

四种 P450 基因调控小菜蛾对氯虫苯甲酰胺的抗性



尹 飞 肖 勇 彭争科 李振宇*

(广东省农业科学院植物保护研究所, 广东省植物保护新技术重点实验室, 广州 510640)

摘要: 为研究 CYP6 家族 P450 基因在小菜蛾 *Plutella xylostella* 代谢氯虫苯甲酰胺中的作用, 利用浸叶法测定不同小菜蛾种群 3 龄幼虫对氯虫苯甲酰胺的抗性水平, 采用实时荧光定量 PCR (quantitative realtime PCR, qRT-PCR) 方法分析 *CYP1v3*、*CYP1v4*、*CYP6B6* 和 *CYP6f* 这 4 种 P450 基因在小菜蛾不同抗性种群体内的表达差异及杀虫剂的短期诱导效应, 并通过 RNA 干扰技术沉默 4 种 P450 基因后分析小菜蛾对氯虫苯甲酰胺的敏感性。结果显示, 4 种 P450 基因在中等抗性水平小菜蛾种群体内高表达; 氯虫苯甲酰胺处理可诱导 4 种基因显著上调表达。分别沉默 4 种 P450 基因后, 处理组小菜蛾的 P450 酶活力显著下降 37.60%~54.82%, 且处理组小菜蛾的死亡率显著高于对照组; 同时沉默 4 种基因处理组的小菜蛾 P450 酶活力显著低于其他各处理组。表明 4 种 P450 基因可能同时参与小菜蛾对氯虫苯甲酰胺的代谢。

关键词: 小菜蛾; P450 基因; 氯虫苯甲酰胺; RNA 干扰; 协同调控; 代谢解毒

Regulation of the resistance of diamondback moth *Plutella xylostella* to chlorantraniliprole by four cytochrome P450 genes

Yin Fei Xiao Yong Peng Zhengke Li Zhenyu*

(Guangdong Provincial Key Laboratory of High Technology for Plant Protection, Plant Protection Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, Guangdong Province, China)

Abstract: To clarify the function of four CYP6 family P450 genes in the metabolism of chlorantraniliprole in diamondback moth *Plutella xylostella*, the resistance levels of the 3rd-instar larvae of different *P. xylostella* populations to chlorantraniliprole were determined with leaf dip method. The expression differences of four P450 genes (*CYP1v3*, *CYP1v4*, *CYP6B6* and *CYP6f*) in different resistant populations of *P. xylostella* and the short-term induction effects of insecticides were analyzed by quantitative realtime PCR (qRT-PCR). After silencing the four P450 genes by RNA inference (RNAi), the sensitivity of *P. xylostella* to chlorantraniliprole was analyzed. The results showed that four P450 genes were highly expressed in moderately resistant population of *P. xylostella*. The expression of the four genes was significantly up-regulated by chlorantraniliprole. After silencing the four P450 genes by RNAi, the activity of P450 was significantly decreased by 37.60%–54.82%. The mortality of *P. xylostella* in the treatment group was significantly higher than that in the control. The activity of P450 after simultaneously silencing the four genes was lower than that in other treatments. The results indicated that the four P450 genes might be involved in the metabolism of chlorantraniliprole in *P. xylostella*.

Key words: *Plutella xylostella*; P450 gene; chlorantraniliprole; RNA inference (RNAi); coordinated regulation; metabolic detoxification

基金项目: 广东省基础与应用基础基金项目(2022A1515012395), 广东省农业科学院“十四五”学科团队建设项目(202105TD), 广州市农村科技特派员项目(20212100003)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: lizhenyu@gdaas.cn

收稿日期: 2023-06-17

小菜蛾 *Plutella xylostella* 是一种世界性的十字花科蔬菜害虫, 属鳞翅目菜蛾科害虫, 其对杀虫剂的抗性严重制约着防控效果。据统计, 我国每年因小菜蛾为害造成的损失达 7.7 亿美元, 全球每年用于防治小菜蛾的防治成本和经济损失达 40 亿~50 亿美元 (Furlong et al., 2013; Li et al., 2016)。氯虫苯甲酰胺是一种新型双酰胺类杀虫剂, 其上市后销售额约 10 亿美元, 并逐年递增, 2019 年的销售量为 17.5 亿美元(陈小平等, 2021)。在我国, 小菜蛾对该药剂在短时间内已产生严重抗性, 抗性倍数最高达 1749.96 倍, 给十字花科蔬菜安全生产带来困扰 (Wang et al., 2013; 李振宇等, 2020)。

细胞色素 P450 (cytochrome P450, 简称 P450 或 CYP) 广泛存在于昆虫体内, 参与植物次生代谢产物、杀虫剂和植物毒素等外源有毒物质的代谢, P450 基因的上调表达导致的代谢解毒作用增强是昆虫对杀虫剂产生抗性的主要机制 (Liu, 2015; 朱江和邱星辉, 2021)。研究表明黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*、冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 对双对氯苯基三氯乙烷 (dichlorodiphenyltrichloroethane, DDT) 的抗性均与 P450 基因过量表达密切相关 (Chiou et al., 2008; McCart & Ffrench-Constant, 2008); 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 对溴氰菊酯的抗性是由 *CYP6BQ9* 基因上调表达引起的 (Zhu et al., 2010), *CYP6CMI* 与 *CYP6AY1* 基因的过量表达分别与烟粉虱 *Bemisia tabaci*、褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 对吡虫啉的抗性密切相关 (Ding et al., 2013; Li et al., 2015); 棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 体内 *CYP337B3* 基因的上调表达致使其对氰戊菊酯产生抗性 (Joußen et al., 2012); *CYP6FD2* 和 *CYP6FD1* 在东亚飞蝗 *Locusta migratoria* 对西维因的抗性中起着重要作用 (Guo et al., 2016)。张良等 (2023) 研究发现亚致死剂量氯虫苯甲酰胺 (10.66 ng/g) 可诱导东方黏虫 *Mythimna separata* 幼虫体内 *CYP9A134* 基因上调表达, 48 h 可诱导上调表达 6.5 倍, 沉默该基因后, 亚致死剂量氯虫苯甲酰胺处理后黏虫幼虫死亡率升高 25%, 表明 *CYP9A134* 基因可能在黏虫代谢氯虫苯甲酰胺中起着重要作用。Zhang et al. (2020) 通过氯虫苯甲酰胺诱导和 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术表明 *CYP321A8*、*CYP321A9* 和 *CYP321B1* 基因在草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 对氯虫苯甲酰胺抗性中发挥着重要的解毒代谢作用。小菜蛾对氯虫苯甲酰胺的抗性机理研究结果表明, *CYP321E1* (Hu et al., 2014)、*CYP9f2* (Ete-

bari et al., 2018)、*CYP307a1* (Li et al., 2018) 和 *CYP6BG1* (Mallott et al., 2019) 基因过量表达参与其对氯虫苯甲酰胺的抗性。

