

褐飞虱 *Kruppel homolog-1* 基因对 *FAMeT* 和 *JHE* 表达的影响

金敏娜, 姚云, 孙冰, 王博, 林欣大* (中国计量学院, 浙江杭州 310018)

摘要 [目的]探究褐飞虱 *Kruppel homolog-1* (*Nlkr-h1*) 基因的锌指结构特点以及对 *FAMeT* 和 *JHE* 表达的影响, 了解 *Nlkr-h1* 的调控作用。[方法]通过 MEGA5.0 分析 *Nlkr-h1* 的功能区域每个锌指结构的进化树, 并采用 qPCR 技术测定 *Nlkr-h1* 干扰后 *FAMeT* 和 *JHE* 的表达情况。[结果]*Nlkr-h1* 的功能区域主要包括 8 个锌指结构, 其中 Zn1 和 Zn8 的保守性相对较低。在褐飞虱 *Nlkr-h1* 基因被敲除的褐飞虱中, 发现保幼激素合成酶基因 *FAMeT* 和代谢酶基因 *JHE* 表达量升高。[结论]为了解保幼激素信号通路分子机理以及褐飞虱的生物防治提供了理论依据。

关键词 *Kruppel homolog-1*; 褐飞虱; 保幼激素; RNA 干扰

中图分类号 S435.112+.3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2013)12-05299-03

Effect of *Kruppel homolog-1* Gene of Brown Planthopper on Expression of *FAMeT* and *JHE*

JIN Min-na et al (China Institute of Metrology, Hangzhou, Zhejiang 310018)

Abstract [Objective] The paper was to explore the characteristics of zinc finger of *Kruppel homolog-1* (*Nlkr-h1*) gene from brown planthopper and its effect on expression of *FAMeT* and *JHE*, and to understand the regulation role of *Nlkr-h1*. [Method] The evolutionary tree of each zinc finger in functional area of *Nlkr-h1* was analysis via MEGA5.0, and expression status of *FAMeT* and *JHE* after interference of *Nlkr-h1* was determined using qPCR technology. [Result] The functional area of *Nlkr-h1* mainly included eight zinc fingers, and the conservativeness of Zn1 and Zn8 was relatively lower. In the brown planthopper with *Nlkr-h1* gene knockout, the expression levels of *FAMeT* and *JHE* increased. [Conclusion] The paper provides the theoretical basis for understanding molecular mechanism of juvenile hormone signaling pathway and biological control of brown planthopper.

Key words *Kruppel homolog-1*; *Brown planthopper*; Juvenile hormone; RNA interference

褐飞虱 (*Nilaparvata lugens*) 属于同翅目飞虱科, 是一种公认的迁飞性水稻害虫。褐飞虱属于不完全变态发育类昆虫, 其生活史包括卵、若虫和成虫 3 部分。成虫期出现翅二型分化现象, 长翅型属于迁飞型, 在环境恶化时向外迁移; 短翅型属于定居型, 发育进度快, 繁殖能力强^[1]。

保幼激素 (JH) 是由咽侧体分泌的, 在昆虫发育、变态和生殖过程中起重要作用^[2]。目前对 JH 信号传导途径的作用机理还不十分清楚^[3]。现有研究表明, *kr-h1* 是一种含 C₂H₂ 锌指结构的保幼激素转录因子^[4-5], JH 可能通过受体 *Met*^[6] 及其下游基因 *kr-h1* 发挥其维持幼虫形态或抑制变态的作用^[7-8]。早在 1986 年, Schun 等提出 *kr-h1* 基因是一种含有 C₂ 和 H₂ 的锌指结构, 可调控昆虫的胚胎发育及卵-幼虫的发育^[9]。

法尼酸 O-甲基转移酶 (FAMeT) 和保幼激素酯酶 (JHE) 分别是保幼激素合成与代谢过程中的 2 个关键性酶^[10-11]。*NIFAMeT* 翻译成的 FAMeT 酶用于合成甲基法尼酯 (MF), 继而合成保幼激素。而 *NLJHE* 翻译成的 JHE 酶用于降解保幼激素, 促使昆虫的变态和发育^[12-13]。笔者研究了 *Nlkr-h1* 锌指结构特点以及对 *NIFAMeT* 和 *NLJHE* 基因表达的影响, 旨在为进一步了解保幼激素信号通路分子机理和褐飞虱的生物防治提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试昆虫。褐飞虱 3 龄若虫 *Nlkr-h1* mRNA 干扰样品由实验室备存。

1.1.2 主要试剂与仪器。焦碳酸二乙酯 DEPC (BBI 公司); PrimeScript™ RT reagent Kit (TaKaRa 公司); SYBR® Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time); 琼脂糖 (BIOWEST® 公司); DL 5 000 Plus DNA Maker (TaKaRa 公司); PCR 引物均由上海桑尼生物技术有限公司合成。微量移液器 (Eppendorf 公司); 凝胶成像系统 (Bio-Rad 公司); 核酸电泳仪 (Bio-Rad 公司); 离心机 (Eppendorf 公司); 超低温冰箱 (Thermo 公司); 核酸蛋白定量分析仪; 荧光定量 PCR-IQ5 (Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 系统发育树的构建。首先在 NCBI 查询所有 *kr-h1* 序列, 通过 DNASTAR 软件分析发现该基因的保守区域为 8 个 C₂H₂ 形式的锌指结构。同时阅读参考文献获知 *kr-h1* 确实存在 8 个锌指结构 (Zn1 ~ Zn8)^[14]。因此, 用 MEGA 5.0 分析每个锌指蛋白的进化树, 以此直观看出锌指在不同物种中的进化情况。

