

# 肿瘤坏死因子受体相关因子基因 *TRAF4* 促进烟粉虱与共生菌 *Portiera* 的共生关系



李娜娜<sup>1</sup> 赵正阳<sup>1</sup> 韦凯恒<sup>1</sup> 洪继生<sup>1</sup> 闫金阳<sup>2</sup> 栾军波<sup>1\*</sup>

(1. 沈阳农业大学植物保护学院, 沈阳 110866; 2. 辽宁省大连市普兰店区现代绿色农业发展服务中心, 大连 116200)

**摘要:** 为明确肿瘤坏死因子受体相关因子(tumor necrosis factor receptor-associated factor, TRAF)基因 *TRAF4* 在烟粉虱 *Bemisia tabaci* 隐种 MEAM1 与含菌细胞共生菌互作中的作用, 对 *TRAF4* 蛋白进行保守结构域及系统发育分析; 通过实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 方法检测 *TRAF4* 在含菌细胞和整虫体内的表达量; 利用 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术抑制烟粉虱 *TRAF4* 基因表达, 然后通过 qPCR 技术检测含菌细胞共生菌滴度、统计烟粉虱产卵量以及采用免疫荧光技术检测烟粉虱含菌细胞的自噬水平。结果表明, *TRAF4* 蛋白含有 Zinc finger 和 TRAF 结构域, 与黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 及埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 的 *TRAF4* 蛋白聚为一支。*TRAF4* 在含菌细胞中显著高表达。注射 ds*TRAF4* 后, *TRAF4* 基因表达量显著下调, *Portiera* 滴度及烟粉虱产卵量均显著下降, 含菌细胞自噬水平显著升高。表明烟粉虱 *TRAF4* 不仅影响烟粉虱的产卵量, 还能通过抑制含菌细胞的自噬水平维持 *Portiera* 在烟粉虱体内的滴度, 对烟粉虱与 *Portiera* 共生关系的维持起到正向调控作用。

**关键词:** 烟粉虱; 共生关系; *Portiera*; 免疫; 自噬

## Tumor necrosis factor receptor-associated factor gene *TRAF4* promotes the symbiosis between tobacco whitefly *Bemisia tabaci* and primary endosymbiotic bacterium *Portiera*

Li Nana<sup>1</sup> Zhao Zhengyang<sup>1</sup> Wei Kaiheng<sup>1</sup> Hong Jisheng<sup>1</sup> Yan Jinyang<sup>2</sup> Luan Junbo<sup>1\*</sup>

(1. College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, Liaoning Province, China;

2. Modern Agricultural Production and Development Service Center of Dalian Pulandian District, Dalian 116200, Liaoning Province, China)

**Abstract:** To determine the role of the tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) gene *TRAF4* in the interaction between the whitefly *Bemisia tabaci* MEAM1 and bacteriocyte symbionts, we analyzed the conserved domain and phylogeny of the *TRAF4* protein. In addition, *TRAF4* expression levels in bacteriocytes and the whole body were detected using quantitative real-time PCR (qPCR). Following inhibition of *TRAF4* expression in *B. tabaci* using RNA interference (RNAi), we measured the titers of symbionts by qPCR, counted the number of eggs, and assessed autophagy levels in bacteriocytes through immunofluorescence. The results showed that *TRAF4* protein contained Zinc finger and TRAF domain and clusters with *TRAF4* proteins from *Drosophila melanogaster* and *Aedes aegypti*. *TRAF4* was highly expressed in the bacteriocytes. Upon injection of ds*TRAF4*, the expression of *TRAF4* was significantly downregulated, leading to decreased titers of *Portiera* and reduced number of eggs laid by females. Additionally, the autophagy level of bacteriocytes was significantly increased. These results

基金项目: 国家杰出青年科学基金(32225042)

\* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: jbluan@syau.edu.cn

收稿日期: 2023-09-05

indicate that *TRAF4* plays a crucial role in maintaining the titer of *Portiera* in *B. tabaci* by inhibiting autophagy in bacteriocytes, and also contributes to the interaction between *B. tabaci* and *Portiera*.

**Key words:** whitefly; symbiosis; *Portiera*; immune; autophagy

肿瘤坏死因子受体相关因子(tumor necrosis factor receptor-associated factor, TRAF)是一类重要的胞内配体蛋白,能够介导包括肿瘤坏死因子受体家族和白细胞介素-1受体/Toll样受体家族在内的一大类受体家族的信号转导过程,在适应性和先天免疫、炎症反应、胚胎发育及骨代谢等方面具有广泛的生物学功能(Wang et al., 2010; Häcker et al., 2011; Zotti et al., 2012)。截至目前,已经在哺乳动物中鉴定到7个TRAF蛋白TRAF1~TRAF7(Zotti et al., 2012; Park, 2018);在果蝇 *Drosophila* 中发现了3个TRAF蛋白,分别为dTRAF1(也称作TRAF4)、dTRAF6(也称作TRAF2)和dTRAF3(Liu et al., 1999; Grech et al., 2000);在埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 中鉴定到1个TRAF蛋白AeTRAF4(Wang et al., 2023)。Medzhitov & Janeway(2000)和Zapata et al.(2000)研究表明在果蝇细胞系中过表达TRAF4和TRAF2蛋白会导致NF- $\kappa$ B信号途径的激活。Wang et al.(2023)研究发现埃及伊蚊感染真菌后Ae-TRAF4蛋白含量显著上调,AeTRAF4蛋白通过促进NF- $\kappa$ B转录因子Rel1转位进细胞核,激活抗菌肽基因的表达,提高了埃及伊蚊对真菌的抗性。除了激活NF- $\kappa$ B信号途径,TRAF蛋白还可以直接调控自噬,如Qi et al.(2017)研究发现TRAF1a和TRAF1b通过调控ATG6的泛素化和稳定性来影响拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 自噬体的形成;Dou et al.(2017)研究认为TRAF6通过抑制丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(serine/threonine-protein kinase, ULK1)的磷酸化水平进而抑制自噬的发生。虽然在果蝇和埃及伊蚊中 *TRAF4* 基因参与了昆虫对外界病原物入侵的免疫反应(Medzhitov & Janeway, 2000; Zapata et al., 2000; Wang et al., 2023),但是该基因在其他昆虫中的功能尚待阐明。

烟粉虱 *Bemisia tabaci* 是一种至少由40种形态上相似的隐种组成的复合体(De Barro et al., 2011; Mugerwa et al., 2021)。其中,中东小亚细亚(Middle East Asia Minor 1, MEAM1)隐种是一种重要的全球入侵性农业害虫,通过直接取食植物韧皮部汁液、分泌蜜露、诱发植物煤污病和传播植物病毒病等方式进行为害,每年对蔬菜、花卉及大田作物的生产造成严重的损失(纠敏等, 2006; Liu et al.,