研究表明, 代谢抗性在害虫抗药性产生初期起主要作用 (Banazeer et al., 2022)。笔者通过前期研究发现 *CYP1v3*、*CYP1v4*、*CYP6B6* 和 *CYP6f* 这 4 种 P450 基因在小菜蛾各抗性种群体内表达量稳定上调, 推测可能参与小菜蛾代谢氯虫苯甲酰胺 (尹飞等, 2022)。基于前期研究选取上述 4 种 P450 基因, 通过用亚致死剂量氯虫苯甲酰胺进行诱导表达、RNAi 等方法解析 4 种 P450 基因在小菜蛾代谢氯虫苯甲酰胺过程中的功能, 以期为进一步阐明小菜蛾对氯虫苯甲酰胺的代谢抗性机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试虫源及植物: 小菜蛾室内敏感种群由中国农业科学院蔬菜花卉研究所提供; 小菜蛾惠州种群, 于 2017 年采自惠州十字花科蔬菜生产基地, 于室内用氯虫苯甲酰胺 LC₅₀ 剂量诱导保持其抗性水平, 置于 25 ℃、相对湿度 65%~70%、光周期 L 16 h:D 8 h 的养虫室内饲养至 3 龄幼虫供试。甘蓝 *Brassica oleracea* 种子在 40 ℃ 下浸种后播种于育苗盆中, 于室温培育, 待苗长出 3 片真叶时移至田间栽培, 生长至结球期备用。

供试药剂、试剂及仪器: 98.6% 氯虫苯甲酰胺 (chlorantraniliprole) 原药, 广州进展生物科技有限公司。EASYspin 组织/细胞 RNA 快速提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; StarScript II 反转录试剂盒, 北京康润诚业生物科技公司; 2×RealStar Fast SYBR qPCR Mix, 北京康润诚业生物科技公司; T7 RNAi Transcription Kit 试剂盒, 南京诺唯赞生物科技有限公司; BCA Protein Assay Kit 试剂盒, 北京索莱宝科技有限公司; 其余试剂均为国产分析纯。Nanoliter 2010 纳升微量注射仪, 德国 WPI 公司; Bio-Rad CFX Connect 荧光定量 PCR 仪, 伯乐生命医药产品上海有限公司; ReadMax1500 全长酶标仪, 上海闪谱生物科技有限公司; DY-CZ-20H 电泳仪、WD-9413B 凝胶成像分析仪, 北京六一生物科技有限公司; DW-86L338J 超低温冰箱, 青岛海尔生物医疗股份有限公司; MJP-D 培养箱, 上海森信实验仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 小菜蛾不同抗性种群室内生物活性的测定

采用浸叶法对小菜蛾敏感种群和惠州种群的

室内生物活性进行测定。测定方法、结果调查和抗性水平均参照中华人民共和国农业行业标准《十字花科小菜蛾抗药性监测技术规程: NY/T2360—2013》。氯虫苯甲酰胺原药用丙酮溶解加工成 5% 氯虫苯甲酰胺母液, 用 0.05% TritonX-100 将 5% 氯虫苯甲酰胺母液依次稀释成系列浓度, 敏感种群药剂浓度分别为 2.72、1.36、0.68、0.34、0.17、0.09 和 0.04 mg/L; 惠州种群药剂浓度分别为 500、250、125、62.50、31.25、15.63、7.81 和 3.91 mg/L。将甘蓝叶片剪成直径 6.5 cm 圆片, 于不同浓度的药液中浸泡 10 s 后取出晾干, 然后置于直径 6.5 cm 培养皿中, 接入 10 头敏感种群或惠州种群的 3 龄幼虫, 覆盖双层吸水卷纸, 盖上培养皿上盖。将其正面向上置于温度(25±1)℃、相对湿度 65%~70%、光周期 L 16 h: D 8 h 的培养箱中, 以含 0.05% TritonX-100 水溶液处理组为对照(CK), 每处理 4 次重复。48 h 后记录情况, 小毛笔或尖锐镊子轻触虫体, 虫体没有反应或不能协调运动视为死亡。计算死亡率以及药剂对小菜蛾的 LC₂₅、LC₅₀、LC₇₅ 与其置信区间, 计算抗性倍数, 评估种群抗性水平。抗性倍数=田间种群的 LC₅₀/敏感品系的 LC₅₀。其中, 抗性倍数≤10 为低水平抗性; 10<抗性倍数<100 为中等水平抗性; 抗性倍数≥100 为高水平抗性。

1.2.2 小菜蛾不同抗性种群 P450 酶活力的测定

收集敏感种群和惠州种群小菜蛾 3 龄幼虫各 10 头置于玻璃匀浆器底部, 4 组重复, 加入 0.1 mol/L、pH 7.5 的磷酸缓冲液 1 mL, 放置在冰上研磨, 研磨完毕, 吸取 200 μL 匀浆液至 1.5 mL 的离心管中, 再加入 200 μL 磷酸缓冲液, 4 ℃、12 000 r/min 下离心 5 min, 上清液即为酶源。按 BCA Protein Assay Kit 试剂盒说明测定样品蛋白含量。

P450 酶活力测定参考 Li et al. (2018) 方法。取 2 μmol/L 对硝基苯甲醚 125 μL、酶源 112.5 μL、9.6 mmol/L 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 12.5 μL, 34 ℃下水浴 30 min, 取 200 μL 加入酶标孔, 在酶标仪上于波长 405 nm 下处读数, 以对硝基苯酚为横坐标, 以吸光度 OD 值为纵坐标制作标准曲线。每分钟每毫克蛋白生成的对硝基苯酚量即为酶活力。

