

昆虫乙酰胆碱酯酶基因变异抗药性 机制研究^{*}

曲明静^{1,2*} 许新军³ 韩召军³ 姜晓静²

(1. 山东省花生研究所 青岛 266100 2. 南京农业大学农业部病虫监测与
治理重点开放实验室 南京 210095 3. 山东出入境检验检疫局动植处 青岛 266002)

Advances in studies of acetylcholinesterase gene variation associated with insect resistance. QU Ming-Jing^{1,2**}, XU Xin-Jun³, HAN Zhao-Jun², JIANG Xiao-Jing² (1. Shandong Peanut Research Institute, Qingdao 266100, China; 2. Key Laboratory of Monitoring and Management of Plant Diseases and Insects of Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, China; 3. Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002, China)

Abstract Intensive use of organophosphate and carbamate insecticides led to development of resistance in many insects. Acetylcholinesterase is an important target enzyme to these insecticides. One of the most important reasons for resistance development is acetylcholinesterase increasing expression or point mutation that makes its insensitivity. Here Acetylcholinesterase gene variation conferring insecticides resistance in the pests is summarized briefly and the effects of acetylcholinesterase mutation on its structure and functions were discussed.

Key words acetylcholinesterase, point mutation, increasing expression

摘要 有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂的大量使用导致昆虫对其产生抗药性。乙酰胆碱酯酶是昆虫对这类杀虫剂产生抗性的重要的靶标酶,昆虫产生抗药性的重要原因之一,就是因为乙酰胆碱酯酶的基因表达量上升,或基因突变而导致其敏感性下降。文章简要论述昆虫乙酰胆碱酯酶基因发生变异而导致的抗药性,分析了变异对其结构和功能的影响。

关键词 乙酰胆碱酯酶, 表达量, 点突变

乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, AChE, EC3.1.1.7) 能够迅速水解兴奋性神经递质乙酰胆碱 (ACh) 而保持神经突触传递的正常功能^[1], 它是有机磷类和氨基甲酸酯类杀虫剂的重要作用靶标。有大量的研究均表明 AChE 对有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂敏感性的降低是昆虫和螨类对这些杀虫剂产生抗性的重要机理之一。Smitsaert 首先在二斑叶螨 *Tetranychus urticae* 上发现了导致对杀虫剂不敏感的 AChE 变构^[2], Lee 和 Batham 也在微小牛虻 *Boophilus microplus* 上发现了有机磷杀虫剂不敏感的 AChE^[3], 随后在许多种昆虫中如家蝇 *Musca domestica*、按蚊 *Anopheles*、小菜蛾 *Plutella xylostella* 和棉蚜 *Aphis gossypii* 等昆虫中陆续发现了不敏感 AChE 的存在^[11, 19~21]。1991 年, Sussman 等首次报道了加州电鳐 *Torpedo*

californica AChE 催化亚基晶体 X 射线衍射图谱, 从图谱中可看出 AChE 的特征结构主要包括特定的活性中心、胆碱结合亚部位、酰基口袋、外周阴离子部位及自然分子的聚合构型^[4]。大量的研究结果均表明, AChE 敏感性下降主要是由于这些特征结构的分子变异所致。

1 AChE 量变与抗药性的关系

El-Abidin Salam 和 Pinsker 在筛选抗对硫磷和倍硫磷的黑尾果蝇 *Drosophila melanogaster* 品系中发现了 AChE 活性的增高, 选育得到的抗性品系 AChE 活力增强了近 10 倍^[5]。Fournier

* 粮食丰产科技工程资助项目 (2004BA520A15)。

** Email: cygnet@njau.edu.cn

等利用 Hoffmann 等构建的 pRA 组建了 pRA-Ace⁺ / Ace⁺, Ace⁺ / Ace⁺, Ace⁺ / Ace⁻ 及 pRA-Ace⁻ / Ace⁻ 4 种具有不同 AChE 基因型的果蝇群体^[7], 其表达乙酰胆碱酯酶量依次下降, 而对马拉硫磷的敏感性依次上升, 这表明随着各品系 AChE 活性的增加, 其对有机磷的抗药性越来越强^[9]。在麦二叉蚜 *Schizaphis graminum* 中^[8], 抗性品系 AChE 的 mRNA 表达量为敏感试虫的 1.5 倍。据此推测, 有机磷抗性品系中 AChE 量的增加可能补偿了被杀虫剂抑制的 AChE 的功能, 从而维持正常的神经传导。因此 AChE 量的增加与抗性是有关系的, AChE 基因表达量上升可提高昆虫对杀虫剂的抗性, 但在田间种群中还没有发现因基因拷贝数不同引起抗药性变化的情况。

