



两个褐飞虱海藻糖转运蛋白基因的结构 及调控海藻糖代谢功能

於卫东^{1,2}, 潘碧莹¹, 邱玲玉¹, 黄镇², 周泰², 叶林², 唐斌¹, 王世贵¹

(¹杭州师范大学生命与环境科学学院, 杭州 310036; ²浙江鼎益生物科技有限公司, 浙江衢州 324100)

摘要: 【目的】海藻糖是昆虫中的主要血糖物质, 在昆虫的发育及生理活动中发挥重要功能。其中, 海藻糖转运蛋白(Tret)在将海藻糖从其生成组织(例如脂肪体)运输到其消耗组织的过程中起着重要作用。本研究通过分析褐飞虱(*Nilaparvata lugens*)两条Tret1的序列结构, 进一步抑制*NTret1*的表达, 探讨这两个NTret1在褐飞虱体内的生物学功能。【方法】以褐飞虱两条Tret1序列为研究对象, 利用生物信息学技术分析其蛋白结构以及与其他昆虫之间的同源性。采用RNAi(RNA interference)技术将合成的外源dsRNA(double-stranded RNA)注射到实验室饲养褐飞虱种群体内, 抑制其体内*NTret1*的表达, 分别在注射48 h后取材, 抽取总RNA并用反转录试剂盒合成第一链cDNA, 采用qRT-PCR(quantitative real-time PCR)技术检测ds*NTret1*的干扰效果以及RNAi后褐飞虱体内海藻糖代谢通路中相关基因的表达, 最后测定葡萄糖、海藻糖和糖原含量以及海藻糖酶活性。【结果】生物信息学分析表明, *NTret1-like X1*和*NTret1-2 X1*的开放阅读框长度分别为1 920和1 578 bp, 分别编码639和525个氨基酸, 预测蛋白分子量分别为69.29和58.71 kD, 等电点分别为8.32和8.36; *NTret1-like X1*和*NTret1-2 X1*的二级结构主要包含螺旋和卷曲, 保守结构域分析显示它们均属于MFS家族。进化分析结果显示, 不同昆虫的Tret1蛋白具有较高的同源性, 且褐飞虱与其他半翅目昆虫具有较近的亲缘关系; 与注射ds*GFP*组相比, 注射靶标基因的dsRNA后均能够显著沉默本基因的表达; 褐飞虱体内糖原、葡萄糖在注射ds*NTret1-like X1*和ds*NTret1-2 X1*后, 其含量均无显著变化, 然而不同于注射ds*NTret1-2 X1*组, 在注射ds*NTret1-like X1*后褐飞虱体内海藻糖含量极显著升高; 干扰*NTret1-like X1* 48 h后褐飞虱体内*TPS1*、*TPS2*、*TRE1-1*、*TRE1-2*和*TRE2*的表达均极显著下调; 而干扰*NTret1-2 X1* 48 h后褐飞虱体内*TPS1*、*TPS2*和*TRE1-1*的表达虽也极显著下降, 但*TRE1-2*和*TRE2*极显著上调; 在注射ds*NTret1-like X1*后, 试虫可溶性海藻糖酶和膜结合型海藻糖酶的活性均极显著降低, 而在注射ds*NTret1-2 X1*后无显著变化。【结论】褐飞虱的两个Tret1在不同组织间发挥着不同的功能, 其中NTret1-like X1在特异性转运海藻糖参与能量供应中起到更为显著的作用。研究结果有助于探索Tret1在昆虫或无脊椎动物中调控海藻糖代谢平衡的调节机制, 可为将来通过调控血糖平衡来控制褐飞虱等害虫提供理论依据。

关键词: 褐飞虱; 海藻糖转运蛋白; 结构; 海藻糖代谢; RNA干扰

The Structure Characteristics and Biological Functions on Regulating Trehalose Metabolism of Two *NTret1*s in *Nilaparvata lugens*

YU WeiDong^{1,2}, PAN BiYing¹, QIU LingYu¹, HUANG Zhen², ZHOU Tai², YE Lin², TANG Bin¹, WANG ShiGui¹

(¹College of Life and Environmental Science, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036; ²Zhejiang Dingyi Biotechnology Co., LTD, Quzhou 324100, Zhejiang)

收稿日期: 2020-07-18; 接受日期: 2020-09-03

基金项目: 国家自然科学基金(31672081, 31371996)

联系方式: 於卫东, E-mail: hzyuweidong@hotmail.com. 通信作者王世贵, E-mail: sgwang@hznu.edu.cn

Abstract: 【Objective】 Trehalose is the main blood sugar substance in insects and plays an important role in insect development and physiological activities. Among them, trehalose transporter (Tret) plays a key role in the transportation of trehalose from trehalose-producing tissues (such as fat body) to trehalose-consuming tissues. The objective of this study is to explore the biological functions of these two *NTret1s* in brown planthopper (*Nilaparvata lugens*) by analyzing the sequence structure of two *NTret1s* and further suppressing the expression of *NTret1s*. 【Method】 Taking these two *NTret1* sequences as the research object, the protein structure and homology with other insects were analyzed by bioinformatics technology. The RNA interference (RNAi) technology was used to inject the synthetic exogenous dsRNA (double-stranded RNA) into the laboratory feeding population of *N. lugens*, to inhibit the expression of the *NTret1s*. The total RNA was extracted to synthesize the first-strand cDNA using reverse transcription Kit, qRT-PCR (quantitative real-time PCR) technology was used to detect the RNAi effect of ds*NTret1s* and the expression of related genes in the trehalose metabolism pathway in *N. lugens* after RNAi, and finally glucose, trehalose and glycogen content as well as trehalase enzyme activity were determined. 【Result】 Bioinformatics analysis showed that the open reading frames of *NTret1-like X1* and *NTret1-2 X1* are 1 920 and 1 578 bp in length, encoding 639 and 525 amino acids, respectively. The predicted protein molecular weights are 69.29 and 58.71 kD, and the isoelectric points are 8.32 and 8.36, respectively. The secondary structure of *NTret1-like X1* and *NTret1-2 X1* is mainly composed of helix and coil. Conservative domain analysis showed that they all belong to the MFS family. The results of evolutionary analysis showed that *Tret1* of different insects had high homology, and *N. lugens* was closely related to other hemiptera insects. Compared with the ds*GFP* group, the target gene was inhibited significantly after injection with ds*NTret1-like X1* or ds*NTret1-2 X1*. Furthermore, the content of glycogen and glucose in *N. lugens* did not change significantly, but unlike the ds*NTret1-2 X1* group, the trehalose content of *N. lugens* was significantly increased with the injection of ds*NTret1-like X1*. Meanwhile, the expression of the *TPS1*, *TPS2*, *TRE1-1*, *TRE1-2* and *TRE2* in *N. lugens* was significantly down-regulated after the *NTret1-like X1* knocked down for 48 h. The expression of *TPS1*, *TPS2* and *TRE1-1* in *N. lugens* also decreased significantly after injection with ds*NTret1-2 X1* for 48 h, while *TRE1-2* and *TRE2* showed a very significant upward trend. Moreover, after injection of ds*NTret1-like X1*, the activities of soluble trehalase and membrane-bound trehalase were significantly reduced, but there was no significant change after injection with ds*NTret1-2 X1*. 【Conclusion】 These two *Tret1s* of *N. lugens* play different functions in different tissues, among which *NTret1-like X1* plays a more significant role in the specific transport of trehalose involved in energy supply. The results are helpful to explore the regulatory mechanism of *Tret1* regulating the balance of trehalose metabolism in insects or invertebrates, and provide a theoretical basis for the future control of pests by regulating blood sugar balance, such as *N. lugens*.

