



# 新疆马铃薯甲虫对噻虫嗪的抗性监测及其细胞色素 P450 基因表达分析

石鑫<sup>1</sup>, 李莎<sup>1</sup>, 王志敏<sup>1</sup>, 付开赞<sup>2</sup>, 付文君<sup>3</sup>, 姜卫华<sup>1</sup>✉

<sup>1</sup> 南京农业大学植物保护学院, 南京 210095; <sup>2</sup> 新疆农业科学院植物保护研究所/农业农村部西北荒漠绿洲作物有害生物综合治理重点实验室, 乌鲁木齐 830091; <sup>3</sup> 新疆伊犁州农业技术推广总站, 新疆伊宁 835000

**摘要:**【目的】以世界性害虫马铃薯甲虫 (*Leptinotarsa decemlineata*) 为研究对象, 筛选其参与噻虫嗪解毒的细胞色素 P450 主效基因。【方法】于 2018、2019 年利用点滴法监测新疆察布查尔县、伊宁县、塔城市、乌鲁木齐市和吉木萨尔县 11 个马铃薯甲虫田间种群对噻虫嗪的抗性水平, 并测定分析噻虫嗪 LD<sub>50</sub> 处理 72 h 后成虫中 3 种主要解毒酶细胞色素 P450 酶 (P450)、谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 和酯酶 (EST) 的活性变化。利用 Illumina HiSeq™ 2500 高通量测序技术进行转录组测序, 获得抗性和敏感种群之间的差异表达基因 (DEG), 运用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术验证 3 个 P450 基因并分析 6 个 P450 基因 (*CYP4C1*、*CYP9e2*、*CYP305a1*、*CYP9Z25*、*CYP9Ya* 和 *CYP9Yc*) 在不同种群及噻虫嗪处理后的表达情况。【结果】抗性监测发现, 2018 年的 YN1、URMQ1、TC 和 QPQL1 以及 2019 年的 YN2 和 JMS 种群成虫对噻虫嗪抗性倍数 (RR) 分别达到 5.99、8.81、10.86 和 20.33 倍和 11.82、14.05 倍, 为低至中水平抗性。解毒酶活性测定结果表明, 2 个敏感种群 URMQ2、URMQ3 以及 2 个抗性种群 YN2、JMS 成虫分别经噻虫嗪 LD<sub>50</sub> 处理 72 h 后其 P450 活性均显著增加, 分别为对照的 1.76、2.75、1.91 和 1.66 倍。另外, URMQ3 种群的 GST (CDNB 和 DCNB 为底物) 及 URMQ2、YN2 种群的 EST 活性显著升高, 分别为对照的 1.19、2.10 倍和 1.35、1.91 倍。转录组分析表明, 通过合并组装分别获得噻虫嗪敏感和抗性种群样品 56 872 051 和 62 249 136 个原始序列数据以及 55 903 706 和 61 082 076 个过滤后的序列数据, 过滤后的序列长度分别为 8.39 和 9.16 G, 碱基错误率均为 0.03%。抗性种群中差异表达的 P450 基因 13 个, 其中 2 个基因显著上调。3 个上调的 P450 基因 *CYP4C1*、*CYP9e2* 和 *CYP305a1* 的 qRT-PCR 检测结果与转录组测序结果基本一致, qRT-PCR 分析还发现 *CYP9Ya*、*CYP9Yc*、*CYP4C1*、*CYP305a1* 和 *CYP9Z25* 在抗性种群成虫中表达量显著增加, 噻虫嗪 LD<sub>50</sub> 处理均可引起 URMQ2 种群 4 龄幼虫和成虫 *CYP9Ya*、*CYP9Yc* 表达量显著上调。相关性分析发现成虫对噻虫嗪的抗性水平与 *CYP9Ya* 表达量呈显著正相关。【结论】*CYP9Ya* 可能在马铃薯甲虫中对噻虫嗪具有重要的解毒作用, 其他基因的作用也不能排除。

**关键词:** 马铃薯甲虫; 噻虫嗪; 抗药性; 细胞色素 P450; 基因表达

## Resistance Monitoring to Thiamethoxam and Expression Analysis of Cytochrome P450 Genes in *Leptinotarsa decemlineata* from Xinjiang

SHI Xin<sup>1</sup>, LI Sha<sup>1</sup>, WANG ZhiMin<sup>1</sup>, FU KaiYun<sup>2</sup>, FU WenJun<sup>3</sup>, JIANG WeiHua<sup>1</sup>✉

<sup>1</sup> College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095; <sup>2</sup> Research Institute of Plant Protection, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Intergraded Management of Harmful Crop Vermin of China North-Western Oasis, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Urumqi 830091; <sup>3</sup> Agricultural Technology Extension Master Station of Yili Prefecture, Yining 835000, Xinjiang

收稿日期: 2020-10-30; 接受日期: 2020-11-21

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFD0200802)

联系方式: 石鑫, E-mail: 907094441@qq.com. 通信作者姜卫华, E-mail: jwh@njau.edu.cn

**Abstract:** 【Objective】Colorado potato beetle (CPB), *Leptinotarsa decemlineata*, is a significant agricultural pest in potato worldwide. The objective of the study is to identify the main cytochrome P450 genes involved in metabolic regulation of neonicotinoid insecticide thiamethoxam in *L. decemlineata*. 【Method】In this study, the resistance level to thiamethoxam was assayed using topical applications in 11 field populations of *L. decemlineata* from Qapqal (QPQL), Yining (YN), Tacheng (TC), Urumqi (URMQ), Jimusar (JMS) of Xinjiang in 2018 and 2019. The activities of three detoxifying enzymes including cytochrome P450 monooxygenase (P450), glutathione *S*-transferase (GST) and esterase (EST), exposed to LD<sub>50</sub> of thiamethoxam for 72 h were analyzed by *in vitro* enzyme activity assay. The differentially expressed genes (DEGs) of *L. decemlineata* adults susceptible and resistant to thiamethoxam were detected by Illumina HiSeq™ 2500 sequencing platform. The expression verification of three P450 genes and the expression change of six P450 genes in different populations and the beetles exposed to LD<sub>50</sub> of thiamethoxam for 72 h were performed by real-time quantitative PCR (qRT-PCR). 【Result】Resistance monitoring results showed that the adults of YN1, URMQ1, TC and QPQL1 populations in 2018 and YN2 and JMS in 2019 developed low to moderate level resistance to thiamethoxam with resistance ratio (RR) ranging from 5.99 to 20.33 times. The P450 activities of adults from two sensitive populations URMQ2 and URMQ3 and two resistant populations YN2 and JMS after treatment with thiamethoxam LD<sub>50</sub> for 72 h were significantly increased to 1.76, 2.75, 1.91 and 1.66 times as high as the control, respectively. In addition, the GST (CDNB and DCNB as substrates) of URMQ3 population and the EST activities of URMQ2 and YN2 populations were obviously increased to 1.19, 2.10 and 1.35, 1.91 times of the control, respectively. Based on Illumina RNA sequencing, the raw reads (56 872 051 and 62 249 136), clean reads (55 903 706 and 61 082 076), clean bases (8.39 and 9.16 G) and error of basic group (0.03%) were obtained for the thiamethoxam-susceptible and -resistant samples of adult populations, respectively. Thirteen differentially expressed P450 genes were identified in the thiamethoxam-resistant sample, of which two genes were significantly up-regulated. The expression levels of three P450 genes, namely *CYP4C1*, *CYP9e2* and *CYP305a1* by RNA sequencing were validated by qRT-PCR analysis. Furthermore, *CYP9Ya*, *CYP9Yc*, *CYP4C1*, *CYP305a1* and *CYP9Z25* were up-regulated in the thiamethoxam-resistant adults, and the expression of *CYP9Ya*, *CYP9Yc* increased significantly in the 4th instar larvae and adults under thiamethoxam treatment. It was found by correlation analysis that there was a significant positive correlation between resistance level to thiamethoxam and *CYP9Ya* expression of adults. 【Conclusion】*CYP9Ya* may be involved in the production of thiamethoxam resistance in *L. decemlineata*, and the role of other genes cannot be ruled out.

