

# 稻纵卷叶螟羧酸酯酶基因的鉴定与表达谱分析\*

刘 苏\*\* 冯明峰 何梦竹

(安徽农业大学植物保护学院, 合肥 230036)

**摘 要** 【目的】鉴定稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis* 的羧酸酯酶基因, 并检测这些基因在成虫不同组织中的表达模式。【方法】从稻纵卷叶螟转录组中搜索羧酸酯酶基因, 使用生物信息学软件对所获得的基因序列进行分析, 使用荧光定量 PCR 检测这些基因在各组织中的相对表达水平。【结果】获得了 15 个羧酸酯酶基因, 分别命名为 *CmCarE1*~*CmCarE15*。其中 *CmCarE12* 缺少 3' 区域, 其余 14 个序列均含有完整的开放阅读框。除 *CmCarE11* 外, 其余 14 个基因编码的蛋白均具有羧酸酯酶的典型特征, 如保守的五肽结构域, 催化三联体和氧阴离子穴等。系统进化分析显示 15 个 *CmCarEs* 被聚在不同的进化支内, *CmCarE13*、*CmCarE14* 和 *CmCarE15* 聚在“胞内催化类”进化支, 其余 12 个 *CmCarEs* 聚在“分泌催化类”进化支。*CmCarE1*、*CmCarE2*、*CmCarE3*、*CmCarE7*、*CmCarE8*、*CmCarE10* 和 *CmCarE13* 特异表达于成虫腹部, 而 *CmCarE9* 特异表达于雌雄成虫触角。其他基因的表达没有组织特异性。【结论】*CmCarE1*、*CmCarE2*、*CmCarE3*、*CmCarE7*、*CmCarE8*、*CmCarE10* 和 *CmCarE13* 编码的酯酶可能参与了内外源化合物的代谢, 而 *CmCarE9* 编码的酯酶可能参与了气味分子的降解。

**关键词** 稻纵卷叶螟, 羧酸酯酶, 系统进化分析, 表达谱

## Identification and expression profiles of *Cnaphalocrocis medinalis* carboxylesterase genes

LIU Su\*\* FENG Ming-Feng HE Meng-Zhu

(College of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

**Abstract** [Objectives] To identify carboxylesterase genes (*CarEs*) in *Cnaphalocrocis medinalis* and determine their expression profiles in various adult tissues. [Methods] *C. medinalis* transcriptome datasets were searched to identify *CarEs*. Bioinformatic software was used to analyze the identified *CarE* sequences, and a real-time quantitative PCR assay was performed to investigate their relative expression levels. [Results] A total of 15 *CarEs* were identified from the *C. medinalis* transcriptome datasets and named *CmCarE1*~*CmCarE15*. Of these, *CmCarE12* lacked the 3'-region whereas the other 14 sequences contained complete open reading frames (ORFs). With the exception of *CmCarE11*, protein encoded by these *CmCarE* genes showed features typical of *CarEs*, including a conserved pentapeptide, catalytic triad, and oxyanion hole. Phylogenetic analysis showed that the 15 *CmCarEs* fell into different clades; *CmCarE13*, *CmCarE14* and *CmCarE15* fell into the “intracellular catalytic class”, whereas the other 12 *CmCarEs* fell into the “secreted catalytic class”. *CmCarE1*, *CmCarE2*, *CmCarE3*, *CmCarE7*, *CmCarE8*, *CmCarE10* and *CmCarE13* were specifically expressed in the adult abdomen, whereas *CmCarE9* was specifically expressed in male and female antennae. Other genes were not tissue-specific. [Conclusion] *CmCarE1*, *CmCarE2*, *CmCarE3*, *CmCarE7*, *CmCarE8*, *CmCarE10* and *CmCarE13* might possibly be involved in the metabolism of endobiotic and xenobiotic compounds, whereas *CmCarE9* might be involved in the degradation of odorant molecules.

**Key words** *Cnaphalocrocis medinalis*, carboxylesterase, phylogenetic analysis, expression profiles

\* 资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金项目 (31401734); 安徽农业大学引进和稳定人才项目 (2013ZR008, YJ2014-2)

\*\*通讯作者 Corresponding author, E-mail: suliu@ahau.edu.cn

收稿日期 Received: 2014-10-28, 接受日期 Accepted: 2015-01-09

羧酸酯酶 (Carboxylesterases, CarEs) 是一类广泛存在于动物、植物与微生物体内、能够催化水解羧基酯类的代谢酶。昆虫的 CarEs 因为能够代谢多种外源有毒化合物(如杀虫剂和植物次生化合物等)以及参与抗药性的形成而受到广泛关注 (Li *et al.*, 2007)。CarEs 可通过至少两种方式增强昆虫的抗药性:一是 CarEs 基因过量表达增强了昆虫对杀虫剂的解毒能力 (Alon *et al.*, 2008; 张建琴等, 2014);二是编码序列突变导致 CarEs 对杀虫剂的代谢效率提升 (Cui *et al.*, 2011; 张柳平等, 2013)。很多 RNA 干扰实验表明,沉默特定 CarEs 之后,抗性品系昆虫对杀虫剂的敏感性显著上升 (Zhang *et al.*, 2011; Gong *et al.*, 2014)。

除了代谢外源有毒化合物,昆虫的 CarEs 还参与了内源化合物(如酯类和保幼激素等)的合成与代谢 (Oakeshott *et al.*, 2010)。此外,特异存在于昆虫触角中的 CarEs 被认为是“气味分子降解酶”,其能够降解嗅觉感器中过量的气味分子,维持嗅觉神经元的敏感性 (He *et al.*, 2014)。最早的气味分子降解酶就是从多音天蚕 *Antheraea polyphemus* 雄蛾触角中分离出的能降解性信息素的 CarE (Vogt *et al.*, 1985)。随后,在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*、海灰翅夜蛾 *Spodoptera littoralis* 与甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 等昆虫中陆续发现,CarEs 除了能降解信息素分子外,还能降解植物挥发物 (Durand *et al.*, 2011; Chertemps *et al.*, 2012; He *et al.*, 2014)。

