

肚倍蚜抗氧化酶基因的克隆与表达

李 芒 王 永 雷朝亮*

(华中农业大学植物科学技术学院 湖北省昆虫资源利用与害虫可持续治理重点实验室 武汉 430070)

摘要 肚倍蚜 *Kaburagia rhusicola* Takagi 是一种转寄主寄生昆虫, 其虫瘿单宁含量较高为 70%。为了解肚倍蚜适应复杂瘿内环境生化机制, 根据已发布的基因保守区域设计引物, 从肚倍蚜中克隆 β -actin、*sod-1*、*sod-2*、*cat*、*prx* 和 *gst* 6 个结构基因的保守序列, 并利用半定量 RT-PCR 方法检测了瘿内外不同时期肚倍蚜中肠中抗氧化相关基因的表达量。研究表明: 与瘿外时期相比, 肚倍蚜 *sod-1*、*sod-2*、*cat*、*prx* 和 *gst* 5 个基因在表达量上存在一定差异; *sod-1*、*cat*、*prx* 和 *gst* 基因在部分瘿内时期表达量显著高于瘿外时期。本研究为肚倍蚜抗氧化相关基因的克隆和肚倍蚜瘿内环境适应机制研究奠定了良好的基础。

关键词 肚倍蚜, 抗氧化酶, 克隆, 中肠, 半定量 RT-PCR

Cloning and expression of genes involved in antioxidant response in *Kaburagia rhusicola*

LI Mang WANG Yong LEI Chao-Liang*

(Hubei Insect Resource Utilization and Sustainable Pest Management Key Laboratory, College of Plant Science & Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract *Kaburagia rhusicola* Takagi is a gall-forming aphid that induces gallnuts with 70% phenolic content. To investigate the biochemical mechanisms of the aphids adapted to the gall environment, we cloned six structural genes (β -actin, *sod-1*, *sod-2*, *cat*, *prx*, *gst*) from these aphids and used semi-quantitative RT-PCR to conduct transcriptional analysis of the antioxidant genes in their midguts. The results showed that *sod-1*, *sod-2*, *cat*, *prx* and *gst* transcripts were expressed differently in the midgut of different generations; *sod-1*, *cat*, *prx* and *gst* genes were expressed at higher levels in gall-dwelling generations than in those living outside galls. These results have established a solid foundation for cloning antioxidant genes from *K. rhusicola* and for further study of the adaptive mechanisms of these aphids to the gall environment.

Key words *Kaburagia rhusicola*, antioxidant enzyme, cloning, midgut, semi-quantitative RT-PCR

虫瘿是致瘿昆虫诱导植物产生的一种特异性增生组织 (Redfern *et al.*, 2002)。与正常组织相比, 虫瘿中通常含有较低的氮类物质和较高的酚类物质 (Hartley, 1998)。由于酚类物质在植物抵御植食动物的侵害过程中发挥着重要作用 (Park *et al.*, 2004), 因此有观点认为, 虫瘿组织中丰富的酚类物质可能与寄主植物抵御致瘿昆虫有关 (Westphal *et al.*, 1981; Abrahamson *et al.*, 1991)。

虽然酚类物质对昆虫具有毒性作用, 但其作用机理还不是十分清楚 (Gross *et al.*, 2008)。多

数观点认为, 酚类物质对昆虫的毒性作用来自于其被氧化时产生的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) (Barbehenn *et al.*, 2008)。当昆虫取食酚类物质后, 酚类物质在昆虫肠道经氧化产生的大量活性氧。过高的活性氧对昆虫机体产生氧化胁迫, 并对多种生物分子如: 营养分子、细胞膜和 DNA 带来破坏作用, 进而对昆虫产生毒性作用 (Summers and Felton, 1994; Bi and Felton, 1995; Bi *et al.*, 1997)。

抗氧化酶系是保护昆虫适应氧化胁迫一种重要物质, 主要由超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢

* 通讯作者, E-mail: ioir@mail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2011-04-11, 接受日期: 2011-05-03

酶(CAT)和过氧化物酶(POD)等组成(Felton and Summers, 1995; Wang et al., 2001)。抗氧化的原理大致为:SOD 将超过氧化自由基催化为过氧化氢和氧气($2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$, Fridovich, 1978);CAT 和其他过氧化物酶再迅速将过氧化氢转化为氧气和水($2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$);此外,谷胱甘肽 S - 转移酶(GST)参与清除氢过氧化物(Ahmad et al., 1991; Felton and Duffey, 1991; Ahmad, 1992)。抗氧化酶中的 SOD、CAT、POD 和 GST 等酶组成了一个有效防御体系。通过协同作用,及时清除生物体内的多余自由基,以维系生物的正常生命活动。

