

伏马毒素 B₁ 诱导棉铃虫 *HaCYP6AE19* 表达 进而增强对高效氯氟氰菊酯的抗药性*

郑小虎** 赵倩倩 庞民好 杨太新 刘颖超*** 唐博文***

(河北农业大学植物保护学院, 保定 071000)

摘要 【目的】玉米耕作模式的转变使得伏马毒素 B₁ 在玉米组织中积累, 棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 在取食玉米时便会摄入伏马毒素 B₁, 但这对棉铃虫的抗药性有何影响未见报道。近年来, 棉铃虫对高效氯氟氰菊酯的抗药性逐年升高, 这是否与棉铃虫取食伏马毒素 B₁ 有关尚不得知。本研究将以此为目的展开探讨, 明确棉铃虫对高效氯氟氰菊酯抗药性升高的原因, 为害虫抗药性产生提供新思路。【方法】在棉铃虫饲料中添加伏马毒素 B₁, 测定了伏马毒素 B₁ 对棉铃虫抗药性的影响, 通过转录组测序和 RNAi 技术鉴定了关键解毒基因, 利用 RT-qPCR 验证了伏马毒素 B₁ 和高效氯氟氰菊酯对解毒基因表达量的影响。【结果】取食 0.01 和 0.1 mg/kg 伏马毒素 B₁ 后, 高效氯氟氰菊酯对棉铃虫的 LC₅₀ 值分别为对照组的 1.31 和 1.43 倍; 转录组测序鉴定到关键解毒基因 *HaCYP6AE19*, 在沉默 *HaCYP6AE19* 后, 高效氯氟氰菊酯对棉铃虫的 LC₅₀ 值为对照组的 2.59 倍; 在伏马毒素 B₁ 和高效氯氟氰菊酯胁迫下, 1 d 后, *HaCYP6AE19* 表达量无明显变化 ($P>0.05$), 2 d 后, 表达量分别为对照组的 4.44 ($P<0.01$) 和 2.39 倍 ($P<0.05$), 3 d 后, 表达量分别为对照组的 5.27 ($P<0.01$) 和 6.25 倍 ($P<0.01$)。【结论】摄入伏马毒素 B₁ 后, 棉铃虫解毒基因 *HaCYP6AE19* 过度表达, 进而增强了棉铃虫对高效氯氟氰菊酯的抗药性。

关键词 棉铃虫; 伏马毒素 B₁; *HaCYP6AE19*; 高效氯氟氰菊酯; 抗药性

Fumonisin B₁ induces the expression of *HaCYP6AE19* in *Helicoverpa armigera*, thereby enhanceing resistance to λ -cyhalothrin

ZHENG Xiao-Hu** ZHAO Qian-Qian PANG Min-Hao YANG Tai-Xin

LIU Ying-Chao*** TANG Bo-Wen***

(College of Plant Protection, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, China)

Abstract [Aim] To investigate whether the ingestion of fumonisin B₁ in maize tissues by *Helicoverpa armigera* could contribute to the increase in resistance of this pest to λ -cyhalothrin. [Methods] Fumonisin B₁ was added to the feed of *H. armigera* and its effect on the resistance of *H. armigera* to λ -cyhalothrin was determined. Key detoxification genes were identified by transcriptome sequencing and RNAi technology, and the effects of fumonisin B₁ and λ -cyhalothrin on the expression of these genes was verified with RT-qPCR. [Results] After feeding on a diet containing 0.01 and 0.1 mg/kg of fumonisin B₁, the LC₅₀ values of *H. armigera* to λ -cyhalothrin were 1.31 and 1.43 times higher, respectively, than those of the control group. The key detoxification gene *HaCYP6AE19* was identified by transcriptome sequencing. After silencing this gene, the LC₅₀ value of *H. armigera* to λ -cyhalothrin was 2.59 times that of the control group. There was no significant change in *HaCYP6AE19* expression after 1 day ($P>0.05$) of either fumonisin B₁ or λ -cyhalothrin stress. However, after 2 days the expression of this gene in the fumonisin B₁ and λ -cyhalothrin treatment groups was 4.44 ($P<0.01$) and 2.39 ($P<0.05$) times, respectively, that of the control, and after 3 days, its expression was 5.27 ($P<0.01$) and 6.25 ($P<0.01$) times, respectively, that

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金 (32202299); 河北省中央引导地方科技发展资金项目 (236Z6504G); 河北省青年拔尖人才项目 (BJK2024007); 河北农业大学引进人才科研专项 (YJ2020012); 国家现代农业产业技术体系项目 (CARS-21)

**第一作者 First author, E-mail: 2695705423@qq.com

***共同通讯作者 Co-corresponding authors, E-mail: tangbowen1992@163.com; liuyingchao@hebau.edu.cn

收稿日期 Received: 2024-05-11; 接受日期 Accepted: 2024-08-04

of the control. **[Conclusion]** Ingestion of fumonisin B₁ by *H. armigera* causes overexpression of the detoxification gene *HaCYP6AE19* and thereby enhances resistance to λ -cyhalothrin.

Key words *Helicoverpa armigera*; *HaCYP6AE19*; fumonisin B₁; λ -cyhalothrin; insecticide resistance

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 属鳞翅目 Lepidoptera 夜蛾科 Noctuidae, 分布范围广, 繁殖能力强 (Noor-ul-Ane *et al.*, 2018), 食性杂 (Brévault *et al.*, 2012), 可取食 68 科 300 余种植物 (Cunningham and Zalucki, 2014; Gu *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018)。棉铃虫主要以幼虫为害, 蛀食植物嫩叶和嫩芽, 为害幼果, 果实腐烂或蛀空后早落, 影响果实品质和产量 (郭晓斌, 2020), 对全球玉米等重大农作物的生产造成了严重经济损失 (Mironidis *et al.*, 2013; Tek *et al.*, 2013)。早期棉铃虫的防治主要通过喷洒化学药剂, 由于药剂的长期不合理使用导致棉铃虫对多种药剂产生了抗性, 其中对拟除虫菊酯类杀虫剂的抗性尤为严重 (Wu *et al.*, 1997; 芮昌辉等, 1999), 对高效氯氟氰菊酯的抗性倍数可达 262 倍 (Wu *et al.*, 2005)。1998 年, 为了防治棉铃虫, 河北省邱县首次引进转 Bt 基因抗虫棉 (Pan *et al.*, 2017), 国内各大棉花产区也推广种植。随着转 Bt 基因棉的大规模种植, 棉铃虫对高效氯氟氰菊酯的抗药性得到了一定缓解, 抗性倍数降到了 9-15 倍 (Wu *et al.*, 2005)。然而, Bt 棉花的广泛种植使棉铃虫田间种群面临着长期单一的选择压力, 导致棉铃虫对 Bt 棉花产生了抗性, 其抗性分子机制已被报道 (吴益东等, 2021)。近些年, 有研究发现, 棉铃虫对高效氯氟氰菊酯的抗性倍数上升, 且有逐年增长的趋势 (胡红岩等, 2021; Wang *et al.*, 2021)。

昆虫在接触到杀虫剂等异源物质时, 会产生大量解毒酶以进行代谢解毒。昆虫体内能够代谢杀虫剂的解毒酶系主要有 3 类, 包括细胞色素 P450s (CYPs)、羧酸酯酶 (CarEs) 和谷胱甘 S-转移酶 (GSTs)。其中, 由 P450 介导的代谢能力增强是棉铃虫抗药性产生的主要机制 (Feyereisen *et al.*, 2015)。研究表明, 在一些对拟除虫菊酯具有抗性的棉铃虫种群中, CYP9A 亚族的 3 条基因 *HaCYP9A12*、*HaCYP9A14* 和 *HaCYP9A17* 过表达 (Yang *et al.*, 2006), 代谢

试验表明这 3 条基因均能代谢多种不同结构的拟除虫菊酯类杀虫剂 (Tian *et al.*, 2021)。抗氰戊菊酯品系棉铃虫幼虫的中肠中, *HaCYP6B7* 基因显著过表达 (唐涛等, 2007; Zhang *et al.*, 2010), RNAi 体系构建和生物测定试验显示, 抑制 *HaCYP6B7* 表达后棉铃虫对高效氯氟氰菊酯和氰戊菊酯的敏感性显著提高 (Tang *et al.*, 2012; 唐涛等, 2013)。