随着多种模式昆虫基因组测序的完成,CarE 基因家族也从这些昆虫中得以鉴定。黑腹果蝇 *D. melanogaster* 有 35 个 CarEs,冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 有 51 个,意大利蜜蜂 *Apis mellifera* 有 24 个,赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 有 49 个 (Oakeshott *et al.*, 2010)。鳞翅目昆虫家蚕 *Bombyx mori* 有 76 个 (Yu *et al.*, 2009),小菜蛾 *Plutella xylostella* 有 63 个 (You *et al.*, 2013)。系统进化分析显示昆虫的 CarEs 可被分为三大类群:胞内催化类 (Intracellular catalytic class)、分泌催化类 (Secreted catalytic class) 和

神经发育类 (Neurodevelopmental class)。其中,胞内催化类和分泌催化类 CarEs 大多具有催化功能,而神经发育类 CarEs 一般为非催化性,但具有其他生理功能 (Oakeshott *et al.*, 2010)。

稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) 属鳞翅目螟蛾科,是重要的迁飞性水稻害虫,每年给我国的水稻生产造成巨大损失 (陈晓等, 2013; 潘攀等, 2013)。当前对此虫的防治主要依赖化学杀虫剂,而无选择性地使用杀虫剂已经导致此虫对部分药剂的敏感性降低 (Zhang *et al.*, 2014)。CarEs 在杀虫剂代谢以及抗药性产生中起着重要作用,但到目前为止,稻纵卷叶螟的 CarE 基因尚无报道。本研究通过搜索已公布的稻纵卷叶螟转录组数据库,鉴定了 15 个 CarE 基因,并检测了这些基因的组织表达谱。实验结果为进一步研究这些 CarEs 在杀虫剂代谢中的作用机理奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

稻纵卷叶螟成虫采集自合肥市北郊大杨镇安徽农业大学试验基地。试虫被带回实验室,置于冰上麻醉后,解剖为不同组织:触角、腹、足和翅,立即用液氮速冻,贮存于 -80 °C 冰箱。

RNA 提取试剂 RNAiso plus、反转录试剂盒 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser 和荧光定量试剂 SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) 均购置于大连宝生物 (TaKaRa) 公司;引物由上海 Invitrogen 公司合成;其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 总 RNA 提取与 cDNA 合成

按照 RNAiso plus 试剂说明书提取稻纵卷叶螟各组织的总 RNA。其中触角分雌雄,其余组织为雌雄混合。使用 Nanodrop 超微量分光光度计 (Thermo Fisher, 美国) 检测 RNA 的完整性与浓度。取 1 µg 总 RNA 进行反转录,产物 (第一链 cDNA) 均用无核酸酶的水稀释至 10 ng/µL。

### 1.3 转录组搜索稻纵卷叶螟 *CarE* 基因

此前,已有 2 组稻纵卷叶螟转录组数据上传至 NCBI SRA 数据库( Li *et al.* ,2012 ; Liu *et al.* , 2013 )。使用本地 Blast 程序( Altschul *et al.* ,1997 )从这两个转录组中搜索可能的 *CarE* 基因。这一过程可分 3 步:首先,下载 GenBank 中已被注释的其他鳞翅目昆虫 *CarE* 蛋白序列作为查询模板,利用 TBLASTN 算法,对这两个转录组数据进行搜索,尽可能获取全长 *CarE* 基因或基因片段;随后,将非全长 *CarE* 基因作为模板,再次搜索转录组,部分基因片段可能会向两端延伸直至拼接为完整序列;最后,非全长 *CarE* 基因的同源序列也被用作查询模板,用于筛选可能的目标序列,输出结果经手工检查确定是否与这些非全长序列相匹配。最终,使用 BlastX 程序将搜索获得的所有稻纵卷叶螟 *CarEs* 与 GenBank 非冗余数据库进行比对。

### 1.4 生物信息学分析

*CarEs* 的开放阅读框( Open reading frame , ORF )使用 ORF Finder 程序( www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html )预测;蛋白质的理论分子量

与等电点使用 ExPASy 工具( www.expasy.org/tools/protparam.html )计算;保守功能域和关键催化氨基酸使用 NCBI 的 CD search ( www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/cdd/cdd.shtml )确定;蛋白质 N 端信号肽使用 SignalP 程序( www.cbs.dtu.dk/services/signalP )预测;稻纵卷叶螟和其他昆虫的 *CarEs* 蛋白序列上传至 Clustal Omega 服务器( www.ebi.ac.uk/tools/msa/clustalo )进行多序列连配,连配结果导入 MEGA5.05 软件( www.megasoftware.net )以 Neighbour-joining 法构建系统发育树,各分支置信度经由 Bootstrap 法循环检验 1 000 次。

### 1.5 荧光定量 PCR

荧光定量 PCR 反应体系为 20  $\mu$ L,内含 SYBR Premix Ex Taq 试剂 10  $\mu$ L, cDNA 模板 1  $\mu$ L ( 10 ng ),上游和下游引物各 0.5  $\mu$ L ( 0.25  $\mu$ mol/L ),无核酸酶的水 8  $\mu$ L。所用引物列于表 1,以稻纵卷叶螟  $\beta$ -actin 作为内参基因。定量 PCR 仪器为美国 Bio-Rad 公司 CFX96 型实时荧光定量系统,热循环条件为 95  $^{\circ}$ C 预变性 30 s,1 个循环;95  $^{\circ}$ C 5 s,60  $^{\circ}$ C 25 s,共 40 个循环。设置

