



王晓曦,刘兴龙,王宇,等.昆虫几丁质合成酶B基因的研究进展[J].黑龙江农业科学,2023(11):144-150.

昆虫几丁质合成酶B基因的研究进展

王晓曦¹,刘兴龙¹,王宇¹,王克勤¹,樊东²

(1.黑龙江省农业科学院植物保护研究所/农业农村部哈尔滨作物有害生物科学观测实验站,黑龙江哈尔滨150086;2.东北农业大学植物保护学院,黑龙江哈尔滨150030)

摘要:几丁质是昆虫的主要组成成分,由于几丁质不存在于植物和无脊椎动物中,被认为是环境友好型农药的设计靶标。几丁质合成酶B是几丁质合成路径中的最后一个关键酶,近些年已成为国内外研究的热点内容。根据国内外对昆虫几丁质合成酶B基因功能的研究,综述了几丁质合成酶B对几丁质合成的调控研究进展,包括时空表达特性、基因功能、基因在害虫防治中的研究,并对RNA干扰技术应用存在的问题及解决途径进行了展望。

关键词:昆虫;几丁质;几丁质合成酶B;环境友好型农药

几丁质又称甲壳素(Chitin),为 β -(1,4)-N-乙酰基-D-葡萄糖胺(GlcNAc)的线性高分子,含量仅次于膳食纤维,为自然界中第二重要大分子化合物,占全部昆虫干质量的40%左右,广泛分布在昆虫体表,中肠和肠道围食膜内。它是进入昆虫体内的第一道屏障,有保护中肠上皮细胞免受食物颗粒机械损伤、阻止病原体入侵及为昆虫解除体内有毒物质等效果,对昆虫的生长和变态发育至关重要^[1-2]。几丁质广泛存在于节肢动物、腕足类、软体动物、昆虫、真菌、线虫、藻类、原生生物、轮虫、海绵和墨鱼中。围食膜(Peritrophic Matrix, PM)是昆虫中肠细胞分泌的,隔开肠内容物与肠上皮细胞的一种半透膜^[3]。几丁质是围食膜的主要成分之一,含量为3%~13%,构成围食膜的几丁质微纤丝具有高弹性,保护了围食膜的韧性和通透性^[3-4]。

昆虫几丁质的合成共8种酶参与,可以实现复杂的生理和生化反应,从而合成昆虫几丁质。1962年,CanDy与Kilby首次发现了昆虫体内甲壳素的生物合成途径,起步于海藻糖,终止于甲壳素,先后包括了海藻糖酶(trehalase)、己糖激酶(hexokinase)、葡萄糖-6-磷酸异构酶(glucose-6-

phosphate isomerase)、谷氨酰基:果糖-6-磷酸转氨酶(glutamine: fructose-6-phosphate aminotransferase)、葡糖胺-6-磷酸-N-乙酰转移酶(glucosamine-6-phosphate n-acetyltransferase)、磷乙酰氨基葡萄糖刺激变位酶(phosphoacetylglucosamine mutase)、UDP-N-乙酰葡萄糖胺焦磷酸化酶(UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase)和几丁质合成酶(chitin synthase, CHS)^[5]。几丁质合成的路径,已有研究中最深入广泛之一是CHS,即几丁质合成的最后一步关键酶。

化学药剂型已使高危险性害虫形成了一定耐药性^[6],且对人、作物、环境和食品的安全产生威胁,亟需新的绿色防控手段^[7]。几丁质合成路径的异常会导致昆虫畸形、无法正常蜕皮及死亡率升高。由于在植物和脊椎动物体内不合成几丁质^[8],控制几丁质合成的相关酶,就可以为新型环境友好型长效杀虫剂的设计与研制提出了潜在的优质靶标,进行害虫预防。近些年基于CHS的生物化学抑制剂,以及基于RNA干扰法(RNA interference, RNAi)的有害生物防治新途径的探讨和进展,也成为农业害虫防治方面的学术前沿和热点^[9]。如对苯甲酰基胍类,作为我国最早、最常用的一类害虫甲壳素合成抑制剂,目前已经产生了许多商业化产品^[10]。近年在害虫防治中随着RNA干扰技术的开发与应用^[11],凭借其专一化高、潜伏的靶点性强、对生态稳定等特点,以及运用基因表达的下调方式,在害虫防控应用研究上取得了新突破。目前鳞翅目、鞘翅目、双翅目和

收稿日期:2023-05-18

基金项目:黑龙江省重点研发计划项目(GA23B010);植物保护研究所青年基金项目(zbsqn2023-3)。

第一作者:王晓曦(1992-),女,硕士,研究实习员,从事作物虫害的防治研究。E-mail:2323458775@qq.com。

通信作者:樊东(1969-),男,博士,教授,博导,从事农作物昆虫及有害生物的防控研究。E-mail:dnfd@163.com。

直翅目等昆虫的几丁质合成酶 B 基因 cDNA 序列已经克隆出来,部分进行了时空表达、基因功能、抑制剂筛选及基因干扰等的研究。本文主要综述了对几丁质合成途径中几丁质合成酶 B 的构成、几丁质合成酶 B 基因的空间表达特征、基因功能、基因结构、在害虫防控中的研究进展,并对存在问题和可能的破解路径等做出了比较系统的归纳总结,以期为几丁质合成的控制机理的进一步深入研究奠定基础,同时也为利用 RNAi 技术进行害虫防控研究提出有价值的理论指导。