Key words: brown planthopper (*Nilaparvata lugens*); trehalose transporter (*Tret*); structure; trehalose metabolism; RNAi

0 引言

【研究意义】我国水稻 (*Oryza sativa*) 年种植面积为 3 000 万公顷, 总产量约达 2 亿吨以上^[1]。作为一种被广泛种植和食用的粮食作物, 水稻生产的质量与产量关系着国家粮食安全。然而其生产和储存过程中常常受到各种害虫的威胁, 其中褐飞虱 (*Nilaparvata lugens*) 是对水稻生产危害最为严重的害虫^[2-4]。20 世纪 70 年代后, 水稻种植密度提高、土壤肥力增加及品种交替频繁等因素使褐飞虱的威胁日益加剧^[5]。目前, 生产中主要依靠化学杀虫剂来防治褐飞虱, 但化学杀虫剂的过度使用对环境和天敌均造成一定影响, 并诱发抗药性^[6-10]。因此, 环保且高效的新型绿色防控方法的开发迫在眉睫。【前人研究进展】海藻糖被称为“昆虫的血糖”, 在昆虫的生长发育和抗逆等方面具有重要作用^[11-15]。昆虫体内海藻糖合成途径主要为 TPS-TPP 途径, 海藻糖的合成依赖于海藻糖合成酶

(trehalose-6-phosphate synthase, TPS) 的催化作用, 而海藻糖分解代谢需要海藻糖酶 (trehalase, TRE) 的帮助, 其中海藻糖酶又可分为两种, 可溶型 (TRE1) 和膜结合型 (TRE2)^[16]。目前对昆虫海藻糖代谢的研究主要集中于海藻糖的合成或分解途径^[15,17], 对于昆虫血糖-海藻糖转运过程的研究却非常少。众所周知不管是海藻糖还是葡萄糖, 它们都不能像水或者脂肪一样直接穿过细胞膜, 而需要在特殊的物质——糖转运蛋白 (sugar transporter, ST) 的帮助下才能顺利地进出细胞, 并发挥具体的功能。糖转运蛋白属于 MFS (major facilitator superfamily) 超家族, 是动物中最丰富的小分子转运体^[18], 葡萄糖转运蛋白和海藻糖转运蛋白是其中的两种。在医学研究中, 葡萄糖转运蛋白被报道与 I 型糖尿病有关, 也被视为癌症的治疗靶点^[19]。在植物中, 糖转运蛋白也被证实与果实的成熟等有关^[20]。在昆虫中, 海藻糖转运蛋白 1 (trehalose transporter1, *Tret1*) 被发现可响应细胞内和细胞外梯度转运海藻糖^[21]。

此外,有研究表明褐飞虱不能直接利用所吸食的水稻中的蔗糖,但糖转运蛋白可以介导蔗糖进入飞虱体内^[22-23]。目前,在褐飞虱中已经鉴定出 18 个推定的糖转运蛋白,其中 7 个在肠道中高度表达^[24]。进一步的研究显示,NIST1 和 NIST16 是葡萄糖转运蛋白而 NIST6 是果糖转运蛋白^[25]。【本研究切入点】褐飞虱其他糖转运蛋白尤其是海藻糖转运蛋白的功能并未有更深入的研究。此外,褐飞虱虽然是一种农业害虫,但是也非常适合作为基因功能研究的靶标昆虫^[26-27]。

【拟解决的关键问题】通过对两个 *NITret1* 的结构以及在调控海藻糖代谢中的潜在功能进行探究,评估 *NITret1* 作为新型杀虫剂靶点的可能性,为开发绿色农药提供理论依据。

1 材料与方法

试验于 2018 年 7 月至 2019 年 7 月在杭州师范大学完成。

1.1 *NITret1* 及蛋白序列分析

首先通过美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 网站搜索获得两条 *NITret1* 基因序列,然后通过 NCBI 网站上的 BLAST-N 和 BLAST-X 工具,将 *NITret1* 的 cDNA 序列与 GenBank 中存在的其他海藻糖转运蛋白的基因序列进行比较。使用多序列比对网站 (<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html>) 上提供的工具和 DNAMAN 软件对昆虫海藻糖转运蛋白氨基酸序列进行多序列比对。使用 ExPASy 蛋白质组预测工具网站 (<http://expasy.org/tools/dna.html>) 上的翻译工具,从相应的 cDNA 序列推导出本研究中使用的 *NITret1* 蛋白序列和其他分析标准,包括相对分子质量 (molecular weight, MW)、等电点 (isoelectric point, pI) 等。通过使用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) 和 TMHMM Server 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 分别预测 *NITret1* 功能域和跨膜域。选取已知 *NITret1* 蛋白的氨基酸序列,使用 MEGA 5.2 软件,采用邻接法构建系统发育树,同时进行自举分析,并使用 1 000 次重复验证每个群集的稳健性。

1.2 供试昆虫

供试褐飞虱为杭州师范大学动物适应与进化重点实验室饲养种群,其初始虫源来自中国水稻研究所杭州种群。饲养用水稻均为感虫品系 TN1 (Taichung Native 1)。褐飞虱饲养条件:温度 (25±1) °C,光周期 16L:8D,相对湿度 (70±5) %。待 TN1 水稻上的褐飞虱若虫长至 5 龄后,用于后期 RNAi 显微

注射试验。

1.3 褐飞虱总 RNA 的抽提及第一链 cDNA 的合成

褐飞虱总 RNA 抽提采用 Trizol 法,抽提过程中使用的 EP 管等均需为 RNase-free。提取得到的总 RNA 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳先检测质量,然后用 NanoDrop 2000 分光光度计测定提取 RNA 的浓度及纯度。使用 PrimeScript®RT reagent Kit With gDNA Eraser 试剂盒配置体系,进行第一链 cDNA 的合成,合成的 cDNA 保存于 -20 °C 冰箱。

1.4 dsRNA 的合成

用 Primer 5 软件设计两个 *NITret1* 的 dsRNA 特异性片段并使用合成的特异性引物进行 PCR 扩增,产物进行 T 克隆,具体引物序列见表 1。随后用带 T7 启动子的引物进行交叉 PCR 反应,根据 T7 RiboMAX™ Express RNAi System 试剂盒的说明进行 dsRNA 合成,待 dsRNA 合成后,采用 NanoDrop™ 2000 测定合成的 dsRNA 浓度,同时以绿色荧光蛋白基因 (*GFP*) 作为对照组,采用同样的方法合成 *GFP* 的 dsRNA。

