

汪彤, 李哲, 张爽. 4种植物次生物质对黄粉虫解毒酶活性及羧酸酯酶基因表达的影响[J]. 江苏农业学报, 2025, 41(3): 501-509.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2025.03.009

4种植物次生物质对黄粉虫解毒酶活性及羧酸酯酶基因表达的影响

汪彤¹, 李哲¹, 张爽^{1,2}

(1.河北农业大学林学院, 河北 保定 071000; 2.河北省城市森林健康技术创新中心, 河北 保定 071000)

摘要: 为了探索京尼平、芸香苷、槲皮素和绿原酸对黄粉虫的作用机制, 本研究通过测定黄粉虫取食4种植物次生物质后羧酸酯酶、细胞色素 *P450* 酶和谷胱甘肽 *S*-转移酶活性, 并用半定量 PCR、荧光定量 PCR 法检测4种植物次生物质对黄粉虫羧酸酯酶基因(*TmCarE*)表达的诱导情况。结果表明, 4种植物次生物质对黄粉虫3种解毒酶活性的诱导存在剂量效应和时间效应, 部分低含量(0.5%、1.0%)的植物次生物质可以诱导并激活黄粉虫解毒酶活性, 部分高含量(3.0%)的植物次生物质能显著抑制解毒酶活性。*TmCarE* 具有羧酸酯酶基因的保守结构域, 与已报道的昆虫羧酸酯酶基因在活性位点附近有较高的相似性。此外, 含量为0.5%的3种植物次生物质(芸香苷、槲皮素和绿原酸)均可诱导 *TmCarE* 基因的相对表达量提高。本研究结果可为筛选高效的植物次生物质、科学利用植物次生物质进行鞘翅目害虫的防治提供理论依据。

关键词: 黄粉虫; 植物次生物质; 解毒酶; 羧酸酯酶基因

中图分类号: S763.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2025)03-0501-09

Effects of four plant secondary metabolites on the detoxification enzyme activity and expression of carboxylesterase genes of *Tenebrio molitor*

WANG Tong¹, LI Zhe¹, ZHANG Shuang^{1,2}

(1. College of Forestry, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, China; 2. Hebei Urban Forest Health Technology Innovation Center, Baoding 071000, China)

Abstract: To explore the mechanisms of genipin, rutin, quercetin, and chlorogenic acid on *Tenebrio molitor*, the activities of carboxylesterase (*CarE*), cytochrome *P450* (*CYP450*), and glutathione *S*-transferase (*GST*) were measured after *T. molitor* fed on four plant secondary metabolites. Additionally, the expression of the carboxylesterase gene in *T. molitor* (*TmCarE*) was detected using semi-quantitative PCR and reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) methods. The results showed that the induction of the three detoxification enzyme activities in *T. molitor* by plant secondary metabolites exhibited both dose- and time-dependent effects. Low contents (0.5% and 1.0%) of plant secondary metabolites could induce and activate the detoxification enzyme activities in *T. molitor*, while the high content (3.0%) significantly inhibited these activities. Bioinformatics analysis revealed that *TmCarE* possessed conserved domains of the carboxylesterase gene and

exhibited high similarity with other insect carboxylesterase genes near the active site. Moreover, three plant secondary metabolites (rutin, quercetin, and chlorogenic acid) at a content of 0.5% could up-regulate the relative expression of the *TmCarE* gene. These findings provide a theoretical basis for screening efficient plant secondary metabolites and scientifically utilizing them to control Coleoptera pests.

收稿日期: 2024-01-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(31000305); 河北省高等学校科学技术研究项目(QN2015182)

作者简介: 汪彤(1996-), 女, 河北唐山人, 硕士研究生, 从事害虫综合治理研究。(E-mail) 2807841686@qq.com

通讯作者: 张爽, (E-mail) zhshsuqq@126.com

Key words: *Tenebrio molitor*; plant secondary metabolites; detoxification enzymes; carboxylesterase gene

昆虫和植物在陆地生物群落中发挥着重要作用,它们之间存在着密切关联^[1]。昆虫取食植物时会产生拒食、避食及生长发育受到抑制等现象,这些多数是由植物诱导自身产生抗性,进而生成有毒的次生物质造成的^[2]。昆虫取食植物次生物质后,其体内生理代谢活动会发生重要转变,并在生理生化上形成多种适应机制来抵抗植物次生物质的毒害^[3]。解毒酶在昆虫应对寄主植物的适应性、抗药性方面发挥着重要作用,它们能通过分解或与有毒、有害物质结合的方式,使这些物质无法到达作用靶标,从而避免或减轻对昆虫的危害^[4]。解毒酶主要包括羧酸酯酶(*CarE*)、谷胱甘肽 *S*-转移酶(*GST*)、细胞色素 *P450*(*CYP450*)等^[5]。*CarE* 可将含酯键的外源物质或内源物质水解为醇或酸,是一种广泛分布于动物、植物和细菌内的多功能超家族酶系^[6]。昆虫中存在着丰度极高的 *CarE*,遍布其头部、肠道、脂肪体、马氏管、丝腺和生殖器^[7]。有研究发现,小麦中的吡啶生物碱水平与蚜虫的 *CarE* 活性呈正相关,抗蚜虫小麦中的吡啶生物碱含量通常高于易感小麦品种^[8]。*GST* 可以催化内源性物质与还原性谷胱甘肽(*GSH*)结合,增加它们的溶解度并将其排出细胞,从而减少昆虫体内的有害亲电底物。高希武等^[9]研究发现,槲皮素、芸香苷分别可以使棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)体内的 *GST* 活性提高 17 倍、3~4 倍。*CYP450* 酶系几乎存在于所有生物中,主要通过脂肪族、杂环的羟基化作用,*N*—、*S*—的氧化作用,以及 *O*-脱甲基、脱乙基、脱烷基等的反应来代谢外源化合物。在昆虫中,*CYP450* 酶主要分布在中肠、脂肪体及头部,以中肠中的含量最高^[10]。研究发现,草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)体内的 *P450* 可以代谢吡啶、槲皮素、黄嘌呤毒素等多种植物次生物质^[11];蜜蜂(*Apis mellifera*)体内的 *CYP6AS* 也可以代谢槲皮素^[12]。

随着化学防治方法弊端的凸显,生物源农药的开发与利用日益受到关注。植物次生物质是生物源农药重要的组成部分。植物中的很多次生代谢物质如槲皮素、绿原酸、单宁等都被证明对诸多害虫具有较强的抗虫性。由于目前越来越多的植物次生物质被证实具有毒杀害虫或抑制害虫生长发育的效果,且相对于化学药剂具有安全环保、延缓抗药性等