1 昆虫几丁质合成酶 B

目前昆虫的几丁质合成酶 CHS 包括了几丁质合成酶 A(chitin synthase A, CHSA)和几丁质合成酶 B(chitin synthase B, CHSB)两种,或称为 CHS2(EC 2.4.1.16),功能为结合中肠上皮细胞的围食膜中的甲壳素,并在其中特异性表达^[12]。几丁质决定了昆虫的生长发育,调控 CHSB 基因的表达来防治害虫会有一定成效^[13-14],如抑制 CHSB 的活性会导致昆虫饥饿致死^[15]。

2 昆虫 CHSB 的结构特性

CHSB 为 160~180 kD 分子量的大型跨膜蛋白^[16],昆虫的 CHSB 含 14~17 个跨膜螺旋及 3 个相同结构域 A、B 和 C,结构域 A 在 CHSB 的 N 端,物种之间氨基酸序列相似性最低;结构域 B 在 CHSB 的中段,是高度保守的蛋白质催化中心,物种之间氨基酸序列相似性较高,含 4 个标签序列 CATMWHXT,DXD,EDR 和 QRRRW;结构域 C 在 CHSB 的 C 端,物种之间氨基酸序列差异性较高^[12,17]。目前未有报道 CHSB 有可变剪接^[18]。第一个 CHSB 基因是在 1998 年时由 Thireos 所鉴定的黑腹果蝇基因 *DmCHSB*^[19],现已从多个昆虫物种中克隆出 CHSB 基因,目前已知黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*)^[20]、赤拟谷盗 (*Tribolium castaneum*)^[21]、烟草天蛾 (*Manduca sexta*)^[22]、甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*)^[23]、家蚕 (*Bombyx mori*)^[24]、亚洲玉米螟 (*Ostrinia furnacalis*)^[17]、冈比亚按蚊 (*Anopheles gambiae*)^[25]、东方黑腹果蝇 (*Bactrocera dorsalis*)^[26]、飞蝗 (*Locusta migratoria*)^[27]、稻纵卷叶螟 (*Cnaphalocrocis medinalis*)^[28]、棉铃虫 (*Helicoverpa*

armigera)^[29]、致倦库蚊 (*Culex quinquefasciatus*)^[30]、马铃薯甲虫 (*Leptinotarsa decemlineata*)^[31]、梨小食心虫 (*Grapholitha molesta*)^[32] 和草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*)^[33] 等 50 多种害虫的 CHSB 基因都已经克隆出来,并在 GenBank 上登录。

3 昆虫 CHSB 基因的时空表达特性

对于昆虫 CHSB 不同发育阶段和不同组织的表达模式研究上,整理了已发表文献的相关研究进展(表 1)。昆虫不同发育阶段的研究表明,CHSB 基因在昆虫发育的各个阶段均有表达。可见,CHSB 基因在昆虫各个发育阶段进行调控,但相对表达量存在差异。飞蝗 *LmCHS2* 基因和冈比亚按蚊 *AgCHSB* 基因在受精卵发育的前期和中期基本不能表达^[25,27,34],但在卵发育后期的表现数量却迅速增加。在卵发育时期高表达有何特定的功能尚待深入研究。大部分 CHSB 在昆虫老熟幼虫和成虫中表达量相对较高,有部分在预蛹期表达量较高,如黑腹果蝇 *DmeCHS2* 基因和梨小食心虫 *GmCHS2* 基因^[32,35],在低龄幼虫和蛹期表达量很低,可能与取食特性有关,它们取食水果,不需要过多的消化,所以不必形成大量围食膜。可见 CHSB 基因在昆虫取食量高的时期高表达,以形成更大面积的围食膜。不同类型昆虫在不同阶段表达量的差异,可能和虫体中不同的激素代谢阶段密切相关。不同昆虫的发育历期不一致。

昆虫不同组织的表达模式研究表明,除梨小食心虫 *GmCHS2* 在前肠表达量最高外^[32],其余昆虫在中肠中表达量最高,其次部分昆虫在前肠、后肠和马氏管表达量较高,CHSB 在昆虫取食过程中的肠道表达,参与围食膜的形成。飞蝗 *LmCHS2* 也在胃盲囊中表达,推测可能是因为昆虫分属不同的目,与体内消化结构存在差异有关^[27,34],锈赤扁谷盗 *CfCHS2* 在腹部表达量最高,可能与中肠组织残留腹部有关^[36]。茶尺蠖 *CS2* 在形成围食膜期间表达^[37]。说明 CHSB 是昆虫中肠的特异性蛋白,合成中肠围食膜上的几丁质,CHSB 合成围食膜的 β -几丁质和 γ -几丁质,对昆虫的生长和发育起到关键作用。

