



# Formosan Entomologist

Journal Homepage: [entsocjournal.yabee.com.tw](http://entsocjournal.yabee.com.tw)

## 東方果實蠅（雙翅目：果實蠅科）性別決定相關基因之表現分析及變形基因之功能研究

李嘉欣<sup>1</sup>、張誠<sup>2</sup>、戴淑美<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 國立中興大學昆蟲學系 40227 台中市南區興大路 145 號

<sup>2</sup> 國立中興大學生物科技發展中心 40227 台中市南區興大路 145 號

\* 通訊作者 email: [sdai5497@dragon.nchu.edu.tw](mailto:sdai5497@dragon.nchu.edu.tw)

收件日期：2017 年 1 月 16 日 接受日期：2017 年 10 月 6 日 線上刊登日期：2017 年 10 月 26 日

### 摘要

東方果實蠅 (*Bactrocera dorsalis* Hendel) 是臺灣果樹最重要的害蟲之一，其危害主要肇因於雌蟲在果實上產卵，導致果實損傷與產量降低。由於果實受損程度與田間雌蟲數量相關，若能全面性了解東方果實蠅的性別決定機制，將有助於新的防治策略擬定，以降低田間雌成蟲的數量。根據文獻指出變形基因 (*transformer, tra*) 是果實蠅性別決定的開關，控制 *tra* 的表現即可影響其性別。因此，本研究從不同時期的東方果實蠅萃取 RNA，再以反轉錄 (reversed transcription) 與聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction) 分析 *tra*、*tra-2*、雙性基因 (*doublesex, dsx*) 及卵黃蛋白基因 (*yolk protein 1, yp1*) 等性別決定相關基因的表現模式，試圖了解這些基因的表現與雌、雄個體發展的關係。結果顯示卵期的 *Bdtra<sup>f</sup>* 相對表現量高，證實母體會透過卵子給予胚胎 *tra<sup>f</sup>* mRNA，作為胚胎性別決定的基礎；然而幼蟲及蛹期因處於性別特徵不明顯的階段，各性別相關基因的表現量皆不高。羽化之後，雌成蟲的 *Bdtra<sup>f</sup>*、*Bddsx<sup>f</sup>* 及 *Bdyp1* 表現量與雄成蟲的 *Bddsx<sup>m</sup>* 表現量皆隨著日齡漸增，此結果應與成蟲需啟動下游大量性別專一性基因有關。*Bdtra-2* 雖為雌雄皆有的輔助性基因，但於幼蟲、蛹、成蟲時期均呈現穩定表現，推測可能參與其他未知的生理作用。其次，以 *Bdtra* 的雙股 RNA (double stranded RNA, dsRNA) 干擾東方果實蠅的蛹期發育，在 68 個注射 *Bdtra* dsRNA 的蛹中分別有 16 個與 19 個羽化為雄成蟲及雌成蟲，性別比例接近 1:1。存活的雌成蟲中有 9 隻產卵器變形，9 隻中又有 7 隻雌成蟲不產卵及 1 隻產出無效卵。雄成蟲大部分皆具有正常的外生殖器，但部分個體無子代產生。推測在蛹期默化 *tra* 之表現，可能間接經由干擾下游 *dsx<sup>f</sup>* 造成雌蟲產卵器變形與無法產卵，但不會影響東方果實蠅之性別決定。

**關鍵詞：**東方果實蠅、性別決定機制、變形基因、RNA 干擾。

### 前 言

東方果實蠅 (*Bactrocera dorsalis* Hendel) 是雙翅目果實蠅科的害蟲，在台灣全年可見，是台灣

重要的果樹經濟害蟲之一。果實蠅對水果的危害主要可分成兩部分：一是雌蠅產卵所造成的表皮傷痕，二是卵孵化後的幼蟲取食所造成的腐果及提早落果的現象。這兩部分的傷害除了嚴重影響水果的品質

與產量，也使台灣成為外銷檢疫果實蠅的疫區，不僅果品外銷受阻，農民收益也受影響。由於東方果實蠅的繁殖力強、善飛翔與遷徙，致使相關防治作業困難。雖然台灣政府多年來利用雄性誘引劑誘殺、藥劑噴灑與配合清園等措施防治已頗見成效，但是仍未能達成全面有效防治東方果實蠅的目標。因此，不同的防治策略相繼被提出，例如：利用性別調控機制發展出有效抑雌的方法，以降低田間雌蟲密度與因雌蟲產卵造成的果品傷害 (Chang *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2016a, b)。

昆蟲中果蠅的性別調控是先經由性染色體 X 的數目決定是否在雌蟲中活化性致死基因 (*Sex-lethal*, *Sxl*) (Erickson and Quintero, 2007)，再藉由此雌性專一的 SXL RNA 結合蛋白以 RNA 選擇性剪接 (alternative splicing) 調控下游變形 (*transformer*, *tra*) 及雙性 (*doublesex*, *dsx*) 基因的表現及功能 (Cline and Meyer, 1996; Salz and Erickson, 2010)。由於只有雌蟲體內存在活化之 SXL 蛋白，才能產生下游具活性的 TRA 蛋白；而 TRA 的活性又是產生雌性 DSX 蛋白 ( $DSX^F$ ) 所必需。因此 TRA 若無活性，在預設的發育模式下將只會產生雄性 DSX ( $DSX^M$ ) (Sosnowski *et al.*, 1989)。果蠅之  $DSX^F$  和  $DSX^M$  蛋白都是轉錄控制因子，分別在雌性和雄性果蠅中產生，功能在於決定其下游特定性別蛋白之表現 (Burtis and Baker, 1989)。例如： $DSX^F$  能夠活化卵黃蛋白的表現，而  $DSX^M$  則具有抑制卵黃蛋白的功能 (Burtis *et al.*, 1991; Coschigano and Wensink, 1993)，此二蛋白在性別調控過程中擔任後期執行者的角色。

然而，出乎預期的是雌性專一的 SXL 同時存在家蠅 (*Musca domestica* Linnaeus)、地中海果實蠅 (*Ceratitis capitata* Wiedemann) 和橄欖果實蠅 (*Bactrocera oleae* Rossi) 的雌、雄蟲體內，因此推測 *Sxl* 基因表現應與這些蠅類的性別調控無關 (Meise *et al.*, 1998; Saccone *et al.*, 1998; Lagos *et al.*, 2005)。後續的研究也證實在地中海果實蠅及橄欖果實蠅中，功能性 TRA 蛋白才是決定雌性發育的重要因子。Pane *et al.* (2002) 認為 *Cctrta* 在 XX 雌性胚胎之表現可誘發自我調節的機制，讓雌性持續保有性別發育區分的能力，並維持著細胞內發育為雌蟲的記憶。若使用 *Cctrta* 的雙股 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 干擾 XX 雌性胚胎，可使成蟲體細胞及生殖細胞受到影響，並產生具有生育力的性逆轉雄性 (XX-reversed male) 果實蠅。在橄欖果實蠅中也發現相似的 *tra* 自我調節現象，利

用 RNA 干擾 (RNA interference, RNAi) 處理也觀察到具生育力的性逆轉雄性果實蠅 (Lagos *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2015)，這些結果皆證實 *tra* 基因之表現對於果實蠅的性別決定具有非常重要的角色。TRA 蛋白與 *transformer-2* (*tra-2*) 基因的產物 TRA-2 蛋白形成複合體之後，會與下游標的 RNA 結合，藉以調控的下游 *dsx* 及 *fruitless* (*fru*) mRNA 之選擇性剪接模式。雖然 *tra-2* 在雌性及雄性的地中海果實蠅與西印度果實蠅 (*Anastrepha oblique*) 中皆可表現，但已有 RNAi 實驗證據指出干擾 *TRA-2* 的表現亦會造成果實蠅性別轉變，並改變下游 *dsx*, *fru* RNA 的剪接模式 (Salvemini *et al.*, 2009; Sarno *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2015)。

