

赵 静,谭永安,房 菊,等. 甜菜夜蛾 *SeKr-h1* 基因分子表达特性及其对保幼激素类似物的响应[J]. 江苏农业科学,2021,49(24):114-120.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.24.020

甜菜夜蛾 *SeKr-h1* 基因分子表达特性及其对保幼激素类似物的响应

赵 静¹,谭永安¹,房 菊²,朱友雯²,姜义平¹,肖留斌¹

(1. 江苏省农业科学院植物保护研究所/江苏省食品质量安全重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地,江苏南京 210014;

2. 南京大学金陵学院,江苏南京 210089)

摘要:*Krüppel homolog 1* (*Kr-h1*) 是保幼激素(JH)的早期响应基因,在 JH 抑制幼虫或若虫变态及促进成虫生殖中发挥关键作用。利用 RT-PCR 技术克隆甜菜夜蛾 *SeKr-h1α* 基因,并进行了生物信息学分析,序列分析结果显示,*SeKr-h1α* 开放阅读框长度 1 068 bp,编码 355 个氨基酸。与美国国家生物技术信息中心(NCBI)上已有的甜菜夜蛾 *Kr-h1β* 序列相比,*SeKr-h1α* N 端缺少 12 个氨基酸。通过荧光定量 qPCR 研究甜菜夜蛾不同发育时期 *SeKr-h1α/β* 的表达水平,结果显示,*SeKr-h1α/β* 表达趋势一致,*SeKr-h1α* 为主要表达的转录产物。*SeKr-h1α/β* 在幼虫末期、预蛹和成虫期高表达,1~4 龄幼虫和蛹期维持低表达。在幼虫和蛹末期施用 JH 类似物 Methoprene,qPCR 检测 *SeKr-h1* 对 JH 的诱导响应表达,结果显示 Methoprene 处理 5 龄幼虫 2、6、24 h 都可诱导 *SeKr-h1* 表达,并且在处理 6 h 时的诱导效果最为明显,为对照的 8.76 倍;Methoprene 处理化蛹末期的雌蛹,试验组羽化 12 h 雌虫 *SeKr-h1* 表达量为对照组的 3.34 倍。本研究克隆得到 *SeKr-h1α* 完整编码序列,并明确 *SeKr-h1* 的表达特性及其对 JH 类似物存在诱导响应,为进一步深入研究甜菜夜蛾 *SeKr-h1* 基因功能以及开发防控新策略奠定了良好基础。

关键词:甜菜夜蛾;*SeKr-h1*;基因克隆;表达特性;JH 类似物

中图分类号:S433.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2021)24-0114-07

甜菜夜蛾 [*Spodoptera exigua* (Hübner)] 是一种世界性分布、间歇性发生的杂食性害虫,危害棉花、蔬菜等多种作物^[1-2]。近年来,随着转基因棉种植

面积扩大,棉田生物群落结构与功能发生了相应的变化。原本为次要害虫的甜菜夜蛾在棉花上的发生日益严重,逐渐成为危害棉花生产的主要鳞翅目害虫^[3-4]。同时,甜菜夜蛾已对氯虫苯甲酰胺、茚虫威等多种杀虫剂产生较高的抗药性,亟需开拓新的防控靶标^[5]。甜菜夜蛾一生经历卵—幼虫—蛹—成虫的变化过程,开展影响甜菜夜蛾变态发育关键基因的研究,对于发展甜菜夜蛾新的防控手段具有重要意义。

保幼激素(juvenile hormone, JH)和蜕皮激素(ecdysteroids, 20E)是参与调控昆虫蜕皮和变态发

收稿日期:2021-04-21

基金项目:国家自然科学基金(编号:31901889);国家重点研发计划(编号:2017YDF0201900);国家农业产业技术体系建设专项(编号:CARS-15-19)。

作者简介:赵 静(1989—),女,江苏宜兴人,博士,助理研究员,主要从事经济作物害虫防控研究工作。E-mail:jingzhao0126@126.com。

通信作者:肖留斌,硕士,研究员,主要从事经济作物害虫防控研究工作。E-mail:xlwll@sohu.com。

[16] 伍晓丽,李隆云,王 珏,等. 健康/根腐病黄连根际土壤真菌组成与根部可培养真菌组成分析[J]. 西南农业学报,2020,33(11):2509-2518.

[17] Lozupone C, Lladser M E, Knights D, et al. UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison[J]. The ISME Journal, 2011, 5(2): 169-172.

[18] Lozupone C A, Hamady M, Kelley S T, et al. Quantitative and qualitative β diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities [J]. Applied and

Environmental Microbiology, 2007, 73(5): 1576-1585.

[19] Wagg C, Dudenhofer J H, van der Heijden M G A. Linking diversity, synchrony and stability in soil microbial communities[J]. Functional Ecology, 2018, 32(5): 1280-1292.

[20] 涂祖南,张莉莉,贺伟华,等. 赣南脐橙黄龙病株与健康株的根际土壤真菌群落多样性比较[J]. 安徽农业大学学报,2017,44(2):333-341.

[21] 刘海洋,王 伟,张仁福,等. 黄萎病不同发生程度棉田土壤中的真菌群落特征分析[J]. 中国农业科学,2019,52(3):455-465.

