

梨小食心虫谷胱甘肽S-转移酶基因序列分析 及其与吡虫啉的相关性

庞钦玮¹ 郭 灵¹ 张学尧² 高玲玲³ 马瑞燕¹ 郭艳琼^{1*}

(1. 山西农业大学植物保护学院, 太谷 030801; 2. 山西大学应用生物学研究所, 太原 030006;

3. 澳大利亚联邦科学与工业研究组织农业与食品部, 文布利 6913)

摘要: 为明确梨小食心虫 *Grapholita molesta* 谷胱甘肽 S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)对吡虫啉的代谢作用, 基于不同亚致死浓度吡虫啉处理的梨小食心虫转录组数据库进行筛选, 并通过生物信息学分析、系统发育树构建、保守位点序列比对、分子对接和表达谱分析来确定梨小食心虫代谢吡虫啉过程中的关键GST。结果显示, 共筛选到梨小食心虫的17个GST基因, 其中 *GmGSTS1*、*GmGSTD2*、*GmGSTE5* 和 *GmGSTE4* 基因编码的蛋白与苹果蠹蛾 *Cydia pomonella* 的GST蛋白有较高的相似性, 相似度达69.12%~89.66%。梨小食心虫 *GmGSTD2* 蛋白 G 位点和 H 位点的保守氨基酸与褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 及烟粉虱 *Bemisia tabaci* 代谢吡虫啉相关 GST 氨基酸序列完全一致。吡虫啉与梨小食心虫 *GmGSTD2* 蛋白 G 位点的 ARG-66 和 H 位点的 TYR-112 可以形成稳定的氢键; 与 *GmGSTE3* 蛋白 G 位点的 LEU-45 和 H 位点的 LYS-123 可以形成稳定的氢键。在吡虫啉处理后, 梨小食心虫体内 *GmGSTD2* 和 *GmGSTE3* 基因的表达量显著高于对照。表明 *GmGSTD2* 和 *GmGSTE3* 为梨小食心虫代谢吡虫啉的关键GST基因。

关键词: 梨小食心虫; 谷胱甘肽S-转移酶; 吡虫啉; 分子对接; 实时荧光定量PCR

Sequence analysis of the glutathione S-transferases gene of oriental fruit moth *Grapholita molesta* and its correlation with imidacloprid

Pang Qinwei¹ Guo Ling¹ Zhang Xueyao² Gao Lingling³ Ma Ruiyan¹ Guo Yanqiong^{1*}

(1. College of Plant Protection, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi Province, China; 2. Institute of Applied Biology, Shanxi University, Taiyuan 030006, Shanxi Province, China; 3. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation (CSIRO), Agriculture and Food, Wembley 6913, WA, Australia)

Abstract: In order to understand the metabolism of imidacloprid by the glutathione S-transferase (GST) of oriental fruit moth *Grapholita molesta*, key GST genes were screened with bioinformatics analysis, phylogenetic tree construction, sequence alignment, molecular docking and expression analysis based on the transcriptome database established by treating *G. molesta* with different sublethal concentrations of imidacloprid. The results showed that 17 GSTs of *G. molesta* were identified, among which *GmGSTS1*, *GmGSTD2*, *GmGSTE5* and *GmGSTE4* showed high similarity with those of *Cydia pomonella*, with a similarity of 69.12%~89.66%. According to sequence alignment, the conserved amino acids at the G-site and H-site of *GmGSTD2* were identical to the GSTs related to imidacloprid metabolism in *Nilaparvata lugens* and *Bemisia tabaci*. Imidacloprid could form stable hydrogen bonds with ARG-66 at the G-site and TYR-112 at the H-site of *GmGSTD2*, and with LEU-45 at the G-site and

基金项目: 山西省自然科学研究面上项目(202103021224153), 国家现代农业产业技术体系(CARS-28-19), 山西农业大学植物保护学院“植保先锋”项目(2021ZBXF012)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: guoyq1979@163.com

收稿日期: 2022-07-17

LYS-123 at the H-site of GmGSTE3. The expression of *GmGSTD2* and *GmGSTE3* in *G. molesta* was significantly higher than that of the control after imidacloprid treatment. It indicated that *GmGSTD2* and *GmGSTE3* were the key GST genes for metabolizing imidacloprid in *G. molesta*.

Key words: *Grapholita molesta*; glutathione S-transferases; imidacloprid; molecular docking; quantitative real-time PCR (qPCR)

梨小食心虫 *Grapholita molesta* 属鳞翅目卷蛾科, 是一种世界性害虫, 在我国广泛分布, 主要为害桃和梨等果树, 尤以桃梨混栽果园发生最重, 造成了巨大的经济损失(Chen et al., 2020; Sarker et al., 2021)。梨小食心虫的发生代数受气候影响较大, 北方地区1年发生3~4代, 南方地区1年发生4~6代(胡雅辉等, 2009)。目前, 化学防治仍是梨小食心虫的主要防治方法, 但长期使用化学药剂不仅会降低梨小食心虫对药剂的敏感度(韩慧等, 2019), 而且会使梨小食心虫产生不同程度的抗药性(Guo et al., 2017; Monteiro et al., 2020), 造成环境和果品中农药残留(Pang et al., 2020; Zhang et al., 2022)。吡虫啉是新烟碱类杀虫剂, 具有广谱、高效和低毒等特点, 对害虫有触杀、胃毒和内吸等多重作用, 通过作用于中枢神经系统的乙酰胆碱受体使害虫神经传导受阻而麻痹死亡(Tomizawa & Casida, 2005)。吡虫啉作为果园中常用的杀虫剂之一, 其在梨小食心虫体内的代谢鲜有报道。

谷胱甘肽 S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)是超基因家族酶, 在动物、植物和微生物中广泛存在(Hayes et al., 2005), 是代谢解毒过程中的重要解毒酶系之一。昆虫体内的GST可以分为2类, 微粒体GST与细胞质GST, 而细胞质GST可分为6个家族(Delta、Epsilon、Omega、Sigma、Theta和Zeta)和一个未分类家族(Enayati et al., 2005)。GST的N端包含1个还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)结合位点(G位点), 在C端包含1个疏水性底物结合位点(H位点), 这也决定了其功能的多样性。GST作为一种II相代谢酶可以催化体内GSH与某些内源或外源性有害物质的亲电基团反应, 使有毒物质更容易排出体外(Hayes & Pulford, 1995)。除解毒功能外某些GST还参与气味分子的降解(Li et al., 2018)、蜕皮激素的合成(Enya et al., 2015)以及氧化应激反应(Liao et al., 2016)。许多昆虫的GST在抗药性中起着重要作用(Pavlidi et al., 2018), 如烟粉虱 *Bemisia tabaci* 的GST在对丁醚脲、吡虫啉和噻虫嗪的抗性中起作用; 棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 的GST在对毒死蜱的抗性中起作用; 小菜蛾 *Plutella xylostella* 的GST在对毒死蜱和氟虫腈的抗性中起作用; 褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 的GST在对吡虫啉的抗性中

