



转录因子 *NIMyc* 在调控褐飞虱致害高麦黄 酮抗性水稻的功能研究

孙靓雯^{1*}, 袁龙宇^{2*}, 赖晓凤², 肖汉祥², 李燕芳²,
戴阳朔², 申建梅^{1**}, 张振飞^{2**}

(1. 仲恺农业工程学院植物健康创新研究院, 广州 510225; 2. 广东省农业科学院植物保护研究所, 广州 510640)

摘要：*NIMyc* 是生物体中极其重要的转录因子，在多种细胞活动过程中起着至关重要的作用，包括细胞周期、细胞生长、增殖、凋亡等细胞过程。但目前转录因子如何调节褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (Stål) 致害水稻的功能方面尚未报道。本研究克隆和鉴定了褐飞虱转录因子 *NIMyc* 基因，结果表明 *NIMyc* 基因全长 1 830 bp，编码 609 个氨基酸。利用 RT-qPCR 技术检测 *NIMyc* 基因的抗性表达水平以及在褐飞虱体内的时空表达方式，研究发现褐飞虱取食抗性水稻后，*NIMyc* 基因表达量显著高于取食感虫水稻时，且 *NIMyc* 基因在褐飞虱雌成虫 1 天和唾液腺组织中表达量最高。对 *NIMyc* 基因进行 RNAi 后，发现褐飞虱在高麦黄酮抗性水稻上的取食孔的数量为 28.9 ± 8.5 个，相比于对照组 (Control、ds*GFP*) 的 13.5 ± 4.3 个和 16.2 ± 8.4 个，取食孔数量显著增多；ds*NIMyc*、Control 和 ds*GFP* 处理 48 h 的褐飞虱平均蜜露分泌量分别为 2.44 mg、5.3 mg 和 4.6 mg；获得性体重为 0.23 mg、0.49 mg 和 0.47 mg，ds*NIMyc* 组相对于对照组的蜜露分泌量和获得性体重都表现出显著的下降，这说明沉默 *NIMyc* 基因降低了褐飞虱在抗性水稻上的适合度及取食能力，调控褐飞虱致害抗性水稻。本研究证明了 *NIMyc* 是调控褐飞虱致害高麦黄酮抗性水稻的关键转录因子，不仅为探索褐飞虱致害性变异提供了新的思路，而且为害虫防治提供了新的分子靶标。

关键词：褐飞虱；麦黄酮；*NIMyc*；RNAi；致害性

中图分类号：Q968.1；Q963

文献标识码：A

Functional study of transcription factor *NIMyc* in regulating the Virulence of the brown planthopper to resistance rice with high tricin Varieties

SUN Jing-Wen^{1*}, YUAN Long-Yu^{2*}, LAI Xiao-Feng², XIAO Han-Xiang², LI Yan-Fang², DAI Yang-Shuo², SHEN Jian-Mei^{1**}, ZHANG Zhen-Fei^{2**} (1. Innovative Institute Plant Health, Zhongkai

基金项目：国家自然科学基金 (32172507, 32202308)；广东省农业科学院创新基金 (202201)；广东省农业科学院中青年学科带头人培养项目 (R2023PY-JG009)

*共同第一作者：孙靓雯，女，硕士研究生，研究方向水稻品种抗虫分子机制，E-mail: 1114395681@qq.com；袁龙宇，男，副研究员，研究方向水稻害虫致害性变异分子机制，E-mail: yuanlongyu@gdaas.cn

**通讯作者 Author for correspondence：申建梅，女，博士，教授，主要研究方向为昆虫分子生物学研究，E-mail: shenjianmei12@163.com；张振飞，男，博士，研究员，主要研究方向为昆虫与寄主植物互作机制，E-mail: zhangzhenfei@gdaas.cn

收稿日期 Received: 2024-09-05；修回日期 Revision received: 2025-02-07；接受日期 Accepted: 2025-02-10

University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China; 2. Plant Protection Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: *NIMyc* is an extremely important transcription factor in living organisms and playing a crucial role in a various of cellular processes, including cell cycle, growth, proliferation, apoptosis and other cellular processes. However, it has not been reported how transcription factors regulate the function of brown planthopper (*Nilaparvata lugens* (Stål)) damage to rice. This study cloned and identified the transcription factor *NIMyc* gene of the brown planthopper. The results showed that the *NIMyc* gene has a total length of 1 830bp and encodes 609 amino acids. Using RT-qPCR technology to detect the resistance expression level of *NIMyc* gene and its spatio-temporal expression pattern in brown planthopper, the study found that after brown planthopper fed on resistant rice, the expression level of *NIMyc* gene was significantly higher than that of brown planthopper fed on susceptible rice, and the expression level of *NIMyc* gene was the highest in the 1-day and salivary gland tissues of brown planthopper. After RNAi of *NIMyc* gene, it was found that the number of feeding holes of brown planthopper on high tricin resistant rice was 28.9 ± 8.5 , which was significantly increased compared to the Control group (Control, *dsGFP*) with 13.5 ± 4.3 and 16.2 ± 8.4 feeding holes; The average honeydew secretion of brown planthoppers treated with *dsNIMyc*, Control and *dsGFP* for 48 hours was 2.44 mg, 5.3 mg and 4.6 mg; The weight gain was 0.23 mg, 0.49 mg, and 0.47 mg, and the *dsNIMyc* group showed a significant decrease in honeydew secretion and weight gain compared to the Control group. This indicates that silencing the *NIMyc* gene reduced the fitness and feeding ability of brown planthoppers, and regulated the damage caused by brown planthopper on resistane rice. This study demonstrates that *NIMyc* is a key transcription factor regulating the damage caused by brown planthopper to high tricin resistant rice, which not only provides new ideas to explore the harmful variation of brown planthopper, but also provides new ideas molecular target for pest Control.

