研 究 报 告
Research Reports

黏虫咽侧体抑制神经肽基因克隆与成虫期表达模式分析

程李莉[1]， 江幸福[1]， 程云霞[1]， 刘悦秋[2]， 张 蕾[1*]， 罗礼智[1]

(1. 中国农业科学院植物保护研究所，植物病虫害生物学国家重点实验室，北京 100193；
2. 北京农学院，北京 102206)

摘要 为明确黏虫咽侧体抑制神经肽基因(allatostatin，AST)在调控黏虫 *Mythimna separata*（Walker）保幼激素(juvenile hormone，JH)中的功能，采用 RT-PCR 和 RACE 技术克隆获得的黏虫 AST 基因 cDNA 全长序列 902 bp，开放阅读框 378 bp，编码 125 个氨基酸。蛋白分子量为 14.33 kD，等电点为 9.25，具有 C 型 AST 典型的 PISCF 序列。进化树分析表明，黏虫 AST 氨基酸序列与一点黏虫、草地贪夜蛾、棉铃虫氨基酸序列相似性高达 80%以上。实时荧光定量 PCR 结果表明 AST 在成虫期的表达有明显组织和时间特异性。AST 在飞行肌中表达量最高，头部其次，卵巢最低；黏虫头部 AST 表达量在 7 日龄最高，飞行肌中 AST 基因的表达量在 1 日龄最高。本研究对进一步揭示黏虫 AST 基因对 JH 调控作用，明确黏虫 JH 调控迁飞和生殖的相关的分子调控机制具有重要意义。

关键词 黏虫； 咽侧体抑制素； 克隆； 表达

中图分类号： Q 965 **文献标识码**： A **DOI**： 10.16688/j.zwbh.2017179

Cloning and expression analysis of allatostatin gene in adults of the oriental armyworm, *Mythimna separata* (Walker)

CHENG Lili[1]， JIANG Xingfu[1]， CHENG Yunxia[1]， LIU Yueqiu[2]， ZHANG Lei[1]， LUO Lizhi[1]

(1. *State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests*, *Institute of Plant Protection*, *Chinese Academy of Agricultural Sciences*, *Beijing* 100193, *China*; 2. *Beijing University of Agriculture*, *Beijing* 102206, *China*)

Abstract In order to clarify the role of the allatostatin gene (AST) in the process of juvenile hormone synthesis and release of *Mythimna separata* (Walker), the AST gene of *M. separata* was cloned by RT-PCR and RACE. The full length of cDNA was 902 bp, which contained a 378 bp open reading frame (ORF) encoding 125 amino acid residues with a molecular mass of 14.33 kD and a theoretical isoelectric point of 9.25. The typical structure of C-type AST (PISCF) was located in the deduced amino acid sequence. Phylogenetic analysis indicated that AST protein of *M. separata* had a high similarity (up to 80%) to those of *Pseudaletia unipuncta*, *Spodoptera frugiperda* and *Helicoverpa armigera*. The qRT-PCR analysis showed that the expression levels of AST gene were significantly different at different stages and in various tissues of the female *M. separata*, mostly expressed in flight muscle and head, weakly expressed in the ovary. The expression was the highest in the head at 7 d but in flight muscle at 1 d. This study has a significance in enriching our knowledge about the function of AST on JH and the molecular mechanism of JH during flight and reproduction in *M. separata*.

Key words *Mythimna separata*; allatostatin; cloning; expression

保幼激素(juvenile hormone，JH)是一种由昆虫咽侧体所分泌的倍半萜类化合物，对昆虫的变态、生殖和发育起到重要的调控作用。在幼虫期，阻止蜕皮激素引起的变态，维持幼虫的结构特征，成虫期

收稿日期： 2017-05-16 **修订日期**： 2017-09-17
基金项目： 公益性行业(农业)科研专项(201403031，201303057)；国家国际科技合作专项(2014DFR31250)；国家自然科学基金(31672019，31371947，31000850)；北京市自然科学基金(6142017)
* 通信作者 E-mail：leizhang@ippcaas.cn

能促进卵子的发生、卵巢的发育和成熟[1-2]。研究表明,昆虫体内的 JH 受合成和代谢两种途径控制。其中,咽侧体(corpora allata, CA)合成 JH 的活性受脑神经细胞产生的神经肽调控[3],分别是促进咽侧体分泌保幼激素的促咽侧体神经肽(allatotropin, AT)和抑制咽侧体活性的 AST (allatostatin, AST)[4-6]。AST 由脑神经细胞分泌,通过神经、体液途径传递到咽侧体抑制保幼激素的合成与释放[7],AST 对咽侧体的抑制作用与昆虫种类、发育阶段有关。体外合成的 AST 多肽可以抑制鳞翅目昆虫烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 的咽侧体合成保幼激素,而对不完全变态昆虫血黑蝽 *Melanoplus sanguinipes* 无影响[8];烟芽夜蛾羽化后 24 h 雌成虫的 AST 多肽显著抑制羽化后 3 d 的雌成虫咽侧体合成保幼激素的能力[9]。但 AST 在昆虫中的功能还不仅限于此,太平洋折翅蠊 *Diploptera punctata* 中肠中的 AST 可以刺激中肠酶的活性,后肠中的 AST 与其调节促肌蛋白的合成有关[10]。目前,已分离鉴定出 AST 的昆虫有家蚕、小菜蛾、黑脉金斑蝶、草地贪夜蛾、水稻二化螟等,按照其氨基酸序列碳端不同结构可以将 AST 分为 3 类:(1)A 型-碳末端有同一酰胺化氨基酸序列 Y/FXFGL[11];(2)B 型-碳末端有一个酰胺化的 W(X)序列[12-13];(3)C 型-碳末端氨基酸未经酰胺化[14],该型咽侧体抑制素 N 末端具有环化阻碍结构,C 末端含有未环化的-PISCF 序列,且在两个内部的半胱氨酸之间有 1 个二硫桥[15]。

