



罗雨嘉, 邱玲玉, 刘永康, 庞晓青, 姚琼, 王世贵, 唐斌, 徐彩娣. 褐飞虱两个糖转运蛋白的功能分析及调控海藻糖代谢的影响 [J]. 环境昆虫学报, 2022, 44 (4): 935–945.

褐飞虱两个糖转运蛋白的功能分析及 调控海藻糖代谢的影响

罗雨嘉¹, 邱玲玉¹, 刘永康¹, 庞晓青¹, 姚琼², 王世贵¹,
唐斌¹, 徐彩娣^{1,3*}

(1. 杭州师范大学生命与环境科学学院, 杭州 311121; 2. 广东省农业科学院植物保护研究所/广东省植物保护新技术重点实验室, 广州 510640;
3. 杭州师范大学经亨颐教育学院, 杭州 311121)

摘要: 海藻糖转运蛋白 (Trehalose transporter, Tret) 可将昆虫“血糖”——海藻糖由脂肪体转运到血淋巴中, 是维持昆虫体内海藻糖平衡的重要转运蛋白。本研究通过对褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 两条糖转运蛋白序列 (NITret1、NITret1 X1) 进行生物信息学分析, 并利用 RNAi 技术沉默 NITret1 与 NITret1 X1 基因, 探讨其对褐飞虱调控海藻糖代谢的生物学功能。生物信息学分析表明, NITret1 与 NITret1 X1 分别有 1 353 bp 和 1 488 bp 的开放阅读框, 编码具有 450 和 495 个氨基酸残基, 蛋白分子量大小为 49.984 kDa 和 53.059 kDa, 理论等电点 pI 为 6.53 和 7.46; 保守结构域分析 NITret1 和 NITret1 X1 分别包含 10 个和 12 个跨膜结构域, 属于 MFS 超家族; 二级结构以及三级结构预测 NITret1 和 NITret1 X1 主要包含无规卷曲和 α 螺旋结构。进化树分析显示 NITret1 和 NITret1 X1 皆与同为半翅目昆虫的 Tret1 蛋白亲缘关系接近。与注射 *dsGFP* 相比 RNAi 后显著抑制了靶标基因的表达量。荧光定量检测海藻糖代谢通路 *TRE* 和 *TPS* 基因, 结果显示注射 *dsNITret1* 48 h 后 *NITRE1-1*、*NITPS2* 基因表达量极显著下调, *NITRE1-2*、*NITRE2* 与 *NITPS1*、*NITPS3* 基因表达量极显著上调; 而注射 *dsNITret1 X1* 则为 *NITRE1-1*、*NITRE2* 与 *NITPS1*、*NITPS2* 基因表达量极显著降低, *NITRE1-2* 和 *NITPS3* 基因表达量极显著增高。注射 *dsNITret1* 与 *dsNITret1 X1* 后海藻糖酶活性均显著性降低, 同时 *NITret1* 的沉默显著抑制了糖原含量和海藻糖含量, *NITret1 X1* 的沉默仅使葡萄糖含量显著增高。褐飞虱两条糖转运蛋白序列经初步分析确定为海藻糖转运蛋白, 这两个海藻糖转运蛋白在转运糖类物质中发挥着不同的作用, 其中 NITret1 X1 可能参与葡萄糖运输功能, 而 NITret1 则更可能参与海藻糖特异性转运。研究结果有利于探究海藻糖转运蛋白 Tret 调控海藻糖代谢的作用机制, 为将来通过其调控昆虫海藻糖代谢平衡治理褐飞虱等害虫提供理论依据。

关键词: 褐飞虱; 海藻糖代谢; 海藻糖转运蛋白; RNA 干扰

中图分类号: Q963; S433

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2022) 04-0935-11

Functional analysis of two sugar transporters of the brown planthopper (*Nilaparvata lugens*) and their effects on regulating trehalose metabolism

LUO Yu-Jia¹, QIU Lin-Yu¹, LIU Yong-Kang¹, PANG Xiao-Qing¹, YAO Qiong², WANG Shi-Gui¹, TANG Bin¹, XU Cai-Di^{1,3*} (1. College of Life and Environmental Science, Hangzhou Normal University, Hangzhou 311121, China; 2. Plant Protection Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences/Guangdong Provincial Key Laboratory of New High Technology for Plant Protection, Guangzhou 510640, China; 3. Jing Hengyi School of Education, Hangzhou Normal University, Hangzhou 311121, China)

基金项目: 广东省农业科学院协同创新中心项目 (XTXM202202); 杭州市科技计划引导项目 (20201231Y072)

作者简介: 罗雨嘉, 女, 广西钦州人, 在读硕士研究生, 研究方向为昆虫生理及分子生物学, E-mail: LYJ_neko@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence: 徐彩娣, 女, 讲师, 研究方向为昆虫生理及分子生物学, E-mail: xucaidi001@163.com

收稿日期 Received: 2021-04-23; 接受日期 Accepted: 2021-06-06

Abstract: Trehalose transporter (Tret) transport trehalose—the “blood sugar” of insects, from fat body to hemolymph, and is an important transporter to maintain trehalose balance in insects. In this study, bioinformatics analysis was conducted on two sugar transporter sequences (NITret1 and NITret1 X1) of *Nilaparvata lugens*, and *NITret1* and *NITret1 X1* genes were silencing by RNAi technology to explore their function on regulation of trehalose metabolism. Bioinformatics analysis showed that *NITret1* and *NITret1 X1* had an open reading frame of 1 353 bp and 1 488 bp, and encoded 450 and 495 amino acid residues, respectively. The molecular weights of the proteins were 49.984 kDa and 53.059 kDa, and the theoretical isoelectric point was 6.53 and 7.46, respectively. Conserved domain analysis showed that NITret1 and NITret1 X1 contained 10 and 12 transmembrane domains, respectively, which belonged to the MFS superfamily. Secondary and tertiary structure prediction showed that NITret1 and NITret1 X1 mainly contained coils and helix structures. The phylogenetic tree analysis showed that both NITret1 and NITret1 X1 were closely related to Tret1 proteins of Hemiptera. Compared with *dsGFP* injection, RNAi significantly inhibited the expression of the target gene. QRT-PCR detection of trehalose metabolic pathway *TRE* and *TPS* genes showed that the expression levels of *NITRE1-1* and *NITPS2* were significantly down-regulated at 48 h after *dsNITret1* injection, and the expression levels of *NITRE1-2*, *NITRE2*, *NITPS1* and *NITPS3* increased significantly. However, the expression levels of *NITRE1-1*, *NITRE2*, *NITPS1* and *NITPS2* were significantly decreased after injecting *dsNITret1 X1*, and the expression levels of *NITRE1-2* and *NITPS3* were extremely significantly increased. Trehalase activity was significantly decreased after *dsNITret1* and *dsNITret1 X1* injection. Meanwhile, silencing of *NITret1* significantly decreased glycogen and trehalose content, while silencing of *NITret1 X1* only significantly increased glucose content. To sum up, two trehalose transporters were identified as trehalose transporters by preliminary analysis. These two trehalose transporters played different roles in the sugars transport, among which NITret1 X1 might be involved in glucose transport, while NITret1 was more likely to be involved in transporting trehalose specifically. These results were conducive to exploring the mechanism of Tret regulating trehalose metabolism, and provided a theoretical basis for pest management such as brown planthopper by regulating trehalose metabolism balance in the future.