Key words: *Nilaparvata lugens*; tricin; *NIMyc*; RNAi; virulence

褐飞虱*Nilaparvata lugens*属半翅目Hemiptera飞虱科Delphacidae, 是亚洲国家最主要的水稻害虫之一, 暴发时会造成水稻大量减产甚至绝收 (Shangguan *et al.*, 2018)。目前, 提高作物自身抗虫性、发展抗虫绿色品种控制害虫, 少用或不用农药是农业可持续发展的趋势和时代的需求 (Zhang *et al.*, 2015; Shangguan *et al.*, 2018), 种植抗虫水稻品种成为控制褐飞虱为害的有效手段 (杜波等, 2018)。褐飞虱在取食水稻后, 水稻会产生一系列的防御反应来保护自身 (李瀚鹏, 2020)。植食性昆虫致害变异过程中, 植物抗性及其次生代谢物质对昆虫体内或唾液腺内的各种解毒和代谢酶类的诱导作用增强, 使这些解毒和代谢酶活性也逐步增强, 最终克服寄主植物抗性, 致使形成新的致害种群 (张海霞等, 2024)。抗性水稻中有一种重要的抗褐飞虱次生化合物麦黄酮, 是水稻体内的一种关键抗虫次生代谢物, 它们不仅具有直接的杀虫活性, 还能抑制褐飞虱的取食, 降低其成虫的产卵量和卵的孵化率 (凌冰等, 2007; Zhang *et al.*, 2015)。麦黄酮含量与水稻对褐飞虱的抗性水平成显著正相关 (Gong *et al.*, 2022), 而高致害性褐飞虱种群为害能显著降低水稻麦黄酮的代谢水平 (Zhang *et al.*,

2015; Zhang *et al.*, 2017; 巩固等, 2019)。当褐飞虱取食高麦黄酮含量的抗性水稻后, 会诱导水稻细胞壁增厚和胼胝质沉积 (Liu *et al.*, 2015), 进而显著降低褐飞虱对抗性水稻的致害性 (Yuan *et al.*, 2020)。目前褐飞虱对水稻的致害能力逐渐增强, 敏感种群只能致害感虫水稻却不能致害抗性水稻, 而抗性种群却能致害两种水稻品种, 说明褐飞虱的致害性种群与水稻抗性之间有一定关联性 (Pang *et al.*, 2024)。

转录因子能够特异地与DNA序列结合, 并在转录过程中发挥调控作用来影响基因的表达水平, 进而对细胞的分化、生长和分裂等关键生物学过程产生影响 (Dang, 2012; Hsien *et al.*, 2015)。目前, 关于转录因子在调控褐飞虱致害性方面的研究较少, 主要集中在翅型分化、卵巢发育等生物学过程。例如, 陈孙杰等 (2024) 研究揭示了褐飞虱中 *InR2* 和 *FoxO* 两种转录因子在调控翅型分化方面具有一致的功能, 通过基因沉默或敲除这两个基因中的任何一个, 都会导致褐飞虱产生长翅的表型; 另外, Dong等 (2020) 研究发现转录因子 *FoxO* 能够调节褐飞虱的产卵数量和孵化率, 从而对其繁殖能力产生影响。在其它的物种中, 潘煜等 (2022) 发现了果蝇 *Drosophila melanogaster* 的 *Myc* 基因在调控同性求偶行为方面的新功能, 并进一步阐明了 *Myc* 蛋白通过转录调控 *Ddc* 基因, 进而导致同性求偶行为的分子机制。 *Myc* 家族中的 *c-Myc* 是近年来备受关注的一类的核转录因子, 参与细胞增殖调控、分化和凋亡以及个体发育等生命活动的重要转录因子, 在昆虫的代谢和生长发育等生命过程中发挥着重要的潜在功能 (徐俊杰, 2022)。目前, 在果蝇中也发现了 *c-Myc* 的同源基因, 果蝇 *Myc* 蛋白的氨基酸序列仅有 26% 与人类的 *c-Myc* 相同, 但却有着高度保守的功能域 (李瑞敏, 2020)。因此, 本研究选择了 *Myc* 家族中的 *c-Myc* 作为褐飞虱的转录因子 *NIMyc* 对如何调控褐飞虱的致害性进行初步研究。

本研究分析了褐飞虱转录因子 *NIMyc* 的时空表达模式和受抗虫水稻诱导后的表达情况, 并运用 RNAi 技术初步揭示了 *NIMyc* 对褐飞虱在高麦黄酮抗性水稻上的适应性和致害性的影响, 为深入探索转录因子在褐飞虱致害高麦黄酮抗性水稻中的作用机制提供新的思路和理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试水稻和昆虫

本研究中使用的水稻为 *Taichung Nalive 1* (TN1, 感虫水稻) 和 *Rathu heenati* (RH, 抗性水稻), 褐飞虱种群分别使用 TN1、RH 水稻品种饲养超过 150 代的 TN1-P 和 RH-P 种群, 以上均由广东省农业科学院植物保护研究所提供。水稻植株和褐飞虱种群培养在 $26^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 的人工气候培养箱中, 相对湿度为 $80\% \pm 5\%$, 光暗比为 16 L : 8 D。实验中供试水稻生长日龄为 30 d; 供试褐飞虱均为初羽化 1 日龄雌成虫。

1.2 生物信息学分析

依据褐飞虱基因组 (GenBank 登录号: XM_039428806.1) 查找转录因子 *NIMyc* 氨基酸序列。应用 NCBI Blast 软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 进行同源性搜索, 下载以 *c-Myc*

蛋白为代表的昆虫氨基酸序列。将这些序列进行多序列比对分析,将比对结果输入MEGA 7.0 软件利用邻接方法 (neighbor-joining) 构建系统进化树,设置bootstrap法的重复值为1 000次。

