

UV 照射对棉铃虫产卵量及 HMG-CoA 还原酶和卵黄原蛋白基因表达量的影响

王智健 牛长缨

华中农业大学植物科学技术学院, 武汉 430070

摘要 检测紫外光 (ultra violet, UV) 照射后棉铃虫 HMG-CoA 还原酶基因、卵黄原蛋白基因的表达量及棉铃虫产卵量的变化。提取经 UV 照射后棉铃虫雌虫的总 RNA 并反转录为 cDNA。利用荧光定量 PCR (qPCR) 技术检测 HMG-CoA 还原酶基因及卵黄原蛋白基因的表达量。UV 照射后, 统计棉铃虫雌虫的产卵量。结果表明: UV 照射 0.5~5.0 h, 棉铃虫 HMG-CoA 还原酶基因的表达量显著增加; UV 照射 1.0~5.0 h, 24 h 后取样发现棉铃虫卵黄原蛋白基因的表达量显著增加; UV 照射 1.0~4.0 h, 棉铃虫雌虫的产卵量显著增加。研究结果证实 UV 照射能影响棉铃虫 *hmgr*、*vg* 的表达量和雌虫的产卵量。

关键词 棉铃虫; UV 照射; HMG-CoA 还原酶; 卵黄原蛋白; 产卵量

中图分类号 Q 965; S 435.622⁺.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2014)02-0046-05

棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*) 寄主广泛、繁殖迅速、适应力强, 对棉花生产造成严重危害, 是世界性农业害虫, 近年来其发生和危害呈上升趋势。利用黑光灯防治棉铃虫应用较广泛, 对其趋光反应的研究主要集中于趋光的行为特点^[1]、复眼对光的适应变化^[2]、复眼形态及细微结构和复眼视网膜的电生理^[3]。这些研究结果从行为特征和视觉生理方面均证明棉铃虫对紫外光 (ultra violet, UV) 非常敏感, 但其分子调控机制尚不清楚。

研究表明, 经 UV 照射后棉铃虫 3-羟-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (HMG-CoA 还原酶, HMGR) 基因表达量上调^[4]。HMGR 在类异戊二烯的生物合成中发挥着关键作用, 是昆虫体内甲羟戊酸代谢途径的限速酶^[5]。甲羟戊酸代谢途径的终产物是保幼激素、辅酶 Q 和多萜醇, 在昆虫的发育和繁殖过程中发挥着重要的作用, 如调控胚胎发育、抑制昆虫变态及诱导卵黄蛋白原的合成^[6]。有研究发现, 昆虫体内 HMGR 受到抑制后, 其体内保幼激素的生物合成受到抑制, 且导致单个卵巢里的卵量减少, 雌虫的生殖力降低^[7-8]。HMGR 在昆虫的生长发育、胚胎发生和生殖中也发挥重要作用。HMGR 能够引导果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 原始生殖细胞的

转移^[9]; 用 HMGR 抑制剂处理德国小蠊 (*Blattella germanica*)、东亚飞蝗 (*Locusta migratoria*) 后, 昆虫体内保幼激素和卵黄原蛋白的生物合成受到抑制^[8,10-11]; RT-PCR 表明小地老虎 (*Agrotis ypsilon*) HMGR 主要存在于卵巢、脂肪体及咽侧体细胞中^[12]。此外, HMGR 抑制剂-康帕丁 (compactin) 抑制家蚕 (*Bombyx mori*) 和斜纹夜蛾 (*Prodenia litura*) 性信息素的合成^[13]。目前, HMGR 基因 (*hmgr*) 已在果蝇^[14]、德国小蠊^[15]、家蚕^[16]、小地老虎^[12] 和棉铃虫^[17] 等昆虫体内克隆得到。

hmgr 表达量与卵黄原蛋白 (vitellogenin, VG) 的生物合成相关^[12]。VG 是产卵雌性动物特定糖蛋白卵黄前体, 特异地存在于非哺乳类性成熟的卵生雌性动物血液中, 是几乎所有卵生动物卵黄蛋白的前体。VG 为卵巢的发育提供营养, 促进卵母细胞的生长和分化。在昆虫体内, 保幼激素激活脂肪体中卵黄原蛋白的合成, 并促使卵母细胞成熟^[9]。笔者以棉铃虫为材料, 观察 UV 照射后棉铃虫产卵量的变化及其对 HMG-CoA 还原酶和卵黄原蛋白基因表达量的影响, 旨在为深入研究 HMG-CoA 还原酶基因对棉铃虫生殖能力的调控作用提供科学依据。