育最重要的 2 种激素^[6-7]。近年来随着分子生物学的发展,保幼激素调控昆虫变态发育的分子机制取得了较大的进展,JH 主要受体蛋白 met 及多个下游响应基因相继被鉴定^[8]。*Krüppel homolog 1* (*Kr-hl*) 是一种含有 8 个锌指结构(C_2-H_2)的转录因子,在家蚕(*Bombyx mori*)、麦红吸浆虫(*Sitodiplosis mosellana*)等昆虫中,*Kr-hl* 被证实是保幼激素早期响应基因^[9-11]。用 JH 类似物 Methoprene 点滴或注射家蚕 4、5 龄幼虫,发现 JH 能诱导家蚕体内 *BmKr-hl* 的表达上调^[9-10]。JHⅢ对麦红吸浆虫滞育幼虫有剂量依赖性的诱导作用。用 0.1 ~ 0.3 pg/nL Methoprene 注射滞育幼虫 6 h, *Kr-hl* 表达量随着浓度升高而增加^[11]。目前,NCBI 上已登录有 20 多种昆虫的 *Kr-hl* 基因序列,大多数昆虫的 *Kr-hl* 只有 1 个转录产物,但是在果蝇(*Drosophila melanogaster*)和家蚕中除外,果蝇存在 3 种可变剪接的转录产物,分别为 *Kr-hl α* 、*Kr-hl β* 、*Kr-hl λ* ; 而家蚕 *BmKr-hl* 有 *BmKr-hl α* 和 *BmKr-hl β* 共 2 种转录产物,*BmKr-hl α* 蛋白比 *BmKr-hl β* 蛋白在 N 端多了十几个氨基酸^[9,12]。

在不同昆虫中,*Kr-hl* 被证实参与变态发育、生殖生理等过程^[13]。赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*)幼虫末期 *TcKr-hl* 短暂高表达对蛹的形成非常重要。干扰幼虫末期 *TcKr-hl* 瞬时高表达,会引起 E93 的表达上调,从而引起虫体直接跳过蛹期到达成虫期^[14]。在飞蝗(*Locusta migratoria*)、大猿叶甲(*Colaphellus bowringi*)等昆虫中,施用 JH 类似物促进 *Met* 及 *Kr-hl* 的转录,进而促进与生殖相关的卵黄原蛋白 *Vg*/卵黄原蛋白受体 *VgR* 基因表达,最终影响卵巢发育与成熟^[15-16]。除了调控昆虫生长发育与生殖,在蜜蜂(*Apis mellifera*)及果蝇中,*Kr-hl* 还能影响觅食行为以及神经元细胞形成^[17-18]。

Kr-hl 是参与昆虫变态发育的关键基因。目前,在 NCBI 上仅登录甜菜夜蛾 *SeKr-hl β* (*S. exigua* *Krüppel homolog 1 β*) 序列,但对于甜菜夜蛾 *SeKr-hl* 的分子特性、表达模式及对 JH 响应机制还未有报道。基于实验室前期测得的甜菜夜蛾转录组数据,笔者检测到甜菜夜蛾 *SeKr-hl* 还存在另一个转录本 *SeKr-hl α* 。本研究利用 RT-PCR 技术,对甜菜夜蛾的 *SeKr-hl α* 基因进行了克隆、测序和基本的生物信息学分析,同时通过 qPCR 技术明确了 *SeKr-hl α / β* 在不同发育阶段的表达特性以及

对 JH 存在诱导响应表达,为进一步研究甜菜夜蛾 *SeKr-hl* 基因的功能以及基于 *SeKr-hl* 基因开发害虫防控手段奠定良好的基础。

1 材料与方法

试验于 2020 年在江苏省农业科学院植物保护研究所完成。

1.1 试验材料

供试甜菜夜蛾虫源采自江苏省南京市江宁区的郊区,于江苏省农业科学院植物保护研究所养虫室用人工饲料对其继代培养。甜菜夜蛾饲养条件为温度(25.5 ± 1) °C,相对湿度(65 ± 5)%,光—暗周期 14 h—10 h,成虫期补充 10% 蜂蜜水。

1.2 方法

1.2.1 甜菜夜蛾 *SeKr-hl α* 基因的克隆 采用 Trizol 法提取甜菜夜蛾雌成虫的 RNA,并反转录为 cDNA。将羽化 1 d 甜菜夜蛾虫体放入研钵中,加入少量的液氮,将虫体充分研磨至粉末状,收集 0.05 ~ 0.1 g 组织量至离心管并加入 1 mL 的 Trizol 试剂,按照试剂说明书提取总 RNA。通过 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 条带完整性,并用紫外可见分光光度计确定 RNA 质量和浓度。通过 M-MLV 反转录酶体系对样品 RNA 进行反转录,所得 cDNA 于 -20 °C 冰箱中保存,备用。

基于测得的甜菜夜蛾转录组序列,设计引物通过 RT-PCR 扩增 *SeKr-hl α* 的全长,引物序列见表 1。通过琼脂糖凝胶电泳鉴定目的片段产物,回收鉴定正确的产物并连接 pClone007 载体,室温(22 ~ 30 °C)反应 5 min,将连接产物转化 DH5 α 感受态细胞,最后通过菌落 PCR 筛选阳性转化子,并送上海生物工程有限公司测序。