2 AChE 基因突变对其结构和功能的影响及与抗药性的关系

MH19 为采自田间并在室内经多代筛选得到的抗马拉硫磷的果蝇品系^[9], 比较抗感两品系 AChE cDNA 序列发现 MH19 存在一个点突变 T/A, 导致 368 位 Phe→Tyr 突变, 表达结果证明该突变直接导致 MH19 品系对多种有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂产生抗药性。Mutero 等对抗性果蝇品系 Saltillo, Bygdea, Pierrefeu 和敏感品系 AChE 基因编码区的克隆和测序结果发现, 抗性品系存在 Ile199, Gly303, Phe368 3 个位点的 4 个突变^[9]。通过定点诱变技术将这些突变导入野生型的 AChE 基因, 并在非洲爪蟾 *Xenopus laevis* 卵母细胞中功能表达, 发现表达产物对马拉硫磷、对氧磷、甲萘威和残杀威的敏感度均有不同程度的降低, 表明这些突变能引起昆虫对杀虫剂的抗性。进一步将不同的点突变组合进行表达研究, 发现单个点突变只表现较低的抗性, 而不同点突变组合后则可产生高水平的抗性。在抗性家蝇中, Walsh 等发现 AChE 中产生了 5 个点突变 (V180L, G262A, G262V, F327Y, G365A), 并证实 AChE 中的单个点突变或几个突变位点联合作用导致家蝇对杀虫剂形成不同程度的抗性^[10]。Kozaki 在分析家

蝇对杀螟硫磷的抗性突变中发现家蝇与果蝇 AChE 高级结构非常相似, 且 Phe327Tyr 及 Gly262Ala/Val 2 个位点突变与果蝇中已报道突变相一致, 因此推测这 2 个突变与家蝇对杀螟硫磷抗性有显著关系^[11]。

Jugen 等首次证明棉蚜基因 S431(331)F 突变是导致棉蚜对抗蚜威和氧化乐果产生抗性的原因, 而且可导致其对甲基 1605 和呋喃丹的敏感和超敏感, 认为棉蚜的 *ace1* 基因是与有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂的毒理作用密切相关的靶基因^[12]。Andrews 等也在棉蚜的 *ace1* 基因发现了 2 个与有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂相关的点突变, 研究同样表明 S431(331)F 可能与氨基甲酸酯类杀虫剂抗蚜威抗性相关^[13]。与棉蚜 S431(331)F 相类似的突变在其它昆虫中也有发现: 在桃蚜 *Myzus persicae* 中^[14], MpAChE2 (I 型) 中 S431(331)F 的突变明显地破坏了 AChE 酰基口袋与催化亚基上 541 His 之间的共轭键。在三带喙库蚊 *Culex tritaeniorhynchus* 中^[15], 研究发现其 *ace2* 基因 (I 型) 中 F455(331)W 与桃蚜、棉蚜等 S431(331)F 突变位置一致, 该突变位于酰基口袋及活性中心部位, 突变使酰基口袋变得更加疏水与狭窄。在二斑叶螨中^[16], 也发现了类似的替代 F439(331)C。在神泽叶螨 *Tetranychus karzawai*^[17] 抗性品系中, 也发现与上述几种昆虫相一致的 F439(331)W 的替代。Li 等在棉蚜中发现, 所有有机磷抗性个体中均发现了 2 组突变, 即: *ace2* 基因中的 Phe139Leu 突变和 *ace1* 基因中的 Ala302Ser 突变^[18]。其中 *ace2* 基因中 Phe139Leu 对应于电鳐的第 78 位, 并与果蝇中 Phe115Ser 突变相似, 该位点接近于催化三联体部位, 并且在果蝇中已经证实了该突变与抗性的关系。*ace1* 基因中 Ala302Ser 突变位于活性中心的 200Ser 附近, 是氧负离子孔的 3 个组成氨基酸之一, 与棉蚜对有机磷杀虫剂的抗性有关。

在冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*、致倦库蚊 *Culex pipiens quinquefasciatus*、尖音库蚊 *Culex pipiens pallens* 中^[19], 对应于电鳐 Gly119Ser 突变, 发生在保守性结构 WIFGGG 中, 导致其突变

