

# 甘蓝夜蛾 *CYP9A90* 基因的克隆及 溴氰菊酯对其诱导表达

刘月庆<sup>1</sup>, 樊星<sup>2</sup>, 周夏<sup>1</sup>, 钱金<sup>1</sup>, 杨文庆<sup>1</sup>, 杨静<sup>1</sup>, 樊东<sup>1\*</sup>

(1. 东北农业大学农学院, 哈尔滨 150030; 2. 东北农业大学资源与环境学院, 哈尔滨 150030)

**摘要** P450 *CYP9A* 家族基因与昆虫对拟除虫菊酯类杀虫剂的抗性相关。为证实溴氰菊酯对甘蓝夜蛾 *CYP9A* 基因的诱导效果,本研究采用 RT-PCR 和 RACE 技术克隆获得甘蓝夜蛾 *CYP9A* 基因,real-time PCR 检测该基因在甘蓝夜蛾不同组织中的表达差异及溴氰菊酯处理甘蓝夜蛾 5 龄幼虫不同时间后该基因相对表达量变化,研究结果可为甘蓝夜蛾对溴氰菊酯的抗性治理提供依据。结果表明:克隆得到甘蓝夜蛾 *CYP9A* 基因 cDNA 全长序列,该序列包含 1 828 bp,包括 1 个 125 bp 的 5'非编码区,1 个 104 bp 的 3'非编码区和 1 个 1 599 bp 的开放阅读框,编码 532 个氨基酸,分子量约为 61.1 kDa,等电点为 8.84,GenBank 登录号为 KR676343,被国际 P450 命名委员会命名为 *CYP9A90*。Real-time PCR 分析结果表明,该基因在甘蓝夜蛾 5 龄幼虫 6 个组织中表达情况不同,其中在脂肪体中表达量最高。低剂量溴氰菊酯作用后不同时间点 *CYP9A90* mRNA 总体呈现诱导表达趋势。

**关键词** 甘蓝夜蛾; P450; 基因克隆; 溴氰菊酯; 表达

**中图分类号:** Q 785, S 436.35 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2017.01.009

## Cloning of *CYP9A90* and effects of deltamethrin on its mRNA expression in *Mamestra brassicae*

Liu Yueqing<sup>1</sup>, Fan Xing<sup>2</sup>, Zhou Xia<sup>1</sup>, Qian Jin<sup>1</sup>, Yang Wenqing<sup>1</sup>, Yang Jing<sup>1</sup>, Fan Dong<sup>1</sup>

(1. College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

2. College of Resources and Environment, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

**Abstract** Genes in *CYP9A* subfamily of P450 are associated with the resistance of insects to pyrethroids. In order to verify the induction effect of deltamethrin to *CYP9A* in *Mamestra brassicae*, RT-PCR and RACE were used to clone the full-length cDNA sequence of *CYP9A* gene. Its mRNA expression profiles in different tissues at fifth-instar larvae and the effect of deltamethrin were detected by real-time PCR. The results would give us a basis for resolving the management problem of the resistance of *M. brassicae* to deltamethrin. The results showed that the cDNA sequence was 1 828 bp in length, which contained a 125 bp 5'-untranslated region, a 104 bp 3' untranslated region and a 1 599 bp open reading frame, and coded a polypeptide of 532 amino acid residues with a predicted molecular weight of 61.1 kDa and pI 8.84 (GenBank accession no. KR676343). It was named *CYP9A90* by the P450 Nomenclature Committee. The real-time quantitative RT-PCR assay showed that *CYP9A90* gene expression levels were different in six tissues of the fifth-instar larvae. The expression level was at the highest point in fat body. Low dosage of deltamethrin treatment could induce *CYP9A90* mRNA expression at different time points after treatment.

**Key words** *Mamestra brassicae*; cytochrome P450; cloning; deltamethrin; expression

细胞色素 P450 多功能氧化酶系 (cytochrome P450 enzymes, P450s) 在昆虫体内主要分布于中肠、脂肪体和马氏管等组织中<sup>[1]</sup>, 可代谢杀虫剂等多种内源及外源性化合物<sup>[2-3]</sup>, 以及多种激素及信息

素<sup>[4-5]</sup>。一般认为, 其对杀虫剂的代谢(解毒或活化)关系到昆虫对杀虫剂的耐受性和杀虫剂对昆虫的选择性, P450 介导的杀虫剂代谢解毒作用的增强是昆虫产生抗药性常见而重要的机制<sup>[4]</sup>。已有研究表明,

收稿日期: 2016-06-20 修订日期: 2016-07-21

基金项目: 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12531045)

