

三个棉蚜谷胱甘肽-S-转移酶 (*GST*) 基因克隆及在不同寄主专化型中的表达分析*

王传鹏^{1,2**} 张 帅² 高雪珂² 雒珺瑜² 朱香镇²
王 丽² 张开心² 杨亦桦^{1***} 崔金杰^{2***}

(1. 南京农业大学植物保护学院, 南京 210095; 2. 中国农业科学院棉花研究所/棉花生物学国家重点实验室, 安阳 455000)

摘 要 【目的】明确棉蚜 *Aphis gossypii* Glover 体内 3 个高表达谷胱甘肽-S-转移酶 (*GST*) 基因不同发育阶段的表达谱, 并比较它们在不同寄主专化型棉蚜中的表达差异。【方法】从棉蚜的伏蚜和苗蚜转录组数据库中挑选 *GSTs* 并克隆得到全长 cDNA 序列, 使用 qRT-PCR 分析这些基因在不同寄主专化型棉蚜不同龄期中的相对表达量。【结果】克隆到 3 个高表达的 *GSTs* 基因, 分别命名为 *AgoGST-s1* (GenBank 登录号: MN688789)、*AgoGST-d1* (GenBank 登录号: MN688790)、*AgoGST-d2* (GenBank 登录号: MN688791)。这 3 个基因在不同龄期均表达, 不同发育阶段的表达谱基本一致, 表达量呈现从低到高的变化趋势。*AgoGST-s1* 基因在各个发育阶段相对表达量的变化幅度较小, 而 *AgoGST-d1*、*AgoGST-d2* 的变化幅度较大。对比两种寄主专化型棉蚜相同龄期时的表达情况发现, 黄瓜型棉蚜中 *GSTs* 基因的表达量在大部分龄期都高于棉花型棉蚜。【结论】*AgoGST-s1*、*AgoGST-d1*、*AgoGST-d2* 基因表达量伴随棉蚜生长发育变化趋势明显, 在不同寄主专化型棉蚜体内的表达量存在差异, 可能与棉蚜对寄主植物的适应性有关。

关键词 棉蚜; 谷胱甘肽-S-转移酶; 发育阶段; 寄主专化型; 表达谱

Clone and expression analysis of three glutathione-S-transferase genes in different host-specific types of *Aphis gossypii* Glover

WANG Chuan-Peng^{1,2**} ZHANG Shuai² GAO Xue-Ke² LUO Jun-Yu²
ZHU Xiang-Zhen² WANG Li² ZHANG Kai-Xin² YANG Yi-Hua^{1***} CUI Jin-Jie^{2***}

(1. College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. State Key Laboratory of Cotton Biology, Institute of Cotton Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Anyang 455000, China)

Abstract [Objectives] To determine the profiles of three high expression glutathione-S-transferase (*GST*) genes in various developmental stages of *Aphis gossypii* Glover, and compare the expression of these genes in different host-races of this pest. [Methods] Full-length cDNA sequences of *GSTs* genes were cloned based on transcriptome data of *A. gossypii* specimens collected from seedling and mid-summer growth stages of cotton. The relative expression levels in different developmental stages (nymph and adult) and host-races (cucumber and cotton host-races) were investigated with real-time quantitative PCR. [Results] Three high expression *GSTs* were identified and named *AgoGST-s1* (GenBank accession no.: MN688789), *AgoGST-d1* (GenBank accession no.: MN688790) and *AgoGST-d2* (GenBank accession no.: MN688791). These 3 genes were expressed in all development stages and their temporal expression profiles all tended to increase over time. The relative expression of *AgoGST-s1* gene was less in all developmental stages, whereas that of *AgoGST-d1* and *AgoGST-d2* was more variable. Expression of these 3 *GSTs* in the cucumber host-race was higher than in the cotton host-race for most age-classes. [Conclusion] Expression of the *AgoGST-s1*, *AgoGST-d1* and *AgoGST-d2* genes is significantly associated with the developmental stage of *A. gossypii*. The expression patterns of these 3 *GST* genes in two host-races differed, which may reflect

*资助项目 Supported projects: 国家棉花产业技术体系 (CARS-15-20)

**第一作者 First author, E-mail: wangcpzs@163.com

***共同通讯作者 Co-corresponding authors, E-mail: yhyang@njau.edu.cn; aycuijinjie@163.com

收稿日期 Received: 2019-07-03; 接受日期 Accepted: 2019-11-20

adaptation to different host plants.

Key words *Aphis gossypii*; glutathione-S-transferase (GST); host specialization; development stage; expression profile

在长期自然选择状态下,昆虫对不同的寄主植物进化出了相应的适应能力,有些种类逐渐演化出寄主专化型(陈文胜等,1997)。我国的棉蚜主要分为黄瓜型棉蚜和棉花型棉蚜(刘向东等,2003),相关研究发现黄瓜和棉花上的棉蚜相互转接后,棉蚜既不能正常生长也不能顺利产生后代(Wang *et al.*, 2016)。目前蚜虫的寄主专化现象已经可利用分子生物学技术进行鉴别,如利用随机扩增多态性 DNA (RAPD 技术)发现寄主上的棉蚜存在分化现象(Masutti and Chavigny, 1998),微卫星标记技术可将棉花、西葫芦、黄瓜等 20 多个寄主植物上的棉蚜群体分为 16 个基因型(Masutti *et al.*, 1999)。

蚜虫寄主专化性长期保持的结果导致了不同寄主专化型蚜在许多方面存在差异。在外部形态上,通过观察喙末端、各足跗节 I、跗节 II 和爪等特征,发现蚜虫与寄主植物之间存在明显的形态适应关系(方燕等,2011)。生理生化的研究表明,瓜类上的棉蚜与茄子和马铃薯上的棉蚜存在酯酶活性上的差异(Saito, 1990)。李飞等(2002)报道与取食棉花的棉蚜相比,取食南瓜的棉蚜乙酰胆碱酯酶对甲胺磷的敏感性下降,羧酸酯酶活性下降,分析得知寄主植物影响羧酸酯酶基因的转录或翻译过程。任柯昱等(2018)证实在相同发育时期,唾液蛋白 C002 基因在棉花型棉蚜和黄瓜型棉蚜表达水平不同,预示着两寄主专化型棉蚜在基因表达方面存在着分化。张元臣(2016)通过转录组测序发现, P450 基因 *CYP302a1*、*CYP6a14*、*CYP4c1*、*CYP6a2* 和消化酶基因 *CL1593-1*、*CL382-1H*、*CL1471-2* 在黄瓜型棉蚜中表达量显著高于棉花型棉蚜。

谷胱甘肽-S-转移酶(GST)是生物体内的一类重要的代谢酶,参与外源和内源有毒物质的代谢(李亚红,2014)。GST 通过催化还原型的谷胱甘肽(GSH)和有毒物质偶联反应,使有毒化合物的水溶性增加从而更容易排出体外,最终达

