

草地贪夜蛾听觉基因 *Cut* 和 *Spalt* 时空表达分析及其功能研究*

何昕峪** 吴宇** 王慧敏 张爱兵***

(首都师范大学生命科学学院, 北京 100048)

摘要 【目的】研究草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 听觉基因 *Cut* 和 *Spalt* 的时空表达特性及其在听器发育过程中的生物学功能, 为草地贪夜蛾的害虫防治提供科学依据。【方法】从 NCBI 数据库上查找并下载草地贪夜蛾 *Cut* 和 *Spalt* 基因的全长序列, 并进行生物信息学分析; 利用实时荧光定量 PCR (Quantitative Real-time PCR, qPCR) 技术检测 *Cut* 和 *Spalt* 基因在草地贪夜蛾不同发育阶段和成虫不同组织中的相对表达量; 通过 RT-PCR 技术克隆 *Cut* 和 *Spalt* 基因的干扰片段, 然后采用 RNAi 和 qPCR 技术验证干扰效率并观察虫体的发育表型。【结果】草地贪夜蛾 *Cut* 基因的氨基酸序列与斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 序列相似度最高, 为 99.19%, *Spalt* 基因的氨基酸序列与美洲棉铃虫 *Helicoverpa zea* 序列相似度最高, 为 97.15%。*Cut* 和 *Spalt* 基因在草地贪夜蛾各发育阶段和成虫各组织中均有表达, 在蛹期第 7 天和成虫头部的表达量最高。本研究设计并扩增获得草地贪夜蛾的 *Cut* 和 *Spalt* 基因的干扰片段, 长度分别为 486 bp 和 317 bp。RNAi 表明, 在幼虫第 5 龄期干扰可显著降低 *Cut* 和 *Spalt* 基因的相对表达量, 在成虫出现听器和翅发育异常的现象。【结论】*Cut* 和 *Spalt* 基因的沉默会使草地贪夜蛾幼虫体内基因表达水平下调并影响成虫听觉器官和翅的发育。

关键词 草地贪夜蛾; 时空表达; 听器发育; RNA 干扰

Spatio-temporal expression and function of the *Spodoptera frugiperda* *Cut* and *Spalt* auditory genes

HE Xin-Yu** WU Yu** WANG Hui-Min ZHANG Ai-Bing***

(College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100048, China)

Abstract 【Objectives】To investigate the spatio-temporal expression and biological function of the *Cut* and *Spalt* genes in *Spodoptera frugiperda* during the development of the auditory organ. 【Methods】Full-length sequences of the *Cut* and *Spalt* genes were downloaded from the NCBI website and bioinformatics analysis performed. Quantitative Real-time PCR was used to detect the relative expression level of *Cut* and *Spalt* in different developmental stages and adult tissues. Interference fragments of *Cut* and *Spalt* were cloned with RT-PCR after which RNAi and qPCR were used to verify their effectiveness and observe the developmental phenotype of the resultant genetically modified insects. 【Results】The amino acid sequence of the *S. frugiperda* *Cut* gene is most similar to that of *Spodoptera litura* (99.19%), whereas the amino acid sequence of the *S. frugiperda* *Spalt* gene is most similar to that of *Helicoverpa zea* (97.15%). *Cut* and *Spalt* were expressed in all developmental stages and adult tissues; expression was highest on the 7th day of the pupal stage and in the heads of adults. Interference fragments for *S. frugiperda* *Cut* and *Spalt*, with lengths of 486 bp and 317 bp, respectively, were successfully designed and amplified. RNAi significantly reduced the relative expression of *Cut* and *Spalt* in 5th instar larvae, resulting in abnormal

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金面上项目 (32170421); “十四五”时期北京市属高校教师队伍建设支持计划 (BPHR20220114)

**共同第一作者 Co-first authors, E-mail: 2200802118@cnu.edu.cn; 2200802112@cnu.edu.cn

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: zhangab2008@cnu.edu.cn

收稿日期 Received: 2022-06-01; 接受日期 Accepted: 2022-06-28

development of the auditory organ and wing in adults. **[Conclusion]** Silencing *Cut* and *Spalt* down-regulated gene expression in larvae, thereby impairing normal development of the auditory organ and wing in adult *S. frugiperda*.

Key words *Spodoptera frugiperda*; the temporal and spatial expression; the development of auditory organ; RNAi

听觉在昆虫的生存活动中扮演着非常重要的角色,如躲避捕食者、吸引异性并寻求配偶和进行种内信息交流等(Nakano *et al.*, 2006; 王珊等, 2010; Corcoran and Conner, 2017)。目前对于昆虫听觉的研究集中在形态学、生理学和行为学上(Hoy and Robert, 1996)。蛾类的听器属于较为高级的鼓膜听器(Zha *et al.*, 2009),以夜蛾科 Noctuidae 研究居多。夜蛾的听器分布在后胸两侧,其鼓膜是胸部骨骼部分表皮形成的薄膜,鼓膜后面有一个充满空气的大气囊,通过后胸的气门与大气相通,鼓膜气囊与逆鼓腔相连向后延伸一直向腹腔内突出(Eaton, 1988; David, 1999; Heldman and Brinker, 1999)。然而,有关昆虫听觉相关基因的研究较少,而且主要集中在秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* (Tobin *et al.*, 2002) 和黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (Todi *et al.*, 2004) 等模式物种上。

昆虫 *Cut* 和 *Spalt* 基因在双翅目、鳞翅目、膜翅目、鞘翅目和半翅目等许多种昆虫中被发现,其中研究较多的是双翅目的果蝇。在果蝇中, *Cut* 和 *Spalt* 参与多种类型的器官形成过程,主要有翅的模式形成(Ludlow *et al.*, 1996; Celis and Barrio, 2000)、江氏器的发育(Dong *et al.*, 2003) 及感觉器官的发育(Dong *et al.*, 2002; Ebacher *et al.*, 2007)。果蝇的听觉器官江氏器分布在触角(Eberl and Boekhoff-Falk, 2013), *Cut* 基因是一类转录因子(Bürglin and Cassata, 2002),是江氏器发育所必需的(Blochlinger *et al.*, 1990, 1991),当触角 *Cut* 基因表达缺失时,会导致构成江氏器具感器的表皮结构被严重破坏,使得江氏器出现异常分化,最终果蝇完全丧失听觉(Ebacher *et al.*, 2007)。*Spalt* 基因编码核 C2H2 锌指蛋白,并具有转录因子的作用(Kühnlein *et al.*, 1994; 查玉平和陈京元, 2011),当触角 *Spalt* 基因表达缺失时,果蝇会表现出江氏器的缺陷,

