

# 粘虫生物钟 *timeless* 基因的克隆及时空和昼夜表达分析

冀佳悦<sup>1,2</sup> 张 蕾<sup>2</sup> 程云霞<sup>2</sup> 罗礼智<sup>2</sup> 仵均祥<sup>1\*</sup> 江幸福<sup>2\*</sup>

(1. 西北农林科技大学, 旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 陕西 杨凌 712100; 2. 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:** 为明确生物钟 *timeless* 基因对粘虫 *Mythimna separata* 迁飞、交配等周期性活动的调节作用, 利用PCR技术克隆了粘虫 *timeless* 基因, 命名为 *Mstim*, 采用生物信息方法分析其序列特征, 使用实时荧光定量PCR技术检测该基因在不同发育阶段、组织及昼夜的表达特征。结果表明, *Mstim* 的cDNA全长为3 132 bp, 编码1 043个氨基酸, 其预测的蛋白质MsTIM分子量为117 kD, 等电点5.14, 具有 *timeless* 保守的PIS、NLS等结构域, 与甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 及棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 的氨基酸序列相似性高达97%。荧光定量PCR结果显示成虫期的 *Mstim* 表达量最高, 卵期和蛹期次之, 6龄幼虫的表达量最低; 在雌、雄蛾中均以触角及头部中的表达量较高, 飞行肌、足及生殖腺中的表达量较低。粘虫雌、雄蛾触角中 *Mstim* 的昼夜表达模式相似, 均为光期表达量低于暗期, 光期5 h的表达量最低, 光期末期逐渐升高, 至暗期后3 h达到最高值, 暗期末期表达量开始下降。说明 *Mstim* 基因在粘虫中的表达不仅具有发育时期和组织的时空特异性, 而且表现出明显的昼夜特性, 推测其可能参与粘虫生长发育和迁飞与生殖等行为、生理节律的调节。

**关键词:** 粘虫; 永恒蛋白基因; 克隆; 时空及昼夜表达

## Molecular cloning and spatiotemporal and diurnal expression of the clock gene *timeless* in the oriental armyworm, *Mythimna separata* (Walker)

Ji Jiayue<sup>1,2</sup> Zhang Lei<sup>2</sup> Cheng Yunxia<sup>2</sup> Luo Lizhi<sup>2</sup> Wu Junxiang<sup>1\*</sup> Jiang Xingfu<sup>2\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Crop Stress Biology in Arid Areas, College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling, 712100, Shaanxi Province, China; 2. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

**Abstract:** To investigate the regulatory effect of *timeless* gene on migration, mating and other rhythmic activities of *Mythimna separata*, PCR was used to clone *M. separata timeless* gene (*Mstim*). Bioinformatic methods were used to analyze the characteristics of *Mstim*. The expression patterns of *Mstim* at different developmental stages, tissues, and zeitgeber were quantified by real-time quantitative PCR (qPCR). The results showed that the full-length cDNA of *Mstim* was 3 132 bp, encoding 1 043 amino acid residues with a predicted molecular mass and theoretical isoelectric point of 117 kD and 5.14, respectively. MsTIM had the conserved PIS and NLS domains of *timeless* family, and the sequence similarity was 97% in comparison with *Spodoptera exigua* and *Helicoverpa armigera*. The qPCR analysis showed that the relative expression level of *Mstim* mRNA was the highest at adult stage, followed by egg and pupal stages,

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(201403031, 201303057), 国家国际科技合作专项(2014DFR31250)

\* 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: junxw@nwsuaf.edu.com, xfjiang@ippcaas.cn

收稿日期: 2017-03-06

and 6th instar larva was the lowest. The higher relative expression of *Mstim* was recorded from antenna and head whereas lower expression was recorded from the flight muscle, leg and gonad in both female and male. The expression patterns of *Mstim* mRNA in antennae of female and male were similar at different zeitgeber time points. The expression of *Mstim* was lower in photophase than in scotophase, and the expression was lowest at the 5th hour of photophase but increased at the late photophase. The highest expression occurred at 3 h after light-out and then declined at the late scotophase. The expression of *Mstim* had not only spatiotemporal but also diurnal specificity, suggesting that this gene may be involved in regulating growth, migratory and reproductive rhythm in *M. separata*.

**Key words:** *Mythimna separata*; timeless; gene cloning; spatiotemporal and diurnal expression

生物面对地球自转、公转所产生的昼夜交替、四季更迭等环境变化,在长期的进化过程中形成了相应的节律性活动,即生物钟现象。生物钟现象广泛存在于各种生物个体的细胞活动、组织、器官和个体行为等各个结构功能层次,存在于运动、呼吸、对时间及空间的辨识能力、血淋巴的化学成分变化等方面(王英等,2008;秦粉菊等,2015)。生物钟在生物提高能量利用率、提高机体空间利用率、维持能量平衡、减少生态位重叠导致的生存竞争等方面均具有重要意义(翟启慧,1996)。生物钟现象受生物钟基因调控,目前已确认的主要生物钟基因有周期蛋白基因(*period, per*)、永恒蛋白基因(*timeless, tim*)、循环蛋白基因(*cycle, cyc*)、时钟蛋白基因(*clock, clk*)、隐花色素基因(*cryptochrome, cry*)等(Young, 2000),其中 *timeless* 是第2个被发现的生物钟基因。

基因 *timeless* 在筛选果蝇 *Drosophila melanogaster* 节律突变体的过程中被首次发现,并定位于第2多线染色体左臂(Sehgal et al., 1994; 宋何煜等, 2014)。*Timless* 的转录产物为4 955 bp的mRNA,其编码蛋白具有NLS结构域、CLD结构域、酸性结构域及与PER中PAS结构域互作的PER-1、PER-2结构域(Dunlap, 1999),并参与生物钟环路中 *per* 转录后的调节,影响PER的定位及积累(Sehgal et al., 1995; Benna et al., 2000; Scully & Kay, 2000)。*Timless* 广泛存在于生物的神经系统及非神经组织中,小鼠的大脑、心、肺、肝、胃、尿生殖脊,果蝇及家蚕 *Bombyx mori* 的头部、生殖腺、脂肪体、飞行肌及消化道等组织中均有表达(Giebultowicz et al., 2001)。在果蝇(Sehgal et al., 1994)、家蚕(Iwai et al., 2006)、黑脉金斑蝶 *Danaus plexippu* (Zhu et al., 2008)、衣鱼 *Thermobia domestica* (Kamae & Tomioka, 2012)、甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* (牛小慧等, 2012)等昆虫

中不同光周期下 *tim* 基因的表达模式也不同。而通过突变或沉默等方式改变 *tim* 表达会导致 *per* 基因表达节律与飞行、生殖等行为节律的丧失,是参与推动生物钟循环,维持个体生命活动的必需因子,也是影响种群动态的关键基因(Kobelková et al., 2015)。