1.3 褐飞虱 *NIMyc* 基因的时空表达检测

收集褐飞虱不同发育阶段1~5龄若虫以及刚羽化的短翅型雌成虫;在体视镜下解剖褐飞虱短翅型雌成虫的头部(去除唾液腺)、唾液腺、中肠、脂肪体以及卵巢。各发育阶段和组织取样均设生物学重复3个,每个生物学重复来自50头个体。采用Trizol法提取总RNA,用琼脂凝胶检测RNA完整度,并用分光光度计测定RNA浓度和纯度。在20 μL反转录体系中加入1 μgRNA进行反转了,prime PCR trument (Genstar, Beijing, China) 试剂进行RT-qPCR分析。qPCR反应程序95°C 2 min; 95°C 15 s; 60°C 30 s进行40个循环。选用*Nlactin* (GenBank登录号: EU179848) 作为内参基因,并将1龄若虫或唾液腺基因表达量的Ct值作为基准,用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算相对表达量,引物见表1。

表1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物 Primers	引物序列 Primers sequences (5'-3')	用途 Used
dsNIMyc-F	<u>GGATCCTAATACGACTCACTATAGG</u> GCAGTATCGCCGGTAGTTC	RNAi
dsNIMyc-R	<u>GGATCCTAATACGACTCACTATAGG</u> GCTTGATGTTGTCCAGCAAG	
dsGFP-F	<u>GGATCCTAATACGACTCACTATAGG</u> GCAGTATCGCCGGTAGTTC	
dsGFP-R	<u>GGATCCTAATACGACTCACTATAGG</u> GCTTGATGTTGTCCAGCAAG	
QNIMyc-F	CGCTATTCCGAGGAGTTTCG	RT-qPCR
QNIMyc-R	GCAGGAAAGCTGCTTGC	
QNlactin-F	TGCGTGACATCAAGGAGAAGC	
QNlactin-R	CCATACCCAAGAAGGAAGGCT	

注:表中下划线部分是 T7 启动子序列。Note: The underlined portion of the table was the T7 promoter sequence.

1.4 褐飞虱 *NIMyc* 基因 RNAi 及效果检测

在设计dsRNA特异性引物前,为防止褐飞虱体内可能存在与*NIMyc*同源基因也被沉默,本研究将*NIMyc*序列与褐飞虱整虫转录组库、基因组数据库均进行了Blast比对,没有发现相似度较高的同源序列。用带有T7启动子序列的ds*NIMyc*和ds*GFP*合成引物(表1)依据T7 Ri bo-MAXTM Express RNAi系统(P1 700, Promega, USA)试剂盒说明书的步骤合成ds*NIMyc*和ds*GFP*。

用2%琼脂糖配制注射平台,注射用玻璃毛细管(World precision instruments, PUSA)制作毛细管针。将注射物装入毛细管针并固定在显微注射装置上。褐飞虱用二氧化碳麻醉,注射时确保试虫仰卧,腹部朝上。用镊子将毛细管针尖在适当部位掐断,在褐飞虱的中后脚之间的柔软部位注射。100只初羽化1 d褐飞虱雌成虫注射10 μL左右。其中,ds*NIMyc*注射浓度为400 ng/μL,以注射等量的ds*GFP*为对照。注射完后的同批次褐飞虱移入植物培养箱的RH新鲜水稻上,于注射24 h、48 h、72 h时分别挑选3头存活褐飞虱提取RNA,每组3次重复。反转录合成cDNA后进行RT-qPCR,具体操作步骤依据按照北京全式金生物公司(TransGen Biotech)的*TransScript*[®] One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix第一链cDNA

合成试剂盒说明书进行，用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算相对表达量，分析Control、dsGFP和dsNIMyc的干扰效率。

1.5 褐飞虱 *NIMyc* 基因 RNAi 后褐飞虱在水稻上的单雌蜜露分泌量与获得性体重的测定

本研究通过检测褐飞虱雌成虫在水稻上的单雌蜜露分泌量来评价取食量大小，具体操作参照方法进行，简述如下：在水稻茎秆的下部固定一只用万分之一天平称量过的由Parafilm折叠的袋子（7 cm × 7 cm），并在每个袋子中放入1头褐飞虱。待取食24 h后，从水稻茎秆上取下Parafilm袋，移除Parafilm袋中的褐飞虱再次称重，两次称重差值即为褐飞虱分泌蜜露量。将取食水稻前和取食水稻后的褐飞虱称量，两者的差值即为获得性体重。每组实验选择10头虫，并设置3次生物学重复。

1.6 褐飞虱 *NIMyc* 基因 RNAi 后褐飞虱在水稻上的取食孔检测

把单株水稻放在长10 cm直径2 cm的圆形玻璃管内，每管放1头雌成虫，用海绵封口，24 h后去除褐飞虱，用剪刀剪下褐飞虱取食部分的水稻茎秆，曙红Y溶液浸泡水稻茎秆12 h，12 h后取出放在体视镜下观察取食孔。每组实验选择10头虫，并设置3次生物学重复。

1.7 数据分析

本研究运用Excel（Microsoft，USA）统计并整理数据，使用SPSS 20数据进行分析，根据分析结果利用Prism 8.0软件（GraphPad software，USA）制作图表。荧光定量PCR实验结果均使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行分析。实验数据采用平均值±标准误来表示，采用单因素方差分析法（one-way ANOVA），多重比较采用Duncan氏新复极差法，显著水平（ $P < 0.05$ ）。

2 结果与分析

2.1 褐飞虱 *NIMyc* 序列特征

NIMyc（GenBank 登录号: XM-039428806.1）的CDS区共编码609个氨基酸，包含一个开放阅读框1 830 bp，一个341 bp 5'未翻译区域和一个3 005 bp 3'未翻译区域。应用Computer PI/Mw Tool软件（<http://web. Expasy. org/compute -pi/>）分析预测*NIMyc*蛋白的预计分子量为66.56 KD，pI为6.81。通过软件预测*NIMyc*蛋白有1个保守结构域为bHLHzip_Myc，此结构域处于第522~601位的氨基酸区域范围内，属于Myc蛋白家族成员。利用（<http://npsa-pbil.ibcp.fr/>）预测分析二级结构发现，*NIMyc*蛋白 α 螺旋占15.93%，延伸链占3.78%，无规则卷曲占80.30%。

