

褐飞虱 *CYP6ER1* 的时空表达及其 对呋虫胺的响应*

肖汉祥^{1,2**} 李燕芳^{1,2} 陈珊媛^{1,2} 戴阳朔^{1,2} 袁龙宇^{1,2***} 张振飞^{1,2***}

(1. 广东省农业科学院植物保护研究所, 广州 510640; 2. 广东省植物保护新技术重点实验室, 广州 510640)

摘要 【目的】揭示褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 对呋虫胺抗药性形成的分子机制。【方法】以呋虫胺不同抗性的褐飞虱种群为材料, 采用 qRT-PCR 方法检测 *CYP6ER1* 在褐飞虱各发育阶段和不同组织以及在呋虫胺半致死浓度处理后的 P450 酶的活性和 *CYP6ER1* 基因的表达情况。采用生物测定的方式检测了广东省不同地理种群褐飞虱对呋虫胺的抗药性和 *CYP6ER1* 基因在不同地理种群中的表达量。【结果】*CYP6ER1* 基因在抗性褐飞虱种群中表达量显著高于敏感种群, 在成虫期 3-9 d 时和中肠组织中也有很高的表达量; 与对照组相比, 褐飞虱在呋虫胺半致死浓度处理后, *CYP6ER1* 基因表达量和 P450 酶的活性均存在差异; 而且广东地区褐飞虱不同地理种群 *CYP6ER1* 基因表达量和抗性水平有关。【结论】*CYP6ER1* 可能参与褐飞虱对呋虫胺的解毒代谢过程, 影响褐飞虱对呋虫胺的抗药性。

关键词 褐飞虱; 抗药性; *CYP6ER1*; 基因表达

Spatiotemporal expression of *CYP6ER1* and response to dinotefuran stress in *Nilaparvata lugens*

XIAO Han-Xiang^{1,2**} LI Yan-Fang^{1,2} CHEN Shan-Yuan^{1,2} DAI Yang-Shuo^{1,2}
YUAN Long-Yu^{1,2***} ZHANG Zhen-Fei^{1,2***}

(1. Plant Protection Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China;

2. Guangdong Provincial Key Laboratory of High Technology for Plant Protection, Guangzhou 510640, China)

Abstract 【Objectives】To investigate the molecular mechanism responsible for the resistance of *Nilaparvata lugens* to dinotefuran. 【Methods】The expression of the *CYP6ER1* gene and the activity of P450 enzymes were measured and compared in brown planthopper (BPH) populations with different levels of resistance to dinotefuran. The expression of the *CYP6ER1* gene in different developmental stages and tissues and the activity of P450 enzymes, were measured after treatment with semi-lethal concentrations of dinotefuran. Susceptibility to dinotefuran was tested using the stem-dip method in a laboratory. 【Results】The *CYP6ER1* gene was significantly more highly expressed in resistant than in sensitive, populations. It was also more highly expressed in 3 to 9 day-old adults than in other age groups, and in midgut tissue than in other tissues. BPHs treated with semi-lethal concentrations of dinotefuran had significantly different *CYP6ER1* gene expression and P450 enzyme activity to the control group. 【Conclusion】There is a correlation between expression of the *CYP6ER1* gene and resistance in different *N. lugens* populations. *CYP6ER1* may therefore be involved in the detoxification of dinotefuran in the brown planthopper.

Key words *Nilaparvata lugens*; pesticide resistance; *CYP6ER1*; differential expression

*资助项目 Supported projects: 国家重点研发计划项目 (2021YFD1401100); 广东省粤穗联合基金项目 (2020A1515110514)

**第一作者 First author, E-mail: 290432210@qq.com

***共同通讯作者 Co-corresponding authors, E-mail: yuanlongyu@gdaas.cn; zhangzhenfei@gdaas.cn

收稿日期 Received: 2022-05-15; 接受日期 Accepted: 2022-07-25

褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 是水稻重大迁飞性害虫之一 (Hu *et al.*, 2016), 具有繁殖力和致害性高等特征 (Yuan *et al.*, 2020)。目前, 褐飞虱的防治主要依靠杀虫剂 (Wang *et al.*, 2008), 然而由于长期大规模地使用杀虫剂, 褐飞虱已经对不同类型的杀虫剂产生不同程度的抗药性 (Wang *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2014; Mu *et al.*, 2016)。褐飞虱产生抗药性已成为当前有效防治褐飞虱的主要障碍之一。2005 年褐飞虱大暴发的主要原因之一就是其对吡虫啉的高抗性 (Garrood *et al.*, 2016)。因此, 有必要研究褐飞虱对杀虫剂抗性产生的机制, 以减少其抗性的产生, 降低褐飞虱对水稻的危害, 保障我国水稻粮食生产安全。

呋虫胺是日本三井公司开发的第三代新烟碱类杀虫剂, 其与现有的烟碱类药物结构有所不同, 其四氢呋喃基取代了氯代吡啶基、氯代噻唑基, 不含卤族元素, 在性能方面与烟碱有所不同 (吴鸿飞等, 2013)。呋虫胺主要作用于害虫的神经, 让害虫异常兴奋, 最终麻痹死亡 (Wang *et al.*, 2015)。呋虫胺对褐飞虱、白背飞虱 *Sogatella furcifera*、茶小绿叶蝉 *Empoasca pirusuga*、蜡象类、白粉虱类及蚜虫类等半翅目害虫有很高的杀虫活性 (郭晓君等, 2022)。广东省不同稻区褐飞虱种群对呋虫胺的敏感性不同, 广州等地区褐飞虱种群对呋虫胺的 LC_{50} 值在 3.67-11.09 mg/L, 抗性倍数为 26.21-84.35 倍 (肖汉祥等, 2017)。张小磊等 (2016) 报道湖北省鄂州和武汉地区褐飞虱对呋虫胺已产生中等水平抗性。

