

摘 要

细胞色素 P450 介导棉蚜对吡虫啉与噻虫嗪抗性功能研究

新烟碱类杀虫剂由于其独特的作用机理一直在害虫防治过程中发挥着重要的作用。但经过多年的杀虫剂压力选择，田间大量的害虫种群已经对其产生了不同水平的抗性。本研究以棉蚜为研究对象，探究了棉蚜对两种重要的新烟碱类杀虫剂吡虫啉和噻虫嗪的抗性产生机制，以期寻找到延缓田间棉蚜种群对新烟碱类杀虫剂产生抗性的方法。

细胞色素 P450 (Cytochrome P450, P450) 是昆虫体内解毒代谢重要酶系之一，其广泛表达于昆虫的脂肪体、中肠、马氏管、神经系统和触角等组织器官中。本论文通过增效剂实验以及转录组测序的方式，初步判断棉蚜 P450 基因可能参与棉蚜对吡虫啉和噻虫嗪抗性的形成，随后运用转基因果蝇技术和 RNA 干扰技术探究 P450 在棉蚜对吡虫啉和噻虫嗪抗性中的作用。

本研究中，实验室敏感品系棉蚜 (SS) 与山东田间品系棉蚜 (SDR) 的生物测定结果表明，SDR 对吡虫啉和噻虫嗪具有较高水平抗性；而在 P450 抑制剂-胡椒基丁醚 (Piperinyl Butoxide, PBO) 的共处理下，SDR 的抗性水平显著下降，表明棉蚜 P450 可能与其对吡虫啉和噻虫嗪的抗性形成有关。经过转录组分析，发现大多数候选差异基因被富集在 P450 解毒代谢的途径中，而后筛选出 18 个 P450 基因表达量在抗性品系棉蚜中上调，可能与吡虫啉和噻虫嗪抗性相关。利用 GAL4/UAS 系统在转基因果蝇中过表达这 18 个 P450 基因并进行功能验证。转基因果蝇生物测定结果表明，*CYP6CY9*、*CYP6CZ1*、*CYP6DB1*、*CYP4CK1*、*CYP6CY22*、*CYP6CY18* 在果蝇中超量表达均显著提高其对吡虫啉和噻虫嗪的抗药性，其中 Act5C > *CYP6CY9* 系和 Act5C > *CYP6DB1* 品系对吡虫啉和噻虫嗪均具有超过 7 倍的抗性，Act5C > *CYP6CY9* 系对噻虫嗪抗药性提高 24.03 倍，对吡虫啉抗药性提高 10.24 倍。结合果蝇生物测定结果，选择转基因果蝇中对吡虫啉和噻虫嗪耐受性较高的 P450 基因进行 RNA 干扰实验，结果表明，抑制 *CYP4CK1*、*CYP6CY9*、*CYP6CY18*、*CYP6CY22*、*CYP6CZ1* 和 *CYP6DB1* 在 SDR 抗性棉蚜表达后，其死亡率均显著提高 20% 以上。

综上，对 SDR 品系 P450 基因功能研究表明，P450 参与了棉蚜对吡虫啉和噻虫嗪的解毒作用，且 *CYP4CK1*、*CYP6CY9*、*CYP6CY18*、*CYP6CY22*、*CYP6CZ1* 和 *CYP6DB1* 6 个 P450 基因在棉蚜对吡虫啉和噻虫嗪抗性产生过程中发挥着重要的作用。

关键词：

棉蚜、细胞色素 P450、吡虫啉、噻虫嗪、抗性机制

ABSTRACT

Cytochrome P450 mediates the function of Imidacloprid and Thiamethoxam resistance from *Aphis gossypii* Glover

Neonicotinoid insecticides have played an important role in pest control due to their unique mechanism of action. However, after years of insecticide pressure selection, pest populations in the field have developed varying levels of resistance to neonicotinoids. This study focuses on the cotton aphid (*Aphis gossypii*) and explores the mechanism of resistance to two important neonicotinoid insecticides, imidacloprid and thiamethoxam, in order to find ways to delay the development of resistance in *A. gossypii* populations in the field.

Cytochrome P450 (P450) is one of the important detoxification metabolic enzyme systems in insects, and is widely expressed in tissues and organs such as the fat body, midgut, Malpighian tubules, nervous system, and antennae of insects. In this paper, through synergist bioassay and transcriptome sequencing, it is preliminarily determined that the P450 gene in *A. gossypii* may be involved in the formation of imidacloprid and thiamethoxam resistance. Transgenic *Drosophila* and RNA interference technology were used to investigate the role of P450 in *A. gossypii* resistance to imidacloprid and thiamethoxam.

