

# 烟粉虱 MED 隐种保幼激素酯酶 cDNA 片段克隆、序列分析及在不同发育阶段的表达

龙楚云, 郭建洋, 万方浩\*

(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)

**摘要:** 昆虫卵黄发生及其内分泌调控机理一直是昆虫生殖生理学的研究热点。由保幼激素代谢通路关键分子介导的调控系统是影响昆虫卵黄发生的关键途径。研究激素代谢通路关键调控因子的功能将为明确生殖调控机理提供理论依据。保幼激素酯酶 (juvenile hormone esterase, JHE) 是降解昆虫体内保幼激素的关键酶之一, 具有调控昆虫发育、变态和生殖等功能。本实验以烟粉虱 *Bemisia tabaci* MED 隐种为研究对象, 采用反转录 PCR (reverse transcription PCR, RT-PCR) 和 cDNA 末端快速扩增 PCR (rapid amplification of cDNA ends PCR, RACE-PCR) 技术克隆获得编码 552 个氨基酸的烟粉虱 MED 隐种保幼激素酯酶基因的部分 cDNA 序列, 将其命名为 *Btjhe* (GenBank 登录号为 KC422259)。同源序列比对发现, 该基因与菜叶蜂 *Athalia rosae*、西方蜜蜂 *Apis mellifera* 的保幼激素酯酶基因推导的氨基酸一致性较高, 且具有昆虫保幼激素酯酶共有的 5 个氨基酸保守模块, 其中包括对保幼激素酯酶活性起关键作用的长疏水结合域 GxSxG。由此推测, *Btjhe* 为烟粉虱 MED 隐种的保幼激素酯酶基因, 其编码蛋白参与烟粉虱体内保幼激素的特异性降解。实时荧光定量 PCR 检测结果表明, *Btjhe* 在烟粉虱若虫、成虫阶段都有表达, 在成虫阶段表达量较高, 且在羽化后 11 d 达到峰值, 其表达模式与卵黄原蛋白基因 (*vg*) 类似。本研究结果为明确烟粉虱的生殖调控机理奠定基础。

**关键词:** 烟粉虱 MED 隐种; 保幼激素酯酶; cDNA 克隆; 序列分析; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2013)03-0234-09

## Molecular cloning, sequence analysis and developmental expression of cDNA fragment of juvenile hormone esterase from the whitefly *Bemisia tabaci* MED (Hemiptera: Aleyrodidae)

LONG Chu-Yun, GUO Jian-Yang, WAN Fang-Hao\* (State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

**Abstract:** Insect reproduction physiology mainly focuses on the endocrine regulation mechanism of vitellogenesis. Vitellogenesis is regulated by the juvenile hormone metabolic pathway in most insects. Analysis of the function of the key regulation elements in hormone metabolic pathway will illustrate the reproductive regulation mechanism. Juvenile hormone esterase (JHE) plays an important role in insect juvenile hormone degradation, development, metamorphosis and reproduction. We cloned partial cDNA sequence of juvenile hormone esterase gene by RT-PCR and RACE-PCR from the whitefly *Bemisia tabaci* MED, which was named as *Btjhe* and deposited in GenBank under the accession no. KC422259, encoding 552 amino acids. *Btjhe* showed high identity in the deduced amino acid sequence with JHE genes in *Athalia rosae* and *Apis mellifera*. The deduced amino acid sequence of *Btjhe* contains five conserved motifs identified in JHEs of other insect species, including a long hydrophobic binding pocket GxSxG motif that is required for the key enzymatic activity of JHE proteins. Thus, *Btjhe* is inferred to code juvenile hormone esterases in *B. tabaci* MED. The mRNA expression level of *Btjhe* was detected in nymphs and adults at different developmental stages by real-time quantitative PCR. The expression level was higher in adults than in nymphs and reached the peak at 11 d after eclosion. Dynamics of the mRNA expression level of *Btjhe* was similar with that of the vitellogenin gene (*vg*). The results provide insights into the molecular and physiological mechanisms underlying the regulation of whitefly reproduction.

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目(2009CB119200); 国家自然科学基金青年基金项目(31101674)

作者简介: 龙楚云, 女, 1988 年生, 湖南衡阳人, 硕士研究生, 研究方向为入侵生物学与生态学, E-mail: dacychuchu@sina.com

\* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: wanfh@mail.caas.net.cn

收稿日期 Received: 2012-12-06; 接受日期 Accepted: 2013-01-24

**Key words:** *Bemisia tabaci* MED; juvenile hormone esterase; cDNA cloning; sequence analysis; real-time quantitative PCR

烟粉虱 *Bemisia tabaci* (Gennadius) 是我国最具危害的 20 种入侵生物之一, 属半翅目(Hemiptera), 粉虱科(Aleyrodidae), 小粉虱属 *Sternorrhyncha*, 是包含 30 个以上隐种的物种复合体(Perring, 2001; De Barro *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2011; 刘树生, 2012), 其中危害和分布较广的是烟粉虱 MEAM1 隐种(对应以往的 B 生物型烟粉虱)和烟粉虱 MED 隐种(对应以往的 Q 生物型烟粉虱)(Perring, 2001; De Barro *et al.*, 2011)。烟粉虱 MED 隐种自 2003 年在我国云南昆明首次发现后(褚栋等, 2005), 陆续在北京、河南、山东等地发现其危害(Chu *et al.*, 2006)。近年来, 该隐种凭借极限温度适应性、较强农药抗性 etc 特性, 在我国境内迅速扩散, 于 2007 年后在一些地区逐渐取代烟粉虱 MEAM1 隐种, 成为危害我国农作物的主要烟粉虱隐种, 表现出比烟粉虱 MEAM1 隐种更强的入侵性和危害性(Chu *et al.*, 2010a, 2010b; Rao *et al.*, 2011; Pan *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2011)。有研究表明, 烟粉虱 MEAM1 隐种利用与双生病毒的互惠共生关系促进自身卵巢发育, 抑制寄主植物的防御反应, 间接提高生殖力, 从而以大量的后代数量取代本地种 ZHJ1 型烟粉虱(Jiu *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2010, 2012)。烟粉虱 MEAM1 隐种的卵黄发生始于若虫期, 体内卵黄蛋白含量在羽化后第 12 天达到峰值(Guo *et al.*, 2012)。然而, 有关入侵种烟粉虱 MED 隐种的卵黄发生模式及其调控机理, 特别是快速建立种群并扩散的生理与分子机制研究则相对较少。