2.2 褐飞虱 *NIMyc* 的系统发育

*NIMyc*的特征和系统发育树分析是为了确定*NIMyc*蛋白的进化关系，本研究基于8种不同的节肢动物的氨基酸序列的多重比对，用MEGA软件采用邻接方法构建了一个系统发育树，聚类分析表明，来自同一目的昆虫Myc蛋白主要聚在一起，其中褐飞虱*NIMyc*与烟粉虱*Bemisia tabaci*的亲缘关系最近，与Blast同源性结果一致。该进化树表明*NIMyc*蛋白进化上具有较好的保守性。

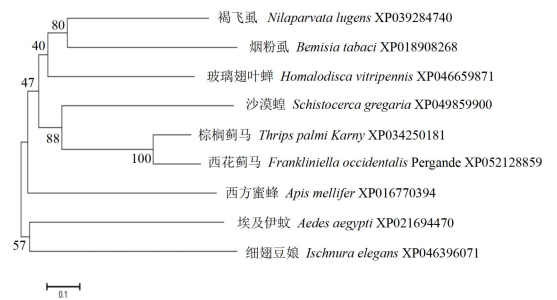


图1 邻接法构建的基于氨基酸序列的褐飞虱 *NIMyc* 与其他昆虫 c-Myc 系统发育树 (1 000 次重复)

Fig.1 Phylogenetic tree of *NIMyc* of *Nilaparvata lugens* and c-Myc of other insects based on amino acid sequences constructed by neighbor-joining method (1 000 replicates)

注: 节点的数值表示 1 000 次重复的 Bootstrap 值; 标尺表示序列差异。Note: Numbers at nodes represented bootstrap percentages (based on 1 000 samples). Scale bar represented sequence divergence.

2.3 褐飞虱 *NIMyc* 基因的时空表达及抗性表达

分别对不同发育阶段的1~5龄若虫时期和1~15日龄成虫时期的褐飞虱进行*NIMyc*表达量分析, RT-qPCR检测结果表明, *NIMyc*在褐飞虱1~5龄若虫期及成虫期均有不同程度的表达, 其中在雌成虫1 d表达量最高。通过RT-qPCR, 分别对褐飞虱不同组织(头部、唾液腺、中肠、足、脂肪体、卵巢、表皮)中的*NIMyc*的表达量进行分析, 组织表达分析结果发现, *NIMyc*在褐飞虱短翅型成虫不同组织中均有不同程度的表达, 其中在唾液腺中的表达量最高, 显著高于其它组织, 卵巢、中肠、足、脂肪体、表皮和头部(去除唾液腺)表达量较低, 表达量显著差异不大。这暗示*NIMyc*在不同组织中可能以多种方式影响褐飞虱的生长发育和繁殖。

通过RT-qPCR技术对饲养于不同抗性水稻品种的褐飞虱体内的*NIMyc*基因的表达量进行了转录水平定量, 结果显示褐飞虱在取食RH抗性水稻品种后, *NIMyc*基因表达量显著高于 ($F=0.682$, $df=4$, $P<0.05$) 取食TN1感虫水稻品种的褐飞虱, 这进一步暗示转录因子*NIMyc*能够调控褐飞虱致害高麦黄酮抗性水稻品种。

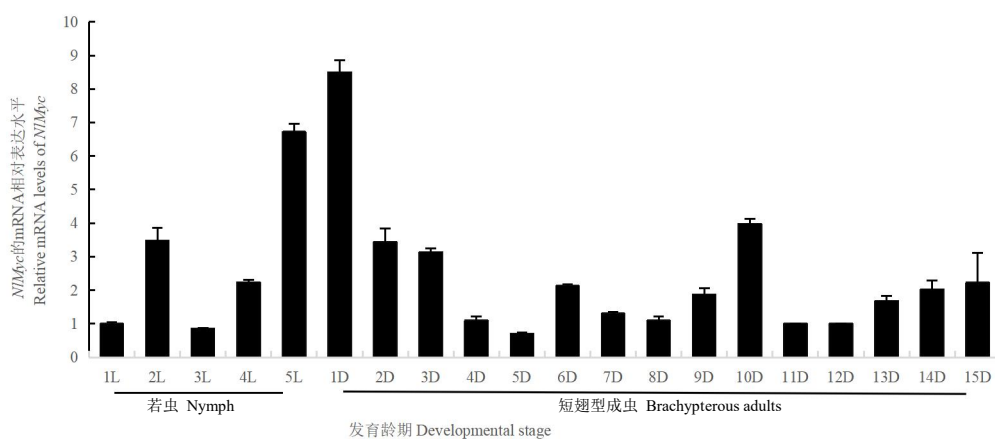


图2 褐飞虱 *NIMyc* 在不同发育阶段的表达量

Fig.2 Expression levels of *NIMyc* in different developmental stages of brown planthopper

注: 结果用平均值±标准误表示。Note: The results were expressed as mean±SE.

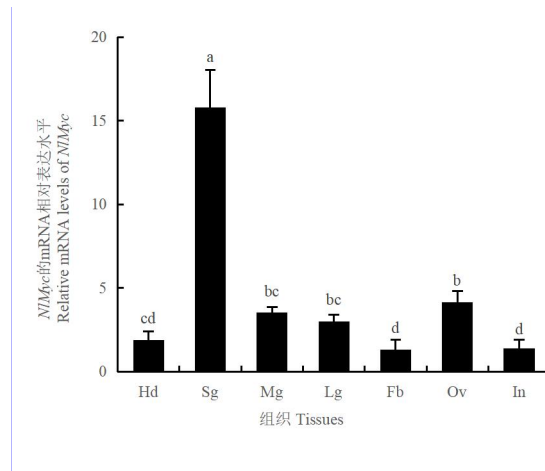


图3 褐飞虱 *NIMyc* 在不同组织的表达量

Fig.3 Expression of *NIMyc* in different tissues of brown planthopper

注：字母缩写分别表示：Hd，头部；sg，唾液腺；Mg，中肠；Lg，足；Fb，脂肪体；Ov，卵巢；In，表皮。柱状图的结果用平均值±标准误表示，使用单因素方差分析评估显著性差异，柱子上方不同的小写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验差异显著， $P < 0.05$ ， $n=3$ 。下图同。

Note: The abbreviations represented the following: Hd, head; sg, salivary gland; Mg, midgut; Lg, leg; Fb, fat body; Ov, ovary; In, integument. The results of the bar graph were presented as mean±SE, and significance was assessed using one-way ANOVA. Different lowercase letters above the bars indicated significant differences according to Duncan's new multiple range test, with $P < 0.05$, $n=3$. The same applies below.

