紫外线、高压静电和大麦黄矮病毒胁迫下荻草谷网蚜SOD基因表达

刘志伟 柳 欣 董 尧 罗 晨 胡祖庆*

（西北农林科技大学植物保护学院，旱区作物逆境生物学国家重点实验室，陕西 杨凌 712100）

摘要：为探索环境胁迫影响昆虫适合度的内在机制，通过cDNA末端快速扩增（rapid amplification of cDNA end，RACE）技术克隆得到荻草谷网蚜*Sitobion miscanthi*体内超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）基因*MnSOD*和*CuZnSOD*的cDNA序列全长，对该序列进行分析，检测紫外线、高压静电和大麦黄矮病毒（barley yellow dwarf virus，BYDV）胁迫下荻草谷网蚜体内*MnSOD*和*CuZnSOD*基因表达量的变化。结果显示，荻草谷网蚜体内*MnSOD*和*CuZnSOD*基因的cDNA序列全长分别为1 517 bp和954 bp（GenBank登录号分别为MT533627和MT533626），开放阅读框分别为669 bp和459 bp，分别编码222个和152个氨基酸，预测蛋白质相对分子量分别为24.99 kD和15.84 kD。荻草谷网蚜体内MnSOD和CuZnSOD蛋白均与半翅目蚜科昆虫同源蛋白氨基酸序列相似性高，亲缘关系最近。0.50 mW/cm^2（低强度）和0.70 mW/cm^2（高强度）紫外线胁迫下荻草谷网蚜体内*MnSOD*基因相对表达量显著上调，分别为对照的2.55倍和1.40倍，高压静电和BYDV胁迫下荻草谷网蚜体内*MnSOD*基因相对表达量显著下调，分别为对照的32%和14%；但低强度和高强度紫外线胁迫下荻草谷网蚜体内*CuZnSOD*基因相对表达量均较对照无显著变化，高压静电和BYDV胁迫下荻草谷网蚜体内*CuZnSOD*基因相对表达量均显著下调，分别为对照的51%和20%。表明SOD基因在荻草谷网蚜适应紫外线、高压静电和BYDV三种环境胁迫中发挥着重要作用。

关键词：荻草谷网蚜；超氧化物歧化酶；MnSOD；CuZnSOD；基因克隆；环境胁迫；基因表达

Gene expression analysis of SOD gene under stresses of ultraviolet radiation, high-voltage electrostatic field and barley yellow dwarf virus in Indian grain aphid *Sitobion miscanthi*

Liu Zhiwei Liu Xin Dong Yao Luo Chen Hu Zuqing*

（State Key Laboratory of Crop Stress Biology in Arid Areas, College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi Province, China）

Abstract: In order to explore the internal mechanism of environmental stress affecting insect fitness, rapid amplification of cDNA end (RACE) technology was used to obtain the full-length of cDNA sequences of superoxide dismutase (SOD) genes (*MnSOD* and *CuZnSOD*) in Indian grain aphid *Sitobion miscanthi*. Then, based on bioinformatics analysis, the expression levels of *MnSOD* and *CuZnSOD* genes under the stress of ultraviolet radiation (UV) treatment, high-voltage static electrostatic treatment, or plant virus infection by barley yellow dwarf virus (BYDV) were detected. Cloning results showed that the full lengths of *MnSOD* and *CuZnSOD* cDNAs in *S. miscanthi* were 1 517 and 954 bases (GenBank accession nos. MT533627 and MT533626), with an open reading frame of 669 and 459 bases, en-

基金项目：国家重点研发计划（2018YFD0200402），国家自然科学基金（31401735）

* 通信作者（Author for correspondence），E-mail：huzuqing@nwsuaf.edu.cn

收稿日期：2021-02-07

coding 222 and 152 amino acid residues, respectively. The molecular weights of the predicted proteins were 24.99 kD and 15.84 kD, respectively. *MnSOD* and *CuZnSOD* in *S. miscanthi* had higher amino acid sequence identity and the closest relationship with their homologues from Aphididae of Hemiptera. Compared with the control, the expression level of *MnSOD* in *S. miscanthi* was increased by 255% under high-level UV treatment and 140% under low-level UV treatment, but decreased by 68% under high-voltage static electrostatic treatment and by 86% under BYDV infection. *CuZnSOD* in *S. miscanthi* had a reduced expression by 49% under high-voltage static electrostatic treatment and by 80% under BYDV infection, and no difference was observed under the stress of UV treatment. Therefore, superoxide dismutase might play an important role in the adaptation of *S. miscanthi* to the above three adverse environmental stresses.

Key words: *Sitobion miscanthi*; superoxide dismutase (SOD); MnSOD; CuZnSOD; gene cloning; environmental stress; gene expression

荻草谷网蚜*Sitobion miscanthi*是为害麦类农作物的一种农业重大害虫，是我国北方地区小麦蚜虫的优势种（杨益众等，1992）。在我国曾被误定为麦长管蚜*Sitobion avenae*，且目前仍在普遍沿用（Jiang et al.，2019）。外界环境胁迫对荻草谷网蚜的适合度有显著影响，如紫外线胁迫下荻草谷网蚜种群内禀增长率、净增殖率和繁殖力均显著降低（杜一民等，2014）。在模拟自然（同时对小麦和麦长管蚜进行高压静电场辐射处理）条件下，荻草谷网蚜种群参数、繁殖参数以及存活率均显著降低（李广雨等，2016）。荻草谷网蚜取食感染大麦黄矮病毒（barley yellow dwarf virus，BYDV）的大麦后，其若虫日均体重增长率、成蚜繁殖期和种群内禀增长率均显著增加，而成蚜繁殖后期则显著缩短（Hu et al.，2014）。本课题组前期研究发现紫外线辐射、高压静电和植物病毒胁迫下，荻草谷网蚜体内超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）的活性均显著变化（周冬等，2014；曹祝等，2016；仝则乾等，2019），但紫外线辐射、高压静电和植物病毒胁迫条件下荻草谷网蚜体内发生变化的SOD种类及机理尚不清楚。

需氧生物在自身生长代谢过程中会产生大量的氧自由基（reactive oxygen species，ROS），这些ROS因为含有未成对的电子容易在生物体内发生氧化还原反应，夺取其他正常部位的电子，从而影响其正常生理代谢，进而损害生物机体（Mittler et al.，2004）。生物体在长期进化过程中形成了抗氧化防御机制，用以降低ROS对机体的损伤（Mann & Keilin，1938）。SOD是生物体抗氧化酶防御系统中的首类，也是最重要的一类酶（Cross & Jones，1991）。根据活性中心结合的金属离子不同，SOD分为MnSOD、CuZnSOD、FeSOD和NiSOD（Youn et al.，1996）。在节肢动物门动物体内仅存在前2种SOD（高现龙，2013）。大量研究表明SOD在清除外界环境胁迫诱导生物体产生ROS的过程中发挥着重要作用（刘建业等，2017；汪伦记等，2019）。在昆虫研究方面，关于SOD适应农药胁迫的功能进行了广泛报道，例如烟粉虱*Bemisia tabaci*体内SOD可以消除由农药吡虫啉和氯虫苯甲酰胺引发的ROS（Li et al.，2021）；在农药胁迫条件下其他昆虫如中华蜜蜂*Apis cerana cerana*、二化螟*Chilo suppressalis*、舞毒蛾*Lymantria dispar*体内*MnSOD*基因表达出现上调（Jia et al.，2014；Tu et al.，2018；Zeng et al.，2019）；在中华稻蝗*Oxya chinensis*体内，敲除*MnSOD*或*CuZnSOD*基因均显著提高有机磷农药马拉硫磷和毒死蜱诱导的ROS含量，且这2种SOD的过表达均介导了对这2种杀虫剂的耐药性（Wu et al.，2017；2020）。但在紫外线辐射、高压静电、病毒、细菌和重金属等其他环境胁迫下，昆虫体内SOD活性变化仅进行了初步探索（孟琳钦等，2019；孔艳艳和赵惠燕，2021），如紫外线照射处理烟青虫*Helicoverpa assulta* 1、3、6、9和12 h后，随着照射时间延长，其体内SOD活性呈先升高再降低的变化趋势（张海玲和周正湘，2015）；麦长管蚜*Sitobion avenae*取食经4 kV/cm高压静电处理的小麦后，其体内SOD活性显著提高（曹祝等，2016）；褐飞虱*Nilaparvata lugens*取食感染南方水稻黑条矮缩病毒（southern rice black streaked dwarf virus，SRBSDV）的水稻植株后，其若虫和成虫体内SOD活性均比取食健康水稻植株的活性增加（陈晨等，2016），但关于紫外线辐射、高压静电、病毒和细菌等胁迫后昆虫体内SOD发生变化的具体种类和机理尚不清楚。

