



网络出版日期:2019-07-15

doi:10.7606/j.issn.1004-1389.2019.07.019

网络出版地址:<http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1220.s.20190712.0855.026.html>

黄野螟蜕皮激素受体基因 *HvEcR* 的鉴定及表达分析

吕子豪, 李治兴, 林同

(华南农业大学 林学与风景园林学院, 广州 510642)

摘要 从转录组文库筛选出具有完整 ORF 框的黄野螟 *EcR* 基因序列, 命名为 *HvEcR* (登录号: MH588318)。序列全长 1 734 bp, 包含 1 638 bp 长的 ORF 框, 共编码 545 个氨基酸, 具有 EcR 家族典型的保守结构域。同源比对结果表明, *HvEcR* 氨基酸序列与三化螟(*Scirpophaga incertulas*)和二化螟(*Chilo suppressalis*)的同源性最高, 分别高达 96% 和 92%。RT-qPCR 结果表明, *HvEcR* 在成虫和 5 龄幼虫时表达最高, 分别为对照的 12 倍和 5.68 倍。*HvEcR* 在黄野螟幼虫不同组织间存在表达差异, 在脂肪体中表达最高, 为对照的 4.54 倍, 其次在头与马氏管中也有较高表达, 分别为对照的 2.85 倍和 2.49 倍。在 20E 胁迫下, *HvEcR* 表达量均高于对照, 表明 *HvEcR* 作为蜕皮激素的核受体基因, 其表达可能受 20E 诱导。

关键词 黄野螟; 蜕皮激素受体; 20E 胁迫; 实时荧光定量

中图分类号 Q966

文献标志码 A

文章编号 1004-1389(2019)07-1187-08

黄野螟(*Heortia vitessoides* Moore)是一种寡食性的食叶害虫^[1-2], 其寄主为国家二级重点保护野生植物土沉香(*Aquilaria sinensis* Sprenger)^[3]。该虫生长季节虫口爆发迅速, 数日便可把叶片吃光, 造成枯苗、死苗, 严重影响植株生长, 制约结香的产量与质量, 造成极大的经济损失^[1,4]。近年来, 国内外关于黄野螟的研究大多集中在生物学特性、行为学、农药防治技术方面, 关于昆虫生长调节剂防治及其分子方面的研究鲜见报道。

蜕皮激素核受体 EcR 是核受体超家族成员^[5], 最早在果蝇(*Drosophila melanogaster*)中得到鉴定^[6], 具有蜕皮激素(Ecdysteroid hormones, EH)配体专一性^[7], EH 通过其进行信号转导。高 20E 浓度条件下, EcR 与另一个蜕皮激素受体——超气门蛋白(Ultraspiracle, USP)会被诱导形成异二聚体, 进而激活一系列早期应答基因与晚期基因的表达^[8-11]。因此, EcR 在昆虫蜕皮和变态过程中具有重要作用。

蜕皮是由数种激素协同调控的昆虫生长发育所必需的复杂生命过程^[12], 蜕皮激素与保幼激素(Juvenile hormone, JH)的协同作用在此过程中

发挥关键作用。蜕皮激素需经过一系列羟基化作用, 被激活为具有更高活性的 20-羟基蜕皮酮(20E)才能发挥作用^[13-16]。当 JH 滴度较高时, 20E 引起昆虫蜕皮, 当 JH 滴度较低, 20E 诱导昆虫进入下一龄期或发生变态^[17]。EcR 接受 20E 信号后, 一系列蜕皮级联反应将被启动。因此, 研究昆虫的 EcR 基因具有相当的分子生物学意义。本研究利用 RT-qPCR 技术检测 *HvEcR* 基因在黄野螟各发育阶段及幼虫组织中的转录水平, 同时明确 *HvEcR* 的表达量对 20E 胁迫的响应, 丰富了 EcR 的分子生物学信息。

1 材料与方法

1.1 材料和主要试剂

于广州天鹿湖森林公园采集虫卵及 1 至 5 龄试虫, 饲喂新鲜土沉香叶片, 室内饲养条件为: 温度 26 °C, 相对湿度 75%, 光期 14 h, 暗期 10 h。20E 试剂购自上海源叶生物科技有限公司。总 RNA 提取试剂盒(E. Z. N. A™ Total RNA Kit II)购自 OMEGA 公司; 反转录试剂盒(Prime-Script RT reagent Kit With gDNA Eraser)及实时荧光定量试剂盒(TB Green™ Premix Ex

收稿日期:2018-08-01 修回日期:2018-10-10

基金项目: 国家自然科学基金(31470653); 广东省自然科学基金(2015A030313416)。

第一作者: 吕子豪, 男, 硕士, 从事昆虫分子生物学研究。E-mail: 1375886@qq.com

通信作者: 林同, 男, 博士, 教授, 主要从事昆虫分子生物学研究。E-mail: lintong@scau.edu.cn

TaqTM)均购自 TaKaRa 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 样品处理 野外采集工作后,立即用液氮处理卵(3片)及各虫态幼虫(各5头),存放于-80℃冰箱中;其余个体饲养至老熟幼虫时,转移到铺有2cm厚沙土(相对湿度为50%)的塑料养虫盒中,待其化蛹羽化后,用同样方法收集蛹及成虫(各5头)。选取40头健康的4~5龄幼虫,经清洗、消毒后,在腊盘上解剖,获取幼虫体壁、头、脂肪体、中肠、马氏管等组织样品,立即置于无菌去酶的冻存管中,经液氮速冻后,存放于-80℃冰箱。