表 1 引物序列

引物用途	引物	序列(5'→3')
基因克隆	Kr-1074F	ATGATAGGCGAAGAGGAAC
	Kr-2306R	CGACTCACACAGACCTAACG
荧光定量 qPCR	Kr α -Q887F	CTAACAATAACGGCACAAATG
	Kr α -Q1081R	CGTTAGGTCTGTGTGAGTCG
	Kr β -30F	GTAAACAATTTCGACAGGC
	Kr β -179R	GCGAAAGTCTTGTGGCAT
	Kr-Q121F	CGTTCTCATCGTGCCACTG
	Kr-Q243R	TTCACATTCAAAGGGTCGTTT
	<i>Actin</i> -F	TGA GAC CTTCAG CTC CCC CG
	<i>Actin</i> -R	GCGACCAGCCAAGTCCAGAC

1.2.2 甜菜夜蛾 *SeKr-h1 α* 序列结构分析及系统进化树的构建 为验证克隆得到的 *SeKr-h1 α* 序列的可靠性,利用 NCBI 的 Blast 工具将其与 GenBank 数据库中的其他物种进行同源性序列比对。采用 DNAMAN 6.0 软件预测 *SeKr-h1 α* 蛋白分子量和等电点。采用 NCBI 的 CCD 软件进行 *SeKr-h1 α* 功能结构域预测。用 Signal 3.0 在线软件对 *SeKr-h1 α* 进行信号肽分析。利用 NetPhos 及 NetGlycate 在线软件对其进行磷酸化位点预测和糖基化分析。使用 Clustal W 软件对鳞翅目 *Kr-h1* 氨基酸序列进行比对。采用 MEGA 5 软件 NJ 法构建昆虫 *Kr-h1* 系统发育树。

1.2.3 甜菜夜蛾不同发育阶段 *SeKr-h1 α/β* 的表达动态 收集甜菜夜蛾 1~5 龄幼虫,预蛹,化蛹 1、3、7 d 的雌、雄蛹,羽化 1~3 d 的雌、雄蛾,立即放置液氮中冷冻, -80 °C 保存以备提取 RNA 以及荧光定量 qPCR 试验。

根据甜菜夜蛾 *SeKr-h1 α/β* 基因序列分别设计 qPCR 引物 (*SeKr-h1 α* : $Kr\alpha-Q887F$, $Kr\alpha-Q1081R$; *SeKr-h1 β* : $Kr\beta-30F$, $Kr\beta-179R$), 进行 qPCR 分析。引物序列见表 1,以 *Actin* 为内参基因。用以 TB Green 为染料的荧光标记法进行 qPCR 定量检测。20 μ L qPCR 体系: TaKaRa TB Green® Premix Ex Taq™ 2 μ L、引物各 0.4 μ L、模板 cDNA 2 μ L、ddH₂O 7.2 μ L。反应条件:95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 5 s,60 °C 退火 20 s,72 °C 延伸 10 s,共 40 个循环。不同发育时期样品各 3 个生物学重复和 4 个技术重复,每个生物学重复取 3 头试虫。

1.2.4 *SeKr-h1* 对保幼激素类似物诱导响应表达的 qPCR 检测 将保幼激素类似物 Methoprene (Sigma, 美国)通过丙酮稀释成 5 μ g/ μ L 的母液,封存于 -20 °C。挑选健康的、大小一致的 5 龄 3 d 幼虫,并用无菌水清洗虫体表面的饲料,用滤纸吸干水分,通过微量注射仪点滴 1 μ L 于幼虫的第 2 与第 3 胸节之间,并以丙酮作为对照。分别收集对照幼虫以及用 Methoprene 处理 2、6、24 h 的幼虫各 4 组,每组 3 头,用液氮快速冷冻虫体,保存于 -80 °C。

选取大小一致、体色发黑、化蛹 7 d 的甜菜夜蛾雌蛹,通过微量注射仪注射,每头蛹施用量为 1 μ L,以丙酮作为对照。将注射后的蛹放入玻璃缸中,为防羽化后飞出用纱布覆盖缸口并用橡皮筋扎紧。将玻璃缸置于恒温箱正常饲养,分别收集羽化 12 h 的雌成虫以及对照成虫各 4 组,每组 3 头。

按“1.2.1”节的方法将上述收集的样品提取 RNA,并反转录成 cDNA,利用 qPCR 检测 JH 类似物施用组和对照组 *SeKr-h1* 的表达情况。

1.3 数据分析

基因表达相对量的变化采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法^[19]表示,采用 SPSS 18.0 软件进行单因素方差分析,并用 Tukey's HSD 法进行差异显著性检测。