1.2.3 氯虫苯甲酰胺对 P450 酶活力及 P450 基因的影响

用氯虫苯甲酰胺 LC₇₅ (2.46 mg/L)、LC₅₀ (0.96 mg/L) 和 LC₂₅ (0.38 mg/L) 3 个浓度浸泡直径 6.5 cm 甘蓝圆片后凉干, 将叶片放入直径 10.5 cm 的培养皿中, 每皿放入 100 头敏感种群小菜蛾 3 龄幼虫, 以含 0.1% TritonX-100 水溶液处理组为对照

(CK), 每处理设 4 次重复。分别在处理 4、8、20、24 和 48 h 后随机收集 10 头幼虫, 按 1.2.2 方法测定 P450 酶活力; 处理 4、8、20、24 和 48 h 后随机收集 10 头幼虫按总 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA, 按照 StarScript II 反转录试剂盒说明书进行 cDNA 的合成, 用 1% 琼脂糖凝胶检测 RNA 质量。

根据 GenBank 中已公布的以及转录组测序得到的小菜蛾体内 *CYP1v3*、*CYP1v4*、*CYP6B6* 和 *CYP6f* 等 P450 基因的序列设计引物(表 1), 引物由北京擎科生物科技有限公司合成。以核糖体蛋白基因 *RPL32* 为内参基因。以 SYBR Green 为染料、稀释 5 倍的 cDNA 作为模板, 采用实时荧光定量 PCR (quantitative realtime PCR, qRT-PCR) 反应测定 P450 基因的相对表达量。20 μL 反应体系: 2×RealStar Green Fast Mixture(2×)10 μL, cDNA 模板 1 μL、上下游引物各 0.5 μL, 用 ddH₂O 补足至 20 μL。PCR 程序: 95 ℃ 预变性 3 min; 94 ℃ 变性 30 s, 49~56 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 40 个循环。每组设 3 次重复。荧光定量数据使用 Bio-Rad CFX Manager 计算相对表达量, 采用 2^{-ΔΔCT} 法分析不同 P450 基因在小菜蛾体内的相对表达量。

1.2.4 P450 基因的功能验证

根据 T7 RNAi Transcription Kit 试剂盒说明书操作说明合成 dsRNA (*dsCYP1v3*、*dsCYP1v4*、*dsCYP6B6* 和 *dsCYP6f*), dsRNA 引物如表 1 所示。选取同一批发育良好、健康、虫龄整齐的小菜蛾惠州种群 3 龄幼虫, 将合成 dsRNA 用 Nanoliter 2000 纳升注射器注射到小菜蛾体内, 注射部位为幼虫第 3 腹足基部, 单独注射不同基因的 dsRNA 时, 每头幼虫注射 dsRNA 300 ng, 同时注射 4 种基因的 dsRNA 时, 每头幼虫每个基因 dsRNA 注射 75 ng。每处理 40 头幼虫, 4 次重复。同时设置未处理对照组(CK)和绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP) dsRNA 处理组。注射 24 h 后, 参照 1.2.2 方法测定小菜蛾体内的 P450 酶活力; 参照 1.2.3 方法测定处理组和对照组幼虫体内基因的表达量。同时, 用亚致死剂量氯虫苯甲酰胺 LC₅₀ (78.90 mg/L) 处理沉默 4 种 P450 基因 24 h 后的小菜蛾, 48 h 后观察小菜蛾死亡情况, 并计算死亡率。

1.3 数据分析

试验数据使用 IBM SPSS Statistics 25 软件进行统计分析, 处理组与对照组间进行单因素方差分析, 两者间采用 t 测验法进行差异显著性检验, 同浓度不同时间处理间采用 Duncan 氏新复极差法进行差

异显著性检验。

表1 本研究所用的引物

Table 1 The primers used in this study

引物用途 Purpose	引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')
荧光定量PCR Quantitative realtime PCR	CYP1v4-F CYP1v4-R	ACAATGGCATAGACGG CGGGAAATACTTAGGGT
	CYP1v3-F CYP1v3-R	CCGTCCACAGCCATAA CGGAAGAACGGTAAA
	CYP6f-F CYP6f-R	GGTCTGAAGGTATTCCCGATAAG CCAGGATCATGTCCACAAAGT
	CYP6B6-F CYP6B6-R	CCGTACACCTACATGCCCTT GCGGTACTTCTTCAGGATCG
	RPL32-F RPL32-R	CCAATTACCGCCCTACC TACCCCTTTGTCAATACCTC
dsRNA 合成 dsRNA synthesis	dsCYP1v4-F dsCYP1v4-R dsCYP1v3-F dsCYP1v3-R dsCYP6f-F dsCYP6f-R dsCYP6B6-F dsCYP6B6-R dsGFP-F dsGFP-R	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGTCAGGAATGACATGGTTGA GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGCTCCGGAAATACTTAGGG GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGTACTGCTCCAGCAAGGAGGT GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGACTGCTCCAGCAAGGAGGT GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGATAAAGGAGCGCAGCCTACA GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGTTCTCGAGCTTCAAGCCATT GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGCTGCAGCAGCTGTGTT GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGTTGGAGCAGTTGACGATGA GGATCCTAATACGACTCACTATAGGAAGGGCGAGGAGCTGTCACC GGATCCTAATACGACTCACTATAGGCAGGACCATGTGATCGCGC

2 结果与分析

2.1 小菜蛾不同抗性种群对氯虫苯甲酰胺的抗性

小菜蛾惠州种群对氯虫苯甲酰胺的抗性为中等

抗药性水平, LC_{50} 为 78.90 mg/L, 其抗性倍数为 82.18 倍; 小菜蛾敏感种群的 LC_{25} 、 LC_{50} 和 LC_{75} 分别为 0.38、0.96 和 2.46 mg/L(表2)。

表2 氯虫苯甲酰胺对小菜蛾不同种群 48 h 的毒力

Table 2 Toxicity of chlorantraniliprole to different *Plutella xylostella* populations at 48 h

