南京农业大学学报 2026,49(4):791-800
Journal of Nanjing Agricultural University
http://nauxb.njau.edu.cn
DOI:10.7685/jnau.202512026

张龙,郝妍泽,刘程宏,等. 棉酚胁迫下棉铃虫 *HarmCYP6AE* 家族的表达响应及 *HarmCYP6AE19* 的功能解析[J]. 南京农业大学学报,2026,49(4):791-800.
Zhang L,Hao Y Z,Liu C H,et al. Expression response of *HarmCYP6AE* family in *Helicoverpa armigera* under gossypol stress and functional analysis of *HarmCYP6AE19*[J]. Journal of Nanjing Agricultural University,2026,49(4):791-800.

棉酚胁迫下棉铃虫 *HarmCYP6AE* 家族的表达响应及 *HarmCYP6AE19* 的功能解析

张龙[1,2],郝妍泽[1],刘程宏[1],刘定蕊[1],黄宗政[1],刘丽[1],刘志兄[1],马小丽[1*]

(1.新疆大学生命科学与技术学院新疆生物资源基因工程重点实验室,新疆 乌鲁木齐 830046;
2.西南大学资源昆虫高效养殖与利用全国重点实验室,重庆 400715)

摘要:[**目的**]本研究旨在明确棉酚对棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)幼虫生长发育的影响,鉴定 *HarmCYP6AE* 家族基因对棉酚的解毒功能,为阐明昆虫与寄主植物协同进化机制及开发新型害虫防控策略提供理论依据。[**方法**]采用生物测定分析不同浓度棉酚对棉铃虫发育历期、死亡率及体重的影响;通过 RT-qPCR 检测 *HarmCYP6AE* 家族基因表达模式;利用碳量子点(CQD)介导的 RNA 干扰(RNAi)技术沉默 *HarmCYP6AE19*,评估其对幼虫生长发育的作用。[**结果**]棉酚对棉铃虫生长发育呈浓度依赖性影响:低浓度(≤0.007 5%)显著延长发育历期,降低存活率及体重($P<0.05$);高浓度(≥0.300 0%)缩短发育历期,增加 5 龄幼虫体重($P<0.05$)。*HarmCYP6AE* 家族 10 个成员含保守基序及 SRS 位点,序列相似性 48.94%~91.97%,聚类为 4 个分支。该家族基因表达受棉酚浓度特异性影响,其中,*HarmCYP6AE17* 和 *HarmCYP6AE19* 受高浓度棉酚诱导显著上调表达,*HarmCYP6AE20* 受低浓度棉酚诱导显著上调表达,*HarmCYP6AE24* 只在高浓度棉酚处理下特异性高表达($P<0.05$)。RNAi 沉默幼虫中肠组织中 *HarmCYP6AE19* 的表达($P<0.05$),造成取食棉酚后幼虫化蛹率降低 20.76%~40.51%,蛹重增加 3.57%~33.70%($P<0.05$)。[**结论**]棉酚以浓度依赖性影响棉铃虫生长发育,*HarmCYP6AE* 家族基因对棉酚表现出差异化的表达响应,其中 *HarmCYP6AE19* 在高浓度棉酚胁迫下显著上调,沉默该基因导致棉铃虫化蛹率显著下降,暗示其可能在棉铃虫响应棉酚胁迫中发挥重要作用。

关键词:植物次生代谢物质;棉酚;棉铃虫;*CYP6AE*;RNA 干扰
中图分类号:S433.4 **文献标志码**:A **文章编号**:1000-2030(2026)04-0791-10

Expression response of *HarmCYP6AE* family in *Helicoverpa armigera* under gossypol stress and functional analysis of *HarmCYP6AE19*

ZHANG Long[1,2],HAO Yanze[1],LIU Chenghong[1],LIU Dingrui[1],
HUANG Zongzheng[1],LIU Li[1],LIU Zhixiong[1],MA Xiaoli[1*]

(1.Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering,College of Life Science and Technology,Xinjiang University,Urumqi 830046,China;2.State Key Laboratory of Resource Insects,Southwest University,Chongqing 400715,China)

Abstract:[**Objectives**]This study aimed to clarify the effects of gossypol on the growth and development of *Helicoverpa armigera* larvae,unravel the gossypol detoxification function of the midgut *HarmCYP6AE* gene family,and provide a theoretical basis for elucidating the co-evolutionary mechanisms between insects and host plants,as well as for developing novel pest management strategies. [**Methods**]Bioassays were performed to assess the effects of different gossypol concentrations on the developmental duration,mortality rate,and body weight of *H. armigera*. RT-qPCR was employed to determine the expression patterns of the *HarmCYP6AE* family. Carbon quantum dot(CQD)-mediated RNAi was utilized to silence *HarmCYP6AE19*,and its impacts on larval growth and pupation were evaluated. [**Results**]Gossypol exerted a concentration-dependent effect on the growth and development of *H. armigera*:low concentrations(≤0.007 5%)significantly prolonged the developmental duration and reduced the survival rate and body weight($P<0.05$),while high concentrations(≥0.300 0%)shortened the developmental duration and increased the body weight of 5th instar larvae($P<0.05$). The 10 members of the *HarmCYP6AE* family contained conserved motifs and substrate recognition sites(SRS),with amino acid sequence identity ranging from 48.94% to 91.97%,and were clustered into 4 phylogenetic clades.

收稿日期:2025-12-29
基金项目:新疆维吾尔自治区科技计划项目-重点研发专项(2024B02005);新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2024D01C26)
作者简介:张龙,博士研究生。* 通信作者:马小丽,副教授,主要从事棉铃虫农药抗性分子机制和绿色植物源农药开发研究,E-mail:xlm87@xju.edu.cn。

Genes of this family exhibited concentration-specific expression profiles: *HarmCYP6AE17* and *HarmCYP6AE19* were up-regulated under high gossypol concentrations, *HarmCYP6AE20* was up-regulated under low concentrations, and *HarmCYP6AE24* showed specific high expression under high concentrations ($P<0.05$). After silencing *HarmCYP6AE19*, the expression level of this gene in the larval midgut was significantly downregulated ($P<0.05$), the pupation rate was reduced by 20.76%-40.51%, and the pupal weight increased by 3.57%-33.70% ($P<0.05$). [**Conclusions**] Gossypol regulates the growth and development of *H. armigera* in a concentration-dependent manner. Members of the *HarmCYP6AE* family exhibit differential expression responses to gossypol. Specifically, *HarmCYP6AE19* was significantly up-regulated under high gossypol concentrations, and its silencing led to a marked decrease in pupation rate, suggesting its crucial role in the *H. armigera*'s response to gossypol stress, though whether it directly participates in gossypol detoxification remains to be elucidated.