2007; 胡明鑫等, 2023)。烟粉虱MEAM1隐种体内的专性共生菌 *Candidatus Portiera aleyrodidarum* (简称 *Portiera*) 和兼性共生菌 *Candidatus Hamiltonella defensa* (简称 *Hamiltonella*) 共同分布在含菌细胞中(Gottlieb et al., 2008; Luan et al., 2016; 陈吉强等, 2020)。含菌细胞分布在烟粉虱腹部血淋巴中,通过钻入卵巢介导共生菌的垂直传播(Luan et al., 2016; 2018)。共生菌 *Portiera* 和 *Hamiltonella* 为烟粉虱合成必需的营养物质,能调控宿主的生殖、代谢、免疫,与宿主之间有紧密的共生关系(Ren et al., 2021; Yao et al., 2023; Luan, 2024)。Wang et al.(2022)研究表明,含菌细胞的自噬水平能够负向调控含菌细胞共生菌 *Portiera* 和 *Hamiltonella* 的滴度。

为研究烟粉虱 *TRAF4* 基因对含菌细胞共生菌的免疫调控,本研究对TRAF4蛋白进行保守结构域及系统发育分析;通过实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, qPCR)方法检测 *TRAF4* 在含菌细胞和整虫中的表达量;利用RNA干扰(RNA interference, RNAi)技术抑制烟粉虱 *TRAF4* 基因表达,通过qPCR方法检测含菌细胞中共生菌滴度、统计烟粉虱产卵量以及采用免疫荧光技术检测烟粉虱含菌细胞的自噬水平,以期拓宽烟粉虱与含菌细胞共生菌互作的分子机制以及为烟粉虱的绿色防控提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试昆虫及植物:烟粉虱隐种MEAM1由浙江大学昆虫研究所刘树生教授实验室提供,以棉花为寄主植物建立的原始种群,在光照周期14 L:10 D、温度(26±2)℃、相对湿度60%~80%的人工气候室内饲养维持种群,每3~5代检测1次种群纯度,选取烟粉虱雌成虫供试。供试棉花品种为石远321,种子由中国农业科学院植物保护研究所陆宴辉研究员提供,室温阴凉干燥保存。棉花栽培于装有混合土(泥炭土:蛭石:珍珠岩按照体积比3:1:1混合)、口径为14 cm的塑料盆中,然后置于长50 cm、宽40 cm、高50 cm的养虫笼中,定期施水肥(4 L水加5 g肥料),待棉花长到6~8片真叶时用于试验。混合土和肥料均购于当地市场。

1.5%琼脂培养基(agar-based medium):称取1.5 g琼脂粉加入100 mL蒸馏水中,加热融化后冷却至60 °C后倒入直径为3.5 cm的培养皿中,备用。

试剂和仪器:Trizol试剂,美国Ambion公司;All-in-One cDNA Synthesis SuperMix Kit、2×SYBR Green Master Mix,美国Bimake公司;T7 RiboMAX™ Express RNAi System Kit,美国Promega公司;Rabbit-anti-Atg8,江苏溥博生物科技有限公司;Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody、Alexa Fluor Plus 488,美国Invitrogen公司;DAPI溶液,美国Thermo公司;牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA),美国Sigma公司;Omega E.Z.N.A.® Extraction Kit,美国Omega公司;2×Taq Master Mix,南京诺唯赞生物科技股份有限公司;琼脂粉,北京索莱宝科技有限公司;琼脂糖,莫纳生物科技有限公司;绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)质粒,西北农林科技大学田宏刚博士惠赠;NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、KCl、Tris-HCl、吐温-20、明胶、乙基苯基聚乙二醇、蛋白酶K,生工生物工程(上海)股份有限公司;其他试剂均为国产分析纯。S1000 PCR仪、CFX-96荧光定量PCR仪、Sub-Cell GT水平电泳槽,美国Bio-Rad公司;NanoDrop 2000核酸测定仪,美国Thermo公司;SMZ1270体式显微镜,日本Nikon公司;FemtoJet 4i显微注射仪,德国Eppendorf公司;P-2000/G拉针仪,美国Sutter Instrument公司;FV3000共聚焦显微镜,日本Olympus公司;MLS-351H光照培养箱,日本Sanyo公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 保守结构域及系统发育分析

从NCBI中获取文献中已报道的智人*Homo sapiens*、黑腹果蝇*Drosophila melanogaster*及埃及伊蚊的TRAF4蛋白序列。烟粉虱隐种MEAM1的TRAF4蛋白序列来自于烟粉虱基因组数据库(<http://www.whiteflygenomics.org/cgi-bin/bta/index.cgi>)。通过Local Blast的方法以烟粉虱隐种MEAM1的TRAF4蛋白序列对烟粉虱隐种MED、隐种SSA-ECA和温室白粉虱*Trialeurodes vaporariorum*的TRAF4蛋白序列进行比对。利用在线工具SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)预测黑腹果蝇、埃及伊蚊、烟粉虱隐种MEAM1、隐种MED、隐种SSA-ECA及温室白粉虱的TRAF4蛋白质的结构域;使用MAFFT 7(<https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>)中L-INS-i algorithm程序进行多序列比对,并使用PhyIemon 2(<http://phyIemon.bioinfo.cipf.es/>)中 tri-

mAL v1.3程序对序列进行校正。采用贝叶斯方法构建系统发育树,在Prottest 3.4软件中预测出最佳建树模型;用MrBayes-3.2.7软件进行建树,mcmt迭代1 000万次,burninfrac=0.25, samolefreq=1 000,采用Tracer v1.7.2软件对系统发育树进行可靠性检验。

### 1.2.2 TRAF4在烟粉虱含菌细胞和整虫中的表达量

收集100头羽化7 d的烟粉虱雌成虫,解剖获得2 000个含菌细胞,作为1个生物学重复;收集10头羽化7 d的烟粉虱雌成虫作为1个生物学重复,各3个生物学重复,分别用于测定TRAF4在烟粉虱含菌细胞和整虫体内的表达量。