使声音诱发的神经电位丧失,最终导致果蝇成虫的听力丧失(Gpfert *et al.*, 2012)。

草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 隶属鳞翅目夜蛾科灰翅夜蛾属,是联合国粮农组织全球预警的世界十大植物害虫之一(Chen *et al.*, 2022)。该虫最早起源于美洲热带和亚热带地区,在美洲每年都会定期迁移,2016 年从美洲入侵非洲,2018 年入侵印度、孟加拉国、泰国、缅甸等亚洲国家,2018 年入侵中国云南(吴秋琳等, 2019)。草地贪夜蛾是一种杂食性害虫,危害玉米和水稻等 353 种植物,因其幼虫扩散能力强和成虫迁飞能力强,对我国粮食安全构成严重威胁(Montezano *et al.*, 2018)。目前对于草地贪夜蛾听器的发育机制知之甚少,本研究依据昆虫听觉相关基因的研究现状,对草地贪夜蛾 *Cut* 和 *Spalt* 基因进行生物信息学分析;通过 qPCR 技术检测 *Cut* 和 *Spalt* 基因的时空表达特征,推测其在草地贪夜蛾生长发育过程中的功能;同时采用 RNAi 技术研究基因的功能,为鳞翅目昆虫听器发育相关基因的功能研究以及鳞翅目害虫防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

草地贪夜蛾虫卵购于河南省济源白云实业有限公司,放置于生化培养箱内孵育饲养。温度保持在 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$,相对湿度在 $50\% \pm 10\%$,光照周期为 16 L : 8 D,幼虫用人工饲料喂养(李传瑛等, 2019),成虫喂食 10% 蜂蜜水。

1.2 引物设计及合成

通过查阅大量有关果蝇听觉相关基因的文献(Boekhoff-Falk, 2005; Bokolia and Mishra, 2015),利用果蝇已知的 *Cut* (*Ct*, GeneBank 登录号: NM_001272381.2), *Spalt major* (*Salm*,

GeneBank 登录号:NM_164966.3)和 *Spalt-related* (*Salr*, GeneBank 登录号:NM_001259054.2) 基因序列,对草地贪夜蛾基因组(GeneBank 登录号:NC_049710.1)中的同源基因进行了检索,得到草地贪夜蛾 *Cut* (GeneBank 登录号:XM_035592076.1)和 *Spalt* (GeneBank 登录号:

XM_035590009.1) 基因序列。从 NCBI 下载基因 CDS 序列,用 ClustalX2 软件比对出保守区后使用 Primer Premier 5.0 设计干扰片段的引物(表 1)。同时基于 *Cut* 和 *Spalt* 基因序列,设计 qPCR 特异性引物,由生工生物工程(北京)股份有限公司合成(表 1)。

表 1 试验所用的引物及其序列

Table 1 Sequence of primers in this experiment

引物用途 Primer application	引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Sequence of primers (5'-3')
基因克隆 Gene cloning	SfCut F	CAGAACCAGCAGATGAACG
	SfCut R	CAGTCTTTGGCTAATGGAGTA
	SfSpalt F	CCCATTTCGCATCTTACAC
	SfSpalt R	AAACGGTTCATTTCTTCC
dsRNA 合成 dsRNA synthesis	dsSfCut F	TAATACGACTCACTATAGGCAGAACCAGCAGATGAACG
	dsSfCut R	TAATACGACTCACTATAGGCAGTCTTTGGCTAATGGAGTA
	dsSfSpalt F	TAATACGACTCACTATAGGCCCATTCGCATCTTACAC
	dsSfSpalt R	TAATACGACTCACTATAGGAAACGGTTCATTTCTTCC
qPCR Quantitative Real-time PCR	SfCut qF	ACAATCACCGAATGCGACTA
	SfCut qR	CAGACCCATCCTTTCCTTTT
	SfSpalt qF	TGGATGGTCCTAACAAACG
	SfSpalt qR	TCGGCTTCAGGCACTTCT
	RPL32 F	GGTTTATCCGCCATCAATCGG
	RPL32 R	GGTAGCATGTGACGGGTCTT

1.3 草地贪夜蛾 *Cut* 和 *Spalt* 基因结构域及分子进化分析

利用 NCBI 的 blastp 进行氨基酸同源性分析,查找已知的其他物种 *Cut* 和 *Spalt* 基因的同源序列。下载选取物种的氨基酸序列进行多序列比对,分析氨基酸结构的保守区。采用软件 MEGA 6.06 (Tamura *et al.*, 2013) 中 ClustalW 对氨基酸序列进行比对,然后用邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 构建系统发育树,Bootstrap 取样值为 1 000。

1.4 RNA 提取及荧光定量检测

取 2 头羽化 3 d 的草地贪夜蛾成虫后胸听器用于总 RNA 的提取,具体提取操作见 Invitrogen 公司总 RNA 提取说明书。RNA 采用 1.0% 琼脂糖凝胶检测完整性,微量紫外分光光度计 Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher) 测定其浓度

和纯度。cDNA 合成步骤参照 TaKaRa 公司 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 试剂盒说明书,制备好的 cDNA 置于 -20 °C 备用。

荧光定量反应体系: cDNA 模板 3 μL, 2×Talent qPCR PreMix 10 μL, 正反向引物各 0.6 μL, 50×ROX Reference Dye 0.4 μL, RNase-free ddH₂O 5.4 μL。反应条件参照 Talent qPCR PreMix (SYBR Green) 试剂盒说明书进行: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 30 s; 60 °C 退火 30 s; 72 °C 延伸 30 s; 40 个循环。以核糖体蛋白 L32 基因 (*RPL32*) 为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析基因的相对表达量。

1.5 PCR 扩增、电泳检测及双链 RNA 合成

PCR 扩增体系为: 以 2 μL 的 cDNA 为模板, 正反向引物各 1 μL, dNTP Mixture 4 μL, 10×Ex Taq Buffer (Mg²⁺ plus) 5 μL, TaKaRa Ex Taq

0.5 μL , 补充灭菌水 36.5 μL 。PCR 扩增条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 复性 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 s, 30 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 总延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ ∞ 。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 然后在紫外凝胶成像仪中观测目的条带。取 30 μL 未纯化 PCR 产物送于生工生物测序, 获得正确的目标条带, 将扩增产物平端化后与 pLB 载体连接 (天根生化科技有限公司), 然后将连接产物转化 TOP10 感受态细胞, 涂布于含 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 平板上, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养过夜。氨苄抗性筛选出阳性菌落进行 PCR 鉴定与测序。测序正确后, 使用 TIANprep Midi Plasmid Kit (天根生化科技有限公司) 提取质粒备用。

