

基于转录组数据的害虫抗药性综合检测方法

陈龙飞¹ 聂僖曼² 梁沛² 李飞^{3*} 韩召军^{1*}

(1. 南京农业大学植物保护学院, 南京 210095; 2. 中国农业大学植物保护学院, 北京 100193;

3. 浙江大学昆虫科学研究所, 杭州 310058)

摘要: 为建立基于转录组数据的害虫抗药性检测方法, 以3种重要害虫家蝇 *Musca domestica*、白纹伊蚊 *Aedes albopictus* 和小菜蛾 *Plutella xylostella* 的8个抗性/敏感种群的转录组数据为对象, 使用已开发的乙酰胆碱酯酶抗性突变检测程序ACE检测不同种群中的乙酰胆碱酯酶抗药性突变, 并使用Bowtie 2软件和R程序包DESeq2检测其解毒酶基因的表达量变化, 分析这3种害虫对有机磷类和氨基甲酸酯类杀虫剂的抗性分子基础。结果显示, 在家蝇2个抗性种群KS8S3和ALHF中检测到 *ace2* 基因上发生了G227A抗药性突变, 突变频率分别为0.318和1.000; 在白纹伊蚊抗性种群Tem-GR中检测到 *CCEae3a* 基因的表达量较敏感种群Par-GR上调了7.175倍; 在小菜蛾抗性种群ZZ中检测到 *ace1* 基因上发生A201S和G227A抗药性突变, 突变频率分别为0.656和0.692。根据上述突变频率和解毒酶基因表达量变化评估的3种害虫种群抗药性情况与其之前的报道基本相符, 表明基于转录组数据同时对靶标抗性机制和代谢抗性机制进行检测的害虫抗药性综合检测方法可以很好地反映害虫种群的抗药性状况。

关键词: 害虫; 抗药性检测; 靶标突变; 解毒酶基因; 转录组数据

The comprehensive method for detecting insecticide resistance by RNA-Seq data analysis

CHEN Longfei¹ NIE Ximan² LIANG Pei² LI Fei^{3*} HAN Zhaojun^{1*}

(1. College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China; 2. College of Plant Protection, China Agricultural University, Beijing 100193, China; 3. Institute of Insect Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang Province, China)

Abstract: In order to develop a reliable method for monitoring insecticide resistance based on RNA-Seq data, and to confirm the genotypes associated with resistance to organophosphates and carbamates in three important insect pests, *Musca domestica*, *Aedes albopictus* and *Plutella xylostella*, the RNA-Seq data from eight resistant/sensitive populations of these three insects were analyzed using a previously reported program, ACE, to detect the target resistant mutations in acetylcholinesterase (*ace*), and by Bowtie 2 and R package DESeq2 to detect the expression changes of detoxification genes. The results showed that a resistance-related mutation G227A in *ace2* was detected in two resistant *M. domestica* populations KS8S3 and ALHF with the ratios of 0.318 and 1.000, respectively; the expression of a resistance-related detoxification gene *CCEae3a* in a resistant *A. albopictus* population Tem-GR was 7.175 fold higher than that in the sensitive population Par-GR, and two resistance-related mutations A201S and G227A in *ace1* were detected in resistant ZZ population of *P. xylostella* with the ratios of 0.656 and 0.692, respectively. The resistance estimated in different pest populations based on the frequencies of

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0200904)

* 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: zjhan@njau.edu.cn, lifei18@zju.edu.cn

收稿日期: 2019-03-20

detected mutations and the expression change of detected detoxification genes were well consistent with the previous reports of these populations. These results indicated that the estimation of the resistance level by combining the mutation frequency and the expression change of detoxification genes based on RAN-Seq data was feasible, providing a new omics-based resistance monitoring method.

Key words: insect pest; insecticide resistance detection; target mutation; detoxification gene; RNA-Seq data

有机磷类和氨基甲酸酯类杀虫剂是害虫防治中广泛使用的传统药剂,其机理是通过抑制乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)的活性来影响害虫神经信号的传导,进而导致害虫死亡(李梦怡等, 2017)。该类杀虫剂最早在20世纪40年代应用于害虫防治,在使用了70多年后,害虫对这类杀虫剂的抗性也越来越突出,已在多种害虫中被报道,如棉蚜 *Aphis gossypii*、桃蚜 *Myzus persicae* 和小菜蛾 *Plutella xylostella* 等(郑炳宗等, 1989; 高希武等, 1992; Khaliq et al., 2007),并导致了这类杀虫剂的田间防治效果明显降低。为了应对害虫抗药性的问题,通常会加大杀虫剂的使用剂量,由此形成恶性循环,加剧了对农业生产、人类健康和生态环境的危害(Gould et al., 2018)。因此,为了能够及时、准确地检测害虫种群的抗药性,建立一个简便、快速的害虫抗药性检测方法显得尤为迫切。