为探明紫外线辐射、高压静电和病毒胁迫下昆

虫体内SOD发生变化的种类及机理，本研究利用cDNA末端快速扩增（rapid amplification of cDNA ends，RACE）技术克隆得到荻草谷网蚜体内*MnSOD*和*CuZnSOD*基因的cDNA全长序列，并对其开放阅读框、蛋白质物理性质、蛋白结构域和系统发育关系等方面进行生物信息学分析，并进一步检测这3种胁迫下*MnSOD*和*CuZnSOD*基因的表达水平，以期为揭示紫外线辐射、高压静电和病毒环境胁迫条件下荻草谷网蚜体内生理生化变化机制及其影响昆虫适合度的内在机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试昆虫：于2018年在西北农林科技大学试验站（34°17'49" N，108°04'35" E）麦田内采集单头荻草谷网蚜成蚜，随后接入人工种植的矮抗58小麦幼苗上，并在温度（25±0.5）℃、相对湿度（60±10）%、光照周期16 L∶8 D的人工气候室内培养1年以上，形成单克隆系，每周更换1次新鲜的小麦幼苗，取若蚜和成蚜供试。

供试植物：小麦品种为矮抗58，由西北农林科技大学农学院陕西省作物杂种优势研究与利用重点实验室提供；小麦种子种植于直径为15 cm、高度为17.5 cm的花盆，花盆用顶端带有纱网的透明塑料笼罩罩住，放入人工气候室培养，条件同上，待长到2~3叶期时整株或叶片用于紫外线胁迫试验和高压静电胁迫试验。携带BYDV-GAV的矮抗58小麦苗由西北农林科技大学植物病毒学实验室吴云峰教授于2018年提供；在上述人工气候室内将10头24 h内孵化的荻草谷网蚜若蚜接到毒源小麦上取食72 h，使得蚜虫带毒，再将蚜虫全部转接到2~3叶期单株无毒小麦上，120 h后剔除蚜虫，此时的小麦为新的带毒小麦；此后每月重复上述操作，从而持续获得带毒小麦。不带毒小麦与带毒小麦同期处理，除用无毒小麦代替毒源小麦外，其余方法同带毒小麦处理方法；待BYDV胁迫试验开始时，选取刚剔除蚜虫的带毒小麦和不带毒小麦供试。

试剂和仪器：总RNA提取试剂盒，天根生化科技（北京）有限公司；SMARTer RACE 5′/3′试剂盒、SYBR Premix EX *Taq*™ II试剂盒、PrimeScript™ RT reagent试剂盒，宝生物工程（大连）有限公司；其他试剂均为国产分析纯。Mastercycler® nexus gradient PCR扩增仪，德国Eppendorf公司；Nano-200超微量核酸分析仪，杭州奥盛仪器有限公司；JY-SPDT平板电泳仪，北京君意东方电泳设备有限公司；ChampGel 5000自动凝胶成像分析仪，北京赛智创业科技有限公司；7500 Fast Real-Time PCR实时荧光定量PCR系统，美国赛默飞世尔科技公司；YZ10型UV-B紫外灯管、UVILEXTM 390 Z滤光器、Schott N-WG280滤光膜，上海荣波医疗科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 荻草谷网蚜SOD基因克隆与序列分析

取10头未受胁迫的无翅荻草谷网蚜成蚜，按照总RNA提取试剂盒说明书提取总RNA。用1%琼脂糖凝胶电泳和超微量核酸分析仪检测后，取1 μg总RNA为模板，按照SMARTer RACE 5′/3′ Kit试剂盒说明书使用反转录试剂盒PrimeScript™ RT reagent反转录合成第一链cDNA。

根据孔艳艳和赵惠燕（2021）前期获得的荻草谷网蚜*MnSOD*和*CuZnSOD*基因的cDNA保守区片段，利用Primer Premier 5.0软件设计5′/3′ RACE引物。以MnSOD 5′RACE（5′-GGATTAAATCCAAGCCAACCCCATCCTG-3′）、MnSOD 3′RACE（5′-TTGCTGTACAAGGTTCAGGATGGGGTTG-3′）、CuZnSOD 5′RACE（5′-GAGAGGTCCCGTAAGCGATATGATTGGA-3′）和CuZnSOD 3′RACE（5′-TCCAATCATATCGCTTACGGGACCTCTC-3′）为引物，按照SMARTer RACE 5′/3′Kit试剂盒说明书进行RACE的PCR扩增反应，所有引物均由西安擎科泽西生物科技有限责任公司合成。50 μL扩增体系：5′-或3′-RACE-Ready cDNA 2.5 μL、10×UPM 5 μL、10 μmol/L 5′或3′ GSP 1 μL、Master Mix 41.5 μL。其中5′ RACE扩增程序采用touchdown PCR：94℃预变性30 s；72℃延伸3 min，5个循环；94℃预变性30 s，70℃退火30 s，72℃延伸3 min，5个循环；94℃预变性30 s，68℃退火30 s，72℃延伸3 min，共25个循环，72℃延伸10 min。3′ RACE扩增程序同上。PCR产物经过电泳检测，切胶回收，连接转化测序。将测序得到的5′和3′末端序列使用DNAMAN 6.0软件进行组装。使用NCBI网站的ORF Finder在线工具（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html）查找序列信息中的开放阅读框；用ProtParam软件（https://web.expasy.org/protparam/）预测基因编码的蛋白及其物理性质；用SignalP 5.0软件进行信号肽分析；用TMHMM 2.0软件预测序列编码蛋白的跨膜结构域。