2 结果与分析

2.1 *SeKr-h1 α* 基因克隆与序列特征

基于甜菜夜蛾的转录组序列,根据预测序列设计引物,通过 RT-PCR 扩增 *SeKr-h1 α* 基因。在图 1 的电泳图中显示扩增得到 1 条 1 000 bp 左右的条带。序列分析显示,其完整编码序列全长 1 068 bp, GC 含量达到 44.5%,编码 355 个氨基酸,预测的 MW 分子量约为 39.35 ku,等电点 PI 为 8.93。用 NetGlycate 以及 Signal 3.0 在线软件对 *SeKr-h1 α* 进行糖基化和信号肽分析,发现 *SeKr-h1 α* 不含糖基化修饰位点和信号肽,暗示 *SeKr-h1 α* 可能为一种无糖基化修饰的非分泌型蛋白。利用 NetPhos 软件对 *SeKr-h1 α* 蛋白进行预测,结果显示, *SeKr-h1 α* 有 37 个磷酸化位点,分别为 19 个 Ser、17 个 Thr 和 1 个 Tyr。

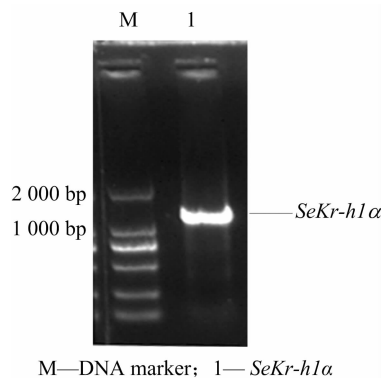


图1 *SeKr-h1 α* 的 PCR 扩增

2.2 *SeKr-h1 α* 氨基酸序列结构比对

与 NCBI 上已有的甜菜夜蛾 *Kr-h1* 氨基酸序列比对,发现本研究克隆的 *SeKr-h1* N 端存在差异,缺少 12 个氨基酸,为 *Kr-h1 α* ,NCBI 的 *Kr-h1* 序列为 *Kr-h1 β* (图 2-A)。鳞翅目不同物种 *Kr-h1* 的氨基酸序列进行多序列比对结果(图 2-B)显示,所有昆虫都有 8 个典型的锌指结构域。与比对的鳞翅目其他昆虫类似, *SeKr-h1* 蛋白的 C 端还包含 2 个蛋白互作基序(LPPRKR 和 SVIQFA)。对鳞翅目现有 *SeKr-h1* 氨基酸序列比较,除了 *SeKr-h1*

