西花蓟马几丁质合成酶基因的克隆和功能分析*

唐映曦** 郑晓斌 曹鸿一 袁江江 陈思蕊
王 京 吴雨蕾 张友军 吴青君***
（中国农业科学院蔬菜花卉研究所，蔬菜生物育种国家重点实验室，北京 100081）

摘 要 **【目的】** 探索几丁质合成酶（Chitin synthase，简称 CHS）对西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* 生长发育的影响，旨在寻找一种潜在的西花蓟马防治靶点。**【方法】** 克隆西花蓟马的 *CHS* 基因，命名为 *Fochs*，采用 RNA 干扰（RNAi）技术研究其功能。**【结果】** *Fochs* 基因开放阅读框全长为 4 656 bp，编码 1 551 个氨基酸，预测分子量为 176.02 kD，保守结构域为 Glyco-tranf-GTA-type superfamily，西花蓟马 *Fochs* 与瓜蓟马 *Thrips palmi CHS* 亲缘关系最近。*Fochs* 基因在西花蓟马生长发育的各个阶段均有表达，2 龄若虫表达量最高，前蛹次之。沉默 *Fochs* 基因 120 h 后，2 龄若虫和前蛹的死亡率均显著增加（$P < 0.01$），化蛹率和羽化率均显著减少（$P < 0.01$）；若虫和蛹均出现了表皮皱缩、体型缩小、畸形等变化，对初羽化成虫几乎没有影响。**【结论】** 几丁质合成酶基因在西花蓟马生长发育过程发挥重要作用，可作为 RNAi 介导的西花蓟马绿色精准防控的潜在靶标。

关键词 西花蓟马；几丁质合成酶；生长发育；RNAi

Cloning and functional analysis of the chitin synthase in *Frankliniella occidentalis*

TANG Ying-Xi** ZHENG Xiao-Bin CAO Hong-Yi YUAN Jiang-Jiang CHEN Si-Rui
WANG Jing WU Yu-Lei ZHANG You-Jun WU Qing-Jun***
(State Key Laboratory of Vegetable Biobreeding, Institute of Vegetables and Flowers,
Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract **[Aim]** To investigate the impact of chitin synthase (CHS) on the growth and development of *Frankliniella occidentalis*, aiming to identify a potential target for controlling *F. occidentalis*. **[Methods]** The *CHS* gene of *F. occidentalis* was cloned and named *Fochs*, and its function was investigated using RNA interference (RNAi) technology. **[Results]** The full-length open reading frame of the *Fochs* gene was 4 656 bp, encoding 1 551 amino acids, and the predicted molecular weight was 176.02 kD. The conserved domain was Glyco-tranf-GTA-type superfamily. The phylogenetic tree indicated that the *Fochs* had the closest genetic relationship with the *CHS* of *Thrips palmi*. RT-qPCR results demonstrated that the *Fochs* gene was expressed at all stages of the growth and development of *F. occidentalis*, with the highest expression in the 2nd instar nymphs, followed by the pro-pupae. After silencing *Fochs* for 120 h, the mortality rates of the 2nd instar nymphs and pro-pupae was significantly increased ($P < 0.01$), while the pupation rate and eclosion rate was significantly decreased ($P < 0.01$). Both nymphs and pupae exhibited morphological changes such as wrinkled cuticle, reduced body size, and deformity, with almost no effect on newly eclosed adults. **[Conclusion]** The chitin synthase gene plays a significant role in the growth

*资助项目 Supported projects：国家特色蔬菜产业技术体系（CARS-24-C-02）；国家自然科学基金项目（32272548）；中央级公益性科研院所基本科研业务费专项（Y2024XK01）
**第一作者 First author，E-mail：tangyingxi10@163.com
***通讯作者 Corresponding author，E-mail：wuqingjun@caas.cn
收稿日期 Received：2024-10-09；接受日期 Accepted：2024-12-22

and development of *F. occidentalis*, making it a potential target for precise and environmentally friendly control through RNAi-mediated approaches.

Key words　*Frankliniella occidentalis*; chitin synthetase; growth and development; RNAi

西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* 是世界性的重要农业害虫（Kirk and Terry, 2003），主要通过独特的锉吸式口器取食植物叶、花、茎、果实等造成危害，同时也传播番茄斑萎病毒（Tomato spotted wilt virus, TSWV）等在内的多种植物病毒，导致植物病毒病的广泛流行，造成更严重损失（吴青君等, 2013; Yuan *et al*., 2023）。西花蓟马个体微小，成虫最大体长不超过 1.2 mm，繁殖能力强，易藏匿，防治难度极大（Reitz, 2009; Reitz *et al*., 2020; Yuan *et al*., 2023）。国内外对于西花蓟马的防治主要依赖各种杀虫剂，但杀虫剂的过度使用也导致西花蓟马抗药性迅速发展（Zhang *et al*., 2022），而寻找农药之外的防治方法成为重要任务。近几年来，随着昆虫表皮发育及生理分子机制的解析，设计害虫防治分子靶标以实现害虫绿色精准防控成为可能。

几丁质是昆虫外骨骼、气管内膜以及围食膜的主要成分，外骨骼构成昆虫基本框架，是昆虫与外界的第一道屏障（Jiang *et al*., 2021）；气管内膜参与昆虫体内氧气运输，具有许多适合运动的垫状表皮（Wang *et al*., 2012）；围食膜为外源性物质通过消化道进入昆虫体内的第一道屏障，保护中肠上皮细胞免受摄食的机械损伤及病原体入侵（Ostrowski *et al*., 2002），几丁质参与三者的构成，为昆虫提供了坚固的保护层，同时也维持了昆虫身体结构的稳定性与完整性，在昆虫的生长发育过程起着重要作用（Merzendorfer, 2011）。几丁质合成酶是几丁质合成途径的关键酶之一（Merzendorfer, 2006），其异常表达将严重影响昆虫的生命活动，因此研究几丁质合成酶可以为西花蓟马的防治提供一种新型绿色的防控靶点。

几丁质合成酶是一系列具有同类功能的酶的合称，是几丁质合成通路上的最后一种酶（Ostrowski *et al*., 2002），其主要功能是将供体底物上的糖基转移到受体几丁质糖链上，这是几丁质生物合成的起始步骤。新生成的几丁质糖链通过细胞膜上的“跨膜转运”通道被释放到细胞外自发组装成几丁质纳米纤维，进而形成昆虫外壳和其他组织中的几丁质结构（张文庆等, 2011; Moussian *et al*., 2015）。昆虫中编码几丁质合成酶的基因（Chitin synthase, *CHS* 基因）主要分为两类：几丁质合成酶 1（*CHS1* 或 *CHSA*）和几丁质合成酶 2（*CHS2* 或 *CHSB*）。多数昆虫中存在 2 种几丁质合成酶，而在部分昆虫中仅发现存在 1 种（Merzendorfer, 2006）。*CHS1* 通常在昆虫外骨骼和气管中大量表达，*CHS2* 则主要负责中肠围食膜的几丁质合成（乐翔兆等，2024）。Shi 等（2016a）通过干扰马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* 几丁质合成上游的 *UAP* 基因，初步揭示了其在表皮角质层（*LdUAP1*）和围食膜（*LdUAP2*）合成中的组织特异性与发育必要性；直接干扰几丁质合成酶基因（*LdCHSA* 与 *LdCHSB*）后导致马铃薯甲虫的幼虫不能蜕皮，无法正常化蛹或羽化为成虫，验证了几丁质合成酶的功能缺失会直接导致马铃薯甲虫发育停滞与关键生理过程受阻（Shi *et al*., 2016b）。而在褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 中，使用 dsNlCHSA 沉默 *CHSA* 基因导致若虫出现畸形，甚至死亡（Li *et al*., 2017）。

