

七星瓢虫保幼激素环氧水解酶基因克隆及表达分析

刘梦姚^{1,2}, 王娟², 王曼姿^{1,2}, 高飞², 张洪志²,
李玉艳^{2*}, 臧连生¹, 张礼生^{2*}

(1. 吉林农业大学, 长春 130118; 2. 中国农业科学院植物保护研究所, 农业农村部作物有害生物
综合治理重点实验室, 中美合作生物防治实验室, 北京 100193)

摘要 保幼激素(juvenile hormone, JH)可以调控昆虫滞育,保幼激素环氧水解酶(juvenile hormone epoxide hydrolase, JHEH)是调节保幼激素代谢的关键酶之一。为探索 JHEH 在七星瓢虫 *Coccinella septempunctata* L. 滞育中的调控作用,利用 RT-PCR 和 RACE 技术克隆获得七星瓢虫 JHEH 全长基因,命名为 *Csjheh* (GenBank 登录号: MH932586),该基因 cDNA 全长 2 077 bp,开放阅读框(ORF)1 380 bp,编码 459 个氨基酸,预测蛋白质分子量为 51.39 kD,理论等电点(pI)为 8.79。疏水性分析结果显示该基因具有典型环氧水解酶的 N 末端疏水结构。氨基酸序列比对结果表明,*Csjheh* 与中欧山松大小蠹、赤拟谷盗、丽蝇蛹集金小蜂、内华达古白蚁保幼激素环氧水解酶同源性达到 64.24%。利用实时荧光定量 PCR 技术研究其时空表达模式,结果表明 *Csjheh* 基因在七星瓢虫成虫初羽化阶段表达量较高,滞育诱导条件下表达量呈先下降后上升的趋势,滞育 60 d 时与初羽化阶段接近。本研究结果对揭示 JHEH 参与 JH 的调控作用,进而调控昆虫滞育提供了理论参考。

关键词 七星瓢虫; 保幼激素环氧水解酶; 基因克隆; 时空表达

中图分类号: S 476.2 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2018496

Cloning and expression analysis of juvenile hormone epoxide hydrolase in *Coccinella septempunctata*

LIU Mengyao^{1,2}, WANG Juan², WANG Manzi^{1,2}, GAO Fei², ZHANG Hongzhi²,
LI Yuyan², ZANG Liansheng¹, ZHANG Lisheng²

(1. Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2. Key Laboratory of Integrated Pest Management in Crops, Ministry of Agriculture and Rural Areas, Sino-American Biological Control Laboratory, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract Juvenile hormone epoxide hydrolase (JHEH) is one of the most important enzymes in regulating juvenile hormone (JH) metabolism, which is of great significance in insect diapause regulation. In order to explore the regulation of JHEH in diapause of *Coccinella septempunctata* L., the full-length cDNA of the gene encoding JHEH in *C. septempunctata* (*Csjheh*) was cloned by using RT-PCR and RACE. The full-length sequence was 2 077 bp, which consisted of a 1 380 bp open reading frame (ORF) encoding 459 amino acid residues with a molecular mass of 51.39 kD and a theoretical isoelectric point of 8.79. The results of amino acid sequence alignment showed that *Csjheh* was homologous to those of *Dendroctonus ponderosae*, *Tribolium castaneum*, *Nasonia vitripennis* and *Zootermopsis nevadensis*, with an amino acid identity of 64.24%. The expression profile of *Csjheh* was detected by using real-time fluorescent quantitative PCR at different stages of diapause. The results showed that the expression level of *Csjheh* gene was the highest in the initial emergence stage of the adult ladybug, and then it decreased firstly but increased in the later time of diapause, at which stage the expression level was close to that at the initial emergence stage. The results of this study have important implications for revealing the role of JHEH in the regulation of JH, which plays an important role in the regulation of diapause.

Key words *Coccinella septempunctata*; juvenile hormone epoxide hydrolase; gene cloning; expression

收稿日期: 2018-12-01

修订日期: 2019-01-18

基金项目: 国家重点研发计划 (2017YFD0201000); 国家重点研发计划—政府间国际科技创新合作重点专项 (2017YFE0104900)

* 通信作者 E-mail: 李玉艳 lyy129@126.com; 张礼生 zhangleesheng@163.com

七星瓢虫 *Coccinella septempunctata* L. 是一种优良的捕食性天敌昆虫,产卵量大,定殖性强,存活时间长,寄主范围广,成虫和幼虫均能持续控制蔬菜、果树、作物上的蚜虫、粉虱、蓟马、介壳虫等害虫为害^[1-2],在国内外已被广泛应用,并实现其大规模商品化扩繁^[3]。该虫属于完全变态昆虫,经过卵、幼虫、蛹、成虫 4 个阶段,以成虫进行滞育越冬或越夏^[4-6]。掌握其滞育调控技术,可以延长其产品货架期,促进天敌昆虫产业发展,具有重要的生产实践意义。