利用Trizol试剂提取烟粉虱含菌细胞及整虫的RNA,使用核酸测定仪检测RNA浓度及质量。按照All-in-One cDNA Synthesis SuperMix Kit说明书将2 μg RNA反转录为cDNA,并稀释2倍备用。在Real-time PCR引物设计网站(<https://www.genscript.com.cn/tools/real-time-pcr-taqman-primer-design-tool>)设计qPCR引物qTRAF4-F/qTRAF4-R(表1),以RPL13和RPL7作为内参基因(表1)进行qPCR反应,引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。20 μL qPCR反应体系:cDNA模板2 μL、2×SYBR Green Master Mix 10 μL、10 μmol/L正反向引物各0.8 μL、ddH<sub>2</sub>O 6.4 μL。采用两步法程序进行qPCR反应,扩增程序:95 °C预变性30 s,95 °C变性5 s,60 °C退火和延伸30 s,共40个循环。最后添加熔解程序:快速升温至95 °C变性15 s,降温至60 °C退火15 s,将反应体系缓慢升温至95 °C保持15 s。2个技术重复。采用2<sup>-ΔCt</sup>方法计算基因表达量(Schmittgen & Livak, 2008)。

### 1.2.3 dsRNA合成及注射

根据烟粉虱TRAF4的编码序列,在Primer Premier 5.0软件上设计dsTRAF4引物dsTRAF4-F/dsTRAF4-R(表1),并在5'端添加T7启动子和保护碱基。以GFP基因作为对照。参考1.2.2方法获得烟粉虱cDNA,以cDNA为模板扩增TRAF4序列,以GFP质粒为模板扩增GFP序列。20 μL PCR反应体系:cDNA/GFP质粒2 μL、2×Taq Master Mix 10 μL、10 μmol/L正反向引物各0.8 μL、ddH<sub>2</sub>O 6.4 μL。扩增程序:94 °C预变性5 min;94 °C变性30 s,65 °C退火30s,72 °C延伸30s,共进行35个循环;最后,72 °C延伸10 min。按照Omega E.Z.N.A.® Extraction Kit说明书纯化PCR产物。按照T7 RiboMAX™ Express RNAi System Kit说明书合成dsTRAF4和ds-

*GFP*。将 dsRNA 溶解于注射缓冲液 (5 mmol/L KCl, 0.1 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 中, 采用核酸测定仪检测 dsRNA 浓度, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 dsRNA 条带大小, 检验合格后于 -80 °C 下保存。使用显微注射仪分别向 500 头羽化 1 d 烟粉虱雌成虫体内注射浓度为 1.5 μg/μL ds*TRAF4* 和 ds*GFP*, 每头烟

粉虱注射 10 nL。将注射后的烟粉虱放入直径为 3.5 cm 的培养皿中, 培养皿底部放一层琼脂培养基, 将棉花叶片平铺在培养基上供烟粉虱取食, 培养皿用封口膜封口, 放入温度为 (26±2) °C、光周期为 14 L:10 D、相对湿度为 60%~80% 的光照培养箱中培养, 用于后续试验。

表 1 本研究所用引物序列

Table 1 Sequences of primers used in this study

引物 Primer	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	用途 Purpose
q <i>TRAF4</i> -F	AAGCCGGCTGCAGATTTAAG	基因表达及沉默效率检测
q <i>TRAF4</i> -R	GGACACAACGTGTCACATCA	Gene expression and silencing efficiency detection
RPL7-F	TTTGACAGACGTCAGTTCTCC	基因表达检测的内参基因
RPL7-R	TTACTGCCTTCTTCGGCTTT	Reference genes for gene expression detection
RPL13-F	GTTCCCTGTGCTATGAGGGT	
RPL13-R	TCCAACCAACATCAGAGGAA	
ds <i>TRAF4</i> -F	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGCTACG- AAGACTGAAGGGACAC	dsRNA 合成 dsRNA synthesis
ds <i>TRAF4</i> -R	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGGACCA- GATGTTGTTGACTGC	
ds <i>GFP</i> -F	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGCACAA- GTTTCAGCGTGTC	
ds <i>GFP</i> -R	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGGTTCA- CCTTGATGCCGTTT	
<i>β-actin</i> -F	TGGAGATGGTGTTCACAC	沉默效率检测的内参基因
<i>β-actin</i> -R	CCAGCCAAGTCCAAACGAAG	Reference gene of silencing efficiency detection
Port73/Port266-F	GTGGGAATAACGTACGG	<i>Portiera</i> 滴度检测
Port73/Port266-R	CTCAGTCCCAGTGTGGCTG	<i>Portiera</i> titer detection
H-16S-F	GCATCGAGTGAGCACAGTTT	<i>Hamiltonella</i> 滴度检测
H-16S-R	TATCCTCTCAGACCCGCTAGA	<i>Hamiltonella</i> titer detection
<i>actin</i> -F	TCTTCCAGCCATCCTTCTTG	共生菌滴度检测的内参基因
<i>actin</i> -R	CGGTGATTTCTTCTGCATT	Reference gene for symbiont titer detection

下划线部分表示 T7 启动子。The T7 promoter sequence is underlined.

#### 1.2.4 注射 dsRNA 后 *TRAF4* 基因沉默效率检测

每个培养皿中分别放入 20 头注射 ds*TRAF4* 和 ds*GFP* 后的烟粉虱, 在光照培养箱中培养 3 d 和 6 d 后, 收集烟粉虱用于检测沉默效率。处理和对照各 5 个生物学重复, 每个生物学重复收集 9 头烟粉虱, 参照 1.2.2 方法提取烟粉虱 RNA 并反转录获得 cDNA。选取 *β-actin* 为内参基因, 引物如表 1 所示, 通过 qPCR 方法检测注射 dsRNA 后 *TRAF4* 基因的表达水平, 采用  $2^{-\Delta C_t}$  方法计算沉默效率 (Schmittgen & Livak, 2008)。qPCR 方法同 1.2.2。

#### 1.2.5 沉默 *TRAF4* 对烟粉虱共生菌滴度和产卵量的影响

每个培养皿中各放入 20 头注射 ds*TRAF4* 和 ds*GFP* 的烟粉虱雌成虫, 在温度为 (26±2) °C、光周期

为 14 L:10 D、相对湿度为 60%~80% 的光照培养箱中培养 6 d 后, 参考 Wang et al. (2020) 方法提取烟粉虱的 DNA, 于 -20 °C 下保存, 用于检测共生菌滴度。通过检测 *Portiera* 和 *Hamiltonella* 的 16S rDNA 基因表达量来反映共生菌滴度, 引物分别为 Port73/Port266 和 H-16S (表 1)。处理和对照各 20 个生物学重复。选取 *actin* 作为内参基因, 以烟粉虱 DNA 为模板进行 qPCR 反应, 反应体系及程序同 1.2.2。同时, 在每个培养皿中放入 1 头注射 dsRNA 的烟粉虱, 在温度为 (26±2) °C、光周期为 14 L:10 D、相对湿度为 60%~80% 的光照培养箱中培养 6 d 后, 吸走烟粉虱成虫, 在体式显微镜下记录并统计产卵量。处理和对照各 23 个生物学重复。

