

转录因子 *E74* 在柑桔全爪螨 后若螨发育中的作用*

刘钰杭^{1,2**} 李传振^{1,3} 夏梦豪^{1,3} 刘巽燕^{1,3}
李玉闯^{1,3} 潘登^{1,3} 王进军^{1,3} 豆威^{1,3***}

(1. 西南大学植物保护学院, 昆虫学及害虫控制工程重庆市重点实验室, 重庆 400715;
2. 西南大学含弘学院, 重庆 400715; 3. 西南大学农业科学研究院, 重庆 400715)

摘要 【目的】作为 20E 诱导产生的一个关键转录因子, *E74* 在昆虫变态发育过程中起重要调控作用, 但该转录因子在螨类中的研究较少。本文旨在探究转录因子 *E74* 在柑桔全爪螨 *Panonychus citri* 后若螨到成螨阶段的功能, 为害螨提供潜在的防控靶点。【方法】利用 RT-qPCR, 明确了 *E74* (*PcE74*) 在柑桔全爪螨后若螨到成螨阶段的表达模式。进一步利用 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术, 通过人工装置饲喂法, 以 3 种不同的处理 (dsRNA, siRNA 和 dsRNA+siRNA) 沉默 *PcE74*, 分析沉默效率以确定最佳处理方式, 并探究了 *PcE74* 在柑桔全爪螨后若螨发育为成螨过程中的作用。【结果】*PcE74* 在柑桔全爪螨后若螨到成螨各阶段均有表达, 后若螨 2 h 至后若螨 16 h 表达量上升, 后若螨 16 h 至发育为 3 日龄成螨表达量递减, 成螨阶段表达量相对较低。RNAi 表明, 与单独饲喂 ds*PcE74* (14%) 或 si*PcE74* (24%) 相比, 饲喂 ds*PcE74*+si*PcE74* 干扰效率显著提高 (54%) ($P < 0.05$), 且成螨羽化率显著下降 ($P < 0.05$), 异常表型表现为静伏期的后若螨不能产生旧表皮而死亡。dsRNA+siRNA 的 RNAi 效率优于单独使用 dsRNA 或 siRNA。【结论】*PcE74* 参与调控柑桔全爪螨后若螨到成螨的发育过程, 与 *E74* 互作的基因调控机制有待进一步研究。

关键词 柑桔全爪螨; *PcE74*; RNAi; siRNA; 羽化率

The role of transcription factor *E74* in the eclosion of *Panonychus citri* from deutonymph to adult

LIU Yu-Hang^{1,2**} LI Chuan-Zhen^{1,3} XIA Meng-Hao^{1,3} LIU Xun-Yan^{1,3}
LI Yu-Chuang^{1,3} PAN Deng^{1,3} WANG Jin-Jun^{1,3} DOU Wei^{1,3***}

(1. Academy of Agricultural Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. Hanhong College, Southwest University, Chongqing 400715, China; 3. College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract 【Aim】*E74* is a key transcription factor induced by 20E in insects that plays an important regulatory role in insect metamorphosis and development. However, few studies have been conducted on the role of *E74* in mites. This study aims to investigate the function of the transcription factor *E74* from *Panonychus citri* deutonymph to adult and provide potential targets for mite control. 【Methods】RT-qPCR was used to analyze the expression characteristics of *E74* during the different developmental stages of *P. citri* from deutonymph to adult. Three different treatments (dsRNA, siRNA, dsRNA+siRNA) were used to interfere with *PcE74* through the leaf-mimicking method using RNAi technology. The silencing efficiency was analyzed to determine the optimal interference mode, and the role of *PcE74* was explored during the deutonymph-adult transition. 【Results】*PcE74* was expressed during all developmental stages from deutonymph to adult. The expression of

*资助项目 Supported projects: 浙江省科技计划项目“尖兵”“领雁”研发攻关计划 (2023C04014); 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系

**第一作者 First author, E-mail: YuhangLiu2020@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: douwei80@swu.edu.cn

收稿日期 Received: 2023-05-31; 接受日期 Accepted: 2023-08-16

PcE74 increased between the 2-hour deutonymph stage to the 16-hour deutonymph stage, before declining during the third instar adult stage where the expression level remained low. The RNAi experiment showed that the interference efficiency of *dsPcE74+siPcE74* (54%) was significantly higher than *dsPcE74* (14%) and *siPcE74* (24%), and the molting percentage was significantly lower than the control ($P < 0.05$). An abnormal phenotype identified was characterized by the inability of the stationary phase of the deutonymph to produce old epidermis, which resulted in death. siRNA can enhance RNAi efficiency at the phenotypic level, and the RNAi efficiency of dsRNA+siRNA is superior to dsRNA or siRNA. **[Conclusion]** *PcE74* is involved in the regulation of the developmental process from deutonymph to adult in *P. citri*. Further investigation is needed on genes that interact with *E74* in the molecular regulatory pathway.

Key words *Panonychus citri*; *PcE74*; RNAi; siRNA; molting percentage

蜕皮激素 (20-hydroxyecdysone, 20E) 通过调控下游基因表达, 影响昆虫蜕皮和变态过程, 是昆虫变态发育的一种重要激素 (Thummel, 1996)。20E 通过与蜕皮激素受体 (EcR) 和超气门蛋白 (Ultraspiracle, USP) 形成的异源二聚体结合, 激活早期转录因子 *E74* 和 *E75*, 进而启动晚期基因的表达 (Yao *et al.*, 1993; Bonneton *et al.*, 2003)。转录因子 *E74* 属于 E-twenty six (ETS) 超家族, 作为 20E 诱导的一个关键转录因子, 在昆虫生长发育中发挥重要调控功能 (Burtis *et al.*, 1990; Sharrocks, 2001)。在美国白蛾 *Hyphantria cunea* 中, 敲除 *HcE74* 后 6 d, 幼虫死亡率高达 $51.11\% \pm 6.94\%$, 伴有明显的发育畸形表型 (Zhang *et al.*, 2022a)。有效沉默褐飞虱 *Nilaparvata lugens* *E74* 后, 若虫蜕皮率下降且卵巢发育延迟 (Zhang *et al.*, 2022b)。 *E74* 参与果蝇 *Drosophila* 变态过程, *E74* 的突变影响蜕皮激素调控转录, 导致化蛹前和化蛹期死亡 (Fletcher and Thummel, 1995)。在长红猎蝽 *Rhodnius prolixus* 中, 干扰雌成虫 *E74*, 导致卵巢和脂肪体中蜕皮激素应答基因显著下调 (Benrabaa *et al.*, 2023)。