1.5 褐飞虱的显微注射

用于显微注射的材料为 5 龄第 1 天的褐飞虱。首先打开显微注射仪,调节氮气压力,并在莱卡 EZ4 解剖镜下通过注射标准毛细管确定每次注射的 dsRNA 的体积 (0.1 μL)。将 CO₂ 麻醉后的褐飞虱虫体腹面朝上放置于提前制备好的琼脂糖胶台的凹槽中,在莱卡 EZ4 解剖镜下于褐飞虱第二和第三对足间的腹节连接处分别注射 ds*NITret1-like X1*、ds*NITret1-2 X1* 和 ds*GFP*,注射量为 50 ng/头。最后将注射好的褐飞虱转移至装有新鲜水稻的玻璃管中,分别在 48 h 后收取依然存活的褐飞虱用于后续试验。每个处理取 6 个平行样,其中 3 个平行样用于基因表达情况检测,每个平行样 10 头褐飞虱;另外 3 个平行样用于糖含量和酶活性测定,每个平行样 20 头褐飞虱。

1.6 RNAi 后褐飞虱体内海藻糖代谢通路相关基因表达量测定

将显微注射 48 h 后不同组别的褐飞虱分装于 3 个平行管中,抽提总 RNA 后反转录得到 3 管平行的 cDNA,参照 SYBR® Premix Ex Taq™ 试剂盒的方法进行 qRT-PCR 检测。qRT-PCR 反应体系 (20 μL): 10 μL SYBR Premix Ex Taq; 1 μL 上游/下游引物; 1 μL cDNA; 7 μL 灭菌水。选用褐飞虱 18S 核糖体核糖核苷酸基因 (18S ribosomal RNA, 18S) 作为内参基因^[28],具体引物序列见表 1。qRT-PCR 程序: 95 °C 预变性 10 s, 95 °C 解链 5 s, 59 °C 退火并延伸 30 s, 39

个循环。每个处理 3 个生物学重复，每个生物学重复含 3 个技术重复。检测基因的相对拷贝数用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法进行分析^[29]。

1.7 总糖原、海藻糖、葡萄糖含量以及海藻糖酶活性测定

取试验组以及对照组材料，加入 200 μ L PBS，用研磨棒充分研磨后放入超声破碎仪进行超声破碎，破碎后再加入 800 μ L PBS，4℃，1 000×*g* 离心 20 min。取 350 μ L 上清，4℃，20 800×*g* 超离心 1 h，剩余上清用于总蛋白、总糖原和海藻糖含量的测定。超离心

后的上清用于测定葡萄糖、蛋白质含量以及可溶型海藻糖酶活性，沉淀悬浮于 300 μ L 的 PBS 后用于测定葡萄糖、蛋白质含量和膜结合型海藻糖酶活性。具体步骤参照 ZHANG 等描述的方法^[30]。

1.8 数据分析

应用 Excel 软件整理、分析数据，通过 SigmaPlot 10.0 和 SPSS 软件进行显著性分析和作图，采用 One-Way ANOVA 法进行差异显著性检验 ($P<0.05$ 为差异显著，用*表示； $P<0.01$ 为差异极显著，用**表示)。

表 1 实时荧光定量 PCR 和 ds*NITret1*、ds*GFP*的引物序列
Table 1 Primer sequence used for qRT-PCR and ds*NITret1s*, ds*GFP*

引物名称 Primer name	正向引物 Forward primer (5'-3')	反向引物 Reverse primer (5'-3')	产物长度 Length (bp)
dsNITret1-like X1	GCAAACAACAGCGAGCAA	CCAAGAGGCACCCATCC	472
dsNITret1-like X1-T7	T7-GCAAACAACAGCGAGCAA	T7-CCAAGAGGCACCCATCC	552
dsNITret1-2 X1	CTTCGTTACACGACACCT	CAAATGGCACTTATTATCGTC	547
dsNITret1-2 X1-T7	T7-CTTCGTTACACGACACCT	T7-CAAATGGCACTTATTATCGTC	597
dsGFP	AAGGGCGAGGAGCTGTTACCG	CAGCAGGACCATGTGATCGCGC	657
dsGFP-T7	T7-AAGGGCGAGGAGCTGTTACCG	T7-CAGCAGGACCATGTGATCGCGC	707
qN18S	CGCTACTACCGATTGAA	GGAAACCTTGTTACGACTT	165
qNITret1-like X1	GTGGAATCGTGAACATGGG	ATGGTCATGAGTGTGCTGGA	101
qNITret1-2 X1	TATGTGTCGGCTGGGTTCTT	CTCTGAGCCAGCACAATGAC	190
qNITPS1	AAGACTGAGGCGAATGGT	AAGGTGGAATGGAATGTG	154
qNITPS2	AGAGTGGACCGCAACAACA	TCAACGCCGAGAATGACTT	161
qNITRE1-1	GCCATTGTGGACAGGGTG	CGGTATGAACGAATAGAGCC	132
qNITRE1-2	GATCGCACGGATGTTTA	AATGGCGTTCAAGTCAA	178
qNITRE2	TCACGGTTGTCCAAGTCT	TGTTTCGTTTCGGCTGT	197

T7 sequence: GGATCCTAATACGACTCACTATAGG

2 结果

2.1 NITret1 蛋白序列分析

两条 *NITret1* (*NITret1-like X1* 和 *NITret1-2 X1*) 的开放阅读框长度分别为 1 920 和 1 578 bp，分别编码 639 和 525 个氨基酸，预测蛋白分子量分别为 69.29 和 58.71 kD，等电点分别为 8.32 和 8.36 (图 1-A)。蛋白质疏水性预测显示 *NITret1-like X1* 和 *NITret1-2 X1* 的 GRAVY (grand average of hydropathicity) 值分别为 0.313 和 0.354，表明这两个转运蛋白主要由疏水性氨基酸组成。二级和三级结构显示这两个 *NITret1* 的结构均较为简单，主要为螺旋和卷曲 (图 1-A、1-C)。SMART 分析以及三级结构预测发现 *NITret1-like X1* 和 *NITret1-2 X1* 分别包含 12 个和 10

个跨膜结构域 (图 1-B、1-C)，表明它们均为跨膜蛋白。此外，保守结构域分析结果显示两者均属于 MFS 超家族 (图 1-B)。

2.2 NITret1 系统进化树

进化分析结果显示，*NITret1-like X1* 和 *NITret1-2 X1* 分别与其他昆虫的 *Tret1-like X1* 和 *Tret1 X1* 聚在一支，其中 *NITret1-like X1* 与黄蔗蚜 (*Sipha flava*)、高粱蚜 (*Melanaphis sacchari*)、棉蚜 (*Aphis gossypii*)、玉米缢管蚜 (*Rhopalosiphum maidis*)、桃蚜 (*Myzus persicae*) 及豌豆蚜 (*Acyrtosiphon pisum*) 的 *Tret1* 聚在一支；*NITret1-2 X1* 则与臭虫 (*Cimex lectularius*) 和茶翅蝽 (*Halyomorpha halys*) 聚在一支，表明褐飞虱的这两个 *Tret1* 与其他昆虫的 *Tret1* 具有较高的同源性，并且与同为半翅目的上述昆虫亲缘关系较近 (图 2)。

