

美国白蛾 *HcGST-E1* 的克隆及基于 RNAi 的功能探究*

高琳娜** 陈麒羽** 孟 香 陈 敏***

(北京林业大学林木有害生物防治北京市重点实验室, 北京 100083)

摘 要 【目的】谷胱甘肽-S-转移酶 (GSTs) 是昆虫体内一种重要的解毒酶。基于美国白蛾 *Hyphantria cunea* 中肠转录组数据筛选鉴定了 *HcGST-E1* 为显著相应槲皮素诱导的差异表达基因。为进一步探究该基因的功能, 我们克隆获得 *HcGST-E1* 全长序列, 并通过 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术验证了 *HcGST-E1* 在美国白蛾幼虫响应槲皮素过程中的作用, 为明确美国白蛾对寄主植物中的次生物质槲皮素的解毒适应机制提供科学依据。【方法】基于 *HcGST-E1* 的核酸序列设计引物, 克隆 *HcGST-E1* 的全长序列并合成 ds*HcGST-E1*, 通过显微注射法用 ds*HcGST-E1* 注射美国白蛾 4 龄幼虫沉默 *HcGST-E1* 基因, 进而分析了该基因的沉默效率以及沉默后的美国白蛾 4 龄幼虫取食槲皮素对体重、存活率等生理指标的影响。【结果】ds*HcGST-E1* 可有效抑制 *HcGST-E1* 基因表达, 相同处理时间内, 注射 1 000 ng 的 ds*HcGST-E1* 比注射 500 ng 的 ds*HcGST-E1* 沉默效率高, 沉默效率最高为 62.3%。用 0.5% 和 1.0% 槲皮素人工饲料分别饲养 *HcGST-E1* 沉默的美国白蛾幼虫, 10 d 后其存活率分别为 40.00% 和 33.33%, 显著低于对照组的 73.33% 和 66.67% ($P < 0.05$) 和空白组的 86.67% 和 80.00% ($P < 0.05$)。注射 ds*HcGST-E1* 后的美国幼虫体重在处理时间内无明显波动, 体重增长量均低于注射无菌水的对照组和未经注射的空白组。其中, 0.5% 槲皮素饲养的实验组美国白蛾幼虫的体重与对照组幼虫体重差异不显著, 与空白组在第 6 天差异显著 ($P < 0.01$); 1.0% 槲皮素饲养的实验组幼虫的体重低于对照组幼虫的体重但差异不显著, 与空白组在第 4 天和第 6 天差异显著 ($P < 0.05$)。【结论】*HcGST-E1* 沉默后, 美国白蛾幼虫对槲皮素的适应能力下降, 生长发育受到影响, 表明 *HcGST-E1* 参与了美国白蛾对槲皮素解毒代谢过程。研究结果为阐明美国白蛾对含槲皮素的寄主植物的适应机制奠定基础。

关键词 美国白蛾; 谷胱甘肽-S-转移酶; *HcGST-E1* 基因; RNA 干扰; 槲皮素

Cloning and functional analysis of the *Hyphantria cunea* glutathione-S-transferase gene, *HcGST-E1*

GAO Lin-Na** CHEN Qi-Yu** MENG Xiang CHEN Min***

(Beijing Key Laboratory of Forest Prepest Control, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract 【Objectives】To clone the *Hyphantria cunea* glutathione S-transferases (GST) gene (*HcGST-E1*) and verify the role of this gene in the response of *H. cunea* to quercetin, a common secondary substance in host plants. 【Methods】*HcGST-E1* was cloned based on the quercetin-induced midgut transcriptome of *H. cunea* and real-time, quantitative PCR results. The gene was then silenced using RNAi technology and the effect of this on the weight and survival of quercetin-treated 4th instar larvae investigated. 【Results】The *HcGST-E1* was successfully cloned and silenced. ds*HcGST-E1* effectively inhibited the expression of *HcGST-E1* with a maximum silencing efficiency of 62.3%. Over the same period of time, 1 000 ng of ds*HcGST-E1* was more effective than 500 ng ds*HcGST-E1*. The survival rates of *HcGST-E1* silenced larvae that had been fed an artificial diet containing either 0.5% or 1.0% quercetin were 40.00% and 33.33%, respectively, significantly

*资助项目 Supported projects: 国家重点研发计划 (2021YFD1400300)

**共同第一作者 Co-first authors, E-mail: gaolinna416@163.com; qyuchan@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: minch@bjfu.edu.cn

收稿日期 Received: 2022-11-29; 接受日期 Accepted: 2022-12-29

lower than their respective control groups (73.33% and 66.67%; $P < 0.05$) or blank control groups (86.67% and 80.00%; $P < 0.05$). The body weight of *HcGST-E1* silenced *H. cunea* larvae did not fluctuate significantly, and their weight was lower than that of larvae in both respective, and blank, control groups. Larvae in the 5% quercetin treatment group were not significantly lighter than those in the respective control group, but were significantly lighter than those in the blank control groups on day 6 ($P < 0.01$). Similarly, larvae in the 1.0% quercetin treatment group were not significantly lighter than those in the respective control group, but were significantly lighter than those in the blank control groups on days 4 and 6 ($P < 0.05$). **[Conclusion]** Silencing the *HcGST-E1* gene increased the susceptibility of *H. cunea* larvae to quercetin, retarding their growth and development. This indicates that *HcGST-E1* plays a role in the detoxification and metabolism of quercetin. These results provide a basis for further research on the role of GST genes in the resistance of *H. cunea* to plant secondary compounds.