双链 RNA 合成: 参考 T7 RiboMAXTM Express Large Scale RNA Production System (Promega) 试剂盒说明书在 PCR 引物两端加上 T7 启动子序列合成 RNA 干扰引物, 将 R 与 F-T7 配成引物对, F 与 R-T7 配成引物对, 以上述提取的质粒为模板分别进行两个 PCR 扩增反应, 得到合成双链的模板 1 和模板 2, 使用 Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) 回收纯化。分别将模板 1 和模板 2 用 T7 RNA 聚合酶进行体外转录, 反应体系: RiboMAXTM Express T7 2 $\times$ Buffer (37 $^{\circ}\text{C}$ 预热) 10 μL , Enzyme Mix, T7 Express 2 μL , 模板 1 或模板 2 1 μg , Nuclease-Free Water 补齐至总体积 20 μL 。将得到的正反义链等体积混合, 混匀后进行退火反应产生双链。用酸性酚氯仿抽提法纯化 dsRNA, dsRNA 浓度采用 Nanodrop ND-1000 测定, 并调至终浓度 2 500 g/L。

1.6 *Cut* 和 *Spalt* 的时空表达分析

不同发育时期: 选取 1-6 龄期的幼虫、预蛹期及第 1、3、5 和第 7 天的蛹和雌雄成虫进行表达量检测。不同组织: 选取雌性成虫头部、听器、肌肉、中肠和表皮进行表达量检测。以基因不同发育时期和不同组织的 cDNA 为模板, 利用 ABI QuantStudioTM 6 荧光定量 PCR 仪扩增。

1.7 *Cut* 和 *Spalt* 基因 RNA 干扰对草地贪夜蛾听器的影响

选取 5 龄第 1 天幼虫, 采取微量注射器将

5 μL dsRNA 从草地贪夜蛾幼虫后胸与腹部连接处的腹节处注入, 注射时避开气门, 以注射 dsGFP 为对照组, 每组共注射 50 头幼虫。将注射后的实验组与对照组放回培养箱, 饲养条件参照 1.1。48 h 后记录幼虫死亡率, 然后分别收集对照组和处理组听器部位样品, 每组 6 个生物学重复, 提取各样品的总 RNA 并反转录成第一链 cDNA, qPCR 检测目的基因 (*Cut* 和 *Spalt*) 和内参基因 (*RPL32*) 的相对表达量, 以计算目的基因的沉默效率。

剩余的幼虫继续饲养直至羽化, 饲养期间观察对照组和处理组幼虫的蜕皮和发育情况, 并记录异常表型。待羽化后, 去除头、翅和足, 保留后胸和第 1 腹节, 置于 0.9% 氯化钠溶液中解剖, 剥离表皮和听器周围的肌肉, 直至能看清鼓膜和逆鼓腔的结构, 使用体式显微镜进行观察, 根据逆鼓腔的形态判断是否发育完全。

1.8 数据分析

采用 SPSS 17.0 软件对时空表达试验数据进行 One-way ANOVA 分析, 并采用 Tukey 法进行多重比较分析 (Tang and Zhang, 2013)。用 Independent samples *T*-test 方法对 RNAi 处理前后的表达数据进行差异显著性分析。试验数据以平均值 $\pm$ 标准误表示。

2 结果与分析

2.1 *Cut* 和 *Spalt* 结构域分析

Cut 全长为 5 674 bp, ORF 为 4 098 bp, 编码 1 365 个氨基酸, 5'非翻译区为 681 bp, 3'非翻译区为 895 bp。*Spalt* 全长为 5 705 bp, ORF 为 4 035 bp, 编码 1 344 个氨基酸, 5'非翻译区为 183 bp, 3'非翻译区为 1 487 bp。使用 NCBI Conserved Domains 搜索, 在草地贪夜蛾 *Cut* 序列中存在 5 个结构域, 分别是 Smc super family (39-250 aa)、EnvC (135-250 aa)、CUT domain (342-406 aa, 741-816 aa, 948-1 023 aa)、COG5576 (1 067-1 130 aa) 和 Homeobox domain (1 075-1 128 aa) (图 1: A); *Spalt* 序列中存在 4 个结构域, 分别是 COG5048 (340-761 aa)、

SUF4-like super family (359-429 aa, 706-759 aa, 388-410 aa, 743-754 aa, 1 153-1 175 aa) 和 1 124-1 172 aa)、Zinc finger C2H2 (360-382 aa, PRK03427 super family (401-525 aa) (图 1: B)。

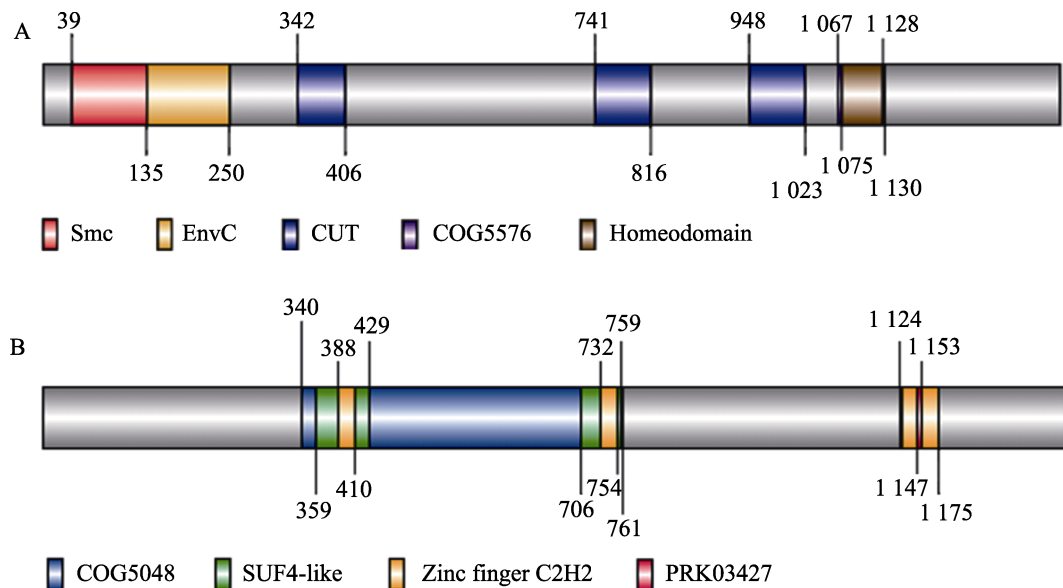


图 1 草地贪夜 *Cut* (A) 和 *Spalt* (B) 基因结构域

Fig. 1 *Cut* (A) and *Spalt* (B) domain of *Spodoptera frugiperda*

灰色代表基因编码区域的全长序列及非编码区域序列。A 图中分别是红色框 Smc super family (染色体结构维持), 黄色框 EnvC (间隔环因子, 胞壁质水解酶 AmiA 和 AmiB 的激活剂), 蓝色框 CUT domain (DNA 结合基序), 紫色框 COG5576 (含同源结构域的转录因子), 棕色框 Homeobox domain (DNA 结合结构域)。

B 图中分别是蓝色框 COG5048 (锌指), 绿色框 SUF4-like super family (N 端锌指结构域), 黄色框 Zinc finger C2H2 (锌指, C2H2 型), 红色框 PRK03427 super family (细胞分裂蛋白 ZipA)。

Gray represents the full length sequence of coding region and non-coding region. Figure A shows Smc super family (structural maintenance of chromosomes) in red box, EnvC (Septal ring factor EnvC, activator of murein hydrolases AmiA and AmiB) in yellow box, CUT domain (DNA-binding motif) in blue box, COG5576 (Homeobox-containing transcription factor) in purple box, Homeobox domain (DNA binding domain) in brown box, respectively. Figure B shows COG5048 (zinc finger) in blue box, SUF4-like super family (N-terminal zinc finger domain) in green box, Zinc finger C2H2 (Zinc finger, C2H2 type) in yellow box, PRK03427 super family (cell division protein ZipA) in red box, respectively.