**Key words:** *Leptinotarsa decemlineata*; thiamethoxam; resistance; cytochrome P450; gene expression

## 0 引言

【研究意义】马铃薯甲虫 (*Leptinotarsa decemlineata*) 属鞘翅目叶甲科, 是世界公认的马铃薯毁灭性检疫害虫。除直接取食危害寄主植物叶片外, 成虫还能传播褐斑病、环腐病等病害, 造成农作物产量和品质的巨大损失<sup>[1-2]</sup>。马铃薯甲虫自 20 世纪 90 年代初经哈萨克斯坦口岸传入我国新疆, 现已扩散至天山以北地带, 对当地马铃薯安全生产构成持续的威胁<sup>[3]</sup>。作为第 4 大类杀虫剂<sup>[4]</sup>, 新烟碱类杀虫剂以其作用机制独特、高效、低毒、对环境安全成为防治马铃薯甲虫的主要杀虫剂之一, 其中 1995 年问世的吡虫啉和 1998 年市场化的噻虫嗪分别为第 1 代和第 2 代新烟碱类药剂的代表品种<sup>[5]</sup>。随着使用的频繁, 国内外抗性调查发现马铃薯甲虫已对吡虫啉等产生了不同水平的抗性。因此, 阐明相关抗药性分子机制对于防止抗性加剧及延长该类药剂的使用寿命具有重要意义。【前人研究进展】ZHAO 等<sup>[6]</sup>2000 年报道纽约州长岛马铃

薯甲虫成虫对吡虫啉产生了 100—150 倍的极高水平抗性; MOTA-SANCHEZ 等<sup>[7]</sup>于 2006 年报道该地区种群对吡虫啉的抗性已发展到 309 倍, 另外美国特拉华、爱达荷、伊利诺斯等地区以及加拿大的安大略、爱德华王子岛、魁北克田间种群也对吡虫啉和噻虫嗪产生不同程度的抗性。在我国, 王志田等<sup>[8]</sup>调查发现新疆奇台和乌鲁木齐马铃薯甲虫成虫对吡虫啉的抗性个体达到 30% 左右; 刘萍等<sup>[9]</sup>监测发现 2009 年新疆 6 个马铃薯甲虫成虫种群中有 3 个对啶虫脒和噻虫嗪产生低水平抗性, 2010 年监测的 6 个种群均对噻虫嗪产生了抗性, 其中低抗和中抗种群各 3 个。由此可见, 新疆马铃薯甲虫对新烟碱类药剂尤其是噻虫嗪的抗性逐年发展。解毒代谢作用的增强是昆虫抗药性产生的重要机制之一。昆虫体内的解毒酶系主要包括细胞色素 P450 单加氧酶系 (cytochrome P450 monooxygenases, P450)、谷胱甘肽 *S*-转移酶 (glutathione *S*-transferase, GST) 和酯酶 (esterase, EST), 其中由 P450 介导的昆虫抗药性是主要的抗性机制。研究表明害虫对

新烟碱类杀虫剂抗性的产生主要与 P450 基因过表达有关。KAPLANOGLU 等<sup>[10]</sup>对吡虫啉抗性马铃薯甲虫种群中显著上调的 *CYP4Q3* 进行 RNA 干扰(RNA interference, RNAi), 验证了该基因在抗性产生中的作用; CLEMENTS 等<sup>[11-12]</sup>发现美国威斯康星州吡虫啉抗性马铃薯甲虫成虫 *CYP9Z26* 过表达, 通过 RNAi 可使马铃薯甲虫对吡虫啉的抗性水平降低, 作者随后在该抗性种群中又发现另一个过表达的 P450 基因 *CYP6K1*<sup>[13]</sup>。【本研究切入点】近年来抗性监测已发现新疆马铃薯甲虫对噻虫嗪的敏感性逐年下降, 抗性分布不断扩展且水平较高, 但有关抗性分子机制尚不明确。【拟解决的关键问题】监测新疆不同地区马铃薯甲虫对噻虫嗪的抗性水平, 测定噻虫嗪处理对主要解毒酶活性的影响, 利用转录组分析抗性和敏感种群的差异表达基因 (differentially expressed gene, DEG), 定量分析不同田间种群以及噻虫嗪处理后的 6 个 P450 基因的表达水平, 筛查与噻虫嗪抗性相关的 P450 基因, 为阐明马铃薯甲虫

对噻虫嗪的代谢抗性分子机制打下基础, 同时为马铃薯甲虫的抗性治理提供依据。

1 材料与方法

试验于 2018—2019 年在新疆农业科学院植物保护研究所安宁渠试验基地和南京农业大学植物保护学院昆虫生理生化与分子生物学实验室完成。

1.1 供试昆虫

马铃薯甲虫分别于 2018 年和 2019 年 6—7 月采自新疆察布查尔县 (Qapqal, QPQL)、伊宁县 (Yining, YN)、塔城市 (Tacheng, TC)、乌鲁木齐市 (Urumqi, URMQ) 和吉木萨尔县 (Jimusar, JMS) 的田间马铃薯苗上, 种群具体采集信息见表 1。室内用马铃薯苗饲养, 养虫室条件为 (26±1)℃, 相对湿度 50%—60%, 光周期为光/暗=16 h/8 h。选取大小一致、生长状态良好的 4 龄幼虫和成虫作为试虫。2018 年抗性测定参照的敏感种群 QPQL-S 于 2015 年 6 月采自察布查尔县扎库齐牛录乡, 不接触药剂下饲养 3 年。

表 1 马铃薯甲虫种群采集信息  
Table 1 Sampling information of *L. decemlineata* populations

| 采集时间 Sampling time | 种群 Population | 采集地点 Sampling location                       |
|--------------------|---------------|--|
| 2018-06            | 察布查尔 QPQL1    | 察布查尔县扎库齐牛录乡 Zhakuqiniulu Town, Qapqal County |
| 2018-06            | 伊宁 YN1        | 伊宁县英塔木乡 Yingtamu Town, Yining County         |
| 2018-06            | 塔城 TC         | 塔城市阿西尔乡 Axier Town, Tacheng City             |
| 2018-07            | 乌鲁木齐 URMQ1    | 乌鲁木齐市安宁渠镇 Anningqu Town, Urumqi City         |
| 2019-06            | 察布查尔 QPQL2    | 察布查尔县扎库齐牛录乡 Zhakuqiniulu Town, Qapqal County |
| 2019-06            | 伊宁 YN2        | 伊宁县英塔木乡 Yingtamu Town, Yining County         |
| 2019-06            | 伊宁 YN3        | 伊宁县胡地于孜乡 Hudiyuzi Town, Yining County        |
| 2019-07            | 乌鲁木齐 URMQ2    | 乌鲁木齐市萨尔达坂乡 Saerdaban Town, Urumqi City       |
| 2019-07            | 乌鲁木齐 URMQ3    | 乌鲁木齐市头屯河区 Toutunhe District, Urumqi City     |
| 2019-07            | 乌鲁木齐 URMQ4    | 乌鲁木齐市板房沟乡 Banfanggou Town, Urumqi City       |
| 2019-07            | 吉木萨尔 JMS      | 吉木萨尔县泉子街镇 Quanzijie Town, Jimusar County     |

1.2 供试药剂

97%吡虫啉原药 (江苏红太阳有限公司); 95%噻虫嗪原药 (盐城双宁农化有限公司)。

1.3 毒力测定

采用微量点滴法。使用丙酮溶解原药并稀释制备 1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.03125、0.015625、0.007813 mg·mL<sup>-1</sup> 系列梯度浓度的药液。采用 Hamilton 微量进样器进行药剂点滴, 药剂点滴部位: 成虫腹部腹面第

二节, 4 龄幼虫腹部背面的第 3、4 节; 点滴量: 4 龄幼虫 0.22 μL/头, 成虫 1.1 μL/头。点滴同体积的丙酮作为对照。每个处理试虫 10 头, 共 3 个重复。处理后置于塑料培养皿 (直径 9 cm), 在室内用新鲜马铃薯叶饲养, 72 h 后检查死亡虫数。马铃薯甲虫死亡标准参考刘萍等<sup>[9]</sup>和卢伟平等<sup>[14]</sup>。

1.4 解毒酶活性测定

1.4.1 酶液制备 收集 URMQ2、URMQ3、YN2 和

JMS 种群成虫分别经噻虫嗪 LD<sub>50</sub> 点滴法处理 72 h 后的存活个体, 对照为丙酮处理, 将试虫单头放于匀浆器内, 加入 1.2 mL 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸缓冲液 (pH 7.6, 其中含 1 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA, 1 mmol·L<sup>-1</sup> DTT, 1 mmol·L<sup>-1</sup> PTU, 1 mmol·L<sup>-1</sup> PMSF) 匀浆用于细胞色素 P450 单加氧酶活性测定; 加入 1.2 mL 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸缓冲液 (pH 7.6) 匀浆用于谷胱甘肽 S-转移酶活性测定; 加入 1.2 mL 0.02 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 匀浆用于酯酶活性测定。匀浆液于 4℃, 13 000×g 下离心 15 min 后, 将上清液转移到新的 1.5 mL 离心管, 重复离心一次后, 取上清液作为酶源。每个处理 6 个生物学重复, 3 个技术性重复。

**1.4.2 P450 活性测定** 在 96 孔酶标板中加入 100 μL 2 mmol·L<sup>-1</sup> 对硝基苯甲酚 (PNA) 和 90 μL 酶液, 混合液在 30℃ 温育 3 min, 然后加入 10 μL 9.6 mmol·L<sup>-1</sup> NADPH 启动反应。利用 SPECTRA max@340-PC 型酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司) 在波长 405 nm 下记录 15 min 内的吸光值变化, 酶促反应温度为 30℃。