Key words *Hyphantria cunea*; glutathione-S-transferase; *HcGST-E1*; RNAi; quercetin

植物次生物质是植物与昆虫长期协同进化的媒介之一 (Howe and Herde, 2015), 能对取食该植物的昆虫产生直接或间接的影响, 因此成为研究昆虫对寄主选择适应的关键因素 (Heil, 2008)。其中, 槲皮素是一种分布广泛、具有多种生物活性的黄酮醇类植物次生物质, 多存在于被子植物中 (Zhang *et al.*, 2012)。研究表明, 槲皮素能抑制短星翅蝗 *Calliptamus abbreviatus*、家蚕 *Bombyx mori*、烟草夜蛾 *Heliothis assulta*、玉米螟 *Pyrausta nubilalis* 和棉铃虫 *Pectinophora gossypiella* (李国印等, 2013; 黄训兵等, 2021) 的生长, 降低斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 幼虫的体重和甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 的蛹重 (Su *et al.*, 2017; 范能能等, 2022), 降低瓜实蝇 *Bactrocera cucurbitae* 和棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 的孵化率、化蛹率和羽化率 (Sharma and Sohal, 2013), 导致南方灰翅夜蛾 *Chrysodeixis eriosoma* 直接死亡 (许力山, 2021)。另外, 槲皮素还能调控中华蜜蜂 *Apis cerana* 对农药的耐受性 (Liu *et al.*, 2021), 抑制昆虫的多酚氧化酶从而影响变态发育和免疫功能 (张永亮和朱勇, 2011)。

昆虫的解毒酶系统, 如谷胱甘肽-S-转移酶 (GSTs), 细胞色素 P450 单加氧酶 (P450s), 糖基转移酶 (GTs) 和 ABC 转运蛋白等, 在抵御植物次生物质的不利影响中起着关键作用 (Li *et al.*, 2007; Koenig *et al.*, 2015)。昆虫体内的 GSTs 具有解毒和抗氧化功能 (Nahar *et al.*, 2015), 在植物次生物质的诱导下其体内的 GST 酶活性和相关基因表达发生变化, 从而增强对这

些物质的解毒代谢或转化利用功能, 提高对次生物质和寄主植物的抗性和适应性 (Huang *et al.*, 2011; 金燕璐等, 2018; 王传鹏等, 2020)。褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 的 GSTs 是水稻芦竹碱的重要解毒酶 (Sun *et al.*, 2013)。黄训兵等 (2021) 使用不同浓度槲皮素饲喂短星翅蝗发现 GSTs 活性与槲皮素浓度显著线性正相关。双斑萤叶甲 *Monolepta hieroglyphica* 取食 6 种不同寄主植物后 GSTs 活性发生显著变化 (徐伟等, 2018)。黄敏燕和李雪峰 (2018) 用不同浓度芦丁、单宁和没食子酸喂食斜纹夜蛾发现其 GSTs 活性上升, *SlGSTe1* 表达上调。黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的 *GstD1*、*GstD2* 分别参与了芥子油与咖啡因、苯巴比妥的代谢 (Willoughby *et al.*, 2006; Gloss *et al.*, 2014)。这些昆虫的 GSTs 虽然被证实会随植物次生物质刺激上调, 但植物次生物质在昆虫肠道中诱导 GSTs 表达、摄食适应和宿主范围之间的关系尚未完全阐明 (Zou *et al.*, 2016)。

美国白蛾 *Hyphantria cunea* 是一种多食性昆虫, 危害寄主种类达 600 多种 (Sullivan and Ozman-Sullivan, 2012)。研究发现槲皮素具有抑制美国白蛾幼虫取食的作用, 0.5% 浓度的槲皮素会延长美国白蛾幼虫的生长发育; 同时槲皮素对美国白蛾体内 GSTs 活性具有一定的剂量效应和时间效应 (潘忠玉, 2020)。为进一步明确美国白蛾 GSTs 对槲皮素的响应的分子机制, 构建了 0.5% 浓度槲皮素诱导的美国白蛾中肠转录组, 鉴定了美国白蛾响应槲皮素诱导的 6 个 GST 基因; 并通过荧光定量 PCR 技术研究发现槲皮素能显

著诱导美国白蛾中肠 6 个 GST 基因的表达水平。其中,0.5%-4.0%浓度的槲皮素均能诱导 *HcGST-E1* 表达水平显著上调,且在诱导后 36 h 内显著上调表达,推测 *HcGST-E1* 是参与美国白蛾解毒代谢槲皮素的关键基因(孟香, 2022)。因此,本文在前期研究基础上,对 *HcGST-E1* 基因进行克隆并合成 *dsHcGST-E1*, 利用 RNAi 介导技术进一步探讨美国白蛾 *HcGST-E1* 对槲皮素的响应机制,为阐明美国白蛾对含槲皮素的寄主植物的适应机制提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

美国白蛾虫源为本实验室所建立的实验室人工饲料种群。供试美国白蛾幼虫采用人工饲料饲养,成虫采用 20% (v/v) 的蜂蜜水饲养,饲养条件为:温度(25±1)℃,相对湿度 55%-70%,光周期 16 L : 8 D。

1.2 人工饲料配制

人工饲料配制方法参考曹利军等(2014),本研究需要配制 0.5%和 1%的槲皮素人工饲料。槲皮素人工饲料配制方法如下:称取 0.167 7 g 槲皮素(纯度 ≥ 98%;源叶生物科技有限公司,上海)于 5 mL 20%的二甲基亚砜(DMSO;百瑞极生物科技有限公司,北京)溶液中溶解,后将其添加到 15 g 正常人工饲料中混合均匀,待其冷却凝固后即配制成 0.5%槲皮素人工饲料。按比例增加槲皮素的含量,相同方法配制含 1%槲皮素的人工饲料,以添加 5 mL 20% DMSO 溶液的人工饲料作为对照(CK)。

1.3 基因克隆与序列分析

选取 10 头健康的、刚蜕皮 1 d 的 4 龄美国白蛾幼虫置于冰上解剖中肠提取 RNA。按照 EASYspin Plus 组织/细胞 RNA 快速提取试剂盒(艾德莱生物科技有限公司,北京)的说明书,进行中肠 RNA 的提取。通过 1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性,使用超微量紫外分光光

度计 NanoDrop8000(赛默飞世尔科技公司,美国)检测 RNA 的浓度和纯度。将完整性、纯度和浓度均合格的 RNA 利用 PrimeScript™ RT reagent Kit(Perfect Real Time)反转录试剂盒(宝日医生物技术有限公司,北京)合成 cDNA 第一链,保存于 -20℃ 备用。

使用 Primer Premier 5.0 软件设计 *HcGST-E1* 的全长引物(表 1),在全长引物的 5'端加上 T7 启动子序列用于合成 *dsHcGST-E1* 模板,引物均由生工生物工程股份有限公司(上海)合成。以上述 cDNA 为模板,使用 *HcGST-E1* 的全长引物进行 PCR 扩增。50 μL PCR 反应体系:5× PrimeSTAR Buffer 10 μL, dNTP Mixture 4 μL, 正反向全长引物各 1 μL, cDNA 2 μL, PrimeSTAR HS DNA Polymerase 0.5 μL, ddH₂O 31.5 μL。PCR 运行程序设置为:98℃ 10 s, 55℃ 5 s, 72℃ 36 s, 30 个循环。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳验证后,使用 TIANGel Midi Purification Kit(天根生化科技有限公司,北京)进行回收纯化,将纯化产物与 *pEASY*®-Blunt1(全式金生物技术有限公司,北京)克隆载体连接,然后转化到 *TransI*-T1 Phage Resistant(全式金生物技术有限公司,北京)化学感受细胞,经蓝白斑筛选后,将阳性单克隆菌液送至擎科生物科技有限公司(北京)进行测序。

