

飞蝗 *Knickkopf* 家族基因表达对蜕皮激素的响应*

张睿^{1,2**} 赵小明¹ 刘晓健¹ 张学尧¹ 张建珍^{1***}

(1. 山西大学应用生物研究所, 太原 030006; 2. 山西大同大学生命科学学院, 大同 037009)

摘要 【目的】研究飞蝗 *Locusta migratoria* *Knickkopf* (*Knk*) 家族基因 mRNA 表达对蜕皮激素 (20-hydroxyecdysone, 20E) 的响应情况, 丰富飞蝗 *Knk* 家族基因功能研究, 为飞蝗表皮发育相关基因的转录调控研究奠定基础。【方法】采用 RT-qPCR 方法, 对 *LmKnk* 家族 4 个基因在飞蝗不同发育天数 (5 龄若虫第 1 天到成虫第 3 天) 的表皮中的表达特性进行分析; 向飞蝗体腔注射 20E, 分析 *LmKnk* 家族 4 个基因表达的变化情况; 采用 RNAi 技术干扰 20E 受体基因 *LmEcR*, 分析 *LmKnk* 家族基因的表达变化情况。【结果】通过 RT-qPCR 检测, 发现 *LmKnk* 在飞蝗 5 龄第 1 天至成虫第 3 天不同发育天数的表皮中均表达, 而 *LmKnk2*, *LmKnk3-FL* 及 *LmKnk3-5'* 基因均在蜕皮前表达量逐渐升高, 蜕皮后迅速降低。向飞蝗体腔注射 20E 后, 发现飞蝗 *Knickkopf* 家族 4 个基因对 20E 均有应答, 但响应时间点有差异, *LmKnk* 和 *LmKnk2* 的表达量分别在注射 20E 3 h 和 6 h 后开始升高, 而 *LmKnk3-FL* 和 *LmKnk3-5'* 的表达量在注射 20E 12 h 后开始上升。飞蝗 5 龄第 1 天若虫注射 ds*LmEcR* 后, 发现 *Knickkopf* 家族 4 个基因表达均下调。【结论】飞蝗 *Knickkopf* 家族基因的表达受 20E 调控, 是 20E 的下游应答基因。

关键词 飞蝗; *Knickkopf*; 蜕皮激素; RNA 干扰

The transcriptional response of *Knickkopf* family genes to 20-hydroxyecdysone in *Locusta migratoria*

ZHANG Rui^{1,2**} ZHAO Xiao-Ming¹ LIU Xiao-Jian¹
ZHANG Xue-Yao¹ ZHANG Jian-Zhen^{1***}

(1. Institute of Applied Biology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China;

2. College of Life Science, Shanxi Datong University, Datong 037009, China)

Abstract 【Objectives】To investigate the transcriptional response of *Knickkopf* family genes to 20-hydroxyecdysone in *Locusta migratoria* in order to advance research on the function of *LmKnk* family genes, and lay a foundation for further research on the regulation of the transcription of genes involved in cuticle development in *L. migratoria*. 【Methods】RT-qPCR was used to analyze the expression characteristics of four *LmKnk* genes in the integument of *L. migratoria* from 1-day-old fifth-instar nymphs to 3-days-old adults. 20E was then injected into nymphs to analyze the expression of *LmKnk* family genes and RNAi was used to suppress the expression of the 20E receptor gene *LmEcR* and thereby detect transcriptional changes in *LmKnk* family genes. 【Results】RT-qPCR revealed that *LmKnk* was evenly distributed in the integument of 1-day-old fifth-instar nymphs to 3-days-old adults, and that the expression of *LmKnk2*, *LmKnk3-FL* and *LmKnk3-5'* all gradually increased before molting but decreased rapidly after molting. Each of the *LmKnk* family genes responded to 20E at a different time point. Expression of *LmKnk* and *LmKnk2* rapidly increased 3 and 6 hours after 20E injection, respectively, whereas expression of *LmKnk3-FL* and *LmKnk3-5'* was upregulated 12 hours after 20E injection. ds*LmEcR* injection reduced transcription of all four *LmKnk* family genes in 1-day-old fifth-instar nymphs. 【Conclusion】*LmKnk* family genes are downstream genes that can be regulated by 20E in *L. migratoria*.

Key words *Locusta migratoria*; *Knickkopf*; 20-hydroxyecdysone; RNAi

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金项目 (31730074)

**第一作者 First author, E-mail: ruiz0106@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: zjz@sxu.edu.cn

收稿日期 Received: 2021-06-30; 接受日期 Accepted: 2022-02-23

昆虫蜕皮和变态受到体内蜕皮激素 (20-hydroxyecdysone, 20E) 和保幼激素 (Juvenile hormone, JH) 协同调控 (Riddiford *et al.*, 2001)。在完全变态昆虫黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 中已证实蜕皮过程是由 20E、蜕皮激素受体 (EcR) 及超气门蛋白 (Ultraspiracle, USP) 启动的 (King-Jones and Thummel, 2005)。20E 和 EcR/USP 形成复合物后启动一系列早期转录因子 *E74*、*E75* 等的表达 (Yao *et al.*, 1993), 这些转录因子又调控大量次级响应因子如 *βFTZ-F1*, *DHR3* 和 *DHR39* 的表达, 最终启动一些直接参与蜕皮和变态的基因的表达, 如几丁质合成与降解、新表皮黑化及硬化等 (Thummel, 2002)。