到解毒的作用(Dixon and Edwards, 2005)。在一些对杀虫剂有抗性的昆虫中, GST 基因表达量明显上调,同时 GST 酶的活性也升高(刘佳等,2013;王圣印等,2013)。在植食性昆虫中谷胱甘肽-S-转移酶可以有效代谢有毒的植物次生代谢物,如 α 、 β -不饱和羰基化合物、异硫氰酸盐、硫氰酸盐等(Wadleigh and Yu, 1987, 1988)。另外在一些昆虫中还发现 GST 具有过氧化物酶的活性,可以保护细胞免受氧化损伤从而在许多生理过程中发挥重要的作用(Vontas *et al.*, 2001)。

本文基于棉蚜转录组数据中的相关信息,克隆获得了 3 个高表达 GST 基因的全长(*AgoGST-s1*、*AgoGST-d1* 和 *AgoGST-d2*),对它们进行了序列和进化树分析;同时研究了这 3 个基因在棉花型和黄瓜型两种寄主专化型棉蚜不同发育阶段的表达特性,比较了在两种不同寄主专化型棉蚜中的表达差异,为进一步研究棉蚜寄主专化型形成的分子机理提供了重要信息。

1 材料与方法

1.1 供试植物

实验所采用的棉花品种为中棉所 49,由中国农业科学院棉花种质资源中期库提供;黄瓜品种为新津优一号,购买于宁阳县金鑫种子销售中心。植物在人工气候室内种植,设定条件:温度(26 ± 1),相对湿度 70%-80%,光周期 L:D=16:8。

1.2 供试棉蚜

供试所用的棉花型棉蚜和黄瓜型棉蚜分别采自中国农业科学院棉花研究所东场试验田($114^{\circ}42' E$, $36^{\circ}11' N$)的棉花和黄瓜植株上,通过分子鉴定技术鉴定其专化型(Zhang *et al.*, 2018),鉴定后的棉蚜单头饲养于温度为(26 ± 1),相对湿度为 70%-80%,光周期 L:D=16:8 的人工气候箱内,最终获得遗传背景一致的品系。

1.3 试验处理

将黄瓜型棉蚜和棉花型棉蚜的成蚜分别转接到离体的黄瓜叶或棉花叶片上, 将叶片的梗部插入 1.8% 琼脂的保湿培养皿中, 盖上盖子后置于人工气候室中, 24 h 后移除成蚜, 留下若蚜在叶片上生长。每隔 2 d 更换一次新鲜叶片以保证蚜虫的正常生长发育。连续收集棉花型棉蚜和黄瓜型棉蚜 2、3、4 龄的若蚜和 1、3、5、7 日龄的成蚜。每个时期收集 20 头作为一个处理, 共 3 个重复。将收集的样品储存在 -80 °C 备用。

1.4 棉蚜总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

棉蚜的总 RNA 的提取步骤按照 TRIzol 试剂 (Ambion 公司) 说明书进行。使用 NanoDrop 2000C 及琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 浓度、纯度及其完整性。

利用 TaKaRa 公司的 PrimeScriptTM RT reagent Kit (Perfect Real Time) 反转录试剂盒将上述不同棉蚜的 RNA 反转录成单链 cDNA。

1.5 棉蚜 GST 基因的克隆

根据本实验室所建立的苗蚜和伏蚜转录组数据库信息 (Li *et al.*, 2013) 中选出表达量相对较高的棉蚜 3 个 GST 基因, 运用 Primer Premier 5.0 软件设计验证引物。AgoGST-s1 的上游引物为 5'-TGATAATGGCACTTAAGTACTA-3', 下游引物为 5'-GGAGATAAGCGAATAAGGGTCATA-3'; AgoGST-d1 的上游引物为 5'-GCCGATCGACTTC TACTACTACTCCC-3', 下游引物为 5'-TCAAAAC ACGAAACGCAAATCTG-3'; AgoGST-d2 的上游

引物为 5'-GTTGCGAAACTACAAAATGACTAT-3', 下游引物为 5'-TTTAATCTAGCAGTTTTGAA AACAG-3'。PCR 反应后将扩增产物用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测后, 切胶回收并纯化, 按照 pEASY-T3 Cloning Kit 试剂盒 (全式金) 的说明书将其连接到 pEASY-T3 载体上, 然后转化 Trans1-T1 Phage Resistant 化学感受态细胞, 挑取单克隆进行测序。

1.6 生物信息学分析

运用网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 预测基因的 OFR (Open reading frame)。运用在线软件 ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>) 分析蛋白质的理化性质。运用网站 (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) 分析蛋白质的结构域和保守位点, 利用软件 MEGA7 以邻接法 (Neighbor-joining method, NJ) 构建系统发育树, 各分支置信度经由 bootstrap 法 1 000 次循环检验。

1.7 荧光定量 PCR

使用 Beacon Designer 7 软件设计荧光定量引物, 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。将 cDNA 模板稀释成 5 个浓度梯度, 进行标准曲线的制作, 并计算各引物的扩增效率 (表 1)。选取棉蚜的甘油三磷酸脱氢酶 GAPDH 作为内参基因 (GenBank 登录号: KP676380.1) (Cao *et al.*, 2014) (表 1)。荧光定量 PCR 反应使用 GoTaq qPCR Master Mix (Promega 公司) 试剂盒进行。反应体系为 qPCR MasterMix 10 μ L、

表 1 实时荧光定量 PCR 引物
Table 1 Primers used for real-time quantitative PCR

基因 Gene	引物序列 Primer sequence (5'-3')	扩增效率 (%) Amplification efficiency	相关系数 (R^2) Correlation coefficient
AgoGST-s1	F-TGATAATGGCACTTAAGTACTA R-AACCACTATCCGAACAAC	90	0.994
AgoGST-d1	F-ACAGTCAGTCGTCATACAC R-TTCTGAATCGGTCGGTTC	91	0.997
AgoGST-d2	F-GTGATTGGCTTCGTTGTAAT R-ATCTGACCAGTTATCCTAATGT	94	0.995
AgoGAPDH	F-ATCATTCCAGCATCTACT R-TCCTTAACCTTATCCTTGA	90	0.999

cDNA 模板 1.0 μL 、上下游引物各 0.8 μL 、无核酶水 7.4 μL ，混匀离心，放入荧光定量 PCR 仪中扩增。反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 2 min；接着进行 40 个循环，条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min。定量 PCR 仪器为 Eppendorf 公司的 Mastercycler ep realplex 荧光定量 PCR 仪。表达量的计算根据 Ct 值采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算基因的相对表达水平 (Livak and Schmittgen, 2001; Broeders *et al.*, 2014)，不同寄主型蚜虫各个不同龄期的 GST 基因的相对表达水平均表示为棉花型若蚜 2 龄 AgoGST-s1 基因 (设为 1 倍) 的相对倍数。

