



国家出版基金项目
NATIONAL PUBLICATION FOUNDATION

现代农业高新技术成果丛书

害虫对植物次生性物质适应的 生物化学和分子机制

——以棉铃虫的解毒代谢适应为例

Insect Adaptation to Plant Allelochemicals Based on Detoxification:
Helicoverpa armigera as an Example

高希武 主编



中国农业大学出版社

CHINA AGRICULTURAL UNIVERSITY PRESS



国家出版基金项目
NATIONAL PUBLICATION FOUNDATION

现代农业高新技术成果丛书

害虫对植物次生性物质适应 的生物化学和分子机制

——以棉铃虫的解毒代谢适应为例

**Insect Adaptation to Plant Allelochemicals
Based on Detoxification:**

***Helicoverpa armigera* as an Example**

高希武 主编

中国农业大学出版社
• 北京 •

内 容 简 介

协同进化(coevolution)是生物界物种间的一种普遍现象,动物在一生当中取食对自身安全的食物是其最基本的本能,对于每一个物种,在形态学、生理学、生态学以及行为学等方面已进化出了许多适合于获取食物和利用食物的特征。动物界中,昆虫显示出了多样性的取食习性,植物次生性物质是决定昆虫能否取食某种植物的主要因子之一。本书从植物次生性物质诱导棉铃虫体内解毒代谢酶系和棉铃虫对外源化合物代谢方面阐述了昆虫对次生性物质适应的生物化学和分子机制。主要内容包括植物次生性物质诱导棉铃虫对杀虫药剂敏感度的变异、取食和气味诱导棉铃虫体内细胞色素 P450、谷胱甘肽-S-转移酶、羧酸酯酶活性和基因表达变化以及诱导后对杀虫药剂代谢的影响等。

本书适合从事植物保护领域研究人员以及大专院校师生参考。

图书在版编目(CIP)数据

害虫对植物次生性物质适应的生物化学和分子机制——以棉铃虫的解毒代谢适应为例/高希武主编. —北京:中国农业大学出版社,2012.10

ISBN 978-7-5655-0576-8

I. ①害… II. ①高… III. ①植物害虫-适应性-生物化学②植物害虫-适应性-分子机制 IV. ①S433

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 166870 号

书 名 害虫对植物次生性物质适应的生物化学和分子机制
——以棉铃虫的解毒代谢适应为例

作 者 高希武 主编

策划编辑 孙 勇

责任编辑 田树君

封面设计 郑 川

责任校对 陈 莹 王晓凤

出版发行 中国农业大学出版社

社 址 北京市海淀区圆明园西路 2 号

邮政编码 100193

电 话 发行部 010-62731190,2620

读者服务部 010-62732336

编辑部 010-62732617,2618

出 版 部 010-62733440

网 址 <http://www.cau.edu.cn/caup>

e-mail cbsszs@cau.edu.cn

经 销 新华书店

印 刷 涿州市星河印刷有限公司

版 次 2012 年 10 月第 1 版 2012 年 10 月第 1 次印刷

规 格 787×1092 16 开本 14.75 印张 360 千字 彩插 2

定 价 72.00 元

图书如有质量问题本社发行部负责调换

现代农业高新技术成果丛书

编审指导委员会

主 任 石元春

副主任 傅泽田 刘 艳

委 员 (按姓氏拼音排序)

高旺盛 李 宁 刘庆昌 束怀瑞

佟建明 汪懋华 吴常信 武维华

编写人员

主 编 高希武

参编人员 (按姓氏拼音排序)

艾国民	陈凤菊	董向丽	郭亭亭	李永丹
梁 沛	刘晓宁	任怡欣	史雪岩	宋敦伦
汤 芳	王 燚	吴少英	于彩虹	张常忠
张 雷				

出版说明

瞄准世界农业科技前沿,围绕我国农业发展需求,努力突破关键核心技术,提升我国农业科研实力,加快现代农业发展,是胡锦涛总书记在 2009 年五四青年节视察中国农业大学时向广大农业科技工作者提出的要求。党和国家一贯高度重视农业领域科技创新和基础理论研究,特别是 863 计划和 973 计划实施以来,农业科技投入大幅增长。国家科技支撑计划、863 计划和 973 计划等主体科技计划向农业领域倾斜,极大地促进了农业科技创新发展和现代农业科技进步。

中国农业大学出版社以 973 计划、863 计划和科技支撑计划中农业领域重大研究项目成果为主体,以服务我国农业产业提升的重大需求为目标,在“国家重大出版工程”项目基础上,筛选确定了农业生物技术、良种培育、丰产栽培、疫病防治、防灾减灾、农业资源利用和农业信息化等领域 50 个重大科技创新成果,作为“现代农业高新技术成果丛书”项目申报了 2009 年度国家出版基金项目,经国家出版基金管理委员会审批立项。