粘虫 *Mythimna separata* 为害范围广、年发生世代多、暴发灾害明显,是我国三大主粮作物玉米、小麦和水稻上的重大害虫。在自然条件下,粘虫成虫除少数会在白天阴暗处羽化外,多数出现在夜间,后半夜开始出现交尾,产卵时间也集中在傍晚至黎明(侯无危, 1964),且每年会发生全国范围的迁飞为害(江幸福等, 2014)。近年来,全球气候变暖加剧、国内耕作制度与种植布局改变,加之农药滥用导致的粘虫抗药性不断增强,使粘虫灾害加剧,并在2012和2013年全国大暴发(张云慧等, 2012; 全国农业技术推广服务中心, 2014)。粘虫季节性远距离迁飞及昼伏夜出的习性均是受光照等昼夜节律授时因子(zeitgeber)影响的为害特点,为粘虫监测及有效防控造成了很大的障碍,是粘虫防治工作的研究重点(涂小云和陈元生, 2013),但目前对其节律性为害的发生机制并不明确,也尚未从生物钟角度对粘虫的环境响应行为进行研究。因此,本研究依据粘虫转录组数据库设计引物,克隆了粘虫 *timeless* 基因,分析其序列特征以及在不同发育期、不同组织及昼夜的基因表达情况,以期为进一步研究 *timeless* 基因对粘虫飞行及生殖等行为节律的调控作用提供基础依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试虫源:供试虫源取自中国农业科学院植物保护研究所迁飞害虫组室内连续多代繁殖的粘虫。

饲养环境为温度 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 $70\%\pm 10\%$ 、光周期L14:D10。幼虫饲养密度为10头/瓶(直径9 cm, 高13 cm),以新鲜玉米叶饲喂至幼虫老熟,停止取食后,将其放入含水量10%~15%的土中化蛹。成虫在养虫罩中(直径9 cm,高21 cm)配对饲养,饲喂5%蜂蜜水。

试剂:总RNA提取试剂Trizol Reagent,美国Invitrogen公司;琼脂糖凝胶DNA纯化回收试剂盒,加拿大新产业科技公司;感受态细胞Trans1-T1、克隆载体pEASY-T3,北京全式金生物技术有限公司;反转录试剂盒FastQuant RT Kit (with gDNase)、实时荧光定量试剂盒 SuperReal PreMix Plus (SYBR Green),北京天根生化科技有限公司;所有引物合成和DNA测序,生工生物工程(上海)股份有限公司;Taq酶及其它PCR相关试剂,日本TaKaRa公司。

仪器:PCR扩增仪,美国伯乐(Bio-Rad)生命医学产品(上海)有限公司;7500 Real-Time PCR System 荧光定量PCR仪,美国Applied Biosystems公司;NanoDrop 2000超微量分光光度计,美国Emplen公司;恒温培养箱,上海福玛实验设备有限公司;DYY-12型电泳仪,北京市六一仪器厂。

## 1.2 方法

### 1.2.1 总RNA的提取和第一条链的合成

取羽化后4 d的粘虫头部,使用TRIzol法提取总RNA,用超微量分光光度计与1.5%琼脂糖凝胶电泳检测RNA浓度、纯度及完整性。按照反转录试剂盒说明书的操作步骤以总RNA为模板合成第一链cDNA。

### 1.2.2 粘虫 *timeless* 基因克隆

以实验室粘虫转录组测序结果为依据,利用软件Primer Express 5设计全长引物并命名为TimF:CGTATCGCAGGAGTATTAGC和TimR:AACGCA-ACGAATGGTAGCAACAAA。使用Taq酶,以第一链cDNA为模板扩增*timeless*。反应条件:95预变性2 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s,57 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸1 min,共35个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min。PCR产物以15%琼脂糖凝胶电泳检测和分离。将目的片段纯化回收并连接到pEASY-T3载体,转化入Trans1-T1感受态细胞中,通过蓝白斑筛选及PCR扩增挑选阳性克隆并测序。

### 1.2.3 粘虫 *timeless* 基因序列分析

粘虫 *timeless* 基因氨基酸序列的推导及开放阅

读框的查找运用在线工具ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)进行处理;使用在线工具ExPASy-ProtParam tool (<http://web.expasy.org/protparam>)分析*timeless*基因编码蛋白的等电点及分子量,使用ProtScal (<http://www.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>)程序计算蛋白质的疏水性,并采用在线工具TMHMM 2.0软件(<http://genome.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>)和SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>),分析该蛋白类型,使用在线工具NetPhos (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)对蛋白的磷酸化位点进行分析,使用亚细胞定位的预测软件TargetP1.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>)对该蛋白质进行细胞定位分析,利用软件([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=NPSA/npsa\\_hnn.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=NPSA/npsa_hnn.html))进行蛋白质二级结构预测。

从NCBI数据库中获得多个物种的*timeless*基因,使用ClustalW将粘虫与获得的物种*tim*序列进行同源比对后,使用软件Mega 6以邻接法(neighbor-joining, NJ)经1 000次抽样分析将部分昆虫*timeless*基因构建系统进化树。

### 1.2.4 粘虫 *timeless* 基因时空表达谱分析

供试虫体取样前在试验光周期下进行驯化以稳定生物钟基因的表达。

测定不同发育阶段粘虫*timeless*基因相对表达量:取不同发育阶段的粘虫,于暗期起始前提取头部RNA,由于卵与1龄幼虫个体太小,取样时整头提取RNA。每个样品取样量为卵100粒,1、2龄幼虫各60头,3、4龄幼虫各15头,5、6龄幼虫各3头,蛹2个,成虫4头,其中蛹及成虫雌雄比均为1:1。

测定成虫不同组织*timeless*基因相对表达量:分别取光驯化4 d的雌、雄成虫,于暗期起始前1 h分别进行组织提取。每个样品取样为触角8对,头4个,飞行肌2个,足6对,生殖腺2个。

测定成虫不同时间*timeless*基因相对表达量:分别取光驯化4 d的雌、雄成虫,于光期起始后1 h起提取触角RNA,每4 h取样1次,每个样品取触角8对。

所有样品均设置3次以上重复,于液氮中速冻并保存于-80 $^{\circ}\text{C}$ 。

根据克隆测序结果设计多对定量引物,在生工生物工程(上海)股份有限公司进行合成,并通过普通PCR、测序以及相对标准曲线法进行荧光定量PCR等步骤筛选最佳引物,并优化反应体系,最终