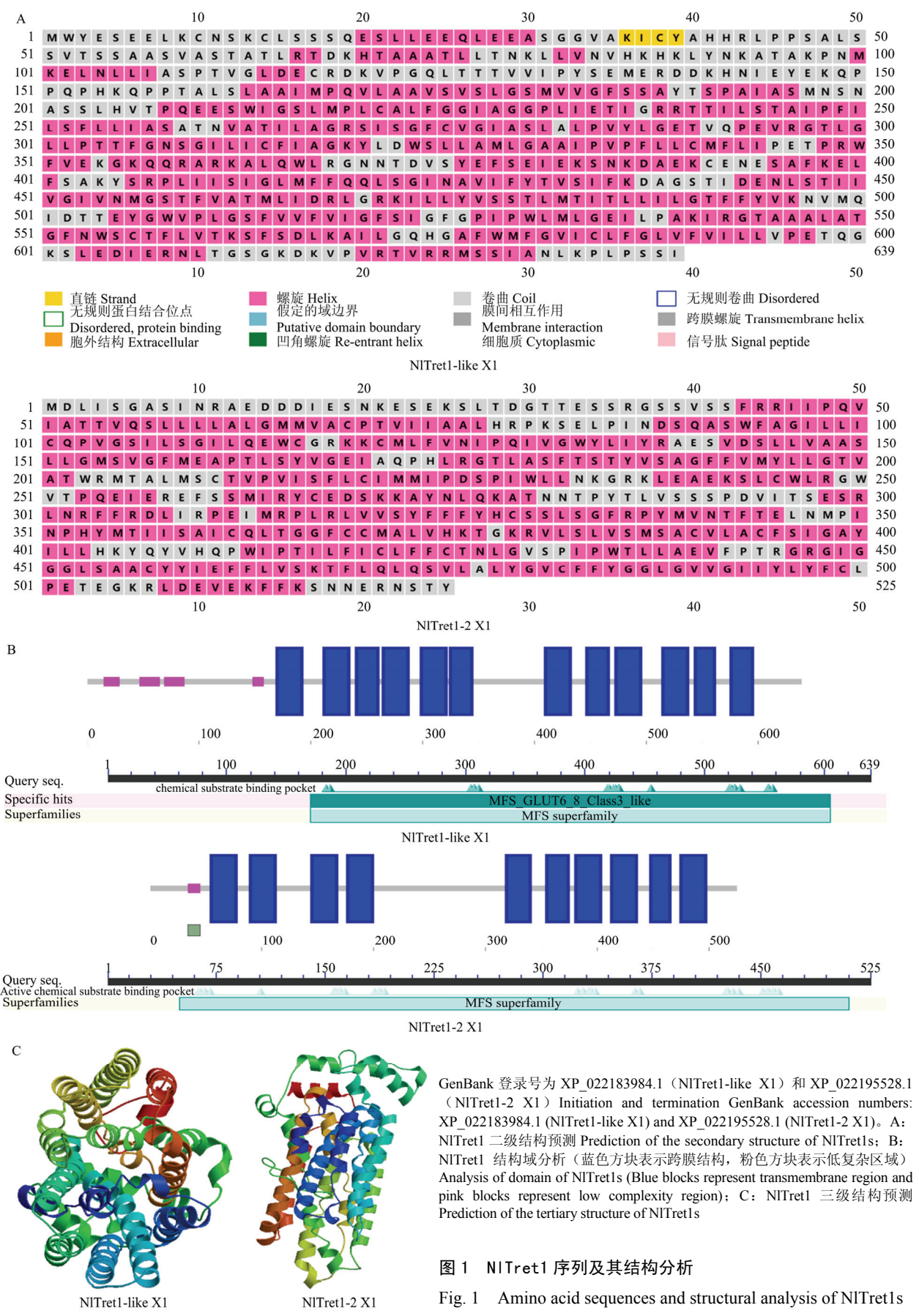
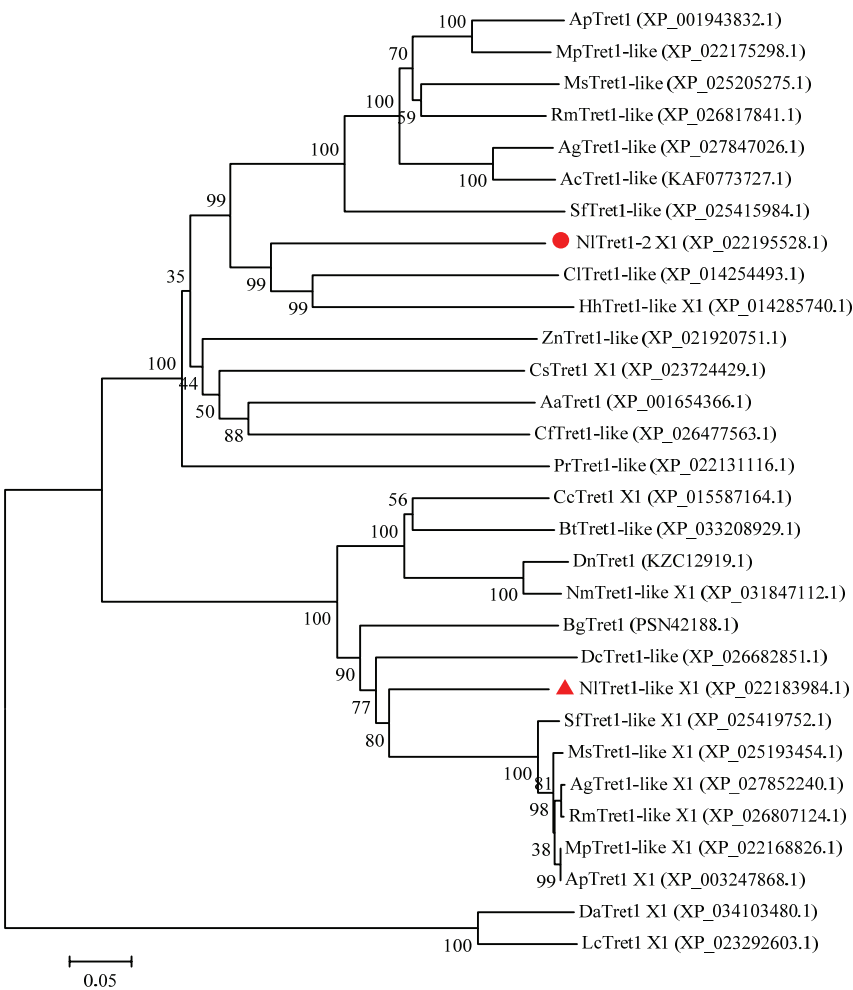