国家出版基金是我国继自然科学基金、哲学社会科学基金之后设立的第三大基金项目。国家出版基金由国家设立、国家主导,资助体现国家意志、传承中华文明、促进文化繁荣、提高文化软实力的国家级重大项目;受助项目应能够发挥示范引导作用,为国家、为当代、为子孙后代创造先进文化;受助项目应能够成为站在时代前沿、弘扬民族文化、体现国家水准、传之久远的国家级精品力作。

为确保“现代农业高新技术成果丛书”编写出版质量,在教育部、农业部和中国农业大学的指导和支持下,成立了以石元春院士为主任的编审指导委员会;出版社成立了以社长为组长的项目协调组并专门设立了项目运行管理办公室。

“现代农业高新技术成果丛书”始于“十一五”,跨入“十二五”,是中国农业大学出版社“十二五”开局的献礼之作,她的立项和出版标志着我社学术出版进入了一个新的高度,各项工作迈上了新的台阶。出版社将以此为新的起点,为我国现代农业的发展,为出版文化事业的繁荣做出新的更大贡献。

中国农业大学出版社

2010 年 12 月

序 言

在昆虫和植物相互关系的研究中出现频次最高的一个词汇恐怕就是“协同进化”，尽管有些不从事该领域研究的科学家对此有些微词，但是在昆虫—植物相互关系的发展过程中却实实在在地表现出了这种现象。化学关系在昆虫和植物间的共同进化中起着重要的作用。动物在一生当中，取食对自身安全的食物是其最基本的本能，对于每一个物种，在形态学、生理学、生态学以及行为学等方面都已进化出了许多适合于获取食物和利用食物的特征。动物界中，昆虫显示出了多样性的取食习性，植物次生性物质是决定昆虫能否取食某种植物的主要因子之一。如果昆虫在进化过程中能够克服植物次生性物质的不良影响，则该种植物就有可能成为其寄主，这时植物体内所含的这种次生性物质又有可能成为引诱昆虫取食的标记物。例如，十字花科植物所含的芥子苷具有杀虫活性，但是菜粉蝶、小菜蛾等不但不受芥子苷的影响，反而受这种物质的引诱，促进取食或诱导产卵。植物本身也进化出了各种各样的机制影响害虫的取食、行为等。

关于该领域的研究涉及的领域比较多，文献数量也很多，很难在一部著作中论述出来。作者本身尽管对这种协同进化现象具有浓厚的研究兴趣，但是限于作者能力，仅是对昆虫如何提高或改变解毒酶的水平适应植物次生性代谢产物方面进行了有限的研究。本书的主要内容来自于作者近年来的部分研究结果，而且有些并没有以论文形式公开发表，仅供参考。

本书目的不是为了追求全面，也不是为了追求多么高深，宗旨是呈献给读者们一些研究结果。谬误之处在所难免，敬请批评指正。

本书主要包括以下章节：

第1章是绪论，主要论述了昆虫和寄主植物共进化的关系；第2章是关于植物次生性物质诱导作用对杀虫药剂毒力的影响；第3章至第8章主要介绍了我们实验室关于植物次生性物质对棉铃虫细胞色素P450诱导作用的研究结果；第9章是关于2-十三烷酮诱导棉铃虫抗药性的研究；第10章至第16章是关于植物次生性物质对棉铃虫GSTs诱导作用的研究；第17章至第20章是植物次生性物质对棉铃虫羧酸酯酶诱导作用的研究；第21章是利用家蚕基因芯片对2-十三烷酮诱导棉铃虫基因表达差异的研究；第22章是2-十三烷酮诱导棉铃虫对虫螨

腈、毒死蜱氧化代谢的研究;最后一章是害虫的化学防治与作物抗虫性关系的阐述。

在本书完稿之际,作者要感谢本书引用参考文献的作者,对有遗漏之处请谅解。作者要特别感谢国家出版基金对该书出版的资助以及在研究过程中国家重点基础研究发展规划项目973计划(2012CB114103、2006BAD08A03、2009CB119203)、自然科学基金(30170621、30170621、39970496、30471153、30571232、30871661)和公益性行业(农业)科研专项(201203038、200903033)的资助。最后作者要感谢本书编辑孙勇和田树君认真的态度、敬业的精神和辛勤劳动。

高希武

2012年初夏于北京

目 录

第 1 章 绪论	1
参考文献	5
第 2 章 植物次生性物质诱导作用对杀虫药剂毒力的影响	8
2.1 芸香苷诱导作用对杀虫药剂毒力的影响	8
2.2 槲皮素诱导作用对杀虫药剂毒力的影响	9
2.3 2-十三烷酮诱导作用对杀虫药剂毒力的影响	10
2.4 讨论	11
参考文献	11
第 3 章 细胞色素 P450 光谱特征的研究	13
3.1 棉铃虫 P450 CO 差光谱测定	14
3.2 环境温度对 Cyt-P450 和 CO 结合的影响	17
3.3 棉铃虫中肠细胞色素 P450 失活的研究	23
3.4 棉铃虫细胞色素 P450 的不同组织以及亚细胞分布	28
3.5 棉铃虫田间种群和室内种群细胞色素 P450 与配体结合光谱研究	33
参考文献	39
第 4 章 棉铃虫对 2-十三烷酮和槲皮素的适应性	42
4.1 2-十三烷酮和槲皮素诱导对棉铃虫 P450s 比含量的影响	43
4.2 棉铃虫细胞色素 P450s O-脱甲基活性的测定	44
4.3 2-十三烷酮和槲皮素诱导对棉铃虫 P450s 活性的影响	48
4.4 棉铃虫 P450s 活性诱导的时间和剂量效应	50
参考文献	51
第 5 章 2-十三烷酮诱导棉铃虫 P450 基因序列分析	54
5.1 棉铃虫中肠和脂肪体 P450 基因序列比较	54