Key words: *Nilaparvata lugens*; trehalose metabolism; trehalose transporter; RNA interference

水稻 *Oryza sativa* L. 作为我国的主要粮食作物几乎每年消费产量达 2 万吨以上, 根据报道估计, 在各种水稻病虫害中仅因褐飞虱产生的损失就占四成以上 (徐春春等, 2018; 刘杰等, 2021), 这严重危害我国粮食的生产与安全。褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 单食水稻, 其刺吸式口器直接插入水稻维管束的韧皮部中吸取汁液, 汁液中含有大量糖分, 这是褐飞虱能量物质的来源 (Sōgawa, 1982)。有研究表明, 褐飞虱在吸食水稻的过程中不能直接利用水稻内的蔗糖, 而是通过糖转运蛋白介导蔗糖进入飞虱体内 (Price *et al.*, 2007; Kikuta *et al.*, 2015), 但具体机制尚未明确。

海藻糖是一种非还原性二糖, 广泛存在于许多原核生物和真核生物中, 包括细菌、真菌、昆虫、植物等 (Elbein *et al.*, 2003; Lunn *et al.*, 2014), 它可以作为能量和糖的来源 (Benaroudj

et al., 2001; Bonini *et al.*, 2004; Lunn *et al.*, 2014), 在昆虫中被称为“昆虫血糖”, 是大多数昆虫主要的血淋巴糖 (Thompson, 2003; Avonce *et al.*, 2006)。与存在海藻糖的许多生物一样, 昆虫的海藻糖也是通过 TPP/TPS 途径合成, 即在昆虫脂肪体中海藻糖的合成依赖于海藻糖合成酶 (Trehalose-6-phosphate synthase, 简称 TPS) 和海藻糖磷酸化酶 (Trehalose-6-phosphate phosphatase, 简称 TPP) 的催化, 并且受唯一的水解酶——海藻糖酶 (Trehalase, 简称 TRE) 的作用水解为两分子的葡萄糖 (Becker *et al.*, 1996; Shukla *et al.*, 2015), 最后通过特定的跨膜转运蛋白运输至血淋巴中, 由此维稳着体内碳水化合物代谢的平衡 (Leyria *et al.*, 2021)。正如 Leyria 所描述, 海藻糖与葡萄糖一样也不能直接穿透细胞膜 (Leyria *et al.*, 2021), 生命体对于这些糖类物质的利用都

必须经过一个膜转运的过程, 其中一种方式就是需要借助糖转运蛋白 (Sugar transporter, 简称 ST) 的运输进出细胞 (Chen *et al.*, 2015)。

糖转运蛋白是血糖水平动态平衡的关键, 例如哺乳动物受激素调节通过葡萄糖转运蛋白 (Glucose transporter, 简称 GLUT) GLUT4 维持血糖水平, 由胰岛素信号通路发出信号控制 GLUT4 易位至细胞膜, 在细胞膜上将血液中多余的葡萄糖运输进细胞 (Huang and Czech, 2007); 而在植物中 SWEET 转运蛋白已被确定为促进蔗糖在多种组织中扩散到质体中的蛋白, Durand 等人研究发现 SWEET 基因表达量的上调可能会使蔗糖到胞外基质的外排增加, 从而适应干旱环境 (Le *et al.*, 2015; Durand *et al.*, 2016; Julius *et al.*, 2017)。此外, 昆虫的海藻糖转运蛋白 (Trehalose transporter, 简称 TRET) 能够协助新合成的海藻糖从脂肪体内转移到循环的血淋巴中, 被其他组织吸收, 并且根据海藻糖的浓度梯度和生理需要以可逆的双向方式起作用 (Thompson, 2003; Leyria *et al.*, 2021), 细胞内海藻糖的水平与昆虫抵抗各种环境胁迫存在相关性 (Benoit *et al.*, 2009; Cornette *et al.*, 2010)。由此可见, 糖转运蛋白的协助对于糖代谢的正常运作来说必不可少, 它严密调控着血糖浓度从而维持其生命活动, 在昆虫中海藻糖转运蛋白则是由执行该功能的糖转运蛋白之一。

综上, 糖转运蛋白可为控制害虫提供新的潜在目标。但是, 目前关于昆虫糖转运蛋白特别是海藻糖转运蛋白的功能研究和信息相对较少, 仅少数学者明确研究过昆虫海藻糖转运蛋白的功能 (Kikawada *et al.*, 2007; Kanamori *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2013; Kikuta *et al.*, 2015), 且已有的研究大多数集中在海藻糖的合成和分解途径 (Shukla *et al.*, 2015; Tang *et al.*, 2018)。随着全基因组测序的完成, 褐飞虱逐渐成为研究基因功能的靶标昆虫。因此, 阐明昆虫血淋巴中糖的摄取机制, 了解能量物质的获取途径, 从而可确定控制害虫的新目标。本研究通过对褐飞虱两个糖转运蛋白基因进行功能分析, 进一步利用 RNAi 技术探究其调控海藻糖代谢的生理作用, 鉴定该基因是否为海藻糖转运蛋白候选基因, 从而评估其作为控制害虫潜在基因的可能性, 为将来寻找防治害虫新靶标提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 褐飞虱糖转运蛋白基因的生物信息学分析

从美国国际生物技术信息中心 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获得褐飞虱两条糖转运蛋白的基因序列, 以 FASTA 格式保存。使用 NCBI 上自带的 Blast-N 和 Blast-X 工具将这两条基因的 cDNA 序列与 GenBank 中的其他糖转运蛋白的核酸序列以及氨基酸序列进行比较。通过软件 Clustal X 对这两个蛋白的氨基酸序列与其他昆虫糖转运蛋白氨基酸基因序列进行多序列比对, 并用 Mega 5.1 中的邻接法构建系统发育树, 设置 Bootstrap 法的重复值为 1 000 (Henao *et al.*, 2014)。

利用瑞士生物信息研究所 (SIB) 维护的蛋白组学分析平台 ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>) 预测本研究所使用的两条基因序列翻译为蛋白后所表现的物理化学性质, 这些性质包括相对分子质量 (Molecular weight)、理论等电点 (Theoretical pI)、原子组成 (Atomic composition) 不稳定指数 (Instability index) 等。然后利用在线预测工具 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 预测蛋白结构域的构成和功能, 使用 NCBI Conserved Domains (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 对蛋白质的保守结构域进行预测。对于蛋白质二级结构的预测使用在线预测工具 PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>), 再将氨基酸序列提交到 SWISS-MODEL 网站 (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) 进行蛋白质三级结构建模。最后利用 Cell-PLoc 2.0 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>) 对该蛋白进行亚细胞定位。

1.2 供试昆虫

供试昆虫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, 供试水稻为感虫水稻 TN1 (Taichung Native1), 褐飞虱置于人工气候室饲养, 环境条件设置为: 温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 光周期 L:D = 16 h:8 h, 相对湿度 $70\% \pm 5\%$ 。