RNA 干扰（RNA interference，RNAi）技术是一种通过引入双链 RNA 特异性地沉默目标基因表达的分子生物学手段，能够高效、特异地抑制害虫体内关键基因的功能（Cooper *et al*., 2019）。基于 RNAi 的生物农药利用这一机制，针对特定害虫设计 dsRNA 序列，实现对害虫的精准打击，符合绿色农药的发展需求，成为害虫精准防控的新趋势（Cagliari *et al*., 2019）。几丁质合成酶基因因其在几丁质合成途径中的关键性，直接影响昆虫蜕皮过程，是潜在的候选基因。本研究基于西花蓟马的基因组和转录组数据，对西花蓟马的几丁质合成酶基因进行了克隆和功能探索，旨在为西花蓟马的绿色防控提供新的靶点基因。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

西花蓟马种群于 2003 年采自中国农业科学院蔬菜花卉研究所温室，使用新鲜无污染的四季豆 *Phaseolus vulgaris* 饲养至今，饲养条件为温度（25±1）℃、相对湿度 70%、光周期 16L∶8D。

1.2 西花蓟马 *CHS* 基因的鉴定

基于作者实验室的西花蓟马基因组和转录组数据（国家生物信息中心基因组数据库，登录号为 GWHCBHL00000000），获得西花蓟马 *CHS* 基因，命名为 *Fochs*。利用在线网站 Primer 5（https://www.primer5plus.com/index.html）设计全长扩增引物进行序列验证（表 1）。克隆体系 25 μL：Mix 12.5 μL（天根高保真酶），上下游引物各 1 μL，cDNA 模板 1 μL，水 9.5 μL；PCR 扩增程序：95 ℃预变性 5 min，95 ℃变性 30 s，58 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 5 min，变性至延伸步骤进行 35 个循环；72 ℃延伸 10 min。扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳回收后与 pEasy Blunt 载体连接，转化感受态细胞 DH5α，菌落 PCR 鉴定正确后进行测序，经测序无误后，用 TIANprep Rapid Mini Plasmid Kit 快速小提试剂盒（TIANGEN）提取质粒，用于后续实验。

表 1 引物信息
Table 1 Primers information

引物名称 Primer name	序列（5′-3′） Sequence (5′-3′)
Fochs-ORF-F	ATGAGTCCCCAGGACAAGATC
Fochs-ORF-R	TCAAAATAAGTTCAAACTGAAA
dsFochs-F	TAATACGACTCACTATAGGGAGA ACAAGTTCGCCCTGTACACC
dsFochs-R	TAATACGACTCACTATAGGGAGA ATGGACTGGTCGATGAGGAG
Fochs-qPCR-F	TCCGTGTTTGCTTTCTTTATGGT
Fochs-qPCR-R	GGAGATGAGCACCTCTTGGG

T7 启动子：TAATACGACTCACTATAGGGAGA，qPCR 扩增效率：E = 98.3%，R^2 = 0.999 5。
T7 promoter: TAATACGACTCACTATAGGGAGA, qPCR amplification efficiency: E = 98.3%, R^2 = 0.999 5.

使用 NCBI blastx 进行氨基酸序列同源性比对，利用在线网站 NCBI batch CD-search（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi）预测 *Fochs* 基因的保守结构域。使用 ExPASy 在线网站（https://web.expasy.org/protparam）预测西花蓟马 *Fochs* 基因蛋白序列的氨基酸长度、分子量和等电点。采用 SignalP 5.0（http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/）预测信号肽，使用 GSDS 在线网站（https://gsds.cgrpoee.top/）绘制目的基因外显子、内含子基因结构图。为了研究鉴定的西花蓟马 *CHS* 基因的进化关系，通过 NCBI 网站（https:www.Ncbi.Nlm.nih.gov）下载鳞翅目、双翅目、缨翅目、半翅目、鞘翅目 5 个目共 17 个物种的昆虫几丁质合成酶序列，利用 MEGA 6 软件 Neighbor joining 方法构建系统进化树。

1.3 *Fochs* 基因的龄期表达谱分析

收集初孵化的西花蓟马 1 龄若虫、2 龄若虫、前蛹、蛹和初羽化 24 h 内的雌成虫各 100 头。采用 Trizol 法提取西花蓟马的总 RNA，用 FastKing™ gDNA 清除型 cDNA 合成试剂盒（TIANGEN）转为 cDNA 模板后进行 qRT-PCR。根据序列信息，利用在线网站 Primer 5（https://www.primer5plus.com/index.html）设计 *Fochs* 的荧光定量特异性引物（表 1），采用实时荧光定量 PCR（qRT-PCR）分析 *Fochs* 在西花蓟马不同龄期的相对表达量。qRT-PCR 体系 20 μL：Mix 10 μL，上下游引物各 0.5 μL，cDNA 模板 1 μL，水 8 μL；程序为 95 ℃预变性 10 min，95 ℃变性 15 s，60 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 30 s，40 个循环。以西花蓟马的琥珀酸脱氢酶基因（Succinate dehydrogenase, *SDHA*）和 *β-actin* 作为参考基因，采用双内参校正策略，有效减少因样本差异或其他因素引起的误差，从而提供更加准确的数据支持（Cifuentes *et al.*, 2012），采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算 *Fochs* 的相对表达量。每个处理设置 4 个生物学重复（每个生物学重复各龄期样本组成同前），每个生物学重复设置 4 个技术重复。

1.4　dsRNA 合成及 RNAi 分析

根据已获得的基因序列，利用 dsRNA 在线设计工具（https://www.flyrnai.org/cgi-bin/RNAi_find_primers.pl/）设计含有 T7 RNA 聚合酶启动子序列的干扰引物 dsFochs，以 EGFP 作为对照（表 1）。以 PEASY-Fochs 质粒为模板，扩增特异性片段并回收，使用 T7 RiboMAX™ Express RNAi System 试剂盒（Promega）合成 dsFochs 与 dsEGFP。体外转录体系为：10×Reaction buffer 2 μL，RiboGuard RNase Inhibitor 2.5 μL，T7 RNA Polymerase 2 μL，ATP、CTP、GTP 和 UTP 各 1.8 μL，DTT 2 μL，cDNA 1 μg，加 RNase free water 补至 20 μL，加入 1 μL RNaes-Free DNase，37 ℃金属浴 30 min。加入等体积的 5 mol/L 醋酸铵，冰浴 15 min，4 ℃ 13 000 r/min 15 min。去除上清液，用 70%的乙醇洗涤沉淀 2 次后晾干。加入 50-100 μL Nuclease-free water 将沉淀溶解，用 NanoDrop 2000（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）测定浓度后置于 - 20 ℃保存备用。