5.2	2-十三烷酮处理前后 P450 CYP6B6 序列比较	58
5.3	讨论	59
	参考文献	60
第 6 章	植物次生性物质诱导对棉铃虫 CYP6B6 基因表达的影响	63
6.1	2-十三烷酮和槲皮素组合诱导对棉铃虫中肠 CYP6B6 基因表达的影响	64
6.2	2-十三烷酮和槲皮素组合诱导对棉铃虫脂肪体 CYP6B6 基因表达的影响	64
6.3	单宁酸诱导对棉铃虫 CYP6B6 基因表达的影响	65
6.4	讨论	65
	参考文献	67
第 7 章	植物损伤挥发物对棉铃虫 P450 活性的影响	69
7.1	玉米损伤挥发物对棉铃虫细胞色素 P450 的诱导作用	69
7.2	棉花损伤挥发物对棉铃虫细胞色素 P450 的诱导作用	70
7.3	小麦损伤挥发物对棉铃虫细胞色素 P450 的诱导作用	71
7.4	植物挥发物对细胞色素 P450 诱导的时间效应	72
7.5	不同植物挥发性次生性物质对棉铃虫细胞色素 P450 诱导模式差异性	73
	参考文献	74
第 8 章	玉米损伤挥发物对棉铃虫 P450 基因表达量的影响	75
8.1	看家基因和目的基因扩增效率的计算	75
8.2	不同处理条件下棉铃虫脂肪体 P450 基因的相对表达量	76
8.3	相同 P450 基因在不同处理下表达量变化	82
8.4	不同 P450 基因相同处理下表达量变化	82
	参考文献	83
第 9 章	2-十三烷酮诱导棉铃虫对杀虫药剂敏感度变异	85
9.1	0.02% 2-十三烷酮诱导棉铃虫对几种杀虫药剂的敏感度变异	85
9.2	0.2% 2-十三烷酮诱导棉铃虫对高效氯氰菊酯的敏感度变异	86
9.3	0.2% 2-十三烷酮诱导棉铃虫对溴虫腈的敏感度变异	87
9.4	2-十三烷酮对棉铃虫谷胱甘肽-S-转移酶的诱导作用	88
9.5	2-十三烷酮对棉铃虫羧酸酯酶的诱导作用	88
	参考文献	89
第 10 章	杀虫药剂、植物次生性物质对棉铃虫 GSTs 的抑制作用	90
10.1	影响棉铃虫 GSTs 活性测定的因素	90
10.2	棉铃虫 GSTs 的酶促反应动力学	95
10.3	杀虫药剂和植物次生性物质对棉铃虫 GSTs 的抑制作用	96
	参考文献	102
第 11 章	棉铃虫谷胱甘肽-S-转移酶的纯化	104
11.1	蛋白质沉淀剂对棉铃虫谷胱甘肽-S-转移酶的部分纯化	104
11.2	蛋白质沉淀剂对棉铃虫 GSTs 米氏常数的影响	112
11.3	棉铃虫 GSTs 的纯化	116