1.2.2 蜕皮激素胁迫处理 先用DMSO将20E稀释至10 mg/mL,存放于-20℃冰箱,备用。试验时用1×PBS将20E稀释至30 ng/μL和150 ng/μL 2个质量浓度。采用注射法对4龄幼虫进行蜕皮激素胁迫,用 $\varphi=75\%$ 酒精擦拭虫体,虫体置于冰上麻醉后,从腹部侧面注射。每头虫子注射1 μL液体,对照组为等量稀释的DMSO。注射后继续用沉香叶片饲养于人工气候箱中,分别于注射后24、48、72 h取样。

1.2.3 RNA提取与cDNA合成 严格按照E.Z.N.A.TM Total RNA Kit II试剂盒说明书提取各样本总RNA,经琼脂糖凝胶电泳以及微量紫外分光光度计(Nanodrop 2000)检测合格后,置于-80℃冰箱保存,备用。严格按照PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser试剂盒说明书,将总RNA(0.8 μg)逆转录为第一链cDNA,稀释20倍后,置于-20℃冰箱保存,备用。

1.2.4 基因表达 从黄野螟转录组文库筛选出具有完整ORF框的EcR基因序列,用实时荧光定量PCR反应(RT-qPCR)检测其表达量,所用内参基因为 β -actin;所用目的基因引物为:Forward: 5'-GCCAACCGAGCAGTTCCCTCATCG-3' 和 Reverse: 5'-CGTCCTCTTCCTCCGTTGATTGC-3';阴性对照为无菌超纯水处理;反应体系包括cDNA模板20 μL,TB Green Premix Ex-Taq 10.0 μL,上游引物0.4 μL,下游引物0.4 μL,ddH₂O 7.2 μL。反应程序为:95℃预变性5 min;95℃解链10 s,60℃延伸20 s,共进行40个循环。每个样本设置3个技术重复,根据反应结束后的C_t值,使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量法计算HvEcR相对表达量。用Excel进行统计分析,采用SPSS 18.0进行单因素方差分析与邓肯分析。

1.3 生物信息学分析、同源比对及系统发育树构建

在multalin网站(<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/cgi-bin/multalin.pl>)进行氨基酸序列同源比对,采用ExPASy-ProtPram软件进行蛋白理化性质预测,采用PSORT在线工具(<https://psort.hgc.jp/cgi-bin/runpsort.pl>)预测亚细胞定位,采用NPS在线工具(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_gor4.pl)预测蛋白质二级结构,采用SWISS-MODEL在线工具(<https://www.swissmodel.expasy.org/interactive/yrSsgx/models/>)模拟EcR蛋白高级结构,采用ClustalX软件和MEGA 5.0软件构建系统发育进化树。

2 结果与分析

2.1 HvEcR基因序列及蛋白高级结构分析

从黄野螟转录组文库中筛选出具有完整ORF框的目的片段,将其命名为HvEcR(登录号:MH588318),序列全长1 734 bp,包含1 638 bp长的ORF框,共编码545个氨基酸。使用ProtPram软件对HvEcR的理化性质进行分析,结果表明,该蛋白的分子质量为61.70 ku,理论等电点为5.89,脂肪指数为73.71,不稳定性指数为68.47,为不稳定蛋白,总平均疏水性为-0.442,为亲水性蛋白。NetPhos 3.1软件的预测结果为:HvEcR含丝氨酸位点16个,苏氨酸和酪氨酸位点各2个(得分大于0.9)。

Signal P 4.1软件预测结果为:HvEcR不存在信号肽,为非分泌蛋白。根据PSORTII软件预测的亚细胞定位结果可知,HvEcR位于线粒体的可能性最大,为60.9%,其次是细胞核和细胞质,分别有26.1%和8.7%的可能性,位于细胞骨架可能性则较低,仅为4.3%。TMpred软件跨膜区分析结果为,无得分大于500的跨膜螺旋。TMHMM软件基于隐马尔可夫模型(hidden Markov model)的跨膜螺旋预测结果为,HvEcR被标记在外部,不含跨膜螺旋。蛋白的疏水性越强,其疏水区为跨膜区的可能性就越大,HvEcR无跨膜区,符合上文的亲水性预测结果。

Conserved Domains软件分析表明(图1),HvEcR含有EcR家族典型的DNA结合域(DNA binding domain,DBD)和配体结合域(Ligand binding domain,LBD)。SMART软件分析显示,HvEcR由6个功能结构域组成,分别为两

