综述和进展

昆虫几丁质酶及其在害虫防治中的应用*

李 瑶 范晓军**

(太原理工大学化学化工学院生物与制药工程系 太原 030024)

摘 要 几丁质是昆虫重要的结构性组分,在昆虫生长发育的各个时期都需要一定量的几丁质来维持其代谢平衡。昆虫几丁质酶可以降解昆虫体壁和围食膜中的几丁质,作为一种潜在的生物杀虫剂在害虫防治方面具有广阔的应用前景。随着对昆虫几丁质酶研究的不断深入,目前已克隆到了30余种昆虫几丁质酶,并应用于转基因作物和基因工程微生物中,对害虫具有一定的防治效果。本文就昆虫几丁质酶的生理功能、生化特性、结构特点、在害虫防治中的研究现状及应用前景做一全面的综述。

关键词 几丁质,昆虫几丁质酶,害虫防治

Insect chitinase and its application in insect pest control

LI Yao FAN Xiao-Jun**

(Department of Biological and Pharmaceutical Engineering, College of Chemical Engineering and Technology, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, China)

Abstract Chitin, an important structural component of insects, plays an essential role at various periods of their growth and development. One potential biopesticide is the insect molting enzyme, chitinase, which degrades chitin in the integument and peritrophic membrane to a low molecular weight and promises to be a biocontrol agent with broad application. More than 30 species of insect chitinases have now been cloned and some of these have been incorporated into transgenic plants and recombinant microorganisms where they have achieved a degree of effectiveness in controlling insect pests. This paper provides a comprehensive review of the physiological function, biochemical characterization and structure of insect chitinase, as well as current research on chitinase for pest control purposes.

Key words chitin, insect chitinase, pest control

几丁质(chitin)又称甲壳素、壳多糖,是通过β-1,4-糖苷键连接成不分支的2-乙酰氨基-2-脱氧-D-葡萄吡喃糖苷(N-乙酰氨基葡萄糖)的同聚物,它是自然界中许多生物的结构性组分,主要存在于无脊椎动物、藻类、真菌等生物体中。昆虫几丁质是昆虫表皮和围食膜的重要组成成分,在昆虫生长、发育的各个时期都需要一定量的几丁质(Tellam *et al.*,1999)。几丁质代谢随昆虫不同生长发育阶段而变化,对昆虫的正常生长发育起着至关重要的作用,高等植物和高等动物体内则不含几丁质,因此,选择几丁质酶来破坏昆虫几丁质结构或几丁质代谢的平衡来防治害虫,具有极大的发展潜力。随着对几丁质酶研究的不断深入,更多的昆虫几丁质酶基因被克隆,并进一步应用于转基因作物或微生物杀虫剂的增效等生物防治手段,都取得了很好的增效杀虫效果。

1 昆虫几丁质酶

1.1 昆虫几丁质酶的生理功能及一般理化特性

昆虫的几丁质酶存在于中肠、蜕皮腺及某些昆虫(如蜜蜂)的毒腺中。中肠中的几丁质酶除了具有降解中肠壁和围食膜中的几丁质外还具有消

* 资助项目:山西省青年科技研究基金(2010021031-2)、太原市技术创新项目(0904014)。

** 通讯作者,E-mail:fanxiaojun@tyut.edu.cn

收稿日期:2010-10-14,接受日期:2010-12-23

综述和进展

昆虫几丁质酶及其在害虫防治中的应用*

李 瑶 范晓军**

(太原理工大学化学化工学院生物与制药工程系 太原 030024)

摘 要 几丁质是昆虫重要的结构性组分,在昆虫生长发育的各个时期都需要一定量的几丁质来维持其代谢平衡。昆虫几丁质酶可以降解昆虫体壁和围食膜中的几丁质,作为一种潜在的生物杀虫剂在害虫防治方面具有广阔的应用前景。随着对昆虫几丁质酶研究的不断深入,目前已克隆到了30余种昆虫几丁质酶,并应用于转基因作物和基因工程微生物中,对害虫具有一定的防治效果。本文就昆虫几丁质酶的生理功能、生化特性、结构特点、在害虫防治中的研究现状及应用前景做一全面的综述。

关键词 几丁质,昆虫几丁质酶,害虫防治

Insect chitinase and its application in insect pest control

LI Yao FAN Xiao-Jun**

(Department of Biological and Pharmaceutical Engineering, College of Chemical Engineering and Technology, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, China)

Abstract Chitin, an important structural component of insects, plays an essential role at various periods of their growth and development. One potential biopesticide is the insect molting enzyme, chitinase, which degrades chitin in the integument and peritrophic membrane to a low molecular weight and promises to be a biocontrol agent with broad application. More than 30 species of insect chitinases have now been cloned and some of these have been incorporated into transgenic plants and recombinant microorganisms where they have achieved a degree of effectiveness in controlling insect pests. This paper provides a comprehensive review of the physiological function, biochemical characterization and structure of insect chitinase, as well as current research on chitinase for pest control purposes.

