

亚致死浓度氟氟虫腈对小菜蛾三种解毒酶及 P450 mRNA 表达量的影响*

申 君^{1**} 鲁艳辉² 张淑真¹ 游 红¹ 李建洪^{1***}

(1. 华中农业大学植物科学技术学院, 武汉 430070; 2. 浙江省农业科学院植物保护与微生物研究所, 杭州 310021)

摘 要 【目的】为探讨亚致死浓度氟氟虫腈对小菜蛾 *Plutella xylostella*(L.) 3 种解毒酶和细胞色素 P450 基因表达量的影响。【方法】采用叶片浸渍法, 测定用氟氟虫腈 LC₁₀ 和 LC₂₅ 处理 72 h 后小菜蛾羧酸酯酶、谷胱甘肽 *S*-转移酶和多功能氧化酶 3 种解毒酶的活性; 应用实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 方法测定了其在 24、48 和 72 h 时对 P450 基因 (*PxCYP4*、*PxCYP6* 和 *PxCYP9* 家族) 表达的影响。【结果】结果表明, 氟氟虫腈 LC₁₀ 和 LC₂₅ 处理对羧酸酯酶活性影响不显著; 对谷胱甘肽 *S*-转移酶活性存在显著抑制作用 ($P < 0.05$); LC₂₅ 处理后多功能氧化酶活性显著增加 ($P < 0.05$), 为对照的 1.39 倍。同时, LC₂₅ 氟氟虫腈处理组小菜蛾 P450 基因 *PxCYP4M19*、*PxCYP6BF1V2*、*PxCYP6CN1* 和 *PxCYP6CV2* mRNA 的相对表达量分别为对照组的 2.33~8.5 倍、1.32~3.48 倍、1.18~2.53 倍、2.02~7.22 倍。【结论】结果显示, 氟氟虫腈可能通过诱导这 4 种 P450 基因 mRNA 的上调表达而增强了小菜蛾多功能氧化酶活性。
关键词 小菜蛾, 氟氟虫腈, 解毒酶, 细胞色素 P450 基因

Effects of sublethal concentrations of metaflumizone on detoxifying enzyme activity, and expression of cytochrome P450 genes, in *Plutella xylostella* (L.)

SHEN Jun^{1**} LU Yan-Hui² ZHANG Shu-Zhen¹ YOU Hong¹ LI Jian-Hong^{1***}

(1. College of Plant Science & Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Institute of Plant Protection and Microbiology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China)

Abstract [Objectives] To clarify the effects of sublethal concentrations of metaflumizone, a novel sodium channel blocker insecticide, on the activities of detoxifying enzymes (carboxylesterase, glutathione *S*-transferase and function oxidase), and the expression of cytochrome P450 genes, in *Plutella xylostella* (L.). [Methods] The activities of the three detoxifying enzymes and the mRNA expression levels of three P450 gene families (*PxCYP4*, *PxCYP6* and *PxCYP9*) in *P. xylostella* were measured in 3rd instar larvae treated with sublethal doses of metaflumizone (LC₁₀ and LC₂₅) via the leaf-dip bioassay method. [Results] There was no significant difference in carboxylesterase (CarE) activity compared with the control, but glutathione *S*-transferase activity (GSTs) was distinctly inhibited by sublethal concentrations of metaflumizone ($P < 0.05$). *O*-demethylation activities of mixed-function oxidases (MFOs) were significantly increased by sublethal concentrations of metaflumizone. When *P. xylostella* were treated with metaflumizone at LC₂₅ for 72 h, MFOs activity significantly increased ($P < 0.05$) to 1.39-fold that of the control. The relative expression levels of *PxCYP4M19*, *PxCYP6BF1V2*, *PxCYP6CN1* and *PxCYP6CV2* after exposure to metaflumizone (LC₂₅) were, respectively, 2.33-8.5-fold, 1.32-3.48-fold, 1.18-2.53-fold, and 2.02-7.22-fold, those of the control. [Conclusion] The results suggest that metaflumizone up-regulates the expression of four P450 genes

*资助项目 Supported projects: 公益性农业行业专项 (201103021)

**第一作者 First author, E-mail: shenjun996@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: jianhl@mail.hzau.edu.cn

收稿日期 Received: 2016-01-19, 接受日期 Accepted: 2016-02-27

and enhances the activity MFOs of in *P. xylostella*.