Keywords: plant secondary metabolites; gossypol; *Helicoverpa armigera*; *CYP6AE*; RNA interference

针对植食性昆虫的侵害,植物在长期进化过程中形成了组成型防御机制和诱导型防御机制[1-3]。其中,诱导型防御是通过诱导植物产生酚类化合物[4]、萜烯类和萜类化合物[5]以及生物碱[6]等次生代谢产物而赋予植物自我保护能力。棉酚(gossypol)是棉花等农作物合成的关键次生代谢产物,其分子结构含6个酚羟基与2个高活性醛基,可通过席夫碱形成、臭氧分解、氧化及甲基化等反应衍生出棉酚席夫碱、棉酚酮、棉酚等多种衍生物[7]。棉酚及其衍生物中的醛基作为核心活性位点,可与蛋白质氨基酸形成席夫碱并发生交联,进而抑制酶活性并产生毒性,这也是其发挥杀虫、抗菌、抗病毒、抗生育、抗寄生虫、抗炎、抗氧化及抗癌等作用的关键机制[4,7-8]。

植食性昆虫也进化出棉酚解毒代谢机制。昆虫代谢棉酚一般分为3个阶段:1)增加毒素分子亲水性和反应活性;2)内源性分子与毒素结合;3)增强毒素跨膜转运能力[9-10]。昆虫细胞色素P450单加氧酶(cytochrome P450 monooxygenases, CYP)和UDP-糖基转移酶(UDP-glycosyltransferases, UGT)在解毒代谢第一阶段发挥重要作用[11-12]。CYP超家族是自然界中规模最大的家族之一,广泛分布于各类生物体内,核心功能是催化内源性与外源性底物的多种氧化转化反应,其成员的功能多样性显著,可参与初级代谢与次级代谢中的众多生化过程及信号通路。基于对CYP酶个体功能特征、分类学分布规律及昆虫生态位适应机制的长期研究,学界提出:在植食性昆虫与寄主植物的长期协同进化中,CYP亚群经历了适应性进化与基因扩张[13-15]。

棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)属鳞翅目夜蛾科,为多食性害虫,棉花是其最适寄主。棉铃虫对棉酚的解毒代谢机制可为其他多食性害虫对植物次生物质的专一性解毒机制提供模型参考。棉酚可经由棉铃虫体内的UGT41B3和UGT40D1介导的糖基化途径进行部分代谢[12]。棉铃虫羧酸酯酶(CarE)基因*CCE001a*于毕赤酵母(*Pichia pastoris*)中表达后,展现出对游离棉酚的有效降解能力[16]。RNAi介导的*CYP6DA2*基因敲除显著增强棉酚对棉蚜(*Aphis gossypii*)的毒性[17]。此外,棉酚与2-十三烷酮可显著诱导棉蚜*CYP305A1*的转录水平及其启动子活性,该基因被沉默后,毒液蛋白酶基因的表达亦随之下降[18]。已有研究发现,棉铃虫通过提高体内CYP酶的表达应对寄主植物棉酚的毒害作用,其中*HarmCYP6AE*亚家族成员发挥重要作用[19-20]。在棉铃虫中,除HarmCYP6AE20外,所有HarmCYP6AE家族成员均能有效代谢顺式氰戊菊酯[21-22],该亚家族中有7个CYP可以代谢吡虫啉,重组HarmCYP6AE酶都不能代谢棉酚[21],HarmCYP6AE19可以代谢黄毒素和2-十三烷酮,后者也可以由HarmCYP6AE11和HarmCYP6AE14代谢[10,23]。另外,HarmCYP6AE11对棉铃虫耐受溴氰菊酯有贡献,在田间灰飞虱溴氰菊酯抗性品系中也发现*CYP*显著高表达[20,24]。尽管HarmCYP6AE14不直接参与棉酚的代谢,但其可能在棉铃虫幼虫应对植物毒素的普遍应激反应中发挥调节功能[7]。

本研究采用不同浓度棉酚对棉铃虫幼虫进行生物测定,系统分析棉酚对幼虫生长发育的影响,同时筛选出受棉酚诱导上调表达的*HarmCYP6AE*家族基因;采用CQD介导的dsRNA递送系统,通过饲喂方式特异性沉默中肠中棉酚高响应的*HarmCYP6AE19*基因,系统评估该基因沉默对棉铃虫生长发育及棉酚耐受性的调控作用,为明确*HarmCYP6AE*家族基因在棉铃虫棉酚解毒代谢中的功能提供直接证据,也为深入解析棉铃虫对寄主植物防御物质的适应机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试虫

供试棉铃虫种群源自新疆大学生物资源基因工程重点实验室。室内人工饲养条件:温度(26±2)℃,

相对湿度(60±10)%,光/暗培养时间 14 h/10 h。人工饲料参照 Sun 等[25]的方法配制,确保试虫生长状态一致。

1.2　生物信息学分析

从 NCBI 数据库(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)及 Pearce 等[26]的研究中获取棉铃虫 *HarmCYP6AE* 家族基因及蛋白序列,SRS 结构域信息参考 Shi 等[21]的研究结果。从 NCBI 下载 15 种鳞翅目昆虫,包括棉铃虫(*H. armigera*)、海灰翅夜蛾(*Spodoptera littoralis*)、斜纹夜蛾(*S. litura*)、烟草粉螟(*Ephestia elutella*)、甜菜夜蛾(*S. exigua*)、草地贪夜蛾(*S. frugiperda*)、东方黏虫(*Mythimna separata*)、舞毒蛾(*Lymantria dispar*)、冬尺蛾(*Operophtera brumata*)、家蚕(*Bombyx mori*)、野蚕(*Bombyx mandarina*)、黄野螟(*Heortia vitessoides*)、烟草天蛾(*Manduca sexta*)、亚洲玉米螟(*Ostrinia furnacalis*)和稻纵卷叶螟(*Cnaphalocrocis medinalis*)的 CYP6AE 家族基因氨基酸序列,使用 MEGA 7.0 软件进行序列比对与系统发育树构建:采用 ClustalW 进行序列比对,默认参数设置,手动剔除未对齐序列;进化树构建采用邻接法(neighbor-joining),步长法(bootstrap)设置为 1 000 次重复检验建树可靠性,"Partial deletion"参数设为 50%,其他参数默认;最终通过 iTOL 在线工具(https://itol.embl.de/login.cgi)进行进化树美化。

1.3　棉酚处理、总 RNA 提取和 cDNA 合成

选取生长一致的棉铃虫 2 龄初幼虫,分为 8 组,饲喂棉酚质量含量分别为 0、0.001 5%、0.007 5%、0.015 0%、0.075 0%、0.150 0%、0.300 0%、0.750 0%的人工饲料,每组 100 头。持续饲养至 5 龄期,记录各龄期发育历期、幼虫死亡率及 5 龄幼虫体重(蜕皮后 24~48 h)并解剖 5 龄幼虫获取中肠组织,采用 TransZol Up Plus RNA Kit(北京全式金生物)按照说明书步骤提取总 RNA,通过 10 g·L^{-1}琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop ND-1000 紫外分光光度计验证 RNA 纯度与完整性。使用 TransScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis Super Mix(北京全式金生物)进行 cDNA 合成。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.4　*HarmCYP6AE* 家族基因表达量测定

按照 TransStart® Green qPCR SuperMix(北京全式金生物)说明书步骤进行实时荧光定量 PCR(RT-qPCR),测定 *HarmCYP6AE* 家族基因表达量。以棉铃虫 *RPL13* 基因(GenBank 登录号:JQ744275.1)作为内参基因,引物对序列见表 1。RT-qPCR 反应程序:95 ℃ 10 min;95 ℃ 30 s,62 ℃ 30 s,40 个循环。每个处理设 3 次生物学重复和 2 次技术重复,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算基因相对转录水平。