植食性昆虫在环境中不仅受到杀虫剂的压力, 还需应对来自真菌毒素的挑战 (Van Leeuwen and Dermauw, 2016)。研究发现, 多种 P450 亚族基因参与昆虫对真菌毒素的解毒, 或受真菌毒素诱导表达 (Berenbaum *et al.*, 2020)。黄曲霉毒素 (Aflatoxin) 可诱导黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* P450 基因 *DmCYP6A2* 的代谢能力增强, 提高黑腹果蝇对杀虫剂的抗性 (Saner *et al.*, 1996); 玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 幼虫在取食花椒毒素 (Xanthotoxin) 后, P450 基因 *OfCYP321A1* 显著上调 51 倍 (Sasabe *et al.*, 2004)。伏马毒素 (Fumonisin) 是一类主要由镰孢菌 *Fusarium* 产生的真菌毒素, 可在籽粒和秸秆中积累 (Farhan *et al.*, 2020)。伏马毒素中以伏马毒素 B₁ 的含量最高且毒性最强, 对多种动物有致癌性和神经毒性等影响 (Li *et al.*, 2020)。伏马毒素 B₁ 可引起玉米螟血细胞的死亡 (Zhang *et al.*, 2018)。在使用伏马毒素 B₁ 对草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* Sf9 细胞系进行处理后, 试虫体内的 17 条 P450 基因的表达量增加 (Zhang *et al.*, 2017)。

近年来, 随着我国农业种植结构的调整和耕作栽培方式的改变, 玉米品种的选育加快, 种植面积增加, 导致棉铃虫等害虫对玉米的危害加重, 且有逐年加重的趋势 (王振营和王晓鸣, 2019)。同时, 玉米耕作方式的变化, 尤其是在秸秆还田后, 导致土壤中积累大量的真菌毒素和致病菌, 以伏马毒素和镰孢菌为主 (胡韬纲, 2015)。研究发现, 带有镰孢菌的种子可导致

伏马毒素在玉米叶片组织中积累, 且以伏马毒素 B₁ 积累最为明显 (Zitomer *et al.*, 2010)。此外, 灌溉水中含有伏马毒素可使玉米幼苗叶片中伏马毒素 B₁ 积累, 受伏马毒素 B₁ 污染的土壤可导致玉米幼苗根部吸收毒素, 并传播至远端组织, 发挥植物毒性作用 (Arias *et al.*, 2016), 因此棉铃虫在取食玉米时势必会摄入伏马毒素 B₁。研究显示玉米螟和棉铃虫等害虫的取食会影响玉米籽粒中伏马毒素的污染水平 (李人杰等, 2015; 李琴理等, 2021), 但这种互作关系对棉铃虫抗药性的影响尚未得到深入研究。

本研究深入探讨了棉铃虫与伏马毒素 B₁ 的互作关系, 分析了棉铃虫对高效氯氟氰菊酯抗药性水平变化的原因, 解析了伏马毒素 B₁ 诱导棉铃虫对高效氯氟氰菊酯的抗药性机制。本研究首次探究了真菌毒素伏马毒素 B₁ 与害虫抗药性之间的关系, 研究的开展为棉铃虫抗药性产生机制提供新思路, 为棉铃虫基因表达的研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试棉铃虫 本试验所用棉铃虫和饲料, 均购于河南省济源白云实业有限公司。在饲料中分别添加低剂量的伏马毒素 B₁ (0.01 mg/kg) 和高效氯氟氰菊酯 (3.92 mg/kg) 对敏感品系棉铃虫进行继代饲养, 饲料中伏马毒素 B₁ 和高效氯氟氰菊酯的剂量逐代增加, 构建伏马毒素 B₁ 耐受品系和高效氯氟氰菊酯耐受品系棉铃虫。3 种品系棉铃虫均为人工饲养。

将初孵幼虫挑至体积为 25 mL 的塑料盒, 每个盒中挑 20 头幼虫并放入 1 g 饲料, 幼虫长至 2 龄后分别挑至新塑料盒中, 单独饲养。试虫置于人工气候培养箱 (HPg-280B 为青岛海尔公司产品) 中饲养。培养箱条件为: 温度 (25±1) °C, 相对湿度 70%±5%, 光周期 16 L : 8 D。

1.1.2 供试试剂 伏马毒素标准品为青岛普瑞邦生物工程有限公司产品; 高效氯氟氰菊酯原药

(96%) 为江苏龙灯化学有限公司产品; RNAiso Plus 为艾科瑞生物工程有限公司产品; cDNA 第一链反转录试剂盒和 Hieff qPCR SYBR Green Master Mix 为上海翊圣生物有限公司产品。

1.2 试验方法

1.2.1 伏马毒素 B₁ 对棉铃虫抗药性影响测定 向棉铃虫饲料添加终浓度为 0.01 和 0.1 mg/kg 的伏马毒素 B₁, 选择敏感品系棉铃虫 3 龄幼虫进行饲喂, 以饲喂不添加伏马毒素 B₁ 普通饲料的幼虫为对照。饲喂 48 h 后, 使用绿甘蓝叶片以浸叶法 (NY/T 1154.14, 2008) 测定高效氯氟氰菊酯对试虫的毒力。使用丙酮溶解高效氯氟氰菊酯原药配置成母液, 使用 0.1% 吐温 80 对母液进行梯度稀释, 浓度设置为 0、1.67、5、15、45 和 135 mg/L, 每个药剂浓度处理设置 30 头试虫, 重复 3 次。72 h 后统计试虫死亡情况, 计算校正死亡率和各处理的 LC₅₀ 值。高效氯氟氰菊酯对第 6 代伏马毒素 B₁ 耐受品系试虫的生物测定方法同上。

1.2.2 试虫的转录组测序和软件预测

(1) 转录组测序样品制备

分别选取第 6 代伏马毒素 B₁ 耐受品系 (饲料中伏马毒素 B₁ 含量为 0.5 mg/kg) 和敏感品系棉铃虫 3 龄幼虫进行解剖, 取中肠和脂肪体混合后进行转录组测序。设置 3 个生物学重复, 每个重复 15 头试虫。样品交由杭州联川生物公司进行测序。

(2) Illumina Miseq 测序和数据处理

在 Illumina 测序平台上进行测序。用 Illumina Novaseq TM 6000 进行建库, 建库操作和数据处理方法使用 Illumina paired-end RNA-seq。以差异倍数 FC (Fold change) ≥2 或 FC ≤0.5 (即 log₂FC 的绝对值 ≥1) 为变化阈值, $q < 0.05$ (q 为 P 值的校正值) 为差异基因筛选标准。使用 NCBI BLAST 工具对结果进行鉴定, 筛选棉铃虫抗药性关键解毒基因。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 使用 RNAisoPlus 提取 RNA。使用翊圣 Hifair®1 st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR 试剂盒进行反转

录, 反应体系如下: 1 μg RNA, 3 μL 5 $\times$ DNA digester Mix, ddH₂O 补至 15 μL 。混匀后于 42 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 min, 加入 5 μL 4 $\times$ Hifair III SuperMix plus, 设置程序为 25 $^{\circ}\text{C}$, 5 min; 55 $^{\circ}\text{C}$, 15 min; 85 $^{\circ}\text{C}$, 5 min 进行逆转录反应。

基因表达量检测, 首先绘制目的基因和内参基因的标准曲线, 模板为 10 倍梯度稀释后的 cDNA, 用 ddH₂O 代替模板作为阴性对照。RT-qPCR 反应体系为 20 μL : 10 μL Hieff qPCR SYBR Green Master Mix, 上、下游引物根据扩增效率确定用量, 1 μL 模板, ddH₂O 补至 20 μL 。扩增程序如下: 95 $^{\circ}\text{C}$, 10 min 1 个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$, 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$, 60 s 40 个循环。从 60 $^{\circ}\text{C}$ 到 95 $^{\circ}\text{C}$ 以每 30 s 0.3 $^{\circ}\text{C}$ 的增量进行熔解曲线分析。扩增效率 (E) 使用公式 $E = (10^{[-1/\text{slope}]} - 1) \times 100\%$ 计算。各基因的 RT-qPCR 引物序列如表 1 所示。RT-qPCR 选用 *RPS15* 和 *RPL32* 作为内参基因 (Shakeel *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015)。使用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 的方法 (庾蕾等, 2007) 计算基因的相对表达量。试验重复 3 次。

