

意大利蝗 *Transformer 2* 基因鉴定及表达分析*

张韦萱** 蒋思涵 扈鸿霞 赵娜 季荣 叶小芳***

(新疆师范大学生命科学学院, 中亚区域跨境有害生物联合控制国际研究中心, 新疆特殊环境物种保护与调控生物学实验室, 新疆特殊环境物种多样性应用与调控重点实验室, 乌鲁木齐 830054)

摘要 【目的】 *Transformer 2* (*Tra2*) 基因作为多种昆虫的性别决定关键基因, 与 *Tra* 协同调控下游 *Dsx* 基因进行性特异性剪接, 从而控制雌雄分化。本研究旨在鉴定意大利蝗 *Calliptamus italicus* 的 *Tra2* 基因结构特征及其在不同发育时期的表达模式。【方法】 基于意大利蝗卵的转录组数据库以及同源性比对结果, 克隆了 *Tra2* 的开放阅读框 (Open reading frame, ORF) 序列片段, 并进行结构预测、多重序列比对以及进化树分析; 采用 qRT-PCR 技术检测意大利蝗卵期、不同发育龄期及成虫精巢和卵巢的 *Tra2* 表达量。【结果】 意大利蝗 *Tra2* 基因 ORF 序列含 672 bp, 编码 223 个氨基酸, *Tra2* 编码的蛋白具有 RRM-TRA 结构域及特有 Linker 区。系统进化关系表明, 意大利蝗 *Tra2* 编码的蛋白与鳞翅目亲缘关系最接近。*Tra2* 在意大利蝗不同发育时期均有表达, 在蝗卵发育过程中, 阶段 I 与阶段 VIII 表达量较高; 蝗蛹与成虫的 *Tra2* 表达量均为雌性显著高于雄性 ($P < 0.05$)。【结论】 明确了意大利蝗的 *Tra2* 基因结构特征, 且雌虫 *Tra2* 的表达水平显著高于雄性, 说明该基因对雌虫性器官的发育影响大于雄虫, 为深入阐明 *Tra2* 在意大利蝗性别决定过程的调控作用奠定了基础。

关键词 意大利蝗; *Tra2*; 结构特征; 表达模式; 性别决定

Isolation and expression of the *Calliptamus italicus Transformer 2* gene

ZHANG Wei-Xuan** JIANG Si-Han HU Hong-Xia ZHAO Na JI Rong YE Xiao-Fang***

(College of Life Science, Xinjiang Normal University, International Center for the Collaborative Management of Cross-border Pest in Central Asia, Xinjiang Key Laboratory of Special Species Conservation and Regulatory Biology, Key Laboratory of Special Environment Biodiversity Application and Regulation in Xinjiang, Urumqi 830054, China)

Abstract 【Aim】 To identify structural characteristics of the *Transformer 2* (*Tra2*) gene, a key gene involved in sex determination in many insects, and quantify its expression in different developmental stages of *Calliptamus italicus*. 【Methods】 Based on the transcriptome database of *C. italicus* eggs and a comparison of homologous genes in other species, the open reading frame (ORF) sequence fragment of *Tra2* was cloned. The predicted structure, multiple sequence alignment and a phylogenetic tree of the cloned sequence were obtained using bioinformatic software. qRT-PCR was used to detect *Tra2* expression in eggs, nymphs, and in the testes and ovaries of adult *C. italicus*. 【Results】 The ORF sequence of the *Tra2* gene contains 672 bp and encodes 223 amino acids. The protein encoded by *Tra2* has an RRM-TRA domain and a unique linker region. A phylogenetic tree indicates that the protein encoded by *Tra2* in *C. italicus* is most closely related to homologous lepidopteran proteins. *Tra2* was expressed in different developmental stages of *C. italicus* but expression was the highest during stage I and VIII of egg development. *Tra2* expression was significantly higher in females than in males in both nymphs and adults ($P < 0.05$). 【Conclusion】 *Tra2* in *C. italicus* is closely related to homologous genes in other lepidopteran species. Expression in females is significantly higher than in males, suggesting that this gene has greater influence on the development of female than male sexual organs. These results lay a foundation for further elucidating the role of *Tra2* in sex determination in *C. italicus*.

Key words *Calliptamus italicus*; *Tra2*; structure characteristics; expression pattern; sex determination

*资助项目 Supported projects: 新疆维吾尔自治区天山创新团队计划 (2024D14006); 新疆维吾尔自治区天山英才青年拔尖人才项目 (20243123638); 新疆师范大学青年拔尖人才项目 (XJNUQB2022-30)

**第一作者 First author, E-mail: 1240832334@qq.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: 44894047@qq.com

收稿日期 Received: 2024-06-14; 接受日期 Accepted: 2025-01-12

性别决定是影响昆虫生殖发育的关键因素。昆虫在生物界中种群数量多、分布广且适应力强,故而在长期进化中形成了复杂多样的性别决定机制,主要包括初始信号、决定因子和两性基因(彭威和翟宗昭, 2021; 霍梁霄, 2023)。多样的性别决定机制导致上游初始信号极其丰富,但 *Transformer* (*Tra*)、*Transformer 2* (*Tra2*) 与 *Doublesex* (*Dsx*) 等下游基因在不同物种间仍具有保守性(郭利桃, 2016)。*Tra2* 编码的蛋白属 SR 蛋白家族 (Serine/Arginine-rich protein family), 该家族能够对目的基因外显子进行选择性地剪接并利用剪接调节蛋白, 典型特征为具有 RNA 结合基序 (RNA recognition motif, RRM) 和两侧富集精氨酸/丝氨酸结构域 (Arginine/Serine rich domain, RS), 其中, RS 结构域可促进蛋白质-蛋白质互作(刘飘, 2021; 刘雅婷等, 2023)。*Tra2* 还参与 *Tra* 的自调控作用并与其结合形成 *Tra/Tra2* 复合体, 与 *Tra* 协同发挥作用 (Gempe and Beye, 2011)。目前已知 *Tra2* 参与了双翅目、膜翅目和鞘翅目一些昆虫的性别决定, 在雌、雄两性中均有表达, 是重要的调控因子 (Salvemini *et al.*, 2009; Shukla and Pallisr, 2013; 王子龙等, 2019)。如在果蝇中 *Tra/Tra2* 复合体激活 *Dsx* pre-mRNA 的雌性特异性剪切形式, 产生 DSX 雌性蛋白, 推进雌性二型特征发育; 干扰其 *Tra2*, 雌性则发育成雄虫表型, 且导致不育 (Burghardt *et al.*, 2005; Schetelig *et al.*, 2012)。