Key words chitin, insect chitinase, pest control

几丁质(chitin)又称甲壳素、壳多糖,是通过β-1,4-糖苷键连接成不分支的2-乙酰氨基-2-脱氧-D-葡萄吡喃糖苷(N-乙酰氨基葡萄糖)的同聚物,它是自然界中许多生物的结构性组分,主要存在于无脊椎动物、藻类、真菌等生物体中。昆虫几丁质是昆虫表皮和围食膜的重要组成成分,在昆虫生长、发育的各个时期都需要一定量的几丁质(Tellam *et al.*,1999)。几丁质代谢随昆虫不同生长发育阶段而变化,对昆虫的正常生长发育起着至关重要的作用,高等植物和高等动物体内则不含几丁质,因此,选择几丁质酶来破坏昆虫几丁质结构或几丁质代谢的平衡来防治害虫,具有极大的发展潜力。随着对几丁质酶研究的不断深入,更多的昆虫几丁质酶基因被克隆,并进一步应用于转基因作物或微生物杀虫剂的增效等生物防治手段,都取得了很好的增效杀虫效果。

1 昆虫几丁质酶

1.1 昆虫几丁质酶的生理功能及一般理化特性

昆虫的几丁质酶存在于中肠、蜕皮腺及某些昆虫(如蜜蜂)的毒腺中。中肠中的几丁质酶除了具有降解中肠壁和围食膜中的几丁质外还具有消

* 资助项目:山西省青年科技研究基金(2010021031-2)、太原市技术创新项目(0904014)。

** 通讯作者,E-mail:fanxiaojun@tyut.edu.cn

收稿日期:2010-10-14,接受日期:2010-12-23

化功能。肠道中的几丁质酶在幼虫取食阶段才分泌,最初是以无活性的酶原形式存在,在需要时被胰蛋白酶激活来降解围食膜(相静波等,2004)。蜕皮液中的几丁质酶精确地调节着昆虫蜕掉旧表皮合成新表皮的过程,在幼虫-幼虫、幼虫-蛹和蛹-成虫时期蜕皮前的短暂时间内表现活性,蜕皮前达到高峰。毒腺中的几丁质酶有助于毒腺物质在取食对象的组织中扩散(Reynolds and Samuels,1996; Zhu *et al.*,2008a)。昆虫几丁质酶的分子量在 45~85 ku 之间,酶的活性范围在 pH 4.0~8.0 之间,等电点在 5.0~7.0 之间,大多属于 18 家族几丁质酶。昆虫几丁质酶属于内切酶,可将几丁质水解为低分子量的乙酰氨基葡萄糖的寡聚物,如几丁四糖、几丁三糖、几丁二糖(Fukamizo and Kramer,1985)。

1.2 昆虫几丁质酶的基因结构及表达时空特点

昆虫体内含有多个不同的几丁质酶基因,分为Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ、Ⅵ、Ⅶ、Ⅷ 8 个不同类型,目前研究最为深入的为Ⅰ型几丁质酶基因。笔者在克隆金纹细蛾 *Lithocolletis ringoniella* 几丁质酶基因过程中也发现了 2 种同源性较高的几丁质酶基因,但最终确定还需要进一步研究。多个几丁质酶基因的存在可能与进行特异的时空表达从而完成不同的生理功能有关。自从编码烟草天蛾 *Manduca sexta* 几丁质酶的 cDNA 序列在 1993 年首次被 Karmer 等人克隆出来后,目前通过 Southern 杂交、标记探针法和 cDNA 末端快速扩增方法克隆得到了烟草天蛾、家蚕 *Bombyx mori* 和美国白蛾 *Hyphantria cunea* 等 30 余种昆虫的几丁质酶 cDNA 序列。这些被克隆的基因主要集中在鳞翅目昆虫中,双翅目、鞘翅目和膜翅目等仅有少数几丁质酶基因被克隆报道。表 1 列出了一些主要的昆虫几丁质酶基因序列。

表 1 在 GenBank 上登录的主要昆虫几丁质酶基因

Table 1 Important insect chitinase gene in GenBank

昆虫种类 Insect	拉丁学名 Scientific name	登录号 GenBank No.	核苷酸序列 Nucleotide	氨基酸序列 Amino acid	发现人 Author
烟草天蛾	*Manduca sexta*	U02270	2452	554	Kramer KJ
家蚕	*Bombyx mori*	U86876	2850	565	Kim MG
美国白蛾	*Hyphantria cunea*	U86877	2788	553	Kim MG
斜纹夜蛾	*Spodoptera litura*	AB032107	2840	552	Shinoda T
棉铃虫	*Helicoverpa armigera*	AY325496	2870	588	Ahmad T
草地贪夜蛾	*Spodoptera frugiperda*	AY527414	1836	555	Kramer KJ
野蚕	*Bombyx mandarina*	AF326596	2625	565	Goo TW
二化螟	*Chilo suppressalis*	AY705930	2287	552	Fan D
粘虫	*Mythimna separata*	AY508698	2810	558	Fan D
甜菜夜蛾	*Spodoptera exigua*	GU371868	2880	557	Zhang D
小菜蛾	*Plutella xylostella*	FJ613480	2441	558	Liao ZH
小地老虎	*Agrotis ipsilon*	FJ899540	2805	557	Fan D
玉米螟	*Ostrinia furnacalis*	AY726548	3343	553	Fan D
甘蓝菜蛾	*Mamestra brassicae*	FJ436415	2809	562	Fan D
埃及伊蚊	*Aedes aegypti*	AF026491	3182	574	Specht CA
冈比亚蚊	*Anopheles gambiae*	AF008575	1723	525	Shen Z
黑腹果蝇	*Drosophila melanoga*	AY061553	2130	595	Stapleton M
辣根猿叶甲	*Phaedon cochleariae*	Y18011	1343	405	Girard C
茧蜂	*Chelonus* sp.	U10422	1579	483	Krishnan A