传统的害虫抗药性检测除了有生物测定外,还有依赖电生理学和酶学进行的生理生化检测,而分子生物学检测技术则是之后发展起来的高灵敏度新技术。抗药性分子检测主要是对害虫2大抗药性机制进行测定,包括检测杀虫剂靶标不敏感突变和解毒代谢酶基因的表达水平(李飞等, 2003)。目前,检测靶标抗药性突变的技术主要有特异性等位基因PCR (PCR amplification of specific alleles, PASA)、随机扩增多态性DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD)等技术(高明等, 2013; 马玉婷等, 2017);检测解毒代谢酶基因表达量的技术主要有定量PCR技术(quantitative PCR, qPCR)等(潘志萍和李敦松, 2006)。使用这些技术能够较为准确地检测导致害虫产生抗药性的突变或解毒代谢基因表达的增强,反映害虫抗药性的发生情况。但这些方法的操作过程较为繁琐,尤其是在检测害虫某个种群的抗药性基因型时,需要对种群取样并对所有个体逐一进行靶标突变检测和解毒酶基因表达量测定,费时费力。

RNA-Seq技术可以对害虫种群样本中所有个体的转录产物进行高通量测序,产生的转录组数据

中包含了基因蛋白编码区的突变信息和基因的表达量信息(de Wit et al., 2015)。前期,浙江大学昆虫基因组与生物信息学实验室开发了基于转录组数据进行AChE抗药性突变检测的程序,命名为ACE(Guo et al., 2017)。通过ACE程序对害虫种群的转录组数据进行分析,能够准确地检测特定靶标中AChE的抗药性突变。除此之外,利用转录组数据还能够对害虫抗药性相关的解毒代谢酶如P450单加氧酶、谷胱甘肽S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)和羧酸酯酶(carboxylesterase, CCE)的基因表达量进行检测(Mamidala et al., 2012; David et al., 2014; You et al., 2015)。

家蝇 *Musca domestica* 和白蚊伊蚊 *Aedes albopictus* 是病媒害虫,能够传播多种病原体,对人类健康造成重大威胁;小菜蛾是十字花科蔬菜上重要的农业害虫,其暴发经常导致蔬菜的减产和绝收;且这3种害虫均对有机磷类和氨基甲酸酯类杀虫剂产生了不同程度的抗性(Huang et al., 1997; Elia-Amira et al., 2018; Sindhu et al., 2018),且抗药性机制也基本明确。家蝇对有机磷类和氨基甲酸酯类杀虫剂的抗性机制主要是靶标 *ace2* 基因上发生了V150L、G227A、G227V、F290Y和G328A突变(Başkurt et al., 2011)。蚊类害虫对有机磷类和氨基甲酸酯类杀虫剂产生抗性的共有机制是 *ace1* 基因上的A119S突变和CCE基因表达的增强(Hemingway & Karunaratne, 1998; Weill et al., 2003),据报道白纹伊蚊的抗药性与CCE *Eae3a* 基因表达增强有关(Grigoraki et al., 2016),但其尚无类似于冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 在 *ace1* 基因上发生A119S抗药性突变的报道。小菜蛾中既存在靶标抗性也存在代谢抗性,靶标抗性主要是由 *ace1* 基因上A201S、G227A和F290V突变引起的(Yeh et al., 2014),代谢抗性则主要是由于GST基因的高表达所致(Huang et al., 1998; Chen & Zhang, 2015)。

由于害虫抗药性主要是由靶标不敏感突变和解毒代谢酶基因表达水平升高引起,本研究拟建立基于转录组数据的害虫抗药性综合检测方法,使用

ACE靶标突变检测程序和解毒酶基因差异表达分析对上述3种为害严重且抗药性问题突出的害虫家蝇、白纹伊蚊和小菜蛾的抗药性机制同时进行检测,评估害虫种群的抗药性发生情况,检验该方法评估害虫种群抗药性的实用性,以期可以及时、准确地检测害虫抗药性,为杀虫剂的合理使用和害虫抗药性的综合治理提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试转录组数据:在NCBI的SRA数据库中下载家蝇、白纹伊蚊和小菜蛾3种害虫8个种群的25个转录组数据。其中,家蝇3个种群的8个转录组数据,包括敏感种群aabys(3个转录组数据)、抗性种群KS8S3(3个转录组数据)和ALHF(2个转录组数据)(Li et al., 2013; Reid et al., 2019);白纹伊蚊2个种群的8个转录组数据,包括敏感种群Par-GR(4个转录组数据)和抗性种群Tem-GR(4个转录组数据)(Grigoraki et al., 2015);小菜蛾3个种群的9个转录组数据,包括敏感种群CHS(3个转录组数据)、CHR(3个转录组数据)和抗性种群ZZ(3个转录组数据)(Zhu et al., 2017)。上述抗性种群均是指对有机磷类和氨基甲酸酯类杀虫剂产生抗性的种群。

