### 烟草甲 Lstoy 基因在复眼发育中的功能分析<sup>\*</sup>

许抗抗\*\* 乐芝君 张茂婷 杨文佳 李 灿\*\*\*

(贵阳学院生物与环境工程学院,贵州省高等学校外来入侵生物监测与防控重点实验室,贵阳 550005)

摘要【目的】复眼作为昆虫重要的光感受器官,在成虫定位导航中起着重要作用。Twin of eyeless (toy) 基因位于视网膜决定基因网络的顶端,是昆虫复眼发育中的"主控基因"。以世界性仓储害虫烟草甲 Lasioderma serricorne为对象,通过RNA干扰(RNA interference, RNAi)技术阐明Lstoy 基因在烟草甲 复眼发育过程中的作用。【方法】通过烟草甲转录组数据筛选获得Lstoy基因,克隆获得其开放阅读框序 列并进行生物学信息分析,利用 qPCR 技术检测 Lstoy 基因的时空表达模式,通过 RNAi抑制烟草甲 Lstoy 的表达,观察记录沉默目的基因后试虫的发育情况,并检测视网膜决定核蛋白基因和视蛋白基因的表达量 变化。【结果】烟草甲 Lstoy 基因(GenBank 登录号: PP796794.1)的开放阅读框序列长度为1380 bp, 编码 459 个氨基酸残基,具有 pax6 蛋白特有保守结构域。Lstoy 在烟草甲各发育阶段均有表达,在成虫期 和蛹期高表达; Lstoy 在 5 日龄蛹的复眼中表达量最高。Lstoy 基因的 RNAi 对蛹期 Lstoy 的表达抑制率为 54.73%-77.52%,注射 dsLstoy 的预蛹 45.56%无法完成蜕皮,复眼发育畸形而死亡; 42.22%虫体蜕皮延迟 2-3 d,复眼色素沉积缓慢,虫体形态较小而死亡; 8.89%虫体成功蜕皮至成虫,但鞘翅形成异常,头部黏 有部分旧表皮且复眼缩小而死亡。敲低烟草甲 Lstoy 表达后 5 个核蛋白基因(Lseya、Lsth、Lshth、Lsso 和 Lsey)和 2 个视蛋白基因(Lshw和 Lsuv)的表达量较对照下降 43.40%-96.94%。【结论】Lstoy 基因在 烟草甲蜕皮变态和复眼发育过程中发挥关键作用。

关键词 烟草甲;复眼;蜕皮变态;基因表达; RNA 干扰

# Functional analysis of the *Lstoy* gene in the development of the compound eyes of *Lasioderma serricorne*

XU Kang-Kang\*\* LE Zhi-Jun ZHANG Mao-Ting YANG Wen-Jia LI Can\*\*\*

(College of Biological and Environmental Engineering, Guiyang University, Key Laboratory of Surveillance and Management of Invasive Alien Species in Guizhou Education Department, Guiyang 550005, China)

**Abstract** [Aim] To clarify the role of *Lstoy* gene in the development of the compound eyes of *Lasioderma serricorne*, a global pest of stored foods. [Methods] The *toy* gene was obtained by screening *L. serricorne* transcriptome data, and the open reading frame (ORF) of *Lstoy* was cloned and analyzed using bioinformatics. The expression levels of *Lstoy* were detected in different developmental stages and tissues using quantitative real-time PCR (qPCR). RNAi was used to knockdown the expression of *Lstoy*, after which any subsequent developmental abnormalities, including changes in the expression levels of *retinal* determination nuclear, and visual, protein genes were observed and recorded. [Results] The ORF sequence of *Lstoy* (GenBank accession number: PP796794.1) is 1 380 bp in length, encodes 459 amino acids and has a conserved domain unique to the *pax6* gene. *Lstoy* was continuously expressed in all life stages tested, with highest expression in the adult and pupal stages. *Lstoy* had the highest expression level in the compound eyes of 5-day-old pupae. RNAi inhibited the expression of *Lstoy* in prepupae by 54.73%-77.52%. 45.56% of prepupae injected with ds*Lstoy* were unable to complete molt, resulting in malformed compound eye development and death. In 42.22% of prepupae, injection with ds*Lstoy* resulted in molt being delayed by about 2-3 d, slow pigment deposition in the compound eyes, small body size, and ultimately, death. Only 8.89% of prepupae injected with ds*Lstoy* successfully completed molt, but these had abnormal elytra, old epidermis partially adhered to their heads and shrunken compound eyes. All this group also ultimately died. Knock down of *Lstoy* significantly decreased the

<sup>\*</sup>资助项目 Supported projects:贵州省基础研究项目(黔科合基础-ZK[2023]一般 020);贵州省教育厅重点实验室(黔教技[2023]024 号);贵州省高层次创新型人才(筑科合同-GCC[2023]008);贵阳市高层次科技人才(筑科合同[2023]48-19号)

<sup>\*\*</sup>第一作者 First author, E-mail: kkxu1988@163.com

<sup>\*\*\*</sup>通讯作者 Corresponding author, E-mail: lican790108@163.com

收稿日期 Received: 2024-06-24; 接受日期 Accepted: 2024-12-02

expression of five nuclear protein genes (*Lseya*, *Lstsh*, *Lshth*, *Lsso*, and *Lsey*) and two visual protein genes (*Lslw* and *Lsuv*) by 43.40%-96.94% compared to the control. **[Conclusion]** The *Lstoy* gene plays a crucial role in the molting, metamorphosis, and compound eye development of *L. serricorne*.