卵黄发生(vitellogenesis)是昆虫重要的生殖发育过程, 卵黄发生动态及其内分泌调控机理是昆虫生殖生理学的研究热点之一(戈林泉和吴进才, 2010)。其中, 有关昆虫卵黄原蛋白(vitellogenin, Vg)合成与摄取的研究较多(Raikhel and Dhadialla, 1992; Tufail and Takeda, 2009)。而昆虫卵黄发生的激素调控机制根据 Vg 的合成方式分成 3 类: (1) 在不完全变态昆虫和鞘翅目中, 保幼激素(juvenile hormone, JH)是调控 Vg 合成与摄取的主要因子(Wyatt and Davey, 1996), 如东亚飞蝗 *Locusta migratoria* (Wyatt *et al.*, 1996) 和马德拉蜚蠊 *Leucophaea maderae* (Don-Wheeler and Engelmann, 1997) 等; (2) 双翅目昆虫由 JH 和 20-羟基蜕皮酮(20-hydroecdysone, 20E) 共同控制 Vg 合成

(Hagedorn and Kunkel, 1979; Kelly *et al.*, 1987; 龚和和李乾君, 1992), 但埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 有所区别, 仅在成虫血餐后卵黄发生和 Vg 合成才被激活(Raikhel and Dhadialla, 1992); (3) 鳞翅目昆虫 Vg 合成受 JH 和 20E 的启动, 如 JH 是鳞翅目昆虫中凤蝶总科和夜蛾总科 Vg 合成和卵子成熟的必需调控因子(Ramaswamy *et al.*, 1997; Sorge *et al.*, 2000), 蜕皮激素则是调控家蚕 *Bombyx mori* 卵黄发生和 Vg 合成的关键激素(Swevers and Iatrou, 1999)。由此可见, 保幼激素是调控昆虫生殖发育最重要的一类激素, 探明保幼激素合成代谢的调控机理显得尤为重要(Wyatt and Davey, 1996; Riddiford *et al.*, 2003)。保幼激素酯酶(juvenile hormone esterase, JHE)是参与 JH 降解最重要的代谢酶, 主要分布在昆虫的血淋巴和一些组织(如脂肪体和中肠)的细胞质中, 对控制昆虫体内的 JH 滴度起着重要作用(Campbell *et al.*, 1998; 李胜等, 2004)。促进或抑制 JHE 的活性能打乱昆虫体内的 JH 水平, 影响卵黄发生和卵巢发育, 使昆虫的发育紊乱, 丧失生活能力或降低生殖力, 从而达到间接杀虫的目的(杨文佳等, 2010)。因此, 探明调控激素代谢基因与编码卵黄原蛋白基因之间的相互关系, 对于进一步明确烟粉虱生殖调控机理以及环境因子对烟粉虱生殖发育的影响有重要意义。本研究利用 RT-PCR 和 RACE-PCR 技术首次克隆烟粉虱 JHE 基因部分 cDNA 序列, 对其推导的氨基酸序列进行比对和分析, 采用实时荧光定量 PCR 技术检测该基因在烟粉虱不同发育阶段的表达情况, 并与 Vg 基因的表达谱进行比较分析, 期望为进一步研究烟粉虱的生殖调控机理和日后发现控制烟粉虱危害的方法提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试昆虫

烟粉虱 MED 隐种采自本实验室温室长期饲养种群, 以番茄为寄主植物, 无用药史, 温室饲养温度为  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , 相对湿度 60% ~ 80%, 光周期为 16L:8D。

### 1.2 主要试剂及仪器

RNA 提取试剂 Trizol Regent 购自 Invitrogen 公

司; RACE 试剂盒 (SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit) 购自 Clontech 公司; 反转录试剂盒 TransScript™ One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix、荧光定量试剂盒 TransStart™ Green qPCR SuperMix、TransStart Taq DNA Polymerase、凝胶回收试剂盒采购自 Transgen 公司。实验所用引物由上海生工生物工程技术有限公司合成, 产物测序由北京三博远志生物技术有限责任公司完成。PCR 仪为美国 MJ 公司的 PTC-200, 实时荧光定量 PCR 仪型号为 ABI 7500。

### 1.3 总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成

取 200 头烟粉虱 MED 隐种雌成虫提取总 RNA, 采用 Trizol (Invitrogen, USA) 一步法进行提取, 用核酸定量仪和 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 的纯度和完整性。cDNA 第一链的合成采用 TransScript™ One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒, 取 1 μg 总 RNA 进行反转录。

### 1.4 保幼激素酯酶基因 cDNA 序列片段的获得

根据 NCBI 数据库中公布的其他昆虫保幼激素酯酶基因的氨基酸序列及核酸序列经 Clustal X 软件分析后选取保守区域, 利用 Primer Premier 5.0 设计引物(表 1), 通过反转录 PCR 扩增目的片段, PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。经琼脂糖凝胶回收试剂盒纯化后, 与 TransGen pEASY-T3 Cloning Vector 连接, 转化至 TransI-T1 感受态细

胞, 接种到含 Ampicillin、X-gal 和 IPTG 的培养基培养。挑取白色单菌落培养, 选出重组克隆, 送北京三博远志生物技术有限责任公司测序。

### 1.5 保幼激素酯酶基因 cDNA 的 5'末端和 3'末端的获得

根据克隆得到的目的基因 cDNA 序列片段设计 5'RACE 引物 5'RACE Outer Primer 和 5'RACE Inner Primer, 及 3'RACE Outer Primer 和 Inner Primer 引物(表 1), 采用 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) 试剂盒并严格按照试剂盒说明书进行操作, 扩增得到目的条带, 将克隆测序后的序列利用 DNAMAN 软件拼接获得保幼激素酯酶基因部分 cDNA 序列。

### 1.6 保幼激素酯酶基因序列分析

采用 Genedoc 和 EditSeq 软件进行 DNA 序列分析; 利用 NCBI 的 BLAST 程序进行序列一致性比对分析; 应用 Clustal X 和 Genedoc 进行氨基酸多重联配分析; 聚类树构建采用 MEGA 5.0 软件, 用于构建聚类树的同源基因检索于 GenBank/EMBL 数据库; 在 www.expasy.ch 网站上进行氨基酸功能结构域的分析。