意大利蝗 *Calliptamus italicus* 是新疆草原的优势害虫, 在野外一年发生 1 代, 以卵越冬, 繁殖能力极强, 在繁殖期产卵量可达 280 块/m² (陈永林, 2000), 严重危害新疆草场。性别决定与分化是影响蝗虫生殖、发育和种群结构的关键因素, 但迄今为止, 有关蝗虫性别决定研究较少, 且意大利蝗 *Tra2* 基因未见报道。本研究通过克隆 *Tra2* 基因的开放阅读框 (Open reading frame, ORF) 序列, 分析氨基酸序列并检测意大利蝗不同发育时期 *Tra2* 的表达量, 明确该基因的结构特征以及表达模式, 有助于阐明意大利蝗的性别决定分子机制, 为开发针对该物种的种群遗传控制新方法奠定基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集与处理

于新疆玛纳斯蝗区采集意大利蝗, 采集的蝗蛹与初羽化成虫按照龄期及雌雄分组, -80 °C 冻存。采集的雌雄成虫饲养于虫笼内, 以黄花苜蓿 *Medicago falcata* 饲喂, 笼内放置装满砂壤土的塑料花盆, 供成虫交配后产卵。筛土收集卵囊, 并埋于室外土壤中自然孵化, 定期取蝗卵于体式显微镜 (SMZ745T, 日本尼康) 下解剖观察。根据王香香等 (2019) 的蝗卵发育阶段划分标准冻存不同发育阶段的蝗卵, 初羽化成虫分别取精巢和卵巢于 -80 °C 冻存。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取与 cDNA 合成 取不同龄期蝗蛹 (3-5 只混合样本)、不同发育阶段蝗卵 (5-8 粒混合样本) 和成虫精巢、卵巢 (3-5 个混合样本), 液氮研磨后取 100 mg 粉末用 Trizol Reagent (美国, Invitrogen) 提取总 RNA, NanoDrop 2000 测定 RNA 浓度和纯度, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其质量, 质量合格的 RNA 使用反转录试剂盒 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (日本, Takara) 合成 cDNA 于 -80 °C 冻存。

1.2.2 意大利蝗 *Tra2* 基因 ORF 片段扩增 根据部分已报道的昆虫 *Tra2* 基因为引索, 在意大利蝗卵转录组数据库进行 Tblastn 同源性比对筛选。将 *Tra2* 基因分为两个片段进行扩增, 使用 Primer 5.0 软件相应设计两段引物以扩增 *Tra2* 基因 ORF 区 (表 1), 以 1.2.1 中获得的 cDNA 为模板。50 μL PCR 反应体系如下: ddH₂O 20 μL, 上下游引物各 2 μL (10 μmol/L), 2× Taq PCR Mix 25 μL, DNA 模板 1 μL, 反应条件为首循环: 95 °C 变性 5 min; 30 个循环: 95 °C 变性 30 s, 退火 30 s (片段 1 = 51 °C; 片段 2 = 63 °C), 72 °C 延伸 (片段 1 = 51 s; 片段 2 = 15 s); 末循环: 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后割取目的片段, 使用 EZ-10 柱式 DNA 回收试剂盒 (上海, 生工) 对目的片段进行回收, 并与 pMD19-T 载体连接 (日本, Takara), 4 °C

过夜后转入大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞中转化, 涂板培养后隔日进行蓝白斑筛选, 挑选合适的单菌落扩大培养并进行菌液

PCR, 以检测 PCR 片段是否插入, 选取检测合格的菌液样品送往生工生物工程(上海)股份有限公司测序。测序结果与转录组数据比对核验。

表 1 引物信息
Table 1 Primer information

引物 Primers	引物序列 (5'-3') Primer sequences (5'-3')	扩增片段长度 (bp) Amplified fragment length (bp)
片段 1-F Section 1-F	TTAAGCATAGCCCAAGTCATAGTG	842
片段 1-R Section 1-R	ATAGCAGATTATCCACGAGTAGCC	
片段 2-F Section 2-F	GTGGTGGAGGCTACAGAGG	238
片段 2-R Section 2-R	GGCGCTTAATATCGACCTG	

1.2.3 意大利蝗 *Tra2* 的生物信息学分析 使用 NCBI 的 ORF Finder 预测开放阅读框并翻译氨基酸序列 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>); 使用 ExPASy 在线软件分析等电点、分子量、氨基酸组成、亲疏水区及理化性质预测 (<https://www.expasy.org/>); 使用 TMHMM-2.0 在线软件进行跨膜结构域分析 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>); 使用 SignalP-5.0 在线软件进行信号肽预测与磷酸位点预测 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>; <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>); 使用 SOPMA 在线软件进行二级结构分析 (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl), 用 MEGA11.0 与 GeneDoc 进行多重序列比对, 用 MEGA11.0 中的邻接法 (Neighbor-Joining, NJ)