Key words *Plutella xylostella*, metaflumizone, detoxify enzymes, cytochrome P450 genes

小菜蛾 *Plutella xylostella* (L.) 是一种世界性十字花科蔬菜的主要害虫之一,全球每年造成的损失和防治费用高达 40~50 亿美元 (Furlong *et al.*, 2013), 长期以来以化学防治为主,致使小菜蛾对有机磷类、氨基甲酸酯类、拟除虫菊酯类、阿维菌素、多杀菌素和 Bt 等 79 种杀虫剂产生了抗药性 (Sun *et al.*, 2012)。

氟氟虫腈 (Metaflumizone) 是德国巴斯夫公司与日本农药株式会社联合推出的一种新型钠离子通道抑制剂,属缩氨基脲类杀虫剂,可以有效防治各种鳞翅目害虫幼虫及某些鞘翅目幼虫和成虫 (Salgado and Hayashi 2007; Takagi *et al.* 2007)。

杀虫剂施于田间可直接杀死大部分害虫,但由于害虫不同个体接触药量的差异和药剂的部分降解,对害虫及天敌有一定的亚致死效应 (昆虫生态行为、发育历期、繁殖力和抗药性发生改变),进而引起目标害虫再猖獗发生 (韩文素等, 2011)。同时,昆虫体内的解毒酶在抵御外援杀虫剂胁迫的过程中起着非常重要的作用,研究发现飞蝗 *Locusta migratoria*、灰飞虱 *Laodelphax striatellus*、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 和橘小实蝇 *Bactrocera dorsalis* 等昆虫体内解毒酶基因在受到药剂胁迫时会通过表达量上调来增强对外源毒素的代谢能力 (Wang *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2012; Qin *et al.*, 2014; 申光茂等, 2015)。本研究用亚致死浓度氟氟虫腈处理小菜蛾 3 龄幼虫后,观察其体内 3 种解毒酶比活力的变化和明确氟氟虫腈对小菜蛾 P450s 的诱导表达作用,寻找小菜蛾解毒酶对亚致死浓度氟氟虫腈的应激效应。为深入研究经显著诱导表达的 P450 基因的功能和探讨氟氟虫腈对小菜蛾的毒杀作用提供理论依据。同时对指导田间合理使用氟氟虫腈,延缓小菜蛾抗药性的产生,延长其使用寿命具有重要意义。

1 材料与方 法

1.1 供试昆虫

供试小菜蛾由中国农业大学昆虫生理毒理

实验室惠赠,采用蛭石萝卜法 (陈之浩等, 1990) 进行室内饲养,饲养期间未接触过任何药剂。饲养条件为温度 (25±1), 相对湿度 60%±5%, 光周期 16 L: 8 D, 成虫期补充 10% 蜂蜜水。

1.2 供试药剂

240 g/L 氟氟虫腈 (德国巴斯夫公司), 曲拉通 (TritonX-100) (国药集团化学试剂有限公司), 对硝基苯甲醚 (上海精纯试剂有限公司), 还原型谷胱甘肽 (武汉亚法生物技术拓展公司), 考马斯亮蓝 G250 (Fluka 分装), 牛血清蛋白和还原型辅酶 (NADPH) (Roche, 进口分装), α -乙酸萘酯、固蓝 B 盐、1-氯-2, 4-二氯硝基苯 (CDNB) 均为 Sigma 分装。

1.3 生物活性测定

采用杀虫剂抗性行动委员会 (IRAC) 提出的浸叶法 (No.018) (<http://www.irc-online.org/methods/plutella-xylostella-larvae/>) 测定氟氟虫腈对小菜蛾的生物活性。根据预实验结果,将氟氟虫腈用 0.1% 的 TritonX-100 配制成 6 个系列浓度; 以 0.1% 的 TritonX-100 作为对照。用直径为 7.0 cm 的打孔器从干净的甘蓝叶上取大小均一的叶片,将其浸入配好的药液 10 s 后取出,室温晾干后置于直径为 7.0 cm 的培养皿中,每皿接入大小一致的 3 龄幼虫 10 头。每个处理 4 次重复, 72 h 后统计各处理的幼虫死亡数。

1.4 亚致死浓度处理

根据生物测定结果,以氟氟虫腈处理 72 h 后的 LC₁₀ 和 LC₂₅ 作为亚致死浓度, 0.1% TritonX-100 的蒸馏水为对照, 分别用 LC₁₀ 和 LC₂₅ 处理小菜蛾 3 龄幼虫, 每个处理设定 10 个重复, 每个重复 1 皿, 每皿 15 头, 每个处理 50 头。小菜蛾幼虫自 3 龄初移入 7.0 cm 培养皿, 24、48 和 72 h 后挑取活虫液氮速冻, -80 保存备用,用于酶活力测定 (72 h) 和实时荧光定量 PCR (Polymerase chain reaction) (24、48 和 72 h)。

1.5 亚致死浓度氰氟虫腙对小菜蛾 3 种解毒酶比活力影响

1.5.1 羧酸酯酶 (CarE) 活性测定 参照夏冰等 (2002) 的方法, 取 10 头幼虫加 pH7.0、0.04 mol/L 的磷酸缓冲液 1 mL, 冰浴匀浆, 高速离心机 4°C、11 000 r/min 离心 15 min, 取上清作为待测酶液。以 α -NA 为底物 (含毒扁豆碱 10^{-4} mol/L), 30°C 水浴中反应 15 min, 加入 1 mL 显色液 (1% 固蓝 B 盐: 5% SDS=2: 5) 终止反应, 于 600 nm 测定光密度值。每处理设 3 次重复。测定酶液蛋白含量后, 计算出 CarE 的比活力 ($\text{nmol} \cdot 15\text{min} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}\text{pro}$)。