种群 Population	回归方程 Regression equation	$\chi^2(df)$	$LC_{25}/(mg/L)$	$LC_{50}/(mg/L)$	$LC_{75}/(mg/L)$	95% 置信区间 95% confidence interval/(mg/L)	抗性倍数 Resistance ratio
敏感种群 Susceptible population	$y=1.652x+0.028$	4.143(5)	0.38	0.96	2.46	0.74~1.30	1.00
惠州种群 Huizhou population	$y=1.264x-2.398$	1.311(6)	23.09	78.90	269.61	57.79~115.78	82.18

2.2 小菜蛾不同抗性种群 P450 酶活力差异

小菜蛾惠州抗性种群体内 P450 酶活力显著高于敏感种群($P<0.05, t=34.04, df=4$), 前者的酶活力为 $86.26 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{mg pro}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, 后者的酶活力为 $26.65 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{mg pro}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, 惠州种群小菜蛾体内 P450 酶活力是敏感种群的 3.2 倍(图1)。

2.3 小菜蛾不同抗性种群 4 种 P450 基因表达差异

4 种 P450 基因在小菜蛾惠州种群体内的表达量

均显著高于敏感种群($P<0.05, t=8.983, df=3$), 其中以 CYP6f 上调表达量最高, 在抗性种群中的表达量为敏感种群的 12.63 倍, CYP6B6、CYP1v3 和 CYP1v4 基因的表达量上调倍数依次为 5.42 倍、4.18 倍和 2.47 倍(图2)。

2.4 氯虫苯甲酰胺对 4 种 P450 基因表达量的影响

小菜蛾暴露于 3 种亚致死剂量氯虫苯甲酰胺后, 4 种 P450 基因均显著上调表达, 其中以处理 20~

24 h时表达量最高。0.38 mg/L氯虫苯甲酰胺处理敏感种群小菜蛾3龄幼虫后,4种基因在处理4~24 h时,其表达量随着处理时间的延长而升高,在48 h时表达量略有差异,其中CYP1v4表达量与敏感种群相当;CYP1v3在48 h时表达量显著高于敏感种群,但显著低于4~24 h时的表达量($P<0.001, F=392.5, df=5$);CYP6f表达量显著低于24 h,但显著高于其他各处理组及敏感种群($P<0.001, F=6.5, df=5$);CYP6B6表达量显著低于20~24 h的表达量,但显著高于其他各处理组及敏感种群($P<0.001, F=23.9, df=5$)(图3)。

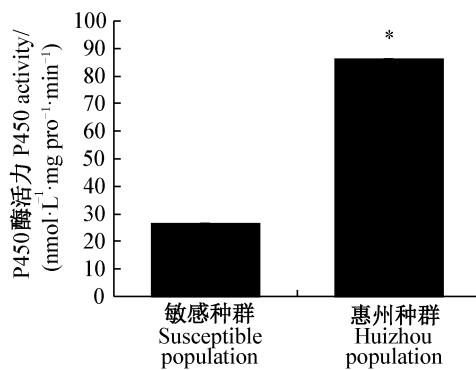


图1 小菜蛾不同抗性种群体内P450酶活力

Fig. 1 Enzyme activity of P450 in different populations of *Plutella xylostella*

图中数据为平均数±标准差。*表示不同种群间经t测验法检验差异显著($P<0.05$)。Data are mean±SE. * indicates significant difference between different populations by t test ($P<0.05$)。

0.96 mg/L氯虫苯甲酰胺处理敏感种群小菜蛾3龄幼虫,CYP6f随着处理时间的延长表达量逐渐升高,其他3种基因在4~24 h时,其表达量随着处理时间的延长而升高,在48 h时表达量略有差异,其中CYP1v4表达量显著低于24 h($P<0.001, F=252.7, df=5$),与20 h时的表达量无显著差异;CYP1v3在48 h时表达量显著高于敏感种群($P<0.001, F=365.8, df=5$),但显著低于处理4~24 h的表达量($P<0.05, F=365.8, df=5$);CYP6B6表达量显著低于8~24 h时的表达量,但显著高于其他各处理组及敏感种群($P<0.001, F=23.9, df=5$)(图3)。

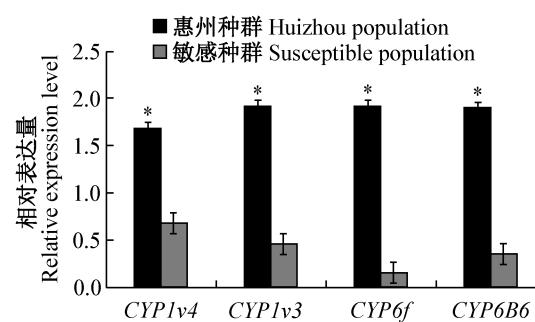


图2 P450基因在小菜蛾不同抗性种群体内的表达差异

Fig. 2 Different expressions of P450 in different populations of *Plutella xylostella*

图中数据为平均数±标准差。*表示不同种群之间经t测验法检验差异显著($P<0.05$)。Data are mean±SE. * indicates significant difference between different populations by t test ($P<0.05$)。

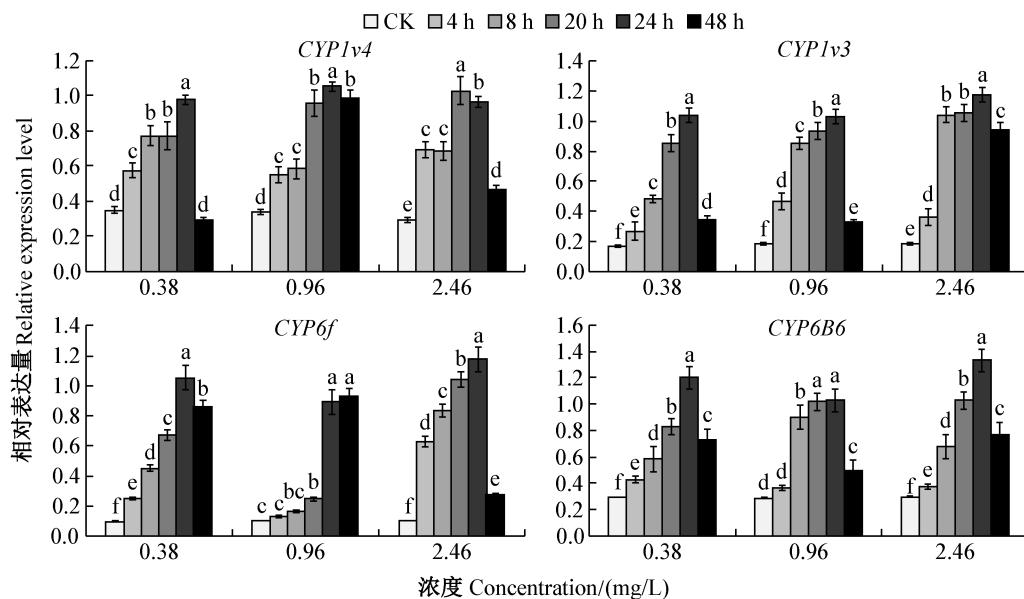


图3 氯虫苯甲酰胺对小菜蛾P450基因表达量的影响

Fig. 3 Effect of chlorantraniliprole on P450 gene expression in *Plutella xylostella*