参考文献	118
第 12 章 植物次生性物质对棉铃虫 GSTs 的诱导	119
12.1 棉铃虫 GSTs 在不同品系和不同组织中的表达	119
12.2 植物次生性物质对棉铃虫 GSTs 的诱导表达	121
12.3 单宁酸对棉铃虫 GSTs 的诱导	123
12.4 讨论	127
参考文献	129
第 13 章 植物次生性物质对棉铃虫 GSTs mRNA 水平的影响	133
13.1 2-十三烷酮和槲皮素诱导对棉铃虫不同组织 GSTs mRNA 含量影响	134
13.2 植物次生性物质对棉铃虫 GSTs mRNA 诱导表达的剂量效应	136
参考文献	138
第 14 章 棉铃虫谷胱甘肽-S-转移酶对杀虫药剂的代谢	139
14.1 谷胱甘肽消耗法测定代谢的条件	139
14.2 对 CDNB、溴氰菊酯、甲基对硫磷和灭多威的代谢测定	141
参考文献	145
第 15 章 寄主植物损伤对棉铃虫 GSTs 活性的影响	147
15.1 研究思路	147
15.2 棉蚜取食和机械损伤棉花挥发物对棉铃虫幼虫 GSTs 活性的影响	148
15.3 麦蚜取食和机械损伤对棉铃虫三龄幼虫 GSTs 活性的影响	149
15.4 玉米螟取食和机械损伤对棉铃虫三龄幼虫 GSTs 活性的影响	151
15.5 不同寄主植物对棉铃虫各部位 GSTs 活性的影响	153
参考文献	153
第 16 章 2-十三烷酮蒸汽对棉铃虫 GSTs 活性的影响	155
16.1 2-十三烷酮熏蒸棉铃虫一龄诱导组 GSTs 活性的变化	156
16.2 2-十三烷酮熏蒸棉铃虫二龄诱导组 GSTs 活性的变化	157
16.3 2-十三烷酮熏蒸棉铃虫三龄诱导组 GSTs 活性的变化	157
参考文献	157
第 17 章 杀虫药剂和植物次生性物质对棉铃虫羧酸酯酶的诱导作用	159
17.1 不同日龄棉铃虫幼虫羧酸酯酶比活力变化	159
17.2 棉铃虫幼虫羧酸酯酶同工酶底物专一性	160
17.3 杀虫药剂对棉铃虫幼虫羧酸酯酶的诱导作用	161
17.4 植物次生性物质对棉铃虫羧酸酯酶的诱导作用	163
17.5 讨论	163
参考文献	164
第 18 章 寄主植物损伤对棉铃虫羧酸酯酶活性的影响	166
18.1 棉蚜取食和机械损伤棉花挥发物对棉铃虫三龄幼虫 CarE 活性的影响	166
18.2 麦蚜取食和机械损伤小麦挥发物对棉铃虫三龄幼虫 CarE 活性的影响	168
18.3 玉米螟取食和机械损伤玉米挥发物对棉铃虫三龄幼虫 CarE 活性的影响	169
18.4 不同寄主植物对棉铃虫各部位 CarE 活性的影响	171

参考文献	172
第 19 章 2-十三烷酮对棉铃虫三龄幼虫羧酸酯酶活性的影响	173
19.1 2-十三烷酮熏蒸棉铃虫一龄诱导组 CarE 活性的变化	173
19.2 2-十三烷酮熏蒸棉铃虫二龄诱导组 CarE 活性的变化	174
19.3 2-十三烷酮熏蒸棉铃虫三龄诱导组 CarE 活性的变化	174
参考文献	175
第 20 章 2-十三烷酮对棉铃虫羧酸酯酶代谢活性的影响	176
20.1 试验处理	176
20.2 2-十三烷酮对棉铃虫羧酸酯酶代谢活性的影响	176
20.3 讨论	179
参考文献	180
第 21 章 2-十三烷酮诱导的棉铃虫基因的表达差异	181
21.1 棉铃虫 RNA 的提取、扩增、标记以及芯片杂交	181
21.2 数据扫描和分析	182
21.3 中肠和脂肪体差异基因比较	187
21.4 家蚕基因与棉铃虫基因差异	193
参考文献	201
第 22 章 2-十三烷酮诱导对棉铃虫对虫螨腈、毒死蜱氧化代谢的影响	203
22.1 代谢产物的结构鉴定	205
22.2 虫螨腈、毒死蜱及其代谢产物的 HPLC 分离分析	206
22.3 ECOD 活性测定中 7-羟基香豆素的标准曲线	209
22.4 2-十三烷酮对虫螨腈、毒死蜱及 7-乙氧基香豆素代谢活性的诱导	209
22.5 PBO 对虫螨腈、毒死蜱代谢的抑制	210
22.6 讨论	211
参考文献	212
第 23 章 害虫的化学防治与作物抗虫性	215
23.1 通过抗虫育种破坏植食性害虫对寄主植物的适应性	215
23.2 植物次生性物质和杀虫药剂受到相同酶系的降解	218
23.3 杀虫药剂对寄主植物的影响	220
参考文献	221

协同进化(coevolution)是生物界物种间的一种普遍现象,如昆虫—植物、真菌—植物、细菌—植物的相互关系等(Jeremy 和 Peter,2009)。明确昆虫—植物的关系、植物—害虫—天敌的关系是害虫治理的关键环节。化学关系在昆虫和植物间的共同进化中起着重要的作用(Dicke 和 van Loon,2000)。动物在一生当中,取食对自身安全的食物是其最基本的本能,对于每一个物种,在形态学、生理学、生态学以及行为学等方面都已进化出了许多适合于获取食物和利用食物的特征。动物界中,昆虫显示出了最多样性的取食习性,植物次生性物质是决定昆虫能否取食某种植物的主要因子之一(董向丽等,1998)。如果昆虫在进化过程中能够克服植物次生性物质的不良影响,则该种植物就有可能成为其寄主,这时植物体内所含的这种次生性物质又有可能成为引诱昆虫取食的标记物。例如,十字花科植物所含的芥子苷具有杀虫活性,但是菜粉蝶、小菜蛾等不但不受芥子苷的影响,反而受这种物质的引诱,促进取食或诱导产卵。植物本身也进化出了各种各样的机制影响害虫的取食、行为等。