起作用(Yang et al., 2020)。

为了探究GST在梨小食心虫代谢吡虫啉中的作用, 本研究通过前期构建的吡虫啉处理后的梨小食心虫转录组数据库筛选GST基因, 同时通过生物信息学分析、分子对接和表达谱分析进一步筛选可能与吡虫啉代谢相关的GST靶标基因, 筛选梨小食心虫代谢吡虫啉过程中的关键GST基因, 以期为进一步研究梨小食心虫GST参与吡虫啉代谢过程及其作用机理提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试昆虫: 梨小食心虫采集自山西省太谷县桃林中, 于山西农业大学生物安全与生物防治研究基地的温度(26±1)℃、相对湿度70%~80%、光照周期15 L:9 D的人工气候箱内饲养多代, 幼虫用人工饲料(杜鹃等, 2010)饲养, 成虫用10%蜂蜜水饲喂。

试剂和仪器: RNAiso Plus 总RNA提取试剂、PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser去除基因组DNA反转录试剂盒, 日本TaKaRa公司; ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix, 南京诺唯赞生物科技有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。MGC-450HP人工气候箱, 上海一恒科技有限公司; Bio-Drop μLite超微量分光光度计, 英国BioDrop公司; 7500荧光定量PCR仪, 美国赛默飞世尔科技公司; PDB-R温控金属浴, 北京鼎昊源科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 梨小食心虫GST的筛选和生物信息学分析

基于本课题组前期构建的不同亚致死浓度吡虫啉处理后的梨小食心虫转录组数据库(数据未发表), 通过与Nr数据库比对注释获得大量重复GST基因, 进一步去除重复基因后获得梨小食心虫GST。对筛选到的梨小食心虫GST使用NCBI ORF finder工具(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)查找其开放阅读框(open reading frame, ORF), 通过BLASTp工具(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)对其进行比对。使用ExPASy-ProtParam工具(<https://web.expasy.org/protparam/>)对GST各项理化性质进行分析。使用SingalP-6.0 Server工具(<https://services.health>-

tech.dtu.dk/service.php?SignalP)预测其信号肽。使用TMHMM 2.0在线工具(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>)预测蛋白质的跨膜区域。使用ExPASy-PortScale工具(<https://web.expasy.org/protscale/>)预测蛋白质的亲疏水性。使用SOPMA在线工具(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=NPSA/npsa_sopma.html)对蛋白质的二级结构进行预测。使用SWISS-MODEL工具(<https://swissmodel.expasy.org/interactive/>)进行蛋白质三级结构建模。从GenBank中下载83条其他昆虫的GST序列,与本研究筛选到的梨小食心虫GST序列进行系统发育分析,使用MEGA 7.0软件以邻接法构建系统发育树(Kumar et al., 2016),共重复检验1 000次。使用DNAMAN软件对梨小食心虫GST序列与烟粉虱及褐飞虱代谢吡虫啉的关键GST序列(He et al., 2018; Yang et al., 2020)进行比对。

1.2.2 梨小食心虫GST与吡虫啉的分子对接方法

使用在线服务器Swiss-Model对梨小食心虫GST进行同源建模。配体分子吡虫啉的3D模型从Pubchem(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库下载。使用pymol软件对蛋白质和吡虫啉的构象进行优化。使用AutoDockTools 1.5.7软件准备分子对接的配置文件,使用vina进行分子对接,参数exhaustiveness设置为100,其余参数均为默认值,使用pymol作图并分析结果。最后以烟粉虱代谢吡虫啉的关键GST——BtGSTD7为标准对梨小食心虫GST进行筛选。

1.2.3 吡虫啉对梨小食心虫GST的诱导表达分析

从不同亚致死浓度LC₁₀、LC₃₀和LC₅₀(17.638、

163.323和762.986 μg/mL)吡虫啉处理后的梨小食心虫转录组数据库(未发表数据)中分别导出GST的每千碱基每百万碱基对序列的片段数(fragments per kilobase per millions base pairs sequenced, FPKM),还包括对照组(丙酮),每个处理均设有3次生物学重复,通过分析比较FPKM值来筛选梨小食心虫代谢吡虫啉的关键GST。

选取24 h内新羽化的梨小食心虫成虫,将LC₁₀、LC₃₀和LC₅₀的吡虫啉通过药膜法对其进行处理,以丙酮处理作为对照,处理24 h后每个处理随机取7头存活的梨小食心虫(1个生物学重复)用液氮速冻,备用。参照RNAiso Plus说明书进行各处理样品总RNA的提取,利用超微量分光光度计分别测定总RNA的纯度与浓度,取A₂₆₀/A₂₈₀值介于1.8~2.0的总RNA按照PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser说明书合成cDNA并作为模板备用,每个处理3个生物学重复。利用Beacon Designer 7软件设计特异性引物(表1),以梨小食心虫β-actin和β-tubulin为内参基因进行实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, qPCR)。本研究所有引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。20 μL qPCR反应体系:2×ChamQ Universal SYBR® qPCR Master Mix 10 μL、10 μmol/L上下游引物各0.4 μL、ddH₂O 8.2 μL、cDNA模板1 μL。qPCR反应程序:95 °C预变性3 min;95 °C变性10 s,不同引物在相应退火温度下(表1)退火30 s,72 °C延伸30 s,共40个循环。采用2^{-ΔΔCt}法计算不同亚致死浓度吡虫啉诱导后梨小食心虫GST的相对表达量(Livak & Schmittgen, 2001)。

