烟草甲 *Lstoy* 基因在复眼发育中的功能分析*

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 1 380 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 ds*Lstoy* 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*、*Lstsh*、*Lshth*、*Lsso* 和 *Lsey*）和 2 个视蛋白基因（*Lslw* 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

*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）

**第一作者 First author，E-mail：kkxu1988@163.com

***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® PCR SuperMix（+dye）、反转录试剂盒 HiScript® Ⅲ 1st Strand cDNA Synthesis Kit（+gDNA wiper）、qPCR 试剂盒 *PerfectStart*® 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® 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 μL、cDNA 模板 1 μL、上下游引物各 1 μL、ddH_2O 7 μL。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 *EF1α* 为内参基因，*Lstoy* 的相对表达量采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 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 ds*Lstoy*，以注射等量的 ds*GFP* 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 ds*Lstoy* 注射对靶标基因、视网膜决定核蛋白基因（*Lsey*、*Lstsh*、*Lsoptix*、*Lsso*、*Lseya*、*Lsdac*、*Lshth* 和 *Lseyg*）和视蛋白基因（*Lslw* 和 *Lsuv*）表达的影响。分别收集 ds*Lstoy* 和 ds*GFP* 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。

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

用途 Purpose	引物 Primers	引物序列（5′-3′） Primer sequence (5′-3′)	产物长度（bp） Product size (bp)	用途 Purpose
ORF 扩增 ORF amplification	*Lstoy*-F	ATGCCGCACAAAGAGGAAGA	1 364	ORF 扩增 ORF amplification
	Lstoy-R	CAGTAATTCGACGCCAGATT		
dsRNA 合成 dsRNA synthesis	ds*Lstoy*-F	T7-CTATAAATCGAGTGTTGCGG	423	dsRNA 合成 dsRNA synthesis
	ds*Lstoy*-R	T7-TTTTTTCAGCGAGCCTTTCC		
	ds*GFP*-F	T7-CAGTTCTTGTTGAATTAGATG	371	
	ds*GFP*-R	T7-AATGTTACCATCTTCTTTAA		
qPCR 分析 qPCR analysis	q-*Lstoy*-F	CAAGAGAGAGTGTCCGTCGA	213	qPCR 分析 qPCR analysis
	q-*Lstoy*-R	TCAAGAGAGAGTGTCCGTCG		
	q-*Lsso*-F	GAAATCCCGGAGCGTTTTGA	175	
	q-*Lsso*-R	CGAACCTTGTCCGTTGTCTT		
	q-*Lseya*-F	GATCCAGGACAGACACGACA	164	
	q-*Lseya*-R	GGATAACGGTGGGATGAGCT		
	q-*Lsey*-F	ACCAAGCACGTCTCAGACTC	161	
	q-*Lsey*-R	CCTGGCTTCCGGTAAACCTA		
	q-*Lsdac*-F	CGGACGCAATTAGAGGAAGC	167	
	q-*Lsdac*-R	GGACTCTCCGCTTCCTTCTT		
	q-*Lshth*-F	GGTTCAGGCGATACAAGTGC	203	
	q-*Lshth*-R	AGTCCGCATTACTCCTGGTG		
	q-*Lstsh*-F	GTCTTGAAGTGCGTCTGGTG	151	
	q-*Lstsh*-R	CGGAGGATATTTGTGGCTGC		
	q-*Lsoptix*-F	TGCGAGACTCTGGAGGAAAG	250	
	q-*Lsoptix*-R	TCTCCGCTTCCTGATAGTGC		
	q-*Lseyg*-F	TCTGAATCCTGCTGCACTCA	157	
	q-*Lseyg*-R	TTGGGTCAACATGTGCTGAG		
	q-*Lsuv*-F	CCAAATCCTTGCGAACACCA	223	
	q-*Lsuv*-R	GCGATGGTGCTGTATCTGTC		
	q-*Lslw*-F	GGGCTTTCTCTATCGGTTGG	197	
	q-*Lslw*-R	CCCGACAATGAACCAGTACG		
	q-*LsEF1α*-F	GCATCTCCACGGATTTCACT	213	
	q-*LsEF1α*-R	AAGGCAAGACGCTTATCGAA		

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。

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 *Lstoy* 基因（GenBank 登录号：PP796794.1）的 ORF 序列为 1 380 bp，编码 459 个氨基酸残基，预测分子式为 $C_{3995}H_{6612}N_{1380}O_{1632}S_{397}$，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*