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是一种在转录水平或转录后水平有效沉默或抑制目的基因表达的保守机制, 可由微小 RNA (MicroRNA, miRNA)、短/小干扰 RNA (Short/Small interfering RNA, siRNA) 和与 PIWI (P-element induced wimpy testis) 蛋白互作的小 RNA (Piwi interacting RNA, piRNA) 触发 (Han *et al.*, 2015; Nandety *et al.*, 2015; Zhu and Palli, 2020)。目前, RNAi 技术已广泛用于昆虫基因功能、控制害虫和 RNAi 作用机制等方面的研究

(Hammond *et al.*, 2000; Song *et al.*, 2017; Zotti *et al.*, 2018; Zhu and Palli, 2020)。在叶螨中, 由 dsRNA 或 siRNA 介导的 RNAi 也是研究基因功能的重要方法 (Niu *et al.*, 2018)。

柑桔全爪螨 *Panonychus citri* 属蛛形纲 Arachnida、蜱螨亚纲 Acari、前气门目 Prostigmata、叶螨科 Tetranychidae、全爪螨属 *Panonychus*, 是危害柑桔产业的世界性重要害螨 (Gotoh *et al.*, 2004)。该螨寄主范围广, 可取食包括芸香科、桑科和豆科在内的 108 种植物 (Migeon *et al.*, 2011)。其具有体积小、有性生殖和产雄孤雌生殖、发育历期短和世代重叠等特点 (Liao *et al.*, 2013)。柑桔全爪螨一生经历卵 (Egg)、幼螨 (Larva)、前若螨 (Protonymph)、后若螨 (Deutonymph) 和成螨 (Adult) 5 个阶段, 经 3 次蜕皮完成变态发育。但叶螨以百日青蜕皮酮 (Ponasterone A, PonA) 作为蜕皮激素活性物质, 不同于典型的 20E (Grbić *et al.*, 2011)。Ponasterone A 与 EcR/RXR 受体结合产生级联反应, 引发一系列信号传导反应, 而螨类 *E74* 可能参与 Ponasterone A 信号通路的调控 (Li *et al.*, 2017; Hornok *et al.*, 2019)。但 *PcE74* 具体功能尚未明确。在前期研究中, 联合柑桔全爪螨全基因组和不同发育阶段的转录组分析, 发现 *PcE74* 在后若螨到成螨阶段差异表达, 暗示其可能参与了后若螨到成螨的发育过程。本文利用 RT-qPCR 技术解析转录因子 *E74* 在柑桔全爪螨后若螨到成螨阶段的表达模式, 利用 RNAi 技术沉默 *PcE74*, 明确 *PcE74* 在柑桔全爪螨变态发育中的重要作用, 为研发柑桔全爪螨的靶向农药提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试螨源

供试柑桔全爪螨于 2016 年 10 月采自重庆北碚中国农业科学院柑桔研究所种质资源苗圃, 用新鲜大豆叶片长期饲养于 MLR-351H 型人工气候箱 (SANYO) 中, 温度为 $(26 \pm 1) ^\circ\text{C}$ 、光周期为 14 L : 10 D、相对湿度为 $60\% \pm 5\%$ 。

1.2 主要供试试剂

用于总 RNA 提取的 RNAPrep Pure 微量样本总 RNA 提取试剂盒以及用于凝胶回收的 Universal DNA Purification Kit 通用型 DNA 纯化回收试剂盒均购自 TIANGEN 公司。反转录试剂 PrimeScript RT Reagent Kit 购自 TAKARA 公司。荧光定量试剂 $2 \times \text{NovoStart}^\circledR$ SYBR qPCR SuperMix Plus 购自 Novoprotein 公司。dsRNA 合成试剂盒 TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit 购自 Promega 公司。siRNA 合成试剂盒 *In vitro* Transcription T7 Kit (for siRNA Synthesis) 购自 TAKARA 公司。

1.3 总 RNA 提取和 RT-qPCR

收集不同发育阶段柑桔全爪螨样品, 检测后若螨 2 h (Deutonymph 2 h, 2 h-D)、后若螨 16 h (Deutonymph 16 h, 16 h-D)、后若螨 26 h

(Deutonymph 26 h, 26 h-D)、后若螨 45 h (Deutonymph 45 h, 45 h-D)、初成螨 2 h (Initial molting adult 2 h, 2 h-A)、1 日龄成螨 (1 day-old adult, 1 d-A)、2 日龄成螨 (2 day-old adult, 2 d-A) 和 3 日龄成螨 (3 day-old adult, 3 d-A) 的 *PcE74* 相对表达量, 每 200 头后若螨或 120 头成螨作为一个生物样本, 各阶段设置 3 个独立的生物学重复。利用微量 RNA 提取试剂盒 (TIANGEN) 提取总 RNA, 用 Nanodrop 2000 分光光度计 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) 测定 RNA 浓度和纯度, 用 1% 琼脂凝胶电泳检测 RNA 完整性。参照 PrimeScript RT Reagent Kit (TAKARA) 说明书取 $1 \mu\text{g}$ RNA 反转录合成第一链 cDNA, 在 $-20 ^\circ\text{C}$ 下保存备用。采用实时荧光定量 PCR 检测 *PcE74* 在后若螨至成螨阶段的表达模式。利用 Primer 3 Input (version 0.4.0) 设计定量引物, 引物序列见表 1。将 cDNA 稀释不同倍数 (1、1/3、1/9、1/27 和 1/81) 制作标准曲线, 确定引物扩增效率。RT-qPCR 反应在 CFX Connect Real-Time 系统中进行, 反应体系为: cDNA $1 \mu\text{L}$ 、上下游引物各 $1 \mu\text{L}$ ($0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、 $2 \times \text{NovoStart}^\circledR$ SYBR qPCR SuperMix Plus $10 \mu\text{L}$ 和 ddH₂O $7 \mu\text{L}$ 。反应程序: $95 ^\circ\text{C}$ 2 min; $95 ^\circ\text{C}$ 15 s, $60 ^\circ\text{C}$ 30 s, 40 循环; $60 ^\circ\text{C}$ 5 s。每个 cDNA 样本设置 2 个技术重复, 用软件 qBase⁺ 计算相对表达量。