黏虫 *Mythimna separata* (Walker)属鳞翅目,夜蛾科,是一种典型的长距离迁飞害虫。主要在亚洲、大洋洲近 30 个国家发生为害,我国除新疆外均有分布。黏虫的寄主种类达 16 科 100 多种,除为害禾本科作物和牧草外,还给经济和油料作物造成重大损失。建国后我国黏虫多次暴发成灾,1950－1989 年全国性黏虫暴发成灾 17 年,成灾面积 7 191 万 hm^2,造成粮食损失 1 600 多万 t[16]。2012 年,三代黏虫在东北等地大面积暴发成灾,发生 927.99 万 hm^2,损失粮食 65.79 万 t。前期研究发现,保幼激素对黏虫的迁飞、生殖和发育具有重要调控作用。黏虫成虫迁飞时保幼激素和卵巢发育水平较低,保幼激素水平升高后卵巢成熟,飞行能力下降,且黏虫迁入种群表现为保幼激素水平高,卵巢发育级别高,飞行能力较弱[17-18];黏虫点滴保幼激素后飞行能力减弱,而生殖能力增强[19];羽化后 1 日龄是保幼激素调控迁飞和生殖的关键期,黏虫 1 日龄飞行可以刺激咽侧体活性促进保幼激素的合成与释放[20],对 1 日龄黏虫进行饥饿处理使得其保幼激素提前分泌,促进卵巢发育[21-22]。由此可见,保幼激素和黏虫的迁飞与生殖密切关联,而与保幼激素相关的分子调控途径的研究将为揭示黏虫迁飞致灾的调控机制奠定基础。为了进一步明确保幼激素在调控黏虫迁飞和生殖中的分子调控途径,本研究对调控保幼激素合成的黏虫 AST 基因开展研究。通过利用 RACE 技术克隆得到黏虫 AST 基因全长,实时荧光定量技术分析其在黏虫体内的时空表达情况,对进一步研究保幼激素调控黏虫飞行与生殖的内在分子调控机制具有重要意义。

1　材料与方法

1.1　材料

供试昆虫:虫源来自田间采集的越冬代黏虫成虫,经室内繁殖 3、4 代供试。幼虫用 30～50 cm 长的玉米叶饲养,饲养密度为 10 头/瓶,温度为(24±1)℃,光周期为 L∥D＝14 h∥10 h,相对湿度为 70%左右。饲养方法参照吕伟祥等[23]的室内人工饲养方法,每日更换新鲜玉米叶,直至幼虫停止取食为止。幼虫老熟时,在玻璃瓶内加入含水量 10%～15%的土粒供其化蛹。成虫羽化后雌雄配对放置于直径 8 cm,高 20 cm 的塑料罩中并喂饲 5%的新鲜蜂蜜水,每日更换。

主要试剂:RNA 提取试剂 TRIzol® Reagent 购于美国 Invitrogen 公司、琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒、DNA 连接试剂盒、5′-Full RACE Kit 试剂盒购于 TaKaRa 公司、FastQuant RT Kit (with gDNase)反转录试剂盒、SuperReal PreMix Plus (SYBR Green)实时荧光定量试剂盒购于北京天根生化科技有限公司。所有引物合成与 DNA 测序由上海生工生物工程股份有限公司完成。大肠杆菌感受态细胞 JM109 购于 TaKaRa 公司、克隆载体 pMD20-T 购于天为时代公司。

1.2　方法

1.2.1　引物的设计与合成

根据黏虫近缘种一点黏虫 *Pseudaletia unipuncta* 基因序列,GenBank 序列号为 U36570.1,参照保守区域结合 PCR 引物设计原则,设计简并引物,根据同源序列设计 3′RACE 引物和 5′RACE 引物,扩增得到基因的 3′端序列和 5′端序列。由得到的黏虫 AST 序列,设计 1 对荧光定量引物 AST-qF/AST-qR,以 *βactin* 基因[24](登录号:GQ856238.1)作为内参基因(表 1)。

表 1 本试验所需引物

Table 1 The primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列(5′-3′) Primer sequence	引物用途 Use of primer
CTE579 F	ATTVATGCDGCDCCWATGGA	同源片段的克隆
CTE579 R	GGTTGAAGTAGCACTGVCGGA	
CTE605 3′	GCCCTGGGACACCATCAACACG	3′RACE 扩增
CTE605 5′	GCCGCCGTGTTGATGGTGTCCC	5′RACE 扩增
CTE605 F	TTTCACGTAAACCTTCCAGCCGTT	基因全长验证
CTE605 R	GCCGTTGAGGTGTTAGGTTGC	
AST-qF	CTGTTTGTGACAATTCGTG	实时荧光定量 PCR
AST-qR	CATCCTCTCCTCAGCATC	
Actin-qF	AACTTCCCGACGGTCAAGTCAT	
Actin-qR	TGTTGGCGTACAAGTCCTTACG	