1.2.2 荻草谷网蚜SOD蛋白序列比对和系统进化分析

用NCBI网站的BLAST序列比对搜索同源蛋白，利用DNAMAN 6.0软件与已知的其他蚜虫SOD

蛋白进行同源序列比对。按照蛋白相似程度由高到低依次从NCBI网站选取下载了7种蚜虫的序列，即豌豆蚜 *Acyrthosiphon pisum* 的MnSOD（GenBank登录号为NP_001232977.1）和CuZnSOD（GenBank登录号为NP_001156243.1）、大豆蚜 *Aphis glycines* 的MnSOD（GenBank登录号为KAE9537288.1）、黑豆蚜 *Aphis craccivora* 的CuZnSOD（GenBank登录号为KAF0757738.1）、高粱蚜 *Melanaphis sacchari* 的MnSOD（GenBank登录号为XP_025203796.1）和CuZnSOD（GenBank登录号为XP_025198487.1）、桃蚜 *Myzus persicae* 的MnSOD（GenBank登录号为XP_022170321.1）和CuZnSOD（GenBank登录号为XP_022172661.1）、玉米缢管蚜 *Rhopalosiphum maidis* 的MnSOD（GenBank登录号为XP_026806837.1）和CuZnSOD（GenBank登录号为XP_026808835.1）、棉蚜 *Aphis gossypii* 的MnSOD（GenBank登录号为XP_027845357.1）和CuZnSOD（GenBank登录号为XP_027853371.1）。使用NCBI网站的BLAST序列比对搜索同源蛋白，分别下载17种昆虫MnSOD和16种昆虫CuZnSOD氨基酸序列，使用Mega 6.0软件采用邻接法构建系统发育树，重复抽样1 000次。

1.2.3 紫外线、高压静电和BYDV胁迫试验

参考赵贝（2019）方法进行紫外线胁迫试验。选用功率均为30 W的3支紫外灯管和2支普通日光灯管作为光源，每2支紫外灯管之间布置1支普通日光灯管，间距6 cm，以5支全部为普通日光灯管为对照，用滤光器去除普通日光灯管中的紫外线，紫外灯管用滤光膜使其只能透过紫外线B波段的光（波长为280~320 nm）；选取24 h内羽化的15头雌性无翅成蚜放到含有小麦叶片的单个培养皿中，培养皿上方分别盖上方形玻璃盖和透光率更好的圆形玻璃盖，使得培养皿内的紫外线强度达到0.50 mW/cm^2（低强度）和0.70 mW/cm^2（高强度），将其置于灯管下方30 cm处照射，48 h后将培养皿转移到2~3叶期小麦上，置于温度（25±0.5）℃、相对湿度（60±10）%、光照周期16 L∶8 D的人工气候室继续饲养，收集第3天的F_2代初生若蚜15头培养至成蚜，再进行F_2代蚜虫的紫外线胁迫处理，方法同上。为模拟自然界紫外线持续胁迫蚜虫的情况，本试验收集持续处理至F_{115}代的成蚜，将其置于1.5 mL离心管内，液氮速冻后−80℃保存用于基因表达分析，每组处理重复3次。

参考孔艳艳和赵惠燕（2021）方法进行高压静电胁迫试验。将24 h内孵化的15头荻草谷网蚜若蚜接入到单个培养皿中，将其置于强度为4 kV/cm的高压静电发生器下处理20 min，以高压静电发生器电源未打开为对照，将胁迫处理后的蚜虫转移到2~3叶期小麦上，置于温度（25±0.5）℃、相对湿度（60±10）%、光照周期16 L∶8 D的人工气候室内培养至成蚜，选取第3天的F_2代初生若蚜再于强度为4 kV/cm的高压静电下处理20 min，以此类推，收集处理至F_{115}代的成蚜，置于1.5 mL离心管内，液氮速冻后−80℃保存用于基因表达量分析，每组处理重复3次。

参考仝则乾等（2019）方法进行BYDV胁迫试验。取24 h内孵化的30头无毒荻草谷网蚜若蚜，接入携带BYDV株系GAV的小麦上，以接入不含病毒的健康小麦为对照，72 h后收集全部蚜虫，分成2份，一份用于反转录PCR（reverse transcription-polymerase chain reaction，RT-PCR）鉴定，确保蚜虫成功携带BYDV-GAV，另一份液氮速冻后于−80℃保存，用于基因表达分析。RT-PCR鉴定引物为BYDV-GAV F（5′-ATGAATTCAGTAGGCCGTAGAAAT-3′）/BYDV-GAV R（5′-CTATTTGGGAGTCATGTTGGCAAC-3′）（仝则乾等，2019）。20 μL RT-PCR扩增体系为2×Reaction Mix（with dye）Buffer 10 μL、引物各1 μL、template 1 μL、Rnase-free水7 μL。RT-PCR扩增程序：95℃预变性3 min；95℃变性30 s，60℃退火30 s，72℃延伸1 min，循环35次；72℃保温10 min。每组处理重复3次。

1.2.4 环境胁迫下荻草谷网蚜SOD基因表达分析

按照1.2.1方法分别提取紫外线、高压静电和BYDV三种环境胁迫下荻草谷网蚜样本总RNA，并反转录成cDNA，每个处理重复3次。以合成的cDNA为模板、以 *actin* 为内参基因、以MnSOD F（5′-CACCTCATTCGACTAAACCTTCTG-3′）/MnSOD R（5′-AAGCCAACCCCATCCTGAAC-3′）和CuZnSOD F（5′-TATCGCTTACGGGACCTCTCAA-3′）/CuZnSOD R（5′-TGGCTCCAGCATTTCCTGTAGT-3′）及actin F（5′-CGTTACCAACTGGGACGATATG-3′）/actin R（5′-GGGTTCAATGGAGCTTCTGTTA-3′）为引物，按照SYBR Premix EX *Taq*™ II试剂盒说明书进行实时荧光定量PCR（quantitative real-time PCR，qPCR）扩增。20 μL qPCR扩增体系：2×SYBR Green Premix EX *Taq*™ II 10.0 μL、cDNA模板2.0 μL、10 μmol/L上下游引物各0.8 μL、50×ROX Reference Dye 0.4 μL，超纯水补足。qPCR扩增程序：95℃预变性30 s；95℃变性5 s，60℃退火30 s，72℃延伸30 s，共40个循环。反应结束后读取 *Ct* 值，每个样品重复测定3次。以对照组中无翅成蚜中基因表达量为基准，

采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算不同胁迫下荻草谷网蚜*MnSOD*和*CuZnSOD*基因相对表达量。

