

## 2015年度“中国生命科学领域十大进展”：昆虫长、短翅可塑性发育的分子“开关”



← 牵头科学家张传溪，浙江大学教授，浙江大学昆虫科学研究所教授委员会主任，中国昆虫学会资源昆虫专业委员会副主任。

中国科协生命科学学会联合体：昆虫翅膀的长短随环境变化而发生改变。稻飞虱是水稻的最重要害虫，若虫可以根据环境条件变化，选择性地发育为能飞行的长翅型成虫，或发育为不能飞行但繁殖能力更强的短翅型成虫，这种可塑性发育是该虫成为毁灭性大害虫的重要原因。浙江大学张传溪教授带领的团队研究发现，稻飞虱翅芽的2个胰岛素受体在长、短翅分化中作用相反，起着分子“开关”作用，影响翅膀长短的发育。本研究成果在2015年3月《Nature》杂志上发表，被认为“是多型现象分子机理研究的一个里程碑”，在稻飞虱防治上具有重要价值。

# 稻飞虱发育为长翅或者短翅的分子“开关”

张传溪, 潘鹏路, 徐海君, 薛建

浙江大学昆虫科学研究所, 杭州 310058

### 1 小虫成大灾

香喷喷的白米饭是我们一日三餐中不可缺少的主食，实际上，中国以稻米为主食的人口占全国人口的60%以上。此外，水稻是中国最为重要的粮食作物，水稻产量占全国粮食总产量的40%以上，可想而知水稻对于我们的生存是多么重要。“谁知盘中餐，粒粒皆辛苦”，水稻种植从数千年前的史前人类开始，经历了传统农业，到如今现代化农业，种植技术不断更新成熟、种植品种不断改良，但却都一直饱受着水稻害虫的侵害。现如今，如果要问哪一类害虫对水稻为害最厉害，答案必然是：3种稻飞虱——褐飞虱（图1）、白背飞虱和灰飞虱，其中又以褐飞虱

为最凶猛。稻飞虱为害猖獗的田间，稻株下部腐烂、上部焦枯，一眼望去犹如被大火烧过一般，俗称“虱烧”，能够对水稻生产造成毁灭性打击，严重时颗粒无收。3种稻飞虱给中国水稻生产造成的年均损失高达100~200万t。此外，它们的抗农药能力极强，很难对付。为了防治稻飞虱，中国每年投入防治的农药约占全国杀虫剂年总用量的20%，破

坏生态平衡，加剧了环境和农产品的农药污染，严重威胁中国的生态安全。



图1 秧苗上的褐飞虱5龄若虫

引用格式：张传溪, 潘鹏路, 徐海君, 等. 稻飞虱发育为长翅或者短翅的分子“开关”[J]. 科技导报, 2016, 34(13): 60-66; doi: 10.3981/j.issn.1000-7857.2016.13.009

稻飞虱体形很小,成虫体长只有3~5 mm,只比芝麻粒大一点,比苍蝇小很多,但是却能飞又能跳。在英文中,飞虱叫做 planthopper,由单词 plant 及 hopper 组成,意为植物上的跳虫。在中文中,最早给这种昆虫起名的是1926年南京农业大学的邹钟琳教授。邹教授在他的论文中有详细的论述:“飞虱之名,不见于古籍,亦不相传于乡里,无锡农民称之为蠓,常州土称曰蠓水子,浙西则曰虱或称苗虱,以蠓名者,因其体小善飞似蠓故得名,然蠓类昆虫属双翅目,与本种害虫相去甚远。以虱名者,亦志其善跳,类似虱,但昆虫以虱名者,均属无翅,而本种害虫,均为有翅者也,俗称如是,颇难采用,故作者暂名曰‘飞虱’,因其体小善跳,形似虱而有翅能飞也。”因此,飞虱之名沿用至今。现在,我们又把在稻田内发生的、危害水稻的飞虱统称为稻飞虱。

那么,这种如此小的虫子,是如何对成片的水稻田造成危害的呢?稻飞虱是知了(蝉)的近亲,两者都属于昆虫纲半翅目(Hemiptera),都是用长长的口针刺穿和插入植物组织,吸取植物汁液为生。其中褐飞虱和白背飞虱非常“挑食”,它们口味非常专一,只吃水稻的汁液。与蝉一样,稻飞虱也是不完全变态昆虫,即它的生活史中没有蛹期,只需要经历卵、若虫和成虫3个阶段。其中若虫期共有5个龄期,每隔2~4 d 蜕皮1次,每蜕1次皮后长大1龄,总共要蜕完5次皮后,才羽化成为长翅或短翅的成虫(图2)。在室温下,一头受精后的雌性褐飞虱可以产下多达上千粒的卵,细小的虫卵像香蕉串一样整齐地排列在水稻的叶鞘中等待孵化,同时使水稻形成了大量伤口,破坏了疏导组织。稻飞虱从卵发育到成虫性成熟,再产下卵,为1个世代。经历这样的1个世代大概仅需要1个月的时间,故而稻飞虱的繁殖速度非常快。

因为具备上述特点,故只要环境条件适宜,稻飞虱就很容易爆发成灾,是典型的“小虫成大灾”。它们直接吸食水稻为害,产卵为害,还可传播多种水稻的病毒病,如草状丛矮病、齿叶矮缩