保幼激素(juvenile hormone, JH)是一种倍半萜烯类亲脂性激素,参与昆虫的滞育调控^[7]。该激素由咽侧体合成并释放到血淋巴,通过保幼激素的合成和降解代谢共同维持其滴度平衡^[8-9]。大量研究证明昆虫滞育期间保幼激素滴度维持在很低水平,解除滞育后又恢复正常水平。在滞育诱导期滴加外源保幼激素会延缓昆虫进入滞育的时间,已经进入滞育的昆虫滴加外源保幼激素会暂时解除滞育^[10-12]。滞育的蓼蓝齿胫叶甲 *Gastrophysa atrofasciata* 雄虫被点滴保幼激素后,滞育解除,性腺发育和交配行为恢复^[13];给处于滞育的黄钩蛱蝶 *Polygonia c-aureum* 滴加外源保幼激素类似物甲氧普林可打破滞育^[14]。保幼激素的代谢由保幼激素环氧水解酶(juvenile hormone epoxide hydrolase, JHEH)、保幼激素酯酶(juvenile hormone esterase, JHE)和保幼激素二醇激酶(juvenile hormone diol kinase, JHDK)等共同催化完成,其中 JHEH 降解 JH 和保幼激素酸(juvenile hormone acid, JHa),降解产物分别为保幼激素二醇(juvenile hormone diol, JHD)和保幼激素酸二醇(juvenile hormone acid diol, JHAD)^[15]。截至目前,针对保幼激素降解代谢的研究主要集中于保幼激素酯酶的作用机制^[16],研究显示 JHEH 对保幼激素参与的代谢调控通路也起到重要作用^[17]。本研究以七星瓢虫为研究对象,利用 RACE 技术对保幼激素环氧水解酶 JHEH 进行全长基因克隆,对该基因序列进行生物信息学分析,运用实时荧光定量 PCR 技术研究了该基因在七星瓢虫滞育各阶段的转录水平,为进一步探究 JHEH 调控 JH 的作用机制进而调控滞育提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

供试七星瓢虫为中国农业科学院植物保护研究

所天敌昆虫组饲养种群,饲养方法参见王伟等^[6]。饲养条件为:温度(24 ± 1)℃、相对湿度 70% ± 10%、光周期 L//D=16 h//8 h,饲养至产卵,为正常发育组。将正常发育下初羽化的成虫雌、雄配对,转移至滞育诱导条件下饲养,诱导条件为温度(18 ± 1)℃、光周期 L//D=10 h//14 h,相对湿度 70% ± 10%,饲养 40 d 未产卵为滞育组,判断方法参考王伟等^[6, 18]。将滞育组转移至正常条件饲养,第一次产卵后为滞育解除组。

1.2 主要试剂

RNA 提取试剂 RNAiso Plus、RACE 试剂盒 SMARTer[®] RACE 5'/3'Kit Clontech、反转录试剂盒及荧光定量试剂盒均购自 TaKaRa 公司。cDNA 第一链合成、PCR 扩增试剂盒购于北京擎科新业生物技术有限公司。其余试剂均为国产分析纯。

1.3 RNA 提取与 cDNA 第一链合成

取滞育雌虫于液氮预冷的研钵中,加入液氮研磨成粉末,转入 1.5 mL RNase-free 离心管中,根据 RNAiso Plus 试剂盒说明书提取总 RNA。在微量分光光度计(NanoPhotometer P-class, Implen)上检测 RNA 浓度和纯度,1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测完整性。按照反转录试剂盒操作说明合成 cDNA 模板,3'和 5'第一链 cDNA 按照 RACE 试剂盒说明书合成,置于-80℃冰箱保存。

1.4 *jheh* 基因克隆及序列分析

1.4.1 引物设计与合成

基于本实验室前期测得转录组数据,鉴定得到 *jheh* 基因序列,利用 Primer 5.0 软件设计一对 RACE 特异性引物及荧光定量引物(表 1)。所有引物均由北京擎科新业生物技术公司合成。

1.4.2 中间片段扩增

以滞育七星瓢虫 cDNA 为模板,利用 *jheh*-f1、*jheh*-r1、*jheh*-f2、*jheh*-r2 两对引物进行 PCR 中间序列扩增。反应体系(50 μ L): PCR Mix 45 μ L,引物各 2 μ L,cDNA 1 μ L,轻微振荡混匀,瞬时离心,进行 PCR 反应。反应程序:98℃ 变性 2 min;98℃ 10 s,56℃ 10 s,72℃ 15 s,30 个循环;72℃,5 min;产物置于 4℃ 保存。对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,对目的条带进行回收纯化。将回收产物与克隆载体连接,转化至大肠杆菌 DH5 α ,氨苄青霉素筛选后挑选阳性克隆子进行扩大培养送至北京擎科生物公司测序。

表 1 本试验所用引物
Table 1 Primers used in the test

引物名称 Primer	引物序列 Primer sequence	引物用途 Use of primer
jheh-f1	GTGCTAAACATACTTACGGTATTTTCATC	中间片段扩增
jheh-r1	CCAGCCGTGGATGAGCAA	
jheh-f2	TGATTTTGAGTCTGGGTATTTACA	
jheh-r2	ATGACGTTATTGTACCAGTTACCCA	
jheh-5'	GATTACGCCAAGCTTCAAGTGTCTTCTAATTTTCGGGATAGGTGGA	RACE
jheh-3'	GATTACGCCAAGCTTACCTACCGCCTGTTGGAGGATAA	
qjhehf	CTTTCAAAATCGCCGTTC	荧光定量 PCR
qjhehr	AAGTCCAGCACTGATTTTCGTG	
18Sf	GGACCTCGATTCTATTTTGTTTGG	
18Sr	TCGCTTCTGTCCGTCTTGC	
Actinf	GATTTCGCCATCCAGGACATCTC	
Actinr	TCCTTGCTCAGCTTGTGTAGTC	