表1 昆虫不同发育阶段和不同组织*CHSB* 基因的表达

目	昆虫及其 <i>CHSB</i> 基因	登录号	发育阶段	组织	参考文献
鳞翅目 (Lepidoptera)	甜菜夜蛾	DQ912929	4龄和5龄第1天表达量较高;	在中肠有最高表达	[23][38]
	<i>ScCHSB</i>		4龄和5龄第2天及预蛹期表 达量较低		
	稻纵卷叶螟	AJG44539.1	成虫期的表达量高于幼虫期	4龄在中肠有最高表达,是表皮 表达量的5倍;脂肪体中也有 表达	[28][39]
	<i>CmCHSB</i>				
	梨小食心虫	KY242360	预蛹期和成虫期表达量最高	预蛹第1天在前肠的表达量最 高,其次是后肠,其余组织表达 量很少或不表达	[32]
	<i>GmCHS2</i>				
	家蚕	JQ074175	3~5龄中,3龄的第1天至第3天 表达量最高,蜕皮后表达量下降, 周期性变化	5龄第3天在中肠特异性表达, 头部和表皮有少量表达,丝腺、 脂肪体、睾丸、卵巢和血细胞中 几乎没有表达	[24][40]
	<i>BmCHSB</i>				
	亚洲玉米螟	EU376026	4龄至成虫期中,预蛹期和5龄有 最高表达,4~5龄蜕皮之间基因 表达量降低,5龄第6天停止进食 时表达量骤降		[17]
	<i>OfCHSB</i>				
(部分 <i>CS2</i> 序列)	粘虫	KY348776	1龄最后1天的基因表达量最低,3 龄第1天和蛹期第1天的基因表 达量最高	5龄第2天在中肠特异性表达, 其次为前肠后肠,体壁和脂肪 体几乎没有可检测的表达	[41]
	<i>MsCHSB</i>				
	茶尺蠖	EU290147	3~5龄幼虫取食阶段表达量高, 蛹期不表达	在中肠围食膜中表达	[37]
	草地贪夜蛾	MZ364352		主要在中肠中表达	[33]
	<i>SfCHSB</i>				
	小地老虎	OL826754	6龄幼虫表达量最高	主要在前肠和中肠中表达	[42]
	<i>AiCHS2</i>				
鞘翅目 (Coleoptera)	赤拟谷盗	AY291477	老熟幼虫和成虫阶段表达量高		[13]
	<i>TcCHS2</i>				
	马铃薯甲虫	KT964742		3龄第1天在中肠有最高表达, 其次是马氏管	[31]
	<i>LdCHSB</i>				
	锈赤扁谷盗	MH234580	幼虫阶段1龄的相对表达量最多, 随着龄期的增加表达量逐渐减少, 在蛹期基因的表达量最低,成虫期 表达量最高	成虫在腹部表达量最高,其次 中肠。在头部、胸部、脂肪体中 有少量的表达,表皮几乎没有 表达	[36]
<i>CfCHS2</i>					
玉米根萤叶甲	MH256856	3龄幼虫期和成虫期表达量最高, 其次是卵、1龄幼虫期和2龄幼虫 期,在蛹期的表达量最低	成虫在中肠有最高表达,在前 肠、后肠和组织中表达极低	[43]	
<i>DvvCHS2</i>					
双翅目 (Diptera)	致倦库蚊	AGAP001205	幼虫期表达量低,卵和蛹期表达量 较低但差异小,成虫期表达量最高		[30]
	<i>CqCHS2</i>				
	东方果蝇	KC354694	卵到3龄幼虫表达量上升,成虫期 表达量最高	3龄在中肠有最高表达,其次是 马氏管,脂肪体中表达最低	[44]
	(桔小实蝇) <i>BdCHSB</i>				
	冈比亚按蚊	XP_321951.2	在成虫的表达量最高,在卵、4龄 幼虫和蛹表达量均很低,尤其是幼 虫阶段	在前肠的表达水平最高,显著 高于中肠	[25]
	<i>AgCHSB</i>				
黑腹果蝇	NM_079485	幼虫期表达量较少,预蛹期显著 升高		[35]	
<i>DmeCHS2</i>					
三叶草斑潜蝇	ON453844	蛹期表达量最高	在成虫的头、胸、腹和肠中无显 著差异	[45]	
<i>LiCHS2</i>					
直翅目 (Orthoptera)	飞蝗	GU067731	卵期的2~11d基本无表达,12~ 14d表达量猛增;1~3龄表达量 逐渐增加,3龄最高,之后保持	在中肠和胃盲囊中特异性表达	[27][34]
	<i>LmCHS2</i>				