选取定量引物 Tim-DF: CTGAAGAAAAGGAGTC-GGATACG、Tim-DR: AGACTGGCCCTGACTGTT-TGC。以  $\beta$ -Actin 为内参基因, 选用引物: AcF: AACTTCCCGACGGTCAAGTCAT、AcR: TGTTG-GCGTACAAGTCCTTACG 并使用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 *timeless* 基因的相对表达量。

### 1.3 数据分析

使用 SPSS 20.0 软件对结果进行统计分析, 粘虫 *timeless* 基因 mRNA 定量测定数据采用 ANOVA 单因素方差分析, 采用 Tukey's HSD 法进行差异显著性检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 粘虫 *timeless* 基因的克隆与进化分析

以粘虫 cDNA 为模板进行 *timeless* 基因的扩增, 经测序拼接得到产物的大小为 3 790 bp, 其中包含完整开放阅读框 (ORF) 3 132 bp, 编码 1 043 个氨基酸残基。Timless 编码蛋白含有 TIMELESS\_C 结构域、NLS 结构域、与 PER 中 PAS 互作的保守区段 PIS、PIS\_II 结构域 (图 1), 说明产物为粘虫 *timeless* 基因, 并命名为 *Mstim* (GenBank 登录号: KY446806)。通过软件分析可得其成熟肽的预测相对分子量为 117 kD, 理论等电点为 5.14, 其中包含酸性氨基酸残基 (Asp+Glu) 149 个, 碱性氨基酸残基 (Arg+Lys) 107 个。其蛋白质疏水性最大值为 2.378, 最小值为 -3.256, 其中有 84 个丝氨酸 (Ser), 36 个苏氨酸 (Thr), 14 个酪氨酸 (Tyr) 可能被磷酸化。其预测的二级结构  $\alpha$ -螺旋比例为 35.28%, 延伸链 12.37%, 无规则卷曲 52.35%, 且该蛋白质无信号肽。

氨基酸序列 BLAST 比对结果表明, 该序列与甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* (GenBank 登录号: HQ731035.1) 及棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (GenBank 登录号: KM233162.1) 的相似性最高, 均为 97%; 与蛀茎夜蛾 *Sesamia nonagrioides* (GenBank 登录号: DQ305401.2) TIM 氨基酸序列一致性最高, 为 82%。结果表明该序列与其它昆虫 *timeless* 基因有较高一致性。基于鳞翅目、双翅目的 12 种 *timeless* 氨基酸序列, 以邻接法构建的进化树结果显示, MsTIM 分别聚为两大支, 且同一目的昆虫聚为一支。MsTIM 与同为夜蛾科的甜菜夜蛾、棉铃虫及蛀茎夜蛾的 *timeless* 先聚合, 其次与其它科蛾类家蚕、柞蚕 *Antheraea pernyi*、地中海粉斑螟 *Ephestia kuehniella* 聚为一支, 再次与鳞翅目中黑脉金斑蝶 *Danaus plexippus*、柑橘凤蝶 *Papilio xuthus*、玉带凤蝶 *Papilio*

*polytes* 等蝶类聚为一支。而双翅目的黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 与红尾肉蝇 *Sarcophaga crassipalpis* 的 *tim* 则聚为另一支 (图 2)。进化树分析结果显示 *timeless* 蛋白聚类结果能较好地反映昆虫间的亲缘关系。

### 2.2 *Mstim* 基因表达分析

#### 2.2.1 不同发育阶段 *Mstim* 基因的表达分析

粘虫 *Mstim* 基因表达具有发育阶段特异性, 在成虫期的表达显著高于其它发育阶段, 分别是蛹期及卵期表达量的 2.00、2.81 倍; 蛹期与卵期表达量相对较高, 分别至少为幼虫期的 9.12、6.40 倍 ( $F_{(8,33)}=18.04, P<0.0001$ ) (图 3)。

#### 2.2.2 不同组织 *Mstim* 基因的表达分析

粘虫 *Mstim* 基因的表达具有组织特异性。MsTIM 基因的表达量在雌虫的头部及触角最高, 其表达量分别为飞行肌中表达量的 2.94、2.11 倍, 为足表达量的 4.45、4.48 倍, 为卵巢表达量的 5.82、5.85 倍 ( $F_{(4,15)}=134.17, P<0.0001$ )。雄虫 *Mstim* 基因表达量最高的组织为触角, 其 *Mstim* 基因表达量是头部表达量的 2.17 倍。雄虫精巢、足及飞行肌中的 *Mstim* 表达量较低, 其中飞行肌中表达量为足及精巢的 0.45 倍 ( $F_{(4,14)}=20.63, P<0.0001$ ) (图 4)。

#### 2.2.3 昼夜节律对粘虫触角 *Mstim* 基因表达的影响

粘虫成虫触角的 *Mstim* 基因表达具有时间特异性, 雌、雄虫表现了相对一致的变化趋势。雌、雄虫 *Mstim* 基因整体表现为光期中期表达量低于暗期表达量。光期起始 5 h 时, 雌、雄成虫 *Mstim* 基因的表达量下降至最低点, 分别为光期 1 h 的 0.16、0.17 倍, 随后表达量开始升高, 在暗期 3 h 时表达量达到最高, 分别为暗期 5 h 的 15.75、18.68 倍, 暗期末期时表达量开始下降 ( $F_{(5,18)}=13.88, P<0.0001$ ;  $F_{(5,18)}=15.67, P<0.0001$ ) (图 5)。