在昆虫蜕皮及变态等生命活动中, 旧表皮降解与新表皮合成周期性发生。几丁质是昆虫表皮组成成分之一, 在昆虫蜕皮过程中不断进行降解、合成及组装。几丁质的有序排列组装对昆虫层状表皮的形成至关重要 (Merzendorfer and Zimoch, 2003)。目前, 在果蝇、云杉卷叶蛾 *Choristoneura fumiferana*、甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*、飞蝗 *Locusta migratoria*、甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae* 及烟草甲 *Lasioderma serricorne* 等多种昆虫中已报道 20E 对几丁质代谢相关基因的调控作用 (Gagou *et al.*, 2002; Zheng *et al.*, 2003; 唐斌, 2008; Li *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2018)。而 20E 对昆虫表皮几丁质排列关键基因调控的研究仅在几丁质脱乙酰基酶基因 CDAs 中有报道。如在药材甲 *Stegobium paniceum* 中, 20E 处理幼虫 4 h 和 8 h 后, *SpCDA1* 的表达与对照组相比显著增加 (Yang *et al.*, 2018)。在家蚕 *Bombyx mori* 中, 20E 处理 24 h 后 *BmCDA1*, *BmCDA2*, *BmCDA3*, *BmCDA4*, *BmCDA5* 和 *BmCDA6* 的表达与对照组相比显著升高 (Zhang *et al.*, 2019)。在黄野螟 *Heortia vitessoides* 中 20E 处理 8 h 后 *HvCDA1* 表达与对照组相比显著升高 (Wang *et al.*, 2019)。

Knickkopf (*Knk*) 是一个家族基因, 有 *Knk*, *Knk2* 和 *Knk3* 3 种类型 (Chaudhari *et al.*, 2014)。*Knk* 参与昆虫表皮几丁质排列 (Schwarz and

Moussian, 2007), 有关 *Knk* 家族基因功能的研究仅在果蝇、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 和飞蝗中有报道。在果蝇中, *DmKnk* 缺失导致果蝇气管和表皮几丁质层状结构无法正常形成 (Moussian *et al.*, 2006)。*TcKnk* 参与赤拟谷盗新表皮几丁质片层结构的形成, 同时负责保护新表皮不被几丁质酶降解 (Chaudhari *et al.*, 2011), 且 *TcKnk* 家族基因在赤拟谷盗表皮形成中出现了功能分化 (Chaudhari *et al.*, 2014)。作者课题组前期以飞蝗 *L. migratoria* 为实验材料, 证明飞蝗 *LmKnk* 家族基因包含 4 个成员, 分别为 *LmKnk*、*LmKnk2*、*LmKnk3-FL* 和 *LmKnk3-5'*。采用 RNAi 的方法, 对其功能进行了初步探讨, 发现 *LmKnk* 和 *LmKnk3-5'* 参与飞蝗表皮形成 (于荣荣, 2017; Zhang *et al.*, 2020)。然而, 在昆虫蜕皮发育中 20E 信号是否参与 *Knk* 家族基因的表达调控及调控机制如何尚无报道。本文在课题组前期研究基础上, 进一步研究 *LmKnk* 家族基因在飞蝗生长发育过程中对蜕皮激素信号 20E 的应答情况, 以期对飞蝗表皮几丁质排列组装相关基因的转录调控机制研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

将订购自河北沧州的飞蝗卵置于人工气候培养箱 (33 °C, 35% RH, 每日光照时长 14 h) 中孵育, 1 龄若虫孵出后移至纱网笼 (35 cm × 35 cm × 35 cm) 中, 置于人工气候培养室 (30 °C, 35% RH, 每日光照时长 14 h) 饲养。1-2 龄若虫饲喂小麦苗, 3 龄若虫后, 加喂麦麸。

1.2 供试试剂

LmKnk、*LmKnk2*、*LmKnk3-FL*、*LmKnk3-5'*、*LmEcR* 和 *GFP* 全长质粒均为本实验室保存。RNAisoTMPlus、RNase Inhibitor、Reverse Transcriptase M-MLV (TaKaRa); SYBR[®]Green Real-time PCR Master Mix (TOYOBO); 2×Tag PCR Master Mix (北京天根); E.Z.N.A.[®]Gel Extraction Kit (Omega); T7 RiboMAXTM Express RNAi System (Promega); 20E (Sigma)。

1.3 引物设计与合成

LmKnk、*LmKnk2*、*LmKnk3-FL*、*LmKnk3-5'*、*LmEcR* 和 β -*actin* 6 个基因的特异性表达引物及 *LmEcR*、*GFP* 特异双链 RNA 引物使用本实验室前期研究设计序列(刘晓健,2013;于荣荣,2017; Zhang *et al.*, 2020), 引物送公司(上海生工)合成。详见表 1。

1.4 飞蝗 *Knickkopf* 家族基因不同发育期的表达特性

挑选发育正常、健康的飞蝗 5 龄第 1 天至第 7 天若虫(N5D1-N5D7)及第 1 天至第 3 天成虫(AD1-AD3), 快速解剖取体壁(去掉上面的马氏管和脂肪体), 置于液氮中备用。首先按照 RNAisoTMPlus 说明书方法抽提 RNA, 然后参照 TaKaRa 反转录试剂说明书操作步骤取 2 μ g 总 RNA 合成 cDNA。使用 RT-qPCR 方法以上述 cDNA(1:5 稀释)为模板, 检测飞蝗 *Knickkopf* 家族 4 个基因在飞蝗 N5D1-AD3 的表达特性。反应体系: 5 μ L cDNA, 10 μ L SYBR[®] Green

Real-time PCR Master Mix, 3.4 μ L ddH₂O, 10 μ mol·L⁻¹ 上下游引物各 0.8 μ L。采用 ABI 7300 型实时定量 PCR 仪检测, 扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 15 s (预变性), 94 $^{\circ}$ C 15 s (变性), 60 $^{\circ}$ C 31 s (退火延伸), 40 个循环。 β -*actin* (KX276642) 为内参基因。各发育天数设置 5 个生物学重复, 每个生物学重复设 2 个技术重复。

