

苹果黄蚜细胞色素 P450 基因 *AcCYP6CY14* 的表达及其在抵抗吡虫啉中的作用*

范继巧^{1,2**} 韩鹏飞^{1,3} 高 越^{1,2} 刘中芳^{1,2}
张鹏九^{1,2} 杨 静^{1,2} 范仁俊^{1,2***}

(1. 农业有害生物综合治理山西省重点实验室, 太原 030031; 2. 山西省农业科学院植物保护研究所, 太原 030031;
3. 山西大学应用生物学研究所, 太原 030006)

摘 要 【目的】研究苹果黄蚜 *Aphis citricola* 细胞色素 P450 基因 *AcCYP6CY14* 的表达及其在抵抗吡虫啉中的作用。【方法】搜索苹果黄蚜转录组数据库, 获得细胞色素 P450 基因 *AcCYP6CY14* 的 cDNA 部分序列, 采用 RT-PCR 技术克隆目的基因 cDNA 序列全长。利用实时定量 PCR (Real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 技术测定目的基因在苹果黄蚜不同发育阶段的表达水平。采用浸虫法, 用浓度为 LC_{30} 的吡虫啉对苹果黄蚜 3 龄若蚜进行诱导, RT-qPCR 检测吡虫啉诱导不同时间后 P450 基因的表达情况。利用 RNA 干扰 (RNAi) 技术沉默苹果黄蚜 3 龄若蚜的 P450 基因, 并研究该基因沉默后, 苹果黄蚜对吡虫啉的敏感性。【结果】获得苹果黄蚜细胞色素 P450 基因的 cDNA 全长序列, 为 1 542 bp, 编码 513 个氨基酸, 命名为 *AcCYP6CY14* (GenBank 登录号: MH717248)。研究发现该基因在苹果黄蚜各个发育阶段均有表达, 在 3 龄若蚜中表达量最高。经吡虫啉诱导 12 h 后, 该基因的相对表达量显著高于对照。dsRNA 饲喂结果显示, 苹果黄蚜取食 ds*AcCYP6CY14* 24 h 后, 将其转接到新鲜的苹果嫩梢上, 24、48、72 h 后, 该基因的表达量显著下调。沉默该 P450 基因后, 苹果黄蚜对吡虫啉的敏感性极显著升高 ($P < 0.01$), 死亡率提高了 65.2%。【结论】克隆得到了苹果黄蚜 P450 基因 *AcCYP6CY14* 的 cDNA 全长序列, 该基因在苹果黄蚜整个生育期均有表达, 且在 3 龄若蚜中表达量最高, 推测该基因可能参与了苹果黄蚜对吡虫啉的解毒代谢。
关键词 苹果黄蚜; 吡虫啉; 细胞色素 P450; RNA 干扰; 解毒代谢

Expression of the cytochrome P450 gene *AcCYP6CY14* and its role in imidacloprid resistance in *Aphis citricola*

FAN Ji-Qiao^{1,2**} HAN Peng-Fei^{1,3} GAO Yue^{1,2} LIU Zhong-Fang^{1,2}
ZHANG Peng-Jiu^{1,2} YANG Jin^{1,2} FAN Ren-Jun^{1,2***}

(1. Shanxi Key Laboratory of Integrated Pest Management in Agriculture, Taiyuan 030031, China;
2. Institute of Plant Protection, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030031, China;
3. Institute of Applied Biology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract [Objectives] To study the developmental expression of the cytochrome P450 gene *AcCYP6CY14* and its role in imidacloprid resistance in *Aphis citricola*. [Methods] Partial cDNA sequences of *AcCYP6CY14* were obtained by searching the transcriptome database of *A. citricola*. Full-length cDNA of the target gene was cloned using RT-PCR, and its relative expression in different developmental stages measured using real-time quantitative PCR (RT-qPCR). The 3rd instar of *A. citricola* was chosen for an induction experiment using the insect-soaking method and the relative expression of *AcCYP6CY14* was detected by RT-qPCR after exposing insects to imidacloprid for different periods of time. The target gene was silenced

*资助项目 Supported projects: 农业有害生物综合治理山西省重点实验室开放课题 (YHSW2016002); 山西省农业科学院科技自主创新能力提升工程项目 (2017ZZCX-15); 山西省科技重点研发 (指南) 项目 (2015-TN-03-09)

**第一作者 First author, E-mail: jqfan926@126.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: rjfan@163.com

收稿日期 Received: 2018-09-20; 接受日期 Accepted: 2018-11-15

using RNA interference (RNAi) technology by feeding nymphs dsRNA, and the susceptibility of the nymphs to imidacloprid was assessed. **[Results]** The length of the full-length cDNA sequence of *AcCYP6CY14* was 1 542 bp, encoding 513 amino acids (GenBank accession No.: MH717248). *AcCYP6CY14* was expressed in all developmental stages of *A. citricola* but was highest in 3rd instar nymphs. After exposure to an LC₃₀ dose of imidacloprid for 12 h, the relative expression of the *AcCYP6CY14* was significantly higher than that of the control group. Feeding nymphs ds*AcCYP6CY14* for 24 h significantly decreased transcripts of *AcCYP6CY14* when nymphs were transferred to tender stems for 24, 48 and 72 h. *A. citricola* became more sensitive to imidacloprid ($P < 0.01$) when *AcCYP6CY14* was silenced after which mortality increased by 65.2%. **[Conclusion]** The full-length cDNA sequence of *AcCYP6CY14* was cloned and was found to be expressed in all developmental stages of *A. citricola*. Expression was highest in 3rd instar nymphs. This gene may play a role in imidacloprid resistance in *A. citricola*.