1.3 总 RNA 的抽提与 dsRNA 的合成

采用 Trizol 法提取褐飞虱总 RNA, 并用 1% 琼脂糖凝胶电泳和 Nano Drop²⁰⁰⁰ 分光光度计分别检测所提取总 RNA 的质量以及浓度。根据 Prime Script[®] RT reagent Kit With g DNA Eraser 试剂盒的

说明书, 合成 cDNA 第一链, 并放于 -20°C 冰箱保存备用。采用 Primer5 软件设计合成特异性引物进行 PCR 扩增, 产物经过切胶回收与纯化后连接于 p MD 18-T 载体进行 T 克隆, 挑取单一菌落进行菌落 PCR, 选取阳性菌液送往 Invitrogen (上海) 公司测序。以返回的质粒为模板使用含 T7 启动子的引物进行交叉 PCR, 并按照 T7 Ribo MAXTM Express

RNAi System 试剂盒的使用方法进行双链 RNA (dsRNA) 的合成。采用相同的方法合成绿色荧光蛋白基因 (GFP) 的 dsRNA 作为对照组, 相关引物序列具体见表 1。使用 Nano Drop²⁰⁰⁰ 分光光度计检测 dsRNA 的浓度, 并加入 DEPC 处理水将其稀释为终浓度 $50 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, 最后放入 -80°C 冰箱保存备用。

表 1 dsRNA 合成引物及荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Primers sequences used for dsRNA synthesis and fluorogenic quantitative PCR

引物名称 Primer name	正向引物 (5'-3') Forward primer	反向引物 (5'-3') Reverse primer
dsNITret1	CGCAACCAGAATCACCAC	ACAGCAGGCAGCCACTTA
dsNITret1-T7	T7-CGCAACCAGAATCACCAC	T7-ACAGCAGGCAGCCACTTA
dsNITret1 XI	CTGGCAAAACCTCAAACC	TAGAAGCATAGCAAGACCCT
dsNITret1 XI-T7	T7-CTGGCAAAACCTCAAACC	T7-TAGAAGCATAGCAAGACCCT
dsGFP	AAGGGCGAGGAGCTGTTACCG	CAGCAGGACCATGTGATCGCGC
dsGFP-T7	T7-AAGGGCGAGGAGCTGTTACCG	T7-CAGCAGGACCATGTGATCGCGC
QNITret1	TCAGCGAGATAGCCTCAGTG	CAGCAGAATGCCCAAGTACC
QNITret1 XI	CGTAGGCTCTCTACTGGCAT	CCCTTGGGCGATCAGATAGT
QNITRE1-1	GCCATTGTGGACAGGGTG	CGGTATGAACGAATAGAGCC
QNITRE1-2	GATCGCACGGATGTTTA	AATGGCGTTCAAGTCAA
QNITRE2	TCACGGTTGTCCAAGTCT	TGTTTCGTTTCGGCTGT
QNITPS1	AAGACTGAGCGAATGGT	AAGGTGGAATGGAATGTG
QNITPS2	AGAGTGACCGCAACAACA	TCAACGCCGAGAATGACTT
QNITPS3	GTGATGCGTCGGTGGCTAT	CCGTTTCATCATTGGGCATAGT
QNlactin	CCCCATCGAGCACGGTATCATA	TCTGGGTCATCTTCTCACGGTTGG

注: T7 序列为 GGATCCTAATACGACTCACTATAGG。Note: T7 sequences was GGATCCTAATACGACTCACTATAGG.

1.4 褐飞虱的显微注射

选取发育至 5 龄第 1 天的褐飞虱若虫用于 RNAi 显微注射试验。

首先将 dsRNA 溶液导入玻璃毛细管针中, 设定显微注射仪参数为: 注射压强 1 000 pah, 补偿压 80 pah, 并根据注射入标准毛细管的体积 (5 龄褐飞虱的注射体积为 100 nL/头) 调整注射时间。然后用毛笔挑取 CO_2 麻醉后的褐飞虱使其腹面朝上, 放置在提前准备好的琼脂糖胶台的凹槽中, 在莱卡 EZ4 解剖镜的观察下将针刺入褐飞虱胸部第二和第三对足之间并注入 dsRNA。把处理后的飞虱放入含新鲜水稻苗的玻璃管中, 48 h 后挑取存活的褐飞虱用于荧光定量分析、糖含量检测以及海藻糖酶活性测定。挑取 3 个平行的样品, 每个平行 10 头褐飞虱用于检测 RNAi 后基因表达水

平; 挑取 3 个平行的样品, 每个平行 20 头褐飞虱用于测定海藻糖酶活和糖含量。

1.5 RNAi 后褐飞虱体内海藻糖代谢通路相关基因表达量测定

取不同处理组显微注射 48 h 后的褐飞虱抽提总 RNA, 参照试剂盒反转录得到 cDNA, 并根据 SYBR[®] Premix Ex TaqTM 试剂盒的方法进行 qRT-PCR 检测, 具体定量引物见表 1。荧光定量 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, 40 个循环。每个处理 3 个模板, 每个模板重复 3 次。目的基因的相对拷贝数根据 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法进行分析 (Livak *et al.*, 2001)。

1.6 总糖原、海藻糖、葡萄糖含量以及海藻糖酶活性测定

取注射后 48 h 的材料分为对照组与实验组,

向其加入 200 μL PBS, 经过组织破碎仪 (程序: 55 Hz, 120 s) 充分研磨后放入超声破碎仪进行超声破碎 0.5 h, 往破碎后的样品再加入 800 μL PBS 补足 1 mL, 4 $^{\circ}\text{C}$, 1 000 g 离心 20 min。取 2 份 350 μL 上清, 1 份用于总蛋白、总糖原和海藻糖含量的测定; 1 份进行 4 $^{\circ}\text{C}$, 20 800 g 超离心 1 h, 超离心后取 300 μL 上清液用于测定葡萄糖、蛋白质含量以及可溶型海藻糖酶活性, 沉淀于 300 μL 的 PBS 悬浮后用于测定葡萄糖、蛋白质含量和膜结合型海藻糖酶活性, 具体操作步骤参照 Zhang 等的方法 (Zhang *et al.*, 2017)。

1.7 数据分析

应用 Excel 软件整理数据, 并使用 SPSS 软件和 Sigma Plot 10.0 进行统计分析和数据作图, 数据用平均值 + 标准误 (SE) 表示, 采用非配对 T 检验 (unpaired t-test) 和单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 中的 LSD 方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)。

2 结果与分析

2.1 两个褐飞虱 *NITret1* 基因序列功能分析

登录号为 XP_022187716.2 和 XP_022188572.1 的核苷酸序列分别有 1 353 bp 和 1 488 bp 的开放阅读框, 编码具有 450 和 495 个氨基酸残基的蛋白质, 将这两个蛋白序列分别命名为 *NITret1* 和 *NITret1 X1*。进行理化分析, 预测这两个蛋白分子量大小为 49.984 kDa 和 53.059 kDa, 理论等电点 pI 为 6.53 和 7.46, 其中 *NITret1* 带负电荷氨基酸残基总数 (Asp + Glu) 为 34, 带正电荷氨基酸残基总数 (Arg + Lys) 为 33, *NITret1 X1* 带负电荷氨基酸残基总数 (Asp + Glu) 为 30, 带正电荷氨基酸残基总数 (Arg + Lys) 为 31。因此推测 *NITret1* 属于酸性氨基酸, *NITret1 X1* 属于碱性氨基酸。它们的不稳定系数为 34.63 和 34.38, 脂肪族氨基酸指数为 115.24 和 114.48, 亲水平均系数分别为 0.565 和 0.713, 综合以上结果, 表明 *NITret1* 和 *NITret1 X1* 都属于疏水性氨基酸。另由 SMART 预测 *NITret1* 和 *NITret1 X1* 的跨膜结构域模型分别包含 10 个跨膜结构域和 12 个跨膜结构域且定位于细