Key words Lasioderma serricorne; compound eye; molting and metamorphosis; gene expression; RNA interference

复眼是昆虫重要的光感受器官,大部分昆虫 的成虫和不完全变态类昆虫的若虫具有复眼 (van der Kooi et al., 2021)。昆虫复眼由许多称 为"小眼"的基本结构单位组成,每个小眼都是 一个独立的感光单元,其结构包括角膜、晶锥细 胞、感杆束、初级色素细胞、次级色素细胞、视 小网膜细胞及基膜等 (Pichaud and Casares, 2022)。昆虫复眼主要用于求偶、寻找寄主植物、 有效定向和导航,以及探测光线来感知昼夜节律 等(Owens and Lewis, 2018; 文超等, 2020)。昆 虫复眼的发育由视网膜决定基因网络进行调控, 该网络由多个核蛋白基因 eyeless (ey)、twin of eyeless (toy), sine oculis (so), optix, eyes absent (eya), dachshund (dac), teashirt (tsh), homothorax( hth ), eyegone( eyg ), twin of eyegone (toe)和 Notch、Wnt、TGFβ 等信号通路组成 (Erclik et al., 2009; Kumar, 2009)。 toy 是脊椎动 物 Paired box protein 6 (Pax6) 的同源基因,是 昆虫复眼发育过程中的"主控基因",目前已成 功克隆了黑腹果蝇 Drosophila melanogaster (Quiring et al., 1994; Czerny et al., 1999)、西方 蜜蜂 Apis mellifera (Honeybee Genome Sequencing Consortium et al., 2006; Kaplan and Linial, 2006)、赤拟谷盗 Tribolium castaneum (Yang et al., 2009) 和丽蝇蛹集金小蜂 Nasonia vitripennis (Keller et al., 2010) 等昆虫的 toy 基 因。研究表明, toy 与位于 ey 增强子元件内的 Pax6 位点结合并调控 ey 基因的表达,从而共同 调控视网膜决定基因网络下游成员(Steinmetz et al., 2018)。在赤拟谷盗中, RNAi 共沉默 toy、 ey 和 dac 的表达会明显减少试虫的小眼数量甚 至导致复眼消失,抑制复眼的正常发育(Yang et al., 2009)。利用果蝇转基因体系表达泡角跳虫 Ceratophysella denticulata 和白符跳虫 Folsomia candida 的 CdPax6 和 FcPax6 蛋白,均能诱导果 蝇在翅、腿和平衡棒等部位出现异位眼(Hou et al., 2016 )。eyg 基因通过激活果蝇眼成虫盘蛋

白 Upd 和细胞周期蛋白 Cyclin D 联级反应,来 调控复眼成虫盘细胞的增殖,过表达 eyg 蛋白可 促进复眼细胞增殖从而使其增大(Jang et al., 2003; Dominguez et al., 2004)。so 和 eya 基因 均能调节复眼感光细胞轴突投射,例如突变 so 基因后果蝇的感光细胞轴突无法延伸,导致感光 细胞退化和视叶发育缺陷(Serikaku and O'Tousa, 1994)。可见, toy 与其他视网膜决定基因的共同 作用在昆虫复眼发育中至关重要。

烟草甲 Lasioderma serricorne 是一种世界性 分布的仓储害虫,以幼虫潜居烟草、粮食、茶叶、 干果和中药材等储藏物为害,在蛀食同时分泌粪 便,遗留下虫尸、排泄物以及脱落的碎屑,严重 影响储藏物的品质和产量(Mishra et al., 2016)。 烟草甲成虫白天藏于仓库的缝隙黑暗处,黄昏或 夜晚飞出活动,对特定的光源有趋光性,大多数 喜紫光不喜绿光 (Baliota et al., 2021)。昆虫的 趋光性是由其复眼光感受器作用产生的,如虫情 监测中使用的黑光灯诱集就是利用了昆虫复眼 紫外-蓝光感受器的生物学特性 ( 蒋月丽, 2014 )。 复眼作为昆虫重要的光感受器官,在成虫定位导 航和远距离迁徙中起着重要作用(Freas and Spetch, 2023 )。因此,本研究拟通过克隆获得烟 草甲视网膜决定通路基因 toy 的开放阅读框 (Open reading frame, ORF),采用实时定量 PCR (Quantitative real-time PCR, qPCR) 技术检测 toy 的时空表达模式,利用 RNAi 技术探究 toy 基因在烟草甲复眼发育中的功能,为将来开发基 于 toy 的仓储害虫光诱捕器提供理论依据。