2 结果与分析

2.1 棉蚜 3 个 GSTs 基因克隆和序列特征分析

根据棉蚜转录组数据，通过基因克隆方法得到的 3 个 GSTs 基因的全长 cDNA 序列，分别命名为 AgoGST-s1、AgoGST-d1 和 AgoGST-d2，并对其相应的氨基酸序列特征进行分析比较，如图 1、图 2 所示。

AgoGST-s1 基因包括 612 bp 的 ORF，编码 203 个氨基酸残基，预测蛋白质分子量为 23.14 ku，等电点为 5.17。经过 PROSITE 和 Conserved

Domains 保守区域分析得知，AgoGST-s1 包含 Sigma 家族特有的催化残基位点“Y8”，N 端结构域位于氨基酸序列第 4-73 位，C 端结构域位于第 83-185 位，其中分别含有 GSH 结合位点 (8Y-14L-50K-51V-52P-63Q-64S) 和疏水底物结合位点 (96H-99R-100Q-103A-104G-159V-162Y)。

AgoGST-d1 基因包括 651 bp 的 ORF，编码 216 个氨基酸，预测蛋白质分子量为 24.17 ku，等电点为 6.51。该基因含有 Delta 家族特有的典型序列“T*AD”和保守的 N 端、C 端结构域，N 端结构域位于氨基酸序列第 3-76 位，C 端结构域位于第 90-207 位，分别具有 GSH 结合位点 (11S-52H-53C-54V-66E-67S) 和疏水底物结合位点 (103V-107Y-108P-111A-112D-115Y-119F-164S-167T-206F)。

AgoGST-d2 基因包括 666 bp 的 ORF，编码 221 个氨基酸，预测相对分子质量为 24.89 ku，等电点为 6.90。同样含有 Delta 家族典型的序列“T*AD”，保守的 N 端和 C 端结构域分别位于氨基酸序列第 3-76 位第 96-212 位，具有 GSH 和结合位点 (11S-52H-53T-54I-66E-67S) 和疏水底物结合位点 (109L-113Y-114R-117S-118D-121G-125A-169T-172C-211F)。

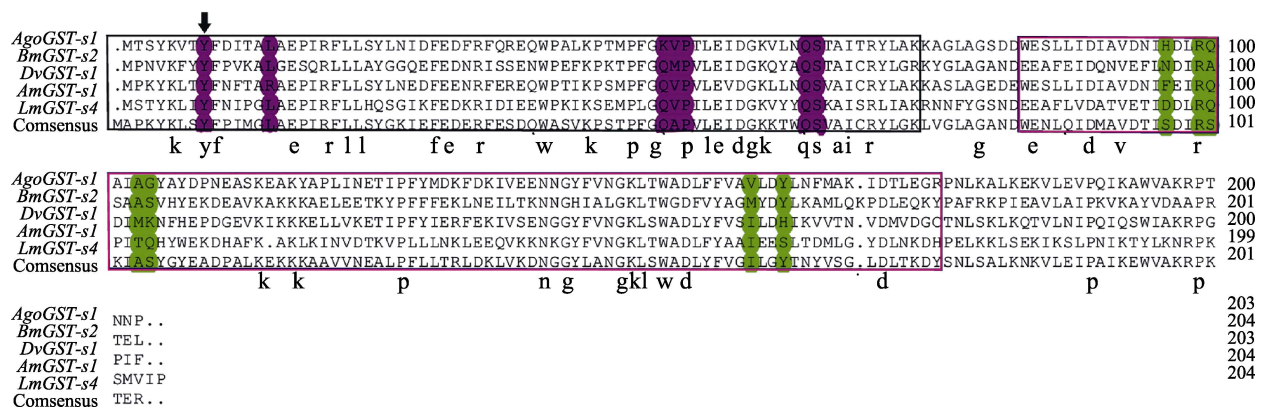


图 1 棉蚜 AgoGST-s1 与其他昆虫 Sigma 类 GSTs 氨基酸序列多重比较

Fig. 1 Amino acid sequence alignment of AgoGST-s1 from *Aphis gossypii* with Sigma-class homologues from other insects

AgoGST-s1: 棉蚜 *Aphis gossypii*, XP_027840459.1; BmGST-s2: 家蚕 *Bombyx mori*, NP_001036994.1; DvGST-s1: 葡萄根瘤蚜 *Daktulosphaira vitifoliae*, AUN35386.1; AmGST-s1: 西方蜜蜂 *Apis mellifera*, NP_001153742.1; LmGST-s4: 飞蝗 *Locusta migratoria*, AEB91976.1。黑色方框为 AgoGST-s1 N 端结构域；红色方框为 AgoGST-s1 C 端结构域；预测的 GSH 结合位点 (G-site) 和底物结合位点 (H-site) 分别标注为红色和绿色，Sigma 家族特有的催化位点残基“Y8”用黑色箭头表示。

Black box region is the N-terminal domain of AgoGST-s1; Red box region is the C-terminal domain of AgoGST-s1; Predicted GSH binding sites (G-sites) and substrate binding sites (H-sites) are shaded red and green, respectively.

The typical catalytic site residue “Y8” of Sigma-class is indicated in black arrow.

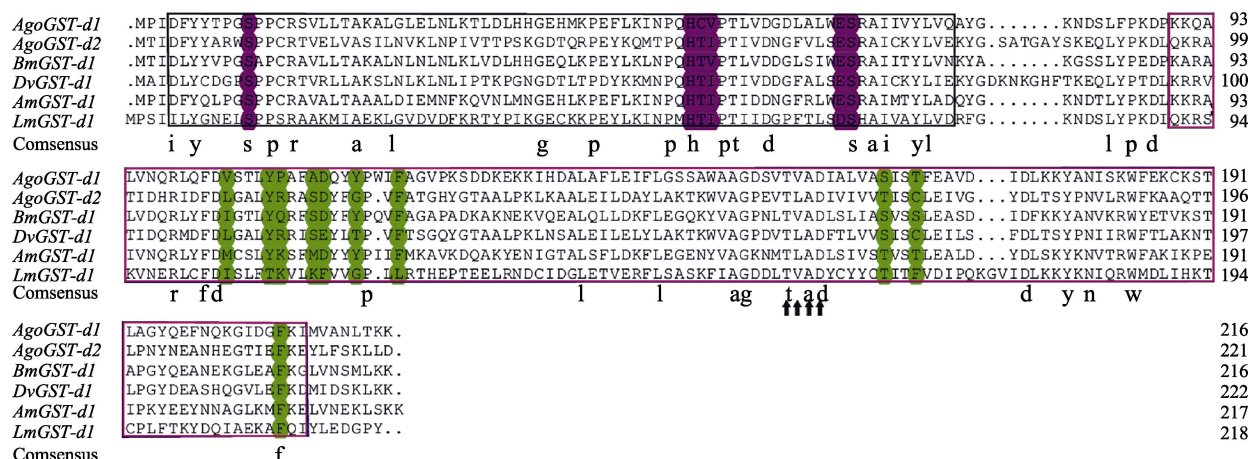


图 2 棉蚜 *AgoGST-d1*、*AgoGST-d2* 与其他昆虫 Delta 类 GSTs 氨基酸序列多重比较

Fig. 2 Amino acid sequence alignment of *AgoGST-d1*, *AgoGST-d2* from *Aphis gossypii* with Delta-class homologues from other insects