Key words *Aphis citricola*; imidacloprid; cytochrome P450; RNA interference; metabolic detoxification

苹果黄蚜 *Aphis citricola* von der Goot 属半翅目蚜科, 又名绣线菊蚜, 主要为害蔷薇科果树和柑橘, 在我国河北、内蒙古、山西、陕西、山东、河南等苹果产区均有分布, 主要寄主有苹果、梨、山楂、杏、李、海棠、樱桃、绣线菊等植物, 是我国苹果产区常见且为害比较严重的叶面害虫 (刘慧平等, 2007; 吕朝军等, 2007; 武荣祥, 2016)。苹果黄蚜是苹果叶部害虫的优势种, 以成蚜、若蚜群集于嫩梢、嫩叶背面及幼果表面刺吸为害, 严重时导致叶片早期脱落、新梢生长受阻, 树势衰弱。苹果黄蚜在刺吸危害的同时还可传播植物病毒病, 诱发果树发生多种病害, 其排出的蜜露覆盖于叶面及果实, 诱发叶片霉污病, 严重影响叶片的光合作用和果品质量 (吕朝军, 2005)。目前, 使用化学农药仍是控制苹果黄蚜的主要方法, 但化学农药的不合理使用不仅严重杀伤了天敌, 而且使苹果黄蚜对药剂的敏感性降低 (封云涛等, 2012), 甚至对一些农药品种已经产生了不同程度的抗药性 (彭波等, 2010; 庾琴等, 2013; 封云涛等, 2015; 郑竹胜等, 2015)。因此, 研究苹果黄蚜对常用药剂的抗药性发生机制, 对筛选杀虫剂新靶标, 研发新型高效杀虫剂具有重要意义。

细胞色素 P450 (Cytochrome P450 简称 P450) 是一类广泛存在于几乎所有生物体中的重要代谢酶系, 可以代谢内源和外源化合物 (Elzaki *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2007), 与昆虫的生长、发育、解毒等密切相关 (张雨良等, 2009)。昆虫对杀虫剂产生抗药性的主要机制之一是细胞

色素 P450 介导的杀虫剂代谢解毒活性的增强 (邱星辉, 2014)。一般认为, 与杀虫剂代谢相关的 P450 基因的表达量增加, 可导致 P450 酶活性增强, 从而使昆虫对杀虫剂产生抗药性 (王学贵等, 2015), 目前已获得的 CYP450 基因多达 18 500 条, 分属几百个物种 (Nelson *et al.*, 2013), 其中与昆虫抗药性相关的 P450 基因多集中于 CYP4、CYP6 和 CYP9 家族 (Feyereisen, 2006)。研究表明, 细胞色素 P450 基因 *LmCYP6FD3* 可能参与飞蝗 *Locusta migratoria* 对西维因的解毒代谢 (朱文雅等, 2017); *CYP6B7*、*CPR* 和 *Cyt-b₅* 参与棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 对菊酯类药剂的解毒作用 (唐涛等, 2013); 在抗性棉铃虫种群中 *CYP6B7*、*CYP332A1* 和 *CYP9A12* 均过量表达, 导致棉铃虫对氰戊菊酯产生抗药性 (徐莉, 2017)。大草蛉 *Chrysopa septempunctata* P450 基因经吡虫啉诱导后表达量上调, 说明其可能参与大草蛉对吡虫啉的解毒代谢 (刘昌燕和曾凡荣, 2014); Bautista 等 (2009) 通过 RNAi 技术研究发现, *CYP6BG1* 参与小菜蛾 *Plutella xylostella* 对苄氯菊酯的代谢, 在小菜蛾抗性品系中过量表达, 导致小菜蛾产生抗药性。苹果黄蚜由于其世代周期短、发生量大等特点, 是极易产生抗药性的一类害虫, 而关于其抗药性发生机制的研究很少。本研究基于苹果黄蚜转录组数据库, 克隆得到 CYP6 家族的细胞色素 P450 基因 *AcCYP6CY14*, 测定了该基因在苹果黄蚜不同发育时期的表达特性和吡虫啉诱导后该基因的表达情况, 采用 RNAi 技术, 研究了该基因在苹果

黄蚜抵抗吡虫啉中的作用, 研究结果将为进一步研究苹果黄蚜抗药性发生机制、筛选杀虫剂新靶标、研发新型高效杀虫剂奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

苹果黄蚜 *Aphis citricola* 采自山西省太原市, 于 2018 年 5 月下旬采摘苹果黄蚜比较集中的苹果树嫩梢, 带回室内在人工气候箱中用苹果嫩梢饲养繁殖, 温度 (23±1) °C, 相对湿度 70%-85%, 光周期为 16 L : 8 D。

1.2 主要试剂和试剂盒

总 RNA 提取试剂 RNAiso™ Plus、SYBR Green Real-time quantitative PCR MasterMix、

RNAase-free DNase I、dNTP Mix、Ribonuclease Inhibitor、M-MLV Reverse Transcriptase 和 Taq DNA Polymerase 均购于 TaKaRa 公司 ;pEASY-T3 载体和 *Trans1*-T1 感受态细胞购于北京全式金公司 ;T7 RiboMAX™ Express RNAi System 试剂盒购于 Promega 公司 ;97.3%吡虫啉原药购于江苏常隆化工有限公司 ;氯仿、异戊醇等试剂均为国产分析纯。

1.3 引物设计

根据苹果黄蚜转录组数据库搜索获得细胞色素 P450 基因核苷酸序列, 经过 BlastX 分析后, 利用 Primer Premier 6.0 软件设计全长验证引物, RT-qPCR 引物及 ds-RNA 合成引物均由上海生物工程技术有限公司合成 (表 1)。

表 1 本研究所用引物信息
Table 1 Primers used in this study

基因名称 Gene name	序列 (5'-3') Primer sequence	引物用途 Purpose
<i>AcCYP6A13</i>	F : ATGATTTCGTACTTGTTC AATT R : TTAATCCACAATTGGCCTAAAA	cDNA 克隆 cDNA cloning
<i>AcCYP6A13</i>	F : TTGGAGATGGACCTCGTCATTGC R : TCGGTGAAGTTATCCACGTTCT	实时定量 PCR Real-time quantitative PCR
<i>β-actin</i>	F : GTCCCACACCGTGCCAATCTA R : CGCCACATAACACAGCTTCTCC	
<i>AcCYP6A13</i>	F : <u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> CAGCGATCAGTTGACAA R : <u>TAATACGACTCACTATAGG</u> CCATATCGGCGTAATGAAGA	dsRNA 合成 dsRNA synthesis
<i>GFP</i>	F : <u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> TGGAGAGGGTGAAGG R : <u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> GCGAGATTGTGTGGAC	

下划线处为 T₇ 启动子。

T₇ RNA polymerase promoter is underlined.