昆虫几丁质酶具有相似的基因结构,都包含信号肽区、酶活性位点区、糖基化和磷酸化位点区、富含半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸的几丁质结合区等。以烟草天蛾的几丁质酶基因为例,烟草天

蛾几丁质酶基因的大小约为 11 kb,包含 11 个外显子,9 个内含子,一个或几个外显子对应着蛋白上的结构功能区。外显子 1 包含起始密码子和编码 19 个氨基酸的信号肽序列; 外显子 2 从编码成熟氨基酸的氮端序列 DSRART 开始; 外显子 3 含编码一个保守区的序列, KFMVAGGWA,为部分催化位点; 外显子 4 含有另一保守区域序列, YDFDGLDLDWEY,这段结构域被认为是几丁质酶的催化核心区; 富含脯氨酸、谷氨酸、丝氨酸、苏氨酸的 PEST 区域主要由第 8 个外显子编码; 外显子 10 含终止密码子和编码 750 核苷酸的非翻译区(Choi *et al.*,1997)。Kramer 等(1993)克隆得到的烟草天蛾几丁质酶基因的全长 cDNA 由 2 452 个核苷酸组成,其开放阅读框含 1 662 个核苷酸,编码 554 个氨基酸,分子量为 62 ku。

昆虫几丁质酶基因只在幼虫 - 幼虫、幼虫 - 蛹和蛹 - 成虫蜕皮前的短时间内表达,在这些变态期间蜕皮激素对其有正调控作用,保幼激素起负调控作用,几丁质酶的及时表达对昆虫的生长发育极为关键。此外,重金属、激素和病原体等生物诱导因子可诱导几丁质酶表达。通过利用 Northern 杂交、Western 杂交、RT-PCR 等技术对昆虫几丁质酶的时空表达和组织特异性表达进行分析研究,结果显示在预蛹期时昆虫的中肠及体壁中转录的几丁质酶 mRNA 量最大(樊东等,2005)。

1.3　昆虫几丁质酶的氨基酸结构特点

昆虫几丁质酶为多结构域蛋白,包括 N 端的活性催化区(catalytic domain),C 端富含半胱氨酸的几丁质结合区(chitin-binding domain),以及连接 C 端和 N 端的富含丝氨酸、苏氨酸的 Linker 连接区。催化区与几丁质酶的活性密切相关,在催化区中含有 2 个高度保守区域,一个是 KFMVAVGGWA,另一个是 YDFDGLDLDWEYP。几丁质结合区(CBD)约含 65 个氨基酸,基本功能是使几丁质酶结合不溶性的底物并提高降解效率,不同的昆虫几丁质酶的 CBD 的序列有很高的相似性。连接催化区和几丁质结合区的 Linker 区使几丁质酶易于分泌到细胞外,而且使几丁质酶在肠道中存在蛋白水解酶的条件下也能够保持稳定(樊东,2004)。除了几丁质酶催化区、几丁质结合区和 Linker 区外,在 N 端成熟蛋白的前端有一个大约由 20 个氨基酸组成的信号肽(Arakane *et al.*,2003)。

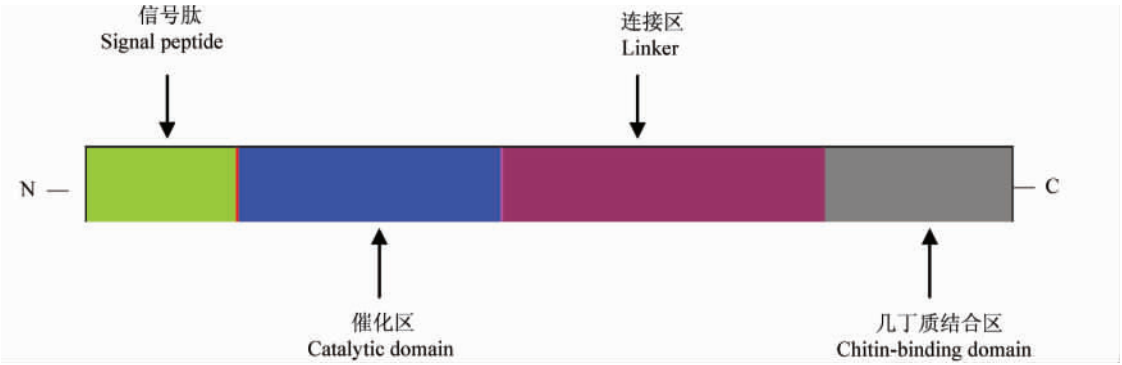

图 1　昆虫几丁质酶氨基酸序列多功能结构区

Fig. 1　Multi-domain structure of insect chitinase amino acid sequences

昆虫体内表达的几丁质酶或 cDNA 克隆的表达产物一般是高度糖基化的,糖基化作用对于其有效发挥酶的活性十分重要。用分子生物学软件 Prosite 对已知的几丁质酶蛋白结构分析表明,其结构域内有多个糖基化位点且数目不等,多数糖基化位点位于 Linker 区和部分催化区(樊东,2004)。此外,昆虫几丁质酶氨基酸序列中除了糖基化作用位点之外还存在多个硫酸化和磷酸化作用位点,这些位点可以通过 Prosite 软件找到,它们的存在对蛋白功能的发挥均起到一定的作用。