表 1　本试验所用引物

Table 1　Primers used in this experiment

引物名称 Primer name	引物序列对 Primer pairs sequence(5′→3′)	目的 Purpose
RPS13 qPCR-F/R	CTGCAAGACGTCACCGCAG/CCACGACCAGCACGAACCT	RT-qPCR
CYP6AE11 qPCR-F/R	GTCAGTAAGAGTCTCACATTG/TATCACGCATAGCAGTCAT	
CYP6AE12 qPCR-F/R	CGTCCAAGATCCTGAACTC/TCCACCTGTCTCCGTAAG	
CYP6AE14 qPCR-F/R	CAGCAGTAGGTAACAGCAT/CTGGTGGAAGAGTTCTGAAT	
CYP6AE15 qPCR-F/R	GAATCAGCGGCGAAAGTGAC/TTGCTAGCACTGGGTACAGC	
CYP6AE16 qPCR-F/R	GCTTACTACGCCACAGAA/CGCTACTTCACGGTTACT	
CYP6AE17 qPCR-F/R	CTGCGTATATTCTTGCCATT/GGTCTGATGTTATGCTTGTT	
CYP6AE19 qPCR-F/R	AGACTGGTGAGAGCAAGA/GTGATGAATGTGGTAGATAGG	
CYP6AE20 qPCR-F/R	CGCTTTTGGGCAATTACGCT/CCATCGGTCTCCTGCATTGA	
CYP6AE24 qPCR-F/R	CTTCCACAACCTGATTACTTC/AGCACTGAGCAACTAACAA	
ds*CYP6AE19*-F	TAATACGACTCACTATAGGGTTTGCTGCGGGTTATGAA	dsRNA
ds*CYP6AE19*-R	TAATACGACTCACTATAGGGCTGCGTGAGGAATGTTCT	
ds*EGFP*-F	TAATACGACTCACTATAGGGAAGTTCAGCGTGTCCGGC	
ds*EGFP*-F-R	TAATACGACTCACTATAGGGCACCTTGATGCCGTTCTTC	

注:下划线为 T7 启动子序列。The underlined segment represent the T7 promoter sequence.

1.5　dsRNA 的合成

根据 MEGAscript® Kit(赛默飞世尔科技,美国)说明书合成 dsRNA,用于 RNAi 试验。针对 *HarmCYP6AE19* 靶基因设计含 T7 启动子的特异性引物(表 1)。PCR 扩增条件:95 ℃ 5 min;95 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,35 个循环;72 ℃ 10 min。dsRNA 合成体系在 37 ℃反应 4 h,随后加入 RNase-free DNase I,37 ℃孵育 15 min 灭活模板 DNA。以 *EGFP* 基因(GenBank 登录号:DQ389577.1)的 dsRNA 作为阴性对照(含 T7 启动子的特异性引物,见表 1),通过 NanoDrop ND-1000 定量 dsRNA 浓度。参照 Das 等[27]的微波法合成 CQD,按质量比 20∶1 将 CQD 与 dsRNA 混合,在硫酸钠溶液中 4 ℃过夜孵育,形成 CQD-dsRNA 复合物,用

于后续饲喂试验。

1.6 生物测定试验

选取饥饿 4 h 的棉铃虫 2 龄初期幼虫,单头置于含 3 mL 人工饲料的一次性饲料杯中饲养。试验设置 2 组棉酚浓度(0.300 0%和 0.750 0%),每个饲料杯中均匀加入 200 μL 含 5 μg ds*CYP6AE19* 的复合物溶液,晾干后备用;对照组加入等量 ds*EGFP*。每个处理组设置 3 次生物学重复,每次重复含 15 头试虫。饲养 24 h 后补加 5 μg dsRNA,5 龄初期幼虫更换新鲜饲料,维持正常饲养环境。分别在 3 龄和 5 龄初期解剖幼虫获取中肠组织,提取总 RNA 并反转录获得 cDNA,通过 RT-qPCR 验证 *HarmCYP6AE19* 沉默效率;记录试虫化蛹率、蛹重等生长发育指标。

1.7 数据分析

所有数据采用 IBM SPSS Statistics 26 软件进行统计分析,通过 GraphPad Prism 8.0 绘制图表。首先进行正态性检验和方差齐性检验,两组间差异显著性采用独立样本 *t* 检验分析,多组间差异采用单因素方差分析(one-way ANOVA)结合 Tukey's HSD 多重比较检验,显著性水平设为 0.05。

2 结果与分析

2.1 *HarmCYP6AE* 家族基因鉴定与生物信息学分析

棉铃虫 *HarmCYP6AE* 基因家族包含 10 个成员[23],序列分析显示,除 *HarmCYP6AE11* 和 *HarmCYP6AE17* 外,其他 8 个成员均含有 2 个外显子,翻译产物的氨基酸长度为 517~549 aa(表 2)。氨基酸序列比对结果(表 3)显示,10 个成员间的序列相似性为 48.94%~91.97%,其中 HarmCYP6AE17 与 HarmCYP6AE18 的相似性最高(91.97%)。保守结构域分析表明,所有 *HarmCYP6AE* 成员均包含 P450 家族特征基序(WxxR、ExxRxxP、PxRF、Heme binding motif)及 6 个底物识别位点(SRS1—SRS6),各 SRS 域由 5~24 个氨基酸组成(图 1-a);除 SRS2 外,其他结构域和基序均具有高度保守性(图 1-b)。通过系统发育树(图 2)分析,将 10 个成员分为 4 个分支:HarmCYP6AE11、HarmCYP6AE14、HarmCYP6AE16、HarmCYP6AE17 和 HarmCYP6AE18 聚为一支;HarmCYP6AE12 和 HarmCYP6AE15 聚为一支;HarmCYP6AE19 和 HarmCYP6AE20 聚为一支;HarmCYP6AE24 单独一支。

表 2 棉铃虫基因组中鉴定的 10 个 *HarmCYP6AE* 描述

Table 2 Description of 10 identified *HarmCYP6AE* in the *Helicoverpa armigera* genome

基因名称 Gene name	基因 ID Gene ID	基因座标签 Locus tag	基因长度/nt Gene size	外显子数量 Exon count	转录本长度/nt Transcript length	编码序列长度/nt CDS length	蛋白长度/aa Protein length
HarmCYP6AE11	110371743	B5X24_HaOG200087	15 792	4	2 317	1 569	522
HarmCYP6AE12	110371687	B5X24_HaOG200088	2 167	2	1 707	1 572	523
HarmCYP6AE14	110371751	B5X24_HaOG200089	1 905	2	1 621	1 578	525
HarmCYP6AE15	110371688	B5X24_HaOG200090	1 871	2	1 627	1 566	521
HarmCYP6AE16	110371744	B5X24_HaOG200091	2 103	2	1 900	1 569	522
HarmCYP6AE17	110371743	B5X24_HaOG200092	15 792	4	1 778	1 572	523
HarmCYP6AE18	110371731	B5X24_HaOG200093	2 058	2	1 655	1 572	523
HarmCYP6AE19	110371725	B5X24_HaOG200094	2 715	2	2 051	1 650	549
HarmCYP6AE20	110371736	B5X24_HaOG200095	5 474	2	2 052	1 587	528
HarmCYP6AE24	110381041	B5X24_HaOG200096	4 785	2	1 795	1 554	517

表 3 HarmCYP6AE 家族氨基酸序列相似性比对

Table 3 Similarity comparison of amino acid sequence alignment of HarmCYP6AE family %

	HarmCYP6AE 11	HarmCYP6AE 12	HarmCYP6AE 14	HarmCYP6AE 15	HarmCYP6AE 16	HarmCYP6AE 17	HarmCYP6AE 18	HarmCYP6AE 19	HarmCYP6AE 20
HarmCYP6AE12	68.01								
HarmCYP6AE14	90.42	66.99							
HarmCYP6AE15	64.93	74.09	64.93						
HarmCYP6AE16	83.72	67.18	84.10	67.12					
HarmCYP6AE17	74.00	65.26	73.23	64.68	75.72				
HarmCYP6AE18	72.66	65.07	71.70	64.11	73.61	91.97			
HarmCYP6AE19	56.67	53.92	56.27	53.92	54.71	54.71	54.31		
HarmCYP6AE20	56.21	55.30	55.83	54.13	55.64	55.17	54.78	91.86	
HarmCYP6AE24	54.99	55.79	54.60	54.67	54.30	52.22	52.41	48.94	49.71