h1 β , 甜菜夜蛾 SeKr - h1 α 与球菜夜蛾 (*Agrotis ipsilon*) 最相似 (92.11%), 其次是棉铃虫

(*Helicoverpa armigera*) (89.80%), 梨小食心虫 (*Grapholita molesta*) (86.04%)。

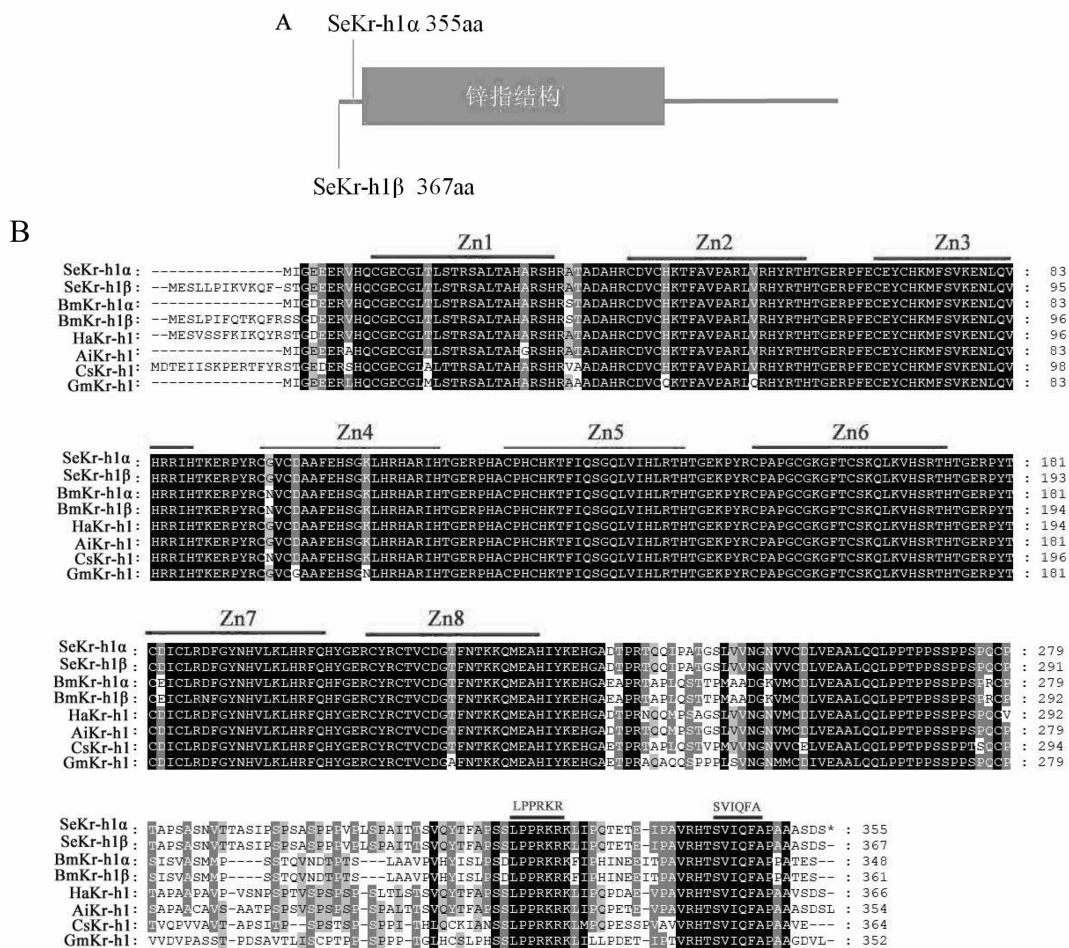


图2 SeKr-h1 结构分析及氨基酸序列对比

2.3 昆虫 Kr - h1 系统发育树分析

为了解不同昆虫 Kr - h1 蛋白之间的进化关系,以人类的 Kr - h1 为外群,基于 14 种昆虫的 Kr - h1 氨基酸序列构建系统发育树。从图 3 可以看出,SeKr - h1 与同源自鳞翅目的棉铃虫以及球菜夜蛾 Kr - h1 亲缘关系最近,形成姐妹群。相比鞘翅目和膜翅目,鳞翅目与双翅目 Kr - h1 亲缘关系更近。

2.4 甜菜夜蛾不同发育时期 SeKr - h1 α/β 表达趋势

通过荧光定量 qPCR 分析 SeKr - h1 α/β 在甜菜夜蛾不同发育时期的表达情况,结果(图 4)显示,SeKr - h1 α/β 表达趋势一致,SeKr - h1 α 为主要表达

的转录产物。SeKr - h1 α/β 在 1 ~ 4 龄幼虫低表达,进入 5 龄后表达量上升,至预蛹阶段表达量达到峰值后开始下降,在蛹期维持低表达(图 4 - A)。SeKr - h1 α/β 在成虫期高表达,雌成虫表达量先上升后下降,在羽化 1 d 时达到峰值(图 4 - A);雄成虫表达量稳步上升,在羽化 3 d 时达到最高(图 4 - B)。

2.5 甜菜夜蛾 SeKr - h1 对 JH 类似物的诱导响应

为进一步探究 SeKr - h1 对激素的诱导响应,用保幼激素类似物 Methoprene 点滴甜菜夜蛾 5 龄 3 d 幼虫和注射化蛹 7 d 的雌蛹(5 μ g/头),于处理后不同时间取样检测 SeKr - h1 的表达水平。荧光定量 qPCR 结果显示, Methoprene 处理 2、6、24 h 都可诱