段锌指结构域(zinc finger, ZF),3个低密度复杂区(low complexity region, LCR)和1个配体结合域(LBD)(图2)。这两个软件的分析结果进一步证明筛选出的 *HvEcR* 基因与其他昆虫的 *EcR* 一样,均为核受体家族成员。经 SOPMA 和 SWISS-

MODEL 软件进行蛋白质结构预测和建模,结果显示, *HvEcR* 编码的蛋白主要由 α -螺旋与无规则螺旋组成,它们分别占 36.15% 和 48.62%(图3)。

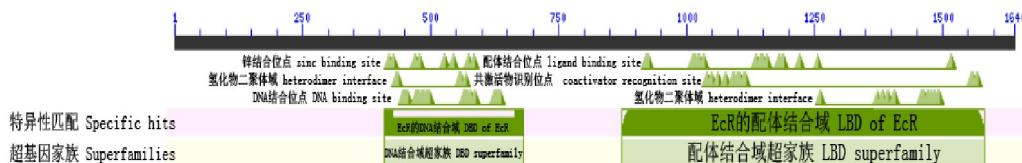


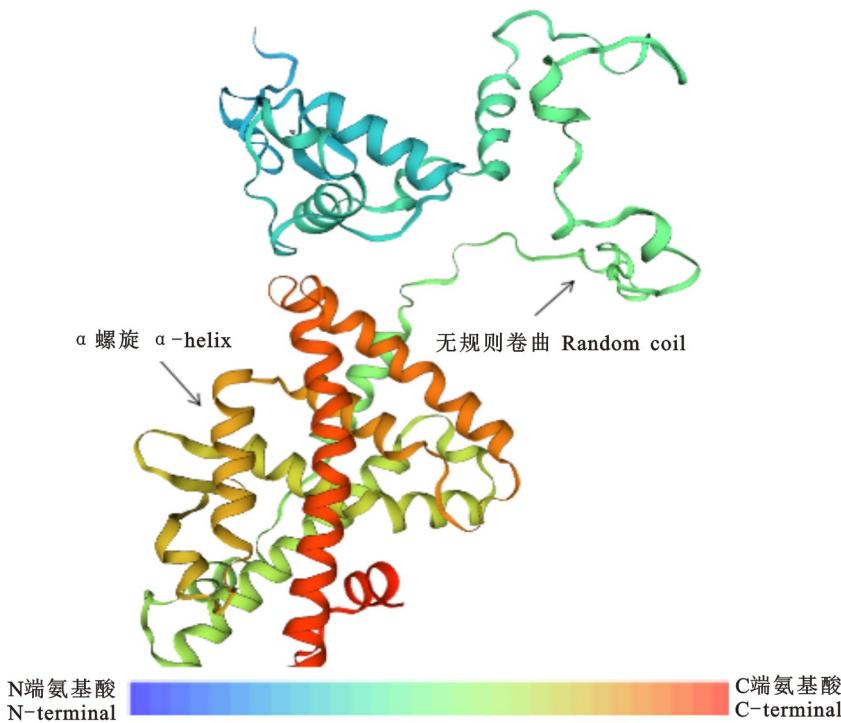
图 1 *HvEcR* 蛋白序列的保守结构域预测
Fig. 1 Putative conserved domain of *HvEcR*