收稿日期: 2013-10-14

基金项目: 国家自然科学基金项目 (Grant IBN-31071690, 31371945) 和华中农业大学研究生优质课程建设立项项目 (2011KC01)

王智健, 博士研究生。研究方向: 昆虫分子生物学。E-mail: wangzhijian.2009@163.com

通信作者: 牛长缨, 博士, 教授。研究方向: 昆虫生理生化及分子生物学。E-mail: niuchangying88@163.com

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

供试棉铃虫为湖北省农业科学院长期饲养的室内种群。幼虫用人工饲料饲养,化蛹后将雌雄虫分开。将羽化后的成虫置于养虫笼(40 cm×30 cm×30 cm)中,饲喂 10% 的蔗糖水。饲养条件:温度(27±1)℃、相对湿度 70%±10%、光周期 L/D=14/10 h(光期 06:00—20:00,暗期 20:00—06:00)。

1.2 UV 处理

在暗期开始后使棉铃虫成虫充分暗适应 2 h,暗适应结束后对其进行 UV 照射处理,照射强度为 300 μW/cm²。在试验过程中温度保持 28℃,照射时间分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0、5.0 h。对照为一直处于黑暗下的棉铃虫,对照组暗处理时间与试验组照射时间对应。将 UV 照射和暗处理(对照组)后的部分雌虫立即置于液氮中冷冻,然后保存于-80℃冰箱。在 24 h 后再将 UV 照射和暗处理(对照组)后的部分雌虫置于液氮中冷冻,同样保存于-80℃冰箱。每处理 3 次重复。

1.3 棉铃虫总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

根据 RNAiso Plus(宝生物公司)试剂说明书提取冻存于-80℃冰箱样品的总 RNA,经 DNase I(Thermo 公司)去除基因组 DNA 污染,并通过苯酚/氯仿/异戊醇=25/24/1(体积比)抽提,去除蛋白质污染。经过琼脂糖凝胶电泳与核酸蛋白测定仪(Eppendorf 公司)检测后,按照反转录试剂盒(Thermo 公司)说明书进行反转录,获得 cDNA 第一链。

1.4 引物设计和合成

根据 GenBank 上所提供的棉铃虫 *hmgr*(登录号 GU584103)、*vg*(登陆号 JQ723600)的基因序列,并选择棉铃虫 *βactin* 基因为内参基因,利用软件 Primer Premier 5.0 (Premier 公司)设计适用于荧光定量 PCR 的引物。引物序列见表 1。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Primers used in real-time PCR

| 基因名称 Gene name | 引物序列 Primer sequence |
|-------------------|---|
| <i>βactin</i> | (Qactin-F)5'-TCCAGCCCTCATTCTGGGTAT-3' (Qactin-R)5'-CAAGTCCTTACGGATGTCAACA-3' |
| <i>hmgr</i> | (Qhmgr-F)5'-TACAGTAGTGGAGGGAC-3' (Qhmgr-R)5'-ATCAAGGAGGCTAATCGGG-3' |
| <i>vg</i> | (Qvg-F)5'-CGGAGACAAGAAACAGAACAC-3' (Qvg-R)5'-AAGCAATAATGCGGACGAGAAT-3' |

1.5 荧光定量 PCR

将 cDNA 样品稀释成 6 个 10 倍浓度梯度并制作标准曲线,检测目的基因和内参基因的 R^2 值和扩增效率,调整反应体系和反应条件,确保 $R^2 > 0.99$, $90\% < \text{扩增效率}(E) < 110\%$ 。试验使用的荧光定量 PCR 仪为 BioRad iCycler iQ5(Bio-Rad 公司),反应采用 20 μL 体系:7.6 μL ddH₂O, 1.6 μL cDNA 模板, 10 μL SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad 公司),正、反向引物各 0.4 μL。PCR 循环程序:95℃ 30 s;循环条件 95℃ 5 s, 60℃ 30 s, 40 个循环。每处理 3 个技术性重复。

