二化螟谷胱甘肽-*S*-转移酶基因的鉴定与表达模式分析*

金燕璐[1**] 张邦贤[1,2] 林华峰[1***]

（1. 安徽农业大学植物保护学院，合肥 230036；2. 滁州学院科技处，滁州 239000）

摘 要 **【目的】** 鉴定二化螟 *Chilo suppressalis* 谷胱甘肽-*S*-转移酶（Glutathione-*S*-transferase，GST）基因，明确 *GST* 基因在幼虫各组织中的表达谱，并分析 *GST* 应对氯虫苯甲酰胺胁迫的表达模式。**【方法】** 从二化螟转录组数据库中鉴定 *GST* 的 cDNA 序列，使用实时荧光定量 PCR 技术分析 *GST* 在幼虫不同组织内的相对表达水平，并考察亚致死剂量氯虫苯甲酰胺处理幼虫之后 *GST* 表达水平的变化。**【结果】** 从二化螟转录组中检索得到 16 个 GST 基因，分别被命名为 *CsGSTd1*-*CsGSTu1*。这 16 个 *GST* 被划分为 6 个家族（Delta、Epsilon、Omega、Sigma、Zeta 和 Theta）和一个“未分类”亚组（Unclassified subgroup）。*CsGSTd2*、*CsGSTd3*、*CsGSTe1*、*CsGSTo3*、*CsGSTt1* 主要表达于脂肪体，*CsGSTe3* 主要表达于马氏管。未检测到特异表达于中肠的 GST 基因。氯虫苯甲酰胺处理 6 h 后，*CsGSTo2* 显著上调，但 *CsGSTd2*、*CsGSTd3*、*CsGSTe3*、*CsGSTo1* 和 *CsGSTt1* 显著下调。药剂处理 12 h 后，*CsGSTd1*、*CsGSTd2*、*CsGSTd3*、*CsGSTe1*、*CsGSTe2*、*CsGSTe3*、*CsGSTo2*、*CsGSTo3*、*CsGSTo4* 和 *CsGSTt1* 显著上调，而 *CsGSTu1* 显著下调。**【结论】** *CsGSTd1*、*CsGSTd2*、*CsGSTd3*、*CsGSTe1*、*CsGSTe2*、*CsGSTe3*、*CsGSTo2*、*CsGSTo3*、*CsGSTo4* 和 *CsGSTt1* 可能参与了对氯虫苯甲酰胺的解毒代谢。

关键词 二化螟，谷胱甘肽-*S*-转移酶，序列分析，表达模式

Identifying, and measuring the expression profiles, of *Chilo suppressalis* glutathione-*S*-transferase genes

JIN Yan-Lu[1**] ZHANG Bang-Xian[1,2] LIN Hua-Feng[1***]

(1. College of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China;
2. Department of Science and Technology, Chuzhou University, Chuzhou 239000, China)

Abstract **[Objectives]** To identify glutathione-*S*-transferase (GST) genes in *Chilo suppressalis*, determine their expression profiles in various larval tissues, and analyze their transcriptional profiles in response to chlorantraniliprole. **[Methods]** The cDNA sequences of *GST* genes were identified from the *C. suppressalis* transcriptome database and their expression profiles in different larval tissues investigated with real-time quantitative PCR. Variation in *GST* expression levels after exposure to a sublethal dose of chlorantraniliprole was measured. **[Results]** A total of 16 *GSTs* were identified and named *CsGSTd1*-*CsGSTu1*. These genes were classified into six families (Delta, Epsilon, Omega, Sigama, Zeta, and Theta) and an “unclassified” subgroup. *CsGSTd2*、*CsGSTd3*、*CsGSTe1*、*CsGSTo3*、*CsGSTt1* were mainly expressed in the fat-body, while *CsGSTe3* was enriched in the malpighian tubes. No midgut-specific genes were detected. *CsGSTo2* was significantly upregulated 6 h after exposure to chlorantraniliprole whereas *CsGSTd2*, *CsGSTd3*, *CsGSTe3*, *CsGSTo1* and *CsGSTt1* were significantly downregulated. *CsGSTd1*, *CsGSTd2*, *CsGSTd3*, *CsGSTe1*, *CsGSTe2*, *CsGSTe3*, *CsGSTo2*, *CsGSTo3*, *CsGSTo4* and *CsGSTt1* were significantly upregulated 12 h after chlorantraniliprole exposure, but *CsGSTu1* was significantly downregulated. **[Conclusion]** *CsGSTd1*, *CsGSTd2*, *CsGSTd3*, *CsGSTe1*, *CsGSTe2*, *CsGSTe3*, *CsGSTo2*, *CsGSTo3*, *CsGSTo4* and *CsGSTt1*

*资助项目 Supported projects：国家重点研发计划（2017YFD02009）

**第一作者 First author，E-mail：jinyl666@163.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：hf.lin@163.com

收稿日期 Received：2017-09-18，接受日期 Accepted：2018-01-31

may play an important role in the detoxification of chlorantraniliprole.

Key words *Chilo suppressalis*, glutathione-*S*-transferase genes, sequence analysis, transcriptional profiles

谷胱甘肽-*S*-转移酶（Glutathione-*S*-transferase，GST）是一类广泛存在于生物体内的重要解毒酶。它的基本功能是催化还原型谷胱甘肽与有毒化合物的偶联反应，增加这些化合物的水溶性，使它们更易于排出细胞，从而降低毒性（Hayes *et al.*，2005）。GST 对于昆虫非常重要，其目前已被证实的功能有：参与多种外源和内源有害化合物（如化学杀虫剂和细胞产生的活性氧）的代谢与害虫抗药性的形成（Li *et al.*，2007；尤燕春等，2013）；使触角中过量的气味分子失活以维持嗅觉敏感性（Rogers *et al.*，1999；Tan *et al.*，2014）；以及参与蜕皮激素的生物合成等（Enya *et al.*，2015）。GST 因为与害虫抗药性形成有关而受到广泛关注，许多昆虫在抗性形成的过程中经常伴随着 *GST* 基因表达的上调和 GST 酶活性的上升（刘佳等，2013；王圣印等，2013；全林发等，2017）。当使用 RNA 干扰（RNA interference，RNAi）技术沉默这些 *GST* 基因之后，抗性品系害虫对杀虫剂的敏感性显著增加（Qin *et al.*，2013；Lu *et al.*，2016）。