1.5.2 谷胱甘肽 S-转移酶 (GSTs) 活性测定 参照梁沛等 (2003) 和 Habig 和 Jakoby (1981) 的方法, 取 10 头幼虫加 pH6.5、0.1 mol/L 的磷酸缓冲液 1 mL, 冰浴匀浆, 4°C、12 000 r/min 离心 10 min 后取上清作为待测酶液。向试管内依次加入 pH6.5 的磷酸缓冲液 790 μL 、0.03 mol/L 的 CDNB 30 μL 、酶液 50 μL 和 0.03 mol/L 的 GSH 30 μL 立即混匀, 室温下记录 340 nm 2 min 内的 OD 变化值。测定酶液蛋白含量, 计算 GSTs 的比活力 ($\Delta\text{OD}_{340} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}\text{pro}$)。

1.5.3 多功能氧化酶 (MFOs) 的测定 Yu 和 Nguyen (1992) 的方法测定多功能氧化酶 O-脱甲基活性。取 10 头幼虫加 pH7.5、0.1 mol/L 的磷酸缓冲液 1 mL, 冰浴匀浆, 4°C、14 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 再次离心 30 min, 取上清作为待测酶液。反应体系为 2 $\mu\text{mol/L}$ 对硝基苯甲醚 1.5 mL, 9.6 mmol/L NADPH 0.15 mL 和稀释后酶液 1.35 mL, 30°C 水浴 30 min, 405 nm 下测定其吸光度。测定酶液蛋白含量后, 计算出多功能氧化酶酶活力 ($\text{nmol} \cdot 30\text{min} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}\text{pro}$)。

1.6 蛋白含量测定

参照 Bradford (1976) 考马斯亮蓝 G-250 方法。

1.7 亚致死浓度氰氟虫腙对小菜蛾 P450 基因 mRNA 表达量的影响

1.7.1 总 RNA 提取 将小菜蛾按照 Invitrogen 公司的 TRIzol 试剂说明书提取总 RNA, 1% 琼脂

糖凝胶电泳确定其提取质量, 利用紫外分光光度计 (NanoDrop2000) 测定 RNA 浓度, -80°C 保存或直接合成第一链 cDNA 合成。

1.7.2 第一链 cDNA 合成 采用 TakaRa 公司反转录试剂盒 (PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit) 对提取的小菜蛾总 RNA 进行反转录, 按说明书进行操作, 获得第一链 cDNA 直接使用或 -20°C 保存备用。

1.7.3 P450 基因引物设计 以小菜蛾的 β -actin 基因作为内参基因, 小菜蛾已知的 10 个 P450 基因 (NCBI) 的定量 PCR 引物序列见表 1。

1.7.4 相关基因的实时荧光定量 PCR 检测

采用 Real-time PCR 方法检测小菜蛾 10 个 P450 基因的相对表达量。反应体系: SsoFast evagreen supermix 10 μL , 正向和反向引物各 1 μL , cDNA 模板 1 μL , ddH₂O 7 μL , 总体系为 20 μL 。反应条件如下: 95°C 30 s, 95°C 5 s, 55°C 10 s, 72°C 10 s, 共 40 个循环; 55°C 退火 10 s, 80 个循环, 每循环一次, 退火温度上升 0.5°C 绘制溶解曲线。每处理重复测定 3 次。基因相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法计算 (Livak and Schmittgen, 2001)。

1.8 数据处理方法

使用 POLO 软件处理结果, 确定 LC₁₀ 和 LC₂₅ 值及其置信区间, 采用 SPSS17.0 的 Duncan's 单因素方差分析比较不同处理之间的酶活性及 mRNA 表达量差异显著性 ($P=0.05$)。

2 结果与分析

2.1 氰氟虫腙对小菜蛾的毒力测定

根据生物活性测定结果, 利用机率值分析法建立氰氟虫腙对小菜蛾的毒力回归方程为: $y=4.63+2.23x$, LC₁₀=0.39 mg/L, LC₂₅=0.73 mg/L。

2.2 亚致死浓度氰氟虫腙对小菜蛾羧酸酯酶 (CarE) 活性的影响

由表 3 可知, LC₁₀ 和 LC₂₅ 处理小菜蛾 72 h 后, 羧酸酯酶活性与对照组相比差异不显著 ($P>0.05$)。

表 1 小菜蛾 β -actin 和 P450 基因定量 PCR 引物
Table 1 Primers of β -actin and P450 gene of *Plutella xylostella*