AgoGST-d1: 棉蚜 *Aphis gossypii*, AFM78644.1; *AgoGST-d2*: 棉蚜 *Aphis gossypii*, XP_027847501.1;

BmGST-d2: 家蚕 *Bombyx mori*, NP_001036974.1; *DvGST-s1*: 葡萄根瘤蚜 *Daktulosphaira vitifoliae*, AUN35382.1;

AmGST-d1: 西方蜜蜂 *Apis mellifera*, NP_001171499.1; *LmGST-d1*: 飞蝗 *Locusta migratoria*, AHC08057.1。

黑色方框为 *AgoGST-s1* N 端结构域; 红色方框为 *AgoGST-s1* C 端结构域; 预测的 GSH 结合位点 (G-site)

和底物结合位点 (H-site) 分别标注为红色和绿色, Delta 家族特有的典型序列 "T*AD" 用黑色箭头标注。

Black box region is the N-terminal domain of *AgoGST-d1*, *AgoGST-d2*; Red box region is the C-terminal domain of *AgoGST-d1*, *AgoGST-d2*; Predicted GSH binding sites (G-sites) and substrate binding sites (H-sites) are shaded red and green, respectively. The typical sequence "T*AD" of Delta-class is marked by black arrow.

将这 3 个棉蚜 GST 基因和其他昆虫的 GST 基因的氨基酸序列以邻接法构建了进化树 (图 3)。从图 3 中可以看出, 棉蚜 GST 与其他半翅目 GST 的亲缘关系较近, 例如 Sigma 家族的 *AgoGST-s1* 和葡萄根瘤蚜 *D. vitifoliae* 的 *DvGST-s3* 聚为同一个进化支, *AgoGST-d1* 与豌豆蚜 *ApiGST-d5* 聚为同一个进化支, *AgoGST-d2* 和湿木白蚁 *ZnGST-d7* 聚类在一支。

2.2 3 个 GST 基因在棉蚜不同发育阶段的表达

2.2.1 棉花型棉蚜的 GST 基因的表达

利用荧光定量 PCR 技术检测了 3 个 GST 基因在棉花型棉蚜若蚜不同龄期和成蚜不同日龄的相对表达量, 结果见图 4。 *AgoGST-s1*、*AgoGST-d1* 和 *AgoGST-d2* 这 3 个基因不同时期的表达谱基本一致, 除若蚜 3 龄时相对表达量最低, 其余基本呈现出从低到高的变化趋势。 *AgoGST-s1* 基因在各个发育阶段相对表达量的变化幅度较小, 而 *AgoGST-d1* 和 *AgoGST-d2* 的变化幅度较大; 其中 *AgoGST-d1*、*AgoGST-d2* 和 *AgoGST-s1* 表达差异

最大时期分别出现在成蚜 3 日龄和成蚜 7 日龄, 分别比 *AgoGST-s1* 高 31 倍和 27 倍, 差异最小时期同时出现在若蚜 2 龄, 但也分别比 *AgoGST-s1* 高出 14 倍。

2.2.2 黄瓜型棉蚜 GST 基因的表达

3 个 GST 基因在黄瓜型棉蚜不同发育时期的相对表达量见图 4。 *AgoGST-s1*、*AgoGST-d1* 和 *AgoGST-d2* 基因在黄瓜型棉蚜不同发育阶段中均表达, 且除成蚜 3 日和 5 日龄, 都表现为表达量随龄期增加而上升。 *AgoGST-d1* 和 *AgoGST-d2* 在黄瓜型棉蚜的表达量明显高于 *AgoGST-s1*; 其中 *AgoGST-d1*、*AgoGST-d2* 和 *AgoGST-s1* 表达差异最大时期同时出现在成蚜 5 日龄, 分别比 *AgoGST-s1* 高 138 倍和 284 倍, 差异最小时期分别出现在若蚜 3 龄和成蚜 7 日龄, 但也分别比 *AgoGST-s1* 高出 23 倍。 *AgoGST-s1* 表达最低和最高分别在成蚜 5 日龄、成蚜 7 日龄, 两者间超过 20 倍。 *AgoGST-d1* 基因表达量最低和最高时期分别出现在成蚜 3 日龄、成蚜 7 日龄, 两者间相差近 20 倍。 *AgoGST-d2* 基因表达量最低和最高时期

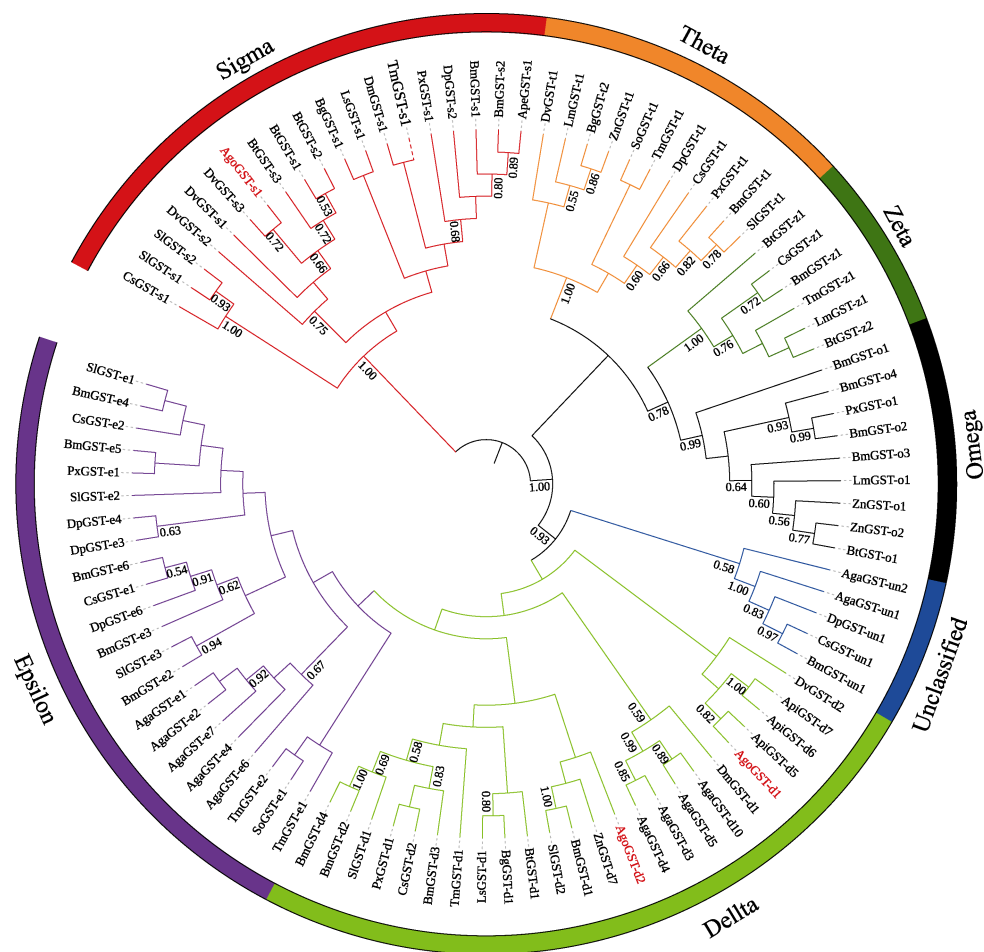


图3 棉蚜与其他不同昆虫 GSTs 系统进化分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of GSTs of *Aphis gossypii* and other insects