1.4.3 3'和5'RACE PCR

以3'和5'第一链 cDNA 为模板,按照 SMARTer® RACE 5'/3'Kit Clontech 试剂盒说明书进行 RACE 全长扩增。反应体系(50 μL):15.5 μL PCR-Grade H₂O, 25.0 μL 2×SeqAmp Buffer,1.0 μL SeqAmp DNA Polymerase,混匀后加入 2.5 μL 模板,5.0 μL 10×UPM,1.0 μL jheh-5'/jheh-3'。反应程序:94℃ 30 s,72℃ 3 min,5 个循环;94℃ 30 s,70℃ 30 s,72℃ 3 min,5 个循环;94℃ 30 s,68℃ 30 s,72℃ 3 min,25 个循环。将 3'/5'RACE PCR 产物回收,连接,转化,测序。

1.4.4 序列拼接与信息分析

将所得序列利用 DNAMAN 和 EditSeq 进行 DNA 序列分析并拼接获得七星瓢虫 *jheh* 基因 cDNA 全长序列。利用 ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.gov/orffinder/>)查找完整的开放阅读框并预测氨基酸序列。利用 NCBI BLAST 软件进行序列比对以及同源序列搜索,MEGA 6.0 进行系统进化树构建。利用 PredictProtein (<https://www.predictprotein.org/>)在线分析和 ExPASy Proteomics Server 在线软件 ProtParam tool (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>)、Prot Scale 在线软件 (<http://expasy.org/tools/protscale.html>)、SignalP 4.0 Server 在线分析 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)、TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)进行跨膜结构的预测等预测蛋白的二级和三级结构、保守结构域、亲疏水区等。

1.5 *jheh* 基因时间表达分析

应用染料法在 ABI 7500 实时荧光定量仪上测定 *Csjheh* 基因表达量。收集不同发育时期(初羽

化、滞育 10 d、滞育 20 d、滞育 30 d、滞育 60 d、正常发育组、滞育解除组)的七星瓢虫雌虫,取样,提取总 RNA。根据 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)试剂盒说明书合成 cDNA,以 cDNA 为模板进行 *jheh* 基因时间表达分析。反应体系(20 μL):SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (2×) 10 μL,上下游引物各 0.8 μL,ROX Reference Dye II (50×) 0.4 μL,cDNA 2 μL,超纯水 6 μL。振荡混匀,离心,进行 RT-qPCR 反应。反应条件:95℃ 30 s;95℃ 5 s,60℃ 34 s,40 个循环;熔解曲线条件:95℃ 15 s,60℃ 1 min,95℃ 15 s。试验采用 3 个生物学重复,4 个技术重复。基因的相对表达量计算采用 2^{-ΔΔC_t}法。

2 结果与分析

2.1 七星瓢虫保幼激素环氧水解酶基因克隆与序列分析

基于七星瓢虫转录组数据,以滞育七星瓢虫 cDNA 作为模板,克隆得到七星瓢虫 *jheh* 基因,命名为 *Csjheh* (GenBank 登录号:MH932586)。序列分析表明,*Csjheh* 基因 cDNA 全长 2 077 bp,开放阅读框(ORF)1 380 bp,编码 459 个氨基酸,5'非编码区 105 bp,3'非编码区 592 bp(图 1)。预测蛋白的分子量为 51.39 kD,理论等电点为 8.79,存在一个跨膜结构,位于第 7—29 个氨基酸之间(图 2),属于跨膜蛋白。在该蛋白的第 53—163 个氨基酸之间存在 EHN 环氧水解酶超家族结构域,具备环氧水解酶的典型结构特征。以保幼激素环氧水解酶(SMTL ID: 4qla.1.A)为模型预测 *Csjheh* 的 3D 结构为同源 JHEH 序列,序列相似度约为 49.65%(图 3)。