为 WIFGGs, 这一突变对 AChE 的催化活性中心构型有显著影响。在小菜蛾中, 很多对 *ace2* 基因的研究并没有发现抗性品系与敏感品系的不同, Ji 等克隆得到了小菜蛾第 2 个 AChE 基因 *ace1*, *ace1* cDNA 序列分析发现: 抗丙硫磷 PR 品系的小菜蛾存在 3 个点突变 G227A, A201S, A441G^[20]。其中 Gly227Ala 突变与果蝇 Gly303Ala 突变、家蝇 Gly262Ala 突变相同, 该位点朝向活性中心的 Ser 并影响其取向, Ala201Ser 与已报道的棉蚜 I 型 *ae* A302(201)S 一致, 因此很有可能也与抗性相关。

在其它农业害虫中, 在马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* 谷硫磷抗性品系中, Zhu 等发现 *ace* 基因 980 位 A/G 替代导致的 S291(238)G 突变虽然并不位于酯动部位或阴离子部位, 却是形成 α -螺旋的第 1 个氨基酸残基, 可能导致 α -螺旋更快的形成转角, 增加蛋白质折叠所需的弹性, 以此影响催化部位和外周阴离子部位, 导致有机磷杀虫剂和其它配基的结合的变化^[21]。Ren 等对棉铃虫 *Helicoverpa armigera* AChE 的研究表明, Ala585Thr 突变位于酶分子的羧基端 2 个 β 片层之间, 可能与抗性品系 LC-R 的敏感性下降有关^[22]。在橄榄实蝇 *Dacus oleae*^[23] 乐果抗性品系中报道了 2 个位点突变: G488S 和 I214V, 并且 2 个突变一般同时出现, 作者推测, 在橄榄实蝇的抗性产生过程中, G488S 先出现在抗性品系中, 随后出现 G488S 和 I214V 双突变, 从而导致高水平的抗性。经过进一步研究发现, 在相同浓度的乐果抑制作用下, G488S 突变 AChE 有 40% 残留活性, 而 G488S 和 I214V 双突变 AChE 酶有 80% 的剩余活性。分析认为, G488S 突变能减少农药大分子与 AChE 的结合, 但同时也会减少 AChE 与底物乙酰胆碱的结合, 而 I214V 突变能在某种程度上进一步减少农药分子与酶的结合, 而且以一种未知的方式降低 G488S 突变对代谢乙酰胆碱造成的不利影响, 因此 I214V 总是伴随着 G488S 出现。

3 展望

目前, 昆虫变构 AChE 的分子生物学研究

主要集中于 AChE 编码区的研究, 但非编码区对基因的表达也有重要影响。Tomila 等在对黑尾叶蝉 *Nephotettix cincticeps* 抗残杀威品系研究发现: 抗性黑尾叶蝉 AChE 抑制中浓度比敏感品系高, 但没有发现导致抗性的突变, 也没有发现多个 AChE 的存在, 但在敏感品系的一个位点上发现了氨基酸的多态性^[24]。Baxter 研究认为, 微小牛蝗的 2 个 AChE 基因在神经系统的表达方式及可变剪接的改变可能使其在有机磷抗性中起作用, 同时推测翻译后的修饰的变化也有可能导致不敏感 AChE 的产生^[25, 26]。另有大量证据表明昆虫体内存在多个 AChE 基因, 它们对杀虫剂的敏感性也可能存在差异。因此不同 AChE 的表达差异, 可能导致昆虫对不同药剂的抗药性。昆虫 2 个甚至更多的 AChE 基因的存在为抗性机理研究和抗性治理揭开了崭新的领域。此外在 AChE 结构位点之外是否存在与抗性相关的点突变, 转录后调控是否参与了抗性, 这些问题仍有待进一步研究阐明。

参 考 文 献

- Gerschenfeld H.M. *Physiol. Rev.*, 1973, (53): 1~119.
- Smitsaert H. R. *Science* 1964, **143**: 129~131.
- Lee R.M., Batham P. *Ent. Exp. Appl.*, 1966, **9**(1): 13~24.
- Sussman J. L., Hare M., Frolow F., Oefner C., Goldman A. *Science*, 1991, **253**(5 022): 872.
- El-Abidin Sakm AZ., Pinsker W. *Genetica*, 1981, **55**(1): 11~14.
- Fournier D., Bride J.M., Hoffmann F., Karch F. *J. Biol. Chem.*, 1992, **267**(20): 14 270~14 274.
- Hoffmann F., Fournier D., Spierer P. *J. Molec Biol.*, 1992, **223**(1): 17~22.
- Gao J. R., Kambhampati S., Zhu K. Y. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2002, **32**(7): 765~775.
- Mutero A., Pralavorio M., Bride J.M., Fournier D. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1994, **91**(13): 5 922~5 926.
- Walsh S. B., Dolden T. A., Moores G. D., Kristensen M., Lewis T. *Biochem. J.*, 2001, **359**(1): 175~181.
- Kozaki T., Shono T., Tomita T., Kono Y. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2001, **31** (10): 991~997.
- Jungen B., Ralf N. *Pest Manag. Sci.*, 2004, (60): 1 051~1 055.
- Andrews M., C., Callaghan A., Field L.M. *Insect Mol. Biol.*, 2004, **13**(5): 555~561.