胞膜, 属于 MFS 超家族, 并都具有特异性糖转运蛋白的功能结构域, 说明这两个蛋白均为固定在细胞膜上的糖转运蛋白。从二级结构和三级结构预测结果可看出, *NITret1* 和 *NITret1 X1* 主要由 α -螺旋和无规卷曲组成 (图 1)。

2.2 两个褐飞虱 *NITret1* 蛋白的进化树分析

从不同昆虫种类进行的系统发育树表明, 两个蛋白聚集在相关的系统发育分支中, *NITret1* 与玉米蚜 *Rhopalosiphum maidis*、高粱蚜 *Melanaphis sacchari*、温带臭虫 *Cimex lectularius* 和褐翅椿象 *Halyomorpha halys* 聚集在一支; *NITret1 X1* 与棉蚜 *Aphis gossypii*、玉米蚜 *Rhopalosiphum maidis*、高粱蚜 *Melanaphis sacchari*、烟蚜 *Myzus persicae*、蔗黄伪毛蚜 *Sipha flava* 和棕榈蓟马 *Thrips palmi* 集中在一支。*NITret1* 与 *NITret1 X1* 蛋白都与其他昆虫的 *Tret1* 与 *Tret1 X1* 蛋白聚集在一支, 并与上述多数互为半翅目的昆虫同源相近 (图 2)。

2.3 RNAi 后褐飞虱两个 *NITret1* 基因沉默效率

为了鉴定 RNAi 的注射效果, 利用 qRT-PCR 检测 *NITret1* 和 *NITret1 X1* 在 mRNA 表达水平上变化情况。干扰 *NITret1* 和 *NITret1 X1* 的 48 h 后本基因表达量都极显著下调 ($P < 0.01$), 其中 *NITret1* 与对照组相比靶标基因的表达量下调了 88.1%, *NITret1 X1* 下调了 95%, 这说明合成的 dsRNA 可以成功抑制靶标基因的表达水平 (图 3)。

2.4 RNAi 后褐飞虱海藻糖代谢关键基因相对表达量变化

荧光定量 PCR 检测的结果显示, 相比于对照组褐飞虱海藻糖酶基因 *NITRE* 在 RNAi 后 mRNA 水平都有不同程度变化, 在注射 *dsNITret1* 和 *dsNITret1 X1* 的 48 h 后 *NITRE1-1* 基因表现为超低水平表达 ($P < 0.01$), 相反地 *NITRE1-2* 基因则表现为高水平的表达 ($P < 0.01$); *NITRE1-3* 基因在注射 *dsNITret1* 后表达量呈极显著上调, 而注射 *dsNITret1 X1* 后则呈极显著下调现象。同时, 检测到 3 个海藻糖-6-磷酸酯酶基因 (*NITPS*) 表达量水平也不一致, 注射两种靶标基因的 dsRNA 后 *NITPS2* 和 *NITPS3* 基因分别表现为极显著下调和极显著上调, *NITPS1* 基因则是在干扰 *NITret1* 后为上调而在干扰 *NITret1 X1* 后为下调 (图 4)。

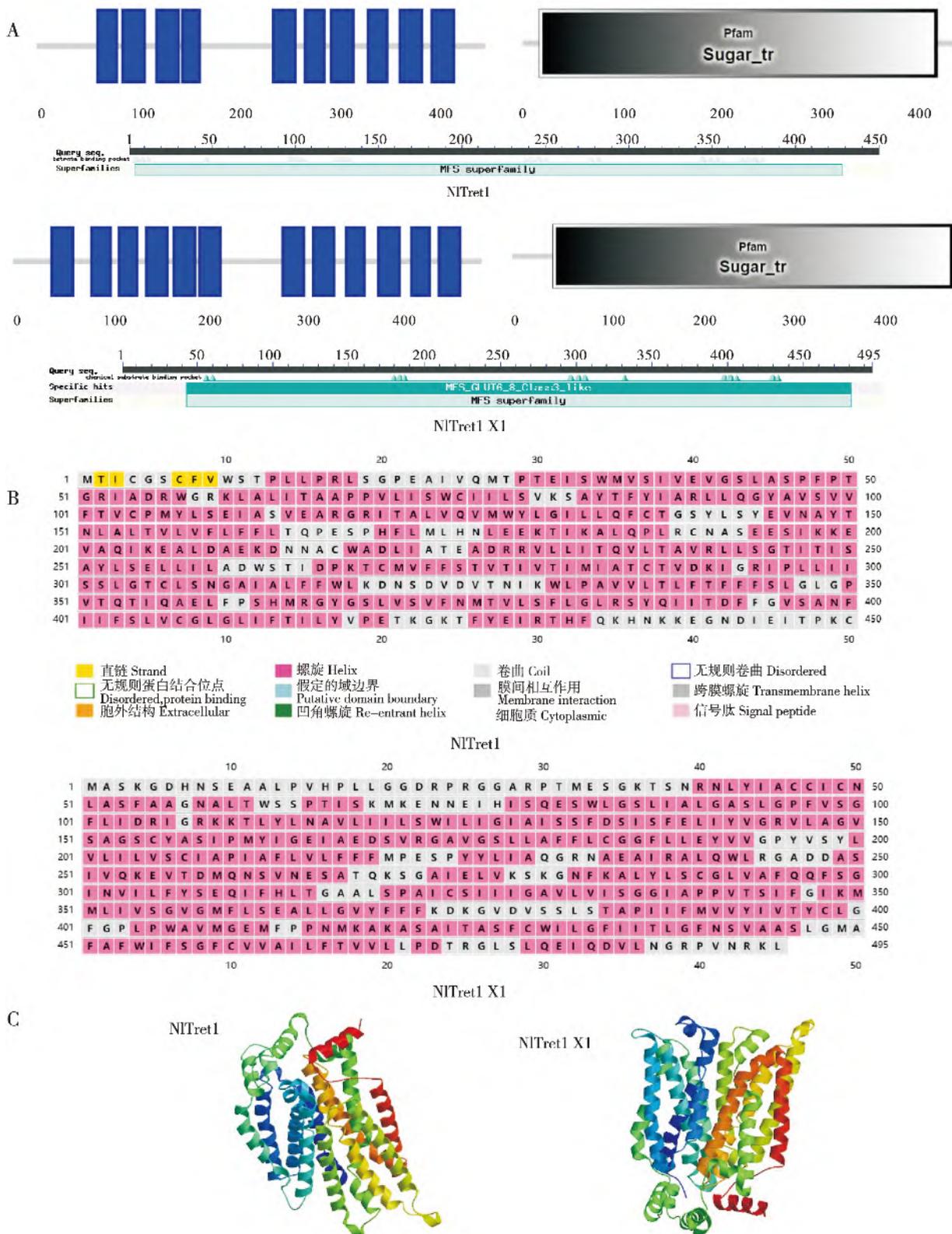


图1 NITret1 和 NITret1 X1 的生物信息学分析

Fig. 1 Bioinformatics analysis of NITret1 and NITret1 X1

注: A, NITret1 与 NITret1 X1 跨膜结构域及保守结构域预测; B, NITret1 与 NITret1 X1 的二级结构域预测; C, NITret1 与 NITret1 X1 三级结构预测。Note: A, NITret1 and NITret1 X1 transmembrane domain prediction and conservative domain prediction; B, Prediction of the secondary domains of NITret1 and NITret1 X1; C, NITret1 and NITret1 X1 tertiary structure prediction.