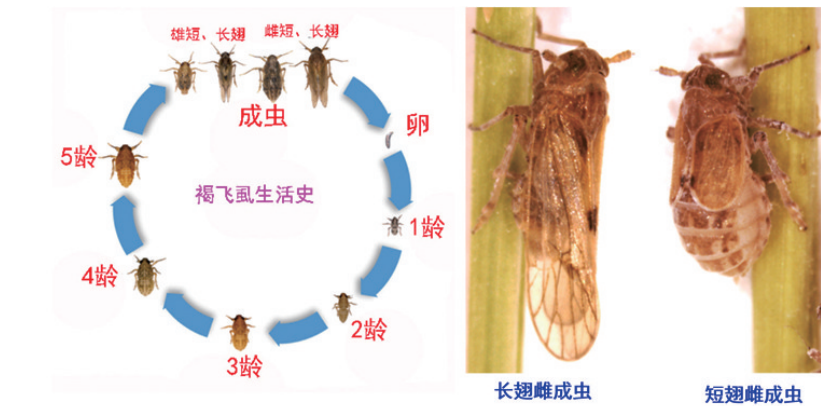
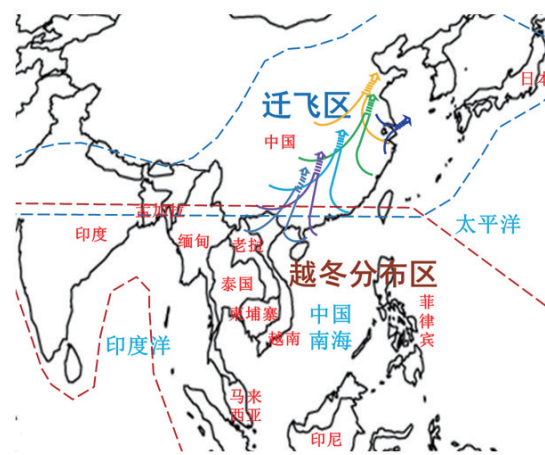


图2 褐飞虱的生活史(左)和长、短翅成虫(右)

病等。稻飞虱取食时排泄的蜜露,因富含各种糖类、氨基酸类,覆盖在稻株上,还极易导致煤烟病菌的滋生。

然而,再厉害的害虫也有弱点——稻飞虱的耐寒性很差,在中国的绝大多数水稻产区并不能越冬,否则难逃被“冻死”的命运。那么中国水稻产区的褐飞虱是从哪儿来的呢?狡猾的稻飞虱扬长避短,经历了一场浩大的迁飞——每年中国水稻主产区的初始虫源都是从温暖的东南亚国家经过长距离迁飞而来(图3)。



箭头表示其在中国东部可能迁飞的路线

图3 褐飞虱越冬分布区和迁飞扩散为害区示意

## 2 稻飞虱与昆虫的翅型分化现象

众所周知,昆虫飞翔需借助发达的飞行肌及大而轻盈的翅膀。昆虫是动物界中最早进化出翅的类群,翅的进化和昆虫一样也经历了漫长的

时期。从最早4亿8千万年前的奥陶纪原始的不具翅的石蛎目和衣鱼目出现,到4亿6百万年前早泥盆纪开始具有较原始翅的蜻蜓目和蜉蝣目出现,然后经过3亿5千万年前昆虫物种扩增以及早白垩纪全变态物种的扩增,昆虫才发展到了今天。由于昆虫种群数量巨大,同一生境并不一定能支撑所有世代的繁衍,随着环境条件的改变,它们需要通过不断扩散到新的环境中维持生存。而昆虫的迁飞扩散能力就主要由自身飞行能力和其巧妙借助自然气流的能力决定,而飞行能力则与翅和飞行肌的完全发育密切相关。

对于稻飞虱,它的成虫拥有长翅或短翅两种形态,是一种典型的“长、短翅可变发育”的昆虫:即稻飞虱生长发育到4~5龄若虫期时,能根据取食的水稻植株营养条件变化、或根据所处地的其他外界环境,确定自己到底变成“长翅”还是“短翅”的成虫(图4),亦称为“翅型分化”。长翅型成虫的前翅和后翅都很长,均超过了腹部末端,就像穿了长长的“双层燕尾服”,能够长距离迁飞;而短翅型成虫的前翅长度还不到腹部的一半,后翅完全退化,就像披了件“单层的短短马甲”,不会飞行,只会蹦跳,但繁殖能力特别强(图4)。在整个若虫阶段,我们从外观上是无法看出稻飞虱羽化后将会变成长翅还是短翅的成虫的。