#### 1 材料与方法

#### 1.1 供试昆虫

本研究所用烟草甲于 2010 年采自贵州省贵 阳市中药材当归 Angelica sinensis 仓库,在实验 室中以中药材当归为食料饲养。在温度为(28±1) ℃,相对湿度 70%±5 %的全黑暗人工气候箱 (Binder, KB240)中连续培养至用于实验。

#### 1.2 主要试剂

总 RNA 提取试剂 *TransZol Up*、PCR 扩增 2×EasyTaq<sup>®</sup> PCR SuperMix (+dye)、反转录试剂 盒 HiScript<sup>®</sup> III 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper)、qPCR 试剂盒 *PerfectStart*<sup>®</sup> Green qPCR SuperMix、感受态细胞 Trans 5α(北 京全式金生物技术有限公司); 胶回收试剂盒 HiPure Gel Pure DNA Mini Kit (Magen); 载体 pGEM-T Easy Vector (Promega); dsRNA 合成 试剂盒 TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit (Thermo Scientific)。

#### 1.3 总 RNA 提取及第一链 cDNA 合成

根据 TransZol Up 试剂盒说明书提取烟草甲 成虫总 RNA,利用 Nanodrop 2000 核酸浓度测定 仪(Thermo Scientific)和 1.0%浓度的琼脂糖凝 胶电泳(Bio-Rad)检测 RNA 的浓度和完整性, 随后按照反转录试剂盒说明书合成第一链 cDNA。

#### 1.4 Lstoy 基因的克隆

根据课题组构建的烟草甲转录组数据库中 获得的 toy 的 Unigene 序列,使用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性引物(表 1)用于开放阅读 框的扩增。PCR 反应按照 2×EasyTaq<sup>®</sup> PCR SuperMix(+dye)试剂盒说明书进行,使用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 扩增产物进行验证,按 照 HiPure Gel Pure DNA Mini Kit 说明书回收目 的条带,连接至 pGEM-T Easy 载体上,并转入 Trans 5α 感受态细胞,大规模培养后筛选出阳性克隆, 送至北京睿博兴科生物技术有限公司进行测序。

#### 1.5 序列分析

采用 BLAST 工具(http://www.ncbi.nlm.gov/ BLAST/)对推导的氨基酸进行同源性比对分析; 利用 SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/)预 测蛋白质的结构域;使用 Clustal X 进行多序列 的比对和编辑;利用 ProtParam (https://web. expasy.org/protparam/)和 NetNGlyc 1.0 server (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/)分析 编码蛋白质的理化性质和 N-糖基化位点。利用 MEGA 7.0 软件中的邻接法构建系统发育树,各 分支重复 1 000 次检验,数值代表 Bootstrap 估算 值(Kumar et al., 2016)。

#### 1.6 Lstoy 的时空表达特性分析

分别收集烟草甲预蛹、1-5 日龄蛹和 1-2 日 龄成虫,每组 30 头试虫,设 3 个生物学重复。 分别解剖蛹的中肠、头部、精巢、翅、表皮、卵 巢以及 2 日龄、5 日龄蛹的复眼,每个组织解剖 50 头试虫,设 3 个生物学重复。根据 1.3 方法分 别提取其总 RNA 并合成用于 qPCR 的第一链 cDNA。采用在线软件 Primer 3.0 (https:// primer3.ut.ee/)设计 qPCR 引物(表 1)。qPCR 反应体系:qPCR SuperMix 10  $\mu$ L、cDNA 模板 1  $\mu$ L、 上下游引物各 1  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu$ L。反应程序: 94 ℃预变性 3 min; 94 ℃变性 30 s, 57 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 30 s, 共 40 个循环。每样品设 3 个技术重复。以烟草甲 *EF1a* 为内参基因,*Lstoy* 的相对表达量采用 2<sup>-△△Ct</sup>法进行分析(Livak and Schmittgen, 2001)。