The bioassay results of laboratory sensitive *A. gossypii* strains (SS) and Shandong field strains (SDR) showed that SDR has a higher level of resistance to imidacloprid and thiamethoxam. However, under the co-treatment of the P450 inhibitor piperonyl butoxide (PBO), the resistance level of SDR significantly decreased, indicating that the P450 of *A. gossypii* may be related to its resistance to imidacloprid and thiamethoxam. By comparing the transcriptome data of SS and SDR strains of *A. gossypii*, it was found that most of the candidate differential genes were enriched in the pathway of P450 detoxification metabolism, and 18 P450 genes were selected as up-regulated in the resistant strains and possibly related to imidacloprid and thiamethoxam resistance. The GAL4/UAS system was used to overexpress these

18 P450 genes in transgenic *Drosophila*, and functional verification was carried out. The biological assay results of transgenic *Drosophila* showed that overexpression of *CYP6CY9*, *CYP6CZ1*, *CYP6DB1*, *CYP4CK1*, *CYP6CY22*, and *CYP6CY18* significantly increased their resistance to imidacloprid and thiamethoxam. Among them, the Act5C>*CYP6CY9* line and Act5C>*CYP6DB1* line both showed more than seven-fold resistance to imidacloprid and thiamethoxam, and the Act5C>*CYP6CY9* line showed a 24.03-fold increase in resistance to thiamethoxam and a 10.24-fold increase in resistance to imidacloprid. Based on the results of the *Drosophila* biological assay, P450 genes with higher tolerance to imidacloprid and thiamethoxam were selected for RNA interference experiments, and the results showed that inhibiting *CYP4CK1*, *CYP6CY9*, *CYP6CY18*, *CYP6CY22*, *CYP6CZ1*, and *CYP6DB1* expression in SDR-resistant *A. gossypii* significantly increased their mortality rate more than 20%.

In summary, the functional study of P450 genes in the SDR strain suggests that P450 may be involved in the detoxification of *A. gossypii* to imidacloprid and thiamethoxam, and six P450 genes (*CYP4CK1*, *CYP6CY9*, *CYP6CY18*, *CYP6CY22*, *CYP6CZ1*, and *CYP6DB1*) may play important roles resistance of *A. gossypii* to imidacloprid and thiamethoxam.

Key word:

Aphis gossypii, Cytochrome P450, imidacloprid, thiamethoxam, resistance mechanisms

目 录

摘 要	I
ABSTRACT	III
目 录	I
第一章 引言	5
1.1 常见杀虫剂的作用机理	5
1.2 新烟碱类杀虫剂及作用机制	6
1.2.1 新烟碱类杀虫剂简介	6
1.2.2 新烟碱类杀虫剂的作用机制	9
1.2.3 棉蚜对新烟碱类杀虫剂抗性研究现状	9
1.3 昆虫抗药性机制	10
1.3.1 行为抗性	11
1.3.2 穿透抗性	11
1.3.3 靶标抗性	12
1.3.4 代谢抗性	12
1.4 细胞色素 P450 概述	13
1.4.1 P450 命名与分类	13
1.4.2 P450 结构与功能	14
1.4.3 P450 分布表达多样性	15
1.4.4 P450 介导的昆虫抗药性机制	16
1.5 研究意义	17

第二章 增效剂对山东田间抗性棉蚜增效作用与转录组分析	19
2.1 实验材料	19
2.1.1 供试昆虫	19
2.1.2 实验试剂与仪器	19
2.2 实验方法	20
2.2.1 试剂配制	20
2.2.2 增效剂对山东田间抗性棉蚜的增效作用	20
2.2.3 转录组分析	21
2.2.4 棉蚜中肠组织的提取	22
2.2.5 棉蚜总 RNA 提取	22
2.2.6 棉蚜 cDNA 反转录	23
2.2.7 RT-qPCR	23
2.3 数据分析	25
2.4 结果与分析	26
2.4.1 PBO 对吡虫啉与噻虫嗪的增效作用	26
2.4.2 SDR 对 α -氯氰菊酯的抗性	26
2.4.3 转录组测序质量评估与组装结果	30
2.4.4 转录组相关性分析与差异基因的筛选	30
2.4.5 转录组中 DEGs 的 GO 和 KEGG 富集分析	31
2.4.6 RT-qPCR 分析 P450s 在 SS 和 SDR 棉蚜间表达差异	32
2.5 小结	33
2.6 讨论	34