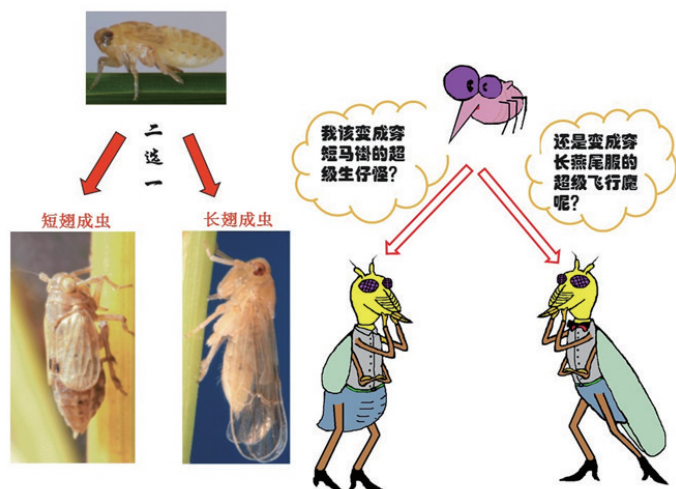


图4 若虫选择性地发育为长翅或短翅成虫示意

因此,正是因为稻飞虱的“长、短翅可变发育”特征,在水稻接近黄熟、稻飞虱种群密度过大,或气候条件变得不适时,褐飞虱和白背飞虱种群就会大量发育为长翅型成虫,进行长距离迁飞,每年自南而北迁飞到水稻植株正处于生长旺盛阶段(分蘖期)的稻区,7月前后到达中国长江中下游水稻主产区,并可以进一步北迁,到达中国东北、日本、韩国等稻区;而长翅稻飞虱成虫一旦迁飞到合适的稻田后,其后代就大量发育为短翅型成虫。短翅型成虫产卵前期短、产卵量大,因而繁殖能力特别强,新迁入区褐飞虱和白背飞虱种群规模就会迅速扩大,从而对水稻造成严重的危害。同时其携带的水稻病毒病的传播范围也会迅速扩大。

翅型分化和长距离迁飞的特性常常使褐飞虱和白背飞虱的发生呈爆发性,虫情动态变得复杂,难以被人们有效监测预警,造成区域性协同防治困难,对一些稻区的水稻生产造成毁灭性损失。因此,褐飞虱和白背飞虱,特别是前者,能成为“国际性、迁飞性、爆发性、毁灭性”大害虫,翅型分化是最主要因素之一。翅型分化和翅型比例也成为褐飞虱迁飞预警和成灾的重要生物学指标。

在生物长期进化的过程中,像稻飞虱这样,成功地进化出一种生物学特性,即其幼期个体在不同环境条件下,

可以选择性地发育成为长翅成虫或短(无)翅成虫的其他种类昆虫还有很多,例如蚜虫(图5)、蟋蟀、飞虱、长蝻、步甲等。这种翅型分化现象是昆虫在飞行扩散和繁殖能力之间权衡的一种策略,对昆虫种群的环境适应性进化具有非常重要的生物学意义:长翅型的成虫个体具有发育完全的前翅和后翅,以及与此相应的很发达的飞行肌,因此具有很强的飞行能力,在昆虫密度过高、或赖以生存的寄主植物营养条件变劣、或气候环境条件不利时,可以迅速向新的适宜生境扩散;而短翅型成虫个体的前翅、后翅和飞行肌都退化,丧失了飞行能力,但羽化为成虫后往往能更快地开始产卵,同时可以把原来分配用于生产强大飞行肌肉和翅的物质和能量全部用于繁殖,因而往往具有更强的生殖能力,从而有利于种群在适宜的环境条件下快速增殖,迅速扩大自己的种群。

我们常说的“遗传基因决定生物的特性”,但实际上,即使遗传基因完全相同的生物,在后天不同的环境条件影响下,也会“长”得很不一样。在昆虫界,例如蜜蜂的蜂后和工蜂的分化,科学家称之为“可塑性发育”。因而,像

上述这种稻飞虱的翅型分化现象也属于可塑性发育的一种。这种翅型可塑性发育的生物学特性往往使这些昆虫在生态系统中成为优势种,如果这些昆虫像稻飞虱一样是重要作物的害虫,就会给人类带来极大麻烦,它会大大增加对作物的为害能力,我们也就更难对付它们。

鉴于昆虫长短翅型可塑性(可变)发育在进化发育生物学和农业科学中的重要性,它一直是基础生物学和害虫防治的一个研究热点。半个世纪以来,国际上众多学者以蚜虫、飞虱、蟋蟀翅型变化为模式,从不同角度对昆虫翅型可塑性发育进行了广泛的研究,也积累了大量的资料,发现植物营养水平、种群拥挤程度、日照、环境温度等非遗传因素都可能影响昆虫翅型分化。例如,一种叫豌豆蚜的蚜虫,会在种群低密度时产生无翅蚜,高密度时产生有翅蚜,当栖境中有天敌存在时,会诱导豌豆蚜产生更多的有翅后代;一种叫甘蔗长蝻的昆虫,长翅型的产生是与种群密度密切相关的,同时也受到季节因子的强烈影响——长日照和高温条件下,即在夏末至初秋,长翅型后代的比例显著增加,这些长翅型更活跃,扩散到更合适的生境如夏季种植的甘蔗地中,并从秋季到冬季在其中产下滞育卵,以适应亚热带冬季气候;而一种叫烟草褐花蓟马



有翅型成虫、无翅型成虫(2头黄色体的)和若虫(黄绿色)