#### 1.7 基于 RNAi 的 Lstoy 的生物学功能分析

根据绿色荧光蛋白 GFP 和烟草甲 Lstoy 基因 的 cDNA 序列,设计 dsRNA 合成引物 (表1), 并按照 TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit 说明书合成 dsRNA。选取发育状态一致的预 蛹,在试虫背部第2和第3节之间用显微注射仪 (WPI, Nanoliter2010) 注射 200 ng dsLstov, 以 注射等量的 dsGFP 为对照,将 dsRNA 注射后的 试虫置于培养皿中,转移至人工气候箱中培养并 观察记录个体发育情况,平行设置两组试验。第 1 组用于测定 dsLstoy 注射对靶标基因、视网膜 决定核蛋白基因(Lsey、Lstsh、Lsoptix、Lsso、 Lseva、Lsdac、Lshth 和 Lsevg )和视蛋白基因(Lslw 和Lsuv)表达的影响。分别收集 dsLstoy 和 dsGFP 注射后 1、2 和 3 d 存活的烟草甲, 按 1.5 方法检 测各时间点 Lstoy 和 dsRNA 注射 3 d 后复眼发育 相关基因的表达量,每处理设3个生物学重复, 每重复 30 头试虫。第 2 组用于检测 RNAi 沉默 Lstoy 后烟草甲的存活率, dsRNA 注射后 15 d 内 统计试虫的死亡数,观察每组试虫的表型变化, 并记录出现畸形、死亡等发育异常的试虫数,每 处理设3个生物学重复,每重复40头试虫。

GGATAACGGTGGGATGAGCT

ACCAAGCACGTCTCAGACTC

CCTGGCTTCCGGTAAACCTA

CGGACGCAATTAGAGGAAGC GGACTCTCCGCTTCCTTCTT

GGTTCAGGCGATACAAGTGC AGTCCGCATTACTCCTGGTG

GTCTTGAAGTGCGTCTGGTG

CGGAGGATATTTGTGGCTGC

TGCGAGACTCTGGAGGAAAG

TCTCCGCTTCCTGATAGTGC

TCTGAATCCTGCTGCACTCA

TTGGGTCAACATGTGCTGAG

CCAAATCCTTGCGAACACCA

GCGATGGTGCTGTATCTGTC

GGGCTTTCTCTATCGGTTGG

CCCGACAATGAACCAGTACG

GCATCTCCACGGATTTCACT

AAGGCAAGACGCTTATCGAA

表 1 本研究所用引物 Table 1 Primers used in this study				
用途	引物	引物序列(5'-3')	产物长度(bp)	用途
Purpose	Primers	Primer sequence $(5'-3')$	Product size (bp)	Purpose
ORF 扩增	Lstoy-F	ATGCCGCACAAAGAGGAAGA	1 364	ORF 扩增 ORF amplification
ORF amplification	Lstoy-R	CAGTAATTCGACGCCAGATT		
dsRNA 合成	dsLstoy-F	T7-CTATAAATCGAGTGTTGCGG	423	dsRNA 合成 dsRNA synthesis
dsRNA synthesis	dsLstoy-R	T7-TTTTTCAGCGAGCCTTTCC		
	dsGFP-F	T7-CAGTTCTTGTTGAATTAGATG	371	
	dsGFP-R	<u>T7-</u> AATGTTACCATCTTCTTTAA		
qPCR 分析	q-Lstoy-F	CAAGAGAGAGTGTCCGTCGA	213	qPCR 分析 qPCR analysis
qPCR analysis	q-Lstoy-R	TCAAGAGAGAGTGTCCGTCG		
	q- <i>Lsso</i> -F	GAAATCCCGGAGCGTTTTGA	175	
	q-Lsso-R	CGAACCTTGTCCGTTGTCTT		
	q- <i>Lseya</i> -F	GATCCAGGACAGACACGACA	164	

161

167

203

151

250

157

223

197

213

T7 序列: taatacgactcactataggg。T7 sequence: taatacgactcactataggg.

#### 1.8 数据分析

采用 SPSS 26.0 软件中的单因素方差分析 (One-way ANOVA)中的最小显著差法(LSD) 分析 Lstoy 的时空表达特性;采用 Kaplan-Meier 分析 RNAi 影响烟草甲存活率的动态分析; RNAi 沉默效率、干扰 Lstoy 后烟草甲复眼发育相关基 因表达的差异显著性分析采用 Student's t-test 法。

q-Lseya-R

q-Lsey-F

q-Lsey-R

q-Lsdac-F

q-Lsdac-R

q-Lshth-F

q-Lshth-R

q-Lstsh-F

q-Lstsh-R

q-Lsoptix-F

q-Lsoptix-R

q-Lseyg-F

q-Lseyg-R

q-Lsuv-F

q-Lsuv-R

q-Lslw-F q-Lslw-R

q-LsEF1a-F

q-LsEF1a-R

#### 2 结果与分析

#### 2.1 烟草甲 Lstoy 基因的克隆与序列分析

利用 RT-PCR 扩增获得烟草甲 Lstov 基因

(GenBank 登录号: PP796794.1)的 ORF 序列 为1380 bp, 编码 459 个氨基酸残基, 预测分子 式为 C3995H6612N1380O1632S397, 理论蛋白分子量为 112.82 kD, 等电点为 4.95。Lstoy 编码的蛋白可 能存在 4 个 N-糖基化位点,分别为 N164、N222、 N231 和 N251。多序列比对结果显示, toy 编码 的蛋白均具有 pax6 特有的保守结构域: 配对结 构域(The paired domain, PD)和同源结构域(The home-domain, HD), 在C末端有初级保守区域 (图1)。