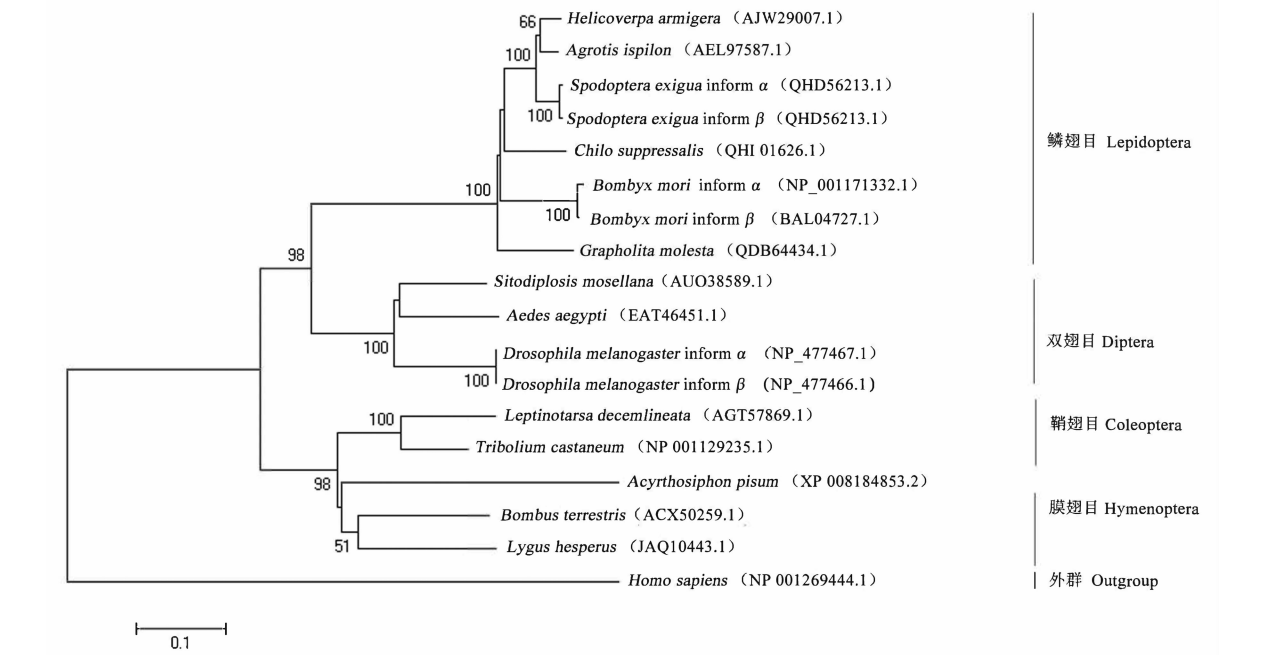


图3 不同昆虫 Kr-h1 蛋白的系统进化树

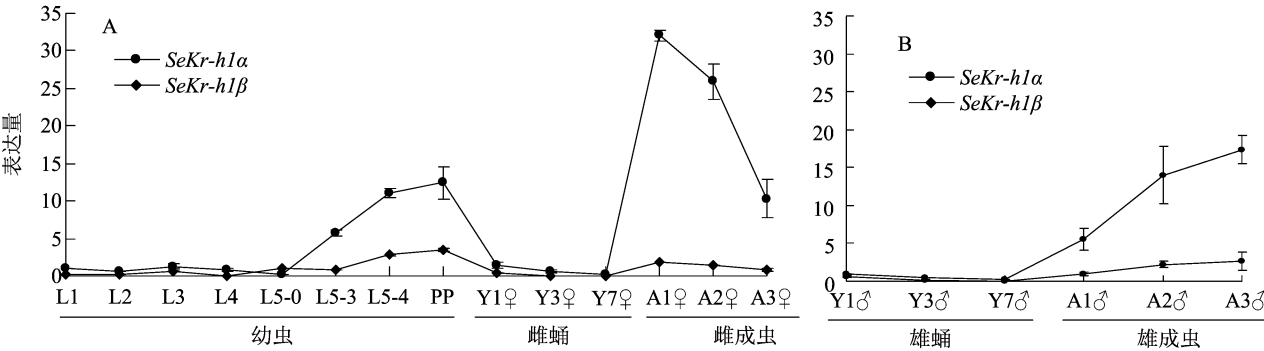


图4 甜菜夜蛾不同发育时期 *SeKr-h1α/β* 表达谱

导 5 龄幼虫 *SeKr-h1* 的表达,并且在处理 6 h 时的诱导表达效果最好,为对照的 8.76 倍;处理 2 h 和 24 h 时,*SeKr-h1* 表达量分别为对照的 4.88 倍和 2 倍(图 5 - A, $P < 0.05$)。用 Methoprene 处理化蛹末期的雌蛹,试验组羽化 12 h 雌虫 *SeKr-h1* 表达量为对照组的 3.34 倍(图 5 - B, $P < 0.05$)。该结果表明甜菜夜蛾

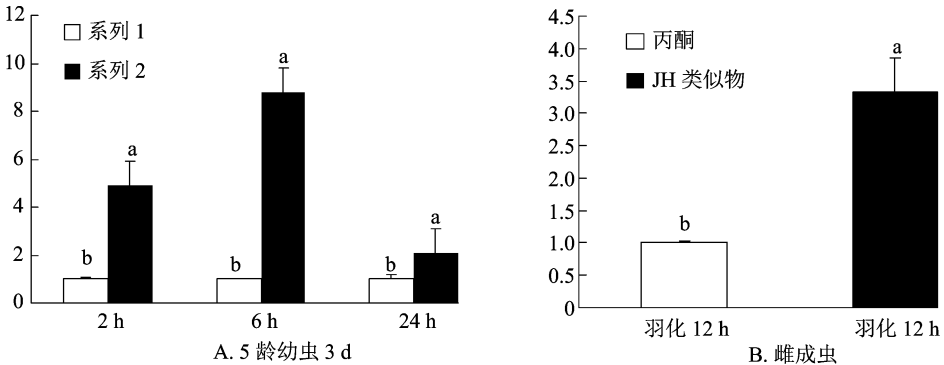


图5 JH 类似物对甜菜夜蛾 *SeKr-h1* 的诱导表达

SeKr-hl 在幼虫期和成虫期受到 JH 的调控。

3 讨论

Kr-hl 是 JH 的早期响应基因,近年来对昆虫 *Kr-hl* 的研究逐渐增多,根据 NCBI 上提供的信息,拥有完整 8 个锌指结构(Zn1 ~ Zn8)的 *Kr-hl* 基因已超过 20 个。目前,克隆的大多数昆虫 *Kr-hl* 只有 1 个转录本,但家蚕和果蝇存在 2 种及以上转录本,其中共有的转录本为 *Kr-hl α* 及 *Kr-hl β* ,*Kr-hl α* 蛋白比 *Kr-hl β* 蛋白在 N 端多了十几个氨基酸,*Kr-hl α* 被认为参与了昆虫的变态发育过程^[9,12]。依据甜菜夜蛾转录组数据库,同时借助 RT-PCR 技术,克隆扩增了 *SeKr-hl* 的开放阅读框序列,与 NCBI 上已有的甜菜夜蛾 *Kr-hl* 序列相比,N 端氨基酸存在差异,缺少 12 个氨基酸,经鉴定为 α 蛋白。对不同鳞翅目昆虫 *Kr-hl* 蛋白的氨基酸结构进行比较,发现它们存在 8 个高度保守的锌指结构域。研究表明,*Kr-hl* 通过保守的锌指结构结合靶基因的 CACCC 或 GC 等位点,进而调控靶基因^[20]。锌指结构域的数量在大多数昆虫中为 8 个,但是在寄生类昆虫中存在缺失,如人头虱(*Pediculus humanus*)没有 Zn7,丽蝇蛹集金小蜂(*Nasonia vitripennis*)的 *Kr-hl* 蛋白只有 Zn4 和 Zn7^[21]。寄生类昆虫 *Kr-hl* 锌指蛋白个数的缺失推测可能与这 2 种昆虫锌指结构功能退化以及结构冗余性有关。