利用 NCBI 对获得的基因序列、开放阅读框、氨基酸序列进行比对分析,利用在线网站 ExPASy(<http://web.expasy.org/protparam/>)预测该基因所编码蛋白的等电点和分子量。利用 NCBI Conserved Domains 对编码蛋白氨基酸序列的保守区域进行预测分析。

1.4 RNAi 干扰

1.4.1 *dsHcGST-E1* 的合成与注射 将测序正确的单克隆菌液扩大培养,使用 TIANGen Rapid Mini Plasmid Kit(天根生化科技有限公司,北京)抽提菌液质粒。以获得的质粒为模板,使用添加 T7 启动子序列的全长引物进行 PCR 扩增,反应体系和程序设置同 1.3, PCR 产物进行回收纯化后即合成 *dsHcGST-E1* 的模板。按照 T7 RNAi

Transcription Kit (诺唯赞生物科技股份有限公司, 南京) 的说明书合成 *dsHcGST-E1*, 将初步得到 *dsHcGST-E1* 采用磁珠方法进行纯化, 纯化后的 *dsHcGST-E1* 经电泳验证和浓度测定, 稀释至 (5×10^{-4} ng/L) 500 ng/ μ L 和 (10^{-3} ng/L) 1 000 ng/ μ L 保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱用于后续注射实验。

根据预实验结果, 选择 500 ng 和 1 000 ng 作为 *dsHcGST-E1* 的注射剂量。挑选健康的、刚蜕皮 1 d 的美国白蛾 4 龄幼虫, 使用微量注射器分别吸取 500 ng 和 1 000 ng *dsHcGST-E1* 注射到幼虫腹部倒数第二腹节间膜位置, 以注射等体积 RNase-free H_2O 作为对照组。每种剂量注射 30 头幼虫为一个重复, 设置 3 个重复。

1.4.2 基因沉默效率检测 分别在注射 24、48、72 和 96 h 后用液氮速冻收集试虫。通过荧光定量 PCR 检测 *HcGST-E1* 在实验组和对照组幼虫中的表达量, 计算得到 *dsHcGST-E1* 的沉默效率。荧光定量 PCR 方法根据 TB Green®Premix Ex Taq™II 试剂盒 (宝日医生物技术有限公司, 北京) 配制 RT-qPCR 反应体系 (25 μ L): TB Green

Premix Ex Taq II 12.5 μ L, 正反引物 ($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 各 1 μ L, cDNA 模板 2 μ L, 灭菌水 8.5 μ L。热循环条件设定为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, 循环 40 次; 最后将产物升温至 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 制作溶解曲线, 检测是否有引物二聚体。空白对照以无菌水代替 cDNA 模板, 用于检测体系是否出现污染。荧光定量 PCR 反应在 CFX96 (Bio-Rad, 美国) PCR 仪中运行。每个处理设置 3 个生物学重复, 每个生物学重复设置 3 个技术重复。*HcGST-E1* 基因的荧光定量引物以及内参 *GAPDH*、*EF1 α* 基因引物序列见表 1。

1.4.3 *HcGST-E1* 功能的生物学验证 挑选一批健康的、刚蜕皮 1 d 的美国白蛾 4 龄幼虫, 每头幼虫注射 1 000 ng *dsHcGST-E1* 作为实验组, 以注射等体积 RNase-free H_2O 的幼虫作为对照组, 不注射任何试剂的幼虫作为空白组, 30 头为一个重复, 设置 3 个生物学重复, 分别转入含有 0.5% 和 1.0% 槲皮素人工饲料中饲养, 统计试虫 7 d 内的体重变化情况和 10 d 内的存活数量。

表 1 引物序列信息

Table 1 Information of primer sequences

基因 Gene	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	扩增效率 (%) Amplification efficiency (%)	用途 Purpose
<i>HcGST-E1</i>	F-CGAGAGCAAGACACACCTGA R-ATAGAGACGCGTGCTTTGGT	93.2	荧光定量 PCR qRT-PCR analysis
<i>GAPDH</i>	F-GACTGGCATGGCTTTTCAGAG R-CATCGTAGCTAGCGGGTTTG	96.5	荧光定量 PCR qRT-PCR analysis
<i>EF1α</i>	F-TTATCGTCGCTGCTGGTACT R-GAGTGTGAAAGCGAGCAGAG	103.5	荧光定量 PCR qRT-PCR analysis
<i>HcGST-E1</i>	F-ATGTCCACGATTCTTTACAAAACA R-TCATAACTGGACTGTTGATTATATTC		基因克隆 gene cloning
<i>dsHcGST-E1</i>	F- <u>taatacgactcactataggg</u> ATGTCCACGATTCTTTACAAAACA R- <u>taatacgactcactataggg</u> TCATAACTGGACTGTTGATTATATTC		dsRNA 合成 dsRNA synthesis

下划线部分为 T7 启动子序列。

The underlined part is the T7 promoter sequence.

1.5 数据处理

采用 Excel 2019 对实验数据进行处理。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法 (Livak and Schmittgen, 2001) 计算基因的相对表达量。数据均以平均值 $\pm$ 标准误差

示, 采用 SPSS 25.0 软件进行各组平均值和标准误差计算, 采用独立样本 t 检验和 One-way ANOVA 进行差异显著性分析, Duncan's 新复极差法在 $P<0.05$ 水平上进行多重比较。采用 GraphPad Prism 8.0 和 Origin 2019 作图。

2 结果与分析

2.1 *HcGST-E1* 基因克隆与序列分析

以美国白蛾 4 龄幼虫中肠 cDNA 为模板, 克隆获得了 *HcGST-E1* 基因的全长序列, 经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 发现在 700 bp 左右有一条亮带 (图 1), 大小与基因实际大小相符。

