

白背飞虱 *ttk* 结构特点及在若虫中的表达*

杨梅, 冯博, 王方海

有害生物控制与资源利用国家重点实验室 / 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275

摘要: *ttk* 基因转录产物为重要的转录因子, 可以调控生物体的发育、分化、性行为等。本研究从自建的转录组数据库中比对到一条来源于白背飞虱 (*Sogatella furcifera*) *ttk* 的 cDNA 序列, 全长为 1 657 bp, 其开放阅读框序列为 1 377 bp, 编码由 458 个氨基酸组成的蛋白质, 具有典型的 BTB 结构域和锌指结构。系统进化树显示白背飞虱 *ttk* 与六星灯蛾 (*Zygaena filipendulae*)、温带臭虫 (*Cimex lectularius*) 和褐飞虱 (*Nilaparvata lugens*) 的同源性较近。定量检测结果显示, *ttk* 在 1 龄若虫期含量较高, 2 龄则下降到较低的水平, 从 3 龄开始, 随着龄期的增长, 表达量则逐渐增加, 到 5 龄若虫时, *ttk* 表达量是 3 龄若虫的 2 倍多。这是第一次详细报道白背飞虱 *ttk* 基因的结构和表达水平, 为今后进一步研究该基因的具体生物学功能提供了基础。

关键词: tramtrack (*ttk*); 白背飞虱 (*Sogatella furcifera*); 若虫; 基因表达

中图分类号: Q965 **文献标志码:** A **文章编号:** 2097-0137 (2023) 02-0047-04

The *ttk* gene structural characteristics of *Sogatella furcifera* and its expression level in nymphs

YANG Mei, FENG Bo, WANG Fanghai

State Key Laboratory for Biocontrol and Institute of Entomology, School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China

Abstract: Tramtrack (*ttk*) gene transcription products are important transcription factors, which can regulate the development, differentiation and sexual behavior of organisms. In this study, a 1 657 bp cDNA sequence of *ttk* was identified from the transcriptome database of *Sogatella furcifera*. The open reading frame is 1 377 bp in length and encodes a protein composed of 458 amino acids. It has a typical BTB domain and a zinc finger structure. The phylogenetic tree shows that *ttk* of *S. furcifera* is closely homologous to that of *Zygaena filipendulae*, *Cimex lectularius* and *Nilaparvata lugens*. Quantitative detection results showed that the transcriptional level of *ttk* was higher in the 1st instar nymphs, but decreased to a lower level in the 2nd instar nymphs. From the 3rd instar, *ttk* expression increased gradually with instar growth, and at the 5th instar nymphs, *ttk* expression was more than twice as high as that in the 3rd instar nymphs. This is the first in detail investigation on *ttk* gene structure of white backed planthopper, and the results provide a foundation for further and function and regulation study of *ttk* gene, in the growth and development of rice planthopper in the future.

Key words: tramtrack (*ttk*); *Sogatella furcifera*; nymph; gene expression

ttk 为 tramtrack 的简写, 最早是在果蝇中发现的 (Harrison et al., 1990), 该基因转录产物为重要

的转录因子, 含有典型的锌指模体结构, 其 N 末端则带有 BTB 结构域 (broad-complex、tramtrack、

* 收稿日期: 2022-07-08

录用日期: 2022-08-05

网络首发日期: 2022-11-08

基金项目: 广东省自然科学基金 (2021A1515012402); 广州市科技计划项目 (202002030019)