### 1.2.6 沉默 *TRAF4* 对含菌细胞自噬的影响

通过免疫荧光标记的方法检测沉默 *TRAF4* 对烟粉虱含菌细胞自噬的影响。收集注射 *dsTRAF4* 和 *dsGFP* 6 d 后的烟粉虱雌成虫,各解剖获得 50 个含菌细胞,将含菌细胞转移到 100  $\mu$ L 的 4% 多聚甲醛溶液中,室温固定 4 h;加入 0.2% TritonX-100 100  $\mu$ L,4  $^{\circ}$ C 过夜渗透;加入用 3% BSA 稀释 200 倍的 Rabbit-anti-Atg8 抗体 100  $\mu$ L,4  $^{\circ}$ C 过夜;加入 3% BSA 稀释 200 倍的 Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor Plus 488 100  $\mu$ L,避光 37  $^{\circ}$ C 孵育 2 h;加入 0.1% 的 DAPI 溶液 100  $\mu$ L,避光 37  $^{\circ}$ C 孵育 15 min,每步处理之后均用 100  $\mu$ L 1 $\times$ PBS 溶液清洗 3 次,每次间隔 5 min。在 FV3000 共聚焦显微镜下观察含菌细胞中 Atg8 蛋白的荧光信号并拍照。以加入 3% BSA 100  $\mu$ L 作阴性对照。利用 Image J 1.8.0 软件分析荧光信号强度,荧光信号强度与含菌细胞内的自噬水平正相关。处理和对照各 3 个生物学重复,每个生物学重复分析 4 个含菌细胞内的荧光

信号强度。

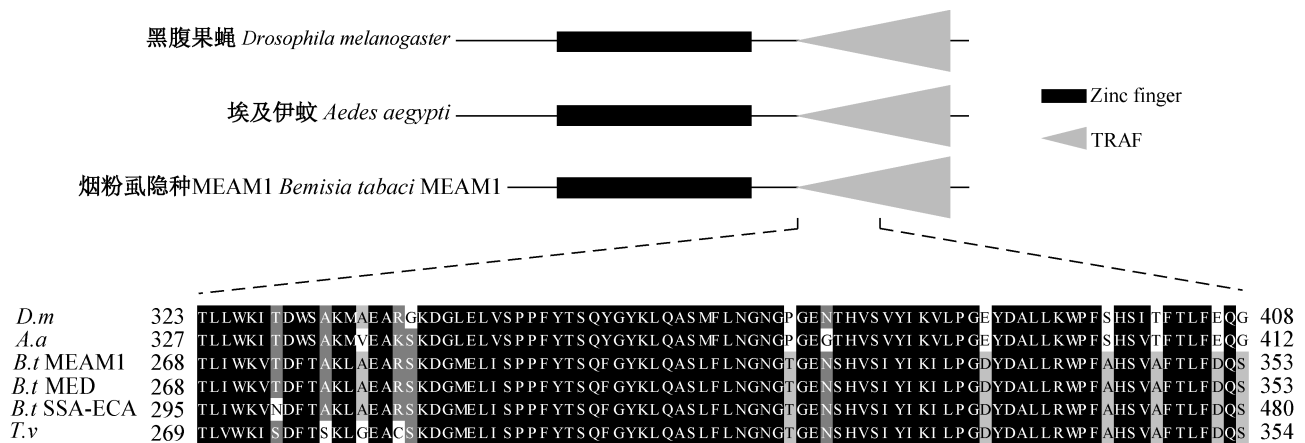
### 1.3 数据分析

试验数据采用 Statistica 12 软件进行单因素方差分析,应用 Student's *t* 检验法进行差异显著性检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 *TRAF4* 蛋白的保守结构域及系统发育分析

分析果蝇、埃及伊蚊及粉虱的 *TRAF4* 蛋白的保守结构域,结果表明黑腹果蝇、埃及伊蚊、烟粉虱隐种 MEAM1、MED、SSA-ECA 及温室白粉虱的 *TRAF4* 蛋白均含有 Zinc finger 和 TRAF 结构域,对 TRAF 结构域的氨基酸序列进行多序列比对,结果表明该结构域的序列相似度在 90% 以上(图 1)。构建果蝇、埃及伊蚊、粉虱及智人的 TRAF 氨基酸序列的系统发育树,结果显示,3 种烟粉虱隐种和温室白粉虱的 *TRAF4* 单独聚为一支,粉虱、黑腹果蝇及埃及伊蚊的 *TRAF4* 聚集在同一进化支内,昆虫的 *TRAF4* 与智人的 *TRAF4* 也聚集在同一进化支内,但与智人的其他 TRAF 蛋白的亲缘关系较远(图 2)。



黑色阴影: 氨基酸序列一致; 灰色阴影: 氨基酸序列一致性在 60% 以上。*D.m*: 黑腹果蝇; *A.a*: 埃及伊蚊; *B.t* MEAM1: 烟粉虱隐种 MEAM1; *B.t* MED: 烟粉虱隐种 MED; *B.t* SSA-ECA: 烟粉虱隐种 SSA-ECA; *T.v*: 温室白粉虱。The black shading indicates consistent amino acid sequences; the gray shading indicates amino acid sequence identity over 60%. *D.m*: *Drosophila melanogaster*; *A.a*: *Aedes aegypti*; *B.t* MEAM1: *Bemisia tabaci* MEAM1; *B.t* MED: *Bemisia tabaci* MED; *B.t* SSA-ECA: *Bemisia tabaci* SSA-ECA; *T.v*: *Trialeurodes vaporariorum*.