图5 红叶李叶片上的一种蚜虫

的害虫,它的翅型分化与光周期的关系不大,主要受到温度的控制,温度越高有翅型的比例越高。此外,一些研究人员还发现昆虫保幼激素滴度与长短翅型发育密切相关。据报道,保幼激素滴度较高时可诱导蚜虫产生无翅型成虫,而在滴度较低时则促进翅的发育。目前关于保幼激素和翅型分化的研究有很多,但依然没人能解释保幼激素影响翅型分化的机制。由于保幼激素在昆虫中由咽侧体负责合成,还有相关研究讨论咽侧体和蚜虫翅型的关系。实际上,从这么多的研究成果中我们发现,不同学者研究的条件和使用的材料不同,得出的结论有时还会互相矛盾,并不令人信服。因此,哪种因子影响翅型的说法至今还莫衷一是。

同样,在过去的几十年间,关于稻飞虱翅型分化的研究也已积累了丰富的资料。但令人遗憾的是,虽然得到了许多影响稻飞虱翅型分化的因素,包括气候因子(温度、湿度、光周期)、寄主(寄主营养、寄主生育期、寄主的品种抗性)、若虫种群密度、激素(蜕皮激素、保幼激素)等,各方面的研究结果亦不尽一致。例如,研究表明短光照条件更有利于褐飞虱短翅型雌性个体的出现,同样在短光照条件下,灰飞虱却将进入休眠和滞育状态,而短光照对白背飞虱翅型分化几乎没有影响,因而光照时数对稻飞虱翅型分化的影响在不同种属间差别较大。再比如,有研究表明稻株中的游离氨基酸含量与褐飞虱翅型分化比率呈极显著正相关,而在白背飞虱中,可溶性蛋白质含量与白背飞虱翅型的分化率之间却没有显著的相关性。综合这些前人的研究成果我们发现,至今还没有人能从根本上阐明翅型分化的确切机制,特别是其中最关键的翅型分化的分子调控机制仍一直不清楚。

那么本课题组是怎样一步步揭开稻飞虱翅型分化的神秘面纱呢?2009年国家重点基础研究发展计划(973计划)把“稻飞虱灾变机理和可持续治理的基础研究”专门单独立项,组织国内相关科学家开展研究。本课题组承担了其中有关稻飞虱分子生物学的课题,

开展了褐飞虱基因组和翅型分化分子机理研究。我们在完成了基因组测序,建立了转录组数据库以及高效的稻飞虱RNA干扰(RNAi)研究平台后,拉开了攻克昆虫翅型分化分子机理这一悬而未决的科学难题的序幕。

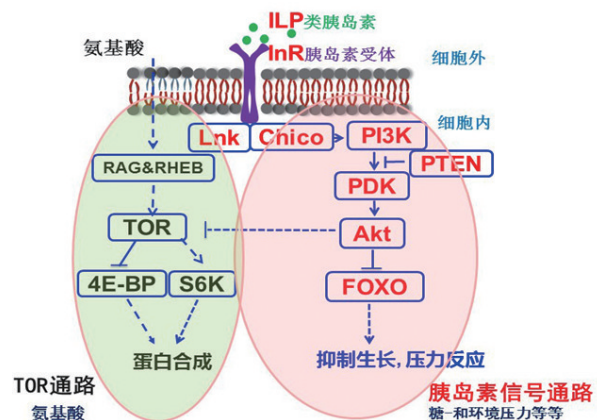
### 3 层层揭开稻飞虱翅型分化的奥秘

首先根据前人的研究,提出水稻营养变化是褐飞虱翅型分化最重要影响因素的科学假设。这是因为褐飞虱一生只取食水稻,不取食其他植物,如果水稻黄熟收割了,这时大多数褐飞虱如没有发育为长翅型,迁飞到新的稻区,只能全军覆没,在进化上也可能早就会被淘汰了。

既然褐飞虱赖以生存的水稻营养状况很可能是诱导翅型分化的外在原因,那么首先要看动物感受营养变化的主要信号通路有哪些?前人的研究表明,真核生物最主要的营养信号通路有2条,一条是胰岛素(Insulin)信号通路,另一条是雷帕霉素靶蛋白(target of rapamycin, TOR)信号通路,前者感受各种糖和环境压力等变化的信号,后者主要感受氨基酸等变化的信号(图6)。实际上,2个通路之间还是互相关联交叉的。胰岛素信号通路是目前研究最为深入的与发育相关的生物学通路之一,从胰岛素发现至今已经有近百年的历史,这个领域的研究至今已经诞生了4个诺贝尔奖,可见其研究意义的重要性。胰岛素最早被发现的作用就是降血糖,由胰腺中的胰岛分泌,与人的糖尿病相关,随后便发现它的功能越来越多样和重要,如肥胖、衰老、寿命、代谢、疾病等。胰岛素的下游有一条完整的信号传导通路——胰岛素信

号通路。通过胰岛素和受体结合,并通过逐级磷酸化,最终将胰岛素的信号传递到下游分子,并调控靶基因的转录表达,从而引起机体不同的反应。目前,这条信号通路在酵母、果蝇、线虫、小鼠等模式动物中均有详尽研究。昆虫中的胰岛素相似蛋白命名为类胰岛素多肽(ILP)。胰岛素信号通路的相关基因在昆虫中也极为保守,但由于昆虫物种多样,这条信号通路在不同发育阶段和不同细胞组织中的作用也是多样化的。