### 1.7 保幼激素酯酶基因的表达分析

采用实时荧光定量 PCR 技术分别检测了烟粉虱 MED 隐种保幼激素酯酶基因和卵黄原蛋白基因 (vg) 在 1, 2 和 3 龄若虫, 伪蛹前、后期以及羽化后 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 和 18 日龄成虫体内的变

表 1 本实验所用引物  
Table 1 Primers for the experiment

引物名称 Primer name	引物序列(5' - 3') Primer sequence	引物用途 Use of primers
JHE-F1	CTCCACATTTACTAGATTACAATTACACCAT	
JHE-R1	ATGGCTTACTCCGAAATTCTCTGTAGAGC	
5'RACE Outer Primer	ACTTGGAAAGGAGCGGTGTGTAGAC	cDNA 序列克隆
5'RACE Inner Primer	CAAGCACATCGGAGGCAAAGTAGA	cDNA cloning
3'RACE Outer Primer	AGCGTCACGATTTCTGGGATGT	
3'RACE Inner Primer	TCCGGTGCCTTACATTTCTCGTCTA	
JHE-F2	AACGCATCTACTTTGCCTCC	
JHE-R2	CAGCGTAACAAAGACGACAT	
β-actin F	TCACCACCACAGCTGAGAGA	实时荧光定量 PCR
β-actin R	CTCGTGATACCGCAAGATT	qRT-PCR
Vg-F	AGCTCTTCCCAGTCCAAC	
Vg-R	CGGATAGAGGCTCCGTT	



化动态, 不同时期样品重复 3 次, 分别取 50 头雌成虫或 200 ~ 300 头若虫提取总 RNA。以  $\beta$ -actin 基因为内参基因, 所用引物序列见表 1, 用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法 (Livak and Schmittgen, 2001) 计算基因的相对表达量。

定量反应体系 (20  $\mu$ L) 如下: 1  $\mu$ L cDNA (稀释 5 倍), 上下游引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 0.5  $\mu$ L, 0.4  $\mu$ L ROX Reference Dye (50  $\times$ ), 10  $\mu$ L  $2 \times$  TransStart<sup>TM</sup> Green qPCR SuperMix 和 7.6  $\mu$ L dd H<sub>2</sub>O。采用 3 步法 PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环, 最后加一个熔解曲线分析。反应在 7500 Real-Time PCR System (ABI) 上进行, 每个样品重复 3 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 烟粉虱 MED 隐种保幼激素酯酶基因的克隆与氨基酸序列分析

根据 NCBI 中黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*、西方蜜蜂 *Apis mellifera*、菜叶蜂 *Athalia rosae* 等其他昆虫 *jhe* 的同源序列设计引物, 采用反转录 PCR 扩增得到目的中间片段, 约为 300 bp。进一步进行 5' RACE 和 3' RACE 扩增, 得到两端序列后拼接, 再设计上下游引物, 经反转录 PCR 扩增到 1 761 bp 的长片段, 经测序验证成功克隆到烟粉虱 MED 隐种 JHE 基因的部分 cDNA 序列 (3' 端已全部获得), 将其命名为 *Btjhe*。

现已获得 *Btjhe* 基因部分开放阅读框 1 659 bp, 编码 552 个氨基酸。该基因推导的氨基酸序列与其他物种同源基因编码的 JHEs 蛋白序列一致性依次为: 菜叶蜂 *A. rosae* 47%, 西方蜜蜂 *A. mellifera* 46%, 美洲散白蚁 *Reticulitermes flavipes* 40%, 埃及伊蚊 *A. aegypti* 41%, 黑腹果蝇 *D. melanogaster* 38%。JHEs 具有羧酸酯酶活性, 特异性地降解昆虫体内呈游离和结合状态的 JH, 在维持昆虫血淋巴 JH 滴度上发挥重要作用。将本研究克隆的 *Btjhe* 基因推导的氨基酸序列与其他物种的同源序列进行多重比对, 发现烟粉虱 MED 隐种 JHE 同样包含其他昆虫保幼激素酯酶所具有的 5 个高度保守的特征性结构域 (图 1), 即一个长疏水结合域 GxSxG, 其他 4 个特殊结构功能域 RF, DQ, E 和 GxxHxxD/E, 其中的 3 个保守模块又分别包涵 3 个催化三分体 S, E 和 H, 由此推测 *Btjhe* 是菜叶蜂等昆虫 *jhe* 的同源基因, 可能编码烟粉虱 MED 隐种保幼激素酯酶。

调用 NCBI 数据库中其他物种的 *jhe* 基因序列和 MEAM1 隐种、ZHJ1 型烟粉虱转录组数据中的 *jhe* 相关序列, 与本研究所克隆的 *Btjhe* 基因进行系统进化分析, 以 MEGA 5.0 构建了 NJ 树 (neighbor-joining tree)。结果表明烟粉虱 MED 隐种 *Btjhe* 与菜叶蜂、西方蜜蜂 *jhe* 系统发生关系较近 (图 2), 这与 *Btjhe* 编码的 JHE 蛋白序列一致性分析结果吻合; 烟粉虱 3 个隐种中 MED 隐种先与 MEAM1 隐种聚为一支, 再与 ZHJ1 型烟粉虱聚在一起, 三者形成一个稳定的进化枝, 其节点处的 Bootstrap 值为 100 (图 2), 说明这 3 个隐种的 *jhe* 基因为直系同源基因。

### 2.2 *Btjhe* 在烟粉虱 MED 隐种不同发育阶段的表达

烟粉虱 MED 隐种 *Btjhe* 在若虫、雌成虫各发育时期均有表达 (图 3)。若虫期 *Btjhe* 的相对表达量较低, 随着若虫龄期的增长, 表达量呈先增高后降低趋势, 在烟粉虱伪蛹前期 (未形成红眼) 达到最高值, 伪蛹后期 (红眼形成后) 基因转录下降到最低水平; *Btjhe* 在成虫期的相对表达量随日龄的增长, 总体上呈先增高后降低趋势, 但在羽化后第 9 天出现小幅降低, 羽化后第 11 天又回升到成虫期的最高值, 随后 *Btjhe* 表达量逐渐降低。*Btjhe* 基因在烟粉虱不同发育阶段的总体表达趋势为成虫大于若虫, 其表达模式与烟粉虱 MED 隐种的 *vg* 表达谱类似, *vg* 相对表达量在若虫期的伪蛹前期最高, 在成虫期羽化后第 11 天达到峰值 (图 3)。