图中数据为平均数±标准误。不同小写字母表示同浓度不同时间经Duncan氏新复极差法检验差异显著($P<0.05$)。Data are mean±SE. Different letters indicate significant difference in same concentration at different times by Duncan's new multiple range test ($P<0.05$)。

2.46 mg/L 氯虫苯甲酰胺处理敏感种群小菜蛾3龄幼虫,在处理4~48 h时,4种基因表达量均显著高于对照组。*CYP1v4*和*CYP6f*在48 h时的表达量显著低于其他各时间处理组;*CYP1v3*在48 h时表达量显著高于4 h时的表达量($P<0.001, F=221.0, df=5$),但显著低于其他各时间处理组($P<0.05, F=221.0, df=5$);*CYP6B6*在48 h时的表达量显著低于20~24 h时的表达量,但显著高于其他各时间处理组($P<0.001, F=23.91, df=5$)(图3)。

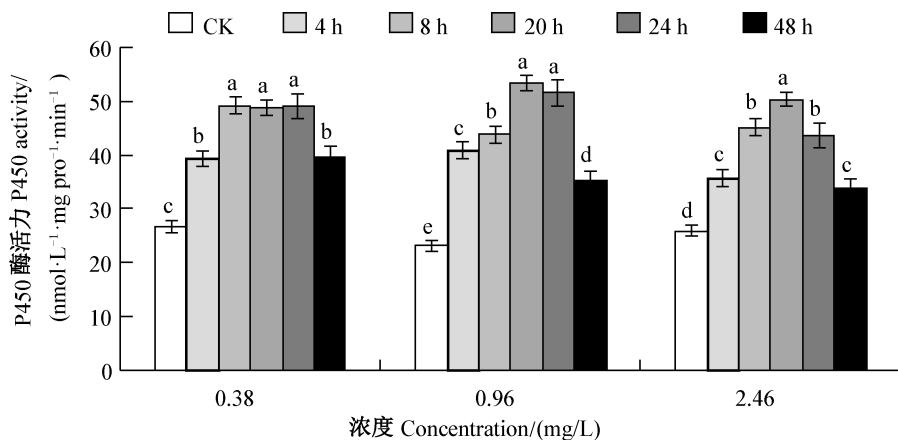


图4 氯虫苯甲酰胺对小菜蛾体内P450酶的影响

Fig. 4 Effects of chlorantraniliprole on P450 activity in *Plutella xylostella*

图中数据为平均数±标准误。不同小写字母表示同浓度不同时间经Duncan氏新复极差法检验差异显著($P<0.05$)。Data are mean±SE. Different letters indicate significant difference in same concentration at different times by Duncan's new multiple range test ($P<0.05$)。

2.6 4种P450基因的功能验证

2.6.1 RNAi对4种P450基因的沉默效果

分别沉默4种P450基因24 h后,与注射dsGFP处理组相比,小菜蛾体内4种P450基因相对表达量均显著降低($P<0.001, F=46.11, df=2$),注射ds*CYP1v4*、ds*CYP1v3*、ds*CYP6f*和ds*CYP6B6*后,各对应的基因表达量分别下降96.61%、59.41%、58.83%和52.35%(图5)。

2.6.2 沉默P450基因对小菜蛾体内酶活力的影响

分别沉默*CYP1v4*、*CYP1v3*、*CYP6f*和*CYP6B6*24 h后测定小菜蛾体内的P450酶活力,结果显示,与dsGFP处理组和未处理对照组相比,沉默4种P450基因处理组的小菜蛾体内P450酶活力均显著降低($P<0.001, F=252.75, df=5$),ds*CYP1v4*处理组比dsGFP处理组的P450酶活力下降了37.60%,ds*CYP1v3*、ds*CYP6f*和ds*CYP6B6*处理组分别比dsGFP处理组的P450酶活力下降了39.39%、54.82%和38.54%;同时沉默4种基因后,P450酶活力显著

2.5 氯虫苯甲酰胺诱导对P450酶活力的影响

小菜蛾敏感种群3龄幼虫在氯虫苯甲酰胺处理下,与未处理对照组相比,处理4、8、20、24和48 h后小菜蛾体内P450酶活力均显著高于对照的酶活力($P<0.001, F=32.66, df=5$),0.38 mg/L处理24 h时的酶活力最高,是未处理对照的1.8倍;0.96 mg/L处理20 h时的酶活力最高,是未处理对照的2.3倍;2.46 mg/L处理20 h时的酶活力最高,是未处理对照的1.9倍(图4)。

低于其他各处理组,与dsGFP处理组相比,P450酶活力下降了91.61%(图6)。

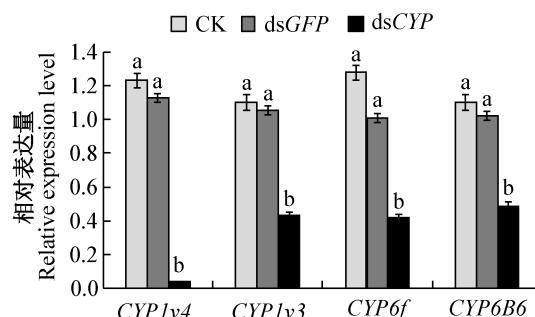


图5 RNAi对4种P450基因的沉默效果

Fig. 5 Effects of gene silencing on four P450 genes by RNAi

图中数据为平均数±标准误。同基因不同小写字母表示经Duncan氏新复极差法检验差异显著($P<0.05$)。Data are mean±SE. Different letters indicate significant difference in the same gene by Duncan's new multiple range test ($P<0.05$)。