4 昆虫 *CHSB* 基因功能的研究进展

4.1 进食、饥饿对虫体生长发育和 *CHSB* 基因表达的影响

各种环境因素中,食物对昆虫的繁殖与变态的影响显著。相关研究表明多数农业害虫幼虫期的取食对于生殖具有重要影响^[46]。为了探究进食是否对 *CHSB* 基因表达有影响,进而影响中肠的取食和消化,对试验昆虫进行饥饿处理。有研究选取 5 龄第 2 天飞蝗若虫,饥饿处理 12, 24 和 48 h 之后,再复食 0.5, 1.0 和 4.0 h,解剖中肠观察,结果发现围食膜遭到了严重破坏,说明围食膜的完整性对害虫生长与发育至关重要,而饥饿也可能影响基因在中肠的表达;但由于饥饿持续时间拉长, *LmCHS2* 基因表达量逐步减少,在重新取食后表达量逐渐恢复^[27]。对 4 龄桔小实蝇进行饥饿处理,饥饿组 *BdCHSB* 基因表达量低于先饲喂组,且差别不明显;先饲喂-饥饿后,表达量变化并不明显;而先饥饿-饲喂后,基因的表达量明显增加至 5 倍以上,并对桔小实蝇几丁质含量的影响明显^[44]。同样,对埃及伊蚊成虫饥饿-复食处理,发现饥饿时中肠 *AaCHSB* 基因的表达量降低,恢复吸食血液后基因的表达量升高^[47]。4 龄第 2 天粘虫,喂食-饥饿, *MsCHSB* 基因表达量明显比持续喂食和持续饥饿低;饥饿-喂食,表达量明显比持续喂食和持续饥饿高。饥饿处理后 *MsCHSB* 基因的表达量变化与中肠几丁质含量的变化具有相同的趋势^[41]。研究表明,饥饿处理对 *CHSB* 基因的表达有显著的抑制作用,验证了饥饿对昆虫的取食和中肠的消化与吸收具有一定影响,也进一步验证该基因在中肠大量表达。

4.2 蜕皮激素对 *CHSB* 基因表达的影响

蜕皮激素(20E, hydroxyecdysone) 20E 诱导昆虫蜕皮和变态,保幼激素(Juvenile Hormone, JH)为了维持平衡 20E 带来的形态改变,使幼虫在蜕皮后始终处于雏体状态,它对控制昆虫变态至关重要。昆虫的生长发育,是由 20E 和 JH 共同配合完成的^[48]。昆虫内源保幼激素较多时,就维持它幼虫或若虫的各个发育阶段形态,不会变态成下一个发育阶段的蛹或成虫;昆虫体内 JH 含量较少且 20E 较多时,全变态发育的幼虫才能变态成蛹^[49]。目前 20E 对 *CHSB* 基因表达影响的研究还很少,已有的研究都表明,20E 可以诱导 *CHSB* 基因的表达。对 3 龄幼虫和刚化蛹的果蝇 *CHSB* 基因表达分析中, *CHSB* 基因的转录会响应 20E 的刺激,数小时后表达水平上调,这与形成蛹前表皮的时间相吻合^[20]。有学者向 4 龄蜕皮后 2 h 内的家蚕采用 $1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的 20E 处理 6

h,结果发现 *BmCHSB* 基因表现明显优于对照组,诱导作用更明显;并在短时间控制了 *BmCHSB* 基因的表达,后又得到了恢复^[24,40]。对 4 龄第 2 天的粘虫注入 20E, 20E 蜕皮激素对 *MsCHSB* 基因的表达有明显诱导效果,对注入了 $10 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的 20E 6 h 的诱导效果尤为突出,相比对照,表达量升高了 32.0%^[41]。给 2 龄初和 3 龄第 2 天的马铃薯甲虫幼虫喂食 20E 处理的马铃薯叶片 12 h 后, *LdCHSB* 基因表达水平均显著升高^[50]。说明 20E 影响 *CHSB* 对几丁质的合成,从而影响昆虫生长发育。基因的表现不仅仅是受外源蜕皮激素单一控制,还和内源激素关系密切。外源 20E 在与 JH 协同作用下怎样控制 *CHSB* 基因表达,也值得进一步深入研究。

5 *CHSB* 基因在害虫防治中的研究进展

5.1 几丁质合成酶抑制剂对靶标 *CHSB* 的影响

几丁质合成抑制剂同时还具有植物生长调节剂的功效,对害虫中的几丁质合成关键酶活性影响较大,通过其底物竞争性和 CHS 结合,进而影响几丁质的正常合成,害虫畸形或死亡。有效霉素(Validamycin)又称井冈霉素(Jinganmycin),是一类几丁质合成酶抑制剂,具有杀虫效果^[38]。对 4 龄第 2 天的粘虫幼虫注射有效霉素,幼虫生长发育缓慢, *MsCHSB* 基因的表达量下降 95%。有效霉素处理后粘虫 *MsCHSB* 基因的表达量变化与中肠几丁质含量的变化具有相同的趋势。这也证实了在粘虫的形成与发育过程中, *MsCHSB* 基因的水平与中肠几丁质浓度之间的正相关关系^[41]。定虫隆是一种昆虫生长调节剂,有研究用定虫隆饲喂锈赤扁谷盗,龄期延长、体重下降、几丁质含量下降, *CfCHSB* 基因表达量提高约 27%。与其他研究得到相反的结果,推测 *CHSB* 受到了抑制,锈赤扁谷盗为维持自身稳定发育,提高 *CHSB* 基因的表达,而触发了补偿性反馈机制,由此推测定虫隆可能作用于 *CHSB*^[51]。氟苯脲、除虫脲和虱螨脲是高效的几丁质合成抑制剂,是目前应用广泛的苯甲酰基脲类杀虫剂。4 龄马铃薯甲虫经氟苯脲处理 36 h 后, *LdCHSB* 基因表达下调^[52]。除虫脲处理对 1 龄桔小实蝇幼虫 *BdCHSB* 基因没有显著影响^[44]。虱螨脲处理对草地贪夜蛾 *SfCHSB* 基因的表达无显著变化^[33],而使小地老虎 *AiCHS2* 基因表达显著提高^[42]。