进化树使用邻接法构建, 各分支置信度经由 1 000 次 Bootstrap 检验。棉蚜 GST 基因用红色字体表示。

So: 米象; Bg: 德国小蠊; Lm: 东亚飞蝗; Cs: 二化螟; Px: 柑橘凤蝶; Aga: 冈比亚按蚊; Dv: 葡萄根瘤蚜; Dm: 黑腹果蝇; Dp: 黑脉金斑蝶; Tm: 黄粉虫; Bm: 家蚕; Pa: 美洲大蠊; Zn: 湿木白蚁; Api: 豌豆蚜; Sl: 斜纹夜蛾; Ls: 烟草甲; Bt: 烟粉虱; Ape: 柞蚕; Ago: 棉蚜。

The tree is constructed by using neighbor-joining method. Bootstrap support values are based on 1 000 replicates.

The GSTs of cotton aphid is marked with the red.

So: *Sitophilus oryzae*; Bg: *Blattella germanica*; Lm: *Locusta migratoria*; Cs: *Chilo suppressalis*; Px: *Papilio xuthus*; Aga: *Anopheles gambiae*; Dv: *Daktulosphaira vitifoliae*; Dm: *Drosophila melanogaster*; Dp: *Danaus plexippus*; Tm: *Tenebrio molitor*; Bm: *Bombyx mori*; Pa: *Periplaneta americana*; Zn: *Zootermopsis nevadensis*; Api: *Acyrtosiphon pisum*; Sl: *Spodoptera littoralis*; Ls: *Lasioderma serricorne*; Bt: *Bemisia tabaci*; Ape: *Antheraea pernyi*; Ago: *Aphis gossypii*.

分别出现在若蚜 2 龄、成蚜 7 日龄, 两者间相差近 4 倍。

2.3 棉花型棉蚜和黄瓜型棉蚜 GST 基因的表达量对比

进一步分析 AgoGST-s1、AgoGST-d1 和 AgoGST-d2 在两种寄主专化型相同龄期的表达情况可以发现(图 4), 3 个基因的相对表达量差

异明显且基本都达到显著水平, 在大部分龄期都是黄瓜型蚜虫中的表达量高于棉花型蚜虫。在成蚜 1 日龄和成蚜 7 日龄, 两种寄主型间基因表达差异相对较大, AgoGST-s1 在黄瓜型棉蚜中的表达量分别是棉花型棉蚜中表达量的 2 倍、3 倍, AgoGST-d1 表达量分别是棉花型棉蚜的 5 倍、7 倍, AgoGST-d2 表达量分别是棉花型棉蚜的 5 倍、2 倍。

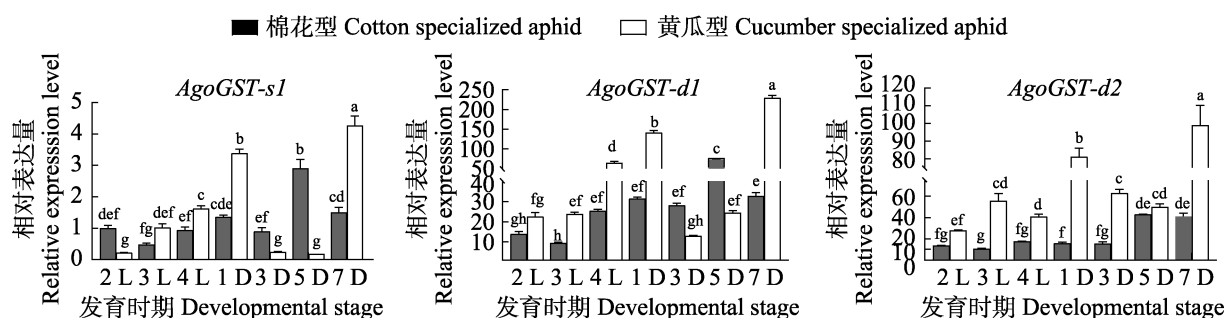


图 4 *AgoGST-s1*、*AgoGST-d1*、*AgoGST-d2* 在棉花型和黄瓜型棉蚜中的相对表达量

Fig. 4 Relative expression levels of *AgoGST-s1*, *AgoGST-d1*, *AgoGST-d2* in cotton specialized and cucumber specialized aphids

2 L: 2 龄若蚜; 3 L: 3 龄若蚜; 4 L: 4 龄若蚜; 1 D: 1 日龄成蚜; 3 D: 3 日龄成蚜; 5 D: 5 日龄成蚜; 7 D: 7 日龄成蚜。柱上标有不同小写字母代表基因表达量的差异显著 (ANOVA, $P < 0.05$)。
2 L: 2nd instar nymph; 3 L: 3rd instar nymph; 4 L: 4th instar nymph; 1 D: 1st adult; 3 D: 3rd adult; 5 D: 5th adult; 7 D: 7th adult. Different lowercase letters above histograms indicate significant difference among various genes (ANOVA, $P < 0.05$).