植物产生次生性物质是其抵御害虫或病菌为害的主要途径(Paré 和 Tumlinson,1999),这些植物次生性物质有些是基础次生性代谢产物,有些是诱导产生的次生性代谢产物。害虫或病菌为害后除了诱导植物的氧化反应产生坏死斑外,更重要的是激活植物体内的植物次生性物质的合成代谢途径,产生不同类型的植物次生性物质干扰昆虫的取食、行为、降低食物质量等。例如,害虫的取食可以通过顺-9,12,15-十八碳-三烯酸(亚麻酸)的脂氧合作用(LOX)启动植物体内的拟十八碳烯(octadecanoid)途径产生茉莉(酮)酸(jasmonic acid,JA)。

茉莉(酮)酸是植物体内许多化合物表达的信号,产生用于抵御害虫、病菌为害的次生性物质或酶等(Liechti 和 Farmer,2002;刘新和张蜀秋,2000)。茉莉(酮)酸类物质是近年来植物生理学领域研究比较多的一类信号传导物质,对于植物的抗逆性具有重要的作用(Zhang 和 Turner,2008;Chehab 等,2008)。在植物抵御害虫为害方面,茉莉(酮)酸可以诱导植物产生释放到植物体外和内源性的两类植物次生性物质,前者可以引诱害虫的天敌或使同种的其他植物个体产生内源性的植物次生性物质抵御害虫为害;后者在自身植物体内产生用于抵御害虫的植物次生性物质和酶类等(张长河等,2000),例如蛋白酶抑制剂(proteinase inhibitor,PI-

NII)、多酚氧化酶(polyphenol oxidase)、甾糖生物碱(steriod glycolalkaloids)等。

害虫为害后诱导植物抗性的最终结果是使害虫在寄主植物上的适应性降低(Pieterse 等, 2001)。这种现象是普遍存在的,到目前为止至少报道了近 30 个科 100 多种植物中具有该现象。次生性代谢产物的形成是植物对害虫为害反应的主要形式。例如,植食性昆虫唾液中的一种脂肪酸—氨基酸共轭物,即 N-(17-羟基十八碳烯)-L-谷氨酸盐(volicitin)可以诱导寄主植物产生大量的次生性物质,这些植物次生性物质能够抵御害虫对其为害。在昆虫唾液中具有类似作用的另一类物质是蛋白质或肽类,如 β -葡萄糖苷酶(β -glucosidase)。植物体内产生的次生性物质按其生物合成起源主要分为三大类,即萜类(terpenoid)、生物碱类(alkaloid)和苯丙烷类化合物(phenylpropanoid)。萜类化合物都是相同的五碳前体——异戊烯焦磷酸(isopentenylpyrophosphate)的衍生物,生物碱是鸟氨酸(orithine)和赖氨酸(lysine)的衍生物,而苯基丙烷类化合物是苯基丙氨酸、酪氨酸等芳香氨基酸的衍生物(极少数为乙酸酯途径),该类化合物主要是酚类。现在发现萜类次生性物质大约 25 000 种、生物碱类约 12 000 种、酚类约 8 000 种。次生性物质的合成主要依赖于由初级代谢产物形成的建筑板块(building block)来完成,通常是通过酶对建筑板块的修饰或组合形成不同类型的次生性物质。害虫为害植物后会诱导茉莉(酮)酸的信号表达系统,激活有关的酶系对建筑板块加工合成相关的次生性产物,每一个合成路径中都有其关键的酶系,即限速酶系。萜合酶是萜类化合物生物合成中的一个关键酶系(限速酶)(Degenhardt 和 Gershenzon, 2000),该类酶系的表达主要是基于转录水平的调控(Shen 等, 2001; Bohlmann 等, 2000)。在玉米中,通常萜合酶基因 *tps1* 的 mRNA 水平是稳态的,埃及棉叶虫取食后可以使玉米中的 *tps1* 转录浓度提高 8 倍(Schnee 等, 2002),而机械损伤几乎不能使之增加,但是将植食性昆虫的唾液或 N-(17-羟基亚麻基)-L-谷氨酰胺放到机械伤处可以增加其转录浓度。编码该酶的 *tps* 基因的转录水平是由植食性害虫取食调控的。*tps* 基因家族在高等植物中可以分成 6 个亚族,编码 3 类萜合酶,即单萜、半萜和双萜合酶。该酶基因序列上的亲缘关系与其催化的多样性的生物化学效应并不完全符合。尽管萜类化合物的诱导合成在玉米上有一些研究(Degenhardt 等, 2000),但是还存在许多问题,例如,寄主植物对不同害虫的为害是如何识别的? 害虫唾液中存在哪些诱导物质? 该酶是否受其他化学因子(如杀虫药剂)直接或间接的影响? 关于该方面的研究在棉花等其他作物中还未见直接相关的报道。