	CGTTTAGATAGTTCAGTGCAGGGAAA
	AGTGAAGTGAAAGCTATTCCGGAGGATGTCCGTCGGAACCTGTGGACTTCGGAGCGTATGACACGCTGCCGAC
1	ATGAGACGACGCTGGTCCAACACGGGGCTTCCAGACGCTGCGAATGCT[GAGGAGAGCTCGTCTGAAGTGCCTCGTCTTG]{}
29	M R R R W S N N G G F Q T L R M L E E S S S S E V T S S S
57	GCTCTGGTCTACCTCCGGCTATGGTATGTCGCCGGACTCTCGCTGCCCGAGTACACGGGACTCGAGCTGCTGTGGGCTAT
85	A L G L P P A M V M S P E S L A S P E Y T G L E L W G Y
113	GATGACGGGATCACATAACACAAC[AAGTCGCTGCTGGCAATACTITGACAGATGCAAGCAGCAGCCTCCACOGCAGCCCTAACCT
141	D D G I T Y N T I Q S L L G N T C M Q Q P P T I Q P L P
169	TCGATGCCCTAACGGATGCCACCCACAGC[GCAAAATAGTCGAAATGTCATCAGGTCGAGAGGAACCTGCTCCGGCT
197	S M P L P M P P T T P K S E N E S S M S S G R E E L S P A
225	TCCAGCGTAAATGGTTCAGCACAGATGGGAAAGCGAGACGGCAAAGAAGGGACCCGACCTCGTCAACAGGAAGAAATTATGC
253	S S V N G C S T D G E A R R Q K K G P A P R Q Q E E L [C
281	CTTGTCTGCCGGACAGGCCCTCCGGATATCACTACAATGCGCTTACGTGTAAGGATGCAAAGGATTCTCAGGCCAGGTGTT
309	L V C G D R A S G Y H Y N A L T C E G C K G F F R R S V
337	ACAAAAAATGCGTGACATATGCAAGTTGGACATGCGTGCAGAATGGACATGTTATGCGACGGAAATGTCAGGAATGTCGA
365	T X N A V Y I C K F G H A C E M D M Y M R R K C Q E C R
393	TTGAAAAAGTGCCTGGCAGTGGCATGGCCAGAAATGCGTGTGCCAGAAAACCGATGTTGATGAAGAGGAAGAGAAAAAG
421	L K K C L A V G M R P E C V V P E N Q C L M K R K E K K
449	GCACAGAGAGAAAAGACAAATTGCCAGTCAGCACGACAACAGTTGACGACCACAT[CCCCCCCATAATGCGATGTCATCCCCCG
477	A Q R E K D K L P V S T T I V D D H M P P I M Q C D P P
505	CCGCCAAAGCAGCCAGGATCTGGAAATGTTGCGCACGAAAGTGGTGCGCGGTTCCTCTCCGAGAAGCTGATGGCAGAAC
533	P P E A A R I L E C L Q H E V V P R F L S E K L M E Q N
	CGGTGAAGAACATACTCCCTGACGCCAACCGCAGCTTCATCCAGCAGCTGGTGTGGTACCAAAGATGGATAACGAGCAG
	R L K N I P P L T A N Q F L I A R L V W Y Q D G Y E Q
	CCTCTGAAGAGGACCTCAAGAGGGTACCGCAGACTTGGCAATCAACGGAGGAAGAGGAAGATTCAGATAATGCTTCCG
	P S E E D L K R V T Q T W Q S T E E D E D S D M P F R
	CAGATCACGGAGATGACGATCTCACAGTCGAATTAAATGCGAGTTGCTAAAGGCTTACCCGGCTTCGAAGATCTCACAG
	Q I T E M T I L T V Q L I V E F A K G L P G F S K I S Q
	CCAGACAGATCACGTTAAAGCTGCTAACGGAGGTGATGATGTCGCGGGTCCGAGACGGTACGACGGTGTGGAC
	P D Q I T L L K A C S S E V M M L R V A R R Y D A V S D
	AGCGCTATTGCCAACACCAACAGGGTACACGGAGGACAACATGCGAACAGCGGGCATGGCTACGTCAITGAAGACCTGCTG
	S V L F A H N N Q A Y T R D N Y R K A G M A Y V I E D L L
	CACTCTGCGGTGCACTGACTCAATGCTATGGACAACGTCATTATGCACTACTCACTGCCATAGTTATATTCAGACCGG
	H F C R C M Y S M S M D N V H Y A L L T A I V I F S D R
	CCGGGGCTGGAAACAGCCGAGCTAGTGGAGGAGATCCAGCGGACTACCTGAAACAGCTCAGGGTGTACATGAAACAGCTC
	P G L E Q P Q L V E E I Q R Y Y L N T L R V Y I M N Q L
	AGTGCATCCCGCGCTGCCGGTACGGCAAGATCTGCGTCTGCACTGCGCACGCTCGGCATGCGAACACTCC
	S A S P R C G V M Y G K I L S V L T E L R T L G M Q N S
	AACATGTGCATCTGCCCTAACAGAACAGGAAGCTGCCGCCCTTCCTGGAGGAGATATGGGACGTGGGGACGGTGTGGACG
	N M C I S L K L K N R K L P P F L E E I W D V A D V S T
	GGCGAGCGCCGCCAGCATCGACACCCACGACGCTCTAG
	A Q A P P G I D T P T T L *

低密度复杂区以大括号标注; 锌指结构域以阴影标注; 配体结构域以方框标注; 终止密码子 TAG 以星号标注 LCRs are marked in braces; ZFs are marked with shadow; LBD is marked with boxes; the termination codon is marked with asterisk

图 2 黄野螟 *EcR* 基因核苷酸序列及其编码的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *EcR* gene from *H. vitessoides*



图中彩虹条表示从 N 端到 C 端的氨基酸 The rainbow bar represents the amino acid from N-terminal to C-terminal

图 3 HvEcR 的三维结构

Fig. 3 Three-dimensional structure of *HvEcR*

2.2 同源比对及系统发育树

在 NCBI 网站上进行同源搜索,用 multalin 软件进行同源比对,结果表明,*HvEcR* 序列与三化螟和二化螟的同源性最高,分别高达 96% 和 92%(图 4)。基于鳞翅目 12 种昆虫的 EcR 氨基酸序列,采用 NJ 法构建系统发育树,结果表明,黄野螟与水稻三化螟和二化螟的亲缘关系最近,结果与同源性比对一致(图 5)。

2.3 黄野螟 *HvEcR* 基因的时空动态表达

黄野螟发育阶段表达谱显示(图 6),以 *HvEcR* 在卵期的表达量为对照,*HvEcR* 的转录水平在各发育时期差异显著,在成虫时达到峰值,为对照的 12 倍;其次是 5 龄幼虫时,为对照的 5.68 倍。在 3 龄幼虫时表达量最低,仅为卵的 0.22。