优势,因此植物次生物质的抗虫效果及抗虫机制研究成为近年来的热点^[13-14]。槲皮素、芸香苷是自然界中广泛存在的黄酮类化合物。有研究发现,苹果棉蚜(*Eriosoma lanigerum*)取食浸蘸槲皮素、芸香苷的枝条后,死亡率均高于 80%,而且槲皮素、芸香苷对其天敌昆虫苹果棉蚜寄生蜂(*Aphelinus mali*)具有较高的安全性^[15]。芸香苷具有抑制美洲棉铃虫(*Helicoverpa zea*)早期幼虫的生长、降低斜纹夜蛾(*Spodoptera litura*)蛹重和延长蛹期、降低欧洲玉米螟(*Ostrinia nubilalis*)存活率的作用^[16-17]。关于黄酮类次生代谢物对昆虫的作用机制,目前存在多种假说,比较有代表性的包括通过抑制非特异性酶活性、干扰免疫系统是影响昆虫生长发育^[18],以及通过邻苯二酚结构与某些金属离子结合从而影响昆虫的发育等^[19]。绿原酸属于正双羟基酚类化合物,在植物中广泛存在^[16]。已有研究发现,取食含绿原酸的人工饲料后,舞毒蛾(*Lymantria dispar*)幼虫死亡率提高,甚至不能完成生命周期;*CarE* 的活性随着时间的延长而逐渐降低,但始终高于取食不添加绿原酸人工饲料的舞毒蛾^[17]。京尼平属于萜烯类-环烯醚萜类化合物,含有酯键,是由京尼平苷通过酶水解后释放得到的。宫芳芳等^[20]发现,京尼平苷对朱砂叶螨具有触杀活性。

为了减少或避免植物次生物质或杀虫剂的毒害,昆虫往往提高解毒酶的活性或上调解毒酶相关编码基因的相对表达量。关于植物次生物质对昆虫防御作用的研究主要集中于鳞翅目(*Lepidoptera*)昆虫,但是以天牛(*Cerambycidae*)、小蠹虫(*Scolytidae*)、叶甲(*Chrysomelidae*)等为主的鞘翅目(*Coleoptera*)昆虫也是森林害虫的重要类群。笔者通过前期试验发现,京尼平、芸香苷、槲皮素和绿原酸在 0.1%~3.0%的含量范围内可以不同程度地抑制黄粉虫(*Tenebrio molitor*)生长发育^[21]。本研究拟通过综合分析 4 种植物次生物质对黄粉虫 3 种解毒酶活性的剂量效应、时间效应,并根据羧酸酯酶基因的表达情况,试图从生理生化、分子水平探索黄粉虫对 4 种植物次生物质的响应机制。研究结果对于科学利用植物次生物质、掌握适宜的施用量与施用时间、植物次生物质与杀虫药剂的科学混配、探索高效且环境友好的综合防控技术并用于鞘翅目害虫防治具有

重要的理论价值及实践指导意义。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫及试剂

黄粉虫饲养于人工气候培养箱[温度(27.0 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$,湿度 $60\% \pm 5\%$,光/暗周期16 h/8 h]内,培养1代后尽量选取生长状态一致的个体用于试验。京尼平(95%)、芸香苷(95%)、槲皮素(95%)和绿原酸(89%)标准品均购自陕西绿清生物工程有限公司,分别配制成0.1%、0.5%、1.0%、3.0%的含量备用。其中芸香苷、槲皮素用无水乙醇溶解,用蒸馏水定容;京尼平、绿原酸用蒸馏水溶解。RNA提取试剂盒、反转录试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒、荧光定量PCR试剂盒以及其他用于解毒酶活性测定的生化试剂等均购自北京聚合美生物科技有限公司;pMD18-T Vector购自TaKaRa公司。

1.2 试验方法

1.2.1 4种植物次生物质诱导解毒酶活性 根据前期预试验结果,分别在麦麸中添加低含量(0.1%、0.5%、1.0%)和高含量(3.0%)京尼平、芸香苷、槲皮素、绿原酸4种植物次生物质,饲喂经饥饿处理的黄粉虫老熟幼虫24 h,在冰上解剖除去杂质,再用生理盐水冲洗并用滤纸吸干水分,以10头幼虫组织为1组放于灭菌离心管中,准确称量样品后,剪碎并放于加有液氮的研钵中,加入2 mL 0.1 mol/L pH值为7.4的磷酸缓冲液,10 000 r/min离心15 min后,吸取上清液备用。

参考刘建业等^[22]的解毒酶活性测定方法,分别测定用不同含量植物次生物质饲喂黄粉虫后*CarE*、*CYP450*、*GST* 3种解毒酶活性及在添加相同含量植物次生物质条件下饲喂4 h、8 h、12 h、24 h、48 h后黄粉虫中*CarE*、*CYP450*、*GST* 3种解毒酶的活性。

1.2.2 反转录PCR扩增黄粉虫羧酸酯酶的基因保守序列及序列分析 结合4种植物次生物质对黄粉虫解毒酶的诱导情况,选用含量为0.5%的4种植物次生物质检测羧酸酯酶基因的表达情况。分别用未添加植物次生物质的麦麸和添加0.5%植物次生物质的麦麸饲喂经饥饿处理的黄粉虫老熟幼虫24 h后,解剖并取其肠道(去除内含物),提取黄粉虫RNA,每个处理设3次重复。用Primer 5设计引物以扩增黄粉虫羧酸酯酶基因的中间序列,反转录体系如下:10.0 μL 2 \times Es *Taq* MasterMix,1.0 μL cDNA,

各1.0 μL 浓度为10 $\mu\text{mol/L}$ 的上、下游引物(表1),最后用7.0 μL ddH₂O补足至20.0 μL 。反应条件如下:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸2 min,共35个循环。

将PCR产物纯化后与pMD18-T载体连接,将阳性单菌落接种到LB液体培养基中并送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。用ProtParam tool(<https://web.expasy.org/protparam/>)分析其理化性质,用DNAMAN软件推导氨基酸序列,用美国国家生物技术信息中心(NCBI)网站的BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)分析其同源性,借助DNAMAN软件与已报道的昆虫羧酸酯酶基因序列进行比对。

1.2.3 4种植物次生物质诱导*TmCarE*基因表达模式的研究 选取30头大小与状态一致的黄粉虫老熟幼虫于养虫瓶内,分别用1 mL含量为0.5%的4种植物次生物质与1 g麦麸混合,饲喂经饥饿处理的黄粉虫24 h后,解剖取其肠道(去除内含物),用液氮速冻后于-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