用浓度为 500 ng/μL 的 dsEGFP 和 dsFochs 分别与 10%蔗糖溶液配制成 200 μL 的人工饲喂液，选取 *Fochs* 表达量最高的 2 龄若虫进行干扰效率测定。用自制吸虫器将 200 头若虫置于干扰装置中（Hua *et al.*, 2023），将装置开口端先覆一层拉开至透明均匀且较薄的封口膜，用移液枪在封口膜中央滴入 200 μL 的人工饲喂液，再拉一张稍厚的封口膜，将液滴压平至均匀铺满干扰装置，最后贴合第一层封口膜封住饲喂液，对每个处理设置 3 个生物学重复（每个生物学重复各龄期样本组成同前）。待饲喂 24、48 和 72 h 后，收集虫体。用 Trizol 法提取 RNA，反转为 cDNA 模板，dsFochs 为处理，dsEGFP 为对照，用 RT-qPCR 检测 *Fochs* 的表达量，计算其干扰效率，选取干扰效率最高的时间段进行后续实验。鉴于前蛹期西花蓟马不取食的特点，采用纳米浸泡法（Nano-immersion）进行干扰（Tao *et al.*, 2022）。收集 200 头前蛹放到一次性塑料培养皿中（直径 3 cm），用移液枪将 15 μL dsRNA 混合溶液（1 μg/μL dsFochs 或 dsEGFP 和等体积的纳米材料）滴在前蛹上，使之被完全浸泡，6 h 后，将处理后的前蛹从培养皿转移至 1.5 mL 离心管中进行 RNA 提取，测定干扰效率。

1.5　西花蓟马表型观察

为检测不同龄期使用 dsFochs 沉默 *Fochs* 后对西花蓟马生长发育的影响，选取涉及蜕皮且 *Fochs* 表达量较高的 2 龄若虫、前蛹以及完成所有蜕皮过程的初羽化成虫分别进行干扰，比较目的基因在不同龄期对蜕皮以及生长发育的影响。分别选取 200 头 2 龄若虫和初羽化成虫于 RNA 干扰装置中进行干扰，选取 200 头前蛹浸泡干扰，操作步骤与 2.4 节一致。处理 48 h（前蛹处理 6 h）后将存活试虫转移至干净培养罐（直径 8 cm，高 6 cm）中，每隔 24 h 观察一次，观察至 120 h，统计这段时间内试虫的死亡、发育情况以及表型变化，在显微镜（Leica M205A 体视显微镜，德国 Leica 公司）下观察表型并拍照。以 dsEGFP 为对照，每个处理设置 3 个重复（每个生物学重复各龄期样本组成同前）。

1.6　数据分析

采用 SPSS 20 软件进行数据分析，*Fochs* 在不同发育阶段的相对表达量采用 Tukey’s 多重比较检验分析差异显著性。利用 Graphpad 8 软件绘图，目的基因干扰效率以及各龄期化蛹率、羽化率及死亡率的统计采用独立样本 *t* 检验。差异显著性检验水平标准 $P < 0.05$ 具有统计学意义（* $P < 0.05$ 表示差异显著，** $P < 0.01$ 表示差异极显著）。

2　结果与分析

2.1　西花蓟马几丁质合成酶基因序列克隆及进化分析

通过对 *Fochs* 的全长扩增验证，获得了西花蓟马 *Fochs* 全长序列。*Fochs* 基因开放阅读框（Open reading frame，ORF）长 4 656 bp（图 1），编码 1 551 个氨基酸，分子量为 176.02 kD，预测等电点为 7.69。*Fochs* 含有 1 个信号肽，区域为第 1-32 个氨基酸：MANQNCLDITVKILKVVAYLVTFIIVLGSGVV。此外，*Fochs* 具有 1 个保守结构域：Glyco-tranf-GTA-type superfamily 结构域（第 513-834 位氨基酸）（图 2）。

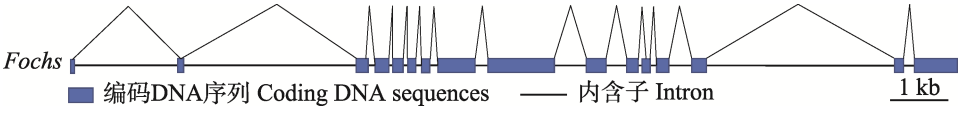

图 1　西花蓟马几丁质合成酶基因结构图

Fig. 1　Gene structure of chitin synthetase in *Frankliniella occidentalis*

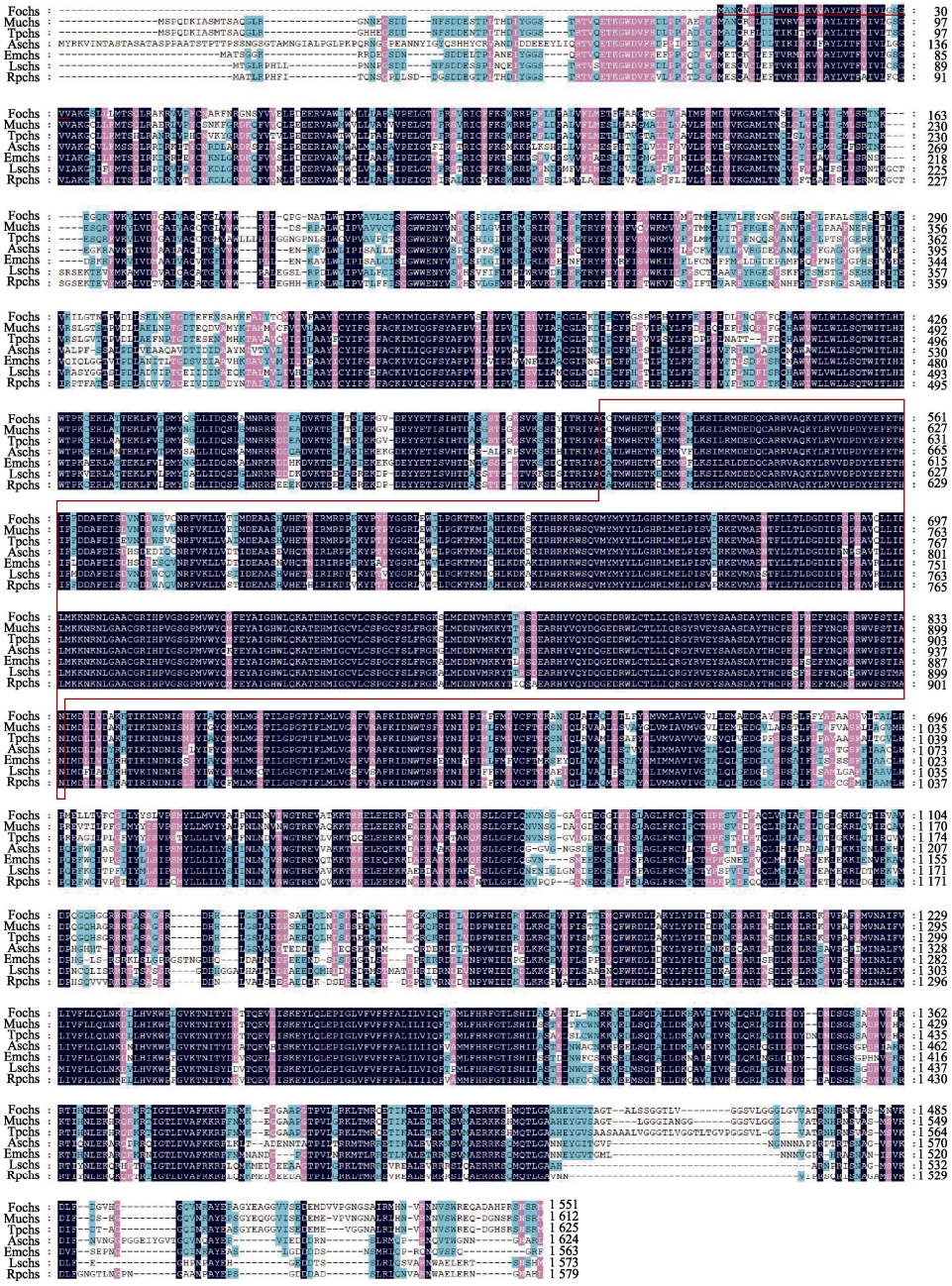

图 2　西花蓟马 *Fochs* 与其他昆虫几丁质合成酶基因的氨基酸序列比对

Fig. 2　The amino acid sequence alignment of *Frankliniella occidentalis Fochs* with other insect chitin synthase genes