供试昆虫:小菜蛾CHS敏感种群采集于北京市,已在实验室连续饲养10年,在此期间不接触任何杀虫药剂;CHR敏感种群是CHS种群经过氯虫苯甲酰胺多代筛选得到的筛选种群,对氯虫苯甲酰胺表现出抗性,对有机磷和氨基甲酸酯类农药敏感。室内饲养采用蛭石萝卜苗法,在尼龙网制成的长31 cm×宽23 cm×高24 cm养虫笼中放置催芽播种后1 d的萝卜苗供小菜蛾CHR敏感种群产卵,每隔2 d更换新鲜萝卜苗,并将带有卵的萝卜苗移入另一个养虫笼中待其孵化。饲养条件为温度 $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度40%~60%、光周期16 h L:8 h D。取其4龄幼虫供试。

试剂和仪器:QuickExtract™ DNA Extraction Solution试剂盒,美国Epicentre公司;2×Taq Master Mix,南京诺唯赞生物科技有限公司。5417R冷冻离心机、Master Cycler Personal PCR仪,德国艾本德股份公司;Kodak电泳凝胶成像仪,美国柯达公司;Power/PAC 3000型电泳仪,美国Bio-Rad公司。

1.2 方法

1.2.1 家蝇3个种群抗药性分子机制检测

家蝇对有机磷类和氨基甲酸酯类杀虫剂的抗性主要与 $ace2$ 基因上的抗药性突变有关,故使用ACE

程序对家蝇敏感种群aabys、抗性种群KS8S3和ALHF的 $ace2$ 基因进行抗药性突变的检测。首先,使用fastq-dump软件将SRA数据库中下载的家蝇3个种群转录组数据sra格式文件转换为fastq格式文件,使用FastQC和trimmomatic软件对这些转录组原始数据进行质量控制,去除低质量的测序结果。按照ACE程序的使用说明,利用ACE程序对这些转录组数据进行分析,得到含突变等位基因的抗性reads和不含突变等位基因的敏感reads,并计算检测到的突变频率。突变频率=抗性reads数目/(抗性reads数目+敏感reads数目)×100%。

1.2.2 白纹伊蚊2个种群抗药性分子机制检测

白纹伊蚊具有2个AChE基因 $ace1$ 和 $ace2$,其中 $ace1$ 基因是有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂的作用靶标。而蚊类害虫对有机磷类和氨基甲酸酯类杀虫剂的抗药性主要与 $ace1$ 基因上的A119S抗药性突变和CCE基因的高表达有关。使用ACE程序对白纹伊蚊敏感种群Par-GR和抗性种群Tem-GR的 $ace1$ 基因上的抗药性突变进行检测,方法同1.2.1。同时,在VectorBase数据库(Giraldo-Calderón et al., 2015)中下载白纹伊蚊已经注释的30条CCE基因序列,使用Bowtie 2软件和R程序包DESeq2对白纹伊蚊2个种群的CCE基因表达量进行计算,对2个种群CCE基因的差异表达进行分析。首先,使用Bowtie 2软件将白纹伊蚊转录组数据质控后的reads比对到30条CCE基因序列上,统计每个转录组数据中每个CCE基因上比对到的reads数目,构建reads数目矩阵,使用R语言程序包DESeq2对reads数目矩阵进行分析,得到30个CCE基因在敏感种群Par-GR和抗性种群Tem-GR间的 $\log_2$ (表达量变化倍数),将该对数值转换为表达量变化倍数后进行分析。

1.2.3 小菜蛾3个种群抗药性分子机制检测

小菜蛾也具有2个AChE基因 $ace1$ 和 $ace2$,其中 $ace1$ 基因是有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂的作用靶标,其对有机磷类和氨基甲酸酯类杀虫剂的抗性主要与 $ace1$ 基因上的抗药性突变和GST基因的高表达有关。使用ACE程序对小菜蛾敏感种群CHS、CHR和抗性种群ZZ的 $ace1$ 基因上的抗药性突变进行检测,方法同1.2.1。同时,在DBM-DB数据库(Tang et al., 2014)中下载小菜蛾已鉴定的22个GST基因,使用Bowtie 2软件和R程序包DESeq2对小菜蛾3个种群的GST基因表达量进行检测,并进行敏感种群CHR、抗性种群ZZ与敏感种群CHS间的GST基因差异表达分析,计算和分析方法同1.2.2。

1.2.4 小菜蛾CHR种群*ace1*基因片段的克隆测序

小菜蛾CHR种群是敏感种群,但基于1.2.3 ACE程序检测结果发现有抗性突变的存在,为验证ACE程序检测的准确性,对小菜蛾CHR种群的*ace1*基因进行克隆测序。在CHR种群中取30头小菜蛾4龄幼虫,使用QuickExtract™ DNA Extraction Solution试剂盒进行单头试虫的基因组DNA提取,具体操作步骤按照试剂盒说明书进行。从GenBank下载小菜蛾*ace1*基因的DNA序列(登录号:JQ085428.1),基于该序列设计特异性引物298-F(5'-GCCTCTA-CATCAACATCGTG-3')和298-R(5'-ACGACCCGT-CTATTATTGGA-3')来扩增含有A201S、G227A突变的*ace1*基因片段。引物由擎科新业生物技术(北京)有限公司合成。25 μL PCR反应体系:基因组DNA 5 μL、上下游引物各1 μL、2×Taq Master Mix 12.5 μL、ddH₂O补足至25 μL。PCR扩增程序:94℃预变性3 min;94℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸50 s,35个循环;最后72℃延伸10 min。在得到的PCR产物中取5 μL用1.0%琼脂糖凝胶进行电泳检测目的条带,扩增产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。将敏感种群CHR的30个样本测序所得序列与GenBank中下载的小菜蛾*ace1*基