**1.4.3 GST 活性测定** 在 96 孔酶标板中分别加入 10 μL 稀释 10 倍的酶液 (CDNB 为底物) 或 25 μL 酶液 (DCNB 为底物)、1.2 mmol·L<sup>-1</sup> CDBN 或 DCNB 100 μL, 以及 6 mmol·L<sup>-1</sup> 谷胱甘肽 (GSH) 100 μL。在波长 340 nm 下记录 10 min 内的吸光值变化, 酶促反应温度为 27℃。

**1.4.4 EST 活性测定** 在 96 孔酶标板中分别加入 20 μL 稀释 10 倍的酶液, 0.2 mol·L<sup>-1</sup> PBS (pH 6.0) 与固蓝 RR 盐和 α-乙酸萘酯 (α-NA) 的乙醇溶液 (100 mmol·L<sup>-1</sup>) 以 1 : 2 : 0.01 比例的混合液 205 μL, 在波长 450 nm 下记录 10 min 内的吸光值变化, 酶促反应温度为 27℃。

**1.4.5 蛋白含量测定** 采用 Bradford 考马斯亮蓝法测定粗酶液的蛋白质含量, 以 BSA 做标准曲线<sup>[15]</sup>。

## 1.5 转录组测序

URMQ3 和 JMS 种群成虫用于转录组测序分析, 每个种群设置 3 个重复, 每个重复 3 头试虫。

转录组测序数据组装及分析: RNA 的提取、cDNA 文库的建立及测序工作由北京诺禾致源科技股份有限公司完成, 采用 Illumina HiSeq™2500 系统进行测序。使用 HISAT2v2.0.5 构建参考基因组的索引, 并使用 HISAT2 v2.0.5 将配对末端 clean reads 与参照基因组比对, 采用 StringTie 软件新转录本进行组装<sup>[16]</sup>。

转录组差异表达基因的筛选: 首先对原始的

readcount 进行标准化 (normalization), 主要是对测序深度的校正。然后通过统计学模型进行假设检验概率 (*P*-value) 的计算, 最后进行多重假设检验校正 (BH), 得到 FDR 值 (错误发现率)。以 *P* < 0.05、|log<sub>2</sub>fold change(FC)| ≥ 1 作为筛选标准<sup>[17]</sup>, |log<sub>2</sub>FC| 越大, 则基因表达差异越明显。筛选出解毒代谢酶、表皮蛋白、ABC 转运蛋白、烟碱型乙酰胆碱受体等与抗性相关的差异表达基因。

## 1.6 马铃薯甲虫种群 P450 基因表达量分析

**1.6.1 总 RNA 提取及反转录** 将马铃薯甲虫 4 龄幼虫和成虫单头分别按照 Trizol 试剂说明进行总 RNA 提取, 于 -80℃ 冰箱贮存备用, 每个处理 6 个重复。按照 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser (日本 TaKaRa 公司) 反转录试剂盒说明书合成 cDNA。

**1.6.2 实时荧光定量 PCR** 根据 GenBank 上马铃薯甲虫 *CYP9Ya*、*CYP9Yc*、*CYP9Z25*、*CYP4C1*、*CYP9e2*、*CYP305a1* 的序列 (NCBI 登录号分别为 XP\_023027514、XP\_023018115、XP\_023018114、XP\_023021616、XP\_023023178、XP\_023015477), 利用 Beacon Designer 7.0 软件设计荧光定量 PCR 引物, 委托南京金斯瑞公司合成, 以 *RPL4* 和 *Ef1α* 作为内参基因<sup>[18]</sup>, 引物序列见表 2。采用 ABI 7500 实时 PCR 系统 (美国 Applied Biosystems 公司), 以 SYBR Green 为染料, 用稀释 5 倍的 cDNA 作为模板, 测定 P450 基因的相对表达水平。反应体系: SYBR Premix Ex Taq™ (2×) 10 μL, cDNA 模板 1.0 μL, 上、下游引物各 0.8 μL, ROX Reference Dye2 (50×) 0.4 μL, 用无核酶水补足至 20 μL。PCR 程序采用两步法: 95℃ 30 s; 95℃ 5 s; 60℃ 34 s, 共 40 个循环, 然后 95℃ 15 s; 60℃ 60 s; 95℃ 15 s 用于记录熔解曲线。每组试验重复 3 次。

## 1.7 数据处理与分析

死亡率和校正死亡率的计算使用 Abbott 公式, 采用机率值分析法计算毒力回归曲线、LD<sub>50</sub>、相关系数及 95% 置信限, 抗性倍数 (RR) = 田间测试种群的 LD<sub>50</sub> / (相对) 敏感种群的 LD<sub>50</sub>。抗药性水平参照以下标准: 敏感 (RR < 3.0)、敏感性降低 (RR 3.1—5.0)、低水平抗性 (RR 5.1—10.0)、中水平抗性 (RR 10.1—40.0)、高水平抗性 (RR 40.1—160.0) 和极高水平抗性 (RR > 160.0)<sup>[19]</sup>。利用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 方法<sup>[20]</sup> 计算相对表达量, 数据用 Excel 2003 进行分析。利用 SPSS 18.0 软件 (One-way ANOVA) 进行数据的差异显著性分析 (Tukey 检验, *P* < 0.05), 以及对抗性水平和基因表达量进行相关性分析。

表 2 马铃薯甲虫实时荧光定量 PCR 引物  
Table 2 The primers of *L. decemlineata* for qRT-PCR

| 基因 Gene         | 上游引物序列 Forward primer sequence (5'-3') | 下游引物序列 Reverse primer sequence (5'-3') |
|-----------------|--|--|
| <i>CYP9Ya</i>   | TGGACCAAAGAGTACCCGAAGGAA               | TCGACAATTCAGTCCGAGGTACGA               |
| <i>CYP9Yc</i>   | ATTTGGAAGTGGACCACGCAATTG               | GCCAAATTCCTTCTCGTCCAGCAAG              |
| <i>CYP9Z25</i>  | ACTTGCACACCTTTGAGAGCATCC               | TTGTCAACTTTCTCATGCCACCC                |
| <i>CYP4C1</i>   | AGCCTGACATTCCACTTC                     | CTGCTCCTCACTAACATCT                    |
| <i>CYP9e2</i>   | CATCATAGCACAAAGCATTCT                  | TTTCTCCACATAATTTCATCAG                 |
| <i>CYP305a1</i> | TTCCGAAGAATACGATGGT                    | GCGAAGATGAAGAGTTACAA                   |
| <i>RPL4</i>     | AAAGAAACGAGCATTGCCCTTCCG               | TTGTCGCTGACACTGTAGGGTTGA               |
| <i>Efla</i>     | AAGGTTTCCTTCAAGTATGCGTGGG              | GCACAATCAGCTTGCGATGTACCA               |

2 结果

2.1 新疆不同马铃薯甲虫种群对噻虫嗪的抗性

对于 4 龄幼虫，2018 年测试种群中，与敏感种群 QPQL-S 相比，YN1、TC 和 URMQ1 种群对噻虫嗪均表现敏感(RR 分别为 1.88、2.14 和 2.42 倍)，而 QPQL1

种群为敏感性降低（RR 为 4.23 倍）；2019 年测试种群中，URMQ2 种群对噻虫嗪的 LD<sub>50</sub> 最低（5.52 ng/头），以此作为相对敏感种群，URMQ3、URMQ4、JMS、QPQL2、YN3 种群对噻虫嗪均保持敏感（RR <3 倍），仅 YN2 种群敏感性降低（RR 为 3.71 倍）（表 3）。

表 3 新疆不同马铃薯甲虫种群 4 龄幼虫和成虫对噻虫嗪的敏感性  
Table 3 Susceptibility to thiamethoxam of *L. decemlineata* 4th instar larvae and adults from Xinjiang

