

网络出版时间:2019-11-27 15:19 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2020.06.011
网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.s.20191127.0922.022.html

短角外斑腿蝗 *GST* 基因的鉴定及其杀虫剂敏感性

马国强¹,高俊仙²,廉梅霞¹

(1 山西林业职业技术学院 林学系,山西 太原 030009;2 山西省林业科学研究院,山西 太原 030012)

【摘 要】 【目的】 鉴定短角外斑腿蝗(*Xenocatantops humilis brachycerus*)谷胱甘肽 S-转移酶(glutathione S-transferase,GST)基因,并对其进行系统发育分析;比较 GST 基因在短角外斑腿蝗不同组织部位的表达水平,探究其对杀虫剂的敏感性。【方法】 基于短角外斑腿蝗转录组数据库,通过 Blast 软件筛选 GST 基因;采用邻接法构建代表性昆虫 GST 家族系统进化树;利用实时荧光定量 PCR 技术,检测 *XbGSTd7*、*XbGSTd8*、*XbGSTe2* 和 *XbGSTe4* 在短角外斑腿蝗 10 个组织部位的表达水平。通过注射 dsRNA 沉默 *XbGSTd8* 和 *XbGSTe4*,结合杀虫剂敏感性试验,比较 GST 基因沉默后短角外斑腿蝗对 4 种杀虫剂敏感性的变化。【结果】 从短角外斑腿蝗转录组数据库筛选得到 15 条 GST 全长序列和 12 条 GST 片段序列。系统发育分析表明,15 条短角外斑腿蝗 GST 全长序列分别属于 Delta、Epsilon、Theta 和 Omega 家族。实时定量 PCR 结果显示,*XbGSTd8* 在短角外斑腿蝗胃毛囊、中肠和马氏管的表达量相对较高,*XbGSTe4* 在短角外斑腿蝗胃毛囊和中肠的表达量相对较高。沉默 *XbGSTe4* 后,短角外斑腿蝗对 4 种杀虫剂的敏感性无明显变化;沉默 *XbGSTd8* 后,短角外斑腿蝗对毒死蜱的敏感性显著提高。【结论】 *XbGSTd8* 可能参与短角外斑腿蝗对毒死蜱的代谢解毒过程。

【关键词】 短角外斑腿蝗;谷胱甘肽 S-转移酶;组织表达;杀虫剂敏感性

【中图分类号】 Q965.9 【文献标志码】 A 【文章编号】 1671-9387(2020)06-0099-07

Identification of glutathione S-transferase (GST) gene family from *Xenocatantops humilis brachycerus* and its insecticide sensitivity

MA Guoqiang¹,GAO Junxian²,LIAN Meixia¹

(Department of Forestry,Shanxi Forestry Vocational Technical College,Taiyuan,Shanxi 030009,China;
2 Shanxi Academy of Forest Sciences,Taiyuan,Shanxi 030012,China)

Abstract: 【Objective】 The glutathione S-transferase (GST) genes from *Xenocatantops humilis brachycerus* were identified and analyzed by phylogenetic analysis,expression levels at different tissues were compared among,and the sensitivity to insecticides was explored.【Method】 Based on the transcriptome database of *X. humilis brachycerus*,GST genes were screened by Blast software, and the phylogenetic tree was constructed by neighboring method. RT-qPCR was used to detect the expression levels of four GST genes among ten tissues of *X. humilis brachycerus*. *XbGSTd8* and *XbGSTe4* were silenced by injection of dsRNA. Combined with insecticide bioassay experiments, the sensitivity of *X. humilis brachycerus* against four insecticides was also determined after GST gene silencing.【Result】 Fifteen full-length sequences and twelve fragment sequences of GST were screened by blast software from the transcriptome database of *X. humilis brachycerus*. Phylogenetic analysis indicated that these full-length sequences belonged to the Delta,Epsilon,Theta and Omega families,respectively. RT-qPCR showed that *XbGSTd8* was highly expressed in gastric caecum,midgut and Malpighian tubules,and *XbGSTe4* was highly expressed in gastric

【收稿日期】 2019-06-13
【基金项目】 山西省自然科学基金项目(2012011033-4)
【作者简介】 马国强(1980—),男,山西神池人,硕士,主要从事林业生态工程及农林害虫防治研究。E-mail: sxlzymgq@163.com

caecum and midgut. After silencing *XbGSTe4*, the sensitivity of *X. humilis brachycerus* against four insecticides changed insignificantly, while silencing *XbGSTd8* significantly increased sensitivity against chlorpyrifos. 【Conclusion】 *XbGSTd8* may be involved in the metabolic detoxification process of chlorpyrifos in *X. humilis brachycerus*.