因DNA序列进行比对,并将突变位点上的碱基翻译成氨基酸残基,若氨基酸只有野生型即为敏感纯合子;若同时存在野生型和突变型即为杂合子;若只有突变型即为抗性纯合子,然后计算抗性突变等位基因频率。抗性突变等位基因频率=(2×抗性纯合子数+杂合子数)/(2×样本总数)×100%。

2 结果与分析

2.1 家蝇3个种群抗药性分子机制检测结果

家蝇中只有1个AChE基因*ace2*。使用ACE程序对家蝇3个种群*ace2*基因上的抗药性突变位点进行检测,发现敏感种群aabys的*ace2*基因未发生抗药性突变,说明该种群尚未发生靶标抗性;但在抗性种群KS8S3的3个转录组数据中均检测到*ace2*基因上的G227A抗药性突变,突变频率分别为0.667、0.143和0.143,平均突变频率为0.318;在抗性种群ALHF的2个转录组数据中均检测到*ace2*基因上的G227A抗药性突变,突变频率分别为1.000和1.000,平均突变频率为1.000(表1)。表明家蝇抗性种群KS8S3和ALHF均已发生靶标抗性,且种群ALHF的靶标抗性水平较种群KS8S3更高,这与之前报道的生物测定结果相符。

表1 家蝇3个种群中*ace2*基因上发生G227A突变的频率

Table 1 The mutation frequencies of G227A in *ace2* gene in three *Musca domestica* populations

种群 Population	SRA 登录号 SRA accession no.	抗性reads数 ^a Number of resistant reads	敏感reads数 ^b Number of sensitive reads	突变频率 Mutation frequency	平均 Mean
敏感种群aabys Sensitive population	SRR5906803	0	4	0.000	0.000
aabys	SRR5906794	0	12	0.000	
抗性种群KS8S3 Resistant population	SRR5906793	0	4	0.000	
KS8S3	SRR5906800	6	3	0.667	0.318
KS8S3	SRR5906799	2	12	0.143	
KS8S3	SRR5906804	1	6	0.143	
抗性种群ALHF Resistant population	SRR521288	13	0	1.000	1.000
ALHF	SRR521289	8	0	1.000	

a: 含抗性等位基因的reads数; b: 含敏感等位基因的reads数。a: Number of reads containing resistant allele; b: number of reads containing sensitive allele.

2.2 白纹伊蚊2个种群抗药性分子机制检测结果

使用ACE程序对白纹伊蚊2个种群*ace1*基因上的抗药性突变位点进行检测,发现敏感种群Par-GR和抗性种群Tem-GR的*ace1*基因均未发生抗药性突变。对CCE蛋白家族的30个基因在2个种群中的表达量进行检测分析,发现有8个CCE基因在2个种群间表达量变化倍数高于2倍,其中有3个在抗性种群Tem-GR中的表达量下调,分别下调了

2.990倍、2.244倍和2.014倍,其余5个在抗性种群Tem-GR中的表达量上调,分别上调了7.175倍、6.407倍、6.256倍、3.463倍和2.141倍。上调倍数最高的基因ID为XM_019670441.1,在NCBI中查询其注释,发现该基因是已经被验证与抗药性相关的CCEae3a基因(表2)。表明白纹伊蚊2个种群没有发生抗药性突变,但抗性种群Tem-GR的代谢解毒能力更高,导致了抗药性的产生,这与之前的报道相符。

表 2 白纹伊蚊抗性种群 Tem-GR 与敏感种群 Par-GR 间差异表达的 CCE 基因

Table 2 The differential expressed CCE genes between *Aedes albopictus* resistant population Tem-GR and susceptible population Par-GR

表达量上调/下调 Up/down regulation	基因 ID Gene ID	表达量变化倍数 Fold change	log ₂ (表达量变化倍数) log ₂ fold change	P
表达量上调 Up-regulation	XM_019670441.1	7.175	2.843	8.93e-56
	XM_019671910.1	6.407	2.680	1.61e-53
	XM_019670345.1	6.256	2.645	5.95e-47
	XM_019672477.1	3.463	1.792	1.02e-08
	XM_019679510.1	2.141	1.099	2.47e-20
表达量下调 Down-regulation	XM_019704752.1	2.990	1.580	7.28e-11
	XM_019679686.1	2.244	1.166	4.34e-11
	XM_019676123.1	2.014	1.010	3.01e-11