图 1 *TRAF4* 蛋白保守结构域分析及多序列比对

Fig. 1 Conserved domain analysis and multiple sequence alignment of *TRAF4* proteins

### 2.2 *TRAF4* 在烟粉虱含菌细胞和整虫中的表达量分析

利用 qPCR 技术对烟粉虱含菌细胞和整虫中 *TRAF4* 基因表达量进行分析,结果显示,相比于整虫, *TRAF4* 基因在含菌细胞内显著上调表达,其表达量约为整虫表达量的 17 倍(图 3)。

### 2.3 注射 *dsRNA* 后 *TRAF4* 基因沉默效率分析

利用 qPCR 技术对注射 *dsRNA* 后烟粉虱 *TRAF4*

基因的沉默效率进行分析,结果显示,相比于注射 *dsGFP*,注射 *dsTRAF4* 3 d 和 6 d 后, *TRAF4* 基因表达量被显著抑制,3 d 和 6 d 的沉默效率分别是 54.8% 和 55.7% (图 4),表明注射 *dsTRAF4* 后 *TRAF4* 基因持续被沉默。

### 2.4 沉默 *TRAF4* 后烟粉虱共生菌滴度及产卵量分析

利用 qPCR 技术对沉默 *TRAF4* 基因后烟粉虱含

菌细胞共生菌滴度进行分析,结果显示,沉默 *TRAF4* 3 d后,烟粉虱体内 *Portiera* 滴度显著降低,而 *Hamiltonella* 滴度无明显变化(图 5-A);沉默 *TRAF4* 6 d后,烟粉虱体内 *Portiera* 滴度也显著降

低,而 *Hamiltonella* 滴度亦无明显变化(图 5-B)。沉默 *TRAF4* 6 d后,烟粉虱产卵量显著下降(图 5-C)。表明沉默 *TRAF4* 能抑制烟粉虱共生菌 *Portiera* 的滴度以及其产卵量。

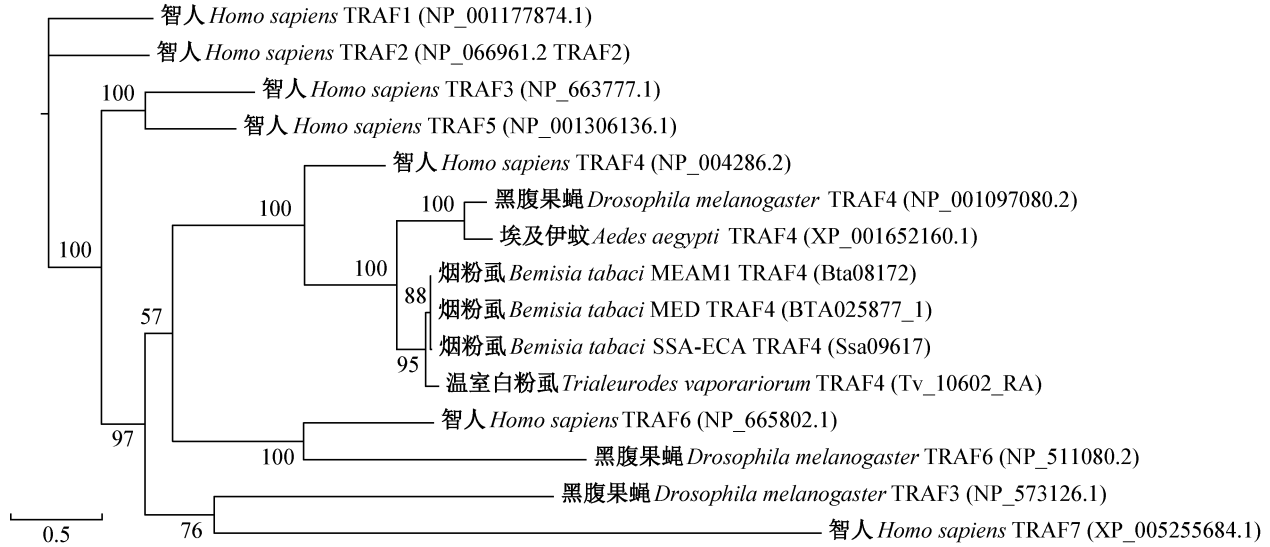


图2 基于 *TRAF4* 蛋白序列采用贝叶斯方法构建系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *TRAF4* protein sequences by using Bayes method

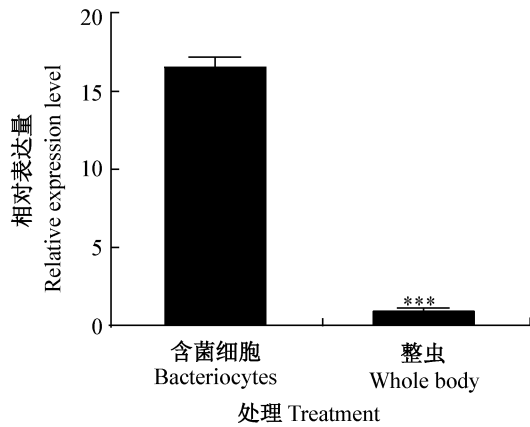


图3 *TRAF4*在烟粉虱含菌细胞和整虫中的相对表达量

Fig. 3 Relative expression level of *TRAF4* in whitefly bacteriocytes and the whole body

图中数据为平均数±标准误。\*\*\*表示处理与对照间经 Student's *t* 检验法检验差异显著 ( $P < 0.001$ )。Data are mean±SE. \*\*\* indicates significant difference between treatment and CK by Student's *t* test ( $P < 0.001$ ).

### 2.5 沉默 *TRAF4* 后烟粉虱含菌细胞的自噬水平

免疫荧光结果表明,相比于注射 *dsGFP*,注射 *dsTRAF4* 6 d后,含菌细胞内 Atg8 信号显著增强(图 6-A),阴性对照中无 Atg8 信号(图 6-B),表明 Atg8 抗体的特异性。对荧光信号统计后发现,相比于注射 *dsGFP*,注射 *dsTRAF4* 6 d后,含菌细胞 Atg8 信号