1.2.2 总 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成

解剖黏虫成虫脑组织、飞行肌、卵巢置于无 RNA 酶离心管中,用液氮冷冻后用 Trizol 提取各组织 RNA 后溶于 DEPC 水,RNA 用核酸蛋白检测仪检测其浓度和纯度,用 1.5%琼脂糖凝胶检测其完整性,参照 FastQuant RT Kit (with gDNase)反转录试剂盒说明书合成 cDNA 第一链,并保存于-80℃以备使用。

1.2.3 黏虫 AST 基因全长 cDNA 序列克隆及重组质粒构建

以获得的 cDNA 产物为模板,利用上述设计的引物(CTE579 F、CTE579 R)扩增同源序列;由上述得到的同源序列,结合 3′RACE 引物设计原则设计引物(CTE605 3′),和 5′RACE 引物设计原则设计引物(CTE605 5′),分别克隆获得基因的 3′和 5′端序列。PCR 反应程序设置为:94℃预变性 3 min;然后 30 个循环,循环条件为 94℃变性 30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 1 min 30 s;最后 72℃延伸 10 min。

上述各 PCR 扩增片段进行 1%琼脂糖凝胶电泳检测,切胶回收后使用连接酶与 pMD20-T 载体连接后,热转化至 *E. coli* Competent Cells JM109 中,涂布平板,37℃过夜培养。蓝白斑筛选,挑选阳性菌落,提取质粒并测序。然后将所得序列片段拼接得到 cDNA 全长序列。由所得 cDNA 序列设计引物(CTE605 F、CTE605 R)进行 PCR 扩增,用于验证开放阅读框。

1.2.4 AST 基因序列分析与系统进化树构建

利用 ORF Finder (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/)查找完整的开放阅读框,并推导出相应的氨基酸序列。利用 NCBI Blastx 进行氨基酸序列相似性搜索。使用在线软件 SignalP4.1 Server (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)进行信号肽预测。序列比对使用 DNAMAN 软件;利用 ClustalX 软件进行氨基酸序列多重比较,采用 MEGA 5.0 邻位相接法(neighbor joining, NJ)进行 1 000 次重复分析构建系统进化树。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 反应

以 1、3、5 和 7 日龄黏虫雌蛾的头部、飞行肌、卵巢的 cDNA 为模板,采用实时荧光定量 PCR 技术检测羽化后不同时间各组织内 AST 的表达水平,以 1 日龄头部的表达量为参照,每个处理分别设置 4 个生物学重复。

实时荧光定量采用 SYBR Green 法,20 μL 体系:2× SuperReal PreMix Plus 10 μL;上、下游引物(10 μmol/L)各 0.6 μL;50×ROX Reference Dye 0.4 μL;cDNA 模板 2 μL;加 ddH_2O 补齐至 20 μL。该反应在 ABI 7500 Real-time PCR 仪中进行;反应条件设置为:95℃预变性 15 min;然后 40 个循环,循环条件为 95℃变性 10 s,60℃退火 30 s,72℃延伸 32 s。

1.2.6 数据统计与分析

黏虫 AST 基因在不同发育阶段和组织的转录水平利用 $2^{-\triangle\triangle G}$ 法分析,不同发育阶段和组织 AST 的相对表达量采用 SAS 5.0 软件进行 One-way ANOVA 方差分析,多重比较采用 Tukey's HSD 法,差异显著性检验水平为 $P<0.05$。

2 结果与分析

2.1 黏虫 AST 片段的克隆与序列分析

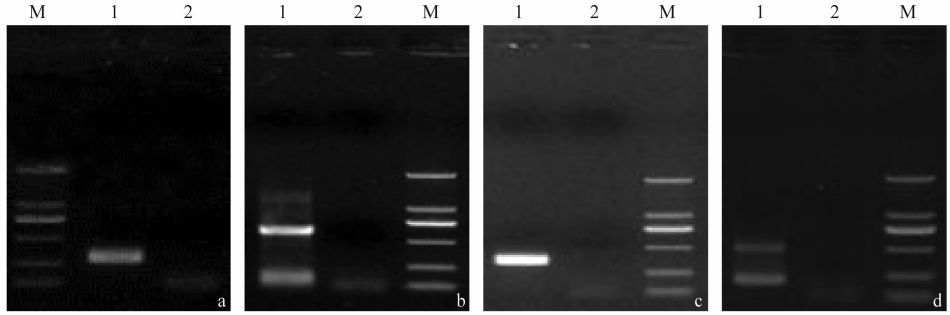
2.1.1 黏虫 AST 片段的克隆

以黏虫脑组织 cDNA 为模板,扩增得到一条特异性同源序列条带,通过 3′RACE 和 5′RACE 反应分别得到长度为 388 bp 的 3′端和 224 bp 的 5′端,该基因被命名为黏虫 AST 基因,GenBank 登录号为 JQ669383.1。