Key words: *Xenocatantops humilis brachycerus*; glutathione S-transferase; tissue-specific expression; insecticide sensitivity

短角外斑腿蝗 (*Xenocatantops humilis brachycerus*) 隶属直翅目 (Orthoptera) 斑腿蝗科 (Catantopidae), 是一种重要的农林业害虫^[1], 主要分布于我国东南、中部和北部等省份, 在印度北部及不丹和尼泊尔等国也有分布, 严重危害玉米、棉花、茶树等多种粮食和经济作物, 导致严重经济损失。蝗灾是具有爆发性和毁灭性的农业生物灾害, 目前蝗灾的应急防治措施主要是施用化学杀虫剂, 但化学杀虫剂的连续、反复施用可使蝗虫产生严重抗性^[2]。因此研究蝗虫对化学杀虫剂的代谢解毒机理和抗性形成机制, 对其的科学防治具有重要的意义。

谷胱甘肽 S-转移酶 (Glutathione S-transferase, GST) 是一类多功能超家族酶系, 广泛分布在细菌、真菌、动物和植物等多种好氧生物体内, 参与多种重要生理过程^[3-4]。GST 是重要的 II 相解毒酶系, 主要通过催化 GSH 与有毒的亲电、疏水底物共价结合, 使其毒性降低、亲水性提高而易排出体外, 从而降低毒性水平、减轻毒害作用^[5-7]。此外, GST 还广泛参与昆虫抗氧化应答、激素合成与代谢、嗅觉行为、信号传导和物质运输等代谢过程^[8-9]。目前, 关于昆虫 GST 的功能在果蝇 (*Drosophila melanogaster*)、赤拟谷盗 (*Tribolium castaneum* Herbst)、冈比亚按蚊 (*Anopheles gambiae*) 等代表性昆虫中研究较为深入^[10-12], 蝗虫 GST 的相关研究相对薄弱, 且研究对象主要集中于飞蝗 (*Locusta migratoria*)、中华稻蝗 (*Oxya chinensis*)、亚洲小车蝗 (*Oedaleus asiaticus*) 等少数物种^[13-15], 有关短角外斑腿蝗 GST 基因的研究尚未见系统报道。GST 基因序列信息的匮乏, 是制约短腿外斑腿蝗 GST 基因家族功能研究的重要因素之一。以转录组技术为代表的通量测序技术, 为系统研究蝗虫 GST 基因家族功能提供了强大的平台。近期黄原教授课题组公布了短角外斑腿蝗转录组数据库, 极大地促进了短角外斑腿蝗分子毒理学的研究^[1]。本研究基于该转录组数据库, 拟对短角外斑腿蝗 GST 家族成员进行系统分类鉴定, 并进一步比较 *XbGSTd7*、*XbGSTd8*、*XbGSTe2* 和 *XbGSTe4* 等 4 个 GST 基因的

组织表达规律, 探讨了 *XbGSTd8* 和 *XbGSTe4* 对短角外斑腿蝗杀虫剂敏感性的影响, 以期对短角外斑腿蝗的可持续治理提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

短角外斑腿蝗成虫采自陕西省西安市小五台山区域, 在环境温度 28~30 ℃、光照周期为 L/D=14 h/10 h 的条件下, 置于昆虫养殖笼内饲养, 主要投喂玉米 (*Zea mays* L.)、狗尾草 (*Setaria viridis* L. Beauv) 和大白菜 (*Brassica campestris* L. ssp. *Pekinensis*) 等食物。

TRIzol、Oligo (dT) 18、dNTP、RNase inhibitor 和 M-MuLV 逆转录酶, 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; HiScribe T7 Quick High Yield RNA Synthesis Kit 试剂盒, 购自 NEB (New England Biolabs); 其他试剂为国产分析纯。

1.2 相关数据下载

从中国国家基因库 (<https://www.cnbg.org/index.html>) 下载短角外斑腿蝗转录组数据库 (CNGB 登录号: CNP0000019); 从果蝇数据库 (<http://flybase.org/>) 下载果蝇 GST 蛋白序列; 从美国国立生物技术信息中心 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载飞蝗 GST 蛋白序列。

1.3 短角外斑腿蝗 GST 的鉴定

短角外斑腿蝗转录组包含若虫、雌性成虫和雄性成虫 3 个样本, 并进行 4 次组装, 分别为若虫 (CNS0000639, 24 030 条序列)、雌性成虫 (CNS0000636, 20 178 条序列)、雄性成虫 (CNS0000638, 40 522 条序列) 和上述 3 个样本的混合组装 (CNS0000637, 43 187 条序列)。选用信息最为全面的混合组装数据库, 利用 makeblastdb 程序将短角外斑腿蝗混合组装转录组中的 43 187 个 Unigene 序列索引化和格式化, 构建本地 Blast 数据库。以飞蝗和果蝇 GST 基因序列为种子序列, 通过 Tblastx 程序对短角外斑腿蝗本地 Blast 数据库进行比对, 比对结果去冗余后获得短角外斑腿蝗 GST

基因待定序列。利用 BlastP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 程序将获得的短角外斑腿蝗待定 GST 序列与非冗余数据库 (Non-redundant database) 进行在线比对,结合 Translate Tools (<https://web.expasy.org/translate/>) 在线翻译结果进一步筛选和验证,最终获得短角外斑腿蝗 GST 全长蛋白序列。

1.4 短角外斑腿蝗 GST 的系统发育分析

利用 ProParam tool 软件 (<https://web.expasy.org/protparam/>),分析短角外斑腿蝗 GST 蛋白质的理论等电点并预测分子质量;利用 SMART 软件 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>),分析短角外斑腿蝗 GST 的结构域组成;利用 ClustalW 软件 (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>),对短角外斑腿蝗和代表性昆虫 GST 序列进行多重序列比对,再利用 MEGA 7 软件 ([\[megasoftware.net/\]\(https://www.megasoftware.net/\)\) 中的邻接法构建代表性昆虫 GST 蛋白家族系统进化树,并对短角外斑腿蝗 GST 全长序列进行分类命名。](https://www.</p></div><div data-bbox=)