构建系统发育树, 重复运行 1 000 次。

1.2.4 意大利蝗 *Tra2* 基因的表达谱分析 使用 Primer 5.0 软件设计 *Tra2* 基因的定量扩增引物 (表 2), 采用 qRT-PCR 技术检测意大利蝗卵期、蝗蛹不同发育龄期和成虫精巢、卵巢的 *Tra2* 基因相对表达量, 使用试剂盒 TB Green[®] Premix Ex Taq[™] II (日本, Takara) 进行 PCR 反应。以 1.2.1 中获得的 cDNA 为模板, β -actin 为内参基因, 每个样品进行 3 次生物学重复, 2 次技术重复。15 μ L qRT-PCR 反应体系如下: ddH₂O 5.3 μ L, 上下游引物各 0.6 μ L (10 μ mol/L), 2 \times TB Green[®] Premix Ex Taq[™] II 7.5 μ L, DNA 模板 1 μ L。qRT-PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 59 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 15 s, 40 个循环; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 65 $^{\circ}$ C 60 s, 97 $^{\circ}$ C 1 s, 生成溶解曲线。

表 2 引物信息
Table 2 Primer information

引物 Primers	引物序列 (5'-3') Primer sequences (5'-3')	扩增片段长度 (bp) Amplified fragment length (bp)
<i>Tra2</i> -F	AAATCAAGACGGAGGGT	130
<i>Tra2</i> -R	TGCCGCACAGACATAGA	
β -actin-F	AAGGCATCAGGGTGTGATGG	177
β -actin-R	GCCACCCTAAGCTCGTTGTA	

1.3 数据分析

以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因相对表达量。使用 SPSS 26.0 软件中的单因素方差法 (One-way ANOVA)

分析意大利蝗卵期、蝗蛹不同发育龄期的 *Tra2* 基因表达量差异, 使用独立样本 *t* 检验分析成虫精巢和卵巢的 *Tra2* 基因表达量差异, $P < 0.05$ 代表差异显著。

2 结果与分析

2.1 意大利蝗 *Tra2* 基因 ORF 克隆与序列特征

克隆获得的 ORF 序列命名为 *CiTra2*，具有 672 bp，编码 223 个氨基酸。ExPASy 预测其分子质量为 26.292 kD，等电点 11.30，脂肪系数为 34.08，跨膜区为 0，有信号肽的概率为 0.096%。TRA 2 蛋白质的氨基酸组成中，甘氨酸 (Gly) 占比最低 (11.21%)，精氨酸 (Arg) 占比最高 (18.83%)；具有由 31 个丝氨酸 (Ser)、22 个酪氨酸 (Tyr) 和 9 个苏氨酸 (Thr) 组成的潜在磷酸位点。有 51 个带正电荷和 17 个带负电荷的氨基酸，推测该蛋白带正电；为亲水性蛋白，总平均亲水系数 -1.36，78AA 处疏水性最强，亲水系数为 2.26；210AA 处亲水性最强，亲水系数为 -3.62；不稳定系数计算为 93.43 (>40)，属于不稳定蛋白质。

2.2 意大利蝗 TRA 2 蛋白的结构域与二级结构预测

NCBI-CDD 结果显示 (图 1)，该序列包含

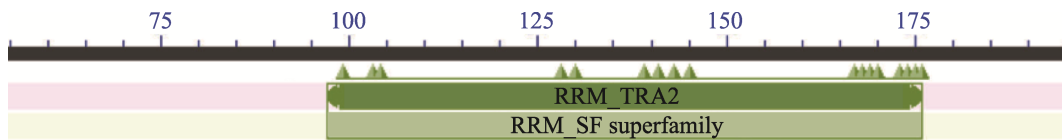


图 1 意大利蝗 TRA2 的保守结构域

Fig. 1 The conserved structure of TRA2 in *Calliptamus italicus*

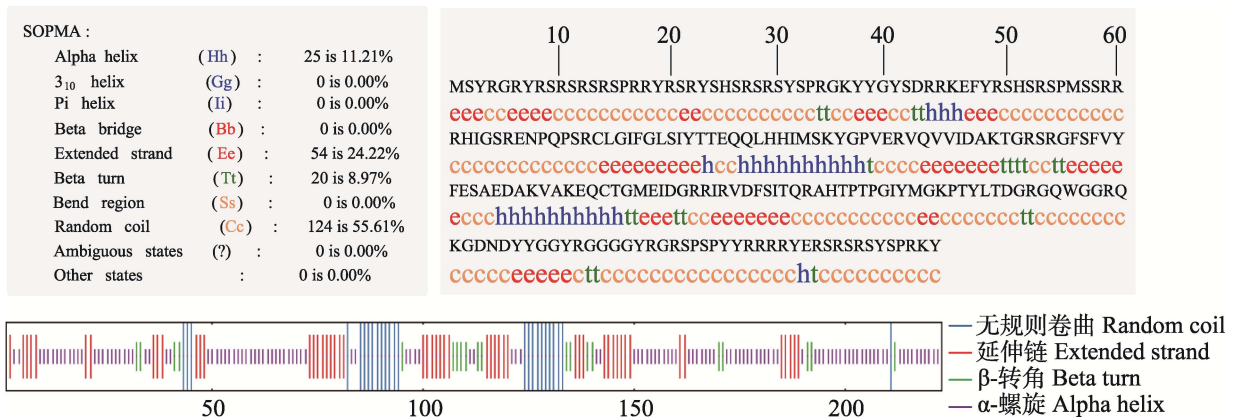


图 2 TRA2 二级结构

Fig. 2 Secondary structure of TRA2

TRA2 特有的保守结构域 RRM-TRA2，表明克隆片段确系意大利蝗 *Tra2* 基因的部分序列。TRA2 蛋白的二级结构分析结果显示，TRA2 蛋白由 α -螺旋 (11.21%)、 β -转角 (8.97%)、延伸链 (24.22%) 和无规则卷曲 (55.61%) 组成 (图 2)。

