



马亿, 张文兵, 张宏玲, 马红悦, 韩海斌, 庞保平, 谭瑶. 牧草盲蝽 *CYP6A13* 和钠离子通道 *LPVSSC* 基因的克隆及参与高效氯氟氰菊酯的抗性分析 [J]. 环境昆虫学报, 2022, 44 (5): 1252–1263.

牧草盲蝽 *CYP6A13* 和钠离子通道 *LPVSSC* 基因的克隆及参与高效氯氟氰菊酯的抗性分析

马 亿^{1*}, 张文兵^{1*}, 张宏玲¹, 马红悦¹, 韩海斌², 庞保平¹, 谭 瑶^{1**}

(1. 内蒙古农业大学草原昆虫研究中心, 呼和浩特 010020; 2. 中国农业科学院草原研究所, 呼和浩特 010010)

摘要: 昆虫对拟除虫菊酯类杀虫剂产生抗性主要是解毒酶活性的增强和钠离子通道的敏感度降低所致。本研究采用 RT-PCR 和 RACE 技术克隆获得了牧草盲蝽 *Lygus pratensis* P450 *CYP6A13* 基因 (GenBank 登录号: MN782520) 及钠离子通道 *LPVSSC* 基因 cDNA 全长序列 (GenBank 登录号: MW821485)。其中 *CYP6A13* 基因全长 2 003 bp, 开放阅读框 1 503 bp, 编码 500 个氨基酸, 预测蛋白分子质量为 57.2 kDa, 主要位于细胞内质网, 等电点为 5.77, 无跨膜区和信号肽, 存在血红素结合保守功能区。同源比对与系统进化分析表明, 牧草盲蝽的 *CYP6A13* 与分类学关系上较为接近的昆虫同源蛋白间高度相似。钠离子通道序列 *LPVSSC* 开放阅读框 6 072 bp, 编码 2 024 个氨基酸, 预测蛋白分子质量为 228.94 kDa, 等电点为 4.99, 无信号肽, 有多个跨膜区域, 4 个同源结构域 (I~IV), 每个结构域有 6 个跨膜片段 (S1~S6), 存在 MFM 基序。基因表达谱结果表明: *CYP6A13* 在牧草盲蝽成虫头部的表达量高于胸、腹部; 室内筛选的高效氯氟氰菊酯抗性 R_{14} 、 R_6 品系的 *CYP6A13* 表达量是敏感品系的 18.74 和 5.45 倍; *CYP6A13* 表达量在雌、雄成虫之间无显著差异; 不同发育期基因表达量为: 初羽化成虫 > 5 龄若虫 > 4 龄若虫 > 3 龄若虫 > 2 龄若虫 > 1 龄若虫。测序比对高效氯氟氰菊酯抗性敏感品系的钠离子通道序列 IIS4~IIS6 区域, 未发现存在可能导致靶标抗性的氨基酸突变。结果表明 *CYP6A13* 基因过表达可能导致了牧草盲蝽对高效氯氟氰菊酯的抗药性, 为深入解析 *CYP6A13* 基因介导抗药性的功能研究奠定基础。

关键词: 牧草盲蝽; 细胞色素 P450; 钠离子通道; 表达谱; 序列分析

中图分类号: Q963; Q965.9; S433

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2022) 05-1252-12

Cloning of *CYP6A13* and sodium channel gene *LPVSSC* and their involvement in analysis on the resistance of lambda-cyhalothrin in *Lygus pratensis* (Hemiptera: Miridae)

MA Yi^{1*}, ZHANG Wen-Bing^{1*}, ZHANG Hong-Ling¹, MA Hong-Yue¹, HAN Hai-Bin², PANG Bao-Ping¹, TAN Yao^{1**} (1. Research Center for Grassland Entomology, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010020, China; 2. Institute of Grassland Research of Chinese Academy of Agricultural Science, Hohhot 010010, China)

Abstract: The pyrethroid resistance of insects is mainly caused by the increased activity of detoxification enzymes and the decreased sensitivity of sodium ion channels. The full-length sequences of P450 *CYP6A13* of *Lygus pratensis* (GenBank accession number: MN782520) and the sodium channel *LPVSSC*

基金项目: 国家自然科学基金 (32160651; 31560519); 内蒙古农业大学高层次人才科研启动基金 (NDYB2019-02)

* 共同第一作者简介: 马亿, 女, 硕士研究生, 主要研究方向牧草害虫抗药性发生, E-mail: mayi-xilin@163.com; 张文兵, 男, 讲师, 主要从事农药残留及抗药性机制研究, E-mail: zhangwenbing@imau.edu.cn

** 通讯作者 Author for corresponding: 谭瑶, 女, 博士, 副教授, 研究方向为昆虫生态毒理、生理生化与分子生物学, E-mail: 850310.tanhuaif4@163.com

收稿日期 Received: 2021-06-29; 接受日期 Accepted: 2021-08-23

(GenBank accession number: MW821485) cDNAs were cloned by using RT-PCR and RACE technology. The full length of *CYP6A13* gene was 2 003 bp, with an open reading frame of 1 503 bp, encoding 500 amino acids. The predicted molecular weight of the protein was 57.2 kDa, the isoelectric point (pI) was 5.77, and there was no transmembrane region and signal peptide. The protein was predicted to be located in the endoplasmic reticulum with heme binding conserved functional regions. Homologous comparison and phylogenetic analysis showed that *CYP6A13* was highly similar to the homologous proteins of insects, which were relatively similar in taxonomy. The open reading frame of sodium ion channel sequence *LPVSSC* was 6 072 bp, encoding 2 024 amino acids, and the predicted molecular weight of the protein was 228.94 kDa with the isoelectric point (pI) of 4.99. There were multiple transmembrane regions without signal peptide, including four homologous domains (I ~ IV), each having six transmembrane segments (S1 ~ S6), and the MFM motif exists. The gene expression results showed that the expression level of *CYP6A13* in the head was higher than that in the thorax and abdomen; the expression of *CYP6A13* in the lambda-cyhalothrin resistant strain R14、R6 were 18.74 and 5.45 fold higher than that in the susceptible strain; there was no significant difference between male and female adults on the expression level of *CYP6A13*; the gene expression of *CYP6A13* in different development stages ranked as: newly emerged adult > 5th instar nymph > 4th instar nymph > 3rd instar nymph > 2nd instar nymph > 1st instar nymph. Sequencing analysis results showed that no amino acid mutations involved in the lambda-cyhalothrin resistance were found in the IIS4 ~ IIS6 domain of the sodium channel sequence between the resistant and susceptible strains. In conclusion, over-expression of the P450 *CYP6A13* gene might confer lambda-cyhalothrin resistance in *L. pratensis*. Our study provided a necessary basis for further studying the function of *CYP6A13* involving in pyrethroid resistance mechanism of *L. pratensis*.