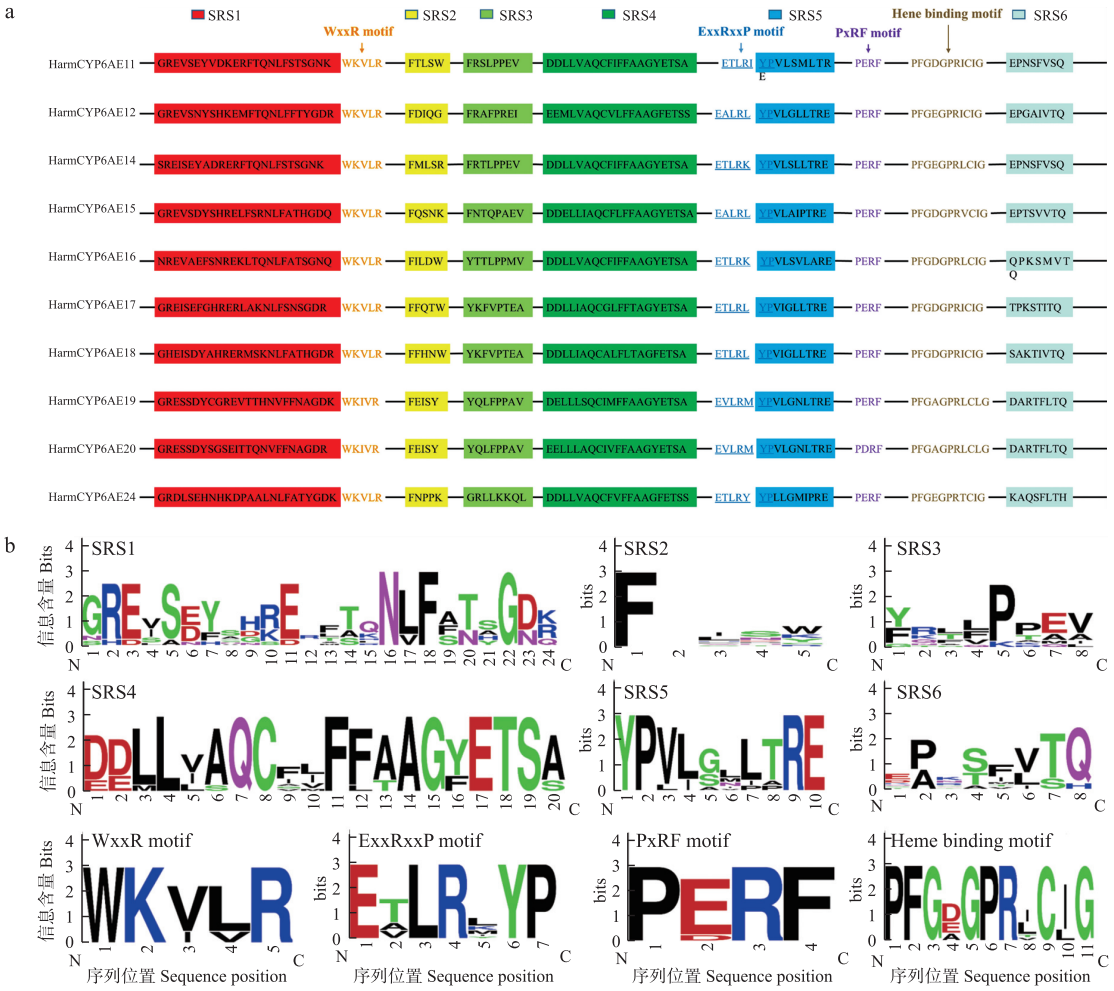

图 1　HarmCYP6AE 家族保守性分析

Fig. 1　Conservation analysis of the HarmCYP6AE family

a. HarmCYP6AE 的 SRS 和保守基序分布 Distribution of SRS and conserved motifs in HarmCYP6AE proteins;b. HarmCYP6AE 家族结构域氨基酸序列偏好性 Amino acid sequence preference of domains in the HarmCYP6AE family.

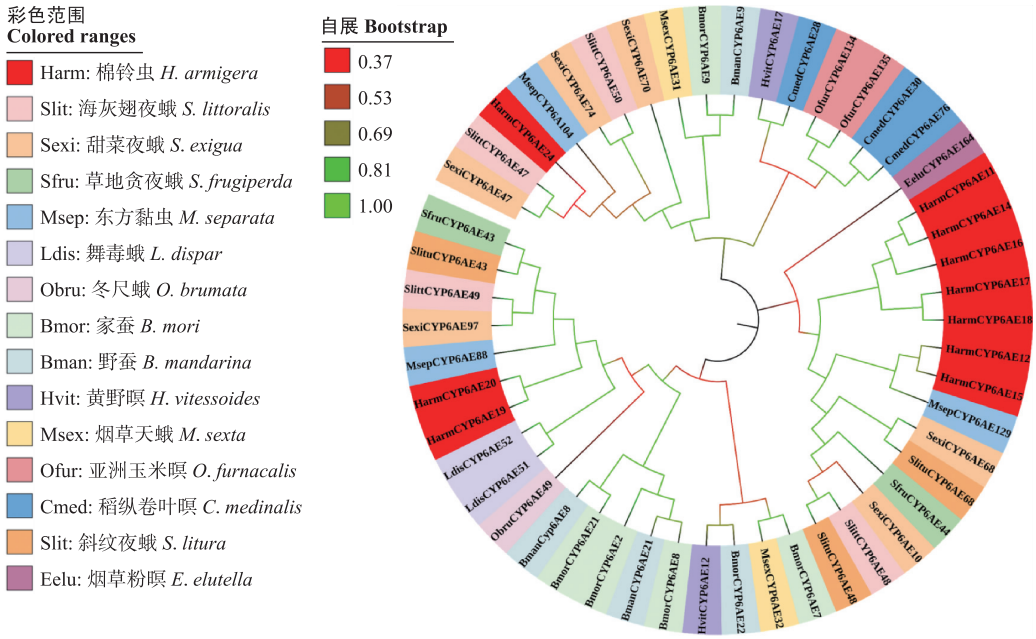

图 2　昆虫 CYP6AE 氨基酸序列进化分析

Fig. 2　Phylogenetic analysis of amino acid sequences of insect CYP6AE

2.2 不同浓度棉酚对棉铃虫生长发育的影响

从图 3 可知:与对照组(无棉酚,发育历期 12.61 d)相比,不同浓度棉酚处理对棉铃虫幼虫发育历期的影响存在显著差异:低浓度棉酚(0.001 5%~0.150 0%)处理后发育历期延长 0.27~1.64 d,其中 0.007 5%浓度组延长最显著($P<0.05$);高浓度棉酚(0.300 0%、0.750 0%)处理后发育历期分别缩短 0.77 和 0.71 d($P<0.05$)。与对照组幼虫死亡率(9.75%)相比,不同浓度棉酚处理对棉铃虫幼虫死亡率有不同程度的影响,其中,0.001 5%、0.750 0%和 0.0750%棉酚处理组的幼虫死亡率分别显著升高至 17.25%、16.25%和 15.50%(图 4)。5 龄幼虫体重测定结果(图 5)表明,仅 0.300 0%棉酚处理组体重(135.25 mg)显著高于对照组(108.40 mg),其他浓度组体重均下降 1.35~15.70 mg,但部分浓度组差异不显著。