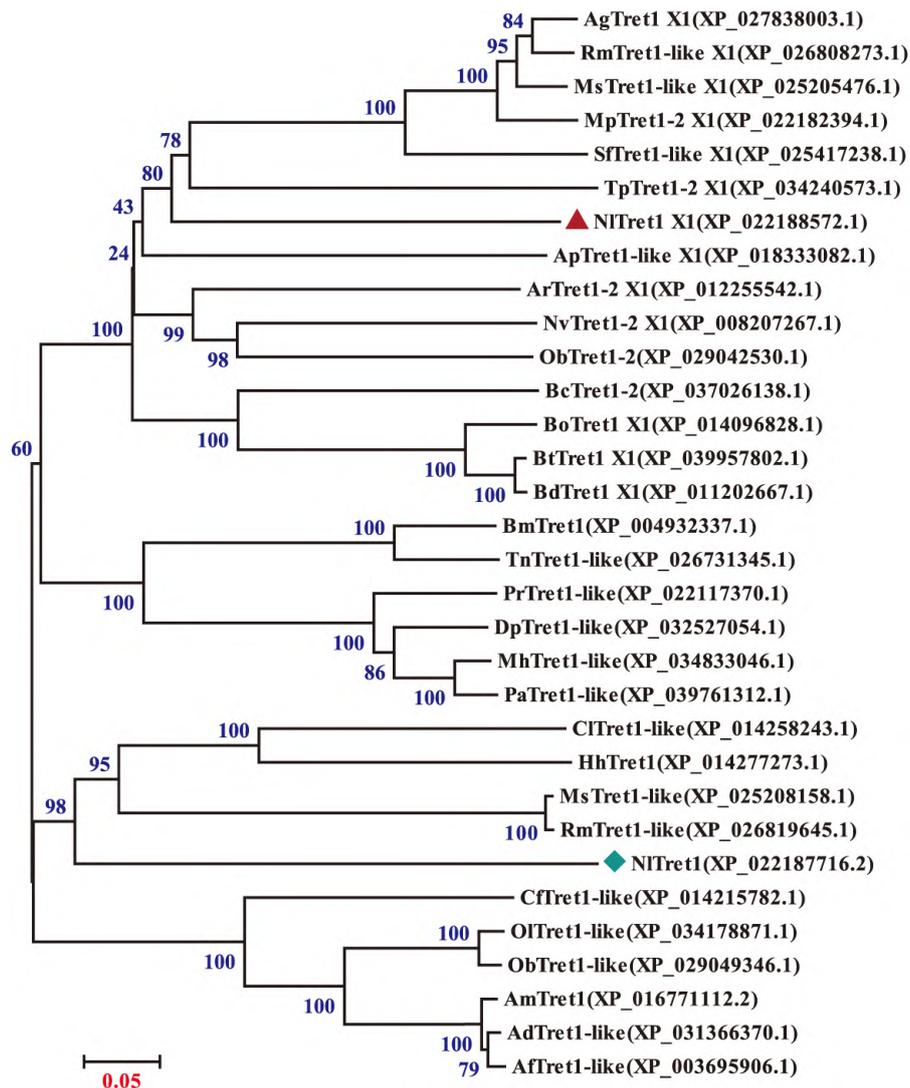


图2 NIret1 (XP_022187716.2) 与 NIret1 X1 (XP_022188572.1) 基于氨基酸序列与其他昆虫 Tret 构建的进化发育树
Fig. 2 Evolution and development tree constructed by NIret1 (XP_022187716.2) and NIret1 X1 (XP_022188572.1) based on amino acid sequence and other insect Trets

注: Tret 蛋白物种来源及其登录号: 棉蚜 *Aphis gossypii*, AgTret1X1 (XP_027838003.1); 玉米蚜 *Rhopalosiphum maidis*, RmTret1-likeX1 (XP_026808273.1)、RmTret1-like (XP_026819645.1); 高粱蚜 *Melanaphis sacchari*, MsTret1-likeX1 (XP_025205476.1)、MsTret1-like (XP_025208158.1); 烟蚜 *Myzus persicae*, MpTret1-2X1 (XP_022182394.1); 蔗黄伪毛蚜 *Sipha flava*, SfTret1-likeX1 (XP_025417238.1); 棕榈蓟马 *Thrips palmi*, TpTret1-2X1 (XP_034240573.1); 白蜡窄吉丁 *Agrilus planipennis*, ApTret1-likeX1 (XP_018333082.1); 黄翅菜叶蜂 *Athalia rosae*, ArTret1-2X1 (XP_012255542.1); 丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis*, NvTret1-2X1 (XP_008207267.1); 红松蜂 *Osmia bicornis*, ObTret1-2 (XP_029042530.1)、ObTret1-like (XP_029049346.1); 韭菜迟眼蕈蚊 *Bradysia coprophila*, BcTret1-2 (XP_037026138.1); 油橄榄果实蝇 *Bactrocera oleae*, BoTret1X1 (XP_014096828.1); 昆士兰实蝇 *Bactrocera tryoni*, BtTret1X1 (XP_039957802.1); 桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis*, BdTret1X1 (XP_011202667.1); 家蚕 *Bombyx mori*, BmTret1 (XP_004932337.1); 甘蓝尺蠖 *Trichoplusia ni*, TnTret1-like (XP_026731345.1); 菜粉蝶 *Pieris rapae*, PrTret1-like (XP_022117370.1); 君主斑蝶 *Danaus plexippus*, DpTret1-like (XP_032527054.1); 阿芬眼蝶 *Maniola hyperantus*, MhTret1-like (XP_034833046.1); 斑点木蝶 *Pararge aegeria*, PaTret1-like (XP_039761312.1); 温带臭虫 *Cimex lectularius*, CtTret1-like (XP_014258243.1); 褐翅椿象 *Halyomorpha halys*, HhTret1 (XP_014277273.1); 多胚跳小蜂 *Copidosoma floridanum*, CfTret1-like (XP_014215782.1); 果园壁蜂 *Osmia lignaria*, Oitret1-like (XP_034178871.1); 西方蜜蜂 *Apis mellifera*, AmTret1 (XP_016771112.2); 大蜜蜂 *Apis dorsata*, AdTret1-like (XP_031366370.1); 小蜜蜂 *Apis florea*, AfTret1-like (XP_003695906.1)。