Key words: *Lygus pratensis*; cytochrome P450; sodium channel; expression profiling; sequence analysis

牧草盲蝽 *Lygus pratensis* 属半翅目 Hemiptera 盲蝽科 Miridae, 是我国西北地区主要危害棉花 *Gossypium* spp、苜蓿 *Medicago sativa* Linn 等经济作物的重要害虫 (Tan *et al.*, 2018; 2020), 在内蒙古中东西部均有分布, 且发生率高 (谭瑶等, 2015)。目前, 除简单的农业防治和物理防治外, 盲蝽主要依赖化学防治, 其中高效氯氟氰菊酯、吡虫啉、马拉硫磷和噻虫嗪等传统杀虫剂被频繁使用 (张倩等, 2017; Tan *et al.*, 2021)。杀虫剂长期单一使用会导致昆虫产生抗药性 (Feyereisen, 2011)。前期研究发现, 在我国北方 7 个农牧交错带上的牧草盲蝽田间种群对高效氯氟氰菊酯的抗性呈上升趋势, 部分田间种群对溴氰菊酯有中等交互抗性 (Tan *et al.*, 2021)。

昆虫对拟除虫菊酯类杀虫剂产生抗药性的机制主要是解毒酶活性增强和钠离子通道靶标位点的敏感度下降 (Zhen *et al.*, 2016; Khan *et al.*, 2020)。昆虫解毒酶系统主要有细胞色素 P450 氧化酶、谷胱甘肽 S-转移酶和羧酸酯酶。其中细胞色素 P450 (cytochrome P450) 具有解毒代谢作用,

参与昆虫的药物代谢 (Feyereisen, 2011; 邱星辉, 2014)。研究表明, P450 基因的过量表达直接导致了害虫对拟除虫菊酯类杀虫剂的抗药性 (Zhu *et al.*, 2016; Hafeez *et al.*, 2020), 且昆虫 CYP4、CYP6 和 CYP9 家族基因主要参与杀虫剂代谢过程 (Balabanidou *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2020)。Komagata 等 (2010) 报道了致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus* 连续筛选 20 代后对氯菊酯抗性倍数达 2 500 倍, 且抗性品系体内 *CYP9M10* 基因的相对表达量是敏感品系的 264 倍; El-Latif 等 (2014) 研究发现棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 的两个田间品系对溴氰菊酯的抗性分别为 2 850 倍和 1 842 倍, 且 *CYP6B7* 基因在这两个品系中显著高表达。

拟除虫菊酯类杀虫剂主要作用靶标是昆虫神经细胞膜上的钠离子通道, 在昆虫中超过 50 个钠通道突变被报道与拟除虫菊酯的击倒抗性 *kdr* 有关 (Yanola *et al.*, 2010; Dong *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2014)。当前, 越来越多的学者通过电生理、分子生物学等手段研究这些突变导致害虫对

菊酯类杀虫剂产生抗药性的机制。Wang 等 (2020) 通过研究发现绿盲蝽 *Apolygus lucorum* 田间种群中双突变点 (L1002F/M906I) 对爪蟾卵母细胞钠通道门控和拟除虫菊酯敏感性的影响。Chen 等 (2019) 报道, 单独的 V1016I、T1520I 突变不影响敏感性, 但是双突变体 T1520I + F1534C 比 F1534C 对 I 型拟除虫菊酯更具有抗性。

牧草盲蝽是西北地区危害广泛的杂食性昆虫, 目前研究仅仅集中于发生规律、行为学和生物学特性 (王伟等, 2020; Zhang *et al.*, 2020)。本研究以牧草盲蝽为对象, 前期通过对高效氯氟氰菊酯抗性及敏感品系的比较转录组与蛋白组学研究, 挖掘到一个在抗性品系中转录和蛋白翻译水平上都显著高表达的细胞色素 P450 *CYP6A13* 基因, 通过测序拼接组装及功能注释获得了一条钠离子通道基因。本文通过 RT-PCR 和 RACE 技术克隆获得了 P450 *CYP6A13* 基因和钠离子通道 *LPVSSC* 基因的 cDNA 全长序列, 进行了生物信息学分析, 测定了 *CYP6A13* 基因的表达谱, 经测序分析了高效氯氟氰菊酯抗性及敏感的牧草盲蝽钠离子通道基因 IIS4 ~ IIS6 区域是否存在抗性相关的突变位点。本研究结果可为深入开展牧草盲蝽对高效氯氟氰菊酯的抗药性分子机制奠定基础, 并为制定科学合理的防治策略提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫与饲养

牧草盲蝽于 2014 年 5 月采自内蒙古呼和浩特市和林格尔县沙尔沁乡中国农科院草原研究所 (40°60'N, 111°80'E) 苜蓿良种繁育基地, 苜蓿栽培品种为 ZhongCao No. 3, 种植面积 20 000 m² 以上, 该地区不使用任何杀虫剂 (Tan *et al.*, 2021)。扫网捕获牧草盲蝽成、若虫, 带回至内蒙古农业大学昆虫实验室, 置于人工气候培养箱中以新鲜豆角 *Phaseolus vulgaris* 进行长期继代饲养 (不接触任何杀虫剂), 以获得敏感品系 S。饲养条件为温度 25 ± 1℃, 相对湿度 60% ~ 70%, 光周期 16 L: 8 D。饲养方法参照贾冰等 (2018) 的报道。

(1) 不同成虫部位: 分别收集敏感品系牧草盲蝽成虫 (3 日龄) 头、胸及腹部作为不同部位样本。(2) 不同性别成虫: 分别收集牧草盲蝽敏感品系雌、雄成虫 (3 日龄) 作为不同性别样本。(3) 不同发育期牧草盲蝽: 分别收集蜕皮 1 d 的敏感品系的牧草盲蝽若虫 1、2、3、4、5 龄若虫及初

羽化的雌雄成虫, 作为不同发育期样本。(4) 不同抗性成虫: 于 2015 年 5 月在相同地点采集的牧草盲蝽带回实验室饲养。将羽化 3 日龄的成虫, 采用点滴法用各代种群 LD₅₀ 浓度的高效氯氟氰菊酯进行处理, 24 h 后存活的个体进行继代饲养, 在室内连续筛选。选取敏感品系 S, 抗性品系 R₆、R₁₄ (分别筛选至 6 代、14 代的牧草盲蝽, 抗性倍数分别为 7.49 倍及 42.56 倍) 作为不同抗性样本, 各代筛选剂量参考 Tan 等 (2021) 的报道。

试验中每个处理 3 个生物学重复, 每个重复 20 头试虫, 并将所有样本置于液氮中冻存, 储存于 -80℃ 冰箱内用于总 RNA 提取。

1.2 牧草盲蝽 *CYP6A13* 基因的克隆

取牧草盲蝽成虫 3 头, 不同发育期牧草盲蝽若虫 20 mg, 液氮迅速冷冻研磨, 使用 MiniBEST Universal RNA Extraction Kit (TaKaRa) 试剂盒提取总 RNA, 并用超微量分光光度计 (Nano Photometer P330, Implen, 德国) 和 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的浓度和完整性。使用 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa) 试剂盒参照说明书合成 cDNA 第 1 链。