昆虫体内有 2 种类型的 *GST*：胞质型（Cytosolic）和微粒体型（Microsomal）（Ketterman *et al.*，2011）。昆虫中鉴定出的大多数 *GST* 都属于胞质型，根据其序列一致性、基因组位置和生化特性可分为 6 个家族：Delta、Epsilon、Omega、Sigma、Theta 和 Zeta。还有一些 *GST* 不能被划分到以上家族，它们均被归为“未分类”亚组（Unclassified subgroup）（Ketterman *et al.*，2011）。到目前为止，多种模式昆虫的 GST 基因家族已被鉴定。在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* Meigen、冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* Giles、家蚕 *Bombyx mori* （L.）、小菜蛾 *Plutella xylostella*（L.）、意大利蜜蜂 *Apis mellifera* L.、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* （Herbst）、褐飞虱 *Nilaparvata lugens* （Stål）和斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*（Fabricius）的基因组中分别发现了 38、31、24、22、10、36、11 和 37 个 *GST* 基因（Liu *et al.*，2017b）。

二化螟 *Chilo suppressalis* （Walker）属鳞翅目（Lepidoptera）螟蛾科（Pyralidae），是危害水稻的重要害虫（秦文婧等，2015）。氯虫苯甲酰胺是一类新型邻氨基苯甲酸联胺杀虫剂，广泛应用于二化螟的防控（邵振润等，2011）。近年来，我国许多地区发现二化螟对氯虫苯甲酰胺的敏感性降低（Gao *et al.*，2013；赵丹丹等，2017）。鉴于其它昆虫如小菜蛾对氯虫苯甲酰胺抗性水平上升与 GST 酶活性增强显著相关（尹飞等，2013；Hu *et al.*，2014b），推测二化螟的 *GSTs* 可能也会参与对氯虫苯甲酰胺的解毒代谢。但是，当前有关二化螟 *GST* 基因鉴定和表达模式的研究非常有限。本论文通过检索二化螟转录组数据库，鉴定了 16 个 *GST* 基因的 cDNA 序列，并研究了这些 *GSTs* 在二化螟幼虫不同组织中的表达谱，以及应对亚致死剂量氯虫苯甲酰胺的表达模式。实验结果为进一步研究这些 *GSTs* 在杀虫剂解毒代谢中的作用机理奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验试虫

供试二化螟为本实验室饲养种群。该种群最初采集于安徽农业大学实验农场水稻田（合肥市大杨镇）。二化螟幼虫以茭白饲养，成虫饲喂以 10%（v/v）蜂蜜水。饲养条件为温度（26±1）℃，相对湿度 75%，光照周期 16L∶8D。将二化螟 5 龄幼虫置于冰上麻醉，解剖并收集中肠、脂肪体和马氏管，立即置于液氮中冷冻，存于 - 80 ℃冰箱待用。

1.2 实验试剂

总 RNA 提取试剂 RNAiso Plus 和反转录试剂盒 PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit 购于宝生物工程（大连）有限公司；PCR 引物由通用生物系统（安徽）有限公司合成；KOD FX

DNA 聚合酶和荧光定量 PCR 试剂 SYBR Green Real-time PCR Master Mix 购于东洋纺（上海）生物科技有限公司；荧光定量 96 孔板和封膜购自美国 Bio-Rad 公司；氯虫苯甲酰胺（纯度 94.5%）购自德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司；色谱级丙酮购于美国 TEDIA 公司；10 μL 微量进样器购于上海高鸽工贸有限公司。

1.3　杀虫剂处理

将氯虫苯甲酰胺溶解于色谱级丙酮，并梯度稀释至 2.8 mg/L。使用微量点滴法，使用微量进样器将 1 μL 溶液（即 2.8 ng 氯虫苯甲酰胺）点滴至二化螟 5 龄幼虫腹部背板上。对照组为仅点滴丙酮的试虫。待药剂自然风干后，将试虫移入人工气候箱（温度（26±1）℃，相对湿度 75%，光照周期 16L∶8D）。分别处理 6 h 和 12 h 后，从处理组和对照组中各取试虫 30 头，置于液氮中冷冻后存于－80 ℃冰箱待用。实验经 3 次生物学重复。

1.4　总 RNA 提取与第一链 cDNA 合成

按照 RNAiso Plus 试剂说明书提取二化螟 5 龄幼虫各组织以及经氯虫苯甲酰胺和丙酮处理幼虫的总 RNA。使用 RNase-free DNase 消除总 RNA 中的 DNA 污染。RNA 样品的纯度使用甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测，RNA 的浓度使用 NanoDrop 2000 超微量分光光度计确定。取 1 μg 总 RNA 反转录为第一链 cDNA，产物均用无核酸酶的水稀释至 20 ng/μL。

1.5　转录组鉴定 *GST* 基因

从 GenBank 数据库中下载模式昆虫如黑腹果蝇、冈比亚按蚊、家蚕、小菜蛾和斜纹夜蛾的 *GST* 氨基酸序列，以这些序列作为模板，从二化螟转录组数据库（http://rptdb.hzau.edu.cn/）（吴昊等，2014）中鉴定 *GST* 基因的 cDNA 序列。所用程序为 BLAST，算法为 TBLASTN，期望值（E-value）设为 10^{-5}。

1.6　生物信息学分析

鉴定出的 *GST* 的开放阅读框（Open reading frame，ORF）使用 ORF Finder 程序（www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html）预测；蛋白质的理论分子量与等电点使用 ExPASy 工具（www.expasy.org/tools/protparam.html）计算；保守功能域和关键催化氨基酸残基使用 NCBI 的 CD search（www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/cdd/cdd.shtml）确定；将二化螟和其它昆虫的 *GST* 氨基酸序列上传至 Clustal Omega 服务器（www.ebi.ac.uk/tools/msa/clustalo）进行多序列连配，连配结果导入 MEGA6 软件以邻接法（neighbour-joining method）构建系统发育树，各分支置信度经由 Bootstrap 法 1 000 次循环检验（Tamura *et al.*，2013）。

1.7　反转录 PCR

根据鉴定出的 *GST* 的 cDNA 序列设计基因特异性引物（表 1），以二化螟 5 龄幼虫的第一链 cDNA 为模板，使用 KOD FX DNA 聚合酶进行 PCR 扩增。PCR 产物经 1%（w/v）琼脂糖凝胶电泳分离后，切下目的条带回收，送通用生物系统（安徽）有限公司从两端直接测序。