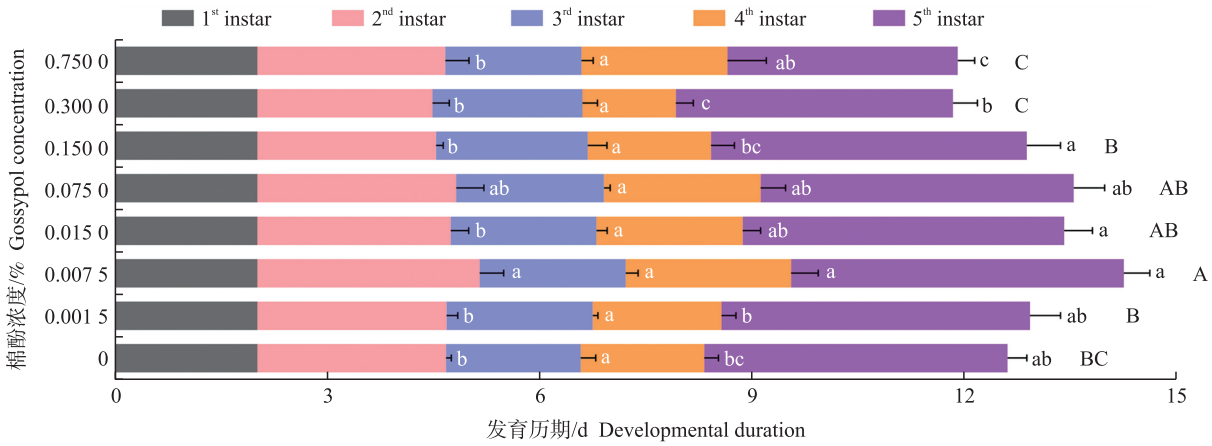

图 3 棉铃虫幼虫在不同浓度棉酚饲喂下的发育历期

Fig. 3 Developmental duration of *H. armigera* larvae fed with different concentrations of gossypol

不同小写字母表示不同处理间差异显著($P<0.05$),大写字母表示整体差异显著($P<0.05$)。下同。Different lowercase letters indicate the significant differences among different treatments ($P<0.05$), while uppercase letters indicate significant overall differences ($P<0.05$). The same as follows.

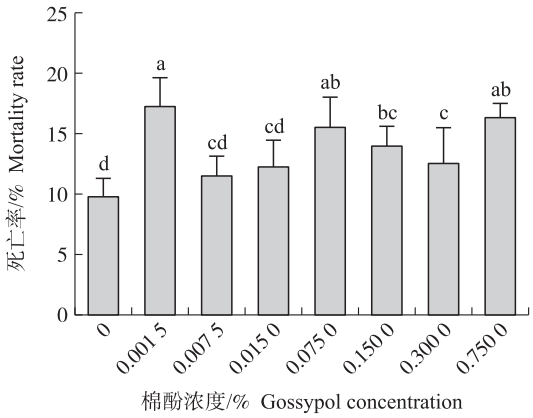

图 4 棉铃虫幼虫在不同浓度棉酚饲喂下的死亡率

Fig. 4 Mortality rate of *H. armigera* larval fed with different concentration of gossypol

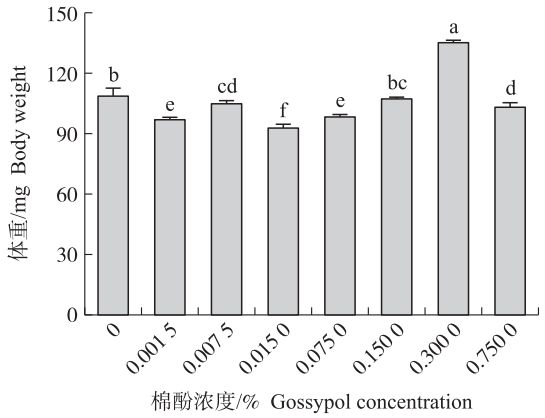

图 5 棉铃虫 5 龄幼虫在不同浓度棉酚饲喂下的体重

Fig. 5 Body weight of 5th instar *H. armigera* larvae fed with different concentration of gossypol

2.3 不同浓度棉酚对幼虫 *HarmCYP6AE* 基因表达的影响

RT-qPCR 结果(图 6)显示:幼虫 *HarmCYP6AE* 家族基因在不同浓度棉酚处理下呈现差异化表达模式。*HarmCYP6AE11* 和 *HarmCYP6AE20* 在低浓度棉酚(≤0.007 5%)处理下上调表达,随棉酚浓度升高表达量逐渐降低;*HarmCYP6AE14*、*HarmCYP6AE17*、*HarmCYP6AE19*、*HarmCYP6AE24* 在高浓度棉酚处理(≥0.015 0%)下显著上调表达,其中 *HarmCYP6AE17* 在≥0.015 0%棉酚处理下的表达量显著高于低浓度组(≤0.007 5%);*HarmCYP6AE19* 的表达量随棉酚浓度升高呈上升趋势,但在 0.750 0%浓度下略有下调;*HarmCYP6AE24* 的表达模式与 *HarmCYP6AE20* 相反,在≥0.300 0%棉酚处理下显著上调,在≤0.075 0%浓度下显著下调;*HarmCYP6AE12*、*HarmCYP6AE15* 和 *HarmCYP6AE16* 分别在 0.150 0%与 0.750 0%棉酚浓度、在 0.750 0%棉酚浓度以及 0.015 0%、0.150 0%与 0.750 0%棉酚浓度时均显著上调表达。