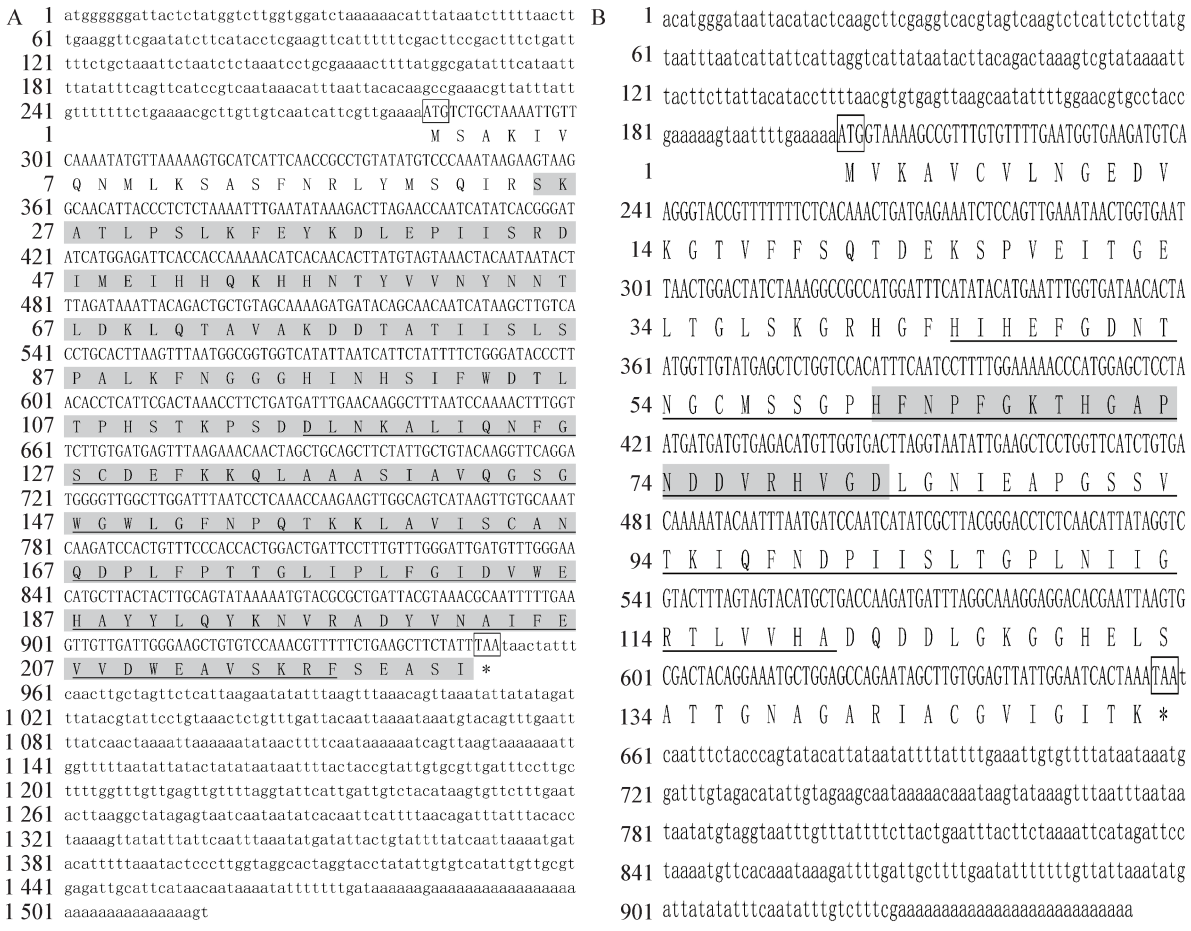
1.3 数据分析

采用SPSS 22.0软件对试验数据进行统计分析，应用Tukey检验法对紫外线胁迫下数据进行差异显著性检验，应用*t*检验法分别对高压静电和BYDV胁迫下数据进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 荻草谷网蚜SOD基因克隆和序列分析

荻草谷网蚜*MnSOD*基因cDNA序列全长为1 517 bp（GenBank登录号为MT533627），开放阅读框为669 bp，编码222个氨基酸（图1-A）。该基因编码的蛋白分子量为24.99 kD，蛋白分子式为$C_{1133}H_{1745}N_{299}O_{328}S_6$，等电点为7.79，正电荷残基总数（Arg+Lys）为22，负电荷残基总数（Asp+Glu）为21，半衰期为30 h，不稳定系数为36.42，为稳定蛋白，脂肪指数为87.48，总亲水性平均数为−0.235。荻草谷网蚜MnSOD蛋白结构域含SodA结构域（25~222位氨基酸）和主要由*α*-螺旋结构构成的Sod_Fe_C结构域（116~217位氨基酸）。



ATG：起始密码子；TAA：终止密码子。图A中阴影为SodA结构域；下划线为Sod_Fe_C结构域。图B中阴影为锌离子结合区域；下划线为铜离子结合区域。ATG: Initiation codon; TAA: termination codon. Black shades in Fig. A indicate SodA domains; SOD_Fe_C domains are underlined in Fig. A. Black shades in Fig. B indicate Zn^{2+} binding regions; Cu^{2+} binding regions are underlined in Fig. B.

图1 荻草谷网蚜MnSOD（A）和CuZnSOD（B）核苷酸及推导的氨基酸序列

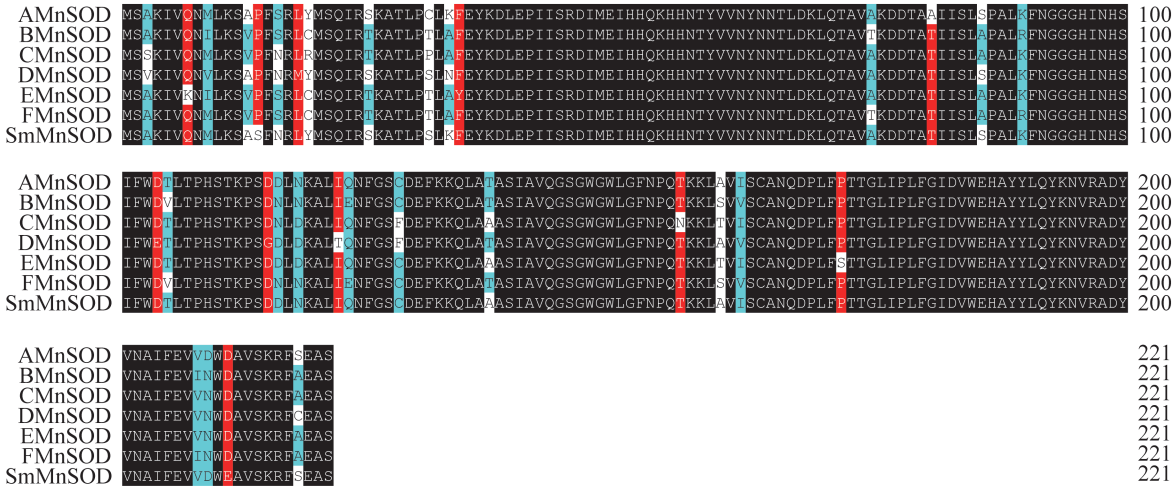
Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of MnSOD (A) and CuZnSOD (B) from *Sitobion miscanthi*

荻草谷网蚜*CuZnSOD*基因cDNA序列全长为954 bp（GenBank登录号为MT533626），开放阅读框为459 bp，编码152个氨基酸（图1-B）。该基因编码的蛋白分子量为15.84 kD，分子式为$C_{688}H_{1090}N_{200}O_{200}S_5$，等电点为5.84，正电荷残基总数（Arg+Lys）为12，负电荷残基总数（Asp+Glu）为17，半衰期为30 h，不稳定系数为30.41，为稳定蛋白，脂肪指数为79.47，总亲水性平均数为−0.216。CuZnSOD蛋白没有展示

跨膜区，说明其不是跨膜蛋白；无信号肽，则为非分泌蛋白。CuZnSOD蛋白结构域含Sod_Cu结构域（10~140位氨基酸），其中45~120位氨基酸为该蛋白质的活跃区域，同时也是CU^{2+}结合区域，62~82位氨基酸为ZN^{2+}结合区域。