1.8　实时荧光定量 PCR

荧光定量 PCR 反应体系为 20 μL，内含 SYBR Green 试剂 10 μL，cDNA 模板 1 μL（20 ng），上游和下游引物各 0.5 μL（0.25 μmol·L^{-1}），无核酸酶的水 8 μL。实验所用引物列于表 2，以二化螟 *β-actin* 作为内参基因(Huang *et al.*，2011)。在预实验中，首先将 PCR 扩增产物进行测序，以确定扩增产物是目的基因片段，而不是亚家族成员之间的交叉干扰；然后通过梯度稀释 cDNA 模板的方法，计算各引物的扩增效率。定量 PCR 仪器为美国 Bio-Rad 公司 CFX96 型实时荧光定量系统，热循环条件为 95 ℃预变性 30 s，1 个循环；95 ℃ 5 s，60 ℃ 25 s，共 40 个循环。设置程序时增加溶解曲线，用于检测是否有引物二聚体形成。空白对照以无核酸酶的水代替 cDNA 模板，用于检测可能的试剂污染。每个样品进行 3 次生物学重复。因引物扩增效率近似（介于 90%-110%），故使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算基因相对表达水平(Livak and Schmittgen, 2001)。

表 1 反转录 PCR 引物
Table 1 Primers used for reverse transcription PCR

基因 Gene	上游引物 Forward primer (5′-3′)	下游引物 Reverse primer (5′-3′)	产物 Product (bp)
CsGSTd1	CAATCTGCTAAGTGTATCAGTC	ATCAATTCTTCAGGAAATTAG	805
CsGSTd2	CTATATTACGTACCCGGCTC	GTTAGGTGCTGACATCTTCA	570
CsGSTd3	GGCCATCGACCTATATTACA	GTGCAGTATTCTTCACCAGT	581
CsGSTd4	TCACTTCCCAATTAGTGGC	CAGACAATACGGCACAATCT	563
CsGSTe1	GAACGATCGTATATCAAACG	GCGAATTTAAGATGAGCAAC	643
CsGSTe2	GCTGTACTCATGACAATCCA	AGTTCGCGGAATAACAAGAT	584
CsGSTe3	CAGTTTCACGCTAGCGTC	CTATGGACGCAATACACCA	723
CsGSTo1	GCACTTACAAACAGGTGATG	GTTAGGGTCTCCTTTAGCAC	694
CsGSTo2	GACTTCATGCAAGTTGTGTC	GCAGAGCAAGTCATAGTTTG	772
CsGSTo3	ATGACTTACTACGAGCACAG	TCACTACATCGTCTAACTGC	643
CsGSTo4	CATACTGGACAATGGGTTCA	GACTACATACTGACTGACGG	680
CsGSTs1	CATATTTTCCCGTGAAGGC	GCTTGTGCAAGGTATTTGG	577
CsGSTs2	CACTATGGTGGGCATAAGTT	TGACCTTGGGTAGATTTTGG	514
CsGSTt1	CTTGATGTCACAACCCTCA	CCTTCGTCGTAATATGGGT	606
CsGSTz1	CTTTATTCGTACTGGCGAAG	GTTCGCGATCTATACGCAAT	556
CsGSTu1	ATGGTGATGAAACTGTACGC	TATGGGATGGTTAAGATGCG	675

表 2 实时荧光定量 PCR 引物
Table 2 Primers used for real-time quantitative PCR

基因 Gene	上游引物 Forward primer (5′-3′)	下游引物 Reverse primer (5′-3′)	产物 Product (bp)
CsGSTd1	GAAGAGCATTTGTTGCTGGA	TCGTTCTTTGGAACCACTTG	132
CsGSTd2	ATACTTCGACATCGGCACAC	GAACTGGTCCAACAGCTTCA	130
CsGSTd3	GCACCCGACTACCTGAAGAT	CAGATCATCCGGGTAAAGGT	144
CsGSTd4	GGTAGCAGGCGACCATATAA	CCAGACAATACGGCACAATC	135
CsGSTe1	ACCAAAGGCTGTTCTTCGAT	CATGCGGTAAGCGTTCTTTA	131
CsGSTe2	TGCATTTACCAGACGGAGAG	GAAACCAGGTAACCGCAGAT	130
CsGSTe3	CTACGCTTGTCTTTCCCAAG	ACTTCATTTGTCGCCTCAAC	100
CsGSTo1	GGCTGTTTGCAATGAGATTC	CCCTTGGGACTAAATTGGAA	136
CsGSTo2	TTTTGAAAGTTTGCCGACAG	GGTTGTGAATAGCTCCAGCA	131
CsGSTo3	GACAAGCTGCGGTTATACCA	CGCTTTGAACCACTCAGGTA	132
CsGSTo4	TTGAAGCTTTTGCACCAGTC	GTGCCTCTCAAAGTGAGCTG	133
CsGSTs2	ACTGCTGCCTTCTGACCTTT	GCTTTTTGAGAGCAGCCTTC	134
CsGSTt1	GGGAAAACAACCAGAGGCTA	AACAAGTCGGCAACAGTGAC	138
CsGSTz1	GTGGGCGATGACATTACACT	GCCGGGTGATTCTCTAGTTC	131
CsGSTu1	CCTAGGGCTGAAGAAAGTGC	GATAGCCTCCAGGGTCATGT	142
β-actin	TACCACCGGTATCGTGCTGG	ATCTCCTGCTCGAAGTCGAG	102

1.9　数据统计

使用 DPS 数据处理系统 v9.5 版进行数据统计（Tang and Zhang，2013）。使用单因素方差分析（One-way ANOVA）方法分析不同 *GST* 基因表达水平的差异，并使用 Tukey 法进行多重比较。显著性水平设为 $P<0.05$。

2　结果与分析

2.1　鉴定二化螟 *GST* 基因

以黑腹果蝇、冈比亚按蚊、家蚕、小菜蛾和斜纹夜蛾等模式昆虫 *GST* 的氨基酸序列为模板，从二化螟转录组中鉴定得到 16 个 *GST* 的 cDNA 序列，分别被命名为 *CsGSTd1*-*CsGSTu1*（表 3）。这 16 个 cDNA 序列均具有完整的开放阅读框，它们编码的蛋白质长度介于 204 至 284 个氨基酸之间（表 3）。

为检测从二化螟转录组中搜索到的 *GST* 基因是否为假基因，以二化螟 5 龄幼虫第一链 cDNA 为模板，设计基因特异性引物，进行反转录 PCR，扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检验。结果表明，从二化螟转录组中鉴定出的 16 个 *GST* 在二化螟幼虫中均有表达（图 1）。测序结果也显示扩增产物的序列与转录组鉴定的序列一致（数据未显示）。