目前已知 *Bdtra* 的基因含有 5 個 exons 及 4 個 introns，在雌、雄個體中經由選擇性剪接分別產生不同的轉錄副本 (transcripts) (Liu *et al.*, 2015; Peng *et al.*, 2015)。雌蟲的 TRA 蛋白含 422 氨基酸且具生物活性，與 TRA-2 蛋白結合後可自我調控及調控下游與雌性相關的因子表現；反之，雄蟲只能產生不具生物活性的未成熟 TRA，因此只會按原設定產生下游與雄性發育相關的因子。以 *Bdtra* 的 dsRNA 干擾胚胎可直接觀測到性逆轉雄性，並證實 *Bdtra* 是東方果實蠅重要的性別決定因子 (Liu *et al.*, 2015)。在本研究進一步分析東方果實蠅之 *Bdtra* 基因及相關下游基因在各發育期中的表現模式，並利用 *Bdtra* dsRNA 干擾蛹期發育，以測試 *Bdtra* 基因表現在蛹期及成蟲期所扮演的生理功能。

## 材料與方法

### 一、試驗昆蟲飼養

本試驗所使用之東方果實蠅品系源自於中興大學昆蟲學系路光暉老師實驗室，於 2008 年 7 月在實驗室建立維持。成蟲飼養於光/暗週期為 12/12 小時的飼養室，並以酵母粉、蛋白胨與糖以 1 : 1 : 3 比例混合餵食，幼蟲則以人工飼料飼養於全暗的環境 (Chiou, 1978)。

### 二、性別決定相關基因表現量檢測

#### 1. 總量 RNA 萃取

基因表現量檢測分析的樣本每組均包含東方果實蠅之卵、幼蟲、蛹及成蟲四個不同發育階段。卵分未受精卵及受精卵，未受精卵是處女蠅性成熟後產下的卵，而受精卵則是雌蠅交配後產下的卵；幼

表一 東方果實蠅性別相關基因之 RT-PCR 分析所使用之引子序列

Table 1. Primer sequences of the sex-related genes of *Bactrocera dorsalis* used for reverse transcription polymerase chain reaction

Primers	Sequences of primers
Bdtra F04	5'- CAA ACT gAA AgT AgA AAC AgC -3'
Bdtra R02	5'- CgA ATg gTT TTA TCg CTA ggT -3'
Bdtra F14	5'- gAA ggA TCT AAT ATC TgC AAC Cg -3'
Bdtra R01	5'- CCA CgA TAT CAT CTC TTT gAA -3'
Bdtra-2 F01	5'- gTA gAT CgC gTg ggT TTT g -3'
Bdtra-2 R01	5'- gAT gAg TAT gTT CAC gTT CAC g -3'
dsx Z	5'- gAT ATC CAT ggg AgA TgA Tg -3'
dsx D	5'- CAA CAg TAg ATT gAT gAg CTT CC -3'
dsx M	5'- gCg AgA AgT gCg AAg TCA gTA AgC -3'
*Bdyp1 F	5'- TCA ACC AAT CAg CAA TAA CCA ggA C -3'
*Bdyp1 R	5'- gCA TCA CCA CgA gCC AAA CC -3'
RpP0 F01	5'- gTA TTT ACC AAg ggC gAT TTg g -3'
RpP0 R01	5'- gAT AAT TTC AAT TgT ACC CTT gg -3'

\* Bdyp1 F and Bdyp1 R are a primer pair of *Bdyp1* (GenBank accession number AF368053) adopted from Chen *et al.* (2008). Bdyp1 F and Bdyp1 R are located at the 516-530 bp and 916-935 bp, respectively, of *Bdyp1*.

蟲取 2 及 5 日齡，蛹取 3 及 7 日齡，性別特徵明顯的雌雄個體則分別取 0、1、3、7 及 15 日齡的個體萃取總量 RNA (total RNA)。由於卵及 2 日齡幼蟲體積小，因此秤取 90 至 100 mg 為一樣本；而 5 日齡幼蟲、蛹及成蟲則以 10 隻個體為一樣本，重量介於 60 至 200 mg。日齡定義為孵化、化蛹或羽化後未滿 24 h 為 0 日齡，24 h 至未滿 48 h 為 1 日齡，依此類推。每組四重覆。

每一樣本取 100 mg 細胞組織萃取總量 RNA，先加入 200  $\mu$ L TriSolution<sup>®</sup> (GeneMark) 以研磨棒磨碎組織，再加入 800  $\mu$ L TriSolution<sup>®</sup>，接著以廠商提供之標準程序完成總量 RNA 萃取。最後把所得到的 RNA 溶於 30  $\mu$ L DEPC (diethyl pyrocarbonate) 水中，加入 RQ1 RNase-Free DNase (Promega)，於 37°C 反應一小時後，進行酒精沉澱。所得 RNA 回溶於 20  $\mu$ L DEPC 水，樣本的 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比值需達 1.8 以上，才進行後續反轉錄作用。

## 2. 反轉錄作用 (reverse transcription, RT)

取 1  $\mu$ L 20  $\mu$ M CDS 引子 (5'- CCg ATA TCT gCA gTC gAC TCg AgT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT -3') 加入含 3  $\mu$ g RNA 的 17  $\mu$ L DEPC 水，置於 70°C 加熱 10 min，接著置於冰上 2 min。依序加入 5  $\mu$ L 5X reaction buffer、1  $\mu$ L 100 mM DTT、1  $\mu$ L 10 mM dNTP 及 1  $\mu$ L SMART<sup>TM</sup>

MMLV Reverse Transcriptase (Clontech) 於 42°C 反應 3 h 完成反轉錄作用，反應後將 cDNA 保存於 -20°C 冷凍櫃。

## 3. 聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)

以東方果實蠅的 cDNA 為模板，利用引子對 Bdtra F14/Bdtra R01、Bdtra F04/Bdtra R02、Bdtra-2 F01/Bdtra-2 R01、dsx D/dsx M or dsx Z、Bdyp1 F/Bdyp1 R 及 RpP0 F01/RpP0 R01 進行聚合酶連鎖反應，分別增幅性別相關基因。實驗中以核糖體 RNA P0 基因 (ribosomal RNA P0) 為內部相對表現控制組。上述所使用的各引子對，其序列詳如表一。PCR 反應溶液包含：0.5  $\mu$ L cDNA, 1  $\mu$ L 10X buffer, 0.8  $\mu$ L dNTP (2.5 mM), 0.1  $\mu$ L Forward primer (20  $\mu$ M), 0.1  $\mu$ L Reverse primer (20  $\mu$ M), 7.75  $\mu$ L 無菌水, 0.05  $\mu$ L rTaq DNA polymerase。PCR 反應條件為 94°C 2 min; 94°C 30 sec, 60°C 30 sec, 72°C 30 sec，重覆 30 次 (cycles); 72°C 7 min。

## 4. 琼膠電泳分析 (agarose gel electrophoresis) 及膠圖影像分析

DNA 樣本完成 1% 琼膠電泳分析，接著以 UV 照膠拍照後，利用 KADAK 1D Image Analysis

Software 分析膠圖上條帶的像素值，並以核醣體 RNA *P0* (*RpP0*) 的表現量為對照校正基準，分別對性別相關基因進行半定量校正，觀察各基因在不同時期的表現趨勢。