Kr-hl 的表达具有发育时期特异性,在大多数昆虫的幼虫向蛹转变期以及成虫期高表达。家蚕 *BmKr-hl α/β* 在幼虫、蛹及成虫 3 个阶段都有表达,表达趋势一致,但 *BmKr-hl α* 表达丰度远高于 *BmKr-hl β* 。*BmKr-hl α/β* 在家蚕 5 龄幼虫初期表达量极低,进入 5 龄末期表达量开始急剧上升然后下降,蛹期维持低表达,成虫期高表达^[9]。梨小食心虫 *Kr-hl* 在幼虫期低表达,在预蛹期表达量先上升后下降,成虫期表达量稳步上升^[22]。与家蚕类似,甜菜夜蛾 *SeKr-hl α* 为主要表达的蛋白形式,在预蛹期和成虫期高表达,可能参与幼虫向蛹及蛹向成虫转变的激素信号转导。在果蝇中,*Kr-hl β* 主要在其胚胎发育时期的中枢神经表达,而 *Kr-hl α* 的表达则贯穿了幼虫的整个时期,在预蛹期的初期表达量较高,同时大部分缺少 *Kr-hl α* 的虫体会在变态时期死亡^[12,23];除了参与变态发育,在其他昆虫中,*Kr-hl* 表达模式还与幼虫滞育、觅食行为有

关。麦吸虫 *Kr-hl* mRNA 丰度随着幼虫进入 3 龄早期、滞育前期和维持期而增加,并在滞育后静止期达到峰值^[24]。*Kr-hl* 在蜜蜂大脑中的表达受 cGMP 调控,其启动子包含一个保守的潜在 cGMP 反应元件,与觅食行为密切相关^[17]。

JH 在全变态或半变态昆虫未成熟期过渡到成虫阶段的过程中发挥了重要的作用^[21,25]。*Kr-hl* 被证实参与调控昆虫 JH 信号的传导而发挥变态发育、生殖生理等功能。用 JH 类似物处理果蝇及家蚕等昆虫,会促进 *Kr-hl* 的转录表达,导致幼虫延迟化蛹并降低 20E 滴度^[26-27]。在赤拟谷盗、果蝇及德国小蠊(*Blattella germanica*)幼虫期干扰 *Kr-hl* 的表达,会引起虫体的早熟^[14,26-28]。对褐飞虱 3 龄若虫注射 *kr-hl* dsRNA,会导致翅膀发育不良和雌雄成虫外生殖器畸形^[29]。在飞蝗、大猿叶甲等昆虫中,JH 通过其受体 Met 促进 *Kr-hl* 的转录,进而促进卵黄原蛋白 *Vg* 及其受体 *VgR* 的表达,最终影响卵巢发育^[15-16]。对球菜夜蛾注射 JH 抑制剂以及 JH 类似物,证实 *Kr-hl* 受到 JH 的调控,并影响球菜夜蛾的性行为^[30]。本研究对甜菜夜蛾幼虫和蛹体外施用 JH 类似物,其试验结果显示,*SeKr-hl* 在幼虫和蛹末期都受到 JH 的诱导,但其响应机制以及发挥的生理功能仍需进一步的研究。

本研究通过 RT-PCR 技术克隆了 *SeKr-hl α* 的编码序列,明确了 *SeKr-hl α/β* 在幼虫向蛹转变期以及成虫期高表达,该表达特性可能与其调控变态发育、成虫生殖等功能有关。*SeKr-hl* 的表达在幼虫和蛹末期都能响应 JH 类似物的诱导。该研究结果可为以 JH 信号传导通路基因为靶标研发新型害虫控制剂奠定良好的研究基础。

参考文献:

- [1] 司升云,周利琳,王少丽,等. 甜菜夜蛾防控技术研究与示范——公益性行业(农业)科研专项“甜菜夜蛾防控技术研究与示范”研究进展[J]. 应用昆虫学报,2012,49(6):1432-1438.
- [2] 王攀,望勇,司升云. 警惕甜菜夜蛾局地大发生[J]. 中国蔬菜,2019(11):95-97.
- [3] 郑霞林,王攀,王小平,等. 转基因棉甜菜夜蛾的为害现状、暴发成因及防治现状[J]. 植物保护,2010,36(3):34-38.
- [4] 曹立耘. 甜菜夜蛾在棉区的危害特点与防治[J]. 农药市场信息,2014(17):48.
- [5] 张帅. 2019 年全国农业有害生物抗药性监测结果及科学用药建议[J]. 中国植保导刊,2020,40(3):64-69.
- [6] 洪芳,宋赫,安春菊. 昆虫变态发育类型与调控机制[J]. 应用昆虫学报,2016,53(1):1-8.