2.2 同源性比对及系统发育分析

通过 NCBI 搜索比对, 草地贪夜蛾 *Cut* 基因的氨基酸序列与斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 相似度最高, 为 99.19%, 其次是棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (97.29%) 和美洲棉铃虫 *Helicoverpa zea* (96.92%); *Spalt* 基因的氨基酸序列与美洲棉铃虫相似度最高, 为 97.15%, 其次是海波斯莫科马属尖蛾 *Hypsmocoma kahamanoa* (86.11%) 和家蚕 *Bombyx mori* (85.39%)。从 NCBI 数据库中选取 13 种昆虫物种的 *Cut* 和 *Spalt* 基因的氨基酸序列, 构建系统发育树 (图 2)。结果表明, 所有鳞翅目昆虫的 2 个基因形成了一个亚分支,

与斜纹夜蛾、棉铃虫和美洲棉铃虫等夜蛾科昆虫亲缘关系较近, 与传统上的分类基本一致。

2.3 时空表达

qPCR 检测 *Cut* 和 *Spalt* 2 个基因在草地贪夜蛾幼虫、预蛹、蛹期及成虫和成虫头部、听器、肌肉、中肠及表皮的时空表达模式。结果显示, 在草地贪夜蛾不同发育阶段的表达检测中, *Cut* 基因的整体表达趋势是末龄幼虫期和蛹期的表达量相对较高, 1-5 龄幼虫其次, 成虫最低。具体来说, *Cut* 基因以蛹期第 1 天与第 7 天表达水平最高, 5 龄幼虫和成虫表达水平最低 (图 3: A); 在不同组织的表达检测中, *Cut* 基因在各

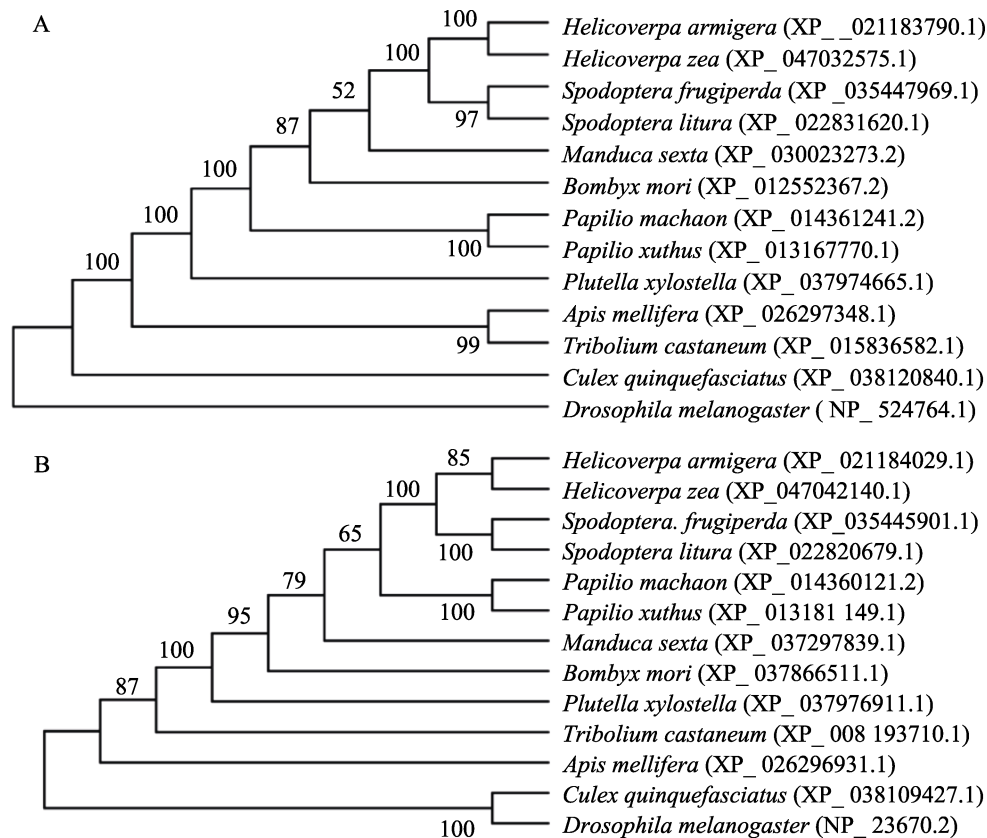


图 2 基于氨基酸序列构建的草地贪夜蛾及其他昆虫 *Cut* (A) 和 *Spalt* (B) 基因的分子进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on the amino acid sequences of insect *Cut* (A) and *Spalt* (B)

图中进化树节点数字代表自展 1 000 次重复检验的百分比值。

The number of nodes in the phylogenetic tree in the figure represents the percentage value using a bootstrap analysis of 1 000 replications.

所选生物物种包括 Selected biological species include: 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*; 致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus*; 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*; 意大利蜜蜂 *Apis mellifera*; 小菜蛾 *Plutella xylostella*; 柑橘凤蝶 *Papilio xuthus*; 金凤蝶 *Papilio machaon*; 家蚕 *Bombyx mori*; 烟草天蛾 *Manduca sexta*; 斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*; 美洲棉铃虫 *Helicoverpa zea*; 棉铃虫 *Helicoverpa armigera*; 草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda*.