肚倍蚜 *Kaburagia rhusicola* Takagi 是我国特有的一种致瘿昆虫。其寄生在寄主青麸杨(*Rhus potaninii* Maxim)上产生肚倍,并在其内部大量繁殖,具有适应复杂瘿内环境的特殊能力。对其进行生理学研究,对于从分子层次揭示其生命本质具有重要意义。为此,本研究克隆了肚倍蚜肌动蛋白基因(β -actin)以及与抗氧化作用相关的超氧化物歧化酶基因(*sod* - 1 和 *sod* - 2)、过氧化氢酶基因(*cat*)、硫氧还蛋白过氧化物酶(*prx*)和谷胱甘肽巯基转移酶基因(*gst*)6个结构基因的保守序列,并利用半定量 RT-PCR 检测了瘿内外不同时期肚倍蚜中肠中抗氧化相关基因的表达量。通过基因的定量技术,从抗氧化反应角度解释肚倍蚜适应瘿内环境这一特殊自然现象。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

供试昆虫采于湖北省十堰市竹山县人工肚倍林,昆虫样品包括瘿外时期的春迁蚜(spring migrant)与瘿内时期的1代干雌成虫(adult generation one)、2代干雌成虫(adult generation tow)、无翅秋迁蚜(wingless migrant)和有翅秋迁蚜(alate migrant)。供试昆虫分别采于2010年2月25日、5月30日、6月15日、7月15日和7月15日。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 运用 ClustalX 软件比较 GenBank 中已报道的昆虫相关基因的 cDNA 序列,根据保守区结合 PCR 引物设计原理,设计肚倍蚜的 β -actin、*sod* - 1、*sod* - 2、*cat*、*prx* 和 *gst* 基因的上

下游简并引物,引物由武汉伯杰生物技术有限公司合成,引物序列如表 1。

表 1 引物设计序列

Table 1 The sequence of primer

基因 Gene	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence(5' - 3')
β -actin	<i>actin</i> -F	GNCTNATGGTNGGNATGGGNCA
	<i>actin</i> -R	NGCNGCNGTNGCCATYTC
<i>sod</i> - 1	<i>sod1</i> -F	CAYGARTTYGGNGAYAAYAC
	<i>sod1</i> -R	CTGGCNCCNGCRTTNCCNGT
<i>sod</i> - 2	<i>sod2</i> - F	TTCAAYGGNGKGGBGBCAYWT
	<i>sod2</i> - R	TANGCRTGYTCCCACRTCTC
<i>cat</i>	<i>cat</i> -F	GAGACTGGNTCNGCNGAYAC
	<i>cat</i> -R	TGAGANCCRTANCCRTTCAT
<i>prx</i>	<i>prx</i> -F	TTCTACCCNYTNGAYTTYAC
	<i>prx</i> -R	TTGGCTGGRCANACYTCN
<i>gst</i>	<i>gst</i> -F	TGCACCCATCMGATTYCTTC
	<i>gst</i> -R	GCCCAAGANAAYTTWCCRTT

注:R = A/G; Y = C/T; M = A/C; K = G/T; W = A/T; B = C/G/T; N = A/C/G/T.

1.2.2 RNA 提取和 cDNA 第 1 链合成 取瘿内 2~3 代肚倍蚜为材料,采用 TRIzol(Invitrogen)法提取总 RNA。加 DNase 于 37℃ 消除 DNA 后,以 1 μ g 总 RNA 为模板,参照 RevertAID™ First cDNA Synthesis Kit(Fermentas 公司)说明书合成 cDNA 第 1 链。

1.2.3 肚倍蚜相关基因的克隆 以 cDNA 第 1 链产物为模板,按表 1 引物组合进行 PCR 扩增反应。反应条件为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 0.5 min,45~50℃ 退火 0.5 min,72℃ 延伸 1 min,共 35 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。利用 DNAMAN 和 NCBI 网站进行序列分析。

1.2.4 半定量 RT-PCR 表达分析 取不同时期的新鲜肚倍蚜,置于 RNAAwait(Solarbio 公司)中。在双目解剖镜下用昆虫针小心挑破虫体,取出蚜虫的中肠放入装有 RNAAwait 的 PCR 管中。300 个肚倍蚜中肠为一个样,置于 -80℃ 保存备用。总 RNA 提取参照 NucleoSpin RNA® II 试剂盒(Macherey-Nagel 公司)提供的方法提取并消除 DNA。以 200 ng 总 RNA 为模板,用 PrimeScript® RT Master Mix Perfect Real Time 试剂盒(TAKARA 公司)合成 cDNA 第 1 链。

根据所获得的 β -actin、sod-1、sod-2、cat、prx 和 gst 基因片段设计特异引物(表 2),以 2~3 代肚倍蚜中肠 cDNA 为模板进行 PCR 扩增反应。反应条件为:95℃预变性 3 min;95℃变性 15 s,58℃退火 15 s,72℃延伸 20 s,共 40 个循环;最后 72℃延伸 10 min。对各基因 PCR 产物进行电泳和双向测序。

以不同时期肚倍蚜中肠 cDNA 为模板进行 PCR 扩增反应。反应条件为:95℃预变性 3 min;95℃变性 15 s,58℃退火 15 s,72℃延伸 20 s,共 38 个循环;最后 72℃延伸 10 min。PCR 产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶上进行电泳,凝胶成像系统采集图片,进行半定量研究。