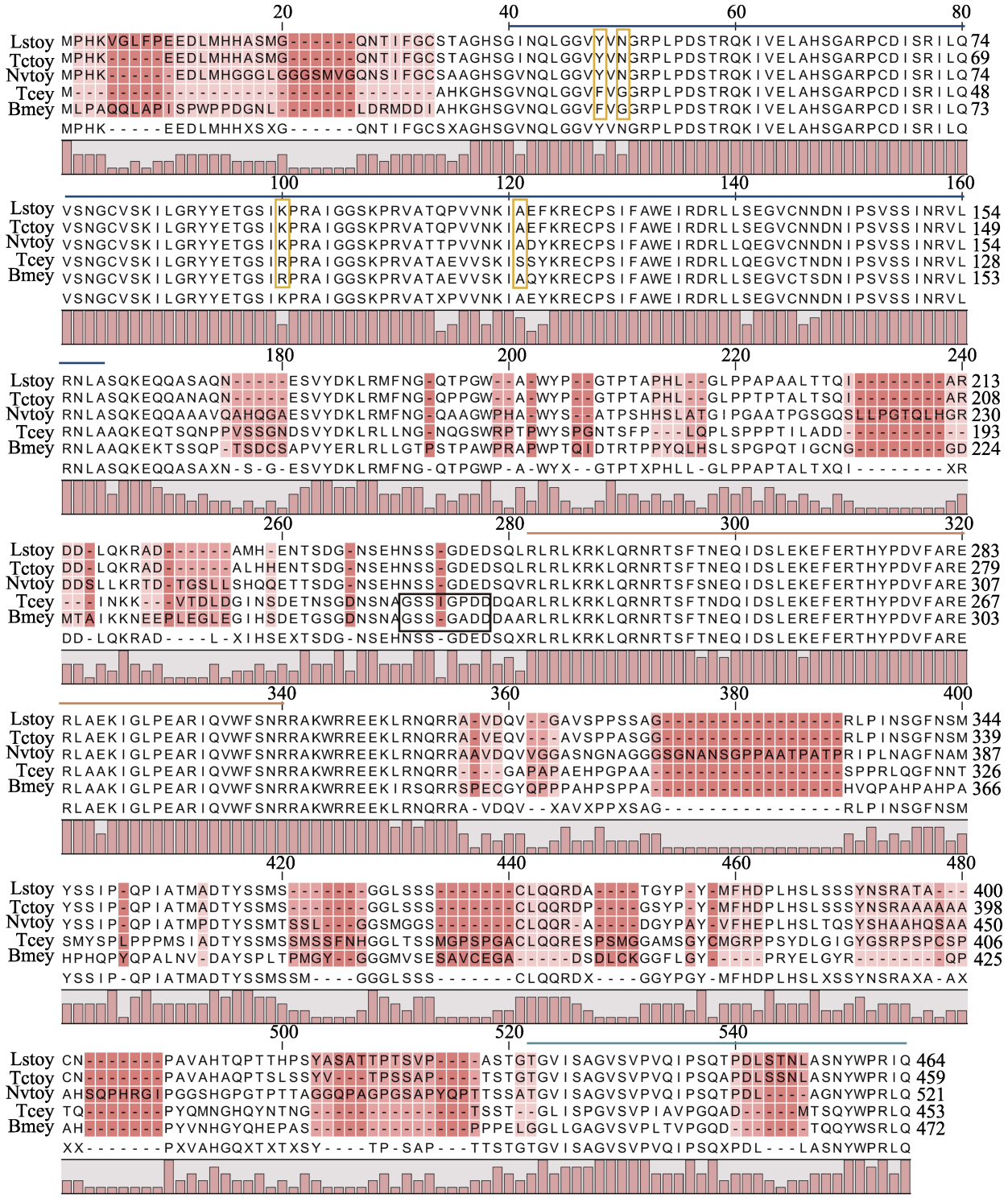

图 1　烟草甲 Lstoy 与其他昆虫同源蛋白的氨基酸序列比较

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

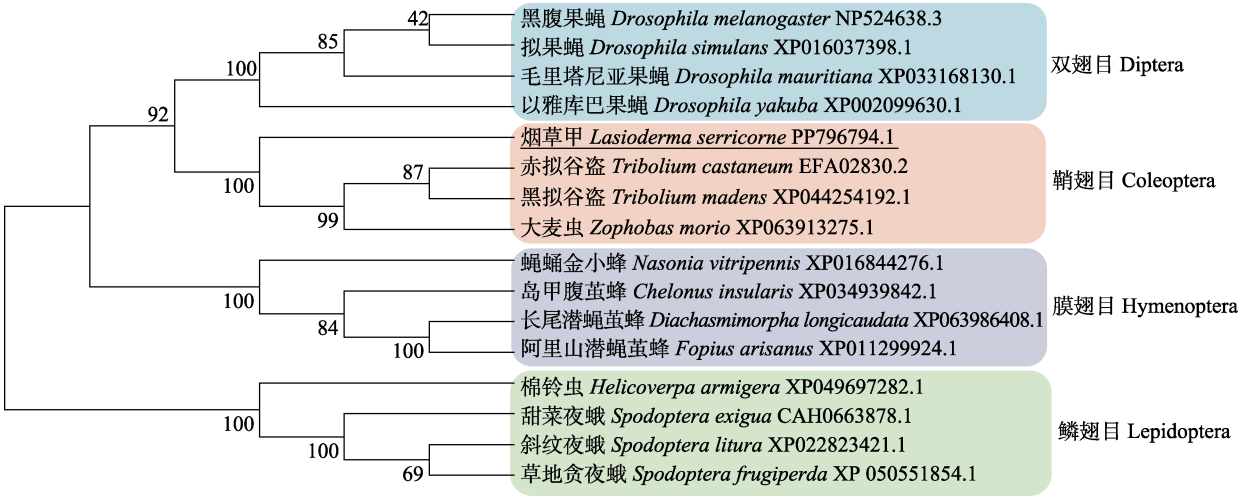

图 2　昆虫 *toy* 基因的系统发育分析

Fig. 2　Phylogenetic analysis of insect *toy* gene