蛋白酶抑制剂是植物受害后表达的另外一类重要化学物质(Jongsma 和 Beekwilder, 2011; Gatehouse, 2011; Lawrence, 2002; 卢晓风等, 1997)。一般情况下,植物受伤或害虫为害后会表达 PINII,真菌或细菌感染后会表达 P4。但是近年研究表明,在这两个主要的植物反应途径中具有重叠性。大戟长管蚜(*Macrosiphum euphorbiae*)取食番茄(*Lycopersicon esculentum*)后,诱导 P4,而不是 PINII;*Pseudomonas syringe* pv. *Tomato*(Pst)感染后对 P4 和 PINII 都有诱导作用。植物蛋白酶抑制剂在抵御害虫和病菌中的作用研究可以追溯到 1947 年(王琛柱和钦俊德, 1997),当时 Mickel 和 Standish 发现有些昆虫不能在豆类上发育。后来证明在大豆中存在胰蛋白酶抑制剂,对杂拟谷盗(*Tribolium confusum*)幼虫是有毒的。通过离体和活体都证明植物蛋白酶抑制剂对许多昆虫是有活性的。植物中蛋白酶抑制剂研究得比较多的主要有 3 个科,豆科(Leguminosae)、茄科(Solanaceae)和禾本科(Gramineae)。通过对植物的基因改造可以把一种植物中的蛋白酶抑制基因转移到另外一种植物中使其表达蛋白酶抑制剂。过去一直认为植物蛋白酶抑制剂的积累是其对受伤的一种反应。早期对番茄抑制剂的研究发现了蛋白酶抑制剂启动因子(protease inhibitor initiation factor, PIIF)。现在的证据表明蛋白

酶抑制剂的产生是通过拟十八碳烯途径,将亚麻酸断裂形成茉莉(酮)酸诱导蛋白酶抑制剂基因表达(Koiwa 等,1997)。在植物中有系统素(systemin)、脱落酸(abscisic acid, ABA)、水压信号(hydraulic signal)和电信号(electrical signal)4种系统信号负责受伤反应沿韧皮部或木质部的传递。其中系统素是由18个氨基酸残基组成的多肽,对蛋白质抑制剂基因的表达具有非常强的诱导作用。表达原系统素反义cDNA(prosystemin antisense cDNA)转基因植物显示出蛋白酶抑制剂合成的系统诱导性明显降低,降低了对害虫的抗性。在番茄中系统素调控20多种对害虫和病菌防御基因的表达。系统素激活一个基于脂质的信号转导(lipid-based signal transduction)途径,亚麻酸从植物膜上释放,转换成一个脂氧信号分子(oxylinin signaling molecule)即茉莉(酮)酸。具有不同作用模式的蛋白酶抑制剂的基因已经克隆,有些基因已经转入到农作物中。目前在水稻、烟草、马铃薯、樱桃、棉花、小麦、豌豆、油菜等植物中都取得了成功,有些已经商业化种植。尽管蛋白酶抑制剂基因研究已经取得了很多有用的结果,但是还存在许多问题。例如,昆虫唾液中的哪些物质对植物中蛋白酶抑制剂基因有诱导表达作用?害虫为害后诱导的时空规律如何?就蛋白质抑制剂基因诱导表达来讲,转蛋白酶抑制剂基因和不转蛋白酶抑制剂基因的植物有何区别?这些问题都是利用蛋白酶抑制剂基因表达控制害虫中至关重要的问题。

虽然害虫为害后,可以诱导寄主植物产生各种各样的防御反应。但是昆虫自身也会进化出各种各样的抵御机制(Yu 和 An, 2000)。例如,植物产生的次生性物质可以诱导昆虫体内的解毒系统、昆虫可以改变消化道中蛋白酶的结构,使蛋白酶抑制剂失去作用。

害虫体内解毒系统的进化是其适应植物防御机制的主要途径(Nelson 和 Kursar, 1991)。在植食性昆虫体内有近20种不同的酶系统与寄主植物产生的各种类型的植物次生性物质的代谢解毒以及杀虫药剂的解毒有关,许多植物次生性物质能够对昆虫的解毒酶系统产生诱导作用(于彩虹等, 2002; Li 等, 2000; Waller 和 Johnson, 1984),使酶活性提高,加强了昆虫的自身保护作用,免受植物次生性物质和杀虫药剂的为害。昆虫体内主要的解毒酶系统有细胞色素P450酶(又称多功能氧化酶)、谷胱甘肽-S-转移酶和酯酶。