细胞色素 P450 是一个典型的代谢家族 (Zhang *et al.*, 2018)。细胞色素 P450 作为一类重要的解毒酶, 广泛参与刺吸式害虫对吡虫啉、呋虫胺、噻虫嗪、噻虫胺、亚砷和丁苯异丙啉等多种杀虫剂的抗性 (Jin *et al.*, 2019; Mao *et al.*, 2019; Hamada *et al.*, 2020)。研究表明褐飞虱对烟碱类农药的抗药性随着细胞色素 P450 基因相对表达量的变化而变化 (廖逊等, 2019); 褐飞虱中多个细胞色素 P450 基因 (*CYP6ER1*、*CYP6AY1*、*CYP4CE1* 和 *CYP6CW1*) 可代谢吡虫啉, 增加褐飞虱对吡虫啉的抗性 (Bass *et al.*,

2011; Ding *et al.*, 2013; Lao *et al.*, 2015; Bao *et al.*, 2016)。*CYP6ER1* 的表达量褐飞虱吡虫啉的抗性呈线性关系。随后证实吡虫啉抗药性种群褐飞虱中 *CYP6AY1* 的表达水平显著升高。虽然 *CYP6AY1* 的表达水平与 *CYP6ER1* 相比没有显著上调, 但 *CYP6AY1* 对吡虫啉的代谢效率更高, RNA 干扰 (RNAi) 实验和体外重组实验均显示 *CYP4CE1* 和 *CYP6CW1* 对吡虫啉具有一定的降解能力, 表明多个过表达的 P450 基因共同导致了吡虫啉的抗性 (Lao *et al.*, 2015; Bao *et al.*, 2016)。那么以上这些 P450 基因是否参与到褐飞虱对呋虫胺的抗性中, 这有待证明。

因此, 本研究在前期对多个 P450 基因表达影响的基础上, 从中选择了表达量最高的 *CYP6ER1* 为研究对象, 采用 qRT-PCR 方法检测 *CYP6ER1* 在高低抗性褐飞虱不同组织、不同生长发育时期的表达模式, 以及不同地理种群褐飞虱在呋虫胺胁迫条件下基因在褐飞虱体内的表达水平。为了解褐飞虱抗呋虫胺的机制提供理论依据, 为该地区有效防控褐飞虱提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

供试褐飞虱来源于广东省农业科学院植物保护研究所室内人工气候箱 (RXZ 型, 宁波江南仪器厂) 中饲养多代的褐飞虱敏感种群 (SS) 和受呋虫胺农药胁迫饲养 30 代左右的褐飞虱抗药性种群 (RR)。2 个褐飞虱种群均饲喂于 TN1 敏感水稻上。人工气候箱设置条件: 温度 (27 ± 1) °C、相对湿度 $80\% \pm 5\%$ 、光周期 L:D = 16:8。褐飞虱 SS 种群和 RR 种群对呋虫胺的敏感性分别为 $LC_{50} = 0.14$ mg/L 和 $LC_{50} = 24.81$ mg/L。

1.2 方法

1.2.1 样本处理 将褐飞虱敏感种群 (SS) 和褐飞虱抗药性种群 (RR) 1-5 龄若虫、1-15 日龄雌成虫和雄成虫 (3 日龄) 不同组织 (脂肪体、唾液腺、表皮、肌肉、中肠和卵巢) 分别放入液

氮速冻, 置于 - 80 ℃ 冰箱备用。每个处理样本 3 头, 3 次重复。

1.2.2 RNA 提取与 cDNA 第一链合成 按照 Eastep Super Total RNA Extraction Kit (普洛麦格北京生物技术有限公司) 试剂盒中方法提取待测样本总 RNA, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳 (全式金北京有限公司) 和超微量紫外分光光度仪 (美国 Bio-rad 公司) 检测 RNA 的质量和浓度。再以高质量总 RNA 为模板, 按照 HiFiScriptcDNA Synthesis Kit (日本 TAKARA 公司) 反转录试剂盒说明书进行 cDNA 第一链合成, 存入 - 20 ℃ 冰箱备用。

1.2.3 褐飞虱 *CYP6ER1* 的表达分析 基于

NCBI 数据库褐飞虱 *CYP6ER1* (GenBank 登录号: MN480657.1) mRNA 序列用 NCBI 中 Primer-BLAST 工具设计一对引物 qCYP6ER1- F、qCYP6ER1-R (表 1), 以褐飞虱不同龄期、不同组织和药剂处理前后样本 cDNA 为模板, 选用核糖体 18S RNA (18S ribosomal RNA) 基因作为内参基因: 18SRNA -F 和 18SRNA-R (表 1), 反应体系 20 μL: SYBR Green Supermix (日本 TAKARA 公司) 10 μL, cDNA 1 μL, 正反向引物各 1 μL, ddH₂O 7 μL。反应条件: 95 ℃ 30 s; 95 ℃ 5 s, 56 ℃ 30 s, 35 循环; 65 ℃ 5 s。采用 qRT-PCR 方法检测 *CYP6ER1* 的时空表达模式和药剂处理前后的差异表达。

表 1 本文所用引物
Table 1 Primers used in this article

引物名称 Primers name	引物序列 (5'-3') Primers sequences (5'-3')	引物用途 Usage of primers
qCYP6ER1-F	GACGGCAGAGAGCCGTTGAG	用于 RT-PCR 检测 <i>CYP6ER1</i> 表达 CYP6ER1 expression was detected by RT-PCR
qCYP6ER1-R	CGCTTGCTGGCAAAACCTTG	
18SRNA -F	CGCTACTACCGATTGAA	用于 RT-PCR 检测内参基因表达 Reference gene expression was detected by RT-PCR
18SRNA -R	GGAAACCTTGTTACGACTT	