1.5 短角外斑腿蝗 GST 基因的组织表达

分别解剖获得短角外斑腿蝗成虫的触角、脑、前肠、胃毛囊、中肠、后肠、马氏管、脂肪体、肌肉和表皮等 10 个组织部位样品,加入 TRIzol 后,采用玻璃匀浆器分对将 10 个组织样品进行匀浆破碎。TRIzol 法提取总 RNA,并将其反转录为 cDNA 模板。根据 *XbGSTd7*、*XbGSTd8*、*XbGSTe2* 和 *XbGSTe4* 基因的序列分别设计引物(表 1),以短角外斑腿蝗 beta-肌动蛋白基因(*Xbβ-Actin*)作为参比基因,实时定量 PCR(RT-qPCR)检测目的基因在短角外斑腿蝗成虫不同组织部位中的相对表达水平。基因相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算。

表 1 目的基因 PCR 扩增所用引物及其序列
Table 1 Primers and sequences for PCR amplification of target genes

引物名称 Primer name	引物序列 (5'—3') Primer sequence (5'—3')	用途 Application
<i>XbGSTd7</i>	FW: TCCTACAGTGGATGACAATGGTTTT RV: CTGATTGACAAGTGCCCTCTTCTTAG	RT-qPCR
<i>XbGSTd8</i>	FW: GCCTGCCATGCTCGAGCTGAAGAACT RV: CGCTACTTGCTGCCTCTGACCGGGTG	
<i>XbGSTe2</i>	FW: ACCACTTCCCACTCAGTCCGCCTTG RV: CGGTATTGTGTGCTCTGGATTTCATC	
<i>XbGSTe4</i>	FW: CAGACACCATGCCAACCATCACAGT RV: GGGTAGGTCCTCTTGAGGTCCACGT	
<i>Xbβ-Actin</i>	FW: AGGGTGTGATGGTGGGTATGGGTCA RV: CTCGCAGCTCGTTGTAGAAGGTGTG	
<i>XbGSTd8</i> -RNAi	FW: taatacgaactcactatagggTGTATCGTTGGTGTCCGAGA RV: taatacgaactcactatagggCTCCTGCTGCAAATTTGGTT	dsRNA 合成 dsRNA synthesis
<i>XbGSTe4</i> -RNAi	FW: taatacgaactcactatagggCAAGAAGCCGAATACCTCA RV: taatacgaactcactatagggCTCGGCGAATTGGTCATACT	

1.6 短角外斑腿蝗 GST 基因的沉默

根据 *XbGSTd8* 和 *XbGSTe4* 的基因序列,用 e-RNAi 软件在线 (<https://www.dkfz.de/signaling/e-rnai3/>) 设计带有 T7 启动子序列的引物 *XbGSTd8*-RNAi 和 *XbGSTe4*-RNAi(表 1)。以短角外斑腿蝗 cDNA 为模板,采用带有 T7 启动子序列的引物扩增目的 cDNA 片段。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳和切胶回收后,通过 DNA 胶回收试剂盒纯化,获得 dsRNA 合成所需 DNA 模板。使用 HiScribe T7 Quick High Yield RNA Synthesis Kit 试剂盒合成 dsRNA。选取健康的短角外斑腿蝗成虫,在其腹部第二至第三腹节之间分别注射 *XbGSTd8* 和 *XbGSTe4* 基因的 dsRNA(5 μg/头),对照组注射等量绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein,

GFP) 基因的 dsRNA。室温饲养 24 和 48 h 后,收取样品提取总 RNA,并反转录为 cDNA 模板,采用实时定量 PCR 法检测目的 GST 基因的沉默效率,采用 *t*-test 法比较 GST 基因的沉默效率是否显著。每处理 3 个重复,每个重复 10~12 头成虫。

1.7 短角外斑腿蝗 GST 基因对杀虫剂的敏感性试验

选取健康的短角外斑腿蝗成虫,在其腹部第二至第三腹节之间分别注射短角外斑腿蝗 *XbGSTd8* 和 *XbGSTe4* 基因的 dsRNA (5 μg/头),对照组注射等量绿色荧光蛋白基因的 dsRNA,24 h 后在其第三至第四腹节处分别点滴 2 μL 滴滴涕 (1 000 μg/mL)、西维因 (100 μg/mL)、毒死蜱 (50 μg/mL) 或溴氰菊酯 (5 μg/mL) 溶液,并以溶剂丙酮为对照,

室温饲养 24 h 后统计死亡率。每处理 3 个重复,每重复 11~15 头成虫。

死亡率=死亡虫体个数/受试虫体总数×100%。

1.8 数据处理

试验数据采用 Tukey’s HSD 法进行多重比较分析,采用不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 短角外斑腿蝗 GST 的鉴定

从 Flybase 和 NCBI 分别下载 35 条果蝇和 28 条飞蝗 GST 基因序列,并将上述序列通过 Tblastx 程序与短角外斑腿蝗本地 Blast 数据库进行逐个比