2.2　系统进化分析

为了深入了解二化螟 *GST* 的分类以及和其它昆虫 *GST* 之间的进化关系，以二化螟和其它模式昆虫的 *GST* 氨基酸序列以邻接法构建了进化树，结果见图 2。进化分析结果表明，二化螟 *GST* 主要分为 6 个家族：Delta、Epsilon、Omega、Sigma、Theta 和 Zeta。但有 1 个基因（*CsGSTu1*）不能被分类到上述家族，暂归于“未分类”亚组（Unclassified subgroup）。二化螟 *GST* 与其它鳞翅目昆虫 *GST* 的亲缘关系较近，例如 Delta 家族的 *CsGSTd1* 与小菜蛾 *PxGSTd1* 聚为同一进化支，*CsGSTd4* 与斜纹夜蛾 *SlGSTd3* 聚为一支。3 个 Epsilon 家族的 *GST*（*CsGSTe1*、*CsGSTe2* 和 *CsGSTe3*）分别与稻纵卷叶螟的 *CmGSTe2*、*CmGSTe3* 以及斜纹夜蛾的 *SlGSTe1* 聚为一支（图 2）。

2.3　*GST* 在不同组织中的表达模式

使用荧光定量 PCR 检测了 16 个 *CsGST* 基因在二化螟 5 龄幼虫不同组织（中肠、脂肪体和马氏管）中的相对表达水平，结果见图 3。*CsGST* 基因在不同组织中的相对表达水平不同。*CsGSTd2*、*CsGSTd3*、*CsGSTe1*、*CsGSTo3* 和 *CsGSTt1* 主要表达于脂肪体，且在脂肪体中的表达水平显著高于中肠和马氏管。*CsGSTe3* 主要表达于马氏管。没有检测到特异表达于中肠的 GST 基因。

属于同一家族的 *GST* 基因之间也表现出不同的表达模式。Delta 家族 4 个 *GST* 在不同组织中表现出不同的表达模式：*CsGSTd1* 和 *CsGSTd4* 在 3 种组织中的表达量均无显著差异，而 *CsGSTd2* 和 *CsGSTd3* 在 3 种组织中的相对表达量均有显著差异，且在脂肪体中的表达量均显著高于中肠和马氏管。Epsilon 家族 3 个 *GST* 中，*CsGSTe1* 主要表达于脂肪体，而 *CsGSTe3* 主要表达于马氏管。和 *CsGSTe3* 在 3 种组织中的表达水平无显著差异。4 个 Omega 家族 *GST* 中，*CsGSTo1* 和 *CsGSTo4* 的表达模式相似，均是在中肠中的表达量显著低于脂肪体和马氏管；而 *CsGSTo3* 在脂肪体中大量表达，显著高于中肠和马氏管。Sigma 家族 *GST* 表达差异较大，*CsGSTs1* 在脂肪体和马氏管中的表达量显著高于中肠，而 *CsGSTs2* 在脂肪体中的表达量显著低于中肠和马氏管（图 3）。

2.4　*GST* 应对氯虫苯甲酰胺的表达模式

实时荧光定量 PCR 结果显示，二化螟幼虫经氯虫苯甲酰胺处理后，部分 *GST* 基因的表达水平有显著变化（图 4）。药剂处理 6 h 后，仅有 1 个 *GST* 基因（*CsGSTo2*）表达水平显著上调，但有 5 个基因（*CsGSTd2*、*CsGSTd3*、*CsGSTe3*、*CsGSTo1* 和 *CsGSTt1*）显著下调。药剂处理 12 h 后，有 9 个 *GST* 基因（*CsGSTd1*、*CsGSTd2*、*CsGSTd3*、*CsGSTe1*、*CsGSTe2*、*CsGSTe3*、

表 3　从二化螟转录组中鉴定的二化螟 16 个 *GST* 信息

Table 3　Information of the 16 *GST*s identified in *Chilo suppressalis*

家族 Class	基因名 Gene name	登录号 GenBank accession number	蛋白长度 Protein size (aa)	基因名 [物种] Gene name [Species]	登录号 GenBank accession number	一致性 Identity (%)
Delta	*CsGSTd1*	KP938857	246	Glutathione *S*-transferase [*Amyelois transitella*]	ACX47897	73
	CsGSTd2	KP938858	216	Glutathione *S*-transferase [*Antheraea pernyi*]	ACB36909	81
	CsGSTd3	KP938859	221	Glutathione *S*-transferase [*Plutella xylostella*]	AHW45900	71
	CsGSTd4	KT984986	215	Glutathione *S*-transferase [*Cnaphalocrocis medinalis*]	AIL29324	84
Epsilon	*CsGSTe1*	KP938861	228	Glutathione *S*-transferase epsilon 2 [*Cnaphalocrocis medinalis*]	AIL29311	69
	CsGSTe2	KP938862	222	Glutathione *S*-transferase epsilon 3 [*Cnaphalocrocis medinalis*]	AIL29312	64
	CsGSTe3	KP938863	228	Glutathione *S*-transferase 1-like [*Amyelois transitella*]	XP_013196516	50
Omega	*CsGSTo1*	KP938864	254	Glutathione *S*-transferase omega 1 [*Cnaphalocrocis medinalis*]	AIL29316	89
	CsGSTo2	KP938865	269	Glutathione *S*-transferase omega 2 [*Bombyx mori*]	NP_001037406	61
	CsGSTo3	KP938866	240	Glutathione *S*-transferase omega3 [*Cnaphalocrocis medinalis*]	AIZ46903	90
	CsGSTo4	KP938867	284	Glutathione *S*-transferase omega 2 [*Cnaphalocrocis medinalis*]	AIL29317	60
Sigma	*CsGSTs1*	KT984985	204	Glutathione *S*-transferase sigma 5 [*Cnaphalocrocis medinalis*]	AIZ46905	72
	CsGSTs2	KP938868	205	Glutathione *S*-transferase [*Choristoneura fumiferana*]	AAF23078	67
Theta	*CsGSTt1*	KP938869	228	Glutathione *S*-transferase theta 1 [*Danaus plexippus*]	EHJ70012	65
Zeta	*CsGSTz1*	KP938870	214	Glutathione *S*-transferase zeta 1 [*Bombyx mori*]	NP_001037418	94
Unclassified	*CsGSTu1*	KP938871	233	Glutathione *S*-transferase unclassified 1 [*Bombyx mori*]	NP_001108462	82