表 1 RT-qPCR 引物序列
Table 1 RT-qPCR primer sequence

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')
<i>HaCYP6AE19</i> -qF	CATTTTACCCCTTCGGTGCG
<i>HaCYP6AE19</i> -qR	CTTCAGGACGGTGACGAGAC
<i>RPS15</i> -qF	CTGAGGTCGATGAAACTCTC
<i>RPS15</i> -qR	CTCCATGAGTTGCTCATTG
<i>RPL32</i> -qF	CATCAATCGGATCGCTATG
<i>RPL32</i> -qR	CCATTGGGTAGCATGTGAC

1.2.4 *HaCYP6AE19* RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 体系的构建

(1) *HaCYP6AE19* 的小干扰 RNA (siRNA) 引物设计

根据 *HaCYP6AE19* 的全长序列设计 3 条候选 siRNA, 位点如下, siRNA-1 为 528-546、siRNA-2 为 672-690、siRNA-3 为 799-817。根据序列设计带有 T7 RNA 聚合酶启动子序列的 siRNA 引物, 引物序列如表 2。

表 2 siRNA 合成引物序列
Table 2 siRNA synthesis primer sequence

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')
siRNA-1-1	<u>GGATCCTAATACGACTCACTATAG</u> ATAGAAACGCGCGCTCAC
siRNA-1-2	AAGTGAGCGCGCGTTTCTATCT <u>TATAGTGAGTCGTATTAGGATCC</u>
siRNA-1-3	<u>GGATCCTAATACGACTCACTATAG</u> TGAGCGCGCGTTTCTATC
siRNA-1-4	AAGATAGAAACGCGCGCTCACTATAGTGAGTCGTATTAGGATCC
siRNA-2-1	<u>GGATCCTAATACGACTCACTATAG</u> GCACCAATCCACGGAGAC
siRNA-2-2	AAGTCTCCGTGGATTGGTGCTATAGTGAGTCGTATTAGGATCC
siRNA-2-3	<u>GGATCCTAATACGACTCACTATAG</u> TCTCCGTGGATTGGTGCC
siRNA-2-4	AAGGCACCAATCCACGGAGACTATAGTGAGTCGTATTAGGATCC
siRNA-3-1	<u>GGATCCTAATACGACTCACTATAG</u> GATACCAACTTTTCCCGC
siRNA-3-2	AAGCGGGAAAAGTTGGTATCC <u>TATAGTGAGTCGTATTAGGATCC</u>
siRNA-3-3	<u>GGATCCTAATACGACTCACTATAG</u> CGGGAAAAGTTGGTATCC
siRNA-3-4	AAGGATACCAACTTTTCCCGCTATAGTGAGTCGTATTAGGATCC
siGFP-1	<u>GGATCCTAATACGACTCACTATAG</u> AGAAGAAGTTTCACTGC
siGFP-2	AAGCAGTGAAAAGTTCTTCTCTATAGTGAGTCGTATTAGGATCC
siGFP-3	<u>GGATCCTAATACGACTCACTATAG</u> CAGTGAAAAGTTCTTCTC
siGFP-4	AAGAGAAGAAGTTTCACTGCTATAGTGAGTCGTATTAGGATCC

下划线部分为 T7 启动子序列。

The underlined portion is the T7 promoter sequence.

(2) siRNA 合成

配制以下体系以生成正义链 RNA 或反义链 RNA 模板: 寡核苷酸-1 10 μL 、寡核苷酸-2 10 μL 、2 $\times$ Oligo 退火缓冲液 50 μL 和无酶核酸水 30 μL , 将寡核苷酸混合物于 93 $^{\circ}\text{C}$ 条件下加热 4 min, 然后使混合物缓慢冷却至室温。接着使用试剂盒 T7 RiboMAXTM Express RNAi System 进行体外转录合成 siRNA, 合成的 siRNA 均稀释至 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

(3) 显微注射法注射 siRNA

将敏感品系棉铃虫 3 龄幼虫放于冰上冷冻麻醉, 用镊子轻轻捏住试虫, 于试虫第 1 腹足位置轻轻扎破表皮, 慢慢推进注射 siRNA, 每头试虫注射 0.5 μL 。处理组每条 siRNA 注射 10 头试虫, 对照组为注射 si-GFP 的试虫, 设置 3 个重复, 每个重复 6 头试虫; 注射 48 h 后, 使用 RT-qPCR 检测 *HaCYP6AE19* 的沉默效率和沉默有效率, 单头试虫的沉默效率为 50% 以上合格, 沉默有效率为 70% (7 头/10 头) 以上合格。RT-qPCR 检测方法同上 1.2.3 节。

1.2.5 药敏试验 使用敏感品系棉铃虫 3 龄幼虫进行试验, 注射 1.2.4 节中效率合格的 siRNA, 注射方法同上 1.2.4 节。48 h 后对注射 siRNA 的试虫进行取样, 检测本次试验样品的基因沉默效率是否达到标准。处理组共取 8 头进行单头试虫检测, 对照组为 3 个重复, 每个重复取 6 头试虫, 使用 RT-qPCR 检测 siRNA 对试虫基因的沉默效率和沉默有效率, 检测方法同上 1.2.3 节。检测合格之后, 采用浸叶法进行生物测定, 操作步骤和药剂浓度设置同上 1.2.1 节。试验重复 3 次。

1.2.6 基因表达量及分布检测

(1) 基因在品系间的表达量检测

分别取第 14 代伏马毒素 B₁ 耐受品系 (饲料中伏马毒素 B₁ 含量为 1.9 mg/kg)、第 10 代高效氯氟氰菊酯 (饲料中高效氯氟氰菊酯含量为 12 mg/kg) 耐受品系及敏感品系棉铃虫 3 龄幼虫 6 头解剖后取中肠和脂肪体混合使用 RT-qPCR 检测基因的相对表达量, 检测方法同上 1.2.3 节。试验重复 3 次。

表达量 (2) 基因在棉铃虫体内的分布情况检测

取敏感品系棉铃虫 3 龄幼虫 6 头, 解剖后取中肠和脂肪体混合于离心管中, 其余组织放于另一离心管, 使用 RT-qPCR 检测基因在棉铃虫体内的分布情况, 检测方法同上 1.2.3 节。试验重复 3 次。

1.2.7 伏马毒素 B₁ 和高效氯氟氰菊酯对 *HaCYP6AE19* 表达量的影响 分别向棉铃虫饲料中添加终浓度为 1 mg/kg 的伏马毒素 B₁ 和 LC₃₀ 剂量 (3.92 mg/kg) 的高效氯氟氰菊酯, 对敏感品系棉铃虫 3 龄幼虫进行胁迫处理, 对照组为饲喂不添加伏马毒素和高效氯氟氰菊酯普通饲料的幼虫, 每组设置各 18 头试虫。在 24、48 和 72 h 后分别取 6 头试虫, 解剖后取中肠脂肪体混合, 使用 RT-qPCR 检测基因的相对表达量, 检测方法同上 1.2.3 节。试验重复 3 次。

1.3 数据处理与分析

所有试验数据均以 3 次独立试验的平均值 $\pm$ 标准误差表示。统计学分析及生物测定的 LC₅₀ 值计算、数据的单因素方差分析或者 *t* 检验均使用软件 SPSS 20。

死亡率 = 死亡虫数 / 供试总虫数 $\times 100\%$,

校正死亡率 = (处理组死亡率 - 对照组死亡率) / (1 - 对照组死亡率) $\times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 伏马毒素 B₁ 诱导棉铃虫对高效氯氟氰菊酯敏感性下降

取食不同浓度伏马毒素 B₁ 饲料 48 h 后, 试虫对高效氯氟氰菊酯敏感性的生物测定结果如表 3 所示。对照组试虫的 LC₅₀ 值为 16.84 mg/L, 取食 0.01 mg/kg 伏马毒素 B₁ 饲料后试虫的 LC₅₀ 值为 22.00 mg/L, 为对照组的 1.31 倍。取食 0.1 mg/kg 伏马毒素 B₁ 饲料后试虫的 LC₅₀ 值为 24.08 mg/L, 为对照组的 1.43 倍。表明试虫在取食伏马毒素 B₁ 后对高效氯氟氰菊酯的敏感性下降。