根据转录组数据中, 注释为细胞色素 P450 *CYP6A13* 基因的 Unigene 序列, 利用 Primer 5.0 软件设计特异性引物 (表 1)。PCR 反应体系 (25 μL): cDNA 模板 1 μL, 上下游引物 (0.2 μmol/L) 各 1 μL, Premix TaqTM 12.5 μL, RNase Free ddH₂O 9.5 μL。反应条件: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 1 min 15 s, 72℃ 延伸 2 min, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 使用 MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver. 4.0 (TaKaRa) 胶回收试剂盒对 PCR 产物进行回收, 并用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。检测后连接至 pMD19-T 载体 (TaKaRa), 并转入感受态细胞 DH5α 后, 取菌液 200 μL 在含氨苄抗性并涂有 X-gal 以及 IPTG 的 LB 平板过夜培养 (12 ~ 16 h)。然后进行蓝白斑筛选, 挑取单一阳性克隆至 10 μL ddH₂O 中, 以 1 μL 为模版进行菌液 PCR 鉴定 (与上述 PCR 条件相同), 对应的验证正确的菌液在含有氨苄抗性的 LB 液体培养基中 37℃ 过夜培养 (12 ~ 16 h), 并送至上海生工公司测序。测序结果使用 DNAMAN 软件与转录组数据库中鉴定的 *CYP6A13* 基因片段进行比对。

根据已知序列片段设计 5' 和 3' 特异性引物 (表 1), 按照 SMARTer[®] RACE 5'/3' Kit 试剂盒 (TaKaRa) 说明书, 采用降落 PCR 和巢式 PCR 扩

表 1 本实验所用的引物
Table 1 Primers used in the study

引物名称 Primer name	引物序列 (5' - 3') Primer sequences	目的片段长度 (bp) Target fragment size	用途 Purpose
CYP6A13-F	GTGGTTTCGCTGGCATCT	954	扩增 <i>CYP6A13</i> 基因片段 Amplification of <i>CYP6A13</i> gene fragment
CYP6A13-R	ACCCGTCTTGGCTCTTCA		
CYP6A13-5'GSP1	ACGATGAAGCCGAGGAGCAGAGCCG	383	5'RACE
CYP6A13-5'GSP2	GCCATCTTTCTTTCTCAGGCTTACAG		
CYP6A13-3'GSP1	GCGACAGGAAATACGCAAGAATGG	170	3'RACE
CYP6A13-3'GSP2	TGATGGAGACACTTCGCAAGCACCC		
CYP6A13-F	GAAAAAAGATGTTGATTCTCCAAC	1 597	全长序列扩增 Full-length sequence amplification
CYP6A13-R	TACGAGTAAGCAAGTATAACCTAGT		
q-CYP6A13-F	AGAAAGATGGCTCGTCACGA	200	q-PCR 目的基因 Target gene amplification in real-time quantitative PCR
q-CYP6A13-R	GGGTTCCGGATTGAGAGACA		
β-tubulin-F	GCCGAATCCAACATGAACGA	159	q-PCR 内参基因 Reference gene amplification in real-time quantitative PCR
β-tubulin-R	AATTGCAGACTTGCCGTTGT		
TAF-F	TGTAGCGGGCTGACACTTTA	156	q-PCR 内参基因 Reference gene amplification in real-time quantitative PCR
TAF-R	GCGCTTGGAGTTCACAGTAG		
RPL32-F	ACCACTCGTTTGCCATTGAC	237	q-PCR 内参基因 Reference gene amplification in real-time quantitative PCR
RPL32-R	CTGGAAACCACTAGTCCCCA		
Na1-F	CCGCCACAACAGGGTCCCATAAT	737	钠离子通道 基因扩增 Amplification of sodium channel gene fragment
Na1-R	CAGTGGACTCAATCGTGGGGGTG		
Na2-F	GTTTTTCGGCGACGGACGCTATGTA	1 169	钠离子通道 基因扩增 Amplification of sodium channel gene fragment
Na2-R	GTCCACGTTGCCCTTCTCTTGTCGG		
Na3-F	ATGGGAATAGATCTCGGAAACCTAG	1 521	钠离子通道 基因扩增 Amplification of sodium channel gene fragment
Na3-R	TTGAGCTGGTTCTATAAAAGGATTG		
Na4-F	TTACAATACGAAACGGGAGATCG	1 577	钠离子通道 基因扩增 Amplification of sodium channel gene fragment
Na4-R	TTCATCTGGTCCCAAATCATCCA		
Na5-F	GCCACTCCTCGTACACCTCGCAC	1 783	钠离子通道 基因扩增 Amplification of sodium channel gene fragment
Na5-R	GCCAACAAGGCGTCTTCCGTACC		
Na6-F	TGCTGAGAGTTTTTCAAATTGGCTAA	499	钠离子通道 基因扩增 Amplification of sodium channel gene fragment
Na6-R	ATAATGTTTCTTTTGACCCAGGCAG		
Na7-F	ACACTAGTAATCGGCAACTTGGTCC	697	钠离子通道 基因扩增 Amplification of sodium channel gene fragment
Na7-R	ACCTCTTGTAACAGTTGTCTGGGCA		
Na8-F	AATCATACGGCAGTCACAAACAT	723	钠离子通道 基因扩增 Amplification of sodium channel gene fragment
Na8-R	AAATCAGACAAACCAAGAGCACA		
Na9-F	GGGCGGGTGGTATTTCAGGCATTC	1 015	钠离子通道 基因扩增 Amplification of sodium channel gene fragment
Na9-R	CGCAGGACTCGACCGACTTTGGC		

增基因的两端。PCR 产物经电泳检测后对目标条带进行回收纯化,送至上海生工公司测序。利用 DNAMAN v6.0 软件对测序结果与中间片段进行拼接,从而得到牧草盲蝽 *CYP6A13* 基因的 cDNA 全长序列,设计包含起始密码子与终止密码子的引物进行 PCR 扩增验证。

1.3 牧草盲蝽钠离子通道基因 cDNA 基因的克隆

RNA 的提取以及 cDNA 的合成方法同 1.2。通过设计多对特异性引物(表 1)对钠离子通道进行分段扩增。PCR 产物的纯化、回收方法同 1.2。测序结果使用 DNAMAN v6.0 软件进行序列拼接。

1.4 牧草盲蝽 *CYP6A13* 及钠离子通道基因的生物信息学分析

利用 ORF Finder 搜索基因的开放阅读框,利用 DNAMAN v6.0 软件预测等电点、分子质量;信号肽使用 SignalP 4.1 Server 进行预测(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>);跨膜区预测利用 TMHMM(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>);蛋白质结构域预测使用 NCBI Conserved Domains 工具(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)。同源比较采用 NCBI 网站中的 BLAST 工具(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)和 DNAMAN v6.0 软件;系统进化树构建使用 MEGA 7.0 软件中的邻接法,重复运行 1 000 次。

1.5 *CYP6A13* 基因表达谱 qRT-PCR 分析

使用 Primer 3.0 软件在线设计荧光定量 PCR 引物(表 1),内参基因参考贾冰等(2019)报道。采用 qRT-PCR 测定不同发育期、不同部位、不同性别以及不同品系的牧草盲蝽 *CYP6A13* 基因 mRNA 的表达水平。RNA 的提取以及 cDNA 的合成方法参考试验 1.2,20 μ L qRT-PCR 反应总体系:cDNA 模板 2 μ L,上、下游引物各 0.4 μ L,Go Taq[®] qPCR Master Mix (Promega) 10 μ L, Nuclease-Free Water 7.2 μ L。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min;95 $^{\circ}$ C 变性 15 s,60 $^{\circ}$ C 退火 1 min,共 40 个循环;94 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 90 s 和 94 $^{\circ}$ C 10 s。每个处理重复 3 组,每组 3 次技术重复。

1.6 数据分析

采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析牧草盲蝽 *CYP6A13* 基因的相对表达量(Livak *et al.*, 2001),不同处理下相对表达量差异显著性分析采用单因素分析(One-way