以反转录cDNA为模板,以*Actin*基因作内参,20.0 μL 半定量PCR反应体系如下:10.0 μL 2 \times Es *Taq* MasterMix,1.0 μL cDNA,各1.0 μL 浓度为10 $\mu\text{mol/L}$ 的上、下游引物(表1),用ddH₂O补足至20.0 μL 。PCR反应程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸2 min,35个循环。

20.0 μL 荧光定量PCR反应体系:10.0 μL 2 \times M5 HiPer SYBR Premix Es *Taq*,1.0 μL cDNA,各0.4 μL 浓度为10 $\mu\text{mol/L}$ 的上、下游引物(表1),0.4 μL ROX Reference Dye(50 \times),用ddH₂O补足至20.0 μL 。PCR反应程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,65 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,共40个循环。每个样品设3个生物学重复,不同植物次生物质处理的*TmCarE*表达量用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算。

表1 引物名称及序列

Table 1 Primers and sequences

| 引物名称 | 引物序列(5'→3') | 引物用途 |
|------|--------------------|-------------------------|
| F1 | TGCCCGTGATGTTCTGG | 扩增 <i>TmCarE</i> 保守序列 |
| R1 | GGGTGGGGTTCCCGT | 扩增 <i>TmCarE</i> 保守序列 |
| F2 | ATACCGTACGCCAAACCG | 半定量PCR扩增 <i>TmCarE</i> |
| R2 | GATTGCACCCATTTCAGC | 半定量PCR扩增 <i>TmCarE</i> |
| F3 | GACGATTGCCCCGTGATG | 荧光定量PCR扩增 <i>TmCarE</i> |
| R3 | TGAACCCAGCGTTTCCTG | 荧光定量PCR扩增 <i>TmCarE</i> |

1.3 数据处理与分析

用 SPSS 21.0 计算 4 种植物次生物质处理下黄粉虫解毒酶活性的平均值、标准误差,用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 和最小显著性差异法 (LSD) 分析不同处理之间的差异显著性,用 Origin 2017 软件绘图。

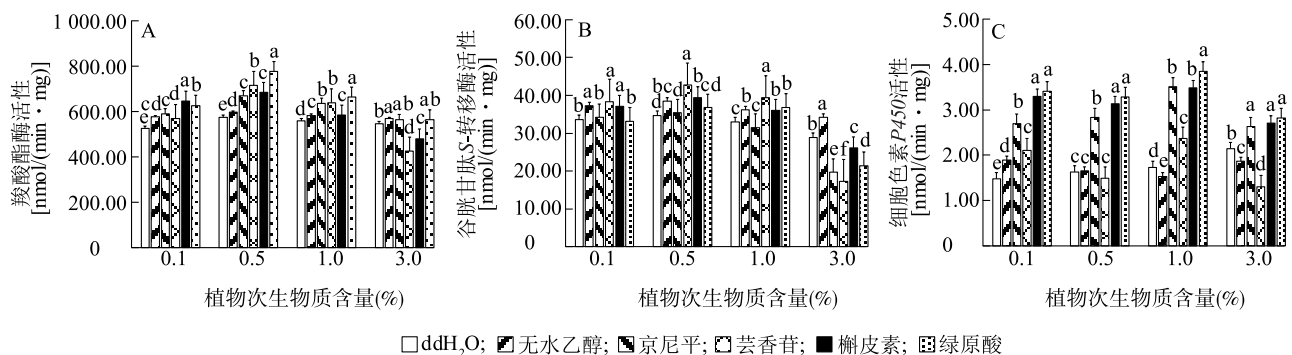
2 结果与分析

2.1 不同植物次生物质对黄粉虫解毒酶活性的影响

2.1.1 不同含量植物次生物质对黄粉虫解毒酶活性的剂量效应 分别用添加 0.1%、0.5%、1.0%、3.0% 植物次生物质的麦麸饲喂黄粉虫 24 h,测定其 *CarE* 活性。如图 1A 所示,用不同含量植物次生物质处理后,黄粉虫的 *CarE* 活性呈现先被激活再被抑制的趋势。在较低含量 (0.1%、0.5%、1.0%) 植物次生物质处理下,各处理组的 *CarE* 活性均高于对照;当植物次生物质含量为 0.5% 时,4 种植物次生物质诱导的黄粉虫 *CarE* 活性达到最高值且各处理组与对照之间的差异显著 ($P < 0.05$),其中绿原酸处理组的 *CarE* 活性最高,激活率为 135.43%。高含量 (3.0%) 植物次生物质处理组的 *CarE* 活性下降,其中芸香苷、槲皮素处理组的 *CarE* 活性与对照间差异显著 ($P < 0.05$),芸香苷处理组的活性最低,为 425.86 nmol/(min · mg);京尼平、绿原酸处理组的 *CarE* 活性与对照差异不显著 ($P > 0.05$)。

用不同含量的植物次生物质饲喂黄粉虫 24 h 后测定其 *GST* 活性。如图 1B 所示,用 4 种不同含量植物次生物质处理后,黄粉虫的 *GST* 活性在 17.29~42.79 nmol/(min · mg) 范围内波动;在较低植物次生物质含量 (0.1%、0.5%、1.0%) 处理下,黄粉虫的 *GST* 活性较高;在较高植物次生物质含量 (3.0%) 处理下,黄粉虫的 *GST* 活性较低。当植物次生物质含量为 0.5% 时,黄粉虫的 *GST* 活性最高,其中芸香苷处理组最高,为 42.79 nmol/(min · mg),激活率为 111.06%;当植物次生物质含量达到 3.0% 时,黄粉虫的 *GST* 活性被显著抑制,各处理组与对照之间的差异显著 ($P < 0.05$),芸香苷处理组的抑制率最高,为 76.54%。

用不同含量的植物次生物质饲喂黄粉虫 24 h 后,测定其 *CYP450* 活性。如图 1C 所示,在低含量 (0.1%、0.5%、1.0%) 植物次生物质处理下,京尼平、槲皮素、绿原酸处理组的 *CYP450* 活性较高,在高含量 (3.0%) 处理下,京尼平、槲皮素、绿原酸处理组的 *CYP450* 活性相对低含量处理组受到抑制。当植物次生物质含量为 1.0% 时,黄粉虫的 *CYP450* 活性整体上最高,其中绿原酸处理组活性最高,为 3.85 nmol/(min · mg),激活率为 222.54%,芸香苷处理组活性最低,为 2.37 nmol/(min · mg),激活率为 154.90%。当植物次生物质含量达到 3.0% 时,芸香苷处理组的活性最低,为 1.30 nmol/(min · mg),抑制率为 69.52%。