1 ATGGGTAATGGTACAGTAATTATTCTTTGCTAGTATTAACAGTGGGTGTTCCCTCTCGGT
1 M G N G T V I I S L L V L T V G V P L G G
61 TTGGTGAAAATTTCTGGTATATTCAACATTCCACCTATCCGAAATTAGAAGACACTTGG
21 L V K I S G I F N I P P I P K L E D T W
121 TGGGGCCAGGGGGCAAAGGTGTAGACGATGTACAGATAAGACCTTTCAAATCGCCGTT
41 W G P G G K G V D D V T I R P F K I A V
181 CC'TGA'FCAGG'TCA'IT'CTAGAT'CT'CAAAAACCAGGCT'GAAAAACACCAGAACCCGA'IT'CCA
61 P D Q V I L D L K T R L K N T R T P I P
241 CCTTTGGAAGGTGCTAAACATACTTACGGTATTTTCATCAACCGTCACGAAATCAGTGCTG
81 P L E G A K H T Y G I S S T V T K S V L
301 CACTTTTGGCTGAACAACCTACGATTGGAACAAGAGCCAGCAATTCCTCAACCAATACCCA
101 D F W L N K Y D W K K R E Q F L N Q Y P
361 CAGTTCAAGACCAAGATACAAGGCCCTTGACATCCATTTCTGCACGTGAAACCGAAGAAG
121 Q F K T K I Q G L D I H F L H V K F K K
421 ATTGAGGGACTCAGAGTTTTTCCGCTATTGCTCATCCACGGCTGGCCCGGCTCGGTCCAGG
141 I E G L R V F P L L I H G W P G S V R
481 GAATTTTATGAAATCATCCCCCTTCTGACAAACACCTCAAAGGATCGTCAATTCGTCTAT
161 E F Y E I I P L L T T P Q K D R Q F V Y
541 GAAGTTATCGTCCCTTCATTACCAAGGTTATGGTTTTTCCGAGGCAGCAGTACGCCAGGC
181 E V I V P S L P G Y G F S E A A V R P G
601 CTAGGAGCTGCACAAATGGCCGTTATATTCAAGAAGCTTGATGAACAGACTGAACATACAG
201 L G A A Q M A V I F K N L M N R L N I Q
661 AAATACTACGTTCAAGGGGGGGATTGGGGTTCGATGATTGTGAACATATATGGCTGTTTTTA
221 K Y Y V Q G G D W G S M I V N Y M A V L
721 TACCCTCAACAAGTTCATCGGAATGCACCTCGAAGTTATGCTTCAGCGATATGCCATAACG
241 Y P Q V I G M I S N L C F S D M P I T
781 AATCTGAAGAAGATCGTTTACGGTTTGAAGCCGTCAGTATCGTGGACAAAAGTATGAA
261 N L K K I V Y G L K P S L I V D K K Y E
841 CACCTTGTATCCGATCTCGACCGTCTCGCCAATTTGATTGTGAGCTGCGGTATTTA
281 H L V Y P M S S V L A N L I L E S G Y L
901 CATCTACAGGCTACCAAACAGATACTGTAGGTACAGCCTTAAACGACTCCCCAGTAGGT
301 H L Q A T K P D T V G T A L A D S P V G
961 CTGGCTGCTTATATTCTGGAALLAGTTTATAAATTGGACAAATCCAGTTTTAAAGAACGC
321 L A A Y I L E K F I T W T N P S F K E R
1021 GAGGACGGGGTTTGACTGAAAAATATAAATGGAGGATCTTCTGGATAATGTATGATA
341 E D G G L T E K Y K M E D L L D N V M I
1081 TATTGGGTAACTGGTACAATAACGTCATCCATGAGGTTATACTCAGAATCTTTCAATAGT
361 Y W V T G T I T S S M R L Y S E S F N S
1141 GCCCACTACAGTTTGCAGCTCTCTAAAATACCTGTGTACGTACCATCTGGATGTTTCGAGA
381 A H Y S L Q L S K I P V S P S G C S R
1201 TTTGCACACGACATAGTGTACGCACCTACCGCCTGTTGGAGGATAAATTTCCCAATTTA
401 F A H D I V Y A P T A L L E D K F P N L
1261 TTACACGTGACTGATCAGCAGCAGGGGCATTTTCGAGCTTTTGAAGTACCAGAAGTACTA
421 L I I V T D I I D A G I I F A A F E V P E V L
1321 GCCAAGGATATTACGATTTTCACTGAAAAAGTTCTAACAGCAGCATCGCCGAAAAATAA
441 A K D I Y D F T E K V L T A A S P K K *

图 1 *Csjheh* 基因编码区序列及对应的氨基酸序列

Fig. 1 ORF region of *Csjheh* and the deduced amino acid residue sequence

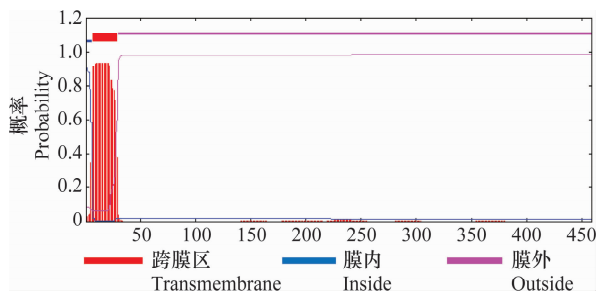


图 2 七星瓢虫 *Csjheh* 蛋白跨膜结构域

Fig. 2 Analysis of the position of possible transmembrane helices of *Csjheh* in *Coccinella septempunctata*

2.2 *Csjheh* 基因的同源性分析及系统进化树的构建

将 *Csjheh* 基因的氨基酸序列在 NCBI 中 BLAST 搜索比对发现, *Csjheh* 基因在不同物种中的同源性较高。从中选取 4 种不同昆虫的 JHEH 氨基酸序列进行同源性分析, 结果显示相似性达到 64.24%,

保守性较高(图 4)。从 NCBI 数据库选取 20 种同源性较高的不同物种, 利用 MEGA 4.0 软件, 通过 neighbor-joining(N-J)方法构建 JHEH 氨基酸序列进化树。从进化树中可以看出, *Csjheh* 蛋白序列与鞘翅目、膜翅目等亲缘性具有较高一致性, 其中与中欧山松大小蠹 *Dendroctonus ponderosae* (登录号 XP_019766997.1) 亲缘关系最近, 聚为一支, 其余以目为类群, 同目物种亲缘关系较近, 同源性较高(图 5)。