图 1 NITret1 序列及其结构分析

Fig. 1 Amino acid sequences and structural analysis of NITret1s



Tret1 蛋白来源物种及其 GenBank 登录号 Source species of Tret1 proteins and their GenBank accession numbers。豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum*: ApTret1 (XP_001943832.1)、ApTret1 X1 (XP_003247868.1); 桃蚜 *Myzus persicae*: MpTret1-like (XP_022175298.1)、MpTret1-like X1 (XP_022168826.1); 高粱蚜 *Melanaphis sacchari*: MsTret1-like (XP_025205275.1)、MsTret1-like X1 (XP_025193454.1); 玉米缢管蚜 *Rhopalosiphum maidis*: RmTret1-like (XP_026817841.1)、RmTret1-like X1 (XP_026807124.1); 棉蚜 *Aphis gossypii*: AgTret1-like (XP_027847026.1)、AgTret1-like X1 (XP_027852240.1); 黑豆蚜 *Aphis craccivora*: AcTret1-like (KAF0773727.1); 黄蔗蚜 *Sipha flava*: SfTret1-like (XP_025415984.1)、SfTret1-like X1 (XP_025419752.1); 褐飞虱 *Nilaparvata lugens*: NITret1-2 X1 (XP_022195528.1)、NITret1-like X1 (XP_022183984.1); 臭虫 *Cimex lectularius*: ClTret1-like (XP_014254493.1); 茶翅蛾 *Halyomorpha halys*: HhTret1-like (XP_014285740.1); 湿木白蚁 *Zootermopsis nevadensis*: ZnTret1-like (XP_021920751.1); 第二隐白蚁 *Cryptotermes secundus*: CsTret1 X1 (XP_023724429.1); 埃及伊蚊 *Aedes aegypti*: AaTret1 (XP_001654366.1); 猫虱 *Ctenocephalides felis*: CfTret1-like (XP_026477563.1); 菜粉蝶 *Pieris rapae*: PrTret1-like (XP_022131116.1); 麦茎蜂 *Cephus cinctus*: CcTret1 X1 (XP_015587164.1); 瘿蜂 *Belonocnema treatae*: BtTret1-like (XP_033208929.1); 汗蜂 *Dufourea novaeangliae*: DnTret1 (KZC12919.1); 彩带蜂 *Nomia melanderi*: NmTret1-like X1 (XP_031847112.1); 银额果蝇 *Drosophila albomicans*: DaTret1 X1 (XP_034103480.1); 铜绿蝇 *Lucilia cuprina*: LcTret1 X1 (XP_023292603.1); 德国小蠊 *Blattella germanica*: BgTret1 (PSN42188.1); 柑橘木虱 *Diaphorina citri*: DcTret1-like (XP_026682851.1)

图 2 基于氨基酸序列构建的 NITret1 与其他昆虫 Tret1 的系统发育树(邻接法)

Fig. 2 Phylogenetic tree of NITret1s and Tret1 proteins from other insect species based on the amino acid sequence (neighbor-joining method)

2.3 RNAi 后褐飞虱体内两个 *NITret1* 的表达情况

与注射 dsGFP 组相比, 干扰 *NITret1-like X1* 或 *NITret1-2 X1* 48 h 后褐飞虱体内靶标基因的表达量均极显著下降 ($P<0.01$) (图 3), ds*NITret1-like X1* 或 ds*NITret1-2 X1* 的干扰效率分别为 66.38% 和 89.45%, 表明靶标基因的干扰有效。

2.4 RNAi 后褐飞虱体内海藻糖代谢通路相关基因的表达情况

与注射 dsGFP 组相比, 干扰 *NITret1-like X1* 48 h 后褐飞虱体内 *TPS1*、*TPS2*、*TRE1-1*、*TRE1-2* 和 *TRE2* 的表达量均极显著下降; 而在干扰 *NITret1-2 X1* 48 h 后褐飞虱体内 *TPS1*、*TPS2* 和 *TRE1-1* 也极显著低表达, 但 *TRE1-2*

和 *TRE2* 的相对表达量极显著上升 ($P<0.01$) (图 4)。

2.5 RNAi 后对褐飞虱体内糖原、海藻糖和葡萄糖含量的影响

与注射 *dsGFP* 组相比,干扰 *NITret1-like X1* 48 h 体内

海藻糖含量极显著增加 ($P<0.01$), 而其他糖类物质含量变化均不显著。干扰 *NITret1-2 X1* 48 h 后, 褐飞虱体内的海藻糖、葡萄糖和糖原含量均无显著变化 (图 5)。

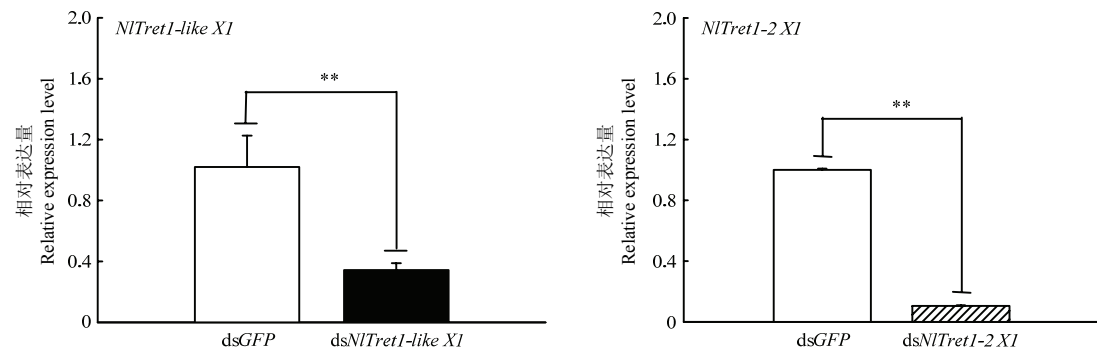


图 3 注射 48 h 后 *NITret1-like X1* 和 *NITret1-2 X1* 的表达量

Fig. 3 Relative expression level of *NITret1-like X1* and *NITret1-2 X1* after injection for 48 h in *N. lugens*