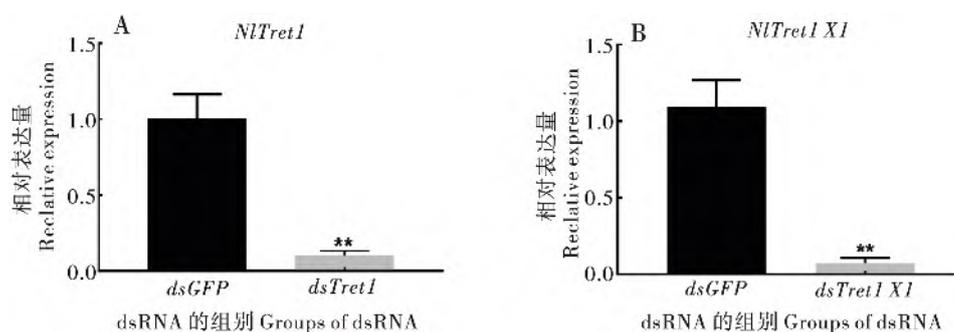


图3 dsRNA 注射 48 h 后褐飞虱 *NITret1* 和 *NITret1 X1* 基因相对表达量水平

Fig. 3 Relative expression levels of *NITret1* and *NITret1 X1* genes 48 h after dsRNA injection

注: 采用非配对 T 检验进行数据分析, 误差用平均值的标准误差表示。“*”表示在 $P < 0.05$ 上差异显著, “**”表示在 $P < 0.01$ 差异极显著。使用绿色荧光蛋白 GFP 作为对照。Note: Unpaired t-test was used for data analysis, the error was expressed as the standard error of the mean value. “*” indicated a significant difference when $P < 0.05$, and “**” indicated a extremely significant difference when $P < 0.01$. GFP, green fluorescent protein was used as control.

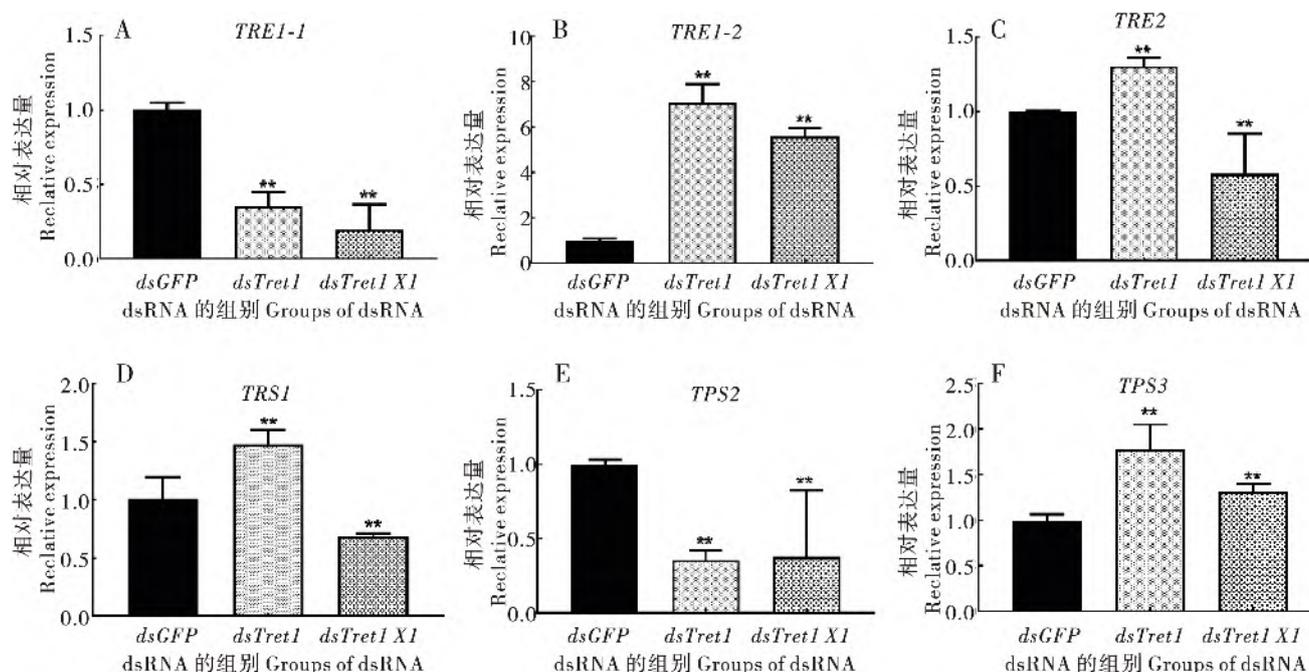


图4 *dsTret1* 和 *dsTret1 X1* 注射 48 h 后褐飞虱体内海藻糖代谢通路 3 个 *NITRE* (*TRE1-1*、*TRE1-2*、*TRE2*) 与 3 个 *NITPS* (*TPS1*、*TPS2*、*TPS3*) 基因相对表达量水平

Fig. 4 Relative expression levels of three *NITREs* (*TRE1-1*, *TRE1-2*, and *TRE2*) and three *NITPSs*

(*TPS1*, *TPS2*, and *TPS3*) genes in trehalose metabolic pathway in BPH after 48 h of *dsTret1* and *dsTret1 X1* injection

注: 采用单因素方差分析进行数据分析, 误差用平均值的标准误差表示, 星号代表与对照组比较的结果。“*”表示在 $P < 0.05$ 上差异显著, “**”表示在 $P < 0.01$ 差异极显著。使用绿色荧光蛋白 GFP 作为对照, 下同。Note: One-way ANOVA was used for data analysis, the error was expressed as the standard error of the mean value, and asterisk represented the results compared to the control group. “*” indicated a significant difference when $P < 0.05$, and “**” indicated a extremely significant difference when $P < 0.01$. GFP, green fluorescent protein was used as control. The same as below.

2.5 RNAi 后褐飞虱体内海藻糖酶活和糖含量变化
dsRNA 能显著抑制靶基因, 进一步检测到 *dsNITret1* 和 *dsNITret1 X1* 对可溶性海藻糖酶活和膜

结合海藻糖酶活也都有极显著的抑制效果 ($P < 0.01$)。糖原与海藻糖含量在干扰 *NITret1* 基因 48 h 后检测到较对照组含量表现为极显著下降, 而

dsNITret1 对葡萄糖含量则无显著影响。干扰 *NITret1 X1* 基因的结果与之相反, 糖原与海藻糖含

量并无显著的变化, 葡萄糖含量与对照组相比却极显著上升 (图 5 ~ 图 6)。

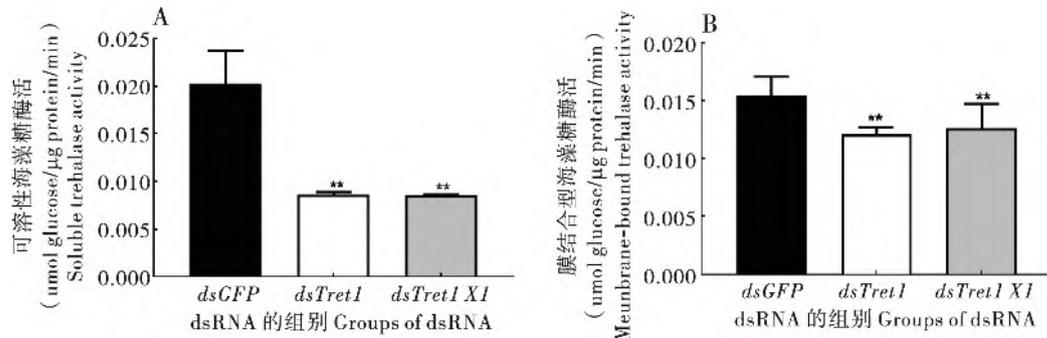


图 5 *dsTret1* 和 *dsTret1 X1* 注射 48 h 后褐飞虱可溶性海藻糖酶与膜结合海藻糖酶酶活

Fig. 5 Soluble trehalase and membrane-bound trehalase activity of the brown planthopper after 48 h of *dsTret1* and *dsTret1 X1* injection