经典胰岛素信号传导过程一般由以下方面组成:1)胰岛素或类胰岛素与位于细胞膜的胰岛素受体(insulin receptor, InR)结合,受体蛋白自我磷酸化(磷酸化指蛋白质被加上磷酸基团的过程,会引起蛋白构象和活性的变化);2)磷酸化的受体蛋白接着诱导与其结合的配体蛋白(Chico)磷酸化;3)激活的Chico再进一步使磷脂酰肌醇(-3)激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)磷酸化;4)PI3K使磷酸肌醇依赖的蛋白激酶(phosphoinositide dependent kinase, PDK)磷酸化,最后是效应器Akt(又称Protein Kinase B, PKB)的活化(磷酸化)。被激活的Akt会正或负调控下游一系列分子,叉头转录因子O(forkhead box protein O, Foxo)是被Akt负调控的主要下游因子之一, Akt通过磷酸化Foxo改变其定位,使Foxo从细胞核转移到细胞质,从而使其失去启动



箭头表示信号激活和传递,“—|”表示信号被抑制

图6 动物主要营养信号通路示意

其他基因转录的活性(也就是磷酸化会使 Foxo 失活),进而调控组织细胞中下游基因表达。在经典的胰岛素信号通路边上,还有一个起刹车作用的调控基因 *Pten*, 其编码的蛋白为 Pten (phosphatase and tensin homolog), 是一种磷酸酶,会抑制 PI3K 活性,从而抑制胰岛素信号传递。

根据提出的假设,首先在前期已经完成的基因组和转录组数据库中,把上述 2 个信号通路及一些相关旁路的有关基因全部搜索寻找出来,并开始对通路中的关键基因进行研究。我们先沉默了褐飞虱若虫的 TOR 信号通路的几个关键基因的表达,包括 *TOR*、*4E-BP*、*S6K* 等,发现这些基因沉默对成虫的长短翅型比例并没有明显影响,但会影响生殖系统发育,从而严重影响其繁殖。我们也对所有相关旁路的基因进行了研究,发现它们也与翅型无关。

在排除了 TOR 信号通路等对翅型调控的作用后,我们随即把重点转到了胰岛素信号通路的研究。首先从褐飞虱基因组中发现它有 2 个胰岛素受体,这与果蝇只有 1 个胰岛素受体很不相同,我们把它们分别称为胰岛素受体 1 (*InR1*)和胰岛素受体 2 (*InR2*)。比较 2 个胰岛素受体氨基酸序列发现,实际上 2 个受体序列特别是功能结构域很像,但与 *InR1* 序列相比,*InR2* 在个别功能域的一些半胱氨酸残基被其他氨基酸残基所取代。问题来了,为什么果蝇只有 1 个胰岛素受体而褐飞虱要有 2 个胰岛素受体? 2 个受体有不同功能吗? 还是其中一个只是另一个的备份呢?

因为褐飞虱不是模式生物,研究基础差,突变体有限,也没有可用的细胞系,没有办法用果蝇的研究方法来进行信号通路研究。但得益于稻飞虱对 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 很敏感,我们在前期的研究过程中已经建立了一种高效率的稻飞虱 RNAi 试验方法,于是我们开始用 RNAi 方法进行研究。RNAi 是在研究秀丽新小杆线虫反义 RNA (antisense RNA) 的过程中发现的,是由双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 诱发的、使与双链 RNA

有相同序列的信使 RNA (mRNA) 高效特异性降解的现象,从而实现该基因部分或完全不能表达,也就是使特异性基因沉默,2006 年,安德鲁·法厄 (Andrew Z. Fire) 与克雷格·梅洛 (Craig C. Mello) 由于在 RNAi 机制研究中的贡献获得诺贝尔生理学或医学奖。我们试验中,就是通过向虫体注射人工合成的某个特定基因的双链 RNA,使该基因的 mRNA 高效特异性降解,进而使该基因不能被进一步翻译为蛋白质而失去功能。研究发现,褐飞虱的 2 龄、3 龄和 4 龄若虫注射了人工合成的 *InR1* 基因的双链 RNA 后,*InR1* 基因的 mRNA 的确会被有效降解,虫体 *InR1* 基因的 mRNA 水平下降到只有对照的约 30% 水平,而最后发育的成虫几乎全部变成了短翅型,但对照处理 (注射一种与褐飞虱任何基因序列都不相同的人工合成双链 RNA) 则只有约 75% 的成虫是短翅型,对照处理组的短翅型比例与没有注射任何双链 RNA 的普通正常饲养的比例相似。这表明胰岛素信号通路与翅型分化有关! 当 2 龄、3 龄和 4 龄若虫注射了人工合成的 *InR2* 基因的双链 RNA 后,*InR2* 基因表达也被有效沉默,更令我们惊奇的事情发生了,发育的成虫几乎全部变成长翅型。*InR2* 与 *InR1* 的功能完全相反 (图 7)。我们为了排除任何 RNAi 脱靶可能,保证结果可靠无误,针对这 2 个基因又各设计了另一个 RNAi 靶点,并由不同的研究生进行操作验证,结果与前