1.5 20E 诱导表达分析

挑选 6 h 内蜕皮进入 5 龄的飞蝗若虫, 放于同一笼中饲养。挑选其中发育正常、健康的飞蝗 N5D1 若虫进行 20E 注射, 此时飞蝗体内 20E 滴度最低(李大琪, 2016)。称取 20E 固体粉末后, 加入适量 10%乙醇溶液, 充分溶解, 配成 2.0 μ g/ μ L 的 20E 溶液。20E (处理组) 和 10%乙醇 (对照组) 各注射 150 头, 5 μ L/头。注射结束后, 将两个注射组若虫分别置于两个 45 cm $\times$ 45 cm $\times$ 45 cm 的纱笼中饲养, 饲喂新鲜的小麦苗和适量麦麸。

取注射 20E 后 1、3、6、9、12、24 和 48 h 的飞蝗若虫第 2-3 腹节处体壁(去掉附着于体壁

表 1 本文所用引物信息
Table 1 Primers information involved in this paper

用途 Application	基因 Genes	引物序列 (5'-3') Sequence of primers (5'-3')	产物大小 (bp) Product size (bp)
基因表达 RT-qPCR analysis	<i>LmKnk</i>	F: CGAGATAGAAGACTGGATGATGATT R: TGGTGGGTAATAGCTGTCTACAATA	198
	<i>LmKnk2</i>	F: TTGAGATTAGTGTGCGATGATGG R: GGGTGTAACACTGATAGTAAACCAGG	94
	<i>LmKnk3-FL</i>	F: CCGAAGTCCCTCTGGTACTG R: TAACGTTTGTGCCCCGCTTTT	151
	<i>LmKnk3-5'</i>	F: CAGTACGATCTGCAACAGCT R: GTTCTGCTCCGTGTCGTAAG	192
	β - <i>actin</i>	F: CGAAGCACAGTCAAAGAGAGGTA R: GCTTCAGTCAAGAGAACAGGATG	156
	<i>LmEcR</i>	F: GACAAACTGCTACGGGAAGA R: CTATCGTTTCTCCCATACCAG	172
双链 RNA 合成 dsRNA synthesis	ds <i>LmEcR</i>	F: taatacgactcactatagggGCAGCAACGCCGACCCT R: taatacgactcactatagggGCACTGGTACACGGCATT	408
	ds <i>GFP</i>	F: taatacgactcactatagggGTGGAGAGGGTGAAGG R: taatacgactcactatagggGGGCAGATTGTGTGGAC	571

上的马氏管和脂肪体), 冷冻保存于液氮中, 每个取样时间点设 6 个生物学重复(每个重复 3 头试虫)。按照 1.4 中描述的方法抽提总 RNA, 反转录为 cDNA 后, RT-qPCR 检测飞蝗 *Knickkopf* 家族基因在 20E 处理组和 10%乙醇对照组中的相对表达差异, 每个样品设 2 个技术重复。

1.6 干扰飞蝗 20E 核受体(*LmEcR*)后 *Knickkopf* 家族基因的表达

为了进一步检测飞蝗 *Knickkopf* 家族基因响应 20E 诱导表达的情况, 本研究采用 RNAi 法, 合成并向飞蝗体内注射 20E 受体基因 *LmEcR* 双链 RNA (ds*LmEcR*), ds*GFP* 作为对照。检测 *LmEcR* 表达降低后, 20E 信号传递受阻情况下, *Knickkopf* 家族基因的 mRNA 表达情况。

1.6.1 dsRNA 的体外合成及注射 以 *GFP*、*LmEcR* 基因全长质粒为模板, 结合表 1 中的双链引物, 根据 2×Taq PCR Master Mix 说明书合成制备 ds*GFP*、ds*LmEcR* 所需模板。产物按照 Gel Extraction Kit 操作步骤回收后, 参照 T7 RiboMAXTM Express RNAi System 试剂盒说明书体外合成 ds*GFP* 和 ds*LmEcR*, 用 NanoDrop 2000 将其定量为 2.5 μg/μL, 储存于 -80 °C 冰箱中备用。

挑选生长发育健康正常的飞蝗 N5D1 若虫用于 dsRNA 注射实验。dsRNA 注射剂量为 4 μL/头, 共计 10 μg。ds*GFP*、ds*LmEcR* 每组各注射 60 头若虫。注射完成后将不同 dsRNA 注射组飞蝗分别放在不同的 40 cm × 40 cm × 40 cm 的笼子中, 置于人工气候室中饲养。

1.6.2 注射 ds*LmEcR* 后飞蝗 *Knickkopf* 家族各基因表达 上述试虫待其生长发育至 N5D5、N5D6 和 N5D7 时, 从各笼中分别挑选 15 头飞蝗若虫, 随机平均分成 5 个生物学重复, 解剖取若虫第 2-3 腹节处体壁, 依据 1.4 中所述方法提取总 RNA, 合成 cDNA 后, RT-qPCR 检测注射 ds*LmEcR* 或 ds*GFP* 后, 飞蝗 *Knickkopf* 家族基因及 *LmEcR* 的 mRNA 相对表达情况。

1.7 数据统计分析

应用 SPSS 16.0 软件中单因素方差分析

(ANOVA) 中的 Tukey's HSD test ($P < 0.05$) 对 *Knickkopf* 家族基因在飞蝗 5 龄若虫及成虫期的 mRNA 相对表达进行差异显著分析。