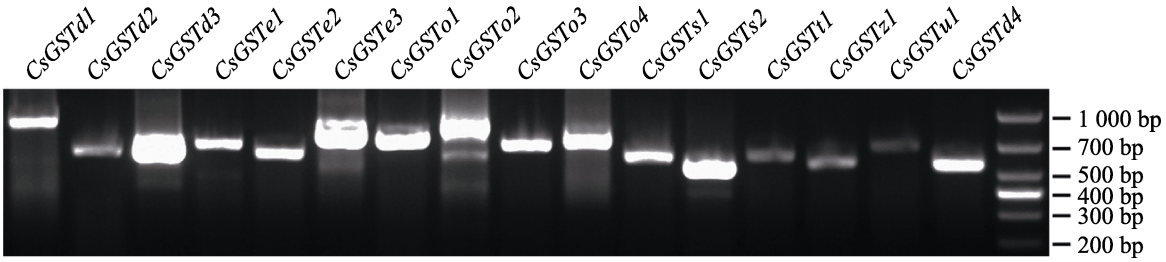

图 1　反转录 PCR 鉴定二化螟 *GST*

Fig. 1　Reverse transcription-PCR validation of *GSTs* in *Chilo suppressalis*

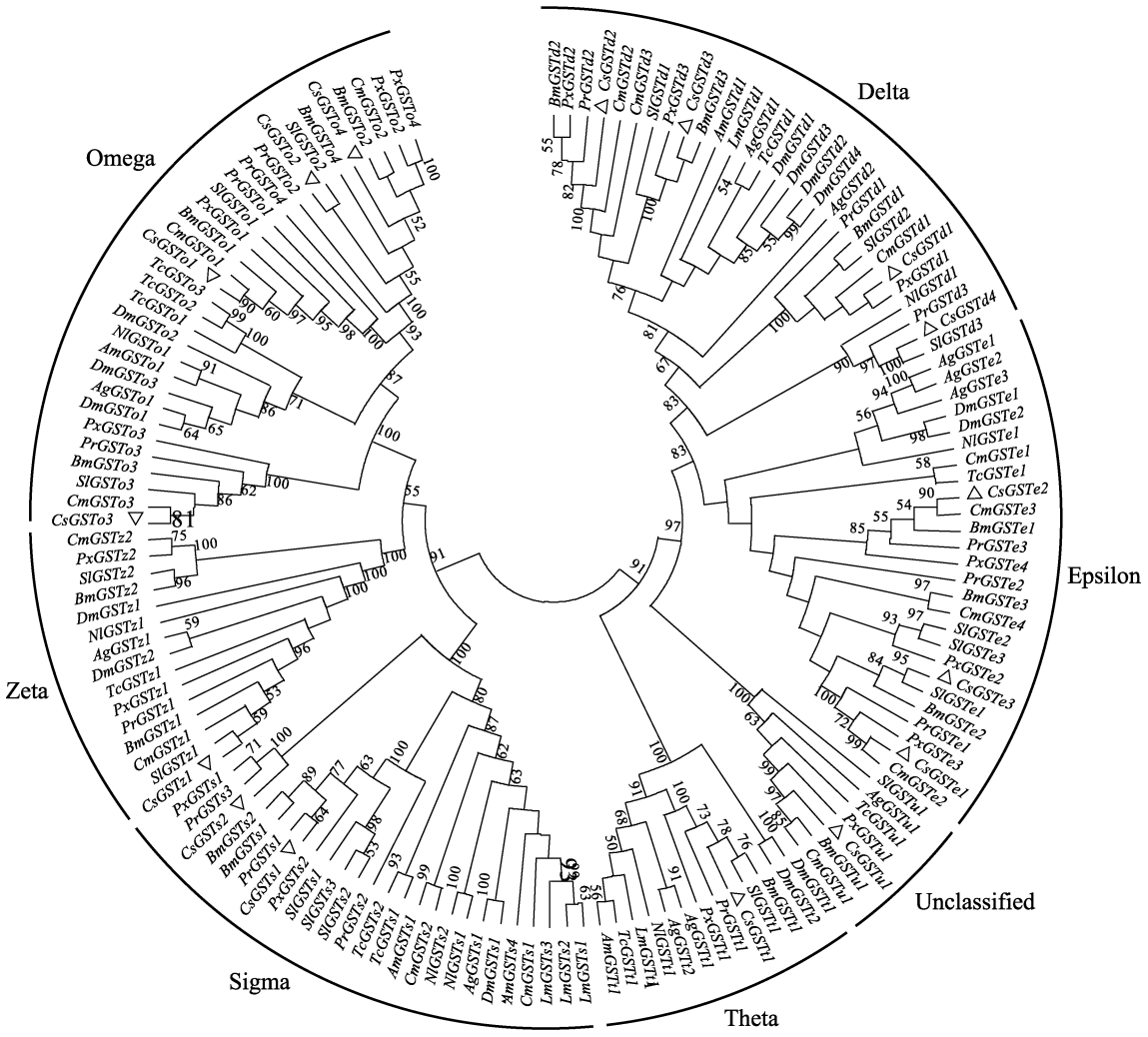

图 2　不同昆虫 *GSTs* 系统进化分析

Fig. 2　Phylogenetic analysis of *GSTs* from different insect species

进化树使用邻接法构建，各分支置信度经由 1 000 次 Bootstrap 检验，只有 Bootstrap 值大于 50 才显示在各分支节点上。二化螟 GST 基因以三角表示。物种名缩写：Cs：二化螟；Pr：菜粉蝶；Bm：家蚕；Px：小菜蛾；Cm：稻纵卷叶螟；Sl：斜纹夜蛾；Dm：黑腹果蝇；Ag：冈比亚按蚊；Tc：赤拟谷盗；Am：意大利蜜蜂；Lm：东亚飞蝗；Nl：褐飞虱。

The tree is constructed by using neighbour-joining method. Bootstrap support values are based on 1 000 replicates, and only bootstrap values above 50% are shown on each node of the tree. *CsGSTs* are indicated with triangles. Species name abbreviation: Cs: *Chilo suppressalis* (Walker); Pr: *Pieris rapae* (L.); Bm: *Bombyx mori* (L.); Px: *Plutella xylostella* (L.); Cm: *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée); Sl: *Spodoptera litura* (Fabricius); Dm: *Drosophila melanogaster* Meigen; Ag: *Anopheles gambiae* Giles; Tc: *Tribolium castaneum* (Herbst); Am: *Apis mellifera* L.; Lm: *Locusta migratoria* (L.); Nl: *Nilaparvata lugens* (Stål).