### 三、東方果實蠅 *transformer* 基因 RNA 干擾

#### 1. 東方果實蠅 *Bdtra* cDNA 選殖

由已知的 *Bdtra* 序列設計出專一性引子對 *Bdtra* E2F (5'- gTT TCA AAG AGA TgA TAT CgT gg -3') 及 *Bdtra* E4R (5'- CgT AAC gTA TTT gTT gTg gAg g -3')，以東方果實蠅蛹期之 cDNA 為模板，增幅出 *Bdtra* exon 2 到 exon 4 的 DNA 片段 (*Bdtra* E2-E4)，再接入 pGEM-T Easy Vector (Promega)。取得不同 *Bdtra* 序列插入方向的質體 pGT-Bdtra E2-E4(+)及 pGT-Bdtra E2-E4(-)樣本後，再以 DNA 定序確認殖入 *Bdtra* 序列之正確性。

#### 2. *Bdtra* dsRNA 製作

利用限制酶 *NaeI* 及 *SpeI* 分別切斷 pGT-Bdtra E2-E4(+)及 pGT-Bdtra E2-E4(-)質體，進行瓊膠電泳把含有 T7 promoter 的 *Bdtra* E2-E4 片段以 GENECLEAN® III Kit (Fisher Scientific) 從瓊膠回收。利用 MEGAscript® RNAi Kit (Ambion®) 以帶 T7 promoter 的 *Bdtra* E2-E4 cDNA 製作單股 RNA。使用廠商提供之標準程序完成單股 RNA 合成，最後回溶於 10 μL 的 DEPC 水。使用超微量分光光度計 (Thermo Scientific NanoDrop™ 1000) 測定濃度及吸光值 (RNA 樣本的 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比值需達 1.8 以上) 後，取等量的 *Bdtra* E2-E4 sense RNA 及 antisense RNA 混合，於 90°C 加熱 5 min 後，再於室溫緩慢降溫，以獲得 *Bdtra* E2-E4 的 dsRNA。對照組使用的 *eGFP* dsRNA 製作方法同 *Bdtra* dsRNA (Chen et al., 2008)。

#### 3. 蛹期 *Bdtra* RNAi 分析

以注射器 (PB600-1 Repeating Dispenser; Hamilton) 對 0 日齡蛹進行注射，每個蛹注射量為 0.5 μL 涵蓋 exon 2 至 exon 4 (984 bp) 序列的 *Bdtra* dsRNA、*eGFP* dsRNA 或 DEPC 水。實驗組一以 3 μg/μL 的 *Bdtra* dsRNA 注射 26 個蛹，實驗組二以 3.8 μg/μL 的 *Bdtra* dsRNA 注射 42 個蛹，對照組則分別為 40 個未注射、40 個注射 DEPC 水及 42 個注射 3.8 μg/μL *eGFP* dsRNA 的 0 日齡蛹，觀察並記錄各實驗組別的發育情形。

成蟲羽化後，先以解剖顯微鏡觀察外部構造，

接著與實驗室品系進行交配。交配比例為一隻處理組個體與三隻未經處理的實驗室品系處女蠅或雄蠅。於 13 日齡開始採卵，採卵次數約為 5 至 7 次，若卵數不足 200 者可增加採卵的次數。觀察子代生長狀況後，計算子代成蟲的雌雄比例。親代在採卵期結束後進行解剖，觀察內生殖器構造。對照組則各選取 3 隻雌成蟲及雄成蟲進行外觀照相及子代雌雄比例觀察。

## 結 果

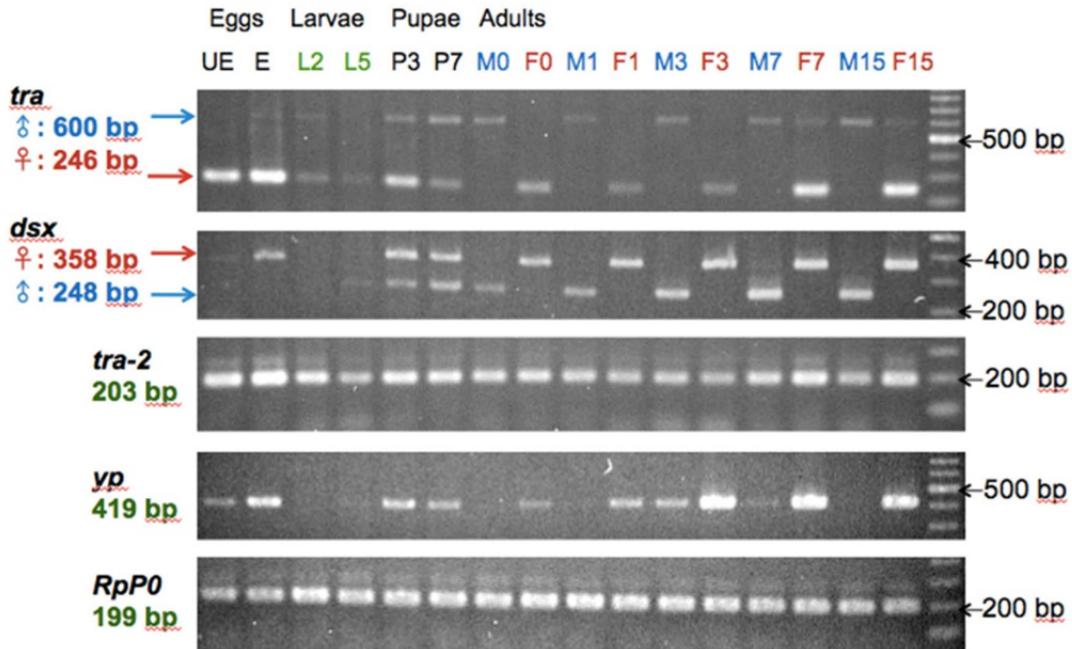
### 一、東方果實蠅 *Bdtra* 及其他相關基因在不同發育期的表現狀況

從不同生長時期的東方果實蠅取得總量 RNA 進行 RT-PCR，再以瓊膠電泳偵測性別決定基因 *tra*、*dsx*、*tra-2* 及卵黃蛋白基因 *yp1* 在不同發育期的表現狀況。結果顯示：對照組 *RpP0* 基因在不同時期的表現量約略一致，但是性別相關基因的表現量隨發育時期不同而異 (圖一 A)。進一步以 KADAK 1D Image Analysis Software 分析膠圖影像對特定基因進行半定量分析，結果顯示 *Bdtra*<sup>m</sup> (600 bp) 在各時期表現量皆低 (圖一 B)，然而 *Bdtra*<sup>f</sup> (246 bp) 除了在未受精的卵 (UE) 大量表現之外，受精卵 (E) 的表現更高；幼蟲期 (L2, L5) 則呈低度表現，蛹期表現量略有增加，羽化後 7 及 15 日齡的雌成蟲 (F7 及 F15) 又偵測到大量的 *Bdtra*<sup>f</sup> 表現 (圖一 C)。至於圖一 A 中的 *Bdtra-2* 基因的表現趨勢雖然略有起伏，但整體上較其他性別專一性基因的表現穩定，且無性別專一性；雙性基因 *Bddsx*<sup>m</sup> (248 bp) 及 *Bddsx*<sup>f</sup> (358 bp) 於卵與幼蟲期的表現量很低，到蛹期變態時表現量漸升，且隨著雄成蟲日齡的增加而逐漸增加；而卵黃蛋白基因 *Bdyp 1* 在未受精卵及幼蟲期的表現較低，蛹期表現量增加，在雌成蟲則隨日齡增加而提高表現量。