由图 7 可知,*HvEcR* 在黄野螟幼虫各组织中均有表达,在体壁中表达量最低,设为对照;在脂肪体中表达较高,为对照的 4.54 倍。其次,*HvEcR* 在头与马氏管中也有较高表达,分别为对照的 2.85 倍和 2.49 倍。

用质量浓度分别为 30 ng/μL、150 ng/μL 的蜕皮激素溶液和等量稀释的 DMSO 溶液处理黄

野螟 4 龄幼虫,于处理后 24 h、48 h 和 72 h 检测 *HvEcR* 基因的表达情况。RT-qPCR 结果显示(图 8),在两种质量浓度处理 24 h 后,均能引起 *HvEcR* 基因的表达量上调。在注射质量浓度为 150 ng/μL,处理时间为 48 h 时,*HvEcR* 表达量上调最为明显,为对照的 4.10 倍。结果表明,*HvEcR* 基因的表达受 20E 调控。

3 讨论

本研究鉴定 1 条黄野螟 *HvEcR* 基因,其编码的氨基酸含 2 个锌指结构域、1 个配体结构域和 3 个低密度复杂区等 6 个保守结构域,具有与其他昆虫 *EcR* 相似的典型的基因家族特征。*HvEcR* 与其他鳞翅目昆虫 *EcR* 的亲缘关系较近,在进化过程中十分保守。

作为蜕皮激素的受体,*HvEcR* 的表达水平可能与 20E 滴度密切相关^[18],本研究结果显示,黄野螟 *HvEcR* 的表达水平可能受 20E 的诱导调节(图 8)。蜕皮激素与保幼激素共同参与每一龄幼虫的组织重建和表皮形成^[19]。RT-qPCR 结果显示,*HvEcR* 在卵期及 1~4 龄幼虫时表达量较低且相对稳定,到 5 龄时达到小高峰,到蛹期又降

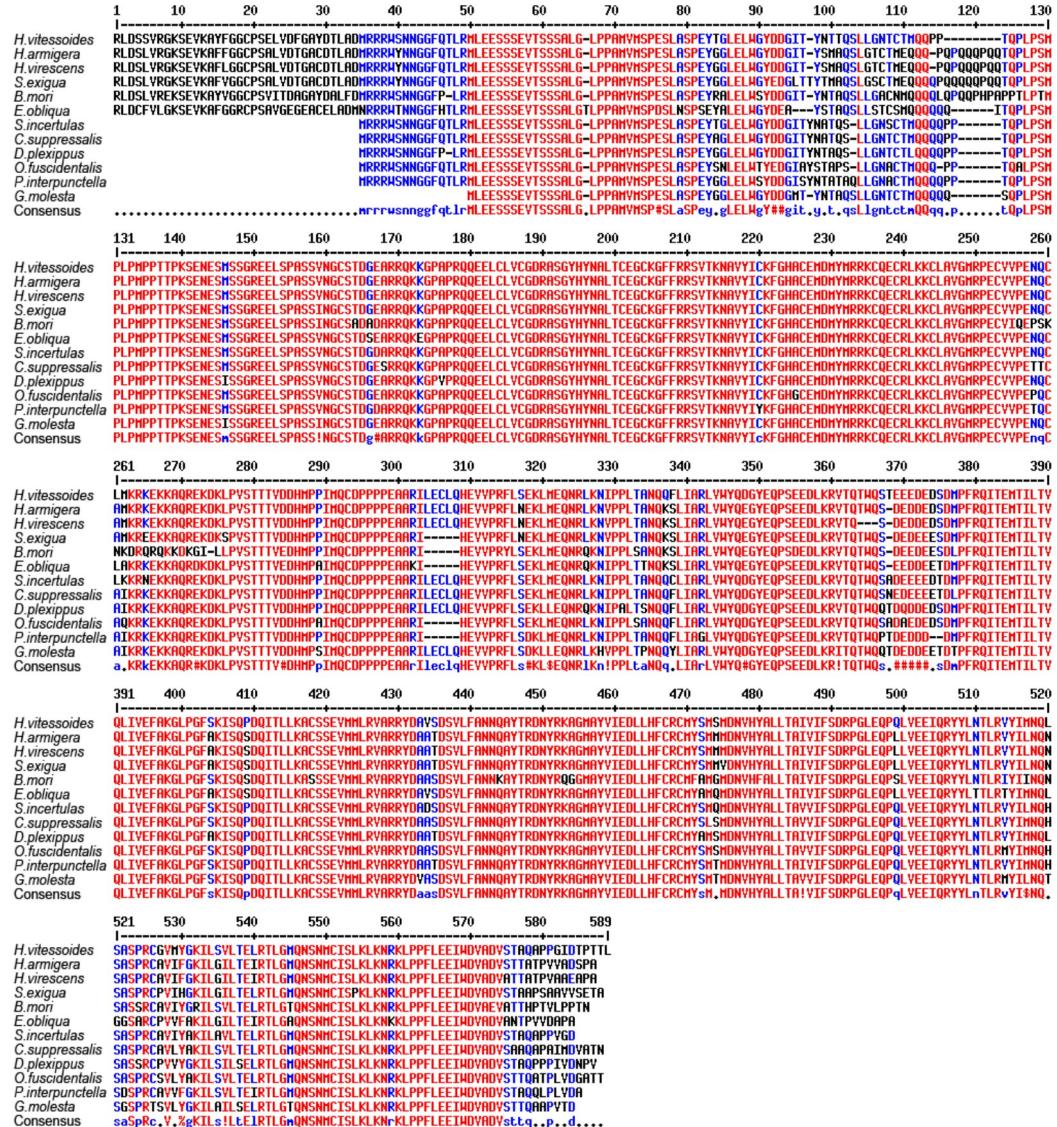
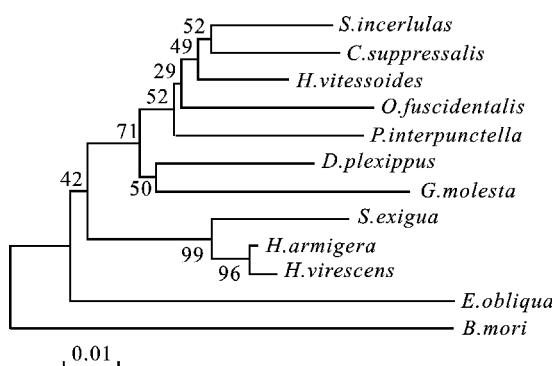
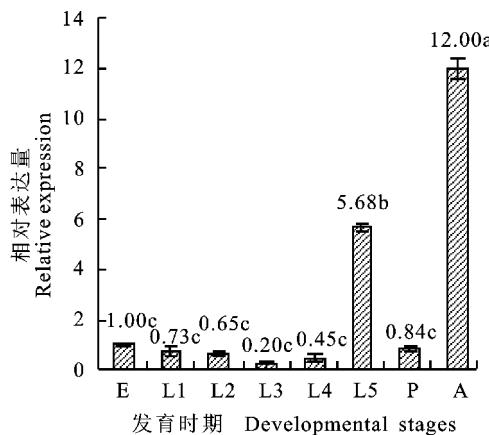
图 4 *HvEcR* 与其他昆虫 EcR 氨基酸序列比对Fig. 4 Amino acid sequence alignment of EcR from *H. vitessoides* and other insects