在 20E 或 ds*LmEcR* 处理后 *Knickkopf* 家族基因及 *LmEcR* 表达的数据分析中, 将其中数值最小的样品相对表达量定为 1, 结果用相对表达倍数来表示。差异分析采用 Student's *t*-test 方法。

2 结果与分析

2.1 飞蝗 *Knickkopf* 家族基因在飞蝗不同发育时期表达特性分析

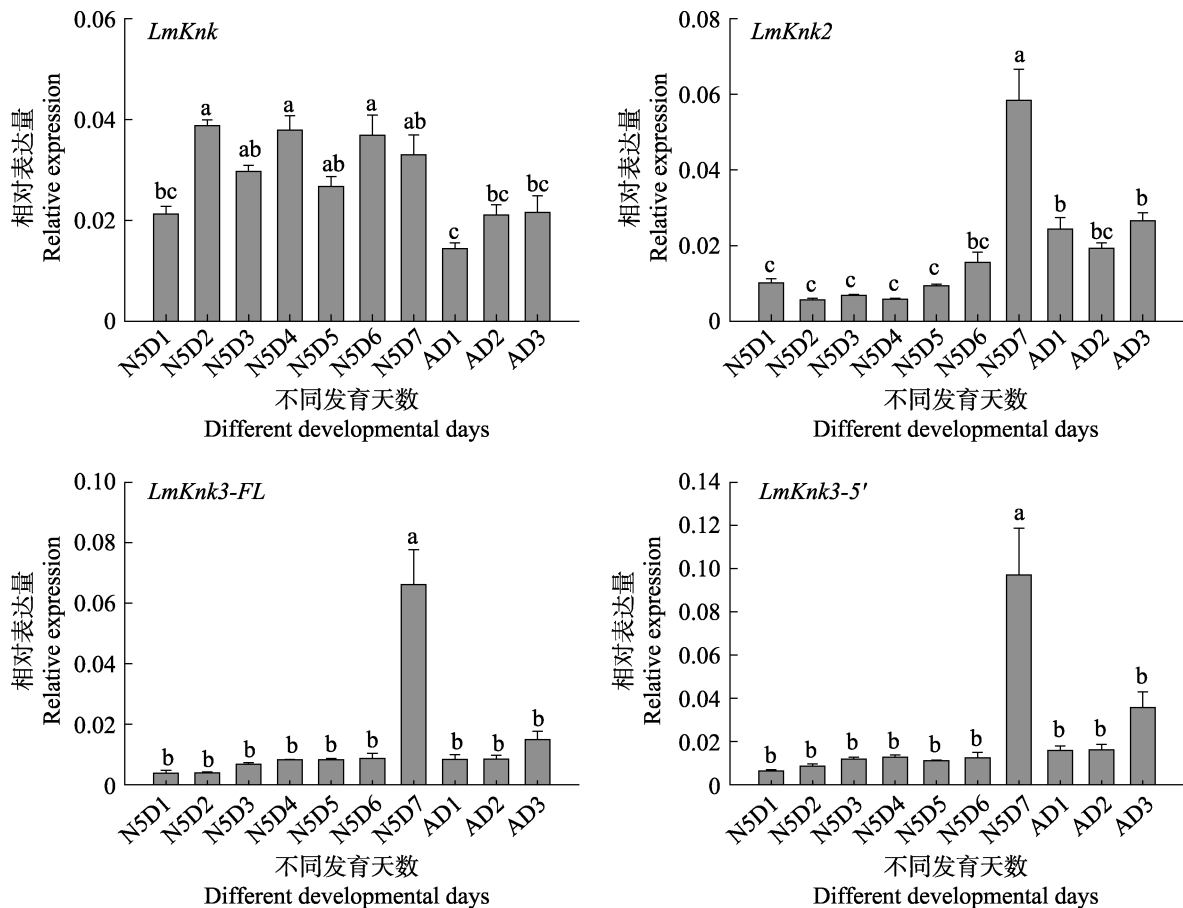
飞蝗 *Knickkopf* 家族基因在飞蝗 5 龄第 1 天至成虫第 3 天试虫的体壁组织的 RT-qPCR 检测结果如图 1 所示, *LmKnk* 在 5 龄期不同发育天数和成虫期不同发育天数均衡表达。 *LmKnk2*, *LmKnk3-FL* 及 *LmKnk3-5'* 3 个基因表达趋势相似, N5D1-N5D6 表达较低, 有逐渐增加的趋势, N5D7 表达达到最高, 且与前 6 d 的表达差异显著 ($P < 0.05$), 之后, 至成虫期 AD1-AD3, 表达又显著降低 ($P < 0.05$)。即蜕皮前表达量逐渐升高, 蜕皮后又迅速降低。

2.2 体内注射 20E 对飞蝗 *Knickkopf* 家族基因表达的影响

为验证飞蝗 *Knickkopf* 家族基因表达是否受 20E 调控, 向飞蝗体腔注射 20E, 在不同时间点取飞蝗体壁组织, 分析 *LmKnk* 家族 4 个基因在其中的表达变化情况。结果如图 2 所示, 20E 注射 3、6 和 9 h 后, *LmKnk* 的相对表达量与对照组相比显著提高 ($P < 0.01$); 20E 注射 6、9 和 24 h 后, *LmKnk2* 的相对表达量显著高于对照组 ($P < 0.05$); 20E 注射 12 h 和 24 h 后, *LmKnk3-FL* 和 *LmKnk3-5'* 的相对表达量均显著高于对照组 ($P < 0.05$)。综合以上研究结果, 表明飞蝗 *Knickkopf* 家族基因均响应 20E 诱导。