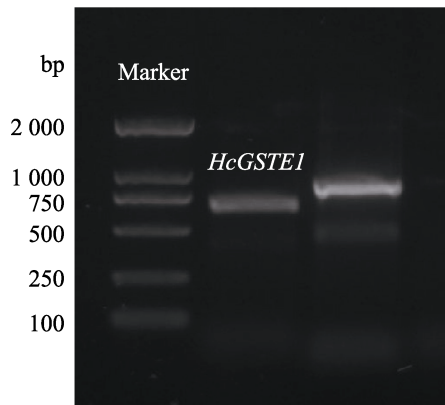


图 1 美国白蛾 *HcGST-E1* PCR 扩增产物的电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis image of PCR amplification product of *HcGST-E1* in *Hyphantria cunea*

克隆获得的美国白蛾 *HcGST-E1* 基因的开放阅读框为 738 bp, 编码 245 个氨基酸 (图 2), 其预测的蛋白分子量为 60.592 kD, 理论等电点为 5.16。NCBI Conserved Domains 进行蛋白保守区域预测分析, 该蛋白含有 C 端保守结构域 “GST-C-Delta-Epsilon_” (位于 325-666 氨基酸残基), 属于类硫氧还原蛋白超家族 (Thioredoxin-like Superfamily) 及谷胱甘肽-S-转移酶超家族 (GST_C_family superfamily)。

2.2 *HcGST-E1* 基因的沉默效率分析

通过荧光定量 PCR 检测美国白蛾中肠 *HcGST-E1* 的沉默效率, 结果见图 3。注射 500 ng 和 1 000 ng 的 ds*HcGST-E1* 24 h 后, 美国白蛾中肠 *HcGST-E1* 的相对表达量分别比对照组显著降低了 13.7% ($P < 0.01$) 和 35.8% ($P < 0.0001$) (图 3: A); 注射 48 h 后, *HcGST-E1* 的相对表达量分别比对照组显著降低了 21.6% ($P < 0.01$) 和 34.8% ($P < 0.001$) (图 3: B); 注射 72 h 后,

HcGST-E1 的相对表达量分别比对照组显著降低了 44.6% ($P < 0.0001$) 和 57.4% ($P < 0.0001$) (图 3: C); 注射 96 h 后, *HcGST-E1* 的相对表达量分别比对照组显著降低了 55.4% ($P < 0.0001$) 和 62.3% ($P < 0.0001$) (图 3: D)。结果表明, 通过美国白蛾体内注射目的基因 ds*HcGST-E1* 能够有效沉默 *HcGST-E1* 基因的表达, 相同时间内注射 1 000 ng ds*HcGST-E1* 的抑制效果高于注射 500 ng 的抑制效果。

2.3 槲皮素对 *HcGST-E1* 沉默的美国白蛾幼虫存活率和体重的影响

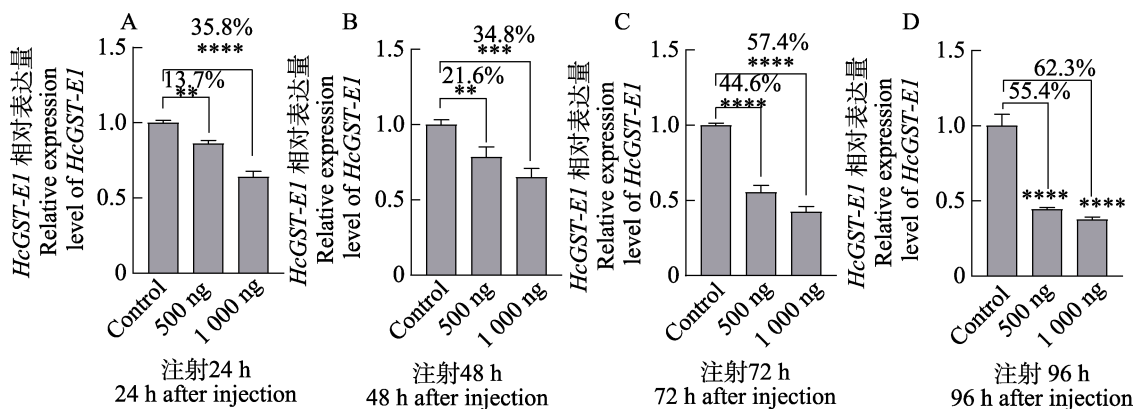
0.5% 和 1.0% 槲皮素能显著降低 *HcGST-E1* 沉默的美国白蛾幼虫的存活率 (图 4)。使用 0.5% 槲皮素人工饲料持续饲养 10 d 后, *HcGST-E1* 沉默的实验组美国白蛾幼虫存活率仅为 40.00%, 显著低于注射 RNase-free H_2O 的对照组幼虫的 73.33% 和未注射的空白组幼虫的 86.67% ($P < 0.05$); 取食 1.0% 槲皮素人工饲料后, *HcGST-E1* 沉默的实验组美国白蛾幼虫存活率仅为 33.33%, 显著低于注射 RNase-free H_2O 的对照组幼虫的 66.67% 和未注射的空白组幼虫的 80% ($P < 0.05$)。同时, 空白组和对照组的美国白蛾幼虫存活率均低于 100%。本实验中, 对照组的幼虫存活率低于空白组幼虫, 说明注射本身会对幼虫存活率产生一定影响。

分别使用 0.5% 和 1.0% 槲皮素人工饲料饲喂注射后的美国白蛾幼虫, 7 d 内体重变化趋势见图 5。取食 0.5% 槲皮素人工饲料后 (图 5: A), 前 6 d 中对照组和实验组的体重没有显著差异, 空白组的幼虫体重在第 6 天显著高于其余两组 ($P < 0.01$); 从体重变化趋势来看对照组和空白组的体重在第 4 天以后开始增加, 实验组的体重一直在平缓的减少, 在第 6 天空白组的幼虫体重增长量显著高于其余两组 ($P < 0.001$)。取食 1.0% 槲皮素人工饲料后 (图 5: B), 在 6 d 中实验组的体重一直低于对照组, 在第 4 天和第 6 天实验组的幼虫体重显著低于空白组的幼虫体重 ($P < 0.05$); 从体重变化趋势来看, 幼虫体重变化趋势与取食 0.5% 槲皮素饲料的幼虫相似, 实验组的幼虫体