| 虫态<br>Stage               | 年份<br>Year | 种群<br>Population | 斜率 Slope<br>(b±SE) | 致死中量 (95%置信限)<br>LD <sub>50</sub> (95% FL) (ng/larva) | 抗性倍数<br>Resistant ratio (RR) |
|---------------------------|------------|------------------|--------------------|---|------------------------------|
| 4 龄幼虫<br>4th instar larva | 2018       | QPQL-S           | 3.456±0.419        | 6.64 (5.12-8.61)                                      | 1.00                         |
|                           |            | YN1              | 2.588±0.090        | 12.40 (10.01-15.43)                                   | 1.88                         |
|                           |            | TC               | 3.236±0.211        | 14.08 (11.53-17.20)                                   | 2.14                         |
|                           |            | URMQ1            | 3.438±0.255        | 16.04 (13.08-19.67)                                   | 2.42                         |
|                           |            | QPQL1            | 1.255±0.086        | 27.94 (17.02-45.81)                                   | 4.23                         |
|                           | 2019       | URMQ2            | 10.911±2.538       | 5.52 (5.21-5.84)                                      | 1.00                         |
|                           |            | URMQ3            | 2.829±0.270        | 5.85 (4.69-7.29)                                      | 1.05                         |
|                           |            | JMS              | 11.508±3.571       | 5.93 (5.60-6.28)                                      | 1.07                         |
|                           |            | QPQL2            | 2.514±0.240        | 9.64 (7.49-12.42)                                     | 1.75                         |
|                           |            | URMQ4            | 2.483±0.205        | 12.97 (9.62-17.49)                                    | 2.36                         |
|                           |            | YN3              | 2.095±0.293        | 14.99 (11.38-19.76)                                   | 2.73                         |
|                           |            | YN2              | 2.607±0.105        | 20.41 (14.76-28.22)                                   | 3.71                         |
| 成虫<br>Adult               | 2018       | QPQL-S           | 1.648±0.098        | 9.42 (6.73-13.39)                                     | 1.00                         |
|                           |            | YN1              | 2.665±0.075        | 56.33 (45.14-70.22)                                   | 5.99                         |
|                           |            | URMQ1            | 5.934±0.321        | 82.76 (74.50-91.94)                                   | 8.81                         |
|                           |            | TC               | 6.857±0.460        | 102.11 (94.00-110.92)                                 | 10.86                        |
|                           |            | QPQL1            | 1.719±0.085        | 191.11 (139.32-262.28)                                | 20.33                        |
|                           | 2019       | URMQ2            | 11.203±1.607       | 24.69 (22.81-26.72)                                   | 1.00                         |
|                           |            | URMQ3            | 3.707±0.551        | 37.65 (30.57-46.38)                                   | 1.53                         |
|                           |            | URMQ4            | 3.023±0.406        | 58.31 (46.96-72.41)                                   | 2.36                         |
|                           |            | QPQL2            | 1.636±0.091        | 85.25 (61.06-119.00)                                  | 3.45                         |
|                           |            | YN3              | 2.802±0.102        | 111.19 (89.43-138.25)                                 | 4.50                         |
|                           |            | YN2              | 1.809±0.212        | 291.97 (161.07-529.24)                                | 11.82                        |
|                           |            | JMS              | 1.384±0.138        | 347.01 (204.51-588.80)                                | 14.05                        |

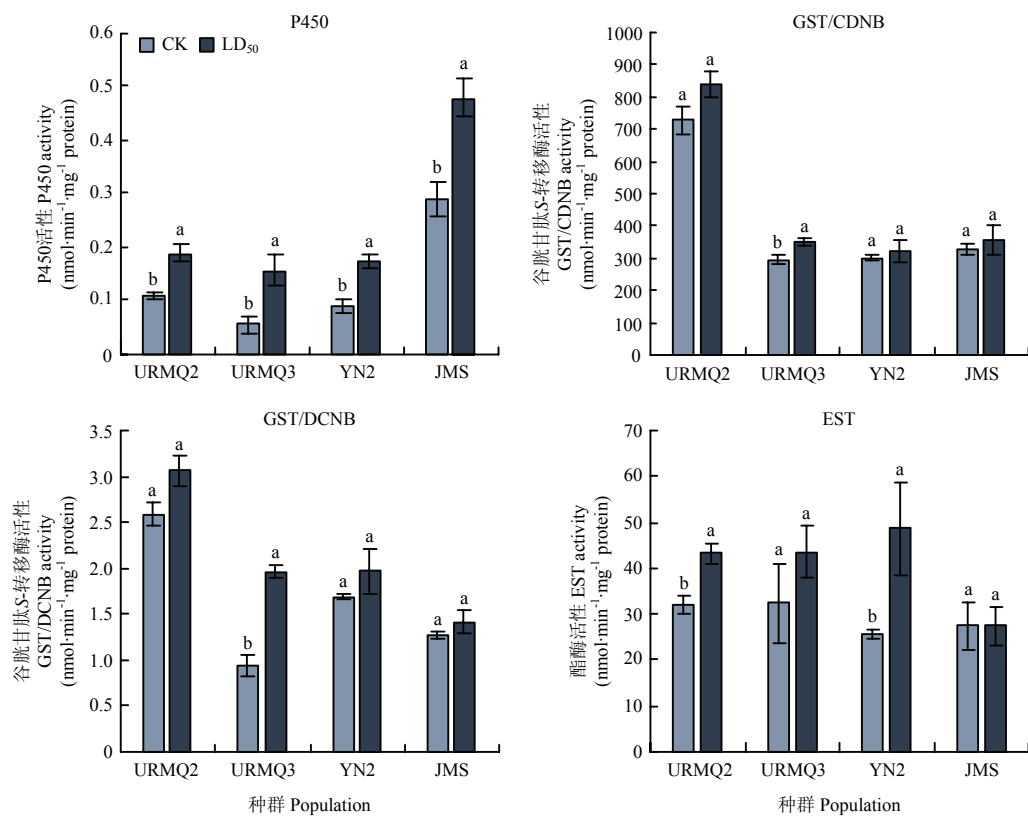
在成虫中，与 QPQL-S 相比，2018 年测试种群均对噻虫嗪产生抗性，其中 YN1 和 URMQ1 种群为低水平抗性，而 TC 和 QPQL1 种群已达中等水平抗性，RR 分别为 5.99、8.81、10.86 和 20.33 倍；2019 年所有种群中，URMQ2 种群对噻虫嗪的 LD<sub>50</sub> 最低，为 24.69 ng/头，与之相比，URMQ3 和 URMQ4 种群对噻虫嗪保持敏感（RR<3 倍），QPQL2、YN3 种群为敏感性降低，RR 分别为 3.45 和 4.50 倍，YN2 和 JMS 种群则达到中水平抗性，RR 分别为 11.82 和 14.05 倍（表 3）。

从两年的抗性监测结果可以看出新疆马铃薯甲虫成虫对噻虫嗪的敏感性普遍较低，抗性达低至中等水

平，而 4 龄幼虫对噻虫嗪普遍敏感。

2.2 噻虫嗪胁迫下马铃薯甲虫的解毒酶活性

噻虫嗪可引起 3 种解毒酶的活性发生改变。其中 P450 活性在 4 个测试种群 URMQ2、URMQ3、YN2、JMS 处理组的活性均显著提高，分别为对照的 1.76、2.75、1.91 和 1.66 倍；URMQ3 种群处理组的 GST 活性（CDNB 和 DCNB 为底物）活性显著升高，分别为对照的 1.19 和 2.10 倍，而其他种群的 GST 活性无显著变化；URMQ2 和 YN2 种群处理组的 EST 活性显著增加，分别为对照的 1.35 和 1.91 倍，其他种群的 EST 活性与对照相比差异不显著（图 1）。



图中数据为平均数±标准误，柱上不同字母表示差异显著（P<0.05）。下同  
Data in the figure are mean±SE. Different letters on the bars indicate significant difference at P<0.05 level. The same as below

图 1 噻虫嗪 LD<sub>50</sub> 处理 72 h 马铃薯甲虫成虫解毒酶活性的变化

Fig. 1 Changes of detoxification enzyme activities of *L. decemlineata* adults exposed to LD<sub>50</sub> of thiamethoxam for 72 h

2.3 马铃薯甲虫敏感和抗性种群的转录组分析及验证

2.3.1 转录组数据组装 对噻虫嗪敏感种群 URMQ3 和抗性种群 JMS 成虫进行转录组分析，分别获得

56 872 051 和 62 249 136 个原始序列数据以及 55 903 706 和 61 082 076 个过滤后的序列数据；过滤后的序列长度分别为 8.39 和 9.16 G；碱基错误率均为 0.03%；Phred 数值>20 的碱基占总碱基的百分比（Q20）分别为



97.77%和 97.75%; Phred 数值>30 的碱基占总碱基的百分比 (Q30) 分别为 93.28%和 93.25%; 鸟嘌呤+胞嘧啶 (guanine cytosine, GC) 含量分别为 38.95%和 38.68%, 表明转录组测序质量较高 (表 4)。

2.3.2 抗药性相关的差异表达基因 按照解毒机

制进行分类, 鉴定到差异表达的 P450 基因 13 个, 谷胱甘肽 S-转移酶基因 1 个, 酯酶基因 7 个, 尿苷二磷酸-葡萄糖基转移酶基因 9 个, 表皮蛋白基因 6 个, ABC 转运蛋白基因 12 个, 烟碱型乙酰胆碱受体基因 11 个 (表 5)。

表 4 敏感和抗性马铃薯甲虫种群成虫的转录组测序结果

Table 4 Sequencing results of susceptible and resistant adults of *L. decemlineata* from Xinjiang

| 样品<br>Sample | 原始序列个数<br>Number of raw<br>sequence | 过滤后的序列个数<br>Number of filtered<br>sequence | 过滤后的序列长度<br>Clean bases | 碱基错误率<br>Error of basic group<br>(%) | Q20 (%) | Q30 (%) | GC 含量 GC<br>content (%) |
|--------------|-------------------------------------|--|-------------------------|--------------------------------------|---------|---------|-------------------------|
| UMRQ3        | 56872051                            | 55903706                                   | 8.39 G                  | 0.03                                 | 97.77   | 93.28   | 38.95                   |
| JMS          | 62249136                            | 61082076                                   | 9.16 G                  | 0.03                                 | 97.75   | 93.25   | 38.68                   |