2.6.3 沉默P450基因后小菜蛾对氯虫苯甲酰胺的敏感性

分别沉默4种P450基因后,小菜蛾的死亡率较

未处理对照组和dsGFP处理组显著升高($P<0.001$, $F=91.38$, $df=5$)，与dsGFP处理组相比,各处理组小菜蛾死亡率升高了28.33%~48.39%(图7)。

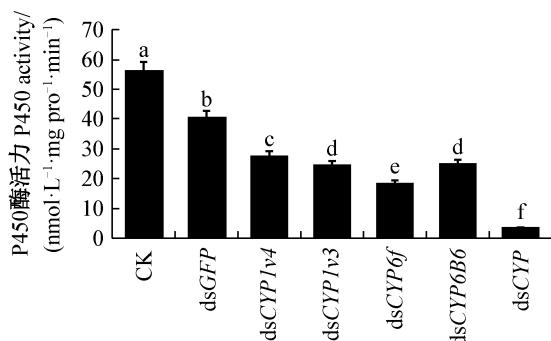


图6 RNAi沉默P450基因后小菜蛾体内P450酶活力
Fig. 6 P450 activity after silencing P450 genes by RNAi in *Plutella xylostella*

图中数据为平均数±标准误。柱上不同小写字母表示经Duncan氏新复极差法检验差异显著($P<0.05$)。Data are mean±SE. Different letters on the bars indicate significant difference by Duncan's new multiple range test ($P<0.05$)。

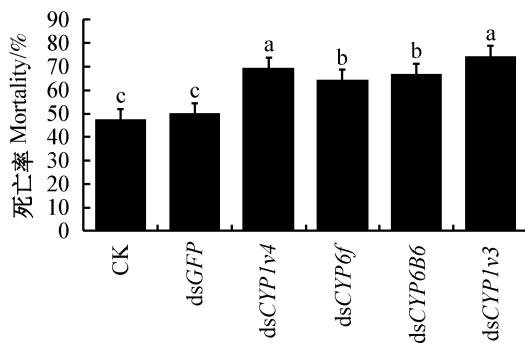


图7 RNAi后小菜蛾对氯虫苯甲酰胺的敏感性
Fig. 7 Sensitivity of *Plutella xylostella* after RNAi to chlorantraniliprole

图中数据为平均数±标准误。柱上不同小写字母表示经Duncan氏新复极差法检验差异显著($P<0.05$)。Data are mean±SE. Different letters on the bars indicate significant difference by Duncan's new multiple range test ($P<0.05$)。

3 讨论

P450由CYP基因编码,其可以催化多种内源性和外源性物质在昆虫体内氧化代谢及参与代谢进入害虫体内的杀虫剂,从而引起害虫对杀虫剂产生抗性,是杀虫剂选择性的关键基因(Nelson, 2018; Vontas et al., 2020)。由顺式作用或反式作用调节因子、基因扩增或重复引起的P450基因的组成性或诱导性变化、转录激活调控引起P450酶活力增强等均为害虫产生抗药性的主要原因,其中P450基因上调表达是害虫对药剂产生抗性的普遍机制(朱江和邱星,

2021; Nauen et al., 2022)。本研究发现,CYP1v3、CYP1v4、CYP6B6和CYP6f这4种P450基因在小菜蛾抗性种群中均上调表达,说明氯虫苯甲酰胺可诱导这4种基因显著上调表达,沉默这4种基因后,小菜蛾体内P450酶活力显著降低,小菜蛾对氯虫苯甲酰胺的敏感性提高,推测4种基因在小菜蛾抗氯虫苯甲酰胺中起着重要作用。

CYP6家族是昆虫纲所特有的家族,其生化功能与外源物质的分解代谢密切相关,CYP6AN35可被马拉硫磷、溴氰菊酯和氯虫苯甲酰胺诱导表达,参与梨小食心虫 *Grapholita molesta* 对杀虫剂的代谢(Han et al., 2022)。美国白蛾 *Hyphantria cunea* 体内CYP6ZB2基因可有效响应槲皮素的诱导,具有剂量效应,同时干扰该基因后(用0.5%槲皮素处理),美国白蛾幼虫生长发育受到抑制(邵红扬等, 2023)。CYP6G1在黑腹果蝇对新烟碱类、氨基甲酸酯类杀虫剂的抗药性中起着重要作用(邵晨等, 2023)。Li et al.(2018)在小菜蛾对氯虫苯甲酰胺的代谢抗性研究中发现,在抗氯虫苯甲酰胺种群中P450酶活力显著高于敏感种群,沉默或过表达CYP6BG1均可引起P450酶活力变化,表明CYP6BG1的过量表达在小菜蛾对氯虫苯甲酰胺抗性中起着重着重要作用。研究表明,CYP家族基因在不同种群不同时间表达有所差异,其在昆虫体内可能通过协同表达来发挥作用(Ellegren & Galtier, 2016; 尹飞等, 2022)。本研究发现沉默CYP1v4、CYP6f、CYP6B6和CYP1v3基因均可影响小菜蛾体内P450酶活力,但基因沉默效率与P450酶活力降低比例并不一致,同时沉默4种基因后,小菜蛾体内P450酶活力显著低于单独沉默1种基因后的酶活力,推测4种P450基因在小菜蛾体内可能协同调控小菜蛾对氯虫苯甲酰胺的代谢,进而引起小菜蛾对氯虫苯甲酰胺的抗性。

亚致死效应是昆虫暴露于非致死剂量的杀虫剂后,昆虫体内生理生化方面发生变化,由化学杀虫剂引起的亚致死效应是害虫的抗药性及有害生物的再猖獗的主要原因。研究表明,当害虫接触亚致死剂量的杀虫剂后,其体内多个CYP基因表达上调,P450酶活力会被诱导表达来代谢杀虫剂,经长期诱导,害虫对药剂产生抗性(Georghiou, 1972; Andreazza et al., 2021)。亚致死剂量氟虫腈诱导二化螟 *Chilo suppressalis* 后,其体内解毒酶活力增强。亚致死效应氯虫苯甲酰胺通过诱导亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis*、沟金针虫 *Pleonomus canaliculatus*