A: 羧酸酯酶活性; B: 谷胱甘肽 S-转移酶活性; C: 细胞色素 P450 活性。在同种植物次生物质含量下,不同处理间标有不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。ddH₂O 为绿原酸、京尼平的对照,无水乙醇为芸香苷、槲皮素的对照。

图 1 4 种植物次生物质对黄粉虫解毒酶诱导的剂量效应

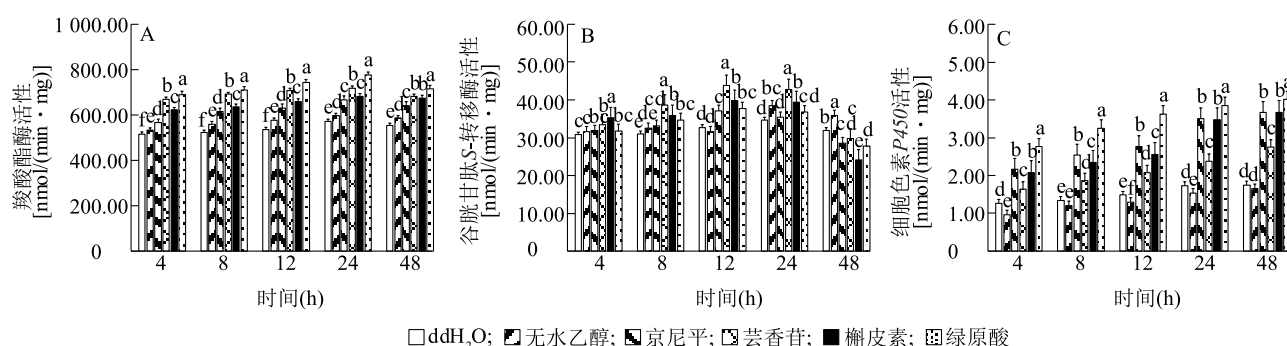
Fig.1 Dose-effect of four plant secondary metabolites on detoxification enzymes of *Tenebrio molitor*

2.1.2 相同含量植物次生物质对黄粉虫解毒酶的时间效应 根据 2.1.1 节的结果,用对黄粉虫 *CarE*、*GST* 诱导活性最高的含量为 0.5% 的 4 种

植物次生物质饲喂黄粉虫,分别于饲喂后 4 h、8 h、12 h、24 h、48 h 测定黄粉虫的 *CarE*、*GST* 活性。如图 2A 所示,各处理组黄粉虫的 *CarE* 活性

在测定时间内始终高于对照,并且随着处理时间的延长无显著变化。如图 2B 所示,处理 4 h 时,4 种植物次生物质处理的黄粉虫 *GST* 活性接近对照;当处理时间达到 12 h 时,4 种植物次生物质处理的黄粉虫 *GST* 活性最高,与对照差异显著 ($P<0.05$),其中芸香苷处理组的 *GST* 活性最高,为 43.86 nmol/(min·mg),激活率为 138.84%;当处理时间达到 48 h 时,4 种植物次生物质处理的黄粉虫的 *GST* 活性相对于其他 4 个时间点显著受到抑制,均低于对照,抑制效果最强的是槲皮素处理组,*GST* 活性为 24.09 nmol/(min·mg),抑制率为 67.23%。

根据 2.1.1 节的结果,选择对黄粉虫 *CYP450* 诱导活性最高含量 (1.0%) 的 4 种植物次生物质饲喂黄粉虫,分别于饲喂后 4 h、8 h、12 h、24 h、48 h 测定黄粉虫的 *CYP450* 活性。如图 2C 所示,在不同处理时间内,4 种植物次生物质处理的 *CYP450* 活性均高于对照,并且随着处理时间的延长,*CYP450* 活性逐渐增强。当处理时间达到 48 h 时,黄粉虫的 *CYP450* 活性最高,其中活性最高的是绿原酸处理组,为 4.01 nmol/(min·mg),激活率为 229.14%,最低的为芸香苷处理组,活性为 2.75 nmol/(min·mg),激活率为 166.67%。



A:羧酸酯酶活性;B:谷胱甘肽 S-转移酶活性;C:细胞色素 P450 活性。在同一处理时间下,不同处理间标有不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。ddH₂O 为绿原酸、京尼平的对照,无水乙醇为芸香苷、槲皮素的对照。

图 2 4 种植物次生物质对黄粉虫解毒酶诱导的时间效应

Fig.2 Time-effect of four plant secondary metabolites on detoxification enzymes in *Tenebrio molitor*

2.2 4 种植物次生物质对黄粉虫解毒酶基因表达的影响

由上述结果可知,在试验含量范围内的 4 种植物次生物诱导下,黄粉虫的 *CarE* 活性显著高于 *GST*、*CYP450* 活性;含量为 0.5% 的植物次生物质对羧酸酯酶的诱导活性最大,因此后续拟克隆黄粉虫羧酸酯酶基因并研究 0.5% 含量的 4 种植物次生物质对黄粉虫羧酸酯酶基因表达的影响。

2.2.1 黄粉虫羧酸酯酶基因核苷酸序列及氨基酸序列 根据反转录 PCR 产物测序结果,明确片段中包含昆虫羧酸酯酶基因的保守区域,将其命名为 *TmCarE*。如图 3 所示,*TmCarE* 保守序列长度约为 321 bp,推导出 107 个氨基酸残基,推导的蛋白质相对分子量为 11 725.34,等电点 (*PI*) 为 4.11,分子式为 C₅₃₇H₈₀₈N₁₃₀O₁₅₇S₄,该分子由 1 636 个原子构成,带正电荷残基[精氨酸 (Arg)+赖氨酸

(Lys)] 总数为 4 个,带负电荷残基[天冬氨酸 (Asp)+谷氨酸 (Glu)] 总数为 14 个,不稳定指数为 41.90,属于不稳定蛋白,脂族指数为 100,总平均亲水性为 0.318。根据 NCBI 网站的保守域数据库 (Conserved domains database) 分析结果,其含有羧酸酯酶的 1 个保守结构域,在第 92~107 位含有丝氨酸活性位点 FGGDPNNVTIFGQSSG。