表 1 荧光定量 PCR 引物  
Table 1 Primers used for real-time quantitative PCR

| 基因 Gene         | 上游引物 Forward primer (5'-3') | 下游引物 Reverse primer (5'-3') | 产物 Product (bp) |
|-----------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------|
| <i>CmCarE1</i>  | GGGAAGATCTACGGGGATTC        | AGGTTTGCTGGTGACAGGAT        | 150             |
| <i>CmCarE2</i>  | CACCCATCTCGTTCTTGCTT        | TCCATACAGCTTCCCCAGTC        | 131             |
| <i>CmCarE3</i>  | GTGGAGCAAGGTGCAAAAGT        | CGTCAATTCCCTCCCCATAA        | 138             |
| <i>CmCarE4</i>  | GCCAGGACTCGGTTATGGTA        | TACTGGCGCTCTTGAGGAGT        | 142             |
| <i>CmCarE5</i>  | GGTCCATCAGCCTCTCAAAC        | CAAGAAGGGCGTTCATCATT        | 144             |
| <i>CmCarE6</i>  | AAGACTGGGGTGTTGCTCAC        | AGTTCCATGGGTGGCATAAG        | 140             |
| <i>CmCarE7</i>  | CCATTGCTCACAATCTGCTG        | AACTGGAGATCCCGTTGTGA        | 142             |
| <i>CmCarE8</i>  | GCTTGTCATGCTGACGATCT        | TCTGGTGTGGGATGTCCATA        | 140             |
| <i>CmCarE9</i>  | GCTGCGATACGGAGTTGAAT        | CGGTCTTGCGCTTCATAACT        | 133             |
| <i>CmCarE10</i> | AGCGCTACTACGCTGGGTTA        | TCTCCGGGATCACTTTATGG        | 155             |
| <i>CmCarE12</i> | TCCATGGAGGTGGTTTCATT        | GGGAGTGGCTAGGCACATAA        | 137             |
| <i>CmCarE13</i> | GTTTTTCAGGAGTGCCGGATA       | AAGTTCGTCCACAGCTTCGT        | 147             |
| <i>CmCarE14</i> | AGGAACCATGGTCTGGAGTG        | CACCATGAATCCAAACGAGA        | 171             |
| <i>CmCarE15</i> | AACCCAACGCCAGATAACAG        | CCTGAAGGTGTCTTCCCAGA        | 144             |

程序时增加溶解曲线,用于检测是否有引物二聚体形成。空白对照以无核酸酶的水代替 cDNA 模板,用于检测可能的试剂污染。每个样品进行 3 次生物学重复,基因相对表达水平使用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法定量 (Livak and Schmittgen, 2001)。数据统计使用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 方法,并使用 Tukey 法进行多重比较分析。统计软件为 DPS 数据处理系统 v9.5 版 (Tang and Zhang, 2013), 显著性水平设为  $P < 0.05$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 鉴定稻纵卷叶螟 *CarE* 基因

通过搜索稻纵卷叶螟转录组,共获得了 15 个 *CarEs* (表 2)。依据被发现的顺序,这些基因被命名为 *CmCarE1*~*CmCarE15* (GenBank 登录号为 KP001147~KP001161)。其中,*CmCarE12* 缺失 3' 区域,而其余 14 个基因均具有完整的开放阅读框。这 14 个全长 *CarEs* 编码的蛋白长度介于 520 和 584 个氨基酸之间,理论分子量介于 58.9 和 65.5 ku 之间,等电点介于 5.02 和 8.32 之间。其中有 12 个 *CmCarEs* 编码的蛋白预测出了 N 端信号肽,表明这些蛋白是分泌蛋白。多序列连配结果表明,这些 *CmCarEs* 编码的蛋白均具有羧酸酯酶的典型特征,包括保守的五肽结构域 (Gly-X-Ser-X-Gly),催化三联体 (Catalytic triad) 和氧阴离子穴 (Gly、Gly、Ala) 等。但 *CmCarE11* 所编码蛋白的五肽结构域却发生了改变,丝氨酸残基 (Ser) 变为了甘氨酸残基 (Gly) (表 2),推测该蛋白可能会因此失去催化活性,*CmCarE11* 基因可能是一个假基因。BLASTX 比对结果表明,除了 *CmCarE6* 和 *CmCarE14* 与膜翅目昆虫中红侧沟茧蜂 *Microplitis demolitor* 的 *CarEs* 显示出较高的同源性 (分别为 92% 和 66%) 之外,其余 13 个 *CmCarEs* 均与其他鳞翅目昆虫的 *CarEs* 显示出较高的同源性 (53%~92%)。

### 2.2 系统进化分析

使用 MEGA5.05 软件分析了稻纵卷叶螟

*CmCarEs* 与其他昆虫 *CarEs* 的系统进化关系。如图 1 所示,昆虫的 *CarEs* 被分为“胞内催化类 (Intracellular catalytic class)”、“分泌催化类 (Secreted catalytic class)”和“神经发育类 (Neurodevelopmental class)”三大类群。*CmCarE13*、*CmCarE14* 和 *CmCarE15* 被聚在“胞内催化类”进化支,而其余 12 个 *CmCarEs* 被聚在“分泌催化类”进化支。这也与信号肽预测结果相符 (表 2)。“胞内催化类”酯酶主要是非分泌型的  $\alpha$ -酯酶,而在“分泌催化类”进化支中,12 个 *CmCarEs* 又被分为“鳞翅目酯酶 (Lepidopteran esterase)”、“ $\beta$ -酯酶 ( $\beta$ -esterase)”和“体壁酯酶 (Integumental esterase)”3 类,每类分别包括 7、2 和 3 个 *CmCarEs* 基因。