第 6 代伏马毒素 B₁ 耐受品系试虫对高效氯氟氰菊酯的生物测定结果如表 4 所示。敏感品系试虫的 LC₅₀ 值为 12.75 mg/L, 伏马毒素 B₁ 耐受

品系试虫的 LC₅₀ 值为 33.04 mg/L, 是敏感品系试虫的 2.59 倍, 表明伏马毒素 B₁ 耐受品系试虫对高效氯氟氰菊酯的抗药性增强。

表 3 敏感品系棉铃虫取食伏马毒素 B₁ 后对高效氯氟氰菊酯的敏感性变化

伏马毒素 B ₁ 浓度 (mg/kg) Fumonisin B ₁ concentration (mg/kg)	斜率 Slope	截距 Intercept	LC ₅₀ (mg/L)	95%置信区间 (mg/L) 95% confidence interval (mg/L)	R ²
0.00	0.95	3.84	16.84±3.23	11.57-24.52	0.95
0.01	0.87	3.83	22.00±4.65	14.54-32.29	0.95
0.10	1.04	3.53	24.08±4.62	16.54-35.06	0.97

表 4 第 6 代伏马毒素 B₁ 耐受品系棉铃虫对高效氯氟氰菊酯的抗药性

试虫类别 Type of test insect	斜率 Slope	截距 Intercept	LC ₅₀ (mg/L)	95%置信区间 (mg/L) 95% confidence interval (mg/L)	R ²
敏感品系 Sensitive strain	1.08	3.81	12.75±2.19	9.10-17.85	0.95
伏马毒素 B ₁ 耐受品系 Fumonisin B ₁ -tolerant strain	1.02	3.44	33.04±6.73	22.16-49.26	0.99

2.2 伏马毒素 B₁ 耐受品系试虫转录组测序结果分析

第 6 代伏马毒素 B₁ 耐受品系和敏感品系棉铃虫的转录组测序及差异表达基因分析如图 1 所示, 其中红框圈出的基因 LOC110371725 为品系间差异表达最为明显的基因, 其在第 6 代伏马毒素 B₁ 耐受品系棉铃虫的表达量为敏感品系的 16.92 倍 ($P<0.05$)。使用 NCBI BLAST 对该基因进行比对, 鉴定其为棉铃虫细胞色素 P450 CYP6AE 亚族基因 HaCYP6AE19。

2.3 HaCYP6AE19 RNAi 体系的构建

2.3.1 HaCYP6AE19 及内参基因标准曲线绘制 各基因 RT-qPCR 引物的熔断曲线均为单峰, 体系、扩增效率和 R² 如表 5 所示, 各数据均符合标准。

2.3.2 siRNA-3 对 HaCYP6AE19 的沉默作用 RT-qPCR 结果显示, 注射 siRNA-1 2 d 后 (图 2: A), HaCYP6AE19 表达量分别为对照组的 0.09、

0.80 和 1.12 倍, 沉默有效率为 1/10, 对 HaCYP6AE19 没有明显的沉默作用 ($P>0.05$); 注射 siRNA-2 2 d 后 (图 2: B), HaCYP6AE19 表达量分别为对照组的 0.44、0.24 和 1.53 倍, 沉默有效率为 2/10, 对 HaCYP6AE19 没有明显的沉默作用 ($P>0.05$); 注射 siRNA-3 2 d 后 (图 2: C), HaCYP6AE19 表达量分别为对照组的 0.19、0.04、0.30、0.13、0.16、1.02、0.04、0.80 和 0.25 倍, HaCYP6AE19 的表达量较对照组显著降低了 76% ($P<0.05$), 且 10 头试虫中有 7 头试虫的沉默效率达到 50% 以上, 沉默有效率为 70%。因此, 以此靶点进行后续的药敏试验。

2.3.3 HaCYP6AE19 沉默后, 棉铃虫对高效氯氟氰菊酯的敏感性增强 注射 siRNA-3 后, 8 头试虫 HaCYP6AE19 的表达量分别为对照组的 0.49、0.11、0.11、0.01、0.02、0.23、0.02 和 1.15 倍, 有 7 头表达量降低了 50% 以上 ($P<0.05$) (图 3), 沉默有效率为 87.5%, 沉默效率和沉默率均符合标准。

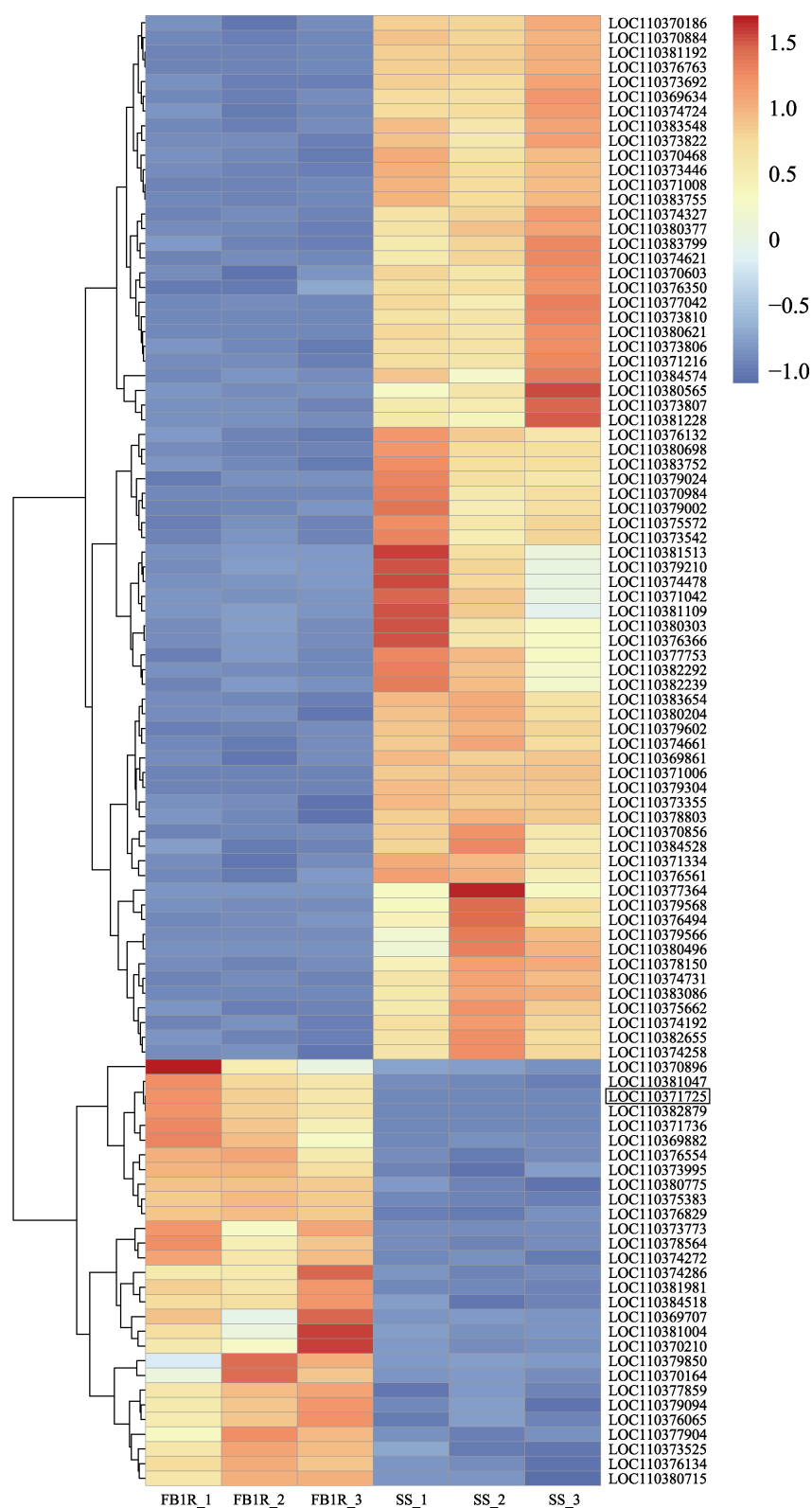


图 1 敏感品系与伏马毒素 B₁ 耐受品系棉铃虫中的差异表达基因

Fig. 1 Differentially expressed genes in sensitive strain and fumonisin B₁-tolerant strain of *Helicoverpa armigera*

FB1R_1、2、3 和 SS_1、2、3 分别代表伏马毒素 B₁ 耐受品系和敏感品系棉铃虫测序样品的 3 次重复。

FB1R_1, 2, 3 and SS_1, 2, 3 represent 3 replicates of sequenced samples from fumonisin B₁-tolerant strain and sensitive strain of *H. armigera*, respectively.