## 3 讨论

昆虫保幼激素是调控生长、发育、变态和生殖最重要的一类激素, 在生殖调控方面的功能具体表现为调控卵巢发育、卵黄蛋白形成及卵子内的沉积、交配和产卵行为等 (Wyatt and Davey, 1996)。如, 在蜜蜂等社会性昆虫种群中, JH 滴度高的雌虫往往具有较高的生殖活力 (Bloch *et al.*, 2000)。参与保幼激素代谢的酶类, 尤其是 JHE 在昆虫的变态和生殖过程中发挥重要作用。JHE 是羧酸酯酶 (carboxylesterases, COEs) 家族的成员, 由脂肪体合成并释放到血淋巴中, 能高度特异性分解血淋巴中与保幼激素结合蛋白 (hemolymph juvenile hormone binding protein, hJHBP) 结合的 JH 以及游离的 JH 分子, 维持昆虫体内的 JH 水平 (Campbell *et al.*, 1998)。

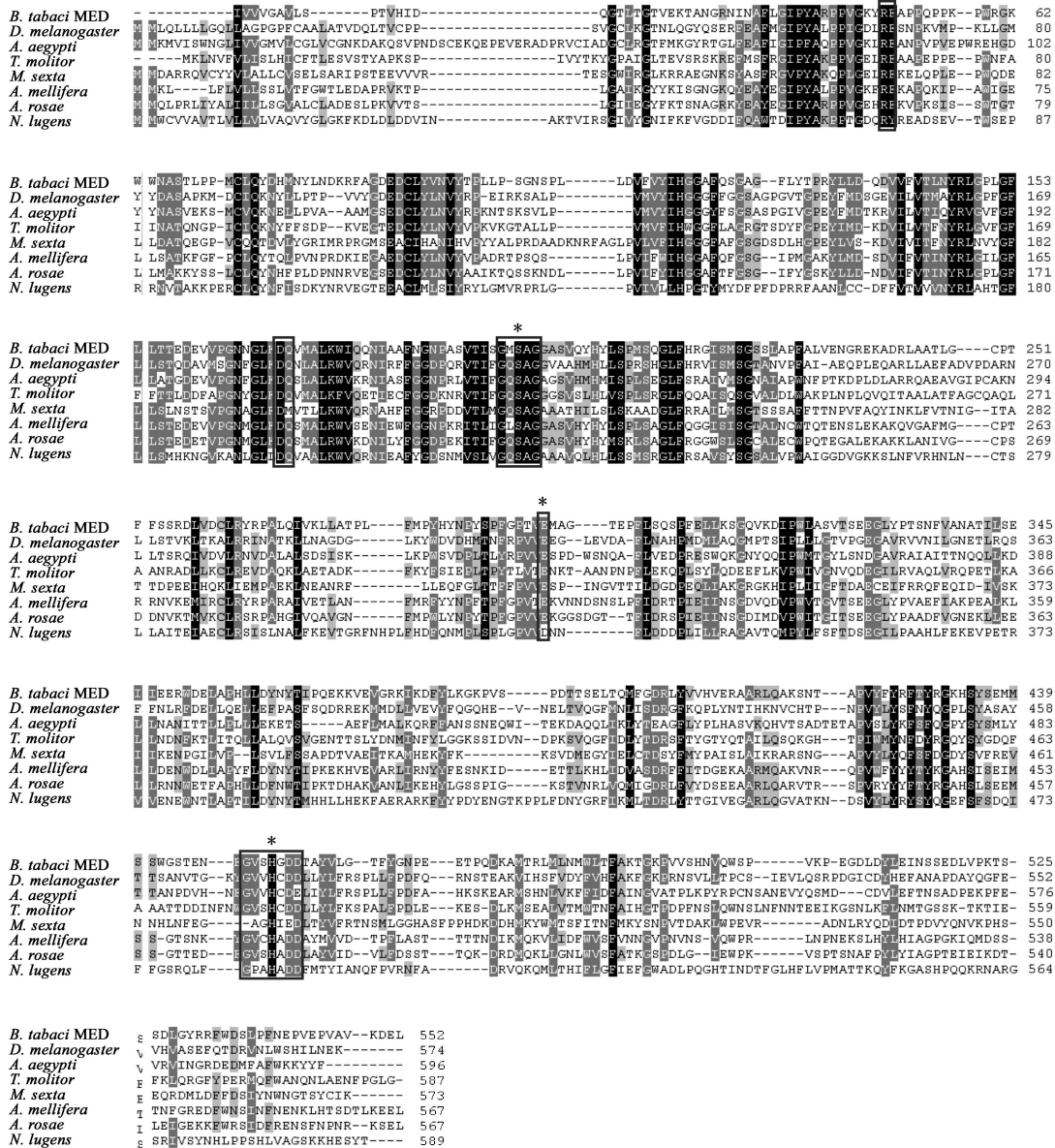


图 1 *Bjthe* 基因的推导氨基酸序列与其同源基因氨基酸序列的多重比对

Fig. 1 Multiple alignment of the deduced amino acid sequence of *Bjthe* and its homologues from other species

各 *jhe* 基因推导的氨基酸序列来源及 GenBank 登录号 The origin of deduced amino acid sequences of the *jhe* genes and their GenBank accession numbers: *A. aegypti*: 埃及伊蚊 *Aedes aegypti*, EAT43357.1; *D. melanogaster*: 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*, AAK07833.1; *T. molitor*: 黄粉虫 *Tenebrio molitor*, AAI41023.1; *A. rosae*: 菜叶蜂 *Athalia rosae*, BAD91554.1; *A. mellifera*: 西方蜜蜂 *Apis mellifera*, NP\_001011563.1; *N. lugens*: 褐飞虱 *Nilaparvata lugens*, ACB14344.1; *M. sexta*: 烟草天蛾 *Manduca sexta*, AAC42021.2. 以 Clustal X 进行多序列比对, 然后进行标注; 黑色阴影表示相同氨基酸, 灰色阴影表示相似氨基酸; 星号代表催化活性位点, 方框标定的序列为羧酸酯酶基因的特征性结构域. Alignments and shading were done using Clustal X. The identical and similar residues are shaded in black and gray, respectively. The catalytic residue Ser, Glu and His are marked with an asterisk. Fingerprint conserved motifs of carboxylesterases are boxed.