1.2.4 褐飞虱 P450 酶的活性分析 采用南京建成生物工程研究所 [用于细胞色素 P450 (*CYP450*) 活性测定] 生产的试剂盒进行酶活测定。取供试昆虫 10 头, 放入 4 ℃ 的 2-5 mg 生理盐水中漂洗干净后用滤纸拭干, 称重, 放入 2 mL 离心管中。定量加入每种试剂盒指定所需的组织匀浆介质, 用组织捣碎机 10 000-15 000 r/min 上下研磨 60 s 制成组织匀浆。将制备好的组织匀浆用低温高速离心机 4 ℃ 冷冻离心。取上清液作为待测酶液备用。按照试剂盒说明分别测定并计算出不同种群褐飞虱体内 *CYP450* 酶的活性。

1.2.5 褐飞虱抗药性分析 按照稻茎浸渍法对实验中使用的水稻茎秆进行处理。以含有 0.1% 吐温-80 的蒸馏水作为稀释液, 按等比稀释成 5 个系列浓度备用。取分蘖盛期的稻株, 剪成长约 10 cm 的连根稻茎, 3 株 1 组, 晾干备用。将稻茎浸泡于药液中约 30 s, 以含 0.1% 吐温-80 的蒸馏水为对照, 晾干后接入生长发育一致的 3 龄若

虫 20 头, 放入玻璃培养杯中。待若虫全部爬上稻茎或杯壁后竖直培养杯, 并置于人工气候箱中, 96 h 后检查死亡虫数, 对照组死亡率超过 10% 时试验无效。每浓度重复 3 次。为防止稻茎干枯, 需保持稻茎根部脱脂棉湿润。褐飞虱对呋虫胺的敏感基线为 LC₅₀ = 0.14 mg/L (肖汉祥等, 2017)。

1.2.6 数据处理 利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法对褐飞虱 *CYP6ER1* 基因的表达量数据进行相对定量分析 (Livak and Schmittgen, 2001)。使用 Microsoft Office Excel 2007 处理 C_q 值, 将 C_q 值采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析, 以 *t*-test 法在 *P* < 0.05 水平上检验各处理之间的差异显著性。抗性倍数 (RR) = 所测种群 LC₅₀/敏感种群 LC₅₀。抗性水平按分级标准: RR < 3 为敏感阶段; 3.1 ≤ RR < 5.0 为敏感性下降; 5.1 ≤ RR < 10.0 为低水平抗性; 10.1 ≤ RR < 40.0 为中等水平抗性; 40.1 ≤ RR < 160.0 为高水平抗性; RR > 160.1 为极高水平抗性 (张凯等, 2013)。用 Graghpad Prism 8.0 软件

作图。

2 结果与分析

2.1 不同抗药性褐飞虱种群 *CYP6ER1* 的时空表达

在室温条件下, *CYP6ER1* 在敏感种群 (SS) 和抗性 (RR) 种群褐飞虱各个发育阶段均有表达, 且存在差异 (图 1)。*CYP6ER1* 在 SS 种群褐飞虱内, 各个发育阶段并没有显著差异; 而 *CYP6ER1* 在 RR 种群褐飞虱羽化 3 d 和 5 d 时的

表达量达到最高, 分别为 3.48 ± 0.09 和 3.32 ± 0.09 , 并且显著高于若虫发育阶段表达量最高的 3 龄若虫期 (2.57 ± 0.18) ($P < 0.01$)。对比 SS 和 RR 种群褐飞虱, 从 3 龄往后的各个发育时期中 *CYP6ER1* 在 RR 种群中的表达量始终高于 SS 种群 ($P < 0.01$)。在两个不同抗药性种群褐飞虱体内各组织间, *CYP6ER1* 基因的表达水平同样存在差异 (图 2)。*CYP6ER1* 基因在中肠中表达量最高, 显著高于其它组织 ($P < 0.01$), 其次是脂肪体, 显著高于在肌肉、表皮、唾液腺、卵巢和足的表达量 ($P < 0.01$)。

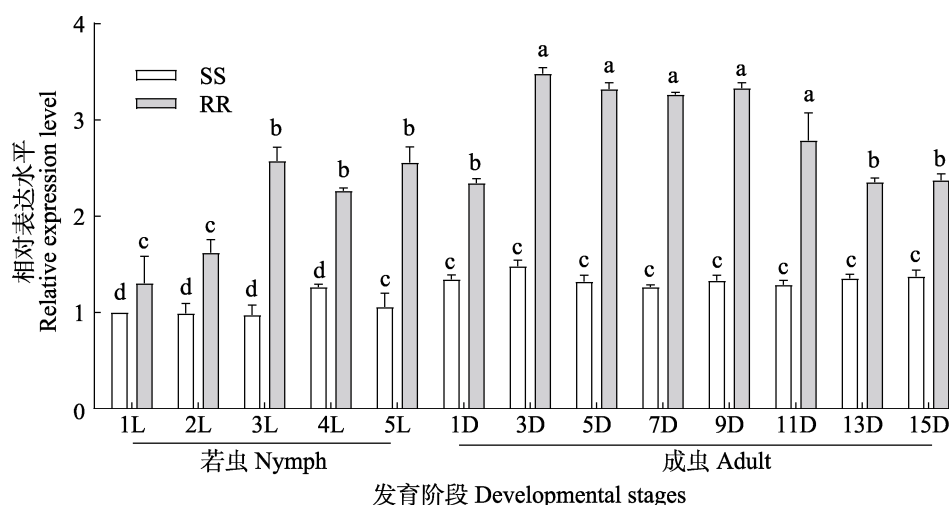


图 1 *CYP6ER1* 在不同抗药性褐飞虱种群各发育阶段表达模式

Fig. 1 Developmental stages expression (in fold) of *CYP6ER1* in different resistant brown planthopper populations