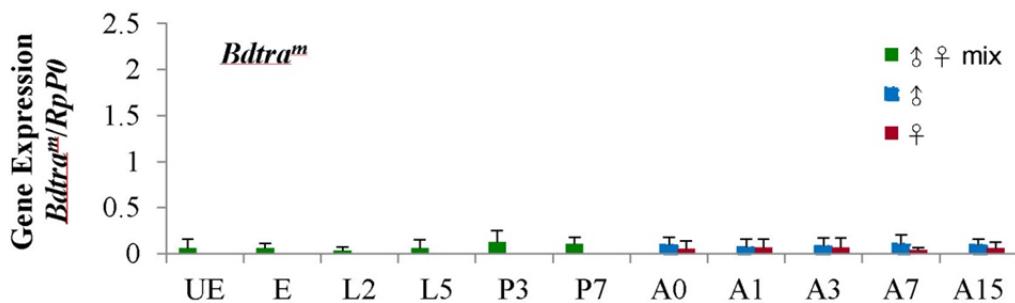
### 二、東方果實蠅 *transformer* 蛹期 RNAi 分析

由於 *Bdtra*<sup>f</sup> 基因在蛹期與成蟲期的表現皆有增加的現象，因而進一步在蛹期進行 RNAi 分析。使用涵蓋 exon 2 至 exon 4 (984 bp) 序列的 *Bdtra* dsRNA 注射 0 日齡的蛹，以確認其表現在後幼蟲期的生理功能。在注射 *Bdtra* dsRNA 的 68 個蛹中，有 16 隻雄成蟲及 19 隻雌成蟲成功羽化 (表二)。19 隻成功羽化的雌蠅中有 9 隻雌蠅的產卵器變形，依據變形程度對雌成蟲進行分類與編號 (圖二)，No. 1-3 為嚴重變形、No. 4-9 為輕微變形、No. 10-19

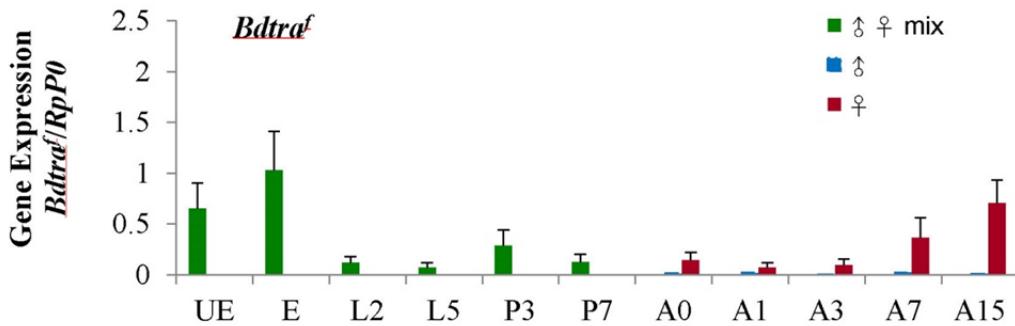
(A)



(B)



(C)



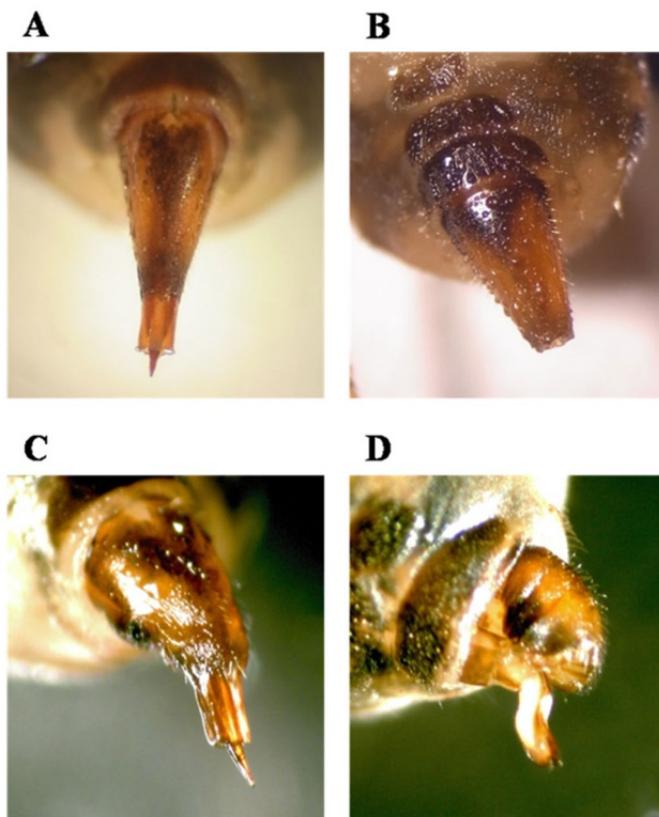
圖一 (A) 東方果實蠅性別相關基因在不同發育期的表現分析；(B) 以 KADAK 1D Image Analysis Software 分析東方果實蠅在不同發育時期之 *transformer* 表現，利用核糖體 RNA P0 (*RpP0*) 為標準評估雄性型 *tra* (*Bdtra<sup>m</sup>*) 的相對表現量；(C) 量化評估雄性型 *tra* (*Bdtra<sup>f</sup>*) 的相對表現量。UE：未受精卵；E：受精卵；L：幼蟲；P：蛹；M：雄性；F：雌性；數字：日齡數。

Fig. 1. (A) Expression analyses of sex-related genes in different stages of *Bactrocera dorsalis*. (B) Analyses of the expression patterns of *Bdtra<sup>m</sup>* at various developmental stages using KADAK 1D Image Analysis Software; (C) Quantitative analyses of the expression patterns of *Bdtra<sup>f</sup>* at various developmental stages. UE: unfertilized egg, E: fertilized egg, P: pupa, M: male, F: female, number: days for each developmental stage.

表二 蛹期注射 *Bdtra* dsRNA 對東方果實蠅成蟲羽化及雌雄比之影響Table 2. Effects of *Bdtra* RNAi on adult eclosion and sex ratio after pupal injection of dsRNA

dsRNAs	Conc. ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	No. of Treated Pupa	No. of Adult Eclosion	
			Total	♂ / ♀
<b>Control</b>				
1	-	-	40	40 17 / 23
2	water	3.8	40	15 8 / 7
3	<i>eGFP</i>	3.8	42	17 8 / 9
<b>Treatment 1</b>				
	<i>Bdtra</i>	3.0	26	20 10* / 10
2	<i>Bdtra</i>	3.8	42	15 6 / 9

\* Two males died after eclosion, which were not counted in the observed result.



圖二 蛹期 *Bdtra* RNAi 處理對羽化雌蟲產卵器的影響。A 圖：正常野生型雌成蟲的產卵器；B 圖：經 *Bdtra* RNAi 處理後產卵器正常之雌成蟲；C 圖：經 *Bdtra* RNAi 處理後產卵器輕微變形之雌成蟲；D 圖：經 *Bdtra* RNAi 處理後產卵器嚴重變形之雌成蟲。

Fig. 2. Effects of pupal *Bdtra* RNAi on the female ovipositor. A: normal ovipositor of untreated female, B: normal ovipositor of female with RNAi treatment, C: slightly deformed ovipositor of female with RNAi treatment, D: seriously deformed ovipositor of female with RNAi treatment.