2.3 小菜蛾 3 个种群抗药性分子机制检测结果

使用 ACE 程序对小菜蛾 3 个种群 *ace1* 基因进行检测分析,在敏感种群 CHS 中未发现 *ace1* 基因上发生抗药性突变,但在敏感种群 CHR 的 *ace1* 基因上检测到了 A201S 和 G227A 抗药性突变,突变频率分别为 0.324 和 0.334;在抗性种群 ZZ 的 *ace1* 基因上也检测到了 A201S 和 G227A 抗药性突变,突变频率分别为 0.656 和 0.692(表 3)。对小菜蛾 3 个种群的 22 个

GST 基因表达量进行检测分析,发现敏感种群 CHR 与抗性 ZZ 种群、敏感种群 CHS 间的 *GST* 基因表达量变化倍数均低于 2 倍,未检测到差异表达的 *GST* 基因。表明敏感种群 CHS 尚未发生靶标抗性,但敏感种群 CHR 和抗性种群 ZZ 均已发生了靶标抗性,且种群 ZZ 靶标抗性水平较种群 CHR 更高。*GST* 的差异表达分析结果显示,3 个种群在代谢水平上无较大差异,这一结果与之前的报道基本相符。

表 3 小菜蛾 3 个种群的 *ace1* 基因上发生 A201S 和 G227A 的突变频率

Table 3 The mutation frequency of A201S and G227A in *ace1* gene in three *Plutella xylostella* populations

靶标突变 Target mutation	种群 Population	SRA 登录号 SRA accession no.	抗性 reads 数 ^a Number of resistant reads	敏感 reads 数 ^b Number of sensitive reads	突变频率 Mutation frequency	平均 Mean
<i>ace1</i> -A201S	敏感种群 CHS	SRR5171274	0	78	0.000	0.000
	Sensitive	SRR5171275	0	118	0.000	
	population CHS	SRR5171277	0	83	0.000	
	敏感种群 CHR	SRR5171278	85	79	0.518	
	Sensitive	SRR5171279	91	110	0.453	0.324
	population CHR	SRR5171453	0	132	0.000	
	抗性种群 ZZ	SRR5171455	232	120	0.659	
	Resistant	SRR5171456	301	146	0.673	
<i>ace1</i> -G227A	population ZZ	SRR5171457	207	119	0.635	0.656
	敏感种群 CHS	SRR5171274	0	84	0.000	
	Sensitive	SRR5171275	0	111	0.000	
	population CHS	SRR5171277	0	85	0.000	
	敏感种群 CHR	SRR5171278	85	84	0.503	0.334
	Sensitive	SRR5171279	91	91	0.500	
	population CHR	SRR5171453	0	102	0.000	
	抗性种群 ZZ	SRR5171455	237	107	0.689	
	Resistant	SRR5171456	324	137	0.703	0.692
	population ZZ	SRR5171457	197	107	0.648	

a: 含抗性等位基因的 reads 数; b: 含敏感等位基因的 reads 数。a: Number of reads containing resistant allele; b: number of reads containing sensitive allele.

2.4 小菜蛾敏感种群 CHR *ace1* 基因上的突变验证

CHR 种群对有机磷类和氨基甲酸酯类杀虫剂敏感,但对其转录组数据进行检测时发现在 *ace1* 基

因上发生了抗药性突变。PCR 扩增测序得到 30 个样本的 DNA 片段序列,比对发现在 A201S 突变位点为敏感纯合子的样本数为 19 个,杂合子的样本数为

11个,没有抗性纯合子;在G227A突变位点为敏感纯合子的样本数为20个,杂合子的样本数为9个,抗性纯合子的样本数为1个,经计算A201S和G227A抗药性突变的频率均为0.183。表明小菜蛾CHR敏

感种群确实存在*ace1*基因上的A201S和G227A抗药性突变(图1),但突变频率不高,所以之前的生物测定中并未检测到抗性。

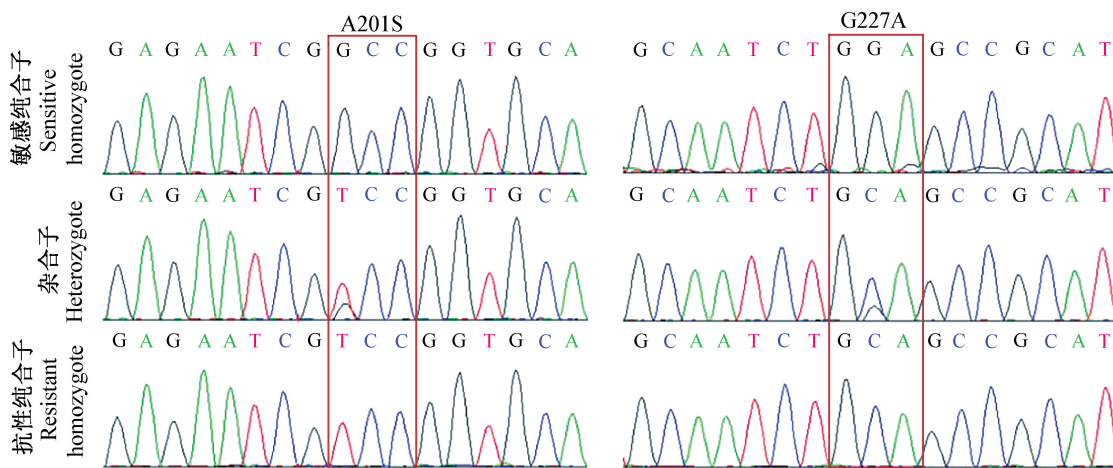


图1 小菜蛾CHR种群中A201S和G227A突变的测序图谱

Fig. 1 Sequence chromatograms of mutations A201S and G227A in CHR population of *Plutella xylostella*