1L-5L: 褐飞虱 1-5 龄若虫; 1D-15D: 褐飞虱羽化后 1-15 d. SS: 敏感种群; RR: 呋虫胺抗药性种群。

图中数据为平均值±标准误, 柱上标有不同小写字母表示褐飞虱 *CYP6ER1* 基因的相对表达量差异显著 ($P < 0.05$, Tukey 检验)。图 2 和图 5 同。

1L-5L: The developmental stage of nymphs 1-5 instar; 1D-15D: The developmental stage of adult nymphs 1-15 days after emergence of nymphs. SS: Sensitive population; RR: Dinotefuran resistant population. Data are mean $\pm$ SE, histograms with different lowercase letters indicate significant differences expression level of *N. lugens* *CYP6ER1* genes ($P < 0.05$, Tukey test). The same as Fig. 2 and Fig. 5.

2.2 不同抗药性褐飞虱种群 *CYP6ER1* 的表达分析和 P450 酶的活性分析

在呋虫胺农药胁迫下, 敏感 (SS) 种群和抗性 (RR) 种群褐飞虱雌成虫中 P450 酶的酶活水平发生较大变化 (图 3)。与敏感种群褐飞虱相比, 经呋虫胺处理 24 h 后抗性种群褐飞虱雌成虫中 P450 酶的酶活水平升高, 且与对照之间存在显著性差异 ($P < 0.01$)。但在相同条件下, 抗性种群褐飞虱雌成虫中 *CYP6ER1* 基因的表达水

平呈上升的趋势, 且表达量是敏感种群褐飞虱的 4.95 倍 (图 4)。因此 *CYP6ER1* 基因参与褐飞虱对呋虫胺抗药性的形成。

2.3 广东不同地区褐飞虱种群 *CYP6ER1* 的表达分析

由表 2 可知, 阳江褐飞虱种群和东莞褐飞虱种群对呋虫胺抗性倍数分别为 26.21 倍和 30.60 倍, 属中等水平抗性外, 开平褐飞虱种群和平远褐飞虱种群对呋虫胺抗性倍数分别为 65.44 倍

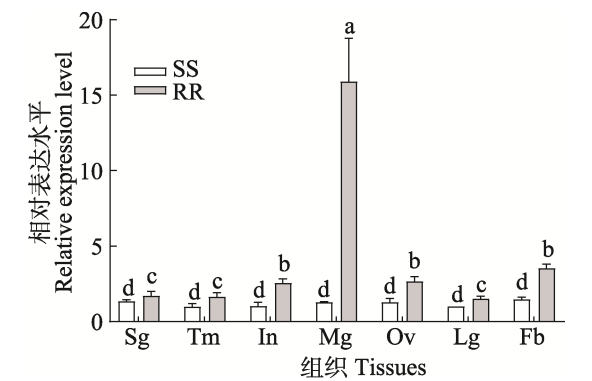


图 2 *CYP6ER1* 在不同抗性褐飞虱种群各组织中的表达模式
Fig. 2 Developmental tissues expression (in fold) of *CYP6ER1* in different resistant brown planthopper populations

Fb: 脂肪体; Sg: 唾液腺; In: 表皮; Mg: 中肠;
Tm: 肌肉; Ov: 卵巢; Lg: 足。
In: Integument; Sg: Salivary gland; Tm: Muscle;
Mg: Midgut; Lg: Leg; Ov: Ovary; Fb: Fat body.

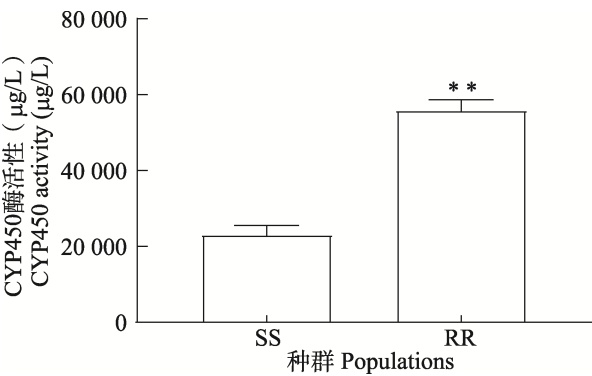


图 3 不同抗性种群褐飞虱 P450 酶的活性
Fig. 3 The P450 activity of the activity of P450 in different drug resistant populations of brown planthopper

柱上的**代表数据差异极显著 ($P<0.01$)。图 4 同。
Histograms with ** represent extremely significantly different ($P<0.01$). The same as Fig. 4.