组织中均有表达,但在头中的表达量最高,显著高于其它组织 ($P < 0.05$),在听器、肌肉、中肠和表皮组织中的表达量没有显著差异(图 3: B)。 *Spalt* 基因的整体表达趋势是蛹末期表达量最高,幼虫期和成虫期其次,具体以蛹期第 5 天和第 7 天表达水平最高,5 龄幼虫和雌性成虫中表达水平最低(图 3: C); *Spalt* 基因在头中的表达量最高,其次是肌肉,在听器中的表达量中等,而在中肠和表皮中的表达量最低(图 3: D)。

2.4 RNA 干扰验证基因功能

通过 RT-PCR 技术克隆获得草地贪夜蛾 *Cut*

和 *Spalt* 基因的干扰片段,分别得到 486 bp 和 317 bp 的条带(图 4)。

RNAi 结果发现,48 h 时,注射 dsGFP、ds*Cut* 和 ds*Spalt* 的 5 龄幼虫出现死亡现象(图 5: B-D),且处理组幼虫死亡后虫体明显比对照组更黑、更软;注射 *Cut* 基因 dsRNA 的虫体校正死亡率达到 20.8%,注射 *Spalt* 基因 dsRNA 的虫体校正死亡率为 16.7%,说明这 2 个基因在其生长发育过程中发挥一定的作用,注射 dsGFP 的虫体死亡率为 4%,可能是注射时造成的物理性损伤。qPCR 结果表明,注射 *Cut* 和 *Spalt* dsRNA 后幼虫体内 2 个基因的表达水平相比注射 dsGFP 的幼虫体内表达水平明显降低(图 6)。

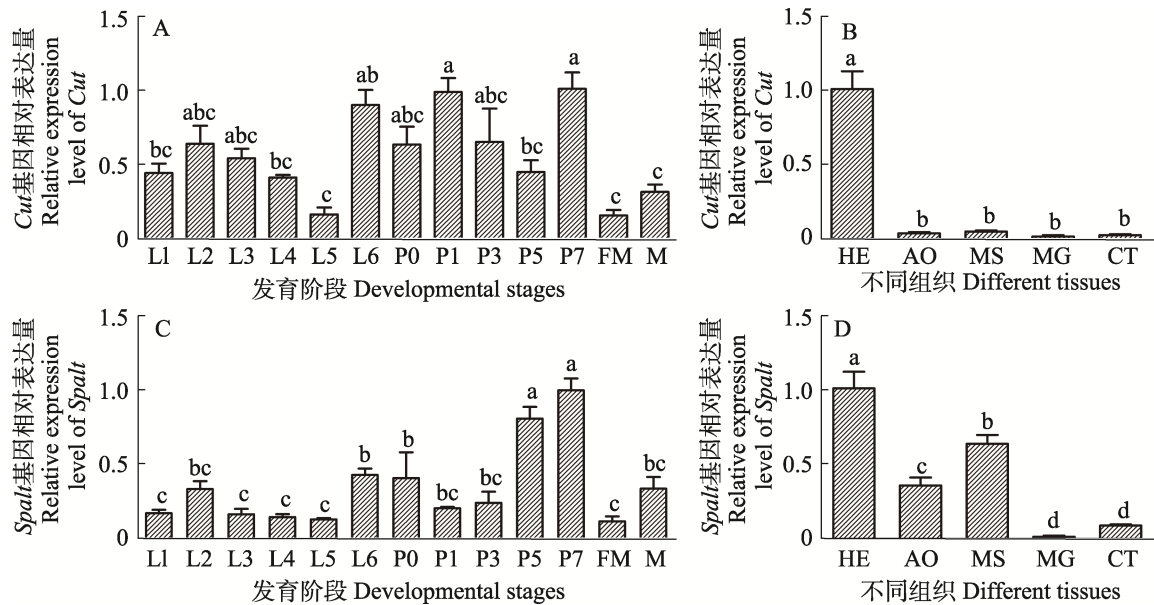


图3 *Cut* 和 *Spalt* 基因在草地贪夜蛾不同发育阶段和不同组织中的表达模式

Fig. 3 The developmental stages and different tissues expression level of *Cut* and *Spalt* in *Spodoptera frugiperda*

A. *Cut* 在不同发育时期 mRNA 水平相对表达量; B. *Cut* 在雌性成虫不同组织中 mRNA 水平相对表达量; C. *Spalt* 在不同发育时期 mRNA 水平相对表达量; D. *Spalt* 在雌性成虫不同组织中 mRNA 水平相对表达量。图中数值为平均值 $\pm$ 标准误, 柱上标有不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$, Tukey 检验)。以表达量最高为 1, L1-L6: 1-6 龄幼虫; P0: 预蛹; P1: 蛹期第 1 天; P3: 蛹期第 3 天; P5: 蛹期第 5 天; P7: 蛹期第 7 天; FM: 雌性成虫; M: 雄性成虫; HE: 头部; AO: 听器; MS: 肌肉; MG: 中肠; CT: 表皮。

A. Relative mRNA expression level of *Cut* at different developmental stages; B. Relative mRNA expression level of *Cut* at different tissues of female adult; C. Relative mRNA expression level of *Spalt* at different developmental stages; D. Relative mRNA expression level of *Spalt* at different tissues of female adult. Data are presented as mean $\pm$ SE, histograms with different letters are significantly different at 0.05 level by Tukey's test. The highest expression amount was 1, L1-L6: 1st-6th instar larvae, respectively; P0: Prepupae; P1: The first day of pupal stage; P3: The third day of pupal stage; P5: The fifth day of pupal stage; P7: The seventh day of pupal stage; FM: Female adults; M: Male adults; HE: Head; AO: Auditory organ; MS: Muscle; MG: Midgut; CT: Cuticle.

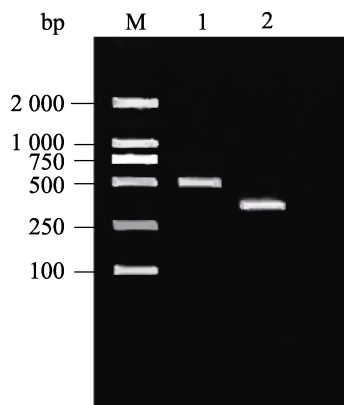


图4 保守区扩增结果

Fig. 4 Amplification of conserved region

M 泳道: DNA maker; 1 泳道: *Cut* 基因干扰片段, 486 bp; 2 泳道: *Spalt* 基因干扰片段, 317 bp。
Lane M: DNA marker; Lane 1: Interference fragment of *Cut*, 486 bp; Lane 2: Interference fragment of *Spalt*, 317 bp.

观察成虫羽化后的表型发现, 与对照组相比, 干扰 2 个基因后出现相似的残翅表型(图 7)。解剖听器的结果表明, 干扰 2 个基因后成虫听器发育异常, 其中逆鼓腔发育不完整, 与周围气囊边界不明显的表型占 31.5% (图 8: B); 逆鼓腔未发育, 整个听器边缘发黑的表型占 16.7% (图 8: D)。

3 结论与讨论

随着生物学技术的不断发展, RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 在昆虫基因功能方面被广泛应用, 并且可以作为一种有效的生物防治方法。RNAi 被证明是一种存在于真核生物中的基因调控机制, 能引起基因沉默 (徐雪亮等,