表 1 引物信息
Table 1 Primers information

名称 Name	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')	用途 Usage
<i>PcE74</i> -F	ATGTGGAATAATAAAATGCATGGGG	PCR 克隆全长 PCR clone full length
<i>PcE74</i> -R	TCAAAATCCTCCCATGTTCCCA	PCR 克隆全长 PCR clone full length
q <i>PcE74</i> -F	CTTCTGGACCTGGTGGTCAT	定量 PCR RT-qPCR
q <i>PcE74</i> -R	GAGGAGAAGGCGAATGTTGA	定量 PCR RT-qPCR
ds <i>PcE74</i> -F	taatacgactcactatagggCTCTCCTATCACAATGCATCGGC	RNAi 合成 dsRNA RNAi synthesizes dsRNA
ds <i>PcE74</i> -R	taatacgactcactatagggAAACAGCCTGGAGTTGGAAGT	RNAi 合成 dsRNA RNAi synthesizes dsRNA

续表 1 (Table 1 continued)

名称 Name	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')	用途 Usage
dsGFP-F	taatacgactcactatagggTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG	RNAi 合成 dsRNA RNAi synthesizes dsRNA
dsGFP-R	taatacgactcactatagggTCGATGCGGTTACACAG	RNAi 合成 dsRNA RNAi synthesizes siRNA
siPcE74-1-sense	ggatcctaatacgactcactataGTATTGTCCAAGATTCATC	RNAi 合成 siRNA RNAi synthesizes siRNA
siPcE74-1-antisense	aaGATGAATCTTGGACAATACtatagtgagtcgtattaggatcc	RNAi 合成 siRNA RNAi synthesizes siRNA
siPcE74-2-sense	ggatcctaatacgactcactataGAAGATCTCTCCTATCACA	RNAi 合成 siRNA RNAi synthesizes siRNA
siPcE74-2-antisense	aaTGTGATAGGAGAGATCTTctatagtgagtcgtattaggatcc	RNAi 合成 siRNA RNAi synthesizes siRNA
siGFP-sense	ggatcctaatacgactcactataGGGCGATGCCACCTACGGC	RNAi 合成 siRNA RNAi synthesizes siRNA
siGFP-antisense	aaGCCGTAGGTGGCATCGCCctatagtgagtcgtattaggatcc	RNAi 合成 siRNA RNAi synthesizes siRNA

1.4 克隆 *PcE74* 全长序列

以上述合成的第一链 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。通过 NCBI 引物设计工具(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) 设计全长引物(表 1)。反应体系共 25 μ L: 12.5 μ L Prime Star Buffer, 9 μ L ddH₂O, 上下游引物各 1 μ L 及模板 1.5 μ L。反应程序按此进行:预变性 98 $^{\circ}$ C 2 min;变性 98 $^{\circ}$ C 10 s, 退火 60 $^{\circ}$ C 10 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 23 s, 34 循环;延伸 72 $^{\circ}$ C 2 min。PCR 扩增产物用 1%琼脂凝胶电泳检验后,按 Universal DNA Purification Kit (TIANGEN) 试剂盒说明回收产物, 随后连接至载体 pGEM[®]-T easy vector (Promega), 将连接产物转入 Trelief[®] 5 α Chemically Competent Cell感受态细胞(TSINGKE), 将 PCR 检测的阳性菌液送至擎科生物重庆分公司测序。

1.5 构建系统进化树

将柑桔全爪螨 *E74* 的氨基酸序列导入 NCBI 的 BLAST 进行比对, 下载其在节肢动物中的同源序列。采用 MEGA 7 最大似然法和模型 Dayhoff+G+I 构建系统发育树, 用自举法对进化

树进行 1 000 次质量测试。

1.6 体外合成 dsRNA 和 siRNA

为提高 RNAi 效率, 在 *PcE74* 的 CDS 区设计 1 条 ds*PcE74* 和 2 条候选 si*PcE74*, 即 ds*PcE74*、si*PcE74*-1 和 si*PcE74*-2。其中 ds*PcE74* 产物长度为 500 bp, 双链 si*PcE74* 长 21 nt (包括 19 nt 的碱基配对序列和 2 nt 的 3'端悬挂末端序列 AA) (Elbashir *et al.*, 2001)。以重组质粒为模板, 在引物 5'端添加 T7 启动子序列(表 1), PCR 克隆获得 DNA 片段, 使用 TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit (Promega) 试剂盒合成 dsRNA。同时以绿色荧光蛋白 *GFP* 基因片段为对照, 按相同方法合成 ds*GFP*。参照 In vitro Transcription T7 Kit (for siRNA synthesis) (TAKARA) 试剂盒说明书合成 siRNA。设置 3 组干扰实验, 分别为: 饲喂 dsRNA 组 (ds*GFP* 和 ds*PcE74*), 饲喂 siRNA 组 (si*GFP*, si*E74*-1 和 si*E74*-2) 以及饲喂 dsRNA 和 siRNA 混合物组 (ds*GFP*+si*GFP*, ds*E74*+si*E74*-1 和 ds*E74*+si*E74*-2), 每组内不同处理各有 3 个生物学重复。调节 dsRNA 和 siRNA 浓度在 5 000-6 000 μ g/mL 范围内, dsRNA 和 siRNA 混合物组按比

例 1 : 1 混合。

1.7 RNAi

采用模拟叶片人工装置饲喂法进行 RNAi 实验 (Ghazy *et al.*, 2020)。具体操作如下: 将 80 目尼龙网片放置在倒置的聚苯乙烯培养皿底表面, 将试剂加入尼龙网片上, 再将一张石蜡薄膜轻轻拉伸覆盖在尼龙网片上方, 使试剂均匀铺满尼龙网, 最后用湿润的 Kimwipe 纸条 (Nippon Paper Crecia, Tokyo, Japan) 包围尼龙网周边, 防止螨逃逸。首先将进入后若期 2 h 的后若螨转移至新鲜大豆叶片上取食 9-10 h, 再将其转移到含有上述试剂的人工装置中。自后若螨到静伏期 (Stationary phase), 再到发育为成螨的过程需要 48 h 左右, 采用上述方法处理 36 h 后观察记录后若螨生存状态, 每个处理 3 个生物重复, 每 70 头后若螨为一个重复, 统计羽化率。收集不同处理的人工装置上静伏期后若螨, 每 200 头后若螨为一个重复, 每个处理 3 个生物重复, 提取总 RNA, 反转录合成 cDNA, 采用 RT-qPCR 检测不同处理下 *PcE74* 表达水平。