2.3 意大利蝗系统发育树分析与氨基酸序列比对

2.3.1 系统发育树分析 为明确新克隆获得的 *Tra2* 编码产物与其他物种 *Tra2* 编码产物间的关系，将意大利蝗 TRA2 蛋白与其他昆虫 TRA2 蛋白进行氨基酸序列比对和进化树分析，进化关系分析由昆虫纲 7 个目 13 种昆虫共同构建 (图 3)。结果显示，意大利蝗 TRA2 蛋白与南美沙漠蝗 *Schistocerca americana* 最为接近，鳞翅目的双委夜蛾 *Athetis dissimilis*、家蚕 *Bombyx mori* 和地中海斑螟 *Ephestia kuehniella* 先聚在一起，而后与直翅目聚为一支，但遗传距离稍远，此后依次与鞘翅目、膜翅目、同翅目、半翅目、双翅目实蝇科聚为该进化树的第一基础分支，而第二基础分支仅有双翅目的黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*，与意大利蝗的亲缘关系距离最远。

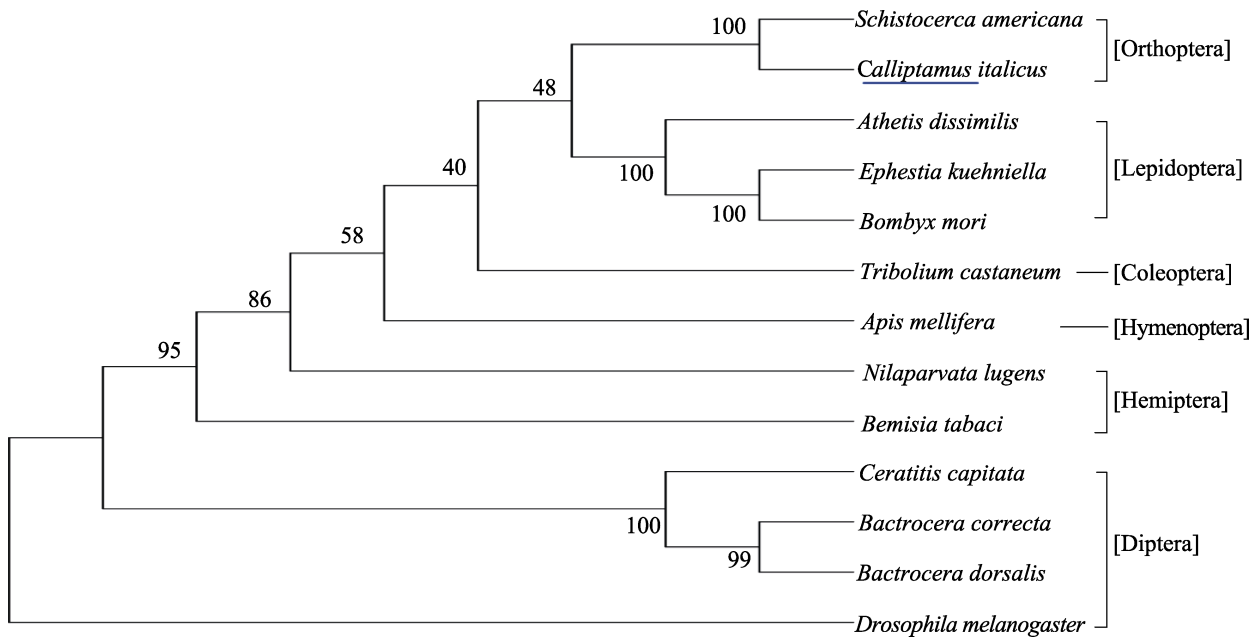


图 3 基于蛋白质序列构建的昆虫 TRA2 的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of TRA2 reconstructed from insects based on protein sequence

带下划线的物种为意大利蝗。图中数字为 Bootstrap 值 (Bootstrap value), 表示该节点的置信度。

The underlined species is the *Calliptamus italicus*. The number in the figure is bootstrap values, indicating the confidence level of the node.

TRA2 的来源 Origin of TRA2 proteins: 直翅目 Orthoptera: 南美沙漠蝗 *Schistocerca americana* [XP-046992601.1]; 鳞翅目 Lepidoptera: 双委夜蛾 *Athetis dissimilis* [WFR85801.1], 地中海斑螟 *Ephestia kuehniella* [CAG7465068.1], 家蚕 *Bombyx mori* [XP-012553369.1]; 鞘翅目 Coleoptera: 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* [KYB25516.1]; 膜翅目 Hymenoptera: 意大利蜜蜂 *Apis mellifera* [KAG9436174.1]; 半翅目 Hemiptera: 褐飞虱 *Nilaparvata lugens* [XP-039297092.1], 烟粉虱 *Bemisia tabaci* [KC333625.1]; 双翅目 Diptera: 地中海实蝇 *Ceratitis capitata* [NP-001266337.1], 番石榴实蝇 *Bactrocera correcta* [QOW08732.1], 橘小实蝇 *Bactrocera dorsalis* [QOW08731.1], 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* [NP-995835.1].

2.3.2 氨基酸序列多重比对 通过与南美沙漠蝗、湿木白蚁 *Zootermopsis nevadensis*、干木白蚁 *Cryptotermes secundus*、长叶异痣螽 *Ischnura elegans*、家蚕、丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis*、赤拟谷盗和意大利蜜蜂的 TRA2 氨基酸序列进行多重序列比对发现, TRA2 中 RNA 识别区域和核糖体蛋白序列高度保守 (图 4)。

2.3.3 *Tra2* 在意大利蝗发育过程精巢、卵巢的表达变化 *Tra2* 参与意大利蝗卵的整个发育过程, 表达量总体呈先降后升的趋势。在蝗卵早期发育的第 I 阶段, *Tra2* 表达量最高, 显著高于卵期其他发育阶段 ($P < 0.05$); 随后 *Tra2* 表达量持续降低, 并在滞育阶段 (第 IV 阶段) 降至最低; 此后 *Tra2* 表达量持续上升, 并在滞育解除后 (阶段 VIII) 显著升高 ($P < 0.05$), 临近孵化时 (阶段