## 3 讨论

本研究根据粘虫转录组设计粘虫 *timeless* 基因引物, 成功克隆了粘虫 *timeless* 基因的 cDNA 全长序列。蛋白氨基酸序列特征分析显示, MsTIM 具有 TIM 家族典型特征, 具有 TIMELESS\_C、NLS 及 PIS、PIS\_II 结构域。粘虫 MsTIM 与其它鳞翅目 TIM 相似性达 81% 以上, 说明昆虫 TIM 较为保守, 这与甜菜夜蛾 (牛小慧等, 2012)、家蚕 (赵浩勤等, 2008)、果蝇 (Sehgal et al., 1994) 等昆虫 TIM 的研究结果一致, 且本研究的系统进化分析结果显示, 亲缘关系较近的昆虫 TIM 发育树所得位置较近, 与传统形态学分类所得结果一致。

```

1 ATGGTCCAATTAATGACATTGTTGTACAAGGACCAACAGCTTGTGACCCCTGCATAAACTTCTCAACCTGTGGATTGAAGCCCTTTTATCC
1 M V Q L I A L L Y K D Q H V V T L H K L L N L W I E A S L S
91 GAAAGTTCAGAAGACAATGAGAGTAATACCTTCGCCACCGGATAGAGGTAGTATCGTCTCCGATGTGCACCTCCGAACCAACGCTCGGAC
91 E S S E D N E S N T S P P D R G S D S S S P M C T S E P T S D
31 TCGTCTGATATGGCGGCGAGCGCAAGAGTAACGACGATCCCAACTCTGTTAACAAGATTGGGATGCGTCTTCTCAAATGAACAACCC
181 S S D M G G S G K S N D D P N S V N K D W D A S S Q M N N T
61 AGCGAATGGAATGTACCGTTCGGGAGACCTGAAGAAAAGGAGTCCGGATACGGAAGACAAAATAACACTACAGCAAGTCCTAACGAT
271 S E N G N V P F R R P E E K E S D T E D K N N T T A S P N D
91 AATGTTGTGCAATCTGATAATGGAATGTCAACGACTTGCACGAGTGGAGTACAGTCTAAGGCAACAGTCCAGGCCAGTCTCTGGCAAC
361 N V V Q S D N G M S T T C S S G V Q S K A N S Q G Q T S P G N
121 ACGTCTGAAAACCTGTAATTCGAAACTTCTGATTGCGGTTATGGTACACAATCGAAAATCAAGATCAATTTCCACATCAAGC
451 T S E K K P V I S E T S D C G Y G T Q I E N Q E S I S T S S
151 AATGAGGATGAATACCGTCAAGAACCTGTCCACCAGAAGCCACACACCCCAACAGAGGGTTAACACAAACAAGAATTCGCGCCGGC
541 N E D E L P S K K P V H Q K P H N P K Q R V N N N K N R A G
181 GTCCCATGCAAGAACGAAAGCAAGAAAATGTCAGAGAGGCAAACTCAACATCATTACGTTCAAGGACTATCCGATCAAAATCCCG
631 V S M Q E R K R K K I V K R G K S N I I N V Q G L S H K T P
211 ACAGATGATGACATTCTAACGTTTTAAAGAGTTCACCTGGGATTTCTTTTAAAGGGTACAATTCATGGTCCAGACACTTCACGAC
721 T D D D I S N V L K E F T V D F L L K G Y N S L V Q T L H D
241 CAAATTCGTCTAATCAATAGAAATAGACACTTCGCACTTCTTCTGGTACTTACTTTTTAAAGTTCGCGACGCAATCGAA
811 Q I L S N H Q L E I D T S H F F W L V T Y F L K F A T Q I E
271 CTTGACTAGAGAAGTAAATTCGGTCTATCTATCGATATTGTCGCTACTTACTGACGAGGGGGTCAATTTATGTAACAGTTCGAA
901 L D L E N V N S V L S I D I V S Y L T A E G V N L C E T F E
301 CTGGCCATCAAACCTGATGGTAATGACTTGAACCCGAACATTAGGCGTCTTCAATTTGGTGTACAGCCATACGGGAAATAATACAAGCT
991 L A I K L D G N D L K P N I R R L H L V V T A I R E I I Q A
331 ATTGATGTGTACAAAAGCTTCCACACATATGCAAGGAGGATCAAGATGCGCTTCTCAAGTACAACCTAAGATGTGTGAGACGGAAGAG
1081 I D V Y K K L P H I C K E D Q D A L K L Q L K M C E T E E
361 CTCCGACCACTTCTGTGCTACTACTGCGTATTACAACCCGAAGTACCCTCGAAGCAATATCTACAAGATGCATAGTTACGAACCA
1171 L R P L L V L L L R H Y N P K Y H S K Q Y L Q D V I V T N H
391 ATATTGCTGATGTTTTGAGCGCCCAATGAAGTCGCGGAATATAACGGTCAACCAATATGGTGTATCATATCAGACAGTTCGCTCG
1261 I L L M F L D G P M K S P E Y N G A T N M V D H I R Q F A S
421 TCTGATATAATGATCAGTACGGTGTCTGCTGGAGGACTACGCCGACAACGGAGAGTTCGTCACCACTGTGCTTCAACGGTGTGCAC
1351 S D I M Y Q Y G L L L E D Y A D N G E F V N D C V F T V M H
451 CACGTGGGGCGCAACTGGAAGCTTGTACTCTGTTTTCAGCCTAAGATTTTAAAGACATTACTACTATATGGAATCAGAATTCGAG
1441 H V G G E L E S L I T L F O P K I L K T F T T I W K S E F E
481 ATTTGTGACGATTTGCTGACCTACGCTACGAGTAAACACTTTTATTA AAAACCCCATTTTACAAGTCGATTTTAAATGAG
1531 I C D D W S D L I E Y V I N T F I K K P H S L O S R E I L I E
511 AGTTTCGAAGAGTTAAGATCGTGCAAAAGCCGGTTCAGCGCCACAAGCCTCACCAGGAGCCACTCAGGCAGGTGATAAGGAAGAACCT
1621 S F E E V K I V Q K P V P A P Q A S P E A T O A G D K K K P
541 ACCAACAGTGTGCAAGCTGCACCTCFAAAGGAAGGCGGAGTCCGAGGTGGACAGAAGATGAACTATCGTTCGTTAAGTTGGAATTCATG
1711 T N S S A S C T S K G K A E S R W T E D E L S S L S W N Y M
571 CAGTGCAGTGTCTACTGATGTCGTCGGAGAAATATCTCACTTATAAGGAAGATGGTATCATTAAATCGAGAGATTCGGTGTCAAG
1801 Q C S A L P D V V G E I I S L Y K E D G I I K S R D S V I K
601 GAGCTTTATACGCAATCTTATAAACAAGAAGATTCAGATAGATATGAAAGGGGAAACTGACAGGAATGTGAACAACAGTACAGGTT
1891 E L Y T O N L I N K E D Y D R Y V K G E T D R N V K T V Q V
631 ATGAAGGAGATGAGACGATGAAATAACAAGCTTTGTGAACAGCTCACACAAGATGGAAGTCCAAGTCTTAGATTGGGTACAAAA
1981 M K E M R D D E I N K L C E Q L T O D E G K S K F L D W A Q K
661 GTATTGTTGAAACCTGTTCCGCTAAAATATATTTAGATAAATGGCCAGGAAAAGCGAAAGTGAATAACGCAATGAAACAAAATG
2071 V L L E T C S A K I Y L D K L A R K S E S E N N A N E T K L
691 ACCACATGAAGAAATCAAATGAATCCACGCTACTGCTCCAGTCTCATATCACTCCATCTTCTCAATCAGTCCGTGCCACTGGTCCG
2161 T T L K K S N E F H V L S P V S Y H S I K L L N Q S V P L V P
721 TGGAACGCAAGCAAGCGCCGTTTGTAAAGATTGAAAGTTTCTGACGCTGCTTCATAAGCTGGGATCCACATGCCGGTGGACTCCGGG
2251 W N C K Q A A V C K D L K F L Q L L H K L G F H M P V D S G
751 AAAGTGTTCATTCGGATTCGCCAGTTTTGGTCTTCTGATTTTCTGTATGACGATAGCAGGAAAAATTCGCGGATGATAAATCAAACCT
2341 K V F I R I P O F W S D F L Y D V G K I S P I D M P
781 AAGTCTCTGTAATGATATTTCCGACAGCGGATTTCAAACCTCAATGCAACAAGAGATTACTATTGTTACCTGAAAACACAAAAGAT
2431 K F S V N D I S D S G I S N S M Q Q E S L L L L P E N T K D
811 ATCACCATGATGGAGAGTCCGAAAATTTCTATCAAAATACACAACAGAACACCTTGTACTATGGTTAACTTACACCAATGCCTGGT
2521 I T M M E S P E N F Y Q I H K Q K H L A T M V N F T P M P G
841 TCTGCTTCAACTCGGATGGTAGTGTGTTGAAAAGCACAACCTGGTGGAGCTGGTACAAAAGTCTCAAGAGTACAAAATAGCCTTGAAC
2611 S A F N S D G S D V E K H N W L E L V Q K S Q E Y K I A L N
871 TTGACAGTAGTATCATTAAACACGAGGAGGATGAAGGTCGACATAGTGTGACATGGCGGCAAGGACCGGGGCTGCGTGGCCG
2701 L S S S I I N N E E D E G S D I V M H M A G K D A A V S V P
901 CCGCTGCTGTCGGCCGCGGCTACCATCAGCTCCACCGCACCATCACCAGCACCCTCCCGCGCACGGCTCATGATGCCCCAC
2791 P L L L A A P V T I S S T A T I T S T T F P G T G L M M M P T
931 ATCATGAGCATCAACAAGAAACACGCACTTCAACGTACTGTGCTGACTCCGAACATTTAGTGTGTGAGAGCGGCATCGGTAGCC
2881 I M S I K Q E T T H F N V P V P D S E H F S V C E T A S V A
961 TCCGACCTGACTCGCATGTACGTGTCGACGAGGACGAGAAGCCGAGACTGTGCGCCCTCATCAAGATGAACCTTATCATGACGAA
2971 S D L T R M Y V S D E D E K P E T V R P L I K M N P I I D E
991 AATTGGCGGATTTGGATGAAGACAATAATTCAGAAAACAGACTACGTTGCAATTTCTTCTCTCTTTTAA
3061 N C G D L D E D N N S E T R L R V N F F S P F *
1021