靶标基因 Target gene	登录号 Accession No.	引物序列 (5'-3') Primer sequence	产物大小 (bp) Product size
<i>Pxβ-actin</i>	JN410820	F:GATGACATGGAGAAGATC R:GGTCTCAAACATGATCTG	141
<i>PxCYP4M19</i>	EU189047.1	F:GATAAGATGATCCAGGAC R:GATAAAAGGTACTGGAGG	153
<i>PxCYP4M20</i>	EU189048.1	F:GCTTCAGGATTAGTGTAC R:GATTGTGTAGTTGCTCAG	237
<i>PxCYP4M21</i>	EU189049.1	F:TGTACAGGACACCATATC R:CACTCCAGATACTTCATC	99
<i>PxCYP4M22</i>	EU189050.1	F:GACATGAGTCAGATGAAG R:CCGTATCAGTGATATAACC	97
<i>PxCYP4M23</i>	EU189051.1	F:CCAATGAAGTTTAGGGAG R:GAACGGTATATACGAGTAG	165
<i>PxCYP4S10V2</i>	EU189052.1	F:GTATCTTCGGATCATCAG R:GTCTCCCATCATAAAGTC	149
<i>PxCYP6CN1</i>	EU189053.1	F:CTCTCCCATATTCCTTC R:GAAATAGACCTCCTGTTC	124
<i>PxCYP6CV2</i>	HQ829967.1	F:GAGCAGAAGTTTGTAGAG R:TAGGGTATTCCTCAGAG	292
<i>PxCYP6BF1V2</i>	DQ088989.1	F:GATGATGAGATAGGAAAGG R:TAGAAGAAGGAAGGGTAG	221
<i>PxCYP9G4</i>	FJ023535.1	F:CCTCCTACATTGATCTTG R:CCTTCTTTCACCGTATAG	92

表 2 小菜蛾 3 龄幼虫对氟氟虫腈的敏感性
Table 2 Susceptibility of the 3rd larvae of *Plutella xylostella* to metaflumizone

品系 Strain	斜率 Slope \pm SE	致死中量 LC ₅₀ (mg/L)	95%置信限 95% CL	卡方 χ^2	LC ₁₀ (mg/L)	LC ₂₅ (mg/L)
敏感品系 Susceptible strain	2.23 \pm 0.27	1.47	1.18-1.85	0.18	0.39	0.73

表 3 亚致死浓度氟氟虫腈对小菜蛾 CarE 活性的影响
Table 3 Effects of metaflumizone at sublethal concentrations on the activity of CarE in *Plutella xylostella*

处理 Treatment	比活力 Specific activity (nmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ pro)	比值 RR
CK	36.67 \pm 2.54a	1.00
LC ₁₀	38.96 \pm 9.21a	1.06
LC ₂₅	38.89 \pm 7.68a	1.06

表中数据是 3 次重复的平均值 \pm 标准误; 数据后标有不同小写字母表示数据间在 0.05 水平上差异显著 ($P < 0.05$); 比值=处理组酶活力/对照组酶活力。下表同。

Data in the table are mean \pm SE of 3 replicates and followed by different small letters in the same column indicate significant difference at 0.05 level. RR=Specific activity of treated ground / Specific activity of CK. The same below.

2.3 亚致死浓度氟氟虫腙对小菜蛾谷胱甘肽 S-转移酶 (GSTs) 活性的影响

由表 4 可知, LC₁₀ 和 LC₂₅ 处理小菜蛾 72 h 后, 谷胱甘肽 S-转移酶活性与对照组相比均显著下降 ($P < 0.05$), 分别下降 36.19% 和 31.63%。

2.4 亚致死浓度氟氟虫腙对小菜蛾多功能氧化酶 (MFOs) 活性的影响

由表 5 可知, LC₁₀ 和 LC₂₅ 处理小菜蛾 72 h 后, 多功能氧化酶活性高于对照组, 尤其是 LC₂₅ 处理后 MFOs 活性显著高于对照组 ($P < 0.05$), 且表现出一定的浓度效应。

2.5 亚致死浓度氟氟虫腙对小菜蛾 P450 基因表达量的影响

由图 1 可知, 与对照组相比, LC₂₅ 处理组小菜蛾 *PxCYP4M19* mRNA 的表达量在 24 h 时为对照组的 2.33 倍, 显著高于 LC₁₀ 处理组 (24 h 的相对表达量为对照组的 1.76 倍); 48 h 时 LC₁₀ 和 LC₂₅ 处理 *CYP4M19* 的相对表达量分别为对照的 9.30 倍和 8.50 倍, 72 h 相对表达量分别为对照的 3.67 倍和 2.55 倍, 但两处理组间无差异。

氟氟虫腙 LC₁₀ 处理组在 24~72 h 时对 *PxCYP6BF1V2* mRNA 的表达量均无显著影响。LC₂₅ 处理组在 24 h 时对 *PxCYP6BF1V2* 的相对表达量无显著影响, 但在 48 h 和 72 h 分别为对照组的 1.32 倍和 3.48 倍, 均显著高于 LC₁₀ 处理组