通过与已报道的昆虫羧酸酯酶的氨基酸序列进行对比,发现虽然不同目昆虫羧酸酯酶的同源性相对较低,但在活性位点附近具有较高的相似性(图 4)。

2.2.2 不同植物次生物质诱导后黄粉虫 *TmCarE* 基因表达分析 以用含量为 0.5% 的 4 种植物次生物质饲喂的黄粉虫为试验材料,通过半定量 RT-PCR、荧光定量 PCR 分析 *TmCarE* 基因的表达情况。半定量 RT-PCR 结果(图 5)表明,含量为 0.5% 的 4 种植物次生物质均能诱导 *TmCarE* 基因表达,但是不

10 20 30 40 50 60
AGAGTCGGAGGTGCAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACGATTGCCCGTGATGTTCTGGAT
E S E V Q L A C L Q V D D L P V M F W I
70 80 90 100 110 120
CCATGGAGGTATC TTCGTTTTTGGATCTGGAAGCACAGAATTCTACGGTCCAGACTTCTT
H G G I F V F G S G S T E F Y G P D F L
130 140 150 160 170 180
AATCACCGAGGACGTGGTAGTCGTTACCATCAACTATCGACTAGGACTGTTGGATTTCCT
I T E D V V V V T I N Y R L G L L D F L
190 200 210 220 230 240
CTGTTTGGAGGACCCCACTCTGGAGTACCAGGAAACGCTGGGTTCAAGGACGTCGTAAT
C L E D P T L G V P G N A G F K D V V M
250 260 270 280 290 300
GGCTTTGAAATGGGTCCACGAAAATATACGCCAGTTTGGCGGCGACCCCAACAATGT CAC
A L K W V H E N I R Q F G G D P N N V T
310 320 330 340 350 360
AATCTTTGGTCAAAGCTCTGGTGCCGCCGTCGTCATCTCTTAACCTTTGTCGCCCATGGG
I F G Q S S G A A V V H L L T L S P M G

数量表示核苷酸位置(bp),下划线表示活性中心的催化三联体位点。

图3 黄粉虫羧酸酯酶 *TmCarE* 核苷酸序列及其氨基酸序列

Fig.3 Nucleotide sequence and amino acid sequence of carboxylesterase *TmCarE* from *Tenebrio molitor*

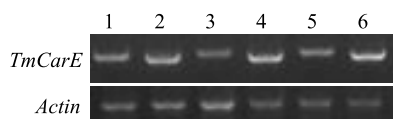
| | | | |
|---------------|---|---------------------|-----|
| <i>TmCarE</i> | ESEVQLACLQVDDLPMVEWI | HGGIFVFGSGSTEFYG | 36 |
| AAC36245.1 | YI NVTYK. . . KI NSNVKQPVMFYI | HGGGFI FGS GNDFF YG | 120 |
| ACU00116.1 | YLNVTYTPQFPSEDTLKDVMVWI | HGGAFAGGSAREEEQG | 138 |
| AHH02590.1 | YLNVTHTPQAPSDSYDDLMDVLFVI | HGGGFNAGDGRKSSVG | 134 |
| ANS06319.1 | FLSVYTTSLTGAT. PVI VFI | HGGYFTLGNSSYEGKG | 131 |
| AAM94377.1 | YLDVYTP. NI NGKFPVMFVI | HGGGFLAGHSGSNIFG | 91 |
| AAR26516.1 | TVNVYTP. VEPSDSLRLPMVFI | HGGAFRDGSGPSFLYG | 138 |
| AKZ17664.1 | FLNVYTQQLPSNTNKTLPVMVWI | HGGAFRSGSNKTDVYG | 123 |
| CAH64510.1 | TLNVYTRDLPKEGSNFLKPMVWVI | HGGGFTSGSGSSEIYG | 123 |
| BAC10282.1 | YLNVTYK. . . QLQLSKPLPMVWVI | HGGAFASGS GNTDQYG | 41 |
| ACI42858.1 | YLNVTYTPQLPDV. SKPLLPMVWVI | YGGGFEAGTSEYNETG | 143 |
| <i>TmCarE</i> | PDFLI TEDVVVTI NYRLGLLDLFLCLEDPTLGVPGNAGFK | | 76 |
| AAC36245.1 | PDFLMRKDI VLVTFN YRLGVFGFLNLEHEVA. . PGNQGLK | | 158 |
| ACU00116.1 | PEMLI PSDVVFVAI NYRLGVFGSFHLEDTSLEYPGNLQMK | | 178 |
| AHH02590.1 | PEFLMPENVVLVSI NYRLGIFGSFNLDASLGYPGNLLMK | | 174 |
| ANS06319.1 | PDFFLDEGVVFMVLMQYRLGLFGFITTE. . DSANPGNWGLK | | 169 |
| AAM94377.1 | AEYFMDKDVVLVSI NYRLGLFGFISTEDDVI. . PGNYGLK | | 129 |
| AAR26516.1 | PKYLVKHGVILVTFN YRLLEI LGFLCLGI KEA. . PGNI GLK | | 176 |
| AKZ17664.1 | PEFLLTEDI VLVTI NYRLGI FGFLSFEDASLGVPGNAGLK | | 163 |
| CAH64510.1 | PEFLMTEDI VLVSI NYRI GI I GFLSLEDPDLEVPGNAGLK | | 163 |
| BAC10282.1 | PDFLVDKDVVI VTI NYRLEVLFGLCLDMEEA. . AGNAGMK | | 79 |
| ACI42858.1 | PDYFFDEDVI FVSLNYRLGVFGFLSLG. . DTVVPGNNGLK | | 181 |
| <i>TmCarE</i> | DVMALKWVHENI RQFGGDPNNVTI FGQSSGAAVVHLLTL | | 116 |
| AAC36245.1 | DQVMALKWVRDNI ANFGGDS ENVTI FGESAGGASVHYLTV | | 198 |
| ACU00116.1 | DQALALKWVQSNIVRF GGNPDSVTI FGGSAGGASVHYHVL | | 218 |
| AHH02590.1 | DQVLALKWVQSNIAKF GGNPDSVTI SGQSAGGASVHYLI L | | 214 |
| ANS06319.1 | DQVLALQVVRDNI QYFGGDP TKVTLWGQSVGGASVGYHLV | | 209 |
| AAM94377.1 | DQVLALRWVQENI AKF GGDPDQVTI FGESAG | | 169 |
| AAR26516.1 | DQVQALKWVKRNI RVFGGDPDNI TIFGESAGSASVSYHLL | | 216 |
| AKZ17664.1 | DMVMALKWVQKNI SKFSGGDPNNTI FGESAGGASVHYLVL | | 203 |
| CAH64510.1 | DMVLALKWVQENI I HF CGDPNNVTI FGESAGAAAAHYLI L | | 203 |
| BAC10282.1 | DQVAALRWVKKNI NKFGGDPNNI TIFGESAG | | 110 |
| ACI42858.1 | DQNLALLWIKQNI I NF GGDEDQITLFGQSAGSASVSYHSL | | 221 |