表 5 抗性种群和相对敏感种群的差异表达基因

Table 5 DEGs between the resistant population and relatively sensitive population

| 差异表达基因分类<br>DEG classification             | 所有基因<br>Whole<br>transcriptome | 上调基因<br>Up-regulated<br>gene | 下调基因<br>Down-regulated<br>gene | 显著上调基因<br>Significantly<br>up-regulated gene | 显著下调基因<br>Significantly<br>down-regulated gene |
|--|--------------------------------|------------------------------|--------------------------------|--|--|
| 细胞色素 P450 Cytochrome P450                  | 13                             | 3                            | 10                             | 2  | 3  |
| 谷胱甘肽 S-转移酶 Glutathione S-transferase       | 1                              | 0                            | 1                              | 0  | 0  |
| 酯酶 Esterase                                | 7                              | 3                            | 4                              | 0  | 0  |
| 尿苷二磷酸-葡萄糖基转移酶 UDP-glucuronosyltransferase  | 9                              | 4                            | 5                              | 1  | 3  |
| 表皮蛋白 Cuticular protein                     | 6                              | 3                            | 3                              | 0  | 0  |
| ABC 转运蛋白 ABC transporter                   | 12                             | 4                            | 8                              | 3  | 0  |
| 烟碱型乙酰胆碱受体 Nicotinic acetylcholine receptor | 11                             | 1                            | 3                              | 0  | 0  |

log<sub>2</sub>FC>1 为判断基因上调的标准,  $P<0.05$  即为显著。下同

Up-regulated transcripts were classified using a log<sub>2</sub>FC>1 and significant difference at  $P<0.05$  level. The same as below

抗性种群 JMS 中表达量上调的基因见表 6, 其中, 显著上调的 P450 基因有 2 个 (111509985、111511395)、ABC 转运蛋白基因 3 个 (有 2 个基因为新预测的基因, NCBI 未见相关序列, 由转录组测序公司编号)、尿苷二磷酸-葡萄糖基转移酶基因 1 个, 显著上调的基因用加粗字体表示。

2.3.3 抗性和敏感种群 P450 差异表达基因的验证 DEG 测序文库结果显示, 抗性种群 JMS 的 *CYP4C1* 和 *CYP9e2* 基因表达量显著上调 ( $P<0.05$ ), 分别为相对敏感种群的 13.45 和 4.44 倍, *CYP305a1* 在抗性种群中的表达量为相对敏感种群的 3.60 倍, 但差异不显著。qRT-PCR 检测结果显示这 3 个 P450 基因 *CYP4C1*、*CYP9e2* 和 *CYP305a1* 在 JMS 种群中的表达量显著上调 ( $P<0.05$ ), 分别为相对敏感种群 URMQ3

的 5.03、5.32 和 8.01 倍 (图 2)。qRT-PCR 检测结果与 DEG 测序文库显示的结果基本一致。

2.4 新疆不同马铃薯甲虫种群 P450 基因的表达水平

2018 年 4 龄幼虫中, 与 QPQL-S 相比, *CYP9Ya* 和 *CYP9Yc* 在 QPQL1 和 YN1 种群、*CYP9Z25* 在 TC 种群的表达量均显著增加, 表达量分别为 QPQL-S 的 1.90、1.58、1.53、1.44 和 1.61 倍 (图 3-A); 2019 年 4 龄幼虫中, 与相对敏感种群 URMQ2 相比, YN3 种群中 *CYP4C1*、*CYP9Z25* 的表达量最高, 显著增加为 URMQ2 的 6.74 和 4.15 倍; JMS 种群 *CYP9e2*、*CYP305a1* 以及 QPQL2 的 *CYP9Ya*、*CYP9Yc* 的表达量在所有种群中最高, 显著上调, 表达量分别是 URMQ2 的 5.35、21.95、3.51 和 3.11 倍。此外, 其他种群的其他基因表达量无显著变化 (图 3-B)。

表 6 抗性种群中表达量上调的基因  
Table 6 Up-regulated genes in the resistant population

| 基因名称 Gene symbol   | 基因号 Gene ID       | log <sub>2</sub> FC | P 值 P value     |
|--|-------------------|---------------------|-----------------|
| <b>CYP4C1 类基因 P450 4C1-like</b>  | <b>111509985</b>  | <b>3.75</b>         | <b>9.82E-17</b> |
| <b>CYP9e2 类基因 P450 9e2-like</b>  | <b>111511395</b>  | <b>2.15</b>         | <b>0.001</b>    |
| 可能为 <i>CYP305a1</i> 类基因 Probable P450 305a1  | 111504977         | 1.85                | 0.449           |
| 酯酶 E4 类基因 Esterase E4-like   | 111513709         | 2.41                | 0.051           |
| 酯酶 B1 类基因%2C 转录本变种 X1<br>Esterase B1-like%2C transcript variant X1   | 111502042         | 1.18                | 0.190           |
| 羧酸酯酶 6 类基因 Carboxylesterase-6-like   | 111514530         | 1.07                | 0.553           |
| 2-羟乙酰鞘氨 1-β 类半乳糖基转移酶基因<br>2-hydroxyacylsphingosine 1-beta-galactosyltransferase-like                       | 111516632         | 1.69                | 0.444           |
| 2-羟乙酰鞘氨 1-β 类半乳糖基转移酶基因<br>2-hydroxyacylsphingosine 1-beta-galactosyltransferase-like                       | 111512327         | 1.90                | 0.457           |
| 未鉴定的 LOC111503457 Uncharacterized LOC111503457   | 111503457         | 1.52                | 0.543           |
| <b>尿苷二磷酸-葡萄糖基转移酶 2B30 类基因<br/>UDP-glucuronosyltransferase 2B30-like</b>                                    | <b>111513316</b>  | <b>2.52</b>         | <b>0.023</b>    |
| 蛹表皮蛋白 36 类基因 Pupal cuticle protein 36-like   | 111501889         | 3.28                | 0.073           |
| 幼虫表皮蛋白 A2B 类基因 Larval cuticle protein A2B-like   | 111503150         | 1.16                | 0.173           |
| 内表皮结构糖蛋白 SgAbd-8 类基因<br>Endocuticle structural glycoprotein SgAbd-8-like                                   | 111517484         | 3.91                | 0.173           |
| <b>ABC 转运蛋白跨膜区 ABC transporter transmembrane region</b>  | <b>novel.1120</b> | <b>7.53</b>         | <b>6.85E-06</b> |
| <b>多药耐药相关蛋白 1 类基因<br/>Multidrug resistance-associated protein 1-like</b>                                   | <b>111516459</b>  | <b>7.98</b>         | <b>7.63E-06</b> |
| <b>ABC 转运蛋白 ABC transporter</b>  | <b>novel.1273</b> | <b>7.35</b>         | <b>0.003</b>    |
| ATP-结合盒 G 亚家族类基因 1%2C 转录本变种 X1<br>ATP-binding cassette sub-family G member 1-like%2C transcript variant X1 | 111510979         | 1.79                | 0.553           |
| 烟碱型乙酰胆碱受体 α3 亚基 α3   | 111512651         | 1.00                | 0.683           |

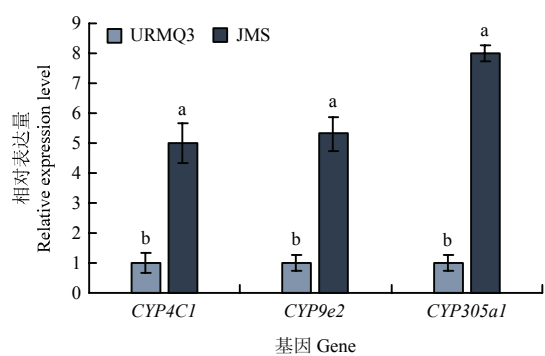


图 2 qRT-PCR 技术验证 3 个 P450 基因的表达  
Fig. 2 The relative level of three up-regulated P450 genes by qRT-PCR validation

2018 年成虫中, *CYP9Ya*、*CYP9Yc* 和 *CYP9Z25* 分别在 QPQL1、URMQ1 种群中显著上调, 表达量分

别为 QPQL-S 的 1.53、1.50 和 2.22 倍, 而 *CYP9Ya* 和 *CYP9Yc* 在 TC 种群中的表达量均显著降低, 表达量是 QPQL-S 的 49.45%和 52.55% (图 4-A); 2019 年成虫中, 与相对敏感种群 URMQ2 相比, YN2 种群 *CYP4C1*、*CYP9Yc* 的表达最高且显著增加, 表达量分别为 URMQ2 的 5.56、4.03 倍, *CYP305a1* 的表达量在 JMS 中最高, 显著高于 URMQ2 (6.6 倍), 其次是 QPQL2, 其他 4 个种群的表达量较低; *CYP9Z25* 在 YN3 的表达量最高, 显著上调, 表达量是 URMQ2 的 7.49 倍, 其次是 URMQ4 和 YN2 种群, JMS、QPQL2 和 URMQ3 种群的表达量较低; *CYP9e2* 的表达量在各种群中无显著变化 (图 4-B)。