IX) 又显著下降 ($P < 0.05$) (图 5: A)。 *Tra2* 在蝗蛹期均有表达; 1-3 龄蝗蛹间的 *Tra2* 表达量差异不显著 ($P > 0.05$), 4 龄后, 雌虫 *Tra2* 表达量均显著高于同龄雄虫 ($P < 0.05$) (图 5: B)。初羽化雌虫卵巢的 *Tra2* 表达量显著高于初羽化雄虫精巢 ($P < 0.05$) (图 6)。

3 结论与讨论

3.1 意大利蝗 *Tra2* 基因的结构特征分析

TRA2 蛋白隶属 SR 蛋白家族, 作为前体剪接蛋白, 它在选择剪接位点上意义重大 (Li *et al.*, 2019)。本研究中, 意大利蝗 TRA2 蛋白具有与已报道昆虫 TRA2 同样的 RS1、RRM、RS2 和 Linker 区等结构域, 说明 *Tra2* 在不同物种间具

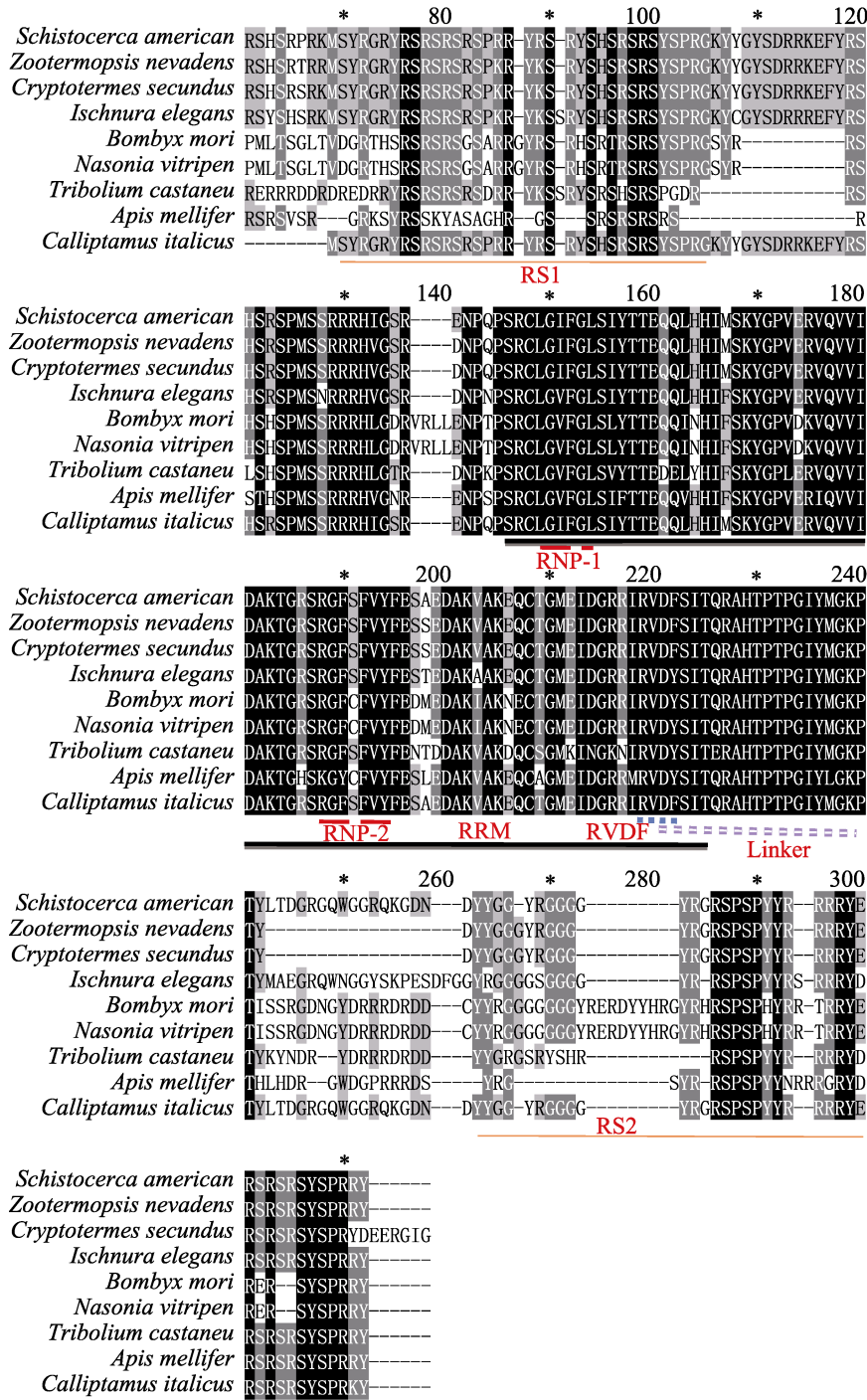


图 4 不同物种 TRA2 氨基酸序列比对

Fig. 4 Alignment of amino acid sequences of TRA2 among species

橘黄色实线为 RS1 和 RS2 结构域；黑色灰色双线为 RRM 结构域；红色短虚线为 RNP1 和 RNP2；蓝色方点为 RVDF；紫色双短横线为 Linker 区。

The red actual line is RS1 and RS2 domains; The thick black line is RRM domains; The red dashed line is RNP1 and RNP2; The blue square dot is RVDF; The purple double short horizontal line is Linker regions.