多种昆虫的 JHE 蛋白已经得到分离纯化和功能验证。运用亲和层析法从烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* (Hanzlik *et al.*, 1989), 粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* (Jones *et al.*, 1994), 马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* (Vermunt *et al.*, 1997), 云杉卷叶蛾 *Choristoneura fumiferana* (Feng *et al.*,

1999), 黑腹果蝇 *D. melanogaster* (Campbell *et al.*, 2001), 家蚕 *B. mori* (Hirai *et al.*, 2002), 烟草天蛾 *Manduca sexta* (Hinton and Hammock, 2001) 以及黄粉虫 *Tenebrio molitor* (Hinton and Hammock, 2003) 等虫体中分离出 JHE, 并在此基础上克隆 cDNA。研究表明昆虫 JHEs 具有一个长疏水结合域 GxSxG,

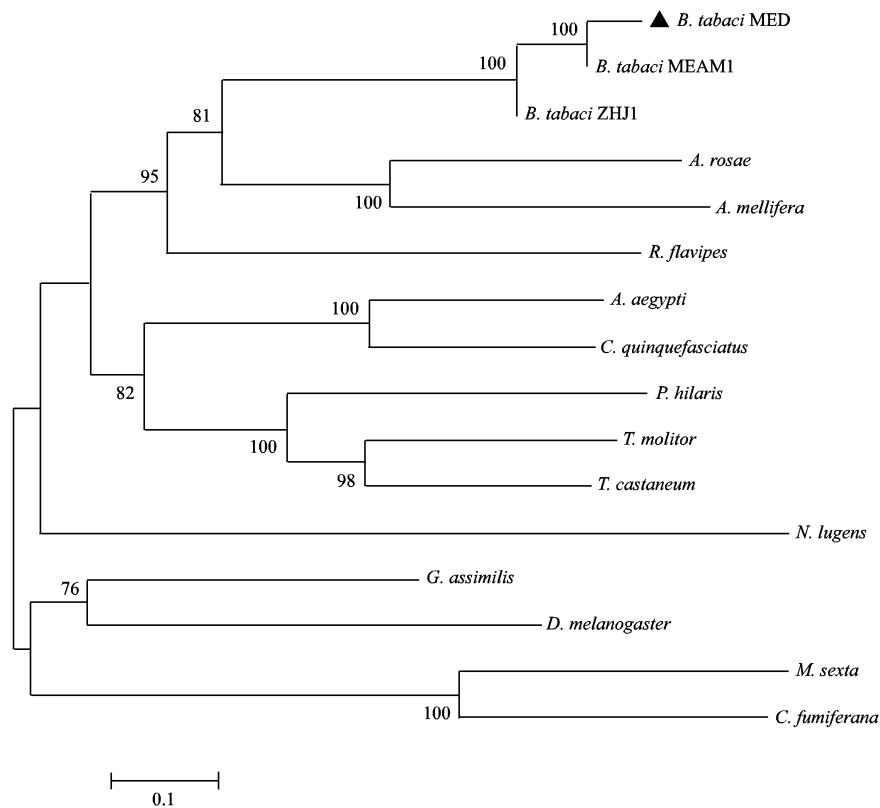


图 2 利用邻接法构建的 *Btjhe* 基因与其同源基因的系统树

Fig. 2 Neighbor-joining phylogenetic tree of *Btjhe* and *jhe* from related species

基于 MEGA 5.0 构建的邻近树, 选取的重要参数为: Kimura 2-Parameter 模型、成对删除 gaps 及 1 000 重复; 节点处仅显示了 >50% 的 Bootstrap 值; 标尺示遗传距离; 黑色三角号代表本实验研究对象烟粉虱 MED 隐种。Kimura 2-Parameter model and pairwise deletion of gaps were selected for the tree reconstruction in the program MEGA 5.0. Bootstrap values (1 000 replicates) >50% are shown. The scale denotes the genetic distance. *Bemisia tabaci* MED is marked by a black triangle. 各 *jhe* 基因来源及 GenBank 登录号为 The origin of the *jhe* genes and their GenBank accession numbers: *B. tabaci* MEAM1: 烟粉虱 MEAM1 隐种 *Bemisia tabaci* MEAM1, HP661505.1; *B. tabaci* MED: 烟粉虱 MED 隐种 *Bemisia tabaci* MED, KC422259; *B. tabaci* ZHJ1: ZHJ1 型烟粉虱 *Bemisia tabaci* ZHJ1, HP822323.1; *T. molitor*: 黄粉虫 *Tenebrio molitor*, AF448479.1; *T. castaneum*: 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*, NM\_001193294.1; *P. hilaris*: 黄星天牛 *Psacothea hilaris*, BAE94685; *A. aegypti*: 埃及伊蚊 *Aedes aegypti*, XM\_001650430; *C. quinquefasciatus*: 致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus*, N251105.1; *G. assimilis*: 黑蟋蟀 *Gryllus assimilis*, EF558769.1; *D. melanogaster*: 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*, AF304352.1; *M. sexta*: 烟草天蛾 *Manduca sexta*, AF327882.2; *C. fumiferana*: 云杉卷叶蛾 *Choristoneura fumiferana*, AF153367.1; *N. lugens*: 褐飞虱 *Nilaparvata lugens*, EU380769.1; *R. flavipes*: 美洲散白蚁 *Reticulitermes flavipes*, GQ180944.1; *A. rosae*: 菜叶蜂 *Athalia rosae*, AB208650.1; *A. mellifera*: 西方蜜蜂 *Apis mellifera*, NM\_001011563.1.