表 2 半定量 RT-PCR 引物

Table 2 Primer for semiquantitative RT-PCR

基因 Gen	引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')
β -actin	actin-2F	AGTTCAACGTGACCAGAGGA
	actin-2R	CCAACGTTCACCAAGCATAA
sod-1	sod1-2F	GACATGTTGGTGAATTGGGTA
	sod1-2R	CTAAAGTACGGCCTATGATGT
sod-2	sod2-2F	CTTCTGTCGCTGTTCAAGGT
	sod2-2R	AATAGAGGAATCAGTCGGGTG
cat	cat-2F	TGCAGACACTGTTAGAGATCCA
	cat-2R	CTTGAAATAACATAGGGTCC
prx	prx-2F	CGGTGTTTACCTAACGGATG
	prx-2R	CTGAGAGTTTCATCTACGCTACG
gst	gst-2F	TGGTAGCGATGATTGGGA
	gst-2R	CGGAATAGTTCGTTGACCA

2 结果与分析

2.1 肚倍蚜相关基因克隆

根据昆虫相关基因的保守区域设计简并引物,以肚倍蚜 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,获得了 β -actin、sod-1、sod-2、cat、prx 和 gst 6 个结构基因的保守序列,其核苷酸长度分别为 570、298、296、301、402 和 412 bp。将 cDNA 基因序列递交 GenBank,获得登录号分别为:HQ231422、HQ231416、HQ231418、HQ231419、HQ231420 和 HQ231421,分别编码 189、98、97、99、133 和 136 个氨基酸。

2.2 肚倍蚜相关基因分析

序列同源性和多重比较分析表明,6 个结构基因与其它昆虫来源的结构基因均具有较高的同源性。将 β -actin 核苷酸序列推导的氨基酸序列与其他昆虫物种相比较(图 1),用 DNAMAN 软件分析氨基酸残基序列一致性为 95~100%。Proscan 软件(<http://npsa-pbil.ibcp.fr/>)分析该片段显示多个特定功能位点,包括 4 个蛋白激酶 C 磷酸化位点(18~20:SKR;24~26:TLK;103~105:SGR;152~154:TER)、2 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点(35~38:TNWD;160~163:TTAE)、2 个酪氨酸激酶磷酸化位点(149~156:KILTERGY;158~176:RDIKEKLCY)、3 个 N-豆蔻酰化位点(6~11:GQKDSY;32~37:GHTNW;116~121:GVSHTV)。分析结果还显示 2 个 actin 蛋白家族特征位点(11~21:YVGDEAQSKRG;62~74:LLTEAPLNPKA-NR)。

通过 DNAMAN(6.0)绘制肚倍蚜 *Kaburagia rhusicola*、豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum*(GenBank:NP_001156243.1;XP_001947690.1;XP_001943641.1;XP_001949571.1;XP_001946604.1)、家蚕 *Bombyx mori*(GenBank:BAD69805.2;NP_001037299.1;NP_001036912.1;NP_001037083.1;NP_001036994.1)、意大利蜜蜂 *Apis mellifera*(GenBank: AAP93581.1;NP_001171519.1;NP_001171540.1;NP_001171495.1;NP_001153742.1)、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*(GenBank:EFA02790.1;EFA09191.1;NP_001153712.1;XP_970797.1;XP_967475.1)、埃及伊蚊 *Aedes aegypti*(GenBank:EAT36424.1;EAT43773.1;ABF18150.1;XP_001663718.1;XP_001661870.1)、冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*(GenBank:XP_311594.2;XP_314490.3;ABK59975.1;EAA06406.3;XP_311546.4)、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*(GenBank:AAA28906.1;AAF57955.1;AAF49228.1;NP_728793.1;NP_725653.1)等昆虫 sod-1、sod-2、cat、prx 和 gst 5 个结构基因的进化树类聚图(图 2)。

从图 2 可以看出,肚倍蚜与同属同翅目的豌豆蚜为同一组,其亲缘关系较近。但不同基因的进化关系存在一定差异,部分进化关系与昆虫的形态分类关系并不一致:黑腹果蝇与冈比亚按蚊