Fo：西花蓟马 *F. occidentalis*；Mu：豆大蓟马 *Megalurothrips usitatus*；Tp：瓜蓟马 *Thrips palmi*；As：斑须按蚊 *Anopheles stephensi*；Bm：野桑蚕 *Bombyx mandarina*；Ls：灰飞虱 *Laodelphax striatellus*；Rp：点蜂缘蝽 *Riptortus pedestris*.

图中右边的数字代表每个氨基酸的位置，横线部分为信号肽氨基酸序列，框内为保守结构域。

The numbers on the right indicate the position of each amino acid residue, the sequence underlined represents the signal peptide, and the boxed area denotes the conserved domain.

系统进化树表明，*Fochs* 和瓜蓟马的几丁质合成酶基因在进化上亲缘关系比较近，达到 95%（图 3）。

2.2　西花蓟马 *CHS* 基因的表达谱

采用 RT-qPCR 分析 *Fochs* 在西花蓟马不同发育阶段的 mRNA 相对表达量，结果表明 *Fochs* 在西花蓟马生长发育的各个阶段均有表达，2 龄若虫表达量最高，其次是前蛹，1 龄若虫表达量最低，2 龄若虫、前蛹以及成虫的表达量分别是 1 龄若虫的 4.1、2.3 和 1.5 倍（图 4）。

2.3　沉默 *Fochs* 对西花蓟马生长发育的影响

干扰 *Fochs* 基因 48 和 72 h 后，该基因表达量均下调。其中，干扰 48 h 后，*Fochs* 基因的表达量显著下调了 50.26%（$P < 0.05$），沉默效果最好，作为后续实验的最佳干扰时间（图 5：A）。前蛹采取纳米材料介导的 RNA 干扰法，干扰 6 h 后 *Fochs* 基因的表达量显著下调了 47.12%（$P < 0.01$），可进行后续干扰实验（图 5：B）。

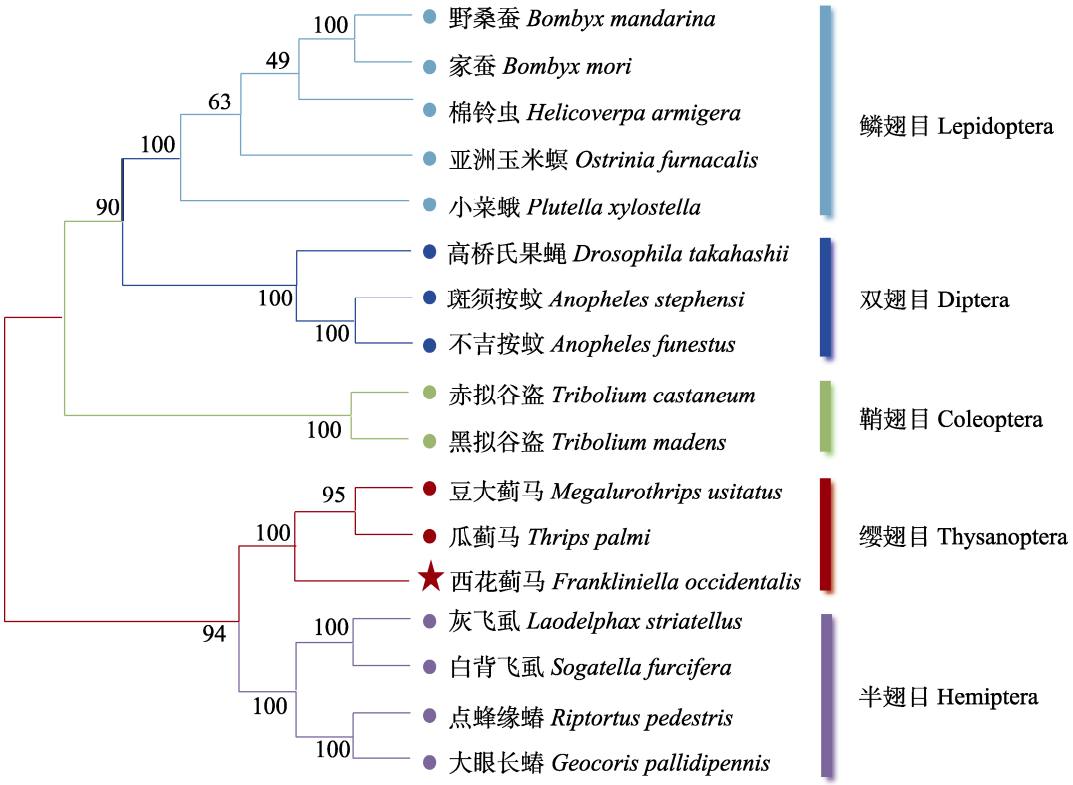

图 3　基于氨基酸序列的几丁质合成酶基因系统发育树

Fig. 3　A phylogenetic tree based on the amino acid sequence of chitin synthase gene

使用 Mega 6 对氨基酸全长序列进行分析，构建系统发育树。采用 Bootstrap 方法分析，每个分支进行 1 000 次验证，数值代表 Bootstrap 估算值。

Phylogenetic analysis is performed based on the full-length amino acid sequences using MEGA 6, where a phylogenetic tree is constructed with the bootstrap method (1 000 replicates for each branch), and the numbers at nodes indicate bootstrap support values.

干扰 2 龄若虫 *Fochs* 后，统计了 48-120 h 的死亡率与化蛹率，72 h 开始处理组死亡率显著上升（$P < 0.01$），在 120 h 时死亡率高达 65.0%，显著高于对照组的 18.2%（$P < 0.01$）（图 6：A）。对照组化蛹率一直呈上升趋势，96 h 的化蛹率为 80.3%，120 h 时 81.1% 的若虫化蛹，而干扰 *Fochs* 后的 2 龄若虫 96 和 120 h 的化蛹率分别为 41.7%和 31.2%（图 6：B），显著低于对照组（$P < 0.01$）。在 2 龄若虫至蛹阶段，畸变的若虫有明显皱缩，体长均值（不区分雌雄）由 0.672 mm

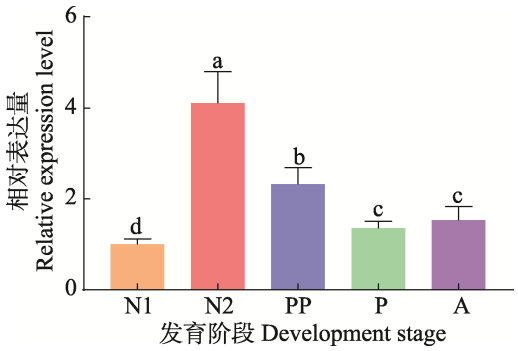

图 4　几丁质合成酶基因在西花蓟马不同龄期的表达

Fig. 4　Relative expression levels of *Fochs* in different developmental stages of *Frankliniella occidentalis*

N1：1 龄若虫 1st instar；N2：2 龄若虫 2nd instar；PP：前蛹 Propupa；P：蛹 Pupa；A：成虫 Adult.
柱上不同小写字母表示不同发育阶段差异显著（$P < 0.05$，Tukey's 多重比较检验）。
Different lowercase letters above bars indicate significant difference in different developmental stages ($P < 0.05$, Tukey's multiple range test).