2.3 干扰 *LmEcR* 后飞蝗 *Knickkopf* 家族基因表达情况

通过干扰蜕皮激素 20E 受体基因 *LmEcR* 检测飞蝗 *Knickkopf* 家族基因表达是否受 20E 调控

图 1 *Knickkopf* 家族基因在飞蝗 N5D1-AD3 体壁表达Fig. 1 Expression of *Knickkopf* family genes in the integuments of *Locusta migratoria* from 1-day fifth-instar nymphs to 3-day adults

N: 发育龄期; D: 发育天数; A: 成虫; N5D1-N5D7: 5 龄第 1-第 7 天; AD1-AD3: 成虫第 1-第 3 天。

图中数据采用平均值 $\pm$ 标准误表示, 柱上标有不同小写字母代表样本间差异显著

($P < 0.05$, 采用单因素方差分析 (ANOVA) 中的 Tukey's HSD 进行检验)。

N: Developmental stages; D: Developmental days; A: Adults; N5D1-N5D7: 1-day fifth-instar nymphs to 7-day fifth-instar nymphs; AD1-AD3: 1-day adults to 3-day adults.

Data are mean $\pm$ SE. Histograms with different small letters indicate significant differences among the samples by Tukey's HSD test ($P < 0.05$).

(图 3)。飞蝗若虫 N5D1 注射 *dsLmEcR* 后, *LmEcR* 在飞蝗 N5D5、N5D6 和 N5D7 的表达均显著降低 ($P < 0.01$), 说明 *dsLmEcR* 可很好地沉默 *LmEcR* 的表达。飞蝗若虫 N5D1 注射 *dsLmEcR* 后, *LmKnk* 在飞蝗 N5D7 的表达与对照组 *dsGFP* 相比显著降低 ($P < 0.05$); *LmKnk2*, *LmKnk3-FL*, *LmKnk3-5'* 在飞蝗 N5D5、N5D6 和 N5D7 的表达与对照组 *dsGFP* 相比均显著降低 ($P < 0.05$)。以上的研究结果表明飞蝗 *Knickkopf* 家族基因表达受 *LmEcR* 介导的 20E 信号通路的调控。

3 讨论

昆虫生长发育离不开蜕皮和变态, 蜕皮激素和保幼激素是调控这两个过程的重要激素。昆虫体内最主要的蜕皮激素是 20E, 其主要作用是调节控制昆虫变态及卵子发育 (Marchal *et al.*, 2010)。保幼激素既可使昆虫维持幼虫形态, 又参与成虫生殖发育 (Riddiford *et al.*, 2010)。在昆虫生长发育过程中, 两者协调控制昆虫的蜕皮发育。蜕皮激素核受体 (EcR) 和超气门蛋白 (USP) 负责接收蜕皮激素信号, 启动昆虫蜕皮

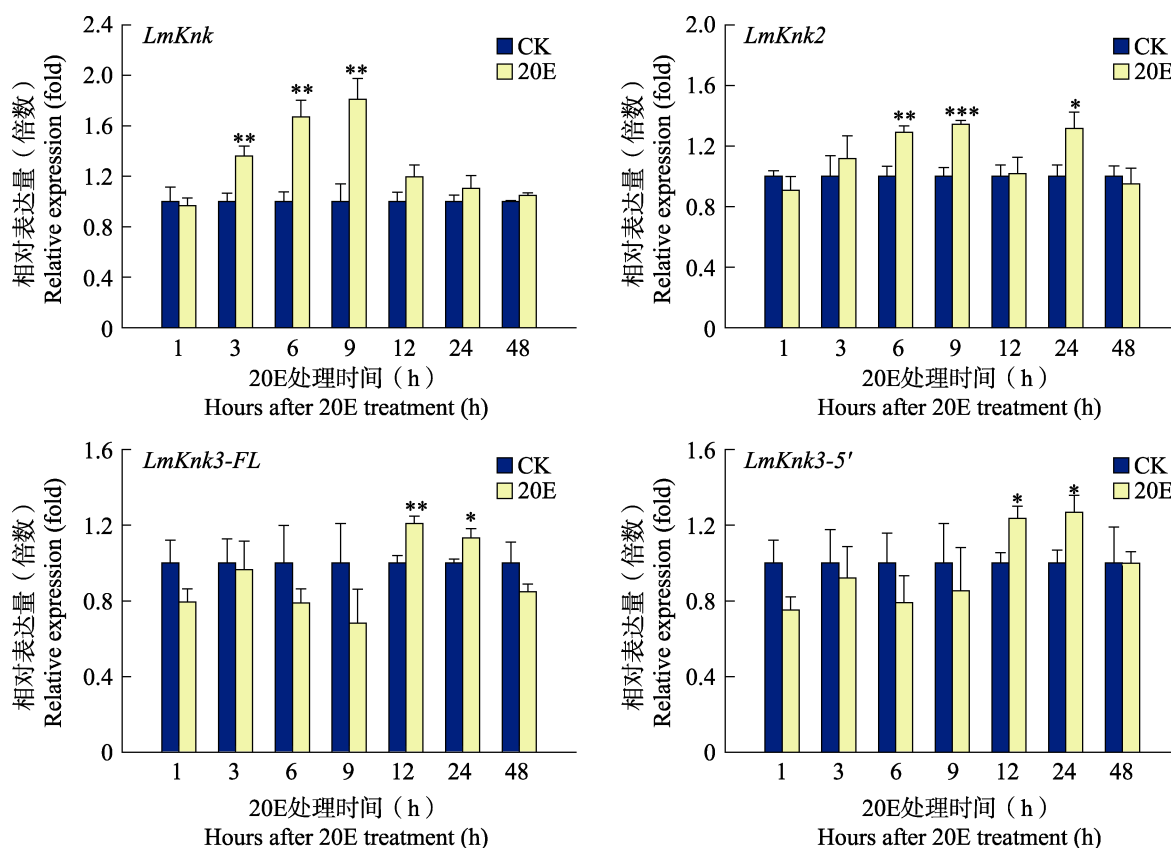


图 2 20E 处理后飞蝗 *Knickkopf* 家族基因的表达

Fig. 2 Expression of *Knickkopf* genes after 20E treatment in *Locusta migratoria*