<i>A.gambiae</i>	VHVGHGQKDSYVGDEAQSKRGILTLKPIEHGIVTNUDDMEKIUHHTFYNELVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQI
<i>T.citricida</i>	VHVGHGQKDSYVGDEAQSKRGILTLKPIEHGIVTNUDDMEKIUHHTFYNELVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQI
<i>B.mori</i>	VHVGHGQKDSYVGDEAQSKRGILTLKPIEHGIVTNUDDMEKIUHHTFYNELVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQI
<i>D.melanogaster</i>	VHVGHGQKDSYVGDEAQSKRGILTLKPIEHGIVTNUDDMEKIUHHTFYNELVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQI
<i>T.castaneum</i>	VHVGHGQKDSYVGDEAQSKRGILTLKPIEHGIVTNUDDMEKIUHHTFYNELVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQI
<i>M.separata</i>	VHVGHGQKDSYVGDEAQSKRGILTLKPIEHGIVTNUDDMEKIUHHTFYNELVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQI
<i>K.rhusicola</i>	VHVGHGQKDSYVGDEAQSKRGILTLKPIEHGIVTNUDDMEKIUHHTFYNELVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQI
<i>A.pisum</i>	VHVGHGQKDSYVGDEAQSKRGILTLKPIEHGIVTNUDDMEKIUHHTFYNELVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQI
<i>H.vitripennis</i>	VHVGHGQKDSYVGDEAQSKRGILTLKPIEHGIVTNUDDMEKIUHHTFYNELVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQI
<i>M.semenowi</i>	VHVGHGQKDSYVGDEAQSKRGILTLKPIEHGIVTNUDDMEKIUHHTFYNELVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQI
<i>A.mellifera</i>	VHVGHGQKDSYVGDEAQSKRGILTLKPIEHGIVTNUDDMEKIUHHTFYNELVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQI
<i>A.aegypti</i>	VHVGHGQKDSYVGDEAQSKRGILTLKPIEHGIVTNUDDMEKIUHHTFYNELVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQI
*****;*****;*****;	
<i>A.gambiae</i>	MFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGRTTGIVLDSDGVSHTVPIYEGYALPHAILRLDLAGRDLTDYLMKILTERGYSFTT
<i>T.citricida</i>	MFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGRTTGIVLDSDGVSHTVPIYEGYALPHAILRLDLAGRDLTDYLMKILTERGYSFTT
<i>B.mori</i>	MFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGRTTGIVLDSDGVSHTVPIYEGYALPHAILRLDLAGRDLTDYLMKILTERGYSFTT
<i>D.melanogaster</i>	MFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGRTTGIVLDSDGVSHTVPIYEGYALPHAILRLDLAGRDLTDYLMKILTERGYSFTT
<i>T.castaneum</i>	MFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGRTTGIVLDSDGVSHTVPIYEGYALPHAILRLDLAGRDLTDYLMKILTERGYSFTT
<i>M.separata</i>	MFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGRTTGIVLDSDGVSHTVPIYEGYALPHAILRLDLAGRDLTDYLMKILTERGYSFTT
<i>K.rhusicola</i>	MFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGRTTGIVLDSDGVSHTVPIYEGYALPHAILRLDLAGRDLTDYLMKILTERGYSFTT
<i>A.pisum</i>	MFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGRTTGIVLDSDGVSHTVPIYEGYALPHAILRLDLAGRDLTDYLMKILTERGYSFTT
<i>H.vitripennis</i>	MFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGRTTGIVLDSDGVSHTVPIYEGYALPHAILRLDLAGRDLTDYLMKILTERGYSFTT
<i>M.semenowi</i>	MFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGRTTGIVLDSDGVSHTVPIYEGYALPHAILRLDLAGRDLTDYLMKILTERGYSFTT
<i>A.mellifera</i>	MFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGRTTGIVLDSDGVSHTVPIYEGYALPHAILRLDLAGRDLTDYLMKILTERGYSFTT
<i>A.aegypti</i>	MFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGRTTGIVLDSDGVSHTVPIYEGYALPHAILRLDLAGRDLTDYLMKILTERGYSFTT
*****;*****;*****;	
<i>A.gambiae</i>	TAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQEMATAA
<i>T.citricida</i>	TAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQEMATAA
<i>B.mori</i>	TAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQEMATAA
<i>D.melanogaster</i>	TAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQEMATAA
<i>T.castaneum</i>	TAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQEMATAA
<i>M.separata</i>	TAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQEMATAA
<i>K.rhusicola</i>	TAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQEMATAA
<i>A.pisum</i>	TAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQEMATAA
<i>H.vitripennis</i>	TAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQEMATAA
<i>M.semenowi</i>	TAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQEMATAA
<i>A.mellifera</i>	TAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQEMATAA
<i>A.aegypti</i>	TAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQEMATAA
*****;	

图 1 肚倍蚜 β -actin 基因氨基酸序列与相关序列的比对分析Fig. 1 Multiple alignment of amino acid sequences of β -actin from different species

A. gambiae:冈比亚按蚊 (AAA03444.1); *T. citricida*:褐色橘蚜 (AAU84923.1); *B. mori*:家蚕 (NP_001119726.1); *D. melanogaster*:黑腹果蝇 (NP_511052.1); *T. castaneum*:赤拟谷盗 (NP_001165844.1); *M. separata*:粘虫 (ACX37085.1); *K. rhusicola*:肚倍蚜 (ADZ52965.1); *A. pisum*:豌豆蚜 (NP_001136108.1); *H. vitripennis*:玻璃叶蝉 (AAT01073.1); *M. semenowi*:谢氏宽漠王 (ACF54724.1); *A. mellifera*:意大利蜜蜂 (XP_623619.1); *A. aegypti*:埃及伊蚊 (AYY81972.1)。

和埃及伊蚊同属双翅目昆虫,其 *sod-2* 和 *gst* 基因在 65% 和 60% 相似系数下与冈比亚按蚊和埃及伊蚊归为一类;但在 *sod-1*、*cat* 和 *prx* 基因中,其亲缘关系却与同翅目昆虫肚倍蚜和豌豆蚜较近。

2.3 肚倍蚜中肠抗氧化酶基因的表达

β -actin、*sod-1*、*sod-2*、*cat*、*prx* 和 *gst* 基因扩增产物如图 3 所示,各 PCR 产物的条带介于 250 bp 和 100 bp 的 Marker 带间,条带清晰且大小与预