1.8 数据统计与分析

采用 Tukey's 法分析 *PcE74* 在柑桔全爪螨后若螨到成螨不同发育时期的表达模式, 采用 Student's *t* 检验分析不同 dsRNA 干扰 *PcE74* 的效率以及不同组合 RNA 干扰 *PcE74* 后的成螨羽化率差异显著性, 采用 Tukey's 法分析不同小 RNA 或者不同组合的 RNA 干扰方式下 *PcE74* 的表达量差异显著性, 应用 GraphPad Prism 8.0.2 软件制图。

2 结果与分析

2.1 *PcE74* 基因克隆及系统进化分析

通过基因克隆获得柑桔全爪螨 *E74*, 在 NCBI 的 BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 比对到柑桔全爪螨基因 XP_053207394.1 和 XP_053207396.1。取 *E74* 的保守结构域氨基酸序列构建系统发育树, 结果如图 1。蜱螨亚纲和昆虫纲的 *E74* 分别聚集在两个大支上, 柑桔全爪螨和二斑叶螨 *Tetranychus urticae* 聚集在同一支。

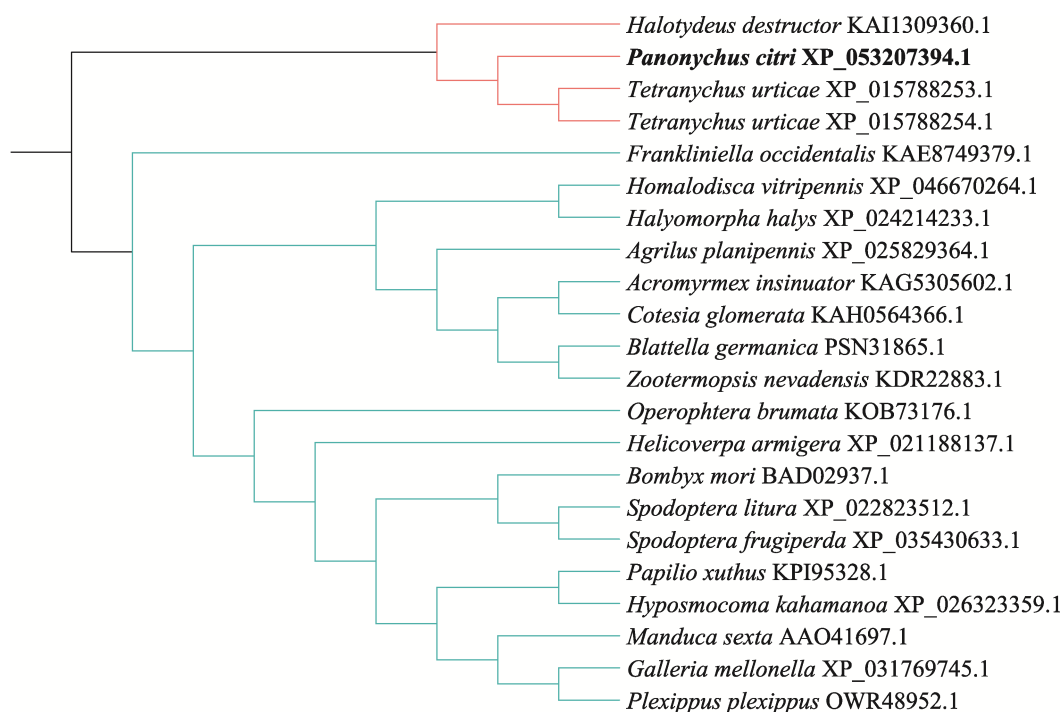


图 1 *E74* 系统进化树分析 (最大自然法, 自展值为 1 000)

Fig.1 A phylogenetic tree analysis (Maximum likelihood method, bootstrap:1 000)

PcE74 与二斑叶螨 2 个 *E74* 变体同源性高达 95%，暗示 *E74* 在叶螨发育中具保守的功能，同时具有作为 RNAi 靶标的潜力。

2.2 *PcE74* 在后若螨到成螨发育过程中表达特性分析

对柑桔全爪螨 *E74* 在后若螨到成螨发育阶段的表达量进行定量分析。RT-qPCR 结果表明，*PcE74* 在后若螨 2 h 至 3 日龄成螨各时期均有表达，且在后若螨和成螨阶段存在显著 ($P < 0.05$) 差异。如图 2 所示，*PcE74* 在后若螨 16 h 表达量最高，后若螨 16 h 之前表达量显著上升 ($P < 0.05$)，后若螨 16 h 之后表达量显著降低 ($P < 0.05$)，且在后若螨 45 h 至 3 日龄成螨阶段相对较低 ($P > 0.05$)。即 *PcE74* 在成螨羽化前表达量显著高于羽化后，暗示 *PcE74* 在成螨羽化过程中起到重要调控作用。

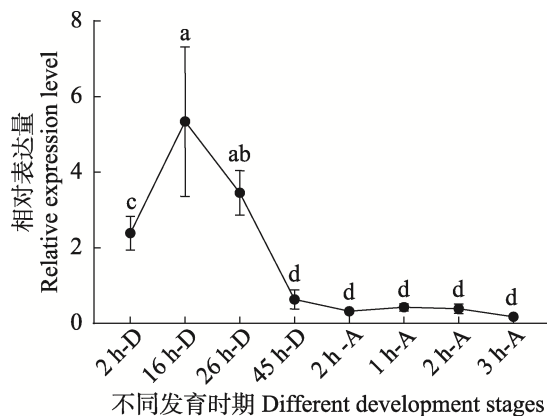


图 2 *PcE74* 在柑桔全爪螨后若螨到成螨不同发育时期的表达模式

Fig. 2 The expression patterns of *PcE74* from deutonymph to adult

2 h-D: 后若螨 2 h; 16 h-D: 后若螨 16 h; 26 h-D: 后若螨 26 h; 45 h-D: 后若螨 45 h; 2 h-A: 初成螨 2 h; 1 d-A: 1 日龄成螨; 2 d-A: 2 日龄成螨; 3 d-A: 3 日龄成螨。

数据均为平均值±标准误，柱上不同字母表显著差异 ($P < 0.05$, Tukey's 多重比较检验)。

2 h-D: Deutonymph 2 h; 16 h-D: Deutonymph 16 h; 26 h-D: Deutonymph 26 h; 45 h-D: Deutonymph 45 h; 2 h-A: Initial molting adult 2 h; 1 d-A: 1 day-old adult; 2 d-A: 2 day-old adult; 3 d-A: 3 day-old adult. Data are mean±SE, different letters above the broken line mean significant difference ($P < 0.05$, Tukey's multiple range test).