第三章 转棉蚜 P450 基因果蝇对吡虫啉与噻虫嗪抗性研究35

3.1 实验材料	35
3.1.1 供试昆虫	35
3.1.2 实验试剂	35
3.1.3 实验仪器与材料	36
3.2 实验方法	36
3.2.1 P450 基因的克隆	36
3.2.2 转基因果蝇品系的构建	40
3.2.3 转基因果蝇的分子验证	41
3.2.4 转基因果蝇的饲养	41
3.2.5 转基因果蝇的抗药性检测	43
3.3 实验结果	45
3.3.1 验证 P450 转基因果蝇的过表达	45
3.3.2 过表达 P450 转基因果蝇对噻虫嗪的敏感性	45
3.3.3 过表达 P450 转基因果蝇对吡虫啉的敏感性	46
3.3.4 过表达 P450 转基因果蝇对 α -氯氰菊酯的敏感性	46
3.4 小结	50
3.5 讨论	50

第四章 RNAi 沉默验证 P450 基因参与棉蚜对吡虫啉与噻虫嗪抗性52

4.1 实验材料	52
4.1.1 供试昆虫	52
4.1.2 实验试剂与仪器	52

4.2 实验方法	52
4.2.1 dsRNA 预测及引物设计	52
4.2.2 dsRNA 短片段序列扩增及合成纯化	53
4.2.3 喂食 dsRNA	53
4.3 实验结果	54
4.3.1 P450s 沉默效率	54
4.3.2 沉默 P450s 后 SDR 品系棉蚜对噻虫嗪耐受性的变化	55
4.3.3 沉默 P450s 后 SDR 品系棉蚜对吡虫啉耐受性的变化	55
4.4 小结	56
4.5 讨论	57
结 论	58
参考文献	59
附 录	70
致 谢	73
作者简介	75

第一章 引言

1.1 常见杀虫剂的作用机理

化学杀虫剂的施用很大程度上缓解了公共卫生害虫和农业害虫对于人类社会为害 (Landrigan, 2018)。由于杀虫剂的不规范施用,带来了许多的生态问题,例如害虫对于化学杀虫剂的敏感性降低,产生了不同程度的抗药性以及对于多种药剂的交互抗性。另外,杀虫剂不可避免的对于非靶标生物造成了负面影响。因此深入了解害虫的抗性机制不仅能够降低杀虫剂的施用频率,同时还能为实现绿色植保方针提供理论基础。

有机氯类杀虫剂 (organochlorine pesticides, OCPs) 的基本构架是由碳和氢组成,而氯原子附加在碳原子上,主要包括双对氯苯基三氯乙烷型,六氯环己烷型和氯化酯环型等有杀虫效果的有机化合物 (Salihovic et al., 2016)。同时 OCPs 也是最早被发现和应用用于农业的人工合成具有神经性毒力的化学杀虫剂。双对氯苯基三氯乙烷型化合物的作用靶标是位于神经系统轴突上的钠离子通道,六氯环己烷型化合物的主要作用位点在位于中央神经系统的突触部位,而氯化酯环型化合物的作用靶标为中枢神经系统中的 γ -氨基丁酸氯离子通道的 GABA 受体,使昆虫兴奋、痉挛、麻痹直至死亡 (Bak et al., 2006)。OCPs 化学性质稳定且在环境中易残留,对非靶标生物和生态环境造成了严重的危害,其残留会对非靶标生物造成不良影响,例如对人类生殖干扰和代谢性疾病等问题 (Freire et al., 2011; Rantakokko et al., 2015)。

有机磷类杀虫剂 (organophosphates, OPs) 是磷酸和硫代磷酸酯类化合物具有神经毒性,通常用于农业和工业领域或者施用于家庭环境中 (Roman et al., 2019)。OPs 的作用机制在于抑制了乙酰胆碱的水解过程,导致其大量积累,最终使神经冲动异常传导 (Georgiadis et al., 2018)。此外,OPs 过量施用和残留会对人类的健康造成不良后果,例如会导致轴突转运缺陷、神经炎症和自身免疫性疾病 (Xu et al., 2015; Naughton and Terry, 2018)。