		10	20	30	40	50	60	70	80
<i>HcGST-E1</i>	1	ATGCATGCTCGAGCGGCCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTGCCCTTATGTCCACGATTCTTTACAAAACAATCGC							
		M H A R A A A S V M D I C R I A L M S T I L Y K T I A							
		90	100	110	120	130	140	150	160
<i>HcGST-E1</i>	81	AAGTCCACCCGCCAGAGCGGTAATGATGTTAATCGATATTCTCGACTTGAGCATCGATCAAAGAGAATTAAACCCGGTTT							
		S P P A R A V M M L I D L D L S I P L L D E G D Y							
		170	180	190	200	210	220	230	240
<i>HcGST-E1</i>	161	TACGAGAGCAAGACACACCTGAACTGAAAAAGAAAAATCCGATGAGGACTATTCTTTGCTGGATGAAGGTGATTACTGG							
		L R E Q D T P E L K K K N P M R T I P L L D E G D Y							
		250	260	270	280	290	300	310	320
<i>HcGST-E1</i>	241	TTGGCAGATAGCCACGCGATATTGATATATCTGCTAGAAAAATATGGCAAACCAAGCAGCGTCTCTATATCCGAAAGA							
		L A D S H A I L I Y L L E K Y G K P K H A S L Y P K D							
		330	340	350	360	370	380	390	400
<i>HcGST-E1</i>	321	CATTAGAAAACGCGCTACAATTTCATCAGAGGCTATTTTCGACTGTGGAATTTATTTCCAGACTGAGATCTATTATGG							
		I R K R A T I H Q R L F F D C G I L F S R L R S I M							
		410	420	430	440	450	460	470	480
<i>HcGST-E1</i>	401	CACCAACATACGGCGCAAGCTTGCAGAAATGTGCGAAAAGCATGATTACAAACGTAGTTGACGCTTATTCAAAACCTTGAA							
		A P T Y G G K L A E M S K S M I T N V D A Y S K L E							
		490	500	510	520	530	540	550	560
<i>HcGST-E1</i>	481	GATTATTATCCGAGAATAAATACATGGCGGATGCTGTAGTTACCATTCAGATTTAAGTATAATATCGACTTTGGGTTTC							
		D Y L S E N K Y M A D A V V T I A D L S I I S T L G S							
		570	580	590	600	610	620	630	640
<i>HcGST-E1</i>	561	CCTGGAAGGATTGATACCATTCATGGAAGGTTTCAGATAGCCCAATGGTATAATAACATGAACAAAATCGATT							
		L E G L I P I D G K R F P R L A Q W Y N N M N K I D							
		650	660	670	680	690	700	710	720
<i>HcGST-E1</i>	641	ATTGTAAGAGGATCAACATTCGGGAAGCAAGCTCCACGCTGATGGTCTGAAGGCATGTATGAATAACACGAAATATAAT							
		Y C K R I N I P G S K L H A D G L K A C M N N T K Y N							
		730							
<i>HcGST-E1</i>	721	CAACAGTCCAAGTTATGA							
		Q Q S K L *							

图2 美国白蛾 *HcGST-E1* 核苷酸和氨基酸序列Fig. 2 The nucleotide and amino acid sequence of *HcGST-E1* of *Hyphantria cunea*

代表终止密码子。 represents the stop codon.

图3 注射 *dsHcGST-E1* 后 *HcGST-E1* 的相对表达量Fig. 3 The relative expression level of *HcGST-E1* after *dsHcGST-E1* injection

A. 注射 *dsHcGST-E1* 24 h; B. 注射 *dsHcGST-E1* 48 h; C. 注射 *dsHcGST-E1* 72 h; D. 注射 *dsHcGST-E1* 96 h。
 A. Injection *dsHcGST-E1* 24 h; B. Injection *dsHcGST-E1* 48 h; C. Injection *dsHcGST-E1* 72 h; D. Injection *dsHcGST-E1* 96 h.

*代表相同时间注射不同浓度 *dsHcGST-E1*, *HcGST-E1* 基因相对表达量差异显著,* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。* represents the same time of injection of different concentrations of *dsHcGST-E1*, the relative expression of *HcGST-E1* gene is significantly different, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

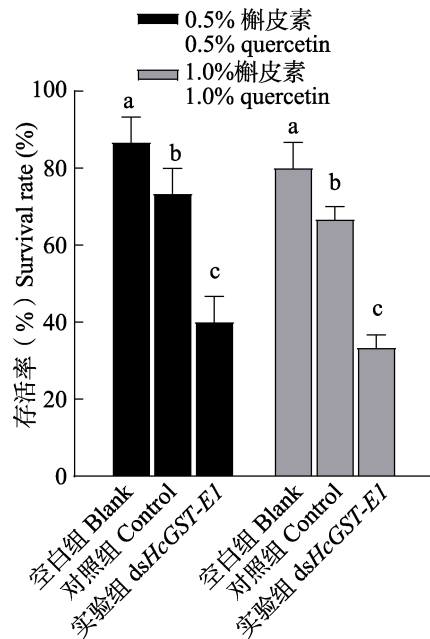


图 4 槲皮素对 *HcGST-E1* 沉默的美国白蛾幼虫存活率的影响

Fig. 4 Effect of quercetin on the survival rate of *Hyphantria cunea* larvae after *HcGST-E1* silencing

空白组: 不注射任何试剂的空白对照;

对照组: 注射等量 RNase-free H₂O;

实验组: 注射 ds*HcGST-E1*。图 5 同。

柱上标有不同小写字母表示不同处理的存活率差异显著 ($P < 0.05$, Tukey 检验法)。

Blank: Control without injection of any reagent; Control: Injection of equal amount of RNase-free H₂O; ds*HcGST-E1*: Injection of ds*HcGST-E1*. The same as Fig. 5. Histograms with different letters indicate significant differences in the survival rates of different treatments at the 0.05 level by Tukey test.