2.5 噻虫嗪胁迫下马铃薯甲虫 P450 基因的表达分析  
将 2019 年马铃薯甲虫相对敏感种群 URMQ2 的 4 龄幼虫和成虫经噻虫嗪 LD<sub>50</sub> 处理 72 h, 利用 qRT-PCR 测定其 P450 基因的表达变化, 结果如图 5 所示。4 龄



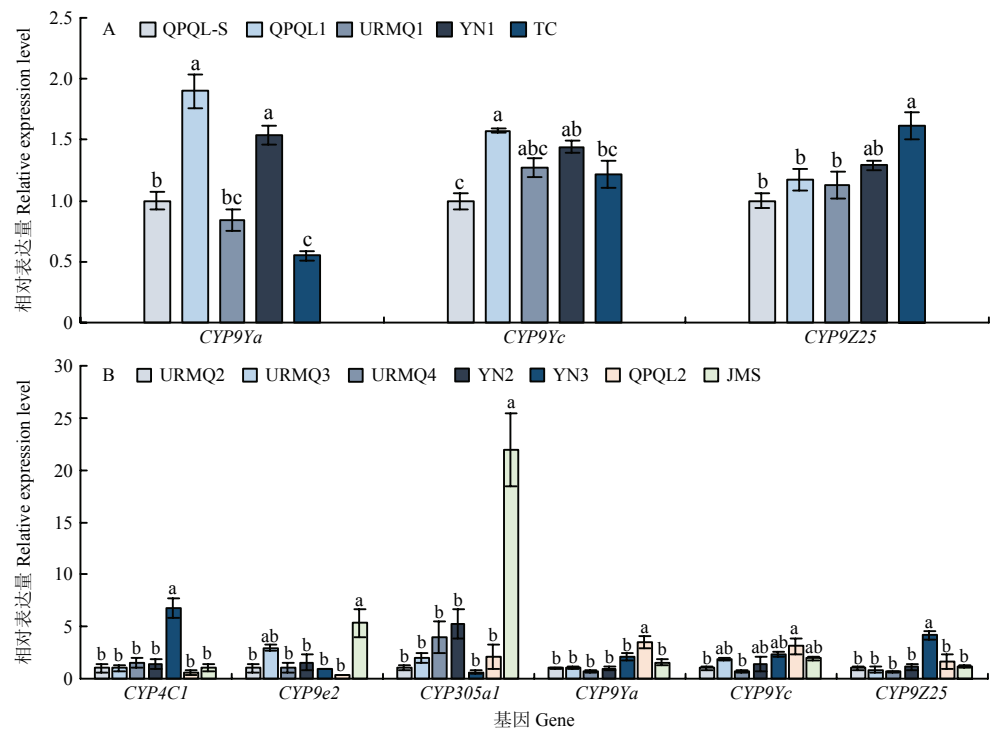


图 3 马铃薯甲虫田间种群 4 龄幼虫 P450 基因的相对表达量 (A: 2018; B: 2019)

Fig. 3 Relative expression of P450 genes in the field populations of *L. decemlineata* 4th instar larvae from Xinjiang in 2018 (A) and 2019 (B)

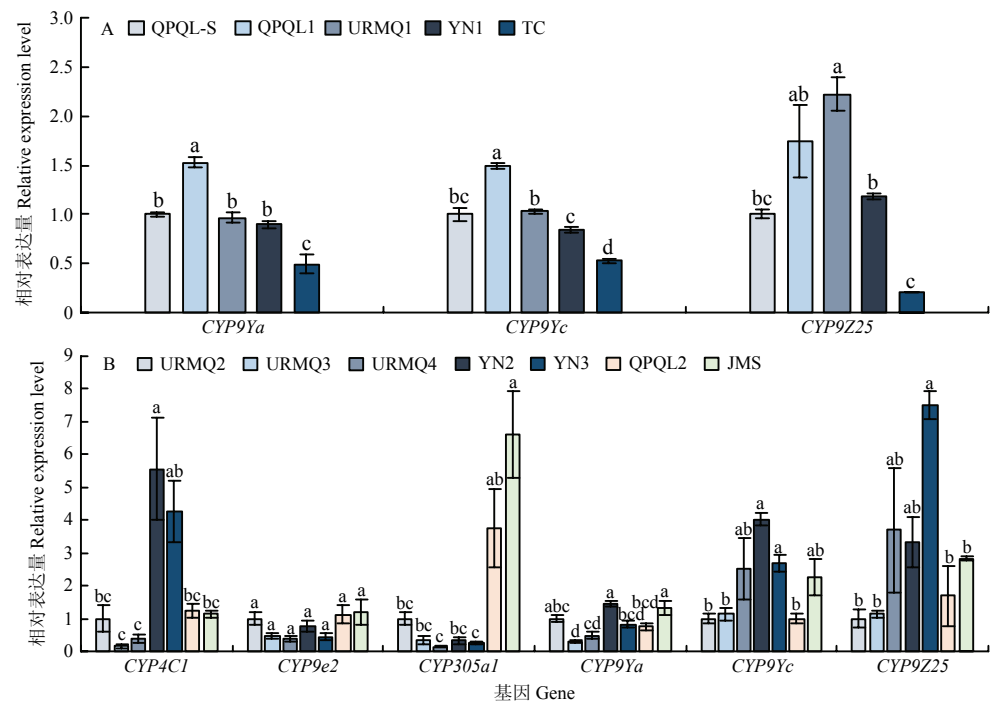


图 4 马铃薯甲虫田间种群成虫 P450 基因的相对表达量 (A: 2018; B: 2019)

Fig. 4 Relative expression of P450 genes in field populations of *L. decemlineata* adults from Xinjiang in 2018 (A) and 2019 (B)

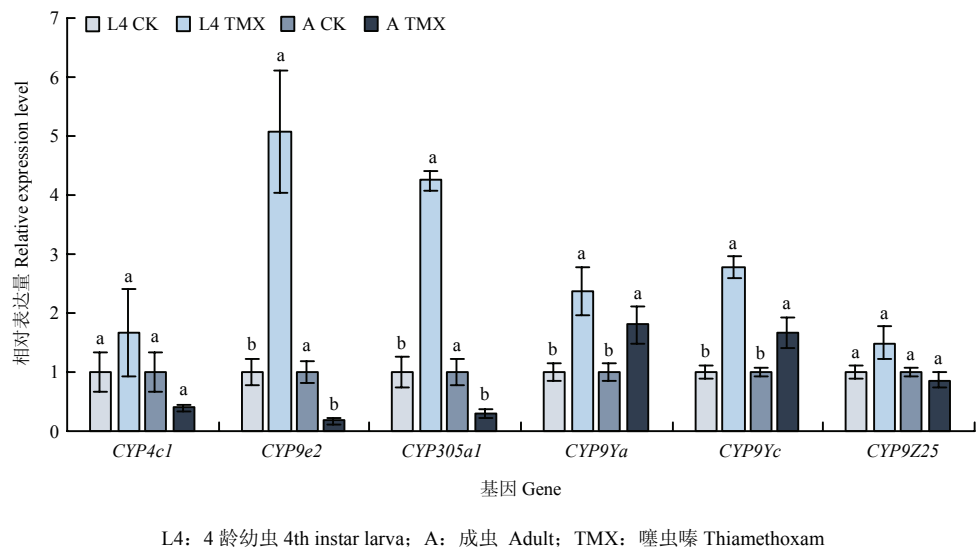


图 5 相对敏感种群 4 龄幼虫和成虫经噻虫嗪处理后 P450 基因的相对表达量

Fig. 5 Relative expression of P450 genes in 4th instar larvae and adults of relatively sensitive population of *L. decemlineata* exposed to thiamethoxam

幼虫中，以未处理同日龄的试虫为对照，处理组 *CYP9e2*、*CYP305a1*、*CYP9Ya*、*CYP9Yc* 的表达量显著上升，分别为对照的 5.08、4.25、2.38 和 2.79 倍；而成虫处理组 *CYP9Ya*、*CYP9Yc* 显著上调，表达量分别为对照的 1.80 和 1.68 倍，*CYP9e2*、*CYP305a1* 显著下调。可以看出，经噻虫嗪 LD<sub>50</sub> 处理均可诱导 4 龄幼虫和成虫 *CYP9Ya*、*CYP9Yc* 表达量显著增加，*CYP9e2*、*CYP305a1* 在 4 龄幼虫和成虫的表达变化则相反，而