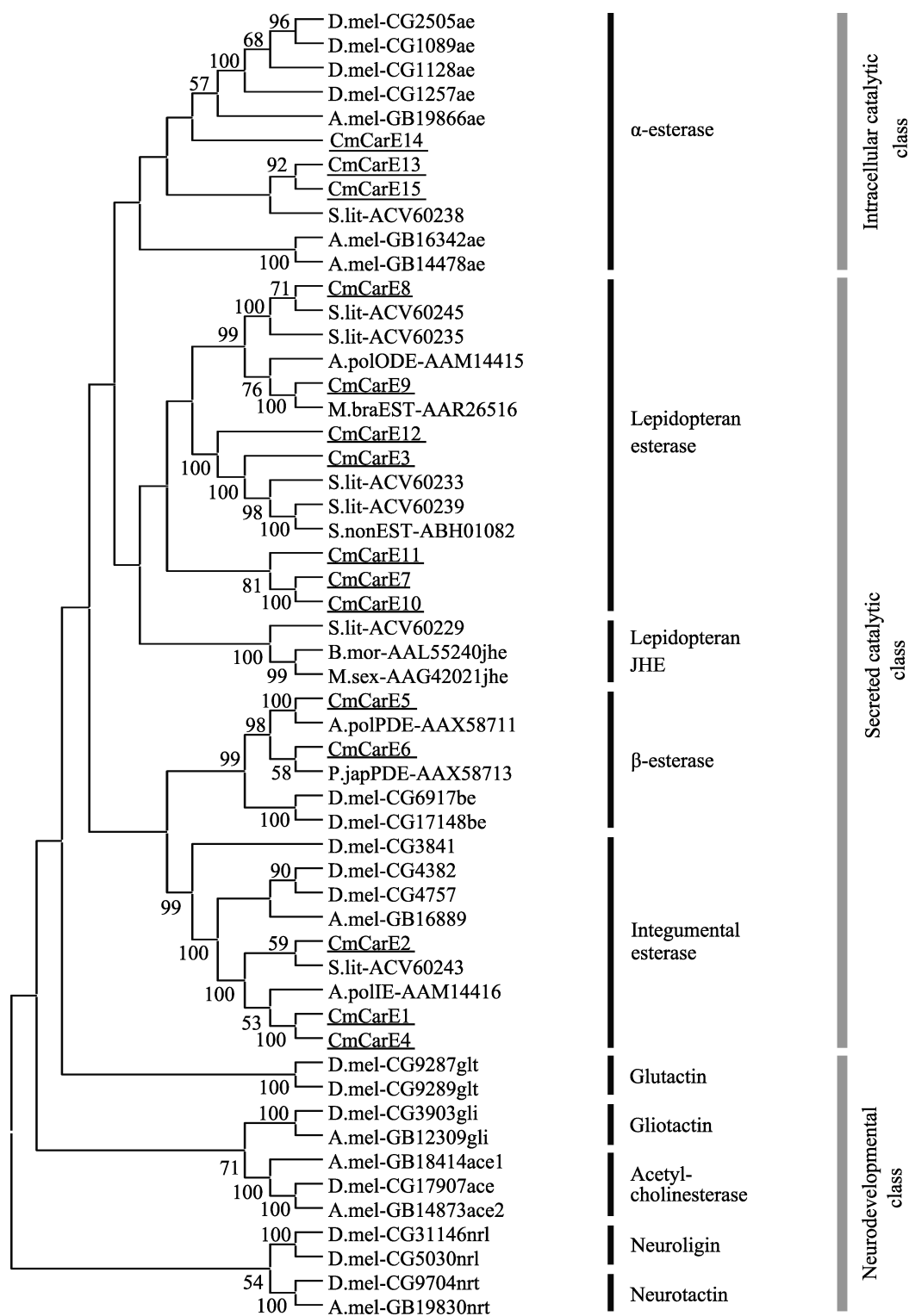
### 2.3 组织表达分析

使用荧光定量 PCR 检测了 14 个 *CmCarEs* 在稻纵卷叶螟不同组织中的表达谱。因为 *CmCarE11* 可能是假基因,所以本实验未对其进行检测。实验结果显示 (图 2), *CmCarEs* 在不同组织中的相对表达水平不同。其中,*CmCarE1*、*CmCarE2*、*CmCarE3*、*CmCarE7*、*CmCarE8*、*CmCarE10* 和 *CmCarE13* 均表现出相似的表达模式,即大量表达于腹部,且表达量显著高于其他组织。在腹部表达量较高的基因还有 *CmCarE5*、*CmCarE6*、*CmCarE12* 和 *CmCarE14*, 其中 *CmCarE5* 和 *CmCarE12* 在腹部的表达量显著高于雌虫触角、足和翅,但不显著高于雄虫触角;*CmCarE6* 在腹部的表达量显著高于雌雄触角,但与足和翅之间无显著差异;*CmCarE14* 在腹部的表达量显著高于雄虫触角、足和翅,但不显著高于雌虫触角。

在触角中表达量较高的有 *CmCarE4*、*CmCarE9* 和 *CmCarE15*,这 3 个基因在雌雄触角中的表达水平均无显著差异。其中 *CmCarE9* 在触角中的表达水平显著高于腹部、足和翅,而 *CmCarE4* 和 *CmCarE15* 在雌雄触角和腹部之间的差异不显著。此外,我们还发现 *CmCarE12* 在雄虫触角中的表达水平显著高于雌虫触角。