CK: 注射 10%乙醇; 20E: 注射 20E。结果用相对表达倍数来表示, 即将其中数值最小的样品相对表达量定为 1; 差异显著分析采用 *t*-检验法, *差异显著 ($P < 0.05$); **差异极显著 ($P < 0.01$); ***差异极显著 ($P < 0.001$)。下图同。

CK: 10% ethanol injection; 20E: 20E injection. The results were presented as relative expression fold, in which the lowest expression of sample was determined to be one, Student's *t*-test was used for significant difference analysis.

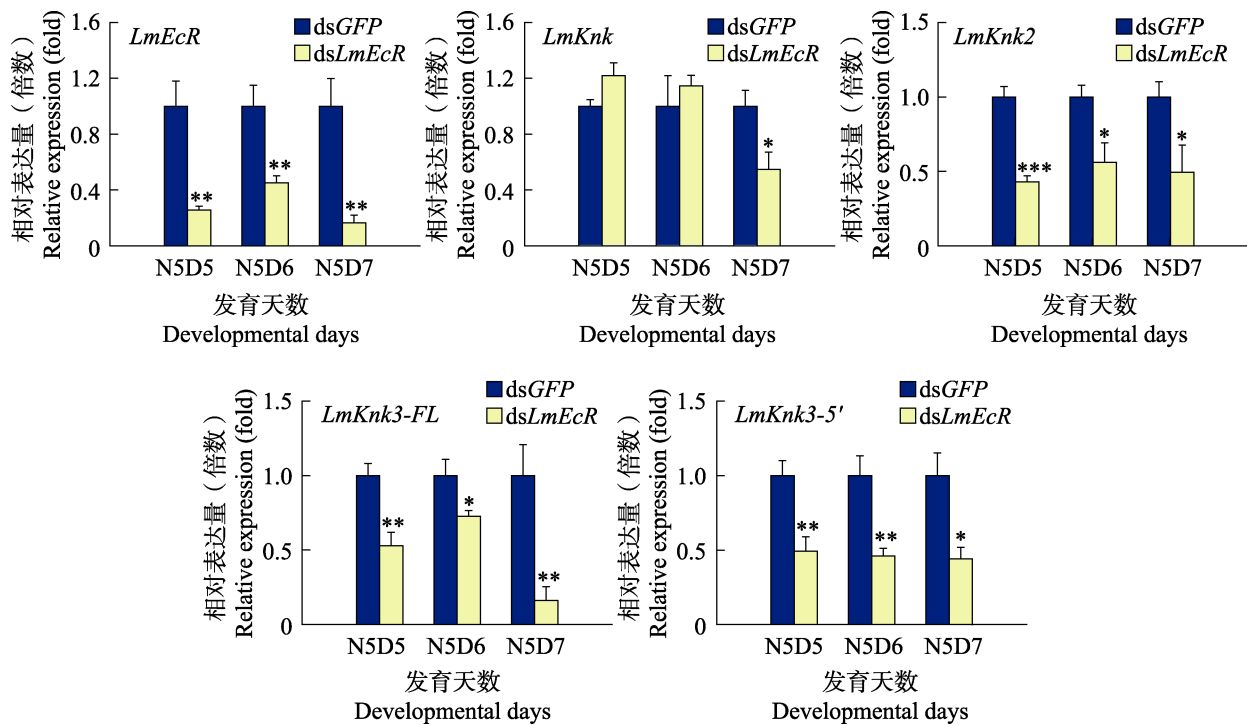
* indicates significant differences at 0.05 level; ** indicates extremely significant differences at 0.01 level;

*** indicates extremely significant differences at 0.001 level. The same below.

和变态等生命过程 (Henrich *et al.*, 1990; Antoniewski *et al.*, 1996), 对蜕皮激素信号传导途径的研究至关重要。20E 随昆虫生长发育呈周期性变化, 在昆虫胚胎发育、蜕皮、变态和生殖等生命过程中起重要作用。

几丁质是昆虫表皮的重要组成成分之一, 随昆虫蜕皮进行周期性的降解、合成及排列组装, 对昆虫的正常生长发育非常重要。已有研究结果表明, 20E 及其受体可以诱导甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 几丁质合成通路 5 个基因的表达 (Yao *et al.*, 2010); Liu 等 (2018) 发现飞蝗几丁质合成通路关键基因 *LmUAPI* 在转录水平响应 20E 调控; 在飞蝗、甘蓝夜蛾和烟草甲中, 均发现 20E 可上调其几丁质降解通路关键基因

NAG 和 CHT5 的表达 (Rong *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2018)。另外, 本课题组前期研究表明, 飞蝗中 20E 通过调控其下游转录因子 *LmHR3* 和 *LmHR39* 的表达, 进而调控几丁质合成酶和几丁质降解酶基因的表达, 控制飞蝗蜕皮发育 (Zhao *et al.*, 2018, 2019)。在药材甲、黄野螟及家蚕中, 均发现 20E 可上调几丁质排列关键基因 CDAs 的表达 (Yang *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019)。上述结果表明, 20E 信号参与调控昆虫表皮几丁质代谢、组装等相关基因的表达, 进而调控昆虫蜕皮及发育过程。然而, 20E 信号通路是否调控 *Knickkopf* 家族基因的表达进而参与表皮几丁质排布目前尚不清楚。