显著增强了 46.0%(图 6-C)。

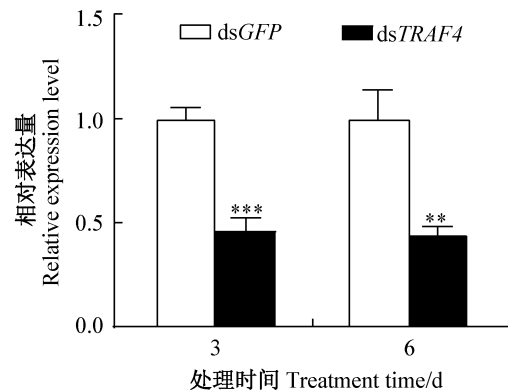


图4 注射 *dsRNA* 后 *TRAF4* 基因的沉默效率

Fig. 4 Silencing efficiency of *TRAF4* after injection with *dsRNAs*

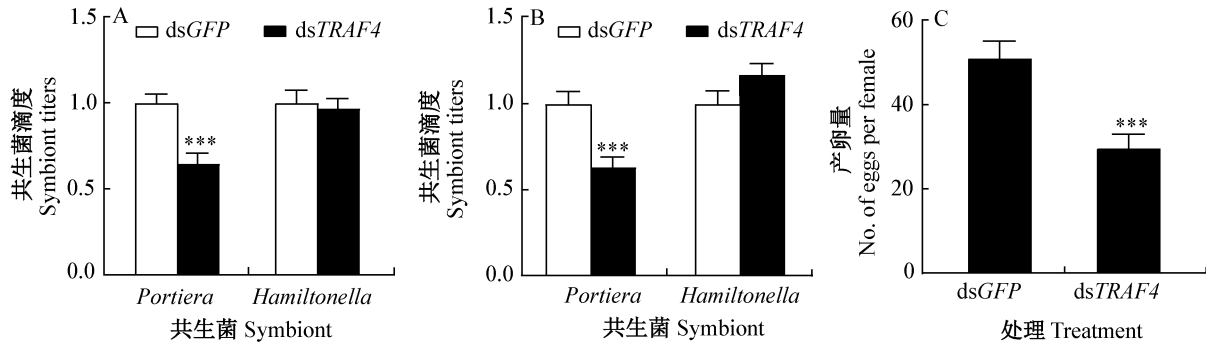
图中数据为平均数±标准误。\*\*, \*\*\*表示处理与对照间经 Student's *t* 检验法检验差异显著 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ )。Data are mean±SE. \*\*, \*\*\* indicate significant difference between treatment and CK by Student's *t* test ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ).

## 3 讨论

本研究发现粉虱、黑腹果蝇及埃及伊蚊的 *TRAF4* 蛋白均含有典型的 Zinc finger 和 TRAF 结构域,并且 TRAF 结构域的序列相似性在 90% 以上,表明 *TRAF4* 蛋白在黑腹果蝇、埃及伊蚊及粉虱中高度

保守。系统发育分析结果表明,3种烟粉虱隐种和温室白粉虱单独聚为一支,表明粉虱的 *TRAF4* 基因可能具有共同的进化起源。粉虱、果蝇和埃及伊蚊的 *TRAF4* 聚集在同一进化支内,表明其可能具有相似的功能。果蝇及埃及伊蚊的 *TRAF4* 参与了对病原菌的免疫调控(Medzhitov & Janeway, 2000; Zapa-

ta et al., 2000; Wang et al., 2023)。本研究发现烟粉虱 *TRAF4* 在含菌细胞中显著高表达,含菌细胞中分布着共生菌 *Portiera* 和 *Hamiltonella* (Gottlieb et al., 2008; Luan et al., 2016),这暗示着在含菌细胞高表达的 *TRAF4* 可能参与了对含菌细胞共生菌的免疫调控。

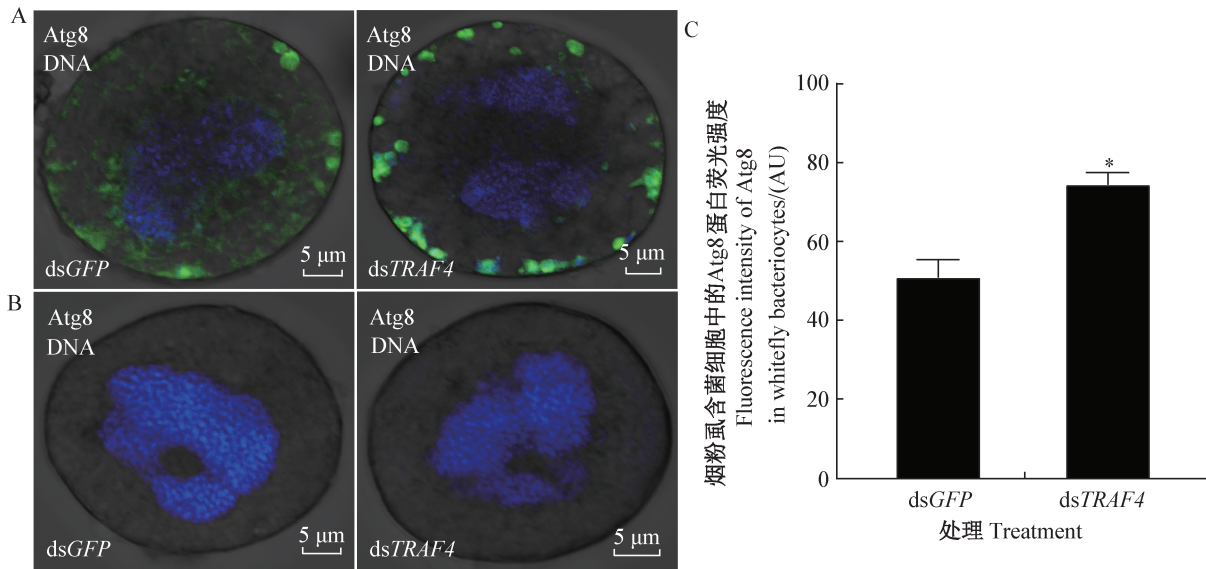


A~B: 注射 dsTRAF4 3 d 和 6 d 后对共生菌滴度的影响; C: 注射 dsTRAF4 6 d 后对产卵量的影响。A~B: Effects of silencing *TRAF4* on symbiont titers in adult females three and six days after the injection with dsTRAF4; C: effects of silencing *TRAF4* on the fecundity in adult females six days after injection with dsTRAF4.

图5 沉默 *TRAF4* 基因对共生菌滴度及烟粉虱产卵量的影响

Fig. 5 Effects of silencing *TRAF4* on symbiont titers and whitefly fecundity

图中数据为平均数±标准误。\*\*\*表示处理与对照间经 Student's *t* 检验法检验差异显著 ( $P < 0.001$ )。Data are mean±SE. \*\*\* indicates significant difference between treatment and CK by Student's *t* test ( $P < 0.001$ ).



A: 注射 dsTRAF4 6 d 后烟粉虱雌成虫含菌细胞的 Atg8 蛋白定位; B: 烟粉虱含菌细胞 Atg8 蛋白定位的阴性对照; C: 注射 dsTRAF4 6 d 后烟粉虱雌成虫含菌细胞 Atg8 蛋白荧光信号强度。A: Localization of Atg8 in bacteriocytes of adult females six days after injection with the dsTRAF4; B: negative controls for the localization of Atg8 in whitefly bacteriocytes; C: fluorescence intensity of Atg8 in bacteriocytes in adult females six days after injection with dsTRAF4.

图6 沉默 *TRAF4* 基因对含菌细胞自噬的影响

Fig. 6 Effect of silencing *TRAF4* on autophagy in whitefly bacteriocytes

图中数据为平均数±标准误。\*表示处理与对照间经 Student's *t* 检验法检验差异显著 ( $P < 0.05$ )。Data are mean±SE. \* indicates significant difference between treatment and CK by Student's *t* test ( $P < 0.05$ ).