缩短至 0.456 mm（图 6：C）。干扰前蛹 *Fochs* 后，72 h 开始处理组死亡率显著上升（$P < 0.05$），在 120 h 时死亡率高达 72.6%，显著高于对照组的 21.2%（$P < 0.01$）（图 6：D）。处理组 120 h 羽化率仅为 22.4%，显著低于对照组的 72.8%（图 6：E）。前蛹至成虫阶段，畸变的蓟马个体也明显皱缩，体长均值由 0.802 mm 缩短至 0.596 mm（图 6：F）。干扰初羽化成虫后，处理组与对照组死亡率无显著差异（$P > 0.05$）（图 6：G），初羽化成虫中，由于不涉及蜕皮过程，对其体长几乎没有影响（图 6：H）。

干扰 *Fochs* 基因后，观察 120 h。相较正常形态的蓟马，2 龄若虫的发育及其蜕皮至前蛹的过程均受到了影响（图 7：A），2 龄若虫发育期间出现表皮皱缩、体型缩小等表型变化（图 7：A-P1, P2, P3），2 龄若虫发育至前蛹后出现腹部表皮皱缩、体型缩小、畸形等表型变化（图 7：A-P4, P5, P6）；前蛹干扰后经历了前蛹蜕皮至蛹期，蛹期羽化至成虫期的过程，与对照相比，前蛹干扰后的发育过程均受到了影响（图 7：B），前蛹发育至蛹期出现表皮皱缩、畸形以及蜕皮失败的表型（图 7：B-P1, P2, P3），蛹期羽化为成虫期阶段出现腹部皱缩、体型缩小、翅发育不良等表型（图 7：B-P4, P5, P6）；且部分畸变程度较大，个体无法正常发育至下一阶段。而初羽化成虫干扰 *Fochs* 基因后表型无显著变化（$P > 0.05$）（图 7：C-P1, P2, P3）。

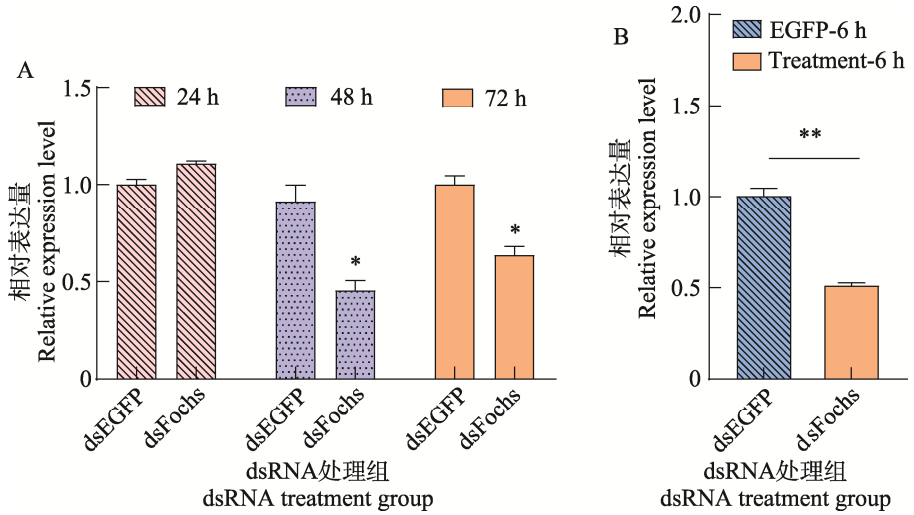

图 5　基因 *Fochs* 干扰效率筛选

Fig. 5　The screening of interference efficiency in *Fochs*

A. 2 龄若虫干扰效率；B. 前蛹干扰效率。* $P < 0.05$ 表示差异显著；** $P < 0.01$ 表示差异极显著（独立样本 *t* 检验）。图 6 同。
A. Interference efficiency of 2nd instar; B. Interference efficiency of propupa. * $P < 0.05$ indicates significant difference; ** $P < 0.01$ indicates highly significant difference (*t*-test). The same for Fig. 6.