作者简介: 杨梅 (1997 年生), 女; 研究方向: 昆虫生物化学与分子生物学; E-mail: fengb27@mail2.sysu.edu.cn

通信作者: 王方海 (1965 年生), 男; 研究方向: 昆虫生物化学与分子生物学; E-mail: lsswf@mail.sysu.edu.cn

bric-a-brac), 也称为 POZ(poxvirus and zinc finger) 结构域。POZ 结构域由 120 个左右, 且多数为疏水性的氨基酸组成, 其三维空间结构由 4 段 α 螺旋和连接螺旋间的 β 折叠组成, 为能与其他蛋白发生相互作用的典型特征性结构体(Albaglio et al., 1995; Siggs et al., 2012)。POZ 结构域不但可以参与形成同源二聚体和蛋白质互作, 也能改变染色质的结构, 引起某些基因的激活或抑制(Bonchuk et al., 2011; Chaharbakhshi et al., 2016)。目前该类基因已发现多种, 功能多样, 对于有机体的发育、分化、性行为等过程的调节具有相当重要的作用。如研究发现在果蝇中该基因参与神经系统的分化(Simon et al., 2019; Wohl et al., 2020)、调节卵泡成熟及排卵(Knapp et al., 2019)、参与雄性求偶行为调节(Sato et al., 2019; Ishii et al., 2020)等。随着测序技术的不断发展, 已测定和发布的昆虫类基因组序列愈来愈多, 导致许多昆虫 *ttk* 基因被发现(Cheng et al., 2014; Huang et al., 2019), 但除了果蝇之外, 其他昆虫中有关 *ttk* 基因的结构和功能则研究报道的很少, 特别在水稻害虫中, 该类基因的结构和功能都是未知, 有待研究。

白背飞虱(*Sogatella furcifera*)为水稻重要害虫, 属昆虫纲、半翅目、飞虱科(Ali et al., 2017)。名称源于其成虫的前胸背板以及中胸背板都为白色(唐楠, 2017)。生活史由卵期、1 至 5 龄的若虫期和成虫期 3 个阶段组成, 成虫有翅二型现象。我们首先测定获得了白背飞虱的转录组数据, 从中搜索比对到白背飞虱 *ttk* 基因 cDNA 序列, 然后具体分析白背飞虱 *ttk* 的结构特点, 并采用荧光定量 PCR 方法测定了 *ttk* 在 5 个不同龄期的若虫体内的表达水平。研究结果有助于加深对农业害虫 *ttk* 基因的结构特点和表达水平的了解, 为进一步研究 *ttk* 在水稻害虫中的生物学功能打下前期基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

白背飞虱采自广州周边的水稻田, 在实验室条件下[温度(28±2) °C、相对湿度 70%、光周期为 16 h 光照:8 h 黑暗]。已连续饲养繁殖多代。选取不同龄期的若虫各 10 头, 冻存在-80 °C 的冰箱中待用。

我们以白背飞虱为材料测序获得的转录组数据在 NCBI 的登录号为 SRP192671。根据注释, 在转录组数据中找到包含有白背飞虱 *ttk* 基因的序列

片段, 序列号 c53168_c4_g1_i3, 长度为 1 657 bp。

1.2 开放阅读框分析

ttk 的开放阅读框序列使用 NCBI 的 ORF finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 网上软件进行分析。

1.3 同源序列验证和进化树图谱

通过 BLAST 工具搜索白背飞虱 *ttk* 的同源序列, 并使用 Mega 7 软件通过 NJ 法绘制进化树图谱。

1.4 预测保守结构域

白背飞虱 *ttk* 的保守结构域的预测是基于 NCBI 的网上保守结构域数据库进行的。具体网址为: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>。

1.5 定量 PCR

从各个龄期若虫样品中利用 Trizol 试剂盒提取总 RNA, 然后按照反转录试剂盒 PrimeScript™ RT Master Mix (TaKaRa, 日本) 的说明书指引进行 cDNA 的反转录合成, 接着使用软件 Primer Premier 5.0 设计 *ttk* 的特异引物

F:TCCTGGTTTGAAATCCCTT,

R:CAACTCACCATCGACAAT,

内参基因为 β -actin (NCBI 的登录号为 NC_004354.4), 实验采用 SYBR green qRT-PCR 方法, 重复 3 次。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法处理实验结果, SPSS 26 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 开放阅读框在线分析

对包含 *ttk* 序列的白背飞虱 c53168_c4_g1_i3 片段进行开放阅读框在线分析。结果表明, 共发现 16 个开放阅读框, 其中最大的一个开放阅读框长度为 1 377 bp, 编码 458 个氨基酸(图 1)。