昆虫通过先天免疫启动 Toll 途径或者 IMD 途径, Toll 途径主要介导由革兰氏阳性菌和真菌引起

的体液免疫,而IMD途径介导由革兰氏阴性菌引起的体液免疫。这2种途径通过激活下游NF- $\kappa$ B转录因子并促进其转位进细胞核,进而诱导下游抗菌肽基因的表达,从而达到清除体内病原微生物的目的(Lemaitre & Hoffmann, 2007; 曾令瑜等, 2019; Hanson & Lemaitre, 2020)。果蝇TRAF4可以与Toll途径中的Pelle蛋白互作,协同激活NF- $\kappa$ B转录因子(Zapata et al., 2000)。埃及伊蚊AeTRAF4促进NF- $\kappa$ B转录因子Rel1转位进细胞核,激活抗菌肽基因的表达,证实了AeTRAF4在NF- $\kappa$ B上游调控埃及伊蚊的免疫应答(Wang et al., 2023)。烟粉虱*Portiera*和*Hamiltonella*均属于革兰氏阴性菌,*Portiera*与烟粉虱协同进化,基因组经高度退化后丢失了细胞壁,而*Hamiltonella*保留有细胞壁(Costa et al., 1993; Szklarzewicz & Moskal, 2001; Sloan & Moran, 2012)。本研究结果显示,沉默烟粉虱TRAF4后*Portiera*滴度显著下降,而*Hamiltonella*滴度无明显变化,表明烟粉虱TRAF4可能不是通过调控NF- $\kappa$ B转录因子激活抗菌肽基因的表达进而调控对含菌细胞共生菌的免疫,具体原因还有待进一步探讨。

TRAF蛋白可以直接调控自噬。如TRAF1a和TRAF1b通过调控ATG6的泛素化和稳定性影响拟南芥自噬体的形成(Qi et al., 2017)。TRAF6通过抑制ULK1的磷酸化水平进而抑制自噬的发生(Dou et al., 2017)。烟粉虱含菌细胞内的共生菌能够通过合成必需氨基酸和B族维生素来抑制含菌细胞内的自噬水平,通过雷帕霉素饲喂及基因沉默诱导自噬后可引起烟粉虱共生菌滴度显著降低(Luan et al., 2015; Ren et al., 2020; Wang et al., 2022)。本研究结果显示,注射dsTRAF4后*Portiera*滴度下调,可能由于沉默TRAF4后诱导了含菌细胞内的自噬水平升高,进而促进*Portiera*滴度下调。本试验还发现,沉默TRAF4后含菌细胞内的Atg8信号显著增强,并且Atg8蛋白主要沿含菌细胞的细胞膜分布,再次证实沉默TRAF4后显著诱导了含菌细胞的自噬反应。

果蝇和埃及伊蚊的TRAF4蛋白可以和其他蛋白互作共同调控对病原微生物的免疫反应(Zapata et al., 2000; Wang et al., 2023)。在烟粉虱中,TRAF4通过抑制含菌细胞的自噬水平维持*Portiera*在烟粉虱体内的滴度,其功能的发挥是否需要其他蛋白质的共同参与值得进一步研究。昆虫-微生物共生关系在自然界广泛存在,许多昆虫均含有分布在含菌细胞中的共生微生物(Vigneron et al., 2014; Matsuu-  
ra et al., 2015; Simonet et al., 2018),未来可探讨是否

更多昆虫TRAF4基因参与了对昆虫共生菌的免疫调控。本研究揭示了一个新的免疫基因通过调控含菌细胞的自噬促进烟粉虱与*Portiera*的互作关系,研究结果有助于加深对烟粉虱与共生菌互作机制的认识,同时也为通过免疫调控实现对烟粉虱的绿色防控提供新靶标。

## 参 考 文 献 (References)

- Chen JQ, Zhang YB, Zhang GF, Wan FH, Liu H. 2020. Localization and distribution of the main endosymbionts in *Bemisia tabaci* MEAM1. *Plant Protection*, 46(2): 24–29, 47 (in Chinese) [陈吉强, 张毅波, 张桂芬, 万方浩, 刘怀. 2020. 烟粉虱MEAM1隐种主要内共生菌的定位和分布. *植物保护*, 46(2): 24–29, 47]
- Costa HS, Westcot DM, Ullman DE, Johnson MW. 1993. Ultrastructure of the endosymbionts of the whitefly, *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum*. *Protoplasma*, 176(3): 106–115
- De Barro PJ, Liu SS, Boykin LM, Dinsdale AB. 2011. *Bemisia tabaci*: a statement of species status. *Annual Review of Entomology*, 56(1): 1–19
- Dou Y, Shen HT, Feng DX, Li HY, Tian XD, Zhang J, Wang Z, Chen G. 2017. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 participates in early brain injury after subarachnoid hemorrhage in rats through inhibiting autophagy and promoting oxidative stress. *Journal of Neurochemistry*, 142(3): 478–492
- Gottlieb Y, Ghanim M, Gueguen G, Kontsedalov S, Vavre F, Fleury F, Zchori-Fein E. 2008. Inherited intracellular ecosystem: symbiotic bacteria share bacteriocytes in whiteflies. *The FASEB Journal*, 22(7): 2591–2599
- Grech A, Quinn R, Srinivasan D, Badoux X, Brink R. 2000. Complete structural characterisation of the mammalian and *Drosophila* TRAF genes: implications for TRAF evolution and the role of RING finger splice variants. *Molecular Immunology*, 37(12): 721–734
- Häcker H, Tseng PH, Karin M. 2011. Expanding TRAF function: TRAF3 as a tri-faced immune regulator. *Nature Reviews Immunology*, 11(7): 457–468
- Hanson MA, Lemaitre B. 2020. New insights on *Drosophila* antimicrobial peptide function in host defense and beyond. *Current Opinion in Immunology*, 62: 22–30
- Hu MX, Yang ZZ, Li Y, Zhang N, Wang F, Bai YC, Jiao XG, Zhang LX, Liu BM. 2023. Cryptic *Bemisia tabaci* species harboring tomato yellow leaf curl virus and endosymbionts and insecticide resistance monitoring in Tianjin. *Journal of Plant Protection*, 50(1): 101–110 (in Chinese) [胡明鑫, 杨泽众, 李妍, 张楠, 王芳, 白义川, 焦晓国, 张李香, 刘佰明. 2023. 天津市烟粉虱隐种鉴定及其携带TYLCV、内共生菌情况和抗药性监测. *植物保护学报*, 50(1): 101–110]
- Jiu M, Zhou XP, Liu SS. 2006. Acquisition and transmission of tobacco curly shoot virus by the B biotype of the whitefly, *Bemisia tabaci*. *Journal of Plant Protection*, 33(2): 168–172 (in Chinese) [纠敏, 周