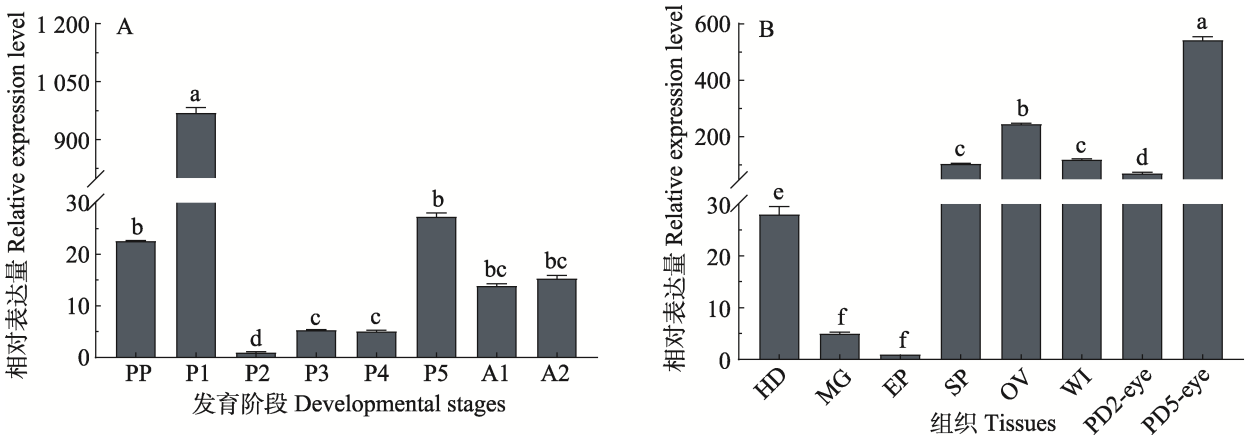

图 3　烟草甲 *Lstoy* 在不同发育阶段（A）和蛹组织（B）中的相对表达量

Fig. 3　Relative expression levels of *Lstoy* in different developmental stages (A) and pupal tissues (B) of *Lasioderma serricorne*

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).