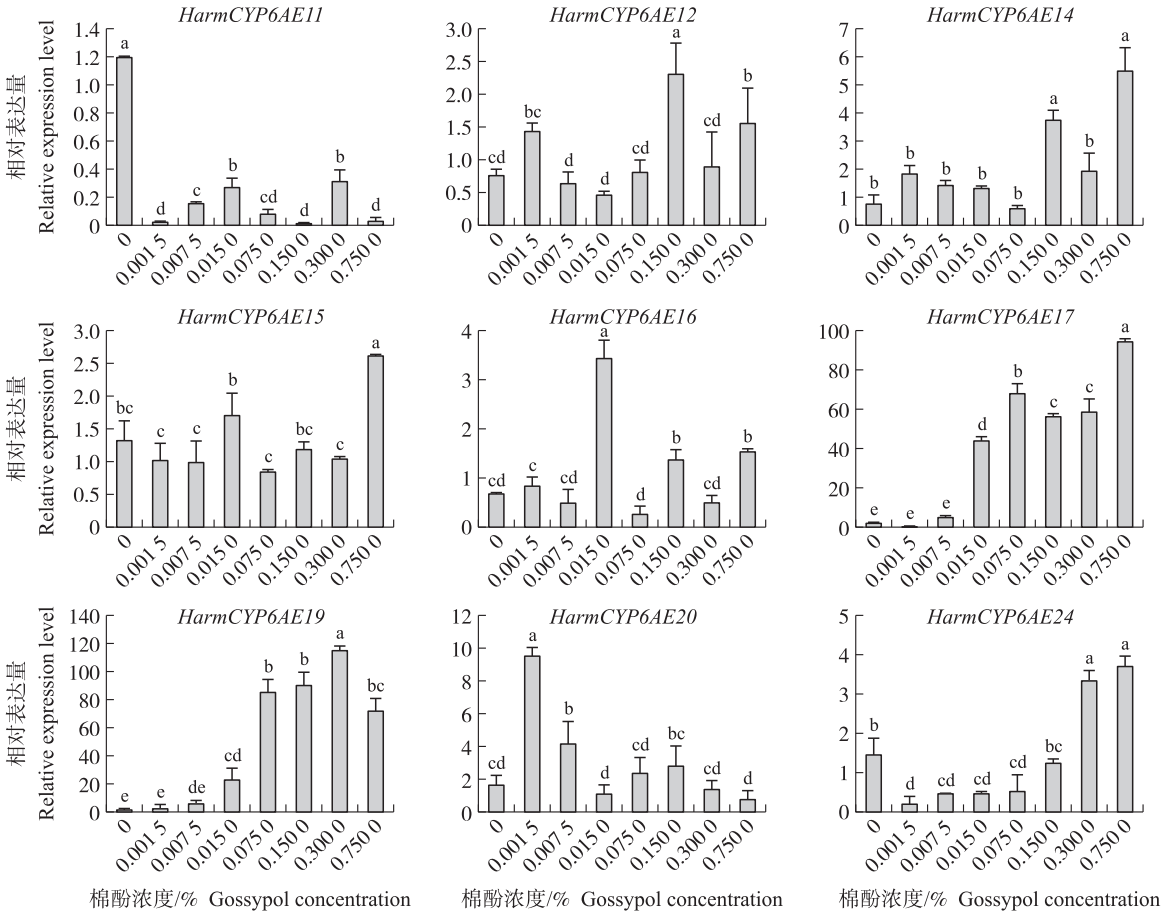

图 6　不同浓度棉酚对 *HarmCYP6AE* 家族基因表达的影响

Fig. 6　Effects of different gossypol concentrations on the expression of *HarmCYP6AE* family genes

2.4　沉默 *HarmCYP6AE19* 对棉铃虫幼虫饲喂棉酚后生长发育的影响

选取经高浓度棉酚饲喂后诱导表达量最高的 *HarmCYP6AE19* 基因,探究其与棉酚解毒代谢的关联。分别在 0.300 0%和 0.750 0%浓度棉酚饲喂幼虫的同时,采用 RNAi 技术下调 *HarmCYP6AE19* 基因的表达。RT-qPCR 分析(图 7)显示,经 0.300 0%和 0.750 0%棉酚诱导后 ds*CYP6AE19* 处理组的 *HarmCYP6AE19* 基因表达量显著下调:3 龄期幼虫分别下降 89.01%和 80.65%($P<0.05$),5 龄期幼虫分别下降 81.37%和 50.78%($P<0.05$)。在 3 龄期幼虫中沉默 *HarmCYP6AE19* 基因,5 龄期表达量出现回升趋势,其中 0.300 0%棉

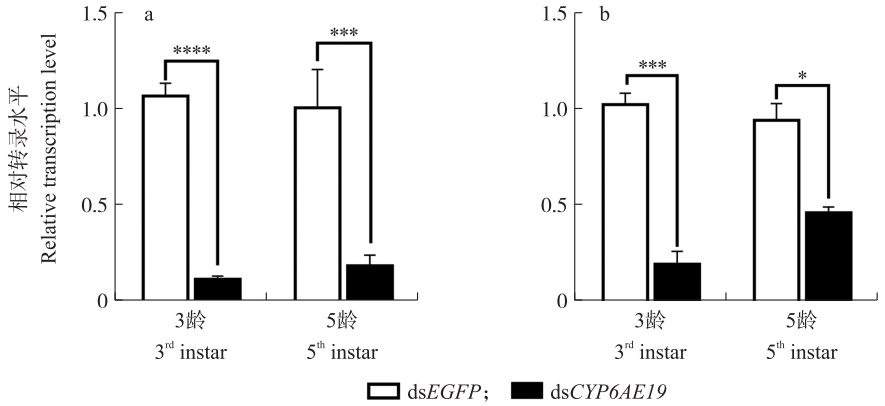

图 7　饲喂 0.300 0%(a)和 0.750 0%(b)棉酚后沉默 *HarmCYP6AE19* 对棉铃虫幼虫 *HarmCYP6AE19* 转录水平的影响

Fig. 7　Effects of *HarmCYP6AE19* silencing on the transcriptional level of *HarmCYP6AE19* in *H. armigera* larvae after feeding with 0.300 0%(a) and 0.750 0%(b) gossypol

* $P<0.05$, *** $P<0.001$, **** $P<0.000\ 1$. The same bellow.

酚处理组上调 59.87%(P<0.05),0.750 0%棉酚处理组上调 133.98%(P<0.05)。

生长发育指标(图 8)分析显示:*HarmCYP6AE19* 沉默后棉铃虫幼虫化蛹率显著下降,0.300 0%棉酚处理组化蛹率下降 20.76%(P<0.05),0.750 0%棉酚处理组下降 40.51%(P<0.05);0.300 0%棉酚处理组蛹重增加 3.57%,但差异不显著,0.750 0%棉酚处理组蛹重显著增加 33.70%(P<0.05)。

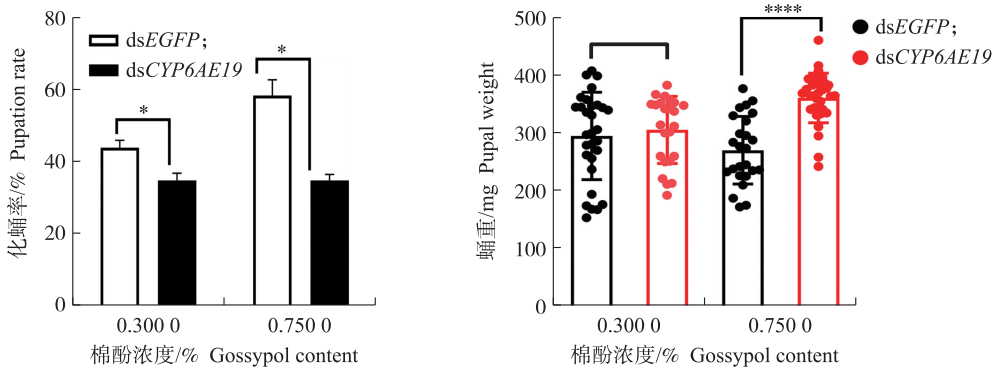

图 8 饲喂含 0.300 0%和 0.750 0%棉酚后沉默 *HarmCYP6AE19* 对棉铃虫化蛹率和蛹重的影响

Fig. 8 Effects of *HarmCYP6AE19* silencing on the pupation rate and pupal weight of *H. armigera* after feeding with 0.300 0% and 0.750 0% gossypol

3 讨论与结论

棉铃虫作为棉花的主要害虫之一,已进化出针对棉酚的解毒代谢适应性机制,其中 CYP 家族发挥核心作用[28]。生物信息学分析显示,棉铃虫 HarmCYP6AE 家族 10 个成员具有典型的 P450 蛋白保守结构域和 SRS 位点,序列相似性差异较大(48.94%~91.97%),且聚类为 4 个系统发育分支,提示该家族成员在进化过程中可能发生功能分化。SRS 位点作为 P450 酶识别底物的关键区域,其序列多样性直接影响酶的底物特异性[21]。已有研究表明,交换 HarmCYP6AE 成员的 SRS1 和 SRS6 位点可显著改变其对拟除虫菊酯类杀虫剂的代谢能力[29-30],推测本研究中 *HarmCYP6AE* 家族成员的 SRS 序列差异可能是其对不同浓度棉酚产生差异化表达响应的分子基础。此外,HarmCYP6AE19 与 HarmCYP6AE20 虽然序列同源性高达 91.86%,但表达模式完全相反,进一步支持了 HarmCYP6AE 家族成员功能分化的假设。