3 讨论

昆虫谷胱甘肽转移酶基因 GST 被划分为 Delta、Epsilon、Omega、Sigma、Theta 和 Zeta 6 个家族及 1 个“未分类”亚族 (Kettermann *et al.*, 2011; 尤燕春等, 2013; Liu *et al.*, 2017)。本研究从棉蚜的转录组数据库中获得 3 个高表达 GST 基因 *AgoGST-d1*、*AgoGST-d2* 和 *AgoGST-s1*, 通过分析全长克隆获得的基因序列和构建系统发育进化树后, 明确这 3 个基因分别属于 Delta 和 Sigma 家族。Delta 是昆虫特有的家族 (Enayati *et al.*, 2005), Ranson 等 (2002) 通过功能验证发现 Delta 家族对外源物质解毒代谢起着重要的作用, 能够增强昆虫对环境的适应性。Sigma 家族则广泛存在于生物体中, Ranson 等 (2001) 报道在对外源物质 DDT 有抗性的冈比亚按蚊 *A.gambiae* 中, Sigma 家族基因 mRNA 的水平比敏感品系高出 5 倍。不管是昆虫特有的 Delta、Epsilon 家族还是生物体都有的其他家族 GST 基因, 在内源和外源化合物代谢等方面都起着重要作用。本研究发现的 3 个 GSTs 基因分属不同的家族, 在两种寄主专化型棉蚜各个发育阶段中均有表达, 并且相对表达量在不同龄期的变化明显, 而且 Delta 家族的两个基因 *AgoGST-d1* 和 *AgoGST-d2* 表达量远高于 Sigma 家族的 *AgoGST-s1*,

推测在不同寄主型棉蚜生长发育过程中, *AgoGST-d1*、*AgoGST-d2* 和 *AgoGST-s1* 在不同程度上参与了植物外源次生物质的解毒代谢。

许多植物次生物质是 GSTs 的底物, 植食性昆虫的 GSTs 参与对取食过程中遇到的植物次生物质的代谢 (Wadleigh and Yu, 1987), 同时 GSTs 活性也受到植物次生物质或杀虫剂的调节 (Lee, 1991; Yu, 1999; 汤方等, 2005; 金燕璐等, 2018)。GSTs 活性增加有两种方式, 一种是在昆虫体内原有的谷胱甘肽-S-转移酶一种或多种同工酶上过量表达, 另一种是合成新的同工酶, 目前更多的研究表明昆虫 GSTs 活性的增加是基因的过量表达引起的 (Hayaoka and Dauterman, 1983; Reidy *et al.*, 1990)。在本研究中棉蚜 *AgoGST-s1*、*AgoGST-d1* 和 *AgoGST-d2* 基因在两种寄主专化型棉蚜中的相对表达量基本都是随着龄期的增加表达呈现上升的趋势, 除黄瓜型棉蚜 3 日龄和 5 日龄成蚜中 *AgoGST-s1* 表达量偏低外, 成蚜期 3 个基因的表达量普遍高于若蚜期。翟颖婷 (2019) 研究发现, 在生物型 HM29 麦长管蚜 *Sitobion avenae* 的人工饲料中分别添加浓度为 0.04% 没食子酸饲喂后, *SaGST3* 基因和 *SaGST4* 基因的表达量分别是对照组的 2.0 倍和 1.4 倍, 添加浓度为 0.03% 豆香素饲喂后, *SaGST3* 基因和 *SaGST4* 基因的表达量分别是对照组的 1.4 倍

和 1.2 倍,同时分别检测到 GSTs 活性增加。Yang 等 (2017) 报道在人工饲料中添加 2 $\mu\text{g/mL}$ 的阿魏酸饲喂褐飞虱后, *NIGSTD1* 基因表达量是对照组的 1.3 倍, *NIGSTE1* 基因的表达量是对照组的 2.5 倍,同时 GSTs 活性增加。棉蚜随着生长发育的进行或在特定阶段生长发育较快、繁殖能力较强,所需的营养物质和能量较多,伴随着营养物质进入棉蚜体内的次生物质也相应增多,所以通过 GST 基因表达量的提升,增强谷胱甘肽转移酶的活性,以促进棉蚜对外源物质的解毒或转化利用,进而增强棉蚜在寄主植物上的适应能力。

寄主专化性是指昆虫对特定植物种类和对植物取食的部位有着长期和专一的嗜好性(刘向东等, 2004)。随着这种特性的定向发展,昆虫往往又会分化成不同的寄主专化型来适应寄主及环境变化(Wadleigh and Yu, 1988),这种适应性的分化是渐进的,其演化速度可能受当地种植模式、地理条件和气候条件等多种因素的影响,并最终可能在合适的条件下形成严格的寄主专化型(袁立兵等, 2008)。南京地区的棉蚜被分为棉花型棉蚜和黄瓜型棉蚜(刘向东等, 2003)。王丽(2015)采用气相色谱-飞行时间质谱联用仪(Gas chromatography time-of-flight mass spectrometry, GC-TOF/MS)进一步明确黄瓜、棉花及西葫芦苗期叶片等寄主植物的次生化合物组成不同很可能与棉蚜寄主专化型形成有关。

有研究表明萜烯类化合物(棉酚)、黄酮类化合物(槲皮素、芸香苷、儿茶素)、单宁类化合物(单宁酸)是棉花防御害虫棉蚜 *A. gossypii* 和棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 的主要次生物质(Hedin et al., 1992; 汤德良, 1999; 武予清等, 2000; Mao et al., 2007; Gao et al., 2008; 刘泽辉等, 2008)。黄酮类化合物、单宁类化合物、酚类和木质素则是黄瓜植株中的重要次生物质。寄主植物和害虫之间存在明显的协同进化关系,植物体内的次生物质和害虫体内的解毒代谢系统间相互影响和适应,进而影响昆虫的寄主适应性。研究发现,将 B 型烟粉虱 *Bemisia tabaci* 从

原始适宜寄主棉花上转接到不适宜寄主辣椒上后, *GST7* 基因的表达量上升了 2 倍,表现出显著差异(何超等, 2017)。辣椒型桃蚜 *Myzus persicae* 从适宜寄主辣椒上转移到不适宜寄主蚕豆上后,体内 *GSTd4* 基因的表达水平下调 60% (朱经云, 2017)。Yu (1982) 研究发现分别取食芥末和大豆两种不同寄主植物后,草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 体内的谷胱甘肽-S-转移酶活性相差 10 倍。与取食人工饲料的对照组相比,取食防风草和欧芹两种寄主植物后,草地贪夜蛾 *S. frugiperda* 体内的谷胱甘肽-S-转移酶的活性分别升高 39 倍和 19 倍(Yu, 1984)。本研究发现相同龄期两种寄主专化型棉蚜 GSTs 基因表达量的差异明显,黄瓜型棉蚜中普遍表达较高,如在若蚜 4 龄、成蚜 1 日龄、成蚜 7 日龄时,黄瓜型棉蚜中 *AgoGST-s1* 相对表达量分别是棉花型棉蚜的 2 倍、2 倍、3 倍; *AgoGST-d1* 相对表达量分别是棉花型棉蚜的 3 倍、5 倍、7 倍; *AgoGST-d2* 相对表达量是黄瓜型棉蚜的 2 倍、5 倍、2 倍。棉花和黄瓜的主要植物次生物质不同,棉蚜通过调节体内相应代谢酶基因的表达,加强对不同寄主的适应能力。本研究中明确了棉花型棉蚜和黄瓜型棉蚜中这 3 个 GST 基因表达量间的明显差异,推测与其寄主专化性有关。但黄瓜和棉花两种寄主植物中哪些次生物质对棉蚜 GST 基因的调节起着主导作用,以及除谷胱甘肽-S-转移酶之外棉蚜体内还有哪些酶类等,参与对次生物质的代谢以进一步影响寄主专化型的形成,这些问题仍需要进一步的研究和验证。

参考文献 (References)

- Broeders S, Huber I, Grohmann L, Berben G, Taverniers I, Mazzara M, Roosens N, Morisset D, 2014. Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. *Trends in Food Science & Technology*, 37(2): 115–126.
- Cao DP, Liu Y, Walker WB, Li JH, Wang GR, 2014. Molecular Characterization of the *Aphis gossypii* olfactory receptor gene families. *PLoS ONE*, 9(6): e101187.
- Chen WS, Gu DJ, Li W, Chen ZP, Zhang WQ, 1997. Study on the host specialisation of *Myzus persicae* in south china. *Journal of South China Agricultural University*, 18 (4): 54–56. [陈文胜, 古德就, 李卫, 陈泽鹏, 张维球, 1997. 烟蚜寄主专化性的研究.