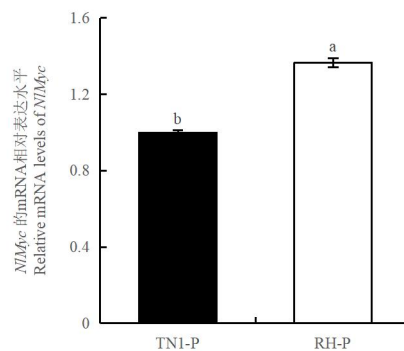


图4 褐飞虱 *NIMyc* 在不同抗性种群的表达量

Fig.4 Expression levels of *NIMyc* in different resistant populations of brown planthopper

2.4 沉默 *NIMyc* 基因在褐飞虱体内的干涉效率

在注射*NIMyc*的dsRNA后，在24 h表达水平就显著降低，分别是Control组 ($F=0.373$, $df=4$, $P<0.05$)、ds*GFP*组 ($F=3.937$, $df=4$, $P<0.05$) 的55.24%和57.25%；48 h时褐飞虱体内*NIMyc*表达量较对照Control组 ($F=8.575$, $df=4$, $P<0.05$)、ds*GFP*组 ($F=0.342$, $df=4$, $P<0.05$) 均显著下降，在48 h*NIMyc*表达水平就下降到最低，沉默效率分别为85.65%和84.69%；在72 h *NIMyc*表达水平开始恢复，分别是Control组 ($F=3.367$, $df=4$, $P<0.05$)、ds*GFP*组 ($F=0.832$, $df=4$, $P<0.05$) 的64.34%和66.14%。从以上结果可以得出，注射 *NIMyc*的dsRNA可以在48 h后就可以达到显著的水平，因此可以认为该dsRNA片段可以成功的在褐飞虱体内诱导靶基因沉默。

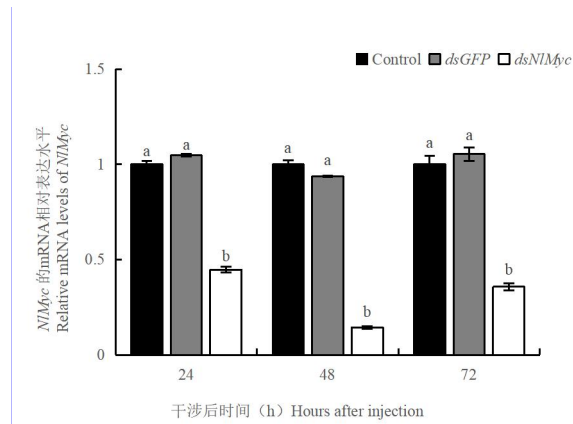


图5 注射 dsRNA 对褐飞虱 *NIMyc* 基因表达水平的影响

Fig.5 Effects of dsRNA injection on the expression level of *NIMyc* in brown planthopper

2.5 沉默 *NIMyc* 对褐飞虱取食行为的影响

上述实验的结果预示*NIMyc*与褐飞虱取食行为之间存在关联, 为了进一步验证这种相关性, 将褐飞虱设置成3个实验组: Control组、dsGFP组、ds*NIMyc*组。试验结果显示, ds*NIMyc*组相比于Control组和dsGFP组, 取食孔的分布更密集。统计不同实验组水稻茎秆上的取食孔数量发现, ds*NIMyc*组在水稻上的取食孔数量最多平均为 28.9 ± 8.5 个, 而Control组 ($F=2.79$, $df=18$, $P<0.05$) 和dsGFP组 ($F=0.187$, $df=18$, $P<0.05$) 的取食孔数量则显著较少, 分别为 13.5 ± 4.3 个和 16.2 ± 8.4 个。这表明, *NIMyc*基因被干扰后褐飞虱出现了明显的取食障碍, 其取食能力受到了抑制, 进一步强调了*NIMyc*基因在调控褐飞虱取食行为方面的重要性。

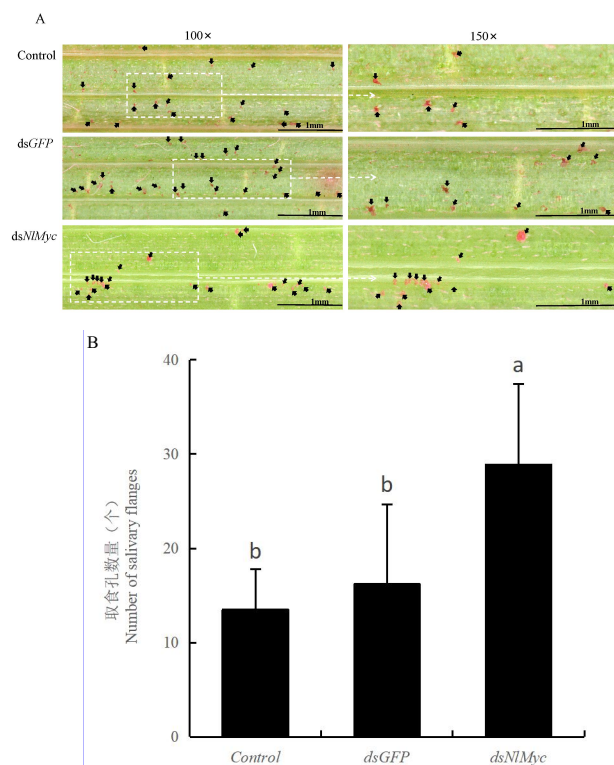


图6 注射 ds*NIMyc* 对褐飞虱取食行为的影响

Fig.6 Effects of ds*NIMyc* injection on the feeding behavior of brown planthopper