图 5 基于昆虫 EcR 氨基酸序列构建的系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic relationships of insects based on amino acids of EcR

低,与昆虫不同发育时期体内蜕皮激素的变化趋势一致^[20-21]。因此,推测 *HvEcR* 对黄野螟末龄幼虫的发育起重要作用,可能与组织重建和预蛹发育有关^[22]。蜕皮激素参与昆虫成虫的卵子发生和生殖过程^[17],在黄野螟成虫体内,*HvEcR* 有高表达,推测作为蜕皮激素受体的 EcR 也与该过程有关^[23]。

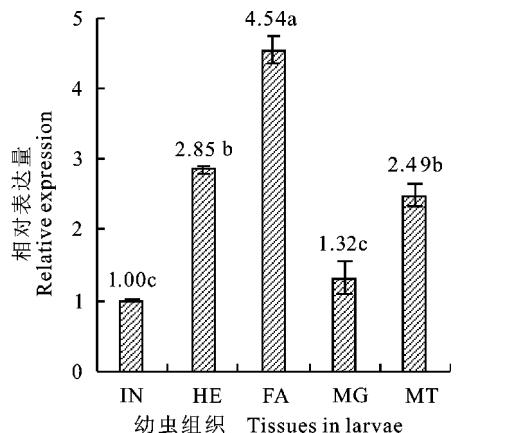
EcR 存在昆虫不同组织中,参与 20E 介导下的组织重建,如 EcR 在埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*) 幼虫中参与组织溶解过程,在家蚕和水稻二化螟幼虫脂肪体中特异性表达,在果蝇中参与神经元重建^[24-27]。对黄野螟幼虫不同组织的 *HvEcR* 转录水平进行检测,发现其主要在脂肪体中表达,



数据为“平均数±标准差”；柱上字母代表差异显著($P<0.05$)；图7、图8同 Data in the figure are represented as mean ± SD; different letters mean significant difference on the bar ($P<0.05$). The same as Fig. 7 and 8; E. 卵 Egg; L1、L2、L3、L4、L5. 1~5 龄幼虫 Larva stage 1~5; P. 蛹 Pupal; A. 成虫 Adult

图6 HvEcR基因在黄野螟各发育时期的表达

Fig. 6 The expression level of *HvEcR* in developmental stages of *H. vitessoides*



IN. 体壁 Integument; HE. 头 Head; FA. 脂肪体 Fat body; MG. 中肠 Midgut; MT. 马氏管 Malpighian tubule

图7 HvEcR基因在黄野螟幼虫中的表达

Fig. 7 The expression level of *HvEcR* in the larvae of *H. vitessoides*

为对照的4.54倍。脂肪体是昆虫重要的能量贮备中心,且在物质代谢中扮演关键角色,作为蜕皮激素受体,*HvEcR*可能与黄野螟营养储存及能量代谢有关。除在脂肪体表达外,*HvEcR*在马氏管和头部中也有较高表达,但其功能需进一步澄清。