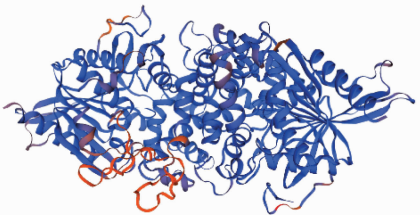


图 3 七星瓢虫 *Csjheh* 蛋白的预测三维结构图

Fig. 3 Predicted three-dimensional structure of *Csjheh*

XP_019766997.1	MGCKCKLTAVLIL.IGAAYVYIKLRAP..LEVPIIEBKWAAAPPREEDPTVRPKINVPKEVIADLKRRLDITALPQCPPLBGNQNGYGINELLGNIV	97
EFA00568.1	MGGCVIVITAIIV.IFILKFVHKIKRFFKVTVEYLEETWGPGRDTEEDDSIQPTTKVPDEVITDLQQRILQANRPLTPPLEGVQHGYGINTNLLKKIV	99
NP_001128399.1	WTYGSSTYLKTVL	14
XP_021936872.1	MGLLRKLVFVTVT.VAAGVIGSIFYSLNQVPLPELGNTWVGAGEPRKIDESIRNFKINISDDIHLQIRLDHSHLTPPLEGKNTNFYQENTDYLKKVV	99
CSJHEH	MGNVTIISLLVLTGVPLGLVLRISGIFNIPPIKLEDTWGGPGKGVDDVTIRPEKIAVFDQVLDLKTRLNKTRTPIPLEGAKHTYGSSTVTKSVL	100
Consensus	yg	
XP_019766997.1	DHFKTKYDMNKQDEELNQFOFOFKKICGLNIHFIAKPKT.VPGQVEVPLLLIHGWPGSVREFEYELIPLITTPQKGRNFVSEVITAPSLPGYGFSDAAVR	196
EFA00568.1	DFWRNEYNMKERETFLNKLFOFTVSVQGLRLHFIHWKPEK.T.DGLKVPPLMLHGWPGSVREFEYELIPLITKQPGRDFVSEVITAPSLPGYGFSEAAVR	197
NP_001128399.1	NHMRKKYNMSQRQALLNKYFOFKTKIQLDHFHYHWKPVQPKDRKVRVPLLLMLHGWPGSVREFEYELIPLITAKPDENFVEELIPLSLPGYGFSGAAAR	114
XP_021936872.1	EFKTKYNMRERQVFLNSFEHFKTYVDGLDHFHFWKPKQ.VEKNTRVPLPLLVHGWPGSVREFEYELIPLITKRRKNVDFVEELIPLSLPGYGFSEGSSK	198
CSJHEH	DFLNKYDMKKREQLNQYFOFKTKIQLDHFHFWKPKK.I.EGLRVPLLLIHGWPGSVREFEYELIPLITQKDRCFVSEVITAPSLPGYGFSEAAVR	198
Consensus	w y w in p f gl h h kp v pll hgwpgs ef ip lt fv e i pslpgygfs	
XP_019766997.1	PGLNQAOAQLFNKIMRRLKFRDREYAGGGDWGSAVSHDMAILYFBNVIALHNFORA.YEITNMKAYVGMYPSSLFFSEKEAAKTYPLSDAFNFMILESG	295
EFA00568.1	PGLCAIQMAVLFKNFMNRRLGQFKYVIOGGDWGAVITQHMAITLYPEKILGLSHSNMCEINTLKSQVLFISFYFPLIVKQEHVKNVPLSSKFATLILETG	297
NP_001128399.1	PGLGPAQMAVVFKNIMORLGEQFYIOGGDWGSLITANMAVLYEKKVITHELMCEIESHKAHFLSLVGAYIEBSLVVSEHYSKMPLSYHFGRLILETG	214
XP_021936872.1	PGLGAVOMAVVMKNIMRRLGQFKFYIOGGDWGALIVSHMTEEBERILGVSHSNMCEVNSISANVRILGVSEFWELIVDEAHVKMPLPKGHYAHLLEBMG	298
CSJHEH	PGLGAAQMAVIFKNIMNRLNIQKYVIOGGDWGSMIVNYMAVLYECCQVIGMSNDCSMDPITNLKTIYVGLPESLIVDKKYEHLVPMSSVLANIILESG	298
Consensus	pgl q a m r y qggdwg m l p h n cf p l yp e g	
XP_019766997.1	YLHLQATKPTVGVVALRESFVGLAAYILEKFTITWTDQWKDLPDGGITOKITYDKRLDNVMYIYVWTSITTSARLYABANKSKYSRSLPLDKPIINVFAGC	395
EFA00568.1	YMHQATKPTVGVVALNDSPIGLAAYILEKFTITWNPANRDLDEGGITTKKSYTSLDNVMYIYVWTSITTSARLYABANKSKYSRSLPLDKPIINVFAGC	397
NP_001128399.1	YLHLQATKPTVGAALTDSPAGLAAYILEKFTITWNPDYFRDGGILEKFTITWTDQWKDLPDGGITOKITYDKRLDNVMYIYVWTSITTSARLYABANKSKYSRSLPLDKPIINVFAGC	314
XP_021936872.1	YMHQATKPTVGVVALRESFVGLAAYILEKFTITWTDKDWRSIPDGGITRKYKLTDLDNVMYIYVWTSITTSARLYABANKSKYSRSLPLDKPIINVFAGC	398
CSJHEH	YLHLQATKPTVGVVALNDSFVGLAAYILEKFTITWNTSFKEREDGGITPKMKMEDLDNVMYIYVWTSITTSARLYABANKSKYSRSLPLDKPIINVFAGC	398
Consensus	y h qatkp tvg al sp glaay ekf twt dggil k lldn m ywvt it s rly e l p p c	
XP_019766997.1	IRSNELLYSSEVLLRQHFNLIHLSD.AEGGHFAAEVFEVLAQDIIEFVGKVRTLPKPKNSKEL.....	460
EFA00568.1	ARGSYDLAYSEFVAVIKKYYKNIVYED.YDAGHFAAEFEVLAQDIIEFVGKVRTLPKPKNSKEL.....	461
NP_001128399.1	ANSPHEILAYRSETIILKRFNTLVQFTHPPRGCHFAAEFEVLAQDIIEFVGKVRTLPKPKNSKEL.....	389
XP_021936872.1	ANSPHEILAYRSETIILKRFNTLVQFTHPPRGCHFAAEFEVLAQDIIEFVGKVRTLPKPKNSKEL.....	463
CSJHEH	SRBAHDIVVAPTALLEKFPNLIHLVTD.HDAGHFAAEFEVLAQDIIEFVGKVRTLPKPKNSKEL.....	459
Consensus	f y ghfaa e p la d	
XP_019766997.1: 中欧山松大小蠹; EFA00568.1: 赤拟谷盗; NP_001128399.1: 丽蝇蛹集金小蜂; XP_021936872.1: 内华达古白蚁		
XP_019766997.1: <i>Dendroctonus ponderosae</i> ; EFA00568.1: <i>Tribolium castaneum</i> NP_001128399.1: <i>Nasonia vitripennis</i> ; XP_021936872.1: <i>Zootermopsis nevadensis</i>		