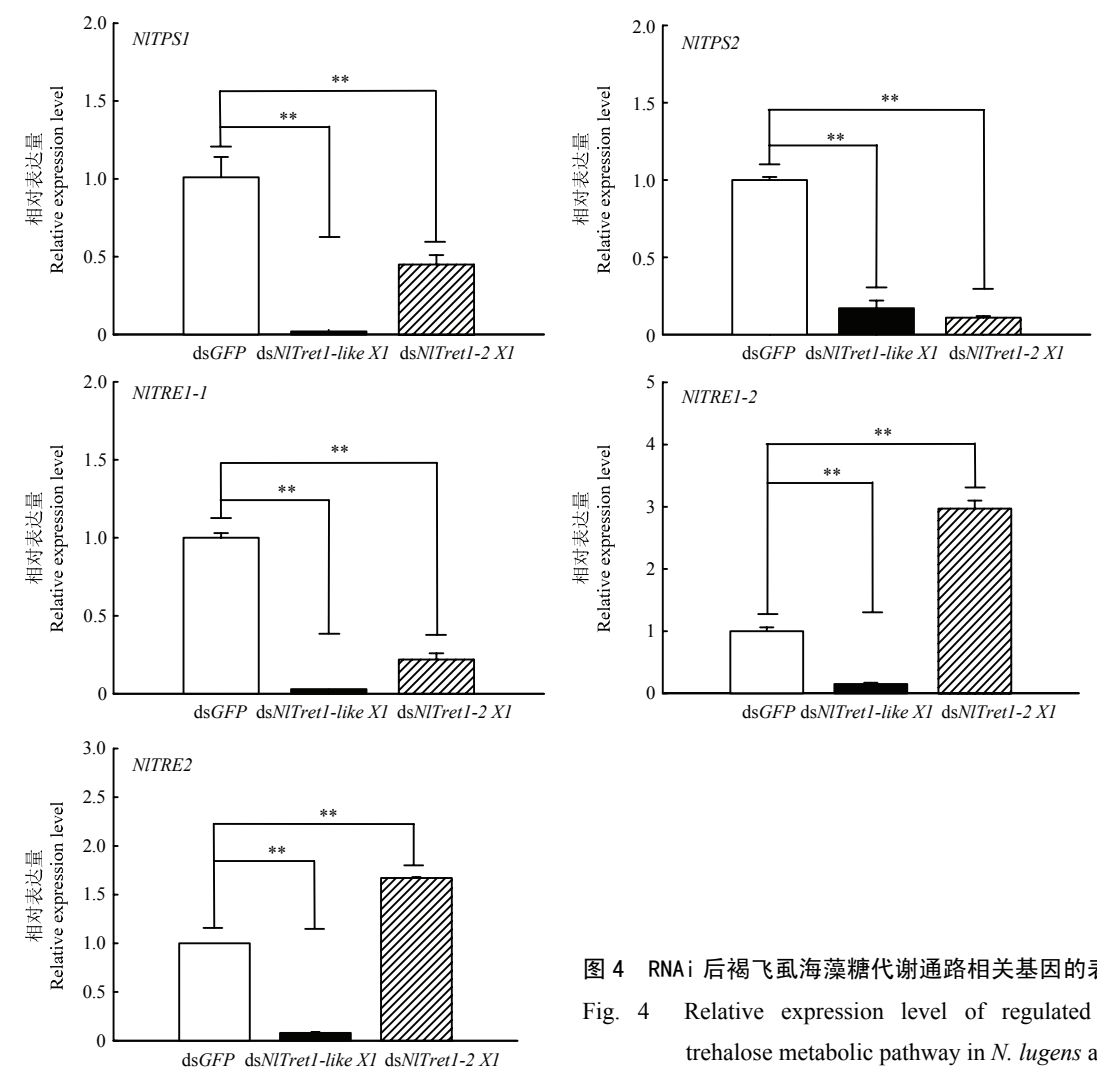
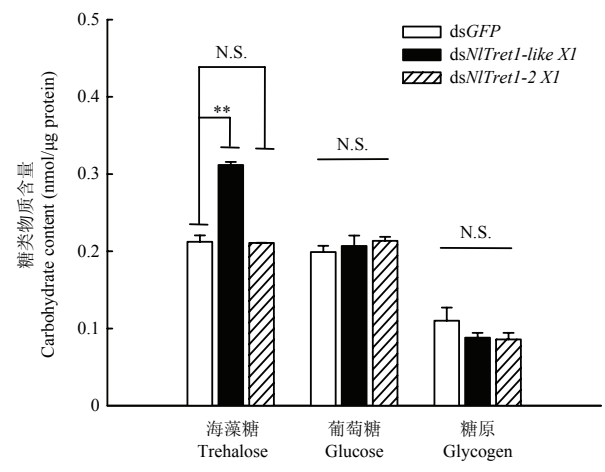


图 4 RNAi 后褐飞虱海藻糖代谢通路相关基因的表达量

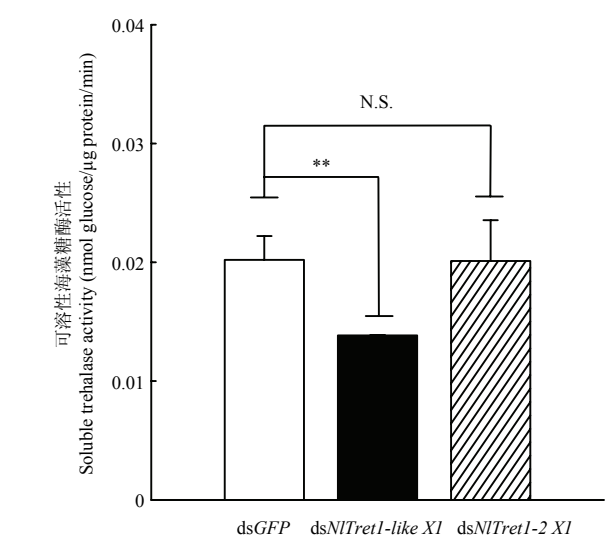
Fig. 4 Relative expression level of regulated genes of trehalose metabolic pathway in *N. lugens* after RNAi



N.S.代表差异不显著。下同
N.S. indicates no significant difference. The same as below

图 5 RNAi 48 h 后褐飞虱体内海藻糖、葡萄糖和糖原的含量

Fig. 5 Contents of trehalose, glucose and glycogen in *N. lugens* after RNAi



2.6 RNAi 后对褐飞虱体内海藻糖酶活性的影响

与注射 dsGFP 组相比，褐飞虱体内可溶性海藻糖酶和膜结合型海藻糖酶活性在干扰 *NITret1-like X1* 48 h 后均极显著下降 ($P<0.01$)，而在干扰 *NITret1-2 X1* 后未出现显著变化 (图 6)。

3 讨论

不同昆虫的 Tret 具有相似的氨基酸序列，且与葡萄糖转运蛋白超家族相似，因此有研究表明 Tret1 可能是葡萄糖转运蛋白超家族的新成员^[31]。此外，也有研究证实，嗜眠摇蚊 (*Polypedilum vanderplanki*) Tret1 不仅可以转运海藻糖，还可以转运葡萄糖类似物^[21]。在葡萄糖转运蛋白 (glucose transporter, Glut) 超家族的几乎所有成员 (包括 Tret1) 中都可以看到序列相似性，但它们的生化特性 (例如底物选择性和动力学) 差异很大，如 Glut1 的底物是葡萄糖、半乳糖、甘露糖和葡萄糖胺，而 Glut5 和 H⁺-肌醇协同转运蛋白 (H⁺-myo-inositol cotransporter, HMIT) 的特定底物