面相同,说明这个结果是真实可靠的。补充一点,其他基因的干扰试验我们都是采用了类似的双靶点干扰的方法,以确保结果完全可靠。

这 2 个胰岛素受体蛋白基因功能完全不同,那么它们表达的时期和组织是不是也不同? 我们通过一种能检测基因表达水平的技术即实时荧光定量 PCR 分析,发现 *InR1* 在不同发育阶段和不同组织中都表达,都比较平稳,但 *InR2* 主要在翅芽发育期的 4 龄和 5 龄若虫阶段有较高表达,更重要的是 *InR2* 几乎只在翅芽组织中表达。这说明 *InR1* 在不同发育时期和不同组织中都发挥功能,可能是基本的胰岛素受体;而 *InR2* 则可能与翅的发育有关。

干扰受体 *InR1* 产生短翅型,那么, *InR1* 是通过前面所述的经典的胰岛素信号通路控制翅型吗? 为回答这个问题,我们又对经典的胰岛素信号通路的其他几个关键基因,包括 *Chico*、*Pi3k*、*Akt* 基因,进行了 RNAi 分析,发现若虫的这些基因被干扰后,发育成的成虫与干扰 *InR1* 一样,也都变为短翅型。这表明 *InR1* 确实是通过经典的胰岛素信号通路控制翅型的。前面说过, *InR1* 在昆虫全身很多组织器官都表达,由于目前还没有好的办法仅仅干扰在翅芽组织中表达的 *InR1*,而不干扰到其他组织中的 *InR1*,我们在干扰翅芽组织的 *InR1* 的同时,也把全身其他组织的 *InR1* 干扰了。全身的 *InR1* 被干扰后,不仅仅是对翅型发生影响,与果蝇等昆虫的 *InR1* 被干扰一样,褐飞虱 *InR1* 被干扰后也会出现生长变慢,体内葡萄糖和甘油三酯含量也会相应发生变化等。这就更进一步证明 *InR1* 是经典的胰岛素信号通路的胰岛素受体。

接下来更关键的问题是, *InR2* 是如何起作用的? 它也是通过调控经典的胰岛素信号通路来控制翅型吗?

在经典的胰岛素信号通路上,如果让起刹车作用的 *Pten* 基因不表达,等于解除了抑制胰岛素信号通路的一个因子,也就等

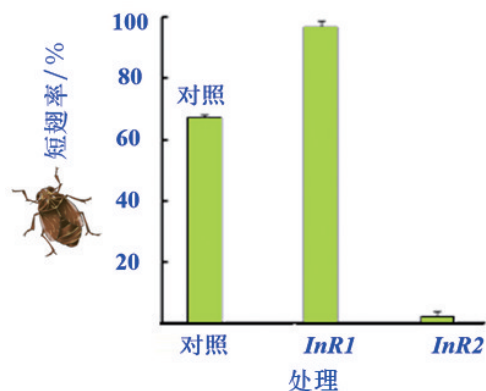


图7 褐飞虱 4 龄若虫注射 *InR1* 和 *InR2* 基因的特异双链 RNA 后成虫发育为短翅的比例

于是加强了胰岛素信号通路(图6)。另外,如果干扰掉若虫翅芽内被胰岛素信号通路抑制的下游转录因子 Foxo,理论上也应该与加强或激活胰岛素信号通路一样(图6),若虫也都应该变成长翅型。实际情况是不是果真与预期的一样?果然,我们实验表明干扰了 *Pten* 基因和 *Foxo* 基因,所有若虫都会发育成为长翅型成虫。这样看来,干扰 *InR2* 与干扰 *Pten* 和 *Foxo* 基因的结果相同,提示 *InR2* 发挥作用也可能是通过胰岛素信号通路,但 *InR2* 与 *InR1* 相反,可能是抑制胰岛素信号通路。

为了搞清 *InR2* 是通过抑制经典的胰岛素信号通路来影响翅型分化,还是通过一条新的独立的信号通路来控制翅型分化,我们设计了同时干扰2个基因的方法,也就是在干扰 *InR2* 的同时,分别干扰胰岛素信号通路上的一个关键基因。如果 *InR2* 也是利用经典胰岛素信号通路,干扰其调控的基因或下游任何基因,将会拮抗干扰 *InR2* 的原有结果,出现短翅。相反,如果 *InR2* 是通过一条新的独立的信号通路控制翅型分化,则干扰 *InR2* 的原有会发育为长翅成虫的结果将无法通过同时干扰 *InR1*、*Chico*、*Akt* 等基因反转回去。我们的双干扰结果表明,在干扰 *InR2* 的同时无论干扰 *InR1*、*Chico*、*Akt* 中的任一基因,若虫都会发育为短翅成虫,也就是说 *InR2* 干扰的效果又被干扰 *InR1*、*Chico*、*Akt* 的结果反转回去了。这些结果不仅说明 *InR2* 也是利用经典的胰岛素信号通路,而且其作用位置在 *InR1* 或其上游。随即我们用一种“蛋白与蛋白互相作用”的研究方法,表明 *InR2* 能与 *InR1* 在物理上互相作用,这就表明翅芽中特异表达的 *InR2* 蛋白可能通过与 *InR1* 蛋白结合的方式,抑制翅芽中 *InR1* 活性,从而在翅芽中负调控胰岛素信号通路。我们又进一步用实验证明, *InR2* 被干扰后,与 *Pten* 被干扰后一样,都会使胰岛素信号通路的 Akt 磷酸化信号增强,并进一步使翅芽细胞中的叉头转录因子 Foxo 蛋白磷酸化,使 Foxo 蛋白从细胞核转移到细胞质(图8),从而失去其在细胞核内控