1.4 苹果黄蚜细胞色素 P450 基因 cDNA 全长克隆及序列分析

收集苹果黄蚜成蚜 50 头, 放入 1.5 mL 无 RNase 的离心管中, 立即加入液氮速冻, 研磨成粉末状, 用 Trizol 法提取总 RNA, 用 DNAase I (RNase Free) 处理所提取的 RNA, 用 Nanodrop 2000 (Thermo) 和琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 提取的纯度和完整性。根据反转录试剂盒

(TaKaRa) 说明书, 以提取的苹果黄蚜成蚜总 RNA 为模板合成 cDNA 第一链, 并置于 - 80 °C 冰箱中保存备用。

以苹果黄蚜成蚜 cDNA 第一链为模板进行 PCR 扩增, 反应体系, 25 μL, 含 ddH₂O 13 μL, 2×Taq PCR Master Mix 10 μL, 上下游引物各 0.5 μL, cDNA 模板 1 μL。扩增条件为: 94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 2 min,

39 个循环, 72 °C 10 min, 4 °C 保存。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 将目标片段用 Omega Gel Extraction Kit 回收, 连接到 pEASY-T3 载体, 并转化到大肠杆菌感受态细胞中, 挑取白色菌落, 提取质粒, PCR 鉴定, 将阳性克隆送北京华大基因公司测序。

1.5 苹果黄蚜细胞色素 P450 基因在苹果黄蚜不同发育阶段的表达分析

收集 1-4 龄苹果黄蚜若蚜、无翅成蚜, 每个龄期设 3 个生物学重复, 每个重复 50-80 头蚜虫, 将虫体材料用液氮速冻, 保存于 -80 °C 冰箱中备用。cDNA 模板的制备方法与 1.4 节相同。用实时荧光定量 PCR 方法分析苹果黄蚜细胞色素 P450 基因在不同龄期的相对表达量, 以 β -actin 为内参基因, 用荧光染料 SYBR Green 经实时定量 PCR 仪进行检测。25 μ L 反应体系含 ddH₂O 13 μ L, SYBR Green Real-time PCR Mastermix 10 μ L, 浓度为 10 μ mol/L 上下游引物各 0.5 μ L, cDNA 模板 1 μ L。PCR 循环程序为: 95 °C 30 s, 95 °C 5 s, 57 °C 10 s, 72 °C 10 s, 共 40 个循环, 每个处理重复 3 次。苹果黄蚜细胞色素 P450 基因在不同龄期的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行计算, 用 SPSS 20.0 软件进行差异显著性分析。

1.6 吡虫啉对苹果黄蚜细胞色素 P450 基因的诱导表达

采用浸虫法进行室内毒力测定, 用 SPSS 20.0 软件计算吡虫啉对苹果黄蚜的毒力回归方程, 据此计算得到吡虫啉对苹果黄蚜的 LC₃₀ 值, 用该浓度的吡虫啉溶液处理苹果黄蚜 3 龄若蚜, 分别于诱导后 3、6、12、24 h 收集存活的苹果黄蚜, 同时设空白对照, 每个处理重复 3 次。提取总 RNA, 荧光定量 PCR 检测吡虫啉诱导不同时间后苹果黄蚜 P450 基因的表达量。

1.7 dsRNA 的合成及饲喂法进行 RNA 干扰

苹果黄蚜细胞色素 P450 基因 dsRNA 的体外合成按照 T7 RiboMAXTM Express RNAi System (Promega) 试剂盒说明书进行, 用琼脂糖凝胶电泳检测合成的 dsRNA, 用 NaNoDrop2000 测

定 dsRNA 浓度, -20 °C 储存。

在无菌水中添加 dsRNA, 使 dsRNA 的终浓度为 10 ng/ μ L, 将饥饿处理 4 h 的苹果黄蚜接入饲喂器中进行人工饲喂。每个饲喂器中放入 50-60 头 3 龄若蚜, 一端用双层纱布封住, 另一端用 Parafilm 膜 (拉至最薄) 封住, 用移液器将 50 μ L 饲喂液滴至 Parafilm 上, 再用另一 Parafilm 膜将饲喂液封在两层 Parafilm 之间, 以 dsGFP 为对照, 24 h 后将苹果黄蚜转接到新鲜苹果嫩稍上, 置于 (23 $\pm$ 1) °C, 相对湿度 70%-85%, 光周期为 16 L : 8 D 的人工气候箱中饲养, 每个处理设 3 次重复, 分别于转接至新鲜嫩稍后 24、48、72 h 随机取 40 头苹果黄蚜提取 RNA, 并反转录为 cDNA, 置于 -20 °C 冰箱中备用。用荧光定量 PCR 的方法检测目的基因的相对表达量。用 SPSS 20.0 软件进行差异显著性分析。

1.8 RNA 干扰后苹果黄蚜对吡虫啉的敏感性分析

挑选个体大小一致、健康的苹果黄蚜 3 龄若蚜, 饲喂浓度为 10 ng/ μ L 的 ds*AcCYP6CY14*, 对照组饲喂同样浓度的 dsGFP, 24 h 后将苹果黄蚜转接到新鲜的苹果嫩稍上饲养, 待其稳定后, 用浸虫法进行苹果黄蚜对吡虫啉的敏感性测定, 吡虫啉药液的浓度为其对苹果黄蚜的 LC₃₀ 值, 即: 6.730 mg/L, 24 h 后统计苹果黄蚜死亡率, 每个实验设 3 次重复, 每个重复 50-80 头苹果黄蚜。