2.1.2 黏虫 AST 基因序列分析

AST 基因 cDNA 序列全长共 902 bp,并具有真核生物典型的 polyA 加尾信号 AATAAA。该基因开放阅读框为 378 bp,起始密码子为 ATG,终止密码子为 TGA,共编码 125 个氨基酸。预测的蛋白分子量为 14.33 kD,等电点为 9.25,N 末端含有 1 个由 26 个氨基酸组成的信号肽,属于 C 型咽侧体抑制素,含有保守的未环化 C 末端-PISCF,内部包含两个半胱氨酸可以形成稳定的二硫桥结构,含有 1 个蛋白激酶磷酸化位点(TIR^{23-25})。对比 AST 编码区 cDNA 的序列,其同源性经过 NCBI 上 BLAST 分析,与一点黏虫 *Pseudaletia unipuncta* (GenBank 登录号:U36570.1)同源性达 95%,和棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (GenBank 登录号:KC340915.1)同源性达 87%,与

脐橙螟蛾 *Amyelois transitella*(GenBank 登录号:XM_013331392.1)和柑橘凤蝶 *Papilio xuthus*(GenBank 登录号:XM_013309172.1)的同源性达 77%以上,比对结果证明该基因为黏虫 AST 基因。



a: 黏虫AST基因的cDNA片段PCR扩增; M: DL2000; 1: 黏虫cDNA为模板; 2: 不加M-MLV阴性对照; b: 黏虫AST基因的3′末端PCR扩增; M: DL2000; 1: 3′RACE PCR产物; 2: 不加M-MLV阴性对照; c: 黏虫AST基因的5′末端PCR扩增; M: DL2000; 1: 5′-RACE PCR产物; 2: 不加M-MLV阴性对照; d: 黏虫AST基因的全长PCR扩增; M: DL2000; 1: 黏虫AST基因全长产物; 2: 不加M-MLV阴性对照
a: PCR amplification of *M. separata* cDNA; b: 3′-RACE PCR amplification of *M. separata* AST cDNA; c: 5′-RACE PCR amplification of *M. separata* AST cDNA; d: Full-length confirmation of *M. separata* AST cDNA. a: Lane M: molecular weight marker (DL2000); Lane 1: PCR amplification of *M. separata* cDNA; Lane 2: Negative control without M-MLV; b: Lane M: molecular weight marker (DL2000); Lane 1: 3′-RACE PCR amplification; Lane 2: Negative control without M-MLV; c: Lane M: Molecular weight marker (DL2000); Lane 1: 5′-RAC PCR amplification; Lane 2: negative control without M-MLV; d: Lane M: Molecular weight marker (DL2000); Lane 1: Full-length confirmation of AST PCR amplification; Lane 2: Negative control without M-MLV

图 1　黏虫 AST 基因 PCR 产物电泳图

Fig. 1　PCR amplification of AST from *Mythimna separata*

```
1    CATTTGCTTTCAAAAACCATCGGCGGCGACCACGGAAGCAGACTGAAGCCTCTCATACCG
61   ACTTGAAAAAGTGATCGTTACTAGTTTCACGTAAACCTTCCAGCCGTTAACAGCTGAAAT
121  TATTTCTACGTGTTGATTAAAGTTTGAAGATCACA
156 ATG AAA ACG AAC GTG TGC AAC GTG TAC TTG GCC ATC GTC GCC GCC ACC TTA GCT ATG CTG
1    M   K   T   N   V   C   N   V   Y   L   A   I   V   A   A   T   L   A   M   L
216 TTT GTG ACA ATT CGT GCC GCA CCT ATG GAG GCG GAG GAC GAG CAG GCC GAC AAC ACT CTG
21   F   V   T   I   R   A   A   P   M   E   A   E   D   E   Q   A   D   N   T   L
276 GTG GCG CAT CCG GAC GGA GAC ATG GAG ATG GCG GGG CCC TGG GAC ACC ATC AAC ACG GCG
41   V   A   H   P   D   G   D   M   E   M   A   G   P   W   D   T   I   N   T   A
336 GCC CTG CGC AAG CTG CTG CTA CAG CTC GAT GCT GAG GAG AGG ATG GGC AGG GTG AGC CGC
61   A   L   R   K   L   L   L   Q   L   D   A   E   E   R   M   G   R   V   S   R
396 TCG TGG CCGCAG GCG GAG CCG CGC GGC TGG GGC CTG CGC GCG CTG GAC GGG CGC CTG GCG
81   S   W   P   Q   A   E   P   R   G   W   G   L   R   A   L   D   G   R   L   A
456 CGG CAG TGG CGC GCC GAC AAG CGC CAG GTC CGC TTC CGC CAG TGC TAC TTC AAC CCC ATC
101  R   Q   W   R   A   D   K   R   Q   V   R   F   R   Q   C   Y   F   N   P   I
516 TCC TGC TTC CGC AAG TGA
121  S   C   F   R   K   *
533 ACGCCACGGACTCGACGACGCATCGACCCTATGACCTAGTTGTGTAGCACTCAACTCATT
593 TCAACATTTTTTCAATAAAGTAGCAACCTAACACCTCAACGGCCACATTGTGAAACGCCA
653 ACGTCATCAAACATTGTCAAATTAGCTATCACAAATTGGGCGTTTCATAATGAGGTCATT
713 GACCAATCCAAAATTAATTATATGGGTATACATTCAATGTAAATACATATTGTAACCACT
773 CTTTTGTCAGCTAAGGTACTAGTAATCAATACTTTTTTATCTAAAAAAAAACATATGTCAA
833 AATGGTTATAAAGCGACTTTGAATGACGTTTCCAAAGTACTAAATAAAACGTAGGCAGAG
893 CTAAAAAAA
```

