



多巴脱羧酶对异色瓢虫生殖力的调控机制

陈旭^{1,2}, 田仁斌¹, 徐庆宣¹, 李姝¹, 王甦¹, 臧连生², 肖达^{1,*}

(1. 北京市农林科学院植物保护环境保护研究所, 北京 100097;

2. 贵州大学, 绿色农药与农业生物工程教育部重点实验室, 贵阳 550025)

摘要: 【目的】为了探究多巴脱羧酶(DOPA decarboxylase, DDC)对异色瓢虫 *Harmonia axyridis* 生殖力的影响及其调控机制。【方法】利用 RNA 干扰技术(RNA interference, RNAi), 将异色瓢虫 4 龄幼虫的 DDC 基因(*HaDDC*)抑制表达, 成虫羽化后第 8 天开始统计 20 d 内累计产卵量及产卵后第 3 天统计子代卵孵化率。同时解剖异色瓢虫雌成虫卵巢, 观察比较处理组(ds*HaDDC* 注射组)和对照组(ds*GFP* 注射组)羽化后第 8 天成虫卵巢组织形态并统计卵巢管数量; 观察比较处理组和对照组羽化后第 14 和 20 天成虫卵巢管中卵的发育情况。【结果】异色瓢虫雌雄成虫 *HaDDC* 基因均通过 RNAi 被抑制表达后, 成虫 20 d 内累计产卵量为 38.67 ± 7.80 粒, 与对照组(371.33 ± 84.31 粒)相比显著降低; 雌成虫或雄成虫 *HaDDC* 基因被抑制表达后, 20 d 内累计产卵量分别为 135.50 ± 28.38 和 76.00 ± 14.00 粒, 均与对照组差异显著。 *HaDDC* 基因均被抑制表达的雌雄成虫交配后, 其子代卵孵化率为 0。异色瓢虫成虫羽化后第 8 天, 处理组中雌虫的卵巢组织形态和卵巢管数量与对照组无显著差异。羽化后第 14 天的异色瓢虫成虫卵巢形态饱满, 双侧卵巢管中有卵母细胞发育, 但与对照组相比, 处理组卵巢组织中未见成熟的卵粒。【结论】基于上述研究结果, 初步判断多巴脱羧酶通过参与异色瓢虫卵母细胞到成熟卵粒的发育过程, 进而调控其生殖力。

关键词: 异色瓢虫; 多巴胺; 多巴脱羧酶; RNAi; 生殖力

中图分类号: Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2022)01-0001-09

Regulatory mechanism of DOPA decarboxylase (DDC) on fecundity in *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae)

CHEN Xu^{1,2}, TIAN Ren-Bin¹, XU Qing-Xuan¹, LI Shu¹, WANG Su¹, ZANG Lian-Sheng², XIAO Da^{1,*} (1. Institute of Plant and Environment Protection, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China; 2. Key Laboratory of Green Pesticide and Agricultural Bioengineering, Ministry of Education, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract 【Aim】The objective of this research is to explore the effects of DOPA decarboxylase (DDC) on fecundity in the multicolored Asian beetle, *Harmonia axyridis*, and its regulatory mechanism. 【Methods】RNA interference (RNAi) was used to suppress the expression of DDC gene (*HaDDC*) in the 4th instar larvae of *H. axyridis*, and the cumulative number of eggs laid in 20 d was counted from the 8th day after adult emergence and the egg hatching rate of offspring was recorded on the 3rd day after egg laying. Then the ovaries of female adults of *H. axyridis* were dissected, the ovarian tissue morphology and the number of ovarioles of the 8-day-old adults between the treatment group (injected with ds*HaDDC*) and the control group (injected with ds*GFP*), and the development of eggs in the ovarioles of the 14- and 20-day-old adults between the treatment group and the control group were observed and

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(31801794); 北京市农林科学院科技创新能力建设专项(KJCX20200110); 北京市科技计划课题(Z201100008020014)

作者简介: 陈旭, 女, 1994 年 5 月生, 黑龙江黑河人, 博士研究生, 研究方向为农业有害生物控制, E-mail: chen_xuu@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: xiaoda@ipebaafs.cn

收稿日期 Received: 2021-06-06; **接受日期** Accepted: 2021-08-13

recorded. 【Results】After the expression of *HaDDC* gene of both sexes of *H. axyridis* was inhibited by RNAi, the cumulative number of eggs laid by adults in 20 d was 38.67 ± 7.80 , which was significantly lower than that of the control group (371.33 ± 84.31). After the expression of *HaDDC* gene in female and male adults was inhibited, the cumulative numbers of eggs laid in 20 d were 135.50 ± 28.38 and 76.00 ± 14.00 , respectively, which were significantly different from that of the control group. The egg hatching rate of offspring was 0 when the expression of *HaDDC* gene in both sexes was inhibited. On the 8th day after emergence of *H. axyridis*, the ovarian tissue morphology and the number of ovarioles in the treatment group were not significantly different from the control. On the 14th day after adult emergence, the ovaries of *H. axyridis* were plump, and the oocytes were developed in the bilateral ovarioles. However, compared with the control group, no mature eggs were found in the treatment group. 【Conclusion】Based on the above results, we can preliminarily conclude that DDC can regulate the fecundity of *H. axyridis* by participating in the development process from oocyte to mature eggs.