是 COEs 的关键组成部分, 包含一个具催化活性的三分体 S; 其他 4 个特殊保守结构功能域 RF、DQ、E 和 GxxHxxD/E, 囊括 E 和 H 两个催化活性三分体 (Feng *et al.*, 1999; Munyiri and Ishikawa, 2007; Mackert *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008)。本实验结果显示烟粉虱 MED 隐种 JHE 与菜叶蜂、西方蜜蜂等的 JHEs 氨基酸序列一致性较高, 且具有与烟芽夜蛾等相同的氨基酸保守结构域, 由此推测, *Btjhe* 是烟粉虱 MED 隐种的保幼激素酯酶基因, 参与烟粉虱体内保幼激素的特异性降解。在主要模式昆虫中 JHEs 往往与变态发育调控和生殖生理学有关, 而在一些社会性昆虫中, JH 不仅调控昆虫的变态发

育、各级型分化, 还被赋予了新的功能——调控工蜂的分工 (Robinson and Vargo, 1997)。Mackert 等 (2008) 的研究表明, 在幼年工蜂体内 JH 滴度较低, 当工蜂行为由看护向觅食转变后, JH 滴度上升, 保幼激素酯酶基因 *Amjhe-like* 表达量下降, 因此 *Amjhe-like* 可能调控工蜂群由看护向外出觅食行为的转变。此外, *Amjhe-like* 基因编码的 GxSxG 保守模块转变为 GLSAG, 与典型序列 GQSAG 相比第 2 位氨基酸发生突变。本实验克隆到的烟粉虱 MED 隐种 JHE 相应保守模块的序列为 GMSAG, 在第 2 位上也出现了氨基酸的突变, 其具体功能有待进一步的研究证实。功能结构域的改变可能代表激素信

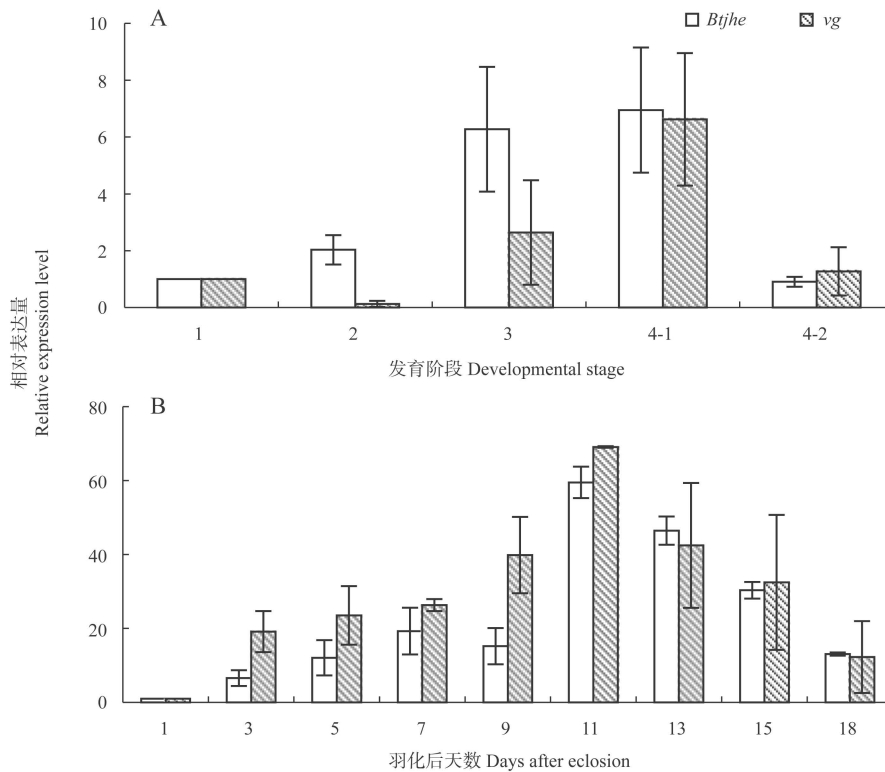


图3 *vg* 和 *Btjhe* 在烟粉虱 MED 隐种若虫(A)以及成虫(B)各时期的表达

Fig. 3 Relative expression level of *vg* and *Btjhe* in nymphs (A) and adults (B) of *Bemisia tabaci* MED

图中数据为平均值  $\pm$  标准误。Data in the figure are mean  $\pm$  SE. A: *vg* 和 *Btjhe* 在若虫各阶段的相对表达量, 以1龄若虫中的表达量作为1, 选取  $\beta$ -actin 作为标准化内参, 用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算相对表达量。The relative expression level of *vg* and *Btjhe* in nymphs is determined by  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method compared with that in the 1st instar nymphs, and  $\beta$ -actin is selected as the housekeeping gene. 1: 1龄若虫 1st instar nymph; 2: 2龄若虫 2nd instar nymph; 3: 3龄若虫 3rd instar nymph; 4-1: 伪蛹前期(未形成红眼)4th instar nymph with non-red eye; 4-2: 伪蛹后期(具红眼)Pseudo-pupa with red eye. B: *vg* 和 *Btjhe* 在成虫各时期的相对表达量, 将羽化后第1天的成虫中的表达量作为1, 选取  $\beta$ -actin 作为标准化内参, 用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算相对表达量。The relative expression level of *vg* and *Btjhe* in adults is determined by  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method compared with that in adults at the 1st day after eclosion, and  $\beta$ -actin is selected as the endogenous control.

号通路功能的调整, 说明保幼激素酯酶在不同昆虫体内的作用途径可能存在差异, 从而具备某些新的功能(Mackert *et al.*, 2008)。

JHE 对控制昆虫体内的 JH 滴度起着重要作用, 因此在昆虫生长发育的某个特定时间段适当地促进或抑制 JHE 的活性可能打乱昆虫体内 JH 水平, 影响正常的生长发育。在烟草天蛾末龄幼虫期添加 JHE 化学抑制剂组分 OTFP (3-octylthio-1, 1, 1-trifluoropropan-2-one), 它能共价结合到烟草天蛾 JHE 保守模块 GxSxG 的丝氨酸位点, 使酯酶活性降低, 虫体内的 JH 未能及时降解, 从而使幼虫不能正常化蛹成为老熟幼虫(Wogulis *et al.*, 2006)。将烟芽夜蛾 *H. virescens* (Bonning *et al.*, 1997), 云杉卷叶蛾 *C. fumiferana* (Feng *et al.*, 1999), 家蚕 *B. mori* (Hirai *et al.*, 2002), 烟草天蛾 *M. sexta* (Hinton and Hammock, 2001) 和黄粉虫 *T. molitor*

(Hinton and Hammock, 2003) 的 JHE 蛋白通过杆状病毒体外表达系统合成, 这些重组 JHE 都具备酯酶活性, 代谢保幼激素的能力和昆虫杆状病毒的杀虫能力都得到提高, 将重组的 JHE 注射进虫体或饲喂幼虫, JHE 蛋白过表达, 显著降低昆虫体内的 JH 滴度, 从而影响昆虫正常的变态发育和生殖。因此 JHE 可以作为未来杀虫剂发展的一个潜在靶标位点。