烟草甲 Lstoy 与赤拟谷盗(GenBank 登录号: EFA02830.2)、黑拟谷盗 Tribolium madens



图 1 烟草甲 Lstoy 与其他昆虫同源蛋白的氨基酸序列比较 Fig. 1 Comparison of amino acid sequences of Lstoy in Lasioderma serricorne and homologous proteins in other insects

Lstoy: 烟草甲 toy 蛋白 Lasioderma serricorne toy; Tctoy: 赤拟谷盗 toy 蛋白 Tribolium castaneum toy; Nvtoy: 丽蝇蛹集金小蜂 toy 蛋白 Nasonia vitripennis toy; Tcey: 赤拟谷盗 ey 蛋白, Tribolium castaneum ey; Bmey: 家蚕 ey

蛋白, Bombyx mori ey. 蓝色线: PD 结构域; 橙色线: HD 结构域; 绿色线: C 末端的初级保守区域;
橙色框: PD 中 ey 和 toy 特有的氨基酸位点; 黑色框: Undecapeptide 基序。

Blue line: The motif of PD; Orange line: The motif of HD; Green line: The conserved primary sequence conservation in C-terminus; Orange box: The aligned amino-acid sequences of PD; Black box: The undecapeptide motif.

(XP\_044254192.1)和大麦虫 Zophobas morio (XP\_063913275.1)的 toy 氨基酸序列一致性分 别为 93.30%、93.09%和 92.03%。系统发育分析 表明,烟草甲 toy 与鞘翅目昆虫 toy 聚为一支, 且与赤拟谷盗的 toy 亲缘关系最近(图 2),说明 昆虫 toy 基因在进化上保守性较强。

#### 2.2 烟草甲 Lstoy 的时空表达模式

qPCR 结果表明, Lstoy 在烟草甲所测试的预 蛹、蛹 1-5 d 和成虫 1-2 d 均有表达,且在 1 日 龄蛹中达到峰值,其表达量为 2 日龄蛹的 969.2

倍(图 3: A)。*Lstoy* 在烟草甲复眼、卵巢、精 巢、翅和头的表达显著高于肠道和表皮(P<0.01)。 其中,*Lstoy* 在 5 日龄蛹复眼和卵巢中的表达显 著高于其他 6 个组织(P<0.05),其表达量分别 是表皮的 543.3 和 245.6 倍(图 3: B)。

#### 2.3 烟草甲 Lstoy 的 RNAi

利用 RNAi 技术解析 Lstoy 在烟草甲蜕皮发 育中的功能, dsRNA 注射 1、3 和 5 d 后, Lstoy 的表达量分别下降了 63.54%、77.52%和 54.73% (图 4: A),表明该基因的表达被有效抑制。与









PP: 预蛹 Prepupae; P1-P5: 1-5 日龄蛹 1 day-old-5 day-old pupae; A1-A5: 1-2 日龄成虫 1 day-old-2 day-old adults; HD: 头 Head; MG: 中肠 Midgut; EP: 表皮 Epidermis; SP: 精巢 Sperm; OV: 卵巢 Ovary; WI: 翅 Wing; PD2-eye: 2 日龄蛹复眼 Compound eye of 2 day-old pupae; PD5-eye: 5 日龄蛹复眼 Compound eye of 5 day-old pupae. 柱上不同字母 表示不同发育阶段或蛹不同组织间的表达量差异显著 (*P* < 0.05, One-way ANOVA )。 Different letters above bars indicate significant difference in the gene expression level among different developmental stages or pupal tissues (*P* < 0.05, One-way ANOVA).



图 4 RNAi 沉默 Lstoy 对烟草甲复眼发育的影响 Fig. 4 Effects of Lstoy RNAi on the compound eye development of Lasioderma serricorne

A. Lstoy 干扰效率; B. 注射 dsRNA 后烟草甲的存活率; C. 注射 dsLstoy 后蜕皮失败的试虫表型;

D. 注射 dsLstoy 后化蛹及羽化试虫表型。\*\*\* 表示 dsGFP 组与 dsLstoy

组之间存在显著差异 (P < 0.001, Student's t 检验)。下图同。

A. Interference efficiency detection of *Lstoy*; B. The survival rates of *L. serricorne* after dsRNA injection; C. Representative phenotypes of the molting failure after *Lstoy* dsRNA injection; D. Representative phenotypes of the pupation and adult eclosion after *Lstoy* dsRNA injection. \*\*\* indicates significant difference between ds*GFP* group and ds*Lstoy* group (P < 0.001, Student's *t*-test). The same below.