Key words: *Harmonia axyridis*; dopamine; DOPA decarboxylase; RNAi; fecundity

异色瓢虫 *Harmonia axyridis* 属于鞘翅目 (Coleoptera) 瓢虫科 (Coccinellinae), 是农业和林业上一种重要的捕食性天敌昆虫, 对蚜虫、叶螨、介壳虫等重要害虫具有很强的捕食能力 (Koch, 2003; 王甦等, 2007; 唐斌等, 2014)。异色瓢虫也是典型的多型性物种, 其成虫鞘翅表型变化丰富, 由黑色 [黑底型 (melanic)] 或淡黄色 [黄底型 (succinic)] 作为底色, 镶嵌以红色或黑色圆点状色块 (Bezzarides *et al.*, 2007)。据不完全统计, 异色瓢虫鞘翅色斑有 200 多种 (Ando *et al.*, 2018)。近年来, 围绕异色瓢虫色型多样性形成机制的研究逐渐增多, 谈家桢先生认为异色瓢虫鞘翅表型的变异是黑色素与非黑色素 (类胡萝卜素衍生物) 的分布范围与布局的更动引起的, 这与其鞘翅黑化过程中鞘翅内部体液中的酶有相关性 (庚镇城和谈家桢, 1980); True (2003) 研究认为异色瓢虫鞘翅颜色的变异可能是昆虫表皮的黑化现象; Chen 等 (2019) 研究证明多巴胺黑色素是异色瓢虫鞘翅黑色素的主要成分, 且在实验中发现干扰了编码黑色素合成过程中的关键酶——多巴脱羧酶 (DOPA decarboxylase, DDC, EC 4.1.1.28) 的基因表达后, 异色瓢虫雌虫的生殖力明显下降。但目前, 多巴脱羧酶对于异色瓢虫生殖的具体调控机制还未见报道。

多巴脱羧酶 (DDC) 是黑色素合成过程中关键转化酶 (Hiruma and Riddiford, 2009), 除了参与昆虫表皮的黑色素合成过程, 还与昆虫胚胎发育、幼虫蜕皮、表皮骨化等有关 (Arakane *et al.*, 2009; Wang S *et al.*, 2013; Sterkel *et al.*, 2019)。多巴脱羧酶主要存在于昆虫的表皮、神经系统和卵巢细胞中 (Wang MX *et al.*, 2013), 催化多巴 (dihydroxyphenylalanine,

DOPA) 生成多巴胺 (dopamine, DA), 而多巴胺是生物体内重要的神经递质, 参与昆虫的各种生命活动, 它也是昆虫生长发育过程中不可或缺的生物胺之一 (Hodgetts and O'Keefe, 2006)。多巴胺可以参与调节昆虫的求偶行为和生殖行为 (姜宏健等, 2020), 还可以与其他生物胺和激素协同互作, 调节社会性昆虫的生殖行为及性别转化 (Harano *et al.*, 2005, 2008)。目前, 多巴胺对于昆虫生殖的调控机制在果蝇 *Drosophila* 中的研究较为透彻。多巴胺与蜕皮激素 (molting hormone, MH)、保幼激素 (juvenile hormone, JH) 和章鱼胺 (octopamine, OA) 之间的互作, 不仅可以调节昆虫的生殖行为, 还可以调节卵细胞的发育 (姜宏健等, 2020)。而这种互作的实现, 通常依赖于调节关联基因表达和酶的活性。

本实验利用基因 RNA 干扰技术 (RNA interference, RNAi) 对异色瓢虫的多巴脱羧酶基因进行表达干扰, 统计分析成虫产卵量和子代卵的孵化率, 并对卵巢进行解剖, 对卵巢组织形态及卵巢管的发育进行研究。以期阐明多巴脱羧酶对异色瓢虫生殖力的调控机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

异色瓢虫为北京市农林科学院植物保护环境保护研究所室内定殖种群。提供蚕豆蚜 *Aphis curviness* 为食物对异色瓢虫试验种群进行扩繁。具体流程如下: 种植蚕豆苗, 对豆蚜进行扩繁, 待豆蚜种群扩繁到适宜的密度时将其放入养虫笼中, 随后接入异色瓢虫的初孵幼虫。放置于温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 相对湿度

70% ±5%,光周期 16L: 8D 条件下饲养(Chen *et al.*, 2019)。

1.2 试验器材

冰箱、温湿度计、透明养虫盒(长×宽×高=13 cm×13 cm×8.0 cm)、培养皿(直径: 5.0 cm)、小型养虫盒(直径: 6.0 cm,高: 2.5 cm)、养虫笼(长×宽×高=50 cm×45 cm×45 cm,尼龙网: 120 目)、玻璃研磨器(5 mL)、显微注射系统 Nanoject II (World Presion Instruments)、MJ Research PTC-100 PCR 仪(MJ Research Inc.)、Kodak 电泳凝胶成像仪、高速冷冻离心机、Power/PAC 3000 型电泳仪、NanoDrop One 超微量紫外分光光度计等。

1.3 主要试剂

Trizol 试剂为 Invitrogen 公司产品。cDNA 合成

试剂盒为 TaKaRa 公司产品。QIAEX II Gel Extraction Kit 切胶回收试剂盒和 QIAquick PCR 产物纯化试剂盒为 QIAGEN 公司产品。MEGAscript® RNAi 试剂盒为 Ambion 公司产品。氯仿、吡啶橙、1×PBS缓冲液、异丙醇、75%乙醇(用 RNase-free 水配制)均购自 Sigma 公司。

1.4 双链 RNA 的合成

1.4.1 引物设计: 根据 NCBI 中提供的异色瓢虫多巴脱羧酶基因(*HaDDC*) (GenBank 登录号: KU820948) 和绿色荧光蛋白基因(*GFP*) 的序列信息,利用在线引物设计网站 E-RNAi(<http://www.dkfz.de/signaling/e-rnai3/idseq.php>) 设计引物。具体引物信息如表 1 所示。

表 1 dsRNA 合成所用引物序列
Table 1 Sequence of primers used for dsRNA synthesis

引物 Primers	引物序列(5'-3') Primer sequences	产物长度(bp) Product size
dsGFP(T7) -F	taatacgactcactatagggaCAGTGCTCAGCCGCTAC	288
dsGFP(T7) -R	taatacgactcactatagggaGTTACCTTGATGCCGTTC	
dsHaDDC(T7) -F	taatacgactcactataggGTATAAGGAGAGGCCGGTTT	385
dsHaDDC(T7) -R	taatacgactcactataggGTAGCTTCACTCGAGTCCC	

表中引物序列中小写字母表示 T7 启动子序列。Small letters of primer sequences in the table indicate T7 promoter sequence.