表1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

基因 Gene	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	退火温度 Annealing temperature/°C	扩增产物长度 Amplification product/bp
β-actin	F: AAATAGGGAAAGTGAAAGTC, R: ATGTGCTGAAACGGATAAGA	60	228
β-tubulin	F: AGTCGTTCCATTTCACCTA, R: AGCAAGACAGTGGTAAGCAT	60	116
GmGSTE1	F: TTGATAGTGGCAACCTCTT, R: GGAACCTCTCAGCAAACTC	57	129
GmGSTE2	F: GATAGAGAATTGATATTGAACCG, R: TCAGAACCGGTACAGATG	57	187
GmGSTE3	F: TCCGTGAAGTTGATGTGA, R: TGCCATGTAAGTCGCTAT	59	143
GmGSTE4	F: AGCACCCAGCACCTATATC, R: CGATAAGTAAGCCTCCAATG	59	197
GmGSTE5	F: GTGGAAGGAAACAAGGAAAT, R: ACAAGTAACAAGAGGCTAGT	55	164
GmGSTE6	F: TGCTATAATCCTGTACCT, R: TCGAATATGTCCTTCTTG	60	198
GmGSTE7	F: CCGATGATGCCAAGATTG, R: TTCAGCCTGTCTAACCAT	59	196
GmGSTS1	F: TTATTAAGGAGACCGATGCT, R: CAGTACCGAGGAACAAGT	59	192
GmGSTS2	F: CGGAGAAGACTTGAATGA, R: CTCTGGTCGATGAGGAAG	60	198
GmGSTD1	F: AAGGCTCTAACGTCACA, R: GTTGGCGAGGTAGGTAAT	58	165
GmGSTD2	F: TTACCGTAGCCGACATTA, R: TTIGCCCTCTCATACCAT	57	106
GmGSTD3	F: GCCATCGCTTGTATCTC, R: GATTCCCTGATTCCGTCTC	59	179

1.3 数据分析

使用GraphPad Prism 9.0软件对试验数据进行处理,采用SPSS 26软件进行单因素方差分析,应用Duncan氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 梨小食心虫GST的生物信息学分析

通过对吡虫啉处理的梨小食心虫转录组数据库进行搜索,共筛选到17个GST基因,根据命名法命名为GmGSTE1~GmGSTE7、GmGSTD1~GmGSTD3、GmGSTZ1、GmGSTZ2、GmGSTO1、GmGSTS1、GmGSTS2、GmGSTT1和GmGSTU1。BLASTp比对结果显示,有2个GST基因比对到了梨小食心虫,有1个GST基因比对到了海灰翅夜蛾*Spodoptera littoralis*,其余14个GST基因均比对到了苹果蠹蛾*Cydia pomonella*,且比对的相似度在65.07%~100.00%之间,其中GmGSTS1、GmGSTD2、GmGSTE5和GmGSTE4与苹果蠹蛾GST的相似度高达69.12%~89.66%(表2)。所有17个GST基因的ORF长度在612~903 bp之间,编码的氨基酸个数在203~300之间,编码的蛋白质相对分子质量在23.25~34.05 kD之间。理化性质预测结果显示,17个GST的理论等电点在7左右,属于中性或弱酸弱碱性;不稳定系数在24~52之间,脂肪系数均在75以上,属于热稳定蛋白;亲疏水性预测结果和总平均疏水性分析结果

显示,除GmGSTE5有微弱疏水性外,其余16个GST全部为亲水性;信号肽预测结果显示所有17个GST都没有信号肽;跨膜结构预测显示所有17个GST均为非跨膜蛋白;17个GST的二级结构以 α 螺旋为主,占比为38.00%~54.68%,此外还构建了蛋白质的三维模型,每个蛋白质均由2个同源二聚体组成。

将褐飞虱及烟粉虱代谢吡虫啉相关GST的氨基酸序列进行比对,发现GST的G位点和H位点均有保守的氨基酸序列,按照从N端到C端的顺序,G位点的保守氨基酸有酪氨酸、亮氨酸、脯氨酸、甘氨酸、丝氨酸、丙氨酸、异亮氨酸和酪氨酸;H位点的保守氨基酸有苯丙氨酸、丙氨酸、天冬氨酸、赖氨酸、酪氨酸和异亮氨酸;通过与褐飞虱及烟粉虱代谢吡虫啉相关GST的氨基酸序列进行比对,发现梨小食心虫GmGSTD2的G位点、H位点的保守氨基酸与褐飞虱及烟粉虱代谢吡虫啉相关GST的氨基酸序列完全一致;GmGSTD1的G位点的保守氨基酸与褐飞虱及烟粉虱代谢吡虫啉相关GST的氨基酸序列完全一致,H位点的保守氨基酸仅有1个异亮氨酸的差异;还有10个GST虽然也有相似的G位点和H位点保守氨基酸,但是与褐飞虱及烟粉虱代谢吡虫啉相关GST的氨基酸序列不完全一致;而其他5个基因无法与这些代谢吡虫啉相关GST进行有效比对,后续不再对其进行分析。