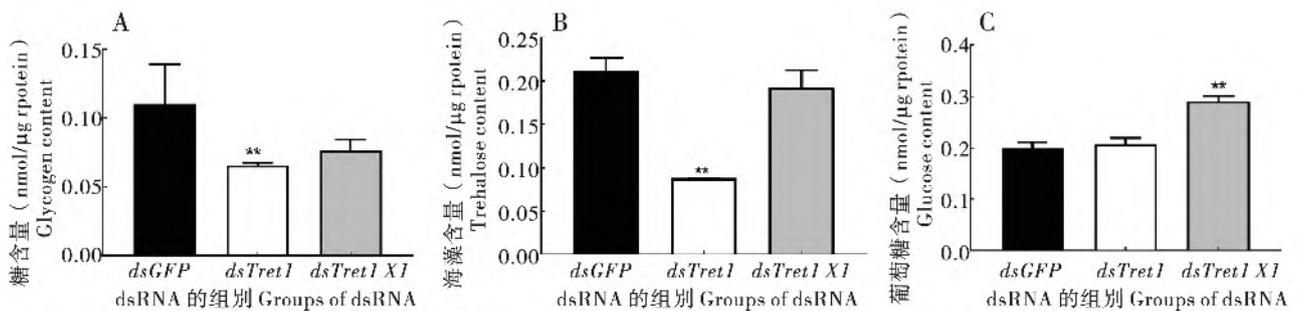


图 6 *dsTret1* 和 *dsTret1 X1* 注射 48 h 后褐飞虱糖原、海藻糖与葡萄糖含量

Fig. 6 Glycogen, trehalose and glucose concentrations of brown planthopper after 48 h of *dsTret1* and *dsTret1 X1* injection

3 结论与讨论

主要的促进子超家族 (MFS superfamily) 是最大的转运蛋白超家族之一, 目前包含 82 个家族, 每个家族特定于一组化合物 (Reddy *et al.*, 2012; Niño-González *et al.*, 2019), 在 MFS 超家族中, 糖由糖转运蛋白 St 运输。虽然在几乎所有的 GLUT 超家族成员中都可以看到序列相似性, 包括 TRET1, 但它们的生化特性差异仍十分大 (Uldry and Thorens, 2004)。另外, TRET1 直系同源物之间的动力学特征也不同 (Kanamori *et al.*, 2010), 这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负责每个转运蛋白的特异性。本研究用生物信息学的方法对 *NITret1* 和 *NITret1 X1* 蛋白进行分析, 通过三级结构预测、跨膜结构域分析以及亚细胞定位表明 *NITret1* 和 *NITret1 X1* 蛋白是与细胞膜结合的跨膜蛋白 (图 1), 拥有特异

性转运糖类物质的结构域, 因此 *NITret1* 和 *NITret1 X1* 为典型的糖转运蛋白, 但它们的二级结构和保守结构域外的氨基酸残基存在差异, 推测其糖运输功能可能会因此有所不同。

糖转运蛋白是负责把糖类物质运输到各种组织中的工具, 在昆虫细胞内海藻糖转运蛋白则是转运海藻糖的主要蛋白并且对适应环境胁迫、平衡营养状态起着重要的作用 (Thompson *et al.*, 2003)。本研究在证实了 RNAi 效果显著的前提下检测 *NITRE* 与 *NITPS* 的基因表达量, 沉默 *NITret1* 和 *NITret1 X1* 后褐飞虱 3 个海藻糖酶基因与 3 个海藻糖合成酶基因都显示了不同程度的超表达水平, 这与 Zhao 等人敲除 *NITRE* 结果几乎一致 (Zhao *et al.*, 2016), 表明海藻糖转运蛋白可影响 *TRE1* 和 *TRE2* 以及 3 个 *TPS* 之间的表达。不同的可溶性海藻糖酶 (Soluble trehalase, 简称 TRE1) 基因存在着不同分工 (陈坚毅等, 2017), 在注射 dsRNA 后 *NITRE1-1* 极显著降低 (图 4-A), 这说明褐飞虱

海藻糖转运蛋白 NITret1 和 NITret1 X1 对 TRE1-1 有着相同的调控功能, NITREI-1 表达量减少后 NITREI-2 表达量显著增加 (图 4-B), 一个基因的表达敲低时可激活其他基因的补充功能, 这揭示了基因之间的相互作用。沉默 NITret1 后 NITPS1 与 NITPS3 表达量显著增加 (图 4-D、图 4-F) 消耗糖原 (图 6-A) 应积累海藻糖 (於卫东等, 2020), 但似乎 NITret1 可严重影响到 NITREI-1 基因的表达 (图 4-A), 尽管最后降低了可溶性海藻糖酶活性与膜结合海藻糖酶活 (图 5), 但是仍大量消耗海藻糖含量, 最终结果表现为海藻糖含量的极显著降低 (图 6-B)。AgTret1 缺陷型冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 的血淋巴海藻糖浓度检测结果也与本实验结果一致, 与对照组相比降低 40% (Liu *et al.*, 2013), 抑制 NITret1 表达可减少海藻糖从脂肪体到血淋巴的转运, 这说明可通过 NITret1 调整维持血淋巴的海藻糖浓度。相对来说, 沉默 NITret1 X1 虽也使 TRE 与 TPS 基因产生不同程度的波动 (图 4), 对海藻糖酶活的影响也是显著降低的 (图 5), 但并不影响到糖原含量与海藻糖含量的变化, 仅使葡萄糖浓度升高 (图 6-C)。Tret1 可能属于 GLUT 家族的新成员, 有研究表明嗜眠摇蚊 *Polypedilum vanderplanki* 的 Tret1 不仅可以转运海藻糖还可转运葡萄糖类似物。此外, 尽管果蝇 *Drosophila melanogaster* 的 Tret1-2 含有保守的 Tret1 氨基酸序列, 但其并不具备运输海藻糖的能力 (Kikawada *et al.*, 2007; Kanamori *et al.*, 2010)。因此推测 NITret1 与 NITret1 X1 这两个蛋白分别执行不同的功能, 在此之中 NITret1 作为特异性转运海藻糖的蛋白可能性更大, 而 NITret1 X1 也许以运输葡萄糖为主, 由实验结果来看可能还存在着功能互补的作用, 但相关机制还需进一步研究与验证。

参考文献 (References)