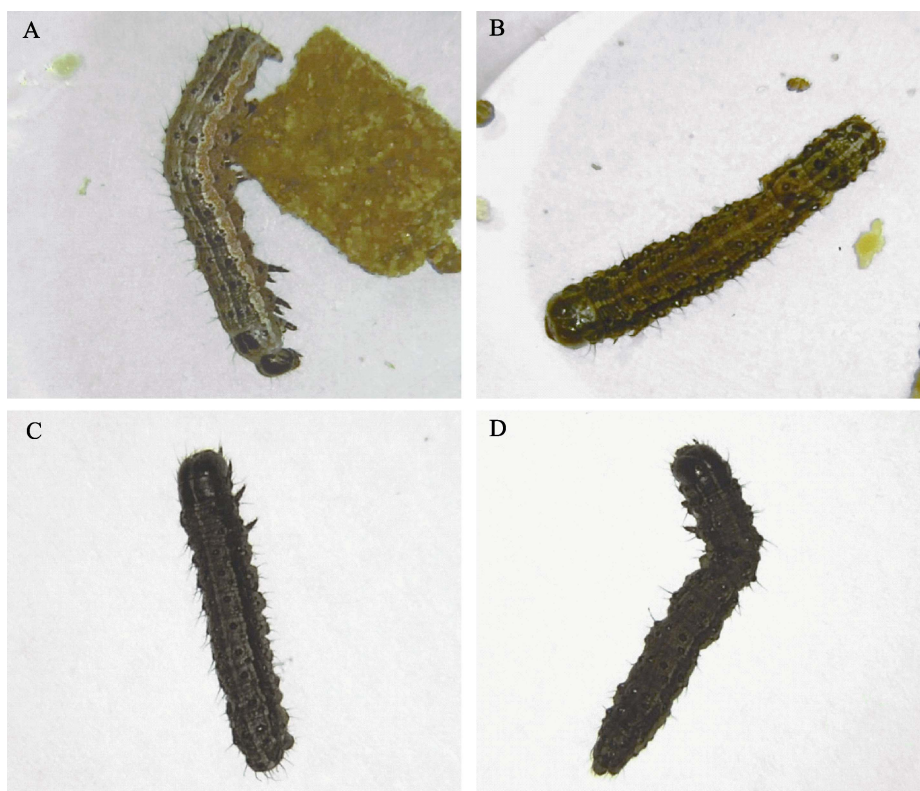
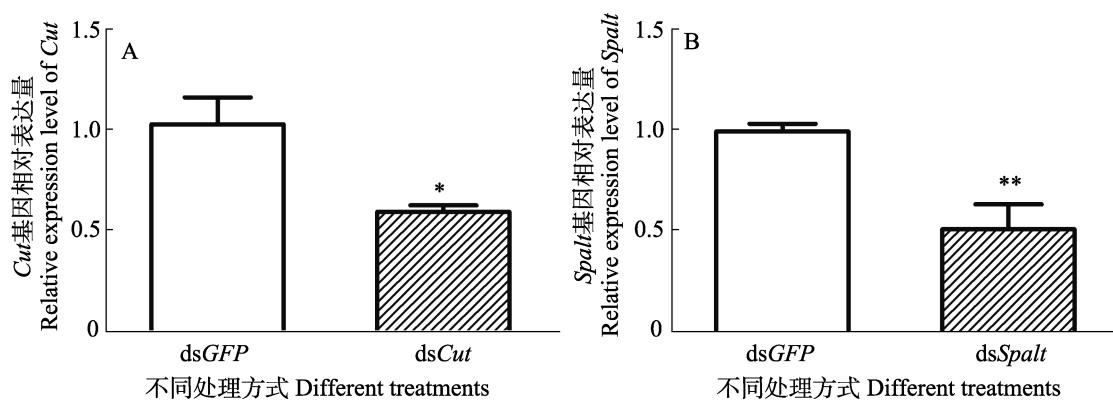


图 5 RNA 干扰 48 h 后虫体死亡表型

Fig. 5 The phenotype of dead larvae after RNAi for 48 h

- A. 野生型 5 龄幼虫; B. 注射 dsGFP 48 h 后死亡虫体; C. 注射 *Cut* dsRNA 48 h 后死亡虫体;
D. 注射 *Spalt* dsRNA 48 h 后死亡虫体。
A. 5th instar larva of wild type; B. Dead larva after injection of dsGFP for 48 h;
C. Dead larva after injection of dsCut for 48 h; D. Dead larva after injection of dsSpalt for 48 h.

图 6 RNA 干扰后 *Cut* (A) 和 *Spalt* (B) 的相对表达量Fig. 6 Expression level of *Cut* (A) and *Spalt* (B) after RNAi

*表示不同处理方式间差异显著 ($P < 0.05$, 独立样本 *T*-检验);

**表示不同处理方式间差异极显著 ($P < 0.01$, 独立样本 *T*-检验)。

* indicates significant differences between different treatments at 0.05 level by independent samples *T*-test;

** indicates extremely significant differences between different treatments at 0.01 level by independent samples *T*-test.