```

图1 粘虫 *Mstim* 基因开放阅读框及其推导的氨基酸序列

Fig. 1 ORF region and deduced amino acid sequence of *Mstim* gene of *Mythimna separata*

双下划线表示该蛋白与PER互作区域PIS域;阴影部分表示NLS结构;实线框表示TIM的C末端区域;\*表示终止密码子。The double-underlined fragments are two PER interaction sites; NLS is shaded; the TIM protein C terminal region is in the box; the asterisk indicates the termination codon of translation.

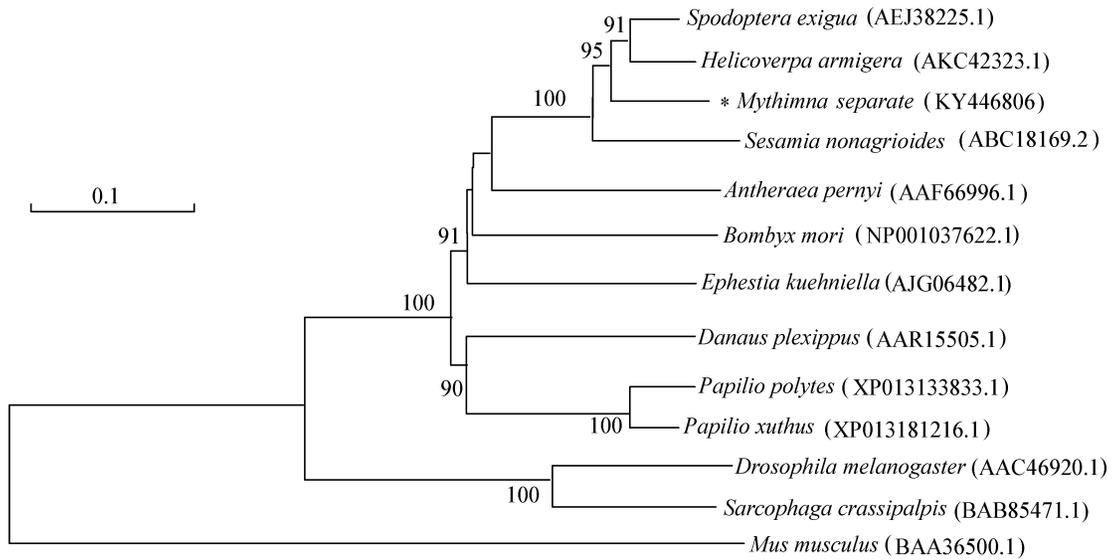


图2 基于TIM氨基酸序列以邻接法构建粘虫及其相近昆虫的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of TIM from *Mythimna separata* and related different insect species by using neighbor-joining method

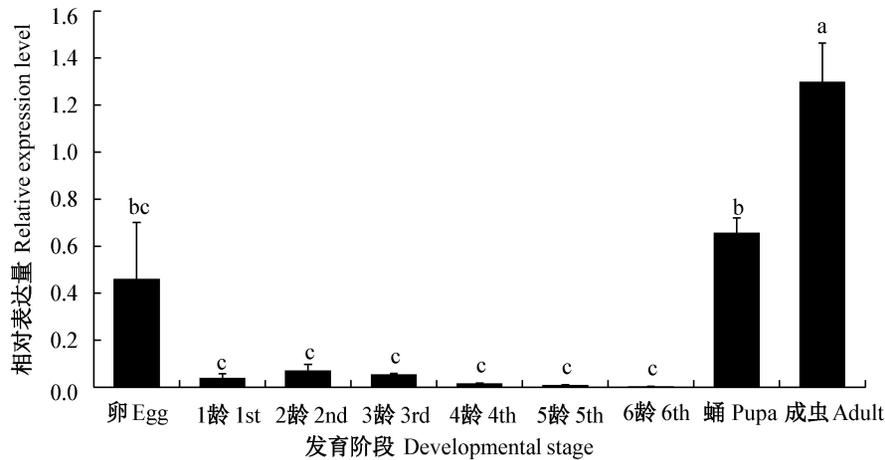


图3 粘虫 *Mstim* 基因 mRNA 在不同发育阶段的相对表达量

Fig. 3 Relative expression of *Mstim* mRNA in *Mythimna separata* at different developmental stages

图中数据为平均数±标准误。不同字母表示用 Tukey's HSD 法检验在  $P < 0.05$  水平差异显著。Data in the figure are mean±SE. Different letters indicate significant difference at  $P < 0.05$  level by Tukey's HSD test.