表 5 各基因 RT-qPCR 标准曲线
Table 5 RT-qPCR standard curve of each gene

基因名称 Gene name	引物用量 (μL) The amount of primer (μL)	扩增效率 E (%) Amplification efficiency (%)	R^2
<i>HaCYP6AE19</i>	0.6	95.0	0.99
<i>RPS15</i>	0.5	106.8	0.99
<i>RPL32</i>	0.5	98.7	0.99

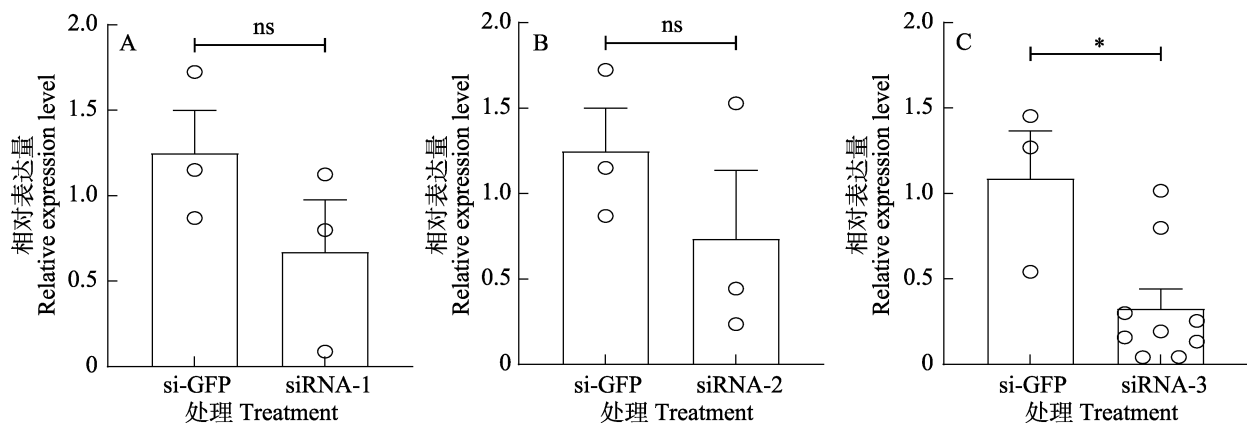


图 2 *HaCYP6AE19* 的 siRNA 筛选
Fig. 2 siRNA screening of *HaCYP6AE19*

- A. siRNA-1 注射 2 d 后 *HaCYP6AE19* 的沉默效率检测; B. siRNA-2 注射 2 d 后 *HaCYP6AE19* 的沉默效率检测;
C. siRNA-3 注射 2 d 后 *HaCYP6AE19* 的沉默效率检测。ns 代表差异不显著 ($P>0.05$, t 检验),
*代表差异显著 ($P<0.05$, t 检验)。下图同。
A. The silencing efficiency assay of *HaCYP6AE19* after 2 d injection of siRNA-1; B. The silencing efficiency assay of *HaCYP6AE19* after 2 d injection of siRNA-2; C. The silencing efficiency assay of *HaCYP6AE19* after 2 d injection of siRNA-3. ns represents no significant difference ($P>0.05$, t -test),
* represents significant difference ($P<0.05$, t -test). The same below.

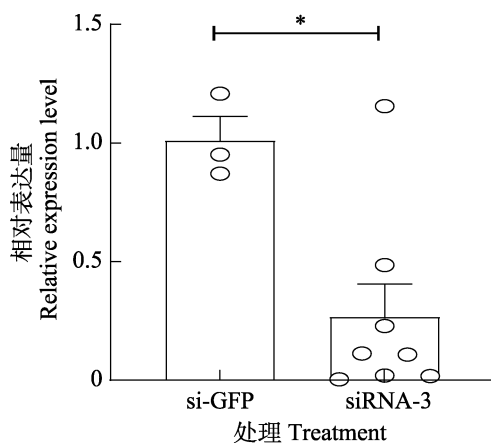


图 3 *HaCYP6AE19* 的沉默效率检测
Fig. 3 Silence efficiency assay of *HaCYP6AE19*

沉默 *HaCYP6AE19* 后试虫对高效氯氟氰菊酯的敏感性变化如图 4 所示, 在沉默

HaCYP6AE19 后, 试虫在 1.67 mg/L 高效氯氟氰菊酯处理下死亡率为 15.73%, 与对照组的 14.61% 相比无显著差异 ($P>0.05$); 在 5 mg/L 高效氯氟氰菊酯处理下的死亡率为 32.58%, 较对照组的 24.72% 显著增加 7.86% ($P<0.05$); 在 15 mg/L 高效氯氟氰菊酯处理下的死亡率为 53.93%, 较对照组的 41.57% 显著增加 12.36% ($P<0.05$); 在 45 mg/L 高效氯氟氰菊酯处理下的死亡率为 71.91%, 较对照组的 55.06% 显著增加 16.85% ($P<0.05$); 在 135 mg/L 高效氯氟氰菊酯处理下的死亡率为 92.14%, 较对照组的 74.16% 显著增加了 17.98% ($P<0.01$)。

试虫的 LC_{50} 变化如表 6 所示, 注射 si-GFP 后, 试虫的 LC_{50} 为 27.68 mg/L; 注射 siRNA-3

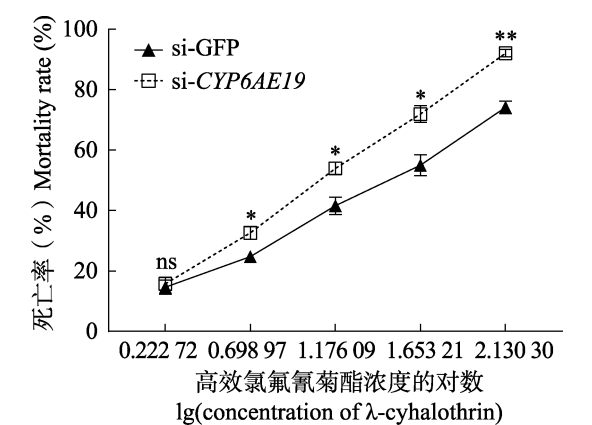


图 4 沉默 *HaCYP6AE19* 后棉铃虫对高效氯氟氰菊酯的敏感性变化
Fig. 4 Changes in susceptibility of *Helicoverpa armigera* to λ -cyhalothrin after silencing of *HaCYP6AE19*

**代表差异非常显著 ($P<0.01$, t 检验)。下图同。
** represents highly significant difference ($P<0.01$, t -test). The same below.

表 6 注射 siRNA-3 后棉铃虫对高效氯氟氰菊酯的抗药性变化
Table 6 Changes in resistance to λ -cyhalothrin in *Helicoverpa armigera* after injection of siRNA-3

处理	斜率	截距	LC ₅₀	95%置信区间	R ²
Treatment	Slope	Intercept	(mg/L)	95% confidence interval (mg/L)	
si-GFP	0.88	3.73	27.68	19.49-39.30	0.99
siRNA-3	1.23	3.68	11.83	9.24-15.14	0.99

后, 试虫的 LC₅₀ 为 11.83 mg/L。结果表明, *HaCYP6AE19* 被沉默后, 棉铃虫对高效氯氟氰菊酯的敏感性显著增加, 抗药性倍数较对照组降低了 2.34 倍。