下划线表示信号肽序列; 粗体字母分别表示起始密码子ATG、终止密码子TGA和加尾信号AATAAA; 灰色阴影表示形成二硫桥的半胱氨酸; 方框表示C末端环化结构

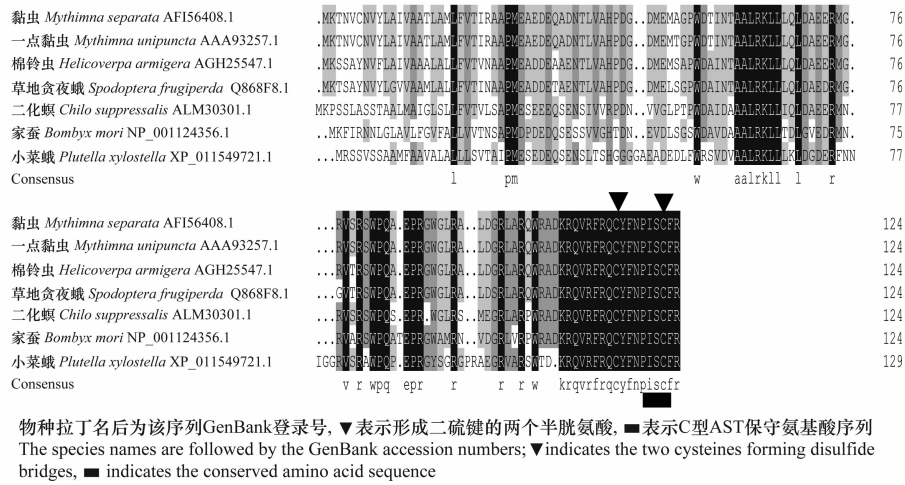
The signal peptide is underlined. ATG as the initiation codon, TGA as the termination codon of translation and AATAAA of the possible polyadenylation signal are shown in bold letters. The cysteine to form disulfide bridges are shaded in gray. The non-amidated C-terminal pentapeptide is in the box

图 2　黏虫咽侧体抑制素 AST 的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

Fig. 2　The nucleotide sequence and deduced amino acid sequences of AST from *Mythimna separata*

2.2 氨基酸序列相似性及进化树分析

推导得到的黏虫 AST（GenBank 登录号：AFI56408.1）编码的氨基酸序列与其他昆虫氨基酸序列比对结果表明，该氨基酸序列与一点黏虫（GenBank 登录号：AAA93257.1）氨基酸序列的一致性最高，达到 99.2%；与棉铃虫（GenBank 登录号：AGH25547.1）、草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda*（GenBank 登录号：Q868F8.1）、二化螟 *Chilo suppressalis*（GenBank 登录号：ALM30301.1）具有较高的序列一致性，分别为 87.2%、85.6%、61.6%；与家蚕 *Bombyx mori*（GenBank 登录号：NP_001124356.1）和小菜蛾 *Plutella xylostella*（GenBank 登录号：XP_011549721.1）的序列一致性较低，分别为 52.8%和 44.8%（图 3）。序列比对分析结果表明，C 型 AST 普遍存在于鳞翅目昆虫中，不同昆虫 AST 氨基酸序列存在共同保守区域 PISCF，并且两个半胱氨酸形成了 AST 中唯一一对链内二硫键。



物种拉丁名后为该序列GenBank登录号，▼表示形成二硫键的两个半胱氨酸，■表示C型AST保守氨基酸序列
The species names are followed by the GenBank accession numbers; ▼indicates the two cysteines forming disulfide bridges, ■ indicates the conserved amino acid sequence

图 3 黏虫 AST 基因氨基酸序列同源性比对

Fig. 3 Alignment of amino acid sequences of AST from *Mythimna separata*

进化树分析显示，黏虫 AST 基因与一点黏虫的亲缘关系最近，与棉铃虫、草地贪夜蛾、分月扇舟蛾 *Clostera anastomosis*（AEM44668.1）的亲缘关系较近，与玉带凤蝶 *Papilio polytes*（XP_013145137.1；XP_013145138.1）、柑橘凤蝶（XP_013164626.1）、黑脉金斑蝶 *Danaus plexippus*（EHJ74863.1）、脐橙螟蛾（XP_013186846.1）、小菜蛾、家蚕、二化螟的亲缘关系较远，而与埃及伊蚊 *Aedes albopictus*（JAC07495.1）、拟果蝇 *Drosophila simulans*（GenBank 登录号：XP_016024602.1）、冬尺蠖 *Operophtera brumata*（KOB78759.1）的亲缘关系最远（图 4），总体趋势是亲缘关系越近，同源性越高，与氨基酸序列比对结果基本一致。