Guo 等(2012)的研究表明, 烟粉虱卵子发生始于4龄若虫期, 即伪蛹期, 同时开始合成卵黄蛋白, 红眼期就有卵巢管的分化。本实验研究结果表明, *Btjhe* 基因的相对表达量在伪蛹前期(未形成红眼前)达到最高值, 对应时期的 *vg* 基因的相对表达量也最高, 此时卵黄蛋白可能开始摄取和沉积; 保幼激素酯酶特异性降解昆虫体内 JH, 因此这个时期可能存在较低的 JH 滴度。此外, Mackert (2008) 等

的研究也表明, 意大利蜜蜂生活史中 *vg* 和 *Amjhe-like* 的转录动态变化一致, 与 *JH* 滴度呈明显负相关关系。目前对昆虫 *JHE* 的研究多集中在分子生物学、生化特性方面, *JHE* 编码基因的结构与功能的关系尚不明确。本实验对 *jhe* 和 *vg* 基因的转录动态进行了研究, 但未检测烟粉虱生活史中 *JH* 滴度的变化, 若要进一步阐述本实验所克隆到的 *Btjhe* 的功能, 就有必要在今后的研究中将烟粉虱不同发育时期体内的保幼激素滴度、保幼激素酯酶活性动态变化与相关基因转录动态结合起来分析, 日后还可尝试运用外源激素处理与 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术研究保幼激素和 *JHE* 对烟粉虱卵黄发生的影响, 为进一步研究保幼激素及其调控因子在烟粉虱生殖调控中的作用奠定基础。

### 参考文献 (References)

- Bloch G, Borst DW, Huang ZY, Robinson GE, Cnaani J, Hefetz A, 2000. Juvenile hormone titers, juvenile hormone biosynthesis, ovarian development and social environment in *Bombus terrestris*. *J. Insect Physiol.*, 46: 47 – 57.
- Bonning BC, Ward VK, van Meer MMM, Booth TF, Hammock BD, 1997. Disruption of lysosomal targeting is associated with insecticidal potency of juvenile hormone esterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 6007 – 6012.
- Campbell PM, Harcourt RL, Crone EJ, Claudianos C, Hammock BD, Russell RJ, Oakeshott JG, 2001. Identification of a juvenile hormone esterase gene by matching its peptide mass fingerprint with a sequence from the *Drosophila* genome project. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 31: 513 – 520.
- Campbell PM, Oakeshott JG, Healy MJ, 1998. Purification and kinetic characterisation of juvenile hormone esterase from *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 28: 501 – 515.
- Chu D, Wan FH, Zhang YJ, Brown JK, 2010a. Change in the biotype composition of *Bemisia tabaci* in Shandong Province of China from 2005 to 2008. *Environ. Entomol.*, 39(3): 1028 – 1036.
- Chu D, Zhang YJ, Brown JK, Cong B, Xu BY, Wu QJ, Zhu GR, 2006. The introduction of the exotic Q biotype of *Bemisia tabaci* from the Mediterranean region into China on ornamental crops. *Fla. Entomol.*, 89(2): 168 – 174.
- Chu D, Zhang YJ, Cong B, Xu BY, Wu QJ, 2005. Identification for Yunnan Q-biotype *Bemisia tabaci* population. *Chin. Bull. Entomol.*, 42(1): 54 – 56. [褚栋, 张友军, 丛斌, 徐宝云, 吴青君, 2005. 云南 Q 型烟粉虱种群的鉴定. 昆虫知识, 42(1): 54 – 56]
- Chu D, Zhang YJ, Wan FH, 2010b. Cryptic invasion of the exotic *Bemisia tabaci* biotype Q occurred widespread in Shandong Province of China. *Fla. Entomol.*, 93(2): 203 – 207.
- De Barro PJ, Liu SS, Boykin LM, Dinsdale AB, 2011. *Bemisia tabaci*: a statement of species status. *Annu. Rev. Entomol.*, 56: 1 – 19.
- Don-Wheeler G, Engelmann F, 1997. The biosynthesis and processing of vitellogenin in the fat bodies of females and males of the cockroach *Leucophaea maderae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 27 (11): 901 – 918.
- Feng QL, Ladd TR, Tomkins BL, Sundaram M, Sohi SS, Retnakaran A, Davey KG, Palli SR, 1999. Spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) juvenile hormone esterase: hormonal regulation, developmental expression and cDNA cloning. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 148: 95 – 108.
- Ge LQ, Wu JC, 2010. Research progress in insect vitellin and its hormone regulation. *Chin. Bull. Entomol.*, 47(2): 236 – 246. [戈林泉, 吴进才, 2010. 昆虫卵黄蛋白及其激素调控的研究进展. 昆虫知识, 47(2): 236 – 246]
- Gong H, Li QJ, 1992. Vitellogenesis and its hormonal control in the housefly *Musca domestica vicina*. *Acta Entomol. Sin.*, 35(2): 129 – 137. [龚和, 李乾君, 1992. 家蝇的卵黄发生及其激素调节. 昆虫学报, 35(2): 129 – 137]
- Guo JY, Dong SZ, Yang XL, Cheng L, Wan FH, Liu SS, Zhou XP, Ye GY, 2012. Enhanced vitellogenesis in a whitefly via feeding on a begomovirus-infected plant. *PLoS ONE*, 7(8): e43567.
- Guo JY, Ye GY, Dong SZ, Liu SS, 2010. An invasive whitefly feeding on a virus-infected plant increased its egg production and realized fecundity. *PLoS ONE*, 5(7): e11713.
- Hagedorn HH, Kunkel JG, 1979. Vitellogenin and vitellin in insects. *Annu. Rev. Entomol.*, 24: 475 – 505.
- Hanzlik TN, Abdel-Aal YAI, Harshman LG, Hammock BD, 1989. Isolation and sequencing of cDNA clones coding for juvenile hormone esterase from *Heliothis virescens*: evidence for a catalytic mechanism for the serine carboxylesterase different from that of the serine proteases. *J. Biol. Chem.*, 264(21): 12419 – 12425.
- Hinton AC, Hammock BD, 2001. Purification of juvenile hormone esterase and molecular cloning of the cDNA from *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32: 57 – 66.
- Hinton AC, Hammock BD, 2003. Juvenile hormone esterase (JHE) from *Tenebrio molitor*: full-length cDNA sequence, *in vitro* expression, and characterization of the recombinant protein. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 33: 477 – 487.
- Hirai M, Kamimura M, Kikuchi K, Yasukochi Y, Kiuchi M, Shinoda T, Shiotsuki T, 2002. cDNA cloning and characterization of *Bombyx mori* juvenile hormone esterase: an inducible gene by the imidazole insect growth regulator KK-42. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32: 627 – 635.
- Hu J, De Barro J, Zhao H, Wang J, Nardi F, Liu SS, 2011. An extensive field survey combined with a phylogenetic analysis reveals rapid and widespread invasion of two alien whiteflies in China. *PLoS ONE*, 6(1): e16061.
- Jiu M, Zhou XP, Tong L, Xu J, Yang X, Wan FH, Liu SS, 2007. Vector-virus mutualism accelerates population increase of an invasive whitefly. *PLoS ONE*, 2(1): e182.
- Jones G, Venkataraman V, Ridley B, O' Mahony P, Turner H, 1994. Structure, expression and gene sequence of a juvenile hormone esterase-related protein from metamorphosing larvae of *Trichoplusia*