多功能氧化酶系统(MFO)是昆虫体内最重要的解毒代谢酶系,由于其主要组成部分细胞色素P450的多样性,使其具有底物多样性(Feyereisen, 1991)。该酶的活性可以通过许多化合物诱导增加(Stevens 等, 2000),其诱导合成不是对已存在酶的活化,也不是阻止该酶的失活,而是酶蛋白的全程合成过程。一种化合物可以诱导该酶不同类型的同工酶,这些同工酶可以降解不同于诱导化合物(即诱导剂)类型的化合物,也就是说,植物次生性物质诱导的MFO的同工酶可以降解杀虫药剂,杀虫药剂诱导的MFO的同工酶也可以降解植物次生性物质(Schuler, 1996)。前者加强了害虫的抗药性,后者使品种的抗性降低或丧失。Brattsten 等(1980)首先发现了当饲料中含有(+)- α -蒎烯、黑芥子硫苷酸钾、反-2-己醛时,可以诱导亚热带黏虫(*Spodoptera eridania*)中肠MFO的活性增加。杂色地老虎(*Peridroma saucia*)幼虫中肠的MFO活性可以因单萜类化合物的存在使MFO的艾氏剂环氧化活性增加24倍,细胞色素P450含量增加6倍。薄荷叶片中含有高浓度的单萜类化合物,取食薄荷叶片的幼虫MFO活性比取食其他饲料的高45倍。寄主植物对昆虫体内的解毒酶系的影响,主要是由于寄主植物体内含有的次生性物质造成的。不同寄主植物或不同品种由于含有的植物次生性物质的种类和数量不同,对昆虫的影响也有所不同。Mahdavi 等(1991)用专一性的抑制剂间接地证明了植物次生性物质诱导马铃薯甲虫(*Leptinotarsa decemlineata*)对二氯苯醚菊酯和氰戊菊酯

的敏感度降低是由于对细胞色素 P450 酶系(Cyt-P450)的诱导引起的。Snyder 等(1995)证明了烟碱对烟草天蛾(*Manduca sexta*)没有毒性主要是由于烟碱对中肠 Cyt-P450 的诱导所致。取食野生番茄叶片的烟芽夜蛾(*Helicoverpa virescens*)的幼虫比取食人工饲料的幼虫对二嗪啉的耐药性提高 4 倍,解毒速率也明显提高。研究证明,野生番茄叶片中 2-十三烷酮是诱导烟芽夜蛾幼虫解毒酶活性提高的主要因子。关于棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)Cyt-P450 同工酶仅见于 Pittendrigh 等(1997)的研究,认为在不同的抗性品系中表达不同的 Cyt-P450。

谷胱甘肽-S-转移酶(GSTs)是昆虫体内植物次生性物质的主要代谢酶系,该酶可以被多种植物次生性物质诱导合成。植物次生性物质对植食性昆虫 GSTs 的诱导已有许多报道(高希武和郑炳宗,1999)。如 Yu(1999)试验表明,用 0.1%的花椒毒素诱导草地黏虫,诱导引起黏虫中肠、脂肪体和马氏管 GSTs 对 DCNB 的活性大幅度提高,分别比对照提高 76、59 和 32 倍,花椒毒素在脂肪体中诱导出两种新的同工酶,用含 0.01%的芸香苷、2-十三烷酮和槲皮素的人工饲料饲养棉铃虫 1~4 代后,GSTs 的活性提高 4~18 倍(高希武等,1997)。寄主植物及其次生性物质对昆虫体内 GSTs 也具有明显的诱导作用(Feng 等,2001)。吡啶-3-甲醇、吡啶-3-乙腈、黄酮和黑芥子硫苷酸钾对亚热带黏虫幼虫 GSTs 有明显的诱导作用,但是,单萜类化合物对 GSTs 却无诱导作用,尽管这类化合物是 MFO 的诱导剂。寄主植物及其次生性物质对 GSTs 的诱导作用与 MFO 不同,不同诱导剂诱导产生的 GSTs 对模式底物的专一性没有明显的改变。

酯酶是昆虫体内一类重要的解毒酶系,该酶具有代谢解毒和作为结合蛋白解毒的双重功能。羧酸酯酶是酯酶的一种,也是杀虫药剂代谢的主要酶系之一(高希武等,1998)。对它的诱导和 Cyt-P450 一样,也是酶蛋白的全程合成过程。有研究证明大豆抗性品种叶片的抽提液可以诱导粉纹夜蛾幼虫体内的羧酸酯酶活性提高,但是使大豆尺夜蛾(*Pseudoplusia includens*)幼虫体内羧酸酯酶活性降低。寄主植物的不同,可以使二点叶螨体内的羧酸酯酶活性相差 2.4 倍。单萜类化合物以及倍半萜烯山道年内酯可以使酯酶活性增加 35%~65%;吡啶-3-甲醇、吡啶-3-乙腈、类黄酮、 β -萘黄酮和金鸡纳碱使酯酶增加 35%~114%。不同寄主植物对棉蚜体内羧酸酯酶的活性也有明显的影响,取食茄子和马铃薯的棉蚜具有比较低的酯酶活性,而取食西瓜的种群酯酶活性则比较高。不同棉花品种对棉蚜羧酸酯酶也具有明显的影响,在试验的 7 个棉花品种中,取食中棉 12 的种群酯酶活性是取食涇阳鸡脚棉的 6 倍,对棉蚜羧酸酯酶的底物专一性也具有明显的影响。