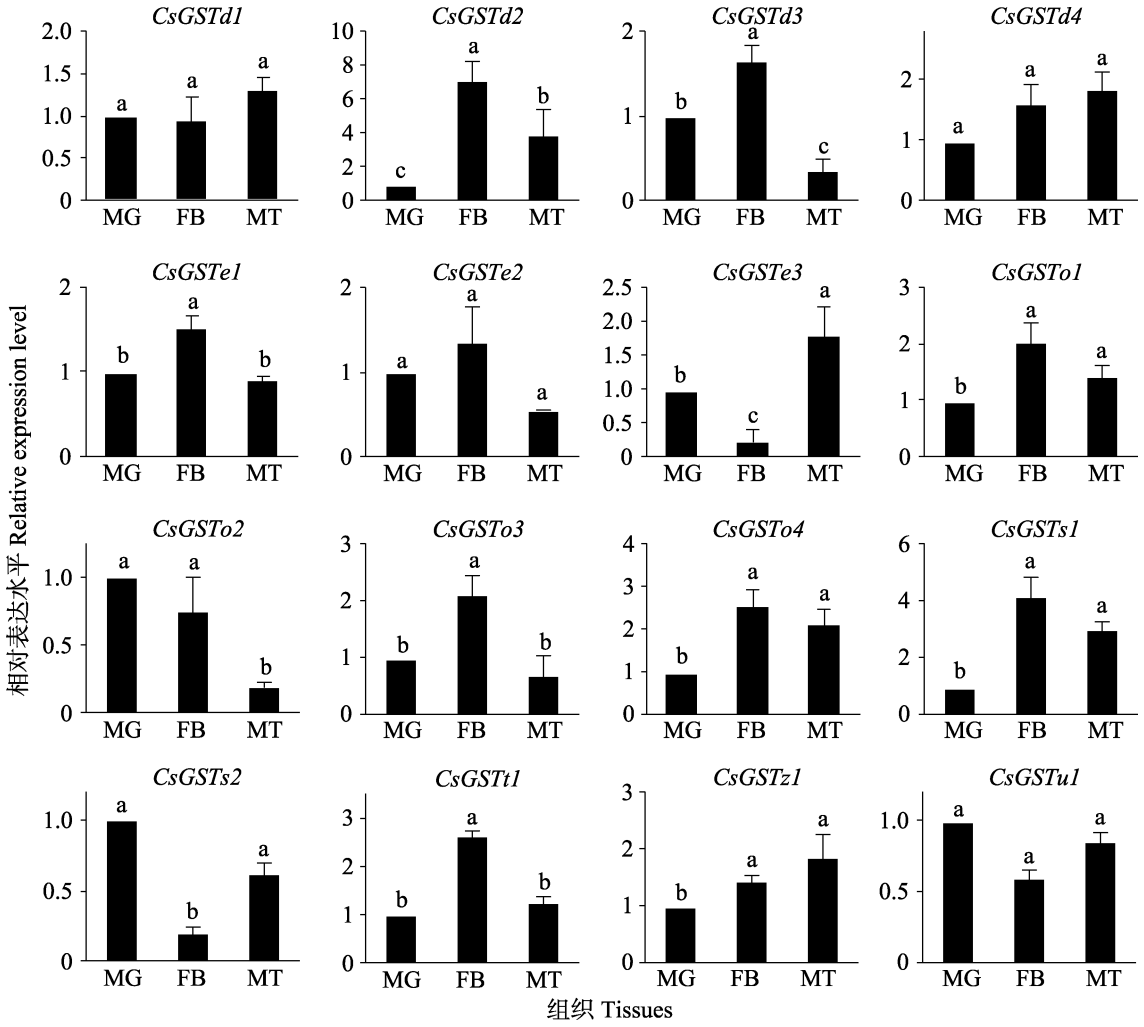

图 3　二化螟 ***GST*** 基因在幼虫各组织中的相对表达水平

Fig. 3　Relative expression levels of *CsGSTs* in various laval tissues

MG：中肠；FB：脂肪体；MT：马氏管。各组织中的 *GST* 基因的表达水平均表示为中肠（设为 1 倍）的相对倍数。不同小写字母表示差异显著（$P<0.05$）。下图同。

MG: Midgut; FB: Fatbody; MT: Mulpighin tubes. Expression levels of *CsGSTs* in various tissues are normalized relative to the level in the midgut, in which the CsGST levels are set as 1-fold. Histograms with different lowercase letters indicate significant differences among various samples ($P<0.05$). The same below.

CsGSTo2、*CsGSTo3*、*CsGSTo4*、*CsGSTt1*）显著上调，但也有 1 个基因（*CsGSTu1*）显著下调。

整体来看，*CsGSTd1*、*CsGSTe1*、*CsGSTe2*、*CsGSTo3*、*CsGSTo4* 的表达模式较为一致，均为药剂处理 6 h 后表达水平无显著变化，但在处理 12 h 后显著上调。而 *CsGSTd2*、*CsGSTd3*、*CsGSTe3*、*CsGSTo1*、*CsGSTt1* 的表达模式均为处理 6 h 后显著下调，但 12 h 后显著上调。*CsGSTo2* 在处理 6 h 和 12 h 后均为显著上调，而 *CsGSTu1* 在处理 6 h 和 12 h 后均为显著下调（图 4）。

3　讨论

本研究从二化螟转录组数据库中鉴定出 16 个 *GST* 基因的 cDNA 序列。基于系统进化分析结果，这些基因被划分为 6 个家族（Delta、Epsilon、Omega、Sigma、Theta 和 Zeta）和“未分类”亚组（Unclassified subgroup）。这与其它昆虫 *GST* 的分类相一致（Liu *et al.*，2017b）。Delta 和 Epsilon 是昆虫特有的 2 个家族，这 2 个家族中的 *GST* 多具有代谢杀虫剂的功能（Ketterman