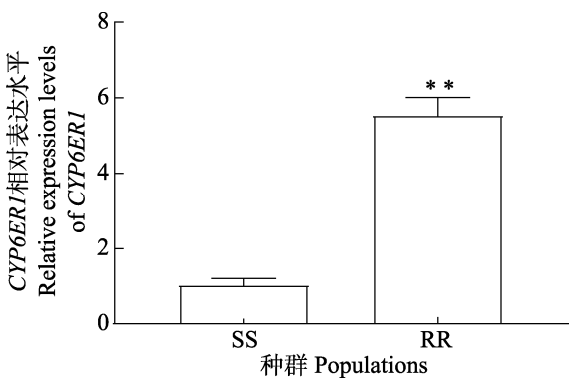


图 4 *CYP6ER1* 在 RR 种群和 SS 种群中的表达模式
Fig. 4 Population-specific expression (in fold) of *CYP6ER1* in RR and SS brown planthopper

和 80.09 倍,属高水平抗性。从 LC_{50} 置信限来看,平远褐飞虱种群和阳江褐飞虱种群对呋虫胺的抗性有较大差异 ($P<0.01$)。在呋虫胺农药半致死浓度的胁迫下,不同地方褐飞虱种群雌成虫中 *CYP6ER1* 基因表达水平有较大区别 (图 3)。与敏感种群褐飞虱相比,经呋虫胺处理 24 h 后不同地方褐飞虱种群雌成虫中 *CYP6ER1* 基因表达水平升高,且与对照敏感种群的表达量之间存在显著性差异 ($P<0.01$)。阳江褐飞虱种群雌成虫中 *CYP6ER1* 基因的表达水平相对较低,其表达量与敏感种群褐飞虱相比,是其 1.5 倍;东莞褐飞虱种群是其 3.5 倍;开平褐飞虱种群是其 5.2 倍;平远种群褐飞虱是其 6.4 倍。从数据上看,4 个褐飞虱地理种群中,平远种群的 *CYP6ER1* 基因表达水平最高,为 6.72 ± 0.74 ($P<0.01$),阳江种群的表达水平最低,开平和东莞种群均有较高的表达水平 (图 5)。因此, *CYP6ER1* 基因的表达水平与不同地方褐飞虱种群对呋虫胺的抗性有明显的相关性。

表 2 广东不同地区褐飞虱种群对呋虫胺的抗性				
Table 2 Resistance levels of Guangdong <i>Nilaparvata lugens</i> populations to dinotefuran				
种群 Population	毒力回归方程 Regression equation of toxicity	LC_{50} (95%置信限) LC_{50} (95% FL) (mg/L)	相关系数 Correlationco efficien	抗性倍数(RR) Resistance ratio
阳江 Yangjiang	$y=3.691\ 6+2.317\ 5x$	3.669\ 3 (1.820\ 2-5.504\ 5)	0.936\ 7	26.21
平远 Pingyuan	$y=3.636\ 6+1.299\ 0x$	11.210\ 4 (8.662\ 3-13.990\ 5)	0.927\ 8	80.07
开平 Kaiping	$y=2.596\ 4+2.498\ 6x$	9.162\ 2 (6.335\ 7-11.750\ 9)	0.924\ 2	65.44
东莞 Dongguan	$y=3.831\ 0+1.850\ 3x$	4.283\ 7 (1.743\ 2-6.922\ 6)	0.930\ 1	30.60

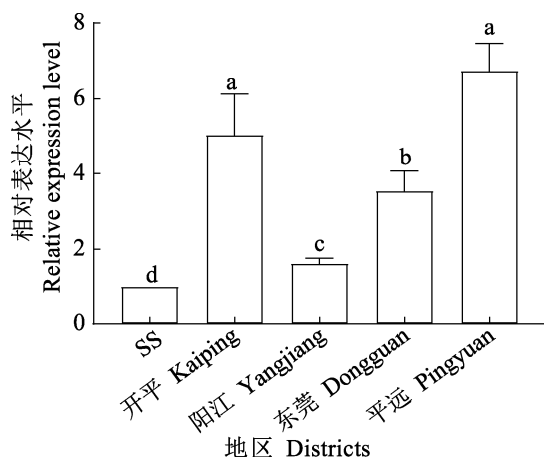


图5 不同地理种群褐飞虱 *CYP6ER1* 的表达
Fig. 5 The expression of *CYP6ER1* in different geographical populations of brown planthopper

3 讨论

在生物发育过程和昆虫对外界胁迫时细胞色素 P450 是生物体内一类经常被调用的超家族多功能氧化酶, 其不同组织中起着不同的作用 (Meunier *et al.*, 2004)。本研究采用 RT-PCR 方法测定了褐飞虱 *CYP6ER1* 的时空表达模式。结果显示, *CYP6ER1* 在褐飞虱成虫期表达量较高, 而若虫期的表达量相对较低 (图 1), 推测这个基因在褐飞虱成虫期的生理过程中起着重要作用。这一结果与 *PaCYP3001U16* 基因在星豹蛛 *Pardosa astrigera* 成蛛期的表达量最高, 在 6 龄幼蛛期的表达量最低一致 (王雅丽等, 2022)。也有研究表明棉铃虫 *Helicoverpa armigera* *CYP6B2* 基因只在幼虫期表达 (徐永强, 2009), 因此细胞色素 P450 基因在不同昆虫不同生长发育阶段起不同作用。本研究发现, *CYP6ER1* 在褐飞虱中肠组织表达量最高, 在脂肪体中表达量次之 (图 2)。这一结果与 Chung 等 (2009) 关于黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* *CYP6G1* 和 *CYP4E3* 的表达模式相似。有研究表明不同基因在昆虫不同组织中表达量, 可能意味着它们在各个组织中执行不同的功能 (商瞰等, 2021)。草地贪夜蛾 *CYP4G15* 在表皮组织中表达量最高; *CYP4L4* 在前肠组织中表达量最高; *CYP4G15* 和 *CYP4L4* 可能参与草地贪夜蛾体内多种内源物