2 结果与分析

2.1 苹果黄蚜细胞色素 P450 基因 cDNA 全长克隆及序列信息分析

搜索苹果黄蚜转录组数据库, 获得细胞色素 P450 基因 cDNA 部分序列, 通过 BlastX 比对分析, 克隆验证苹果黄蚜细胞色素 P450 基因的全长 cDNA 序列, 共 1 542 bp, 编码 513 个氨基酸, 提交国际 P450 命名委员会命名为 *AcCYP6CY14* (GenBank 登录号: MH717248)。用 Primer Premier 6.0 软件将所得的核苷酸序列翻译为氨基酸序列, 发现 *AcCYP6CY14* 编码的氨基酸序列中包含昆虫 P450 蛋白的 5 个保守结构域, 即血

红素结合区序列 F ## G ### C # G、K 螺旋序
列 E ## R、I 螺旋序列 A/GG # D/ETT/S、C 螺旋

N 端保守序列 W ## R (#代表任意氨基酸) 和
Meander 区序列 P ## F # P # RF (图 1)。

```

ATGATTTCTGACTTGTTC AATTGATGTTTGACAACATCCTTTTAAGTTTAATTATTGTTTGTACTTTTCTTTATTATTATACGACGTCGACTTACGACACA
1  M I S Y L F N L M F D N I L L S L I I V C T F L Y Y Y T T S T Y D T
TGGAGGAAATTAATGTGCCGTACGCAAAACAGTGCCTTTTTCGGGAATATATTCAAAATGTTACGGGCTTAGAGCATCAAGTGGACTCATTTGGACGA
35  W R K L N V P Y A K P V P F F G N I F K M F T G L E H Q V D S F G R
ATTTATCAACAATTTCCCAATGATAAATTTGCGGGTTTATCAAATGAGTACGCCGTTTAAATGATTCGCGATCCAGAGTTGATCAATACGATGATCATC
69  I Y Q Q F P N D K F C G F Y Q M S T P F L M I R D P E L I N T M I I
AAAGACTTCTCGTATTTCACCGACCCGATTGACATGAACCTTCGTTAAACGTAATGGCGAGAAGCTTGTTTTTGCGACCGGACAAAATGGAATA
103 K D F S Y F T D H G I D M N P S V N V M A R S L F F A T G Q K W K I
ATGAGACAAAACCTAAGTCCAGGATTCACGTCTGGTAAGCTCAAGGTACGCATGAACAAATCCGAGAGTGCAGCGATCAGTTGACAACTGTATTCATGAT
137 M R Q K L S P G F T S G K L K G T H E Q I R E C S D Q L T N C I H D
AAATCCAAGGAACCGACGAATTGAAGTATATGAACCTTGTTCGGAATTTAGCCACTGACGTAATGGAACATGTGCATTGGTATGAAATGGATACAATT
171 K S K E T D G I E V Y E L V G N L A T D V I G T C A F G M K L D T I
AATAACGCAACTCAAGTTTGTAGACAAAATGTAAAAAAGTGTCAAACCTAGTGTAAAGTAATTTTCTTCAATACTTGGAGTCTTATTTCCGAAAATC
205 N N D N S S F R Q N V K K V F K P S G K V I F L Q I L G V L F P K I
GTTAAGTTATTGAACTTCAAACCTTCTCCGGTGGACGTAATGCCATTAATTTTTTCCATTCTGTATTAGAGAAGTCATCGAGTATAGGACCAAAAATGAT
239 V K L L K L L F T A G S E T V T A T A S F C F Y E L A L H K D I Q D
GTGGTTAGAAACGACCTAACACAGACTTTAATGAAAGCAGAGGATTTGGTTGTAAGCAGTGATTATAAGGAGAAGAAAAGTATTGTAATTAGATATA
273 V V R N D L T Q T L M K A R Q D L V V S S D Y K G E E K Y C E L D I
ATTGCAATGCAATGTTGTTGTTACGGCTGGTCTGAAACTGTAAGTGCACAGCATCTTTTGTGTTTATGAGTTGGCATTGCACAAAGATATCCAAGAC
307 I A N A M L L F T A G S E T V T A T A S F C F Y E L A L H K D I Q D
AGATTACGTGCCGAGATAATTTTCGTGAAAATAAAGTATGGTGGACAGCTTAAACATGAATTTTGAAGATCTTCATTACGCCGATATGGTTTATGATGAA
341 R L R A E I I S S K I K Y G G Q L N N E F L E D L H Y A D M V L D E
ACTCATCGTAAGTACACTATTATTACGGCCCTATTGAGAGGAGCTACACAGATTATGAAGTACCTGGGGAGTCATTAACAATTGAAAAGGACAAAATTT
375 T H R K Y T I I T A L L R G A T Q D Y E V P G E S L T I E K G Q K I
TTAATACCAATTTATAGTATACATCATGATCCAAAGTATTATCCAAATCCAGATCTTTCGATCCGGAAGATTTACTCGGGAAGAAAATCTAAACGACCG
409 L I P I Y S I H H D P K Y Y P N P D T F D P E R E T A E E K S K R P
AACGGAACATTCTTACCGTTTGGAGATGGACCTCGTCATTGCATAGGAAACGTTTCGCTGAATTGGAATTAATAAATCTATCAAAAATATTATCGAAA
443 N G T F L P F G D G P R H C I G K R F A E L E L K I I L S K I L S K
TTTGAAATATCACCTTGTGAAAAACGGAATACCGCTGCAATGAAAAAGAACGTGGGATACTTCACCGAAAATGGAATTGGTTAAATTTTAGGCCA
477 F E I S P C E K T E I P L Q M K K E R G I T S P K N G I W L N F R P
ATTGTGGATTAA
511 I V D *
  
```

图 1 苹果黄蚜 *AcCYP6CY14* cDNA 序列及推导的氨基酸序列

Fig. 1 The cDNA and deduced amino acid sequences of *AcCYP6CY14* from *Aphis citricola*

血红素结合位点 F ## G ### C # G, K 螺旋 E ## R, I 螺旋 A/GG # D/ETT/S, C 螺旋 W ## R,
和 Meander 区序列 P ## F # P # RF 用灰色和下划线标出。

The heme-binding regions F ## G ### C # G, Helix-K (E ## R), Helix-I (A/GG # D/ETT/S), Helix-C (W ## R)
and Meander (P ## F # P # RF) are highlighted in grey and underline.