- [7] Bellés X. The metamorphosis of insects and their regulation[J]. Comptes Rendus Biologies, 2019, 342(7/8): 254–256.
- [8] 柳鹏飞, 王伟伟, 凌晓霏, 等. 保幼激素和蜕皮激素调控昆虫变态发育机制的进展[J/OL]. 基因组学与应用生物学[2021-03-20]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/45.1369.Q.20200225.0935.002.html>.
- [9] Kayukawa T, Murata M, Kobayashi I, et al. Hormonal regulation and developmental role of Krüppel homolog 1, a repressor of metamorphosis, in the silkworm *Bombyx mori* [J]. Developmental Biology, 2014, 388: 48–56.
- [10] 胡启豪, 朱子丹, 李婵丹, 等. 家蚕保幼激素信号途径中转录因子 BmKr-h1 的基因克隆与表达分析[J]. 蚕业科学, 2016, 42(3): 415–424.
- [11] Cheng W N, Li X J, Zhao J J, et al. Cloning and characterization of Methoprene-tolerant (*Met*) and Krüppel homolog 1 (*Kr-h1*) genes in the wheat blossom midge, *Sitodiplosis mosellana* [J]. Insect Science, 2020, 27: 292–303.
- [12] Beck Y, Pecasse F, Ichards G. Krüppel-homolog is essential for the coordination of regulatory gene hierarchies in early *Drosophila* development[J]. Development Biology, 2004, 268(1): 64–75.
- [13] Lozano J, Belles X. Conserved repressive function of Krüppel homolog 1 on insect metamorphosis in hemimetabolous and holometabolous species[J]. Scientific Reports, 2011, 1: 163–163.
- [14] Urena E, Chafino S, Manjon C, et al. The occurrence of the holometabolous pupal stage requires the interaction between E93, Krüppel-Homolog 1 and Broad-complex [J]. PLoS Genetics, 2016, 12(5): e1006020.
- [15] Song J, Wu Z, Wang Z, et al. Krüppel-homolog 1 mediates juvenile hormone action to promote vitellogenesis and oocyte maturation in the migratory locust [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2014, 52: 94–101.
- [16] Liu W, Guo S, Sun D, et al. Molecular characterization and juvenile hormone-regulated transcription of the vitellogenin receptor in the cabbage beetle *Colaphellus bowringi* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology (Part A, Molecular & Integrative Physiology), 2019, 229: 69–75.
- [17] Fussnecker B, Grozinger C. Dissecting the role of Kr-h1 brain gene expression in foraging behavior in honey bees (*Apis mellifera*) [J]. Insect Molecular Biology, 2008, 17: 515–522.
- [18] Fichelson P, Brigui A, Pichaud F. Orthodenticle and Krüppel homolog 1 regulate *Drosophila* photoreceptor maturation [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(20): 7893–7898.
- [19] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method [J]. Methods, 2001, 25: 402–408.
- [20] 熊倩, 阮修艳, 方向东. Sp1/Krüppel 样因子的研究进展[J]. 遗传, 2010, 32(6): 531–538.
- [21] 金敏娜, 林欣大. 保幼激素在昆虫中的分子作用机理[J]. 生态学报, 2014, 34(6): 1361–1370.
- [22] Zhang J, Liu X X, Liu Y C, et al. Molecular characterization of primary juvenile hormone responders methoprene-tolerant (*Met*) and krüppel homolog 1 (*Kr-h1*) in *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) with clarification of their roles in metamorphosis and reproduction [J]. Journal of Economic Entomology, 2019, 112(5): 2369–2380.
- [23] Pecasse F, Beck Y, Ruiz C, et al. Krüppel-homolog, a stage specific modulator of the prepupal ecdysone response, is essential for *Drosophila metamorphosis* [J]. Developmental Biology, 2000, 221(1): 53–67.
- [24] Cheng W N, Li X J, Zhao J J, et al. Cloning and characterization of Methoprene-tolerant (*Met*) and Krüppel homolog 1 (*Kr-h1*) genes in the wheat blossom midge, *Sitodiplosis mosellana* [J]. Insect Science, 2020, 27: 292–303.
- [25] Truman J W, Riddiford L M. The evolution of insect metamorphosis: a developmental and endocrine view [J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Sciences, 2019, 374(1783): 20190070.
- [26] Minakuchi C, Zhou X, Riddiford L M. Krüppel homolog 1 (*Kr-h1*) mediates juvenile hormone action during metamorphosis of *Drosophila melanogaster* [J]. Mechanisms of Development, 2008, 125: 91–105.
- [27] Zhang T, Song W, Li Z, et al. Krüppel homolog 1 represses insect ecdysone biosynthesis by directly inhibiting the transcription of steroidogenic enzymes [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2018, 115(15): 3960–3965.
- [28] Barbora K, Vlastimil S, Marek J. Common and distinct roles of juvenile hormone signaling genes in metamorphosis of holometabolous and hemimetabolous insects [J]. PLoS One, 2011, 6(12): e28728.
- [29] Jin M N, Xue J, Yao Y, et al. Molecular characterization and functional analysis of Krüppel-homolog 1 (*Kr-h1*) in the Brown Planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål) [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2014, 13(9): 1972–1981.
- [30] Duportets L, Bozzolan F, Abrieux A, et al. The transcription factor Krüppel homolog 1 is linked to the juvenile hormone-dependent maturation of sexual behavior in the male moth, *Agrotis ipsilon* [J]. General and Comparative Endocrinology, 2012, 176: 158–166.