测产物一致。对各 PCR 产物分别用表 2 中的上下游特异引物进行双向测序。序列比较表明, β -actin、*sod-1*、*sod-2*、*cat*、*prx* 和 *gst* 基因 PCR 反应所产生的片段和原序列基本一致,说明 PCR 无非特异扩增存在。

图 4 表明, β -actin 在肚倍蚜中肠中具有恒定表达量,不同世代肚倍蚜间中肠 mRNA 的表达无显著差异;而抗氧化酶基因在不同世代中表达差

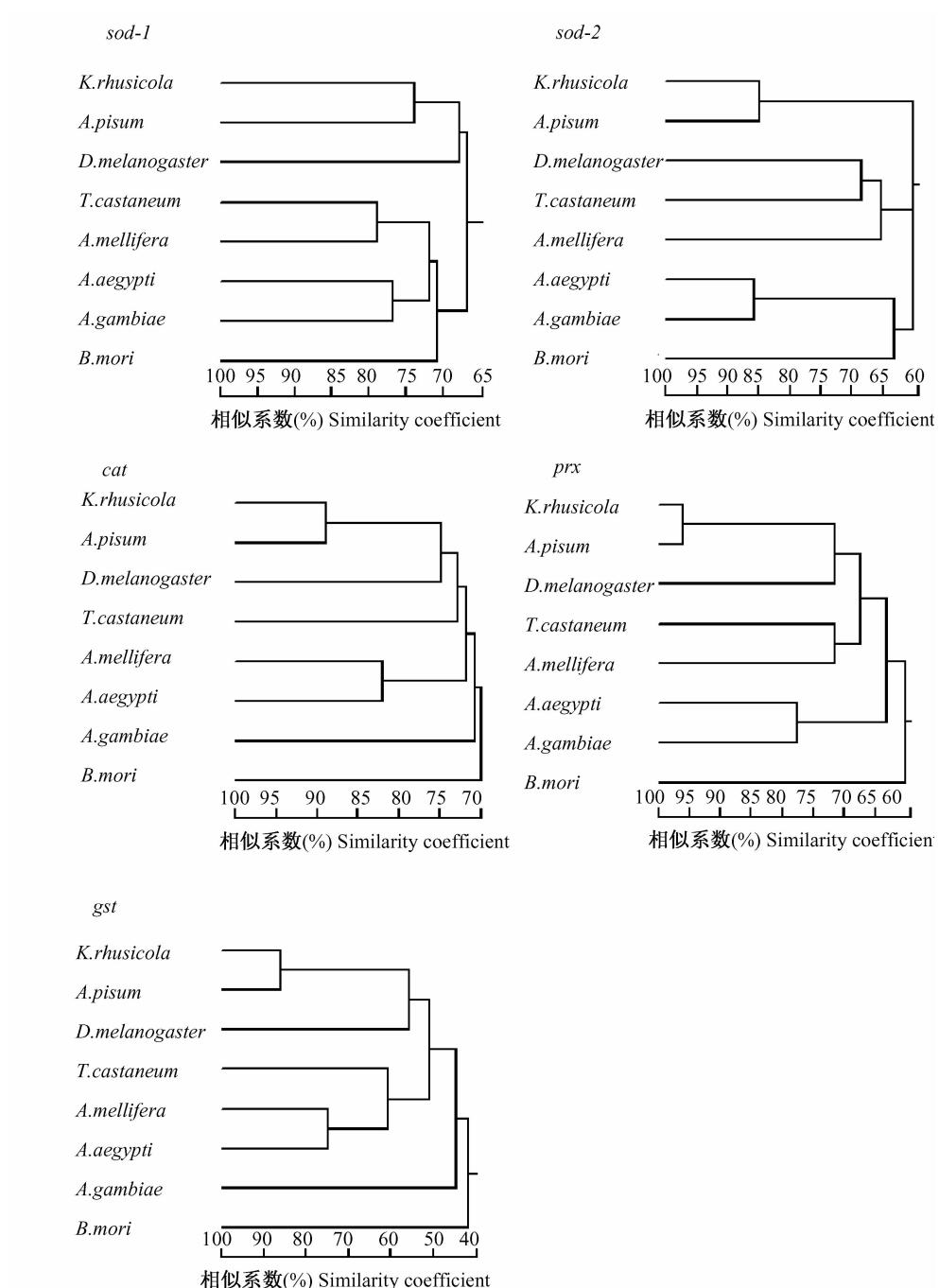


图 2 肚倍蚜抗氧化相关基因与其它昆虫氨基酸序列的发育树分析

Fig. 2 Phylogenetic tree of clustering of enzymes involved in antioxidant between *Kaburagia rhusicola* and other insects

异较大。与春迁蚜相比, *sod-1* 基因在瘿内 1 代和 2 代干雌中表达量较高, *sod-2* 在 1 代干雌和有翅秋迁蚜中表达较低。*cat* 基因在 1 代干雌中表达量最高, 无翅秋迁蚜和有翅秋迁蚜次之, 在春迁蚜和 2 代干雌中表达更低。*prx* 基因在 1 代干雌中表达量较高, 而在其它世代中较低。*gst* 基因