ANOVA, Duncan 法),雌、雄间的数据差异显著性比较采用 *t* 检验法。分别应用 SPSS 20.0 软件和 MAGE 7.0 软件进行统计分析及构建系统发育进化树。

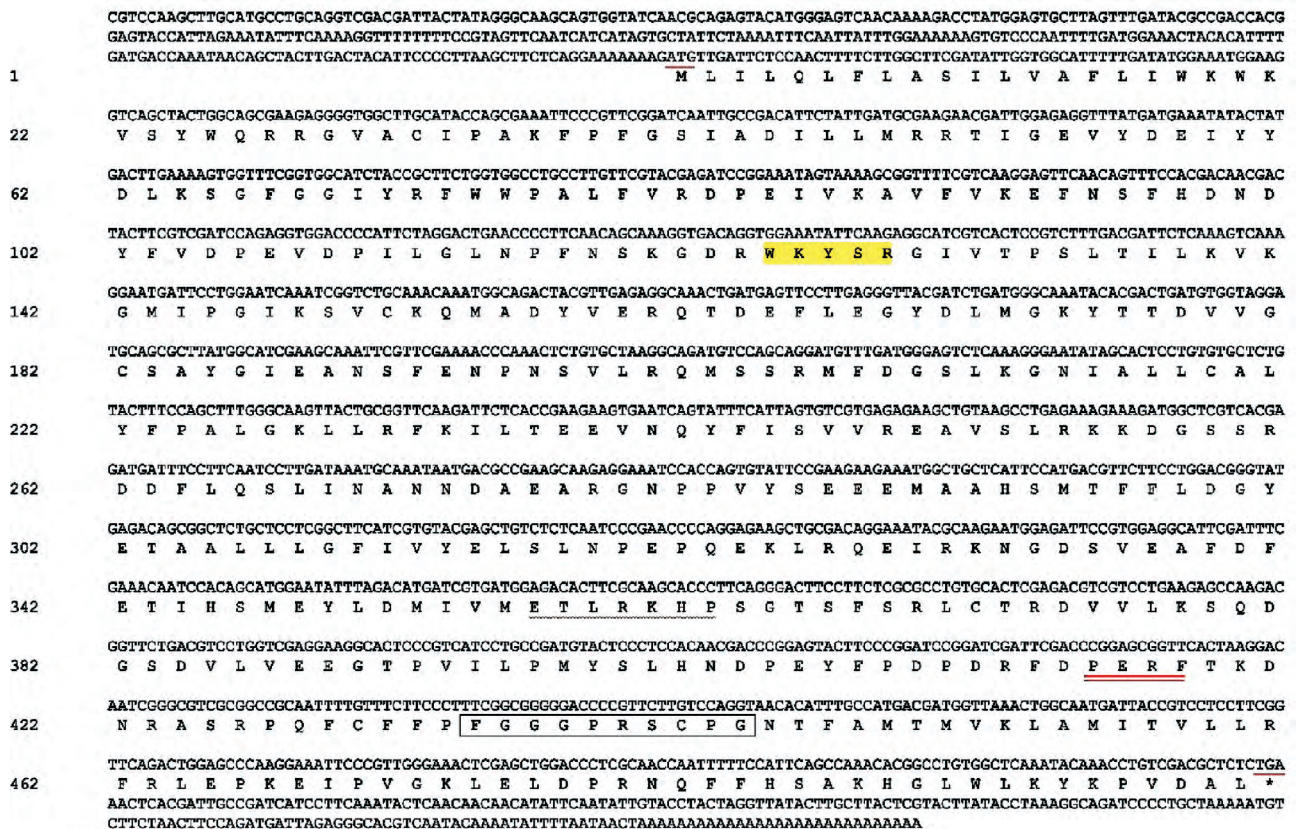
2 结果与分析

2.1 牧草盲蝽 *CYP6A13* 基因的克隆与序列分析

根据牧草盲蝽转录组数据获得的细胞色素 P450 *CYP6A13* 基因的序列信息,进行中间片段的扩增,得到了 954 bp 的 PCR 产物,通过获得的中间片段设计 3' 和 5' 引物进行两端扩增,分别获得了 3' 端 732 bp 和 5' 端 1 071 bp 的 PCR 片段。拼接后获得了 *CYP6A13* 基因(GenBank 登录号: MN782520)的 cDNA 序列,全长 2 003 bp,开放阅读框(ORF)为 1 503 bp,编码氨基酸 500 个(图 1),3' 端具有 polyA 结构。蛋白分子量为 57.20 kDa,等电点(pI)为 5.77。无跨膜区域,无信号肽。该基因具有 P450 蛋白质家族特征序列:血红素结合基序 FXXGXXXCXG(X 代表任意碱基),K 螺旋(ExxRxxP),C 螺旋(WxxxR),以及 PERF 结构域。蛋白质亚细胞定位预测该蛋白位于细胞内质网。对该蛋白进行了二级结构预测,结果表明, α -螺旋(alpha helix) 166 个、85 个延伸链(extended strand)和 249 个无规则卷曲(random coil),各占 33.2%、17.0% 和 49.8%。

2.2 牧草盲蝽 *CYP6A13* 同源比对及系统进化分析

将牧草盲蝽 *CYP6A13* 基因编码的氨基酸序列与 NCBI 数据库中搜索的其他昆虫的 P450 蛋白进行氨基酸序列比对,并采用邻接法(neighbor-joining, NJ)构建系统进化树(图 2)。如图 2 所示:牧草盲蝽 *CYP6A13* 与温带臭虫 *Cimex lectularius*(GenBank 登录号: XP_014257089.1)的 *CYP6A13* 聚集,二者均为半翅目,且氨基酸序列一致性达 52.17%;与同为 *CYP6* 家族的绿盲蝽 *Apolygus lucorum* *CYP6X2* 氨基酸序列进行对比,一致性为 30.31%,与同为半翅目的桃蚜 *Myzus persicae*、豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum* 和棉蚜 *Aphis gossypii* 的 P450 聚为一支。综上,聚类结果表明,牧草盲蝽 *CYP6A13* 蛋白与分类学关系上较为接近的物种的同源蛋白间有较高的相似度。

图1 牧草盲蝽 *CYP6A13* 的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *CYP6A13* in *Lygus pratensis*

注: 起始密码子和终止密码子使用下划线标出, 预测蛋白含有血红素结合基序 FxxGxxxCxG (X 代表任意碱基) 使用方框标出, 阴影标注的是 C 螺旋 (WxxxR), 双下划线为 PERF 结构域, K 螺旋 (ExxRxxP) 使用波浪线标注。Note: Start codon and termination codon were underlined, the heme binding Motif was boxed, with an oval labeled and a shaded C Helix (WxxxR), the PERF domain was double underlined. K Helix (ExxRxxP) were indicated by wavy line.



图2 牧草盲蝽与其他昆虫 P450 蛋白的氨基酸序列构建的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of cytochrome P450 from *Lygus pratensis* and other insects

注: 使用 MEGA 7.0 软件中的邻接法构建系统发育树, 采用模型 p 距离 (p-distance), 进化树分支的置信度检测利用 Bootstrap 进行 1 000 次计算, 分支上的数值表示置信度。Note: The tree was generated by MEGA 7.0 using the Neighbor-Joining (NJ) method, using model p-distance. The topology was tested using bootstrap analyses (1 000 replicates). Numbers at nodes were bootstrap values.