1.4.2 总 RNA 提取与 cDNA 第 1 链的合成: 将异色瓢虫 4 龄幼虫单头放入玻璃匀浆器中,加入 1 mL TRIzol 试剂。室温下放置 5 min 后,将其充分匀浆。按照 Trizol 试剂说明书提取总 RNA,然后使用 NanoDrop One 分光光度计检测 RNA 浓度和纯度(ng/μL)。根据 PrimeScript™ RT Master Mix 试剂盒说明书进行反转录合成 cDNA,产物于 -20℃ 冰箱保存备用。

1.4.3 含 T7 启动子序列的双链 RNA(dsRNA) 合成模板的制备: 以异色瓢虫 cDNA 为模板,利用含有 T7 启动子序列的引物进行双链 RNA(dsRNA) 模板的扩增。PCR 反应程序: 95℃ 1 min; 94℃ 30 s, 70-60℃ 30 s, 72℃ 30 s, 11 个循环; 94℃ 30 s, 65℃ 30 s, 72℃ 30 s, 30 个循环; 72℃ 10 min。利用琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,利用 QIAEX II Gel Extraction Kit 试剂盒进行切胶回收目的片段产物,然后以回收产物为模板,继续扩增目的片段,PCR 反应程序: 94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 65℃ 30 s, 72℃ 45 s, 35 个循环; 72℃ 10 min。确认目的条带大小正确,无特异性扩增。采用 QIAquick PCR 产物

纯化试剂盒进行 PCR 产物的纯化,NanoDrop One 分光光度计进行浓度检测。

1.4.4 dsRNA 的制备: 根据 MEGAscript® RNAi 试剂盒的说明书,以 1.4.3 节所得的模板 DNA 为模板,在体外转录合成 *GFP* 和 *HaDDC* 的双链 RNA。利用 NanoDrop One 检测 dsRNA 浓度,放置于 -80℃ 冰箱保存备用。

1.5 显微注射

收集异色瓢虫 4 龄幼虫,将其放入玻璃培养皿中并加入灭菌水浸泡。10 min 后取出幼虫进行显微注射 ds*GFP*(对照组) 和 ds*HaDDC*(处理组),注射量为 300 ng/头。注射部位为幼虫背部倒数第 1 或第 2 个节间膜处。每个处理注射幼虫 40 头,3 个生物学重复。已经注射的幼虫放入干净的培养皿中,放置于标准的饲养条件下饲养。

1.6 生殖力检测

待幼虫羽化为成虫后,根据表型选取黑底四窗型异色瓢虫成虫进行交配,具体操作如下(图 1):

(1) 注射 ds*GFP* 雄虫×注射 ds*GFP* 雌虫(G-M + G-F);

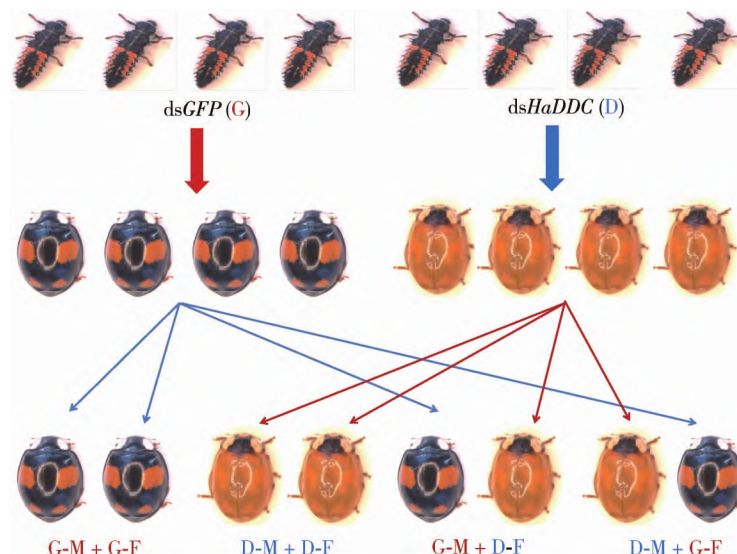


图1 *HaDDC* 被 RNAi 后异色瓢虫生殖力检测

Fig. 1 Fecundity test in *Harmonia axyridis* after RNAi of *HaDDC*

G-M + G-F: 注射 dsGFP 雄虫 × 注射 dsGFP 雌虫 Male injected with dsGFP × female injected with dsGFP; D-M + D-F: 注射 dsHaDDC 雄虫 × 注射 dsHaDDC 雌虫 Male injected with dsHaDDC × female injected with dsHaDDC; G-M + D-F: 注射 dsGFP 雄虫 × 注射 dsHaDDC 雌虫 Male injected with dsGFP × female injected with dsHaDDC; D-M + G-F: 注射 dsHaDDC 雄虫 × 注射 dsGFP 雌虫 Male injected with dsHaDDC × female injected with dsGFP. 向 4 龄幼虫显微注射 300 ng/头 dsGFP 和 dsHaDDC 进行 RNAi, 成虫羽化后第 1 天根据表型进行交配。RNA interference experiment was conducted by microinjecting with 300 ng/individual of dsHaDDC and dsGFP, respectively, into the 4th instar larvae, and the adults were mated on the 1st day after emergence according to the phenotype. 下同。The same below.

(2) 注射 dsHaDDC 雄虫 × 注射 dsHaDDC 雌虫 (D-M + D-F);

(3) 注射 dsGFP 雄虫 × 注射 dsHaDDC 雌虫 (G-M + D-F);

(4) 注射 dsHaDDC 雄虫 × 注射 dsGFP 雌虫 (D-M + G-F)。

每个处理有 3 对瓢虫, 3 个生物学重复。从羽化第 8 天后收集并开始记录产卵量, 统计 20 d 内累计产卵量, 产卵后第 3 天统计子代卵孵化率。

1.7 异色瓢虫卵巢组织解剖与染色

待注射了 dsHaDDC 和 dsGFP 的 4 龄幼虫羽化为成虫后, 按照雌雄 1:1 的比例分别放入养虫盒中, 每个养虫盒中共 30 头成虫。分别在羽化第 8, 14 和 20 天时进行解剖。将异色瓢虫雌成虫放置于琼脂糖凝胶培养皿中, 腹部朝上并用标本针插入胸部第 2 节将其固定, 随后加入 1 × PBS 缓冲液, 用镊子将腹部延中间小心剖开, 分离卵巢组织, 然后用 1 × PBS 缓冲液冲洗卵巢上的脂肪体。将冲洗完毕的卵巢放到新的载玻片上, 然后加入一滴吡啶橙染料 (0.02 mg/mL), 将其浸没。将载玻片放入培养箱中, 37℃ 避光染色 15 min。染色结束后, 将卵巢组织用 1 × PBS 缓冲液冲洗 2 次, 然后将冲洗完毕的卵巢组织放入新的载玻片上, 加入 1 × PBS 缓冲液。