表2 梨小食心虫GST基因的BLASTp比对

Table 2 Comparison of GST genes of *Grapholita molesta* using BLASTp

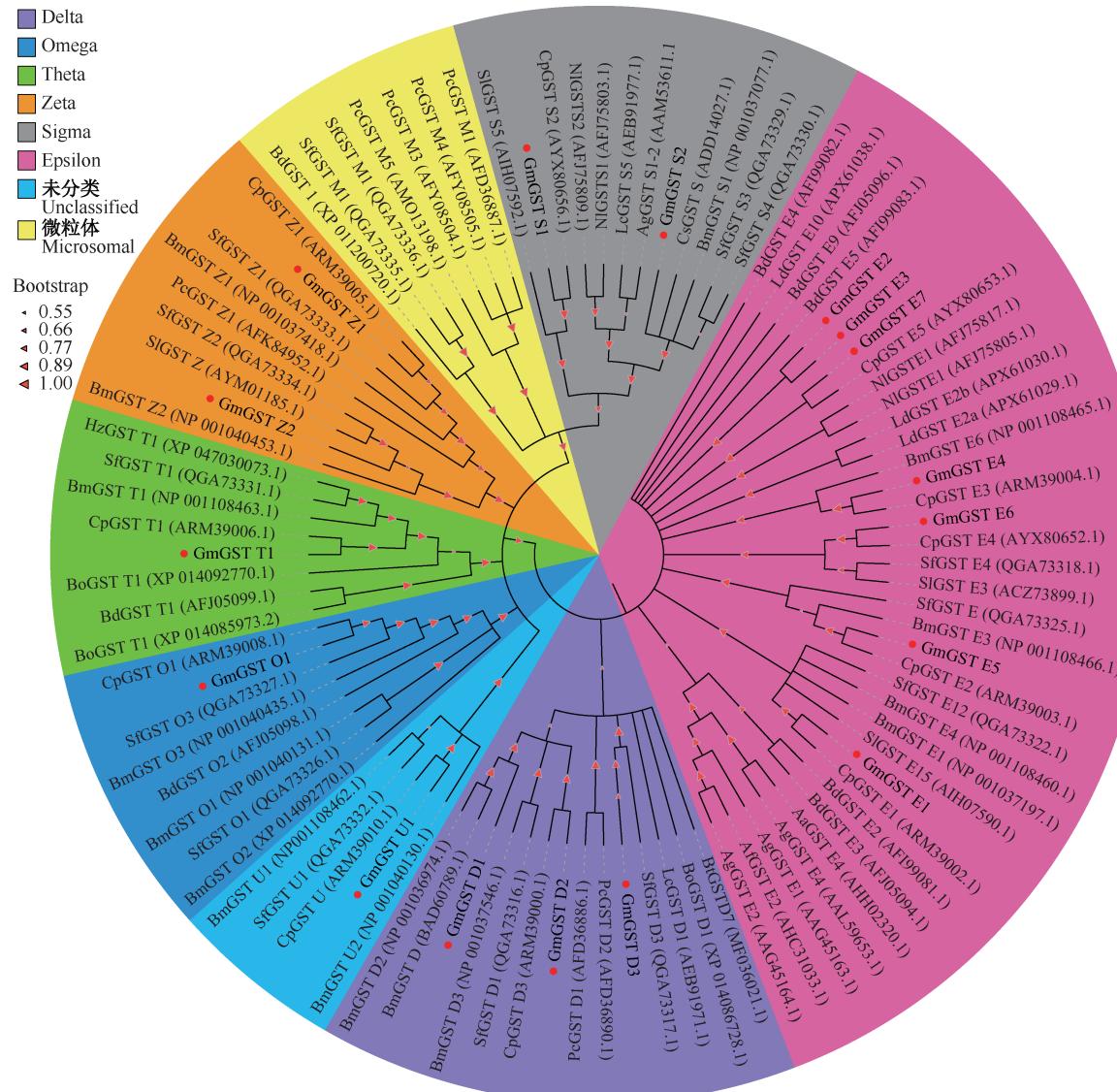
基因名称 Gene name	开放阅读框长度 ORF length/bp	NCBI比对相似度最高的蛋白 Best BLASTp match of NCBI					
		名称 Name	登录号 Accession no.	物种 Species	E值 E value	相似度 Identity/%	
GmGSTD1	636	GST 1	AVZ44716.1	梨小食心虫 <i>Grapholita molesta</i>	1×10^{-151}	100.00	
GmGSTE5	648	GST e2	ARM39003.1	苹果蠹蛾 <i>Cydia pomonella</i>	4×10^{-110}	69.77	
GmGSTS2	615	GST	AVX32553.1	梨小食心虫 <i>G. molesta</i>	3×10^{-148}	99.51	
GmGSTZ2	651	GST z	AYM01185.1	海灰翅夜蛾 <i>Spodoptera littoralis</i>	4×10^{-96}	65.07	
GmGSTU1	702	GST u	ARM39010.1	苹果蠹蛾 <i>C. pomonella</i>	9×10^{-163}	94.42	
GmGSTE3	903	GST like4	AYX80662.1	苹果蠹蛾 <i>C. pomonella</i>	1×10^{-159}	86.22	
GmGSTD3	660	GST u2	AYX80654.1	苹果蠹蛾 <i>C. pomonella</i>	3×10^{-142}	85.07	
GmGSTE1	657	GST e1	ARM39002.1	苹果蠹蛾 <i>C. pomonella</i>	2×10^{-112}	72.91	
GmGSTE6	699	GST e4	AYX80652.1	苹果蠹蛾 <i>C. pomonella</i>	8×10^{-144}	83.62	
GmGSTT1	687	GST t1	ARM39006.1	苹果蠹蛾 <i>C. pomonella</i>	1×10^{-147}	87.28	
GmGSTZ1	660	GST z1	ARM39005.1	苹果蠹蛾 <i>C. pomonella</i>	7×10^{-156}	100.00	
GmGSTE7	759	GST e5	AYX80653.1	苹果蠹蛾 <i>C. pomonella</i>	1×10^{-121}	68.85	
GmGSTD2	651	GST d3	ARM39000.1	苹果蠹蛾 <i>C. pomonella</i>	6×10^{-93}	69.12	
GmGSTS1	612	GST s2	AYX80656.1	苹果蠹蛾 <i>C. pomonella</i>	3×10^{-136}	89.66	
GmGSTE2	780	GST like3	AYX80660.1	苹果蠹蛾 <i>C. pomonella</i>	1×10^{-108}	76.53	
GmGSTO1	723	GST o1	ARM39008.1	苹果蠹蛾 <i>C. pomonella</i>	2×10^{-176}	98.75	
GmGSTE4	687	GST e3	ARM39004.1	苹果蠹蛾 <i>C. pomonella</i>	8×10^{-150}	88.60	

系统发育树结果显示,有7个GST为Epsilon家族,有3个GST为Delta家族,有2个GST为Zeta家

族,有1个GST为Omega家族,有2个GST为Sigma家族,有1个GST为Theta家族,有1个GST属于未

分类家族,未发现微粒体GST,并且这些GST与苹

果蠹蛾的亲缘性较高(图1)。



红色圆所示为本研究中的17个梨小食心虫GST。The red circle indicates the 17 GSTs of *Grapholita molesta* in this study.

图1 基于GST序列以邻接法构建梨小食心虫与其他物种的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of *Grapholita molesta* and other species based on GST sequences by neighbor-joining method

2.2 梨小食心虫GST与吡虫啉的分子对接分析

以烟粉虱代谢吡虫啉的关键GST——BtGSTD7为标准,吡虫啉分子与其G位点的SER-9、ARG-66和H位点的GLN-101可以形成稳定的氢键(图2),且结合能为-6.0 kcal/mol。有6个梨小食心虫GST与吡虫啉的结合能小于BtGSTD7,其中GmGSTE7、GmGSTD1、GmGSTD3、GmGSTE3、GmGSTD2和GmGSTE5与吡虫啉的结合能分别为-6.7、-6.3、-6.2、-6.1、-6.0和-6.0 kcal/mol。分子对接结果显示,吡虫啉分子与GmGSTE7蛋白G位点的SER-48、ASP-71和LEU-72, GmGSTD3蛋白H位点的ARG-115, GmGSTD1蛋白G位点的THR-71、