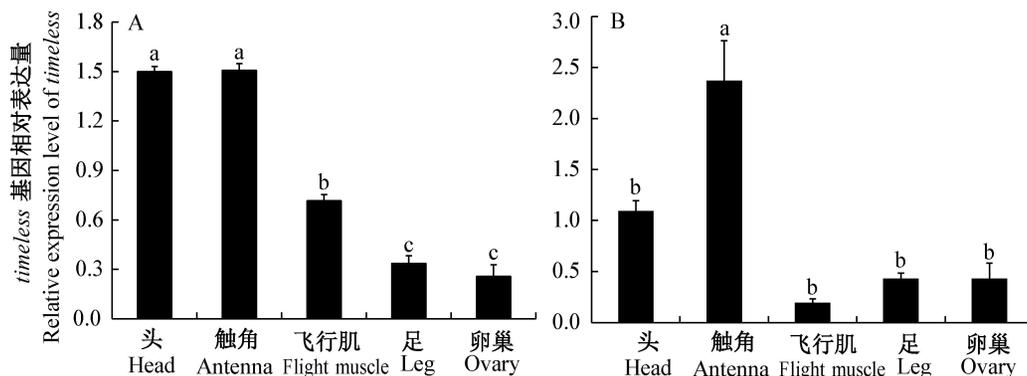


图4 粘虫 *Mstim* 基因在雌(A)、雄(B)成虫不同组织中的相对表达模式

Fig. 4 Relative expression patterns of *Mstim* mRNA in *Mythimna separata* female (A) and male (B) at different tissues

图中数据为平均数±标准误。不同字母表示用 Tukey's HSD 法检验在  $P < 0.05$  水平差异显著。Data in the figure are mean±SE. Different letters indicate significant difference at  $P < 0.05$  level by Tukey's HSD test.

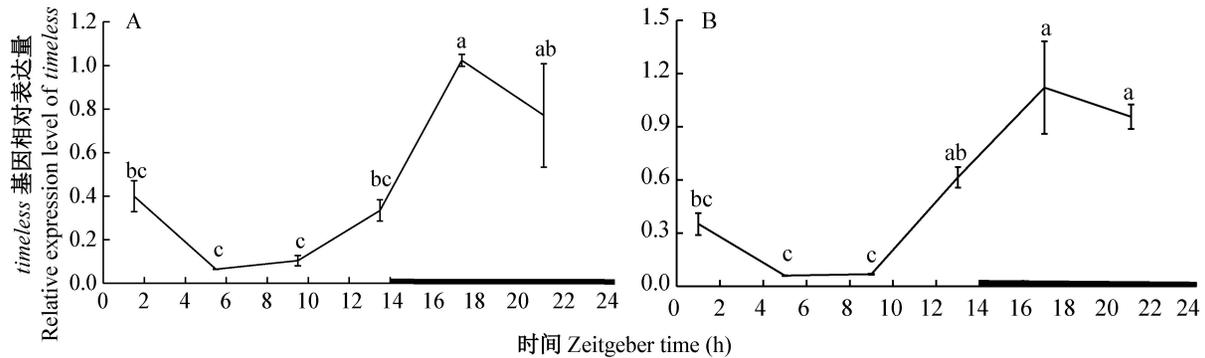


图5 粘虫 *Mstim* 基因在雌(A)、雄(B)成虫触角中不同时间的相对表达量

Fig. 5 Relative expression patterns of *Mstim* mRNA in *Mythimna separata* female (A) and male (B) antennae at different zeitgeber time points

图中数据为平均数±标准误。不同字母表示用 Tukey's HSD 法检验在  $P < 0.05$  水平差异显著。Data in the figure are mean±SE. Different letters indicate significant difference at  $P < 0.05$  level by Tukey's HSD test.

RT-qPCR 结果表明,粘虫 *Mstim* 在不同发育阶段的表达具有显著性差异,成虫期表达量显著高于其它时期,卵期和蛹期表达量则显著高于幼虫期,这种趋势和家蚕生物钟基因的表达类似(梁辉,2011)。作为全变态昆虫,粘虫蛹期开始形成触角、翅、飞行肌等器官,成虫期组织器官不断成熟,对环境变化也具有较强响应,节律性行为丰富且明显,如求偶、取食、迁飞和产卵等,可能是生物钟基因在成虫期表达量高于其它发育阶段的原因(侯无危,1964;寻慧等,2013;曾保娟和冯启理,2014)。家蚕 *period*、*timless* 基因表达情况由于孵化期诱导滞育的光温变化而改变,是卵滞育分子网络的上位基因(宋艳,2009;刘仲敏和张亚平,2001;宋何煜等,2014),因而粘虫生物钟基因在卵期及蛹期表达除可能参与调节孵化、化蛹及羽化节律外,还可能参与调节器官发育等功能。而幼虫期生物钟基因的表达量较低可能由于该时期神经、生殖等系统尚未发育完全,节律行为表现较弱。

粘虫 *Mstim* 基因在头部和触角中表达量较高,与果蝇 *timless* 表达情况相同,而家蚕及黑脉金斑蝶中,也表现为头部表达量高于飞行肌、生殖腺等外周组织(梁辉,2011)。头部作为粘虫神经系统集中的部位,是行为控制的中枢,头部的外侧神经元被认为是生物钟调控中心(Myers et al., 2003),而触角中的感觉系统集中,具有触觉、嗅觉、味觉、感受气流及温湿度等功能,与昆虫的行为发生密切相关(Schneider, 1964;魏延弟,2015)。将具有迁飞习性的黑脉金斑蝶触角涂黑后,其触角中生物钟基因的表达节律被打破,并丧失了定向飞行的能力(Guerra et al., 2012)。因此,粘虫 *Mstim* 在不同组织中的表达差异可能由于头部及触角是行为节律的主要调节器

官。在灰翅夜蛾 *Spodoptera littoralis* 等夜蛾中已发现 *timless* 的表达与雄虫精子的释放节律有关(Kotwica et al., 2009),而在点蜂缘蝽 *Riptortus pedestris* 中通过基因干扰确定生物钟基因影响了其足表皮的正常沉积(Ikeno et al., 2010),因此粘虫生殖腺及足等组织中 *Mstim* 基因的表达可能参与粘虫生殖及发育等方面的节律调节。