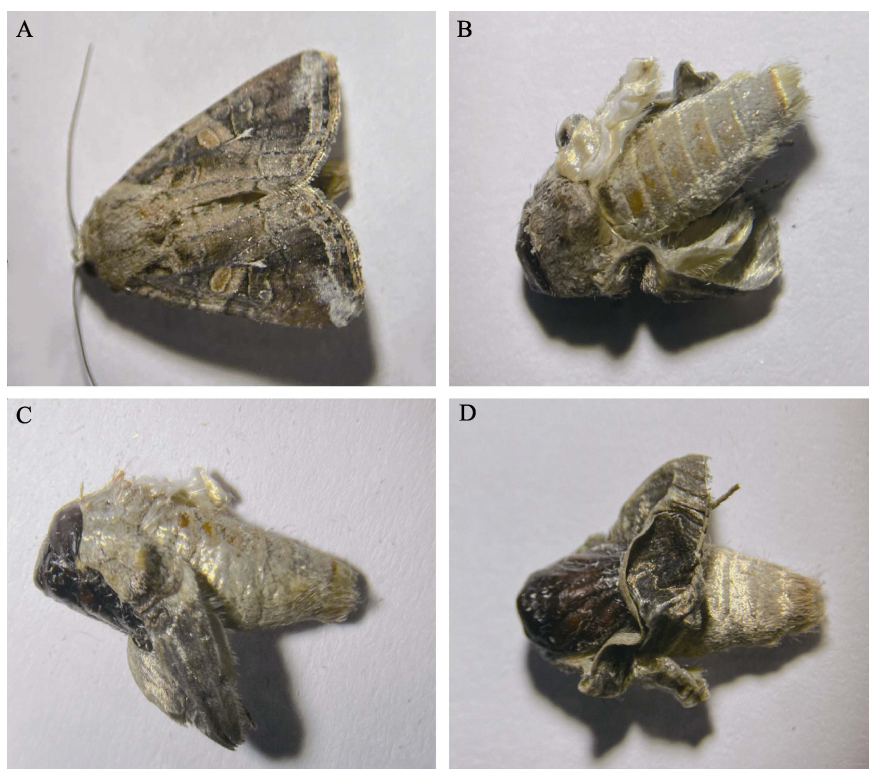


图 7 RNA 干扰后翅的表型

Fig. 7 Phenotype of wings after RNAi

A. 野生型成虫的正常翅型；B, C, D. RNA 干扰后成虫的残翅表型。

A. Normal wing type of wild type adult; B, C, D. Residual wing type of adults after RNAi.

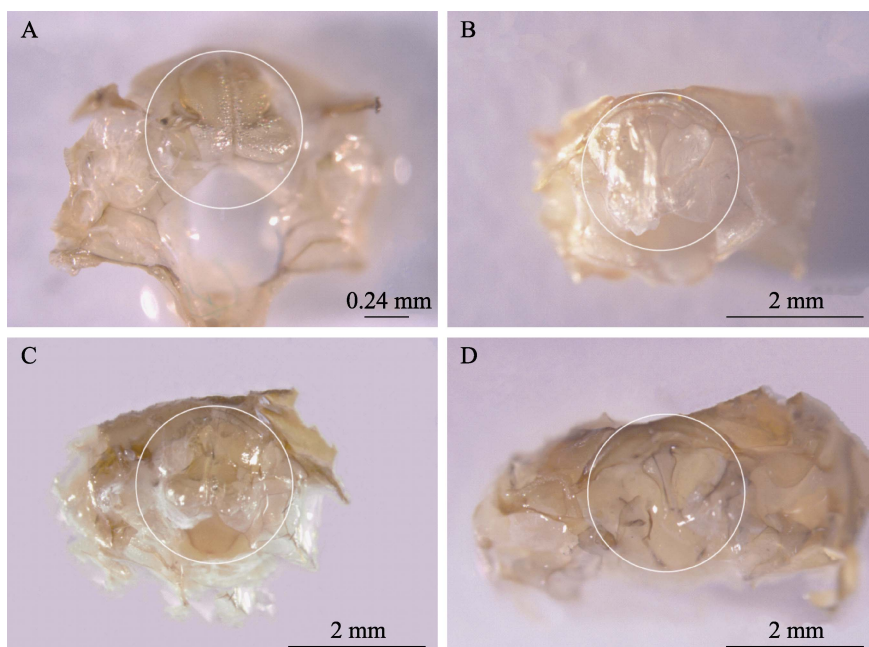


图 8 RNA 干扰后听器的表型变化

Fig. 8 Phenotypic changes of auditory organ after RNAi

A, C. 野生型成虫的听器，画圈部分为逆鼓腔；B, D. RNA 干扰后成虫的听器。

A, C. Auditory organ of wild type adults, and circled part is countertympanic cavity; B, D. Auditory organ of adults after RNAi.

2021)。昆虫 RNAi 研究一般是通过检测目的基因的干扰效率和分析相应生物表型来研究昆虫相应的基因功能 (Xiang *et al.*, 2011)。目前, RNAi 已被大量应用到鳞翅目昆虫基因功能研究以及生物防治策略的研究中。*Cut* 和 *Spalt* 基因被证明是果蝇江氏器发育中必不可少的基因, 敲除 *Cut* 和 *Spalt* 基因会造成果蝇江氏器的缺陷, 并且会导致成虫丧失听觉能力 (Dong *et al.*, 2003; Ebacher *et al.*, 2007)。昆虫听觉相关基因的研究还处在起步阶段, 研究还主要集中在果蝇这一模式物种上。草地贪夜蛾是重大农业害虫, 然而对草地贪夜蛾听觉相关研究还未涉及到分子层面, *Cut* 和 *Spalt* 基因在草地贪夜蛾中的生物学功能尚不清楚。

本文通过对 *Cut* 和 *Spalt* 基因在草地贪夜蛾不同发育时期的表达模式分析, *Cut* 和 *Spalt* 基因从幼虫期到成虫期均有表达, 表明其参与草地贪夜蛾整个生活史。其中 *Cut* 和 *Spalt* 基因在蛹期第 7 天高表达, 5 龄幼虫期低表达。有研究表明, 果蝇成虫触角结构与其头部和胸部表皮结构一样, 均起源于成虫盘的原基, 而构成原基的细胞在胚胎发生过程中进行增殖, 在幼虫期经历广泛的模式, 并在蛹期最终分化 (Boekhoff-Falk, 2005), 因此推测基因在蛹期高表达可能与蛹期各个器官组织重新组合有关。对草地贪夜蛾成虫特定组织动态变化情况研究发现, *Cut* 和 *Spalt* 基因在头部高表达, 这与在 Uniprot 数据库中查找的果蝇同源基因的表达量数据相似; 而 *Cut* 和 *Spalt* 基因在成虫听器中的表达量不是很高, 可能是经过蛹期变态发育后听觉器官已经发育完成。

本研究对 5 龄幼虫 *Cut* 和 *Spalt* 2 个基因进行 RNAi, 结果表明处理组的死亡率均明显高于对照组, 说明 *Cut* 和 *Spalt* 基因在草地贪夜蛾的生长发育中发挥作用, 这与 De 和 Rosa (2009) 的研究结果相似。qPCR 检测结果为 *Cut* 和 *Spalt* 基因表达水平显著下调, 而注射 dsGFP 的对照组, *Cut* 和 *Spalt* 基因表达水平及草地贪夜蛾的生长发育均未受影响。此外, 还发现在干扰后存在化蛹失败的现象, 幼虫期的皮不能完全褪下,

导致化蛹率比对照组低。通过解剖成虫听器发现构成听器结构的逆鼓腔发育异常。在 Celis 和 Barrio (2000) 及 Ludlow 等 (1996) 的研究中发现 *Cut* 和 *Spalt* 控制果蝇翅的发育, 本研究结果也同样证明了这点, 即草地贪夜蛾蛹羽化为成虫时, 出现翅折叠不能伸展或翅卡在蛹中等残翅表型。综上, 草地贪夜蛾的听器对成虫具有十分重要的作用, 听器发育异常, 使得听力受损, 不仅无法探测到捕食者, 增加被捕食的几率, 而且不能进行种内信息交流, 影响其繁殖交配, 从而达到害虫防治的效果。

通过注射 *Cut* 和 *Spalt* 基因的 dsRNA 到草地贪夜蛾幼虫体内, 使得其幼虫体内 *Cut* 和 *Spalt* 基因表达水平下调, 并且成虫听器和翅出现发育异常的现象。本研究结果为进一步探讨 *Cut* 和 *Spalt* 基因在草地贪夜蛾体内的生物学功能提供了理论依据, 利用 RNAi 技术在生物防治草地贪夜蛾方面奠定了基础, 为从分子生物学角度开展害虫防治提供新的参考。

参考文献 (References)