(48 h 和 72 h 的相对表达量为对照组的 0.82 倍和 0.88 倍) 和对照组。

与对照组相比, 氟氟虫腙 LC₁₀ 和 LC₂₅ 处理组 *PxCYP6CN1* mRNA 的表达量在 24 h 和 48 h 时均显著高于对照组, 分别为对照组的 1.39~1.88 倍和 1.92~2.53 倍, 但在 48 h 时两处理组间无差异。在 72 h 时两个处理组与对照组间该基因相对表达量无差异。

处理后 24~72 h, 氟氟虫腙 LC₁₀ 和 LC₂₅ 处理组 *PxCYP6CV2* 的相对表达量均显著高于对照组, 其相对表达量分别为对照组的 1.70~7.65 倍和 2.20~7.22 倍。但在同一时间点两个处理组间该基因相对表达量无差异。

同时, 氟氟虫腙 LC₁₀ 和 LC₂₅ 处理组在 24~72 h 时对 *PxCYP4M20*、*PxCYP4M21*、*PxCYP4M22*、*PxCYP4M23*、*PxCYP4S10V2* 和 *PxCYP9G4* mRNA 的相对表达量均无明显影响。

3 讨论

近年来, 杀虫剂对昆虫的亚致死效应成为研究热点之一, 氟氟虫腙广泛应用于田间后同样存在亚致死效应。研究表明小菜蛾对氟氟虫腙产生抗性的风险较低, 且亚致死浓度氟氟虫腙不易引起小菜蛾和甜菜夜蛾的再猖獗 (张喆, 2011; 马凤娟等, 2012; Han *et al.*, 2012), 但在用药频繁地区甜菜夜蛾和小菜蛾分别对氟氟虫腙产生

表 4 亚致死浓度氟氟虫腙对小菜蛾 GSTs 活性的影响

Table 4 Effects of metaflumizone at sublethal concentrations on the activity of GSTs in *Plutella xylostella*

处理 Treatment	比活力 Specific activity (nmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ pro)	比值 RR
CK	17.96 ± 0.39a	1.00
LC ₁₀	11.46 ± 0.05c	0.64
LC ₂₅	12.28 ± 0.04b	0.68

表 5 亚致死浓度氟氟虫腙对小菜蛾 MFOs 活性的影响

Table 5 Effects of metaflumizone at sublethal concentrations on the activity of MFOs in *Plutella xylostella*

处理 Treatment	比活力 Specific activity (nmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ pro)	比值 RR
CK	1.92 ± 0.03b	1.00
LC ₁₀	1.94 ± 0.06b	1.01
LC ₂₅	2.67 ± 0.05a	1.39