研究昆虫EcR的分子机制,不仅有助于深入理解昆虫的蜕皮行为,还能为害虫防控提供新思路。基于本试验对黄野螟*HvEcR*功能的初步研究,后续还将通过RNA干扰技术及相关生理生

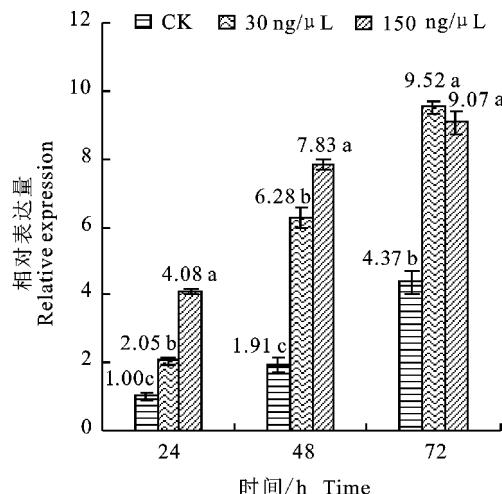


图8 不同时间不同质量浓度的20E处理对*HvEcR*基因表达的影响

Fig. 8 Expression profile of *HvEcR* at different time and different 20E mass concentration

化试验,进一步研究该基因的功能,为开发环境友好型的EcR靶标杀虫剂提供更多的分子生物学参考。

参考文献 Reference:

- [1] 苏跃平.白木香黄野螟生物学特性[J].中药材,1994,17(2):7-9.
SU Y P. Biological characteristics of *Heortia vitessoides* Moore[J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 1994, 17(2): 7-9.
- [2] KALITA J. *Heortia vitessoides* Moore (Lepidoptera: Pyralidae)—A serious pest of agarwood plant (*Aquilaria malaccensis* Lamk.) [J]. *Geobios*, 2001, 29(1): 13-16.
- [3] 茅裕婷,张蒙,靳秀芳,等.土沉香对黄野螟的抗性研究[J].华南农业大学学报,2017,38(6):89-96.
MAO Y T, ZHANG M, JIN X F, et al. Study on resistance of *Aquilaria sinensis* against *Heortia vitessoides* [J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2017, 38(6): 89-96.
- [4] 乔海莉,陆鹏飞,陈君,等.黄野螟生物学特性及发生规律研究[J].应用昆虫学报,2013,50(5):1244-1252.
QIAO H L, LU P F, CHEN J, et al. Biological characteristics and occurrence patterns of *Heortia vitessoides* [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2013, 50(5): 1244-1252.
- [5] VERHAEGEN Y, PARMENTIER K, SWEVERS L, et al. The brown shrimp (*Crangon crangon* L.) ecdysteroid receptor complex: cloning, structural modeling of the ligand-binding domain and functional expression in an EcR-deficient *Drosophila* cell line[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2010, 168(3): 415-423.
- [6] MR K, WS T, WA S, et al. The *Drosophila* EcR gene en-