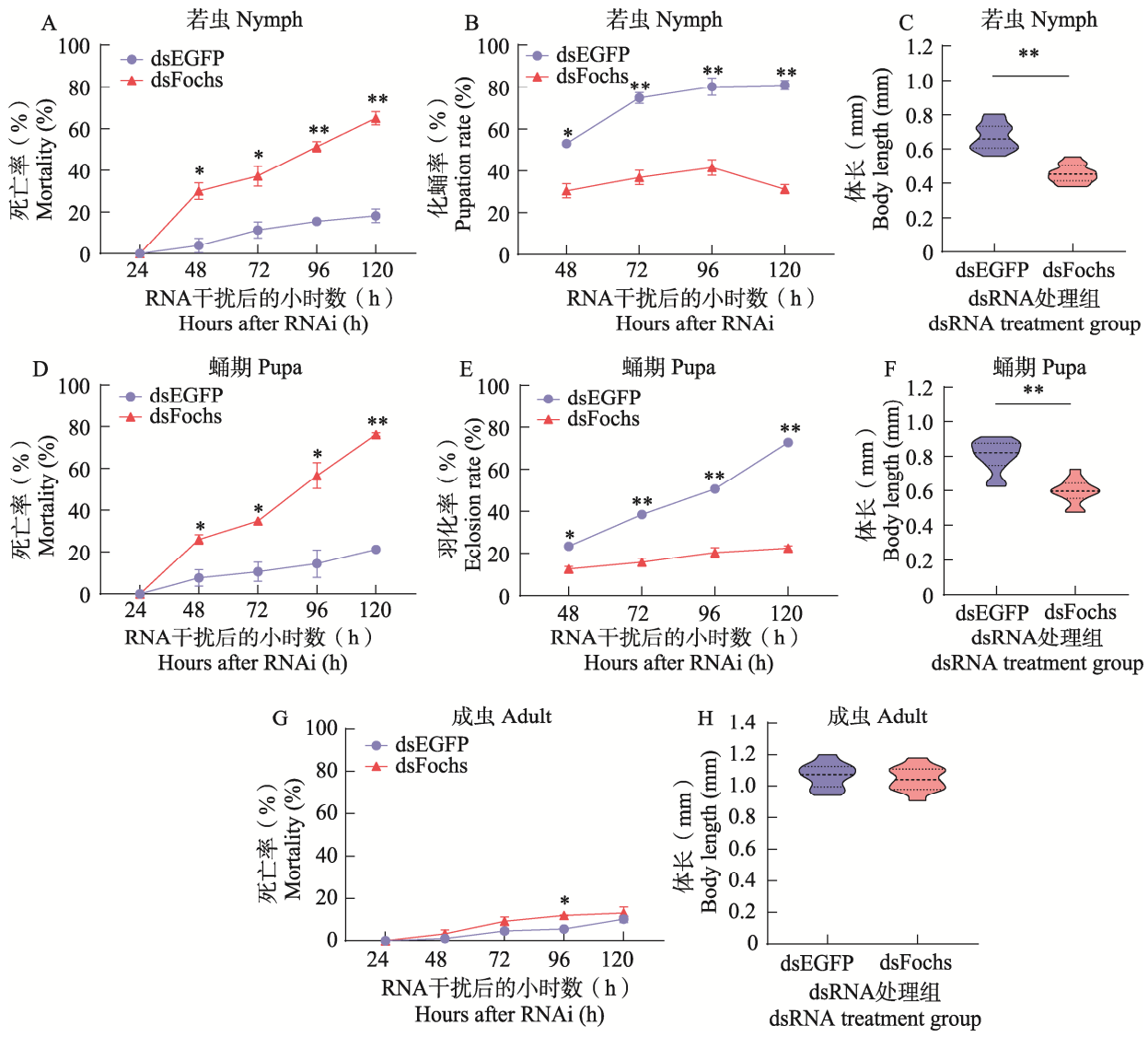

图 6　dsFochs 处理对西花蓟马不同发育阶段生长及死亡率的影响

Fig. 6　Effects of dsFochs on growth and mortality rate in different developmental stages of *Frankliniella occidentalis*

A. 若虫死亡率；B. 若虫化蛹率；C. 若虫体长；D. 蛹期死亡率；E. 蛹期化蛹率；F. 蛹期体长；G. 成虫死亡率；H. 成虫体长。

A. Nymph mortality; B. Nymph pupation rate; C. Nymph body length; D. Pupa mortality; E. Pupa eclosion rate; F. Pupa body length; G. Adult mortality; H. Adult body length.

3　结论与讨论

几丁质是昆虫表皮的主要成分，其合成与分解过程决定了昆虫的蜕皮行为从而影响其生长发育。几丁质的合成途径始于海藻糖酶，结束于几丁质合成酶，几丁质合成酶是决定几丁质合成的最关键基因之一，昆虫中有 1-2 种几丁质合成酶（Merzendorfer, 2006）。通常，有 2 种几丁质合成酶基因的昆虫个体较大，飞行能力强，例如鞘翅目的赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*、双翅目的冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*、鳞翅目的草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda*、斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 和直翅目的东亚飞蝗 *Locusta migratoria*（Tian *et al.*, 2009; Muthukrishnan *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2016; Shao *et al.*, 2020）等。*CHS1* 基因在昆虫外骨骼及气管中大量表达，而 *CHS2*

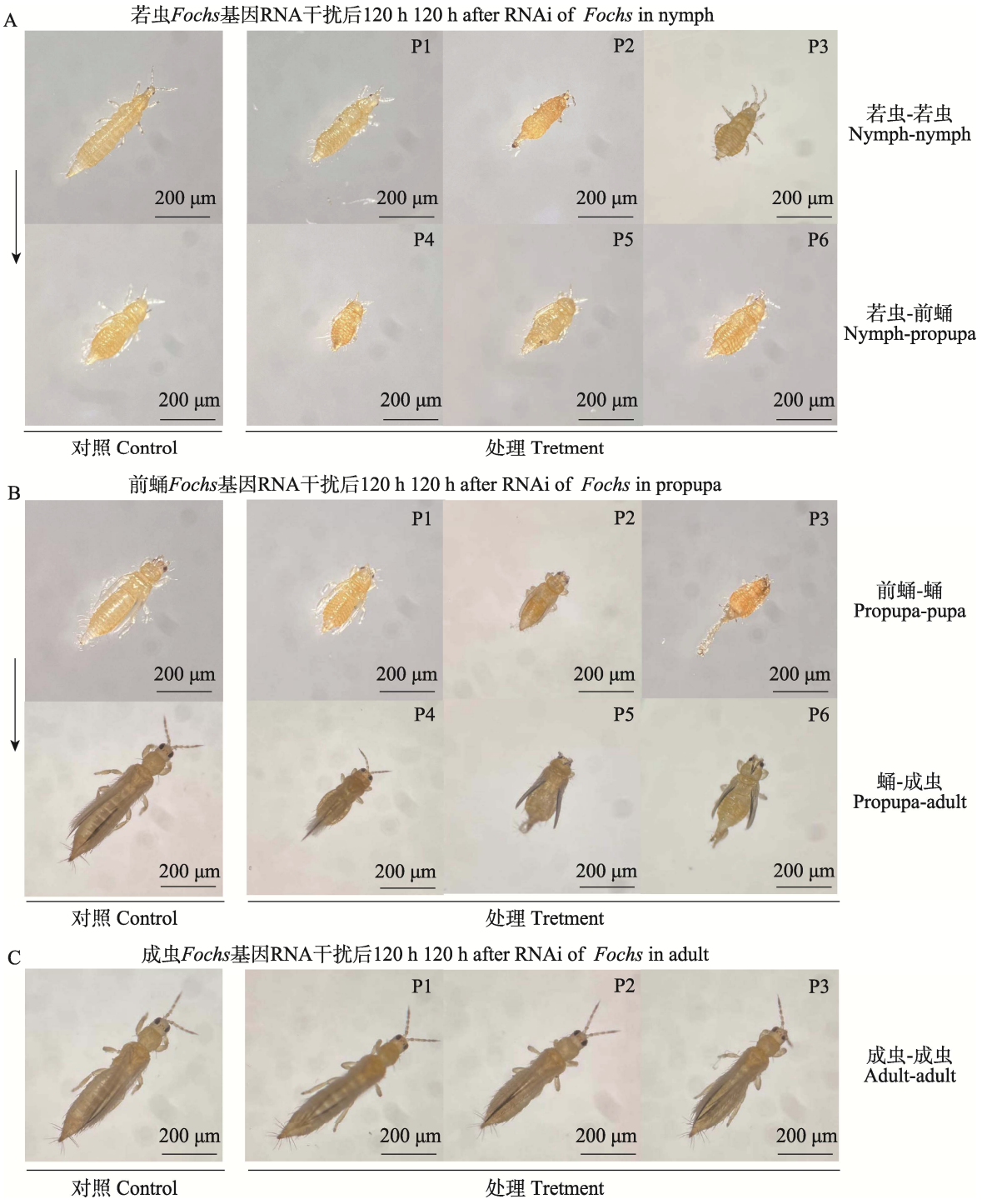

图 7 dsFochs 处理对西花蓟马表型的影响（左：对照；右：干扰处理）

Fig. 7 Effect of dsFochs on the phenotype of *Frankliniella occidentalis* (Light: Control; Right: Interference treatment)

A. 2 龄若虫 RNAi 后的发育表型（P1, P2, P3：2 龄若虫异常表型；P4, P5, P6：2 龄若虫发育至前蛹的异常表型）；B. 前蛹 RNAi 后的发育表型（P1, P2, P3：前蛹发育至蛹期异常表型；P4, P5, P6：蛹期发育至成虫的异常表型）；C. 初羽化成虫 RNAi 后的发育表型（P1, P2, P3：成虫干扰后表型无影响）。

A. Developmental phenotypes after RNAi of 2nd instar(P1, P2, P3: Abnormal phenotypes of 2nd instar; P4, P5, P6: Abnormal phenotype from 2nd instar to propupa) ; B. Developmental phenotypes after RNAi of pro-pupa (P1, P2, P3: Abnormal phenotype from pro-pupa to pupa; P4, P5, P6: Abnormal phenotype from pro-pupa to adult) ; C. Developmental phenotypes after RNAi of emerging adult (P1, P2, P3: The phenotype of adult was not affected after interference).