对,去冗余后共获得 27 条短角外斑腿蝗待定 GST 基因序列。通过 Translate Tools 将待定 DNA 翻译为蛋白质序列,通过 BlastP 程序将短角外斑腿蝗 GST 蛋白序列针对非冗余数据库进行在线比对,最终获得 15 条短角外斑腿蝗 GST 的全长序列和 12 条片段序列。Blast 结果(表 2)显示,短角外斑腿蝗 GST 与飞蝗 GST 的相似性最高,E-期望值为 $3e^{-158} \sim 6e^{-20}$,序列一致性为 45.51%~91.77%。短角外斑腿蝗 GST 基因序列的开放阅读框为 645~726 bp,包含 214~241 个氨基酸,预测分子质量为 24.22~26.96 ku,理论等电点 5.51~8.92,具有完整的 N-端和 C-端结构域。

表 2 短角外斑腿蝗 GST 的生物信息学分析

Table 2 Bioinformatics analysis of GST from <i>Xenocantantops humilis brachycerus</i>							
基因名称 Gene name	GenBank 登录号 Accession number of GenBank	开放阅读框/bp Open reading frame	氨基酸数 Deduced amino acid residues	预测分子量/u Predicted MM	理论等电点 Theoretical isoelectric point	N-端结构域 N-Terminal domain	C-端结构域 C-Terminal domain
<i>XbGSTd1</i>	MN226995	666	221	25.37	5.63	2~77	107~199
<i>XbGSTd2</i>	MN227004	660	219	25.01	6.64	2~77	105~213
<i>XbGSTd3</i>	MN226997	702	233	26.10	6.60	2~77	105~201
<i>XbGSTd4</i>	MN227001	657	218	24.82	8.27	2~77	104~192
<i>XbGSTd5</i>	MN227000	675	224	25.82	6.53	2~77	109~219
<i>XbGSTd6</i>	MN226993	669	222	24.56	6.84	2~77	95~189
<i>XbGSTd7</i>	MN227006	651	216	24.61	8.30	2~77	94~189
<i>XbGSTd8</i>	MN226994	645	214	24.55	8.92	2~77	104~207
<i>XbGSTe1</i>	MN226996	669	222	24.80	6.16	1~76	90~188
<i>XbGSTe2</i>	MN226998	669	222	24.79	5.89	1~76	95~188
<i>XbGSTe3</i>	MN227002	669	222	24.60	5.51	1~76	103~198
<i>XbGSTe4</i>	MN226992	666	221	24.22	7.70	1~76	88~188
<i>XbGSTo1</i>	MN227005	726	241	26.96	8.77	23~98	133~207
<i>XbGSTt1</i>	MN227003	696	231	26.58	8.25	1~76	114~206
<i>XbGSTt2</i>	MN226999	696	231	26.74	8.85	1~76	110~201

2.2 短角外斑腿蝗 GST 的系统发育分析

为进一步明确短角外斑腿蝗 GST 家族成员的系统发育关系,使用 ClustalW 程序将短角外斑腿蝗(15 个 GST)与果蝇(35 个 GST)、赤拟谷盗(30 个 GST)、飞蝗(28 个 GST)、冈比亚按蚊(28 个 GST)等代表性昆虫 GST 的蛋白质序列进行比对。利用 MEGA 7 软件中的邻接法构建系统发育树,结果(图 1)显示,短角外斑腿蝗 15 条全长 GST 中包含 8 个 Delta、4 个 Epsilon、2 个 Theta 和 1 个 Omega 家族成员。

2.3 短角外斑腿蝗 GST 基因的组织表达

Delta 家族和 Epsilon 家族不仅是昆虫特有的 GST 家族,还广泛参与昆虫对外源毒性物质的解毒过程。飞蝗 *LmGSTd6* 基因不仅参与西维因和毒死蜱的代谢解毒过程^[16],且与短角外斑腿蝗 Delta 家族中 *XbGSTd7* 和 *XbGSTd8* 的序列最为相似。因此从短角外斑腿蝗 Delta 家族 GST 基因中选择

XbGSTd7 和 *XbGSTd8* 基因,从 Epsilon 家族 GST 基因中随机选择 *XbGSTe2* 和 *XbGSTe4* 基因,进行组织部位表达检测。实时定量 PCR 结果(图 2)显示,*XbGSTd7* 基因在短角外斑腿蝗触角的相对表达水平最高,在胃毛囊、后肠、马氏管和脂肪体等部位的表达水平居中,在脑、中肠和表皮等组织中的表达水平较低;*XbGSTd8* 在胃毛囊、中肠和马氏管等组织中的相对表达水平较高,在其余 7 个组织的表达水平较低。*XbGSTe2* 基因 mRNA 在脂肪体中的表达水平相对较高,在其余组织部位中的表达差异较小;*XbGSTe4* 在胃毛囊和中肠中的表达量相对较高,在其余组织部位表达水平较低。中肠、胃毛囊和马氏管是典型的代谢解毒器官,在上述组织部位高表达的 GST 基因,可能参与了有毒物质的代谢解毒过程,因此选择 *XbGSTd8* 和 *XbGSTe4* 基因进行 RNA 干扰效率和杀虫剂敏感性试验。