表 2 *CmCarE* 基因序列信息  
Table 2 Sequence information of *CmCarE* genes

| 基因名<br>Gene name | 登录号<br>Accession number | 长度(氨基酸)<br>Length (aa) | 信号肽<br>Signal peptide | 催化残基<br>Catalytic residues |         |                        |     |  | 分子量<br>Mw (ku) | 等电点<br>pI | BLASTX 最佳匹配<br>BLASTX best hit                          |                         |               |                         |
|------------------|-------------------------|------------------------|-----------------------|----------------------------|---------|------------------------|-----|--|----------------|-----------|---------------------------------------------------------|-------------------------|---------------|-------------------------|
|                  |                         |                        |                       | 五肽<br>结构域                  |         | 氧阴离子穴<br>Oxyanion hole |     |  |                |           | 物种/基因名<br>Species/Gene name                             | 登录号<br>Accession number | 一致性(%)<br>E 值 | Identity (%)<br>E-value |
|                  |                         |                        |                       | GxSxG                      | version | E                      | H   |  |                |           |                                                         |                         |               |                         |
| <i>CmCarE1</i>   | KP001147                | 562                    | Yes                   | GSSAG                      | +       | +                      | PGA |  | 63.37          | 6.77      | <i>Sesamia inferens</i> / Odorant degrading enzyme      | AI121981                | 64/0.0        |                         |
| <i>CmCarE2</i>   | KP001148                | 567                    | Yes                   | GCSAG                      | +       | +                      | SGA |  | 63.28          | 6.94      | <i>Bombyx mori</i> / Integument esterase                | NP_001121191            | 63/0.0        |                         |
| <i>CmCarE3</i>   | KP001149                | 520                    | Yes                   | GESYG                      | +       | +                      | GGY |  | 58.90          | 6.73      | <i>Sesamia nonagrioides</i> / Esterase                  | ABH01082                | 53/0.0        |                         |
| <i>CmCarE4</i>   | KP001150                | 567                    | Yes                   | GYSAG                      | +       | +                      | PGA |  | 63.47          | 6.62      | <i>Sesamia inferens</i> / Odorant degrading enzyme      | AI121981                | 63/0.0        |                         |
| <i>CmCarE5</i>   | KP001151                | 560                    | Yes                   | GCSAG                      | +       | +                      | GGA |  | 61.77          | 8.04      | <i>Sesamia inferens</i> / Odorant degrading enzyme      | AI121987                | 68/0.0        |                         |
| <i>CmCarE6</i>   | KP001152                | 566                    | Yes                   | GLSAG                      | +       | +                      | GGA |  | 63.53          | 6.25      | <i>Microplitis demolitor</i> / Venom carboxylesterase   | XP_008543575            | 92/0.0        |                         |
| <i>CmCarE7</i>   | KP001153                | 563                    | Yes                   | GSSAG                      | +       | +                      | GGA |  | 63.13          | 6.19      | <i>Helicoverpa armigera</i> / Carboxyl/choline esterase | ADF43459                | 58/0.0        |                         |
| <i>CmCarE8</i>   | KP001154                | 550                    | Yes                   | GESAG                      | +       | +                      | GGA |  | 61.88          | 6.77      | <i>Bombyx mori</i> / Alpha-esterase                     | NP_001116814            | 63/0.0        |                         |
| <i>CmCarE9</i>   | KP001155                | 542                    | Yes                   | GESAG                      | +       | +                      | GGA |  | 61.50          | 8.32      | <i>Sesamia inferens</i> / Odorant degrading enzyme      | AI121992                | 59/0.0        |                         |
| <i>CmCarE10</i>  | KP001156                | 559                    | Yes                   | GQSAG                      | +       | +                      | GEA |  | 62.36          | 6.43      | <i>Helicoverpa armigera</i> / Carboxylesterase          | ADE05551                | 59/0.0        |                         |
| <i>CmCarE11</i>  | KP001157                | 552                    | Yes                   | GHGSG                      | +       | +                      | GGS |  | 62.40          | 7.96      | <i>Bombyx mori</i> / Carboxylesterase                   | NP_001266383            | 44/7e-160     |                         |
| <i>CmCarE12</i>  | KP001158                | >388                   | Yes                   | GNSVG                      | +       | -                      | GGV |  | -              | -         | <i>Bombyx mori</i> / Carboxylesterase                   | AGG20205                | 49/5e-112     |                         |
| <i>CmCarE13</i>  | KP001159                | 584                    | No                    | GESAG                      | +       | +                      | GGA |  | 65.50          | 6.94      | <i>Bombyx mori</i> / Esterase FE4-like                  | XP_004927161            | 59/0.0        |                         |
| <i>CmCarE14</i>  | KP001160                | 537                    | No                    | GESAG                      | +       | +                      | GGA |  | 59.81          | 5.67      | <i>Microplitis demolitor</i> / Esterase FE4-like        | XP_008553668            | 66/0.0        |                         |
| <i>CmCarE15</i>  | KP001161                | 539                    | No                    | GESAG                      | +       | +                      | GGA |  | 61.22          | 5.02      | <i>Sesamia inferens</i> / Odorant degrading enzyme      | AI121984                | 54/0.0        |                         |

图 1 昆虫 *CarEs* 系统进化分析Fig. 1 Phylogenetic analysis of insect *CarEs*

15 个 *CmCarEs* 以下划线表示。D.mel: 黑腹果蝇; A.mel: 意大利蜜蜂; S.lit: 海灰翅夜蛾; B.mor: 家蚕; M.sex: 烟草天蛾; M.bra: 甘蓝夜蛾; S.non: 蛙茎夜蛾; A.pol: 多音天蚕; P.jap: 日本金龟子。

15 *CmCarEs* are underlined. D.mel: *Drosophila melanogaster*; A.mel: *Apis mellifera*; S.lit: *Spodoptera littoralis*; B.mor: *Bombyx mori*; M.sex: *Manduca sexta*; M.bra: *Mamestra brassicae*; S.non: *Sesamia nonagrioides*; A.pol: *Antheraea polyphemus*; P.jap: *Popillia japonica*.