基因则主要在中肠围食膜表达，这两类几丁质合成酶基因在昆虫的发育和摄食行为中发挥着不同的作用（Wang *et al.*, 2012），推测几丁质合成酶的数量与昆虫生活习性（如蜕皮、食性、翅的发育）相关。鞘翅目和鳞翅目等昆虫体积较大，需要长期飞行，*CHS1* 基因主要负责其外骨骼和翅的发育，例如家蚕 *Bombyx mori* 蛹中期翅盘中表达的 *CHS1-2b* 被敲低引起了翅发育功能障碍（Xu *et al.*, 2017）；频繁飞行需大量取食供能和储能，中肠的发育至关重要，而中肠围食膜的发育等则需 *CHS2* 基因调控，中肠表达的 *CHS2* 基因受到抑制后，会导致中肠变短，围食膜结构被破坏，昆虫体重下降，甚至因饥饿而死亡（Khajuria *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012）。部分昆虫只有 1 种几丁质合成酶，如褐飞虱、豌豆蚜 *Acyrthosiphon pisum*、大豆蚜 *Aphis glycines* 等半翅目昆虫（Tian *et al.*, 2009）。褐飞虱中，沉默 5 龄若虫的 *NlCHS1* 导致个体无法脱旧角质层在羽化前死亡，且产生“细腰”、角质层褶皱等表型（Wang *et al.*, 2012）；豌豆蚜中沉默 *ApisCHS* 对蚜虫的生长和繁殖有抑制作用，导致若虫死亡率增加、蜕皮障碍以及新生若虫畸形（Ye *et al.*, 2019）。本研究从西花蓟马中鉴定到 1 种几丁质合成酶。具有 1 种几丁质合成酶基因的昆虫相对体型较小，无需远距离迁飞，可能同时发挥 *CHS1* 和 *CHS2* 的功能。

在大多数昆虫中，几丁质合成酶基因在各个阶段均有表达，且表达水平决定了其发挥的作用可能不同。如在白背飞虱 *Sogota furcifera* 中，*SfCHS1* 基因在若虫 4 龄和 5 龄期的第 1 天表达量最高，随即快速下降，表明在每个龄期初始需要大量几丁质参与表皮形成，参与几丁质合成的 *CHS1* 基因的表达量会快速升高，而在每个龄期的最后 1 d，即蜕皮开始时，*CHS* 表达量最低（陈静等, 2018）。在赤拟谷盗中 *TcCHS1* 在蛹早期表达最高，而 *TcCHS2* 在幼虫后期表达水平最高，且干扰 *TcCHS1* 基因不影响 *TcCHS2* 的表达，说明 *TcCHS1* 和 *TcCHS2* 均在生长发育阶段高表达且两个基因互不影响独立行使功能（Arakane *et al.*, 2005）。本研究发现，*Fochs* 基因在西花蓟马生长发育的各个阶段均有表达，其中 2 龄若虫表达量最高，前蛹次之，说明这两个阶段是蜕皮化蛹、蜕皮羽化的关键阶段，需要几丁质的大量合成。*Fochs* 基因在成虫期表达量最低，说明成虫期西花蓟马发育趋于稳定，已不再需要大量几丁质供给。结合其他昆虫中几丁质合成酶也存在明显的时间表达特异性，验证了 *CHS1* 的表达对昆虫蜕皮阶段的重要影响。

对昆虫若虫期或蛹前期 *CHS1* 进行 RNA 干扰，均导致虫体出现严重的蜕皮障碍，虫体大量死亡（Arakane *et al.*, 2005; Qu and Yang, 2012），如在赤拟谷盗中，在幼虫、前蛹单独干扰 *TcCHS1* 均导致试虫无法蜕皮发育到下一阶段，幼虫干扰后还存在主要气管外侧分支很明显的黑化症状，干扰 *TcCHS2* 则对蛹和成虫的发育与存活没有影响（Arakane *et al.*, 2005）。*CHS1* 基因还可调控昆虫翅的发育，褐飞虱中，沉默 *NlCHS1* 导致 5 龄若虫远端翅芽异常伸长，出现“蜂腰状”或表皮皱缩表型，无法蜕皮导致羽化前死亡（Wang *et al.*, 2012）；家蚕中沉默 *CHS1-2b* 造成翅发育功能障碍（Xu *et al.*, 2017）。本研究通过饲喂干扰法进行功能验证，探究沉默 *Fochs* 基因后对西花蓟马生长发育的影响。选取涉及蜕皮的 2 龄若虫和前蛹两个龄期进行 RNA 干扰，结果表明，用 dsFochs 饲喂干扰后，2 龄若虫和前蛹处理组死亡率均显著提高，前者化蛹率显著降低，后者羽化率显著降低；而初羽化成虫处理组与对照组死亡率无显著差异。表型观察发现，若虫及蛹干扰 *Fochs* 后蜕皮发育至下一龄期的过程均出现了表皮皱缩，体型缩小，畸形等变化，而干扰的初羽化成虫，由于不涉及蜕皮阶段，对其表型几乎没有影响。这一结果说明在西花蓟马中，沉默几丁质合成酶对翅的发育影响不大，主要通过影响蜕皮过程影响其生长发育。

本研究明确了西花蓟马 *Fochs* 基因的序列特征及其在西花蓟马生长发育过程中的表达模式，并利用 RNAi 技术验证该基因对西花蓟马生长发育的影响，几丁质合成酶基因表达水平下降导致几丁质合成受阻而引发虫体畸形甚至死亡，西花蓟马只有 1 种几丁质合成酶基因，当该基因

表达水平下降时会造成虫体显著畸变和致死后果。*Fochs* 是影响西花蓟马蜕皮发育的关键基因，本研究为基于RNAi的西花蓟马绿色防控提供了潜在的靶点。

参考文献 (References)

Arakane Y, Muthukrishnan S, Kramer KJ, Specht CA, Tomoyasu Y, Lorenzen MD, Kanost M, Beeman RW, 2005. The *Tribolium* chitin synthase genes TcCHS1 and TcCHS2 are specialized for synthesis of epidermal cuticle and midgut peritrophic matrix. *Insect Molecular Biology*, 14(5): 453–463.

Cagliari D, Dias NP, Galdeano DM, Dos Santos EÁ, Smagghe G, Zotti MJ, 2019. Management of pest insects and plant diseases by non-transformative RNAi. *Frontiers in Plant Science*, 10: 1319.

Chen J, Zhang DW, Qian ZM, 2018. Study on the structure and characteristics of chitin synthase 1 gene of *Sogota furcifera*. *Biotechnology Bulletin*, 34(1): 195–201. [陈静, 张道伟, 钱正敏, 2018. 白背飞虱几丁质合成酶 1 基因的结构及特性研究. 生物技术通报, 34(1): 195–201.]

Cifuentes D, Chynoweth R, Guillén J, De la Rúa P, Bielza P, 2012. Novel cytochrome P450 genes, CYP6EB1 and CYP6EC1 are over-expressed in acrinathrin-resistant *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). *Journal of Economic Entomology*, 105(3): 1006–1018.