2.2 荻草谷网蚜SOD蛋白序列同源性分析

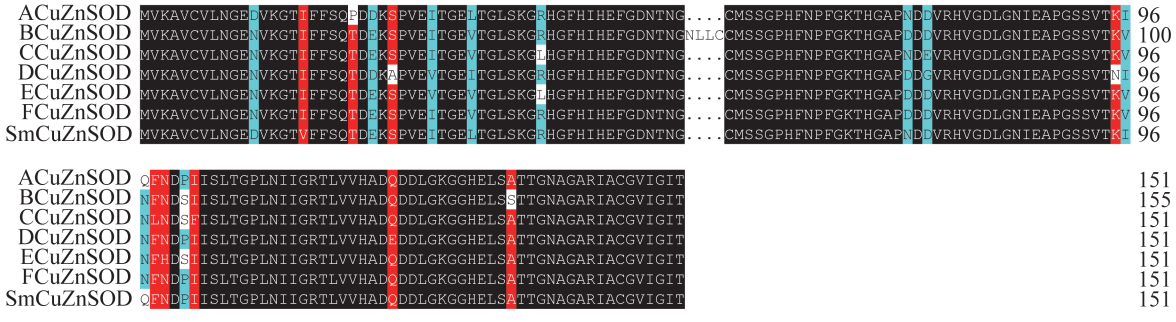
序列比对结果表明，MnSOD序列表现出高度保守性，同源序列相似性高达95.17%（图2）。CuZnSOD序列表现出高度保守性，同源序列相似性高达94.41%（图3）。



蓝色阴影：同源水平≥50%；红色阴影：同源水平≥75%；黑色阴影：同源水平为100%。AMnSOD、BMnSOD、CMnSOD、DMnSOD、EMnSOD、FMnSOD和SmMnSOD分别为豌豆蚜、大豆蚜、高粱蚜、桃蚜、玉米缢管蚜、棉蚜和荻草谷网蚜的MnSOD序列。Blue shade: homology level≥50%; red shade: homology level≥75%; black shade: homology level 100%. AMnSOD, BMnSOD, CMnSOD, DMnSOD, EMnSOD, FMnSOD and SmMnSOD: MnSOD sequences from *Acyrthosiphon pisum*, *Aphis glycines*, *Melanaphis sacchari*, *Myzus persicae*, *Rhopalosiphum maidis*, *Ap. gossypii* and *Sitobion miscanthi*, respectively.

图2 荻草谷网蚜与其他蚜虫的MnSOD多重序列比对

Fig. 2 Multiple alignment of MnSOD sequences from *Sitobion miscanthi* and other aphids



蓝色阴影：同源水平≥50%；红色阴影：同源水平≥75%；黑色阴影：同源水平为100%。ACuZnSOD、BCuZnSOD、CCuZnSOD、DCuZnSOD、ECuZnSOD、FCuZnSOD和SmCuZnSOD分别为豌豆蚜、黑豆蚜、高粱蚜、桃蚜、玉米缢管蚜、棉蚜和荻草谷网蚜的CuZnSOD序列。Blue shade: homology level≥50%; red shade: homology level≥75%; black shade: homology level 100%. ACuZnSOD, BCuZnSOD, CCuZnSOD, DCuZnSOD, ECuZnSOD, FCuZnSOD and SmCuZnSOD: CuZnSOD sequences from *Acyrthosiphon pisum*, *Aphis craccivora*, *Melanaphis sacchari*, *Myzus persicae*, *Rhopalosiphum maidis*, *Ap. gossypii* and *Sitobion miscanthi*, respectively.

图3 荻草谷网蚜与其他蚜虫的CuZnSOD多序列比对

Fig. 3 Multiple alignment of CuZnSOD sequences from *Sitobion miscanthi* and other aphids

2.3 荻草谷网蚜SOD蛋白序列系统发育树

系统发育树结果显示，半翅目蚜科MnSOD聚为一支，与缨翅目、鞘翅目、双翅目和鳞翅目昆虫MnSOD蛋白序列分开，表明荻草谷网蚜MnSOD蛋白序列与蚜科昆虫MnSOD蛋白序列亲缘关系最近，与传统分类结果相一致（图4-A）。半翅目蚜科

的CuZnSOD聚为一支，与等翅目、鞘翅目和直翅目昆虫CuZnSOD蛋白序列分开，表明荻草谷网蚜CuZnSOD蛋白序列与蚜科昆虫CuZnSOD蛋白序列亲缘关系最近，与传统分类结果相一致（图4-B）。

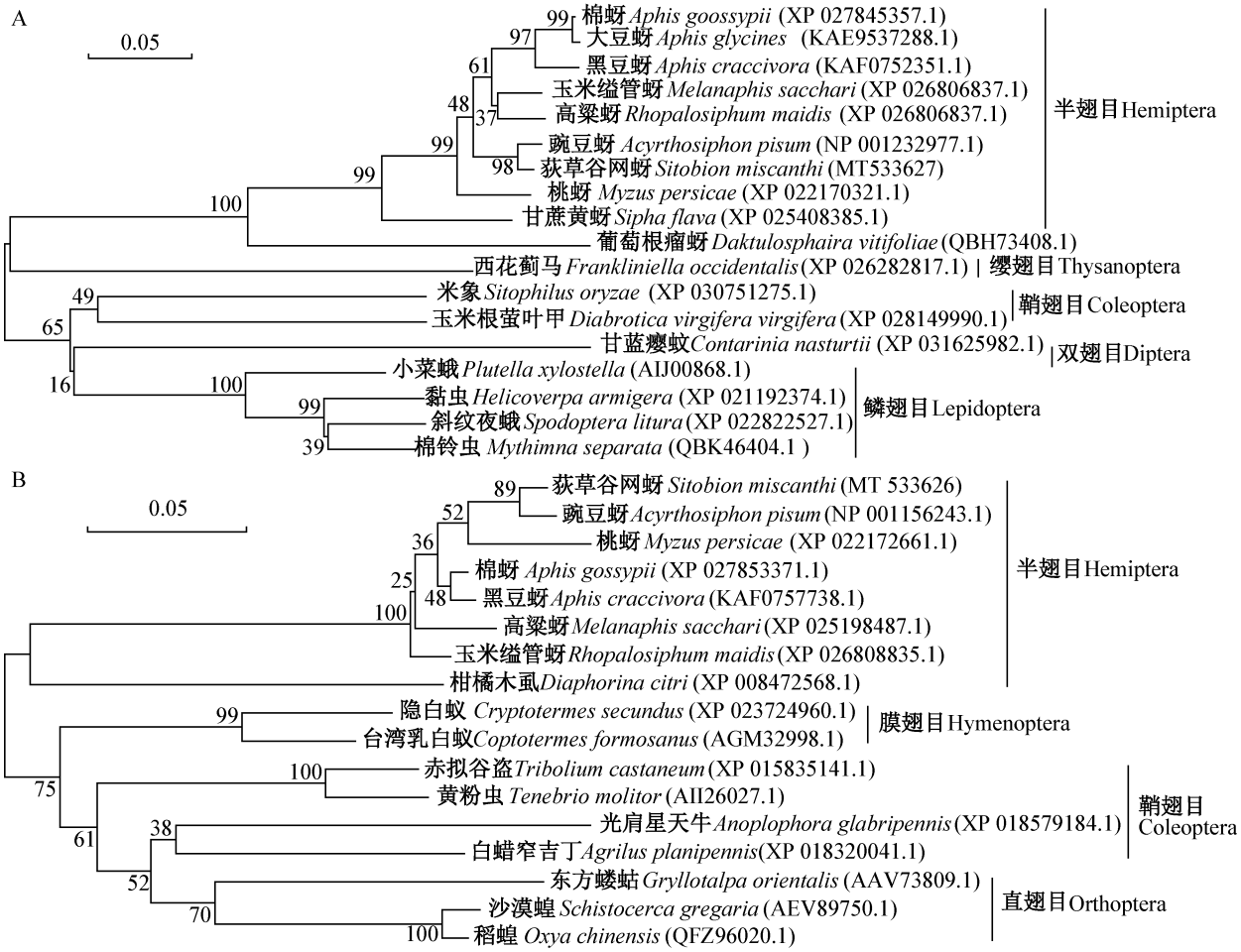


图4　基于氨基酸序列采用邻接法构建荻草谷网蚜与其他昆虫MnSOD（A）和CuZnSOD（B）的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic trees of MnSOD (A) and CuZnSOD (B) based on amino acid sequences from *Sitobion miscanthi* and other insects using the neighbor-joining method