制 DNA 转录的活性,进而调控下游基因表达,最后使翅芽发育为长翅,这也同时从另一角度证明 *InR2* 是通过经典的胰岛素信号通路来调控翅型发育的。

那么,胰岛素受体上游的胰岛素是什么情况呢?在褐飞虱基因组和转录组数据库中,我们共发现褐飞虱有4个类胰岛素多肽的基因,分别称为 *NIILP1*、*NIILP2*、*NIILP3*、*NIILP4*。那么,到底是哪一个类胰岛素多肽与翅型有关呢?我们又通过 RNA 干扰方法,发现只有 *NIILP3* 与翅型有关,干扰了 *NIILP3* 的若虫会发育为短翅型,而干扰其他3个类胰岛素基因的结果则与翅型比例无关。用免疫荧光方法我们进一步确定了 *NIILP3* 这个类胰岛素多肽是由脑细胞分泌的(图9)。*NIILP3* 大量表达并与 *InR1* 结合,可以激活胰岛素信号通路,使褐飞虱若虫发育为长翅型成虫,如果把 *NIILP3* 基因干扰掉,也会出现短翅型。

为进一步明确2个胰岛素受体在其他昆虫的翅型决定中是否也发挥了关键相反作用,我们又用水稻上另外2种飞虱,即白背飞虱和灰飞虱进行了验证,发现这2种稻飞虱的长短翅发育也同样受2个胰岛素受体调控的。在自然人工饲养条件下,灰飞虱雌成虫基本是短翅型,但 *InR2* 被干扰后,能几乎全部变为长翅型;相反,白背飞虱特别是雄成虫在野外和自然人工饲养条件下几乎都

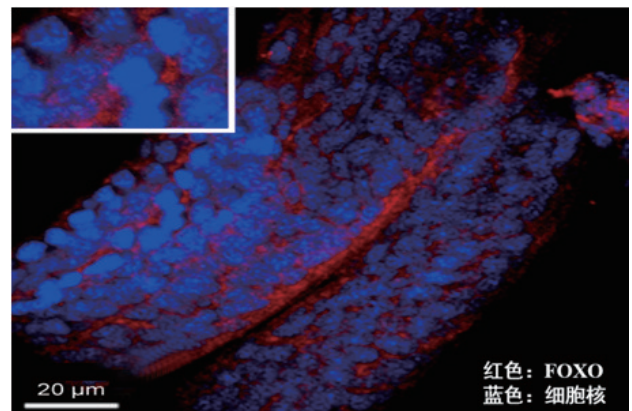
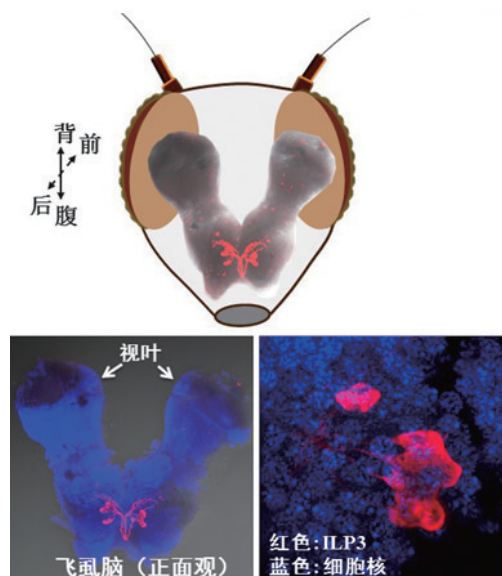


图8 褐飞虱若虫注射 *InR2* 的双链 RNA 后,翅芽细胞中 Foxo 蛋白(染为红色)从细胞核(染为蓝色)移到细胞质中

是长翅型,在野外很难找到雄的短翅型,但 *InR1* 被干扰后,能几乎全部变为短翅型。说明至少在飞虱科的昆虫中,翅型可塑性发育都是由这2种胰岛素受体“开关”调控的(图10)。

基于上述的一系列实验结果,我们提出了稻飞虱长短翅选择性可变发育的分子调控模式:长翅型是稻飞虱等有翅昆虫成虫的基本翅型模式,脑分泌的类胰岛素 ILP 通过与翅芽细胞的胰岛素受体 *InR1* 结合,激活胰岛素信号通路,使稻飞虱若虫发育为长翅型成虫;但当 *InR2* 与 *InR1* 结合后,会抑制胰岛素信号通路的活性,导致稻飞虱若虫发育为短翅型成虫(图11)。通俗地说