2.3 siRNA 和 dsRNA 对 *PcE74* 的沉默效率分析

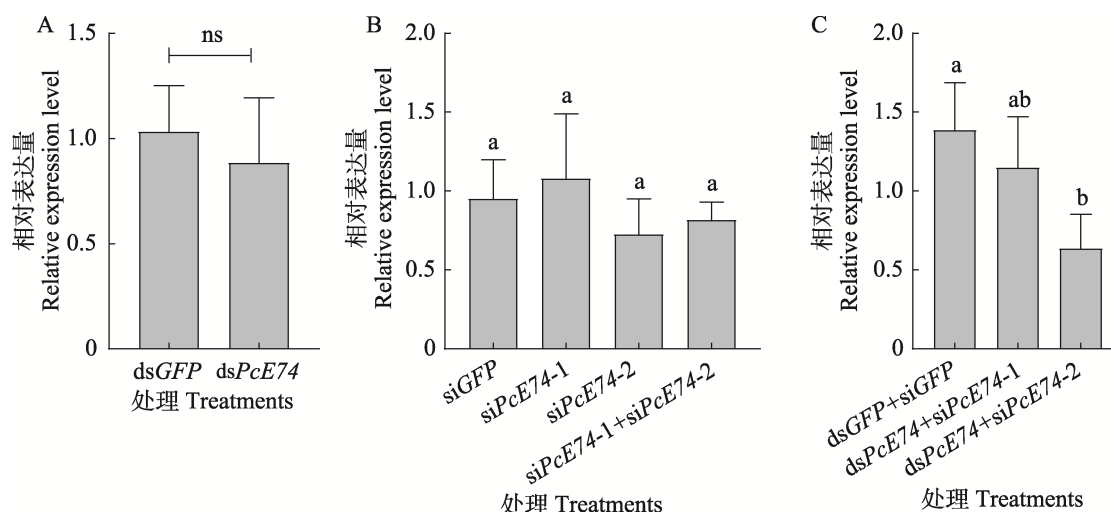
首先单独饲喂 dsRNA 沉默 *PcE74* 发现，相较于对照组 dsGFP，处理组 ds*PcE74* 沉默效率为 14%，与对照组无显著差异 ($P > 0.05$) (图 3: A)。单独饲喂 siRNA 沉默 *PcE74*，检测沉默效率发现，图 3 (B) 所示，相较于对照组 siGFP，处理组 si*PcE74*-1、si*PcE74*-2 和 si*PcE74*-1+si*PcE74*-2 沉默效率分别为 13%、24%和 14%，均与对照组无差异 ($P > 0.05$)。dsRNA 或 siRNA 的沉默效率均未达到高效沉默目的基因的效果，因此我们选择 dsRNA 和 siRNA 组合干扰目的基因。进一步检测 dsRNA+siRNA 的沉默效率，图 3 (C) 所示，处理组 ds*PcE74*+si*PcE74*-1 和 ds*PcE74*+si*PcE74*-2 的沉默效率分别为 17%和 54%，处理组 ds*PcE74*+si*PcE74*-2 沉默效率显著高于对照组 ($P < 0.05$)，因此选择 ds*PcE74*+si*PcE74*-2 处理组合模式进行 RNAi 探究 *PcE74* 功能。

2.4 *PcE74* 对成螨羽化率影响

以 RNAi 为基础，利用人工装置饲喂法干扰 *PcE74* 后，统计柑桔全爪螨成螨羽化率。沉默 *PcE74* 后，处理 ds*PcE74*+si*PcE74*-2 的羽化率显著下降至 ($70.18\% \pm 0.81\%$) ($P < 0.001$)，并且处理组后若螨在后若静伏期出现异常表型，表现为虫体颜色加深，且保持静伏姿态，不能产生旧表皮羽化为成螨 (图 4, 5)。表明 *PcE74* 在后若螨到成螨的羽化过程中起重要作用。

3 讨论

在节肢动物中，dsRNA 和 siRNA 诱导 RNAi 的途径已被广泛应用。dsRNA 被核糖核酸酶 III 家族的 Dicer 切割成 siRNA 后，与蛋白质 Argonaute 结合，随后与酶等其他蛋白质形成沉默复合物使目标 mRNA 降解 (Tolia and Joshua-Tor, 2007; Niu *et al.*, 2018)。在二斑叶螨中，siRNA 介导的 *Dll* (Distal-less) 基因功能沉默比 dsRNA 介导的更有效 (Khila and Grbić, 2007)。双链 siRNA 的干扰效率受靶位点核苷酸序列和

图 3 RNA 干扰对 *PcE74* 的抑制作用Fig. 3 Gene repression effect of RNAi on *PcE74*

A. 饲喂 dsRNA 对 *PcE74* 的抑制作用; B. 饲喂 siRNA 对 *PcE74* 的抑制作用;

C. 饲喂 dsRNA+siRNA 对 *PcE74* 的抑制作用。

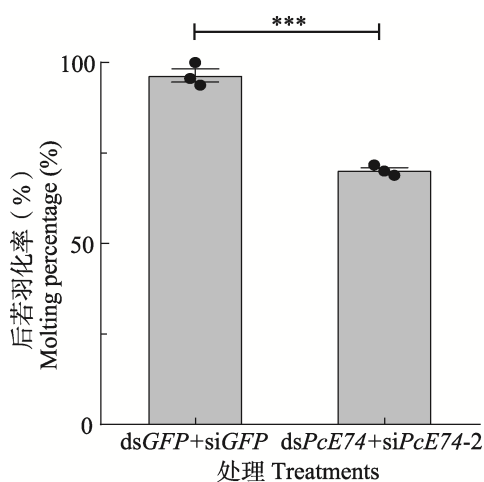
图中数据为平均值±标准误, ns 表示无显著差异 ($P > 0.05$, Student's *t* 检验),

不同字母表显著差异 ($P < 0.05$, Tukey's 多重比较检验)。

A. Gene repression effect of feeding dsRNA on *PcE74*; B. Gene repression effect of feeding siRNA on *PcE74*;

C. Gene repression effect of feeding dsRNA+siRNA on *PcE74*.

Data in figure are mean ± SE, ns indicates no significant difference ($P > 0.05$, Student's *t*-test), different letters above the bars mean significant difference ($P < 0.05$, Tukey's multiple range test).