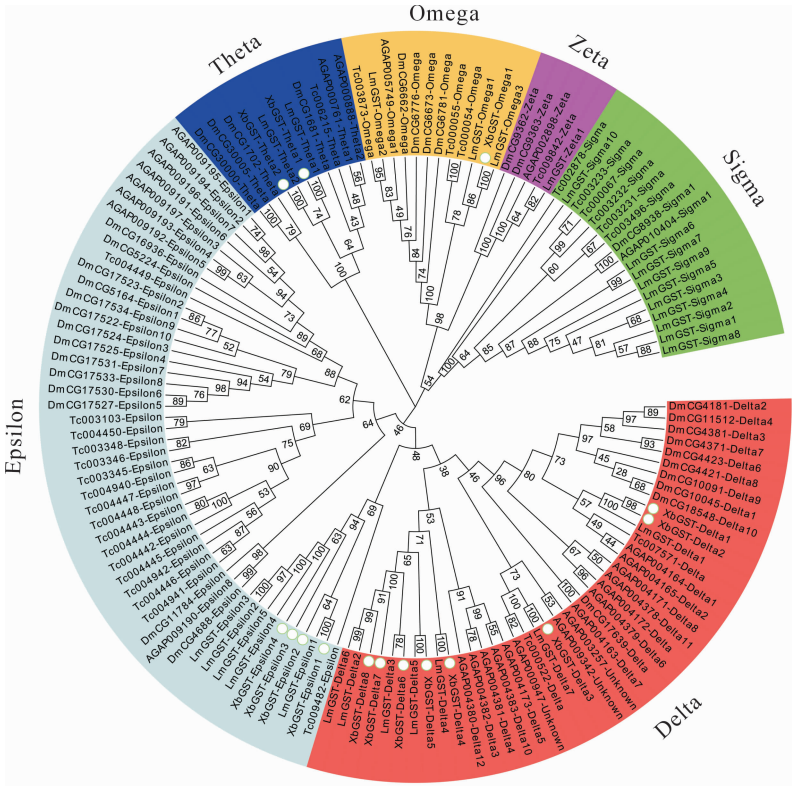
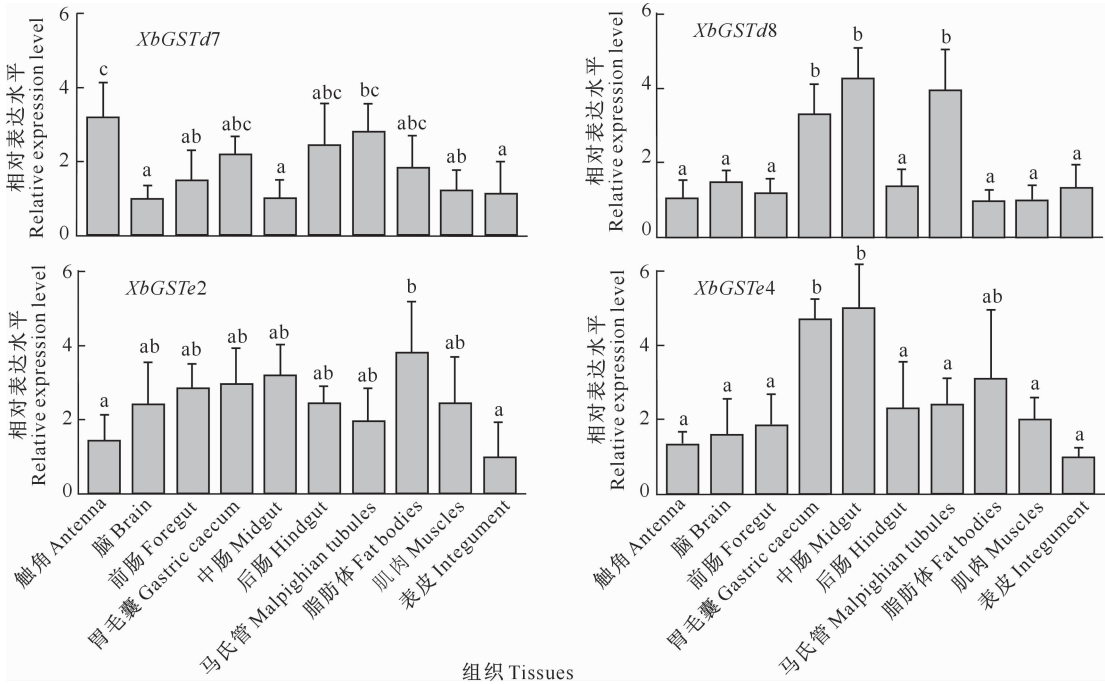


图 1 短角外斑腿蝗和代表性昆虫 GST 蛋白质序列的系统发育分析
Fig. 1 Phylogenetic analysis of protein sequences of cytosolic GSTs from *Xenocatantops humilis brachycerus* and representative insect species



图柱上标不同小写字母表示不同组织间差异显著 ($P < 0.05$)
Different lowercase letters indicate significant differences between tissues ($P < 0.05$)

图 2 短角外斑腿蝗 4 种 GST 基因的组织表达特征
Fig. 2 Tissue-specific expression patterns of four GST genes from *Xenocatantops humilis brachycerus*