1.2.2 qPCR 检测 *FAMeT* 和 *JHE* 的表达。按照 SYBR® Premix Ex Taq™ 试剂盒配制 20.0 μl qPCR 反应体系: SYBR® Premix Ex Taq (2 ×) 10.0 μl, Forward primer (10 μmol/L) 0.4 μl, Reverse primer (10 μmol/L) 0.4 μl, cDNA 2.0 μl, dH₂O (灭菌蒸馏水) 7.2 μl。采用 2 步法 qPCR 扩增, 第 1 步预变性: 94 °C 1.0 min; 第 2 步 PCR 扩增: 94 °C 15 s; 58 °C 40 s, 45 个循环。所用引物见表 1。

2 结果与分析

2.1 *Nlkr-h1* 锌指蛋白的结构 利用 MEGA 5.0 分别绘制 8 个锌指蛋白基因的进化树, 观察发现 Zn1 和 Zn8 的进化性状较相近, 物种间较分散, 说明 Zn1 和 Zn8 的同源性并不是很高 (图 1-A 和图 1-H)。而 Zn2 树中明显可见物种分布较密集; 西花蓟马 (Fo) 与赤拟谷盗 (Tc) 之间的昆虫为一类, 褐

基金项目 “973” 项目 (2010CB126200)。

作者简介 金敏娜 (1987 -), 女, 浙江杭州人, 硕士研究生, 研究方向: 生物化学与分子生物学。* 通讯作者, 副教授, 从事分子遗传学研究, E-mail: chuanxiziluo@163.com。

收稿日期 2013-04-07

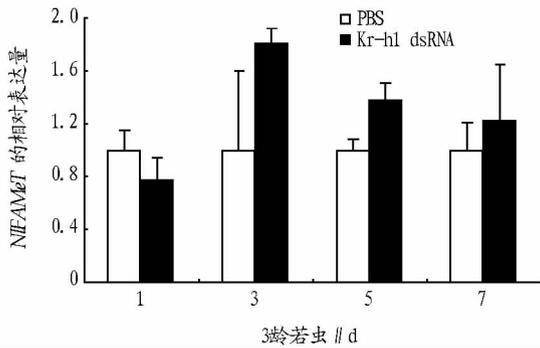


图2 *Nlkr-h1* 干扰 *NIFAMeT* 基因的表达情况

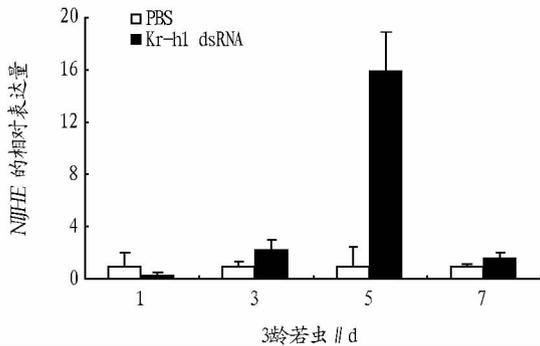


图3 *Nlkr-h1* 干扰后 *NIJHE* 基因的表达情况

区域。其中首尾 2 个锌指 Zn1 和 Zn8 的保守性没有 Zn2 ~ Zn7 的高。从进化树图可知, *Nlkr-h1* 的 8 个锌指进化存在时间差, 可能与该基因的功能密切相关。从离树根的远近程度分析可知, 在 Zn8 进化树中 *Nlkr-h1* 离树根最远, 推测该基因的第 8 个锌指蛋白基因可能是最晚进化的。

此外, 在 *Nlkr-h1* 突变体褐飞虱中发现 *NIFAMeT* 和 *NIJHE* 2 个关乎保幼激素合成与代谢的关键性基因, 表达量都发生了明显升高变化。虽然具体的作用机理不明, 但至少证明了 *Nlkr-h1* 基因的变化将引起 *NIFAMeT* 和 *NIJHE* 基因的正常表达, 从而影响保幼激素的合成与代谢, 对褐飞虱的生长发育造成一定程度的影响。

近年来国内外正在努力研究昆虫保幼激素的分子作用

机制, 多方面、多角度地挖掘保幼激素合成与代谢基因、应答基因、受体及 *kr-h1* 等的功能和相互作用, 今后必将研制出更安全的生物农药, 解决农业上褐飞虱等虫害问题。