- 14 Nabeshima T., Kozaki T., Tomita T., Kono Y. *Biochem. Biophys. Res. Co.*, 2003, **307**(1): 15~22.
- 15 Takeshi N., Mori A., Kozaki T. *Biochem. Biophys. Res. Co.*, 2004, **313**(3): 794~801.
- 16 Anazawa Y., Tomita T., Aiki Y., Kozaki T., Kono Y. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2003, **33**(5): 509~514.
- 17 Yasuhiko A., Kozaki T., Mizuno H. Kono Y. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 2005, **82**(2): 154~161.
- 18 Li F., Han Z. J. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2004, (34): 397~405.
- 19 Weill M., Lutfalla G., Mogensen K., Chandre F., Berthomieu A. *Nature*, 2003, **423**(6 936): 136~137.
- 20 Baek J.H., Kim J. L., Lee D. W., Chung B. K., Miyata T. *Pestic Biochem. Physiol.*, 2005, **81**(3): 164~175.
- 21 Zhu K. Y., Brindley W.A. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 1990, **36**(1): 22~28.
- 22 Ren X. X., Han Z.J. *Archi. Insect Biochem.*, 2002, **51**: 103~110.
- 23 Vontas J. G., Hejazi M. J., Hawkes N. J., Cosmidis N., Loukas M. *Insect Mol. Biol.*, 2002 **11**(4): 329~336.
- 24 Tomita T., Hidoh O., Kono Y. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2000, **30**(4): 325~333.
- 25 Baxter G. D., Barker S. C. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2002, **32**(7): 815~820.
- 26 Baxter G. D., Barker S. C. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 1998, **28**(8): 581~589.

害虫及害螨对阿维菌素抗药性研究进展^{*}

刘开林 何林^{**} 王进军 赵志模

(西南大学植物保护学院 重庆市昆虫学及害虫控制工程重点实验室 重庆 400716)

Advances in the research on the pest resistance to avermectins. LIU Kai-Lin, HE Lin^{**}, WANG Jin-Jun, ZHAO Zhi-Mo (Key Laboratory of Entomology and Pest Control Engineering, College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract Avermectins are a new group of natural compounds with high efficiency and broad spectrum properties which possess excellent control effects on many insect and mite pests. With the extensive application in pest control, the great attention has been paid on the resistance of insect and mite pests to avermectins. The studies at home and abroad suggest that both *Plutella xylostella* (L.) and *Tetranychus urticae* Koch have developed resistance to avermectins while the resistance do not always exist the fitness cost. Meanwhile, the sensitivity of the resistant pest populations is hard to recover. Besides, the resistance inheritance to avermectins is subject to polygenic and non-complete recessiveness. The resistance mechanisms are involved with many factors. The comprehensive analysis reveals that there is a quite high and potential resistance risk of insect and mite pests to avermectins.

Key words avermectins, resistance, fitness, resistance inheritance, mechanism of resistance

摘要 阿维菌素(avermectins)是一类新型高效广谱的生物源农药,对多种害虫及害螨具有极好的防效。随着阿维菌素在害虫及害螨防治中的广泛应用,害虫和害螨对其的抗性问题的关注度日益受到关注。文章综述国内外的最新研究结果表明:小菜蛾 *Plutella xylostella* (L.)、二斑叶螨 *Tetranychus urticae* Koch 等已对阿维菌素产生抗性,对阿维菌素产生抗性的害虫和螨并不总是表现适合度劣势,且抗性一旦产生敏感性较难以恢复;抗性遗传多数由多基因、不完全隐性控制;抗性机理涉及多种因素。综合分析发现害虫和螨对阿维菌素存在较大的、潜在抗性风险。

关键词 阿维菌素, 抗药性, 抗性适合度, 抗性遗传, 抗性机理

* 国家自然科学基金(30600059); 重庆市教委项目(KJ052208)。

** 通讯作者, E-mail: helinok@tom.com

收稿日期: 2006-01-20, 修回日期: 2006-03-01, 2006-04-18 再修回