蛋白酶(protease)包括内肽酶(endopeptidase)和外肽酶(exopeptidase)。昆虫体内的蛋白酶具有较大的多样性,大体上可以分成三大类,即丝氨酸蛋白酶(serine proteinase)、半胱氨酸蛋白酶(cysteine proteinase)和天冬氨酸和金属—蛋白酶(aspartic and metallo-proteinase)。蛋白酶敏感度的降低会使相应的转基因植物失去抗虫作用,也会使诱导出的蛋白酶抑制剂失去作用(Solomon 等,1999)。

近年来关于植物次生性物质诱导昆虫体内解毒酶系的研究比较多,大部分是限于对其活性的测定(Underwood 等,2002),极少数涉及相关基因的克隆。关于植物次生性物质诱导昆虫解毒酶的分子机制及其调控还没有报道。

实际上,对于任意一种植物,不能取食它的昆虫种群要比能取食的多得多。同样,任意一种昆虫不能取食的植物要比能取食的多得多。说明一种昆虫只能够克服少数植物的防御,使之作为食物。这种昆虫与植物间的特殊的组合也正是农作物与害虫间的关系,抗虫育种的目的

的就是打破这种关系。例如,可以通过育种使野生品种中的能够控制产生影响昆虫行为、感觉生理、代谢或内分泌的植物次生性物质的基因转移到栽培品种上,使之对昆虫具有抵抗能力。

寄主植物及其次生性物质诱导的解毒酶系与杀虫药剂的代谢酶系相同或相近,使得取食含有高浓度次生性物质植物的昆虫对杀虫药剂的解毒代谢增加,从而使耐药性或抗药性增加(Kessler 和 Baldwin, 2001; Gao Xiwu 等, 2001)。抗虫育种往往是使一些对昆虫有影响的植物次生性物质的基因集中,从而导致对昆虫的抗性增加。因此,抗虫品种对害虫耐药性或抗药性也会由此产生影响。

针对植物对害虫防御,害虫对植物反防御中存在的问题,该项目以棉花和棉铃虫为对象,研究害虫为害后寄主植物产生用于抵御害虫为害的内源性次生性物质的生理生化过程关键酶的调控机制和害虫对寄主植物次生性物质适应的分子机制。该项目完成对于揭示寄主植物和害虫间的生物化学适应关系,开辟害虫新的防治途径以及协调抗虫品种和化学防治具有重要的理论意义和实践价值。我们现在的研究已经证明棉铃虫为了适应植物次生性物质,其体内的一些代谢酶系可以被诱导(郭予元, 1998);植物受到害虫为害或使用农药后,植物体内一些相关的酶系会有明显的改变。

参考文献

- [1]董向丽,高希武,郑炳宗. 植物次生性物质诱导作用对杀虫药剂毒力影响的研究. 昆虫学报, 1998, 41: 111-116.
- [2]高希武,董向丽,郑炳宗,陈青. 棉铃虫谷胱甘肽-S-转移酶(GSTs):杀虫药剂和植物次生性物质的诱导作用与 GSTs 对杀虫药剂的代谢. 昆虫学报, 1997, 40: 122-127.
- [3]高希武,赵颖,王旭,董向丽,郑炳宗. 杀虫药剂和植物次生性物质对棉铃虫羧酸酯酶的诱导作用. 昆虫学报, 1998, 41(增刊): 5-11.
- [4]高希武,郑炳宗. 槲皮素对棉铃虫羧酸酯酶、谷胱甘肽转移酶和乙酰胆碱酯酶的诱导作用. 农药学报, 1999, 1: 56-60.
- [5]郭予元. 棉铃虫的研究. 北京:中国农业出版社, 1998.
- [6]刘新,张蜀秋. 茉莉酸类在伤信号转导中的作用机制. 植物生理学通讯, 2000, 36: 76-81.
- [7]卢晓风,夏玉先,裴炎. 植物蛋白抑制剂在植物抗虫与抗病中的作用. 生物化学与生物物理进展. 2000, 25: 328-333.
- [8]王琛柱,钦俊德. 植物蛋白酶抑制素抗虫作用的研究进展. 昆虫学报, 1997, 40: 212-218.
- [9]于彩虹,高希武,郑炳宗. 2-十三烷酮对棉铃虫细胞色素 P450 的诱导作用. 昆虫学报, 2002, 45: 1-7.
- [10]张长河,梅兴国,余龙江. 茉莉酸与植物抗性相关基因的表达. 生命的化学, 2000, 20: 118-120.
- [11]Brattsten L B, Price S L and Gunderson C A. Microsomal oxidases in midgut and fat-body tissues of a broadly herbivorous insect larva, *Spodoptera eridania* Cramer (Noctuidae). *Comp. Biochem. Physiol.*, 1980, 66C: 231-237.
- [12]Bohlmann J, Martin D, Oldham N J and Gershenzon J. Terpenoid secondary metabolism in *Arabidopsis thaliana*: cDNA cloning, characterization, and functional expression of a