1.6 产卵量统计

棉铃虫将卵产在养虫笼一侧的纱布上,每天更换纱布并统计纱布上卵的数量。将每天的卵量累加,除以养虫笼中的雌虫数,即可得到单雌产卵量。

1.7 数据统计与分析

利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对检测结果进行数据分析(Livak and Schmittgen, 2001),不同处理之间差异利用 SPSS 16.0 软件进行独立样本 *t* 检验。

2 结果与分析

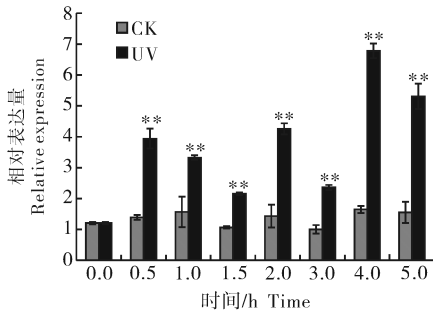
2.1 UV 照射对 *hmgr* 和 *vg* 表达量的影响

在 UV 照射 0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0、5.0 h 后,提取棉铃虫雌虫的总 RNA,qPCR 检测结果显示 *hmgr* 的表达量显著高于对照组(图 1);当 UV 照射 4.0 h 时该基因表达量增加效果最显著,高于对照组 4 倍以上。UV 照射 24 h 后,qPCR 检测结果显示 *hmgr* 的表达量与对照组差异不显著(图 2)。*hmgr* 的表达量在 UV 照射后显著增加,并在 24 h 后恢复到正常水平。UV 照射后,棉铃虫雌虫 *vg* 的表达量在较短时间内并未发生显著变化(图 3),但处理 24 h 后,UV 照射 1.0、1.5、3.0、4.0、5.0 h 后的 *vg* 表达量显著增加(图 4)。

检测结果表明:经 UV 照射后,棉铃虫雌虫的 *hmgr* 表达量增加,UV 照射 24 h 后 *hmgr* 表达量与对照组无显著差异;UV 照射后,棉铃虫雌虫的 *vg* 表达量与对照组无显著差异,UV 照射 24 h 后 *vg* 表达量增加。

2.2 UV 照射对棉铃虫生殖力的影响

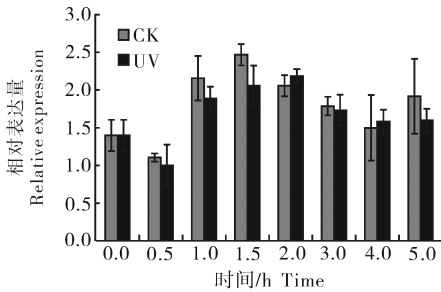
生殖力检测结果表明,UV 照射后棉铃虫雌虫的产卵量有所增加,UV 照射 1.0、1.5、2.0、3.0、4.0 h 后的雌虫产卵量分别增长 31%、21%、32%、35%、25%(图 5)。



UV 照射后,立即提取样品 RNA;柱状图代表平均值±SE,星号表示有显著性差异(独立样本 *t* 检验, ** $P<0.01$)。The sample was collected after UV light irradiation immediately. Histograms represent mean±SE, asterisks represent significant differences (independent sample *t* test, ** $P<0.01$).

图 1 UV 照射后 *hmgr* 的相对表达量

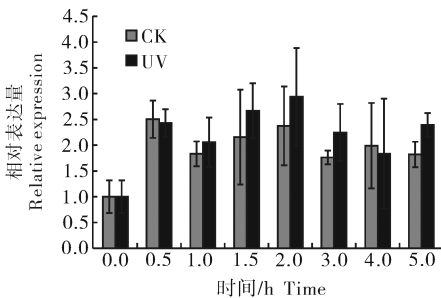
Fig. 1 Relative expression of *hmgr* after UV light irradiation



UV 照射 24 h 后,提取样品 RNA;柱状图代表平均值±SE(独立样本 *t* 检验)。The sample was collected 24 h later after UV light irradiation. Histograms represent mean±SE (independent sample *t* test).