ASN-75和H位点的TYR-84, GmGSTE3蛋白G位点的LEU-45和H位点的LYS-123, GmGSTD2蛋白G位点的ARG-66和H位点的TYR-112, GSTE5蛋白H位点的ASN-111,均可以形成稳定的氢键(图2)。另外6个梨小食心虫GST与吡虫啉的结合能大于BtGSTD7,介于-5.9~-3.7 kcal/mol之间,吡虫啉分子与GmGSTE2蛋白G位点的SER-24、LEU-67和H位点的TYR-122、ARG-126, GmGSTS1蛋白H位点的ILE-159, GmGSTS2蛋白H位点的ALA-198, GmGSTE1蛋白G位点的GLU-44和ASN-45,均可形成稳定的氢键;而与GmGSTE4蛋白和GmGSTE6蛋白无法形成稳定的氢键。

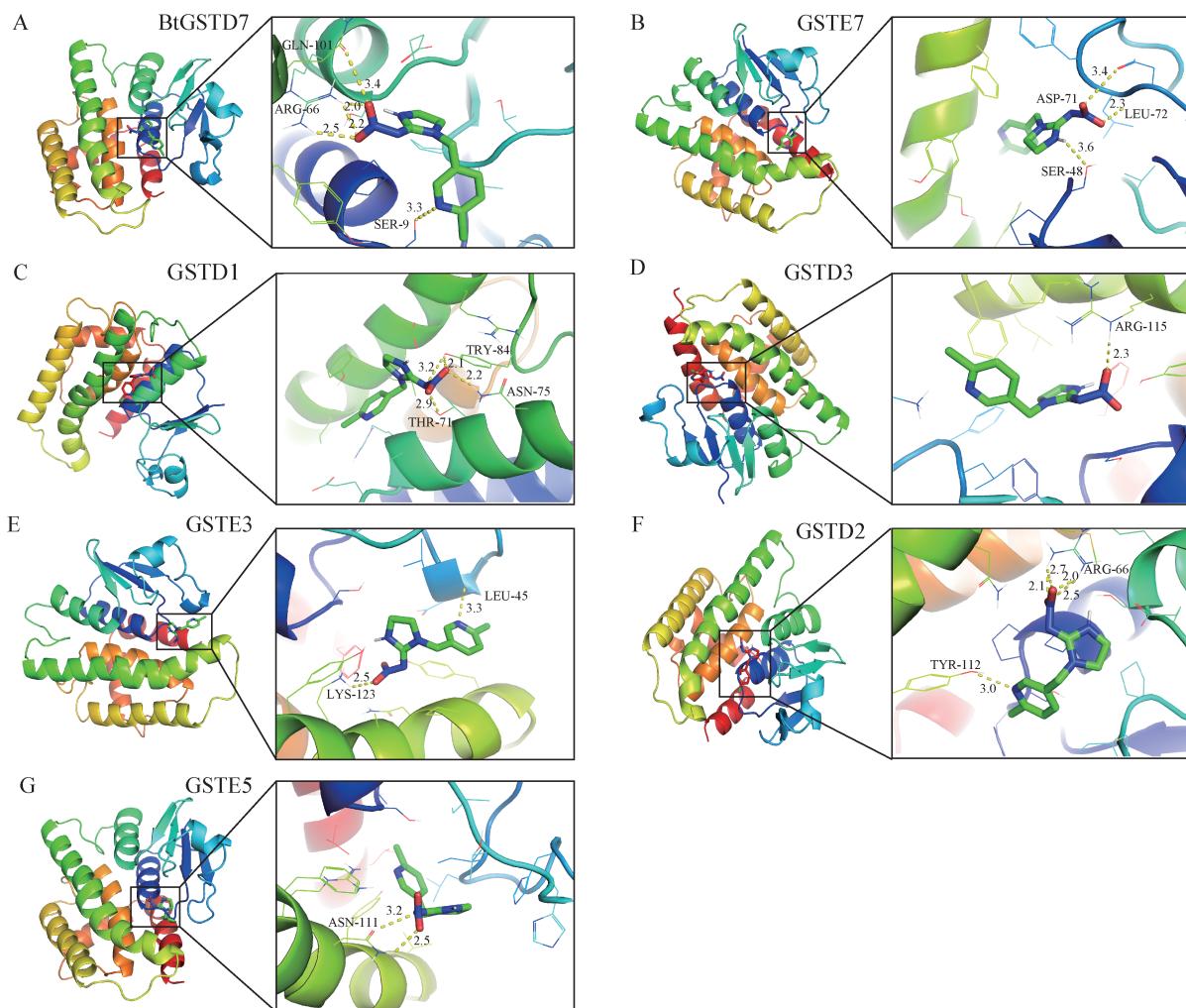


图2 梨小食心虫GST蛋白与吡虫啉的分子对接模型

Fig. 2 Molecular docking model for the GST proteins of *Grapholita molesta* and imidacloprid

2.3 梨小食心虫GST基因的诱导表达分析

qPCR检测结果显示, *GmGSTE1*的相对表达量在LC₁₀和LC₅₀处理下显著高于对照($P<0.05$), 在LC₃₀处理下的相对表达量虽然高于对照但差异不显著, 且与转录组FPKM分析结果趋势相同; *GmGSTE2*和*GmGSTE3*在LC₁₀处理下的相对表达量显著高于对照($P<0.05$); *GmGSTE4*和*GmGSTD2*的相对表达量在LC₅₀处理下显著高于对照($P<0.05$), 在LC₁₀和LC₃₀处理下也高于对照但差异不显著, 且与转录组FPKM分析结果趋势相同; *GmGSTE5*的相对表达量在LC₅₀处理下最高, 但与对照无显著差异, 且与转录组FPKM分析结果趋势相同; *GmGSTE6*和*GmGSTE7*的相对表达量在不同亚致死浓度吡虫啉处理后均呈上调趋势, *GmGSTE6*的相对表达量在LC₅₀处理下最高, *GmGSTE7*的相对表达量则在LC₃₀处理下最高, 但两者与对照均无显著差异, 且与转录组FPKM分析结果趋势相同; *GmGSTS1*的相对表达量在LC₁₀和LC₅₀处理下显著高于对照($P<0.05$), 且与转录组FP-

KM分析结果趋势相同; *GmGSTS2*和*GmGSTD1*的相对表达量在不同亚致死浓度吡虫啉处理后均呈现先上调后下调的趋势, 但与对照均无显著差异; *GmGSTD3*的相对表达量在LC₃₀和LC₅₀处理下呈现上调趋势, 但与对照无显著差异, 且与转录组FPKM分析结果趋势相同(图3)。不同亚致死浓度吡虫啉处理后的梨小食心虫GST转录组FPKM分析结果显示, *GmGSTD1*和*GmGSTE5*的表达量远高于其他基因, 其次是*GmGSTS2*、*GmGSTE3*、*GmGSTU1*和*GmGSTZ1*, 其余基因的表达量都相对较低。