3 讨论

依据害虫抗药性的主要机制,本研究提出利用转录组数据同时检测靶标抗药性突变和解毒酶基因表达量来综合预测害虫种群抗药性的新方法,并利用抗药性状况已知的3种害虫8个种群的转录组数据进行实用性验证检测。结果显示,家蝇敏感种群aabyss未检测到抗药性突变,而抗性种群KS8S3和ALHF中均检测到G227A靶标抗药性突变,根据抗药性基因型对种群抗药性情况的预测结果与之前Li et al. (2013)和Reid et al. (2019)的报道相符。白纹伊蚊的2个种群虽然均未检测到靶标抗药性突变,但在抗性种群Tem-GR中检测到了相对于敏感种群Par-GR表达量显著上调的5个CCE基因,其中包括1个已经被验证与白纹伊蚊对有机磷类杀虫剂抗性有关的CCEae3a基因,根据抗药性基因型预测的抗药性情况也与之之前Grigoraki et al. (2015)的报道相符。小菜蛾3个种群中均未检测到表达量变化高于2倍的解毒酶基因GST,但在抗性种群ZZ中检测到了高频率的靶标抗药性突变A201S(0.656)和G227A(0.692),在敏感种群CHS中没有检测到靶标抗药性突变,而在敏感种群CHR中仅检测到低频率的靶标抗药性突变,根据抗药性基因型预测的抗药性情况亦与之前Zhu et al. (2017)的报道相符。表明本研究建立的基于转录组数据的害虫抗药性综合检测方法,通过同时对靶标抗性机制和代谢抗性机制

进行检测,可以很好地反映害虫种群的抗药性状况。本实验室前期开发的ACE程序仅对靶标抗药性突变进行检测(Guo et al., 2017),就验证的3种试虫而言,单独检测靶标抗药性突变就无法预测白纹伊蚊对有机磷类杀虫剂的抗性。由于害虫抗药性的机制复杂,抗药性预测首先要考虑主要机制,而精确预测则需要尽可能全面地考虑各种机制。

一般认为敏感种群应该没有明显的抗药性突变,但在利用转录组数据进行检测时,发现敏感种群CHR具有靶标抗药性突变,为了验证检测结果的准确性,对敏感种群CHR试虫进行了基因克隆和测序检测,确认了利用转录组数据检测靶标抗药性突变的准确性,但同时也发现,利用转录组数据检测靶标抗药性突变与基因克隆测序检测到的突变频率并不完全一致。如克隆测序时取样为30头,检测到的突变频率为0.183;而在转录组数据中比对的总reads数为102~201个,检测到的突变频率为0.324~0.334。检测如此突变频率的取样数量和转录组质量均符合要求,这种频率差异很可能来自方法本身,具体原因尚需进一步研究。

转录组数据不仅可以用于害虫种群抗药性的检测,还可以用于抗药性机制的研究。如Zhao et al. (2018)曾对埃及伊蚊Aedes aegypti抗性种群与敏感种群的转录组数据进行分析,得到表达量差异显著的2个基因CYP9J28和CYP9J10,且验证确认这2个基因与抗药性相关。本研究在白纹伊蚊抗性与敏感

种群间检测到表达量差异显著的8个CCE基因,除了已报道的CCEae3a基因外,其它7个基因尚未见报道,这些基因也可能与抗药性有关,具有重要的研究价值,后续可以针对其进行基因功能验证,挖掘更多的抗药性相关基因。

综上所述,基于转录组数据能够同时对靶标抗药性突变和解毒酶基因表达量进行检测,进而有效地评估害虫种群的抗药性情况。但必须指出,目前使用转录组数据进行抗性分子检测并进行田间监测时仍需要进一步完善。一是需要对多个农药靶标上的突变进行同时检测,如电压门控钠离子通道(voltage-gated sodium channel, VGSC)、鱼尼丁受体(ryanodine receptor, RyR)等(王建军等, 2008; 李秀霞等, 2015);二是需要建立基因型和抗药性表型之间的定量关系,由基因型可以直接预测抗药性水平;三是尽可能地综合检测各种抗药性机制导致的核酸变化或表达量水平变化,实现对抗药性水平更全面、更准确的预测;四是开发在线综合分析平台,害虫抗药性不是一个局部问题,根据局部地区的抗药性检测情况和少数专家的意见制定的治理策略可能不够全面,在线综合分析平台将整合全世界范围内害虫对杀虫剂的抗药性情况,通过全世界范围内该领域内的专家为治理害虫抗药性提供更加全面、准确、及时的策略。

参 考 文 献 (References)