图 2 UV 照射 24 h 后 *hmgr* 的相对表达量

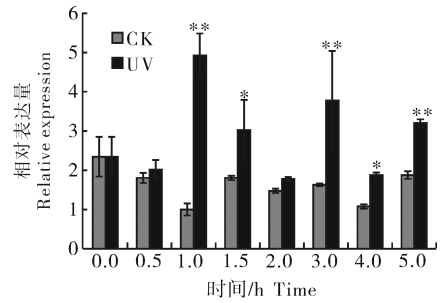
Fig. 2 Relative expression of *hmgr* after UV light irradiation 24 h later



UV 照射后,立即提取样品 RNA;柱状图代表平均值±SE(独立样本 *t* 检验)。The sample was collected after UV light irradiation immediately. Histograms represent mean±SE (independent sample *t* test).

图 3 UV 照射后 *vg* 的相对表达量

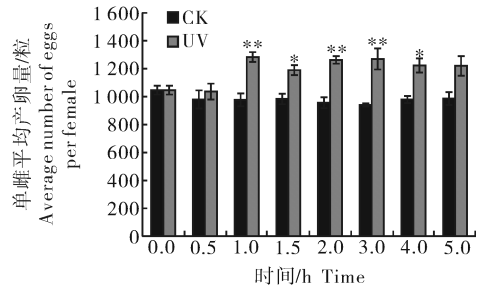
Fig. 3 Relative expression of *vg* after UV light irradiation



UV 照射 24 h 后,提取样品 RNA;柱状图代表平均值±SE,星号表示有显著性差异(独立样本 *t* 检验, * $P<0.05$, ** $P<0.01$)。The sample was collected 24 h later after UV light irradiation. Histograms represent mean±SE, asterisks represent significant differences (independent sample *t* test, * $P<0.05$, ** $P<0.01$).

图 4 UV 照射 24 h 后 *vg* 的相对表达量

Fig. 4 Relative expression of *vg* after UV light irradiation 24 h later



所有处理设置 3 个重复。柱状图代表平均值±SE,星号表示有显著性差异(独立样本 *t* 检验, * $P<0.05$, ** $P<0.01$)。All the experiments were triplicated. Histograms represent mean±SE, asterisks represent significant differences (independent sample *t* test, * $P<0.05$, ** $P<0.01$).

图 5 UV 照射对棉铃虫生殖力的影响

Fig. 5 Effect of UV light irradiation on the fecundity of *H. armigera*

3 讨论

为阐明 UV 照射与棉铃虫雌虫产卵量的关系,本试验观察并分析了 UV 照射对生殖相关基因表达量的影响。试验结果表明,在 UV 照射后,棉铃虫雌虫 *hmgr* 基因表达量随即显著增加,*vg* 的表达量在处理 24 h 后增加。*hmgr* 和 *vg* 基因有重要的生物学功能,本试验结果可为进一步研究 *hmgr* 和 *vg* 对昆虫生殖的调控作用提供理论依据。

紫外线辐射是一种最常见的、几乎能对所有生物造成影响的非生物胁迫。孟建玉等^[4]认为诱虫灯的 UV 光源对昆虫也是一种环境胁迫因子,采用蛋

白质组学的方法研究了 UV 胁迫对棉铃虫成虫体内总蛋白表达的影响,结果表明棉铃虫成虫在 UV 照射 1 h 后,体内 HMGR 表达上调。本试验结果表明,UV 照射棉铃虫后棉铃虫体内 *hmgr* 表达量显著升高,且在 24 h 后体内 *hmgr* 表达量恢复到正常水平,首次在分子水平证实 UV 照射与棉铃虫 *hmgr* 的转录表达相关。

hmgr 在德国小蠨雌虫脂肪体中大量表达, HMGR 水平和酶活力在德国小蠨的生殖周期中期达到高峰,且与 VG 的生物合成水平平行^[18]。这证实甲羟戊酸通路与卵黄原蛋白的合成有关。利用 RNAi 技术干扰棉铃虫 *hmgr*, 会导致 *vg* 表达量发生下降,并降低雌虫产卵量^[17]。此外,甲羟戊酸代谢通路终产物之一的保幼激素(JH)可调节雌虫生殖和 VG 的生物合成,但作用机制尚不清楚^[19]。在某些昆虫中,外源的 JH 可介导 VG 在脂肪体中的合成^[20],并有研究证实在赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*)中 JH 调节 *vg* 的合成^[21]。本试验结果表明,在 *hmgr* 表达升高 24 h 后,*vg* 发生显著升高,证实 *vg* 的表达可能受 *hmgr* 的调控。当 UV 照射棉铃虫 1~4 h,导致棉铃虫产卵量显著增加,表明棉铃虫的产卵量与 *hmgr* 的表达量成正比。VG 是昆虫生殖中的主要营养物质,VG 调节雌虫生殖已在果蝇等昆虫中被证实^[22]。结合本试验结果,推测由于 *hmgr* 在 UV 照射后表达量升高,影响 JH 的生物合成,导致 *vg* 表达量发生变化,进而影响到昆虫的生殖。