在家蚕及鳞翅目大红斑蝶研究中提出的生物钟调控环路中, *cryptochrome2*、*period*、*timless* 被 CLK 与 CYC 形成异二聚体后发生转录,导致 TIM/PER/CRY1 所组成的三聚体结合并积累。三聚体在白天则由于 TIM 见光分解而降解,剩余的 PER/CRY1 聚合物则对 CLK/CYC 的形成进行抑制从而调节钟基因的循环表达(王文栋等,2016)。*Mstim* 基因的昼夜表达节律表现为光期表达量下降进入暗期表达量上升,符合上述环路模型中 *timless* 变化特征,与果蝇(周先举等,2005)、黑脉金斑蝶(Guerra et al., 2012)、甜菜夜蛾(牛小慧等,2012)、地中海粉斑螟(Kobelková et al., 2015)等昆虫 *timless* 基因对光照变化的响应情况基本一致,因此推测 *timless* 在粘虫中的作用应与其它昆虫相近。粘虫其飞行、觅食及产卵等活动均发生在暗期,这种节律行为与果蝇等活动节律一样均受光调节,因此 *timless* 的昼夜振荡同样推动粘虫生物钟循环并调节其飞行等行为的发生时间。粘虫雌虫求偶行为及信息素的释放与雄虫对信息素的反应也发生在暗期,并表现出相似的昼夜节律,而这种节律在其它昆虫上证明是内源性的(侯无危,1964;汪新文和刘孟英,1997;Silvegren et al., 2005)。在甜菜夜蛾中,已发现信息素结合蛋白的昼夜表达节律受生物钟基因(*period* 和 *timless*)

的影响(牛小慧等, 2012), 在对果蝇几个近似种的求偶研究中发现, 它们求偶声节律差别在几十秒内, 却是种间正确识别交配的重要生理基础(Hall & Rosbash, 1987)。因而 *Mstim* 在雌雄粘虫的触角中呈节律性表达, 且表现出相同的相位, 可能参与调节信息素结合蛋白的表达节律, 进而影响觅食及求偶行为的昼夜节律, 并提供了同种间正确配对的基础。但是, 同样的 *timless* 基因表达模式如何导致了日行及夜行不同的行为模式还不明确, 需进一步对同种生物钟进行深入研究(Kobelkova et al., 2015)。

本研究首次对粘虫生物钟基因 *timeless* 进行了克隆, 并完成了在不同组织、不同发育阶段及昼夜表达谱的测定, 确定了 *Mstim* 的基本性质, 对比其它昆虫生物钟基因的研究, 推测 *Mstim* 基因同样在粘虫生物钟回路对节律行为的调节起重要作用。这些结果丰富了对生物钟基因 *timeless* 的认知, 并为进一步探索粘虫生物钟对其迁飞与生殖等行为的调控机制, 利用生物节律控制粘虫为害提供了理论基础。

### 参 考 文 献 (References)

- Benna C, Scannapieco P, Piccin A, Sandrelli F, Zordan M, Rosato E, Kyriacou CP, Valle G, Costa R. 2000. A second *timeless* gene in *Drosophila* shares greater sequence similarity with mammalian *tim*. *Current Biology*, 10(14): 512–513
- Dunlap JC. 1999. Molecular bases for circadian clocks. *Cell*, 96(2): 271–290
- Giebultowicz JM, Ivanchenko M, Vollintine T. 2001. Organization of the insect circadian system: spatial and developmental expression of clock genes in peripheral tissues of *Drosophila melanogaster*.// Denlinger DL, Giebultowicz JM, Saunders DS. *Insect timing: circadian rhythmicity to seasonality*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Science B.V, pp. 31–42
- Guerra PA, Merlin C, Gegear RJ, Reppert SM. 2012. Discordant timing between antennae disrupts sun compass orientation in migratory monarch butterflies. *Nature Communications*, 3: 958#
- Hall JC, Rosbash M. 1987. Genes and biological rhythms. *Trends in Genetics*, 3(3): 1185–1191
- Hou WW. 1964. The observation about active characteristics of *Leucania separata* Walker moth. *Entomological Knowledge*, 1(5): 197–200 (in Chinese) [侯无危. 1964. 粘虫 *Leucania separata* Walker 蛾的活动习性观察. *昆虫知识*, 1(5): 197–200]
- Ikeno T, Tanaka SI, Numata H, Goto SG. 2010. Photoperiodic diapause under the control of circadian clock genes in an insect. *BMC Biology*, 8: 116#
- Iwai S, Fukui Y, Fujiwara Y, Takeda M. 2006. Structure and expressions of two circadian clock genes, *period* and *timeless* in the commercial silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology*, 52(6): 625–637
- Jiang XF, Zhang L, Cheng YX, Luo LZ. 2014. Novel features, occurrence trends and economic impact of the oriental armyworm, *Mythimna separata* (Walker) in China. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 51(6): 1444–1449 (in Chinese) [江幸福, 张蕾, 程云霞, 罗礼智. 2014. 我国粘虫发生危害新特点及趋势分析. *应用昆虫学报*, 51(6): 1444–1449]
- Kamae Y, Tomioka K. 2012. *Timeless* is an essential component of the circadian clock in a primitive insect, the firebrat *Thermobia domestica*. *Journal of Biological Rhythms*, 27(2): 126–134
- Kobelkova A, Zavadská R, Sauman I, Bazalová O, Dolezel D. 2015. Expression of clock genes *period* and *timeless* in the central nervous system of the Mediterranean flour moth, *Ephesia kuehniella*. *Journal of Biological Rhythms*, 30(2): 104–116
- Kotwica J, Bebas P, Gvakharia BO, Giebultowicz JM. 2009. RNA interference of the *period* gene affects the rhythm of sperm release in moths. *Journal of Biological Rhythms*, 24(1): 25–34
- Liang H. 2011. Cloning and functional identification of *cry* gene from *Bombyx mori*. Master Thesis. Suzhou: Soochow University (in Chinese) [梁辉. 2011. 家蚕生物钟基因 *Cry* 的克隆和功能鉴定. 硕士学位论文. 苏州: 苏州大学]
- Liu ZM, Zhang YP. 2001. *Timeless* gene and biological clock genes. *Zoological Research* (in Chinese) [刘仲敏, 张亚平. 2001. *Timeless* 与生物钟基因. *动物学研究*, 22(6): 497–501]
- Myers EM, Yu J, Sehgal A. 2003. Circadian control of eclosion: interaction between a central and peripheral clock in *Drosophila melanogaster*. *Current Biology*, 13(6): 526–533
- National Agro-Technical Extension and Service. 2014. Occurrence trend forecast of the major diseases and insect pest of main crops in China in 2014. *Plant Protection*, 40(2): 1–4 (in Chinese) [全国农业技术推广服务中心. 2014. 2014年全国主要粮食作物重大病虫害发生趋势预报. *植物保护*, 40(2): 1–4]
- Niu XH, He P, Zhang T, Dong SL. 2012. Molecular identification and diurnal expression of clock gene *per* and *tim* in the common cutworm, *Spodoptera exigua* (Hübner). *Journal of Nanjing Agricultural University*, 35(1): 51–56 (in Chinese) [牛小慧, 贺鹏, 张婷, 董双林. 2012. 甜菜夜蛾生物钟基因 *Per* 和 *Tim* 的分子克隆及昼夜表达动态. *南京农业大学学报*, 35(1): 51–56]
- Qin FJ, Chen LL, Tong J. 2015. Progress of the study on chronotoxicology. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 27(11): 1427–1432 (in Chinese) [秦粉菊, 陈丽莉, 童建. 2015. 时间毒理学研究进展. *生命科学*, 27(11): 1427–1432]
- Schneider D. 1964. Insect antennae. *Annual Review of Entomology*, 9(9): 103–122
- Scully AL, Kay SA. 2000. Time flies for *Drosophila*. *Cell*, 100(3): 297–300
- Sehgal A, Price J, Man B, Young MW. 1994. Loss of circadian behavioral rhythms and *per* RNA oscillations in the *Drosophila* mutant *timeless*. *Science*, 263(5153): 1603–1606
- Sehgal A, Rothenfluhhilfiker A, Hunterensor M, Chen YF, Myers MP, Young MW. 1995. Rhythmic expression of *timeless*: a basis for promoting circadian cycles in *period* gene autoregulation. *Science*, 270(5237): 808–810