則外形正常；對照組 9 隻雌成蟲的產卵器皆正常（表三）。至於 16 隻成功羽化的雄成蟲，有兩隻剛羽化不久即死亡，因此列入觀察的個體只有 14 隻（表四），其中 7 號及 12 號雄成蟲外生殖器異常。然而在注射 *eGFP* dsRNA 的對照組中，也發現一隻雄成蟲（No.

3 號）具有類似的異常外生殖器（圖三）。此外，其餘 12 隻實驗組雄成蟲及對照組雄成蟲的外生殖器皆正常（表四）。

為了觀察 *Bdtra* dsRNA 處理個體的生育力及子代雌雄比例，進一步將實驗組的所有雌、雄蟲分

表三 蛹期 *Bdtra* dsRNA 處理對羽化雌蟲發育及子代的影響Table 3. Effects of pupal *Bdtra* dsRNA treatment on female development and progeny

Samples	dsRNA	No. of female	Level of deformed ovipositors	Egg laying	Sex ratio in progeny ♂ : ♀
Treatment	<i>Bdtra</i>	1 ♀	Seriously	—	W/o progeny
		2 ♀	Seriously	—	W/o progeny
		3 ♀	Seriously	—	W/o progeny
		4 ♀	Slightly	—	W/o progeny
		5 ♀	Slightly	+	1.11 : 1
		6 ♀	Slightly	—	W/o progeny
		7 ♀	Slightly	—	W/o progeny
		8 ♀	Slightly	+	W/o progeny
		9 ♀	Slightly	—	W/o progeny
		10 ♀	Normal	+	1.62 : 1
		11 ♀	Normal	+	1.33 : 1
		12 ♀	Normal	+	1.10 : 1
		13 ♀	Normal	—	1.12 : 1
		14 ♀	Normal	+	W/o progeny
		15 ♀	Normal	+	1.22 : 1
		16 ♀	Normal	+	0.82 : 1
		17 ♀	Normal	+	1.17 : 1
		18 ♀	Normal	+	1.13 : 1
		19 ♀	Normal	+	0.76 : 1
Control	-	1 ♀	Normal	+	1.04 : 1
		2 ♀	Normal	+	0.91 : 1
		3 ♀	Normal	+	0.95 : 1
<i>eGFP</i>	DEPC water	1 ♀	Normal	+	W/o progeny
		2 ♀	Normal	+	1.11 : 1
		3 ♀	Normal	+	1.56 : 1

別與實驗室品系未處理的雄、雌蟲進行單隻配對與觀察；對照組則各選擇三隻雌雄蟲進行單隻配對。在實驗組 No. 1-9 產卵器變形的雌成蟲中，有 7 隻未採集到卵，產卵的 5 號及 8 號雌成蟲中，只有 5 號產的卵順利孵化。在產卵器正常的雌蟲中，有 9 隻順利產生子代，No. 13 的雌蟲在產卵前即死亡，所以無子代產生。對照組的部分，注射 DEPC 水的 No. 1 雌蟲雖產下卵但未孵化，其餘對照組雌蟲皆順利產生子代（表三）。解剖採卵後的雌成蟲發現實驗組及對照組的卵巢外形及大小皆正常，因此雌成蟲無法產卵的原因並非出於卵巢發育不良（圖四）。至於子代雌雄比例，所有組別的皆約為 1 : 1（表三），

顯示在蛹期處理 *Bdtra* dsRNA 並不會影響子代性別比例。

以 *Bdtra* dsRNA 處理的雄成蟲中有 2 隻外生殖器發生變異（No. 7 及 12），而 *eGFP* 對照組 No. 3 雄成蟲也有相類似現象；此 3 隻雄成蟲皆無子代產生，精巢外形無顯著變化（表四及圖三）。此外，無子代的雄性個體有實驗組 No. 1、5、8、11、13 及 14，其中 No. 1、5、8 雄蟲較早死亡，推測其無子代產生的原因可能為未與雌成蟲交配就死亡。但 No. 11、13、14 雄蟲並無提早死亡的狀況，且 No. 11 及 14 精巢外形正常，推測無子代的原因可能是注射的機械傷害對生殖力造成影響。對照組雄成蟲除了

表四 蛹期 *Bdtra* dsRNA 處理對羽化雄蟲發育及子代的影響Table 4. Effects of pupal *Bdtra* dsRNA treatment on male development and progeny

Samples	dsRNA	No. of Male	Deformation of external genitalia	Longevity	Sex ratio in progeny ♀ : ♂
Treatment	<i>Bdtra</i>	1 ♂	—	Short	W/o progeny
		2 ♂	—	Normal	0.94 : 1
		3 ♂	—	Normal	1.43 : 1
		4 ♂	—	Normal	0.95 : 1
		5 ♂	—	Short	W/o progeny
		6 ♂	—	Normal	1.07 : 1
		7 ♂	+	Normal	W/o progeny
		8 ♂	—	Short	W/o progeny
		9 ♂	—	Normal	0.92 : 1
		10 ♂	—	Normal	1.09 : 1
		11 ♂	—	Normal	W/o progeny
		12 ♂	+	Normal	W/o progeny
		13 ♂	—	Normal	W/o progeny
		14 ♂	—	Normal	W/o progeny
Control	-	1 ♂	—	Normal	0.82 : 1
		2 ♂	—	Normal	1.33 : 1
		3 ♂	—	Normal	0.99 : 1
DEPC water	DEPC water	1 ♂	—	Normal	1.29 : 1
		2 ♂	—	Normal	1.22 : 1
		3 ♂	—	Normal	0.98 : 1
<i>eGFP</i>	<i>eGFP</i>	1 ♂	—	Normal	1.14 : 1
		2 ♂	—	Normal	1.11 : 1
		3 ♂	+	Normal	W/o progeny

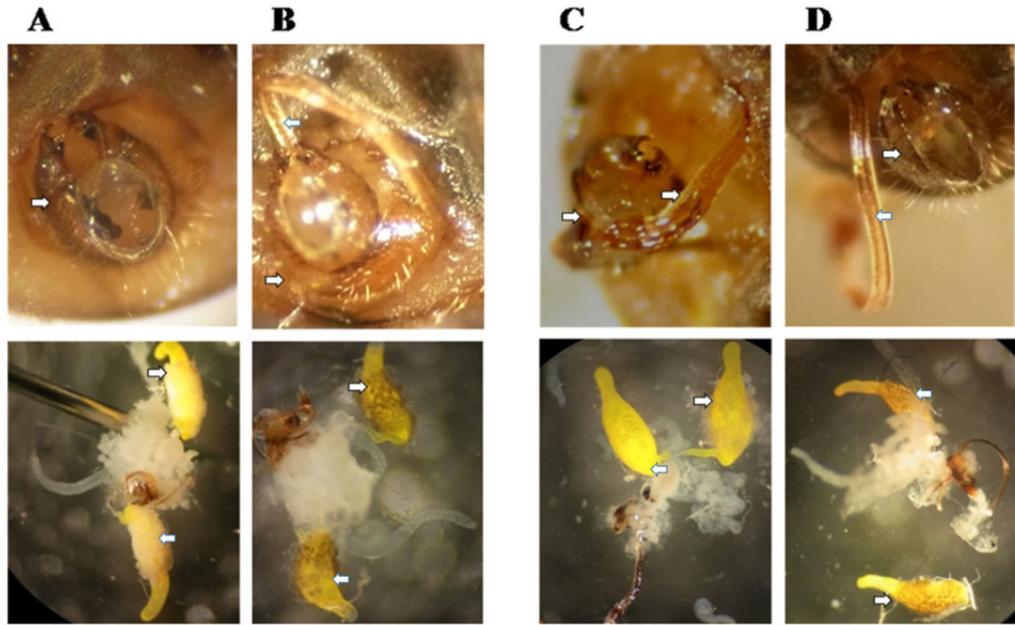
外生殖器變異的 No. 3 雄成蟲外，其餘外生殖器及精巢皆正常。由子代雌雄比例結果顯示，實驗組雄成蟲中沒有性逆轉雄性個體（表四）。