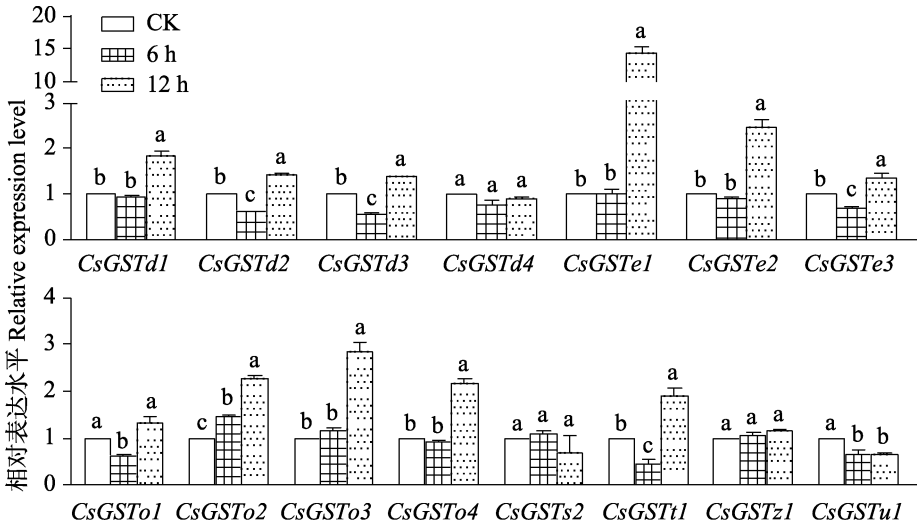

图 4　二化螟 *GST* 基因应对氯虫苯甲酰胺的表达模式

Fig. 4　Transciptional profiles of *CsGSTs* in response to chlorantraniliprole

氯虫苯甲酰胺处理 6 h 和 12 h 后，处理组试虫 GST 基因的表达水平均表示为对照组（CK，设为 1 倍）的相对倍数。

After the 6 h and 12 h exposure to chlorantraniliprole, expression levels of *CsGSTs* in chlorantraniliprole-treated group are normalized relative to those in control group (acetone-treated).

et al.，2011）。此外，Delta 和 Epsilon 家族 *GST* 经常被发现在对杀虫剂产生抗性的农业害虫中上调表达，说明与害虫抗药性密切相关（Li *et al.*，2007）。二化螟有 5 个 Delta 家族 *GST* 和 3 个 Epsilon 家族 *GST*，这些 *GST* 可能也有代谢杀虫剂和其他有害化合物的功能。

中肠、脂肪体和马氏管是昆虫体内重要的解毒器官。在其他鳞翅目模式昆虫如家蚕和小菜蛾中，部分 *GST* 基因特异表达于这些器官中（Yu *et al.*，2008；You *et al.*，2015）。本研究发现二化螟有 5 个 *GST* 基因（*CsGSTd2*、*CsGSTd3*、*CsGSTe1*、*CsGSTo3* 和 *CsGSTt1*）主要表达于脂肪体，只有一个基因（*CsGSTe3*）主要表达于马氏管。推测这些基因可能具有解毒功能。其它 *GST* 基因在两个以上的器官中大量表达，推测这些基因可能具有其它重要的生理功能。

氯虫苯甲酰胺属于邻甲酰氨基苯甲酰胺类杀虫剂，被广泛用于防治二化螟与其它鳞翅目害虫（邵振润等，2011）。但是近年来，大量使用氯虫苯甲酰胺造成我国部分地区二化螟对此药剂的敏感性降低（赵丹丹等，2017）。虽然鱼尼丁受体（Ryanodine receptor）特定氨基酸位点突变会造成害虫对氯虫苯甲酰胺不敏感（Troczka *et al.*，2012），但解毒酶如 *GST* 等基因表达水平的上调和酶活性的增加也会参与对此杀虫剂的代谢（Hu *et al.*，2014b）。此外，昆虫的 *GST* 还具有过氧化物酶活性，能够通过清除杀虫剂诱导细胞产生的活性氧而间接地降低杀虫剂的毒性（Liu *et al.*，2017a）。因此，受到氯虫苯甲酰胺胁迫后，*GST* 基因表达上调暗示着 GST 酶活性的增加，从而增强其相应的解毒代谢功能。在甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*（Hübner）与菜粉蝶 *Pieris rapae*（L.）中，*GST* 基因受到氯虫苯甲酰胺胁迫后，表达水平也显著上调（刘佳等，2013）。本研究发现二化螟 *CsGSTo2* 在氯虫苯甲酰胺处理 6 h 后表达水平显著上调，*CsGSTd1*、*CsGSTd2*、*CsGSTd3*、*CsGSTe1*、*CsGSTe2*、*CsGSTe3*、*CsGSTo2*、*CsGSTo3*、*CsGSTo4*、*CsGSTt1* 在处理 12 h 后显著上调。此外，（Huang *et al.*，2011）也报道了二化螟 *CsGSTsigma*（即本研究中的 *CsGSTs1*）受到氯虫苯甲酰胺胁迫后表达水平上调。这些基因可能会参与对氯虫苯甲酰胺的解毒代谢。

本研究同时也观察到氯虫苯甲酰胺处理后，部分 *CsGST* 基因的表达水平显著下调（图 5）。在其它昆虫中如菜粉蝶、桔小实蝇 *Bactrocera*

dorsalis Hendel 马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata*（Say）中，杀虫剂处理同样会导致 *GST* 表达量下调（Hu *et al.*，2014a；Han *et al.*，2016；Liu *et al.*，2017b）。有学者推测 GST 基因的下调表达可能是一种应对杀虫剂的应激反应，因为有 *GST* 表达上调，必须要有部分基因下调，才能避免过量的 *GST* 将虫体内的还原型谷胱甘肽耗尽（Han *et al.*，2016）。但这一假说仍需要进一步的实验来验证。

参考文献 (References)

Enya S, Daimon T, Igarashi F, Kataoka H, Uchibori M, Sezutsu H, Shinoda T, Niwa R, 2015. The silkworm glutathione *S*-transferase gene noppera-bo is required for ecdysteroid biosynthesis and larval development. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 61: 1–7.

Gao C, Yao R, Zhang Z, Wu M, Zhang S, Su J, 2013. Susceptibility baseline and chlorantraniliprole resistance monitoring in *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Economic Entomology,* 106(5): 2190–2194.

Han JB, Li GQ, Wan PJ, Zhu TT, Meng QW, 2016. Identification of glutathione *S*-transferase genes in *Leptinotarsa decemlineata* and their expression patterns under stress of three insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 133: 26–34.

Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR, 2005. Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology & Toxicology*, 45(1): 51–88.