体内代谢酶上调表达来代谢氯虫苯甲酰胺(支昊宇等,2021)。本研究用亚致死剂量氯虫苯甲酰胺诱导小菜蛾敏感种群后,小菜蛾体内4种P450基因显著上调表达,P450酶活力显著增强,说明小菜蛾可以通过调节解毒酶活性提高对氯虫苯甲酰胺的耐受性,从而提高小菜蛾对氯虫苯甲酰胺的抗性。

P450介导的害虫抗药性存在进化可塑性,不同P450酶的底物特异性不同,它们之间可能重叠以满足昆虫正常生长发育与适应不断变化的环境需要,在特定杀虫剂选择压力下,同一昆虫品系响应的P450基因种类和表达特性会随着杀虫剂的持续选择而变化(邱星辉,2014;Brown & Redak,2023;乔宪凤等,2023)。本研究中氯虫苯甲酰胺诱导小菜蛾不同时间,各基因的表达量随着时间的变化有所差异,处理20~24 h的酶活力和基因表达量最高,推测短时间内小菜蛾体内酶活力迅速增加以清除体内外源毒物,待代谢酶量足以代谢体内的外源毒物时,代谢酶活力不再增加,以维持体内其他组织器官的能量需求和能量平衡以更好地适应新环境,研究结果符合害虫对外界环境变化的应激反应现象。

本研究通过亚致死剂量氯虫苯甲酰胺诱导和RNAi技术分析发现,CYP1v4、CYP6f、CYP6B6和CYP1v3四种基因可能协同调控小菜蛾对氯虫苯甲酰胺的代谢,进而引起小菜蛾对氯虫苯甲酰胺的抗性,但具体协同调控机制需要进一步深入研究。

参 考 文 献 (References)

- Andreazza F, Oliveira EE, Martins GF. 2021. Implications of sublethal insecticide exposure and the development of resistance on mosquito physiology, behavior, and pathogen transmission. *Insects*, 12(10): 917
- Banazeer A, Afzal MBS, Hassan S, Ijaz M, Shad SA, Serrão JE. 2022. Status of insecticide resistance in *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Plutellidae) from 1997 to 2019: cross-resistance, genetics, biological costs, underlying mechanisms, and implications for management. *Phytoparasitica*, 50(2): 465–485
- Brown DJ, Redak RA. 2023. Fitness costs associated with insecticide resistance in populations of *Homalodisca vitripennis* Germar (Hemiptera: Cicadellidae). *Journal of Economic Entomology*, 116(2): 560–564
- Chen XP, Liu AP, Guan SF, Yu WW, Ren YG, Liu XP. 2021. Diamide insecticides and their application market and prospect of controlling sucking pests. *World Pesticide*, 43(11): 1–12 (in Chinese) [陈小平, 柳爱平, 关少飞, 余蔚蔚, 任叶果, 刘兴平. 2021. 双酰胺类杀虫剂及其应用市场与防治刺吸式口器害虫前景. 世界农药, 43(11): 1–12]
- Chiu TL, Wen ZM, Rupasinghe SG, Schuler MA. 2008. Comparative molecular modeling of *Anopheles gambiae* CYP6Z1, a mosquito P450 capable of metabolizing DDT. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(26): 8855–8860
- Ding ZP, Wen YC, Yang BJ, Zhang YX, Liu SH, Liu ZW, Han ZJ. 2013. Biochemical mechanisms of imidacloprid resistance in *Nilaparvata lugens*: over-expression of cytochrome P450 CYP6AY1. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 43(11): 1021–1027
- Ellegren H, Galtier N. 2016. Determinants of genetic diversity. *Nature Reviews Genetics*, 17(7): 422–433
- Etebari K, Afrad MH, Tang B, Silva R, Furlong MJ, Asgari S. 2018. Involvement of microRNA miR-2b-3p in regulation of metabolic resistance to insecticides in *Plutella xylostella*. *Insect Molecular Biology*, 27(4): 478–491
- Furlong MJ, Wright DJ, Dosdall LM. 2013. Diamondback moth ecology and management: problems, progress, and prospects. *Annual Review of Entomology*, 58: 517–541
- Georghiou GP. 1972. The evolution of resistance to pesticides. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 3(1): 133–168
- Guo YQ, Wu HH, Zhang XY, Ma EB, Guo YP, Zhu KY, Zhang JZ. 2016. RNA interference of cytochrome P450 CYP6F subfamily genes affects susceptibility to different insecticides in *Locusta migratoria*. *Pest Management Science*, 72(11): 2154–2165
- Han H, Yang YY, Hu J, Wang YX, Zhao ZG, Ma RY, Gao LL, Guo YQ. 2022. Identification and characterization of CYP₆ family genes from the oriental fruit moth (*Grapholita molesta*) and their responses to insecticides. *Insects*, 13(3): 300
- Hu Z, Lin Q, Chen H, Li Z, Yin F, Feng X. 2014. Identification of a novel cytochrome P450 gene, CYP321E1 from the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) and RNA interference to evaluate its role in chlorantraniliprole resistance. *Bulletin of Entomological Research*, 104(6): 716–723
- Joußen N, Agnolet S, Lorenz S, Schöne SE, Ellinger R, Schneider B, Heckel DG. 2012. Resistance of Australian *Helicoverpa armigera* to fenvalerate is due to the chimeric P450 enzyme CYP337B3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(38): 15206–15211
- Li JJ, Li XM, Bai RE, Shi Y, Tang QB, An SH, Song QS, Yan FM. 2015. RNA interference of the P450 CYP6CM1 gene has different efficacy in B and Q biotypes of *Bemisia tabaci*. *Pest Management Science*, 71(8): 1175–1181
- Li XX, Li R, Zhu B, Gao XW, Liang P. 2018. Overexpression of cytochrome P450 CYP6BG1 may contribute to chlorantraniliprole resistance in *Plutella xylostella* (L.). *Pest Management Science*, 74(6): 1386–1393
- Li ZY, Feng X, Liu SS, You MS, Furlong MJ. 2016. Biology, ecology, and management of the diamondback moth in China. *Annual Review of Entomology*, 61: 277–296
- Li ZY, Xiao Y, Wu QJ, Chen AD, Wang XL, Zhang JM, Feng X. 2020. Progress in research on diamondback moth (*Plutella xylostella*) outbreaks and the management of resistance in this pest. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 57(3): 549–567 (in Chinese) [李