质合成以及受高温、低温胁迫的代谢过程 (Maibèche-Coisne *et al.*, 2002)。在本研究中, *CYP6ER1* 在中肠中表达量最高, 在脂肪体中表达量仅次于中肠, 这是因为在昆虫生长发育和代谢过程中细胞色素 P450 具有解毒和代谢的重要作用 (Senger *et al.*, 2006; Hou *et al.*, 2010)。

昆虫是通过调节体内生理生化反应来改变体内水分、糖类以及高分子蛋白类等物质的含量和改变细胞结构及其内环境和一系列酶的活性来应对农药胁迫 (Pang *et al.*, 2016)。本研究采用酶联免疫和 qRT-PCR 的方法检测了褐飞虱在呋虫胺胁迫条件下的 P450 酶的活性和 *CYP6ER1* 基因的表达水平 (图 3, 图 4)。结果显示, 抗性种群褐飞虱雌成虫 P450 酶的活性和 *CYP6ER1* 基因的表达水平显著高于敏感种群, 说明在抗性种群褐飞虱雌成虫体内, P450 酶的活性的提高有利用褐飞虱对呋虫胺产生抗药性。*NICYP6ER1* 似乎代谢大量外源化合物, 从而参与 BPH 对丁异丙噁、呋喃、亚砷、烯吡和噻虫胺的抗性 (Liao *et al.*, 2018)。有研究发现过表达 *NICYP6ER1* 的转基因果蝇对吡蚜酮的敏感性有一定程度的降低; 与阳性对照 *UAS BtCYP6CM1* 转基因果蝇相比, 过表达 *NICYP6CS1* 果蝇对吡蚜酮的抗性显著增加 (Wang *et al.*, 2021)。这也说明 *CYP6ER1* 可能参与褐飞虱抗药性产生的代谢过程中, P450 代谢活性的增强使褐飞虱对杀虫剂产生极大的抗药性。

广东省不同稻区褐飞虱种群对呋虫胺的敏感性不同。广东省不同地区褐飞虱种群对呋虫胺的敏感性 LC_{50} 值在 3.669 3-11.210 4 mg/L, 抗性倍数分别 26.21-80.07 倍 (表 2)。呋虫胺为第三代新烟碱类杀虫剂, 自 2005 年泰国开始使用呋虫胺防治褐飞虱, Punyawattoe 等 (2016) 报道在泰国褐飞虱对呋虫胺已产生低水平抗性。在日本, Matsukura 等 (2014) 连续 8 年监测了褐飞虱对呋虫胺的抗药性, 结果表明褐飞虱对呋虫胺的抗药性上升, 并且 2012 年呋虫胺对褐飞虱的毒力显著低于 2006 年呋虫胺对褐飞虱的毒力。在我国, 王彦华等 (2008) 报道褐飞虱对呋虫胺仍处于敏感阶段; 张小磊等 (2016) 报道湖北省

鄂州和武汉地区褐飞虱对呋虫胺已产生中等水平抗性。本文测定的广东 4 个地区褐飞虱种群对呋虫胺的抗性倍数为 26.10-80.07 倍 (表 2), 说明经过最近几年的用药, 广东省不同地区褐飞虱种群对呋虫胺已产生中等水平抗性。广东省不同地区褐飞虱种群 *CYP6ER1* 基因的表达量对比敏感种群都显著升高 (图 5)。其中阳江褐飞虱种群雌成虫中 *CYP6ER1* 基因的表达水平相对较低, 约为 1.5 倍; 平远种群褐飞虱表达水平相对较高, 约为 6.4 倍。而且 *CYP6ER1* 基因的表达水平与不同地方褐飞虱种群对呋虫胺的抗性水平之间都有上升的趋势, 说明 *CYP6ER1* 明显与褐飞虱对呋虫胺的抗性相关。近年来, 与新烟碱类农药抗性相关的 P450 基因在其他多种昆虫中也有报道, 如灰飞虱 *Laodelphax striatellus* 中 *CYP6AY3v2* 和 *CYP353D1v2*, 黑腹果蝇 *CYP6G1* 和烟粉虱 *CYP6CM1vQ* (Joussen *et al.*, 2008; Karunker *et al.*, 2009; Elzaki *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017)。这些 P450 基因的发现也预示着 P450 基因在害虫抗药性治理方面的潜力, 目前已有部分研究应用相关基因开展核酸农药的研究 (Ma *et al.*, 2022)。

随着害虫抗药性的升高, 害虫将直接影响寄主植物的产量和生态环境的安全, 而细胞色素 P450 基因的表达量与昆虫抗药性息息相关。本研究初步阐明了 *CYP6ER1* 参与褐飞虱对呋虫胺的适应性, 为进一步研究昆虫抗药性的机制提供理论依据。

参考文献 (References)