Hu F, Dou W, Wang JJ, Jia FX, Wang JJ, 2014a. Multiple glutathione *S*-transferase genes: identification and expression in oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*. *Pest Management Science*, 70(2): 295–303.

Hu ZD, Feng X, Lin QS, Chen HY, Li ZY, Yin F, Liang P, Gao XW, 2014b. Biochemical mechanism of chlorantraniliprole resistance in the diamondback moth, *Plutella xylostella* Linnaeus. *Journal of Integrative Agriculture*, 13(11): 2452–2459.

Huang J, Wu S, Ye G, 2011. Molecular characterization of the sigma class glutathione *S*-transferase from *Chilo suppressalis* and expression analysis upon bacterial and insecticidal challenge. *Journal of Economic Entomology*, 104(6): 2046–2053.

Huang J, Wu SF, Ye GY, 2011. Molecular characterization of a proline transporter from *Chilo suppressalis*. *Insect Science*, 18(5): 495–502.

Ketterman AJ, Saisawang C, Wongsantichon J, 2011. Insect glutathione transferases. *Drug Metabolism Reviews*, 43(2): 253–265.

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.

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, Cao Y, Zhang YX, Pan YM, Li SG, 2017a. Molecular characterization of a delta class glutathione *S*-transferase gene from the black cutworm *Agrotis ipsilon*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 20(4): 1175–1182.

Liu S, Zhang YX, Wang WL, Zhang BX, Li SG, 2017b. Identification and characterisation of seventeen glutathione *S*-transferase genes from the cabbage white butterfly *Pieris rapae*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 143: 102–110.

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4): 402–408.

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: Toxicology and Pharmacology*, 180: 40–48.

Qin G, Jia M, Liu T, Zhang X, Guo Y, Zhu KY, Ma E, Zhang J, 2013. Characterization and functional analysis of four glutathione *S*-transferases from the migratory locust, *Locusta migratoria*. *PLoS ONE*, 8(3): e58410.

Qin WJ, Huang SJ, Huang JH, Chen HF, Chen Q, Qin HG, 2015. Resistance of rice varieties to the stripe stem borer *Chilo suppressalis*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 52(3): 721–727. [秦文婧, 黄水金, 黄建华, 陈洪凡, 陈琼, 秦厚国, 2015. 抗二化螟的水稻品种筛选. 应用昆虫学报, 52(3): 721–727.]

Quan LF, Qiu GS, Sun LN, Li YY, Yan WT, Yue Q, Zhang HJ, 2017. Effect of sublethal concentration of beta -cypermethrin on activities of detoxifying enzymes in *Carposina sasakii* Matsumura (Lepidoptera: Carposinidae) adults. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 19(3): 316–323. [全林发, 仇贵生, 孙丽娜, 李艳艳, 闫文涛, 岳强, 张怀江, 2017. 高效氯氰菊酯亚致死浓度对桃小食心虫成虫体内解毒酶活性的影响. 农药学学报, 19(3): 316–323.]

Rogers ME, Jani MK, Vogt RG, 1999. An olfactory-specific glutathione-*S*-transferase in the sphinx moth *Manduca sexta*. *Journal of Experimental Biology*, 202(12): 1625–1637.

Shao ZR, Li YP, Shen JL, Zhang S, Gao CF, Zhang KX, Chen Y, 2011. Field demonstration experiment of rice leaf roller and striped rice borer with Chlorantraniliprole. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 30(5): 609–612. [邵振润, 李永平, 沈晋良, 张帅, 高聪芬, 张凯雄, 陈宇, 2011. 氯虫苯甲酰胺防治稻纵卷叶螟和二化螟的大田示范试验. 华中农业大学学报, 30(5): 609–612.]

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S, 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12): 2725–2729.

Tan X, Hu XM, Zhong XW, Chen QM, Xia QY, Zhao P, 2014. Antenna-specific glutathione *S*-transferase in male silkmoth *Bombyx mori*. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(5): 7429–7443.

Tang QY, Zhang CX, 2013. Data processing system (DPS) software with experimental design, statistical analysis and data mining developed for use in entomological research. *Insect Science*, 20(2): 254–260.

Troczka B, Zimmer CT, Elias J, Schorn C, Bass C, Davies TGE, Field LM, Williamson MS, Slater R, Nauen R, 2012. Resistance to diamide insecticides in diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) is associated with a mutation in the membrane-spanning domain of the ryanodine receptor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 42(11): 873–880.

Wang SY, Zhou XH, Zhang AS, Li LL, Men XY, Liu YJ, Li XK, Yu Y, 2013. Mechanisms and crossresistance 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 H, Li F, Hua HX, Wang R, Gao L, Hou JX, Chen H, Zhou F, Lin YJ, 2014. Rice pest transcriptome database. *Scientia Sinica Vitae*, 44(8): 832–836. [吴昊, 李飞, 华红霞, 王睿, 高亮, 侯吉祥, 陈浩, 周菲, 林拥军, 2014. 水稻害虫转录组数据库. 中国科学：生命科学, 44(8): 832–836.]

Yin F, Chen HY, Li ZY, Lin QS, Hu ZD, Zhang DY, Feng X, 2013. Changes in susceptibility to chlorantraniliprole and detoxification enzymes of *Plutella xylostella* feeding on different host plants. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 50(5): 1335–1340. [尹飞, 陈焕瑜, 李振宇, 林庆胜, 胡珍娣, 张德雍, 冯夏, 2013. 取食不同寄主植物小菜蛾对氯虫苯甲酰胺敏感性及体内解毒酶活性的变化. 应用昆虫学报, 50(5): 1335–1340.]

You Y, Xie M, Ren N, Cheng X, Li J, Ma X, Zou M, Vasseur L, Gurr G, You M, 2015. Characterization and expression profiling of glutathione *S*-transferases in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *BMC Genomics*, 16(1): 152.

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 Q, Lu C, Li B, Fang S, Zuo W, Dai F, Zhang Z, Xiang Z, 2008. Identification, genomic organization and expression pattern of glutathione S-transferase in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38(12): 1158–1164.

Zhao DD, Zhou LQ, Zhang S, Yao R, Qiu YX, Gao CF, 2017. Resistance monitoring and cross-resistance to the diamides in the rice stem borer, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Chinese Journal of Rice Science*, 31(3): 307–314. [赵丹丹, 周丽琪, 张帅, 姚蓉, 邱运霞, 高聪芬, 2017. 二化螟对双酰胺类杀虫剂的抗药性监测和交互抗性研究. 中国水稻科学, 31(3): 307–314.]