2.2 *AcCYP6CY14* 在苹果黄蚜不同发育阶段的表达分析

为了确定 *AcCYP6CY14* 基因在苹果黄蚜不同发育阶段的表达谱, 采用 RT-qPCR 技术检测了 *AcCYP6CY14* 在苹果黄蚜不同发育阶段的相对表达量, 结果表明, *AcCYP6CY14* 在苹果黄蚜的各个发育阶段均有表达, 其中在 3 龄若蚜中表达量最高, 其次为 2 龄和 4 龄若蚜, 在 1 龄若蚜中表达量最低 (图 2)。

2.3 吡虫啉对 *AcCYP6CY14* 基因的诱导表达

为了确定 *AcCYP6CY14* 对吡虫啉是否有响应, 以便对 *AcCYP6CY14* 的功能进行深入研究, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算了 *AcCYP6CY14* 在吡虫啉诱导 3、6、12、24 h 后的相对表达水平。从图 3 可

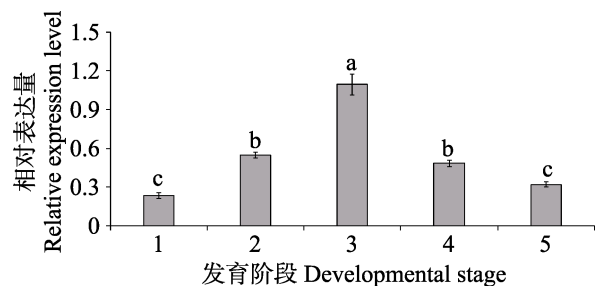


图 2 苹果黄蚜不同发育阶段 *AcCYP6CY14* 的表达水平
Fig. 2 The expression levels of *AcCYP6CY14* at different developmental stages of *Aphis citricola*

1-4: 分别是 1-4 龄若蚜; 5: 成蚜。图中数值为平均值 ± 标准误 (N=3); 柱上标有不同字母表示差异显著

($P < 0.05$, Duncan's 多重检验法)。图 3 同。

1-4: 1st -4th instar nymph, respectively; 5: Adult.

The data in the figure are mean ± SE from three independent experiments. Histograms with different letters indicate significant difference ($P < 0.05$, Duncan's multiple range test). The same as Fig.3.

以看出, 苹果黄蚜 3 龄若蚜经过吡虫啉诱导, 仅在 12 h 时表达量与对照组有显著差异 ($P < 0.05$); 其他时间点与对照组差异不显著 ($P > 0.05$)。

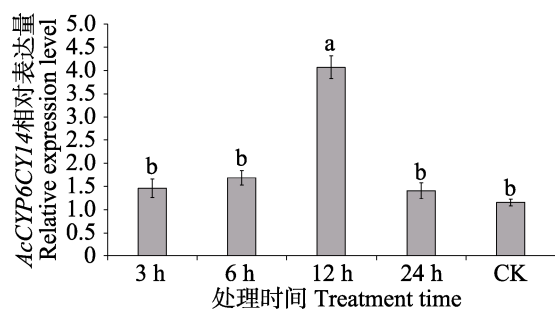


图 3 吡虫啉对苹果黄蚜 *AcCYP6CY14* 基因的诱导表达
Fig. 3 Relative expression of *AcCYP6CY14* gene induced by imidacloprid in *Aphis citricola*

2.4 饲喂 ds*AcCYP6CY14* 对苹果黄蚜 *AcCYP6CY14* 基因表达水平的影响

利用 RNAi 技术沉默苹果黄蚜 3 龄若蚜 *AcCYP6CY14* 基因后, 采用荧光定量 PCR 的方法测定干扰 24 h 转接至新鲜苹果嫩梢上 24、48、72 h 后 *AcCYP6CY14* mRNA 的相对表达量。结果表明, 与对照组相比, ds*AcCYP6CY14* 处理组在干扰不同时间后, *AcCYP6CY14* 的相对表达量均显著下降, 但不同时间点之间无显著差异 (图 4)。

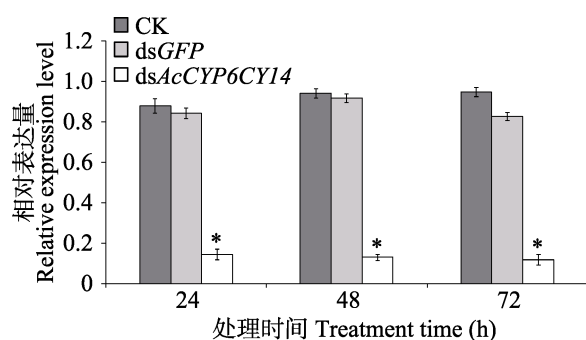


图 4 取食 ds*AcCYP6CY14* 后苹果黄蚜 *AcCYP6CY14* 的相对表达量

Fig. 4 Relative expression of *AcCYP6CY14* in *Aphis citricola* after feeding ds*AcCYP6CY14*

图中数据为平均值±标准误 ($N=3$);

*代表差异显著 ($P < 0.05$)。

Data in the figure are mean $\pm$ SE from three independent experiment. * indicate significant difference at 0.05 level ($P < 0.05$).