2　昆虫几丁质酶在害虫防治方面的应用

昆虫的围食膜和外壳作为物理化学屏障来抵抗不良环境和捕食者,其主要由几丁质和蛋白质

组成,因此可以利用几丁质酶来分解昆虫的外壳、围食膜等含几丁质的组织来抑制害虫的正常生理活动,从而达到害虫防治作用。同时,几丁质酶还可以激发寄主释放一些防御性物质增强寄主的抗性(吴青君等,2000)。由于高等植物和高等动物不含几丁质,因此利用几丁质酶来防治害虫是一种安全、有效的手段。昆虫几丁质酶在害虫防治方面应用的主要体现在以下几方面:

2.1 昆虫几丁质酶的杀虫效果

昆虫几丁质酶虽然能水解昆虫的外壳、围食膜等组织,具有潜在的杀虫效果,但实验表明昆虫几丁质酶单独作用时杀虫效果并不显著。樊东(2004)用大肠杆菌和毕赤酵母分别表达了甜菜夜蛾几丁质酶和粘虫几丁质酶,并检测了蛋白含量,用表达的几丁质酶对甜菜夜蛾和粘虫单独作用后,发现其杀虫活性不到10%,与空白组没有显著差异。原因可能与进入肠道的几丁质酶被肠道内的蛋白酶水解而无法进行正常的分解几丁质作用有关。在几丁质的分解代谢过程中,昆虫可能会同时表达多种不同结构的几丁质酶,Zhu 等(2008b)的研究表明在果蝇 *Drosophila melanogaster* 和赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 的基因组中存在十几种几丁质酶类似基因,其中一些类几丁质酶蛋白可通过与几丁质结合来增强几丁质酶的作用效果,且多种几丁质酶的协同作用效果远高于单个几丁质酶作用效率高,此外,几丁质酶与蛋白酶的联合作用以及对几丁质酶抑制剂的深入研究都可为几丁质酶的增效提供重要的理论依据。

2.2 昆虫几丁质酶与微生物杀虫剂的协同作用

在20世纪70年代人们就发现了几丁质酶与微生物杀虫剂之间的增效作用。Brandt 等(1978)发现几丁质酶可在昆虫围食膜上造成穿孔而有利于病原微生物进入昆虫组织。刘艳荷(2008)、王芳(2004)等的研究证实杆状病毒几丁质酶基因的表达产物对昆虫病毒早期侵染和苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*)都有明显的增效作用,Arora 等(2003)报道,几丁质酶 Chi36 的加入使得 Bt 对斜纹夜蛾幼虫的半致死浓度降低了30%。这说明几丁质酶和一些病原微生物存在着协同作用。昆虫几丁质酶与苏云金芽胞杆菌等微生物杀虫剂的结合使用也必然具有一定的增效杀虫效果。

杆状病毒是昆虫专一性的病原微生物,在农业害虫的防治中有很大的应用前景,昆虫几丁质酶可增强杆状病毒的杀虫活性。Gopalakrishnan 等(1995)把烟草天蛾几丁质酶基因转入到苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒 AcMNPV 中,在多角体蛋白启动子的控制下烟草天蛾几丁质酶基因表达了分子量为85 ku的糖基化的几丁质酶;用重组病毒去注射草地贪夜蛾幼虫,发现死亡率明显高于单独使用野生型 AcMNPV 处理的对照组。Shinoda 等(2001)从斜纹夜蛾中克隆到了一个几丁质酶基因,并将该基因插入美国白蛾核型多角体病毒 HycuNPV 基因组中,与野生型病毒相比,重组杆状病毒具有更高特异性的生物学活性。范晓军等(2007)用重组有东亚钳蝎昆虫神经毒素基因和烟草天蛾几丁质酶基因的双价重组苜蓿银纹夜蛾杆状病毒和野生型杆状病毒分别感染中国棉铃虫,结果表明重组病毒的半致死浓度比野生型病毒明显减小;随后将不同剂量的重组病毒悬液灌胃小鼠,被染毒的小鼠无一例死亡,各项生理指标均显正常,可见重组昆虫几丁质酶基因的杆状病毒是一种安全的生物杀虫剂。这些结果表明昆虫几丁质酶可以增强杆状病毒的杀虫活性,重组病毒有望成为一种新型高效生物杀虫剂。

2.3 昆虫几丁质酶在转基因作物中的应用

将细菌几丁质酶基因或植物几丁质酶基因导入转基因作物,使转基因植株获得防御部分病原菌的功能,但是对昆虫没有明显的抵御作用,而昆虫几丁质酶基因在转基因植物中的组成型表达却能获得更好的防治害虫效果(Kramer and Muthukrishnan,1997)。Masoud 等(1996)对来源于烟草天蛾、细菌、放线菌和植物的4种几丁质酶转基因烟草进行试验,均以1% ~2%的浓度加入到新生的甲虫幼虫食物中,结果发现来源于细菌和植物的几丁质酶转基因烟草对幼虫的成活率及生长情况没有产生明显的影响,而取食了含昆虫几丁质酶转基因烟草食物的幼虫在卵孵化后的几天内死亡。这一结果表明昆虫几丁质酶对增强植物抗虫效果更为有效。目前已通过多种途径,将昆虫几丁质酶基因导入到植物以增强其抗虫性能。Gatehous 等(1996)将昆虫几丁质酶基因转入马铃薯中表达,获得的转基因马铃薯增强了对蚜虫的抗性。Wang 等(1996)利用几丁质酶与 Bt 具