- 华南农业大学学报, 18(4): 54–56.]
- Dixon DP, Edwards R, 2005. Glutathione transferases. *The Arabidopsis Book*, 8(45): 125–131.
- Enayati AA, Ranson H, Hemingway J, 2005. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Molecular Biology*, 14(1): 3–8.
- Fang Y, Qiao GX, Zhang GX, 2011. Morphological adaptation of aphid species on different host plant leaves. *Acta Entomologica Sinica*, 54(2): 157–178. [方燕, 乔格侠, 张广学, 2011. 不同寄主植物叶片上蚜虫的形态适应. *昆虫学报*, 54(2): 157–178.]
- Gao F, Zhu SR, Sun YC, Du L, Parajulee M, Kang L, Ge F, 2008. Interactive effects of elevated CO₂ and cotton cultivar on tri-trophic interaction of *Gossypium hirsutum*, *Aphis gossypii* and *Propylaea japonica*. *Environmental Entomology*, 37(1): 29–37.
- Hayaoka T, Dauterman WC, 1983. The effect of phenobarbital induction on glutathione conjugation of diazinon in susceptible and resistant house flies. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 19(3): 344–349.
- He C, Xie W, Zhang YJ, 2017. Comparison of the responses of glutathione-S-transferase genes in *Bemisia tabaci* B to different host plant transfers. *Plant Protection*, 43(6): 72–77. [何超, 谢文, 张友军, 2017. 谷胱甘肽-S-转移酶基因在 B 型烟粉虱寄主转换中的差异比较. *植物保护*, 43(6): 72–77.]
- Hedin PA, Parrott WL, Jenkins JN, 1992. Relationships of glands, cotton square terpenoid aldehydes, and other allelochemicals to larval growth of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, 85(2): 359–364.
- Jin YL, Zhang BX, Lin HF, 2018. Identifying and measuring the expression profiles, of *Chilo suppressalis* glutathione-S-transferase genes. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 55(3): 349–359. [金燕璐, 张邦贤, 林华峰, 2018. 二化螟谷胱甘肽-S-转移酶基因的鉴定与表达模式分析. *应用昆虫学报*, 55(3): 349–359.]
- Ketterman AJ, Saisawang C, Wongsantichon J, 2011. Insect glutathione transferases. *Drug Metabolism Reviews*, 43(2): 253–265.
- Lee K, 1991. Glutathione-S-transferase activities in phytophagous insects: Induction and inhibition by plant phototoxins and phenols. *Insect Biochemistry*, 21(4): 353–361.
- Li F, Han ZJ, Wu ZF, 2002. Comparison of esterase and acetylcholinesterase of cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover reared on different host plants. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 25(2): 57–60. [李飞, 韩召军, 吴智锋, 2002. 取食不同寄主棉蚜的羧酸酯酶和乙酰胆碱酯酶特性比较. *南京农业大学学报*, 25(2): 57–60.]
- Li YH, 2014. The progress in the research of insect GST on insecticide detoxification and endogenous metabolism, *Journal of Shanxi Datong University (Natural Science)*, 30(4): 49–51. [李亚红, 2014. 昆虫谷胱甘肽硫转移酶农药解毒与内源代谢研究进展. *山西大同大学学报(自然科学版)*, 30(4): 49–51.]
- Li ZQ, Zhang S, Luo JY, Wang CY, Lv LM, Dong SL, Cui JJ, 2013. Ecological adaption analysis of the cotton aphid (*Aphis gossypii*) in different phenotypes by transcriptome comparison. *PLoS ONE*, 8(12): e83180.
- Liu J, Li RM, Zhou XM, 2013. Characteristics of mRNA expression of *GSTs1* gene in *Spodoptera exigua* and the effect of chlorantraniliprole on its expression. *Plant Protection*, 39(3): 18–21. [刘佳, 李如美, 周小毛, 2013. 甜菜夜蛾 *GSTs1* 基因 mRNA 表达特征及氯虫苯甲酰胺对其表达量的影响. *植物保护*, 39(3): 18–21.]
- Liu S, Zhang YX, Wang WL, Zhang BX, Li SG, 2017. Identification and characterisation of seventeen glutathione-S-transferase genes from the cabbage white butterfly *Pieris rapae*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 143: 102–110.
- Liu XD, Zhai BP, Zhang XX, 2003. Studies on the host biotypes and its cause of cotton aphid in Nanjing, China. *Scientia Agricultura Sinica*, 36(1): 54–58. [刘向东, 翟保平, 张孝羲, 2003. 南京地区棉蚜寄主专化型及其成因研究. *中国农业科学*, 36(1): 54–58.]
- Liu XD, Zhang XX, Zhai BP, 2004. Host biotypes and their formation causes in aphids. *Acta Entomologica Sinica*, 47(4): 499–506. [刘向东, 张孝羲, 翟保平, 2004. 蚜虫寄主专化型及其成因. *昆虫学报*, 47(4): 499–506.]
- Liu ZH, Zhao GH, Lu JS, Shui Y, Wu G, 2008. Studies on content of cotton gossypol and characteristics of pest resistance. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 45(3): 409–413. [刘泽辉, 赵国虎, 陆敬善, 水涌, 武刚, 2008. 棉花棉酚含量与抗虫特性的研究. *新疆农业科学*, 45(3): 409–413.]
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods*, 25(4): 402–408.
- Mao YB, Cai WJ, Wang JW, Hong GJ, Tao XY, Wang LJ, Huang YP, Chen XY, 2007. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nature Biotechnology*, 25(11): 1307–1313.
- Masutti FV, Chavigny P, 1998. Host-based genetic differentiation in the aphid *Aphis gossypii* Glover, evidenced from RAPD fingerprints. *Molecular Ecology*, 7(7): 905–914.
- Masutti FV, Chavigny P, Fuller SJ, 1999. Characterization of microsatellite loci in the aphid species *Aphis gossypii* Glover. *Molecular Ecology*, 8(4): 693–695.
- Ranson H, Claudianos C, Ortellì F, Abgrall C, Hemingway J, Sharakhova MV, Unger MF, Collins FH, Feyereisen R, 2002. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science*, 298(5591): 179–181.
- Ranson H, Rossiter L, Ortellì F, Jensen B, Wang XI, Roth CW, Collins FH, Hemingway J, 2001. Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochemical Journal*, 359(2):