注：A，褐飞虱取食孔在水稻茎秆上的图像，在 RH 水稻样品上使用 100 倍和 150 倍的显微镜放大倍数。图中标尺为 1 mm；B，褐飞虱取食孔数量。Note: A, Images of brown planthopper feeding holes on rice stems, captured using a microscope with magnifications of 100x and 150x from Rice samples at RH; B, The quantity of brown planthopper feeding holes.

2.6 沉默 *NIMyc* 对褐飞虱蜜露分泌量和获得性体重的影响

为了更全面地了解褐飞虱在水稻上的适应情况，同样将褐飞虱设置成 3 个实验组：Control 组、*dsGFP* 组、*dsNIMyc* 组，并在 48 h 后对其蜜露量和获得性体重进行了统计。图 7 结果显示，*dsNIMyc* 处理组蜜露量相对 Control 组 ($F=8.722$, $df=18$, $P<0.05$) 和 *dsGFP* 组 ($F=8.494$, $df=18$, $P<0.05$) 均显著降低，分别为 2.44 mg、5.3 mg 和 4.6 mg。图 8 结果显示，*dsNIMyc* 处理组获得性体重相对 Control 组 ($F=0.074$, $df=18$, $P<0.05$) 和 *dsGFP* 组 ($F=0.129$, $df=18$, $P<0.05$) 均显著降低，分别为 0.23 mg、0.49 mg 和 0.47 mg。其中，*dsNIMyc* 组与对照组 (Control、*dsGFP*) 的蜜露分泌量和获得性体重都表现出显著的差异，这说明 *NIMyc* 基因被干扰后能够有效降低褐飞虱的蜜露分泌量和获得性体重，严重影响了褐飞虱的正常取食和生长发育，进而降低了褐飞虱在高麦黄酮抗性水稻上的适应能力和致害性。

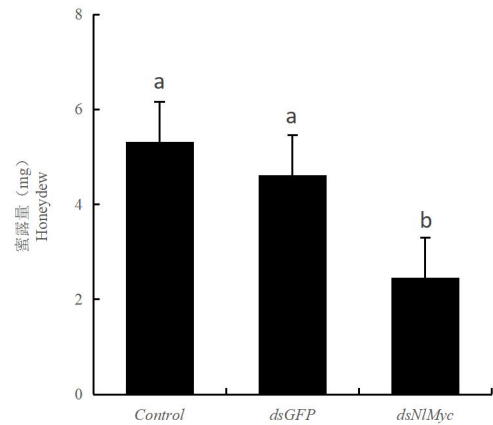


图 7 注射 *dsNIMyc* 对褐飞虱蜜露量的影响

Fig.7 Effects of *dsNIMyc* injection on the honeydew of brown planthopper

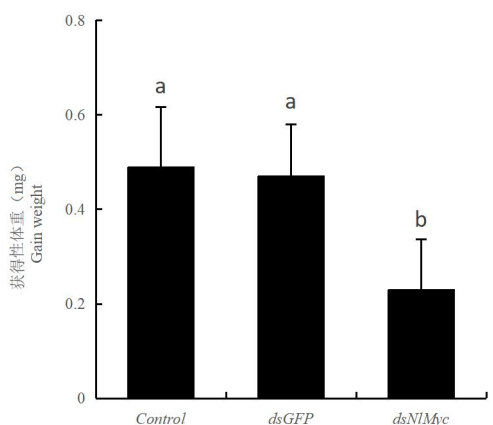


图 8 注射 *dsNIMyc* 对褐飞虱获得性体重的影响

Fig.8 Effects of *dsNIMyc* injection on the gain weight of brown planthopper

3 结论与讨论

为研究褐飞虱转录因子*NIMyc*致害高麦黄酮抗性水稻的机制,本研究克隆得到*NIMyc*基因的全长,并且将氨基酸序列与其他昆虫进行多重比对,进化树分析表明*NIMyc*在蛋白进化上具有较好的保守性。这与李双喜(2013)在果蝇中的研究发现Myc是定位于细胞核的高度保守特性相一致。通过对不同抗性种群的转录情况发现褐飞虱取食抗性水稻后,RH-P种群雌成虫*NIMyc*基因表达量是TN1-P种群中的1.6倍,抗性水稻的褐飞虱需要产生更多的*NIMyc*来抵御抗性水稻的抗性。这一发现与前人在多种水稻品种中发现RH抗虫水稻的麦黄酮的含量较高结果一致(Gong *et al.*, 2022)。因此,*NIMyc*表达量的上调可能是RH-P种群克服抗性水稻的重要基因之一,同时也暗示转录因子*NIMyc*能够调控褐飞虱致害高麦黄酮抗性水稻品种。

通过对*NIMyc*基因在褐飞虱不同发育阶段虫体中、不同组织中抗性种群的转录情况进行鉴定,发现该基因在4龄若虫时期的表达量开始上升,而在雌性成虫1 d达到了最高。这表明*NIMyc*在褐飞虱的生长发育过程中,尤其是在若虫向成虫转化的关键阶段,发挥着重要作用。这一结果与陈桐桐等人(2023)的研究相一致,他们发现卵黄原蛋白基因*NIVgI*在5龄若虫中有少量表达,而在羽化后的第3天,成虫阶段的表达量达到峰值,这一时期恰好是褐飞虱对卵黄蛋白需求最为旺盛的时段。*NIMyc*在唾液腺的表达量较高,而唾液腺是刺吸性害虫取食的关键部位,唾液腺分泌的唾液是植食性昆虫调控植物防御反应、产生寄主适应性的关键(Hogenhout and Bos, 2011),这说明了*NIMyc*在褐飞虱唾液腺发育中的十分重要。

