。由于 YLS 释放至血淋巴这一过程受影响, 从而影响 YLS 在褐飞虱体内的垂直传递。褐飞虱生长发育过程中必要的生理过程受到影响, 因此褐飞虱无法正常生长发育, 出现死亡率上升的现象。因此初步推断, *NIGPI* 和 YLS 从脂肪体释放到血淋巴的过程紧密相关, 可能通过改变质膜的结构影响褐飞虱体内 YLS 释放至血淋巴这一胞吐过程, 并对褐飞虱的生长、发育及繁殖等生理过程造成影响。因此 *NIGPI* 可作为褐飞虱防控的潜在靶标, *NIGPI* 在褐飞虱 YLS 释放过程中的具体调控机制还需进一步深入研究。

参考文献 (References)

- Brown D, Wanek GL, 1992. Glycosyl-phosphatidylinositol-anchored membrane proteins. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 3(4): 895-906.
- Cheng DJ, Hou RF, 2001. Histological observations on transovarial transmission of a yeast-like symbiote in *Nilaparvata lugens* Stål (Homoptera, Delphacidae). *Tissue Cell*, 33(3): 273-279.
- Denny PW, Field MC, Smith DF, 2001. GPI-anchored proteins and glycoconjugates segregate into lipid rafts in kinetoplastida. *FEBS Lett.*, 491(1/2): 148-153.
- Ferguson MA, Homans SW, Dwek RA, Rademacher TW, 1988. Glycosyl-phosphatidylinositol moiety that anchors *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein to the membrane. *Science*, 239(4841): 753-759.
- Garner AE, Smith DA, Hooper NM, 2007. Sphingomyelin chain length influences the distribution of GPI-anchored proteins in rafts in supported lipid bilayers. *Mol. Membr. Biol.*, 24(3): 233-242.

- Horgan FG, Srinivasan TS, Naik BS, Ramal AF, Bernal CC, Almazan MLP, 2016. Effects of nitrogen on egg-laying inhibition and ovicidal response in planthopper-resistant rice varieties. *Crop Prot.*, 89: 223–230.
- Huang HJ, Liu CW, Zhou X, Zhang CX, Bao YY, 2017. A mitochondrial membrane protein is a target for rice ragged stunt virus in its insect vector. *Virus Res.*, 229: 48–56.
- Kinoshita T, Fujita M, 2016. Biosynthesis of GPI-anchored proteins: Special emphasis on GPI lipid remodeling. *J. Lipid Res.*, 57(1): 6–24.
- Klemm RW, 2021. Protein sorting: A new quality control pathway for GPI-anchored proteins. *Curr. Biol.*, 31(18): R1084–R1087.
- Kooyman DL, Byrne GW, Logan JS, 1998. Glycosyl phosphatidylinositol anchor. *Exp. Nephrol.*, 6(2): 148–151.
- Lakhan SE, Sabharanjak S, De A, 2009. Endocytosis of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *J. Biomed. Sci.*, 16: 93.
- Lebreton S, Zurzolo C, Paladino S, 2018. Organization of GPI-anchored proteins at the cell surface and its physiological relevance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 53(4): 403–419.
- Lu JF, Huang GY, 2006. Causes and control countermeasures of outbreak of brown planthopper in Zhejiang province. *Pesticide Science and Management*, 27(1): 42–43. [陆剑飞, 黄国洋, 2006. 浙江省褐飞虱暴发成灾的原因与治理对策. *农药科学与管理*, 27(1): 42–43.]
- Maeda Y, Kinoshita T, 2011. Structural remodeling, trafficking and functions of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *Prog. Lipid Res.*, 50(4): 411–424.
- Müller GA, 2018. The release of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins from the cell surface. *Arch. Biochem. Biophys.*, 656(15): 1–18.
- Reeves VL, Thomas CM, Smart EJ, 2012. Lipid rafts, caveolae and GPI-linked proteins. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 729(1): 3–13.
- Roller RF, Malik A, Carillo MA, Garg M, Rella A, Raulf MK, Lepenies B, Seeberger PH, Silva DV, 2020. Semisynthesis of functional glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *Angewandte Chemie International Edition*, 59(29): 12035–12040.
- Saha S, Anilkumar AA, Mayor S, 2016. GPI-anchored protein organization and dynamics at the cell surface. *J. Lipid Res.*, 57(2): 159–175.
- Sangiorgio V, Pitto M, Palestini P, Masserini M, 2004. GPI-anchored proteins and lipid rafts. *Ital. J. Biochem.*, 53(2): 98–111.
- Shentu XP, Li DT, Xu JF, She L, Yu XP, 2016. Effects of fungicides on the yeast-like symbiotes and their host, *Nilaparvata lugens* Stål (Hemiptera: Delphacidae). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 128: 16–21.
- Wan PJ, Tang YH, Yuan SY, He JC, Wang WX, Lai FX, Fu Q, 2017. Reference genes for quantitative real-time PCR analysis in symbiont *Entomomyces delphacidicola* of *Nilaparvata lugens* (Stål). *Sci. Rep.*, 7: 42206.
- Xu WY, Fang XD, Cao Q, Gao Q, Gao DM, Qiao JH, Zang Y, Xie L, Ding ZH, Yang YZ, Wang Y, Wang XB, 2022. A cytorhabdovirus-based expression vector in *Nilaparvata lugens*, *Laodelphax striatellus*, and *Sogatella furcifera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 140(2): 103703.
- Xue J, Bao YY, Li BL, Cheng YB, Peng ZY, Hang L, Xu HJ, Zhu ZR, Lou YG, Cheng JA, Zhang CX, 2010. Transcriptome analysis of the brown planthopper *Nilaparvata lugens*. *PLoS ONE*, 5(12): e14233.
- Xue J, Zhou X, Zhang CX, Yu LL, Fan HW, Wang Z, Xu HJ, Xi Y, Zhu ZR, Zhou WW, Pan PL, Li BL, Colbourne JK, Noda H, Suetsugu Y, Kobayashi T, Zheng Y, Liu SL, Zhang R, Liu Y, Luo YD, Fang DM, Chen Y, Zhan DL, Lv XD, Cai Y, Wang ZB, Huang HJ, Cheng RL, Zhang XC, Lou YH, Yu B, Zhuo JC, Ye YX, Zhang WQ, Shen ZC, Yang HM, Wang J, Wang J, Bao YY, Cheng JA, 2014. Genomes of the rice pest brown planthopper and its endosymbionts reveal complex complementary contributions for host adaptation. *Genome Biol.*, 15(12): 521.
- Xue J, Bao YY, Li BL, Cheng YB, Peng ZY, Liu H, Xu HJ, Zhu ZR, Lou YG, Cheng JA, Zhang CX, 2010. Transcriptome analysis of the brown planthopper *Nilaparvata lugens*. *PLoS ONE*, 5(12): e14233.
- Yukuhiro F, Miyoshi T, Noda H, 2014. Actin-mediated transovarial transmission of a yeastlike symbiont in the brown planthopper. *Journal of Insect Physiology*, 60(2): 111–117.