2.4 *HaCYP6AE19* 主要分布于棉铃虫的中肠脂肪体

HaCYP6AE19 的分布检测结果如图 5 所示, *HaCYP6AE19* 在棉铃虫的中肠脂肪体中的表达量是其余组织的 4.45 倍 ($P<0.05$)。

2.5 *HaCYP6AE19* 在两个抗性品系棉铃虫中均显著上调

品系间 RT-qPCR 检测结果如图 6 所示, 与敏感品系试虫相比, *HaCYP6AE19* 在伏马毒素

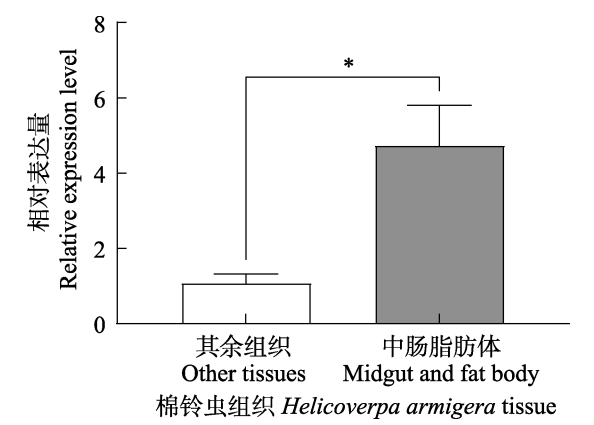


图 5 *HaCYP6AE19* 在棉铃虫体内的分布情况
Fig. 5 Distribution of *HaCYP6AE19* in *Helicoverpa armigera*

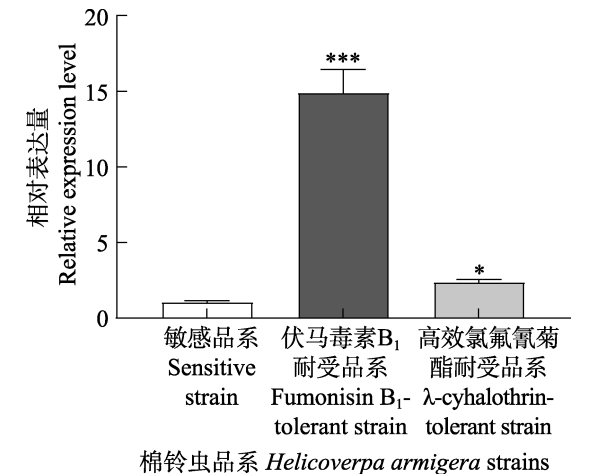


图 6 *HaCYP6AE19* 在不同棉铃虫品系之间的表达情况
Fig. 6 Expression levels of *HaCYP6AE19* among different *Helicoverpa armigera* strains

***代表差异极显著 ($P<0.001$, t 检验)
*** represents extremely significant difference ($P<0.001$, t -test)

B₁ 耐受品系中显著上调 14.84 倍 ($P<0.01$), 在高效氯氟氰菊酯耐受品系中显著上调 2.35 倍 ($P<0.05$)。

2.6 伏马毒素 B₁ 和高效氯氟氰菊酯均可诱导 *HaCYP6AE19* 过表达

伏马毒素 B₁ 和高效氯氟氰菊酯胁迫下 *HaCYP6AE19* 的表达量变化如图 7(A, B)所示。在伏马毒素 B₁ 胁迫下 (图 7: A), 1 d 后 *HaCYP6AE19* 的表达量无明显变化 ($P>0.05$), 2 d 后 *HaCYP6AE19* 表达量显著上调 4.44 倍

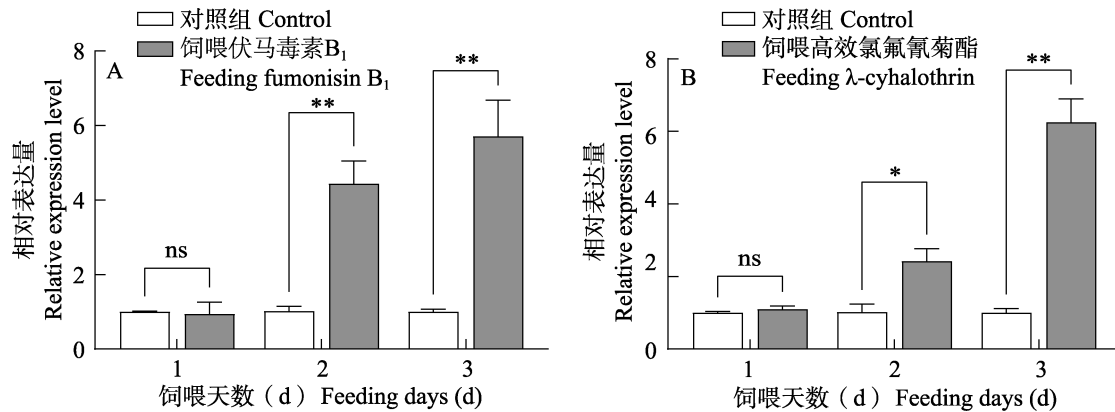


图 7 伏马毒素 B₁ 和高效氯氟氰菊酯胁迫下棉铃虫 *HaCYP6AE19* 表达量变化

Fig. 7 Changes in the expression level of *HaCYP6AE19* in *Helicoverpa armigera* under the stress of fumonisin B₁ and λ -cyhalothrin

- A. 伏马毒素 B₁ 胁迫不同天数下 *HaCYP6AE19* 的表达量变化; B. 高效氯氟氰菊酯胁迫不同天数下 *HaCYP6AE19* 的表达量变化。A. The changes in the expression of *HaCYP6AE19* under different days of fumonisin B₁ stress; B. The changes in the expression of *HaCYP6AE19* under different days of λ -cyhalothrin stress.

($P < 0.01$), 3 d 后 *HaCYP6AE19* 表达量显著上调 5.72 倍 ($P < 0.01$)。在高效氯氟氰菊酯胁迫下 (图 7: B), 1 d 后 *HaCYP6AE19* 的表达量无明显变化 ($P > 0.05$), 2 d 后 *HaCYP6AE19* 表达量显著上调 2.39 倍 ($P < 0.05$), 3 d 后 *HaCYP6AE19* 表达量显著上调 6.25 倍 ($P < 0.01$)。

3 讨论

近年来,随着种植模式的改变和抗虫棉种植面积减少,棉铃虫对玉米的危害逐年加重(陆宴辉等, 2018)。依前言所述,秸秆还田会导致伏马毒素 B₁ 在玉米组织中积累,这使得棉铃虫在取食玉米时摄入伏马毒素 B₁,但这种互作关系对棉铃虫有何影响未见报道。研究发现花椒毒素可诱导草地贪夜蛾 CYP9A 家族多个基因的表达,进而增强对溴氰菊酯的耐受性(Tao *et al.*, 2012);黄曲霉毒素可诱导黑腹果蝇 P450 基因 *DmCYP6A2* 的代谢能力增强,进而提高黑腹果蝇对杀虫剂的抗药性(Berenbaum *et al.*, 2020)。同属植物毒素的伏马毒素 B₁ 可能也具有类似功能,在促进棉铃虫抗药性方面发挥作用。近几年有研究发现棉铃虫对高效氯氟氰菊酯的抗药性回归至中高水平(胡红岩等, 2021; Wang *et al.*, 2021),但历史的演变暗示其可能存在新的机制。

研究发现,高浓度的伏马毒素 B₁ 会对棉铃虫的生长发育产生不利影响,且有可能使幼虫畸形(肖宏丽等, 2024)。为了探讨伏马毒素 B₁ 对棉铃虫抗药性的影响,本研究在棉铃虫饲料中添加了较低浓度(0.01 和 0.1 mg/kg)的伏马毒素 B₁。生物测定结果显示,棉铃虫在取食伏马毒素 B₁ 后对高效氯氟氰菊酯的敏感性呈下降趋势。为进一步验证该结果,本研究培养了伏马毒素 B₁ 耐受品系棉铃虫,并在培养至第 6 代时再次进行生物测定。结果发现,耐受品系试虫对高效氯氟氰菊酯产生了一定的抗药性。