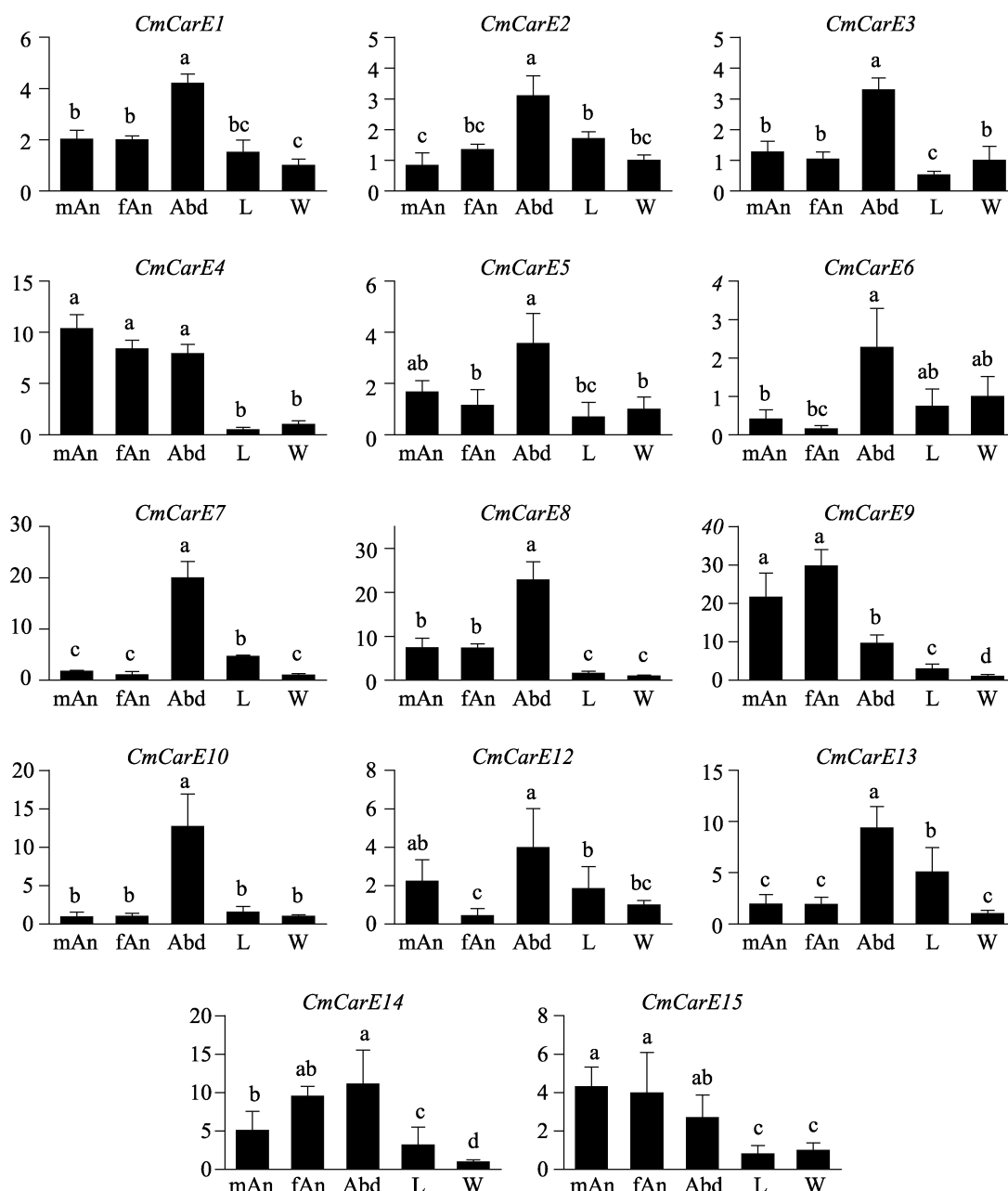


图2 *CmCarE* 基因在成虫各组织中的相对表达水平

Fig. 2 Relative expression levels of *CmCarE* genes in various adult tissues

mAn: 雄虫触角; fAn: 雌虫触角; Abd: 腹部; L: 足; W: 翅。各组织中 *CmCarE* 表达水平均表示为翅 (1 倍) 的相对倍数。柱上标有不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

mAn: Male antenna; fAn: Female antenna; Abd: Abdomen; L: Leg; W: Wing. Levels of *CmCarE* gene expression in various tissues are normalized relative to the level in the wing, in which the *CmCarE* levels are set as 1-fold. Histograms with different lowercase letters indicate significant differences among various samples ( $P < 0.05$ ).