## 討 論

變形基因 *transformer* 是果實蠅科 (Tephritidae)、蠅科 (Muscidae) 及麗蠅科 (Calliphoridae) 性別決定基因調控階層的最上游基因，也是性別決定路徑的開關 (Verhulst *et al.*, 2010)。果實蠅的 XX 胚胎藉著母體給予的 *Bdtra*<sup>f</sup> 及 *Bdtra*-2 mRNA 分別轉譯成 TRA 及 TRA-2 蛋白，並建立本身的 *tra* 自我調控系統。本研究的 RT-PCR 結果發現東方果實蠅未受精之前的卵具有 *Bdtra*<sup>f</sup> 及 *Bdtra*-2 的 cDNA，顯示此二基因的 mRNA 源自於母體。Concha and Scott (2009) 的研究也顯示羊麗蠅 (*Lucilia cuprina*) 的胚胎在未受精之前即具有

*Lctrat<sup>f</sup>*，然而 *Lctrat<sup>m</sup>* 到幼蟲期才會表現。至於 *Bdtrat<sup>m</sup>* 在東方果實蠅每一個發育時期的表現量皆很低，可能是由於 *Bdtrat<sup>m</sup>* 無法轉譯成完整的 TRA 蛋白，因此不需要耗費能量製造大量無功能的 *Bdtrat<sup>m</sup>* mRNA。

1996 年一個位於 Y-染色體的雄性因子 (M factor) 被認為可能與雄性胚胎的發育有關 (Willhoeft and Franz, 1996)，但是目前的研究結果皆支持胚胎進行雌性性別決定路徑取決於胚胎本身的 *Bdtrat<sup>f</sup>* 表現量與雄性因子的交互作用。本研究發現 *Bdtrat<sup>f</sup>* 的表現量在卵受精之後會持續增加，顯示由母體而來的 *Bdtrat<sup>f</sup>* 是胚胎建立 *Bdtrat<sup>f</sup>* 自我調控系統的啟動基礎；在此之後，雌性胚胎為了正常發育，繼續表現 *Bdtrat<sup>f</sup>*。當胚胎期決定性別之後，在幼蟲期除了 *Bdtra*-2 的表現較多之外，*Bdtra*、*Bddsx* 及 *Bdyp1* 的表現量都不高，推測可能由於幼蟲期的雌雄性別特徵不明顯，不需大量表現與性別專一性



圖三 東方果實蠅蛹期 *Bdtra* RNAi 造成羽化雄蟲的外生殖器變異與精巢發育。A 圖：正常雄成蟲之外生殖器及精巢；B 圖：注射 eGFP dsRNA 之 No. 3 雄成蟲的外生殖器及精巢；C、D 圖：注射 *Bdtra* dsRNA 之 No. 7 及 12 雄成蟲的外生殖器及精巢。小箭頭用以標示外生殖器與精巢。

Fig. 3. Testes of males with normal or deformed external genitalia after *Bdtra* RNAi at pupal stage of *Bactrocera dorsalis*. A: normal external genitalia and testes of an untreated male, B: deformed external genitalia and normal testes of a male treated with eGFP dsRNA, C-D: deformed external genitalia and normal testes of a male treated with *Bdtra* dsRNA.

相關的基因。在蛹期 *Bdtra<sup>f</sup>* 的表現略增，應與變態過程中雌性組織開始分化有關。至於 *Bdtra<sup>f</sup>* 在 7 日齡雌蟲表現明顯增加，則可能與雌成蟲卵巢發育時需給予卵細胞大量的 *Bdtra<sup>f</sup>* mRNA 有關；亦有可能於此時需藉由 *Bdtra* 之表現，以啟動並調控下游基因所導致。

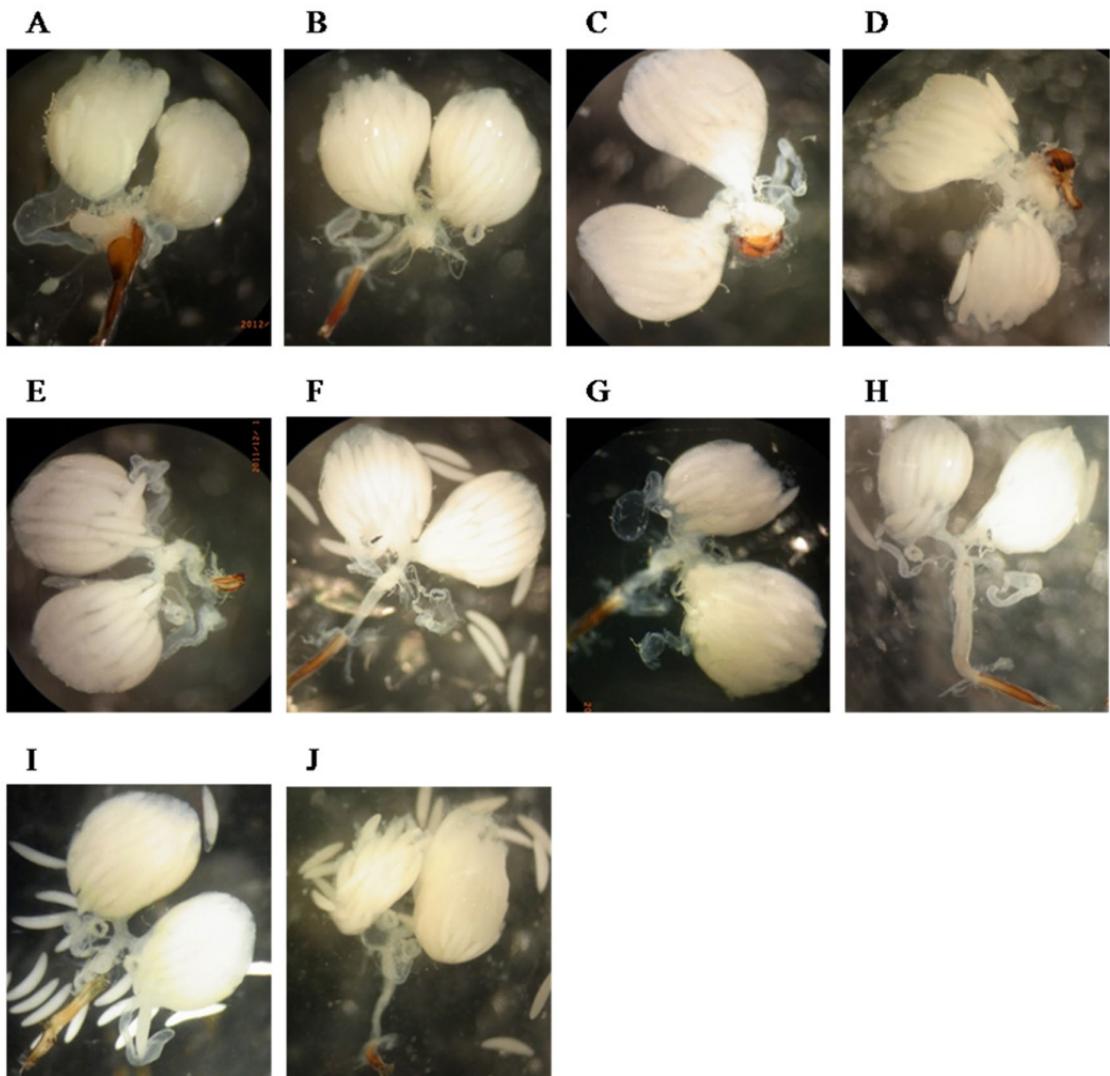
有研究指出，在地中海果實蠅 (Salvemini *et al.*, 2009)、家蠅 (Burghardt *et al.*, 2005) 及東方果實蠅 (Liu *et al.*, 2015) 的胚胎期默化 *Bdtra-2* 會導致 XX 個體雄性化，甚至發育成性逆轉雄性個體。這些證據建議 *Bdtra-2* 在性別決定機制中扮演重要的角色。然而由於本研究結果發現 *Bdtra-2* 在雌雄個體的不同發育時期皆有穩定的表現，因此推測 TRA-2 蛋白除了有輔助 TRA 蛋白決定性別決定路徑的功能外，還有其他未知的功能，但目前相關研究甚少。