2.4 短角外斑腿蝗 *GST* 基因的沉默效率检测

为检测 *XbGSTd8* 和 *XbGSTe4* 基因的 RNA 干扰效率,首先针对 *XbGSTd8* 和 *XbGSTe4* 基因序列在线设计带有 T7 启动子序列的引物。PCR 扩增双链 dsRNA 合成所需 DNA 模板,使用 HiScribe T7 Quick High Yield RNA Synthesis Kit 试剂盒合成 *XbGSTd8* 和 *XbGSTe4* 基因的 dsRNA,分别将其注射在健康短角外斑腿蝗成虫腹部第二和第三腹

节之间,检测其 RNA 沉默效率。结果(图 3)显示,注射 24 h 后,*XbGSTd8* 的表达水平下降了 72.7%,*XbGSTe4* 的表达量下降了 70.5%;注射 48 h 后,*XbGSTd8* 的表达水平下降了 87.8%,*XbGSTe4* 的表达水平下降了 91.6%。上述结果表明,d sRNA 介导的 *XbGSTd8* 和 *XbGSTe4* 基因的沉默效果至少可以维持 48 h,这为后续杀虫剂敏感性试验奠定了基础。

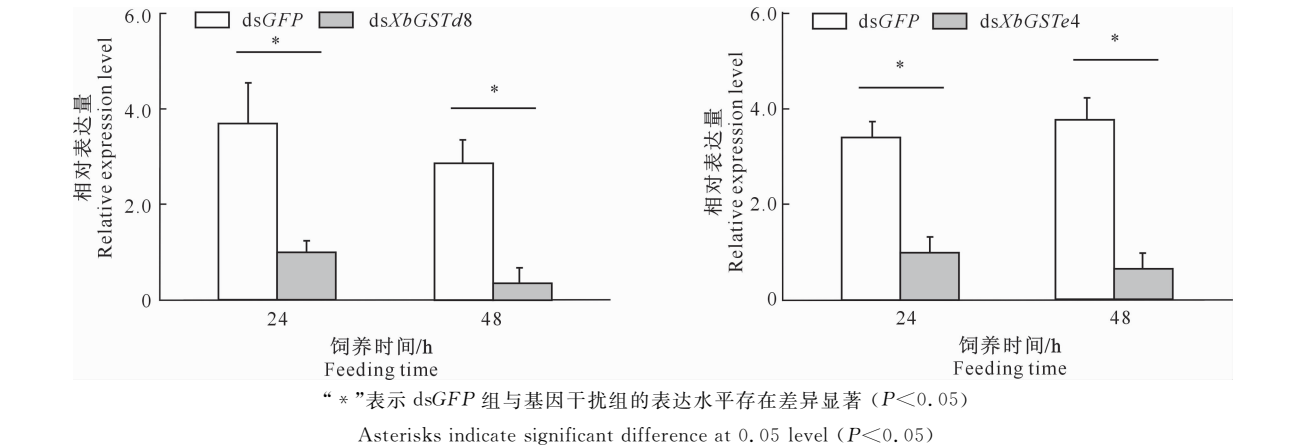


Fig. 3 Effect of dsRNA injection on transcription levels of *XbGSTd8* and *XbGSTe4* in *Xenocatantops humilis brachycerus*

2.5 短角外斑腿蝗 *GST* 基因对杀虫剂的敏感性

在短角外斑腿蝗成虫第二至第三腹节之间分别注射 *XbGSTd8* 和 *XbGSTe4* 基因的 dsRNA (5 $\mu\text{g}/\text{头}$),对照组注射等量 *GFP* 基因的 dsRNA,24 h 后在其第三至第四腹节处分别点滴 2 μL 的滴滴涕 (DDT)、西维因、毒死蜱或溴氰菊酯,室温饲养 24 h 后统计短腿外斑腿蝗的死亡率,结果见图 4。

图 4 显示,与对照组相比,沉默 *XbGSTe4* 基因后,4 种杀虫剂对短角外斑腿蝗的死亡率无显著影响;沉默 *XbGSTd8* 基因后,DDT、西维因和溴氰菊酯对短角外斑腿蝗的死亡率也无显著改变作用,但毒死蜱使短角外斑腿蝗的死亡率显著提高了 38.33%。

3 讨 论

GST 家族是昆虫三大解毒酶系之一,也是昆虫适应环境胁迫的重要方式^[17-18]。根据氨基酸序列同源性、底物适应性和免疫反应,昆虫 *GST* 可分为 Delta、Epsilon、Sigma、Theta、Omega、Zeta 和 Unknown 等 7 个家族^[19-20]。不同昆虫基因组中 *GST* 基因总量差异较大,黑腹果蝇 (*D. melanogaster*)、赤拟谷盗 (*T. castaneum*)、冈比亚按蚊 (*A. gambiae*)、家蚕 (*Bombyx mori*)、西方蜜蜂 (*Apis mellifera*) 和人体虱 (*Pediculus humanus humanus*) 分别含有 40、41、35、23、13 和 11 个 *GST* 基因。

一般而言,食性单一、生活环境稳定的昆虫,其基因组中 *GST* 基因的数量相对较少。不同种类昆虫 Delta、Epsilon、Omega、Sigma、Theta 家族中的 *GST* 数量差异较大,仅 Zeta 家族 *GST* 数量较少且较为恒定(一般含有 0~2 个)^[21-23]。本研究利用短