2.3 牧草盲蝽 *CYP6A13* 基因的表达谱分析

采用 qRT-PCR 对牧草盲蝽 *CYP6A13* 在不同发育阶段、组织部位、性别、品系中进行了相对表达量的测定。结果表明, 在昆虫的不同发育阶段, *CYP6A13* 基因均有表达, 呈上升趋势, 并存在显著差异 ($P < 0.05$), 其中在初羽化成虫体内表达量最高, 在高龄若虫体内表达量显著高于低龄若虫 (图 3-A)。在成虫不同组织部位中, 该基因表

达量差异显著, 在头部的表达量显著高于胸、腹部 ($P < 0.01$) (图 3-B)。在不同性别牧草盲蝽成虫中, *CYP6A13* 基因的表达在雌、雄成虫中无显著差异 (图 3-C)。对高效氯氟氰菊酯不同抗性品系和敏感品系中该基因的表达水平进行测定, 结果显示两个抗性品系表达量均显著高于敏感品系, 在 R_6 、 R_{14} 品系中表达量分别是敏感品系的 5.45 和 18.74 倍, 差异显著 ($P < 0.05$) (图 3-D)。

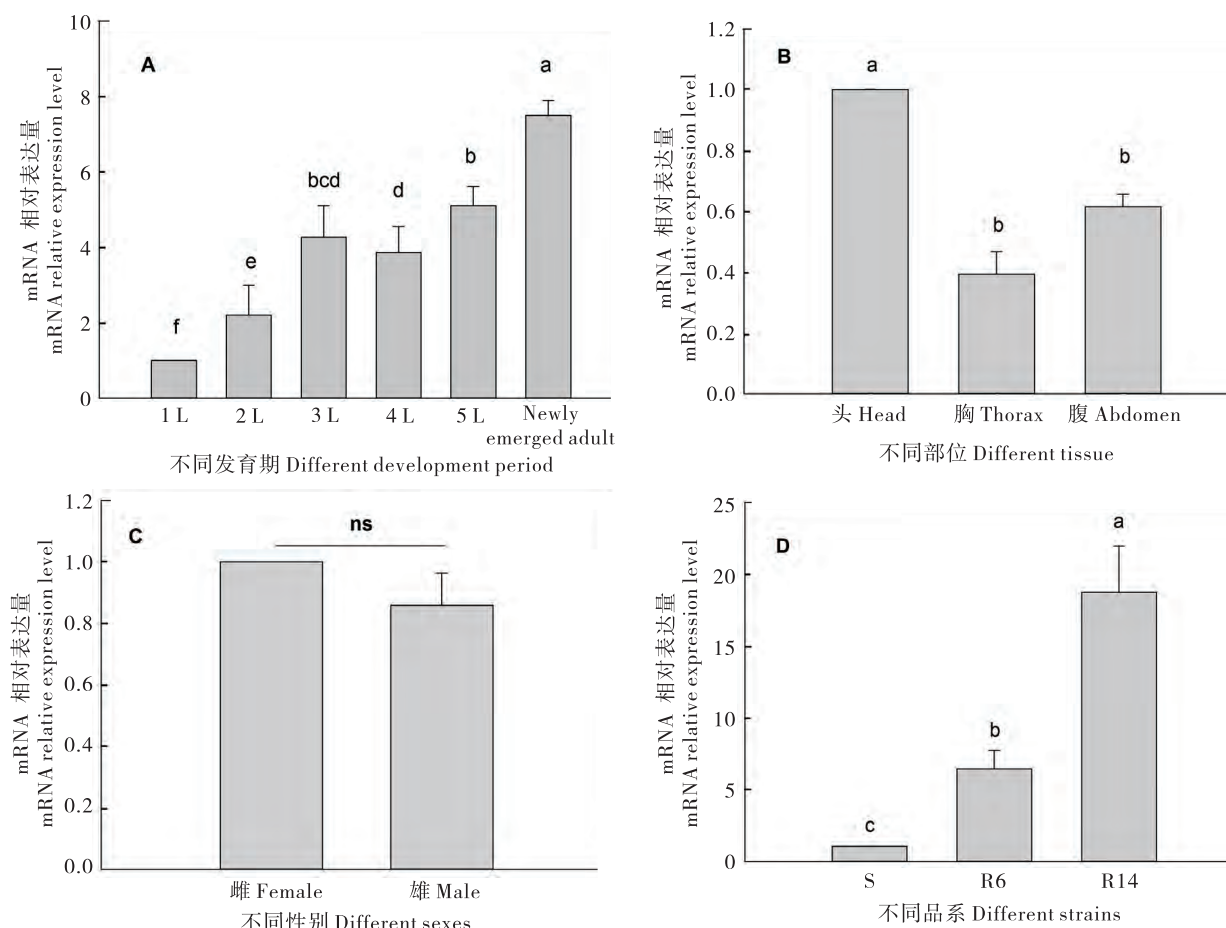


图 3 牧草盲蝽 *CYP6A13* 基因在不同处理下的表达量

Fig. 3 Expressions levels of P450 *CYP6A13* in different treatments of *Lygus pratensis*

注: 1L, 1 龄; 2L, 2 龄; 3L, 3 龄; 4L, 4 龄; 5L, 5 龄; S, 敏感品系; R6, 抗性第 6 代; R14, 抗性第 14 代。柱上不同字母表示差异显著性 (Duncan 氏检验, $P < 0.05$), ns 表示雌、雄成虫间无显著性差异 (t 检验, $P > 0.05$)。Note: 1L, 1st instar nymph; 2L, 2nd instar nymph; 3L, 3rd instar nymph; 4L, 4th instar nymph; 5L, 5th instar nymph; S, Susceptible strain; R6, The 6th resistant strain; R14, The 14th resistant strain. Different letters above bars indicated significant difference by Duncan's multiple comparison ($P < 0.05$), while ns indicated no significant difference between females and males (t -test, $P > 0.05$).

2.4 钠离子通道 cDNA 基因的克隆与序列分析

牧草盲蝽钠离子通道 *LPVSSC* 序列开放阅读框 6 072 bp, 编码 2 024 个氨基酸, 预测蛋白分子质量为 228.94 kDa, 等电点 (pI) 4.99, 有多个跨膜区域, 无信号肽。通过已知序列推导了该蛋白由 4 个同源结构域 I ~ IV 组成, 每个结构域有 6 个

跨膜片段 S1 ~ S6。昆虫所特有的钠离子通道的三肽基序 MFM (1551 ~ 1553) 是保守的 (图 4)。在每个同源域的第 4 个跨膜区 S4 上都有 4 ~ 7 个碱性氨基酸残基 (arginine or lysine, R 和 K), 分别被两个中性氨基酸分开。MFM 三联体 (均为疏水氨基酸) 存在于同源域 III 和 IV 之间的细胞连接处