棉酚对棉铃虫生长发育的影响呈现明显的浓度依赖性:低浓度棉酚处理延长幼虫发育历期,降低存活率和体重;高浓度棉酚处理则缩短发育历期,增加 5 龄幼虫体重。这一现象可能与棉铃虫的能量分配策略相关:低浓度棉酚胁迫下,幼虫需消耗大量能量合成解毒酶,导致生长发育资源不足,表现为发育迟滞和体重下降;而高浓度棉酚可能触发幼虫的应激反应,通过加快新陈代谢速率尽快完成发育周期,以规避不利环境[31]。本研究中,不同浓度棉酚处理下棉铃虫幼虫死亡率和体重变化未呈现明显的浓度依赖性,可能与棉铃虫的个体差异、取食行为的补偿性调整以及体内多通路协同解毒机制有关[32]。棉酚作为一种多靶点毒素,其毒性效应可能在不同个体中引发差异化的生理响应,如能量分配策略的改变、解毒酶的诱导程度等。此外,棉酚可能通过影响幼虫的取食量或营养吸收效率,间接导致体重变化的不规律性[33]。未来研究可通过更大样本量及更精细的个体跟踪设计,进一步阐明棉酚浓度与生理效应之间的关系。

RT-qPCR 结果表明:*HarmCYP6AE* 家族成员对棉酚的表达响应具有浓度特异性,*HarmCYP6AE17* 和 *HarmCYP6AE19* 在高浓度棉酚处理下显著上调,*HarmCYP6AE20* 在低浓度棉酚处理下特异性高表达,*HarmCYP6AE24* 则仅在极高浓度棉酚(≥0.300 0%)处理下上调。这一表达模式暗示 *HarmCYP6AE* 家族可能通过“分工协作”响应棉酚造成的不利影响,形成多层次的防御网络。已有研究证实棉铃虫摄食棉酚后 *HarmCYP6AE14* 上调,但棉酚不是 HarmCYP6AE14 的直接底物[7,34]。本研究发现 *HarmCYP6AE17* 和 *HarmCYP6AE19* 的上调表达幅度高于 *HarmCYP6AE14*,暗示这 2 个基因可能在高浓度棉酚代谢中发挥重要的作用。遗憾的是,基因的诱导表达并不直接表明其具有代谢活性。Wang 等[10]的研究显示,体外重组的 HarmCYP6AE 家族成员均不能直接代谢棉酚,说明棉酚诱导对 *HarmCYP6AE* 家族基因扩张进化的作用有限[13,23]。推测 *HarmCYP6AE* 基因可能通过间接调控其他解毒通路或协同其他蛋白参与棉酚代谢,如 UGT41B3 和 UGT40D1 能够将棉酚糖基化为棉酚的二糖基化异构体[12]。此外,棉铃虫解毒代谢棉酚需要

多种蛋白的协同完成,如 HaCYP4L11、HaCYP6AB9 和 HaABCB6 等蛋白在代谢棉酚中起重要作用[9]。因此,本研究发现被高浓度棉酚诱导高表达的 *HarmCYP6AE17* 和 *HarmCYP6AE19* 可能通过间接调控其他解毒通路或协同其他蛋白参与棉酚代谢。

刘丽等[35]制备的 HarmCYP6AE19 多克隆抗体可特异性识别棉铃虫天然 P450 蛋白。当茉莉酸甲酯(MeJA)与黄曲霉毒素 B1(AFB1)结合使用时,*HarmCYP6AE19* 被高度诱导[36]。为验证 *HarmCYP6AE19* 在棉酚代谢中的功能,本研究采用 CQD 介导的 RNAi 技术沉默该基因。CQD 作为高效的 dsRNA 递送载体,具有逃逸能力强、生物相容性好等特点,已在鳞翅目昆虫中得到成功应用[37]。沉默 *HarmCYP6AE19* 后棉铃虫幼虫取食棉酚后化蛹率显著下降,蛹重显著增加,暗示其可能在棉铃虫响应棉酚胁迫中发挥重要作用,与其受到高浓度棉酚诱导高表达一致。化蛹率下降可能是 *HarmCYP6AE19* 沉默后棉铃虫对高浓度棉酚的耐受性降低,导致发育异常;而蛹重增加可能与幼虫期能量分配的改变相关,即因解毒能耗上升,幼虫通过调整能量分配以增加物质储备,进而支撑蛹期的体重增长。同时,*HarmCYP6AE19* 在 5 龄幼虫期表达量的回升,可能是棉铃虫在基因沉默背景下的补偿性响应机制。

本研究系统分析了棉酚对棉铃虫生长发育的影响及 *HarmCYP6AE* 基因家族的表达响应,为解析棉铃虫的棉酚适应机制提供了新的试验证据,但仍存在一些有待深入探讨的问题。棉酚诱导 *HaCYP6AE* 表达是否为一种普遍应激响应,而非特异性解毒机制? *CYP6AE* 基因与 UGT、CarE 等其他解毒酶的协同作用机制尚不明确,可通过转录组或代谢组学技术进行系统分析。棉酚浓度与 *CYP6AE* 表达模式之间的剂量-效应关系是否存在物种或种群差异?

综上所述,本研究证实棉酚通过浓度依赖性方式影响棉铃虫生长发育,*HarmCYP6AE* 家族基因对棉酚表现出差异化的表达响应,其中 *HarmCYP6AE19* 在棉铃虫应对高浓度棉酚胁迫过程中发挥重要作用。研究结果为深入理解植食性昆虫与寄主植物的协同进化机制提供了依据,同时为开发靶向 *HarmCYP6AE* 基因的新型害虫防控技术(如 RNAi 农药、转基因抗虫棉等)提供了候选基因和试验基础。

参考文献 References:

[1] Kaplan I,Halitschke R,Kessler A,et al. Constitutive and induced defenses to herbivory in above- and belowground plant tissues[J]. Ecology,2008,89(2):392-406.

[2] Vandenhole M,Dermauw W,van Leeuwen T. Short term transcriptional responses of P450s to phytochemicals in insects and mites[J]. Current Opinion in Insect Science,2021,43:117-127.

[3] Zeng R S,Wen Z M,Niu G D,et al. Enhanced toxicity and induction of cytochrome P450s suggest a cost of "eavesdropping" in a multitrophic interaction[J]. Journal of Chemical Ecology,2009,35(5):526-532.

[4] Wang X,Howell C P,Chen F,et al. Gossypol:a polyphenolic compound from cotton plant[J]. Advances in Food and Nutrition Research,2009,58:215-263.

[5] Palenzuela M,Sánchez-Roa D,Damián J,et al. Polymerization of terpenes and terpenoids using metal catalysts[M]//Advances in Organometallic Chemistry. San Diego:Academic Press,2021:55-93.

[6] Jia S Z,Li Y H,Dai X P,et al. Physiological adaptations to sugar-mimic alkaloids:insights from *Bombyx mori* for long-term adaption and short-term response[J]. Ecology and Evolution,2020,10(18):9682-9695.