2.4　环境胁迫下荻草谷网蚜SOD基因的表达差异

0.50 mW/cm^{2}和0.70 mW/cm^{2}强度紫外线胁迫下，荻草谷网蚜体内*MnSOD*基因相对表达量均显著上调（$P<0.05$），分别为对照的2.55倍和1.40倍，前者显著高于后者（$P<0.05$，表1）。高压静电和BYDV胁迫下，荻草谷网蚜体内*MnSOD*基因相对表达量均显著下调（$P<0.05$），分别为对照的32%和14%（表1）。0.50 mW/cm^{2}和0.70 mW/cm^{2}强度紫外线胁迫下，荻草谷网蚜体内*CuZnSOD*基因相对表达量均与对照差异不显著，而高压静电和BYDV胁迫下，荻草谷网蚜体内*CuZnSOD*基因相对表达量均显著下调（$P<0.05$），分别为对照的51%和20%（表1）。

3　讨论

昆虫体内抗氧化酶SOD被广泛研究。当昆虫受到外界环境胁迫时，SOD基因表达量会出现显著变化（刘小飞等，2018；谌苗苗等，2020），进而清除环境胁迫带来的ROS以维持生物体正常的生理代谢活动。因此SOD在昆虫生长发育、适应环境、应对病毒侵染和寄主转换方面起着重要作用（Rosell et al.，2008；Li et al.，2011）。本研究克隆得到荻草谷网蚜体内MnSOD和CuZnSOD两种蛋白的基因，这2种蛋白均包含已知的SOD蛋白结构域及金属结合位点，且荻草谷网蚜与其他半翅目蚜科已知的MnSOD和CuZnSOD蛋白序列同源性高，系统发育树中亲缘关系接近，表明荻草谷网蚜体内MnSOD和CuZnSOD这2类SOD蛋白均为SOD蛋白家族成员且序列高度保守，与中华蜜蜂*Apis cerana cerana*（刘俊峰等，2012）、柑橘全爪螨*Panonychus citri*（Feng et al.，2015）等节肢动物体内SOD蛋白的研究结果

一致。

表1 3种环境胁迫下荻草谷网蚜*MnSOD*和*CuZnSOD*基因相对表达量

Table 1 Relative expression levels of *MnSOD* and *CuZnSOD* genes in *Sitobion miscanthi* under three environmental stresses

胁迫类型 Type of stress	处理 Treatment	相对表达量Relative expression level	
		MnSOD	*CuZnSOD*
紫外线 Ultraviolet radiation	0(CK)	1.00±0.06 c	1.00±0.07 a
	0.50 mW/cm^2(低强度) 0.50 mW/cm^2 (low intensity)	2.55±0.35 a	1.34±0.40 a
	0.70 mW/cm^2(高强度) 0.70 mW/cm^2 (high intensity)	1.42±0.14 b	1.11±0.25 a
高压静电 High-voltage electrostatic field	0(CK)	1.00±0.07 a	1.00±0.05 a
	4 kV/cm	0.32±0.05 b	0.51±0.24 b
大麦黄矮病毒 Barley yellow dwarf virus(BYDV)	取食健康植株(对照) Feeding on healthy plant (CK)	1.00±0.08 a	1.00±0.06 a
	取食感染BYDV植株 Feeding on plant infected with BYDV	0.14±0.01 b	0.20±0.05 b

表中数据为平均数±标准误。紫外线胁迫下同列不同小写字母表示经Tukey检验法检验差异显著(P<0.05),其他胁迫下同列不同小写字母表示经t检验法检验差异显著(P<0.05)。Data in the table are mean±SE. Different lowercase letters in the same column under ultraviolet radiation stress indicate significant difference by Tukey test (P<0.05). Different lowercase letters in the same column under other stresses indicate significant difference by t test (P<0.05).

本研究结果发现不同辐射强度的紫外线处理下荻草谷网蚜体内*MnSOD*基因的表达量均显著上调,而*CuZnSOD*基因的表达量变化不明显,表明紫外线胁迫仅能诱导荻草谷网蚜体内*MnSOD*基因的表达,明确了SOD发生改变的种类。周冬等(2014)研究同样发现紫外线胁迫会显著提高荻草谷网蚜体内SOD的活性,但未明确SOD发生改变的种类。刘小飞等(2018)和卢亚菲等(2019)研究还表明紫外线胁迫也会导致烟蚜*Myzus persicae*和三叶草斑蚜*Therioaphis trifolii*体内的SOD活性增加,推测紫外线会提高昆虫体内*MnSOD*基因的表达量,进而使得酶活性显著增加,从而修复体内ROS损伤。徐建祥等(2006)研究发现昆虫通过产生表皮黑色素来对抗紫外线,因此下一步可在黑色素生成过程中研究昆虫体内*MnSOD*基因表达量的变化,从而揭示昆虫抵御紫外线的作用机理。

本研究结果发现,4 kV/cm强度高压静电胁迫下荻草谷网蚜体内*MnSOD*和*CuZnSOD*基因相对表达量均较对照显著下调。曹祝等(2016)研究发现4 kV/cm强度高压静电同时处理小麦和荻草谷网蚜后,荻草谷网蚜体内SOD活性显著增加,与本研究结果不一致,究其原因可能是前者高压静电仅处理荻草谷网蚜,而后者同时处理荻草谷网蚜和寄主小麦,推测高压静电胁迫对寄主小麦产生不利影响,进而间接引起植食性昆虫体内酶活性的增加。孔艳艳和赵惠燕(2021)研究发现高压静电胁迫下,F_4代荻草谷网蚜体内*MnSOD*和*CuZnSOD*基因相对表达量显著上调,但F_{11}~F_{31}代荻草谷网蚜体内*MnSOD*和*CuZnSOD*基因相对表达量变化不显著或呈下调模式,与本研究高世代(F_{115}代)荻草谷网蚜体内SOD基因表达量显著下调的结果一致。推测短期高压静电胁迫诱导荻草谷网蚜体内SOD基因表达量上调,随着世代增加,高压胁迫逐渐被蚜虫体内的复杂生理代谢机制所适应,且可能进一步提升了荻草谷网蚜的适合度。

作为传播病毒的介体昆虫,当昆虫携带植物病毒后其适合度增加。如Araya & Foster(1987)研究发现蚜虫感染BYDV后其繁殖力增加;Alvarez et al.(2007)研究发现感染马铃薯卷叶病毒(potato leaf roll virus,PLRV)后,马铃薯成熟叶片对蚜虫吸引力增加。仝则乾等(2019)研究发现与取食健康小麦的荻草谷网蚜相比,取食感染了BYDV小麦的荻草谷网蚜体内SOD活性显著下降。本研究结果也表明取食感染BYDV小麦后,荻草谷网蚜体内*CuZnSOD*和*MnSOD*基因的表达量均显著下调,说明携带BYDV降低了SOD基因的表达量,进而提高了荻草谷网蚜的适合度。植物-介体昆虫-病毒作为一个复杂的互作系统,病毒可改变植物中过氧化物含量从而改变介体昆虫取食活动(张艳静等,2020)。因此推测BYDV可能通过改变荻草谷网蚜的取食活动来提高其适合度。