AAC36245.1:象虫金小蜂(*Anisopteromalus calandrae*)基因序列号;ACU00116.1:华北大黑鳃金龟(*Holotrichia oblita*)基因序列号;AHH02590.1:暗黑鳃金龟(*Holotrichia parallela*)基因序列号;ANS06319.1:莲草直胸跳甲(*Agasicles hygrophila*)基因序列号;AAM94377.1:棉蚜(*Aphis gossypii*)基因序列号;AAR26516.1:甘蓝夜蛾(*Mamestra brassicae*)基因序列号;AKZ17664.1:大黄粉虫(*Tenebrio molitor*)基因序列号;BAC10282.1:小菜蛾(*Plutella xylostella*)基因序列号;CAH64510.1:赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*)基因序列号;ACI42858.1:异色瓢虫(*Harmonia axyridis*)基因序列号。保守的氨基酸残基用黑色表示。

图4 黄粉虫与其他昆虫羧酸酯酶氨基酸序列的同源性比较

Fig.4 Homology comparison of amino acid sequences of carboxylesterase between *Tenebrio molitor* and other insects

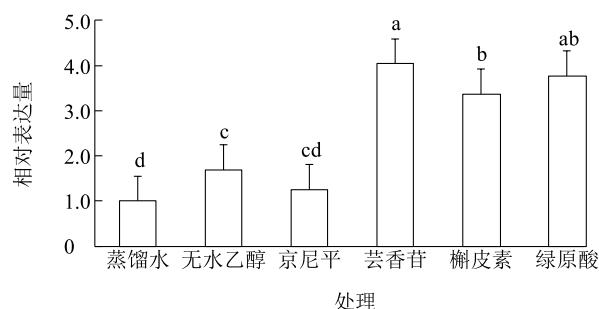
同种类的植物次生物质对其诱导效果不同;与对照相比,芸香苷、绿原酸能明显诱导 *TmCarE*, 槲皮素次之, 京尼平的诱导效果不明显。荧光定量 PCR 结果表明, 含量为 0.5% 的 4 种植物次生物质均能诱导 *TmCarE*, 且 4 种植物次生物质对 *TmCarE* 的诱导量存在显著差异, 其中芸香苷处理组的基因相对表达量较高, 约为对照的 2.39 倍, 其次是绿原酸、槲皮素处理组, 分别为对照的 3.77 倍、1.98 倍, 京尼平处理组的相对表达量与对照无显著差异(图 6)。



1: 对照组(蒸馏水); 2: 对照组(无水乙醇); 3: 京尼平; 4: 芸香苷; 5: 槲皮素; 6: 绿原酸; *Actin*: 内参基因。

图 5 4 种植物次生物质对黄粉虫羧酸酯酶基因 *TmCarE* 的诱导模式

Fig.5 Induction of carboxylesterase gene *TmCarE* in *Tenebrio molitor* by four plant secondary metabolites



不同处理间标有不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。ddH₂O 为绿原酸、京尼平的对照, 无水乙醇为芸香苷、槲皮素的对照。

图 6 黄粉虫取食 4 种植物次生物质后 *TmCarE* 基因相对表达量的变化

Fig.6 Changes in the relative expression of *TmCarE* gene after *Tenebrio molitor* fed on four plant secondary substances

3 讨论

解毒酶可以减轻有毒物质对昆虫的毒害作用, 从而维持昆虫正常的生长代谢^[23]。本研究结果表明, 不同植物次生物质对不同解毒酶活性的诱导情况不同。黄粉虫取食供试含量范围内的京尼平、芸香苷、槲皮素、绿原酸后, *CarE* 活性均显著高于 *GST*、*CYP450* 活性, 提示 *CarE* 可能是黄粉虫代谢 4 种次生物质的关键解毒酶。在 0.1%~3.0% 的供试含量范围内, 除 0.1% 含量下槲皮素处理组的 *CarE*

活性最高外, 其他含量的绿原酸处理组的 *CarE* 活性均高于芸香苷、京尼平和槲皮素处理组。而当植物次生物质含量为 0.1%、0.5%、1.0% 时, 芸香苷处理组的 *GST* 活性均高于绿原酸、京尼平、槲皮素处理组; 当植物次生物含量为 3.0% 时, 芸香苷处理组的 *GST* 活性最低。用 4 种植物次生物质饲喂黄粉虫发现, 绿原酸处理组的 *CYP450* 活性一直最高, 芸香苷处理组 *CYP450* 活性较低。潘忠玉等^[24] 研究不同植物次生物质对美国白蛾解毒酶活性的影响发现, 在供试含量范围 (0.250%~4.000%) 内, 随着槲皮素含量的升高, *GST* 活性也逐渐升高; 各含量槲皮素处理对美国白蛾幼虫的 *CYP450* 活性均未表现出显著影响; 各含量绿原酸对美国白蛾幼虫的 *CarE* 活性也均未表现出显著影响。Liu 等^[25-26] 研究发现, 棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*) 取食槲皮素能显著提高虫体 *P450* 活性、*CarE* 活性。以上结果一方面说明, 不同次生物质在生物体中需要多种解毒酶的协调作用对其进行解毒代谢; 另一方面说明, 植物次生物质对解毒酶活性的诱导情况既与次生物质种类有关, 也与昆虫种类密切相关^[27]。

另外, 本研究中的 4 种植物次生物质对黄粉虫解毒酶活性存在明显的剂量效应, 黄粉虫取食低剂量 (0.1%~1.0%) 的植物次生物质后, 其 *CarE*、*GST*、*CYP450* 活性与对照相比整体较高, 说明低剂量植物次生物质可以激发黄粉虫 *CarE*、*GST*、*CYP450* 活性, 即黄粉虫通过提高 *CarE*、*GST*、*CYP450* 活性来代谢植物次生物质对它的毒害作用; 随着植物次生物质含量的进一步升高, 降毒酶活性下降, 说明较高含量的植物次生物质在黄粉虫体内的积累, 超出了解毒酶的解毒极限。潘忠玉等^[24] 研究不同植物次生物质对美国白蛾解毒酶活性的影响发现: 槲皮素含量为 0.500% 时, *CarE* 活性最低; 槲皮素含量高于 0.500% 后, *CarE* 活性升高; 绿原酸含量为 0.500%~2.000% 时, *CYP450*、*GST* 的活性均被显著诱导, 且 *CYP450* 活性在绿原酸含量为 1.000% 时达到最大值, 之后酶活性被抑制。此规律与本研究结果一致。