- BAŞKURT S, TAŞKIN BG, DOĞAÇ E, TAŞKIN V. 2011. Polymorphism in the acetylcholinesterase gene of *Musca domestica* L. field populations in Turkey. *Journal of Vector Ecology*, 36(2): 248–257
- CHEN X, ZHANG YL. 2015. Identification and characterisation of multiple glutathione *S*-transferase genes from the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Pest Management Science*, 71(4): 592–600
- DAVID JP, FAUCON F, CHANDOR-PROUST A, POUPARDIN R, RIAZ MA, BONIN A, NAVRATIL V, REYNAUD S. 2014. Comparative analysis of response to selection with three insecticides in the dengue mosquito *Aedes aegypti* using mRNA sequencing. *BMC Genomics*, 15: 174
- DE WIT P, PESPENI MH, PALUMBI SR. 2015. SNP genotyping and population genomics from expressed sequences: current advances and future possibilities. *Molecular Ecology*, 24(10): 2310–2323
- ELIA-AMIRA NMR, CHEN CD, LAU KW, LEE HL, LOW VL, NORMA-RASHID Y, SOFIAN-AZIRUN M. 2018. Organophosphate and organochlorine resistance in larval stage of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Sabah, Malaysia. *Journal of Economic Entomology*, 111(5): 2488–2492
- GAO M, SHEN RP, ZHANG P, MU W. 2013. Detection of beta-cypermethrin resistance in Shandong populations of *Spodoptera exigua* by competitive PCR amplification of specific allele. *Journal of Plant Protection*, 40(4): 363–368 (in Chinese) [高明, 申瑞平, 张鹏, 慕卫. 2013. 竞争性特异等位基因PCR检测山东甜菜夜蛾对高效氯氰菊酯的抗性. *植物保护学报*, 40(4): 363–368]
- GAO XW, ZHENG BZ, CAO BJ. 1992. Research in *Myzus persicae* to organophosphorus and carbamate insecticides in China. *Journal of Plant Protection*, 19(4): 365–371 (in Chinese) [高希武, 郑炳宗, 曹本钧. 1992. 桃蚜对有机磷和氨基甲酸酯抗性机制研究. *植物保护学报*, 19(4): 365–371]
- GIRALDO-CALDERÓN GI, EMRICH SJ, MACCALLUM RM, MASLEN G, DIALYNAS E, TOPALIS P, HO N, GESING S, VECTORBASE CONSORTIUM, MADEY G, et al. 2015. VectorBase: an updated bioinformatics resource for invertebrate vectors and other organisms related with human diseases. *Nucleic Acids Research*, 43(D): 707–713
- GOULD F, BROWN ZS, KUZMA J. 2018. Wicked evolution: can we address the sociobiological dilemma of pesticide resistance? *Science*, 360(6390): 728–732
- GRIGORAKI L, BALABANIDOU V, MERISTOUDIS C, MYRIDAKIS A, RANSON H, SWEVERS L, VONTAS J. 2016. Functional and immunohistochemical characterization of CCEae3a, a carboxylesterase associated with temephos resistance in the major arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 74: 61–67
- GRIGORAKI L, LAGNEL J, KIOULOS I, KAMPOURAKI A, MOROU E, LABBÉ P, WEILL M, VONTAS J. 2015. Transcriptome profiling and genetic study reveal amplified carboxylesterase genes implicated in temephos resistance, in the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(5): e0003771
- GUO DH, LUO JP, ZHOU YN, XIAO HM, HE K, YIN CL, XU JH, LI F. 2017. ACE: an efficient and sensitive tool to detect insecticide resistance-associated mutations in insect acetylcholinesterase from RNA-Seq data. *BMC Bioinformatics*, 18(1): 330
- HEMINGWAY J, KARUNARATNE SH. 1998. Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. *Medical and Veterinary Entomology*, 12(1): 1–12
- HUANG HS, HU NT, YAO YE, WU CY, CHIANG SW, SUN CN. 1998. Molecular cloning and heterologous expression of a glutathione *S*-transferase involved in insecticide resistance from the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 28(9): 651–658
- HUANG Y, QIAO C, WILLIAMSON MS, DEVONSHIRE AL. 1997. Characterization of the acetylcholinesterase gene from insecticide-resistant houseflies (*Musca domestica*). *Chinese Journal of Biotechnology*, 13(3): 177–183
- KHALIQ A, ATTIQUE MN, SAYYED AH. 2007. Evidence for resistance to pyrethroids and organophosphates in *Plutella xylostella*