研究表明, *CYP6AE* 亚族基为鳞翅目害虫所特有,并在拟除虫菊酯杀虫剂抗性中发挥关键作用(Shi *et al.*, 2018)。在本研究中,通过转录组测序筛选到该亚族基因中的 *HaCYP6AE19*。包括 *HaCYP6AE19* 在内的 9 条 *CYP6AE* 亚族基因过量表达,介导棉铃虫对氰戊菊酯的抗性(Shi *et al.*, 2018)。此外, *HaCYP6AE11* 的过量表达还可调节棉铃虫对溴氰菊酯和 λ -氯氟氰菊酯的抗药性(Brun-Barale *et al.*, 2010)。为了探究 *HaCYP6AE19* 的功能,本研究构建了 *HaCYP6AE19* 的 RNAi 体系并成功将 *HaCYP6AE19* 沉默,药敏试验显示 *HaCYP6AE19* 沉默后,棉铃虫对高效氯氟氰菊酯的敏感性增加,表明 *HaCYP6AE19* 在调控棉铃

虫对高效氯氟氰菊酯的抗药性中起着关键作用。

P450 基因的过表达是害虫抗药性发展中的一种常见现象(黄云等, 2022)。溴氰菊酯能够诱导 *HaCYP6B6* 基因在棉铃虫幼虫的中肠和脂肪体中高度表达(Zhou *et al.*, 2010), 代谢试验证明了 *HaCYP6B6* 的代谢能力(Tian *et al.*, 2017)。此外, 溴氰菊酯可诱导 *HaCY96A14* 等基因显著上调, RNAi 试验证实了 *HaCY96A14* 的解毒作用(Zhou *et al.*, 2010)。在本研究中, RT-qPCR 结果显示伏马毒素 B₁ 和高效氯氟氰菊酯均可诱导 *HaCYP6AE19* 的过表达, 再次证明了 *HaCYP6AE19* 在解毒异源物质中的关键作用。综上, 本研究通过药敏试验、RT-qPCR 和转录组测序等技术证实了伏马毒素 B₁ 可以诱导棉铃虫 *HaCYP6AE19* 的过表达, 进而增强棉铃虫对高效氯氟氰菊酯的抗药性。伏马毒素 B₁ 对棉铃虫抗药性影响的分子机制值得进一步探究。在秸秆还田的背景下, 本研究深入探讨了伏马毒素 B₁ 与棉铃虫抗性之间的影响关系和作用机制, 为害虫的绿色防控提供了一定的理论支持, 也为棉铃虫抗药性机制的研究提供了新思路。

参考文献 (References)

Arias SL, Mary VS, Otaiza SN, Wunderlin DA, Rubinstein HR, Theumer MG, 2016. Toxin distribution and sphingoid base imbalances in *Fusarium verticillioides*-infected and fumonisin B₁-watered maize seedlings. *Phytochemistry*, 125(5): 54–64.

Berenbaum MR, Bush DS, Liao LH, 2020. Cytochrome P450-mediated mycotoxin metabolism by plant-feeding insects. *Current Opinion in Insect Science*, 43(1): 85–91.

Brévault T, Nibouche S, Achaleke J, Carrière Y, 2012. Assessing the role of non-cotton refuges in delaying *Helicoverpa armigera* resistance to Bt cotton in West Africa. *Evolutionary Applications*, 5(1): 53–65.

Brun-Barale A, Héma O, Martin T, Suraporn S, Audant P, Sezutsu H, Feyereisen R, 2010. Multiple P450 genes overexpressed in deltamethrin-resistant strains of *Helicoverpa armigera*. *Pest Management Science*, 66(8): 900–909.

Cunningham JP, Zalucki MP, 2014. Understanding heliothine (Lepidoptera: Heliothinae) pests: What is a host plant. *Journal of Economic Entomology*, 107(3): 881–896.

Farhan Y, Smith JL, Limay-Rios V, Schaafsma AW, 2020. The effect of simulated lepidopteran ear feeding injury on mycotoxin accumulation in grain corn (Poales: Poaceae). *Journal of Economic Entomology*, 113(5): 2187–2196.

Feyereisen R, Dermauw W, Van Leeuwen T, 2015. Genotype to phenotype, the molecular and physiological dimensions of resistance in arthropods. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 121: 61–77.

Gu SM, Han P, Ye ZP, Perkins LE, Li J, Wang HQ, Zalucki MP, Lu ZZ, 2018. Climate change favours a destructive agricultural pest in temperate regions: Late spring cold matters. *Journal of Pest Science*, 91(4): 1191–1198.

Guo XB, 2020. Occurrence and control of cotton bollworm in vegetables. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2020(12): 148, 150. [郭晓斌, 2020. 蔬菜棉铃虫的发生及防治. 现代农业科技, 2020(12): 148, 150.]

Hu HY, Ren XL, Ma XY, Ma YJ, Song XP, Wang D, Li HH, Ma Y, 2021. Monitoring of resistance to three insecticides in *Helicoverpa armigera* in North China cotton regions. *Journal of Plant Protection*, 48(4): 901–906. [胡红岩, 任相亮, 马小艳, 马亚杰, 宋贤鹏, 王丹, 李欢欢, 马艳, 2021. 华北棉区棉铃虫对三种杀虫剂的抗性监测. 植物保护学报, 48(4): 900–906.]

Hu TG, 2015. Research progress on corn ear rot. *Grain Science and Technology & Economy*, 40(3): 50–52. [胡韬纲, 2015. 玉米穗腐病研究进展. 粮食科技与经济, 40(3): 50–52.]

Huang Y, Wu PZ, Zheng JY, Zhang Y, Qiu LH, 2022. Research progress on the resistance status and molecular mechanism of *Helicoverpa armigera* to chemical insecticides. *Journal of Plant Protection*, 49(1): 3361–350. [黄云, 吴沛卓, 郑钧月, 张瑜, 邱立红, 2022. 棉铃虫对化学杀虫剂的抗性现状及分子机制研究进展. 植物保护学报, 49(1): 336–350.]

Li QC, Shi J, He KL, Wang ZY, 2021. Effects of chemical control of corn ear boring pests on reducing fusarium verticillioides ear rot and fumonisin. *Chinese Journal of Agricultural Sciences*, 54(17): 37021–3711. [李琴理, 石洁, 何康来, 王振营, 2021. 化学防控玉米蛀穗害虫对减轻拟轮枝镰孢穗腐病及伏马毒素的作用. 中国农业科学, 54(17): 3702–3711.]

Li RJ, Wei TS, Guo CC, Pang MH, Liu YC, Dong JG, 2015. Effects of *Helicoverpa armigera* infestation and fusarium verticillioides infection on the occurrence of corn ear rots and fumonisin contamination in corn kernels. *Plant Protection*, 41(4): 68–72. [李人杰, 魏铁松, 郭聪聪, 庞民好, 刘颖超, 董金皋, 2015. 棉铃虫为害与拟轮生镰孢侵染对玉米穗腐病发生及玉米籽粒中伏马毒素污染水平的影响. 植物保护, 41(4): 68–72.]