- ni. Biochem. J.*, 302: 827–835.
- Kelly TJ, Adams TS, Schwartz MB, Birnbaum MJ, Rubenstein EC, Imberski RB, 1987. Juvenile hormone and ovarian maturation in the Diptera: a review of recent results. *Insect Biochem.*, 17(7): 1089–1093.
- Li S, Jang RJ, Cao MX, 2004. Metabolism of juvenile hormone. *Acta Entomol. Sin.*, 47(3): 389–393. [李胜, 蒋容静, 曹梅讯, 2004. 保幼激素的代谢. 昆虫学报, 47(3): 389–393]
- Liu SH, Yang BJ, Gu JH, Yao XM, Zhang YX, Song F, Liu ZW, 2008. Molecular cloning and characterization of a juvenile hormone esterase gene from brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *J. Insect Physiol.*, 54: 1495–1502.
- Liu SS, 2012. *Bemisia tabaci* is a species complex. *Chin. J. Biol. Contr.*, 28(4): 466. [刘树生, 2012. 烟粉虱是一个物种复合体. 中国生物防治学报, 28(4): 466]
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. *Methods*, 25: 402–408.
- Mackert A, do Nascimento AM, Bitondi MMG, Hartfelder K, Simões ZLP, 2008. Identification of a juvenile hormone esterase-like gene in the honey bee, *Apis mellifera* L. – Expression analysis and functional assays. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 150: 33–44.
- Munyiri FN, Ishikawa Y, 2007. Molecular cloning and developmental expression of the gene encoding juvenile hormone esterase in the yellow-spotted longicorn beetle, *Psacothoa hilaris*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 37: 497–505.
- Pan HP, Chu D, Ge DQ, Wang SL, Wu QJ, Xie W, Jiao XG, Liu BM, Yang X, Yang NN, Su Q, Xu BY, Zhang YJ, 2011. Further spread of and domination by *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) biotype Q on field crops in China. *J. Econ. Entomol.*, 104(3): 978–985.
- Perring TM, 2001. The *Bemisia tabaci* species complex. *Crop Prot.*, 20: 725–737.
- Raikhel AS, Dhadialla TS, 1992. Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. *Annu. Rev. Entomol.*, 37: 217–251.
- Ramaswamy SB, Shu SQ, Park YI, Zeng FR, 1997. Dynamics of juvenile hormone-mediated gonadotropism in the Lepidoptera. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 35: 539–558.
- Rao Q, Luo C, Zhang H, Guo X, Devine GJ, 2011. Distribution and dynamics of *Bemisia tabaci* invasive biotypes in central China. *Bull. Entomol. Res.*, 101(1): 81–88.
- Riddiford LM, Hiruma K, Zhou XF, Nelson CA, 2003. Insights into the molecular basis of the hormonal control of molting and metamorphosis from *Manduca sexta* and *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 33: 1327–1338.
- Robinson GE, Vargo EL, 1997. Juvenile hormone in adult eusocial Hymenoptera: gonadotropin and behavioral pacemaker. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 35: 559–583.
- Sorge D, Nauen R, Range S, Hoffmann KH, 2000. Regulation of vitellogenesis in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Insect Physiol.*, 46: 969–976.
- Swevers L, Iatrou K, 1999. The ecdysone agonist tebufenozide (RH-5992) blocks the progression into the ecdysteroid-induced regulatory cascade and arrests silkworm oogenesis at mid-vitellogenesis. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 29: 955–963.
- Tufail M, Takeda M, 2009. Insect vitellogenin/lipophorin receptors: molecular structures, role in oogenesis, and regulatory mechanisms. *J. Insect Physiol.*, 55: 88–104.
- Vermunt AMW, Koopmanschap AB, Vlak JM, De Kort CAD, 1997. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding a putative juvenile hormone esterase from the Colorado potato beetle. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 27(11): 919–928.
- Wogulis M, Wheelock CE, Kamita SG, Hinton AC, Whetstone PA, Hammock BD, Wilson DK, 2006. Structural studies of a potent insect maturation inhibitor bound to the juvenile hormone esterase of *Manduca sexta*. *Biochemistry*, 45(13): 4045–4057.
- Wyatt GR, Braun RP, Zhang J, 1996. Priming effect in gene activation by juvenile hormone in locust fat body. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 32: 633–640.
- Wyatt GR, Davey KG, 1996. Cellular and molecular actions of juvenile hormone. II. Roles of juvenile hormone in adult insects. *Adv. Insect Physiol.*, 26: 1–155.
- Yang WJ, Shen GM, Dou W, Wang JJ, 2010. Research progress of insect juvenile hormone esterase. In: Proceedings of Public Plant Protection and Green Prevention and Control – The 2010 Academic Conference of Chinese Society of Plant Protection. 364–369. [杨文佳, 申光茂, 豆威, 王进军, 2010. 昆虫保幼激素酯酶的研究进展. 公共植保与绿色防控——中国植物保护学会 2010 年学术年会. 364–369]

(责任编辑: 赵利辉)