TRA2 的来源 Origin of TRA2 proteins: *Schistocerca americana*: 南美沙漠蝗; *Zootermopsis nevadensis*: 内华达潮木白蚁; *Cryptotermes secundus*: 干木白蚁; *Ischnura elegans*: 叶异痣螳; *Bombyx mori*: 家蚕; *Nasonia vitripennis*: 丽蝇蛹集金小蜂; *Tribolium castaneum*: 赤拟谷盗; *Apis mellifera*: 意大利蜜蜂; *Calliptamus italicus*: 意大利蝗。

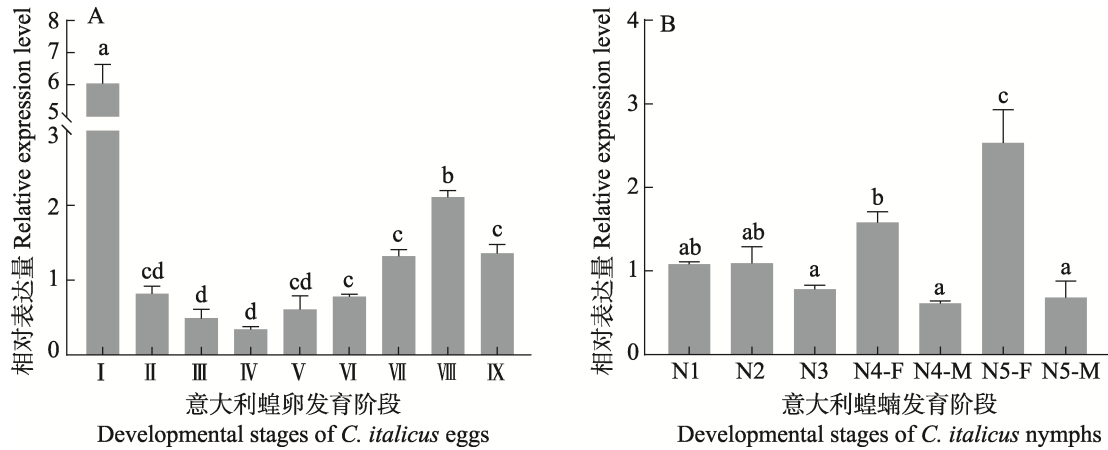


图 5 *Tra2* 在意大利蝗卵期与蝗蛹发育过程的表达水平

Fig. 5 Relative expression of *Tra2* in *Calliptamus italicus* eggs and nymphs

A. 意大利蝗卵期 *Tra2* 表达量; B. 意大利蝗蛹期 *Tra2* 表达量; N: 蝗蛹; F: 雌性; M: 雄性。

柱上不同字母示不同发育阶段的表达量存在显著差异 ($P < 0.05$, 单因素方差分析)。

A. Expression levels of *Tra2* at different developmental stages of *C. italicus* eggs;

B. Expression levels of *Tra2* at different developmental stages of *C. italicus* nymphs. N: Nymph; F: Female; M: Male.

Different letters above bars indicate significant difference in expression

levels among different developmental stages ($P < 0.05$, One-way ANOVA).

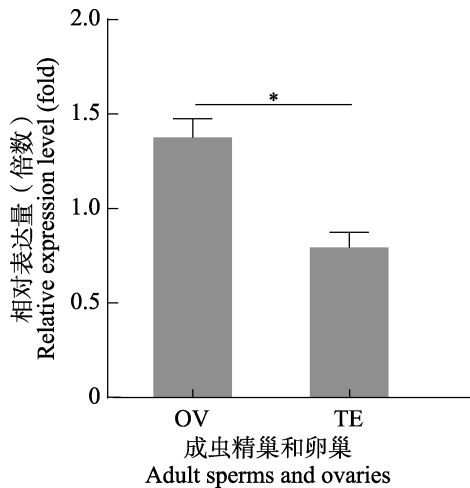


图 6 *Tra2* 在意大利蝗成虫精巢和卵巢组织的表达水平

Fig. 6 Relative expression of *Tra2* in testis, ovary of adults in *Calliptamus italicus*

OV: 卵巢; TE: 精巢。图中星号表示不同组织表达量存在显著差异 ($P < 0.05$, 独立样本 *t* 检验)。

OV: Ovary; TE: Testis. The asterisk in the figure indicates significant differences in expression levels among different groups ($P < 0.05$, independent samples *t*-test).

有一定保守性(刘培文等, 2013; 刘桂清等, 2015; 王晓兰, 2022)。对多个物种 *TRA2* 氨基酸序列比对发现, 两侧 RS1 和 RS2 的不同导致各物种 *TRA2* 氨基酸序列总体长度具有差异, RS 结构域作为富含丝氨酸/精氨酸二肽, 赋予其蛋白质

互作能力, 提示意大利蝗 *TRA2* 蛋白可通过与其他蛋白结合发挥作用 (Amrein *et al.*, 1988; Concha and Scott, 2009)。在 RS1 和 RS2 中间存在 RRM 功能区, 这种“RS+RRM+RS”的结构是 RNA 结合蛋白的典型特征, 说明意大利蝗 *Tra2* 可能具有 RNA 剪接功能 (Glisovic *et al.*, 2008)。RRM 功能区内部包含 RNP1 和 RNP2 结构, 这两个核糖核蛋白域 (Ribonucleoprotein domain, RNP) 用于调控转录后的基因表达 (牛宝龙, 2005)。RRM 结构域在大多数 RNA 结合蛋白中存在, 并非 *TRA2* 蛋白独有。意大利蝗 RRM 结构域下游的 Linker 区是 *TRA2* 蛋白区别于其他蛋白的重要结构域, 目前仅在 *TRA2* 蛋白中发现, 其长度与序列组成都相对保守, 固定的 19 AA 中至少有 8 个保守的氨基酸 (刘培文等, 2013)。改变 Linker 区蛋白序列, 将会影响体细胞的性别分化, Linker 结构的完整对维持 *TRA2* 蛋白功能至关重要 (Martin *et al.*, 2011)。本研究中, 意大利蝗 *TRA2* 的 Linker 区至少有 17 个保守氨基酸, 进一步证实 *TRA2* 蛋白结构在昆虫纲内高度保守。对多种昆虫的 *TRA2* 蛋白进行系统进化关系分析, 结果显示意大利蝗的 *TRA2* 与双翅目昆虫不仅亲缘关系最远, 还表现出实质性

的分化, 其功能可能与鳞翅目昆虫更为相近。

3.2 意大利蝗 *Tra2* 的表达模式研究

在昆虫的漫长进化过程中, 随着新物种的形成, 性别决定通路中不断有新的基因随进化被更替。*Tra2* 的功能与结构都相对保守, 在多种昆虫的性别决定中, *Tra2* 联合上游因子对 *Dsx* 进行性别特异性剪接并产生性别特异性蛋白, 进而促进雌雄二型性的发育 (曾秀丹, 2019)。