解毒酶活性的增高既能够提高昆虫对植物次生物质的解毒代谢能力, 又能够增强昆虫对杀虫剂的耐药性。因此研究昆虫对植物次生物质的时间效应, 对于明确将植物次生物质结合化学防治手段用于害虫防治时化学药剂的合理施用时间和方式具有重要意义。例如, Zhang 等^[28] 研究发现, 黄酮类化合

物诱导的 *P450* 能显著提高烟粉虱对 2 种农药的耐受性。甜菜夜蛾幼虫取食含有棉酚的日粮能显著提高其对溴氰菊酯的耐受性^[29]。槲皮素能显著提高西方蜜蜂对联苯菊酯、氟氯氰菊酯和氟胺氰菊酯的耐受性^[30]。质量浓度为 37.8 mg/L 的槲皮素提前处理 24 h 能显著降低吡虫啉对中华蜜蜂的致死效应、亚致死效应,但 75.6 mg/L、151.2 mg/L 的槲皮素处理加剧了吡虫啉对中华蜜蜂的致死效应^[31]。本研究选用对黄粉虫 *CarE*、*GST* 诱导活性最高的 0.5% 含量以及对黄粉虫 *CYP450* 诱导活性最高的 1.0% 含量的 4 种植物次生物质饲喂黄粉虫,研究相同含量下处理 4 h、8 h、12 h、24 h、48 h 5 个时间点植物次生物质对黄粉虫解毒酶的时间效应。结果表明,4 种植物次生物质对黄粉虫 *CarE* 活性不存在明显的时间效应,但对 *GST*、*CYP450* 解毒酶活性的时间效应显著。当处理时间达到 12 h 时 4 种植物次生物质处理的 *GST* 活性最高,与对照差异显著 ($P < 0.05$),且多数次生物质处理组之间差异显著 ($P < 0.05$)。在不同的处理时间内,4 种植物次生物质处理的黄粉虫 *CYP450* 活性均高于对照组,当处理时间达到 48 h 时,其活性最高。因此,在用以 *GST*、*CYP450* 作为主要解毒酶的植物次生物质预防虫害时,应考虑其适宜的施用时间。

羧酸酯酶 (*CarE*) 属于丝氨酸水解酶,在动植物体内广泛存在,可以参与多种植物次生物质、杀虫剂等的代谢,并在生物胁迫过程中发挥重要作用^[32]。昆虫 *CYP*、*GST* 和 *CarE* 等解毒酶家族基因均可被植物次生物质诱导,且基因表达量上调往往代表这些基因参与次生物质的代谢^[33]。尹菲等^[34-35]发现,飞蝗羧酸酯酶基因 *LmCesA2* 在果蝇肠道中高表达,可能参与马拉硫磷的解毒代谢。华山松大小蠹取食含有(-)- β -蒎烯的纯人工饲料后,*DaCarE5* 基因显著上调表达;在取食含有柠檬烯、松节油的纯人工饲料后,*DaCarE6* 上调表达。本研究的半定量 PCR、荧光定量 PCR 结果均表明,在 4 种植物次生物质处理下,黄粉虫的 *TmCarE* 均上调表达,诱导率为对照的 1.98~3.77 倍,说明 *TmCarE* 基因极有可能参与黄粉虫对京尼平、芸香苷、槲皮素、绿原酸 4 种植物次生物质的代谢解毒过程;相对于京尼平,该基因对绿原酸、芸香苷和槲皮素 3 种次生物质具有更强的代谢能力。有研究发现,羧酸酯酶介导的害虫抗药性的发挥主要是通过蛋白质结构的变化或表达量的增

加实现的^[36],该基因在本研究中 4 种植物次生物质代谢过程中发挥作用的机制还有待深入研究。

本研究探讨了京尼平、芸香苷、槲皮素和绿原酸 4 种植物次生物质对黄粉虫解毒酶的诱导效果和解毒酶基因的表达情况。解毒酶诱导试验结果表明,在供试含量范围内,4 种植物次生物质都不同程度地影响了黄粉虫体内的解毒酶活性。其中,0.5%、1.0% 的植物次生物质整体上对黄粉虫解毒酶均有诱导激活作用,对 *CarE* 的诱导活性最强。高剂量 (3.0%) 的植物次生物质会显著抑制黄粉虫中的 3 种解毒酶活性,暗示 3 种解毒酶均参与黄粉虫对供试 4 种植物次生物质的解毒代谢,其中 *CarE* 是黄粉虫解毒代谢的关键解毒酶。半定量 PCR、荧光定量 PCR 结果表明,当 4 种植物次生物质含量为 0.5% 时,均可诱导 *TmCarE* 基因的表达且绿原酸、芸香苷和槲皮素能显著提高 *TmCarE* 基因的表达量。由此推测,*TmCarE* 极有可能参与黄粉虫对京尼平、芸香苷、槲皮素、绿原酸的代谢解毒过程,且该基因对绿原酸、芸香苷和槲皮素 3 种次生物质具有更强的代谢能力。本研究结果可为研发高效植物源农药、科学把握植物源农药的施用含量和方法及与化学药剂的协同应用从而高效发挥其在害虫防治中的作用、延缓和阻止昆虫抗药性产生等奠定理论基础。

参考文献:

- [1] 钦俊德,王琛柱. 论昆虫与植物的相互作用和进化的关系[J]. 昆虫学报,2001,44(3):360-365.
- [2] 张 晶,段至柔,刘常权,等. 寄主植物与刺吸式昆虫互作防御的研究进展[J]. 昆虫学报,2023,66(4):575-590.
- [3] 黄敏燕,李雪峰. 植物次生物质对斜纹夜蛾解毒酶活性的影响[J]. 基因组学与应用生物学,2018,37(8):3495-3502.
- [4] GIRAUDO M, HILLIOU F, FRICAUX T, et al. Cytochrome P450s from the fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*): responses to plant allelochemicals and pesticides[J]. Insect Molecular Biology, 2015,24(1):115-128.
- [5] JIN M H, LIAO C Y, CHAKRABARTY S, et al. Transcriptional response of ATP-binding cassette (ABC) transporters to insecticides in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2019,154:46-59.
- [6] MARSHALL S D G, PUTTERILL J J, PLUMMER K M, et al. The carboxylesterase gene family from *Arabidopsis thaliana*[J]. Journal of Molecular Evolution, 2003,57(5):487-500.
- [7] YU Q Y, LU C, LI W L, et al. Annotation and expression of carboxylesterases in the silkworm, *Bombyx mori*[J]. BMC Genomics, 2009,10:553.