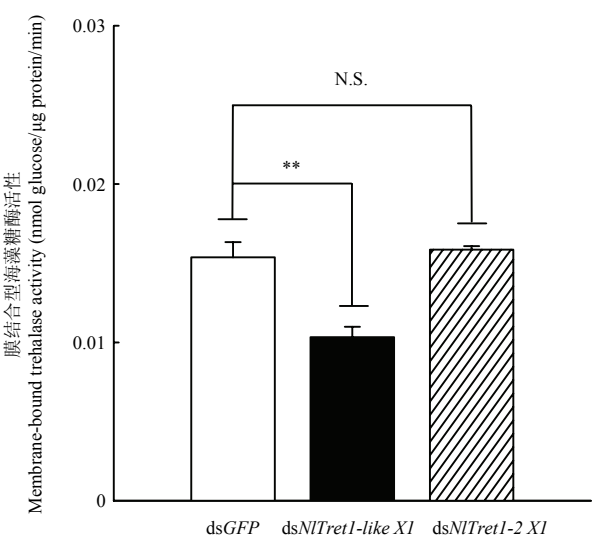


图 6 RNAi 后褐飞虱体内的海藻糖酶活性

Fig. 6 Enzyme activity of trehalase in *N. lugens* after RNAi

分别是果糖和肌醇^[32]。说明除了保守区域中的氨基酸残基外，其他氨基酸残基也可能对每个转运蛋白的特异性产生影响。本研究通过生物信息学方法分析了褐飞虱的两个 Tret1 序列，发现它们的二级结构主要是螺旋及卷曲，且均属于 MFS 超家族。但其二级结构以及保守结构域外的氨基酸残基均存在差异，推测它们

的海藻糖转运功能可能存在差异。此外，这两个 NITret1 同其他糖转运蛋白相似，拥有较多个跨膜区域，其中 NITret1-like X1 有 12 个跨膜区域，NITret1-2 X1 有 10 个跨膜区域 (图 1)。SAIER 研究表明，MFS 超家族成员蛋白的二级结构预测显示其大多都具有 12 次 α -螺旋跨膜结构域，而其他一些具有 14 或 24 次

α -螺旋的可能是进化过程中以 12 次跨膜 α -螺旋为基础产生的^[33]。NITret1-2 X1 只具有 10 个跨膜区域,可能是由于所得到的片段并不是全长。

海藻糖是昆虫中的主要血淋巴糖,而海藻糖转运蛋白则负责海藻糖的运输并调节海藻糖在不同组织中的分布,在昆虫的营养稳态和胁迫耐受性中起着重要作用^[11-15,24]。此外,自在秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)的研究中首次发现 RNAi 现象之后, RNAi 技术已成为昆虫基因功能研究、基因表达调控、害虫控制、新型农药开发等方面的有力工具^[34-36]。本研究在验证基因干扰有效的前提下(图 3),检测了与海藻糖代谢相关的一些基因表达情况以及部分生化指标,发现干扰 NITret1-like X1 后,褐飞虱体内所有的 TPS 和 TRE 均呈极显著低表达(图 4),但 TPS 的表达量高于 TRE 的表达量,且可溶性海藻糖酶及膜结合型海藻糖酶的活性均极显著下降(图 6),因此在干扰 NITret1-like X1 后,褐飞虱体内的海藻糖被积累(图 5)。干扰 NITret1-2 X1 后 TPS 的表达量均显著下降且 TRE1-2 和 TRE2 均极显著高表达(图 4),但海藻糖酶活性无明显变化(图 6),推测可能是褐飞虱体内的糖原和葡萄糖在向海藻糖转化,导致褐飞虱体内的海藻糖含量无显著变化(图 5)。在大猿叶虫(*Colaphellus bowringi*)中发现了两个 Tret1,其中 Tret1a 在脂肪体中高表达,且 RNAi 后会导致脂肪体中海藻糖含量升高;Tret1b 则在卵巢中高表达,然而在干扰其表达后,卵巢内的海藻糖含量却呈极显著下降趋势^[37]。表明不同的 Tret1 可能在不同的组织或不同的生理过程中起作用。但由于大猿叶虫的研究主要针对脂肪体和卵巢组织进行,与本研究选取整个虫体存在差异,笔者推测褐飞虱的两个 Tret1 可能也在不同组织间发挥着不同功能, NITret1-like X1 可能在特异性转运海藻糖参与能量供应中起到更为显著的作用。

4 结 论

褐飞虱的两个 Tret1 结构均较为简单,主要为螺旋和卷曲;此外,它们均属于 MFS 超家族,具有较多的跨膜结构域;褐飞虱的 Tret1 与其他昆虫的 Tret1 具有较高的同源性,且与其他半翅目昆虫如黄蔗蚜等的亲缘关系较近;注射 dsNITret1-like X1 和 dsNITret1-2 X1 均能有效抑制本基因的表达;dsNITret1-like X1 和 dsNITret1-2 X1 注射到褐飞虱体内,能够打破体内海藻糖代谢的平衡。推测褐飞虱的这两个 Tret1

可能在不同组织间发挥着不同的功能,且 NITret1-like X1 在特异性转运海藻糖参与能量供应中起到更为显著的作用。

References

- [1] 徐春春, 纪龙, 陈中督, 方福平. 2017 年我国水稻产业形势分析及 2018 年展望. 中国稻米, 2018, 24(2): 1-3.
XU C C, JI L, CHEN Z D, FANG F P. Analysis of China's rice industry in 2017 and the outlook for 2018. *China Rice*, 2018, 24(2): 1-3. (in Chinese)
- [2] CHENG X Y, ZHU L L, HE G C. Towards understanding of molecular interactions between rice and the brown planthopper. *Molecular Plant*, 2013, 6(3): 621-634.
- [3] LU G, ZHANG T, HE Y, ZHOU G. Virus altered rice attractiveness to planthoppers is mediated by volatiles and related to virus titre and expression of defense and volatile-biosynthesis genes. *Scientific Reports*, 2016, 6: 38581.
- [4] BODDUPALLY D, TAMIRISA S, GUNDRAS R, VUDEM D R, KHAREEDU V R. Expression of hybrid fusion protein (Cry1Ac::ASAL) in transgenic rice plants imparts resistance against multiple insect pests. *Scientific Reports*, 2018, 8: 8458.
- [5] 吴碧球, 黄所生, 黄凤宽. 环境因素对水稻品种抗褐飞虱的影响研究概况. 植物保护, 2015, 41(1): 1-6.
WU B Q, HUANG S S, HUANG F K. A review on factors affecting resistance of rice varieties to the rice brown planthopper. *Plant Protection*, 2015, 41(1): 1-6. (in Chinese)
- [6] TANAKA K, ENDO S, KAZANO H. Toxicity of insecticides to predators of rice planthoppers: Spiders, the mirid bug and the dryinid wasp. *Applied Entomology and Zoology*, 2000, 35(1): 177-187.
- [7] ROLA A C, PINGALI P L. *Pesticides, Rice Productivity, and Farmers' Health: An Economic Assessment*. Manila, Philippines: International Rice Research Institute, 1993.
- [8] NAUEN R, DENHOLM I. Resistance of insect pests to neonicotinoid insecticides: Current status and future prospects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2005, 58(4): 200-215.
- [9] WANG H Y, YANG Y, SU J Y, SHEN J L, GAO C F, ZHU Y C. Assessment of the impact of insecticides on *Anagrus nilaparvatae* (Pang et Wang) (Hymenoptera: Mymaridae), an egg parasitoid of the rice planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae). *Crop Protection*, 2008, 27(3/5): 514-522.
- [10] BOTTRELL D G, SCHOENLY K G. Resurrecting the ghost of green revolutions past: The brown planthopper as a recurring threat to high-yielding rice production in tropical Asia. *Journal of Asia-Pacific*