2.5 *AcCYP6CY14* 沉默后苹果黄蚜对吡虫啉的敏感性

为了分析 *AcCYP6CY14* 在苹果黄蚜抵抗吡虫啉中的作用, 通过 RNA 干扰技术结合室内生物测定实验, 检测 *AcCYP6CY14* 沉默后苹果黄蚜对吡虫啉的敏感性。结果发现, 饲喂 ds*AcCYP6CY14* 的处理组与饲喂 ds*GFP* 的对照组相比, 用浸虫法处理苹果黄蚜后, 处理组苹果黄蚜的死亡率为 78.2%, 对照组苹果黄蚜的死亡率为 12.97%, 处理组死亡率比对照组提高了 65.23%, 差异极显著 ($P < 0.01$) (图 5)。

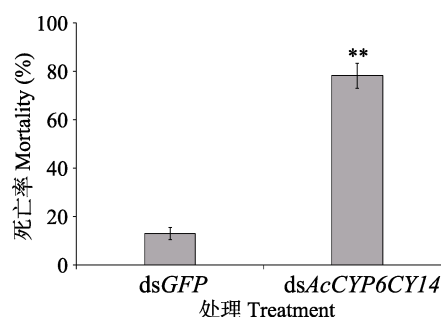


图 5 RNA 干扰后苹果黄蚜对吡虫啉的敏感性
Fig. 5 The sensitivity of *Aphis citricola* to imidacloprid after feeding ds*AcCYP6CY14*

**代表差异极显著。

** indicates extremely significant difference at 0.01 level ($P < 0.01$).

3 讨论

苹果黄蚜是为害苹果树的重要害虫, 研究其对杀虫剂的抗性机理对于农药的减量化使用、提高果品品质具有重要意义。国内外研究表明细胞色素 P450 对杀虫剂的解毒代谢作用增强, 是导致昆虫对靶标农药产生抗性的主要原因 (邱星辉, 2014), 其中与昆虫抗药性相关的 P450 基因多集中于 CYP4、CYP6 和 CYP9 家族 (Feyereisen, 2006)。本研究基于苹果黄蚜转录组数据库, 搜索得到一条 CYP6 家族基因片段, 并且克隆获得该基因的 cDNA 全长序列, 提交国际 P450 命名委员会命名为 *AcCYP6CY14*, GenBank 登录号为 MH717248, 该基因隶属于 CYP6 家族, 推测可能参与杀虫剂的解毒代谢。基因在不同发育时期的表达特性在一定程度上可以反映出该基因的

功能,通过对 *AcCYP6CY14* 基因进行时序表达模式分析发现,该基因在苹果黄蚜各个发育时期均有表达,其表达量随着苹果黄蚜发育龄期的增长呈现出先升高后降低的趋势,这与其他昆虫中 P450 基因在不同发育阶段表达模式类似,如飞蝗 *Locusta migratoria* 的 *LmCYP6FD3*,家蚕 *Bombyx mori* 的 *CYP6AB5* 和烟草天蛾 *Manduca sexta* 的 *CYP4M3*。我们研究发现 *AcCYP6CY14* 在苹果黄蚜 3 龄若蚜中表达量最高,该龄期为利用 RNA 干扰技术研究该基因功能的最佳时期。

细胞色素 P450 在昆虫代谢外源有毒物质的过程中发挥着重要作用,一些外源性和内源性化合物可诱导昆虫细胞色素 P450 基因的表达 (Li *et al.*, 2007),而 P450 基因的过量表达可以导致昆虫对杀虫剂的高抗性 (Berenbaum, 2002; 潘貽武等, 2007; Schuler, 2011)。朱文雅等 (2017) 的研究表明沉默飞蝗 P450 基因 *LmCYP6FD3* 后,其对西维因的敏感性显著升高,死亡率上升了 32%。李晓叶 (2015) 研究发现禾谷缢管蚜 P450 基因 *CYP6CY3-1* 和 *CYP6CY3-2* 经吡虫啉诱导后,其表达量显著高于敏感品系。麦二叉蚜 P450 基因 *CYP6A3* 在对吡虫啉的解毒代谢过程中起重要作用 (朱英慧, 2018)。本研究采用吡虫啉对苹果黄蚜 3 龄若蚜进行诱导不同时间后发现该基因也可以被吡虫啉诱导,但仅在 12 h 时表达量显著升高。这与刘昌燕和曾凡荣 (2014) 对大草蛉 P450 基因的研究结果一致,推测 *AcCYP6CY14* 基因可能参与苹果黄蚜对吡虫啉的分解代谢,在苹果黄蚜对吡虫啉抗性发展过程中起重要作用。王晖等 (2012) 的研究发现干扰麦长管蚜和桃蚜的 P450 基因后,对虫体产生了致死效应,但我们在实验过程中未发现沉默 *AcCYP6CY14* 后苹果黄蚜出现死亡现象,而是苹果黄蚜对吡虫啉的敏感性显著升高,这可能是由于该 P450 基因参与了吡虫啉的解毒代谢过程,其沉默后,使得苹果黄蚜对杀虫剂的解毒代谢过程受到影响,进而使得苹果黄蚜对杀虫剂更加敏感。

近年来, RNA 干扰 (RNAi) 技术作为反向遗传学工具被广泛应用于昆虫基因功能研究、新

型农药研发、害虫防治等领域 (王聪等, 2018),对害虫有致死作用的 dsRNA 产品被称作是潜在的第 4 代杀虫剂,主要是通过转 dsRNA 植物来实现对害虫的防控, RNAi 被广泛的应用在作物的抗蚜研究中,如通过转基因拟南芥成功表达蚜虫看家基因 V-ATPase-A 的 dsRNA,棉蚜取食植物后,成功干扰了体内 V-ATPase-A 基因 (张维等, 2013)。目前,在麦长管蚜 (Zhang *et al.*, 2013; 李雪峰等, 2014)、麦二叉蚜 (Zhang *et al.*, 2015)、豌豆蚜 (Mutti *et al.*, 2006)、桃蚜 (Pitino *et al.*, 2011) 等蚜虫的 RNAi 靶标基因鉴定和基因功能分析中均有应用。本研究利用 RNAi 技术,通过体外饲喂 ds*AcCYP6CY14*,沉默苹果黄蚜 3 龄若蚜 *AcCYP6CY14* 基因不同时间后,发现 *AcCYP6CY14* 的相对表达量均显著下降。结合吡虫啉对苹果黄蚜的室内毒力测定,研究了苹果黄蚜 *AcCYP6CY14* 基因在抵抗吡虫啉中的作用。研究发现沉默 *AcCYP6CY14* 后,苹果黄蚜对吡虫啉的敏感性显著升高,死亡率较对照组提高了 65.23%,推测该基因可能参与了吡虫啉在苹果黄蚜体内的解毒代谢。本研究结果为揭示苹果黄蚜 P450 基因对化学农药的解毒代谢机制奠定理论基础,为农药的减量化使用提供新思路。