- (Lepidoptera: Plutellidae) from Pakistan. *Bulletin of Entomological Research*, 97(2): 191–200
- LI F, HUANG SJ, HAN ZJ. 2003. Molecular monitoring techniques of insect resistance. *Chemistry of Life*, 23(5): 392–395 (in Chinese) [李飞, 黄金, 韩召军. 2003. 害虫抗药性分子检测技术. *生命的化学*, 23(5): 392–395]
- LI M, REID WR, ZHANG L, SCOTT JG, GAO X, KRISTENSEN M, LIU N. 2013. A whole transcriptomal linkage analysis of gene co-regulation in insecticide resistant house flies, *Musca domestica*. *BMC Genomics*, 14: 803
- LI MY, PENG B, LI B, SHAO WH, YANG J, FU X, SHI GL, BU CY. 2017. Advances on agricultural anticholinesterase inhibitors. *Current Biotechnology*, 7(2): 127–134 (in Chinese) [李梦怡, 彭博, 李博, 邵文华, 杨金, 付欣, 师光禄, 卜春亚. 2017. 农用乙酰胆碱酯酶抑制剂研究进展. *生物技术进展*, 7(2): 127–134]
- LI XX, LIANG P, GAO XW. 2015. Research advances in resistance mechanisms of pest insects to diamide insecticides. *Journal of Plant Protection*, 42(4): 481–487 (in Chinese) [李秀霞, 梁沛, 高希武. 2015. 昆虫对双酰胺类杀虫剂抗性机制研究进展. *植物保护学报*, 42(4): 481–487]
- MA YT, WEI J, LI XG. 2017. Advance on detection method of insecticide resistance. *Current Biotechnology*, 7(4): 272–278 (in Chinese) [马玉婷, 魏娟, 李相敢. 2017. 昆虫抗药性检测方法研究进展. *生物技术进展*, 7(4): 272–278]
- MAMIDALA P, WIJERATNE AJ, WIJERATNE S, KORNACKER K, SUDHAMALLA B, RIVERA-VEGA LJ, HOELMER A, MEULIA T, JONES SC, MITTAPALLI O. 2012. RNA-Seq and molecular docking reveal multi-level pesticide resistance in the bed bug. *BMC Genomics*, 13: 6
- PAN ZP, LI DS. 2006. Research advances in monitoring and detecting insect pesticide-resistance. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 17(8): 1539–1543 (in Chinese) [潘志萍, 李敦松. 2006. 昆虫抗药性监测与检测技术研究进展. *应用生态学报*, 17(8): 1539–1543]
- REID WR, SUN HN, BECNEL JJ, CLARK AG, SCOTT JG. 2019. Overexpression of a *glutathione S-transferase* (*Mdgst*) and a *galactosyltransferase-like* gene (*Mdgt1*) is responsible for imidacloprid resistance in house flies. *Pest Management Science*, 75(1): 37–44
- SINDHU T, VENKATESAN T, PRABHU D, JEYAKANTHAN J, GRACY GR, JALALI SK, RAI A. 2018. Insecticide-resistance mechanism of *Plutella xylostella* (L.) associated with amino acid substitutions in acetylcholinesterase-1: a molecular docking and molecular dynamics investigation. *Computational Biology and Chemistry*, 77: 240–250
- TANG WQ, YU LY, HE WY, YANG G, KE FS, BAXTER SW, YOU SJ, DOUGLAS CJ, YOU MS. 2014. DBM-DB: the diamondback moth genome database. *Database*, 2014: bat087
- WANG JJ, HAN ZJ, WANG YC. 2008. Mechanisms of pyrethroids resistance in diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.), from Nanjing. *Journal of Plant Protection*, 35(6): 541–545 (in Chinese) [王建军, 韩召军, 王荫长. 2008. 南京小菜蛾对拟除虫菊酯的抗性机制. *植物保护学报*, 35(6): 541–545]
- WEILL M, LUTFALLA G, MOGENSEN K, CHANDRE F, BERTHOMIEU A, BERTICAT C, PASTEUR N, PHILIPS A, FORT P, RAYMOND M. 2003. Comparative genomics: insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature*, 423(6936): 136–137
- YEH SC, LIN CL, CHANG C, FENG HT, DAI SM. 2014. Amino acid substitutions and intron polymorphism of acetylcholinesterase1 associated with mevinphos resistance in diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 112: 7–12
- YOU YC, XIE M, REN NN, CHENG XM, LI JY, MA XL, ZOU MM, VASSEUR L, GURR GM, YOU MS. 2015. Characterization and expression profiling of glutathione *S*-transferases in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *BMC Genomics*, 16: 152
- ZHAO LM, ALTO BW, SHIN DY, YU FH. 2018. The effect of permethrin resistance on *Aedes aegypti* transcriptome following ingestion of Zika virus infected blood. *Viruses*, 10(9): e470
- ZHENG BZ, GAO XW, WANG ZG, LIANG TT, CAO BJ, GAO H. 1989. Resistant mechanism of organophosphorus and carbamate insecticides in *Aphis gossypii* Glov. *Journal of Plant Protection*, 16(2): 131–138 (in Chinese) [郑炳宗, 高希武, 王政国, 梁同庭, 曹本钧, 高洪. 1989. 瓜-棉蚜对有机磷及氨基甲酸酯杀虫剂抗性机制研究. *植物保护学报*, 16(2): 131–138]
- ZHU B, XU MY, SHI HY, GAO XW, LIANG P. 2017. Genome-wide identification of lncRNAs associated with chlorantraniliprole resistance in diamondback moth *Plutella xylostella* (L.). *BMC Genomics*, 18(1): 380

(责任编辑:李美娟)