对照 dsGFP 组相比, 注射 dsLstoy 后烟草甲出现 明显的致死表型, 15 d 后试虫的死亡率为 100% (图 4: B), 其中 45.56%无蜕皮现象发生、复 眼发育畸形而死亡(图 4: C); 42.22%虫体蜕皮 化蛹延迟 2-3 d, 蛹的复眼出现色素沉积缓慢, 形态较小而死亡; 其余注射 dsLstoy 的虫体成功 蜕皮至成虫, 但鞘翅无法完成后展和糅化, 头部 黏有部分表皮且复眼缩小而死亡(图 4: D)。

## 2.4 沉默 Lstoy 对烟草甲视网膜决定核蛋白和 视蛋白基因表达的影响

为进一步揭示 Lstoy 对烟草甲复眼发育的影

响,在干扰 Lstoy 基因后检测了复眼发育相关的 视网膜决定核蛋白基因和视蛋白基因的表达变 化。结果显示,注射 dsLstoy 后 3 d,烟草甲 5 个核蛋白基因(Lsey、Lstsh、Lsso、Lseya 和 Lshth) 和 2 个视蛋白基因(Lslw 和 Lsuv)的表达显著 降低(P<0.05),其表达量较对照组相比分别降 低了 80.59%、59.55%、54.29%、70.24%、43.40%、 96.94%和 95.72%,而 Lsdac 和 Lseyg 的表达量显 著高于对照组(P<0.05)(图 5),推测 Lstoy 可 能通过影响下游核蛋白基因和视蛋白基因的表 达进而参与烟草甲的复眼发育过程。





虚线表示 dsGFP 注射组。Dotted line indicates the dsGFP injection group.

### 3 结论与讨论

不同于脊椎动物仅有 1 个 Pax6 基因,大多数无脊椎动物有 2 个 Pax6 同源基因 toy 和 ey,并在眼的发育中起重要作用。本研究克隆获得了烟草甲 Lstoy 基因的开放阅读框序列,其编码蛋白的配对结构域(PD)决定了 DNA 的结合能力以及具有强大反转录活性的 C-末端保守序列(Hauck et al., 1999)。此外,在 PD 和 HD 两个区域间包含 toy 特有的保守序列,与其高度同源的 ey 具有差异(Yang et al., 2009)。同源性比对结合系统进化分析表明,烟草甲 Lstoy 与同为鞘翅目昆虫 toy 亲缘关系较近,暗示昆虫 toy 在进化上保守性较强。

昆虫 toy 基因具有时空表达特异性。如 toy 在果蝇胚胎期的大脑区和眼盘中高表达(Friedrich, 2006)。赤拟谷盗 toy 基因在成虫头部和复眼发 育过程中高表达,这可能与其复眼由嵌在末龄幼 虫和蛹头外侧上皮的原基组织形成有关(Yang et al., 2009)。本研究发现 Lstoy 在烟草甲 5 日龄蛹的 复眼中表达量最高,且在复眼形成的关键时期 2-5 日龄蛹中呈上升趋势,推测 Lstoy 在烟草甲 的复眼发育过程中发挥关键作用。此外,Lstoy 在烟草甲卵巢和精巢中表达量较高,暗示 Lstoy 也可能参与烟草甲的生殖发育。在果蝇和德国小 蠊 *Blattella germanica* 中, *eya* 基因在复眼形成和 雌虫卵巢发育中发挥作用(Bai and Montell, 2002; Ramos *et al.*, 2020)。

本研究利用 RNAi 沉默烟草甲 Lstoy 基因, 导致视网膜决定基因网络下游 5 个核蛋白基因 Lsey、Lstsh、Lsso、Lseya 和 Lshth 的表达受阻, 蛹的复眼发育出现停滞,存活的试虫复眼较对照 明显减小。虽然 toy 是视网膜决定网络中最上游 的调控因子,然而越来越多的研究表明 toy 与下 游基因协同作用参与昆虫的复眼形成过程。同时 敲除 ey 和 toy 基因会严重影响果蝇眼-触角盘衍 生的整体头部结构发育, 而过表达 Notch 通路或 tsh 基因仅能挽救触角和头部表皮的发育, 但无 法恢复复眼的正常形成 (Zhu et al., 2017)。单一 敲减赤拟谷盗 toy 的表达会导致其复眼的小眼间 距变宽且无法紧密排列,这与本研究中敲低 toy 的表达对烟草甲复眼发育的影响结果一致,同时 下调 toy、ey 和 dac 的表达对赤拟谷盗复眼的影 响最为显著,导致其出现小眼不正常发育甚至整 个复眼消失(Luan et al., 2014)。本研究发现降 低 Lstoy 的表达导致 Lsdac 的表达量显著上升, 推测 Lstoy 可能与 Lsdac 协同作用才能最大程度 地影响烟草甲的复眼形成。在地中海蟋蟀 Gryllus bimaculatus 中, 单独/共沉默 toy 或 ey 基因均无 法影响其复眼的形成 (Ohuchi et al., 2017), 这 可能与不完全变态类昆虫从胚胎期发育复眼直 至成虫期完全成熟的发育方式有关。综上,虽然 toy 在不同昆虫中发挥的功能和作用机制存在差 异,与视网膜决定网络中其他基因的协同作用也 大相径庭,但高度保守的 Pax6 同源基因仍然是 昆虫复眼发育的主控基因。此外, 敲低果蝇 Lstoy 的表达后2个下游视蛋白基因 Lslw 和 Lsuv 的表 达量显著下降,推测视蛋白基因可能参与果蝇长 日照下的昼夜节律调控(Allada and Chung, 2010); 在甜菜夜蛾 Spodoptera exigua 中, 视蛋 白基因 Seuv、Sebl 和 Selw 在白天的表达量均高 于夜晚,且在暗期快结束时快速回升(Liu et al., 2018), 本研究发现敲低 Lstoy 的表达导致烟草 甲视蛋白基因 Lslw 和 Lsuv 的表达量显著降低,