- Entomology*, 2012, 15(1): 122-140.
- [11] BECKER A, SCHLÖDER P, STEELE J E, WEGENER G. The regulation of trehalose metabolism in insects. *Experientia*, 1996, 52(5): 433-439.
- [12] ELBEIN A D, PAN Y T, PASTUSZAK I, CARROLL D. New insights on trehalose: A multifunctional molecule. *Glycobiology*, 2003, 13(4): 17R-27R.
- [13] IORDACHESCU M, IMAI R. Trehalose biosynthesis in response to abiotic stresses. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2008, 50(10): 1223-1229.
- [14] TANG B, CHEN J, YAO Q, PAN Z Q, XU W H, WANG S G, ZHANG W Q. Characterization of a trehalose-6-phosphate synthase gene from *Spodoptera exigua* and its function identification through RNA interference. *Journal of Insect Physiology*, 2010, 56(7): 813-821.
- [15] SHUKLA E, THORAT L J, NATH B B, GAIKWAD S M. Insect trehalase: Physiological significance and potential applications. *Glycobiology*, 2015, 25(4): 357-367.
- [16] AVONCE N, MENDOZA-VARGAS A, MORETT E, ITURRIAGA G. Insights on the evolution of trehalose biosynthesis. *BMC Evolutionary Biology*, 2006, 6: 109.
- [17] TANG B, WANG S, WANG S G, WANG H J, ZHANG J Y, CUI S Y. Invertebrate trehalose-6-phosphate synthase gene: Genetic architecture, biochemistry, physiological function, and potential applications. *Frontiers in Physiology*, 2018, 9: 30.
- [18] 刘貽聪. 丽蚜小蜂取食糖分对寄生烟粉虱的影响及糖转运蛋白诱导表达分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2018.
- LIU Y C. Effects of sugar diets on the parasitism of *Encarsia formosa* on *Bemisia tabaci* and analysis of induced expression of sugar transporter gene[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2018. (in Chinese)
- [19] 郭婧, 范宇鸿, 宋立猛. 葡萄糖转运蛋白-1 在肿瘤中的表达及意义. 国际检验医学杂志, 2019, 40(16): 2009-2011, 2034.
- GUO J, FAN Y H, SONG L M. Expression and significance of glucose transporter-1 in tumors. *International Journal of Laboratory Medicine*, 2019, 40(16): 2009-2011, 2034. (in Chinese)
- [20] 杨泽众. Q 烟粉虱与内共生细菌互作机制及 B 烟粉虱糖转运蛋白超家族注释与功能研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2017.
- YANG Z Z. Symbiotic relationship between *Bemisia tabaci* B and its endosymbionts and annotation and function research of sugar transporter superfamily of *Bemisia tabaci* B[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2017. (in Chinese)
- [21] KIKAWADA T, SAITO A, KANAMORI Y, NAKAHARA Y, IWATA K, TANAKA D, WATANABE M, OKUDA T. Trehalose transporter 1, a facilitated and high-capacity trehalose transporter, allows exogenous trehalose uptake into cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(28): 11585-11590.
- [22] KIKUTA S, NAKAMURA Y, HATTORI M, SATO R, KIKAWADA T, NODA H. Herbivory-induced glucose transporter gene expression in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2015, 64: 60-67.
- [23] PRICE D R, WILKINSON H S, GATEHOUSE J A. Functional expression and characterisation of a gut facilitative glucose transporter, NIHT1, from the phloem-feeding insect *Nilaparvata lugens* (rice brown planthopper). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2007, 37(11): 1138-1148.
- [24] KIKUTA S, KIKAWADA T, HAGIWARA-KOMODA Y, NAKASHIMA N, NODA H. Sugar transporter genes of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*: A facilitated glucose/fructose transporter. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, 40(11): 805-813.
- [25] PRICE D R, KARLEY A J, ASHFORD D A, ISAACS H V, POWNALL M E, WILKINSON H S, GATEHOUSE J A, DOUGLAS A E. Molecular characterisation of a candidate gut sucrose in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2007, 37(4): 307-317.
- [26] YOON J S, MOGILICHERLA K, GURUSAMY D, CHEN X, CHEREDDY S C, PALLI S R. Double-stranded RNA binding protein, Staufen, is required for the initiation of RNAi in coleopteran insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(33): 8334-8339.
- [27] XI Y, PAN P L, YE Y X, YU B, XU H J, ZHANG C X. Chitinase-like gene family in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect Molecular Biology*, 2015, 24(1): 29-40.
- [28] ZHAO L N, YANG M M, SHEN Q D, SHI Z K, WANG S G, TANG B. Functional characterization of three trehalase genes regulating the chitin metabolism pathway in rice brown planthopper using RNA interference. *Scientific Reports*, 2016, 6: 27841.
- [29] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [30] ZHANG L, QIU L Y, YANG H L, WANG H J, ZHOU M, WANG S G,

- TANG B. Study on the effect of wing bud chitin metabolism and its developmental network genes in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, by knockdown of *TRE* gene. *Frontiers in Physiology*, 2017, 8: 750.
- [31] KANAMORI Y, SAITO A, HAGIWARA-KOMODA Y, TANAKA D, MITSUMASU K, KIKUTA S, WATANABE M, CORNETTE R, KIKAWADA T, OKUDA T. The trehalose transporter 1 gene sequence is conserved in insects and encodes proteins with different kinetic properties involved in trehalose import into peripheral tissues. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, 40(1): 30-37.
- [32] ULDRY M, THORENS B. The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *European Journal of Physiology*, 2004, 447(5): 480-489.
- [33] SAIER M H. Genome archeology leading to the characterization and classification of transport proteins. *Current Opinion in Microbiology*, 1999, 2(5): 555-561.
- [34] PRENTICE K, CHRISTIAENS O, PERTRY I, BAILEY A, NIBLETT C, GHISLAIN M, GHEYSEN G, SMAGGHE G. RNAi-based gene silencing through dsRNA injection or ingestion against the African sweet potato weevil *Cylas puncticollis* (Coleoptera: Brentidae). *Pest Management Science*, 2017, 73(1): 44-52.
- [35] LOU Y H, PAN P L, YE Y X, CHENG C, XU H J, ZHANG C X. Identification and functional analysis of a novel chorion protein essential for egg maturation in the brown planthopper. *Insect Molecular Biology*, 2018, 27(3): 393-403.
- [36] XI Y, PAN P L, ZHANG C X. The β -n-acetylhexosaminidase gene family in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect Molecular Biology*, 2015, 24(6): 601-610.
- [37] LI J X, CAO Z, GUO S, TIAN Z, LIU W, ZHU F, WANG X P. Molecular characterization and functional analysis of two trehalose transporter genes in the cabbage beetle, *Colaphellus bowringi*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 2020, 23(3): 627-633.

(责任编辑 岳梅)