Cooper AM, Silver K, Zhang JZ, Park Y, Zhu KY, 2019. Molecular mechanisms influencing efficiency of RNA interference in insects. *Pest Management Science*,75(1): 18–28.

Hua DK, Li XY, Yuan JJ, Tao M, Zhang K, Zheng XB, Wan YR, Gui LY, Zhang YJ, Wu QJ, 2023. Fitness cost of spinosad resistance related to vitellogenin in *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Pest Management Science*, 79(2): 771–780.

Jiang LH, Mu LL, Jin L, Anjum AA, Li GQ, 2021. RNAi for chitin synthase 1 rather than 2 causes growth delay and molting defect in *Henosepilachna vigintioctopunctata*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 178: 104934.

Khajuria C, Buschman LL, Chen MS, Muthukrishnan S, Zhu KY, 2010. A gut-specific chitinase gene essential for regulation of chitin content of peritrophic matrix and growth of *Ostrinia nubilalis* larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40(8): 621–629.

Kirk WDJ, Terry LI, 2003. The spread of the western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Agricultural and Forest Entomology*, 5(4): 301–310.

Le XZ, Wu K, He LY, 2024. Research progress on transcriptional regulation of insect chitin synthase genes. *Guangdong Agricultural Sciences*, 51(4): 19–34. [乐翔兆, 吴凯, 何丽云, 2024. 昆虫几丁质合成酶基因转录调控研究进展. 广东农业科学, 51(4): 19–34.]

Li TC, Chen J, Fan XB, Chen WW, Zhang WQ, 2017. MicroRNA and dsRNA targeting chitin synthase A reveal a great potential for pest management of the hemipteran insect *Nilaparvata lugens*. *Pest Management Science*, 73(7): 1529–1537.

Liu XJ, Zhang HH, Li S, Zhu KY, Ma EB, Zhang JZ, 2012. Characterization of a midgut-specific chitin synthase gene (LmCHS2) responsible for biosynthesis of chitin of peritrophic matrix in *Locusta migratoria*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 42(12): 902–910.

Merzendorfer H, 2006. Insect chitin synthases: A review. *Journal of Comparative Physiology B*, 176(1): 1–15.

Merzendorfer H, 2011. The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: Common principles and differences. *European Journal of Cell Biology*, 90(9): 759–769.

Moussian B, Letizia A, Martínez-Corrales G, Rotstein B, Casali A, Llimargas M, 2015. Deciphering the genetic programme triggering timely and spatially-regulated chitin deposition. *PLoS Genetics*, 11(1): e1004939.

Muthukrishnan S, Merzendorfer H, Arakane Y, Kramer JK, 2012. Chitin metabolism in insects// Gilbert LI (eds.). Insect Molecular Biology and Biochemistry. New York: Academic Press. 193–235.

Ostrowski S, Dierick HA, Bejsovec A, 2002. Genetic control of cuticle formation during embryonic development of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 161(1): 171–182.

Qu M, Yang Q, 2012. Physiological significance of alternatively spliced exon combinations of the single-copy gene class A chitin synthase in the insect *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera). *Insect Molecular Biology*, 21(4): 395–404.

Reitz SR, 2009. Biology and ecology of the western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae): The making of a pest. *Florida Entomologist*, 92(1): 7–13.

Reitz SR, Gao YL, Kirk WDJ, Hoddle MS, Leiss KA, Funderburk JE, 2020. Invasion biology, ecology, and management of western flower thrips. *Annual Review of Entomology*, 65: 17–37.

Shao ZM, Li YJ, Ding JH, Liu ZX, Zhang XR, Wang J, Sheng S, Wu FA, 2020. Identification, characterization, and functional analysis of chitin synthase genes in *Glyphodes pyloalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). *International Journal of Molecular Sciences*, 21(13): 4656.

Shi JF, Fu J, Mu LL, Guo WC, Li GQ, 2016a. Two *Leptinotarsa* uridine diphosphate N-acetylglucosamine pyrophosphorylases are specialized for chitin synthesis in larval epidermal cuticle and

midgut peritrophic matrix. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 68: 1–12.

Shi JF, Mu LL, Chen X, Guo WC, Li GQ, 2016b. RNA interference of chitin synthase genes inhibits chitin biosynthesis and affects larval performance in *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *International Journal of Biological Sciences*, 12(11): 1319–1331.

Tao M, Wan YR, Zheng XB,Qian KH, Merchant A, Xu BY, Zhang YJ, Zhou XG, Wu QJ, 2022. Tomato spotted wilt *Orthotospovirus* shifts sex ratio toward males in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, by down-regulating a FSCB-like gene. *Pest Management Science*, 78(11): 5014–5023.

Tian HG, Peng H, Yao Q, Chen HX, Xie Q, Tang B, Zhang WQ, 2009. Developmental control of a lepidopteran pest *Spodoptera exigua* by ingestion of bacteria expressing dsRNA of a non-midgut gene. *PLoS ONE*, 4(7): e6225.

Wang Y, Fan HW, Huang HJ, Xue J, Wu WJ, Bao YY, Xu HJ, Zhu ZR, Cheng JA, Zhang CX, 2012. Chitin synthase 1 gene and its two alternative splicing variants from two sap-sucking insects, *Nilaparvata lugens* and *Laodelphax striatellus* (Hemiptera: Delphacidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 42(9): 637–646.

Wu QJ, Xu BY, Xie W, Wang SL, Zhang YJ, 2013. Monitoring methods of drug resistance of whiteflies and thrips pests. *Journal of Applied Entomology*, 50(2): 553–555. [吴青君, 徐宝云, 谢文, 王少丽, 张友军, 2013. 粉虱和蓟马类害虫的抗药性监测方法. 应用昆虫学报, 50(2): 553–555.]

Xu GF, Zhang J, Lyu H, Liu J, Ding Y, Feng QL, Song QS, Zheng SC, 2017. BmCHSA-2b, a Lepidoptera specific alternative splicing variant of epidermal chitin synthase, is required for pupal wing development in *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 87: 117–126.

Ye C, Jiang YD, An X, Yang L, Shang F, Niu JZ, Wang JJ, 2019. Effects of RNAi-based silencing of chitin synthase gene on moulting and fecundity in pea aphids (*Acyrthosiphon pisum*). *Scientific Reports*, 9(1): 3694.

Yuan JJ, Zheng XB, Wang J, Qian KH, Feng JM, Zhang Y, Zhang K, Zhang YJ, Liang P, Wu QJ, 2023. Insecticide resistance of western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande) in China. *Crop Protection*, 172: 106339.

Zhang K, Yuan JJ, Wang J, Hua DK, Zheng XB, Tao M, Zhang Z, Wan YR, Wang SY, Zhang YJ, Liang P, Wu QJ, 2022. Susceptibility levels of field populations of *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) to seven insecticides in China. *Crop Protection*, 153: 105886.

Zhang WQ, Chen XF, Tang B, Tian HG, Chen J, Yao Q, 2011. Research frontiers on chitin synthesis and its regulation in insects. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 48(3): 475–479. [张文庆, 陈晓菲, 唐斌, 田宏刚, 陈洁, 姚琼, 2011. 昆虫几丁质合成及其调控研究前沿. 应用昆虫学报, 48(3): 475–479.]