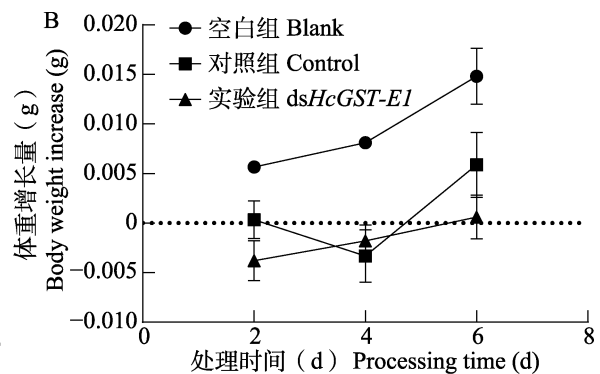
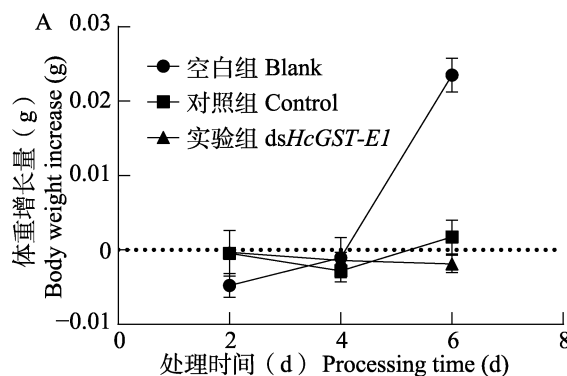


图 5 0.5% (A) 和 1.0% (B) 槲皮素对 *HcGST-E1* 沉默的美国白蛾幼虫体重增长量的影响

Fig. 5 Effect of 0.5% (A) and 1.0% (B) quercetin on the weight gain of *Hyphantria cunea* larvae after *HcGST-E1* silencing

重一直在下降, 对照组和空白组的体重都在 4 d 后明显增加, 在 6 d 中实验组和空白组的幼虫体重增长量都有显著差异 ($P < 0.05$)。上述结果表明, *HcGST-E1* 基因在美国白蛾解毒适应槲皮素中发挥着关键作用, 相同浓度槲皮素诱导下, *HcGST-E1* 基因沉默的美国白蛾幼虫的生长状况比正常美国白蛾幼虫的生长状况差; 槲皮素对美国白蛾的生长发育有一定的影响, 槲皮素浓度越高, 作用时间越长, 对注射 ds*HcGST-E1* 美国白蛾幼虫的负面影响越大。

3 结论与讨论

植物次生物质能影响昆虫取食、生长和繁殖等过程, 甚至会直接导致昆虫死亡。这些次生物质能够诱导昆虫体内解毒酶活性发生变化(陈澄宇等, 2015)。GSTs 作为昆虫的三大解毒酶系之一, 在抵御植物次生物质胁迫的过程中发挥着重要的作用。Galit 等 (2018) 采用植物介导 RNAi 的方法沉默了烟粉虱 *Bemisia tabaci* 中肠 *BtGSTs5* 的表达, *BtGSTs5* 沉默的烟粉虱在取食十字花科植物后, 其存活率显著下降。舞毒蛾 *Lymantria dispar* 3 龄幼虫的 4 个 GSTs 基因 (*LdGSTe1*、*LdGSTs1*、*LdGSTs2* 和 *LdGSTz1*) 的表达被干扰后, 取食含有槲皮素和黄酮的人工饲料, 幼虫的体重和存活率显著低于对照组(齐琪等, 2021)。褐飞虱若虫 8 个 GSTs 基因被分别干扰以后再取食芦竹碱和阿魏酸, 其死亡率明

显增加(杨军, 2017)。本研究结果与上述研究结果一致, 美国白蛾中肠 *HcGST-E1* 被沉默后, 再取食含有槲皮素的人工饲料, 美国白蛾幼虫的体重和存活率显著降低, 证明 *HcGST-E1* 在美国白蛾幼虫解毒代谢槲皮素过程中发挥重要作用, *HcGST-E1* 的沉默导致美国白蛾幼虫对槲皮素的适应能力下降, 取食和消化过程受到抑制从而体重增长减缓, 影响幼虫的正常生长发育, 导致存活率降低。另外, 在体重测量的第 3 天, 观察到两个实验组和对照组的幼虫均处于准备蜕皮时期, 相应的在这几天幼虫的体重处于无明显波动或少量减少的趋势, 推测在即将蜕皮时幼虫减少摄食量和体内发生一系列生理变化, 导致幼虫体重减少, 有利于幼虫从旧皮中蜕出。同时, 课题组前期分别使用 0.25%-4.0% 浓度槲皮素人工饲料喂养美国白蛾 5 龄幼虫, 一周后幼虫存活率分别为 72.5%、70%、67.5%、62.5% 和 30%(潘忠玉, 2020), 而在本实验中未进行注射的美国白蛾幼虫取食 0.5% 和 1.0% 槲皮素后的存活率为 86.67% 和 80.00%, 以及取食 1.0% 浓度槲皮素时幼虫体重增长量低于取食 0.5% 浓度槲皮素时的幼虫体重增长量, 两个实验探究均表现出类似的结果, 说明幼虫在取食过程中可能是槲皮素的毒性积累导致了美国白蛾幼虫死亡, 且取食浓度越高美国白蛾的生长状况越差。该结论也再次证明了槲皮素会对美国白蛾的生长发育造成不利影响。

RNA 干扰是通过将双链 RNA (dsRNA) 导入昆虫体内来降低靶基因表达的方法, 已被广泛应用于昆虫基因功能的研究(Rupasinghe *et al.*, 2007)。Yang 等(2017)研究发现, 褐飞虱 GSTs 基因的沉默效率随着双链 RNA 剂量的增加呈现先增加后降低的趋势, 在注射剂量为 0.04 g/L 时沉默效率最高。周雨晴等(2019)的研究表明, 茶尺蠖 *Ectropis oblique* 的 *EoGST534* 和 *EoGST968* 随着 dsRNA 浓度的升高, 干扰效果越来越明显。许力山(2021)研究发现, 舞毒蛾 *LdGSTs1*、*LdGSTs2*、*LdGSTz1* 在处理 48 h 时沉默效果最佳, *LdGSTe2* 在处理 72 h 时沉默效率最高。在本研究中, 相同剂量的 ds*HcGST-E1* 在供试时间内,

作用时间越长, 基因沉默效率越高。然而, Ma 等(2021)的研究表明, 舞毒蛾注射 1 000 ng dsRNA 后, GSTs 基因的沉默效率随着注射时间的延长逐渐降低。Lu 等(2016)发现在桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis* 注射 ds*BdGSTe8* 后 12 h 的基因沉默效率最高, 48 h 的沉默效率最低。马雯(2019)研究发现飞蝗 *Locusta migratoria* 的 ds*LmGSTe1* 在 24 h 和 48 h 沉默效率相似, ds*LmGSTe4* 在 24 h 的沉默效率低于 48 h, ds*LmGSTs2* 的沉默效率则是 24 h 明显高于 48 h。这些结果表明不同昆虫不同靶标基因的沉默效率和作用时间存在差异, 可能是因为注射后 dsRNA 需要一定的时间与靶标序列结合, 以达到沉默效果, 同时昆虫体内含有很多 RNA 酶会使 dsRNA 发生降解, 所以在注射 dsRNA 一定时间后, 沉默效率会降低甚至不再有沉默现象发生(Christiaens *et al.*, 2014)。