图 4 RNA 干扰 *PcE74* 对柑桔全爪螨羽化率的影响Fig. 4 Effect of RNA interference *PcE74* on molting percentage

图中数据为平均值±标准误, ***表示不同处理间存在极显著差异 ($P < 0.001$, Student's *t* 检验)。

Data are mean±SE. *** indicates extremely significant difference ($P < 0.001$, Student's *t*-test).

靶标 RNA 结构的影响 (Elbashir, 2001)。本研究中, 预先设计的 2 条 siRNA 候选序列均作用

于 *PcE74* 的 CDS 区, 但 siPcE74-2 的干扰效果更明显, 原因可能在于 siPcE74-1 和 siPcE74-2 针对的基因靶点不同, 导致 RNAi 效率有差异。利用昆虫细胞系 (*Spodoptera frugiperda*, Sf 21) 转染斜纹夜蛾幼虫基因 *APN* 的 dsRNA 或 siRNA 后发现, 虽然 siRNA 诱导的沉默比 dsRNA 诱导的沉默更有效, 但仍不能完全抑制靶基因的转录, siRNA 浓度提高至 18 nmol/L 后抑制水平仍不会增加 (Agrawal *et al.*, 2004)。本研究中, 利用饲喂法, 对柑桔全爪螨后若螨 dsPcE74 或 siPcE74 单独处理虽有一定沉默效率, 但相较对照组并未有显著性, 而 dsPcE74+siPcE74 组合处理后, 干扰效率显著高于其它处理。同样, dsPcE74+siPcE74 处理显著抑制后若螨的羽化率。因此, 我们推测 siRNA 的存在导致 dsRNA 效应在基因沉默效率和生物学表型水平上得到强化。在鳞翅目模式昆虫家蚕 *Bombyx mori* 中, 与长 dsRNA 相比, 注射 siRNA 诱导了更显著的 RNAi 效应 (Yamaguchi *et al.*, 2011)。长 dsRNA

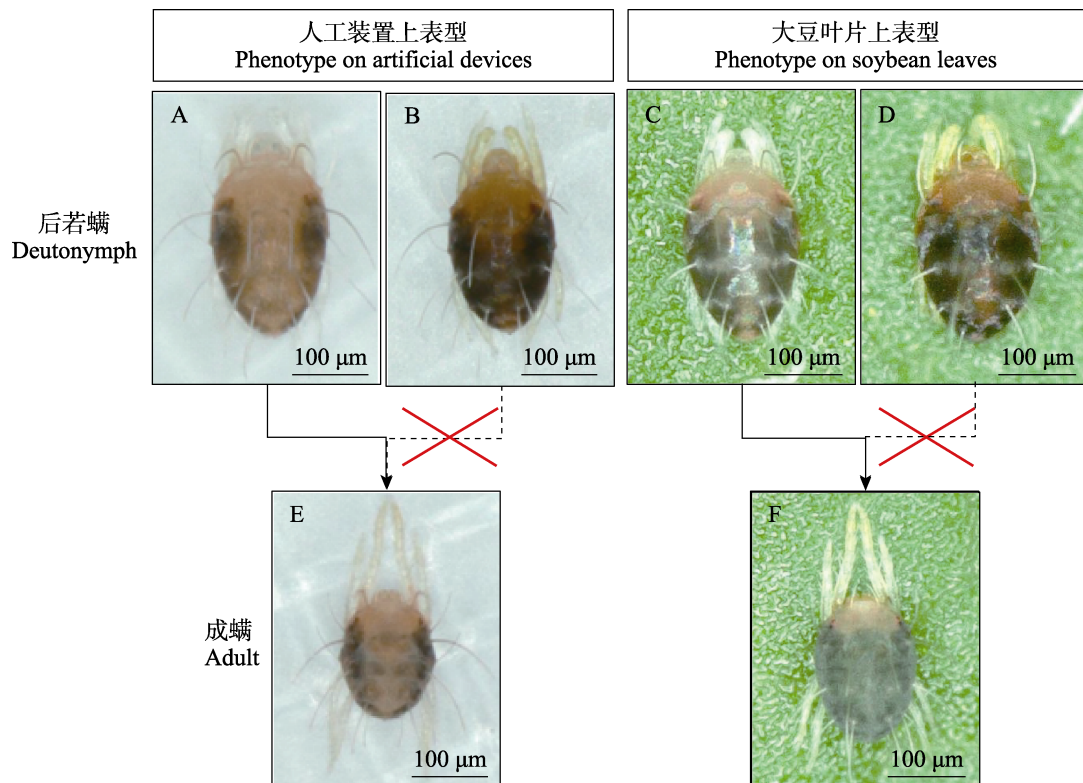


图5 RNA干扰 *PcE74* 后的柑桔全爪螨后若螨异常表型

Fig. 5 Abnormal phenotypes of deutonymph following RNAi against *PcE74*

- A. 人工装置上对照组 (dsGFP, siGFP 和 dsGFP+siGFP) 后若螨正常表型; B. 人工装置上处理组 (dsPcE74, siPcE74 和 dsPcE74+siPcE74) 后若螨异常表型; C. 大豆叶片上对照组 (dsGFP, siGFP 和 dsGFP+siGFP) 后若螨正常表型; D. 大豆叶片上处理组 (dsPcE74, siPcE74 和 dsPcE74+siPcE74) 后若螨异常表型; E. 人工装置上初羽化成螨; F. 大豆叶片上初羽化成螨。

A. Normal phenotype of deutonymph after control groups (dsGFP, siGFP and dsGFP+siGFP) on artificial device; B. Abnormal phenotype of deutonymph after treatment groups (dsPcE74, siPcE74 and dsPcE74+siPcE74) on artificial device; C. Normal phenotype of deutonymph after control groups (dsGFP, siGFP and dsGFP+siGFP) on soybean leaves; D. Abnormal phenotype of deutonymph after treatment groups (dsPcE74, siPcE74 and dsPcE74+siPcE74) on soybean leaves; E. Initial molting adult on artificial devices; F. Initial molting adult on soybean leaves.