目前有关褐飞虱转录因子致害高麦黄酮抗性水稻的机制还不明确。在褐飞虱中,蜜露量常用来衡量褐飞虱致害能力(李波, 2019),与Control组和ds*GFP*组相比,ds*NIMyc*组的褐飞虱蜜露量分别下降了54%和47%,同样ds*NIMyc*组的获得性体重与Control组和ds*GFP*组相比也显著下降,分别下降了53%和51%。这与纪锐(2013)研究唾液基因*NI1860*致害变异中蜜露量、存活率及单雌产卵量结果一致,对*NIMyc*基因RNAi后,发现褐飞虱在取食行为方面发生了一系列的变化,ds*NIMyc*组的取食孔的数量与对照组相比显著增多,说明褐飞虱的取食功能出现障碍,ds*NIMyc*基因的表达能影响褐飞虱的正常取食和生长发育,进而说明褐飞虱在致害高麦黄酮抗性水稻上发挥着重要作用,这与Shangguan等(2018)发现唾液腺高表达的褐飞虱基因*NIMLP*在被干扰后显著影响褐飞虱取食功能以及索倩等(2023)在棉铃虫*Helicoverpa armigera* (Hübner)中的干扰c-Myc后棉铃虫体重显著下降的结果相似。c-Myc是一种生物体内功能较为广泛的转录因子,在昆虫的代谢和生长发育等生命过程中发挥重要的潜在功能(索倩, 2023)。已有研究在果蝇中发现c-Myc同源基因,研究推测c-Myc通过Wingless (Wg)/Wnt、Decapentaplegic (Dpp)/BMP/TGF- β 、Hpo、dInr/mTOR和EcR等信号通路参与果蝇细胞生长和个体发育等重要生命活动的调控(Gallant, 2013)。也有研究报道棉铃虫c-Myc参与Wnt/ β -catenin信号通路,c-Myc与下游靶基因的启动子结合,激活滞育激素的表达,影响昆虫蜕皮激素表达和蛹的发育(Chen, 2014)。但在褐飞虱生殖代谢与生理调节

中有关c-Myc转录因子通过何种信号途径、如何发挥调控作用尚不清晰。通过KEGG分析发现,褐飞虱转录因子*NIMyc*在MAPK通路中与ERK的关系密切,c-Myc作为一个重要的转录调节因子,可以通过调控下游基因的表达来影响细胞增殖和分化。因此推测在MAPK通路中,c-Myc可以与ERK相互作用,促进ERK的激活并增强其下游效应的表达,形成一个正反馈回路,从而在褐飞虱的发育和致害方面起到关键作用。

本研究证明了*NIMyc*是调控褐飞虱致害高麦黄酮抗性水稻的关键转录因子,这些试验和结果不仅为后续研究其它转录因子在褐飞虱的生长发育和行为功能提供了参考基础,也为褐飞虱可持续防控提供了新的分子靶标,同时也为探索水稻抗虫性与褐飞虱致害性之间的协同进化提供了新的思路。

参考文献 (References)

- Chen SJ, Xu HJ. Research progresses of the regulatory mechanisms of wing polyphenism in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae) [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2024, 67 (4): 589-594. [陈孙杰, 徐海君. 褐飞虱翅型分化调控机制的研究进展 [J]. 昆虫学报, 2024, 67 (4): 589-594]
- Chen TT, Zhang YN, Hao PY, et al. Molecular cloning and expression of vitellogenin gene *NIVg1* of *Nilaparvata lugens* Stål (Homoptera: delphacidae) [J]. *Journal of China University of Metrology*, 2023, 34 (4): 608-617. [陈桐桐, 张旖旎, 郝培应等. 褐飞虱卵黄原蛋白基因 *NIVg1* 的克隆及表达分析 [J]. 中国计量大学学报, 2023, 34 (4): 608-617]
- Chen W, Xu WH. Wnt/ β -catenin signaling regulates *Helicoverpa armigera* pupal development by up-regulating c-Myc and AP-4 [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2014, 53: 44-53.
- Dang VC. MYC on the path to cancer [J]. *Cell*, 2012, 149 (1): 22-35.
- Dong Y, Chen W, Kang K, et al. *FoxO* directly regulates the expression of *TOR/S6K* and vitellogenin to modulate the fecundity of the brown planthopper [J]. *Science China Life Sciences*, 2020, 64 (1): 133-143.
- Du B, Chen RZ, He GC. Exploitation, identification and utilization of brown planthopper resistance genes in rice [J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2018, 30 (10): 1072-1082. [杜波, 陈荣智, 何光存. 抗褐飞虱基因的发掘、鉴定与利用 [J]. 生命科学, 2018, 30 (10): 1072-1082]
- Gallant P. Myc function in *Drosophila* [J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2013, 3 (10): a014324.
- Gong G, Cui BY, Dai ZY, et al. Salivary proteomics response of rice brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Stål) to stimulation of triclin, a key rice insect-resistant compound [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2019, 41 (1): 50-61. [巩固, 崔百元, 戴彰言, 等. 褐飞虱应对水稻抗虫物质麦黄酮刺激的唾液蛋白组学响应 [J]. 环境昆虫学报, 2019, 41 (1): 50-61]
- Gong G, Yuan LY, Li YF, et al. Salivary protein NISP7 of the brown Planthopper functions as an effector for mediating triclin metabolism in rice plants [J]. *Scientific Reports*, 2022, 12 (1): 3205.
- Hogenhout SA, Bos JI. Effector proteins that modulate plant-insect interactions [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2011, 14 (4): 422-428.
- Hsieh AL, Walton ZE, Altman BJ, et al. MYC and metabolism on the path to cancer [J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2015, 43:11-21.
- Ji R. The role of a Salivary Protein NI1860 in the Change in Virulence of the Rice Brown Planthopper, *Nilaparvata lugens*, and its Mechanisms [D]. Hangzhou: Zhejiang University Doctor Thesis, 2013. [纪锐. 唾液蛋白 NI1860 在褐飞虱致害性变异中的作用与机理研究 [D]. 杭州: 浙江大学博士论文, 2013]
- LI BO, He JC, Wan PJ, et al. Studies on the virulence of different geographic populations of *Nilaparvata lugens* (Stål) collected from China [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2019, 41 (1): 9-16. [李波, 何佳春, 万品俊, 等. 我国褐飞虱若干地理种群致害性的研究 [J]. 环境昆虫学报, 2019, 41 (1): 9-16]
- Li HP. Cloning and Functional Characterization of *Chilo Suppressalis* and *Nilaparvata Lugens* Inducible Promoters of rice [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University Doctor Thesis, 2020. [李翰鹏. 二化螟和褐飞虱为害诱导型水稻启动子的克隆及功能分析 [D]. 武汉: 华中农业大学博士论文, 2020]
- Li RM. The Molecular Mechanism of Transcription Factor dMyc Regulating the Homeostasis of Innate Immunity in *Drosophila melanogaster* via the Imd Pathway [D]. Nanjing: Nanjing Normal University Doctor Thesis, 2020. [李瑞敏. 转录因子 dMyc 调控果蝇 Imd 通路先天免疫稳态的分子机制 [D]. 南京: 南京师范大学博士论文, 2020]
- Li SX. Regulation of c-Myc by Proteasome Activator REG γ [D]. Shanghai: East China Normal University Doctor Thesis, 2013. [李双喜. 蛋白