3 讨论

GST作为经典的三大解毒酶系之一, 其功能的多样性被广泛研究, 其中对杀虫剂的解毒代谢研究最多(Kameyama et al., 1998; Pavlidi et al., 2018)。在橘小实蝇*Bactrocera dorsalis*中*BdGSTe2*、*BdGSTe3*、*BdGSTe4*和*BdGSTe9*被报道在代谢马拉硫磷的过程中起重要作用(Lu et al., 2016)。在棉铃虫中

*HaGST-8*参与了对有机磷农药的代谢(Labade et al., 2018)。在东亚飞蝗 *Locusta migratoria* 中 *LmGSTu1* 和 *LmGSTd1* 参与了对毒死蜱的解毒代谢, *LmGSTs5* 参与了对马拉硫磷的解毒代谢(Qin et al., 2013)。经 BLASTp 比对发现, 本研究中梨小食心虫 *GmGSTs2* 与 *GmolGST5*(李帅, 2018) 的相似度为 99.51%, 而李帅(2018)研究结果显示 *GmolGST5* 在梨小食心虫触角中高表达, 且重组的 *GmolGST5* 蛋白具有催化 1-氯-2,4-二硝基苯(1-chloro-2,4-dinitrobenzene, CDBN)的活性, 有解毒作用但未明确其可以解毒代谢哪些物质。在苹果蠹蛾中, 重组的 *CpGSTs2* 和 *CpGSTd3* 对 λ -三氯氟氰菊酯有结合活性和代谢能力(Hu et al., 2020a; Wang et al., 2019); 重组的 *CpGSTd4*、*CpGSTe2* 和 *CpGSTe3* 都有结合 λ -三氯氟氰菊酯的能力, 但是只

有重组的 *CpGSTe3* 有代谢 λ -三氯氟氰菊酯的能力(Hu et al., 2020b)。本研究中梨小食心虫 *GmGSTs1*、*GmGSTD2*、*GmGSTe5* 和 *GmGSTe4* 四个 GST 与上述苹果蠹蛾的 GST 有较高的相似性, 相似度为 69.12%~89.66%, 推测这些 GST 也可能参与梨小食心虫对杀虫剂的代谢。已有研究表明, GST 可以参与昆虫对吡虫啉的代谢, 例如, 在烟粉虱中, 干扰 *BtGSTd7* 后显著增加了吡虫啉处理后烟粉虱的死亡率(He et al., 2018); 在褐飞虱中, 干扰 *NlGSTs1*、*NlGSTs2* 和 *NlGSTe1* 后吡虫啉的 LC₅₀ 在 48、72 和 96 h 均显著下调(Yang et al., 2020)。本研究将梨小食心虫 GST 基因与这些代谢吡虫啉的 GST 基因进行比对, 锁定了 Epsilon、Delta 和 Sigma 三个家族的 12 个代谢吡虫啉的 GST 候选基因, 后续可对其进行更深入的研究。

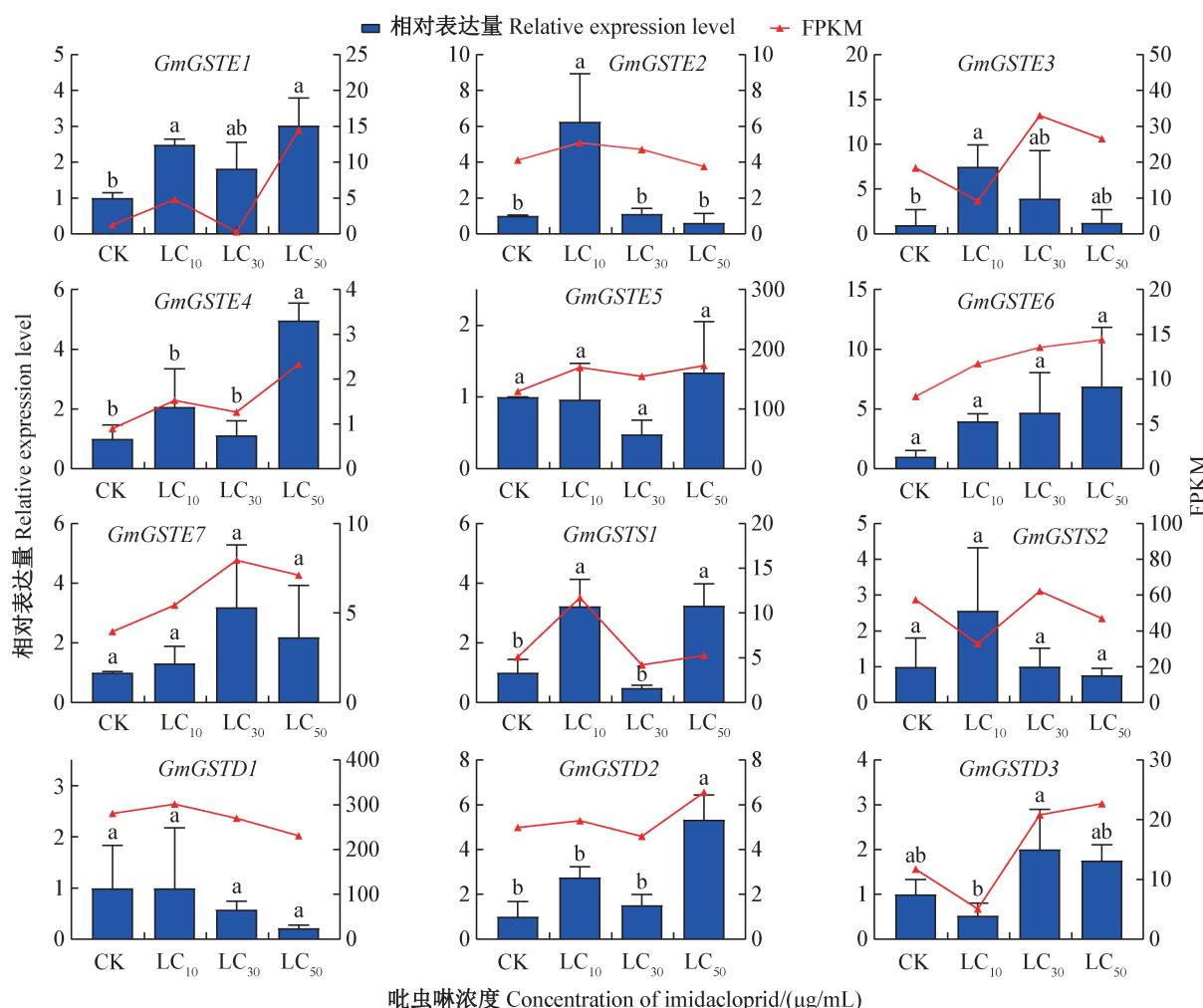


图3 不同亚致死浓度吡虫啉处理后梨小食心虫 GST 基因的相对表达量

Fig. 3 Relative expression levels of GST genes of *Grapholita molesta* after treatment with different sublethal concentrations of imidacloprid