有的协同作用,将烟草夜蛾的几丁质酶基因通过农杆菌 Ti 质粒介导转化到烟草中,用获得的转基因烟草饲喂烟蚜和烟草天蛾幼虫,发现烟蚜的取食量明显减少。

在植物转基因研究中,转基因作物表达的单一外源抗性基因时往往会出现表达量低、抗虫谱较窄、昆虫容易产生耐受性等问题,若是联合使用 2 种或 2 种以上不同杀虫机制的抗虫基因使转基因植株表达多个具有不同毒性机制的毒素,将会减缓昆虫抗性的产生。研究表明将昆虫几丁质酶基因和钳蝎神经毒素基因 *Bmk* IT 同时转入甘蓝型油菜中,这种表达双价抗性基因的油菜比含单一抗性基因的植株有更高的杀虫活性(Wang *et al.*,2005)。张志云等(2004)构建了包含烟草天蛾几丁质酶和东亚钳蝎昆虫特异性神经毒素 2 种不同基因的双价重组质粒,通过农杆菌介导法转入棉花中,对转基因棉进行了初步的抗虫性试验,结果显示所获得转基因棉花对棉铃虫幼虫有明显的抗性。

将昆虫几丁质酶基因应用于转基因植物中扩充抗虫基因来源,构建多样转基因抗性系统,在实际应用中也存在一些问题。由于密码子的偏爱性不同导致植物中表达昆虫几丁质酶的效率相对较低,另外在植物中表达的昆虫几丁质酶与其天然形式会有不同,造成这一现象的原因可能是富含 Ser/ Thr 区域与蛋白酶作用靶点"PEST"区相类似,致使昆虫几丁质酶在转基因作物中表达时较易降解(涂洪涛等,1997; 贺玉年等,2009)。但随着研究的不断深入和抑制因素逐步解决,昆虫几丁质酶基因在植物保护中的应用将会更加广泛。

3　结论与展望

昆虫几丁质酶在害虫防治方面具有特别的效用,包括对一些细菌或植物几丁质酶不敏感的害虫种类也有效。昆虫的几丁质酶基因的克隆可用于获得对害虫有更强抗性的转基因植株,但也存在一些问题,比如植物和昆虫的密码子偏好不同导致转基因植物表达昆虫基因的转录效率很低,而且表达产物有被截短的现象,可以通过定点突变、更改启动子或功能区来提高昆虫几丁质酶的表达和稳定性。昆虫几丁质酶的大量纯化分离可以作为微生物杀虫剂的增效剂,昆虫几丁质酶与多角体杆状病毒和苏云金芽胞杆菌的协同使用可增强杀虫剂的效率,这种策略可能会延迟昆虫对昆虫杀虫剂如 *Bt* 毒素的抗性发展。

几丁质在昆虫生长的每一阶段都必须维持在一定的水平,过量或缺乏都将对昆虫造成致命的影响。通过控制昆虫表皮和围食膜中几丁质的完整性和含量来抑制害虫的生长,是很好的害虫防治策略,加之高等动物和植物均不含有几丁质,以几丁质为靶标的杀虫剂对其它生物体则相对安全,因此围绕昆虫几丁质代谢水平设计开发新型农药品种,其前景应是极为广阔。几丁质水解酶具有独特的选择活性,同时它能够增加其它杀虫剂的毒力或促进害虫对杀虫剂的吸收,这些特点也应充分用于害虫的防治策略中。此外,几丁质的水解产物还具有提高免疫力、抑制肿瘤细胞生长等特性。昆虫几丁质酶基因作为一个独特的基因源,也逐步纳入农业生物技术人员的研究轨迹,虽然仍处于探索阶段,但对其结构和调节特性的深入了解,将会对害虫防治措施提供更直接有力的信息。

参考文献(References)

Arakane Y, Zhu QS, Matsumiya M, 2003. Properties of catalytic, linker and chitin-bindingdomains of insect chitinase. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 33(6): 631—648.

Arora N, Ahmad T, Rajagopal R, 2003. A constitutively expressed 36 kDa exochitinase from *Bacillus thuringiensis* HD-1. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 307(3): 620—625.

Brandt CR, Adang MJ, Spence KD, 1978. Spence The peritrophic membrane: Ultrastructuralanalysis and function as a mechanical barrier to microbial infection in *Orgyia pseudotsugata*. *J. Invertebr. Pathol.*, 32(1): 12—24.

Choi HK, Choi KH, Kramer KJ, 1997. Isolation and characterization of a genomic clone for the gene of an insect molting enzyme chitinase. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 27(1): 37—47.

樊东,2004. 几种鳞翅目昆虫几丁质酶基因的克隆与表达研究. 博士学位论文. 哈尔滨: 东北农业大学.

樊东,赵奎军,张杰,2005. 昆虫几丁质酶基因的分子特性概述. 昆虫知识,42(4): 364—369.

范晓军,曹建斌,许成钢,付月军,张志云,梁爱华,2007. 重组杆状病毒(AcMNPV-BmKIT-Chi)的杀虫活性和安全性初步研究. 华北农学报,22(5): 161—164.

Fukamizo T, Kramer KJ, 1985. Mechanism of chitin oligosaccharide hydrolysis by the binary enzyme chitinase

system in insect moulting fluid. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 15(1): 1—7.

Gatehous AMR, Down RE, Powell KS, 1996. Transgenic potato plants with enhanced resistance to the peach-potato aphid *Myzus persicae*. *Exp. Appl.*, 17(3): 295—307.