用荧光显微镜观察卵巢的形态和卵巢管的发育情况, 统计卵巢管数量并拍照记录。

1.8 数据分析

利用 Excel 软件对各试验所得观测值进行统计分析, 获得平均值和标准误。利用 SigmaPlot 进行作图。数据统计分析采用单因素方差分析 (SPSS V22)。

2 结果

2.1 抑制 HaDDC 表达对异色瓢虫产卵量的影响

异色瓢虫具有非常敏感的 RNAi 效应 (Xiao *et al.*, 2020)。将注射了 dsGFP 和 dsHaDDC 的 4 龄幼虫在标准条件下饲养, 成虫羽化后第 1 天根据表型进行配对, 第 8 天开始记录产卵量, 结果如图 2 所示: 注射 dsGFP 雄虫与注射 dsGFP 雌虫 (G-M + G-F) 交配后, 20 d 内累计产卵量达到 371.33 ± 84.31 粒。相比之下, 注射 dsHaDDC 雄虫与注射 dsHaDDC 雌虫 (D-M + D-F) 交配后, 20 d 内累计产卵量仅为 38.67 ± 7.80 粒, 显著低于对照组 ($P < 0.05$)。注射 dsGFP 雄虫与注射 dsHaDDC 雌虫 (G-M + D-F) 交配后, 20 d 内累计产卵量为 135.50 ± 28.38 粒, 与对照组差异显著 ($P < 0.05$)。注射 dsHaDDC 雄虫与注

射 *dsGFP* 雌虫 (D-M + G-F) 交配后, 20 d 内累计产卵量为 76.00 ± 14.00 粒, 与对照组差异显著 ($P < 0.05$)。除此之外, 我们在试验过程中还观察到对照组 (G-M + G-F) 所产的卵是聚集在一起的卵块, 而雌雄虫均注射 *dsHaDDC* 的处理组 (D-M + D-F) 的卵, 不聚集成卵块, 而是散落在实验容器中。

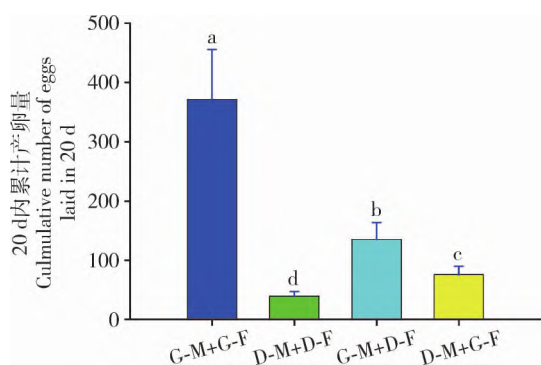


图2 RNAi 介导的基因沉默抑制异色瓢虫 4 龄幼虫 *HaDDC* 表达对成虫产卵量的影响

Fig. 2 Effects of RNAi-mediated gene silencing of *HaDDC* in the 4th instar larvae of *Harmonia axyridis* on the fecundity of adults

注射了 *dsGFP* 和 *dsHaDDC* 的 4 龄幼虫在标准条件下饲养, 成虫羽化后第 1 天根据表型进行配对, 羽化后第 8 天开始记录 20 d 内累计产卵量, 产卵后第 3 天统计子代卵孵化率。图中数据为平均值 $\pm$ 标准误; 柱上不同小写字母代表显著差异 ($P < 0.05$, 单因素方差分析)。图 3 同。The 4th instar larvae injected with *dsGFP* and *dsHaDDC* were reared under standard conditions. The adults were mated according to the phenotype on the 1st day after emergence, the fecundity (cumulative number of eggs laid in 20 d) was recorded from the 8th day after emergence and the egg hatching rate of offspring was counted on the 3rd day after oviposition. Data in the figure are mean $\pm$ SE. Different small letters above bars indicate significant differences ($P < 0.05$, one-way ANOVA). The same for Fig. 3

2.2 抑制 *HaDDC* 表达对异色瓢虫子代卵孵化率的影响

对 2.1 节成虫所产的卵 3 d 后统计记录其孵化率, 结果如图 3 所示: 对照组注射 *dsGFP* 雄虫与注射 *dsGFP* 雌虫 (G-M + G-F) 交配后, 子代卵孵化率达 $72.80\% \pm 1.38\%$; 雌雄虫均注射 *dsHaDDC* (D-M + D-F) 交配后, 所产的卵均未孵化; 注射 *dsGFP* 雄虫与注射 *dsHaDDC* 雌虫 (G-M + D-F) 交配后, 子代卵孵化率为 $33.89\% \pm 2.38\%$, 显著低于对照组 ($P < 0.05$); 注射 *dsHaDDC* 雄虫与注射 *dsGFP* 雌虫 (D-M + G-F) 交配后, 子代卵孵化率仅为 $2.91\% \pm 0.56\%$, 显著低于对照组 ($P < 0.05$)。

2.3 抑制 *HaDDC* 表达对异色瓢虫卵巢组织形态的影响

选取异色瓢虫 4 龄幼虫, 分别注射 *dsGFP* 和

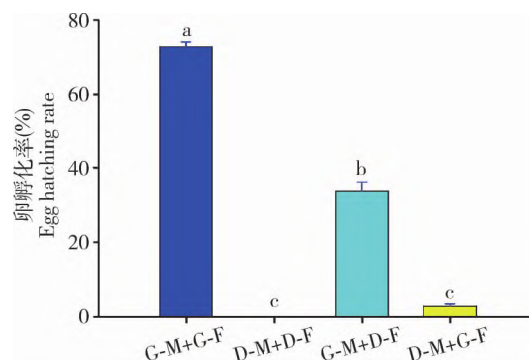


图3 RNAi 介导的基因沉默抑制异色瓢虫 4 龄幼虫 *HaDDC* 的表达对子代卵孵化率的影响

Fig. 3 Effects of RNAi-mediated gene silencing of *HaDDC* in the 4th instar larvae of *Harmonia axyridis* on the egg hatching rate of offspring

dsHaDDC 后放入养虫室中饲养, 在其羽化后第 8 天对雌成虫卵巢进行解剖并拍照记录。结果如图 4 所示: 注射 *dsHaDDC* 的雌成虫卵巢形态和大小与注射 *dsGFP* 的对照组相比无明显差异。