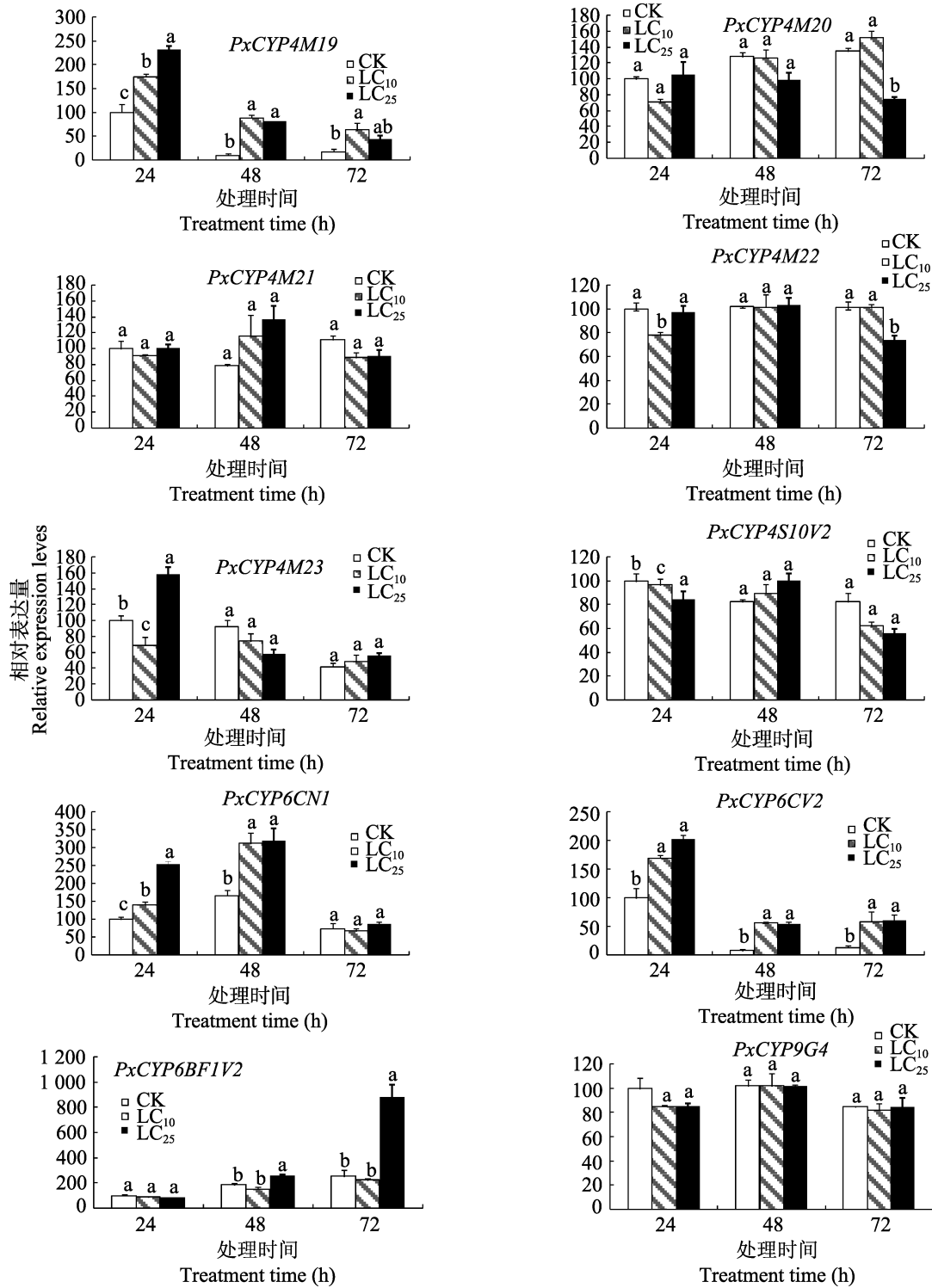


图 1 亚致死浓度氟氟虫腈对小菜蛾 P450 表达量的影响

Fig. 1 Effects of metaflumizone at sublethal concentrations on the relative expression level of P450 in *Plutella xylostella*

图中数据是 3 次重复的平均值±标准误；柱上标有不同小写字母表示相同时间点不同处理在 0.05 水平上差异显著 ($P < 0.05$)。

Data are presented as the mean ± SE of three replication. Histograms with different letters indicate significant different among different treatments at the same time ($P < 0.05$).

了高等水平和中等水平抗性 (Su and Sun, 2014; Wang *et al.*, 2016)。因此, 研究新型药剂氟氟虫腈亚致死浓度对小菜蛾体内三种解毒酶及 P450 表达量的影响, 为氟氟虫腈的使用剂量和轮换用药提供指导, 且降低杀虫剂对小菜蛾的选择压是延缓其抗性发展的重要措施。

羧酸酯酶、谷胱甘肽 *S*-转移酶和多功能氧化酶是昆虫体内的三大解毒酶系, 亚致死浓度杀虫剂不仅能影响害虫的生长发育和繁殖, 而且可对害虫体内解毒酶系产生诱导作用, 为害虫抗药性进化提供持续的选择压力。尹显慧等 (2008) 研究发现小菜蛾不同处理在不同时间段对 CarE 有升高, 有降低, 对谷胱甘肽 *S*-转移酶有明显的诱导作用, 而对细胞色素 P450 酶系的 *O*-脱甲基酶活性具有明显的抑制作用; 王建军等 (2009) 研究发现亚致死浓度茚虫威对斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 体内酯酶、谷胱甘肽 *S*-转移酶和多功能氧化酶活力影响不大; 尹飞等 (2014) 用亚致死剂量氯虫苯甲酰胺处理小菜蛾后发现, 谷胱甘肽 *S*-转移酶活性显著下降; 戴瀚洋等 (2015) 在研究亚致死浓度甲维盐处理对甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 幼虫体内解毒酶活力的影响时发现, 经甲维盐亚致死浓度 (LC₅、LC₂₀、LC₅₀) 处理后, 与对照相比谷胱甘肽 *S*-转移酶和多功能氧化酶的比活力显著增强, 且二者均随着处理浓度的增大而先上升后下降, 而酯酶则被显著抑制。本研究对小菜蛾体内解毒酶活力进行了比较, 发现经氟氟虫腈亚致死浓度处理后, 与对照相比, 幼虫体内羧酸酯酶活性无显著差异, 谷胱甘肽 *S*-转移酶被显著抑制, 而多功能氧化酶活性随浓度增加而增强, 尤其是 LC₂₅ 处理后, 酶活力为对照的 1.39 倍。

在已知的昆虫细胞色素 P450 家族中, 一般认为 *CYP4*、*CYP6* 和 *CYP9* 家族与杀虫剂抗药性有关 (Liu and Scott, 1998), 细胞色素 P450 参与的杀虫剂抗药性主要是由于其解毒作用的增强, 表现为 P450 酶活性的增加或其表达量的增加 (Wang and Hobbs, 1995)。张喆等 (2011) 利用 qPCR 技术研究了亚致死浓度氟氟虫腈 (LC₁₅ 和 LC₂₅) 对小菜蛾 *CYP6CV2* 基因表达影响, 结