几丁质合成抑制剂对主要天敌和非靶标生物的危害都很小,对昆虫也难以形成耐药性,因此可与低毒量和低残留危害性都很小的长效化学农药混合,以实现增效目的。同时也是几丁质合成抑

制剂防治农作物害虫,在田间大范围使用的基础。随着未来对作用机理的深入研究,几丁质合成抑制剂类杀虫剂将在害虫化学防治中发挥重要作用。

5.2 作为 RNAi 的靶标基因

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 使靶基因沉默的技术特异性且高效,技术简便,目前已被广泛用于农业上主要的害虫绿色防控新技术开发中。现有许多研究利用 RNAi 技术来抑制昆虫 *CHSB* 基因的表达,取得了一定成效。有研究利用注射 dsRNA 的方法干扰赤拟谷盗幼虫 *TcCHSB* 基因的表达,幼虫身体皱缩,围食膜基本不再生成^[13]。RNA 干扰了赤拟谷盗膜上的海藻糖酶基因 (*Tre-2*),干扰中肠 *CHSB*,使中肠甲壳素水平降低了 20% 以上^[53]。沉默飞蝗的 *LmCHS2* 基因,引起飞蝗中肠围食膜残缺不全,中肠和胃盲囊生长减少,主食无法消化和吸收,最后由于饥饿而死去,蛛网膜下腔出血可达到 75% 以上^[27];干扰 3 龄家蚕幼虫 *BmCHSB* 基因的表达致使家蚕大部分难以正常蜕皮^[40]。喂食 2 龄和 4 龄马铃薯甲虫幼虫细菌表达的 ds*CHSB*,幼虫进食量减少、生长缓慢,且中肠几丁质含量降低^[31]。喂食方式干扰 3 龄甜菜夜蛾 4 h 后,发现对试验组幼虫阶段基本无影响,使预蛹和成虫发育受阻,20% 和 25% 无法化蛹和羽化^[38]。注射方式干扰稻纵卷叶螟幼虫 *CmCHS2* 的表达,4~5 d 后表达量下降 37%~50%,取食量减少,试验组部分幼虫蜕皮受阻,虫体显著变轻变小变黑,死亡率约 41%^[54-56]。玉米根茎叶甲成虫取食 ds*CHS2*,干扰对 *DvvCHS2* 基因最高沉默效率达 90%,取食 1 d 后,成虫 *DvvCHS2* 基因表达量显著降低^[43]。沉默锈赤扁谷盗 *CfCHS2* 基因,会使幼虫蜷缩干瘪,无法正常爬行,导致死亡,7 d 后,死亡率达 63% 且围食膜缺失,肠道上皮细胞严重破损。与上述实验结果不同,说明 *CHS2* 在锈赤扁谷盗的中肠围食膜的生成途径中起到关键性的作用。持续干扰发现 *CfCHS2* 基因有过表达现象,基因表达量先下降后上升再下降,这说明在 *CfCHS2* 基因被 dsRNA 沉默后,昆虫为了维持机体的稳定,使 *CfCHS2* 基因的表达量升高,而形成的一种补偿反馈机制^[36]。对 4 龄粘虫幼虫注射 ds*MsCHSB*,*MsCHSB* 基因的表达量下降,表明 RNA 干扰成功抑制了 *MsCHSB* 基因的表达。处理 24 和 48 h 后,该基因的表达水平分别下降了 82.1% 和 86.0%,处理 96 h 后粘虫的死亡率最高,达 46.7%。基因沉默影响了粘虫中肠几丁质的合成,可能破坏了中肠围食膜的通透性,进而影响进食导致虫体生长发育缓慢,无法正常蜕皮,产生异形,甚至死亡^[41]。对小地老虎注射 ds*AiCHS2*

干扰,化蛹率降低 30% 以上^[42]。干扰三叶草斑潜蝇 *LtCHS2* 在蛹中的表达,羽化率显著低于对照。综上所述,*CHSB* 在昆虫中肠围食膜的形成过程中发挥重要作用,影响昆虫生长发育^[45]。干扰 *CHSB* 基因的表达,会导致昆虫中肠围食膜受到破坏、降低中肠围食膜几丁质含量、进食量减少、身体皱缩变轻、生长缓慢、无法正常蜕皮化蛹和羽化、变黑、死亡率升高。