- Bao HB, Gao HL, Zhang YX, Fan DZ, Fang JC, Liu ZW, 2016. The roles of *CYP6AY1* and *CYP6ER1* in imidacloprid resistance in the brown planthopper: Expression levels and detoxification efficiency. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 129: 70–74.
- Bass C, Carvalho RA, Oliphant L, Puinean AM, Field LM, Nauen R, Williamson MS, Moores G, Gorman K, 2011. Overexpression of a cytochrome P450 monooxygenase, *CYP6ER1*, is associated with resistance to imidacloprid in the brown planthopper *Nilaparvata lugens*. *Insect Molecular Biology*, 20(6): 763–773.
- Chung H, Sztal T, Pasricha S, Sridhar M, Batterham P, Daborn PJ, 2009. Characterization of *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 genes. *PANS*, 106(14): 5731–5736.
- Ding ZP, Wen YC, Yang BJ, Zhang YX, Liu SH, Liu ZW, Han ZJ, 2013. Biochemical mechanisms of imidacloprid resistance in *Nilaparvata lugens*: Over expression of cytochrome P450 *CYP6AY1*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 43(11): 1021–1027.
- Elzaki MEA, Zhang WF, Feng A, Qiou XY, Zhao WX, Han ZJ, 2016. Constitutive overexpression of cytochrome P450 associated with imidacloprid resistance in *Laodelphax striatellus* (Fallén). *Pest Management Science*, 72(5): 1051–1058.
- Garrood WT, Zimmer CT, Gorman KJ, Nauen R, Bass C, Davies TGE, 2016. Field-evolved resistance to imidacloprid and ethiprole in populations of brown planthopper *Nilaparvata lugens* collected from across south and east Asia. *Pest Management Science*, 72(1): 140–149.
- Guo XJ, Feng YT, Li Y, Li GY, Yu Q, Zhang RX, 2022. Synergistic effect of three surfactants on dinotefuran against *Aphis citricola*. *Plant Protection*, 48(4): 341–345, 352. [郭晓君, 封云涛, 李娅, 李光玉, 庾琴, 张润祥, 2022. 3 种喷雾助剂对呋虫胺防治苹果黄蚜的增效作用. 植物保护, 48(4): 341–345, 352.]
- Hamada A, Stam L, Nakao T, Kawashima M, Banba S, 2020. Differential metabolism of neonicotinoids by brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, *CYP6ER1* variants. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 165: 104538.
- Hou Y, Zou Y, Wang F, Gong J, Zhong XW, Xia QY, Zhao P, 2010. Comparative analysis of proteome maps of silkworm hemolymph during different developmental stages. *Proteome Science*, 8(1): 45–54.
- Hu G, Lim KS, Horvitz N, Clark SJ, Reynolds DR, Sapir N, Chapman JW, 2016. Mass seasonal bioflows of high-flying insect migrants. *Science*, 354(6319): 1584–1587.
- Jin RH, Mao KK, Liao X, Xu PF, Li Z, Ali E, Wan H, Li JH, 2019. Overexpression of *CYP6ER1* associated with clothianidin resistance in *Nilaparvatalugens* (Stål). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 154: 39–45.
- Joußen N, Heckel DG, Haas M, Schuphan I, Schmidt B, 2008. Metabolism of imidacloprid and DDT by P450 GYP6G1 expressed in cell cultures of *Nicotiana tabacum* suggests detoxification of these insecticides in *Cyp6g1*-overexpressing strains of *Drosophila melanogaster*, leading to resistance. *Pest Management Science*, 64(1): 65–73.
- Karunker I, Morou E, Nikou D, Nauen R, Sertchook R, Stevenson BJ, Paine MJ, Morin S, Vontas J, 2009. Structural model and

- functional characterization of the *Bemisia tabaci* CYP6CM1vQ, a cytochrome P450 associated with high levels of imidacloprid resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39(10): 697–706.
- Matsukura K, Shiba T, Sasaki T, Yoshida K, Matsumura M, 2014. Dynamics of *Neotyphodium uncinatum* and N-formylmethylornithine in Italian ryegrass, and their relation to insect resistance in the field. *Journal of Applied Microbiology*, <https://doi.org/10.1111/jam.12374>.
- Lao SH, Huang XH, Huang HJ, Liu CW, Zhang CX, Bao YY, 2015. Genomic and transcriptomic insights into the cytochrome P450 monooxygenase gene repertoire in the rice pest brown planthopper *Nilaparvata lugens*. *Genomics*, 106(5): 301–309.
- Liao X, Jin RH, Zhang XL, Ali E, Mao KK, Xu PF, Li JH, Wan H, 2018. Characterization of sulfoxaflor resistance in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål). *Pest Management Science*, 75(6): 1646–1654.
- Liao X, Wan H, Li JH, 2019. Research progress on insecticides resistance in brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål). *Chinese Journal of Pesticide Science*, 21(5/6): 718–728. [廖逊, 万虎, 李建洪, 2019. 褐飞虱对杀虫剂抗性研究进展. 农药学报, 21(5/6): 718–728.]
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4): 402–408.
- Ma ZZ, Zheng Y, Chao ZJ, Chen HT, Zhang YH, Yin MZ, Shen J, Yan S, 2022. Visualization of the process of a nanocarrier-mediated gene delivery: Stabilization, endocytosis and endosomal escape of genes for intracellular spreading. *Journal of Nanobiotechnology*, 20(1): 124.
- Mao KK, Zhang XL, Ali E, Liao X, Jin RH, Ren ZJ, Wan H, Li JH, 2019. Characterization of nitenpyram resistance in *Nilaparvata lugens* (Stål). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 157: 26–32.
- Maibèche-Coisne M, Jacquin-JolyMarie E, Francois MC, Nagnan-Le Meillour P, 2002. cDNA cloning of biotransformation enzymes belonging to the cytochrome P450 family in the antennae of the noctuid moth *Mamestra brassicae*. *Insect Molecular Biology*, 11(3): 273–281.
- Meunier B, de Visser SP, Shaik S, 2004. Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Chemical Reviews*, 104(9): 3947–3980.
- Mu XC, Zhang W, Wang LX, Zhang S, Zhang K, Gao CF, Wu SF, 2016. Resistance monitoring and cross-resistance patterns of three rice planthoppers, *Nilaparvata lugens*, *Sogatella furcifera* and *Laodelphax striatellus* to dinotefuran in China. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 134: 8–13.
- Pang R, Chen M, Liang ZK, Yue XZ, Ge H, Zhang WQ, 2016. Functional analysis of CYP6ER1, a P450 gene associated with imidacloprid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Scientific Reports*, 6: 34992.
- Punyawattoe P, 2019. Operator exposure to spray deposits using various application techniques in paddy fields. *Journal of Health Research*, 33(5): 375–385.
- Senger KT, Harris K, Levine M, 2006. GATA factors participate in tissue-specific immune responses in *Drosophila* larvae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(43): 15957–15962.
- Shang T, Yang MF, Yu XF, Chen YC, Tian TA, 2021. Spatiotemporal expression of CYP4G15 and CYP4L4 and their response to high and low temperature stress in *Spodoptera frugiperda*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 58(3): 664–671. [商瞰, 杨茂发, 于晓飞, 陈亦钊, 田太安, 2021. 草地贪夜蛾 CYP4G15 和 CYP4L4 的时空表达及其对高低温胁迫的响应. 应用昆虫学报, 58(3): 664–671.]
- Wang L, Zeng L, Chen J, 2015. Impact of imidacloprid on new queens of imported fire ants, *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). *Scientific Reports*, 5: 17938.
- Wang R, Zhu Y, Deng L, Zhang H, Wang Q, Yin M, Song P, Elzaki MEA, Han Z, Wu M, 2017. Imidacloprid is hydroxylated by *Laodelphax striatellus* CYP6AY3v2. *Insect Molecular Biology*, 26(5): 543–551.
- Wang YL, Zhao R, Wang M, Zhang XC, Yan JJ, Li R, 2022. Cloning and expression analysis of cytochrome P450 gene *PaCYP3001U16* in a wolf spider *Pardosa astrigera*. *Journal of Plant Protection*, 49(2): 603–611. [王雅丽, 赵瑞, 王美, 张晓晨, 燕晶晶, 李锐, 2022. 星豹蛛 *PaCYP3001U16* 基因的克隆与表达分析. 植物保护学报, 49(2): 603–611.]
- Wang YH, Gao CF, Zhu YC, Chen J, Li WH, Zhuang YL, Dai DJ, Zhou WJ, Ma CY, Shen JL, 2008. Imidacloprid susceptibility survey and selection risk assessment in field populations of *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae). *Journal of Economic Entomology*, 101(2): 515–522.
- Wang LX, Tao S, Zhang Y, Jia YL, Wu SF, Gao CF, 2021. Mechanism of metabolic resistance to pymetrozine in *Nilaparvata lugens*: Over-expression of cytochrome P450 CYP6CS1 confers pymetrozine resistance. *Pest Management*