图3 *dsLmEcR* 处理后飞蝗 *Knickkopf* 家族基因的表达Fig. 3 Relative expression of *Knickkopf* family genes after *dsLmEcR* treatment in *Locusta migratoria*

为了探究 *Knickkopf* 家族基因是否受 20E 调控, 本文首先检测 *Knickkopf* 家族基因在飞蝗 5 龄若虫 (N5D1-N5D7) 及成虫 (AD1-AD3) 期体壁表达情况。结果发现, *LmKnk2*、*LmKnk3-FL* 及 *LmKnk3-5'* 的表达与 20E 的滴度变化趋势相似, 暗示这些基因的表达可能受 20E 的调控。然后选择保幼激素几乎不存在和蜕皮激素滴度最低的 5 龄第 1 天飞蝗 (李大琪, 2016) 进行 20E 注射, 激活 20E 信号在飞蝗体内的传递, 研究 *Knickkopf* 家族基因表达对 20E 的响应情况, 结果发现, *Knickkopf* 家族 4 个基因对 20E 均有应答, 但是响应的时间点有差异, 注射 20E 3 h 后 *LmKnk* 的表达量开始迅速升高, 注射 20E 6 h 后, *LmKnk2* 的表达量开始升高, 而注射 20E 12 h 后, *LmKnk3-FL* 和 *LmKnk3-5'* 的表达量才开始上升, 这些结果表明 *Knickkopf* 家族基因响应 20E 调控具有时间顺序。接着本文通过向飞蝗 5 龄第 1 天若虫注射 *dsLmEcR* 沉默飞蝗 *LmEcR* 的表达, 从而抑制 20E 信号在飞蝗体内的传递, 结果发现 *LmEcR* 表达降低后, *Knickkopf* 家族 4 个基因表

达均显著下调。综上所述, 本文发现 20E 对飞蝗 *Knickkopf* 家族 4 个基因 *LmKnk*、*LmKnk2*、*LmKnk3-FL* 和 *LmKnk3-5'* 的表达均有影响, 是 20E 的下游应答基因, 但 4 个基因对 20E 的响应时间有差异, 这可能与不同基因上游的转录调控因子有关。课题组后续将克隆飞蝗 *Knickkopf* 家族基因的启动子区, 预测其潜在转录因子, 进一步深入探索转录因子介导的 20E 信号通路对 *Knickkopf* 家族基因的转录调控机制。

本文以飞蝗表皮层状排列关键基因 *Knickkopf* 家族基因为研究对象, 开展该家族基因对 20E 的响应研究, 研究结果丰富了昆虫学领域中几丁质有序排列关键基因的研究内容, 为深入开展 20E 信号通路介导的表皮几丁质排列关键基因转录调控机制研究奠定了基础。

参考文献 (References)

- Antoniewski C, Mugat B, Delbac F, Lepesant JA, 1996. Direct repeats bind the EcR/USP receptor and mediate ecdysteroid responses in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and Cellular*