6 展望

RNAi 方法中因对 *CHSB* 靶基因沉默方式的高度特异性和高效的优点,以及研究过程的简便性,目前已被广泛用于重大农业有害生物的防控研发技术中。*CHSB* 是重大农业有害生物形成与传播中的非常重要的基因,是潜在的杀虫有效靶标基因,也是将 RNAi 方法应用于重大农业有害生物防治中的关键。如昆虫 *CHSB* 是重大农业有害生物几丁质形成过程中的关键基因之一,但因为高等动、植物自身还没有形成这些蛋白质,所以被认为是比较好的对环境友好的杀虫剂靶标。体外喷洒 dsRNA (核酸杀虫剂) 对开展农作物害虫防治工作中有以下优点:第一,dsRNA 可高效专一地防治目标害虫,对天敌昆虫、作物和人畜健康没有影响;第二,dsRNA 可有效减少害虫;第三,可明显降低化学农药的施用量,从而有效保护了食品生产安全;第四,因为 dsRNA 属于核酸化合物,对人类健康没有什么影响,是一种对人类真正友好的生物杀虫剂,它对降低农药残留和环境污染都具有重要的意义。

目前,应用于 dsRNA 的 *CHSB* 基因作为靶标防控危险害虫的瓶颈在于:第一,实验室中通常制备 dsRNA 是通过测定试剂盒中微量制备的,如果作为核酸外施或喷洒药物,就必须将大量的 dsRNA 使用在田间。其二,dsRNA 合成成本过高。为此,利用害虫体内的高效靶标 *CHSB* 基因的 RNAi,如何工厂化批量合成 dsRNA,且降低成本,还有待未来研究解决。

农业害虫对药剂抗性也与靶标 *CHS* 基因有关。比如,经虱螨脲诱导处理后,*SfCHSA* 基因的表达量显著提高,表明 *SfCHSA* 基因在草地贪夜蛾对虱螨脲的抗性中发挥的作用大于 *SfCHSB* 基因^[33]。了解害虫对杀虫剂的抗药性水平、杀虫剂对害虫的主要作用机制以及害虫对杀虫剂的抗性机制,将有助于保护作物,延长该杀虫剂的使用寿命。另外,在与生物纳米材料偶联包被、脂质体修复技术、与 BT 类杀虫药的结合,以及多靶标联用技术等方面迫切需要系统深入地开展研究^[18]。并使 RNAi 技术在防治有害生物领域广泛获得应用。相信随着对甲壳素合成途径

的挖掘与研究,以及该途径的相关酶基因对几丁质生成的控制效果的深入研究,基于靶标基因的 RNAi 研究将有助于今后害虫的绿色防治研究,为农业害虫的有效防控提供理论依据。为以几丁质生成途径的酶基因为主要工作靶点的绿色杀虫剂研究,及发现更有效的几丁质合成酶抑制剂等绿色杀虫剂,奠定了必要的科学基础。

参考文献:

- [1] LYONET P. Traite anatomique dela chenille[M]. La Haye: Grosse Pinet,1762;25-36.
- [2] BALBIANI E G. Etudes anatomiqueset histologiques surle tube digestif des Cryptops [J]. Archives de Zoologie Experimentale et Generale,1890(8);1-82.
- [3] TABASHNIK B E,ZHANG M,FABRICK J A,et al. Dual mode of action of Bt proteins: protoxin efficacy against resistant insects[J]. Scientific Reports,2015,5(1):15107.
- [4] KUUSK S,SÖRLIE M,VÄLJAMÄE P. The predominant molecular state of bound enzyme determines the strength and type of product inhibition in the hydrolysis of recalcitrant polysaccharides by processive enzymes[J]. Journal of Biological Chemistry,2015,290(18):11678-11691.
- [5] MERZENDORFER H,ZIMOCH L. Chitin metabolism in insects; structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases[J]. Journal of Experimental Biology,2003,206(24):4393-4412.
- [6] 朱江,邱星辉. 昆虫抗药性相关细胞色素 *P450* 基因的表达调控机制[J]. 昆虫学报,2021,64(1):109-120.
- [7] 谢丹洁,刘云朋,汪海鹏,等. 美国白蛾核型多角体病毒与四种常用化学杀虫剂的复配增效作用研究[J]. 应用昆虫学报,2023,60(1):49-57.
- [8] YU H Z,LI N Y,XIE Y X,et al. Identification and functional analysis of two chitin synthase genes in the common cutworm,*Spodoptera litura*[J]. Insects,2020,11(4):253.
- [9] 汪芳,党聪,金虹霞,等. RNA 干扰技术在害虫防治中的应用及其安全性[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版),2022,48(6):683-691.
- [10] 杨霞. 几丁质合成酶抑制剂的研究进展[J]. 福建农业,2015(2):90.
- [11] 陈静,张道伟,钱正敏. 白背飞虱几丁质合成酶 1 基因的结构及特性研究[J]. 生物技术通报,2018,34(1):195-201.
- [12] MERZENDORFER H. Insect chitin synthases: a review[J]. Journal of Comparative Physiology B,2006,176(1):1-5.
- [13] ARAKANE Y,MUTHUKRISHNAN S,KRAMER K J,et al. The *Tribolium* chitin synthase genes *TcCHS1* and *TcCHS2* are specialized for synthesis of epidermal cuticle and midgut peritrophic matrix[J]. Insect Molecular Biology,2005,14(5):453-463.
- [14] TIAN H G,PENG H,YAO Q,et al. Developmental control of a lepidopteranpest *Spodoptera exigua* by ingestion of bacteria a expressing dsRNA of a non-midgut gene[J]. PLoS One,2009,4(7):e6225.
- [15] CHAUDHARI S S,NOH M Y,MOUSSIAN B,et al. Knickkopf and retroactive proteins are required for formation of laminar serosal procuticle during embryonic development of *Tribolium castaneum*[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology,2015,60(3):1-6.
- [16] TRUMAN J W,RIDDIFORD L M. Insect developmental hormones and their mechanism of action[J]. Hormones Brain and Behavior,2002(2):841-873.
- [17] QU M B,LIU T,YANG J,et al. The gene,expression pattern and subcellular localization of chitin synthase B from the insect *Ostrinia furnacalis*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications,2011,404(1):302-307.
- [18] 许静静,李思琪,任梦圆,等. 昆虫几丁质合成关键酶功能及其 RNAi 技术在害虫防治中的研究进展[J]. 陕西农业科学,2022,68(8):10.
- [19] THIREOS G,KAFETZOPOULOS D. DNA encoding an arthropod chitin synthase[J]. Patent,2000,WO9853053-A.
- [20] GAGOU M E,KAPSETAKI M,TURBERG A,et al. Stage-specific expression of the chitin synthase *DmeChSA* and *DmeChSB* genes during the onset of *Drosophila metamorphosis*[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology,2002,32(2):141-146.
- [21] ARAKANE Y,HOGENKAMP D G,ZHU Y C,et al. Characterization of two chitin synthase genes of the red flour beetle, *Tribolium castaneum* and alternate exon usage in one of the genes during development[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology,2004,34(3):291-304.
- [22] HOGENKAMP D G,ARAKANE Y,ZIMOCH L,et al. Chitin synthase genes in *Manduca sexta*: characterization of a gut-specific transcript and differential tissue expression of alternately spliced mRNAs during development[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology,2005,35(6):529-540.
- [23] KUMAR N S,TANG B,CHEN X F,et al. Molecular cloning, expression pattern and comparative analysis of chitin synthase gene B in *Spodoptera exigua*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B,2008,149(3):447-453.
- [24] 孔令斐. 家蚕几丁质酶与几丁质合成酶的基因表达与功能研究[D]. 苏州:苏州大学,2010.
- [25] ZHANG X,ZHANG J,PARK Y,et al. Identification and characterization of two chitin synthase genes in *African malaria* mosquito, *Anopheles gambiae*[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology,2012,42(9):674-682.
- [26] LI C,YANG W J,LIN C,et al. Molecular cloning, characterization and mRNA expression of a chitin synthase 2 gene from the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) [J]. International Journal of Molecular Sciences,2013,14(8):17055-17072.
- [27] 刘晓健,崔森,李大琪,等. 飞蝗几丁质合成酶 2 基因的表达特性、功能及调控[J]. 中国农业科学,2014,47(7):1330-1340.
- [28] 余海中,黄克慧,汪婉玲,等. 稻纵卷叶螟几丁质合成酶及合成通路相关酶基因的鉴定及表达分析[J]. 应用昆虫学报,2015,52(5):1181-1194.
- [29] 韩国英. 棉铃虫 *HaCHS* 和 *CDA* 基因的克隆、表达及 Feeding RNAi 分析[D]. 保定:河北大学,2015.
- [30] 赵文静,张春林,翟素珍,等. 致倦库蚊几丁质合成酶基因 *CqCHS1* 和 *CqCHS2* 的表达与分析[J]. 基因组学与应用生物学,2016,35(9):2317-2323.
- [31] SHI J F,MU L L,CHEN X,et al. RNA interference of chitin synthase genes inhibits chitin biosynthesis and affects larval performance in *Leptinotarsa decemlineata* (Say)[J]. International Journal of Biological Sciences,2016,12(11):1319-1331.