- Blochlinger K, Bodmer R, Jan LY, Jan YN, 1990. Patterns of expression of *Cut*, a protein required for external sensory organ development in wild-type and *cut* mutant *Drosophila* embryos. *Genes & Development*, 4(8): 1322–1331.
- Blochlinger K, Jan LY, Jan YN, 1991. Transformation of sensory organ identity by ectopic expression of *cut* in *Drosophila*. *Genes & Development*, 5(7): 1124–1135.
- Boekhoff-Falk G, 2005. Hearing in *Drosophila*: Development of Johnston's organ and emerging parallels to vertebrate ear development. *Developmental Dynamics*, 232(3): 550–558.
- Bokolia NP, Mishra M, 2015. Hearing molecules, mechanism and transportation: Modeled in *Drosophila melanogaster*. *Developmental Neurobiology*, 75(2): 109–130.
- Bürglin TR, Cassata G, 2002. Loss and gain of domains during evolution of *cut* superclass homeobox genes. *The International Journal of Developmental Biology*, 46(1): 115–123.
- Celis J, Barrio R, 2000. Function of the *spalt/spalt-related* gene complex in positioning the veins in the *Drosophila* wing. *Mechanisms of Development*, 91(1/2): 31–41.
- Chen HL, Xie MH, Lin LL, Zhong YZ, Zhang F, Su WH, 2022. Transcriptome analysis of detoxification-related genes in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of*

- Insect Science*, 22(1): 1–8.
- Corcoran AJ, Conner WE, 2017. Predator counteradaptations: Stealth echolocation overcomes insect sonar-jamming and evasive-maneuvring defences. *Animal Behaviour*, 2017(132): 291–301.
- David DY, 1999. Structure, development, and evolution of insect auditory systems. *Microscopy Research & Technique*, 47(6): 380–400.
- De C, Rosa B, 2009. Regulation and function of Spalt proteins during animal development. *International Journal of Developmental Biology*, 53(8/9/10): 1385–1398.
- Dong PD, Dicks JS, Panganiban G, 2002. Distal-less and homothorax regulate multiple targets to pattern the *Drosophila* antenna. *Development*, 129(8): 1967–1974.
- Dong PD, Todi SV, Eberl DF, Boekhoff-Falk GE, 2003. *Drosophila* spalt/spalt-related mutants exhibit townes-brocks' syndrome phenotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(18): 10293–10298.
- Eaton JL, 1988. Lepidopteran anatomy. *Quarterly Review of Biology*, 64(2): 206–207.
- Ebacher DJS, Todi SV, Eberl DF, Boekhoff-Falk GE, 2007. Cut mutant *Drosophila* auditory organs differentiate abnormally and degenerate. *Fly*, 1(2): 86–94.
- Eberl DF, Boekhoff-Falk GE, 2013. The *Drosophila* auditory system. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 3(2): 179–191.
- Gpfert MC, Piepenbrock D, Winkler M, Mbius W, Howard J, Senthilan PR, Bechstedt S, Nadrowski B, 2012. *Drosophila* auditory organ genes and genetic hearing defects. *Cell*, 150(5): 1042–1054.
- Hoy RR, Robert D, 1996. Tympanal hearing in insects. *Annual Review of Entomology*, 41(1): 433–450.
- Heldman AW, Brinker JA, 1999. Good vibrations. *Catheterization & Cardiovascular Interventions Official*, 46(1): 105.
- Kühnlein RP, Frommer G, Friedrich M, Gonzalez-Gaitan M, Schuh R, 1994. *Spalt* encodes an evolutionarily conserved zinc finger protein of novel structure which provides homeotic gene function in the head and tail region of the *Drosophila* embryo. *The EMBO Journal*, 13(1): 168–179.
- Li CY, Zhang YP, Huang SH, Liu WL, Su XN, Pan ZP, 2019. A study on artificial rearing technique of *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) in the laboratory. *Journal of Environmental Entomology*, 41(5): 986–991. [李传瑛, 章玉苹, 黄少华, 刘伟玲, 苏湘宁, 潘志萍, 2019. 草地贪夜蛾室内人工饲养技术的研究. 环境昆虫学报, 41(5): 986–991.]
- Ludlow C, Choy R, Blochlinger K, 1996. Functional analysis of *Drosophila* and Mammalian cut proteins in flies. *Developmental Biology*, 178(1): 149–159.
- Montezano DG, Specht A, Sosa-Gómez DR, Roque-Specht VF, Hunt T, 2018. Host plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas. *African Entomology*, 26(2): 286–300.
- Nakano R, Ishikawa Y, Tatsuki S, Surlykke A, Skals N, Takanashi T, 2006. Ultrasonic courtship song in the asian corn borer moth, *Ostrinia furnacalis*. *Naturwissenschaften*, 93(6): 292–296.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S, 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology & Evolution*, 30(12): 2725–2729.
- Tang QY, Zhang CX, 2013. Data processing system (DPS) software with experimental design, statistical analysis and data mining developed for use in entomological research. *Insect Science*, 20(2): 254–260.
- Tobin DM, Madsen DM, Kahn-Kirby A, Peckol EL, Bargmann CI, 2002. Combinatorial expression of TRPV channel proteins defines their sensory functions and subcellular localization in *C.elegans* neurons. *Neuron*, 35(2): 307–318.
- Todi SV, Sharma Y, Eberl DF, 2004. Anatomical and molecular design of the *Drosophila* antenna as a flagellar auditory organ. *Microscopy Research & Technique*, 63(6): 388–399.
- Wang S, Na YH, Leng X, Na J, 2010. Insect auditory organs. *Chinese Bulletin of Entomology*, 47(4): 652–656. [王珊, 那宇鹤, 冷雪, 那杰, 2010. 昆虫的听觉器官. 昆虫知识, 47(4): 652–656.]
- Wu QL, Jiang YY, Wu KM, 2019. Analysis of migration routes of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) from Myanmar to China. *Plant Protection*, 45(2): 1–6. [吴秋琳, 姜玉英, 吴孔明, 2019. 草地贪夜蛾缅甸虫源迁入中国的路径分析, 植物保护, 45(2): 1–6.]
- Xiang H, Li MW, Guo JH, Jiang JH, Huang YP, 2011. Influence of RNAi knockdown for e-complex genes on the silkworm proleg development. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 76(1): 1–11.
- Xu XL, Wang FS, Liu ZR, Fan LJ, Ji XY, Jiang JX, Yao YJ, 2021. Research progress of RNA interference technology in the field of entomology. *Biotechnology Bulletin*, 37(1): 255–261. [徐雪亮, 王奋山, 刘子荣, 范琳娟, 季香云, 蒋杰贤, 姚英娟, 2021. RNA 干扰技术在昆虫学领域研究进展. 生物技术通报, 37(1): 255–261.]
- Zha YP, Chen QC, Lei CL, 2009. Ultrasonic hearing in moths. *Annales de la Societe Entomologique de France*, 45(2): 145–156.
- Zha YP, Chen JY, 2011. Advances on auditory gene in insects. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 48(1): 160–166. [查玉平, 陈京元, 2011. 昆虫听觉相关基因的研究进展. 应用昆虫学报, 48(1): 160–166.]