在瓜实蝇 *Bactrocera cucurbifae* 和橘小实蝇中, *Tra2* 具有母体遗传的表达特性, 在卵发育初期呈高表达 (彭威, 2018; 曾秀丹, 2019)。本研究中, 意大利蝗卵期第 I 阶段的 *Tra2* 表达量显著高于卵期其他发育阶段, 推测意大利蝗中 *Tra2* 同样具有母体遗传特性。*Tra2* 表达量在整个滞育期都处于低表达水平, 推测是因为滞育期能量代谢降低, 发育停滞所致。研究表明, *Tra2* 在胚胎发育中不可或缺, 敲低蜜蜂胚胎 *Tra2* 可导致胚胎在 70 h 后死亡 (Nissen *et al.*, 2012)。滞育解除后意大利蝗卵恢复发育, *Tra2* 在滞育后期的高表达可能是为了维持胚胎发育和虫体器官表型形成。

4 龄后的蝗蛹, *Tra2* 为雌性显著高表达, 且表达量随蝗蛹发育逐渐升高。在黑腹果蝇、香梨优斑螟 *Euzophera pyriella* 和橘小实蝇的幼虫发育晚期同样发现 *Tra2* 表达量显著上升, 与本研究结果一致 (王慧超等, 2003; 彭威, 2018; 贺鹏鹏, 2022)。果蝇幼虫发育晚期的 *Tra/Tra2* 复合体剪接 *Dsx* 并产生雌雄特异性产物, 其特异的剪接体表达量变化代指果蝇体内蛋白的含量变化 (王慧超等, 2003)。意大利蝗蛹在 4 龄后其外生殖器表型差异明显, 推测此时 *Tra2* 表达量升高是为了产生更多性别特异蛋白, 进一步调控其靶分子以促进性别二态性发育, 从而形成稳定的雌雄二型性。在初羽化的意大利蝗成虫中 *Tra2* 在卵巢的表达量显著高于精巢, 可能是因为 *Tra2* 对雌性性器官发育的影响大于雄虫, 这与 *Tra2* 在香梨优斑螟成虫雌雄腹部表达差异的结果一致 (贺鹏鹏, 2022)。

综上, 本研究克隆得到的意大利蝗 *Tra2* ORF 序列具有 TRA2 蛋白的特有结构域, 说明

其确为意大利蝗 *Tra2* 基因的一部分, 且 TRA2 蛋白结构在昆虫纲内保守。在意大利蝗整个发育过程均表达 *Tra2*, 且雌性显著高于雄性, 说明 *Tra2* 的表达对雌性性器官的发育影响可能大于雄虫, 因而形成稳定的雌雄二型性。本研究仅对意大利蝗 *Tra2* 的序列结构和表达模式进行了分析, 还需进一步对其进行功能验证, 以明确该基因参与意大利蝗性别调控的具体功能, 为最终揭示意大利蝗性别决定机制奠定基础。

参考文献 (References)

- Amrein H, Gorman M, Nöthiger R, 1988. The sex-determining gene *tra-2* of *Drosophila* encodes a putative RNA binding protein. *Cell*, 55(6): 1025–1035.
- Burghardt G, Hediger M, Siegenthaler C, Moser M, Dübendorfer A, Bopp D, 2005. The *transformer2* gene in *Musca domestica* is required for selecting and maintaining the female pathway of development. *Development Genes and Evolution*, 215(4): 165–176.
- Concha C, Scott MJ, 2009. Sexual development in *Lucilia cuprina* (Diptera, Calliphoridae) is controlled by the *transformer* gene. *Genetics*, 182(3): 785–798.
- Chen YL, 2000. Control and ecological management of locust infestation again. *Bulletin of Chinese Academy of Sciences*, 15(5): 341–345. [陈永林, 2000. 蝗虫再猖獗的控制与生态学治理. 中国科学院院刊, 15(5): 341–345.]
- Gempe T, Beye M, 2011. Function and evolution of sex determination mechanisms, genes and pathways in insects. *BioEssays*, 33(1): 52–60.
- Glisovic T, Bachorik JL, Yong J, Dreyfuss G, 2008. RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS Letters*, 582(14): 1977–1986.
- Guo LT, 2016. Study on sex determination mechanism of *Bemisia tabaci* based on cascade interaction of *transformer2* and *doublesex*. Doctor dissertation. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences. [郭利桃, 2016. 基于 *Transformer2* 和 *Doublesex* 级联互作的烟粉虱性别决定机制研究. 博士学位论文. 北京: 中国农业科学院.]
- Huo LX, 2023. Sexual transcription differences, molecular clone and expression analysis of sex determination genes in *Trichogramma dendrolimi*. Master dissertation. Shenyang: Shenyang Agricultural University. [霍凌霄, 2023. 松毛虫赤眼蜂雌雄转录组分析及性别决定基因的克隆和表达模式分析. 硕士学位论文. 沈阳: 沈阳农业大学.]
- He PP, 2022. Analysis and function of *Tra2* gene in the sex