推测 Lstoy 可能通过影响烟草甲视蛋白基因的表达来影响其复眼对光信号的接收。

另一方面,本研究中沉默 Lstoy 基因导致烟 草甲部分试虫无法完成蜕皮形成蛹,而完成羽化 的成虫色素沉积异常, 鞘翅无法后展和完成鞣 化,出现头部黏有表皮无法蜕去的现象,dsLstoy 处理后烟草甲的死亡率达 100%。结合 Lstoy 在 翅中的特异性高表达,推测 Lstoy 可能参与烟草 甲蜕皮发育中鞘翅的形成。昆虫的鞘翅由外表皮 和内表皮构成, 鞘翅的形成过程也被称为"外骨 骼形成"或"外骨骼化",是多种生理生化过程 (如鞣制、硬化和色素沉淀)以及基因转录调控 (如角质层基因的表达上调)的作用结果, 使鞘 翅目昆虫的角质层变得更加厚实、坚硬,并有色 素沉积。利用 RNAi 沉默赤拟谷盗 tov 在内的多 个复眼发育基因后,成虫和蛹的复眼出现缺失现 象,并引起 286 个基因的表达显著下调, GO 富 集分析发现上述基因大多富集在角质层结构成 分、几丁质代谢过程和几丁质结合;进一步对角 质层结构基因 TcasCPR15 和 TcasCp63 经 RNAi 处理引起大量的幼虫和蛹死亡(Chen et al., 2023 )。综上, toy 基因在昆虫蜕皮发育过程中具 有重要的调控作用,但具体机制有待进一步解析。

#### 参考文献 (References)

- Allada R, Chung BY, 2010. Circadian organization of behavior and physiology in *Drosophila*. Annual Review of Physiology, 72: 605–624.
- Bai JW, Montell D, 2002. Eyes absent, a key repressor of polar cell fate during *Drosophila* oogenesis. *Development*, 129(23): 5377–5388.
- Baliota GV, Athanassiou CG, Cohnstaedt LW, 2021. Response of phosphine-resistant and susceptible *Lasioderma serricorne* adults to different light spectra. *Journal of Stored Products Research*, 92: 101808.
- Chen Q, Sasikala-Appukuttan AK, Husain Z, Shrivastava A, Spain M, Sendler ED, Daines B, Fischer S, Chen R, Cook TA, Friedrich M, 2023. Global gene expression analysis reveals complex cuticle organization of the *Tribolium* compound eye. *Genome Biology and Evolution*, 15(1): evac181.
- Czerny T, Halder G, Kloter U, Souabni A, Gehring WJ, Busslinger M, 1999. *twin of eyeless*, a second *Pax-6* gene of *Drosophila*,

acts upstream of eyeless in the control of eye development. *Molecular Cell*, 3(3): 297–307.