果表明氟氟虫腈对其表达具有时间和剂量效应; 王学贵等 (2015) 研究发现低剂量氯虫苯甲酰胺 (0.01 和 0.02 mg/kg) 对甜菜夜蛾 4 个 P450 基因 (*CYP9A9*、*CYP4G37*、*CYP4S11* 和 *CYP6B*) 均有明显的诱导表达上调作用, 尤其是 *CYP9A9*、*CYP4G37* 和 *CYP6B* 表达上调明显; 戴瀚洋等 (2015) 研究发现在甲维盐 (LC₅、LC₂₀ 和 LC₅₀) 胁迫 72 h 后, 甜菜夜蛾体内 *SeCYP450*、*SeGSTs* 和 *SeGSTs1* 表达量均较对照极显著上升 ($P < 0.01$), 且随处理浓度的增大而先上升后下降。本研究中, 亚致死浓度氟氟虫腈对小菜蛾 4 个 P450 基因 (*PxCYP4M19*、*PxCYP6BF1V2*、*PxCYP6CN1* 和 *PxCYP6CV2*) 均有明显的诱导表达上调作用。

本研究中经氟氟虫腈亚致死浓度处理后小菜蛾体内多功能氧化酶活性升高, 表明其可以被诱导以代谢氟氟虫腈。因此 MFO 及其相关基因 (*PxCYP4M19*、*PxCYP6BF1V2*、*PxCYP6CN1* 和 *PxCYP6CV2*) 有可能参与到小菜蛾对氟氟虫腈抗药性的演化过程中, 且这些基因在氟氟虫腈抗性品系的表达情况如何及通过何种途径被调控仍值得深入研究。

参考文献 (Reference)

- Bradford WW, 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilization the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72(S1/2): 248-254.
- Dai HY, Sun Y, Bai LX, Zhao J, Xiao LB, Tan YA, 2015. Activities of detoxification enzymes and expressions of related genes in *Spodoptera exigua* larvae treated with sublethal concentrations of emamectin benzoate. *Cotton Science*, 27(2): 149-158. [戴瀚洋, 孙洋, 柏立新, 赵静, 肖留斌, 谭永安, 2015. 亚致死浓度甲维盐胁迫甜菜夜蛾幼虫解毒酶系活力及其相关基因表达量的影响. 棉花学报, 27(2): 149-158.]
- Furlong MJ, Wright DJ, Dosdall ML, 2013. Diamondback moth ecology and management: Problems, progress and prospects. *Annu. Rev. Entomol.*, 58: 517-541.
- Habig WH, Jakoby WB, 1981. Assay for differentiation of glutathione-S-transferase//Jakoby WB(ed.). *Methods in Enzymology*. New York: Academic Press. 398-405.
- Han WS, Ren CC, Yan HY, Zhang SF, Shen FY, Gao XW, 2012. Sublethal effects of metaflumizone on abamectin-resistance and susceptible strains of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Acta Entomologica Sinica*, 55(6): 694-702.
- Han WS, Wang LH, Sun HH, Gao XW, 2011. Research progress on