*CYP4C1*、*CYP9Z25* 的表达量均无显著变化。

2.6 新疆马铃薯甲虫对噻虫嗪的抗性水平与 P450 基因表达量的相关性分析

利用 SPSS 分析 2018 年和 2019 年新疆马铃薯甲虫不同种群对噻虫嗪的抗性水平与上述 P450 基因表达量之间的相关性，结果如表 7 所示，马铃薯甲虫成虫对噻虫嗪的抗性水平与 *CYP9Ya* 表达量之间的相关系数 (*R*) 为 0.810 (*P*=0.027)，二者之间为高度显著正相关。

表 7 新疆马铃薯甲虫对噻虫嗪的抗性水平与 P450 基因表达量的相关性分析

Table 7 Correlation analysis between expression of P450 genes and resistance level to thiamethoxam of *L. decemlineata* from Xinjiang

| 采集时间<br>Sampling time | 基因<br>Gene      | R 值 R value            |          | P 值 P value            |          |
|-----------------------|-----------------|------------------------|----------|------------------------|----------|
|                       |                 | 4 龄幼虫 4th instar larva | 成虫 Adult | 4 龄幼虫 4th instar larva | 成虫 Adult |
| 2018                  | <i>CYP9Ya</i>   | 0.549                  | 0.548    | 0.338                  | 0.339    |
|                       | <i>CYP9Yc</i>   | 0.790                  | 0.487    | 0.112                  | 0.406    |
|                       | <i>CYP9Z25</i>  | 0.049                  | 0.309    | 0.938                  | 0.613    |
| 2019                  | <i>CYP9Ya</i>   | -0.096                 | 0.810*   | 0.838                  | 0.027    |
|                       | <i>CYP9Yc</i>   | -0.101                 | 0.646    | 0.829                  | 0.117    |
|                       | <i>CYP9Z25</i>  | 0.270                  | 0.189    | 0.558                  | 0.685    |
|                       | <i>CYP4C1</i>   | 0.667                  | 0.679    | 0.102                  | 0.094    |
|                       | <i>CYP9e2</i>   | -0.198                 | 0.426    | 0.670                  | 0.340    |
|                       | <i>CYP305a1</i> | 0.144                  | 0.179    | 0.758                  | 0.702    |
|                       |                 |                        |          |                        |          |

### 3 讨论

马铃薯甲虫对杀虫剂容易产生抗性,对于一种新的杀虫剂,往往在使用2—4年就产生明显的抗药性<sup>[2]</sup>。噻虫嗪是新疆地区防治马铃薯甲虫的主推药剂之一,随着使用周期的累积,其抗性发展不可避免。2009、2010年的调查发现新疆马铃薯甲虫4龄幼虫对噻虫嗪普遍敏感,仅2010年特克斯(TKS)种群产生8.03倍的低水平抗性<sup>[14]</sup>;同时马铃薯甲虫成虫的抗性监测显示2009年昌吉(CJ)种群对噻虫嗪具有5.22倍的低水平抗性,2010年CJ、QPQL、TC和URMQ1种群对噻虫嗪发展了低到中等水平抗性(7.48、5.98、10.15和10.39倍)<sup>[9]</sup>。本研究抗性监测表明2018年YN1、URMQ1、TC和QPQL1以及2019年YN2、JMS田间种群成虫对噻虫嗪产生了5.99—20.33倍的低至中水平抗性。其中2019年YN2种群对噻虫嗪的抗性水平比2018年YN1种群增加了1倍。对上述采集地用药情况的调查发现,察布查尔、伊宁地区近3年均施用噻虫嗪、吡虫啉等药剂,吉木萨尔县近10年持续使用阿立卡(12.6%噻虫嗪·9.4%高效氯氟氰菊酯)防治马铃薯甲虫。可见长期、频繁的用药导致当地种群对新烟碱类杀虫剂的敏感性明显下降。另外,还可以发现本文的监测结果与刘萍等<sup>[9]</sup>、卢伟平等<sup>[14]</sup>的调查结果具有相似的趋势,即成虫对噻虫嗪的敏感性较低,而幼虫的敏感性较高,且随着时间发展田间最高抗性水平有所上升。虽然新疆马铃薯甲虫对噻虫嗪的抗性还处于低至中等水平,但其发展不容忽视,注意合理轮换使用不同作用机制的药剂,尽量避免在高龄期或成虫期用药,同时开展持续的抗性监测及抗性机制研究是马铃薯甲虫抗性治理的重要前提。

细胞色素P450单加氧酶是马铃薯甲虫代谢吡虫啉的主要酶系。ZHAO等<sup>[6]</sup>研究发现,胡椒基丁醚在纽约州长岛马铃薯甲虫成虫和幼虫中对吡虫啉都有明显增效作用;MOTA-SANCHEZ等<sup>[7,21]</sup>在其他种群的增效研究也获得同样的结果。在本研究中,噻虫嗪LD<sub>50</sub>处理72h都可引起敏感和抗性马铃薯甲虫4个种群的P450活性显著升高,另外URMQ2和YN2种群的EST及URMQ3种群的GST活性也显著增加,这表明P450可能在马铃薯甲虫对噻虫嗪的解毒代谢中起主要作用。类似的研究发现褐飞虱(*Nilaparvata lugens*)噻虫嗪抗性种群的细胞色素P450活性也显著高于室内敏感品系(2.13倍)<sup>[22]</sup>。

近年来随着分子生物学及生物信息学的快速发展,

有关昆虫对新烟碱类杀虫剂抗性的解毒代谢分子机制也取得了一系列进展<sup>[10-13]</sup>。为了筛查新疆马铃薯甲虫对噻虫嗪抗性相关的解毒酶基因,本研究就马铃薯甲虫噻虫嗪抗性和敏感成虫进行转录组分析,结果发现与抗性相关的显著差异表达的上调解毒酶基因有P450基因2个、尿苷二磷酸-葡萄糖基转移酶基因1个、ABC转运蛋白基因3个,但未见有显著差异表达的酯酶和谷胱甘肽S-转移酶基因。CLEMENTS等<sup>[23]</sup>将吡虫啉处理后的马铃薯甲虫与对照进行转录组测序,按照解毒机制进行分类,发现吡虫啉可诱导4个P450基因、1个尿苷二磷酸-葡萄糖基转移酶基因以及1个羧酸酯酶基因上调。可见不同背景的种群其解毒酶基因的表达量变化不同。本文利用qRT-PCR验证转录组数据中3个上调的P450基因*CYP4C1*、*CYP9e2*和*CYP305a1*在抗性种群的表达量,结果与DEG数据基本一致,另外结合ZHU等<sup>[18]</sup>在美国长岛马铃薯甲虫吡虫啉抗性种群中发现的过表达基因*CYP9Z25*、*CYP9Ya*和*CYP9Yc*,本研究进一步对上述6个P450基因在新疆马铃薯甲虫不同田间种群的表达进行了比较分析,结果表明,4龄幼虫中,对噻虫嗪敏感性降低的QPQL1种群中*CYP9Ya*、*CYP9Yc*的表达量显著增加;成虫中,对噻虫嗪低水平抗性的URMQ1种群中*CYP9Z25*高表达,*CYP9Ya*和*CYP9Yc*、*CYP4C1*和*CYP9Yc*以及*CYP305a1*分别在QPQL1、YN2以及JMS种群中显著上调,这些种群对噻虫嗪达到中水平抗性。综上,可以看出*CYP9Ya*和*CYP9Yc*在敏感性降低的幼虫和抗性成虫种群中表达量均显著提高,除*CYP9e2*以外其他5个基因在抗性成虫中都显著上调,表明这些基因可能参与了新疆马铃薯甲虫对噻虫嗪抗性的产生。

吡虫啉对昆虫P450基因表达具有诱导作用。ZHU等<sup>[18]</sup>研究显示对吡虫啉约30倍抗性的美国长岛马铃薯甲虫种群中有21个P450基因可被吡虫啉诱导上调表达;吡虫啉处理蜜蜂可引起6个P450基因的表达量增加<sup>[24]</sup>;大草蛉(*Chrysopa pallens*)幼虫经吡虫啉诱导4h其体内P450基因表达量略微上调,16h后转录水平达最高值,随后逐渐下降<sup>[25]</sup>。本文qRT-PCR结果表明,经噻虫嗪LD<sub>50</sub>处理72h,URMQ2种群4龄幼虫和成虫的*CYP9Ya*和*CYP9Yc*均显著上调表达。ZHANG等研究发现褐飞虱中13个可被吡虫啉诱导的P450基因在抗性种群中却无差异表达,而*CYP4FB2*、*CYP439B1*和*CYP6BD12*不能被吡虫啉诱导,但在抗性种群中表达上调<sup>[26]</sup>,这表明可被药剂诱导的基因与抗性相关的过表达基因并非完全一致。因此,综合本