图 4 七星瓢虫 *Csjheh* 及其他昆虫同源序列的多序列比对

Fig. 4 Multiple alignment of *Csjheh* in *Coccinella septempunctata* and its homologues from other insects

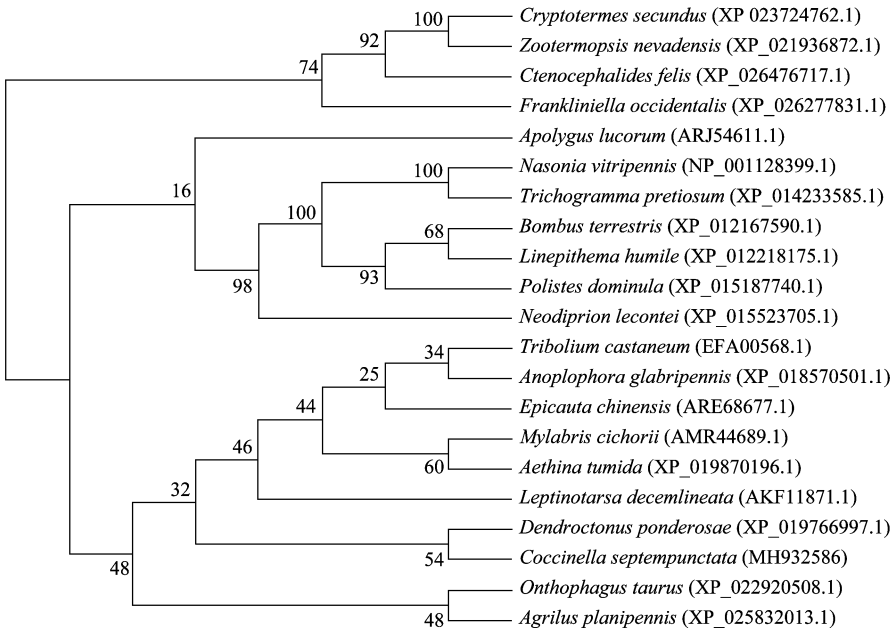


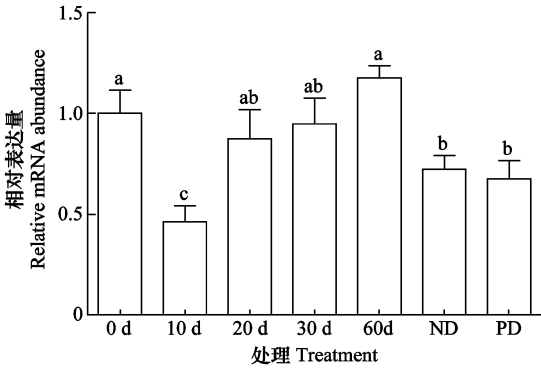
图 5 七星瓢虫 *Csjheh* 及其他昆虫同源序列的系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of *Csjheh* in *Coccinella septempunctata* and its homologues from other insects

2.3 *Csjheh* 基因的时空表达分析

采用实时荧光定量 PCR 的方法,以 18S rRNA 和 *actin* 为双内参,根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对 *Csjheh* 基因在滞育不同阶段的表达量进行检测。结果如图 6 所示,

Csjheh 基因在七星瓢虫滞育各阶段均有表达,初羽化时期表达量较高,滞育 10 d 时显著降低,随着滞育时间增加,表达量逐渐增加,滞育 60 d 时表达量达最高。正常发育和滞育解除后表达量没有显著差异。



图中柱上(平均数±标准误)相同小写字母表示经Tukey's多重比较后差异不显著(ANOVA, $P < 0.05$)。0 d: 初羽化; 10 d: 滞育诱导10 d; 20 d: 滞育诱导20 d; 30 d: 滞育诱导30 d; 60 d: 滞育诱导60 d; ND: 正常发育期; PD: 滞育解除
The same lowercase letters above the bars (means±SE) indicate no significant difference at $P < 0.05$ (ANOVA). 0 d: Newly emerged; 10 d: Diapause induction for 10 days; 20 d: Diapause induction for 20 days; 30 d: Diapause induction for 30 days; 60 d: Diapause induction for 60 days; ND: Normal development; PD: Post diapause