高表达于 1 代和 2 代干雌中, 在有翅秋迁蚜中表达较高, 而在春迁蚜和无翅秋迁蚜中较低。

3 讨论

肠道是食物在昆虫体内运输和代谢的主要场所, 其内所含酶系在昆虫适应食物中的外源物质

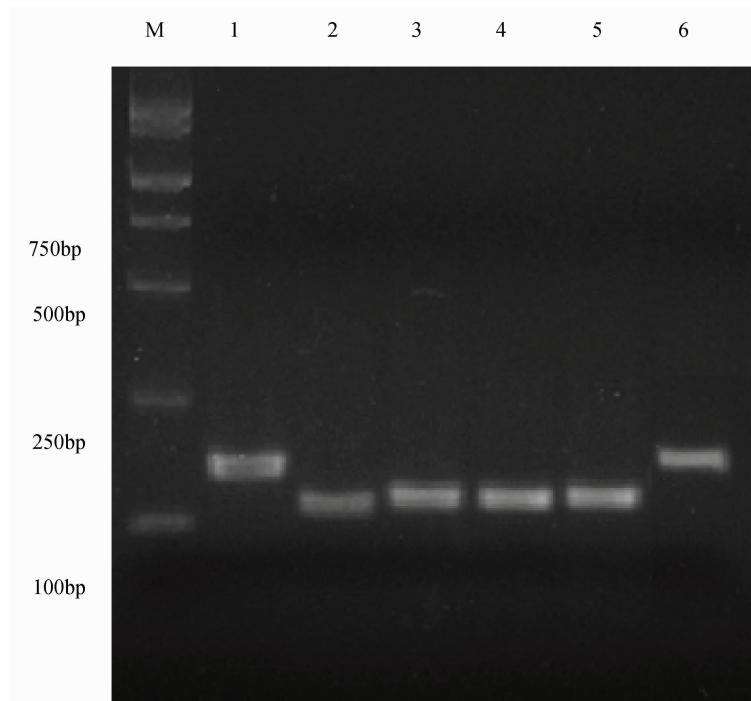


图 3 肚倍蚜相关基因 PCR 扩增电泳图

Fig. 3 Electrophoresis detection about PCR products of some genes in *Kaburagia rhusicola*

M :DNA Marker; 1: β -actin; 2: sod - 1; 3: sod - 2; 4: cat; 5: prx; 6: gst.

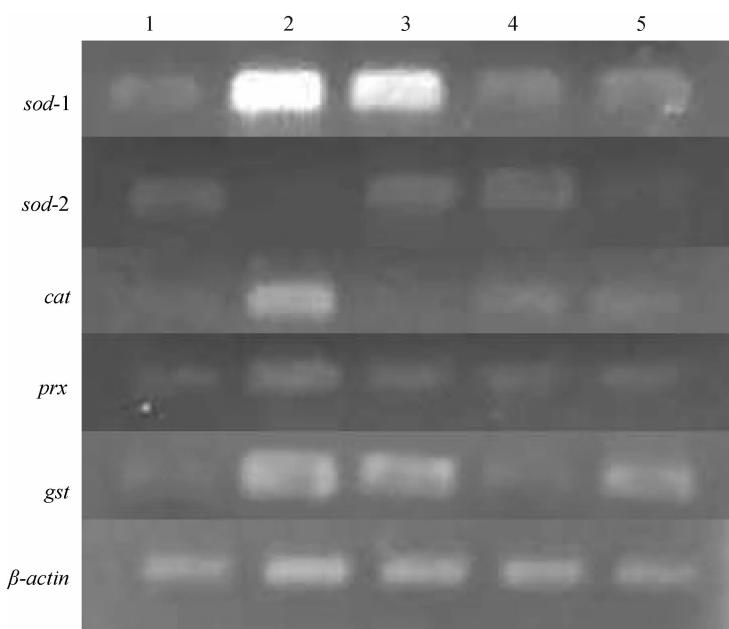
图 4 肚倍蚜中肠中 *sod - 1*、*sod - 2*、*cat*、*prx* 和 *gst* 的表达

Fig. 4 Expression of *sod - 1*, *sod - 2*, *cat*, *prx* and *gst* in midguts of *Kaburagia rhusicola*

1: 春迁蚜; 2: 1代干雌成虫; 3: 2代干雌成虫; 4: 无翅秋迁蚜; 5: 有翅秋迁蚜。

1: spring migrant; 2: adult generation one; 3: adult generation tow; 4: wingless migrant, 5: alate migrant.