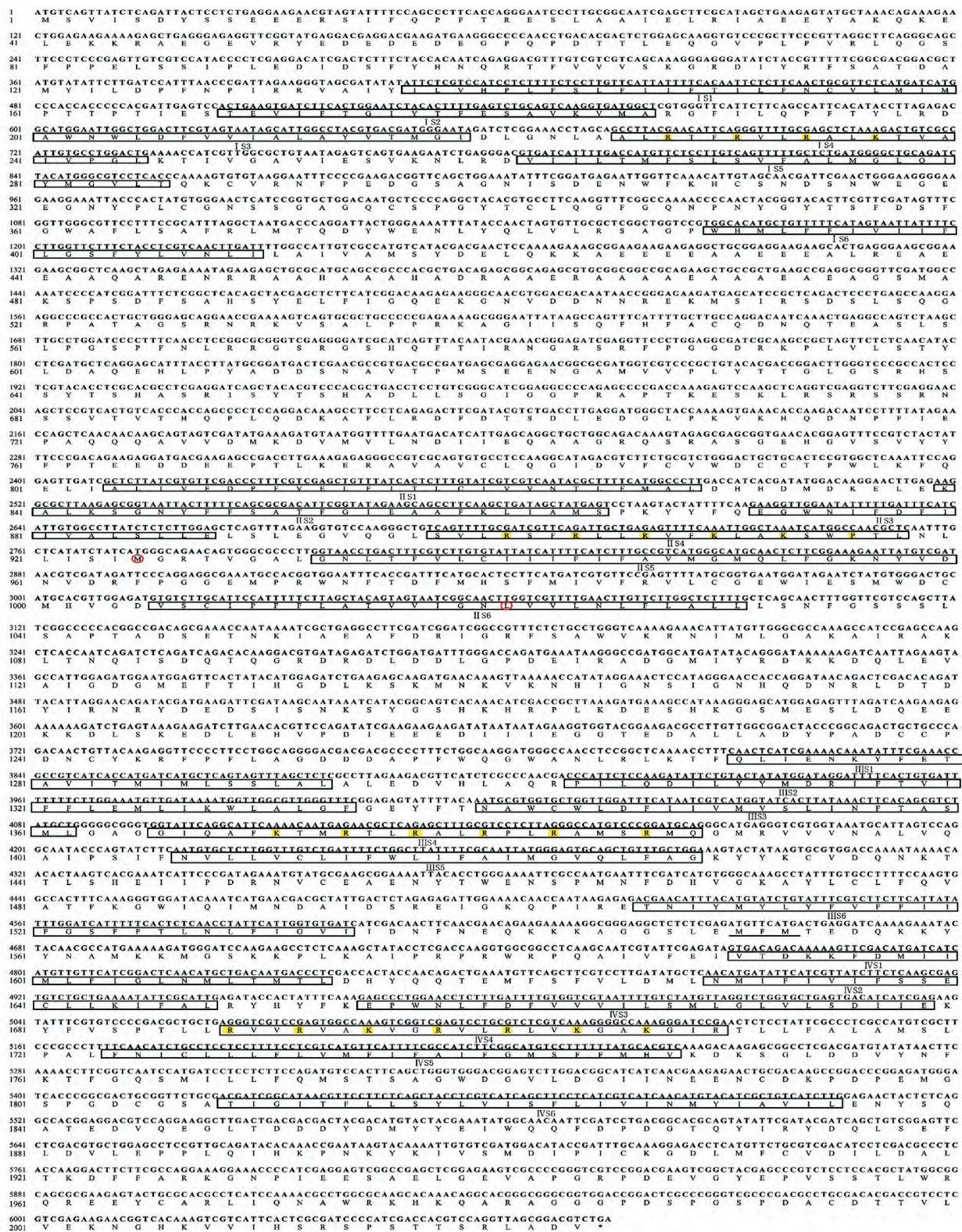


图4 牧草盲蝽钠离子通道核苷酸序列和推导的氨基酸序列分析

Fig. 4 Nucleotide and deduced amino acid sequences of sodium channel gene in *Lygus pratensis*

注: 矩形标注的为同源结构域 (I~IV) 中的 6 个跨膜区域 (S1~S6); 假定与三氯氟氰菊酯抗性相关的突变位点使用圆圈标注; 黄色高亮为碱性氨基酸; MFM 下划线标出。Note: The rectangle marks six transmembrane regions (S1~S6) in the homologous domain (I~IV); It was assumed that mutations associated with lambda-cypermethrin resistance were marked with circles; the yellow highlights were alkaline bases.

构成疏水域,与哺乳动物的 IFM 模体相对应。DEKA 模体普遍存在于每个同源域的 S5 与 S6 之间的连接环处。利用 NCBI 搜索其他昆虫的钠离子通道氨基酸序列,并构建系统进化树(图 5),结果显示半翅目、鞘翅目、鳞翅目、双翅目各聚为一

类,牧草盲蝽与同为半翅目的绿盲蝽聚为一支,和温带臭虫亲缘关系较近,表明牧草盲蝽钠离子通道蛋白与关系较近的物种的同源蛋白相似度较高。



图 5 牧草盲蝽钠离子通道氨基酸序列与其他昆虫钠离子通道氨基酸序列的系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree based on amino acid sequence of sodium channel from *Lygus pratensis* and other insects

注: 使用 MEGA 7.0 软件中的邻接法构建系统发育树, 采用模型 p 距离 (p-distance), 进化树分支的置信度检测利用 Bootstrap 进行 1 000 次计算, 分支上的数值表示置信度, 牧草盲蝽钠离子通道蛋白用三角标注。Note: The phylogenetic tree was constructed using MEGA 7.0 based on amino acid sequences of insect sodium channel with the neighbor-joining (NJ) method. GenBank accession numbers of sodium channel were in brackets. One thousand replications were performed, and the numerals at nodes were bootstrap P-values. The sodium channel of *L. pratensis* was marked with filled triangle.

2.5 高效氯氟氰菊酯抗性、敏感牧草盲蝽的钠离子通道跨膜区域比对分析

根据钠离子通道 cDNA 序列设计引物 Na6-F、Na6-R 扩增并检测 IIS4 ~ IIS6 区域是否存在可能的

突变位点。以抗性 R₁₄ 和敏感 S 品系的 cDNA 作为模板进行 PCR 扩增, 测序后比对其钠离子通道跨膜 IIS4 ~ IIS6 域, 除存在个别核苷酸多态性外, 并未发现氨基酸突变位点 (图 6)。



图 6 抗性、敏感品系的 II S4 ~ II S6 区域测序结果比对

Fig. 6 Comparison of II S4 ~ II S6 region sequencing results of resistant and sensitive strains

注: S, 敏感品系; R, 抗性品系。矩形标注的为突变位点 M918 和 L1014F。Note: S, Susceptible strain; R, Resistant strain. The mutation sites M918 and L1014F were labeled with rectangle.