- 295–304.
- Reidy GF, Rose HA, Visetson S, Murray M, 1990. Increased glutathione-S-transferase activity and glutathione content in an insecticide-resistant strain of *Tribolium castaneum* (Herbst). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 36(3): 269–276.
- Ren KY, Zhang S, Luo JY, Wang CY, Lv LM, Zhang LJ, Zhu XZ, Wang L, Cui JJ, Zhu JB, 2018. Clone and expression analysis of salivary gland protein C002 in different host-specific types of *Aphis gossypii* Glover. *Journal of Environmental Entomology*, 40(3): 617–623. [任柯昱, 张帅, 雒珺瑜, 王春义, 吕丽敏, 张利娟, 朱香镇, 王丽, 崔金杰, 祝建波, 2018. 棉蚜唾液蛋白 C002 基因克隆及在棉蚜不同寄主专化型中的表达分析. 环境昆虫学报, 40(3): 617–623.]
- Saito T, 1990. Insecticide resistance of the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae): Variation of esterase activity by host plants. *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology*, 34(1): 37–41.
- Tang DL, 1999. The secondary metabolism of plant insect resistant. *World Agriculture*, 239(3): 32–33. [汤德良, 1999. 植物抗虫的次生代谢物质. 世界农业, 239(3): 32–33.]
- Tang F, Liang P, Gao XW, 2005. 2-tridecylketone and quercetin induce tissue-specific expression of glutathione-S-transferase in *Helicoverpa armigera*. *Natural Science Exhibition*, 15(7): 805–810. [汤方, 梁沛, 高希武, 2005. 2-十三烷酮和槲皮素诱导棉铃虫谷胱甘肽-S-转移酶组织特异性表达. 自然科学进展, 15(7): 805–810.]
- Vontas JG, Small GJ, Hemingway J, 2001. Glutathione-S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochemical Journal*, 357(1): 65–72.
- Wadleigh RW, Yu SJ, 1987. Glutathione transferase activity of fall armyworm larvae toward α , β -unsaturated carbonyl allelochemicals and its induction by allelochemicals. *Insect Biochemistry*, 17(5): 759–764.
- Wadleigh RW, Yu SJ, 1988. Detoxification of isothiocyanate allelochemicals by glutathione-S-transferase in three lepidopterous species. *Journal of Chemistry Ecology*, 14(5): 1279–1288.
- Wang L, 2015. Preliminary studies on the host biotypes and formation mechanism of cotton aphid in cotton areas of north China. Master dissertation. Anyang: Chinese Academy of Agricultural Sciences. [王丽, 2015. 华北棉区棉蚜寄主专化型及其形成机制初步研究. 硕士学位论文. 安阳: 中国农业科学院.]
- Wang L, Zhang S, Luo JY, Wang CY, Lü LM, Zhu XZ, Li CH, Cui JJ, 2016. Identification of *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae) biotypes from different host plants in north China. *PLoS ONE*, 11(1): 34–39.
- Wang SY, Zhou XH, Zhang AS, Li LL, Men XY, Liu YJ, Li XK, Yu Y, 2013. Mechanisms and cross-resistance of imidacloprid resistance in *Frankliniella occidentalis*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 50(1): 167–172. [王圣印, 周仙红, 张安盛, 李丽莉, 门兴元, 刘永杰, 李许可, 于毅, 2013. 西花蓟马对吡虫啉的抗性机制及交互抗性研究. 应用昆虫学报, 50(1): 167–172.]
- Wu YQ, Guo YY, Yang J, 2000. Analysis of flavonoid substance in cotton plants for resistance to pests by HPLC. *Plant Protection*, 26(5): 1–3. [武予清, 郭予元, 杨舰, 2000. 棉株中抗虫物质黄酮类化合物的高效液相色谱分析. 植物保护, 26(5): 1–3.]
- Yang J, Sun XQ, Yan SY, Pan WJ, Zhang MX, Ca QN, 2017. Interaction of ferulic acid with glutathione-S-transferase and carboxylesterase genes in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Journal of Chemical Ecology*, 43(7): 1–10.
- You YC, Xie M, You MS, 2013. The diversity and role of glutathione-S-transferase in insecticide resistance in insects. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 50(3): 831–840. [尤燕春, 谢苗, 尤民生, 2013. 昆虫谷胱甘肽-S-转移酶的多样性及其介导的抗药性. 应用昆虫学报, 50(3): 831–840.]
- Yu SJ, 1982. Host plant induction of glutathione-S-transferase in the fall armyworm. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 18(1): 101–106.
- Yu SJ, 1984. Interactions of allelochemicals with detoxication enzymes of insecticide-susceptible and resistant fall armyworms [*Spodoptera frugiperda*, host plants]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 22(1): 60–68.
- Yu SJ, 1999. Induction of new glutathione-S-transferase isozymes by allelochemicals in the fall armyworm. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 63(3): 163–171.
- Yuan LB, Gao ZL, Dang ZH, Li YF, Chi GT, Pan WL, 2008. Fitness differentiation in *Aphids gossypii* populations to cotton and cucumber. *Chinese Bulletin of Entomology*, 45(6): 896–899. [袁立兵, 高占林, 党志红, 李耀发, 赤国彤, 潘文亮, 2008. 不同棉蚜种群对棉花和黄瓜的适合度分化. 昆虫知识, 45(6): 896–899.]
- Zhai YT, 2015. Defense function analysis of three host secondary substances for different biotypes of *Sitobion avenae*. Master dissertation. Xianyang: Northwest A&F University. [翟颖婷, 2015. 三种寄主次生物质对不同生物型麦长管蚜的防御功能分析. 硕士学位论文. 咸阳: 西北农林科技大学.]
- Zhang S, Luo JY, Wang L, Wang CY, Lv LM, Zhang LJ, Zhu XZ, Cui JJ, 2018. The biotypes and host shifts of cotton-melon aphid *Aphis gossypii* in northern China. *Journal of Integrative Agriculture*, 17(9): 2066–2073.
- Zhang YC, 2016. The regulation mechanisms of population density of *Buchnera aphidicola* in *Aphis gossypii* Glover. Doctoral dissertation. Nanjing: Nanjing Agricultural University. [张元臣, 2016. 棉蚜体内原生共生菌 *Buchnera aphidicola* 种群密度的调控机制. 博士学位论文. 南京: 南京农业大学.]
- Zhu JY, 2017. Host switching affects the fitness and metabolism of *Myzus persicae*. Master dissertation. Xianyang: Northwest A&F University. [朱经云, 2017. 寄主转换对桃蚜适合度及生理代谢的影响. 硕士学位论文. 咸阳: 西北农林科技大学.]