- 雪平, 刘树生. 2006. B型烟粉虱携带传播烟草曲茎病毒的能力. 植物保护学报, 33(2): 168–172]
- Lemaitre B, Hoffmann J. 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. Annual Review of Immunology, 25(1): 697–743
- Liu HZ, Su YC, Becker E, Treisman J, Skolnik EY. 1999. A *Drosophila* TNF-receptor-associated factor (TRAF) binds the Ste20 kinase misshapen and activates Jun kinase. Current Biology, 9(2): 101–104
- Liu SS, De Barro PJ, Xu J, Luan JB, Zang LS, Ruan YM, Wan FH. 2007. Asymmetric mating interactions drive widespread invasion and displacement in a whitefly. Science, 318(5857): 1769–1772
- Luan JB. 2024. Insect bacteriocytes: adaptation, development, and evolution. Annual Review of Entomology, 69: 81–98
- Luan JB, Chen WB, Hasegawa DK, Simmons AM, Wintermantel WM, Ling KS, Fei ZJ, Liu SS, Douglas AE. 2015. Metabolic coevolution in the bacterial symbiosis of whiteflies and related plant sap-feeding insects. Genome Biology and Evolution, 7(9): 2635–2647
- Luan JB, Shan HW, Isermann P, Huang JH, Lammerding J, Liu SS, Douglas AE. 2016. Cellular and molecular remodelling of a host cell for vertical transmission of bacterial symbionts. Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences, 283(1833): 2591–2599
- Luan JB, Sun XP, Fei ZJ, Douglas AE. 2018. Maternal inheritance of a single somatic animal cell displayed by the bacteriocyte in the whitefly *Bemisia tabaci*. Current Biology, 28(3): 459–465
- Matsuura Y, Kikuchi Y, Miura T, Fukatsu T. 2015. Ultrathorax is essential for bacteriocyte development. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 112(30): 9376–9381
- Medzhitov R, Janeway CJ. 2000. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. Immunological Reviews, 173: 89–97
- Mugerwa H, Colvin J, Alicai T, Omongo CA, Kabaalu R, Visendi P, Sseruwagi P, Seal SE. 2021. Genetic diversity of whitefly (*Bemisia* spp.) on crop and uncultivated plants in Uganda: implications for the control of this devastating pest species complex in Africa. Journal of Pest Science, 94(4): 1307–1330
- Park HH. 2018. Structure of TRAF family: current understanding of receptor recognition. Frontiers in Immunology, 9: 1–7
- Qi H, Xia FN, Xie LJ, Yu LJ, Chen QF, Zhuang XH, Wang Q, Li FQ, Jiang LW, Xie Q, et al. 2017. TRAF family proteins regulate autophagy dynamics by modulating autophagy protein 6 stability in *Arabidopsis*. The Plant Cell, 29(4): 890–911
- Ren FR, Sun X, Wang TY, Yan JY, Yao YL, Li CQ, Luan JB. 2021. Pantothenate mediates the coordination of whitefly and symbiont fitness. The ISME Journal, 15(6): 1655–1667
- Ren FR, Sun X, Wang TY, Yao YL, Huang YZ, Zhang X, Luan JB. 2020. Biotin provisioning by horizontally transferred genes from bacteria confers animal fitness benefits. The ISME Journal, 14(10): 2542–2553
- Schmittgen TD, Livak KJ. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. Nature Protocols, 3(6): 1101–1108
- Simonet P, Gaget K, Balmand S, Lopes MR, Parisot N, Buhler K, Dupont G, Vulsteke V, Febvay G, Heddi A, et al. 2018. Bacteriocyte cell death in the pea aphid/*Buchnera* symbiotic system. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 115(8): E1819–E1828
- Sloan DB, Moran NA. 2012. Endosymbiotic bacteria as a source of carotenoids in whiteflies. Biology Letters, 8(6): 986–989
- Szklarzewicz T, Moskal A. 2001. Ultrastructure, distribution, and transmission of endosymbionts in the whitefly *Aleurochiton aceris* Moeder (Insecta, Hemiptera, Aleyrodinae). Protoplasma, 218(1): 45–53
- Vigneron A, Masson F, Vallier A, Balmand S, Rey M, Vincent-Monégat C, Aksoy E, Aubailly-Giraud E, Zaidman-Rémy A, Heddi A. 2014. Insects recycle endosymbionts when the benefit is over. Current Biology, 24(19): 2267–2273
- Wang YB, Li C, Yan JY, Wang TY, Yao YL, Ren FR, Luan JB. 2022. Autophagy regulates whitefly-symbiont metabolic interactions. Applied and Environmental Microbiology, 88(3): 1–19
- Wang YB, Ren FR, Yao YL, Sun X, Walling LL, Li NN, Bai B, Bao XY, Xu XR, Luan JB. 2020. Intracellular symbionts drive sex ratio in the whitefly by facilitating fertilization and provisioning of B vitamins. The ISME Journal, 14(12): 2923–2935
- Wang YH, Chang MM, Wang M, Ji YN, Sun XM, Raikhel AS, Zou Z. 2023. OTU7B modulates the mosquito immune response to *Beauveria bassiana* infection via deubiquitination of the toll adaptor TRAF4. Microbiology Spectrum, 11(1): e0312322
- Wang YY, Zhang P, Liu YF, Cheng GH. 2010. TRAF-mediated regulation of immune and inflammatory responses. Science China Life Sciences, 53(2): 159–168
- Yao YL, Ma XY, Wang TY, Yan JY, Chen NF, Hong JS, Liu BQ, Xu ZQ, Zhang N, Lv C, et al. 2023. A bacteriocyte symbiont determines whitefly sex ratio by regulating mitochondrial function. Cell Reports, 42(2): 112102
- Zapata JM, Matsuzawa SI, Godzik A, Leo E, Wasserman SA, Reed JC. 2000. The *Drosophila* tumor necrosis factor receptor-associated factor-1 (DTRAF1) interacts with Pelle and regulates NF $\kappa$ B activity. Journal of Biological Chemistry, 275(16): 12102–12107
- Zeng LY, Li ZH, Liu LJ. 2019. Research progress in the immunity of insects and the immune mechanisms of five important invasive insects. Journal of Plant Protection, 46(1): 6–16 (in Chinese) [曾令瑜, 李志红, 柳丽君. 2019. 昆虫免疫及五种重要入侵昆虫免疫机制研究进展. 植物保护学报, 46(1): 6–16]
- Zotti T, Vito P, Stilo R. 2012. The seventh ring: exploring TRAF7 functions. Journal of Cellular Physiology, 227(3): 1280–1284

(责任编辑:王璇)