- determination of *Euzophera pyriella*. Master dissertation. Alaercity: Tarim University. [贺鹏鹏, 2022. 香梨优斑螟性别决定 *Tra2* 基因分析与功能研究. 硕士学位论文. 阿拉尔城: 塔里木大学.]
- Li XC, Jin BB, Dong YQ, Chen XG, Tu ZJ, Gu JB, 2019. Two of the three *Transformer-2* genes are required for ovarian development in *Aedes albopictus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 109: 92–105.
- Liu GQ, Wu Q, He DY, Zhang GF, Li JW, Wan FH, 2015. Cloning, sequence characterization and expression analysis of sex determining genes *Bcotra* and *Bcotra2* in the guava fruit fly, *Bactrocera correcta* (Bezzi) (Diptera: Tephritidae). *Acta Entomologica Sinica*, 58(5): 516–525. [刘桂清, 武强, 和丹阳, 张桂芬, 李建伟, 万方浩, 2015. 番石榴实蝇性别决定基因 *Bcotra* 和 *Bcotra2* 的克隆、序列特征及表达分析. 昆虫学报, 58(5): 516–525.]
- Liu PW, Chen YT, Gu JB, Chen XG, 2013. Isolation and expression profiling of *transformer 2* gene in *Aedes aegypti*. *Journal of Southern Medical University*, 33(11): 1583–1589. [刘培文, 陈宇婷, 顾金保, 陈晓光, 2013. 埃及伊蚊性别决定基因 *Transformer 2* 的鉴定与表达分析. 南方医科大学学报, 33(11): 1583–1589.]
- Liu P, 2021. Bioinformatics analysis of candidate genes for sex determination and differentiation in spider and transcriptome analysis of gonads in water spider. Master dissertation. Chongqing: Southwest University. [刘飘, 2021. 蜘蛛潜在性别决定与分化基因的生物信息学分析及水蛛性腺转录组研究. 硕士学位论文. 重庆: 西南大学.]
- Liu YT, Wang WL, Chen ZZ, Xie W, Zhang YJ, 2023. Research progress on sex determination cascade in insects. *Acta Entomologica Sinica*, 66(2): 245–254. [刘雅婷, 王文璐, 陈宗泽, 谢文, 张友军, 2023. 昆虫性别决定级联的研究进展. 昆虫学报, 66(2): 245–254.]
- Martin I, Ruiz MF, Sánchez L, 2011. The gene *transformer-2* of *Sciara* (Diptera, Nematocera) and its effect on *Drosophila* sexual development. *BMC Developmental Biology*, 11(1): 1–13.
- Nissen I, Müller M, Beye M, 2012. The *Am-tra2* gene is an essential regulator of female splice regulation at two levels of the sex determination hierarchy of the honeybee. *Genetics*, 192(3): 1015–1026.
- Niu BL, 2005. Cloning and study the transcription of *Bmtra2* gene and the location of *Bmtpi* gene on z-chromosome using silkworm (*Bombyx mori*) est database. Doctor dissertation. Hangzhou: Zhejiang University. [牛宝龙, 2005. 家蚕 (*Bombyx mori*) triosephosphate isomerase 和 *transformer-2* 基因的克隆与染色体定位研究. 博士学位论文. 杭州: 浙江大学.]
- Peng W, 2018. The molecular mechanism research of sex determination and differentiation in *Bactrocera dorsalis*. Doctor dissertation. Wuhan: Huazhong Agricultural University. [彭威, 2018. 橘小实蝇性别决定及分化分子机制研究. 博士学位论文. 武汉: 华中农业大学.]
- Peng W, Zhai ZZ, 2021. Progress and prospects of insect sex determination mechanism. *Chinese Journal of Biological Control*, 37(6): 1313–1324. [彭威, 翟宗昭, 2021. 昆虫性别决定机制研究进展及展望. 中国生物防治学报, 37(6): 1313–1324.]
- Salvemini M, Robertson M, Aronson B, Atkinson P, Polito LC, Saccone G, 2009. *Ceratitis capitata transformer-2* gene is required to establish and maintain the autoregulation of *Cctra*, the master gene for female sex determination. *International Journal of Developmental Biology*, 53(1): 109–120.
- Schetelig MF, Milano A, Saccone G, Handler AM, 2012. Male only progeny in *Anastrepha suspensa* by RNAi-induced sex reversion of chromosomal females. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 42(1): 51–57.
- Shukla JN, Palli SR, 2013. *Tribolium castaneum Transformer-2* regulates sex determination and development in both males and females. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 43(12): 1125–1132.
- Wang HC, Zhu Y, Xia QY, 2003. Sex control of *Drosophila melanogaster*. *Hereditas*, 25(1): 97–101. [王慧超, 朱勇, 夏庆友, 2003. 黑腹果蝇的性别控制. 遗传, 25(1): 97–101.]
- Wang XL, 2022. Cloning and eunctional exploration of the key gene *Tra2* for sex determination in *Bradysia odoriphaga*. Master dissertation. Tai'an: Shandong Agricultural University. [王晓兰, 2022. 韭菜迟眼蕈蚊性别决定关键基因 *Tra2* 的克隆及功能探索. 硕士学位论文. 泰安: 山东农业大学.]
- Wang XX, Yan MY, Zhang M, Yu CM, Yu F, Wang H, Hu HX, Yuan L, He L, Wang WL, Ji R, Ye XF, 2019. Expression profiling of hemocyanin gene in the developmental process of eggs of *Calliptamus italicus* (Orthoptera: Catantopidae). *Acta Emntomologica Sinica*, 62(8): 912–920. [王香香, 闫蒙云, 张敏, 余成敏, 于非, 王晗, 扈鸿霞, 袁亮, 何岚, 王伟亮, 季荣, 叶小芳, 2019. 意大利蝗卵发育过程中血蓝蛋白基因表达分析. 昆虫学报, 62(8): 912–920.]
- Wang ZL, Pan LX, Hu WW, Li M, Zeng ZJ, 2019. Mechanisms of sex determination in hymenopteran insects. *Acta Emntomologica Sinica*, 62(11): 1335–1343. [王子龙, 潘露霞, 胡弯弯, 李茫, 曾志将, 2019. 膜翅目昆虫的性别决定机制. 昆虫学报, 62(11): 1335–1343.]
- Zeng XD, 2019. Clong and functional analysis of sex determining genes, *Dsx* and *Tra2* in *Bactrocera cucurbitae*. Master dissertation. Haikou: Hainan University. [曾秀丹, 2019. 瓜实蝇性别决定基因 *Dsx* 和 *Tra2* 的克隆及功能研究. 硕士学位论文. 海口: 海南大学.]