3 结论与讨论

本研究采用 RT-PCR 和 RACE 技术克隆获得了牧草盲蝽细胞色素 P450 *CYP6A13* 的 cDNA 全长基因序列, 编码 500 个氨基酸。构建系统发育树并进行序列同源性分析, 确认该基因为牧草盲蝽的 P450 *CYP6A13* 基因。有研究表明完整的 P450 氨基酸序列包含典型的保守 P450 结构域, 包括 C 端附近的血红素蛋白结合区 (FxxGxRxG)、PERF 结构域 (PxRF) 和 K-螺旋结构 (ExxR) (López *et al.*, 2013), ETLR motif 在所有 CYP6 家族成员中均具有保守性, 残基 E 和 R 似乎都是保守的 (Berge *et al.*, 1998)。选取其他昆虫的 *CYP6A13* 氨基酸序列与牧草盲蝽的 *CYP6A13* 氨基酸序列进行比对分析, 发现都具有这些保守的结构域。但是 PERF 基序在不同物种的 *CYP6A13* 基因中出现不同程度的变化, 表明其功能可能存在差异, 充分体现了 P450 酶系功能的多样性。牧草盲蝽 *CYP6A13* 蛋白与分类学关系相近的同源蛋白相似度较高, 系统进化树显示牧草盲蝽 *CYP6A13* 与温带臭虫氨基酸序列一致性达 52.17%; 与同为 CYP6 家族的绿盲蝽 *CYP6X2* 氨基酸序列进行比对, 一致性为 30.31%。

研究发现 *CYP6A13* 基因在牧草盲蝽的不同发育阶段均有表达, 且呈现逐渐升高的趋势, 推测在其生长发育过程中, 需要适应包括杀虫剂在内的外源有毒物质, P450 基因在高表达的生长发育阶段可能增强了对杀虫剂等外源物质的解毒代谢。该基因在牧草盲蝽成虫头部表达量高于胸腹部, 这与姬继超 (2013)、张坤等 (2018) 的研究结果相似, 这表明基因在不同部位表达、参与杀虫剂解毒代谢的程度不同。除此之外, 该基因是否还具有其他生物学功能, 有待于进一步研究。伴随着杀虫剂筛选剂量的不断提高, 在牧草盲蝽 R_0 和 R_{14} 抗性品系中 *CYP6A13* 表达量显著升高, 说明很可能涉及抗药性。Zhen 等 (2018) 报道了在绿盲蝽对高效氯氟氰菊酯的抗性品系中, 3 个 CYP6 家族基因及 *CYP395H1* 的表达量显著升高。据此, 推测 *CYP6A13* 高表达可能介导了牧草盲蝽对高效氯氟氰菊酯的抗药性, 下一步将深入开展 *CYP6A13* 涉及抗药性的功能研究。

本研究获得了牧草盲蝽的钠离子通道 *LPVSSC*

基因 cDNA 全长序列 (GenBank 登录号: MW821485), 其开放阅读框 6 072 bp, 编码 2 024 个氨基酸, 包含 4 个同源结构域 (I ~ IV), 每个结构域有 6 个跨膜片段 (S1 ~ S6)。据前人研究报道, 钠离子通道 IIS4 ~ IIS6 区域包含诸多与菊酯类杀虫剂击倒抗性 (knockdown, *kdr*-type) 相关的突变位点 (Haddi *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2017; Zardkoohi *et al.*, 2019; Maestre-Serrano *et al.*, 2020), 例如: M918T (*skdr*-)、T929I (*skdr*-)、L1014F (*kdr*-), 在许多对菊酯类杀虫剂产生高抗性的昆虫中均能被检测到, 这些与抗性相关的突变位点及抗性频率的检测被用来评估田间种群的抗性水平及了解抗性产生的机制。Maestre-Serrano 等 (2020) 报道了 L1014F *kdr*-突变导致了哥伦比亚致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus* 对拟除虫菊酯杀虫剂产生抗药性; Zhen 等 (2016) 报道了在绿盲蝽的高效氯氟氰菊酯抗性田间种群中, 经检测钠离子通道 IIS4 ~ IIS6 区域 L1015F 的突变率达到 50%, 而未产生高抗性的田间种群中均没有检测到突变发生。Chen 等 (2017) 发现对高效氯氟氰菊酯和溴氰菊酯高抗性的棉蚜田间种群, 同样在钠离子通道 IIS4 ~ IIS6 区域, 产生了 M918L 的突变, 且高于 83.3% 的个体是杂合子。本研究中, 对高效氯氟氰菊酯抗性、敏感牧草盲蝽钠离子通道 IIS4 ~ IIS6 跨膜区域进行测序比对分析, 由于测序时接头引物的干扰, 尽管序列开头和结尾 10 bp 左右碱基不能准确判读, 个别碱基存在简并性, 但最终翻译的氨基酸序列并未发生改变, 所以在这段被报道发生抗性突变位点最多的区域, 室内筛选的抗性品系并未检测到突变位点存在, 这可能是抗性倍数较低所致。接下来将进一步对田间种群进行检测, 明确田间是否已产生抗性突变位点的牧草盲蝽个体或种群。

本研究克隆获得了牧草盲蝽的 P450 *CYP6A13* 和钠离子通道 *LPVSSC* cDNA 全长基因, 进行了序列分析、*CYP6A13* 基因的表达谱测定及钠离子通道 IIS4 ~ IIS6 跨膜区域突变位点检测, 为明确 *CYP6A13* 基因和钠离子通道涉及牧草盲蝽对高效氯氟氰菊酯抗药性分子机制的研究奠定了基础, 为下一步深入开展细胞色素 P450 的生物学功能研究和检测田间种群的抗性突变发生与抗性频率奠定了基础, 同时为制定科学、合理、有效的化学防治措施提供了借鉴意义。

参考文献 (References)