Gopalakrishnan B, Muthukrishnan S, Kramer KJ, 1995. Baculovirus-mediated expression of a *Manduca sexta* chitinase gene: Properties of the recombinant protein. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 25(2): 255—265.

贺玉年,王晓云,韩岚岚,樊东,2009. **甘蓝夜蛾几丁质酶基因** cDNA **序列的克隆与序列分析. 昆虫知识,**46(5): 697—702.

Kramer KJ, Corpuz L, Choi HK, 1993. Sequence of a cDNA and expression of the gene encoding epidermal and gut chitinases of *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 23(6): 691—701.

Kramer KJ, Muthukrishnan S, 1997. Insect chitinases: molecular biology and potential use as biopesticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 27(11): 887—900.

刘艳荷,王利华,杨凤霞,方继朝,2008. SpltNPV **和** SeNPV **几丁质酶基因大肠杆菌表达产物对病毒的增效作用. 植物保护学报,**35(3): 209—214.

Masoud SA, Ding XF, Johnson BL, 1996. Expression of a corn bifunctional inhibitor of serine proteinases and insect α-amylases in transgenic tobacco plants. *Plant Sci.*, 115(1): 59—69.

Reynolds SE, Samuels RI, 1996. Physiology and biochemistry of insect moulting fluid. *Adv. Insect. Physiol.*, 26: 157—232.

Shinoda T, Kobayashi J, Matsui M, 2001. Cloning and functional expression of a chitinase cDNA from the common cutworm, *Spodoptera litura*, using a recombinant baculovirus lacking the virus-encoded chitinase gene. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 31(6): 521—532.

Tellam RL, Wijffels G, Willadsen P, 1999. Peritrophic matrix proteins. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 29(2): 87—101.

涂洪涛,付晓伟,郭线茹,李为争,罗梅浩,原国辉,2009. **烟夜蛾几丁质酶基因的克隆与表达. 昆虫知识,**46(2): 223—229.

王芳,顾奇伟,吴家才,张传溪,2004. HaSNPV **几丁质酶基因在大肠杆菌和昆虫细胞中的表达及其产物对** Bt **杀虫剂的增效作用. 中国生物化学与分子生物学报,**20(6): 792—797.

Wang JX, Chen ZL, Du JZ, 2005. Novel insect resistance in *Brassica napus* developed by trans-rmation of chitinase an dscorpion toxin genes. *Plant Cell. Rep.*, 24: 549—555.

Wang XR, Ding XF, Gopalakrishnan B, 1996. Characterization of a 46 kda insect chitinase from transgenic tobacco. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 26(10): 1055—1064.

吴青君,张文吉,张友军,2000. **昆虫几丁质酶及其在植物保护中的应用. 昆虫知识,**37(5): 314—317.

相静波,刘慧霞,吴文君,2004. **昆虫围食膜的研究进展. 昆虫知识,**41(2): 116—122.

张志云,张虎生,孙毅,梁爱华,2004. **双价抗虫基因植物表达载体的构建. 西北植物学报,**24(8): 1402—1408.

Zhu QS, Arakane Y, Beeman RW, 2008a. Characterization of recombinant chitinase-like proteins of *Drosophila melanogaster* and *Tribolium castaneum*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38(1): 467—477.

Zhu QS, Arakane Y, Debarshi B, 2008b. Domain organization and phylogenetic analysis of the chitinase-like family of proteins in three species of insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38(4): 452—466.

植物的抗螨机理*

雍小菊 丁 伟**

(西南大学植物保护学院 重庆 400715)

摘 要 植食性螨类分布广泛,危害多种寄主植物。本文从3个方面介绍了植物的抗螨机理:植物形态如叶型、叶色主要影响螨类的取食产卵位点和营养物质的获取;植物组织结构如叶厚、蜡质、茸毛、气孔等决定螨能否顺利利用口针取食到植物的汁液,而虫菌穴则作用于捕食螨和植食性螨的相互关系,从而达到保护植物的目的;植物理化性质如叶鲜重、生长速度、生育期反映了植物受害后的恢复能力,植物营养成分如水分、氮、可溶性糖、淀粉、叶绿素、氨基酸等的含量会直接影响螨的取食、生长发育和繁殖等,而植物的次生代谢物质,如酚类化合物、单宁、香豆素、类黄酮、生物碱等,则发挥着更加重要的抗螨作用。文章讨论了转Bt基因植物对植食性螨及其天敌的影响,短期内其对植食性螨没有显著的影响,但是螨在Bt植物上有逐渐加深危害的趋势。

关键词 植食性螨,植物形态,组织结构,代谢物质,Bt基因

The resistant mechanisms of plants to mites

YONG Xiao-Ju DING Wei**

(College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract Phytophagous mites are widely distributed and cause damage to various host plants. Three aspects of plant resistance mechanisms are discussed: 1. Plant morphology, such as leaf shape and leaf color, mainly affects the feeding and oviposition sites of mites and obtainable nutrients. 2. Tissue structures, such as leaf thickness, waxiness, leaf trichomes and stomata, may influence the ease of stylet penetrations and leaf domatia play an important role in the relationship between predatory mites and phytophagous mites. 3. Physical and chemical properties, such as leaf weight, growth rate and development stages, reflect recovery of plants from damage. The availability of water, carbon and nitrogen used for the production of soluble sugars, starch and amino acids, directly affects the feeding, growth and reproduction of mites. More critical and more influential are plant secondary metabolites, such as phenolic compounds, tannins, coumarins, flavonoids and alkaloids, amongst others. In addition, the effects of Bt-modified plants on phytophagous mites and natural enemies are discussed; the addition of the transgene does not have an obvious impact on phytophagous mites in short term, but mites on Bt-modified plants display a gradual increase in adverse demographic trends.