- Dominguez M, Ferres-Marco D, Gutierrez-Aviño FJ, Speicher SA, Beneyto M, 2004. Growth and specification of the eye are controlled independently by *Eyegone* and *Eyeless* in *Drosophila melanogaster*. *Nature Genetics*, 36(1): 31–39.
- Erclik T, Hartenstein V, McInnes RR, Lipshitz HD, 2009. Eye evolution at high resolution: The neuron as a unit of homology. *Developmental Biology*, 332(1): 70–79.
- Freas CA, Spetch ML, 2023. Varieties of visual navigation in insects. *Animal Cognition*, 26(1): 319–342.
- Friedrich M, 2006. Continuity versus split and reconstitution: Exploring the molecular developmental corollaries of insect eye primordium evolution. *Developmental Biology*, 299(2): 310–329.
- Hauck B, Gehring WJ, Walldorf U, 1999. Functional analysis of an eye specific enhancer of the *eyeless* gene in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(2): 564–569.
- Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*, 443(7114): 931–949.
- Hou YN, Li S, Luan YX, 2016. *Pax6* in Collembola: Adaptive evolution of eye regression. *Scientific Reports*, 6(2016): 20800.
- Jang CC, Chao JL, Jones N, Yao LC, Bessarab DA, Kuo YM, Jun S, Desplan C, Beckendorf SK, Sun YH, 2003. Two *Pax* genes, eye gone and eyeless, act cooperatively in promoting *Drosophila* eye development. *Development*, 130(13): 2939–2951.
- Jiang YL, 2014. Sensitivity and behavioral response mechanism of Anomala corpulenta Motschulsky to light signal. Doctor dissertation. Yangling: Northwest A&F University. [蒋月丽, 2014. 铜绿丽金龟对光信号的感受和行为响应机制研究. 博 士学位论文. 杨凌: 西北农林科技大学.]
- Kaplan N, Linial M, 2006. ProtoBee: Hierarchical classification and annotation of the honey bee proteome. *Genome Research*, 16(11): 1431–1438.
- Keller RG, Desplan C, Rosenberg MI, 2010. Identification and characterization of *Nasonia Pax* genes. *Insect Molecular Biology*, 19(Suppl. 1): 109–120.
- Kumar JP, 2009. The molecular circuitry governing retinal determination. *Biochimica et Biophysica Acta-Gene Regulatory Mechanisms*, 1789(4): 306–314.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K, 2016. Mega 7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology* and Evolution, 33(7): 1870–1874.
- Liu YJ, Yan S, Shen ZJ, Li Z, Zhang XF, Liu XM, Zhang QW, Liu

XX, 2018. The expression of three *opsin* genes and phototactic behavior of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae): Evidence for visual function of opsin in phototaxis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 96: 27–35.

- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCT</sup> method. *Method*, 25(4): 402–408.
- Luan Q, Chen Q, Friedrich M, 2014. The *Pax6* genes eyeless and twin of eyeless are required for global patterning of the ocular segment in the *Tribolium* embryo. *Developmental Biology*, 394(2): 367–381.
- Mishra PR, Patra R, Mohapatra RN, 2016. Influence of environmental factors on the growth and development of tobacco beetle, *Lasioderma serricorne* (Fab.) in storage. *Journal of Entomological Research*, 40(1): 53.
- Ohuchi H, Bando T, Mito T, Noji S, 2017. Eye development and photoreception of a hemimetabolous insect, *Gryllus bimaculatus*. *The Cricket as a Model Organism*, 4: 49–62.
- Owens ACS, Lewis SM, 2018. The impact of artificial light at night on nocturnal insects: A review and synthesis. *Ecology and Evolution*, 8(22): 11337–11358.
- Pichaud F, Casares F, 2022. Shaping an optical dome: The size and shape of the insect compound eye. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 130: 37–44.
- Quiring R, Walldorf U, Kloter U, Gehring WJ, 1994. Homology of the *eyeless* gene of *Drosophila* to the Small eye gene in mice and Aniridia in humans. *Science*, 265(5173): 785–789.
- Ramos S, Chelemen F, Pagone V, Elshaer N, Irles P, Piulachs MD,

2020. Eyes absent in the cockroach panoistic ovaries regulates proliferation and differentiation through ecdysone signalling. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 123:103407.

- Serikaku MA, O'Tousa JE, 1994. Sine oculis is a homeobox gene required for Drosophila visual system development. Genetics, 138(4): 1137–1150.
- Steinmetz EL, Dewald DN, Walldorf U, 2018. Homeodomaininteracting protein kinase phosphorylates the *Drosophila* paired box protein 6 (Pax6) homologues twin of eyeless and eyeless. *Insect Molecular Biology*, 27(2): 198–211.
- van der Kooi CJ, Stavenga DG, Arikawa K, Belušič G, Kelber A, 2021. Evolution of insect color vision: From spectral sensitivity to visual ecology. *Annual Review of Entomology*, 66: 435–461.
- Wen C, Ma T, Wang C, Liang SP, Zhu Y, Wen JB, Wen XJ, 2020. The role of visual signals in insect detection of plant hosts. *Journal of Environmental Entomology*, 42(3): 607–614. [文超, 马涛, 王偲, 梁仕萍, 朱映, 温俊宝, 温秀军, 2020. 视觉信号 在昆虫检测植物寄主中的作用. 环境昆虫学报, 42(3): 607–614.]
- Yang XY, Weber M, ZarinKamar N, Posnien N, Friedrich F, Wigand B, Beutel R, Damen WGM, Bucher G, Klingler M, Friedrich M, 2009. Probing the *Drosophila* retinal determination gene network in *Tribolium* (II): The *Pax6* genes eyeless and twin of eyeless. *Developmental Biology*, 333(1): 215–227.
- Zhu JJ, Palliyil S, Ran C, Kumar JP, 2017. Drosophila Pax6 promotes development of the entire eye-antennal disc, thereby ensuring proper adult head formation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 114(23): 5846–5853.