- Biology*, 16(6): 2977–2986.
- Chaudhari SS, Arakane Y, Specht CA, Moussian B, Boyle DL, Park Y, Kramer KJ, Beeman RW, Muthukrishnan S, 2011. Knickkopf protein protects and organizes chitin in the newly synthesized insect exoskeleton. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(41): 17028–17033.
- Chaudhari SS, Moussian B, Specht CA, Arakane Y, Kramer KJ, Beeman RW, Muthukrishnan S, 2014. Functional specialization among members of knickkopf family of proteins in insect cuticle organization. *PLoS Genetics*, 10(8): e1004537.
- Chen XYL, Xu KK, Yan X, Chen CX, Cao Y, Wang YW, Li C, Yang WJ, 2018. Characterization of a β -N-acetylglucosaminidase gene and its involvement in the development of *Lasioderma serricorne* (Fabricius). *Journal of Stored Products Research*, 77: 156–165.
- Gagou ME, Kapsetaki M, Turberg A, Kafetzopoulos D, 2002. Stage-specific expression of the chitin synthase *DmeChSA* and *DmeChSB* genes during the onset of *Drosophila* metamorphosis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(2): 141–146.
- Henrich VC, Sliter TJ, Lubahn DB, MacIntyre A, Gilbert LI, 1990. A steroid/thyroid hormone receptor superfamily member in *Drosophila melanogaster* that shares extensive sequence similarity with a mammalian homologue. *Nucleic Acids Research*, 18(14): 4143–4148.
- King-Jones K, Thummel CS, 2005. Nuclear receptors—a perspective from *Drosophila*. *Nature Reviews Genetics*, 6(4): 311–323.
- Li DQ, Zhang JQ, Wang Y, Liu XJ, Ma EB, Sun Y, Li S, Zhu KY, Zhang JZ, 2015. Two chitinase 5 genes from *Locusta migratoria*: Molecular characteristics and functional differentiation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 58(3): 46–54.
- Li DQ, 2016. Function of *Locusta migratoria* chitinase family genes and potential application in RNAi-mediated pest control. Doctoral dissertation. Taiyuan: Shanxi University. [李大琪, 2016. 飞蝗几丁质酶家族基因功能及 RNAi 介导的害虫防治应用研究. 博士学位论文. 太原: 山西大学.]
- Liu XJ, 2013. Studies on the characteristics and transcriptional regulation of key genes involved in chitin biosynthesis of *Locusta migratoria*. Doctoral dissertation. Taiyuan: Shanxi University. [刘晓健, 2013. 飞蝗几丁质合成关键基因特性及转录调控研究. 博士学位论文. 太原: 山西大学.]
- Liu XJ, Sun YW, Li DQ, Li S, Ma EB, Zhang JZ, 2018. Identification of *LmUAPI* as a 20-hydroxyecdysone response gene in the chitin biosynthesis pathway from the migratory locust, *Locusta migratoria*. *Insect Science*, 25(2): 211–221.
- Marchal E, Vandersmissen HP, Badisco L, Velde SV, Verlinden H, Iga M, Wielendaele PV, Huybrechts R, Simonet G, Smagghe G, Broeck JV, 2010. Control of ecdysteroidogenesis in prothoracic glands of insects: A review. *Peptides*, 31(3): 506–519.
- Merzendorfer H, Zimoch L, 2003. Chitin metabolism in insects: Structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *The Journal of Experimental Biology*, 206(24): 4393–4412.
- Moussian B, Tång E, Tonning A, Helms S, Schwarz H, Nüsslein-Volhard C, Uv AE, 2006. *Drosophila* Knickkopf and Retroactive are needed for epithelial tube growth and cuticle differentiation through their specific requirement for chitin filament organization. *Development*, 133(1): 163–171.
- Riddiford LM, Cherbas P, Truman JW, 2001. Ecdysone receptors and their biological actions. *Vitamins and Hormones*, 60: 1–73.
- Riddiford LM, Truman JW, Mirth CK, Shen YC, 2010. A role for juvenile hormone in the prepupal development of *Drosophila melanogaster*. *Development*, 137(7): 1117–1126.
- Rong S, Li DQ, Zhang XY, Li S, Zhu KY, Guo YP, Ma EB, Zhang JZ, 2013. RNA interference to reveal roles of β -N-acetylglucosaminidase gene during molting process in *Locusta migratoria*. *Insect Science*, 20(1): 109–119.
- Schwarz H, Moussian B, 2007. Electron-microscopic and genetic dissection of arthropod cuticle differentiation. *Modern Research and Educational Topics in Microscopy*, 3: 316–325.
- Tang B, 2008. Studies on the characteristic and transcriptional regulation of important genes in chitin biosynthesis pathway of *Spodoptera exigua*. Doctoral dissertation. Guangzhou: Sun Yat-sen University. [唐斌, 2008. 甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*) 几丁质合成通路中重要基因的特性与转录调控初步研究. 博士学位论文. 广州: 中山大学.]
- Thummel CS, 2002. Ecdysone-regulated puff genes 2000. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(2): 113–120.
- Wang CY, Cheng J, Lyu ZH, Li ZX, Chen JX, Lin T, 2019. Chitin deacetylase 1 and 2 are indispensable for larval-pupal and pupal-adult molts in *Heortia vitessoides* (Lepidoptera: Crambidae). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 237: 110325.

- Yang WJ, Xu KK, Yan X, Chen CX, Cao Y, Meng YL, Li C, 2018. Functional characterization of chitin deacetylase 1 gene disrupting larval-pupal transition in the drugstore beetle using RNA interference. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 219/220: 10–16.
- Yao Q, Zhang DW, Tang B, Chen J, Chen J, Lu L, Zhang WQ, 2010. Identification of 20-hydroxyecdysone late -response genes in the chitin biosynthesis pathway. *PLoS ONE*, 5(11): e14058.
- Yao TP, Forman BM, Jiang Z, Cherbas L, Chen JD, McKeown M, Cherbas P, Evans RM, 1993. Functional ecdysone receptor is the product of *EcR* and *Ultraspiracle* genes. *Nature*, 366(6454): 476–479.
- Yu RR, 2017. Functional analysis of key genes involved in chitin organization of cuticle in *Locusta migratoria*. Doctoral dissertation. Taiyuan: Shanxi University. [于荣荣, 2017. 飞蝗表皮几丁质有序排列关键基因的功能研究. 博士学位论文. 太原: 山西大学.]
- Zhang H, Zhao KJ, Fan D, 2016. Molecular cloning and RNA interference analysis of β -N-acetyl glucosaminidase in *Mamestra brassicae* L.. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 19(3): 721–728.
- Zhang R, Zhao XM, Liu XJ, Zhang XY, Yu RR, Ma EB, Moussian B, Zhu KY, Zhang JZ, 2020. Effect of RNAi-mediated silencing of two *Knickkopf* family genes (*LmKnk2* and *LmKnk3*) on cuticle formation and insecticide susceptibility in *Locusta migratoria*. *Pest Management Science*, 76(9): 2907–2917.
- Zhang ZY, Yan JM, Liu Q, Zhang YH, Gong J, Hou Y, 2019. Genome-wide analysis and hormone regulation of chitin deacetylases in silkworm. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(7): 1679.
- Zhao XM, Qin ZY, Liu WM, Liu XJ, Moussian B, Ma EB, Li S, Zhang JZ, 2018. Nuclear receptor HR3 controls locust molt by regulating chitin synthesis and degradation genes of *Locusta migratoria*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 92(1): 1–11.
- Zhao XM, Qin ZY, Zhang J, Yang Y, Jia P, Yang Q, Ma EB, Zhang JZ, 2019. Nuclear receptor hormone receptor 39 is required for locust moulting by regulating the chitinase and carboxypeptidase genes. *Insect Molecular Biology*, 28(4): 537–549.
- Zheng YP, Retnakaran A, Krell PJ, Arif BM, Primavera M, Feng QL, 2003. Temporal, spatial and induced expression of chitinase in the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. *Journal of Insect Physiology*, 49(3): 241–247.