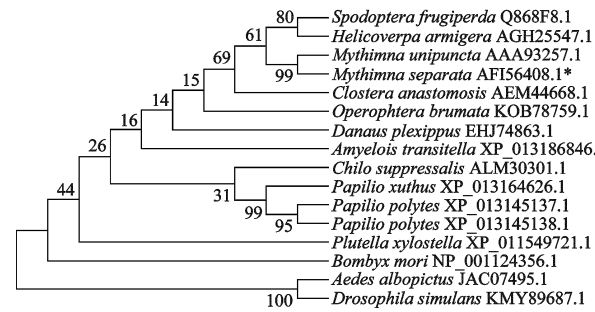


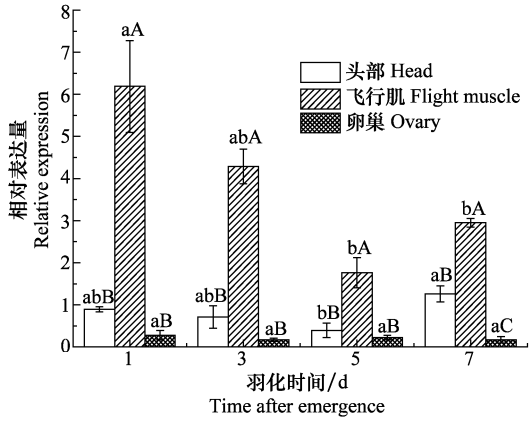
图 4 AST 氨基酸序列的系统进化树分析

Fig. 4 Phylogenetic tree of AST amino acid sequences

2.3 黏虫 AST 基因的时序差异性表达

采用实时荧光定量 PCR，从羽化后 1～7 日龄黏虫的头、飞行肌和卵巢中均检测到 AST 基因的表达，但其表达情况随组织和发育时间的不同而有明显的差异。整体而言，AST 在组织中的表达情况为飞行肌＞头部＞卵巢。首先，黏虫 AST 基因的表达具有明显的组织分布表达特异性（$F_{2,9}=26.53$，$P<0.01$；$F_{2,8}=62.55$，$P<0.01$；$F_{2,9}=112.14$，$P<0.01$）。在羽化后 1、3、5 龄黏虫飞行肌中 AST 的表达量均显著高于头部和卵巢（$P<0.05$），但头部和卵巢之间无显著性差异（$P>0.05$）。羽化后 7 日龄飞行肌 AST 基因的表达量显著高于卵巢和头部的表达量，且头部表达量也显著高于卵巢 AST 的表达（$F_{2,9}=13.48$，$P<0.01$）。其次，黏虫头部 AST 基因在羽化后不同时间内的表达量差异显著（$F_{3,11}=4.53$，$P<0.05$）；羽化后 7 日龄头部的相对表达量最高且显著高于羽化后 5 日龄（$P<0.05$），但和其他日龄差异不显著（$P>0.05$）。羽化后不同日龄飞行肌中 AST 基因的表达量也存在显著性差异（$F_{3,12}=$

9.63，$P<0.01$)，羽化后 1 日龄 AST 基因的表达量最高，显著高于羽化后 5 日龄和 7 日龄($P<0.05$)，但和羽化后 3 日龄差异不显著($P>0.05$)；卵巢中 AST 基因的表达量较低，且不同日龄之间的表达量无显著性差异($F_{3,12}=0.49$，$P>0.05$)。



图中数据为平均数±标准误；不同小写字母表示同一组织不同日龄有显著性差异；不同大写字母表示同一日龄不同组织间有显著性差异；数据分析采用Tukey's HSD多重比较法，$P<0.05$

Values are means±SE; different lowercase letters represent significant difference among days after emergence; different capital letters represent significance among tissues; statistical significance is analyzed by Tukey's HSD, $P<0.05$

图 5　AST 基因在黏虫雌成虫的组织和时间特异性表达情况

Fig. 5　Temporal and spatial expression of AST in female *Mythimna separata* moths

3　讨论

AST 是昆虫体内重要神经肽激素，与昆虫咽侧体合成释放保幼激素的活性密切相关[25]，除此之外还参与昆虫体内能源物质的积累以及中肠的蠕动等生命活动。本研究通过 RT-PCR 和 RACE 技术从黏虫的脑部克隆获得 AST 基因全长序列，并预测其蛋白分子量为 14.33 kD，等电点为 9.25，N 末端含有 1 个由 26 个氨基酸组成的信号肽，该基因属于 C 型 AST，含有保守的未环化 C 末端-PISCF，氨基酸序列内部的两个半胱氨酸可以形成稳定的二硫桥结构。NCBI BLAST 分析结果表明该基因核酸序列与一点黏虫、棉铃虫、脐橙螟蛾、柑橘凤蝶的相似性达 80%以上，亲缘关系高度接近。由该基因序列推导的氨基酸序列，经进化树分析与一点黏虫、棉铃虫、草地贪夜蛾亲缘关系最近，氨基酸序列比对结果显示高度同源，达到 85%以上。以上结果表明本试验克隆获得的黏虫 AST 基因属于昆虫 AST 基因家族成员之一。