- Balabanidou, Vasileia, Kampouraki, *et al.* Cytochrome P450 associated with insecticide resistance catalyzes cuticular hydrocarbon production in *Anopheles gambiae* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113 (33): 9268–9273.
- Berge J, Feyereisen R, Amichot M. Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 1998, 353 (1376): 1701–1705.
- Chen ML, Du YZ, Wu SY, *et al.* Molecular evidence of sequential evolution of DDT and pyrethroid-resistant sodium channel in *Aedes aegypti* [J]. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2019, 13 (6): e0007432.
- Chen XW, Tie MY, Chen AQ, *et al.* Pyrethroid resistance associated with M918L mutation and detoxifying metabolism in *Aphis gossypii* from Bt cotton growing regions of China [J]. *Pest Management Science*, 2017, 73 (11): 2353–2359.
- Dong K, Du Y, Rinkevich F, *et al.* Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2014, 50 (1): 1–17.
- El-Latif AOA, Kranthi KR, Kranthi S, *et al.* Overexpression of cytochrome P450 CYP6B7 mediated pyrethroid resistance in Indian strains of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) [J]. *Journal of Plant Protection Research*, 2014, 54 (3): 287–293.
- Feyereisen R. Insect CYP genes and P450 enzymes [J]. *Insect Molecular Biology*, 2011, 8: 236–316.
- Haddi K, Berger M, Bielza P, *et al.* Identification of mutations associated with pyrethroid resistance in the voltage-gated sodium channel of the tomato leaf miner (*Tuta absoluta*) [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2012, 42: 506–513.
- Hafeez M, Qasim M, Ali S, *et al.* Expression and functional analysis of P450 gene induced tolerance/resistance to lambda-cyhalothrin in quercetin fed larvae of beet armyworm *Spodoptera exigua* (Hübner) [J]. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2020, 27 (1): 77–87.
- Ji JC, An SH, Li WZ, *et al.* Cloning, sequence analysis and prokaryotic expression of a P450 gene *HarmCYP9A33* from *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2013, 56 (5): 465–474. [姬继超, 安世恒, 李为争, 等. 棉铃虫 P450 基因 *HarmCYP9A33* 的克隆、序列分析及原核表达 [J]. 昆虫学报, 2013, 56 (5): 465–474]
- Jia B, Ma Y, Pang BP, *et al.* Screening of reference genes for quantitative real-time PCR in *Lygus pratensis* (Hemiptera: Miridae) [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2019, 62 (12): 1379–1391. [贾冰, 马亿, 庞保平, 等. 牧草盲蝽实时定量 PCR 内参基因的筛选 [J]. 昆虫学报, 2019, 62 (12): 1379–1391]
- Jia B, Tan Y, Fu XT, *et al.* Effects of host plants on the development reproduction and digestive enzyme activity in *Lygus pratensis* [J]. *Prataculture Science*, 2018, 35 (8): 1975–1984. [贾冰, 谭瑶, 付晓彤, 等. 不同寄主植物对牧草盲蝽生长发育、繁殖及消化酶活性的影响 [J]. 草业科学, 2018, 35 (8): 1975–1984]
- Khan RR, Al-Ghafri THA, Al-Khatiri SAH, *et al.* Resistance to deltamethrin and fenitrothion in dubas bug, *Ommatissus lybicus* de Bergevin (Homoptera: Tropiduchidae) and possible biochemical mechanisms [J]. *Scientific Reports*, 2020, 10 (1): 13220.
- Komagata O, Kasai S, Tomita T. Overexpression of cytochrome P450 genes in pyrethroid-resistant *Culex quinquefasciatus* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, 40 (2): 146–152.
- Liu ZX, Zhou LJ, Yao Q, *et al.* Laboratory selection, resistance risk assessment, multi-resistance, and management of *Tetranychus urticae* Koch to bifenthrin, bifentazate and cyflumetofen on cowpea [J]. *Pest Management Science*, 2020, 76 (5): 1912–1919.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25 (4): 402–408.
- Lopez MF, Cano-Ramirez C, Cesar-Ayala AK, *et al.* Diversity and expression of P450 genes from *Dendroctonus valens* LeConte (Curculionidae: Scolytinae) in response to different kairomones [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2013, 43 (5): 417–432.
- Maestre-Serrano R, Lara-Cobos J, Gomez-Camargo D, *et al.* Susceptibility to pyrethroids and the first report of L1014F *kdr* mutation in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Colombia [J]. *Journal of Medical Entomology*, 2020, 57 (6): 1830–1834.
- Qiu XH. Molecular mechanisms of insecticide resistance mediated by cytochrome P450s in insects [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2014, 57 (4): 477–482. [邱星辉. 细胞色素 P450 介导的昆虫抗药性的分子机制 [J]. 昆虫学报, 2014, 57 (4): 477–482]
- Tan Y, Jia B, Chi YM, *et al.* The complete mitochondrial genome of the plant bug *Lygus pratensis* Linnaeus (Hemiptera: Miridae) [J]. *Journal of Insect Science*, 2018, 18 (2): 41; 1–8.
- Tan Y, Jia B, Foster SP, *et al.* Sublethal and transgenerational effects of lambda-cyhalothrin on the mirid bugs *Lygus pratensis* Linnaeus and *Polymerus cognatus* Fieber [J]. *Crop Protection*, 2020, 139: 105354.
- Tan Y, Ma Y, Jia B, *et al.* Laboratory selection, cross-resistance, risk assessment to lambda-Cyhalothrin resistance and monitoring of insecticide resistance for plant bug *Lygus pratensis* (Hemiptera: Miridae) in farming-pastoral ecotones of Northern China [J]. *Journal of Economic Entomology*, 2021, 114 (2): 891–902.
- Tan Y, Wang CY, Meng C, *et al.* Community composition and diversity of Hemiptera insects on alfalfa in Inner Mongolia [J]. *Journal of Inner Mongolian Agricultural University* (National Science Ed.), 2015, 36 (6): 24–28. [谭瑶, 王春媛, 孟超, 等. 内蒙古地区紫花苜蓿半翅目昆虫群落结构与多样性 [J]. 内蒙古农业大学学报 (自然科学版), 2015, 36 (6): 24–28]
- Wang LK, Lin LY, Wang H, *et al.* Two classic mutations in the linker-Helix III45 and segment IIS6 of *Apolygus lucorum* sodium channel

- confer pyrethroid resistance [J]. *Pest Management Science*, 2020, 76 (12): 3954–3964.
- Wang W, Zhang RF, Liu HY, *et al.* Behavioral responses and population dynamics of *Lygus pratensis* (Heteroptera: Miridae) to five host plants [J]. *Xinjiang Agricultural Science*, 2020, 57 (4): 671–678. [王伟, 张仁福, 刘海洋, 等. 牧草盲蝽对 5 种寄主植物的行为反应及其种群动态 [J]. 新疆农业科学, 2020, 57 (4): 671–678]
- Yanola J, Somboon P, Walton C, *et al.* A novel F1552/C1552 point mutation in the *Aedes aegypti* voltage-gated sodium channel gene associated with permethrin resistance [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2010, 96 (3): 127–131.
- Zardkoobi A, Castaeda D, Lol JC, *et al.* Co-occurrence of *kdr* mutations V1016I and F1534C and its association with phenotypic resistance to pyrethroids in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations from Costa Rica [J]. *Journal of Medical Entomology*, 2019, 57 (3): 830–836.
- Zhang BZ, Su X, Zhen GA, *et al.* Silencing of cytochrome P450 in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) by RNA interference enhances susceptibility to chlorantraniliprole [J]. *Journal of Insect Science*, 2020, 20 (3): 12.
- Zhang K, Deng DH, Guo JL, *et al.* Cloning, sequence analysis and expression of *Helicoverpa armigera* *CYP9G5* gene under stress of deltamethrin [J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2018, 34 (4): 520–526. [张坤, 邓登辉, 郭江龙, 等. 棉铃虫 *CYP9G5* 基因的克隆、序列分析及溴氰菊酯胁迫表达 [J]. 中国生物防治学报, 2018, 34 (4): 520–526]
- Zhang Q, Liu YQ, Lu YH, *et al.* Toxicity and persistence of four kinds of insecticides against *Apolygus lucorum* [J]. *China Cotton*, 2017, 44 (12): 5–7. [张倩, 刘永强, 陆宴辉, 等. 4 种杀虫剂对绿盲蝽的毒力及其持效性 [J]. 中国棉花, 2017, 44 (12): 5–7]
- Zhang RF, Wang W, Liu HY, *et al.* Field evaluation of sunflower as a potential trap crop of *Lygus pratensis* in cotton fields [J]. *PLoS ONE*, 2020, 15 (8): e0237318.
- Zhao MH, Dong YD, Ran X, *et al.* Sodium channel point mutations associated with pyrethroid resistance in Chinese strains of *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) [J]. *Parasites Vectors*, 2014, 7 (1): 369.
- Zhen C, Gao X. A point mutation (L1015F) of the voltage-sensitive sodium channel gene associated with lambda-cyhalothrin resistance in *Apolygus lucorum* (MeyerDr) population from the transgenic Bt cotton field of China [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2016, 127: 82–89.
- Zhen CA, Tan Y, Miao L, *et al.* Overexpression of cytochrome P450s in a lambda-cyhalothrin resistant population of *Apolygus lucorum* (Meyer-Dür) [J]. *PLoS ONE*, 2018, 13 (6): e0198671.
- Zhu WY, Yu RR, Wu HH, *et al.* Identification and characterization of two *CYP9A* genes associated with pyrethroid detoxification in *Locusta migratoria* [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2016, 132: 65–71.