参考文献 (References)

- Bautista MA, Miyata T, Miura K, Tanaka T, 2009. RNA interference-mediated knockdown of a cytochrome P450, *CYP6BG1*, from the diamondback moth, *Plutella xylostella*, reduces larval resistance to permethrin. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 39(1): 38–46.
- Berenbaum MR, 2002. Postgenomic chemical ecology: from genetic code to ecological interactions. *J. Chem. Ecol.*, 28(5): 873–896.
- Elzaki ME, Zhang W, Han Z, 2015. Cytochrome P450 CYP4DE1 and CYP6CW3v2 contribute to ethiprole resistance in *Laodelphax striatellus* (Fallen). *Insect Mol. Biol.*, 24(3): 368–376.
- Feyereisen R, 2006. Evolution of insect P450. *Biochem. Soc. Trans.*, 34(Pt 6): 1252–1255.
- Feng YT, Yu Q, Wang Z, Liu ZF, Xie YP, Fan RJ, 2012. Susceptibility of *Aphis citricola* von der Goot to seven insecticides in Yuncheng Shanxi. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 40(11): 1214–1216. [封云涛, 庾琴, 王振, 刘中芳,

- 谢映平, 范仁俊, 2012. 山西运城地区苹果黄蚜对 7 种杀虫剂的敏感性. *山西农业科学*, 40(11): 1214–1216.]
- Feng YT, Wang Z, Zhang RX, Yu Q, Liu ZF, Gao Y, Fan RJ, 2015. Research on discrimination dose of acetamiprid and bifenthrin in *Aphis citricola* van der Goot. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 52(5): 1149–1153. [封云涛, 王振, 张润祥, 庾琴, 刘中芳, 高越, 范仁俊, 2015. 联苯菊酯和啉虫脒对苹果黄蚜的区分剂量研究. *应用昆虫学报*, 52(5): 1149–1153.]
- Lv CJ, 2005. Susceptibility dynamics of *Aphis citricola* von der Goot to insecticides and resistance management strategy. Taigu: Shanxi Agricultural University. [吕朝军, 2005. 苹果黄蚜对杀虫剂的敏感性动态及抗性治理对策研究. 硕士学位论文. 太谷: 山西农业大学.]
- Lv CJ, Han JC, Liu HP, Ren YX, Ma L, 2007. Influence of host plants to detoxification enzymes and susceptibilities to insecticides on *Aphis citricola* von der Goot. *Journal of Plant Protection*, 34(5): 534–538. [吕朝军, 韩巨才, 刘慧平, 任一新, 马林, 2007. 寄主植物对苹果黄蚜药剂敏感性及解毒酶活性的影响. *植物保护学报*, 34(5): 534–538.]
- Liu CY, Zeng FR, 2014. Cloning of *Chrysopa septempunctata* P450 cDNA fragment and the expression induced by imidacloprid. *Chinese Journal of Biological Control*, 30(3): 427–433. [刘昌燕, 曾凡荣, 2014. 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*, 30(3): 427–433.]
- Liu HP, Han JC, Xu Q, Lv CJ, Liu HQ, 2007. Selective toxicity of insecticides between *Aphis citricola* and *Coccinella septempunctata*. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 15(2): 126–129. [刘慧平, 韩巨才, 徐琴, 吕朝军, 刘慧芹, 2007. 杀虫剂对苹果黄蚜与七星瓢虫的毒力及选择性研究. *中国生态农业学报*, 15(2): 126–129.]
- Li XF, Fan J, Sun YW, Wang GP, Chen HM, Yan T, Du WM, Xia LQ, 2014. Cloning and RNA interference analysis of the *Sitobion avenae* salivary protein C002 gene. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 51(6): 1479–1487. [李雪峰, 范佳, 孙永伟, 王根平, 陈红梅, 闫婷, 杜文明, 夏兰琴, 2014. 麦长管蚜唾液蛋白 C002 的基因克隆与 RNA 干扰研究. *应用昆虫学报*, 51(6): 1479–1487.]
- Li X, Schuler MA, Berenbaum MR, 2007. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu. Rev. Entomol.*, 52: 231–253.
- Li XY, 2015. Molecular cloning and expression analysis of P450 *CYP6CY3* genes from *Rhopalosiphum padi*. Master degree dissertation. Yangling: Northwest A&F University. [李晓叶, 2015. 禾谷缢管蚜 P450 *CYP6CY3* 基因的分子克隆和表达分析. 硕士学位论文. 杨凌: 西北农林科技大学.]
- Mutti NS, Park Y, Reese JC, Reeck GR, 2006. RNAi knockdown of a salivary transcript leading to lethality in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *J. Insect Sci.*, 6(38): 1–7.
- Nelson DR, 2013. A world of cytochrome P450s. *Philos. Trans. R Soc. Lond B Biol. Sci.*, 368(1612): 20120430.
- Peng B, Si SD, Luan BH, Wang KW, Wang YZ, 2010. Resistance monitoring of *Aphis citricola* in major apple producing areas in Shandong province. *China Fruits*, (5): 48–51. [彭波, 司树鼎, 栾炳辉, 王可伟, 王英姿, 2010. 山东省主要苹果产区苹果黄蚜抗药性水平监测. *中国果树*, (5): 48–51.]
- Pitino M, Coleman AD, Maffei ME, Ridout CJ, Hogenhout SA, 2011. Silencing of aphid genes by dsRNA feeding from plants. *PLoS ONE*, 6(10): e25709.
- Pan YW, Liu N, Liu XN, 2007. Advances in studies of cytochrome P450 in the insect and its mediated insecticide resistance. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 44(4): 470–475. [潘贻武, 刘宁, 刘小宁, 2007. 昆虫细胞色素 P450 的研究进展及其介导的抗药性. *新疆农业科学*, 44(4): 470–475.]