Key words phytophagous mites, plant morphology, tissue structure, metabolites, Bt gene

植食性螨类是否对寄主植物进行选择,取决于螨和植物2个方面。螨的因素包括螨的生殖方式、生长发育、取食、产卵、交配行为等生物学特性。植物的因素主要包括植物的形态、组织结构、理化性质以及最近研究较多的转Bt基因作物,其中植株的理化性质在螨类对于寄主植物的选择中发挥着举足轻重的作用,特别是植物次生代谢物质对螨的选择性产生多方面的影响。另外,一些气候因素如温度、湿度、暴雨等也会对螨的选择性产生短期的影响。本文主要分析了植物在螨类选择寄主的过程中所发挥的作用。对这方面的深入研究和分析,有助于我们很好地理解螨类与寄主植物的相互关系,对于减轻螨类对植物的危害,选育抗螨品种,有效地运用植物提取物或者次生代谢物质开发更多安全高效的植物源杀螨剂具有重要的价值和意义。

* 资助项目:国家自然科学基金(30671392)、重庆市科技攻关项目(CSTC,2008AC1094)、重庆市自然科学基金(CSTC,2010BB1016)。

** 通讯作者,E-mail: dwing818@yahoo.com.cn

收稿日期:2010-11-29,接受日期:2011-04-14

1 植物叶型及叶色的抗螨机理

1.1 植物叶型的抗螨性

通常来说,叶型较窄的叶片螨害轻,这与叶面积指数有关。叶面积指数越低,植物受到的螨害也就越轻,这主要是因为叶面积小的植物限制了螨类所能够摄取到的营养物质(刘雁南和刘明星,1995)。Bailey 等(1978),Bailey 和 Meredith(1983)及 Wilson 和 Fitt(1987),Wilson(1994)研究发现鸡脚叶棉对于螨的抗性要比一般的棉花品种强,这是由于螨缺少适合取食和产卵的位点而造成对植株的排拒性。

1.2 植物叶色对螨的影响

植物叶的颜色主要是通过影响光合速率、叶绿素含量等因子,进而对植物的抗螨性产生影响。通常绿叶植物受到的螨害较重,而其它颜色植物则具有一定程度的抗螨性。潘学标(1989)研究发现,在田间条件下,单叶净光合速率、单位叶面积的叶绿素含量等通常以绿叶棉为最高,红叶棉次之,黄叶棉最低。同时许多研究都表明红叶棉花品种具有潜在的抗螨性,如武予清等(1997)通过对 98 个棉花品种的苗期鉴定,筛选出了一批对朱砂叶螨 *Tetranychus cinnabarinus*(Boisduval)抗性强的种质资源,发现所鉴定的红叶品种平均受害指数显著低于所选定的推广品种。而 McEnroe(1971)研究表明,二斑叶螨 *Tetranychus urticae*(Koch)雌成螨对波长 375 nm(紫外光)和 500 nm(绿光)光强度反应有 2 个高峰,其前足体侧具有对此二波段的光接收器,这导致了其对绿叶的选择,而不选择红叶。

2 植物组织结构的抗螨机理

植物叶片组织结构可以从多个方面对螨的取食危害产生影响,主要包括叶片厚度、蜡质含量、茸毛密度、茸毛长度、气孔密度以及虫菌穴等,这些因素决定了螨的取食行为和对食物的消化等(表 1)。许多学者都表示寄主植物叶片表面组织结构的复杂性能够调节捕食者与植食性螨的关系,同时还能影响节肢动物的种群密度和群落结构,因此这方面具有很大的研究价值。

表 1 植物叶片组织结构与植物抗螨性的关系

Table 1 The relationship between tissue structure of plant leaf and resistance of plant to mites

植物叶片组织结构 Tissue structure of plant leaf	抗螨品种 Types	主要抗螨机理 Primary resistant mechanism of plants to mites
叶片厚度 Leaf thickness	厚 Thick	螨口针不能刺入叶片取食(刘捷平,1991;王朝生等,1991;刘奕清等,1999;桂连友等,2001a)
蜡质含量 Waxiness	多 Many	阻碍螨的取食,并且取食后不易消化(王朝生等,1991;刘奕清等,1999;袁辉霞等,2009)
茸毛密度 Leaf trichome density	大 Great	影响螨的取食活动以及与叶片的接触(张金发等,1993;武予清等,1997;刘奕清等,1999;Roda *et al.*,2001;郑兴国和洪晓月,2009;Hasnain *et al.*,2009)
茸毛长度 Leaf trichome length	长 Long	使得螨不能很好地在寄主叶片上附着(刘奕清等,1999;Roda *et al.*,2001)
气孔密度 Stomata density	小 Low	减少螨口针刺入叶片取食的通道(陈华才等,1996;刘奕清等,1999;桂连友等,2001b)
虫菌穴 Leaf domatia	有 Exist	保护捕食螨,并使其与植食性螨形成稳定的关系(Brouwer and Clifford,1990;Agrawal and Karban,1997;Roda *et al.*,2000;Romero and Benson,2005)