- sublethal effects of insecticides on insect. *China Plant Protection*, 31(11): 23–27. [韩文素, 王丽红, 孙姗姗, 高希武, 2011. 杀虫剂对昆虫的亚致死效应的研究进展. 中国植保导刊, 31(11): 23–27.]
- Liang P, Xia B, Shi T, Gao XW, 2003. Effect of sublethal doses of abamectin and β -cypermethrin on glutathione *S*-transferases in diamondback moth *Plutella xylostella* (L.). *Journal of China Agricultural University*, 8(3): 65–68. [梁沛, 夏冰, 石泰, 高希武, 2003. 阿维菌素和高效氯氰菊酯亚致死剂量对小菜蛾谷胱甘肽 *S*-转移酶的影响. 中国农业大学学报, 8(3): 65–68.]
- Liu N, Scott JG, 1998. Increased transcription of *CYP6D1* causes cytochrome P450-mediated insecticide resistance in house fly. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 28(8): 531–535.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2^{-C_t} method. *Methods*, 25(4): 402–408.
- Ma FJ, Li YD, Gao XW, 2012. Sublethal effects of metaflumizone on the development and reproduction of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 49(2): 428–433. [马凤娟, 李永丹, 高希武, 2012. 氟氰虫脒亚致死剂量对甜菜夜蛾生长发育和繁殖力的影响. 应用昆虫学报, 49(2): 428–433.]
- Qin GH, Liu TX, Guo YP, Zhang XY, Ma EB, Zhang JZ, 2014. Effects of chlorpyrifos on glutathione *S*-transferase in migratory locust, *Locusta migratoria*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 109(6): 1–5.
- Salgado VL, Hayashi JH, 2007. Methaflumzion is a novel sodium channel blocker insecticide. *Vet. Parasitol.*, 150 (3): 182–189.
- Shen GM, Wang XN, Huang Y, Dou W, Wang JJ, 2015. Tissue specific expression of genes encoding detoxification enzymes in the larvae of *Bactrocera dorsalis* under β -Cypermethrin stress. *Scientia Agricultura Sinica*, 48(19): 3857–3865. [申光茂, 王晓娜, 黄勇, 豆威, 王进军, 2015. 橘小实蝇幼虫解毒酶系基因应对高效氯氰菊酯胁迫的组织特异性表达. 中国农业科学, 48(19): 3857–3865.]
- Han WS, Ren CC, Yan HY, Zhang SF, Shen FY, Gao XW, 2012. Sublethal effects of metaflumizone on abamectin-resistant and susceptible strains of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Acta Entomologica Sinica*, 55(6): 694–702.
- Su JY, Sun XX, 2014. High level of metaflumizone resistance and multiple insecticide resistance in field populations of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) in Guangdong Province, China. *Crop Protection*, 61(3): 58–63.
- Sun JY, Liang P, Gao XW, 2012. Cross-resistance patterns and fitness in fufenozide-resistant diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Pest Management Science*, 68(2): 285–289.
- Takagi K, Hamaguchi H, Nishimatsu T, Konno T, 2007. Discovery of metaflumozone, a novel semicarbazone insecticide. *Vet. Parasitol.*, 150(3): 117–181.
- Wang JJ, Dong HG, Yuan LZ, 2009. Effects of indoxacarb at sublethal concentrations on the development and activities of detoxification enzymes of *Spodoptera litura*. *Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science Edition)*, 30(4): 85–89. [王建军, 董红刚, 袁林泽, 2009. 亚致死浓度茚虫威对斜纹夜蛾生长发育及解毒酶活性的影响. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 30(4): 85–89.]
- Wang SP, He GL, Chen RR, Li F, Li GQ, 2012. The involvement of cytochrome P450 monooxygenases in methanol elimination in *Drosophila melanogaster* larvae. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 79(4/5): 264–275.
- Wang XG, Yu HL, Liang P, Shi XY, Song DL, Gao XW, 2015. Chlorantraniliprole induces up-regulated expression of cytochrome P450 genes in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomologica Sinica*, 58(3): 281–287. [王学贵, 余慧灵, 梁沛, 史雪岩, 宋敦伦, 高希武, 2015. 氯虫苯甲酰胺诱导甜菜夜蛾细胞色素 P450 基因上调表达. 昆虫学报, 58(3): 281–287.]
- Wang XL, Su W, Zhang JH, Yang YH, Dong K, Wu YD, 2016. Two novel sodium channel mutations associated with resistance to indoxacarb and metaflumizone in the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Insect Science*, 23(1): 50–58.
- Wang XP, Hobbs A, 1995. Isolation and sequence analysis of a cDNA clone for a pyrethroid indecible cytochrome P450 from *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 25(9): 1001–1009.
- Xia B, Shi T, Liang P, Gao XW, 2002. Effects of insecticides at sublethal concentrations on the activity of CarE in *Plutella xylostella* (L.). *Chinese Journal of Pesticide Science*, 4(1): 23–27. [夏冰, 石泰, 梁沛, 高希武, 2002. 杀虫剂亚致死剂量对小菜蛾羧酸酯酶活性的影响. 农药学报, 4(1): 23–27.]
- Yin F, Feng X, Li ZY, Lin QS, Hu ZD, Zhang DY, Chen HY, 2014. Effect of sublethal concentrations of chlorantraniliprole on detoxifying enzyme activity in *Plutella xylostella* (L.). *Plant Protection*, 40(2): 66–69. [尹飞, 冯夏, 李振宇, 林庆胜, 胡珍娣, 张德雍, 陈焕瑜, 2014. 亚致死剂量氯虫苯甲酰胺对小菜蛾体内活性酶的影响. 植物保护, 40(2): 66–69.]
- Yin XH, Wu QJ, Li XF, Zhang YJ, Xu BY, 2008. Effect of sublethal concentrations of spinosad on the activities of detoxifying enzymes in the larvae of diamondback moth *Plutella xylostella*. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 10(1): 28–34. [尹显慧, 吴青君, 李学锋, 张友军, 徐宝云, 2008. 多杀菌素亚致死浓度对小菜蛾解毒酶系活力的影响. 农药学报, 10(1): 28–34.]
- Yu SJ, Nguyen SN, 1992. Detection and biochemical characterization of insecticide resistance in the diamondback moth. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 44(1): 74–81.
- Zhang Z, 2011. Resistance risk assessment to metaflumizone and P450 *CYP6CV2* gene induced expression in *Plutella xylostella*. Master dissertation. Wuhan: Huazhong Agricultural University. [张喆, 2011. 小菜蛾对氟氰虫脒抗药性风险评估及 P450 *CYP6CV2* 基因诱导表达. 硕士学位论文. 武汉: 华中农业大学.]
- Zhou WW, Li XW, Quan YH, Cheng J, Zhang CX, Gurr G, Zhu ZR, 2012. Identification and expression profiles of nine glutathione *S*-transferase genes from the important rice phloem sap-sucker and virus vector *Laodelphax striatellus* (Fallen) (Hemiptera: Delphacidae). *Pest Management Science*, 68(9): 1296–1305.