图中数据为平均数±标准差。柱上不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验各处理间差异显著($P<0.05$)。Data are mean±SD. Different letters on the bars indicate significant difference among different treatments by Duncan's new range multiple test ($P<0.05$)。

不同种类GST的G位点均较保守,预示着它们功能的相似性,而同类的不同GST的H位点保守性不高,这也决定了它们结合底物的多样性和特异性(Wilce & Parker, 1994; Yamamoto et al., 2012)。本研究结果显示,12个候选的GST和代谢吡虫啉的GST均有保守的G位点和H位点,此外GmGSTD2具有与代谢吡虫啉相关的GST完全一致的保守序列,这也预示着其在梨小食心虫代谢吡虫啉中可能拥有同样的作用。H位点与G位点相邻,可以组成一个完整的催化活性位点和催化单元(Luo et al., 2002)。本研究分子对接结果显示,梨小食心虫GmGSTD2、GmGSTD1、GmGSTE2和GmGSTE3的G位点、H位点的氨基酸在结合吡虫啉过程中存在相互作用,而GmGSTD3、GmGSTE5、GmGSTS1和GmGSTS2仅有H位点的氨基酸在结合吡虫啉过程中存在相互作用,GmGSTE7和GmGSTE1仅有G位点的氨基酸在结合吡虫啉的过程中存在相互作用。单个氨基酸的改变往往会导致解毒酶对杀虫剂代谢能力的改变(李欣莲等,2022; Shi et al., 2022);结合能越小表示蛋白与药剂分子的结合能力越高,本研究中有6个GST与吡虫啉分子的结合能力大于等于BtGSTD7,按照结合能力从高到低的排序为GmGSTE7>GmGSTD3>GmGSTD1>GmGSTE3>GmGSTD2=GmGSTE5,今后可对这些基因的时空表达特异性开展进一步的研究。

梨小食心虫GST的诱导表达分析结果显示,在转录组数据中所有GST经过不同亚致死浓度的吡虫啉处理后均未表现出显著差异;而qPCR检测结果显示GmGSTE1、GmGSTE2、GmGSTE3、GmGSTE4、GmGSTS1和GmGSTD2六个GST基因都可以被吡虫啉显著诱导,转录组分析数据也支持这一点,而其他基因的表达量虽有上升但均与对照无显著差异。推测原因可能是供试梨小食心虫对吡虫啉产生较高的代谢能力,通过吡虫啉对梨小食心虫的室内毒力测定数据(未发表),以及与其他梨小食心虫种群生物测定数据的比较可以明确这一点(杜恩强等,2019;庾琴等,2020)。

本研究从不同亚致死浓度吡虫啉处理的梨小食心虫转录组数据库中筛选到17个GST,与本课题组前期构建的梨小食心虫不同龄期混合样本的转录组数据库(Guo et al., 2017)相比较,其中有5个为新发现的GST;并最终筛选出代谢吡虫啉的8个候选基因GmGSTE7、GmGSTD3、GmGSTD1、GmGSTE5、GmGSTE2、GmGSTE4、GmGSTS1和GmGSTE1,以及2个关键基因GmGSTD2和GmGSTE3。后续研究中将

通过吡虫啉诱导分析这些候选基因对其的响应,进一步筛选关键GST基因,并探究这些关键GST基因对吡虫啉的代谢能力与代谢机制。

参考文献(References)

- Chen LH, Tian K, Xu XL, Fang AA, Cheng WN, Wang GR, Liu W, Wu JX. 2020. Detecting host-plant volatiles with odorant receptors from *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(9): 2711–2717
- Du EQ, Yu Q, Feng YT, Guo XJ, Guo GM, Zhang RX. 2019. Killing function of 5 kinds of pesticides against *Grapholita molesta* (Busck) and inhibition of its oviposition. *China Plant Protection*, 39(1): 57–60 (in Chinese) [杜恩强, 庾琴, 封云涛, 郭晓君, 郭贵明, 张润祥. 2019. 5种农药对梨小食心虫成虫杀灭及产卵抑制作用. 中国植保导刊, 39(1): 57–60]
- Du J, Wang YR, Wu JX. 2010. Effect of four different artificial diets on development and reproduction of *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Shanxi Agricultural University (Natural Science Edition)*, 30(3): 228–231 (in Chinese) [杜娟, 王艳蓉, 仵均祥. 2010. 不同饲料配方对梨小食心虫生长发育及繁殖的影响. 山西农业大学学报(自然科学版), 30(3): 228–231]
- Enayati AA, Ranson H, Hemingway J. 2005. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Molecular Biology*, 14(1): 3–8
- Enya S, Daimon T, Igarashi F, Kataoka H, Uchibori M, Sezutsu H, Shionoda T, Niwa R. 2015. The silkworm glutathione S-transferase gene *nopperra-bo* is required for ecdysteroid biosynthesis and larval development. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 61: 1–7
- Guo YQ, Chai YP, Zhang LJ, Zhao ZG, Gao LL, Ma RY. 2017. Transcriptome analysis and identification of major detoxification gene families and insecticide targets in *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Insect Science*, 17(2): 43
- Han H, Mao RQ, Zhao ZG, Zhang LJ, Gao LL, Guo YQ. 2019. Indoor toxicity of three types of insecticides against *Grapholita molesta* Busck. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 47(8): 1470–1473 (in Chinese) [韩慧, 毛瑞卿, 赵志国, 张利军, 高玲玲, 郭艳琼. 2019. 3种不同类型杀虫剂对梨小食心虫的室内毒力测定. 山西农业科学, 47(8): 1470–1473]
- Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. 2005. Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45: 51–88
- 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. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 30(6): 445–600
- He C, Xie W, Yang X, Wang SL, Wu QJ, Zhang YJ. 2018. Identification of glutathione S-transferases in *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) and evidence that GSTd7 helps explain the difference in insecticide susceptibility between *B. tabaci* Middle East-Minor Asia 1 and Mediterranean. *Insect Molecular Biology*, 27(1): 22–35
- Hu C, Wang W, Ju D, Chen GM, Tan XL, Mota-Sanchez D, Yang XQ. 2020b. Functional characterization of a novel λ -cyhalothrin me-