### 3 讨论

本研究从已公布的稻纵卷叶螟转录组中鉴定了 15 个 *CarEs*。系统进化分析显示, 这些 *CarEs*

被划分到不同的进化支中。 *CmCarE13*、*CmCarE14* 和 *CmCarE15* 与其他昆虫的  $\alpha$ -酯酶聚在一起, 很多研究表明昆虫的  $\alpha$ -酯酶能够代谢有机磷杀虫剂, 并且与害虫抗药性的产生有直接关

系(Oakeshott *et al.*, 2010; Jackson *et al.*, 2013)。其余 12 个 *CmCarEs* 聚在“分泌催化类”进化支中, 这一进化支中的羧酸酯酶具有多种生理功能, 如代谢有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂、生殖、降解性信息素分子等(Oakeshott *et al.*, 2010)。*CmCarEs* 在进化上的差异暗示着他们编码的酯酶可能也具有功能上的分化。

荧光定量 PCR 结果表明, 有 7 个基因(*CmCarE1*、*CmCarE2*、*CmCarE3*、*CmCarE7*、*CmCarE8*、*CmCarE10* 和 *CmCarE13*) 在腹部的表达量均显著高于其他组织。昆虫的腹部是生殖和代谢的中心, 含有很多重要的功能器官, *CmCarEs* 在腹部高量表达暗示着这些基因可能参与了内源或外源化合物的代谢过程(Oakeshott *et al.*, 2010)。很多昆虫的 *CarEs* 都大量表达于成虫腹部, 如家蚕的羧酸酯酶基因 *Bmae35* 和棉铃虫的羧酸酯酶基因 *HaCXE6* 均是在腹部高量表达(杨微等, 2011; 姬继超等, 2013)。

*CmCarE9* 在触角中的表达水平显著高于腹部、足和翅。触角是昆虫重要的化学感受器官, 分布有众多的嗅觉感器, 当气味分子大量聚集于触角感器之中时, 会造成信号饱和, 且会损伤嗅觉神经, 成了必须被清除的有害物质(He *et al.*, 2014)。推测 *CmCarE9* 编码的酯酶可能参与了对触角中过量气味分子的降解。*CarEs* 的本职功能是水解酯类化合物, 很多气味分子也具有与酯类化合物相似的结构, 因此有可能被 *CarEs* 降解。例如在海灰翅夜蛾 *S. littoralis* 和甜菜夜蛾 *S. exigua* 触角中发现的数个 *CarEs* 能够降解性信息素和植物挥发物(Durand *et al.*, 2011; He *et al.*, 2014)。

前人的假说认为, 特异性表达于雄虫触角的 *CarEs* 可能与降解性信息素分子有关, 而特异表达于雌虫触角、或雌雄触角之间表达差异不显著的 *CarEs* 则可能参与了对植物挥发物的代谢(Durand *et al.*, 2011)。由于 *CmCarE9* 在稻纵卷叶螟雌雄触角中的表达水平没有显著差异, 加之稻纵卷叶螟的性信息素由醛类和醇类组成, 而不含酯类(Kawazu *et al.*, 2009), 因此我们初步

推断该基因编码的酯酶可能与降解水稻挥发物有关。此外, *CmCarE12* 虽大量表达于腹部, 但其在雄虫触角中的表达水平显著高于雌虫触角, 推测其可能也会参与嗅觉过程, 但以上推测需要进一步的功能验证。

需要说明的是, 本实验仅检测了 *CmCarEs* 在稻纵卷叶螟成虫组织中的表达谱, 没有检测这些基因在幼虫解毒代谢器官(如中肠、马氏管和脂肪体等)中的表达状况, 因此这些基因在幼虫生理代谢中的功能暂不明确。后期将针对以上问题进行研究, 并结合真核表达、酶活检测和 RNA 干扰等技术, 以期明确 *CmCarEs* 的生理功能。

## 参考文献 (References)

- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ, 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 25(17): 3389–3402.
- Alon M, Alon F, Nauen R, Morin S, 2008. Organophosphates' resistance in the B-biotype of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) is associated with a point mutation in an ace1-type acetylcholinesterase and overexpression of carboxylesterase. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38(10): 940–949.
- Chen X, Liu WC, Zhu JS, Zhang XX, Zhai BP, 2013. Climatic factors influencing the 2003 outbreak of *Cnaphalocrocis medinalis* in China. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 50(3): 615–621. [陈晓, 刘万才, 朱建生, 张孝羲, 翟保平, 2013. 2003 年我国稻纵卷叶螟特大发生的气候背景. 应用昆虫学报, 50(3): 615–621.]
- Chertemps T, Francois A, Durand N, Rosell G, Dekker T, Lucas P, Maibeche-Coisne M, 2012. A carboxylesterase, esterase-6, modulates sensory physiological and behavioral response dynamics to pheromone in *Drosophila*. *BMC Biol.*, 10(1): 56.
- Cui F, Lin Z, Wang H, Liu S, Chang H, Reeck G, Qiao C, Raymond M, Kang L, 2011. Two single mutations commonly cause qualitative change of nonspecific carboxylesterases in insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 41(1): 1–8.
- Durand N, Carot-Sans G, Bozzolan F, Rosell G, Siaussat D, Debernard S, Chertemps T, Maibèche-Coisne M, 2011. Degradation of pheromone and plant volatile components by a same odorant-degrading enzyme in the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*. *PLoS ONE*, 6(12): e29147.
- Gong YH, Yu XR, Shang QL, Shi XY, Gao XW, 2014. Oral delivery