在上述同批的实验试虫中选取羽化后第 8 天的雌成虫对其卵巢组织进行解剖, 统计双侧卵巢中卵巢管的数量, 结果如图 5 所示: 注射 *dsGFP* 的对照组雌成虫卵巢管数量为 63.95 ± 9.22 根, 注射 *dsHaDDC* 的处理组雌成虫卵巢管数量为 59.19 ± 9.65 根, 两者无显著差异 ($P > 0.05$)。

2.4 抑制 *HaDDC* 表达对异色瓢虫卵发育的影响

异色瓢虫在羽化后 15 d 左右开始产卵, 我们选择羽化后第 14 天雌成虫对其卵巢进行解剖, 结果发现: 注射 *dsGFP* 的对照组雌成虫卵巢形态饱满, 双侧卵巢管中均有卵母细胞发育, 其中可见 2 粒成熟的卵粒 (图 6: A), 除此之外, 我们在解剖卵巢过程中还观察到有散落的成熟卵粒; 注射 *dsHaDDC* 的处理组雌成虫卵巢形态也比较饱满, 双侧卵巢管中也有卵母细胞发育, 但是未见已经明显成熟的卵粒 (图 6: B)。

异色瓢虫羽化后 20 d 左右进入产卵高峰期, 我们选择羽化后第 20 天雌成虫对其卵巢进行解剖, 结果表明: 注射 *dsGFP* 的对照组雌成虫卵巢形态饱满, 卵巢管中可见大量卵母细胞发育 (图 6: C); 注射 *dsHaDDC* 的处理组雌成虫卵巢形态较为饱满, 卵巢管中仅见少量卵母细胞发育 (图 6: D)。

3 讨论

昆虫高效的繁殖能力不仅是害虫暴发成灾的原

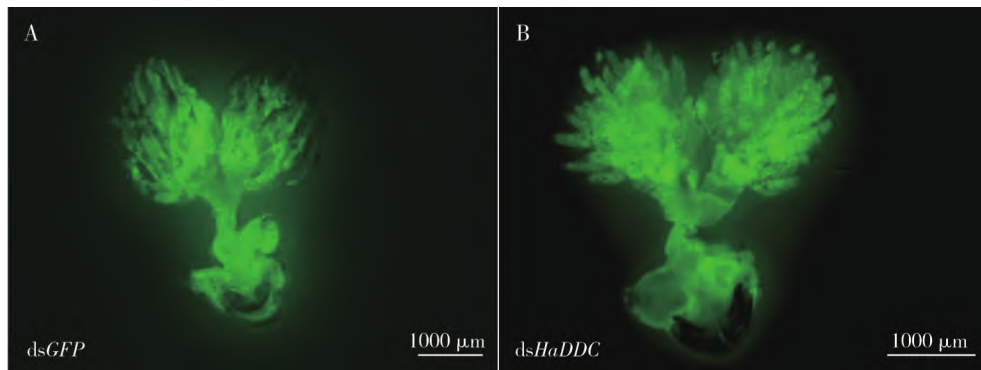


图4 RNAi 介导的基因沉默抑制异色瓢虫 4 龄幼虫 *HaDDC* 的表达对雌成虫卵巢发育的影响

Fig. 4 Effects of RNAi-mediated gene silencing of *HaDDC* in the 4th instar larvae of *Harmonia axyridis* on the ovarian development of female adults

A: 对照组, 注射 *dsGFP* 的 4 龄幼虫羽化后第 8 天的成虫卵巢 Ovary of the 8-day-old adult emerged from the 4th instar larva injected with *dsGFP* in the control group; B: 处理组, 注射 *dsHaDDC* 的 4 龄幼虫羽化后第 8 天的成虫卵巢 Ovary of the 8-day-old adult emerged from the 4th instar larva injected with *dsHaDDC* in the treatment group. 图 5 同。The same for Fig. 5.

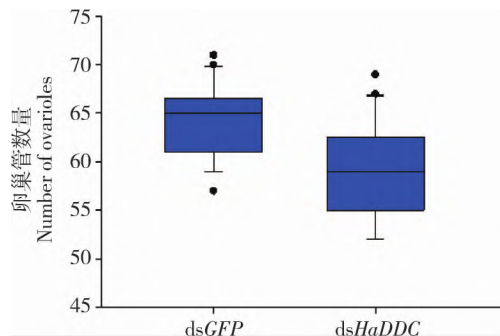


图5 RNAi 介导的基因沉默抑制异色瓢虫 4 龄幼虫 *HaDDC* 的表达对雌成虫双侧卵巢管数量的影响

Fig. 5 Effects of RNAi-mediated gene silencing of *HaDDC* in the 4th instar larvae of *Harmonia axyridis* on the number of ovarioles of female adults

图中数据为分别注射 *dsGFP* (CK) 和 *dsHaDDC* 的雌成虫卵巢管数量, 经显著性检验, 差异不显著 ($P > 0.05$, t 检验)。The data in the figure are the number of ovarioles of female adults injected with *dsGFP* (CK) and *dsHaDDC*, respectively. After significance test, the difference is not significant ($P > 0.05$, t -test).