Li XR, Cao CY, Zhu XY, Li XW, Wang K, 2020. Fumonisin B₁

- exposure triggers intestinal tract injury via activating nuclear xenobiotic receptors and attracting inflammation response. *Environmental Pollution*, 267(1): 115461–115469.
- Lu YH, Jiang YY, Liu J, Zeng J, Yang XM, Wu KM, 2018. Cultivation restructuring increases the disaster risk of cotton bollworm. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 55(1): 19–24. [陆宴辉, 姜玉英, 刘杰, 曾娟, 杨现明, 吴孔明, 2018. 种植业结构调整增加棉铃虫的灾变风险. 应用昆虫学报, 55(1): 19–24.]
- Mironidis GK, Kapantaidaki D, Bentila M, Morou E, Savopoulou-Soultani M, Vontas J, 2013. Resurgence of the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* in northern Greece associated with insecticide resistance. *Insect Science*, 20(4): 505–512.
- Noor-ul-Ane M, Kim DS, Zalucki MP, 2018. Fecundity and egg laying in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae): Model development and field validation. *Journal of Economic Entomology*, 111(5): 2208–2216.
- NY/T 1154. 14–2008. Guideline for laboratory bioassay of pesticides. Part 14: Leaf-dipping method. [NY/T 1154.14–2008. 农药室内生物测定试验准则. 杀虫剂. 第 14 部分: 浸叶法.]
- Pan LD, Shi M, Chen J, Wei Q, Gao CF, 2017. Resistance monitoring of larvae treated with Bt cotton and pesticides in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Oriental Insects*, 51(3): 285–296.
- Rui CG, Meng XQ, Fan XL, Liang GM, Li YP, 1999. Resistance of cotton bollworms in Hebei, Shandong, Henan and Xinjiang to pesticides. *Journal of Plant Protection*, 26(3): 260–264. [芮昌辉, 孟香清, 范贤林, 梁桂梅, 李永平, 1999. 冀鲁豫和新疆棉铃虫的抗药性. 植物保护学报, 26(3): 260–264.]
- Saner C, Weibel B, Wurgler FE, Sengstag C, 1996. Metabolism of promutagens catalyzed by *Drosophila melanogaster* CYP6A2 enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 27(1): 46–58.
- Sasabe M, Wen ZM, Berenbaum MR, Schuler MA, 2004. Molecular analysis of CYP321A1, a novel cytochrome P450 involved in metabolism of plant allelochemicals (furanocoumarins) and insecticides (cypermethrin) in *Helicoverpa zea*. *Gene*, 338(2): 163–175.
- Shakeel M, Zhu X, Kang TH, Wan H, Li JH, 2015. Selection and evaluation of reference genes for quantitative gene expression studies in cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 18(2): 123–130.
- Shi Y, Wang HD, Liu Z, Wu SW, Yang YH, Feyereisen R, Heckel DG, Wu YD, 2018. Phylogenetic and functional characterization of ten P450 genes from the CYP6AE subfamily of *Helicoverpa armigera* involved in xenobiotic metabolism. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 93(2): 79–91.
- Tek TW, Miguel FS, Thomas W, Danielle T, Pierre S, Gajanan TB, Craig A, Sharon D, 2013. A brave new world for an old world pest: *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Public Library of Science One*, 8(11): e80134.
- Tian K, Liu D, Yuan YY, Li M, Qiu XH, 2017. CYP6B6 is involved in esfenvalerate detoxification in the polyphagous lepidopteran pest, *Helicoverpa armigera*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 138: 51–56.
- Tian K, Feng J, Zhu J, Cheng JG, Li M, Qiu XH, 2021. Pyrethrin-resembling pyrethroids are metabolized more readily than heavily modified ones by CYP9As from *Helicoverpa armigera*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 176(6): 104871–104882.
- Tang T, Cheng YH, Wang CJ, Zhang WJ, Qiu LH, 2007. Cloning and analysis of the cytochrome P450 CYP6B7 gene from pyrethroid-resistant cotton bollworm. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 9(4): 370–375. [唐涛, 成玉红, 王成菊, 张文吉, 邱立红, 2007. 抗氰戊菊酯棉铃虫细胞色素 P450 CYP6B7 基因的克隆及分析. 农药学报, 9(4): 370–375.]
- Tang T, Zhao CQ, Feng XY, Liu XY, Qiu LH, 2012. Knockdown of several components of cytochrome P450 enzyme systems by RNA interference enhances the susceptibility of *Helicoverpa armigera* to fenvalerate. *Pest Management Science*, 68(11): 1501–1511.
- Tang T, Zhao CQ, Feng XY, Liu XY, Qiu LH, 2013. Effects of RNAi-mediated silencing of several cytochrome P450 enzyme components on the toxicity of lambda-cyhalothrin in cotton bollworm. *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.]
- Tao XY, Xue XY, Huang YP, Chen XY, Mao YB, 2012. Gossypol-enhanced P450 gene pool contributes to cotton bollworm tolerance to a pyrethroid insecticide. *Molecular Ecology*, 21(17): 4371–4385.
- Van Leeuwen T, Dermauw W, 2016. The molecular evolution of xenobiotic metabolism and resistance in chelicerate mites. *Annual Review of Entomology*, 61: 475–498.
- Wang HD, Shi Y, Wang L, Liu S, Wu SW, Yang YH, Feyereisen R, Wu YD, 2018. CYP6AE gene cluster knockout in *Helicoverpa armigera* reveals role in detoxification of phytochemicals and insecticides. *Nature Communications*, 9(1): 4820–4827.
- Wang QQ, Rui CH, Wang L, Nahiyoona SA, Huang WL, Zhu JS, Ji XJ, Yang QJ, Yuan HZ, Cui L, 2021. Field-evolved resistance to

- 11 insecticides and the mechanisms involved in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Management Science*, 77(11): 5086–5095.
- Wang ZY, Wang XM, 2019. Current status, trends, and control strategies of corn pests and diseases in China. *Plant Protection*, 45(1): 1–11. [王振营, 王晓鸣, 2019. 我国玉米病虫害发生现状、趋势与防控对策. 植物保护, 45(1): 1–11.]
- Wu KM, Liang GM, Guo YY, 1997. Phoxim resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in China. *Journal of Economic Entomology*, 90(4): 868–872.
- Wu KM, Mu W, Liang GM, Guo YY, 2005. Regional reversion of insecticide resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) is associated with the use of Bt cotton in Northern China. *Pest Management Science*, 61(5): 491–498.
- Wu YD, Guan F, Shen HW, Yang YH, 2021. Research progress on the resistance to Bt protein Cry1Ac and its molecular mechanism in *Helicoverpa armigera* in China. *Journal of Plant Protection*, 48(5): 9581–963. [吴益东, 管放, 沈慧雯, 杨亦桦, 2021. 我国棉铃虫对 Bt 蛋白 Cry1Ac 抗性现状及分子机制研究进展. 植物保护学报, 48(5): 958–963.]
- Xiao HL, Yang N, Zhao QQ, Pang MH, Tang BW, Liu YC, 2024. Effects of fumonisin B₁ on growth and development, detoxifying enzyme system, and antioxidant enzyme system in *Helicoverpa armigera*. *Journal of Biological Control*, 40(3): 600–607. [肖宏丽, 杨南, 赵倩倩, 庞民好, 唐博文, 刘颖超, 2024. 伏马毒素 B₁ 对棉铃虫生长发育、解毒酶系和抗氧化酶系的影响. 中国生物防治学报, 40(3): 600–607.]
- Yang YH, Chen S, Wu SW, Yue LN, Wu YD, 2006. Constitutive overexpression of multiple cytochrome P450 genes associated with pyrethroid resistance in *Helicoverpa armigera*. *Journal of Economic Entomology*, 99(5): 1784–1789.
- Yu L, Liu JP, Zhuang ZX, Yang LQ, Zhang RL, Ye XM, Cheng JQ, 2007. Comparison of real-time RT-PCR gene expression relative quantification using REST-software analysis and the 2^{-(-ΔΔCT)} method. *Journal of Tropical Medicine*, 7(10): 956–958. [庾蕾, 刘建平, 庄志雄, 杨淋清, 张仁利, 叶小明, 程锦泉, 2007. 实时 RT-PCR 基因表达相对定量 REST-软件分析与 2^{-(-ΔΔCT)} 法比较. 热带医学杂志, 7(10): 956–958.]
- Zhang H, Tang T, Cheng Y, Shui R, Zhang W, Qiu L, 2010. Cloning and expression of cytochrome P450 CYP6B7 in fenvalerate-resistant and susceptible *Helicoverpa armigera* (Hübner) from China. *Journal of Applied Entomology*, 134(9/10): 754–761.
- Zhang H, Zhang LY, Diao X, Li N, Liu CL, 2017. Toxicity of the mycotoxin fumonisin B₁ on the insect Sf9 cell line. *Toxicon*, 129: 20–27.
- Zhang H, Diao X, Li N, Liu CL, 2018. FB₁-induced programmed cell death in hemocytes of *Ostrinia furnacalis*. *Toxicon*, 146(55): 114–119.
- Zhang SD, An SH, Li Z, Wu FM, Yang QP, Liu YC, Cao JJ, Zhang HJ, Zhang QW, Liu XX, 2015. Identification and validation of reference genes for normalization of gene expression analysis using qRT-PCR in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Genetics*, 555(2): 393–402.
- Zhou XJ, Sheng CF, Li M, Wan H, Liu D, Qiu XH, 2010. Expression responses of nine cytochrome P450 genes to xenobiotics in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 97(3): 209–213.
- Zitomer NC, Jones S, Bacon C, Glenn AE, Baldwin T, Riley RT, 2010. Translocation of sphingoid bases and their 1-phosphates, but not fumonisins, from roots to aerial tissues of maize seedlings watered with fumonisins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(12): 7476–7481.