图 6 不同处理条件下 *Csjsheh* 基因 mRNA 的相对表达水平

Fig. 6 Expression levels of *Csjsheh* under different treatments based on qPCR

3 讨论

保幼激素在昆虫生长发育中具有重要作用,保幼激素环氧水解酶是保幼激素的分解酶之一,是调控昆虫体内保幼激素滴度的重要酶。保幼激素环氧水解酶基因首先在烟草天蛾中被克隆出来^[19-20],迄今为止,已经在家蚕 *Bombyx mori*、意大利蜜蜂 *Apis mellifera*、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 等多种昆虫中进行了研究报道,证明保幼激素环氧水解酶的典型结构特征是在 N 末端具有疏水信号肽结构^[21-24]。保守区域与其他昆虫一样具有真核生物环氧水解酶的典型结构特征,对近源物种进行同源比较,构建进化树分析表明,七星瓢虫保幼激素环氧水解酶 *Csjsheh* 与同属鞘翅目的中欧山松大小蠹保幼激素环氧水解酶亲缘关系最近。

滞育是昆虫适应不良环境的一种生存策略,保幼激素可以调控昆虫的滞育^[25]。作为保幼激素的关键分解酶,保幼激素环氧水解酶在调节保幼激素滴度方面起到重要作用^[26]。前人研究证明保幼激素具有保持幼虫形态与促进成虫生殖系统发育的作用,滞育阶段保幼激素滴度极低,抑制生殖系统发育是导致成虫生殖滞育的重要原因^[27-28]。本研究通过实时荧光定量 PCR 检测发现 *Csjsheh* 基因在七星瓢虫滞育的各个阶段均存在特异性表达。其中初羽化

成虫体内表达量较高,滞育条件下降低,随着滞育诱导时间的增加,表达量又逐渐增加,在滞育 60 d 时达到与初羽化接近的程度。初羽化成虫体内具有大量的保幼激素环氧水解酶 *Csjsheh*,调控保幼激素滴度降低至正常浓度。在滞育诱导条件下,*Csjsheh* 表达量逐渐增加,调控保幼激素滴度降低至极低浓度,七星瓢虫成虫进入滞育状态。推测保幼激素环氧水解酶 *Csjsheh* 在七星瓢虫滞育过程中通过调节保幼激素滴度从而参与调控其滞育过程。

本研究通过克隆得到保幼激素环氧水解酶 cDNA 全长,分析序列特征,并从 mRNA 水平检测了该基因在七星瓢虫雌虫体内滞育不同阶段的时间表达模式。该研究为进一步利用 RNA 干扰技术研究该基因的功能奠定了基础,为更好的应用七星瓢虫防治害虫提供了理论依据。

参考文献

- [1] HODEK I, MICHAUD J P, et al. Why is *Coccinella septempunctata* so successful? (A point-of-view) [J]. European Journal of Entomology, 2008, 105(1): 1-12.
- [2] HONĚK A. The distribution of overwintered *Coccinella septempunctata* L. (Col., Coccinellidae) adults in agricultural crops [J]. Journal of Applied Entomology, 2010, 94(1/5): 311-319.
- [3] DIXON A F G. Insect predator-prey dynamics: ladybird beetles and biological control [J]. Quarterly Review of Biology, 2000, 82(3): 244.
- [4] FAROOQ M, SHAKEEL M, IFTIKHAR A, et al. Age-stage, two-sex life tables of the lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae) feeding on different aphid species [J]. Journal of Economic Entomology, 2018, 111(2): 575-585.
- [5] HODEK I, VAN EMDEN H F, HONĚK A. Ecology and behaviour of the ladybird beetles (Coccinellidae) [J]. Physiology & Behavior, 2012, 8(6): 1035-1037.
- [6] 王伟,张礼生,陈红印,等. 北京地区七星瓢虫滞育诱导的温光效应[J]. 中国生物防治学报, 2013, 29(1): 24-30.
- [7] DENLINGER D L. Regulation of diapause [J]. Annual Review of Entomology, 2002, 47: 93-122.
- [8] 欧阳迎春,李胜. 保幼激素及其代谢产物的 HPLC 分离方法的改进和应用[J]. 昆虫学报, 2003, 46(3): 282-287.
- [9] GILBERT L I A. GRANGER N, ROE R M. The juvenile hormones: historical facts and speculations on future research directions [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2000, 30(8): 617-644.
- [10] DENLINGER D L, YOCUM G D, RINEHART J P. Hormonal control of diapause-10 [J]. Insect Endocrinology, 2012, 8: 430-463.
- [11] KOPPER B J, SHU S, CHARLTON R E, et al. Evidence for reproductive diapause in the fritillary *Speyeria idalia* (Lepi-