- Avonce N, Mendoza-Vargas A, Morett E, *et al.* Insights on the evolution of trehalose biosynthesis [J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2006, 6: 109.
- Becker A, Schlöder P, Steele JE, *et al.* The regulation of trehalose metabolism in insects [J]. *Experientia*, 1996, 52 (5): 433-439.
- Benaroudj N, Lee DH, Goldberg AL. Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276 (26): 24261-24267.
- Benoit JB, Lopez-Martinez G, Elnitsky MA, *et al.* Dehydration - induced cross tolerance of *Belgica antarctica* larvae to cold and heat is facilitated by trehalose accumulation [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A, Molecular & Integrative Physiology*, 2009, 152 (4): 518-523.
- Bonini BM, Van D, Pand JM. Trehalose metabolism: Enzymatic pathways and physiological functions [J]. *The Mycota: A Treatise on the Biology of Fungi with Emphasis on Systems for Fundamental and Applied Research*, 2004: 291-332.
- Chen JY, Zhang L, Wang SS, *et al.* Molecular characterization of soluble trehalase and expression of dsRNA in *Nilaparvata lugens* [J]. *Journal of Hangzhou Normal University (Natural Science Edition)*, 2017, 16 (3): 260-267. [陈坚毅, 张露, 王莎莎, 等. 褐飞虱可溶性海藻糖酶的分子特性及 dsRNA 抑制表达分析 [J]. 杭州师范大学学报 (自然科学版), 2017, 16 (3): 260-267]
- Chen LQ, Cheung LS, Feng L, *et al.* Transport of sugars [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2015, 84: 865-894.
- Chen ME, Holmes SP, Pietrantonio PV. Glucose transporter 8 (GLUT8) from the red imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae) [J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2006, 62 (2): 55-72.
- Cornette R, Kanamori Y, Watanabe M, *et al.* Identification of anhydrobiosis - related genes from an expressed sequence tag database in the cryptobiotic midge *Polypedilum vanderplanki* (Diptera: Chironomidae) [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285 (46): 35889-99.
- Durand M, Porcheron B, Hennion N, *et al.* Water deficit enhances c export to the roots in *Arabidopsis thaliana* plants with contribution of sucrose transporters in both shoot and roots [J]. *Plant Physiology*, 2016, 170 (3): 1460-1479.
- Elbein A, Pan YT, Pastuszak I, *et al.* New insights on trehalose: A multifunctional molecule [J]. *Glycobiology*, 2003, 13 (4): 17R-27R.
- Henao JD, Rincon SM, Filgueira J. "Head to tail" tool analysis through ClustalW alignment algorithms and construction of distance method neighbor - joining trees based on genus *Fusarium* genomic distances [J]. *Advances in Intelligent Systems and Computing*, 2014, 232: 97-102.
- Huang S, Czech MP. The GLUT4 glucose transporter [J]. *Cell Metabolism*, 2007, 5 (4): 237-252.
- Julius BT, Leach KA, Tran TM, *et al.* Sugar transporters in plants: New insights and discoveries [J]. *Plant & Cell Physiology*, 2017, 58 (9): 1442-1460.
- Kanamori Y, Saito A, Hagiwara - Komoda Y, *et al.* The trehalose transporter 1 gene sequence is conserved in insects and encodes proteins with different kinetic properties involved in trehalose import into peripheral tissues [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, 40 (1): 30-37.
- Kikawada T, Saito A, Kanamori Y, *et al.* Trehalose transporter 1, a facilitated and high - capacity trehalose transporter, allows exogenous trehalose uptake into cells [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007,

- 104 (28): 11585–11590.
- Kikuta S, Nakamura Y, Hattori M, et al. Herbivory – induced glucose transporter gene expression in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2015, 64: 60–67.
- Le HR, Spinner L, Klemens PA, et al. Disruption of the sugar transporters AtSWEET11 and AtSWEET12 affects vascular development and freezing tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Molecular Plant*, 2015, 8 (11): 1687–1690.
- Leyria J, El-Mawed H, Orchard I, et al. Regulation of a trehalose – specific facilitated transporter (Tret) by insulin and adipokinetic hormone in *Rhodnius prolixus*, a vector of chagas disease [J]. *Frontiers in Physiology*, 2021, 12: 624165.
- Liu J, Jiang YY, Huang C, et al. Forecast of major diseases and insect pests of grain crops in China in 2021 [J]. *China Plant Protection*, 2021, 41 (1): 37–39, 42. [刘杰, 姜玉英, 黄冲, 等. 2021 年全国粮食作物重大病虫害发生趋势预报 [J]. 中国植保导刊, 2021, 41 (1): 37–39, 42]
- Liu K, Dong Y, Huang Y, et al. Impact of trehalose transporter knockdown on *Anopheles gambiae* stress adaptation and susceptibility to *Plasmodium falciparum* infection [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110 (43): 17504–17509.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25 (4): 402–408.
- Lunn JE, Delorge I, Figueroa CM, et al. Trehalose metabolism in plants [J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 2014, 79 (4): 544–567.
- Niño-González M, Novo-Uzal E, Richardson DN, et al. More transporters, more substrates: The *Arabidopsis* major facilitator superfamily revisited [J]. *Molecular Plant*, 2019, 12 (9): 1182–1202.
- Price DR, Wilkinson HS, Gatehouse JA. Functional expression and characterisation of a gut facilitative glucose transporter, NIHT1, from the phloem – feeding insect *Nilaparvata lugens* (rice brown planthopper) [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2007, 37 (11): 1138–1148.
- Reddy VS, Shlykov MA, Castillo R, et al. The major facilitator superfamily (MFS) revisited [J]. *The FEBS Journal*, 2012, 279 (11): 2022–2035.
- Shukla E, Thorat LJ, Nath BB, et al. Insect trehalase: Physiological significance and potential applications [J]. *Glycobiology*, 2015, 25 (4): 357–367.
- Sōgawa K. The rice brown planthopper: Feeding physiology and host plant interactions [J]. *Annual Review of Entomology*, 1982, 27 (1): 49–73.
- Tang B, Wang SS, Wang SG, et al. Invertebrate trehalose-6-phosphate synthase gene: Genetic architecture, biochemistry, physiological function, and potential applications [J]. *Frontiers in Physiology*, 2018, 9: 30.
- Thompson SN. Trehalose—the insect “blood” sugar [J]. *Insect Physiol.*, 2003, 31: 205–283.
- Uldry M, Thorens B. The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters [J]. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, 2004, 447 (5): 480–489.
- Xu CC, Ji L, Chen ZD, et al. Analysis of China’s rice industry in 2017 and the outlook for 2018 [J]. *China Rice*, 2018, 24 (2): 1–3. [徐春春, 纪龙, 陈中督, 等. 2017 年我国水稻产业形势分析及 2018 年展望 [J]. 中国稻米, 2018, 24 (2): 1–3]
- Yu WD, Pan BY, Qiu LY, et al. The structure characteristics and biological functions on regulating trehalose metabolism of two NITret1s in *Nilaparvata lugens* [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2020, 53 (23): 4802–4812. [於卫东, 潘碧莹, 邱玲玉, 等. 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 [J]. 中国农业科学, 2020, 53 (23): 4802–4812]
- Zhang L, Qiu LY, Yang HL, et al. 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 [J]. *Frontiers in Physiology*, 2017, 8: 750.
- Zhao LN, Yang MM, Shen QD, et al. Functional characterization of three trehalase genes regulating the chitin metabolism pathway in rice brown planthopper using RNA interference [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 27841.