- Science*, 77(9): 4128–4137.
- Wang YH, Chen J, Shen JL, Gao CF, Huang Y, Zhang JS, Li WH, Zhou WJ, 2008. Laboratory screening and cross-resistance analysis of alternative insecticides for highly-toxic pesticides for controlling brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Chinese J. Rice Sci.*, 22(5): 519–526. [王彦华, 陈进, 沈晋良, 高聪芬, 黄悦, 张久双, 李文红, 周威君, 2008. 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*, 22(5): 519–526.]
- Wu HF, Sun K, Zhang MH, 2013. A review of synthetic methods of dinotefuran. *Agrochemicals*, 52(1): 71–74. [吴鸿飞, 孙克, 张敏恒, 2013. 呋虫胺合成方法述评. *农药*, 52(1): 71–74.]
- Xiao HX, Liu MJ, Li YF, Zhang Y, Zhang ZF, Li YF, 2017. Determination of susceptibility of *Nilaparvata lugens* to nitenpyram and dinotefuran in Guangdong. *Journal of Environmental Entomology*, 39(6): 1369–1373. [肖汉祥, 刘明津, 李燕芳, 张扬, 张振飞, 李怡峰, 2017. 广东稻区褐飞虱对烯啶虫胺和呋虫胺的敏感性测定. *环境昆虫学报*, 39(6): 1369–1373.]
- Xu YQ, 2009. Molecular cloning, sequence analysis and expression of cytochrome P450 gene in *Tribolium castaneum* (Herbst). Master dissertation. Chongqing: Southwest University. [徐永强, 2009. 赤拟谷盗细胞色素 P450 基因的克隆、序列分析及表达研究. 硕士学位论文. 重庆: 西南大学.]
- Yuan LY, Hao YH, Chen QK, Pang R, Zhang WQ, 2020. Pancreatic triglyceride lipase is involved in the virulence of the brown planthopper to rice plants. *Journal of Integrative Agriculture*, 19(11): 2758–2766.
- Zhang K, Wang ZW, Gao CF, 2013. Methods for rice planthopper resistance monitoring. *Journal of Applied Entomology*, 50(2): 542–547. [张凯, 王志伟, 高聪芬, 2013. 稻飞虱的抗药性监测方法. *应用昆虫学报*, 50(2): 542–547.]
- Zhang XL, Liu XY, Zhu FX, Li JH, You H, Lu P, 2014. Field evolution of insecticide resistance in the brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål) in China. *Crop Protection*, 58: 61–66.
- Zhang XL, Liao X, Mao KK, Wan H, Lu P, Li JH, 2016. Resistance monitoring of the field populations of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae) to common insecticides in rice production areas of Hubei province, central China. *Acta Entomologica Sinica*, 59(11): 1222–1231. [张小磊, 廖逊, 毛凯凯, 万虎, 卢鹏, 李建洪, 2016. 湖北稻区褐飞虱田间种群对常用杀虫剂抗药性监测. *昆虫学报*, 59(11): 222–1231.]
- Zhang H, Zhao MT, Liu YR, Zhou ZS, Guo JY, 2018. Identification of cytochrome P450 monooxygenase genes and their expression in response to high temperature in the alligatorweed flea beetle *Agasicles hygrophila* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Scientific Reports*, 8: 1–13.