中发挥重要作用(David et al., 2000)。因此,测定昆虫肠道中的相关酶活力变化是了解昆虫适应外

源物质的一种较为常见的办法。然而蚜虫形体较小,其中肠中的蛋白获取存在较大难度,而且在肚

倍蚜生活史中,倍蚜仅在肚倍生长的中后期数量较多,其它世代的倍蚜在采集上也存在材料不足的问题。为研究肚倍蚜适应瘤内复杂环境的抗逆机理,我们采用了定量 PCR 技术,将肚倍蚜中肠组织中的 RNA 转录为 cDNA,经 PCR 反应扩增,通过与特定的内参基因比较,判断目的基因 mRNA 在不同条件下,细胞中表达丰度的高低,从而为分析其生理相关的反应变化提供依据。

抗氧化酶在保护细胞不受自由基伤害中扮演着重要角色(Graça-Souza *et al.*, 2006)。SOD 酶作用于超氧化物,在清除活性氧的过程中作用至关重要。SOD 酶按金属辅基的成分不同主要分为 2 种:Cu/Zn-SOD (SOD - 1), 主要存在于细胞液中;Mn-SOD(SOD - 2),多发现于质粒中(Mittapalli *et al.*, 2007)。Pritsos 等(1991)研究发现,2 种不同类型的 SOD 酶在昆虫适应食物多酚物质中作用不同,当用 DDTC(二乙基二硫代氨基甲酸钠)抑制 5 龄幼虫细胞液中 SOD 活性时,槲皮素对北美黑尾凤蝶 *Papilio polyxenes* 和南部灰翅夜蛾 *Spodoptera eridania* 2 种昆虫毒性显著提高,而对槲皮素毒性较敏感粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* 来说,其往往通过不取食槲皮素食物来保护自己,粉纹夜蛾体内的质粒中的 SOD 酶活性远高于细胞液中的 SOD 酶活性。在本次研究中,与春迁蚜相比,瘤内时期的 *sod - 1* 基因在 1 代和 2 代干雌中表达量较高;*sod - 2* 基因表达情况不同于 *sod - 1*,*sod - 2* 在无翅蚜和 2 代干雌表达量与春迁蚜相当,而其它时期则低于春迁蚜水平。从结果看,瘤内环境对 1 代和 2 代干雌 *sod - 1* 表达影响较大,*sod - 1* 在 mRNA 水平的提升是肚倍蚜适应氧自由基的一种生理反应。

过多内源 SOD 酶将导致产生大量的过氧化氢,这对于生物机体来说是有害的(Peskin, 1997)。为了清除体内过量的过氧化氢,生物体利用 CAT 和其他过氧化物酶将过氧化氢分解为水和氧气,以维持抗氧化防御中的平衡(Radyuk *et al.*, 2001; Bauer *et al.*, 2002; Krishnan and Kodrík, 2006)。在本研究中,与春迁蚜相比,瘤内时期肚倍蚜的 *cat* 基因有显著变化,*cat* 基因的表达在 1 代干雌、无翅秋迁蚜和有翅秋迁蚜时期都高于春迁蚜;*prx* 基因在瘤内的 1 代干雌中表达较高。*cat* 和 *prx* 基因在肚倍蚜肠道中的变化反应了瘤内时期的肚倍蚜对瘤内氧化胁迫环境的适应。

GST 是昆虫体内重要的一种酶,它具有多种功能,主要表现在以下 3 个方面:1) 对异源有毒物质解毒;2) 保护细胞免受氧化损伤;3) 对激素、内源代谢物和外源化合物进行细胞间运输(Feng *et al.*, 1999)。GST 多以解毒酶作为对象研究(Yu, 1995; Gui *et al.*, 2009),但也有观点认为,GST 具有依赖于 GSH 的过氧化物酶活力,是一种重要的抗氧化酶(Ahmad *et al.*, 1991; Konno and Shishido, 1992; Meng *et al.*, 2009),可以保护机体免受内源过氧化物的损害(Hayes and Pulford, 1995)。在本研究中,肚倍蚜 *gst* 基因在 1 代干雌、2 代干雌和有翅秋迁蚜表达量明显高于瘤外的春迁蚜世代。我们认为这种表达上的变化与瘤内胁迫环境相关。

抗氧化酶是昆虫适应氧化胁迫环境的重要物质。本研究描述了由 *sod - 1*、*cat*、*prx* 和 *gst* 所组成肚倍蚜抗氧化系统在基因表达上的变化,初步探讨了肚倍蚜适应虫瘤环境的分子机理,认为抗氧化基因在肚倍蚜适应瘤内环境中起到了重要作用,为致瘤类昆虫的相关研究提供了基础资料。

参考文献 (References)

- Abrahamson WG, McCrea KD, Whitwell AJ, Vernieri LA, 1991. The role of phenolics in goldenrod ball gall resistance and formation. *Biochem. Syst. Ecol.*, 19(8):615—622.
- Ahmad S, Duval DL, Weinhold LC, Pardini RS, 1991. Cabbage looper antioxidant enzymes: Tissue specificity. *Insect Biochem.*, 21(5):563—572.
- Ahmad S, 1992. Biochemical defence of pro-oxidant plant allelochemicals by herbivorous insects. *Biochem. Syst. Ecol.*, 20: 269—296.
- Barbehenn R, Weir Q, Salminen JP, 2008. Oxidation of ingested phenolics in the tree-feeding caterpillar *Orgyia leucostigma* depends on foliar chemical composition. *J. Chem. Ecol.*, 34(6):748—756.
- Bauer H, Kanzok SM, Schirmer RH, 2002. Thioredoxin - 2 but not Thioredoxin - 1 is a substrate of thioredoxin peroxidase - 1 from *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.*, 277(20):17457—17463.
- Bi J, Felton G, 1995. Foliar oxidative stress and insect herbivory: Primary compounds, secondary metabolites, and reactive oxygen species as components of induced resistance. *J. Chem. Ecol.*, 21(10):1511—1530.
- Bi JL, Felton GW, Murphy JB, Howles PA, Dixon RA,