染为蓝色的为脑细胞核,染为红色的为 ILP3  
图9 与翅型发育相关的类胰岛素 *NIILP3* 在脑中的定位

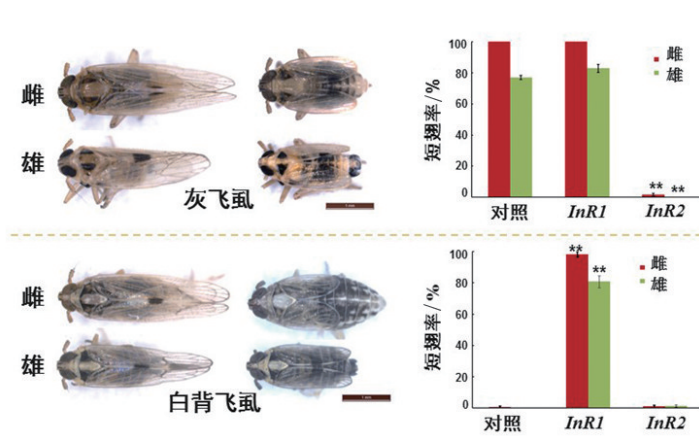


图10 灰飞虱和白背飞虱的若虫 *InR1* 和 *InR2* 分别被干扰后成虫长短翅比例

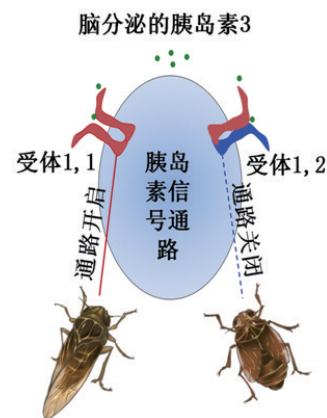


图11 2个胰岛素受体控制稻飞虱长、短翅选择性发育的示意

即,稻飞虱的翅芽组织内存在着2个胰岛素受体,它们的表现决定了胰岛素的信号传导如何调节这种昆虫翅型的发育,就像一个“分子开关”。当只有胰岛素受体1(*InR1*)活跃时,就打开了“长翅”这个开关,“长翅”的信号一路得到传递,最终若虫发育成具有远程迁飞能力的长翅型成虫。在另一种情况下,2个胰岛素受体同时活跃,其结果相当于关闭了开关,稻飞虱的成虫翅会变得很短,但具备更强的繁殖能力。当这些昆虫刚长途迁飞来到一片新水稻田后,它们关闭“开关”,产出大量的短翅型后代,以尽可能扩大种群数量;而当水稻黄熟营养即将耗尽时,短翅型成虫可以部分或完全打开“开关”,使后代发育成更多的长翅型,以迁徙到远处的另一片稻田。

这样,我们的研究团队经过全力的合作攻关,在解析了褐飞虱基因组、不同时间和组织转录组及进行了一系列功能基因研究的基础上,克服了非模式生物研究的一系列困难后,通过自主设计,经过近5年多的潜心研究,终于发现了控制稻飞虱长、短翅型可塑性发育的分子“开关”,解开了昆虫翅型控制机制这一困扰学界多年的难题,提出了2个胰岛素受体调控翅型分化的信号通

路模型。研究结果“Two insulin receptors determine alternative wing morphs in planthoppers”于2015年3月18日在线发表于《Nature》。

该成果有何理论和实际意义?

首先,基因型完全相同的生物在生长发育过程中,由于受到不同外部环境条件下的诱导和影响,不同幼体可以生长发育为具有显著外形差异的成年个体。表型发育可塑性是生物在长期进化过程为适应不断变化的生态环境而形成的一种极其重要的生存策略,其中昆虫翅型的可变发育就是这种生物表型可塑性发育的典型例子。因此该项结果在进化发育生物学和昆虫翅型可塑性发育研究上具有重要意义,《Nature》杂志评审专家指出“该研究代表了多型现象分子机理研究的一个里程碑”。

其次,胰岛素信号转导通路是动物细胞最基本通路,该通路异常与人和动物的许多疾病相关。本项研究发现了2个胰岛素受体具有完全相反的正负向调节功能,这挑战了人们对胰岛素受体传统功能的认知,扩展了人们对生物胰岛素信号途径调控的认识。这可能为胰岛素信号通路相关疾病研究提供重要参考。

第三,该项研究从分子机制上解析了昆虫翅型分化的本质,在害虫防治上也具有重要的价值。本研究表明,稻飞虱在产生长、短翅的若虫期,其胰岛素信号通路基因的表达就会发生变化,而长短翅比例可以作为害虫扩散的重要指标,因此本研究结果为稻飞虱的测报预警提供了重要的理论依据;同时,目前在实验室中已经可以通过调控基因,人为地使褐飞虱幼体全部发育为短翅型或长翅型,今后有望在此基础上开发出通过水稻介导基因表达的方式调控褐飞虱翅型,或直接开发能抑制不同翅型发育的绿色新型药剂,从而达到控制稻飞虱的迁飞扩散和危害的目的。

但是,虽然我们解决了昆虫翅型可塑性发育的分子“开关”这一核心问题,仍还有不少问题需要进一步研究,比如水稻发育阶段和其他环境条件变化是如何转化为分子信号进而影响类胰岛素和胰岛素受体2基因表达及其活性变化的?胰岛素受体2是如何具体调节受体1的?转录因子Foxo是如何调控与翅和间接飞行肌相关的一系列下游基因表达的?除飞虱科外,所有昆虫的翅型都是由这2个胰岛素受体控制的吗?这些问题,都有待科学家们逐步解答。