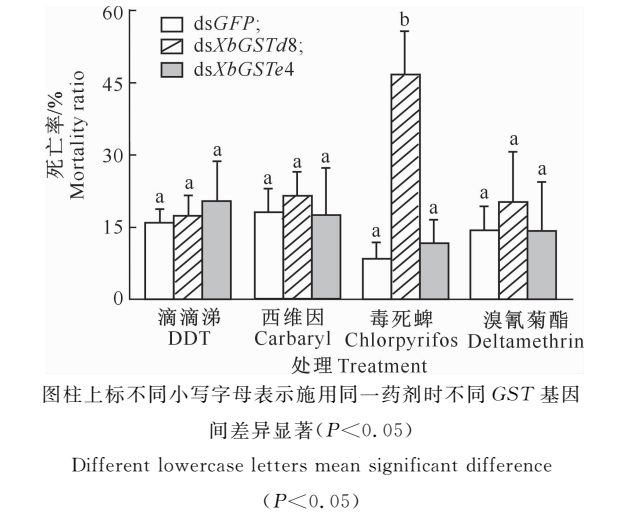


图 4 *XbGSTd8* 和 *XbGSTe4* 沉默后短角外斑腿蝗对不同杀虫剂的敏感性

Fig. 4 Sensitivity of *Xenocatantops humilis brachycerus* to four insecticides after *XbGSTd8* and *XbGSTe4* silencing

角外斑腿蝗转录组数据成功获得了 15 条 GST 全长序列,分属于 Delta、Epsilon、Theta 和 Omega 家族。但由于转录组测序技术的局限性,尚有 12 条 GST 片段未获得全长序列,也无法得到准确分类与命名。上述 12 个 GST 片段中是否包含未知的短角外斑腿蝗 GST,短角外斑腿蝗 GST 家族是否含有 Sigma、Zeta 和 Unknown 家族成员,短角外斑腿蝗基因组中共有多少个 GST 基因,这些问题均有待进一步研究。

昆虫 GST 对杀虫剂特别是对有机磷杀虫剂代谢的分子机制相对比较复杂^[11,24-26]。GST 既可以通过直接催化 GSH 与毒死蜱等有机磷杀虫剂的共价整合,实现代谢解毒;也可作为典型的Ⅱ相解毒酶,联合Ⅰ相解毒酶(如细胞色素 P450 单加氧酶和羧酸酯酶)产生的有机磷代谢产物,进一步提高有机磷代谢产物的水溶性,促使其排出体外^[26-27];GST 也可能不参与代谢解毒,而是作为蛋白配体,通过吸附和结合有机磷分子,降低有机磷分子在体内的有效浓度,达到缓解毒性作用的效果^[17]。本研究中沉默 *XbGSTd8* 基因后,毒死蜱使短角外斑腿蝗的死亡率由 8.36% 显著提高至 46.69%,但 *XbGSTd8* 在短角外斑腿蝗体内参与毒死蜱代谢解毒的具体分子机制还有待深入探讨。

[参考文献]

[1] Zhao L,Zhang X M,Qiu Z Y,et al. De novo assembly and characterization of the *Xenocantantops brachycerus* transcriptome [J]. International Journal of Molecular Sciences,2018,19(2): 520. [2019-06-12]. <https://doi.org/10.3390/ijms19020520>.

[2] Yang M L,Zhang J Z,Zhu K Y,et al. Mechanisms of organophosphate resistance in a field population of oriental migratory locust,*Locusta migratoria* manilensis (Meyen) [J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology,2009,71(1):3-15.

[3] You Y C,Xie M,Ren N N,et al. Characterization and expression profiling of glutathione S-transferases in the diamondback moth,*Plutella xylostella* (L.) [J]. BMC Genomics,2015,16(1):152. [2019-06-12]. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1343-5>.

[4] Chen X E,Zhang Y L. Identification and characterisation of multiple glutathione S-transferase genes from the diamondback moth,*Plutella xylostella* [J]. Pest Management Science,2015,71(4):592-600.

[5] Liu S,Zhang Y X,Wang W L,et al. Identification and characterisation of seventeen glutathione S-transferase genes from the cabbage white butterfly *Pieris rapae* [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology,2017,143:102-110.

[6] Han J B,Li G Q,Wan P J,et al. Identification of glutathione S-transferase genes in *Leptinotarsa decemlineata* and their expression patterns under stress of three insecticides [J]. Pesti-

cide Biochemistry and Physiology,2016,133:26-34.

[7] Reid W R,Sun H,Becnel J J,et al. Overexpression of a glutathione S-transferase (*Mdgst*) and a galactosyltransferase-like gene (*Mdgt1*) is responsible for imidacloprid resistance in house flies [J]. Pest Management Science,2019,75(1):37-44.

[8] Durand N,Pottier M A,Siaussat D,et al. Glutathione-S-transferases in the olfactory organ of the noctuid moth *Spodoptera littoralis*, diversity and conservation of chemosensory clades [J]. Frontiers in Physiology,2018,9:1-11.