张长禹^[23]的研究结果表明,棉铃虫处于环境胁迫下时,其体内用于生殖和寿命能量的分配存在补偿效应。此外,棉铃虫为了保护自身免受 UV 照射带来的损伤,增强了虫体的抗氧化防御系统^[4],这种应答反应也可能会消耗机体的大量能量。在 UV 照射条件下,昆虫的抗氧化防御系统和生殖力均表现为增强,根据生活史理论推测,这种现象必然导致生存力在一定程度上降低。当棉铃虫接受 UV 照射后,其子代幼虫需要经过较长的时间才能进入蛹期,这表明 UV 照射对棉铃虫子代的幼虫期有负面效应。

目前,已有研究证实 UV 照射对棉铃虫而言是一种胁迫因子^[4,24],而生物体会通过明显延长其发育历年来减少环境胁迫带来的负面效应,这在一定程度上可以补偿对生长发育造成的有害效应,是适应环境的一种策略。本研究结果证实 UV 照射影

响 *hmgr* 和 *vg* 的表达量,并影响雌虫的产卵量,这可为进一步研究昆虫在光胁迫条件下 *hmgr* 基因的调控作用提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] 李典谟,马幼飞.夜蛾趋光特性的研究——复眼反射光的变化和上等概率分析[J].昆虫学报,1977,20:128-134.
- [2] 丁岩钦,高慰曾,李典谟.夜蛾趋光特性的研究:棉铃虫和烟青虫成虫对单色光的反应[J].昆虫学报,1974,17:307-317.
- [3] EGUCHI E. Retinular fine structure in compound eyes of diurnal and nocturnal sphingid moths [J]. Cell Tissue Res, 1982, 223:29-42.
- [4] MENG J Y, ZHANG C Y, ZHU F, et al. Ultraviolet light-induced oxidative stress: effects on antioxidant response of *Helicoverpa armigera* adults [J]. J Insect Physiol, 2009, 55:588-592.
- [5] GOLDSTEIN J L, BROWN M S. Regulation of the mevalonate pathway [J]. Nature, 1990, 343:425-430.
- [6] NIJHOUT H F. Genes on the wing [J]. Science, 1994, 265:44-45.
- [7] ZAPATA R, MARTIN D, PIULACHS M D, et al. Effects of hypocholesterolaemic agents on the expression and activity of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in the fat body of the German cockroach [J]. Arch Insect Biochem Physiol, 2002, 49:177-186.
- [8] ZAPATA R, PIULACHS M D, BELLES X. Inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase lower fecundity in the German cockroach: correlation between the effects on fecundity *in vivo* with the inhibition of enzymatic activity in embryo cells [J]. Pest Manag Sci, 2003, 59:1111-1117.
- [9] SANTOS A C, LEHMANN R. Isoprenoids control germ cell migration downstream of HMGCoA reductase [J]. Dev Cell, 2004, 6:283-293.
- [10] MARTIN D, PIULACHS M D, BELLES X. Inhibition of vitellogenin production by allatostatin in the German cockroach [J]. Mol Cell Endocrinol, 1996, 121:191-196.
- [11] DEBERNARD S, ROSSIGNOL F, COUILLAUD F. The HMG-CoA reductase inhibitor fluvastatin inhibits insect juvenile hormone biosynthesis [J]. Gen Comp Endocrinol, 1994, 95: 92-98.
- [12] DUPORTETS L, BELLES X, ROSSIGNOL F, et al. Molecular cloning and structural analysis of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase of the moth *Agrotis ipsilon* [J]. Insect Mol Biol, 2000, 9:385-392.
- [13] OZAWA R, MATSUMOTO S, KIM G H, et al. Intracellular signal transduction of PBAN action in lepidopteran insects: inhibition of sex pheromone production by compactin, an HMG CoA reductase inhibitor [J]. Regul Pept, 1995, 57:319-327.
- [14] GERTLER F B, CHIU C Y, RICHTER-MANN L, et al. Developmental and metabolic regulation of the *Drosophila melano-*