- tabolizing glutathione S-transferase, CpGSTe3, from the codling moth *Cydia pomonella*. Pest Management Science, 76(3): 1039–1047
- Hu C, Wei ZH, Li PR, Harwood JD, Li XY, Yang XQ. 2020a. Identification and functional characterization of a sigma glutathione S-transferase *CpGSTs2* involved in λ -cyhalothrin resistance in the codling moth *Cydia pomonella*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 68(45): 12585–12594
- Hu YH, Zhang XF, Zhang QW, Zhao ZW. 2009. The occurrence regulation and control of the summer fruit tortrix moth (*Adoxophyes orana*) and oriental fruit moth (*Grapholita molesta*) in peach orchard. Chinese Bulletin of Entomology, 46(5): 727–731 (in Chinese) [胡雅辉, 张夏芳, 张青文, 赵章武. 2009. 梨小食心虫和苹小卷叶蛾在桃园的发生规律与防治. 昆虫知识, 46(5): 727–731]
- Kameyama M, Isogai S, Kosugi E. 1998. Glutathione S-transferase (GST). Japanese Journal of Clinical Medicine, 56(S3): 390–394
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology and Evolution, 33(7): 1870–1874
- Labade CP, Jadhav AR, Ahire M, Zinjarde SS, Tamhane VA. 2018. Role of induced glutathione-S-transferase from *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) HaGST-8 in detoxification of pesticides. Ecotoxicology and Environmental Safety, 147: 612–621
- Li GW, Chen XL, Xu XL, Wu JX. 2018. Degradation of sex pheromone and plant volatile components by an antennal glutathione S-transferase in the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* Busck (Lepidoptera: Tortricidae). Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 99(4): e21512
- Li S. 2018. Cloning, prokaryotic expression and enzymatic characteristics of the glutathione-S-transferase GmGST5 and GmGST6 in *Grapholita molesta* Busck. Master thesis. Yangling: Northwest A&F University (in Chinese) [李帅. 2018. 梨小食心虫谷胱甘肽-S-转移酶GmGST5和GmGST6的基因克隆、原核表达与酶学特征分析. 硕士学位论文. 杨凌: 西北农林科技大学]
- Li XL, Qi YX, Lu YY. 2022. Advances for the metabolic detoxification genes in major Tephritidae species. Journal of Plant Protection, 49(1): 351–365 (in Chinese) [李欣莲, 齐易香, 陆永跃. 2022. 重大实蝇类昆虫解毒代谢基因的研究进展. 植物保护学报, 49(1): 351–365]
- Liao CY, Xia WK, Feng YC, Li G, Liu H, Dou W, Wang JJ. 2016. Characterization and functional analysis of a novel glutathione S-transferase gene potentially associated with the abamectin resistance in *Panonychus citri* (McGregor). Pesticide Biochemistry and Physiology, 132: 72–80
- 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 X, Wang LL, Huang Y, Dou W, Chen CT, Wei D, Wang JJ P. 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 & Pharmacology, 180: 40–48
- Luo JK, Hornby JA, Wallace LA, Chen J, Armstrong RN, Dirr HW. 2002. Impact of domain interchange on conformational stability and equilibrium folding of chimeric class micro glutathione transferases. Protein Science, 11(9): 2208–2217
- Monteiro LB, Witt LG, Guioloski IC, dos Santos RSS, Silva de Assis HC. 2020. Evaluation of resistance management for the oriental fruit moth (Lepidoptera: Tortricidae) to insecticides in Brazilian apple orchards. Journal of Economic Entomology, 113(3): 1411–1418
- Pang S, Lin Z, Zhang Y, Zhang W, Alansary N, Mishra S, Bhatt P, Chen S. 2020. Insights into the toxicity and degradation mechanisms of imidacloprid via physicochemical and microbial approaches. Toxics, 8(3): e65
- Pavlidi N, Vontas J, van Leeuwen T. 2018. The role of glutathione S-transferases (GSTs) in insecticide resistance in crop pests and disease vectors. Current Opinion in Insect Science, 27: 97–102
- 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
- Sarker S, Woo YH, Lim UT. 2021. Developmental stages of peach, plum, and apple fruit influence development and fecundity of *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae). Scientific Reports, 11: 2105
- Shi Y, Sun S, Zhang YJ, He YS, Du MH, ÓReilly AO, Wu SW, Yang YH, Wu YD. 2022. Single amino acid variations drive functional divergence of cytochrome P450s in *Helicoverpa* species. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 146: 103796
- Tomizawa M, Casida JE. 2005. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 45: 247–268
- Wang W, Hu C, Li XR, Wang XQ, Yang XQ. 2019. CpGSTd3 is a lambda-cyhalothrin metabolizing glutathione S-transferase from *Cydia pomonella* (L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 67(4): 1165–1172
- Wilce MCJ, Parker MW. 1994. Structure and function of glutathione S-transferases. Biochimica et Biophysica Acta: Protein Structure and Molecular Enzymology, 1205(1): 1–18
- Yamamoto K, Usuda K, Kakuta Y, Kimura M, Higashiura A, Nakagawa A, Aso Y, Suzuki M. 2012. Structural basis for catalytic activity of a silkworm delta-class glutathione transferase. Biochimica et Biophysica Acta: General Subjects, 1820(10): 1469–1474
- Yang BJ, Lin XM, Yu N, Gao HL, Zhang YX, Liu W, Liu ZW. 2020. Contribution of glutathione S-transferases to imidacloprid resistance in *Nilaparvata lugens*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 68(52): 15403–15408
- Yu Q, Du EQ, Guo XJ, Feng YT, Zhang RX. 2020. Toxicity of six insecticides and their mixtures to the neonate larvae of *Grapholita molesta* (Busck) and their field control effects. Plant Protection, 46(5): 265–269 (in Chinese) [庾琴, 杜恩强, 郭晓君, 封云涛, 张润祥. 2020. 不同杀虫剂及其组合对梨小食心虫初孵幼虫的毒力及田间防效. 植物保护, 46(5): 265–269]
- Zhang HJ, Tao LM, Liu X, Zhou XG, Huang XZ. 2022. Current status and challenges of pesticide management in China. Journal of Plant Protection, 49(1): 398–406

(责任编辑:李美娟)