酶体激活因子 REGγ对 c-Myc 蛋白的调控研究 [D]. 上海: 华东师范大学博士论文, 2013]

- Ling B, Dong HX, Zhang MX, *et al.* Potential resistance of tricin in rice against brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Stål) [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27 (4):1300-1307. [凌冰, 董红霞, 张茂新, 等. 水稻麦黄酮对褐飞虱的抗性潜力 [J]. 生态学报, 2007, 27 (4): 1300-1307]
- Liu YQ, Wu H, Chen H, *et al.* A gene cluster encoding lectin receptor kinases confers broad-spectrum and durable insect resistance in rice [J]. *Nature Biotechnology*, 2015, 33 (3): 301-305.
- Pan Y. *Myc* Regulates Male-male Courtship Behavior in *Drosophila* [D]. Shanghai: Tongji University Doctor Thesis, 2022. [潘煜. 果蝇 *Myc* 基因对同性求偶行为的调控作用 [D]. 上海: 同济大学博士论文, 2022]
- Pang R, Li S, Chen W, *et al.* Insecticide resistance reduces the profitability of insect-resistant rice cultivars [J]. *Journal of Advanced Research*, 2024, 60: 1-12.
- Shangguan XX, Zhang J, Liu BF, *et al.* A mucin-like protein of planthopper is required for feeding and induces immunity response in plants [J]. *Plant Physiology*, 2018, 176 (1): 552-565.
- Suo Q, Sun XY, Wang YJ, *et al.* Prokaryotic expression, polyclonal antibody preparation, spatio-tempora expression profile and functional analysis of *c-Myc* of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2023, 39 (7): 2730-2742. [索倩, 孙晓燕, 张莹, 等. 棉铃虫 *c-Myc* 基因的原核表达纯化、抗体制备、时空表达谱测定与功能分析 [J]. 生物工程学报, 2023, 39 (7): 2730-2742]
- Xu JJ, You QD, Guo XK. The development of small-molecule inhibitors targeting MYC [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2022, 57 (6): 1689-1701. [徐俊杰, 尤启冬, 郭小可. 靶向 MYC 小分子抑制剂的研究进展 [J]. 药学报, 2022, 57 (6): 1689-1701]
- Yu HX. Study on the Mechanism Responsible for the Virulence Variation of the Rice Brown Planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål) [D]. Hangzhou: Zhejiang University Doctor Thesis, 2013. [禹海鑫. 褐飞虱致害性变异相关机理研究 [D]. 杭州: 浙江大学博士论文, 2013]
- Yuan LY, Hao YH, Chen QK, *et al.* Pancreatic triglyceride lipase is involved in the virulence of the brown planthopper to rice plants [J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2020, 19 (11): 2758-2766.
- Yuan LY, Li YF, Xiao HX, *et al.* Research progress on mechanism of virulence of the brown planthopper (Hemiptera: Delphacidae) [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2022, 44 (2): 297-304. [袁龙宇, 李燕芳, 肖汉祥, 等. 褐飞虱致害性变异机制研究进展 [J]. 环境昆虫学报, 2022, 44 (2): 297-304]
- Zhang HX, Chen LM, Li XW, *et al.* Research advances for the mechanisms of insect herbivores adapting to host plants by salivary glands [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2024, 46 (1): 13-25. [张海霞, 陈利民, 李晓维, 等. 植食性昆虫利用唾液腺适应寄主植物防御机制研究进展 [J]. 环境昆虫学报, 2024, 46 (1): 13-25]
- Zhang YB, Lou YG. Research progress in chemical interactions between plants and phytophagous insects [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2020, 31 (7): 2151-2160. [张月白, 娄永根. 植物与植食性昆虫化学互作研究进展 [J]. 应用生态学报, 2020, 31 (7): 2151-2160]
- Zhang ZF, Cui BY, Yan SJ, *et al.* Evaluation of tricin, a stylet probing stimulant of brown planthopper, in infested and non-infested rice plants [J]. *Journal of Applied Entomology*, 2017, 141 (5): 393-401.
- Zhang ZF, Cui BY, Zhang Y, *et al.* Electrical penetration graphs indicate that tricin is a key secondary metabolite of rice inhibiting the phloem feeding of brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Stål) [J]. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 2015, 156 (1): 14-27.