2.1 叶片厚度与植物的抗螨性

植物叶片的组织结构主要分为 4 层:上表皮层、栅栏组织、海绵组织和下表皮层(刘捷平,1991)。螨是靠口针刺入叶片组织,取食栅栏组织细胞的叶绿素和细胞液,而植物叶片下表皮是害螨栖息的主要场所。植物叶片下表皮增厚对螨口

针刺吸食物具有一定的阻碍效应,因此对植物具有机械保护的作用。叶片越厚,特别是下表皮越厚,植株的抗螨性也就越强。

刘奕清等(1999) 研究发现茶树抗侧多食跗线螨 *Polyphagotarsonemus latus*(Banks) 品种叶片具有下表皮厚的形态特征; 桂连友等(2001a) 在对 27 个茄子品种抗侧多食跗线螨的研究中也发现,该螨口器不发达,口针能通过下表皮层进入海绵组织,但不能进入栅栏组织,叶片下表皮层厚的品种上螨的种群密度和叶片为害指数均显著低,而上表皮层厚的品种,其种群增长倍数高,抗性相对较低。王朝生等(1991) 研究发现抗棉叶螨棉花种质川 98 系叶厚 0.5 mm,而螨螯针的长度为 0.117 ~ 0.121 mm,不利螨吸食棉叶栅栏组织上层或下层叶绿素,尤其不利于若螨(螯针长 0.102 ~ 0.105 mm) 的取食。

2.2　蜡质含量与植物的抗螨性

叶片蜡质层主要在植物的水分平衡机制中起作用,但是也含有抑制病原和阻止螨类侵袭的物质。许多研究(王朝生等, 1991; 刘奕清等, 1999; 袁辉霞等, 2009) 都表明叶表面蜡质层越厚,蜡质含量越多,角质化程度也就越强,从而对叶螨取食的机械阻力越大,抗螨性越强,同时还能减缓因螨害损伤叶片组织造成的水分散失。王朝生等(1991) 发现抗棉叶螨品种川 98 具有蜡质含量高的特点,指出棉叶蜡质存在于角质层外表,常见的成分为脂肪酸、蜡脂、正烷、正伯醇,螨取食后不利于消化而减少取食量。因此,抗螨性不仅取决于叶组织中各种物质和营养成分的含量与比例,也取决于叶螨对它的取食和消化利用。

2.3　叶片茸毛与植物的抗螨性

叶片茸毛又称绒毛、软毛和香毛簇。叶片表面的茸毛对于螨类种群密度有着很重要的影响,特别是在利用捕食螨进行生物防护中发挥着关键性的作用。植物表面的茸毛对螨类有直接和间接的影响。直接的影响是植物表面的茸毛及其所含或分泌的化学物质影响螨的生长发育和取食活动,间接的影响是植物茸毛通过影响天敌或叶面的微环境影响螨在植物叶片上的附着和生存等(郑兴国和洪晓月, 2009)。叶片茸毛主要从茸毛密度和茸毛长度 2 个方面对螨产生影响。

2.3.1　茸毛密度　叶片茸毛密度大是抗螨性植物品种的重要形态特征。这主要是由于螨类的个体小,其取食活动会受到叶片表面茸毛等附属物的影响,使其不能很好地与叶片表面接触,口针难于深达叶肉内正常的取食部位。张金发等(1993) 在 1988—1991 年进行的棉花抗朱砂叶螨的机制研究中表明,叶片具有致密茸毛的品种抗螨性较强。Hasnain 等(2009) 分析了巴基斯坦 5 种精选的棉花品种对于叶螨科螨的抗性与植物形态特征之间的关系,发现抗性最强的 NIAB-999,其叶片茸毛密度也最大。

2.3.2　茸毛长度　茸毛的长度会在一定程度上影响螨类的适应性,但是这种影响没有茸毛密度对螨类取食的影响显著。一般而言,茸毛长度越长,越有利于捕食螨的生存,而不利于植食性螨的取食危害。Roda 等(2001) 用室内模拟叶毛的对比试验说明,在纤维密度较低时,捕食性螨梨盲走螨 *Typhlodromus pyri*(Scheuten) 选择较长的纤维,而纤维密度较高时,选择较短的纤维,着卵比例在长纤维中较高。刘奕清等(1999) 研究发现茶树抗侧多食跗线螨品种的茸毛长度显著大于感性品种。

2.4　叶片气孔密度与植物的抗螨性

叶片的气孔是螨类取食的天然通道。气孔位于上、下表皮层,螨要获得营养,必须刺穿下表皮进入海绵组织,或从上表皮进入栅栏组织,或刺入保卫细胞中取食叶绿体。由于许多植物叶片的上、下表皮层较厚,角质化程度较高,而气孔及周围区域角质化程度较低,所以从气孔及周围区域进入栅栏组织或海绵组织对螨取食更有利。因此,通常叶片气孔密度越大,螨所造成的危害也越严重。

刘奕清等(1999) 研究发现茶树叶片气孔密度越大,越有利于侧多食跗线螨口针取食,从而促进了螨类的生长发育和繁殖,使害螨产生选择性,气孔密度小则会对害螨取食产生不利影响。陈华才等(1996) 在对茶橙瘿螨 *Acaphylla theae*(Watt) 抗性和感性的两组无性系茶树新梢叶片下表皮组织结构进行分析时,发现茶树新梢叶片下表面具有低气孔密度的形态学抗螨机制。桂连友等(2001b) 研究也发现茄子叶片背面气孔密度与侧多食跗线螨的田间种群密度呈显著正相关,而叶片正面气孔密度与之相关不显著。因此叶片下表