前体产生的 siRNA 靶序列通过扩大覆盖率, 从而提高切割片段对目标基因不同靶位点的干扰机会 (Bensoussan *et al.*, 2020)。我们推测外源 siRNA 诱导了更强烈的生物体 RNAi 效应, 同时加强了识别切割 dsRNA 的效率, 进一步增加了 RNAi 分子数量, 从而大幅提高 RNAi 效率。目前研究表明, RNAi 效率受供试对象、靶基因特性、dsRNA 和 siRNA 分子长度、dsRNA 和 siRNA 递送方式及其他多种因素的影响 (Upadhyay *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2018)。虽然螨类 RNAi 的具体机制尚不完全清楚, 但本研究可在实际应用中为提高螨类 RNAi 效率提供新思路。

昆虫的变态发育受类固醇激素蜕皮激素控

制, 转录调控对蜕皮激素的合成十分重要 (Ou and King-Jones, 2013)。作为昆虫 20E 直接诱导的早期转录因子, *E74* 在蜕皮激素信号传导中有重要调控功能 (de La Fuente *et al.*, 2022)。本研究表明, *PcE74* 在柑桔全爪螨后若螨发育到成螨过程中起重要调控功能。在褐飞虱中, *E74* 下调导致若虫羽化率显著降低 (Zhang *et al.*, 2022b)。在马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* 中, RNAi 处理 *E74* 后, 大多数 4 龄幼虫不能蜕皮, 少数发育期延长且蛹形态异常 (Xu *et al.*, 2018)。然而, 在叶螨中, 尚未明确 *E74* 通过调控哪些下游应答基因来参与叶螨蜕皮激素 Ponasterone A 信号传导的分子机制。目前在昆虫中已有研究证

实, *E74* 与相关基因互作调控昆虫生长发育。例如, 在果蝇中, *E74* 和 *BR-C* 被蜕皮激素直接诱导并编码调控下游基因表达 (Fletcher and Thummel, 1995)。在埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 雌蚊中, 通过酵母双杂交和免疫共沉淀分析证明了 *E74* 和 *Vg* 基因直接的互作关系 (Sun *et al.*, 2005)。此外, 与单独突变 *BR* 相比, 烟草天蛾 *Manduca sexta* *E74* 突变诱导了更显著的生物学表型, 暗示两者在遗传水平可能相互作用, 共同调控发育过程 (Stilwell *et al.*, 2003)。在柑桔全爪螨中, *E74* 是否存在类似的基因互作机制有待进一步探究。

柑桔全爪螨作为危害严重的农业害螨, 目前主要采用化学防治, 由于农药过度使用和柑桔全爪螨自身生物学特性, 该螨已对多种杀螨剂产生抗药性 (Yu *et al.*, 2020; Pan *et al.*, 2023)。近年来 RNAi 在害虫防治策略中展现出较大应用前景 (Gao *et al.*, 2020)。本研究利用 RNAi 技术明确沉默 *PcE74* 显著抑制柑桔全爪螨后若螨的正常发育, 导致其无法羽化而死亡, 揭示了转录因子 *E74* 在柑桔全爪螨变态发育中扮演重要角色, 有望成为害螨防控的潜在靶点。

参考文献 (References)

- Agrawal N, Malhotra P, Bhatnagar RK, 2004. siRNA-directed silencing of transgene expressed in cultured insect cells. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 320(2): 428–434.
- Benrabaa S, Orchard I, Lange AB, 2023. A critical role for ecdysone response genes in regulating egg production in adult female *Rhodnius prolixus*. *PLoS ONE*, 18(3): e0283286.
- Bensoussan N, Dixit S, Tabara M, Letwin D, Milojevic M, Antonacci M, Jin PY, Arai Y, Bruinsma K, Suzuki T, Fukuhara T, Zhurov V, Geibel S, Nauen R, Grbic M, Grbic V, 2020. Environmental RNA interference in two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*, reveals dsRNA processing requirements for efficient RNAi response. *Scientific Report*, 10(1): 19126.
- Bonneton F, Zelus D, Iwema T, Robinson-Rechavi M, Laudet V, 2003. Rapid divergence of the ecdysone receptor in Diptera and Lepidoptera suggests coevolution between ECR and USP-RXR. *Molecular Biology and Evolution*, 20(4): 541–553.
- Burtis KC, Thummel CS, Jones CW, Karim FD, Hogness DS, 1990. The *Drosophila* 74EF early puff contains *E74*, a complex ecdysone-inducible gene that encodes two ets-related proteins. *Cell*, 61(1): 85–99.
- de La Fuente M, Folgar RM, Martínez-Paz P, Cortés E, Martínez-Guitarte JL, Morales M, 2022. Effect of environmental stressors on the mRNA expression of ecdysone cascade genes in *Chironomus riparius*. *Environmental Science and Pollution Research International*, 29(7): 10210–10221.
- Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T, 2001. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO Journal*, 20(23): 6877–6888.
- Fletcher JC, Thummel CS, 1995. The *Drosophila* *E74* gene is required for the proper stage- and tissue-specific transcription of ecdysone-regulated genes at the onset of metamorphosis. *Development*, 121(5): 1411–1421.
- Gao L, Wang YL, Fan YH, Abbas M, Ma EB, Cooper AMW, Silver K, Zhu KY, Zhang JZ, 2020. Multiple argonaute family genes contribute to the siRNA-mediated RNAi pathway in *Locusta migratoria*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 170(6): 104700.
- Ghazy NA, Okamura M, Sai K, Yamakawa S, Hamdi FA, Grbic V, Suzuki T, 2020. A leaf-mimicking method for oral delivery of bioactive substances into sucking arthropod herbivores. *Frontiers in Plant Science*, 11: 1218.
- Gotoh T, Kitashima Y, Adachi I, 2004. Geographic variation of susceptibility to acaricides in two spider mite species, *Panonychus osmanthi* and *P-citri* (Acari: Tetranychidae) in Japan. *International Journal of Acarology*, 30(1): 55–61.
- Grbić M, Van Leeuwen T, Clark RM, Rombauts S, Rouzé P, Grbić V, Osborne EJ, Dermauw W, Ngoc PCT, Ortego F, Hernández-Crespo P, Diaz I, Martinez M, Navajas M, Sucena É, Magalhães S, Nagy L, Pace RM, Djuranović S, Smagghe G, Iga M, Christiaens O, Veenstra JA, Ewer J, Villalobos RM, Hutter JL, Hudson SD, Velez M, Yi SV, Zeng J, Pires-Dasilva A, Roch F, Cazaux M, Navarro M, Zhurov V, Acevedo G, Bjelica A, Fawcett JA, Bonnet E, Martens C, Baele G, Wissler L, Sanchez-Rodriguez A, Tirry L, Blais C, Demeestere K, Henz SR, Gregory TR, Mathieu J, Verdon L, Farinelli L, Schmutz J, Lindquist E, Feyereisen R, Van De Peer Y, 2011. The genome of *Tetranychus urticae* reveals herbivorous pest adaptations. *Nature*, 479(7374): 487–492.
- Guo XJ, Wang Y, Sinakevitch I, Lei H, Smith BH, 2018. Comparison of RNAi knockdown effect of tyramine receptor 1 induced by dsRNA and siRNA in brains of the honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Insect Physiology*, 111: 47–52.

- Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ, 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, 404(6775): 293–296.
- Han BW, Wang W, Li CJ, Weng ZP, Zamore PD, 2015. Noncoding RNA piRNA-guided transposon cleavage initiates Zucchini-dependent, phased piRNA production. *Science*, 348(6236): 817–821.
- Hornok S, Csorba A, Kováts D, Csörgő T, Hunyadi A, 2019. Ecdysteroids are present in the blood of wild passerine birds. *Scientific Reports*, 9(1): 17002.
- Khila A, Grbić M, 2007. Gene silencing in the spider mite *Tetranychus urticae*: dsRNA and siRNA parental silencing of the Distal-less gene. *Development Genes and Evolution*, 217(3): 241–251.
- Li G, Niu JZ, Zotti M, Sun QZ, Zhu L, Zhang J, Liao CY, Dou W, Wei DD, Wang JJ, Smagghe G, 2017. Characterization and expression patterns of key ecdysteroid biosynthesis and signaling genes in a spider mite (*Panonychus citri*). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 87: 136–146.
- Liao CY, Zhang K, Niu JZ, Ding TB, Zhong R, Xia WK, Dou W, Wang JJ, 2013. Identification and characterization of seven glutathione S-transferase genes from citrus red mite, *Panonychus citri* (McGregor). *International Journal of Molecular Sciences*, 14(12): 24255–24270.
- Migeon A, Nouguié E, Dorkeld F, 2011. Spider mites web: A comprehensive database for the Tetranychidae. (<https://www1.montpellier.inra.fr/CBGP/spmweb>).
- Nandety RS, Kuo YW, Nouri S, Falk BW, 2015. Emerging strategies for RNA interference (RNAi) applications in insects. *Bioengineered*, 6(1): 8–19.
- Niu JZ, Shen GM, Christiaens O, Smagghe G, He L, Wang JJ, 2018. Beyond insects: Current status and achievements of RNA interference in mite pests and future perspectives. *Pest Management Science*, 74(12): 2680–2687.
- Ou QX, King-Jones K, 2013. What goes up must come down: Transcription factors have their say in making ecdysone pulses. *Current Topics in Development Biology*, 103: 35–71.
- Pan D, Xia MH, Luo QJ, Liu XY, Li CZ, Yuan GR, Wang JJ, Dou W, 2023. Resistance of *Panonychus citri* (McGregor) (Acari: Tetranychidae) to pyridaben in China: Monitoring and fitness costs. *Pest Management Science*, 79(3): 996–1004.
- Sharrocks AD, 2001. The ETS-domain transcription factor family. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(11): 827–837.
- Song HF, Zhang JQ, Li DQ, Cooper AMW, Silver K, Li T, Liu XJ, Ma EB, Zhu KY, Zhang JZ, 2017. A double-stranded RNA degrading enzyme reduces the efficiency of oral RNA interference in migratory locust. *Insect Biochemistry Molecular Biology*, 86: 68–80.
- Stilwell GE, Nelson CA, Weller J, Cui HY, Hiruma K, Truman JW, Riddiford LM, 2003. E74 exhibits stage-specific hormonal regulation in the epidermis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Development Biology*, 258(1): 76–90.
- Sun GQ, Zhu JS, Chen L, Raikhel AS, 2005. Synergistic action of E74B and ecdysteroid receptor in activating a 20-hydroxyecdysone effector gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 102(43): 15506–15511.
- Thummel CS, 1996. Flies on steroids: *Drosophila* metamorphosis and the mechanisms of steroid hormone action. *Trends in Genetics*, 12(8): 306–310.
- Tolia NH, Joshua-Tor L, 2007. Slicer and the argonautes. *Nature Chemical Biology*, 3(1): 36–43.
- Upadhyay SK, Dixit S, Sharma S, Singh H, Kumar J, Verma PC, Chandrashekar K, 2013. siRNA machinery in whitefly (*Bemisia tabaci*). *PLoS ONE*, 8(12): e83692.
- Xu QY, Meng QW, Deng P, Fu KY, Guo WC, Li GQ, 2018. Requirement of *Leptinotarsa decemlineata* gene within the 74EF puff for larval-pupal metamorphosis and appendage growth. *Insect Molecular Biology*, 27(4): 439–453.
- Yamaguchi J, Mizoguchi T, Fujiwara H, 2011. siRNAs induce efficient RNAi response in *Bombyx mori* embryos. *PLoS ONE*, 6(9): e25469.
- 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 SJ, Cong L, Liu HQ, Ran C, 2020. Genetic analysis and screening of detoxification-related genes in an amitraz-resistant strain of *Panonychus citri*. *Bulletin of Entomological Research*, 110(6): 743–755.
- Zhang B, Yao B, Li X, Jing T, Zhang S, Zou H, Zhang G, Zou C, 2022a. E74 knockdown represses larval development and chitin synthesis in *Hyphantria cunea*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 187:105216.
- Zhang Y, Zheng S, Li Y, Jiang X, Gao H, Lin X, 2022b. The function of *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae) E74 and its interaction with betaFtz-F1. *Journal of Insect Science*, 22(3): 15.
- Zhu KY, Palli SR, 2020. Mechanisms, applications, and challenges of insect RNA interference. *Annual Review of Entomology*, 65: 293–311.
- Zotti M, Dos Santos EA, Cagliari D, Christiaens O, Taning CNT, Smagghe G, 2018. RNA interference technology in crop protection against arthropod pests, pathogens and nematodes. *Pest Management Science*, 74(6): 1239–1250.