- mediated RNA interference of a carboxylesterase gene results in reduced resistance to organophosphorus insecticides in the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover. *PLoS ONE*, 9(8): e102823.
- He P, Zhang YN, Li ZQ, Yang K, Zhu JY, Liu SJ, Dong SL, 2014. An antennae-enriched carboxylesterase from *Spodoptera exigua* displays degradation activity in both plant volatiles and female sex pheromones. *Insect Mol. Biol.*, 23(4): 475–486.
- Jackson CJ, Liu JW, Carr PD, Younus F, Coppin C, Meirelles T, Lethier M, Pandey G, Ollis DL, Russell RJ, Weik M, Oakeshott JG, 2013. Structure and function of an insect  $\alpha$ -carboxylesterase ( $\alpha$ Esterase7) associated with insecticide resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110(25): 10177–10182.
- Ji JC, Wang LS, Zhao M, Li WZ, Yuan GH, Luo MH, Guo XR, 2013. Cloning, sequence analysis and mRNA expression levels of the antennal carboxylesterase gene *HaCXE6* from *Helicoverpa armigera*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 50(5): 1311–1319. [姬继超, 王丽莎, 赵曼, 李为争, 原国辉, 罗梅浩, 郭线茹, 2013. 棉铃虫触角羧酸酯酶 *HaCXE6* 基因的克隆、序列分析与 mRNA 表达. 应用昆虫学报, 50(5): 1311–1319.]
- Kawazu K, Adati T, Yosiyasu Y, Sumiartha K, Susila W, Sudiarta P, Purwanto H, Tatsuki S, 2009. Sex pheromone components of the rice leafroller, *Cnaphalocrocis medinalis* (Lepidoptera: Crambidae), in Indonesia. *J. Asia-Pac Entomol.*, 12(2): 97–99.
- Li SW, Yang H, Liu YF, Liao QR, Du J, Jin DC, 2012. Transcriptome and gene expression analysis of the rice leaf folder, *Cnaphalocrocis medinalis*. *PLoS ONE*, 7(11): e47401.
- Li X, Schuler MA, Berenbaum MR, 2007. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu. Rev. Entomol.*, 52(1): 231–253.
- Liu Y, Shahzad MF, Zhang L, Li F, Lin K, 2013. Amplifying long transcripts of ryanodine receptors of five agricultural pests by transcriptome analysis and gap filling. *Genome*, 56(11): 651–658.
- 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.
- Oakeshott JG, Johnson RM, Berenbaum MR, Ranson H, Cristino AS, Claudianos C, 2010. Metabolic enzymes associated with xenobiotic and chemosensory responses in *Nasonia vitripennis*. *Insect Mol. Biol.*, 19(S1): 147–163.
- Pan P, Luo LZ, Jiang XF, Zhang L, 2013. The character of flight in the rice leaf roller, *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) (Lepidoptera: Pyralidae). *Chinese Journal of Applied Entomology*, 50(3): 583–591. [潘攀, 罗礼智, 江幸福, 张蕾, 2013. 稻纵卷叶螟飞行行为特征. 应用昆虫学报, 50(3): 583–591.]
- Tang QY, Zhang CX, 2013. Data Processing System (DPS) software with experimental design, statistical analysis and data mining developed for use in entomological research. *Insect Sci.*, 20(2): 254–260.
- Vogt RG, Riddiford LM, Prestwich GD, 1985. Kinetic properties of a sex pheromone-degrading enzyme: the sensillar esterase of *Antheraea polyphemus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82(24): 8827–8831.
- Yang W, Qi DW, Yu QY, Zhang Z, 2011. Cloning, sequence analysis and expression of carboxylesterase gene *Bmae35* in the silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Entomologica Sinica*, 54(6): 634–641. [杨微, 齐登伟, 余泉友, 张泽, 2011. 家蚕羧酸酯酶基因 *Bmae35* 的克隆、序列分析及表达. 昆虫学报, 54(6): 634–641.]
- You M, Yue Z, He W, Yang X, Yang G, Xie M, Zhan D, Baxter SW, Vasseur L, Gurr GM, Douglas CJ, Bai J, Wang P, Cui K, Huang S, Li X, Zhou Q, Wu Z, Chen Q, Liu C, Wang B, Li X, Xu X, Lu C, Hu M, Davey JW, Smith SM, Chen M, Xia X, Tang W, Ke F, Zheng D, Hu Y, Song F, You Y, Ma X, Peng L, Zheng Y, Liang Y, Chen Y, Yu L, Zhang Y, Liu Y, Li G, Fang L, Li J, Zhou X, Luo Y, Gou C, Wang J, Wang J, Yang H, Wang J, 2013. A heterozygous moth genome provides insights into herbivory and detoxification. *Nat. Genetics*, 45(2): 220–225.
- Yu QY, Lu C, Li WL, Xiang ZH, Zhang Z, 2009. Annotation and expression of carboxylesterases in the silkworm, *Bombyx mori*. *BMC Genomics*, 10(1): 553.
- Zhang J, Zhang J, Yang M, Jia Q, Guo Y, Ma E, Zhu KY, 2011. Genomics-based approaches to screening carboxylesterase-like genes potentially involved in malathion resistance in oriental migratory locust (*Locusta migratoria manilensis*). *Pest Manag. Sci.*, 67(2): 183–190.
- Zhang JQ, Wang Y, Li DQ, Yang ML, Zhang JZ, Ma EB, 2014. Effect of deltamethrin on carboxylesterase gene expression in *Locusta migratoria*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 51(2): 418–424. [张建琴, 王燕, 李大琪, 杨美玲, 张建珍, 马恩波, 2014. 溴氰菊酯对飞蝗羧酸酯酶基因表达的影响. 应用昆虫学报, 51(2): 418–424.]
- Zhang LP, Yao SM, Lin Z, Cui F, 2013. Effect of two single mutations on malathion degradation by insect carboxylesterases. *Acta Entomologica Sinica*, 56(5): 566–569. [张柳平, 姚淑敏, 林哲, 崔峰, 2013. 两个单点突变对昆虫羧酸酯酶降解马拉硫磷的影响. 昆虫学报, 56(5): 566–569.]
- Zhang SK, Ren XB, Wang YC, Su J, 2014. Resistance in *Cnaphalocrocis medinalis* (Lepidoptera: Pyralidae) to new chemistry insecticides. *J. Econ. Entomol.*, 107(2): 815–820.