雙性基因位於性別決定基因調控機制的下游，其基因產物 DSX 蛋白的氨基酸序列在各物種間具有高度保守性，可做為部分昆蟲的親緣關係研判依據。DSX 蛋白為其下游性別專一性基因的轉錄調控因子，例如：DSXF 會促進卵黃蛋白表現，而 DSXM 則會抑制卵黃蛋白表現。昆蟲藉由啟動不同的性別

專一性基因，使個體依性別進行分化，最終發育為雌性或雄性個體 (Burtis and Baker, 1989; Shukla and Nagaraju, 2010)。東方果實蠅的雌性型 *Bddsxf* 及雄性型 *Bddsxm* 在蛹期表現明顯，推測是由於蛹期變態過程需要形成雌性或雄性組織而需大量表現 DSX 蛋白所致。在成蟲時期，此二基因的表現量皆隨日齡增加而增加，表示成蟲需要大量表現此具有功能性的性別專一性蛋白。

雌成蟲因生殖需要大量的卵黃蛋白，本研究發現 3 日齡雌成蟲的卵黃蛋白基因 *yp1* 及上游 *Bddsxf* 表現皆大幅增加。此外，3 日齡雄成蟲也會表現少量卵黃蛋白，此一現象也曾在果蠅中被觀察到 (Majewska *et al.*, 2014)。雖然其表現量不多，亦有可能在雄性生殖上扮演特定角色，需要進一步進行研究來確認。

為進一步了解 *Bdtra* 基因在蛹期及成蟲期表現所扮演的生理功能，本研究將 *Bdtra* dsRNA 直接注射到 0 日齡蛹，以干擾後幼蟲期的發育。此實驗結果發現部分雌成蟲的產卵器變形，但並未發現中間性或性逆轉雄性個體。推測可能原因有二：(1) 東方果實蠅的性別在胚胎期已決定，所以在蛹期默化 *tra* 無法獲得預期影響；(2) 注射蛹的 *Bdtra* dsRNA 不



圖四 東方果實蠅蛹期 *Bdtra* RNAi 造成羽化雌蟲產卵器變形個體之卵巢。A、B 圖：正常雌成蟲之卵巢；C、D 圖：*Bdtra* RNAi 組 No. 1、2 號產卵器嚴重變形雌成蟲的卵巢變化；No. 3 雌成蟲提早死亡，並未進行解剖觀察；E-J 圖：*Bdtra* RNAi 組 No. 4-9 號產卵器輕微變形雌成蟲的卵巢。

Fig. 4. Ovaries of females with deformed ovipositors after *Bdtra* RNAi at pupal stage of *Bactrocera dorsalis*. A-B: ovaries of normal females, C-D: ovaries of females with seriously deformed ovipositors, E-J: ovaries of females with slightly deformed ovipositors.

足以默化所有的 *tra*，以致無法發育成中間性或性逆轉雄性。根據果實蠅性別決定機制，在胚胎期默化 *tra*，能導致 XX 個體雄性化，而產生中間性或性逆轉雄性個體。此現象在果實蠅科的東方果實蠅 (Liu et al., 2015)、地中海果實蠅 (Pane et al., 2002) 與橄欖果實蠅 (Lagos et al., 2007)，以及非果實蠅科的家蠅 (Hediger et al., 2010)、羊麗蠅 (Concha and Scott, 2009) 等昆蟲也相繼被證實。雖然在東方果實蠅成蟲期才進行 *Bdtra* RNAi，不會影響子代性別比例，但會影響雌蟲平均產卵數及卵黃蛋白表現量 (Peng et al., 2015)。另外也有研究證實默化東方果實蠅雌蟲的 *Bddsx* 基因會導致雌成蟲產卵

器變形及生殖力下降 (Chen et al., 2008; 2011)，因此合理推論在蛹期默化 *tra* 可以間接抑制型 *dsxf* 的表現量，進而導致實驗中出現雌蟲產卵器變形的現象。相對而言，*Bdtra*<sup>m</sup> 在每個時期表現量低，且雄成蟲不預期會產生有功能的 TRA 蛋白，因此理論上 *Bdtra* RNAi 應該不影響雄成蟲的發育。雖然仍觀察到經 *Bdtra* dsRNA 注射處理的實驗組及對照組中少部分雄成蟲產生生殖器變異、早死或無子代的現象，因為所佔比例不高，推測其可能的原因應來自機械傷害，因為未注射處理的雄成蟲並無觀察到此現象。