参考文献

- [1] 乌慧玲, 许晓风. 褐飞虱生物型的分子生物学研究进展[J]. 植物保护, 2004, 30(4): 11-14.
- [2] 李娟, 周娇, 骆有庆, 等. 保幼激素及其生理学作用的研究进展[J]. 中国医学创新, 2012(3): 154-157.
- [3] 刘影, 胜振涛, 李胜. 保幼激素的分子作用机制[J]. 昆虫学报, 2008, 51(9): 974-978.
- [4] 周树堂, 郭伟, 宋佳晨. 保幼激素的分子作用机制研究[J]. 应用昆虫学报, 2012, 49(5): 1087-1094.
- [5] MINAKUCHI C, NAMIKI T, SHINODA T. Kruppel homolog 1, an early juvenile hormone-response gene downstream of Methoprene-tolerant, mediates its anti-metamorphic action in the red flour beetle *Tribolium castaneum* [J]. Dev Biol, 2009, 325(2): 341-350.
- [6] ABDOU M, PENG C, HUANG J, et al. Wnt signaling cross-talks with JH signaling by suppressing Met and gce expression [J]. PLoS One, 2011, 6(11): 26772.
- [7] MINAKUCHI C, ZHOU X, RIDDIFORD L M. Kruppel homolog 1 (*Kr-h1*) mediates juvenile hormone action during metamorphosis of *Drosophila melanogaster* [J]. Mech Dev, 2008, 125(1/2): 91-105.
- [8] JINDRA M, CHARLES J P, IWEMA T, et al. Signaling through the JH receptor Met and the repressor of metamorphosis *Kr-h1* is common to insects [C]. 24th International Congress of Entomology Korea, 2012.
- [9] SCHUH R, AICHER W, GAUL U, et al. A conserved family of nuclear proteins containing structural elements of the finger protein encoded by *Krüppel*, a *Drosophila* segmentation gene [J]. Cell, 1986, 47(6): 1025-1032.
- [10] 刘艳, 胜振涛, 蒋容静, 等. 保幼激素合成的研究进展[J]. 昆虫学报, 2007(12): 1285-1292.
- [11] 李胜, 蒋容静, 曹梅讯. 保幼激素的代谢[J]. 昆虫学报, 2004, 47(3): 389-393.
- [12] 杨文佳, 申光茂, 豆威, 等. 昆虫保幼激素酯酶的研究进展[C]//吴孔明. 公共植保与绿色防控—中国植物保护学会 2010 年学术年会. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2010.
- [13] 戴华国, 程薇, 吴晓毅, 等. 稻飞虱保幼激素酯酶活性测定[J]. 南京农业大学学报, 1997, 20(4): 108-110.
- [14] KAYUKAWA T, MINAKUCHI C, NAMIKI T, et al. Transcriptional regulation of juvenile hormone-mediated induction of *Krüppel* homolog 1, a repressor of insect metamorphosis [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012, 109(29): 11729-11734.
- [15] 甘丽萍, 龙菲菲, 张进, 等. 家蚕保幼激素甲基转移酶基因的克隆与表达分析[J]. 西南农业学报, 2012(6): 2380-2386.
- [16] 冯从经, 戴华国, 武淑文. 高温对褐飞虱体内保幼激素酯酶活性的影响[J]. 南京农业大学学报, 2000(2): 114-115.

(上接第 5286 页)

WP, 64% 杀毒矾 WP 室内毒力测定抑菌效果较差, 可不予考虑。

3 结论与讨论

该研究表明, 防治牡丹链格孢叶斑病菌时, 首先选用 30% 福噬霉悬浮剂、10% 世高水分散剂, 其次选用 80% 大生 M-45WP、35% 黑星叶霉唑 WP、3% 多抗霉素 WP、50% 扑海因 WP, 而 75% 百菌清 WP、64% 杀毒矾 WP 室内毒力测定抑菌效果较差, 可不予考虑。该研究仅就几种药剂对牡丹链格孢病菌叶斑病菌的抑制效果进行了室内毒力测定, 后续还需田间试验对药剂进行进一步筛选, 以确定最佳防治药剂, 为牡丹新病害的防治提供理论依据。

参考文献

- [1] 李广领, 陈军, 陈锡岭, 等. 几种杀菌剂对玉米新月弯孢霉室内毒力测定[J]. 现代农业科技, 2006(2): 21-22.
- [2] 陈照, 张欣, 蒲金基, 等. 内吸性杀菌剂对橡胶白根病菌的室内毒力测定[J]. 农药, 2007, 46(9): 642.
- [3] 张泽博. 杀虫剂及杀菌剂的生物测定[M]. 北京: 中国工业出版社, 1962.
- [4] 桑维钧, 李小霞, 宋宝安, 等. 5 种杀菌剂对半夏立枯病的室内毒力测定[J]. 农药, 2008, 47(2): 138-139.
- [5] 吴文君. 植物化学保护实验技术导论[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1988.
- [6] 吴仁锋. 5 种杀菌剂对番茄晚疫病病菌室内毒力测定[J]. 湖北植保, 2006, 18(1): 35-36.
- [7] 方中达. 抗病研究法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [8] 深见顺一. 农药实验法——杀菌剂篇[M]. 李树正, 译. 北京: 农业出版社, 1991.
- [9] 慕立义. 植物化学保护研究[M]. 北京: 中国农业出版社, 1994.