氨基甲酸酯 (Carbamate) 基于蔓生的豆科植物毒扁豆中的次级代谢产物毒扁豆碱的结构合成的化合物,该化合物属于氨基甲酸的酯类化合物 (King and

Aaron., 2015)。氨基甲酸酯农药的作用机理同 OPs 一样，通过抑制乙酰胆碱酯酶（AChE）活性，导致神经冲动传导异常，最终导致害虫生理和行为异常而死亡（Arora and Kumar, 2021）。氨基甲酸酯类农药在生物体内不稳定容易被水解，且与 AChE 的结合是可逆的，因此相比于 OPs，氨基甲酸酯类农药的有效持久力和毒力相对较低（Barlow and Bradberry, 2023）。

拟除虫菊酯类化学杀虫剂的活性成分是菊科菊属植物中天然除虫菊酯的类似物合成而来（Smith and Stratton, 1986）。根据拟除虫菊酯类杀虫剂的活性成分结构和毒力差异将其分为第一代和第二代拟除虫菊酯类杀虫剂（Soderlund, 2012）。第二代拟除虫菊酯杀虫剂相比于一代多了 α -氰基团，具有更强的神经毒性（Palmquist et al., 2011）。拟除虫菊酯的作用机制是主要改变轴突膜上 Na 离子的通透性，使 Na 离子通道长期开放，Na 离子不断透过使害虫由兴奋、痉挛到麻痹而死亡。而第二代拟除虫菊酯杀虫剂也会以钙离子和氯离子通道以及 γ 氨基丁酸（GABA）受体为次要作用位点（Schleier and Peterson, 2012）。除此之外，拟除虫菊酯类杀虫剂还会引起神经组织（中央神经系统和周围神经系统）的病变和生理生化的变化，拟除虫菊酯在控制蚊媒疾病，特别是防治疟疾虫媒方面发挥着突出作用（Palmquist et al., 2011）。由于哺乳动物和昆虫的钠离子通道结构高度保守，因此拟除虫菊酯类杀虫剂对于哺乳动物也会造成一定程度的威胁（Soderlund, 2012）。

1.2 新烟碱类杀虫剂及作用机制

1.2.1 新烟碱类杀虫剂简介

除有机磷、有机氯、氨基甲酸酯和拟除虫菊酯四类化学杀虫剂外，新烟碱类杀虫剂也是世界范围内使用最广泛的杀虫剂（Sparks and Nauen, 2015）。1972 年，壳牌公司的研究人员以烟草中天然烟碱为基础，通过对其结构修饰首次合成了一种烟碱类杀虫剂噻虫醛。由于噻虫醛存在较易水解、较差的光稳定性、对哺乳动物毒性高等问题，因此拜耳公司通过优化其生物活性成分，在 1991 年第一代新烟碱类杀虫剂吡虫啉被成功开发上市。此后新烟碱类杀虫剂不断的被研发，吡虫啉上市后不久，烯啶虫胺（Minamida et al., 1993; Takeda, 1995）和啉虫脒

(Takahashi et al., 1992; Nippon, 1996) 也相继被推向市场。新烟碱类杀虫剂和烟碱类杀虫剂的有效成分都来源于烟碱衍生物, 然而前者能有效的杀灭靶标生物、对哺乳动物危害低, 后者杀虫效力有限、对哺乳动物危害高。现如今市面上的新烟碱类杀虫剂分为三代, 第一代具有一个 6-氯吡啶-3-甲基作为杂环基团, 第二代以噻虫嗪为代表是市面上第一个含有 2-氯-5-噻唑杂环的新烟碱类杀虫剂商品 (Maienfisch et al., 2001b), 而随后上市的第三代新烟碱杀虫剂呋虫胺它不同于前二代, 其活性成分的结构不含氯原子和芳环, 并且其活性成分结构上的四氢呋喃基团取代了前两代的氯代吡啶和氯代噻唑基团 (Wakita et al., 2003)。根据新烟碱杀虫剂的结构和研发年份, 可将其具体分为杂环类: 噻虫啉 (1977 年)、吡虫啉 (1985 年)、噻虫啉 (1985 年) 和噻虫嗪 (1992 年); 无环类: 烯啶虫胺 (1988 年)、啉虫脒 (1989 年)、噻虫胺 (1989 年) 和呋虫胺 (1994 年) (Bass and Field, 2018)。新烟碱类杀虫剂的市场占有率为 24%, 取得了持久的成功 (Sparks et al., 2020)。