2.2 同源序列的验证

结果表明白背飞虱 *ttk* 基因的开放阅读框序列与许多昆虫的 *ttk* 序列同源度较高, 且和相近的水稻害虫褐飞虱的同源性最高。对来源于 15 种昆虫的 *ttk* 蛋白序列, 用 Mega 7 进行同源度相关分析(表 1), 白背飞虱与六星灯蛾(*Zygaena filipendulae*)、温带臭虫(*Cimex lectularius*)和褐飞虱(*Nilaparvata lugens*)等有较高的同源度。构建出的进化树中显示出不同昆虫来源的 TTK 比较保守, 且亲缘关系最近的是白背飞虱和六星灯蛾的 TTK(图 2)。

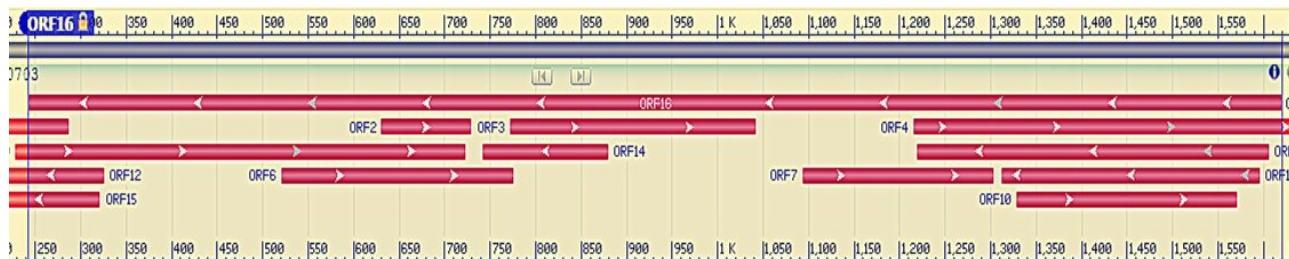


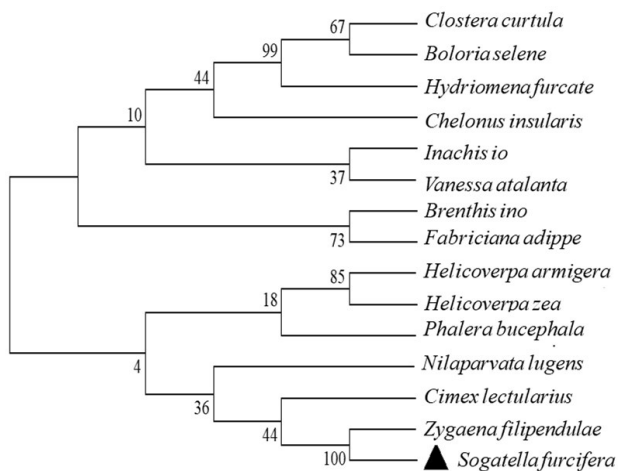
图 1 *ttk* 基因的开放阅读框预测

Fig. 1 Open reading frame prediction of *ttk* gene

表 1 不同物种 TTK 的氨基酸登录号

Table 1 TTK accession numbers of amino acid from different species

学名	登录号
<i>Nilaparvata lugens</i>	XM_039439950.1
<i>Cimex lectularius</i>	XM_014388728.2
<i>Phalera bucephala</i>	LR990617.1
<i>Chelonus insularis</i>	XM_035092273.1
<i>Clostera curtula</i>	FR997798.1
<i>Brenthis ino</i>	OV170223.1
<i>Fabriciana adippe</i>	FR989984.1
<i>Helicoverpa armigera</i>	XM_021336800.1
<i>Helicoverpa zea</i>	XM_047182814.1
<i>Boloria selene</i>	HG993133.1
<i>Nymphalis io</i>	LR989897.1
<i>Vanessa atalanta</i>	XM_047686211.1
<i>Hydriomena furcata</i>	OU538826.1
<i>Vanessa atalanta</i>	LR990551.1
<i>Zygaena filipendulae</i>	OU015651.1