## 引用文献

- Burghardt G, Hediger M, Siegenthaler C, Moser M, Dubendorfer A, Bopp D.** 2005. The *transformer 2* gene in *Musca domestica* is required for selecting and maintaining the female pathway of development. *Development Genes and Evolution* 215: 165-176.
- Burtis KC, Baker BS.** 1989. *Drosophila doublesex* gene controls somatic sexual differentiation by producing alternatively spliced mRNAs encoding related sex-specific polypeptides. *Cell* 56: 997-1010.
- Burtis KC, Coschigano KT, Baker BS, Wensink PC.** 1991. The doublesex proteins of *Drosophila melanogaster* bind directly to a sex-specific yolk protein gene enhancer. *EMBO J* 10: 2577-2582.
- Chang C, Huang CY, Dai SM, Atlihan R, Chi H.** 2016. Genetically engineered ricin suppresses *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) based on demographic analysis of group-reared life table. *J Econ Entomol* 109: 987-992.
- Chen SL, Dai SM, Lu KH, Chang C.** 2008. Female-specific *doublesex* dsRNA interrupts *yolk protein* gene expression and reproductive ability in oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *Insect Biochem Mol Biol* 38: 155-165.
- Chen SL, Lu KH, Dai SM, Li CH, Shieh CJ, Chang C.** 2011. Display female-specific *doublesex* RNA interference in early generations of transformed oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *Pest Manag Sci* 67: 466-473.
- Chiu HT.** 1978. Studies on the improvement of mass rearing for oriental fruit flies. *Plant Protect Bull* 20: 87-92.
- Cline TW, Meyer BJ.** 1996. Vive la différence: males vs females in flies vs worms. *Annu Rev Genet* 30: 637-702.
- Concha C, Scott MJ.** 2009. Sexual development in *Lucilia cuprina* (Diptera, Calliphoridae) is controlled by the *transformer* gene. *Genetics* 182: 785-798.
- Coschigano KT, Wensink PC.** 1993. Sex-specific transcriptional regulation by the male and female doublesex proteins of *Drosophila*. *Genes Dev* 7: 42-54.
- Erickson JW, Quintero JJ.** 2007. Indirect effects of ploidy suggest X chromosome dose, not the X: A ratio, signals sex in *Drosophila*. *PLoS Biol.* 5: e332.
- Hediger M, Henggeler C, Meier N, Perez R, Saccone G, Bopp D.** 2010. Molecular characterization of the key switch F provides a basis for understanding the rapid divergence of the sex-determining pathway in the Housefly. *Genetics* 184: 155-170.
- Huang CY, Dai SM, Chang C.** 2016a. Introduction of the *RTA-Bddsx* gene induces female-specific lethal effects in transformed *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *Pest Manag Sci* 72: 1160-1167.
- Lagos D, Koukidou M, Savakis C, Komitopoulou K.** 2007. The *transformer* gene in *Bactrocera oleae*: the genetic switch that determines its sex fate. *Insect Mol Biol* 16: 221-230.
- Huang CY, Huang CC, Dai SM, Chang C.** 2016b. Establishment of an *RTA-Bddsx* hybrid system for female-specific splicing that can affect the sex ratio of *Bactrocera dorsalis* (Hendel) after embryonic injection. *Pest Manag Sci* 72: 280-288.
- Lagos D, Ruiz MF, Sanchez L, Komitopoulou K.** 2005. Isolation and characterization of the *Bactrocera oleae* genes orthologous to the sex determining *Sex-lethal* and *doublesex* genes of *Drosophila melanogaster*. *Gene* 348: 111-121.
- Liu G, Wu Q, Li J, Zhang G, Wan F.** 2015. RNAi-mediated knock-down of *transformer* and *transformer 2* to generate male-only progeny in the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *PLoS One* 10: e0128892.
- Majewska MM, Suszczynska A, Kotwica-**

- Rolinska J, Czerwic T, Paterczyk B, Polanska MA, Bernatowicz P, Bebas P.** 2014. Yolk proteins in the male reproductive system of the fruit fly *Drosophila melanogaster*: spatial and temporal patterns of expression. Insect Biochem Mol Biol. 47: 23-35.
- Meise M, Hilfiker-Kleiner D, Dübendorfer A, Brunner C, Nöthiger R, Bopp D.** 1998. Sex-lethal, the master sex-determining gene in *Drosophila*, is not sex-specifically regulated in *Musca domestica*. Development 125: 1487-1494.
- Pane A, Salvemini M, Bovi PD, Polito C, Saccone G.** 2002. The *transformer* gene in *Ceratitis capitata* provides a genetic basis for selecting and remembering the sexual fate. Development 129: 3715-3725.
- Peng W, Zheng W, Handler AM, Zhang H.** 2015. The role of the *transformer* gene in sex determination and reproduction in the tephritid fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel). Genetica 143: 717-727.
- Saccone G, Peluso I, Artiaco D, Giordano E, Bopp D, Polito LC.** 1998. The *Ceratitis capitata* homologue of the *Drosophila* sex-determining gene *Sex-lethal* is structurally conserved, but not sex-specifically regulated. Development 125: 1495-1500.
- Salvemini M, Robertson M, Aronson B, Atkinson P, Polito LC, Saccone G.** 2009. *Ceratitis capitata transformer-2* gene is required to establish and maintain the autoregulation of *Cctra*, the master gene for female sex determination. Int J Develop Biol 53: 109-120.
- Salz HK, Erickson JW.** 2010. Sex determination in *Drosophila*: the view from the top. Fly 4: 60-70.
- Sarno F, Ruiz MF, Eirin-Lopez JM, Perondini ALP, Selivon D, Sanchez L.** 2010. The gene *transformer-2* of *Anastrepha* fruit flies (Diptera, Tephritidae) and its evolution in insects. BMC Evol Biol 10: 1-14.
- Shukla JN, Nagaraju J.** 2010. *Doublesex*: a conserved downstream gene controlled by diverse upstream regulators. J Genetics 89: 341-356.
- Sosnowski BA, Belote, JM, McKeown, M.** 1989. Sex-specific alternative splicing of RNA from the *transformer* gene results from sequence-dependent splice site blockage. Cell 58: 449-459.
- Verhulst EC, van de Zande L, Beukeboom LW.** 2010. Insect sex determination: it all evolves around *transformer*. Curr Opin Genet Dev 20: 376-383.
- Willhoefft U, Franz G.** 1996. Identification of the sex-determining region of the *Ceratitis capitata* Y chromosome by deletion mapping. Genetics 144: 737-745.

# **Expression Analyses of Sex-Related Genes and Functional Studies of the *transformer* Gene in *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae)**

**Chia-Hsin Lee<sup>1</sup>, Cheng Chang<sup>2</sup>, and Shu-Mei Dai<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> Department of Entomology, National Chung Hsing University, 145 Xingda Rd., Taichung 40227, Taiwan

<sup>2</sup> Biotechnology Center, National Chung Hsing University, 145 Xingda Rd., Taichung 40227, Taiwan

\* Corresponding email: sdai5497@dragon.nchu.edu.tw

Received: 16 January 2017      Accepted: 6 October 2017      Available online: 26 October 2017

## **ABSTRACT**

The oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel), is one of the most economically detrimental insect pests in Taiwan. The females puncturing the skin of fruit to deposit eggs and the larvae feeding in fruit cause severe damage to fruits and lead to huge economic losses. Because the number of female flies in the field is correlated with the degree of loss, more knowledge on the sex-determination mechanism would be beneficial to developing efficient control strategies for the pest. In tephritid flies, the *transformer* gene (*tra*) is a key switch in sex determination. To learn more about this process, the relative expression patterns of sex-related genes, including *tra*, *transformer-2* (*tra-2*), *doublesex* (*dsx*), and *yolk protein* gene (*Bdyp1*), in *Bactrocera dorsalis* were examined at different developmental stages using reverse transcription polymerase chain reaction. High levels of *Bdtra*<sup>f</sup> observed in both unfertilized and fertilized eggs were consistent with previous observations that the female deposits of *tra*<sup>f</sup> mRNA into eggs. During larval and pupal stages, many gender characteristics are still indefinite and expression levels of these sex-related genes are relatively low compared with those of adults. After eclosion, the expressions of *Bdtra*<sup>f</sup>, *Bddsx*<sup>f</sup>, and *Bdyp1* in females and *Bddsx*<sup>m</sup> in males increase gradually with age. The phenomena indicate these products are functionally required and critical in downstream sex differential regulation. Because TRA-2 is present in males and females, its constant expression in all stages implies it might have other physiological functions in addition to forming the TRA/TRA-2 complex. For functional analysis, *Bdtra* double-stranded RNA (dsRNA) covering exon 2 to exon 4 was injected into 68 early pupae. A total of 16 male and 19 female flies eclosed successfully, with a sex ratio close to 1:1 and none of the expected intersex or XX-reversed males detected. However, eight dsRNA-treated females had deformed ovipositors, and six of these females laid no eggs. Most of the male adults possessed normal external genitalia, but a few individuals had no offspring. These results suggested that timing for conducting RNAi of *Bdtra* is critical for XX-reversed male formation and that *Bdtra* silencing in the pupal stage was unable to affect the sex determination of *B. dorsalis*.

**Key words:** *Bactrocera dorsalis*, *transformer* gene, sex determination, RNA interference