- Lamb CJ, 1997. Do plant phenolics confer resistance to specialist and generalist insect herbivores? *J. Agr. Food Chem.*, 45(11):4500—4504.
- David JP, Rey D, Cuany A, Amichot M, Meyran JC, 2000. Comparative ability to detoxify alder leaf litter in field larval mosquito collections. *Arch. Insect Biochem.*, 44(4):143—150.
- Felton GW, Duffey SS, 1991. Protective action of midgut catalase in lepidopteran larvae against oxidative plant defenses. *J. Chem. Ecol.*, 17(9):1715—1732.
- Felton GW, Summers CB, 1995. Antioxidant systems in insects. *Arch. Insect Biochem.*, 29:187—197.
- Feng QL, Davey KG, Pang AS, Primavera M, Ladd TR, Zheng SC, Sohi SS, Retnakaran A, Palli SR, 1999. Glutathione S-transferase from the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*: identification, characterization, localization, cDNA cloning, and expression. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 29(9):779—793.
- Fridovich I, 1978. The biology of oxygen radicals. *Science*, 201(4359):875—880.
- Graça-Souza AV, Maya-Monteiro C, Paiva-Silva GO, Braz GRC, Paes MC, Sorgine MHF, Oliveira MF, Oliveira PL, 2006. Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. *Insect Biochem. Mol.*, 36(4):322—335.
- Gross EM, Brune A, Walenciak O, 2008. Gut pH, redox conditions and oxygen levels in an aquatic caterpillar: Potential effects on the fate of ingested tannins. *J. Insect Physiol.*, 54(2):462—471.
- Gui Z, Hou C, Liu T, Qin G, Li M, Jin B, 2009. Effects of insect viruses and pesticides on glutathione S-transferase activity and gene expression in *Bombyx mori*. *J. Econ. Entomol.*, 102(4):1591—1598.
- Hartley SE, 1998. The chemical composition of plant galls: are levels of nutrients and secondary compounds controlled by the gall-former? *Oecologia*, 113(4):492—501.
- Hayes JD, Pulford DJ, 1995. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 30(6):445—600.
- Konno Y, Shishido T, 1992. Distribution of glutathione S-transferase activity in insect tissues. *Appl. Entomol. Zool.*, 27(3):391—397.
- Krishnan N, Kodrýk D, 2006. Antioxidant enzymes in *Spodoptera littoralis* (Boisduval): Are they enhanced to protect gut tissues during oxidative stress? *J. Insect Physiol.*, 52(1):11—20.
- Meng JY, Zhang CY, Zhu F, Wang XP, Lei CL, 2009. Ultraviolet light-induced oxidative stress: Effects on antioxidant response of *Helicoverpa armigera* adults. *J. Insect Physiol.*, 55(6):588—592.
- Mittapalli O, Neal JJ, Shukle RH, 2007. Antioxidant defense response in a galling insect. *PANS*, 104(6):1889—1894.
- Park CG, Lee KC, Lee DW, Choo HY, Albert PJ, 2004. Effects of purified persimmon tannin and tannic acid on survival and reproduction of bean bug, *Riptortus clavatus*. *J. Chem. Ecol.*, 30(11):2269—2283.
- Peskin AV, 1997. Cu, Zn-Superoxide dismutase gene dosage and cell resistance to oxidative stress: a review. *Bioscience Rep.*, 17(1):85—89.
- Pritsos CA, Pastore J, Pardini RS, 1991. Role of superoxide dismutase in the protection and tolerance to the prooxidant allelochemical quercetin in *Papilio polyxenes*, *Spodoptera eridania*, and *Trichoplusia ni*. *Arch. Insect Biochem.*, 16(4):273—282.
- Radyuk SN, Klichko VI, Spinola B, Sohal RS, Orr WC, 2001. The peroxiredoxin gene family in *Drosophila melanogaster*. *Free. Radical. Biol. Med.*, 31(9):1090—1100.
- Redfern M, Shirley P, Bloxham M, 2002. British plant galls identification of galls on plants and fungi. *Field. Stud.*, 10(2):207—531.
- Summers CB, Felton GW, 1994. Prooxidant effects of phenolic acids on the generalist herbivore *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae): Potential mode of action for phenolic compounds in plant anti-herbivore chemistry. *Insect Biochem. Mol.*, 24(9):943—953.
- Wang Y, Oberley LW, Murhammer DW, 2001. Antioxidant defense systems of two lipidopteran insect cell lines. *Free. Radical. Biol. Med.*, 30(11):1254—1262.
- Westphal E, Bronner R, Ret ML, 1981. Changes in leaves of susceptible and resistant *Solanum dulcamara* infested by the gall mite *Eriophyes cladophthirus* (Acarina: Eriophyoidea). *Can. J. Bot.*, 59(5):875—882.
- Yu SJ, 1995. Insect glutathione transferases. *Zool. Stud.*, 35:9—19.