- [32] 杨静,庾琴,高越,等. 梨小食心虫几丁质合成酶 2 基因的克隆与表达研究[J]. 应用昆虫学报, 2017, 54(3): 407-416.
- [33] SHENG L L, ZHENG Y X, MING J L, et al. Detection of chitin synthase mutations in lufenuron-resistant *Spodoptera frugiperda* in China[J]. Insects, 2022, 13(10): 963.
- [34] 刘晓健. 东亚飞蝗几丁质合成酶基因的分子特性及功能研究[D]. 太原: 山西大学, 2010.
- [35] ISHII S, MATSUMURA F. Diflubenzuron-induced changes in activities of the cAMP-dependent protein kinase in the newly molted integument of the American cockroach in situ and in cell free conditions[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 1992, 22(1): 69-79.
- [36] 杜梦园. 锈赤扁谷盗几丁质合成酶 2 基因的克隆与功能研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2019.
- [37] 林晨. 茶尺蠖几丁质合成酶基因克隆及其双链干涉重组病毒毒力研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2010.
- [38] KIM H S, NOH S, PARK Y. Enhancement of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac and Cry1Ca toxicity against *Spodoptera exigua* (Hübner) by suppression of a chitin synthase B gene in midgut[J]. Journal of Asia-Pacific Entomology, 2017, 20(1): 199-205.
- [39] 黄克慧. 稻纵卷叶螟几丁质合成通路相关酶基因的鉴定及表达分析[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2015.
- [40] ZHUO W W, CHU F, KONG L F, et al. Chitin synthase B: a midgut-specific gene induced by insect hormones and involved in food intake in *Bombyx mori* larvae [J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 2013, 85(1): 36-47.
- [41] 王晓曦, 赵桂莹, 杨航, 等. 蜕皮激素和有效霉素对粘虫几丁质合成酶 B 基因表达的影响[J]. 应用昆虫学报, 2019, 56(5): 1026-1036.
- [42] REN M R, LU J J, LI D Q, et al. Identification and functional characterization of two chitin synthases in the Black Cutworm, *Agrotis ipsilon* (Hufnagel) (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. Journal of Economic Entomology, 2023, 116(2): 574-583.
- [43] 王思一. 玉米根萤叶甲围食膜相关基因的分子特性及功能分析[D]. 北京: 中国农业大学, 2018.
- [44] 陈力. 桔小实蝇几丁质合成通路上 3 个基因的 cDNA 克隆及功能分析[D]. 重庆: 西南大学, 2013.
- [45] CHANG Y W, WANG Y C, YAN Y Q, et al. RNA interference of chitin synthase 2 gene in *Liriomyza trifolii* through immersion in Double-Stranded RNA[J]. Insects 2022, 13: 832.
- [46] 熊佳新, 嵇保中, 刘曙雯, 等. 五羟色胺对昆虫取食、生殖和非遗传多型的调控[J]. 生命科学, 2019, 31(1): 9-17.
- [47] IBRAHIM G H, SMARTT C T, KILEY L M, et al. Cloning and characterization of a chitin synthase cDNA from the mosquito *Aedes aegypti* [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2000, 30(12): 1213-1222.
- [48] 柳鹏飞, 王伟伟, 凌晓霏, 等. 保幼激素和蜕皮激素调控昆虫变态发育机制的进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2021, 40(5): 2054-2062.
- [49] JINDRA M, PALLI S R, RIDDIFORD L M. The juvenile hormone signaling pathway in insect development [J]. Annual Review of Entomology, 2013, 58(1): 181-204.
- [50] 史继峰. 马铃薯甲虫 (*Leptinotarsa decemlineata*) 海藻糖代谢和几丁质合成相关基因的克隆与功能分析[D]. 南京: 南京农业大学, 2016.
- [51] 鲁玉杰, 杜梦园, 张蒙, 等. 定虫隆对锈赤扁谷盗生长发育影响及其作用机理初探[J]. 环境昆虫学报, 2020, 42(1): 205-211.
- [52] 王静静. 氟苯脲对马铃薯甲虫 (*Leptinotarsa decemlineata*) 幼虫表型和几丁质含量的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2017.
- [53] CHEN J, TANG B, CHEN H X, et al. Different functions of the insect soluble and membrane-bound trehalase genes in chitin biosynthesis revealed by RNA interference [J]. PLoS One, 2010, 5(4): e10133.
- [54] 夏浪. 利用 RNA 干扰技术沉默稻纵卷叶螟几丁质合成酶 B 基因[D]. 贵阳: 贵州大学, 2018.
- [55] 赵凤. 利用 RNAi 技术沉默稻纵卷叶螟 *CmTre* 和 *CmCHS* 基因[D]. 贵阳: 贵州大学, 2019.
- [56] 张泽杰. 利用 RNAi 技术沉默稻纵卷叶螟几丁质合成酶基因[D]. 贵阳: 贵州大学, 2020.

Research Progress of Insect Chitin Synthase B Gene

WANG Xiaoxi¹, LIU Xinglong¹, WANG Yu¹, WANG Keqin¹, FAN Dong²

(1. Plant Protection Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences/Harbin Crop Pest Science Observation and Experimental Station of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Harbin 150086, China; 2. College of plant protection, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Chitin is the main component of insects, and its synthesis plays an important role in insect growth and metamorphosis. Because chitin does not exist in plants and invertebrates, it is considered to be a design target for environmentally friendly pesticides. Chitin synthase B is the last key enzyme in the chitin synthesis pathway, which has become a hot topic in recent years. Based on the author's own, domestic and foreign research on the function of insect chitin synthase B gene, this paper reviewed the research progress of chitin synthase B in the regulation of chitin synthesis including temporal and spatial expression characteristics, gene function, gene research progress in pest control, and the problems and solutions of RNA interference technology application.

Keywords: insects; chitin; chitin synthase B; environmentally friendly pesticides