实时荧光定量 PCR 结果显示：AST 广泛存在于黏虫的各种组织中，包括脑、飞行肌、卵巢，但是其在不同发育时期和不同组织的表达量不同。羽化后 1～5 d AST 在头部的表达量较低，7 d 时出现升高，且与 1、3、5 d 有显著性差异。研究表明迁飞型黏虫一般在羽化后第 5 天开始产卵[26]，因此羽化后 1～5 d 是黏虫卵巢发育与卵黄原蛋白形成时期，此时期 AST 的表达量较低；羽化后第 7 天黏虫卵巢发育成熟产卵行为发生后，AST 在黏虫头部的表达量上升，且显著高于产卵前期时的表达量，推测黏虫头部 AST 基因的表达量变化与其生殖周期有关，这与 AST 在太平洋折翅蠊中的表达类似[27]。有关研究表明黏虫羽化后 1～5 d 时咽侧体活性呈上升趋势，并于羽化后第 5 天出现最大值后下降[20]；黏虫羽化后血淋巴内保幼激素滴度与头部 AT 表达量变化一致，羽化初期黏虫头部 AT 的表达量和保幼激素滴度较低，随着羽化后时间的增加 AT 的表达量和保幼激素Ⅱ滴度呈上升状态，并于羽化后第 5 天出现最大值[28]后呈下降趋势，黏虫头部 AT 基因的表达量、咽侧体活性和保幼激素滴度的变化均与头部 AST 基因的表达量变化相反。由此推测：黏虫羽化后 1～5 d，头部 AT 表达量较高而 AST 表达量较低，刺激了咽侧体活性，促进保幼激素的合成与释放，致使体内保幼激素滴度较高，利于生殖系统发育和卵黄原蛋白的合成，卵母细胞吸收卵黄原蛋白，以及卵母细胞的成熟[2]；黏虫羽化后第 7 天产卵后，生殖系统对于保幼激素的需求量较低，自身通过升高 AST 的表达量，同时降低 AT 的表达量，抑制咽侧体释放保幼激素的活性，致使体内保幼激素滴度降低。以上研究表明黏虫可以根据自身发育需要通过调节关键基因的表达量来调控保幼激素水平，从而达到维持影响迁飞和生殖的目的。

飞行肌中 AST 在黏虫羽化初期表达水平最高，随着羽化时间呈下降趋势。羽化初期黏虫处于幼嫩期，飞行系统尚未发育成熟时飞行肌中 AST 的表达量较高，随着发育时间，黏虫飞行能力逐渐增强飞行肌中 AST 的表达量保持较低水平，AST 的表达量与飞行能力呈一定负相关，推测飞行肌中 AST 可能参与抑制黏虫的飞行。曾有研究指出 AST 可以抑制太平洋折翅蠊肌肉的收缩[29]，AST 是否参与抑制黏虫飞行肌肌肉收缩还有待进一步研究。AST 的广泛分布反映了其功能的多样性，但是目前仅探究了 AST 在头部、中肠、后肠的功能，而本试验中黏虫的空间表达结果表明黏虫内主要表达部位是头部和飞行肌，卵巢中的表达相对较少，且试验所选 4 个日龄飞行肌中的表达量均远远高于头部和卵巢，亟须进一步探究 AST 在黏虫飞行肌的功能。

本研究克隆得到了黏虫 AST 基因 cDNA 序列全长，分析明确了该基因的序列特征，并从 mRNA 水平检测了该基因在黏虫雌蛾体内的时空表达模式。该研究结果为利用 RNAi 技术进一步研究该基因的功能奠定了基础，丰富了影响黏虫迁飞和生殖的 JH 相关调控理论。

参考文献

[1] RIDDIFORD L M. Juvenile hormone: the status of its "status quo" action [J]. Archives of Insect Biochemistry & Physiology, 1996, 32(3/4): 271 - 286.

[2] WYATT G R, DAVEY K G. Cellular and molecular actions of juvenile hormone. Ⅱ. Roles of juvenile hormone in adult insects [J]. Advances in Insect Physiology, 1996, 26(8): 1 - 155.

[3] 关雪辰. 昆虫神经肽 allatostatin 与 allatotropin 的研究新进展[J]. 昆虫学报,1996, 39(2): 214 - 218.

[4] RACHINSKY A, TOBE S S. Role of second messengers in the regulation of juvenile hormone production in insects, with particular emphasis on calcium and phosphoinositide signaling [J]. Archives of Insect Biochemistry & Physiology, 1996, 33(33): 259 - 282.

[5] LI Sheng, JIANG Rongjing, CAO Meixun. Allatotropic and allatostatic activities in extracts of brain and the effects of *Manduca sexta* allatotropin and *Manduca sexta* allatostatin on juvenile hormone synthesis *in vitro* by corpora allata from the Eri silkworm, *Samia cynthia ricini* [J]. Physiological Entomology, 2002, 27(4): 322 - 329.

[6] AUDSLEY N, WEAVER R J, EDWARDS J P. Juvenile hormone biosynthesis by corpora allata of larval tomato moth, *Lacanobia oleracea*, and regulation by *Manduca sexta* allatostatin and allatotropin [J]. Insect Biochemistry & Molecular Biology, 2000, 30(8): 681 - 689.