因,也是益虫人工饲养和利用的基础。研究表明昆虫的生殖能力主要受内部因素如激素(郭鄂, 1963)和生物胺(熊佳新等, 2019)等以及外部因素如营养(苏天运, 1986)、温度(蒋丰泽等, 2015)、湿度(周睿琦等, 2013)等的影响。生物胺是影响昆虫生殖状态的一种微量物质, 主要包括: 多巴胺、酪胺、章鱼胺、色胺和组胺(申王尚等, 2018)。多巴胺是昆虫表皮鞣化过程的产物, 由酪氨酸代谢而来, 酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase) 和多巴脱羧酶是多巴胺合成过程中重要的限速酶。本研究以多巴脱羧酶为切入点, 利用基因沉默技术从表观遗传学角度揭示

其对异色瓢虫生殖力的调控作用。

前期研究结果表明, 异色瓢虫具有非常敏感的基因沉默效应。将多巴脱羧酶基因双链 RNA (*dsHaDDC*) 注射到异色瓢虫 4 龄幼虫体内, 会引起其表达量显著降低, 同时出现明显的黑色素缺失的表现型(Xiao *et al.*, 2020)。生殖力检测结果表明, 异色瓢虫雌虫的 *HaDDC* 基因被抑制表达后其产卵量显著降低(图 2)。异色瓢虫 *HaDDC* 基因被抑制表达后, 其子代卵的孵化率也显著降低(图 3)。在长红猎蝽 *Rhodnius prolixus* 研究中同样发现多巴脱羧酶抑制表达后, 可以延迟产卵期并降低卵的孵化率(Sterkel and Oliveira, 2017; Sterkel *et al.*, 2019)。综上分析所述, 我们可以推断多巴脱羧酶可以调控异色瓢虫的生殖力。目前对于多巴脱羧酶调控昆虫生殖力的研究主要以其下游产物多巴胺为切入点进行(Sasaki and Nagao, 2001; Liu *et al.*, 2008; 姜宏健等, 2020)。有研究表明多巴胺对于昆虫生殖调控的机制是由其作为神经递质对下游受体进行激活进而产生一系列与生殖相关的级联反应(Gruntenko and Rauschenbach, 2008)。

前期研究发现, 多巴脱羧酶的下游产物多巴胺与昆虫卵巢发育的关系十分密切, 例如在蚂蚁 *Diacamma* sp. 和黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 中雌性个体脑内多巴胺含量越高, 其卵巢发育越好(Shimoji *et al.*, 2017)。我们研究中发现多巴脱羧酶被抑制表达后, 异色瓢虫的产卵量及其子代卵孵化率均显著降低(图 2 和 3)。为探究产生这种影响的原因是否是由于多巴脱羧酶表达量降低导致了其产物多巴胺含量减少进而影响了异色瓢虫卵巢的发

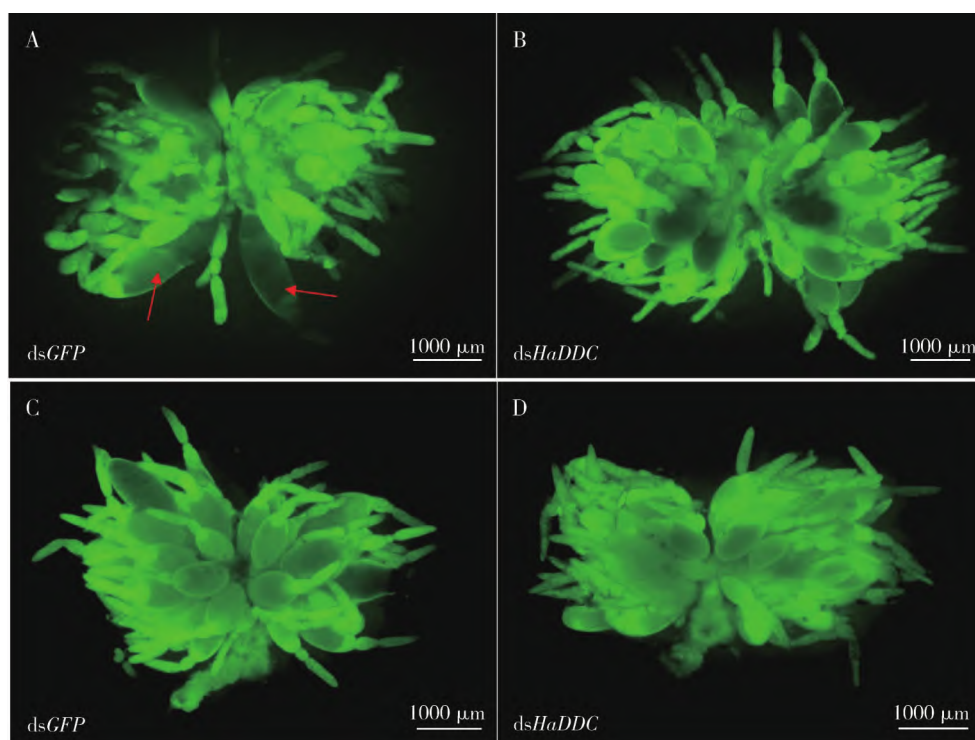


图6 RNAi 介导的基因沉默抑制异色瓢虫 4 龄幼虫 *HaDDC* 的表达对卵发育的影响

Fig. 6 Effects of RNAi-mediated gene silencing of *HaDDC* in the 4th instar larvae of *Harmonia axyridis* on the development of eggs
A: 对照组, 注射 *dsGFP* 的 4 龄幼虫羽化后第 14 天成虫的卵巢 Ovary of the 14-day-old adult emerged from the 4th instar larva injected with *dsGFP* in the control group; B: 处理组, 注射 *dsHaDDC* 的 4 龄幼虫羽化后第 14 天成虫的卵巢 Ovary of the 14-day-old adult emerged from the 4th instar larva injected with *dsHaDDC* in the treatment group; C: 对照组, 注射 *dsGFP* 的 4 龄幼虫羽化后第 20 天成虫的卵巢 Ovary of the 20-day-old adult emerged from the 4th instar larva injected with *dsGFP* in the control group; D: 处理组, 注射 *dsHaDDC* 的 4 龄幼虫羽化后第 20 天成虫的卵巢 Ovary of the 20-day-old adult emerged from the 4th instar larva injected with *dsHaDDC* in the treatment group.