[7] Krempl C,Heidel-Fischer H M,Jiménez-Alemán G H,et al. Gossypol toxicity and detoxification in *Helicoverpa armigera* and *Heliothis virescens*[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology,2016,78:69-77.

[8] Sharma K,Kumar M,Dukare A,et al. Gossypol and semisynthetic derivatives:chemistry,bioactivities,and mechanism of actions[J]. Chemistry & Biodiversity,2025,22(8):e202402872.

[9] Jin M,Liao C,Fu X,et al. Adaptive regulation of detoxification enzymes in *Helicoverpa armigera* to different host plants[J]. Insect Molecular Biology,2019,28(5):628-636.

[10] Wang H D,Shi Y,Wang L,et al. *CYP6AE* gene cluster knockout in *Helicoverpa armigera* reveals role in detoxification of phytochemicals and insecticides[J]. Nature Communications,2018,9:4820.

[11] Chen C Y,Shan T S,Liu Y,et al. Identification of a novel cytochrome P450 *CYP3356A1* linked with insecticide detoxification in *Bradysia odoriphaga*[J]. Pest Management Science,2019,75(4):1006-1013.

[12] Krempl C,Sporer T,Reichelt M,et al. Potential detoxification of gossypol by UDP-glycosyltransferases in the two Heliothine moth species *Helicoverpa armigera* and *Heliothis virescens*[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology,2016,71:49-57.

[13] Calla B. Signatures of selection and evolutionary relevance of cytochrome P450s in plant-insect interactions[J]. Current Opinion in Insect Science,2021,43:92-96.

[14] Nauen R,Bass C,Feyereisen R,et al. The role of cytochrome P450s in insect toxicology and resistance[J]. Annual Review of Entomology,

2022,67:105-124.

[15] Liu N N,Li M,Gong Y H,et al. Cytochrome P450s:their expression,regulation,and role in insecticide resistance[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology,2015,120:77-81.

[16] Zhang L,Yang X L,Huang R Z,et al. Biodegradation of free gossypol by *Helicoverpa armigera* carboxylesterase expressed in *Pichia pastoris*[J]. Toxins,2022,14(12):816.

[17] Peng T,Pan Y,Gao X,et al. Cytochrome P450 *CYP6DA2* regulated by *cap 'n' collar isoform C*(*CncC*)is associated with gossypol tolerance in *Aphis gossypii* Glover[J]. Insect Molecular Biology,2016,25(4):450-459.

[18] Li F,Ma K S,Liu Y,et al. Characterization of the cytochrome P450 gene *CYP305A1* of the cotton aphid(Hemiptera:Aphididae)and its responsive *cis*-elements to plant allelochemicals[J]. Journal of Economic Entomology,2019,112(3):1365-1371.

[19] Hafeez M,Liu S S,Jan S,et al. Gossypol-induced fitness gain and increased resistance to deltamethrin in beet armyworm,*Spodoptera exigua*(Hübner)[J]. Pest Management Science,2019,75(3):683-693.

[20] Tao X Y,Xue X Y,Huang Y P,et al. Gossypol-enhanced P450 gene pool contributes to cotton bollworm tolerance to a pyrethroid insecticide[J]. Molecular Ecology,2012,21(17):4371-4385.

[21] Shi Y,O'Reilly A O,Sun S,et al. Roles of the variable P450 substrate recognition sites SRS1 and SRS6 in esfenvalerate metabolism by CYP6AE subfamily enzymes in *Helicoverpa armigera*[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology,2020,127:103486.

[22] Shi Y,Wang H D,Liu Z,et al. Phylogenetic and functional characterization of ten P450 genes from the CYP6AE subfamily of *Helicoverpa armigera* involved in xenobiotic metabolism[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology,2018,93:79-91.

[23] Shi Y,Sun S,Zhang Y J,et al. Single amino acid variations drive functional divergence of cytochrome P450s in *Helicoverpa* species[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology,2022,146:103796.

[24] 张林林,徐鹿,韩召军. 田间灰飞虱抗药性相关细胞色素 *P450* 基因和酯酶基因的筛选[J]. 南京农业大学学报,2010,33(5):29-34.
Zhang L L,Xu L,Han Z J. Screening of cytochrome P450 and esterase genes related to insecticide resistance in field population of *Laodelphax striatellus*(Homoptera:Delphacidae)[J]. Journal of Nanjing Agricultural University,2010,33(5):29-34(in Chinese with English abstract).

[25] Sun L L,Hou W H,Zhang J J,et al. Plant metabolites drive different responses in caterpillars of two closely related *Helicoverpa* species[J]. Frontiers in Physiology,2021,12:662978.

[26] Pearce S L,Clarke D F,East P D,et al. Genomic innovations,transcriptional plasticity and gene loss underlying the evolution and divergence of two highly polyphagous and invasive *Helicoverpa* pest species[J]. BMC Biology,2017,15(1):63.

[27] Das S,Debnath N,Cui Y J,et al. Chitosan,carbon quantum dot,and silica nanoparticle mediated dsRNA delivery for gene silencing in *Aedes aegypti*:a comparative analysis[J]. ACS Applied Materials & Interfaces,2015,7(35):19530-19535.

[28] Mao Y B,Cai W J,Wang J W,et al. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol[J]. Nature Biotechnology,2007,25(11):1307-1313.

[29] Brun-Barale A,Héma O,Martin T,et al. Multiple P450 genes overexpressed in deltamethrin-resistant strains of *Helicoverpa armigera*[J]. Pest Management Science,2010,66(8):900-909.

[30] Wang Z G,Jiang S S,Mota-Sanchez D,et al. Cytochrome P450-mediated λ-cyhalothrin-resistance in a field strain of *Helicoverpa armigera* from Northeast China[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2019,67(13):3546-3553.

[31] Feyereisen R. Insect CYP Genes and P450 Enzymes[M]. Amsterdam:Academic Press,2012:236-316.

[32] Lu K,Song Y,Zeng R S. The role of cytochrome P450-mediated detoxification in insect adaptation to xenobiotics[J]. Current Opinion in Insect Science,2021,43:103-107.

[33] Leite Dias S,D'Auria J C. The bitter truth:how insects cope with toxic plant alkaloids[J]. Journal of Experimental Botany,2025,76(1):5-15.

[34] Mao Y B,Tao X Y,Xue X Y,et al. Cotton plants expressing CYP6AE14 double-stranded RNA show enhanced resistance to bollworms[J]. Transgenic Research,2011,20(3):665-673.

[35] 刘丽,古丽·库尔班,覃万里,等. 棉铃虫细胞色素 P450 基因(*CYP6AE17* 和 *CYP6AE19*)原核表达及多克隆抗体制备[J]. 生物安全学报(中英文),2026,35(1):21-28.
Liu L,Guli·Kuerban,Qin W L,et al. Prokaryotic expression and polyclonal antibody preparation of cytochrome P450(*CYP6AE17* and *CYP6AE19*)from *Helicoverpa armigera*[J]. Journal of Biosafety,2026,35(1):21-28(in Chinese with English abstract).

[36] Elzaki M E A,Xue R R,Hu L,et al. Bioactivation of aflatoxin B1 by a cytochrome P450,CYP6AE19 induced by plant signaling methyl jasmonate in *Helicoverpa armigra*(Hübner)[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology,2019,157:211-218.

[37] Wang K X,Peng Y C,Chen J S,et al. Comparison of efficacy of RNAi mediated by various nanoparticles in the rice striped stem borer(*Chilo suppressalis*)[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology,2020,165:104467.

责任编辑:刘怡辰