[9] Xu P F,Han N N,Kang T H,et al. SeGSTo, a novel glutathione S-transferase from the beet armyworm (*Spodoptera exigua*), involved in detoxification and oxidative stress [J]. Cell Stress & Chaperones,2016,21(5):805-816.

[10] Shi H,Pei L,Gu S,et al. Glutathione S-transferase (GST) genes in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*, and comparative analysis with five additional insects [J]. Genomics,2012,100(5):327-335.

[11] Gonzalez D,Fraichard S,Grassein P,et al. Characterization of a drosophila glutathione transferase involved in isothiocyanate detoxification [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology,2018,95:33-43.

[12] Ding Y C,Ortelli F,Rossiter L C,et al. The Anopheles gambiae glutathione transferase supergene family: annotation, phylogeny and expression profiles [J]. BMC Genomics,2003,4: 35. [2019-06-12]. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-4-35>.

[13] Zhang X Y,Wang J X,Zhang M,et al. Molecular cloning, characterization and positively selected sites of the glutathione S-transferase family from *Locusta migratoria* [J]. PLOS ONE,2014,9(12):e114776.

[14] Zhang Y P,Song D N,Wu H H,et al. Effect of dietary cadmium on the activity of glutathione S-transferase and carboxylesterase in different developmental stages of the *Oxya chinensis* (Orthoptera:Acridoidea) [J]. Environmental Entomology,2014,43(1):171-177.

[15] Dong W,Zhang X B,Zhang X Y,et al. Susceptibility and potential biochemical mechanism of *Oedaleus asiaticus* to betacypermethrin and deltamethrin in the Inner Mongolia, China [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology,2016,132:47-52.

[16] Qin G H,Jia M,Liu T,et al. Characterization and functional analysis of four glutathione S-transferases from the migratory locust, *Locusta migratoria* [J]. PLoS One,2013,8(3): e58410.

[17] Cheng J,Wang C Y,Lyu Z H,et al. Multiple glutathione S-transferase genes in *Heortia vitessoides* (Lepidoptera:Crambidae): identification and expression patterns [J]. Journal of Insect Science,2018,18(3): 35. [2019-06-12]. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iey064>.

[18] Lu X P,Wang L L,Huang Y,et al. The epsilon glutathione S-transferases contribute to the malathion resistance in the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology,2016,180:40-48.

area [J]. Research of Soil and Water Conservation, 2018, 130 (5): 93-98.

[25] 王全九,赵光旭,刘艳丽,等. 植被类型对黄土坡地产生沙及氮磷流失的影响 [J]. 农业工程学报, 2016, 32(14): 195-201.

Wang Q J, Zhao G X, Liu Y L, et al. Effects of vegetation types on yield of surface runoff and sediment, loss of nitrogen and phosphorus along loess slope land [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2016, 32 (14): 195-201.

[26] 闫建梅,何丙辉,田太强. 不同施肥与耕作对紫色土坡耕地土壤侵蚀及氮素流失的影响 [J]. 中国农业科学, 2014, 47(20): 4027-4035.

Yan J M, He B H, Tian T Q. Effect of fertilizer levels and tillage methods on soil erosion and nutrient loss in purple soil area [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2014, 47(20): 4027-4035.

.....

(上接第 105 页)

[19] Pavlidis N, Khalighi M, Myridakis A, et al. A glutathione-S-transferase (*TuGSTd05*) associated with acaricide resistance in *Tetranychus urticae* directly metabolizes the complex II inhibitor cyflumetofen [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2017, 80: 101-115.

[20] Zhou W W, Liang Q M, Xu Y, et al. Genomic insights into the glutathione S-transferase gene family of two rice planthoppers, *Nilaparvata lugens* (Stål) and *Sogatella furcifera* (Horváth) (Hemiptera: Delphacidae) [J]. PLoS One, 2013, 8 (2): e56604.

[21] Enayati A A, Ranson H, Hemingway J. Insect glutathione transferases and insecticide resistance [J]. Insect Molecular Biology, 2005, 14(1): 3-8.

[22] Roncalli V, Cieslak M C, Passamaneck Y, et al. Glutathione S-transferase (GST) gene diversity in the crustacean *Calanus finmarchicus*-contributors to cellular detoxification [J]. PLoS One, 2015, 10(5): e0123322.

[23] Nebert D W, Vasiliou V. Analysis of the glutathione S-transferase (GST) gene family [J]. Human Genomics, 2004, 1(6): 460. [2019-06-12]. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-1-6-460>.

[24] Shi H, Pei L, Gu S, et al. Glutathione S-transferase (GST) genes in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*, and comparative analysis with five additional insects [J]. Genomics, 2012, 100(5): 327-335.

[25] Hu F, Ye K, Tu X F, et al. Identification and expression profiles of twenty-six glutathione S-transferase genes from rice weevil, *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 120: 1063-1071.

[26] Sookrung N, Reamtong O, Poolphol R, et al. Glutathione S-transferase (GST) of american cockroach, *Periplaneta americana*: classes, isoforms, and allergenicity [J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 484. [2018-01-11]. <https://doi.org/10.1038/S41598-017-18759-z>.

[27] Armstrong R N. Glutathione S-transferases: reaction mechanism, structure, and function [J]. Chemical Research in Toxicology, 1991, 4(2): 131-140.