- Silvegren G, Löfstedt C, Rosén WQ. 2005. Circadian mating activity and effect of pheromone pre-exposure on pheromone response rhythms in the moth *Spodoptera littoralis*. *Journal of Insect Physiology*, 51(3): 277–286
- Song HY, Zhang Y, Jiang H. 2014. Progress on biological function of circadian gene *timeless*. *Letters in Biotechnology*, 25(3): 421–424 (in Chinese) [宋何煜, 张耀, 江红. 2014. 生物节律基因 *Timeless* 的生物学功能研究进展. *生物技术通讯*, 25(3): 421–424]
- Song Y. 2009. Research on expression of circadian rhythm gene *period* and gene *timeless* in the diapause-induce process of silkworm, *Bombyx mori*. Master Thesis. Suzhou: Soochow University (in Chinese) [宋艳. 2009. 家蚕滞育诱导过程中近日节律基因 *period* 和 *timeless* 的表达研究. 硕士学位论文. 苏州: 苏州大学]
- Tu XY, Chen YS. 2013. The behavior rhythm of moth insect. *Biological Disaster Science*, 36(1): 18–21 (in Chinese) [涂小云, 陈元生. 2013. 蛾类昆虫行为节律. *生物灾害科学*, 36(1): 18–21]
- Wang WD, Shu MY, Zhang DY, Xu SQ. 2016. Bioinformatics analysis of circadian rhythm biological clock genes in *Bombyx mori*. *Sichuan Journal of Zoology*, 35(2): 275–282 (in Chinese) [王文栋, 束梅影, 张达艳, 徐世清. 2016. 家蚕昼夜节律生物钟基因的生物信息学分析. *四川动物*, 35(2): 275–282]
- Wang XW, Liu MY. 1997. Periodicity of calling behavior and variation of sex pheromone titer in the gland of the oriental armyworm *Mythimna separata* Walker. *Acta Entomologica Sinica*, 40(4): 428–431 (in Chinese) [汪新文, 刘孟英. 1997. 粘虫雌蛾求偶周期和性信息素含量变化规律. *昆虫学报*, 40(4): 428–431]
- Wang Y, Sima YH, Song Y, Zhu XS, Xu SQ. 2008. Advances in bio-clock genes and molecular mechanism of insects. *Jiangsu Sericulture*, 30(1): 9–14 (in Chinese) [王英, 司马杨虎, 宋艳, 朱晓苏, 徐世清. 2008. 昆虫生物钟基因及其分子作用机制研究进展. *江苏蚕业*, 30(1): 9–14]
- Wei YD. 2015. Study of antennal microstructure in six species of Noctuidae. Master Thesis. Changchun: Jilin Agricultural University (in Chinese) [魏延弟. 2015. 夜蛾科6种害虫触角微观结构比较分析. 硕士学位论文. 长春: 吉林农业大学]
- Xun H, Ding KZ, Yang M, Chen HB. 2013. Histological observation of the central nervous system in *Simulium (Wilhelmia) xingyiense* (Diptera: Simuliidae). *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*, 31(6): 443–447 (in Chinese) [寻慧, 丁凯泽, 杨明, 陈汉彬. 2013. 兴义维蚋中枢神经系统的组织学观察. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 31(6): 443–447]
- Young MW. 2000. Circadian rhythms: marking time for a kingdom. *Science*, 288(5465): 451–453
- Zeng BJ, Feng QL. 2014. Study of insect metamorphosis. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 51(2): 317–328 (in Chinese) [曾保娟, 冯启理. 2014. 昆虫的变态发育研究. *应用昆虫学报*, 51(2): 317–328]
- Zhai QH. 1996. Some aspects of progress in insect molecular biology: biological clock genes. *Acta Entomologica Sinica*, 39(3): 321–329 (in Chinese) [翟启慧. 1996. 昆虫分子生物学的一些研究进展: 生物钟的基因. *昆虫学报*, 39(3): 321–329]
- Zhang YH, Zhang Z, Jiang YY, Zeng J, Gao YB, Cheng DF. 2012. Preliminary analysis of the third-generation armyworm *Mythimna separata* in China in 2012. *Plant Protection*, 38(5): 1–8 (in Chinese) [张云慧, 张智, 姜玉英, 曾娟, 高月波, 程登发. 2012. 2012年三代黏虫大发生原因初步分析. *植物保护*, 38(5): 1–8]
- Zhao HQ, Li JM, Xia DG, Zhang YS, Zhang GZ. 2008. Cloning and sequence analysis of biological clock gene *bmtim2* in *Bombyx mori*. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 36(17): 7233–7237 (in Chinese) [赵浩勤, 李佳梅, 夏定国, 张业顺, 张国政. 2008. 家蚕生物钟基因 *bmtim2* 的克隆与序列分析. *安徽农业科学*, 36(17): 7233–7237]
- Zhou XJ, Yuan CY, Yang XK, Guo AK. 2005. Progress in molecular mechanisms of circadian rhythm in *Drosophila*. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 32(1): 3–8 (in Chinese) [周先举, 袁春燕, 杨旭科, 郭爱克. 2005. 果蝇昼夜节律的分子机制研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 32(1): 3–8]
- Zhu H, Sauman I, Yuan Q, Casselman A, Emery-Le M, Emery P, Reppert SM. 2008. Cryptochromes define a novel circadian clock mechanism in monarch butterflies that may underlie sun compass navigation. *PLoS Biology*, 6(1): 4#

(责任编辑:高峰)