- codes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily[J]. *Cell*, 1991, 67(1): 59-77.
- [7] WANG S F, AYER S, SEGRAVES W A, et al. Molecular determinants of differential ligand sensitivities of insect ecdysteroid receptors[J]. *Molecular & Cellular Biology*, 2000, 20(11): 3870-3879.
- [8] LAN Q, HIRUMA K, HU X, et al. Activation of a delayed-early gene encoding *MHR3* by the ecdysone receptor heterodimer EcR-B1-USP-1 but not by EcR-B1-USP-2[J]. *Molecular & Cellular Biology*, 1999, 19(7): 4897-4906.
- [9] THOMAS H E, STUNNENBERG H G, STEWART A F. Heterodimerization of the *Drosophila ecdysone* receptor with retinoid X receptor and ultraspiracle [J]. *Nature*, 1993, 362(6419): 471-475.
- [10] YAO T P, FORMAN B M, JIANG Z, et al. Functional ecdysone receptor is the product of *EcR* and ultraspiracle genes[J]. *Nature*, 1993, 366(6454): 476-479.
- [11] LIU X P, FU K Y, LÜ F G, et al. Involvement of FTZ-F1 in the regulation of pupation in *Leptinotarsa decemlineata* (Say) [J]. *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, 2014, 55: 51-60.
- [12] SPINDLER K D, HÖNL C, TREMMEL C, et al. Ecdysteroid hormone action[J]. *Cellular & Molecular Life Sciences*, 2009, 66(24): 3837-3850.
- [13] GILBERT L I. Halloween genes encode P450 enzymes that mediate steroid hormone biosynthesis in *Drosophila melanogaster* [J]. *Molecular & Cellular Endocrinology*, 2004, 215(1-2): 1-10.
- [14] REWITZ K F, RYBCZYNSKI R, WARREN J T, GILBERT L I. Developmental expression of *Manduca* shade, the P450 mediating the final step in molting hormone synthesis [J]. *Molecular & Cellular Endocrinology*, 2006, 247(1): 166-174.
- [15] HUANG X, WARREN J T, GILBERT L I. New players in the regulation of ecdysone biosynthesis[J]. *Journal of Genetics & Genomics*, 2008, 35(1): 1-10.
- [16] YAMAZAKI Y, KIUCHI M, TAKEUCHI H, et al. Ecdysteroid biosynthesis in workers of the European honeybee *Apis mellifera* L[J]. *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, 2011, 41(5): 283-293.
- [17] RIDDIFORD L M, HIRUMA K, ZHOU X, et al. Insights into the molecular basis of the hormonal control of molting and metamorphosis from *Manduca sexta* and *Drosophila melanogaster*[J]. *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, 2003, 33(12): 1327-1338.
- [18] HOSSAIN M, SHIMIZU S, FUJIWARA H, et al. EcR expression in the prothoracicotropic hormone-producing neurosecretory cells of the *Bombyx mori* brain [J]. *Febs Journal*, 2006, 273(16): 3861-3868.
- [19] HENRICH V C, RYBCZYNSKI R, GILBERT L I. Peptide hormones, steroid hormones, and puffs: mechanisms and models in insect development[J]. *Vitamins & Hormones-advances in Research & Applications*, 1998, 55(1): 73-125.
- [20] BOLLENBACHER W E, SMITH S L, GOODMAN W, et al. Ecdysteroid titer during larval-pupal-adult development of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*[J]. *General & Comparative Endocrinology*, 1981, 44(3): 302-306.
- [21] THUMMEL C S. Molecular mechanisms of developmental timing in *C. elegans* and *Drosophila* [J]. *Developmental Cell*, 2001, 1(4): 453-465.
- [22] GILBERT L I, GRANGER N A, ROE R M. The juvenile hormones: historical facts and speculations on future research directions[J]. *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, 2000, 30(8): 617-644.
- [23] ISHIMOTO H, SAKAI T, KITAMOTO T. Ecdysone signaling regulates the formation of long-term courtship memory in adult *Drosophila melanogaster*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(15): 6381-6386.
- [24] PARTHASARATHY R, PALLI S R. Stage- and cell-specific expression of ecdysone receptors and ecdysone-induced transcription factors during midgut remodeling in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*[J]. *Journal of Insect Physiology*, 2007, 53(3): 216-229.
- [25] SCHUBIGER M, TOMITA S, SUNG C, et al. Isoform specific control of gene activity in vivo by the *Drosophila ecdysone* receptor [J]. *Mechanisms of Development*, 2003, 120(8): 909-918.
- [26] MINAKUCHI C, NAKAGAWA Y, KIUCHI M, et al. Molecular cloning, expression analysis and functional confirmation of two ecdysone receptor isoforms from the rice stem borer *Chilo suppressalis*[J]. *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, 2003, 32(9): 999-1008.
- [27] KAMIMURA M, TOMITA S, KIUCHI M, et al. Tissue-specific and stage-specific expression of two silkworm ecdysone receptor isoforms-ecdysteroid-dependent transcription in cultured anterior silk glands[J]. *Febs Journal*, 2010, 248(3): 786-793.

Identification and Expression Analysis of *HvEcR* Gene in *Heortia vitessoides* Moore

LÜ Zihao, LI Zhixing and LIN Tong

(College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract Ecdystone receptor is a member of the nuclear receptor superfamily and plays an important role in the process of insect molting. In this study, the *EcR* gene sequence with complete ORF was successfully screened from the transcriptional library and named *HvEcR* (GenBank: MH588318). The sequence is 1 734 bp, including a 1 638 bp ORF, encoding 545 amino acids with typical conserved domains of the EcR family. Sequence alignment showed that the amino acid sequence of *HvEcR* had the highest homology with *Scirpophaga incertulas* and *Chilo suppressalis*, which were as high as 96% and 92%, respectively. The results of RT-qPCR showed that the expression of *HvEcR* in adults and 5th instar larvae was 12 times and 5.68 times higher than that of the control, respectively. The expression of *HvEcR* in fat body was 4.54 times higher than that of the control, and the expression in the head and malpighian tube was 2.85 times and 2.49 times higher than that of the control, respectively. The expression of *HvEcR* was higher than that of the control after 20E injection, indicating that *HvEcR*, as a nuclear receptor gene of ecdysone, may induced by 20E.

Key words *Heortia vitessoides* Moore; Ecdysone receptor; 20E; RT-qPCR

Received 2018-08-01 **Returned** 2018-10-10

Foundation item The National Natural Science Foundation of China (No. 31470653); the Natural Science Foundation of Guangdong Province (No. 2015A030313416).

First author LÜ Zihao, male, master. Research area: insect molecular biology. E-mail: 1375886@qq.com

Corresponding author LIN Tong, male, Ph. D, professor. Research area: insect molecular biology. E-mail: lintong@scau.edu.cn

(责任编辑:郭柏寿 Responsible editor: GUO Baishou)