- 振宇,肖勇,吴青君,谌爱东,王兴亮,章金明,冯夏.2020.小菜蛾种群灾变及抗药性治理研究进展.应用昆虫学报,57(3): 549-567]
- Liu NN. 2015. Insecticide resistance in mosquitoes: impact, mechanisms, and research directions. Annual Review of Entomology, 60: 537-559
- Mallott M, Hamm S, Troczka BJ, Randall E, Pym A, Grant C, Baxter S, Vogel H, Shelton AM, Field LM, et al. 2019. A flavin-dependent monooxygenase confers resistance to chlorantraniliprole in the diamondback moth, *Plutella xylostella*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 115: 103247
- McCart C, Ffrench-Constant RH. 2008. Dissecting the insecticide-resistance-associated cytochrome P450 gene *Cyp6g1*. Pest Management Science, 64(6): 639-645
- Nauen R, Bass C, Feyereisen R, Vontas J. 2022. The role of cytochrome P450s in insect toxicology and resistance. Annual Review of Entomology, 67: 105-124
- Nelson DR. 2018. Cytochrome P450 diversity in the tree of life. Biichimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics, 1866(1): 141-154
- Qiao XF, Wang K, Peng X, Zhang XH, Chen MH. 2023. The roles of CPR and P450 genes in the resistance of insects to insecticides. Journal of Environmental Entomology, <https://kns.cnki.net/kcms2/detail/44.1640.Q.20230614.1528.008.html> (in Chinese) [乔宪凤,王康,彭雄,张晓赫,陈茂华.2023.CPR和P450基因在昆虫抗药性中的作用研究进展.环境昆虫学报, <https://kns.cnki.net/kcms2/detail/44.1640.Q.20230614.1528.008.html>]
- Qiu XH. 2014. Molecular mechanisms of insecticide resistance mediated by cytochrome P450s in insects. Acta Entomologica Sinica, 57(4): 477-482 (in Chinese) [邱星辉.2014.细胞色素P450介导的昆虫抗药性的分子机制.昆虫学报, 57(4): 477-482]
- Shao C, Shi Y, Zhu YT, Cheng JG, Li Z, Xu ZP. 2023. Eukaryotic expression of *Drosophila* CYP6G1 and its metabolism on neonicotinoid insecticides *in vitro*. Acta Entomologica Sinica, 66(2): 190-199 (in Chinese) [邵晨,施雨,朱语彤,程家高,李忠,须志平.2023.果蝇CYP6G1真核表达及其对新烟碱类杀虫剂的体外代谢.昆虫学报, 66(2): 190-199]
- Shao HY, Meng X, Zhang T, Chen M. 2023. Analysis of cytochrome P450 genes in response to quercetin and function of *CYP6ZB2* in *Hyphantria cunea*. Scientia Agricultura Sinica, 56(7): 1322-1332 (in Chinese) [邵红扬,孟香,张涛,陈敏.2023.响应槲皮素诱导的美国白蛾P450基因及CYP6ZB2功能分析.中国农业科学, 56(7): 1322-1332]
- Vontas J, Katsavou E, Mavridis K. 2020. Cytochrome P450-based metabolic insecticide resistance in Anopheles and Aedes mosquito vectors: muddy the waters. Pesticide Biochemistry and Physiology, 170: 104666
- Wang XL, Khakame SK, Ye C, Yang YH, Wu YD. 2013. Characterisation of field-evolved resistance to chlorantraniliprole in the diamondback moth, *Plutella xylostella*, from China. Pest Management Science, 69(5): 661-665
- Yin F, Li ZY, Shabbir S, Lin QS. 2022. Expression and function analysis of cytochrome P450 genes in *Plutella xylostella* with different chlorantraniliprole resistance. Scientia Agricultura Sinica, 55(13): 2562-2571 (in Chinese) [尹飞,李振宇,Shabbir S,林庆胜.2022.P450基因在氯虫苯甲酰胺不同抗性品系小菜蛾中的表达及功能分析.中国农业科学, 55(13): 2562-2571]
- Zhang BZ, Su X, Zhen CA, Lu LY, Li YS, Ge X, Chen DM, Pei Z, Shi MW, Chen XL. 2020. Silencing of cytochrome P450 in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) by RNA interference enhances susceptibility to chlorantraniliprole. Journal of Insect Science, 20(3): 12
- Zhang L, Yang HJ, Li Z, Zhang CY, Hu YS, Fan D. 2023. Cloning of *CYP9A134* gene and its detoxification function in *Mythimna separata*. Chinese Journal of Biological Control, 39(1): 130-140 (in Chinese) [张良,杨洪佳,李泽,张春雨,胡育硕,樊东.2023.黏虫CYP9A134基因的克隆及其解毒功能.中国生物防治学报, 39(1): 130-140]
- Zhi HY, Ding XH, Chen P, Ye ML, Yan YY, Jiang WH. 2021. Effects of chlorantraniliprole on activities of detoxification enzymes and growth and reproduction of *Ostrinia furnacalis*. Journal of Nanjing Agricultural University, 44(1): 89-96 (in Chinese) [支昊宇,丁新华,陈萍,叶茂林,闫阳阳,姜卫华.2021.氯虫苯甲酰胺对亚洲玉米螟解毒酶活性及生长发育的影响.南京农业大学学报, 44(1): 89-96]
- Zhu F, Parthasarathy R, Bai HA, Woithe K, Kaussmann M, Nauen R, Harrison DA, Palli SR. 2010. A brain-specific cytochrome P450 responsible for the majority of deltamethrin resistance in the QTC279 strain of *Tribolium castaneum*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107(19): 8557-8562
- Zhu J, Qiu XH. 2021. Molecular mechanisms of expression regulation of insect cytochrome P450 genes involved in insecticide resistance. Acta Entomologica Sinica, 64(1): 109-120 (in Chinese) [朱江,邱星辉.2021.昆虫抗药性相关细胞色素P450基因的表达调控机制.昆虫学报, 64(1): 109-120]

(责任编辑:王璇)