育及功能,我们解剖了异色瓢虫的卵巢组织,结果显示 *HaDDC* 基因被抑制表达后不影响卵巢组织的形态发育(图 4: A, B)。有报道,瓢虫卵巢管的数量与卵的数量密切相关(刘志伟等, 2016), 异色瓢虫每侧卵巢管数为 28 ~ 33 根(陈洁等, 2015)。我们又继续探究了异色瓢虫卵巢管的数量,研究发现多巴脱羧酶被抑制表达后卵巢管的数量降低,但与对照组无显著差异(图 5)。因此,我们推断多巴脱羧酶与异色瓢虫卵巢管的发育进程无关,推测其可能参与了异色瓢虫生殖过程的其他方面。综上所述,多巴脱羧酶与异色瓢虫卵巢发育无直接关系。

多巴脱羧酶产物多巴胺不仅影响昆虫生殖系统形态发生,也影响昆虫的交配行为。Neckameyer (1998) 发现雄性果蝇体内多巴胺含量降低所引起的同性求偶、交配紊乱。但本研究中,我们观察发现异色瓢虫多巴脱羧酶被抑制表达后,雌虫和雄虫之间可以正常交配。在黑须伊蚊 *Aedes atropalpus*、双斑蟋蟀 *Gryllus bimaculatus* 和黑腹果蝇 *D. melanogaster* 等昆虫中研究发现多巴脱羧酶的产物多巴胺也能通

过调控保幼激素作用于脂肪体,进而调节卵黄原蛋白的合成最终影响卵母细胞的发育(孙建新和谭环宪, 1990; Woodring and Hoffmann, 1994; Gruntenko and Rauschenbach, 2008)。我们在异色瓢虫产卵初期及产卵高峰期对其卵巢组织进行解剖,结果表明 *HaDDC* 基因被抑制表达后,卵巢组织中发育的卵母细胞个数及成熟的卵粒数均明显少于对照组(图 6: B, D)。因此,我们推断多巴脱羧酶可以调控异色瓢虫卵母细胞到成熟卵粒的发育过程,进而参与对生殖力的调控。此外,有研究表明多巴脱羧酶参与卵壳表皮和绒毛膜硬化和变暗(Schlaeger and Fuchs, 1974)。本研究中,我们发现多巴脱羧酶被抑制表达后,子代卵的孵化率显著降低,我们推断可能是由于多巴脱羧酶被抑制表达后,影响卵壳的硬化过程,导致卵失水进而影响孵化。

综上,本研究对异色瓢虫多巴脱羧酶调控生殖力的机制进行解析,利用 RNAi 技术结合组织解剖证明多巴脱羧酶参与异色瓢虫卵母细胞到成熟卵粒的发育过程,进而调控生殖力。本研究结果为利用 RNAi 机制为核心的害虫防控技术提供备选基因。

然而,对于多巴脱羧酶对异色瓢虫卵母细胞发育的分子调控机制还有待进一步研究。

参考文献 (References)

- Ando T, Matsuda T, Goto K, Hara K, Ito A, Hirata J, Yatomi J, Kajitani R, Okuno M, Yamaguchi K, Kobayashi M, Takano T, Minakuchi Y, Seki M, Suzuki Y, Yano K, Itoh T, Shigenobu S, Toyoda A, Niimi T, 2018. Repeated inversions within a pannier intron drive diversification of intraspecific colour patterns of ladybird beetles. *Nat. Commun.*, 9: 3843.
- Arakane Y, Lomakin J, Beeman RW, Muthukrishnan S, Gehrke SH, Kanost MR, Kramer KJ, 2009. Molecular and functional analyses of amino acid decarboxylases involved in cuticle tanning in *Tribolium castaneum*. *J. Biol. Chem.*, 284(24): 16584–16594.
- Bezerides AL, McGraw KJ, Parker RS, Hussein J, 2007. Elytra color as a signal of chemical defense in the Asian ladybird beetle *Harmonia axyridis*. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 61(9): 1401–1408.
- Chen J, Wu CJ, Zhang QW, Ma Z, Sun HK, He YZ, 2015. Ovarian development and oogenesis of *Harmonia axyridis* Pallas. *J. Plant Prot.*, 42(2): 237–243. 陈洁, 吴春娟, 张青文, 马卓, 孙海昆, 何运转, 2015. 异色瓢虫卵巢发育及卵子发生过程观察. *植物保护学报*, 42(2): 237–243]
- Chen X, Xiao D, Du XY, Guo XJ, Zhang F, Desneux N, Zang LS, Wang S, 2019. The role of the dopamine melanin pathway in the ontogeny of elytral melanization in *Harmonia axyridis*. *Front. Physiol.*, 10: 1066.
- Geng ZC, Tan CC, 1980. Some genetic problems of *Harmonia axyridis*. *Chin. J. Nat.*, 3(7): 512–518. 庚镇城, 谈家桢, 1980. 异色瓢虫的几个遗传学问题. *自然杂志*, 3(7): 512–518]
- Gruntenko NE, Rauschenbach IY, 2008. Interplay of JH, 20E and biogenic amines under normal and stress conditions and its effect on reproduction. *J. Insect Physiol.*, 54(6): 902–908.
- Guo F, 1963. Some problems of insect hormone control reproduction. *Entomol. Knowl.*, (1): 31–36, 27. 郭鄂, 1963. 关于昆虫的激素控制生殖的一些问题. *昆虫知识*, (1): 31–36, 27]
- Harano KI, Sasaki K, Nagao T, 2005. Depression of brain dopamine and its metabolite after mating in European honeybee (*Apis mellifera*) queens. *Naturwissenschaften*, 92(7): 310–313.
- Harano KI, Sasaki M, Nagao T, Sasaki K, 2008. Dopamine influences locomotor activity in honeybee queens: Implications for a behavioural change after mating. *Physiol. Entomol.*, 33(4): 395–399.
- Hiruma K, Riddiford LM, 2009. The molecular mechanisms of cuticular melanization: The ecdysone cascade leading to dopa decarboxylase expression in *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 39(4): 245–253.
- Hodgetts RB, O'Keefe SL, 2006. Dopa decarboxylase: A model gene-enzyme system for studying development, behavior, and systematics. *Annu. Rev. Entomol.*, 51: 259–284.
- Jiang FZ, Zheng LY, Guo JX, Zhang GR, 2015. Effects of temperature stress on insect fertility and its physiological and biochemical mechanisms. *J. Environ. Entomol.*, 37(3): 653–663 蒋丰泽, 郑灵燕, 郭技星, 张古忍, 2015. 温度对昆虫繁殖力的影响及其生理生化机制. *环境昆虫学报*, 37(3): 653–663]
- Jiang HJ, Liu SW, Ji BZ, Wang Y, Xiong JX, 2020. Dopamine regulation of reproduction in insects. *Sci. Sin. Vit.*, 50(3): 296–310. 姜宏健, 刘曙雯, 嵇保中, 王怡, 熊佳新, 2020. 多巴胺对昆虫生殖的调控. *中国科学: 生命科学*, 50(3): 296–310]
- Koch RL, 2003. The multicolored Asian lady beetle, *Harmonia axyridis*: A review of its biology, uses in biological control, and non-target impacts. *J. Insect Sci.*, 3(1): 32.
- Liu T, Dartevelle L, Yuan CY, Wei HP, Wang Y, Ferveur JF, Guo AK, 2008. Increased dopamine level enhances male-male courtship in *Drosophila*. *J. Neurosci.*, 28(21): 5539–5546.
- Liu ZW, Zhang C, Qiu BL, Wang XM, 2016. Reproductive system and oogenesis of *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant (Coccinellidae: Coleoptera). *Chin. J. Appl. Entomol.*, 53(2): 381–389. 刘志伟, 张灿, 邱宝利, 王兴民, 2016. 孟氏隐唇瓢虫生殖系统结构和卵子发生的研究. *应用昆虫学报*, 53(2): 381–389]
- Neckameyer WS, 1998. Dopamine modulates female sexual receptivity in *Drosophila melanogaster*. *J. Neurogenet.*, 12(2): 101–114.
- Sasaki K, Nagao T, 2001. Distribution and levels of dopamine and its metabolites in brains of reproductive workers in honeybees. *J. Insect Physiol.*, 47(10): 1205–1216.
- Schlaeger DA, Fuchs MS, 1974. Localization of dopa decarboxylase in adult *Aedes aegypti* females. *J. Exp. Zool.*, 187(2): 217–221.
- Shen WS, Chen P, Chen P, 2018. Research advances in the effects of biogenic amines on insect reproduction. *J. Agric. Biotechnol.*, 26(11): 1979–1988. 申王尚, 陈鹏, 陈萍, 2018. 生物胺对昆虫生殖影响的研究进展. *农业生物技术学报*, 26(11): 1979–1988]
- Shimoji H, Aonuma H, Miura T, Tsuji K, Sasaki K, Okada Y, 2017. Queen contact and among-worker interactions dually suppress worker brain dopamine as a potential regulator of reproduction in an ant. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 71(2): 35.
- Sterkel M, Oliveira PL, 2017. Developmental roles of tyrosine metabolism enzymes in the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, 284(1854): 20162607.
- Sterkel M, Ons S, Oliveira PL, 2019. DOPA decarboxylase is essential for cuticle tanning in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae), affecting ecdysis, survival and reproduction. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 108: 24–31.
- Su TY, 1986. The effect of nutritional factors on the reproductive cycle and fecundity of insects. *Sichuan J. Zool.*, 5(4): 21–23. 阚天运, 1986. 营养因素对昆虫生殖营养周期及生殖力的影响. *四川动物*, 5(4): 21–23]
- Sun JX, Tan JX, 1990. Hormone regulation of vitellogenin biosynthesis in medical insects. *Int. J. Med. Parasit. Dis.*, (2): 63–66. 孙建新, 谭璟究, 1990. 医学昆虫卵黄原蛋白生物合成的激素调节. *国外医学(寄生虫病分册)*, (2): 63–66]
- Tang B, Shi ZK, Guo HS, Wang S, Wang SG, Zhang F, 2014. Cloning and sequence analysis of the *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellinae) catalase gene. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 51(1): 26–34. 唐斌, 施佐堃, 郭红双, 王甦, 王世贵, 张帆, 2014.