综上所述, 本研究从美国白蛾中肠中克隆了 1 个响应槲皮素诱导的 *HcGST-E1* 基因, 通过 RNAi 技术, 进一步验证了该基因的功能。*HcGST-E1* 沉默后, 美国白蛾幼虫对槲皮素的适应能力下降, 生长发育受到影响, 表明 *HcGST-E1* 参与了美国白蛾对槲皮素解毒代谢过程。后期可通过 Sf9 细胞系体外表达、转基因等多种技术验证 *HcGST-E1* 基因在响应槲皮素当中的具体分子作用机理, 也可以寻找美国白蛾体内响应槲皮素的转录调控因子, 从分子层面进一步探明美国白蛾对寄主植物次生物质的解毒适应机制。

参考文献 (References)

- Cao LJ, Yang F, Tang SY, Chen M, 2014. Development of an artificial diet for three lepidopteran insects. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 51(5): 1376–1386. [曹利军, 杨帆, 唐思堂, 陈敏, 2014. 适合三种鳞翅目昆虫的一种人工饲料配方. 应用昆虫学报, 51(5): 1376–1386.]
- Chen CY, Kang ZJ, Shi XY, Gao XW, 2015. Metabolic adaptation mechanisms of insects to plant secondary metabolites and their implications for insecticide resistance of insects. *Acta Entomologica Sinica*, 58(10): 1126–1139. [陈澄宇, 康志娇, 史雪岩, 高希武, 2015. 昆虫对植物次生物质的代谢适应机制及其对昆虫抗药性的意义. 昆虫学报, 58(10): 1126–1139.]

- Christiaens O, Swevers L, Smagghe G, 2014. DsRNA degradation in the pea aphid (*Acyrtosiphonpisum*) associated with lack of response in RNAi feeding and injection assay. *Peptides*, 53: 307–314.
- Fang NN, Wang JY, Wan NF, Jiang JX, 2022. Effects of plant secondary metabolites on the growth, development and detoxification enzyme activity, of *Spodoptera exigua*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 59(1): 165–171. [范能能, 王金彦, 万年峰, 蒋杰贤, 2022. 植物次生代谢物对甜菜夜蛾生长发育及解毒酶的影响. *应用昆虫学报*, 59(1): 165–171.]
- Galit E, Rita MK, Pnina M, Natividad MR, Vass DG, Katrin L, Rotem S, Osnat M, Shai M, 2018. Targeting detoxification genes by phloem-mediated RNAi: A new approach for controlling phloem-feeding insect pests. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 100: 10–21.
- Gloss AD, Vassao DG, Hailey AL, Nelson AC, Schramm K, Reichelt M, Rast TJ, Weichsel A, Cravens MG, Gershenson J, Motfort WR, Whiteman NK, 2014. Evolution in an ancient detoxification pathway is coupled with a transition to herbivory in the Drosophilidae. *Molecular Biology and Evolution*, 31(9): 2441–2456.
- Heil M, 2008. Indirect defence via tritrophic interactions. *New Phytologist*, 178(1): 41–61.
- Howe GA, Herde M, 2015. Interaction of plant defense compounds with the insect gut: New insights from genomic and molecular analyses. *Current Opinion in Insect Science*, 9: 62–68.
- Huang MY, Li XF, 2018. Effects of plant secondary metabolite on detoxification enzyme activity of *Spodoptera litura*. *Genomics and Applied Biology*, 37(8): 3495–3502. [黄敏燕, 李雪峰, 2018. 植物次生物质对斜纹夜蛾解毒酶活性的影响. *基因组学与应用生物学*, 37(8): 3495–3502.]
- Huang YF, Xu ZB, Lin XY, Feng QL, Zheng SC, 2011. Structure and expression of glutathione S-transferase genes from the midgut of the common cutworm, *Spodoptera litura* (Noctuidae) and their response to xenobiotic compounds and bacteria. *Insect Physiol.*, 57(7): 1033–1044.
- Huang XB, Wang XC, Li H, 2021. Effects of quercetin on the growth and development and detoxification enzyme activities of *Calliptamus abbreviatus*. *Journal of Northern Agriculture*, 49(2): 71–77. [黄训兵, 王馨超, 李辉, 2021. 槲皮素对短星翅蝗生长发育及解毒酶活性的影响. *北方农业学报*, 49(2): 71–77.]
- 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.]
- Koenig C, Bretschneider A, Heckel DG, Grosse-Wilde E, Hansson BS, Vogel H, 2015. The plastic response of *Manduca sexta* to host and non-host plants. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 63: 72–85.
- Li GY, Yu QY, Zhang Z, 2013. Cloning of carboxylesterase genes in silkworm midgut and induced expression variation by quercetin and organophosphorus insecticide. *Science of Sericulture*, 39(2): 247–256. [李国印, 余泉友, 张泽, 2013. 家蚕中肠羧酸酯酶基因的克隆及用槲皮素和有机磷杀虫剂诱导后的表达变化. *蚕业科学*, 39(2): 247–256.]
- Li X, Schuler MA, Berenbaum MR, 2007. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annual Review of Entomology*, 52(1): 231–253.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*, 25(4): 402–408.
- Liu JL, Li YY, Zhang ZH, Luo WH, Cao L, Liu H, 2021. Low concentration of quercetin reduces the lethal and sublethal effects of imidacloprid on *Apis cerana* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology*, 114(3): 1053–1064.
- Lu XP, Wang LL, Huang Y, Dou W, Chen CT, Wei D, Wang JJ, 2016. The epsilon glutathione S-transferases contribute to the malathion resistance in the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *Comparative Biochemistry and Physiology (Part C)*, 180: 40–48.
- Ma J, Sun L, Zhao H, Wang Z, Zou L, Cao C, 2021. Functional identification and characterization of GST genes in the Asian gypsy moth in response to poplar secondary metabolites. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 176: 104860.
- Ma W, 2019. Degradation effect analysis of four detoxification enzymes of *Locusta migratoria* on pesticides and its application in *Astragali radix*. Master's thesis. Shanxi: Shanxi University. [马雯, 2019. 四种飞蝗解毒酶对农药降解效果分析及在黄芪药材中的应用初探. 硕士学位论文. 山西: 山西大学.]
- Meng X, 2022. Identification and functional study of quercetin-induced detoxification enzyme gene in *Hyphantria cunea* (Drury) (Lepidoptera: Erebididae). Master's thesis. Beijing: Beijing Forestry University. [孟香, 2022. 槲皮素诱导的美国白蛾解毒酶基因鉴定及其功能研究. 硕士学位论文. 北京: 北京林业大学.]
- Nahar K, Hasanuzzaman M, Alam MM, Fujita M, 2015. Roles of exogenous glutathione in antioxidant defense system and methylglyoxal detoxification during salt stress in mung bean. *Biologia Plantarum*, 59(4): 745–756.
- Pan ZY, 2020. Effects of three secondary metabolites on the growth and development and detoxification enzyme activities in