本研究克隆得到荻草谷网蚜*MnSOD*和*CuZnSOD*基因,并通过体内表达量分析认为*MnSOD*和*CuZnSOD*基因在荻草谷网蚜应对紫外线、高压静电

和植物病毒等环境胁迫中起着重要作用，为明确环境胁迫下荻草谷网蚜体内生理生化变化机制提供了理论依据。然而这3种环境胁迫对昆虫的作用机制尚不清楚，下一步可利用蛋白组学及RNA干扰等方法深入研究。

参 考 文 献（References）

Alvarez AE, Garzo E, Verbeek M, Vosman B, Dicke M, Tjallingii WF. 2007. Infection of potato plants with potato leafroll virus changes attraction and feeding behaviour of *Myzus persicae*. Entomologia Experimentalis et Applicata, 125(2): 135−144

Araya JE, Foster JE. 1987. Laboratory study on the effects of barley yellow dwarf virus on the life cycle of *Rhopalosiphum padi* (L.). Journal of Plant Diseases and Protection, 94(6): 578−583

Cao Z, Li GY, He J, Zhao HY, Mkdk P, Hu ZQ, Hu XS. 2016. Effects of high voltage electrostatic fields on protective enzyme activity in wheat plants and on the population dynamics of *Sitobion avenae* Fabricius (Hemiptera: Aphididae). Acta Ecologica Sinica, 36(4): 1001−1009 (in Chinese) [曹祝, 李广雨, 赫娟, 赵惠燕, Mkdk P, 胡祖庆, 胡想顺. 2016. 高压静电场对小麦叶片保护酶系统及麦长管蚜种群动态的影响. 生态学报, 36(4): 1001−1009]

Chen C, Jiang DC, Yang H, Jin DC. 2016. Effects of southern rice black streaked dwarf virus on defense enzymes in brown planthopper and white-blacked planthopper. Journal of Environmental Entomology, 38(1): 113−118 (in Chinese) [陈晨, 蒋德春, 杨洪, 金道超. 2016. 南方水稻黑条矮缩病对褐飞虱和白背飞虱体内三种保护酶活性的影响. 环境昆虫学报, 38(1): 113−118]

Chen MM, Xu L, Jiao Y, Qi L, Su GM, Li XS, Zhong L. 2020. Effect of low temperature stress on activity of three antioxidases in *Antheraea pernyi* larvae. Acta Sericologica Sinica, 46(4): 458−463 (in Chinese) [谌苗苗, 徐亮, 焦阳, 戚俐, 宿桂梅, 李喜升, 钟亮. 2020. 低温胁迫对柞蚕幼虫3种抗氧化酶活性的影响. 蚕业科学, 46(4): 458−463]

Cross AR, Jones OTG. 1991. Enzymic mechanisms of superoxide production. Biochimica et Biophysica Acta (BBA): Bioenergetics, 1057(3): 281−298

Du YM, Wang P, Yang J, Zhou D, Li GY, Zhao HY, Hu ZQ, Hu XS. 2014. Effects of UV-B radiation intensity and duration on the growth, development and fecundity of *Sitobion avenae* (Hemiptera: Aphididae). Acta Entomologica Sinica, 57(12): 1395−1401 (in Chinese) [杜一民, 王萍, 杨杰, 周冬, 李广雨, 赵惠燕, 胡祖庆, 胡想顺. 2014. 不同强度与持续时间UV-B辐射对麦长管蚜生长发育和繁殖的影响. 昆虫学报, 57(12): 1395−1401]

Feng YC, Liao CY, Xia WK, Jiang XZ, Shang F, Yuan GR, Wang JJ. 2015. Regulation of three isoforms of SOD gene by environmental stresses in citrus red mite, *Panonychus citri*. Experimental and Applied Acarology, 67(1): 49−63

Gao XL. 2013. Cloning, expression and characterization of superoxide dismutases from the whitefly, *Bemisia tabaci*. Master thesis. Hangzhou: Zhejiang University (in Chinese) [高现龙. 2013. 烟粉虱超氧化物歧化酶功能基因研究. 硕士学位论文. 杭州: 浙江大学]

Hu ZQ, Zhao HY, Thieme T. 2014. Comparison of the potential rate of population increase of brown and green color morphs of *Sitobion avenae* (Homoptera: Aphididae) on barley infected and uninfected with barley yellow dwarf virus. Insect Science, 21(3): 326−333

Jia HH, Sun RJ, Shi WN, Yan Y, Li H, Guo XQ, Xu BH. 2014. Characterization of a mitochondrial manganese superoxide dismutase gene from *Apis cerana cerana* and its role in oxidative stress. Journal of Insect Physiology, 60: 68−79

Jiang X, Zhang Q, Qin YG, Yin H, Zhang SY, Li Q, Zhang Y, Fan J, Chen JL. 2019. A chromosome-level draft genome of the grain aphid *Sitobion miscanthi*. GigaScience, 8(8): giz101

Kong YY, Zhao HY. 2021. Effect of high voltage electrostatic field (HVEF) stress on weight and expression of antioxidant enzyme gene in *Sitobion avenae* (Hemiptera: Aphididae). Journal of Environmental Entomology, 43(2): 387−396 (in Chinese) [孔艳艳, 赵惠燕. 2021. 高压静电场胁迫对各代麦长管蚜体重及抗氧化酶基因表达的影响. 环境昆虫学报, 43(2): 387−396]

Li GY, Gao R, He J, Cao Z, Hu ZQ, Hu XS, Zhao HY. 2016. Effect of high-voltage electrostatic field (HVEF) on the growth and fecundity of *Sitobion avenae* Fabricius (Hemiptera: Aphididae). Acta Ecologica Sinica, 36(13): 3987−3994 (in Chinese) [李广雨, 高瑞, 赫娟, 曹祝, 胡祖庆, 胡想顺, 赵惠燕. 2016. 高压静电胁迫对麦长管蚜种群生长发育与繁殖的影响. 生态学报, 36(13): 3987−3994]

Li JM, Su YL, Gao XL, He J, Liu SS, Wang XW. 2011. Molecular characterization and oxidative stress response of an intracellular Cu/Zn superoxide dismutase (CuZnSOD) of the whitefly, *Bemisia tabaci*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 77(3): 118−133

Li MY, Tu XH, Cao Y, Li SG, Liu S. 2021. Characterisation of a copper/zinc superoxide dismutase from *Pieris rapae* and its role in protecting against oxidative stress induced by chlorantraniliprole. Pesticide Biochemistry and Physiology, 174: 104825

Liu JF, Liu TT, Wang H, Wang ZL, Yan WY, Zeng ZJ, Wu XB. 2012. Cloning, sequence analysis and expression profile of copper/zinc superoxide dismutase gene of *Apis cerana cerana*. Chinese Journal of Animal Nutrition, 24(8): 1512−1519 (in Chinese) [刘俊峰, 刘亭亭, 王欢, 王子龙, 颜伟玉, 曾志将, 吴小波. 2012. 中华蜜蜂铜锌超氧化物歧化酶基因的克隆、序列分析及表达特征. 动物营养学报, 24(8): 1512−1519]