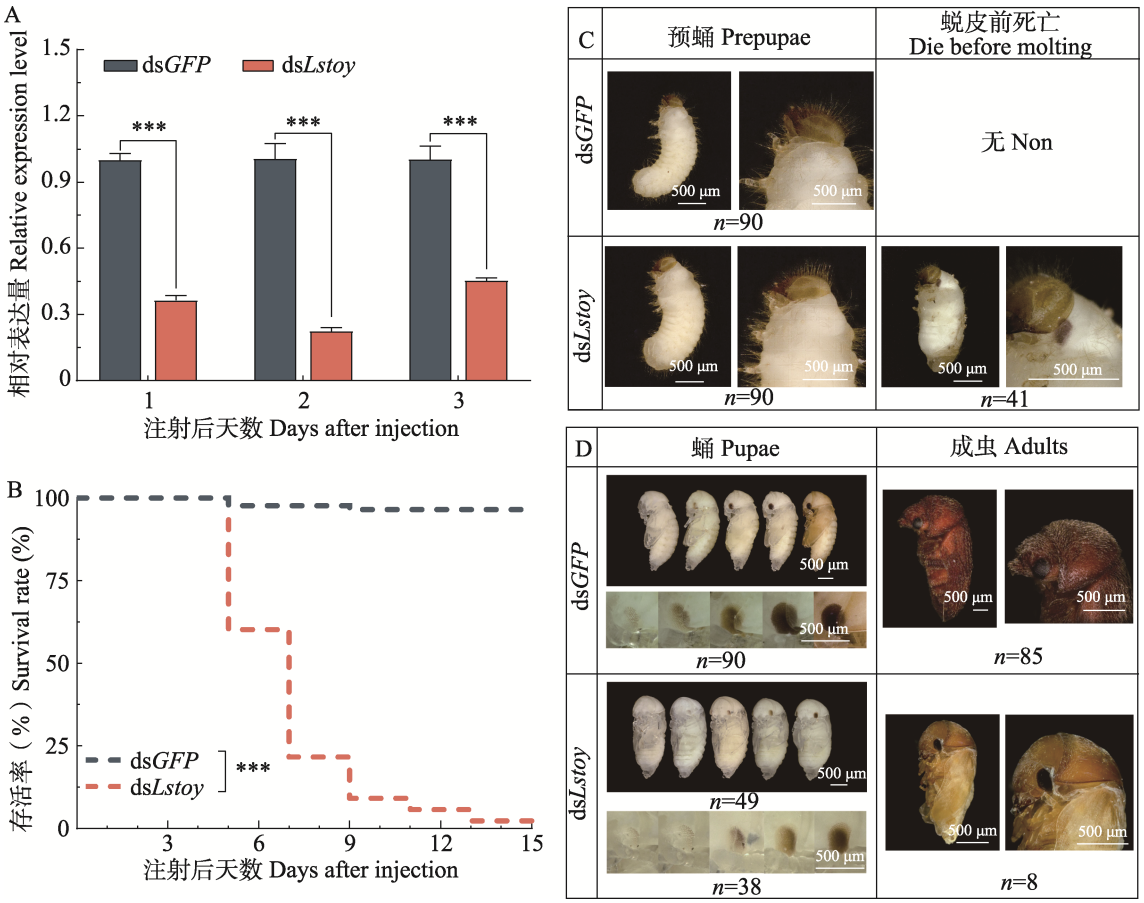

图 4　RNAi 沉默 *Lstoy* 对烟草甲复眼发育的影响

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 ds*Lstoy* 后蜕皮失败的试虫表型；D. 注射 ds*Lstoy* 后化蛹及羽化试虫表型。*** 表示 ds*GFP* 组与 ds*Lstoy* 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 ds*GFP* 组相比，注射 ds*Lstoy* 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 ds*Lstoy* 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 ds*Lstoy* 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。

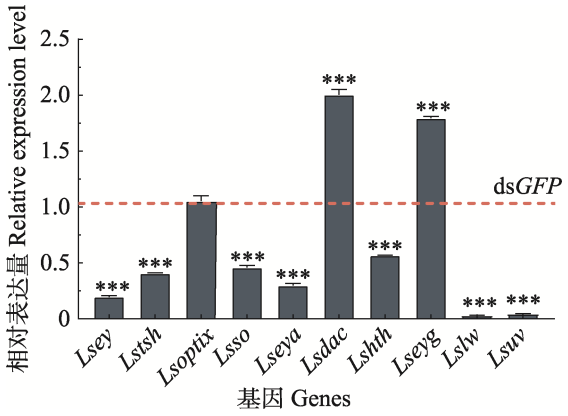

图 5　RNAi 沉默 *Lstoy* 对烟草甲复眼发育相关基因表达的影响

Fig. 5　Effects of RNAi silencing *Lstoy* on the expression of compound eye development-related genes in *Lasioderma serricorne*

虚线表示 ds*GFP* 注射组。Dotted line indicates the ds*GFP* 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，ds*Lstoy* 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 *toy* 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 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 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. Homeodomain-interacting 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.