[7] 曾辉明，黄俊生. 昆虫神经肽 allatostatin 的研究进展[J]. 生命科学, 2003, 15(3): 168 - 172.

[8] KRAMER S J, TOSCHI A, MILLER C A, et al. Identification of an allatostatin from the tobacco hornworm *Manduca sexta*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991, 88(21): 9458 - 9462.

[9] TEAL P E A. Effects of allatotropin and allatostatin on *in vitro* production of juvenile hormones by the corpora allata of virgin females of the moths of *Heliothis virescens* and *Manduca sexta*[J]. Peptides, 2002, 23(4): 663 - 669.

[10] LANGE A B, CHAN K K, STAY B. Effect of allatostatin and proctolin on antennal pulsatile organ and hindgut muscle in the cockroach, *Diploptera punctata* [J]. Archives of Insect Biochemistry & Physiology, 1993, 24(2): 79 - 92.

[11] PRATT G E, FARNSWORTH D E, SIEGEL N R, et al. Identification of an allatostatin from adult *Diploptera punctata* [J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 1989, 163(3): 1243 - 1247.

[12] LORENZ M W, KELLNER R, HOFFMANN K H. A family of neuropeptides that inhibit juvenile hormone biosynthesis in the cricket, *Gryllus bimaculatus* [J]. Journal of Biological Chemistry, 1995, 270(36): 21103 - 21108.

[13] LORENZ M W, KELLNER R, HOFFMANN K H. Identification of two allatostatins from the cricket, *Gryllus bimaculatus* de Geer (Ensifera, Gryllidae): additional members of a family of neuropeptides inhibiting juvenile hormone biosynthesis [J]. Regulatory Peptides, 1995, 57(3): 227 - 236.

[14] KRAMER S J, TOSCHI A, MILLER C A, et al. Identification of an allatostatin from the tobacco hornworm *Manduca sexta*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991, 88(21): 9458 - 9462.

[15] STAY B, TOBE S S. The role of allatostatins in juvenile hormone synthesis in insects and crustaceans [J]. Annual Review of Entomology, 2007, 52(1): 277 - 299.

[16] 马宗晋. 中国重大自然灾害及减灾对策：分论[M]. 北京：科学出版社, 1993.

[17] 江幸福，罗礼智. 黏虫迁出与迁入种群的行为和生理特性比较[J]. 昆虫学报, 2005, 48(1): 61 - 67.

[18] JIANG Xingfu, LUO Lizhi, ZHANG Lei, et al. Regulation of migration in *Mythimna separata* (Walker) in China: A review integrating environmental, physiological, hormonal, genetic, and molecular factors[J]. Environmental Entomology, 2011, 40(3): 516 - 533.

[19] LUO Lizhi, LI Kebin, JIANG Xingfu, et al. Regulation of flight capacity and contents of energy substances by methoprene in the moths of oriental armyworm, *Mythimna separata* [J]. Entomologia Sinica, 2001, 8(1): 63 - 72.

[20] 李克斌，曹雅忠，罗礼智，等. 飞行对黏虫体内甘油酯积累与咽侧体活性的影响[J]. 昆虫学报, 2005, 48(2): 155 - 160.

[21] 张蕾，罗礼智，江幸福，等. 一日龄饥饿对黏虫成虫卵巢发育和飞行能力的影响[J]. 昆虫学报, 2006, 49(6): 895 - 902.

[22] ZHANG Lei, JIANG Xingfu, LUO Lizhi. Determination of sensitive stage for switching migrant oriental armyworms into residents [J]. Environmental Entomology, 2008, 37(6): 1389 - 1395.

[23] 吕伟祥，江幸福，张蕾，等. 一日龄黏虫不同时长吊飞对生殖及寿命的影响[J]. 应用昆虫学报, 2014(4): 914 - 921.

[24] 王玲，江幸福，罗礼智，等. 黏虫类钙黏蛋白基因的克隆、序列分析及时空表达[J]. 昆虫学报, 2011, 54(10): 1094 - 1103.

[25] WOODHEAD A P, KHAN M A, STAY B, et al. Two new allatostatins from the brains of *Diploptera punctata*[J]. Insect Biochemistry & Molecular Biology, 1994, 24(3): 257 - 263.

[26] 罗礼智，李光博. 粘虫幼虫密度对成虫飞行与生殖的影响[J]. 昆虫学报, 1995(1): 38 - 45.

[27] YU C G, STAY B, DING Q, et al. Immunochemical identification and expression of allatostatins in the gut of *Diploptera punctata* [J]. Journal of Insect Physiology, 1995, 41(12): 1035 - 1043.

[28] ZHANG Lei, LUO Lizhi, JIANG Xingfu. Starvation influences allatotropin gene expression and juvenile hormone titer in the female adult oriental armyworm, *Mythimna separata*[J]. Archives of Insect Biochemistry & Physiology, 2008, 68(2): 63 - 70.

[29] STAY B, BACHMANN J A S, STOLTZMAN C A, et al. Factors affecting allatostatin release in a cockroach (*Diploptera punctata*): Nerve section, juvenile hormone analog and ovary [J]. Journal of Insect Physiology, 1994, 40(5): 365 - 372.

（责任编辑：田 喆）