- [8] CAI Q N, ZHANG Q W, CHEO M. Contribution of indole alkaloids to *Sitobion avenae* (F.) resistance in wheat[J]. Journal of Applied Entomology, 2004, 128(8):517-521.
- [9] 高希武,董向丽,郑炳宗,等. 棉铃虫的谷胱甘肽 S-转移酶(GSTs):杀虫剂和植物次生生物质的诱导与 GSTs 对杀虫剂的代谢[J]. 昆虫学报, 1997, 40(2):122-127.
- [10] SCOTT J G, LIU N. Insect cytochrome P450s: thinking beyond detoxification [J]. Research Signpost, 2008, 46(1):117-124.
- [11] 郭婷婷,姜 辉,高希武,等. 昆虫细胞色素 P450 基因的多样性、进化及表达调控[J]. 昆虫学报, 2009, 52(3):301-311.
- [12] MAO W F, RUPASINGHE S G, JOHNSON R M, et al. Quercetin-metabolizing CYP6A5 enzymes of the pollinator *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2009, 154(4):427-434.
- [13] GONG B, ZHANG G F. Interactions between plants and herbivores: a review of plant defense [J]. Acta Ecologica Sinica, 2014, 34(6):325-336.
- [14] 王景顺,吴秋芳,路志芳,等. 植物次生代谢物与林木抗虫性研究进展 [J]. 江苏农业科学, 2015, 43(8):4-7.
- [15] ATEYYAT M, ABU-ROMMAN S, ABU-DARWISH M, et al. Impact of flavonoids against woolly apple aphid, *Eriosoma lanigerum* (Hausmann) and its sole parasitoid, *Aphelinus mali* (Hald.) [J]. Journal of Agricultural Science, 2012, 4(2):227.
- [16] 高锦明,张鞍灵,赵晓明,等. 绿原酸分布、提取与生物活性研究综述[J]. 西北林学院学报, 1999, 14(2):73-82.
- [17] 王晓丽,王予彤,段立清,等. 四种植物酚类物质对舞毒蛾生长发育及繁殖的影响[J]. 昆虫学报, 2014, 57(7):831-836.
- [18] HOOVER J D, WENDER S H, SMITH E C. Effect of phenolic compounds on glucose-6-phosphate dehydrogenase isoenzymes [J]. Phytochemistry, 1977, 16(2):199-201.
- [19] ELLIGER C A, CHAN B C, WAISS A C. Flavonoids as larval growth inhibitors [J]. Naturwissenschaften, 1980, 67(7):358-360.
- [20] 宫芳芳,王有年,任建军,等. 植物粗提物对朱砂叶螨触杀活性的研究[J]. 农学报, 2013, 3(2):26-30, 43.
- [21] 汪 彤,史东霞,张 爽,等. 4种植物次生物质对黄粉虫生长发育的影响及维生素 B₁ 的增效作用[J]. 林业与生态科学, 2021, 36(1):49-55.
- [22] 刘建业,钱 蕾,蒋兴川,等. CO₂ 浓度升高对西花蓟马和花蓟马成虫体内解毒酶和保护酶活性的影响[J]. 昆虫学报, 2014, 57(7):754-761.
- [23] 樊艳平,党海燕,王宏民,等. 绿豆胰蛋白酶抑制剂对绿豆象生长发育及体内解毒酶和保护酶活性的影响[J]. 昆虫学报, 2020, 63(12):1473-1481.
- [24] 潘忠玉,莫夏娜,孟 香,等. 绿原酸对美国白蛾幼虫生长发育和解毒相关蛋白活性的影响[J]. 昆虫学报, 2020, 63(9):1081-1090.
- [25] LIU D, YUAN Y, LI M, et al. Effects of dietary quercetin on performance and cytochrome P450 expression of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* [J]. Bulletin of Entomological Research, 2015, 105(6):771-777.
- [26] CHEN C Y, LIU Y, SHI X Y, et al. Elevated carboxylesterase activity contributes to the lambda-cyhalothrin insensitivity in quercetin fed *Helicoverpa armigera* (Hübner) [J]. PLoS One, 2017, 12(8):e0183111.
- [27] 王柄权,程凌寒,方 宇,等. 植物次生代谢物质对草地贪夜蛾解毒酶活性及相关基因表达的影响[J]. 江苏农业科学, 2022, 50(8):11-15.
- [28] ZHANG Q H, YANG F B, TONG H, et al. Plant flavonoids enhance the tolerance to thiamethoxam and flupyradifurone in whitefly *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2021, 171:104744.
- [29] HAFEZ M, LIU S S, JAN S, et al. Knock-down of gossypol-inducing cytochrome P450 genes reduced deltamethrin sensitivity in *Spodoptera exigua* (Hübner) [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(9):2248.
- [30] LIAO L H, WU W Y, BERENBAUM M R. Impacts of dietary phytochemicals in the presence and absence of pesticides on longevity of honey bees (*Apis mellifera*) [J]. Insects, 2017, 8(1):22.
- [31] LIU J L, LI Y Y, ZHANG Z H, et al. Low concentration of quercetin reduces the lethal and sublethal effects of imidacloprid on *Apis cerana* (Hymenoptera: Apidae) [J]. Journal of Economic Entomology, 2021, 114(3):1053-1064.
- [32] 刘建光,赵贵元,赵俊丽,等. 植物羧酸酯酶的结构、表达调控及生物功能研究进展[J]. 作物杂志, 2018(3):32-36.
- [33] FENG Q L, DAVEY K G, PANG A S D, et al. Developmental expression and stress induction of glutathione S-transferase in the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* [J]. Journal of Insect Physiology, 2001, 47(1):1-10.
- [34] 尹 菲,杨 洋,张徐波,等. 转飞蝗羧酸酯酶基因果蝇品系的构建及其在有机磷农药代谢解毒中的作用[J]. 昆虫学报, 2020, 63(7):843-850.
- [35] DAI L L, GAO H M, YE J Q, et al. Isolation of *CarE* genes from the Chinese white pine beetle *Dendroctonus armandi* (Curculionidae: Scolytinae) and their response to host chemical defense [J]. Pest Management Science, 2019, 75(4):986-997.
- [36] 杨 婵,潘 婧,李 梅,等. 家蝇羧酸酯酶 *MdaE7* 抗性相关基因突变检测及其进化起源分析[J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2023, 30(2):88-94.

(责任编辑:徐 艳)