白背飞虱 *ttk* 所在位置用 ▲ 标识。

图 2 白背飞虱 *ttk* 系统发育树分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of *ttk* of *Sogatella furcifera* and other homologous sequences from insects

2.3 保守结构域的分析

结果发现白背飞虱 *ttk* 含有典型的锌指模体结构和 BTB 结构域, 即具有 *ttk* 的典型特征(图 3)。

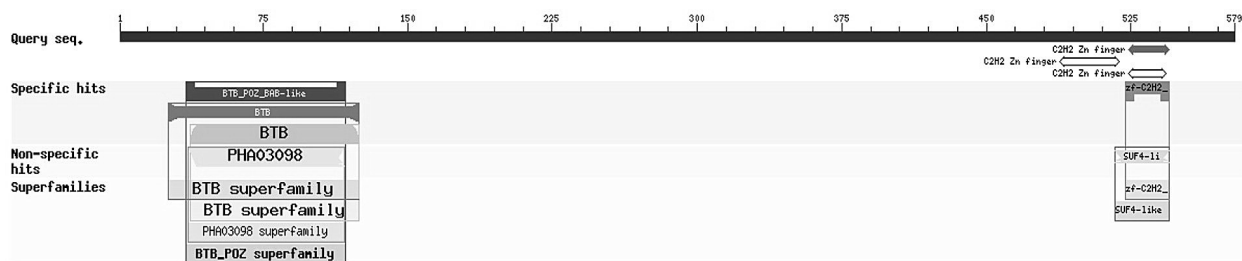


图 3 白背飞虱 *ttk* 的保守结构域

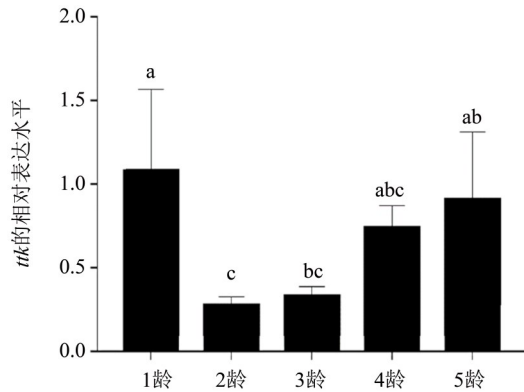
Fig. 3 The conserved domains of *ttk* gene of *Sogatella furcifera*

2.4 *ttk* 的若虫表达水平

在白背飞虱中, *ttk* 在 1 龄若虫期含量较高, 2 龄则下降到较低的水平, 且差异达到显著水平。从 3 龄开始, 随着龄期的增长, 表达量也逐渐增加, 到 5 龄若虫时, *ttk* 表达量达到较高水平, 是 3 龄若虫的 2 倍多(图 4)。

3 讨论

本研究首先测定获得了白背飞虱转录组数据, 并从中搜索比对到相应的白背飞虱 *ttk* 的 cDNA 序列, 进一步采用开放阅读框分析, 获得的开放阅读框序列全长 1 377 bp, 编码的蛋白质由 458 个氨



数值以平均值±标准差表示($n=3$),
不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

图4 *ttk* 基因在若虫期的表达水平

Fig. 4 The expression level of *ttk* genes at nymph stage

氨基酸组成, 包含有 *ttk* 的典型结构: BTB 结构域和锌指结构。BTB 结构域定义了一个基因家族, 主

参考文献:

- 唐楠, 2017. 白背飞虱基因组测序及其受南方水稻黑条矮缩病毒感染的转录组分析[D]. 合肥: 中国科学技术大学.
- 杨梅, 何静怡, 林佳, 等, 2020. 昆虫母体效应基因功能研究进展[J]. 应用昆虫学报, 57(3): 568-573.
- ALBAGLI O, DHORDAIN P, DEWEINDT C, et al, 1995. The BTB/POZ domain: A new protein-protein interaction motif common to DNA and act in binding proteins [J]. Cell Growth and Differ, 6: 1193-1198.
- ALI E, LIAO X, YANG P, et al, 2017. Sublethal effects of buprofezin on development and reproduction in the white-backed planthopper, *Sogatella furcifera* (Hemiptera: Delphacidae)[J]. Sci Rep, 7(1): 16913.
- BONCHUK A, DENISOV S, GEORGIEV P, et al, 2011. *Drosophila* BTB/POZ domains of “*ttk* group” can form multimers and selectively interact with each other[J]. J Mol Biol, 412(3): 423-436.
- CHAHARBAKHSHI E, JEMC J C, 2016. Broad-complex, tramtrack, and bric-à-brac (BTB) proteins: Critical regulators of development[J]. Genesis, 54(10): 505-518.
- CHENG D J, QIAN W L, MENG M, et al, 2014. Identification and expression profiling of the BTB domain-containing protein gene family in the silkworm, *Bombyx mori* [J]. Int J Genomics, 2014:865065.
- HARRISON S D, TRAVERS A A, 1990. The tramtrack gene encodes a *Drosophila* finger protein that interacts with the *ftz* transcriptional regulatory region and shows a novel embryonic expression pattern [J]. EMBO J, 9 (1) : 207-216.
- HUANG J F, FANG L, WANG S, et al, 2019. Molecular cloning, expression profiling, and functional analysis of a broad-complex isoform 2/3 (Br-Z2/Z3) transcription factor in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) [J]. Arch Insect Biochem and Physiol, 101(2): e21549.
- ISHII K, WOHL M, DESOUZA A, et al. 2020. Sex-determining genes distinctly regulate courtship capability and target preference via sexually dimorphic neurons [J]. eLife, 9: e52701.
- KNAPP E M, LI W, SUN J J, 2019. Downregulation of homeodomain protein cut is essential for *Drosophila* follicle maturation and ovulation [J]. Development, 146 (18): dev179002.
- SATO K, GOTO J, YAMAMOTO D, 2019. Sex mysteries of the fly courtship master regulator fruitless [J]. Fron Behav Neurosci, 13: 245.
- SIGGS O M, BEUTLER B, 2012. The BTB-ZF transcription factors[J]. Cell Cycle, 11(18): 3358-3369.
- SIMON F, RAMAT A, LOUVET-VALLÉE S, et al, 2019. Shaping of *Drosophila* neural cell lineages through coordination of cell proliferation and cell fate by the BTB-ZF transcription factor tramtrack-69 [J]. Genetics, 212(3) : 773-788.
- WOHL M, ISHII K, ASAHINA K, 2020. Layered roles of fruitless isoforms in specification and function of male aggression-promoting neurons in *Drosophila* [J]. eLife, 9:e52702.
- ZOLLMAN S, GODT D, PRIVÉ G G, et al, 1994. The BTB domain, found primarily in zinc finger proteins, defines an evolutionarily conserved family that includes several developmentally regulated genes in *Drosophila* [J]. Proc Nat Acad Sci USA, 91(22): 10717-10721.

要位于锌指蛋白的N末端, 并且在从果蝇到哺乳动物的进化上是保守的(Zollman et al., 1994)。系统进化树显示白背飞虱 *ttk* 与六星灯蛾、温带臭虫、褐飞虱等有较高的同源性。这是第一次详细报道白背飞虱 *ttk* 基因的结构, 有助于加深对农业害虫 *ttk* 基因的结构特点和表达水平的了解, 为进一步研究 *ttk* 在水稻害虫中的生物学功能打下前期基础。

定量PCR检测表明 *ttk* 在白背飞虱1龄若虫期含量较高, 2龄则下降到较低的水平, 从3龄开始, 随着龄期的增长, 表达量则逐渐增加。为何 *ttk* 在白背飞虱1龄若虫期含量较高? 由于雌成虫中有许多基因大量表达并输送到卵中储存和发挥作用(杨梅等, 2020), 故我们推测白背飞虱卵中存有大量母源的 *ttk* 表达的 mRNA, 且到1龄若虫时, 这些 mRNA 还远未耗尽, 故能在1龄若虫期检测到较高的 *ttk* 表达水平。具体情况还有待实验进一步证实。