Liu JY, Qian L, Ke R, Chen XY, Li ZY, Gui FR. 2017. Effects of elevated carbon dioxide on the activities of physiological enzymes in thrips *Frankliniella occidentalis* and *F. intonsa* fed on different host plants. Journal of Plant Protection, 44(1): 45−53 (in Chinese) [刘建业, 钱蕾, 可芮, 陈晓燕, 李正跃, 桂富荣. 2017. CO_2浓度升高对取食不同寄主的西花蓟马和花蓟马生理酶活性的影响. 植物保护学报, 44(1): 45−53]

Liu XF, Meng JY, Zhang Y, Zhang CY. 2018. Effects of UV-B radiation

on the antioxidant system of *Myzus persicae*. Journal of Environmental Entomology, 40(6): 1422−1428 (in Chinese) [刘小飞, 孟建玉, 张滢, 张长禹. 2018. UV-B照射对烟蚜抗氧化系统的影响. 环境昆虫学报, 40(6): 1422−1428]

Lu YF, Zhang X, Wang G, Ma W, Liu CZ. 2019. Effects of ultraviolet radiation on three types of protective enzymes in *Therioaphis trifolii*. Pratacultural Science, 36(5): 1428−1434 (in Chinese) [卢亚菲, 张祥, 王广, 马雯, 刘长仲. 2019. 紫外辐射对三叶草彩斑蚜3种保护酶活性的影响. 草业科学, 36(5): 1428−1434]

Mann T, Keilin D. 1938. Haemocuprein and hepatocuprein, copper-protein compounds of blood and liver in mammals. Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences, 126(844): 303−315

Meng LQ, Li DD, Su D, Zhao HY, Hu ZQ. 2019. Activities of protective and detoxifying enzymes in spring-grain aphid *Schizaphis graminum* (Hemiptera: Aphididae) fed on wheat infected with Barley yellow dwarf virus. Journal of Plant Protection, 46(3): 707−708 (in Chinese) [孟琳钦, 李丹丹, 苏丹, 赵惠燕, 胡祖庆. 2019. 取食感染大麦黄矮病毒小麦后麦二叉蚜体内保护酶和解毒酶活性变化. 植物保护学报, 46(3): 707−708]

Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, van Breusegem F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. Trends in Plant Science, 9 (10): 490−498

Rosell RC, Shah A, Khan M, Aghakasiri N, Shatters RG, Mckenzie CL. 2008. Superoxide dismutase activity in temperature stressed viruliferous whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae).//XXIII International Congress of Entomology. Durban South Africa, pp. 23−46

Tong ZQ, Meng LQ, Su D, Zhang C, Hu ZQ. 2019. Changes in the activities of antioxidant enzymes and detoxification enzymes in vector aphid *Sitobion avenae* (Homoptera: Aphididae) and non-vector aphid *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae) feeding on wheat plants infected with barley yellow dwarf virus. Acta Entomologica Sinica, 62(12): 1392−1399 (in Chinese) [仝则乾, 孟琳钦, 苏丹, 张弛, 胡祖庆. 2019. 取食感染大麦黄矮病毒的小麦后介体麦长管蚜和非介体禾谷缢管蚜体内抗氧化酶和解毒酶活性的变化. 昆虫学报, 62(12): 1392−1399]

Tu XH, Zhuo YL, Jiang XY, Liu HL, Cao Y, Liu S. 2018. Molecular characterization of a mitochondrial manganese superoxide dismutase from *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae). Journal of Economic Entomology, 111(5): 2391−2400

Wang LJ, Ren LN, Li JJ, Zhang M, Jiu M. 2019. Differential physiological and biochemical responses of tobacco plants to the feeding by tobacco whitefly *Bemisia tabaci* and the co-infection with Tomato yellow leaf curl China virus. Journal of Plant Protection, 46(4): 860−867 (in Chinese) [汪伦记, 任利娜, 李晶晶, 张敏, 纠敏. 2019. 普通烟对烟粉虱取食及其与TYLCCNV共侵染的生理生化反应. 植物保护学报, 46(4): 860−867]

Wu HH, Li RY, Liu YM, Zhang XY, Zhang JZ, Ma EB. 2020. A second intracellular copper/zinc superoxide dismutase and a manganese superoxide dismutase in *Oxya chinensis*: molecular and biochemical characteristics and roles in chlorpyrifos stress. Ecotoxicology and Environmental Safety, 187: 109830

Wu HH, Zhang YW, Shi XK, Zhang JZ, Ma EB. 2017. Overexpression of Mn-superoxide dismutase in *Oxya chinensis* mediates increased malathion tolerance. Chemosphere, 181: 352−359

Xu JX, Yang HY, Wu JC. 2006. Effects of elevated solar UV-B radiation on herbivorous insects. Chinese Journal of Ecology, 25(7): 845−850 (in Chinese) [徐建祥, 杨海燕, 吴进才. 2006. 紫外B辐射增强对植食性昆虫的影响. 生态学杂志, 25(7): 845−850]

Yang YZ, Lin GL, Hu CF. 1992. Effects on wheat quality and yield by aphid infestation, index with discussions on control. Journal of Plant Protection, 19(2): 152, 158 (in Chinese) [杨益众, 林冠伦, 胡长富. 1992. 麦蚜为害对小麦品质和产量的影响及其防治指标的初步研究. 植物保护学报, 19(2): 152, 158]

Youn HD, Kim EJ, Roe JH, Hah YC, Kang SO. 1996. A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces* spp. The Biochemical Journal, 318 (Pt3): 889−896

Zeng JY, Bi B, Zhang FM, Cheng G, Vuong Thi MD, Zhang GC. 2019. Cu/ZnSOD always responded stronger and rapider than MnSOD in *Lymantria dispar* larvae under the avermectin stress. Pesticide Biochemistry and Physiology, 156: 72−79

Zhang HL, Zhou ZX. 2015. Influence of ultraviolet on the number of haemocytes and superoxide dismutase activity from *Helicoverpa assulta*. Guizhou Agricultural Sciences, 43(5): 98−100 (in Chinese) [张海玲, 周正湘. 2015. 紫外线对烟青虫血细胞数及SOD活性的影响. 贵州农业科学, 43(5): 98−100]

Zhang YJ, Li DY, Guo HJ, Sun YC. 2020. The regulatory mechanism of aphid feeding behaviors associated with the transmission of nonpersistent viruses. Journal of Plant Protection, 47(5): 949−961 (in Chinese) [张艳静, 李丹阳, 郭慧娟, 孙玉诚. 2020. 蚜虫传播非持久性病毒的取食行为调控机制. 植物保护学报, 47 (5): 949−961]

Zhao B. 2019. Effects on population parameters, epidermis and chitin synthase of *Sitobion avenae* (Fabricius) exposed to long-term UV-B stress. Master thesis. Yangling: Northwest A&F University (in Chinese) [赵贝. 2019. UV-B长期胁迫对麦长管蚜种群参数、表皮及几丁质合成酶的影响研究. 硕士学位论文. 杨凌: 西北农林科技大学]

Zhou D, Du YM, Yang J, Zhang L, Zhao HY, Hu ZQ, Hu XS. 2014. Effects of UV-B radiation in successive generations on the activities of protective enzymes in the grain aphid, *Sitobion avenae* (Hemiptera: Aphididae). Acta Entomologica Sinica, 57(7): 762−768 (in Chinese) [周冬, 杜一民, 杨杰, 张丽, 赵惠燕, 胡祖庆, 胡想顺. 2014. 连续多代UV-B照射对麦长管蚜保护酶活性的影响. 昆虫学报, 57(7): 762−768]

（责任编辑：张俊芳）