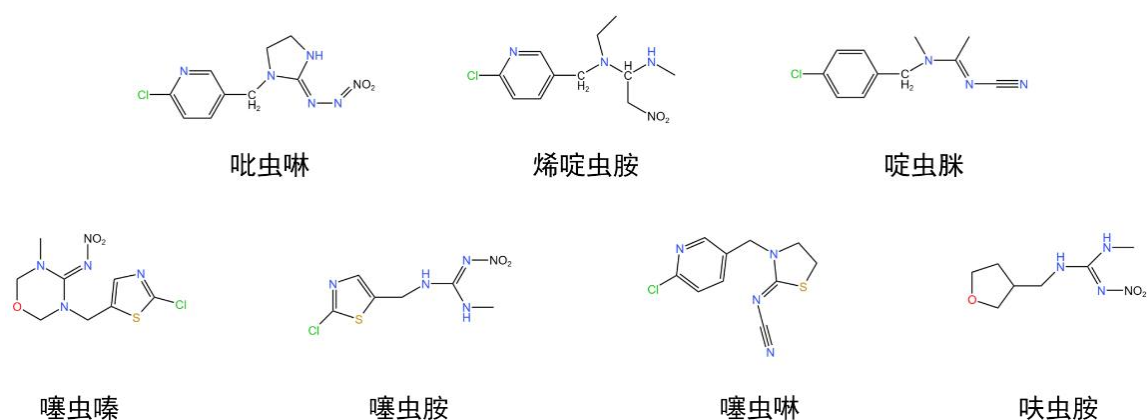


图 1.1 新烟碱类杀虫剂

Figure 1.1 Neonicotinoid pesticides

吡虫啉 (Imidacloprid, IMI) 作为被研发的第一个新烟碱类杀虫剂, 是尼古丁的氯化类似物, 其结构包含硝基亚胺基团和 6-氯-3-吡啶甲基 (CPM)。植物能够快速吸收吡虫啉, 且能够被植物转运到体内各处, 对于害虫同时兼有胃毒和触杀作用。自吡虫啉进入杀虫剂市场以来, 由于其选择性毒性和对生态环境低毒, 而被大家广泛使用。

表 1.1 吡虫啉的理化性质

Table 1.1 Physicochemical properties of imidacloprid

基本信息	吡虫啉
CAS 号	105827-78-9
分子式	$C_9H_{10}ClN_5O_2$
分子量	255.7
水中溶解度 g/L	0.51
密度 g/cm^3 (20°C)	1.543
熔点 °C	136.4-143.8

噻虫嗪 (Thiamethoxam) 属于第二代新烟碱类杀虫剂，其结构包含 2-氯-5-噻唑基杂环，位于 5 位的甲基基团增强了对刺吸式口器昆虫的杀虫活性，而 2-氯-5-噻唑杂环则是有效的增强对咀嚼害虫的杀虫效果，因此噻虫嗪具有更为出色的杀虫效果 (Maienfisch et al., 2001a)。噻虫嗪相比于目前已登记的新烟碱类杀虫剂具有突出的优势，即使施用量低于田间建议浓度，多数情况下也能获得出色的防治害虫效果 (Hilton et al., 2016)。

表 1.2 噻虫嗪的理化性质

Table 1.2 Physicochemical properties of thiamethoxam

基本信息	噻虫嗪
CAS 号	153719-23-4
分子式	$C_8H_{10}ClN_5O_3S$
分子量	291.7
水中溶解度 g/L	4.1
密度 g/cm^3 (20°C)	1.57
熔点 °C	139.1

由于新烟碱类杀虫剂超高的杀虫活性，因此很快的在全球范围内被不断开发和推广。截至 2018 年，新烟碱类杀虫剂已成为全球市场份额占有率最高的一类杀虫剂，高达 24% (Sparks et al., 2020)。新烟碱类杀虫剂由于其独特的化学和生物特性使其具有高效的杀虫活性，例如其广谱性、低施用性、新颖的作用机制 (Krupke et al., 2017; Bora et al., 2019)。新烟碱类杀虫剂很好的补充了对于农业害虫的控制方法，其对于刺吸食害虫 (蚜虫、叶蝉和粉虱) 作用迅速、效果显著 (Matsuda et al., 2020)。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/627200161111006053>