- gaster 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase [J]. *Mol Cell Biol*, 1988, 8: 2713-2721.
- [15] MARTINEZ-GONZALEZ J, BUESA C, PIULACHS M D, et al. Molecular cloning, developmental pattern and tissue expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase of the cockroach *Blattella germanica* [J]. *Eur J Biochem*, 1993, 213: 233-241.
- [16] KINJOH T, KANEKO Y, ITOYAMA K, et al. Control of juvenile hormone biosynthesis in *Bombyx mori*: cloning of the enzymes in the mevalonate pathway and assessment of their developmental expression in the corpora allata [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2007, 37: 808-818.
- [17] WANG Z, DONG Y, DESNEUX N, et al. RNAi silencing of the HMG-CoA reductase gene inhibits oviposition in the *Helicoverpa armigera* cotton bollworm [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e67732.
- [18] CASALS N, BUESA C, PIULACHS M D, et al. Coordinated expression and activity of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase and reductase in the fat body of *Blattella germanica* (L.) during vitellogenesis [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 1996, 26: 837-843.
- [19] ZHANG J, WYATT G R. Cloning and upstream sequence of a juvenile hormone-regulated gene from the migratory locust [J]. *Gene*, 1996, 175: 193-197.
- [20] COMAS D, PIULACHS M D, BELLES X. Fast induction of vitellogenin gene expression by juvenile hormone III in the cockroach *Blattella germanica* (L.) (Diptera, Blattellidae) [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 1999, 29: 821-827.
- [21] PARTHASARATHY R, SUN Z, BAI H, et al. Juvenile hormone regulation of vitellogenin synthesis in the red flour beetle, *Tribolium castaneum* [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2010, 40: 405-414.
- [22] ISAAC P G, BOWNES M. Ovarian and fat-body vitellogenin synthesis in *Drosophila melanogaster* [J]. *Eur J Biochem*, 1982, 123: 527-534.
- [23] 张长禹. UV胁迫下棉铃虫生殖补偿研究及 Hsps 基因的克隆与表达 [D]. 武汉: 华中农业大学图书馆, 2010.
- [24] MENG J Y, ZHANG C Y, LEI C L. A proteomic analysis of *Helicoverpa armigera* adults after exposure to UV light irradiation [J]. *J Insect Physiol*, 2010, 56: 405-411.

Influence of ultraviolet light irradiation on HMG-CoA reductase, vitellogenin mRNA expression and oviposition of *Helicoverpa armigera*

WANG Zhi-jian NIU Chang-ying

College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University,
Wuhan 430070, China

Abstract The objective of this study is to investigate the relative expression of HMG-CoA reductase (*hmgr*) and vitellogenin (*vg*) mRNA of *Helicoverpa armigera* adults under UV light irradiation, together with the fecundity variation of UV light irradiation group. Quantitative real-time PCR (qPCR) technique was applied to detect the expression of *hmgr* and *vg* of *H. armigera* of the UV light irradiation group. Total RNA was extracted from the whole body of *H. armigera*, and synthesized to cDNA via reverse transcription. Specific primers on *hmgr*, *vg* and β -actin in GenBank were used to carry out qPCR. In addition, this study also recorded the number of the eggs for female adults after UV light irradiation. The expression of *hmgr* of *H. armigera* significantly increased after the exposure to UV light irradiation from 0.5 h to 5.0 h, which was higher than that of control after UV light irradiation, while the *vg* expression increased 24 h later after UV light irradiation. The results also suggest that the fecundity of female adults significantly increased after UV treatment of 1.0 h to 4.0 h. This study is the first analysis of differentially expressed mRNAs in phototactic insects under UV light irradiation conditions and gives new insights into the adaptation mechanisms responsive to UV light irradiation stress.

Key words *Helicoverpa armigera*; UV light irradiation; HMG-CoA reductase; vitellogenin; oviposition

(责任编辑:陈红叶)