异色瓢虫过氧化氢酶(Catalase) 的基因克隆及序列分析. 应用昆虫学报, 51(1) : 26 – 34]

True JR, 2003. Insect melanism: The molecules matter. *Trends Ecol. Evol.*, 18(12) : 640 – 647.

Wang MX, Cai ZZ, Lu Y, Xin HH, Chen RT, Liang S, Singh CO, Kim JN, Niu YS, Miao YG, 2013. Expression and functions of dopa decarboxylase in the silkworm, *Bombyx mori* was regulated by molting hormone. *Mol. Biol. Rep.*, 40(6) : 4115 – 4122.

Wang S, Michaud JP, Tan XL, Murray L, Zhang F, 2013. Melanism in a Chinese population of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) : A criterion for male investment with pleiotropic effects on behavior and fertility. *J. Insect Behav.*, 26(5) : 679 – 689.

Wang S, Zhang RZ, Zhang F, 2007. Research progress on biology and ecology of *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae) . *Chin. J. Appl. Ecol.*, 18(9) : 2117 – 2126. [王甦, 张润志, 张帆, 2007. 异色瓢虫生物生态学研究进展. 应用生态学报, 18(9) : 2117 – 2126]

Woodring J, Hoffmann KH, 1994. The effects of octopamine, dopamine

and serotonin on juvenile hormone synthesis, *In vitro*, in the cricket, *Gryllus bimaculatus*. *J. Insect Physiol.*, 40(9) : 797 – 802.

Xiao D, Chen X, Tian RB, Wu MM, Zhang F, Zang LS, Harwood JD, Wang S, 2020. Molecular and potential regulatory mechanisms of melanin synthesis in *Harmonia axyridis*. *Int. J. Mol. Sci.*, 21(6) : 2088.

Xiong JX, Ji BZ, Liu SW, Wang Y, 2019. The role of 5-HT in feeding, reproduction and polyphenism of the insects. *Chin. Bull. Life Sci.*, 31(1) : 9 – 17. 熊佳新, 嵇保中, 刘曙雯, 王怡, 2019. 5-羟色胺对昆虫取食、生殖和非遗传多型的调控. 生命科学, 31(1) : 9 – 17]

Zhou RQ, Feng L, Quan WL, Wang XP, 2013. Mating behavior of *Chilo suppressalis* and its influencing factors. Studies on central China insects. (1) : 33 – 40. [周睿琦, 冯莲, 全为礼, 王小平, 2013. 二化螟的交配行为及其影响因素. 华中昆虫研究, (1) : 33 – 40]

(责任编辑: 赵利辉)