- doptera: Nymphalidae) [J]. Annals of the Entomological Society of America, 2001, 94(3): 427–432.
- [12] SUANG S, MANABOON M, SINGTRIPOP T, et al. Larval diapause termination in the bamboo borer, *Omphisa fuscidentalis* [J/OL]. PLoS ONE, 2017, 12(4): e174919.
- [13] OJIMA N, ISHIGURO S, AN Y, et al. Male reproductive maturity and diapause termination in the leaf beetle *Gastrophysa atrocyanea* [J]. Physiological Entomology, 2015, 40(4): 277–283.
- [14] HIROYOSHI S, REDDY G V P, MITSUHASHI J. Effects of juvenile hormone analogue (methoprene) and 20-hydroxyecdysone on reproduction in *Polygonia c-aureum* (Lepidoptera: Nymphalidae) in relation to adult diapause [J]. Journal of Comparative Physiology A, 2017, 203: 1–13.
- [15] 李胜, 蒋容静, 曹梅讯. 保幼激素的代谢[J]. 昆虫学报, 2004, 47(3): 389–393.
- [16] KAMITA S G, HINTON A C, WHEELLOCK C E, et al. Juvenile hormone (JH) esterase: why are you so JH specific? [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2003, 33(12): 1261–1273.
- [17] ANSPAUGH D D, ROE R M. Regulation of JH epoxide hydrolase versus JH esterase activity in the cabbage looper, *Trichoplusia ni*, by juvenile hormone and xenobiotics [J]. Journal of Insect Physiology, 2005, 51(5): 523–535.
- [18] 王伟. 七星瓢虫滞育调控的温光周期效应及滞育后生物学研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2012.
- [19] TOUHARA K, PRESTWICH G D. Juvenile hormone epoxide hydrolase. photoaffinity labeling, purification, and characterization from tobacco hornworm eggs [J]. Journal of Biological Chemistry, 1993, 268(26): 19604–19609.
- [20] WOJTASEK H, PRESTWICH G D. An insect juvenile hormone-specific epoxide hydrolase is related to vertebrate microsomal epoxide hydrolases [J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 1996, 220(2): 323–329.
- [21] HIRAI M, KAMIMURA M, KIKUCHI K, et al. cDNA cloning and characterization of *Bombyx mori* juvenile hormone esterase: an inducible gene by the imidazole insect growth regulator KK-42 [J]. Insect Biochemistry & Molecular Biology, 2002, 32(6): 627–635.
- [22] MACKERT A, HARTFELDER K, BITONDI M M G, et al. The juvenile hormone (JH) epoxide hydrolase gene in the honey bee (*Apis mellifera*) genome encodes a protein which has negligible participation in JH degradation [J]. Journal of Insect Physiology, 2010, 56(9): 1139–1146.
- [23] TSUBOTA T, NAKAKURA T, SHIOTSUKI T. Molecular characterization and enzymatic analysis of juvenile hormone epoxide hydrolase genes in the red flour beetle *Tribolium castaneum* [J]. Insect Molecular Biology, 2010, 19(3): 399–408.
- [24] KIYOKO T, INCEOGLU A B, KENJI Y, et al. Characterization and cDNA cloning of a clofibrate-inducible microsomal epoxide hydrolase in *Drosophila melanogaster* [J]. European Journal of Biochemistry, 2010, 270(23): 4696–4705.
- [25] 徐卫华. 昆虫滞育研究进展[J]. 昆虫知识, 2008, 45(4): 512–517.
- [26] CASAS J, HARSHMAN L G, HAMMOCK B D. Epoxide hydrolase activity on juvenile hormone in *Manduca sexta* [J]. Insect Biochemistry, 2015, 21(1): 17–26.
- [27] KHALIL S M, ANSPAUGH D D, MICHAEL R R. Role of juvenile hormone esterase and epoxide hydrolase in reproduction of the cotton bollworm, *Helicoverpa zea* [J]. Journal of Insect Physiology, 2006, 52(7): 669–678.
- [28] 许永玉. 中华通草蛉的滞育机制和应用研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2001.

(责任编辑: 田 喆)



《植物保护》刊出的“中国热带和南亚热带地区草地贪夜蛾春夏两季迁飞轨迹的分析”入选第四届中国科协优秀科技论文遴选计划

近期,中国科协公布了第四届中国科协优秀科技论文遴选计划入选论文名单,《植物保护》刊出的“中国热带和南亚热带地区草地贪夜蛾春夏两季迁飞轨迹的分析”成为入选的98篇优秀论文之一,也是农业学科入选的10篇论文之一,该论文由中国农业科学院植物保护研究所吴孔明院士研究团队撰写,第一作者为吴秋琳博士后,原刊登于《植物保护》2019年第3期。发表仅4个月,已被引21次。

草地贪夜蛾是今年入侵我国的重大迁飞性害虫,由于其扩散迅速,为害严重,受到国务院有关部门高度重视。在草地贪夜蛾迁入早期,吴秋琳等利用历史气象数据,对中国热带和南亚热带地区草地贪夜蛾春、夏两季的迁飞轨迹以及主要降落和波及地区进行了模拟预测。该研究结果为中国热带与南亚热带地区草地贪夜蛾迁出虫源的监测预警提供了科学依据,对该害虫的监测预警和防控工作起到了十分重要的指导作用。

希望今后有更多的作者能够把更多优秀论文首先发表在我国科技期刊上。《植物保护》编辑部也将继续努力,力争把更多优秀论文凝聚到本刊发表,为广大科技工作者把论文写在祖国大地上提供更加优质的服务。

据悉,本届入选的98篇论文是2015年以来发表在我国科技期刊上的优秀论文的代表。它们或在基础研究领域对所在学科发展有重大影响,能够开拓和引领学科发展;或在应用研究领域具有巨大应用价值,能够引领所在学科工程与技术发展等。