研究中诱导试验及不同田间种群 P450 基因的表达分析结果, 在噻虫嗪抗性种群中显著上调同时又能被噻虫嗪诱导的基因即为 *CYP9Ya* 和 *CYP9Yc*。另外相关性分析显示成虫对噻虫嗪的抗性与 *CYP9Ya* 表达量呈显著正相关。而真正参与马铃薯甲虫对噻虫嗪抗性形成的基因有待进一步的功能验证。

## 4 结论

通过抗性监测发现 2018 年 YN1、URMQ1、TC 和 QPQL1 以及 2019 年 YN2 和 JMS 种群成虫对噻虫嗪产生了低至中水平抗性。噻虫嗪处理可引起测试种群 P450 活性的升高, 表明其在马铃薯甲虫对噻虫嗪抗性产生中可能起到重要作用。抗性和敏感种群的转录组分析以及 qRT-PCR 结果显示包括 *CYP9Ya* 和 *CYP9Yc* 的 5 个 P450 基因在抗性种群中显著上调, 同时噻虫嗪又可诱导这两个基因在 4 龄幼虫和成虫中的表达。结合相关性分析推测 *CYP9Ya* 与马铃薯甲虫对噻虫嗪的抗性形成密切相关, 但不排除其他 P450 基因以及其他解毒酶基因的作用。

## 参考文献 References

- [1] ALYOKHIN A. Colorado potato beetle management on potatoes: Current challenges and future prospects//Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology, 2009, 3(1): 10-19.
- [2] ALYOKHIN A, BAKER M, MOTA-SANCHEZ D, DIVELY G, GRAFIUS E. Colorado potato beetle resistance to insecticides. American Journal of Potato Research, 2008, 85: 395-413.
- [3] 郭文超, 吐尔逊, 许建军, 刘建, 何江, 李晶, 马德成, 王俊. 马铃薯甲虫识别及其在新疆的分布、传播和危害. 新疆农业科学, 2010, 47(5): 906-909.  
GUO W C, TU E R, XU J J, LIU J, HE J, LI J, MA D C, WANG J. Research on the identification of Colorado potato beetle and its distribution, dispersal and damage in Xinjiang. Xinjiang Agricultural Sciences, 2010, 47(5): 906-909. (in Chinese)
- [4] 须志平. 新烟碱类杀虫剂在作物保护方面的应用. 世界农药, 2009, 31(1): 18-21.  
XU Z P. Application of neonicotinoids insecticides in crop protection. World Pesticides, 2009, 31(1): 18-21. (in Chinese)
- [5] 王彦华, 王鸣华. 害虫对噻虫嗪抗性及其治理. 世界农药, 2008, 30(4): 42-45.  
WANG Y H, WANG M H. Pest resistance to thiamethoxam and its management. World Pesticides, 2008, 30(4): 42-45. (in Chinese)
- [6] ZHAO J Z, BISHOP B A, GRAFIUS E J. Inheritance and synergism of resistance to imidacloprid in the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). Journal of Economic Entomology, 2000, 93(5): 1508-1514.
- [7] MOTA-SANCHEZ D, HOLLINGWORTH R M, GRAFIUS E J, MOYER D D. Resistance and cross-resistance to neonicotinoid insecticides and spinosad in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae). Pest Management Science, 2006, 62(1): 30-37.
- [8] 王志田, 姜卫华, 李国清. 新疆北疆马铃薯甲虫成虫抗药性水平监测. 农药, 2010, 49(3): 206-208.  
WANG Z T, JIANG W H, LI G Q. Insecticide resistance in adult of the Colorado potato beetle among north Xinjiang Uygur autonomous region. Agrochemicals, 2010, 49(3): 206-208. (in Chinese)
- [9] 刘萍, 姜卫华, 卢伟平, 李国清. 新疆北疆马铃薯甲虫成虫对新烟碱类杀虫剂的敏感性变化. 农药学报, 2011, 13(3): 271-275.  
LIU P, JIANG W H, LU W P, LI G Q. Susceptibility of Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* adults from northern Xinjiang Uygur autonomous region to 4 neonicotinoids. Chinese Journal of Pesticide Science, 2011, 13(3): 271-275. (in Chinese)
- [10] KAPLANOGLU E, CHAPMAN P, SCOTT I M, DONLY C. Overexpression of a cytochrome P450 and UDP-glycosyltransferase is associated with imidacloprid resistance in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. Scientific Reports, 2017, 7: 1762.
- [11] CLEMENTS J, SCHOVILLE S, PETERSON N, LAN Q, GROVES R L. Characterizing molecular mechanisms of imidacloprid resistance in select populations of *Leptinotarsa decemlineata* in the central sands region of Wisconsin. PLoS ONE, 2016, 11(1): e0147844.
- [12] CLEMENTS J, SCHOVILLE S, PETERSON N, HUSETH A S, LAN Q, GROVES R L. RNA interference of three up-regulated transcripts associated with insecticide resistance in an imidacloprid resistant population of *Leptinotarsa decemlineata*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2017, 135: 35-40.
- [13] CLEMENTS J, OLSON J M, SANCHEZ-SEDILLO B, BRADFORD B, GROVES R L. Changes in emergence phenology, fatty acid composition, and xenobiotic-metabolizing enzyme expression is associated with increased insecticide resistance in the Colorado potato beetle. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 2020, 103(3): e21630.
- [14] 卢伟平, 刘萍, 姜卫华, 李国清. 4 种新烟碱类杀虫剂对马铃薯甲虫的触杀毒力比较. 农药, 2011, 50(2): 137-140.  
LU W P, LIU P, JIANG W H, LI G Q. Comparison of contact toxicities of 4 neonicotinoids against *Leptinotarsa decemlineata*. Agrochemicals, 2011, 50(2): 137-140. (in Chinese)

- [15] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248-254.
- [16] 祝海栋, 李瑞琳, 何小雨, 赵丹, 韩鑫胤, 牛北方. 六倍体小麦基因组注释流程构建与优化. *计算机系统应用*, 2019, 28(8): 222-228.
- ZHU H D, LI R L, HE X Y, ZHAO D, HAN X Y, NIU B F. Construction and optimization of hexaploid wheat genome annotation process. *Computer Systems and Applications*, 2019, 28(8): 222-228. (in Chinese)
- [17] LANGMEAD B, TRAPNELL C, POP M, SALZBERG S L. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology*, 2009, 10(3): R25.
- [18] ZHU F, MOURAL T W, NELSON D R, PALLI S R. A specialist herbivore pest adaptation to xenobiotics through up-regulation of multiple cytochrome P450s. *Scientific Reports*, 2016, 6: 20421.
- [19] 王彦华, 陈进, 沈晋良, 高聪芬, 黄悦, 张久双, 李文红, 周威君. 防治褐飞虱的高毒农药替代药剂的室内筛选及交互抗性研究. *中国水稻科学*, 2008, 22(5): 519-526.
- WANG Y H, CHEN J, SHEN J L, GAO C F, HUANG Y, ZHANG J S, LI W H, ZHOU W J. Laboratory screening and cross-resistance analysis of alternative insecticides for highly-toxic pesticides for controlling brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Chinese Journal of Rice Science*, 2008, 22(5): 519-526. (in Chinese)
- [20] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [21] MOTA-SANCHEZ D, WHALON M, GRAFIUS E, HOLLINGWOETH R. Resistance of Colorado potato beetle to imidacloprid. *Resistant Pest Management*, 2000, 11(1): 31-34.
- [22] 张钰明, 向兴, 王学贵. 噻虫嗪对褐飞虱的毒力及解毒代谢酶活性的影响. *华南农业大学学报*, 2020, 41(3): 80-85.
- ZHANG Y M, XIANG X, WANG X G. Effects of thiamethoxam on toxicity and detoxification metabolic enzyme activity of *Nilaparvata lugens*. *Journal of South China Agricultural University*, 2020, 41(3): 80-85. (in Chinese)
- [23] CLEMENTS J, SANCHEZ-SEDILLO B, BRADFIELD C A, GROVES R L. Transcriptomic analysis reveals similarities in genetic activation of detoxification mechanisms resulting from imidacloprid and chlorothalonil exposure. *PLoS ONE*, 2018, 13(10): e0205881.
- [24] WU M C, CHANG Y W, LU K H, YANG E C. Gene expression changes in honey bees induced by sublethal imidacloprid exposure during the larval stage. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2017, 88: 12-20.
- [25] 刘昌燕, 曾凡荣. 大草蛉 P450 基因 cDNA 片段的克隆及吡虫啉诱导表达. *中国生物防治学报*, 2014, 30(3): 427-433.
- LIU C Y, ZENG F R. Cloning of *Chrysopa pallens* P450 cDNA fragment and the expression induced by imidacloprid. *Chinese Journal of Biological Control*, 2014, 30(3): 427-433. (in Chinese)
- [26] ZHANG Y X, YANG Y X, SUN H H, LIU Z W. Metabolic imidacloprid resistance in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, relies on multiple P450 enzymes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2016, 79: 50-56.

(责任编辑 岳梅)