- Hyphantria cunea* (Lepidoptera: Arctiidae). Master's thesis. Beijing: Beijing Forestry University. [潘忠玉, 2020. 3 种次生代谢物对美国白蛾幼虫生长发育及解毒酶活性的影响. 硕士学位论文. 北京: 北京林业大学.]
- Qi Q, Sun LL, Xu LS, Cao CW, 2021. Response of glutathione S-transferase (GST) genes in *Lymantria dispar* to flavone and quercetin stresses based on RNAi analysis. *Journal of Environmental Entomology*, 43(6): 1359–1367. [齐琪, 孙丽丽, 许力山, 曹传旺, 2021. RNAi 分析舞毒蛾谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 基因对黄酮和槲皮素胁迫响应. 环境昆虫学报, 43(6): 1359–1367.]
- Rupasinghe SG, Wen ZM, Chiu TL, Schuler MA, 2007. *Helicoverpa zea* CYP6B8 and CYP321A1: Different molecular solutions to the problem of metabolizing plant toxins and insecticides. *Protein Engineering, Design & Selection*, 20(12): 615–624.
- Sharma R, Sohal SK, 2013. Bioefficacy of quercetin against melon fruit fly. *Bulletin of Insectology*, 66(1): 79–83.
- Sullivan GT, Ozman-Sullivan SK, 2012. Tachinid (Diptera) parasitoids of *Hyphantria cunea* (Lepidoptera: Arctiidae) in its native North America and in Europe and Asia - A literature review. *Entomologica Fennica*, 23(4): 181–192.
- Su Q, Zhou ZX, Zhang JM, Shi CH, Zhang GH, Jin ZY, Wang WK, Li CR, 2017. Effect of plant secondary metabolites on common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Entomological Research*, 48(1): 18–26.
- Sun XQ, Zhang MX, Yu JY, Jin Y, Ling B, Du JP, Li GH, Qin QM, Cai QN, 2013. Glutathione S-transferase of brown planthoppers (*Nilaparvata lugens*) is essential for their adaptation to gramine-containing host plants. *PLoS ONE*, 8(6): e64026.
- Wang CP, Zhang S, Gao XK, Luo JY, Zhu XZ, Wang L, Zhang KX, Yang YH, Cui JJ, 2020. Clone and expression analysis of three glutathione-S-transferase genes in different host-specific types of *Aphis gossypii* Glover. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 57(4): 823–832. [王传鹏, 张帅, 高雪珂, 雒珺瑜, 朱香镇, 王丽, 张开心, 杨亦桦, 崔金杰, 2020. 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. 应用昆虫学报, 57(4): 823–832.]
- Willoughby L, Chung H, Lumb C, Robin C, Batterham P, Daborn PJ, 2006. A comparison of *Drosophila melanogaster* detoxification gene induction responses for six insecticides, caffeine and phenobarbital. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36(12): 934–942.
- Xu LS, 2021. Study on effects of three secondary metabolites and cyanobromonamide on P450 and GST in *Lymantria dispar*. Master's thesis. Harbin: Northeast Forestry University. [许力山, 2021. 三种次生物质与溴氰虫酰胺对舞毒蛾 P450 和 GST 影响研究. 硕士学位论文. 哈尔滨: 东北林业大学.]
- Xu W, Zhang JH, Bi JR, Ma YX, Zhang YK, Shi SS, 2018. Effects of host plants on digestive enzymes and detoxification enzyme activities in the midgut of *Monolepta hieroglyphica* (Motschulsky). *Journal of Jilin Agricultural University*, 40(5): 551–556. [徐伟, 张吉辉, 毕嘉瑞, 马延旭, 张益恺, 史树森, 2018. 寄主植物对双斑萤叶甲中肠消化酶和解毒酶活性的影响. 吉林农业大学学报, 40(5): 551–556.]
- Yang J, 2017. Interaction of detoxification enzyme genes in brown planthopper (*Nilaparvata lugens*) with gramine and ferulic acid in rice and their potential application. Doctoral dissertation. Beijing: China Agricultural University. [杨军, 2017. 稻褐飞虱解毒酶基因与水稻芦竹碱和阿魏酸互作及其潜在应用. 博士学位论文. 北京: 中国农业大学.]
- Yang J, Sun XQ, Yan SY, Pan WJ, Zhang MX, Cai 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): 693–702.
- Zhang YL, Zhu Y, 2011. Inhibitory types of quercetin and thiourea on the polyphenoloxidase from *Bombyx mandarina*. *Hubei Agricultural Sciences*, 50(21): 4399–4400. [张永亮, 朱勇, 2011. 槲皮素和硫脲对野桑蚕多酚氧化酶的抑制类型. 湖北农业科学, 50(21): 4399–4400.]
- Zhang YE, Ma HJ, Feng DD, Lai XF, Chen ZM, Xu MY, Yu QY, Zhang Z, 2012. Induction of detoxification enzymes by quercetin in the silkworm. *Journal of Economic Entomology*, 105(3): 1034–1042.
- Zhou YQ, Mao XF, Liu ZY, 2019. Prokaryotic expression and in vivo expression characteristics of *EoGST534* in *Ectropis oblique*. *Biotechnology*, 29(6): 525–532. [周雨晴, 毛新芳, 刘忠渊, 2019. 茶尺蠖 *EoGST534* 的原核表达及体内表达特征. 生物技术, 29(6): 525–532.]
- Zou XP, Xu ZB, Zou HW, Liu JS, Chen SN, Feng QL, Zheng SC, 2016. Glutathione S-transferase *SIGSTE1* in *Spodoptera litura* may be associated with feeding adaptation of host plants. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 70: 32–43.