- Qiu XH, 2014. Molecular mechanisms of insecticide resistance mediated by cytochrome P450s in insects. *Acta Entomologica Sinica*, 57(4): 477–482. [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.]
- Schuler MA, 2011. P450s in plant-insect interactions. *Biochim. Biophys. Acta*, 1814(1): 36–45.
- Tang T, Zhao QC, Feng XY, Liu XY, Qiu LH, 2013. Effects of RNAi-mediated silencing of several components of cytochrome P450s on beta-cypermethrin toxicity against *Helicoverpa armigera*. *Journal of Plant Protection*, 40(4): 355–362. [唐涛, 赵春青, 冯晓云, 刘雪源, 邱立红, 2013. RNAi 介导的棉铃虫细胞色素 P450 酶系几种组分基因沉默对高效氯氰菊酯毒力的影响. *植物保护学报*, 40(4): 355–362.]
- Wang C, Cai PM, Zhang QW, Yang YC, Chen JH, 2018. Research progress on RNAi technology application in agricultural insect pest control. *China Plant Protection*, 38(6): 22–29. [王聪, 蔡普默, 张琪文, 杨燕川, 陈家骅, 2018. RNAi 技术在农业害虫防治中的应用研究进展. *中国植保导刊*, 38(6): 22–29.]
- Wang H, Zhang M, Zhang XH, Xia LQ, 2012. Silencing of cytochrome P450 in *Sitobion avenae* and *Myzus persicae* through RNA interference. *Scientia Agricultura Sinica*, 45(17): 3463–3472. [王晖, 张珉, 张小红, 夏兰琴, 2012. 利用 RNAi 技术沉默麦长管蚜与桃蚜细胞色素 P450. *中国农业科学*, 45(17): 3463–3472.]
- 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.]
- Wu RX, 2016. Resistance monitoring and population dynamics of *Aphis citricola* in apple orchards of Shaanxi province. Master dissertation. Yangling: Northwest A&F University. [武荣祥, 2016. 陕西省苹果黄蚜的抗药性监测及种群动态研究. 硕士学位论文. 杨凌: 西北农林科技大学.]
- Xu L, 2017. Study on over-expression and regulation mechanisms of cytochrome P450 *CYP6B7* in cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. Doctoral dissertation. Beijing: China Agricultural University. [徐莉, 2017. 棉铃虫细胞色素 P450 *CYP6B7* 基因过量表达及调控机制研究. 博士学位论文. 北京: 中国农业大学.]
- Yu Q, Wang Z, Feng YT, Liu ZF, Zhang RX, 2013. Toxicity test of different pesticides and their mixed formulation against *Aphis citricola*. *Plant Protection*, 39(3): 178–181. [庾琴, 王振, 封云涛, 刘中芳, 张润祥, 2013. 不同杀虫剂对苹果黄蚜的毒力及复配研究. 植物保护, 39(3): 178–181.]
- Zhang M, Zhou Y, Wang H, Jones H, Gao Q, Wang D, Ma Y, Xia L, 2013. Identifying potential RNAi targets in grain aphid (*Sitobion avenae* F.) based on transcriptome profiling of its alimentary canal after feeding on wheat plants. *BMC Genomics*, 14: 560.
- Zhang W, Gao CB, Yin X, Peng M, Cui BM, 2013. Construction of RNAi vector for *Aphis gossypii* V-ATPase-A gene and the gene expression in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 41(10): 17–20. [张维, 高朝宝, 尹秀, 彭明, 崔百明, 2013. 棉蚜 V-ATPase-A 基因 RNAi 载体的构建及其在转基因拟南芥的基因表达. 江苏农业科学, 41(10): 17–20.]
- Zhu WY, Wu HH, Zhang XR, Liu J, Zhang JZ, Ma EB, 2017. Expression profiles of the cytochrome P450 gene *LmCYP6FD3* in *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae) and its role in insecticide detoxification. *Acta Entomologica Sinica*, 60(7): 742–749. [朱文雅, 吴海花, 张学尧, 刘娇, 张建珍, 马恩波, 2017. 飞蝗细胞色素 P450 基因 *LmCYP6FD3* 的表达及其在杀虫剂解毒中的作用. 昆虫学报, 60(7): 742–749.]
- Zhang YL, Zeng HM, Yang XF, Yang FS, Liu H, Yin FS, Mao JJ, Qiu DW, 2009. Cloning of *Ostrinia furnacalis* P450 gene cDNA and inducible expression of secondary plant metabolite. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 25(2): 126–131. [张雨良, 曾洪梅, 杨秀芬, 杨峰山, 刘华, 尹富仕, 毛建军, 邱德文, 2009. 玉米螟 P450 基因 cDNA 的克隆及植物次生物质对其诱导表达. 中国生物化学与分子生物学报, 25(2): 126–131.]
- Zhu YH, 2018. Resistant mechanism of cytochrome P450 mediated *Schizaphis graminum* on insecticides. Master dissertation. Xinxiang: Henan Institute of Science and Technology. [朱英慧, 2018. 细胞色素 P450 介导的麦二叉蚜对杀虫剂的抗性机制. 硕士学位论文. 新乡: 河南科技学院.]
- Zhang Y, Fan J, Sun JR, Chen JL, 2015. Cloning and RNA interference analysis of the salivary protein *C002* gene in *Schizaphis graminum*. *Journal of Integrative Agriculture*, 14(4): 698–705.
- Zheng ZS, Xing K, Wang JM, Zhang XT, 2015. Monitoring for pesticides resistance in green aphid at different regions in Taiyuan. *Pesticide Science and Administration*, 36(1): 49–53. [郑竹胜, 邢鲲, 王建民, 张秀廷, 2015. 太原市不同地区苹果黄蚜抗药性水平监测. 农药科学与管理, 36(1): 49–53.]