\* 通信作者 E-mail: dnfd@163.com

对二氯苯醚菊酯产生抗性的致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus* *CYP9M10* 基因的 mRNA 表达为敏感体系的 264 倍<sup>[6]</sup>, 小菜蛾对二氯苯醚菊酯抗性品系中 *CYP6BG1* 基因表达是敏感品系的 4.9 倍<sup>[7]</sup>。P450 的可诱导性表现为昆虫暴露于药剂或其他异源物质环境下, 其体内某一种或几种细胞色素 P450 的水平会显著上升, 使得解毒作用显著增强<sup>[8]</sup>。其诱导作用增强了昆虫的解毒作用, 提高了昆虫对环境有毒物质的适应能力, 因此昆虫抗药性产生通常表现为 P450 酶活性的增强和其表达量的上升<sup>[4]</sup>。用氯氰菊酯诱导野桑蚕 *Bombyx mandarina* 时, *CYP9A21* 基因在中肠的表达量是对照的 2.1 倍, 导致野桑蚕对氯氰菊酯氧化解毒代谢作用的增加<sup>[9]</sup>。用氯虫苯甲酰胺诱导甜菜夜蛾, 4 个 P450 基因 *CYP9A9*、*CYP4G37*、*CYP4S11* 及 *CYP6B* 的表达明显上调<sup>[10]</sup>。溴氰菊酯可以显著增强褐飞虱体内 *CYP303A1* 的表达<sup>[11]</sup>。

甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae* Linnaeus, 又名甘蓝夜盗虫、夜盗蛾等, 属于鳞翅目夜蛾科, 盗夜蛾亚科, 为世界性分布害虫<sup>[12]</sup>。不仅为害甘蓝、白菜、卷心菜等十字花科蔬菜, 还是瓜类、豆类、茄果类、甜菜的重要害虫<sup>[13]</sup>。目前对于甘蓝夜蛾的主要防治手段是化学防治, 主要药剂包括高效氯氟氰菊酯、高效氯氰菊酯和溴氰菊酯。目前国内外一些文章报道了 P450 对杀虫剂的代谢解毒机制, 研究多在 *CYP4* 家族、*CYP6* 家族和 *CYP9* 家族三个与抗药性相关的家族中<sup>[14]</sup>, 且 Yang 等通过试验证实发现棉铃虫中 *CYP9A* 家族与氰戊菊酯、溴氰菊酯、氯氰菊酯抗性有关<sup>[15-17]</sup>, 烟芽夜蛾中与硫代灭多威和氯氰菊酯抗性相关的基因为 *CYP9A1*<sup>[18-19]</sup>, 家蚕当中的 *CYP9A22* 与野桑蚕中的 *CYP9A21* 均能被氯氰菊酯诱导<sup>[9, 20]</sup>。因此, 本研究对甘蓝夜蛾 *CYP9A* 型基因的 cDNA 序列进行克隆, 将其命名为 *CYP9A90*; 并通过荧光定量 PCR 技术检测该基因在各组织中的表达以及经溴氰菊酯诱导后的表达, 为开展甘蓝夜蛾细胞色素 P450 基因的功能分析提供基础, 同时也为 P450 酶系的抗性机理研究及甘蓝夜蛾抗性治理提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试昆虫

在东北农业大学香坊实验基地黑光灯下诱集甘蓝夜蛾成虫, 将其放入恒温培养箱内进行饲养, 饲养温度为 (25±1) °C, 光周期 L//D=14 h//10 h, 相对

湿度 70%, 以 5% 蜂蜜水饲喂, 待其产卵, 幼虫取食未接触任何农药的白菜叶, 饲养 2 代后再用作试验材料。

### 1.2 试剂

RNA 提取试剂盒 TRIzol<sup>®</sup> Reagent 购自 Invitrogen 公司; 反转录酶 M-MLV、低熔点琼脂糖购自 Fermentas(FBI)公司; DNA 胶回收试剂盒、克隆载体 pMD18-T、DL2000 DNA Marker、3' RACE 试剂盒、5' RACE 试剂盒、*Tap* DNA 聚合酶购自大连宝生物公司; 感受态细胞 Trans5 $\alpha$  购自北京全式金生物技术公司、限制性内切酶购自 NEB 公司、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix 购自 TOYOBO 公司; 大肠杆菌 DH5 $\alpha$ (本实验室保存), 其余试剂均为进口或国产分析纯。基因测序由上海生工生物有限公司完成。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 总 RNA 提取与第一链 cDNA 的合成

选取发育良好的甘蓝夜蛾 5 龄第 1 天幼虫为试验材料, 提取方法根据 TRIzol 试剂盒使用说明进行, 提取得到的 RNA 为模板, 以 dt-Adapter(表 1) 为 cDNA 合成引物, 根据 M-MLV 反转录酶使用说明进行, 合成第一链 cDNA。

#### 1.3.2 cDNA 全长序列克隆及序列分析

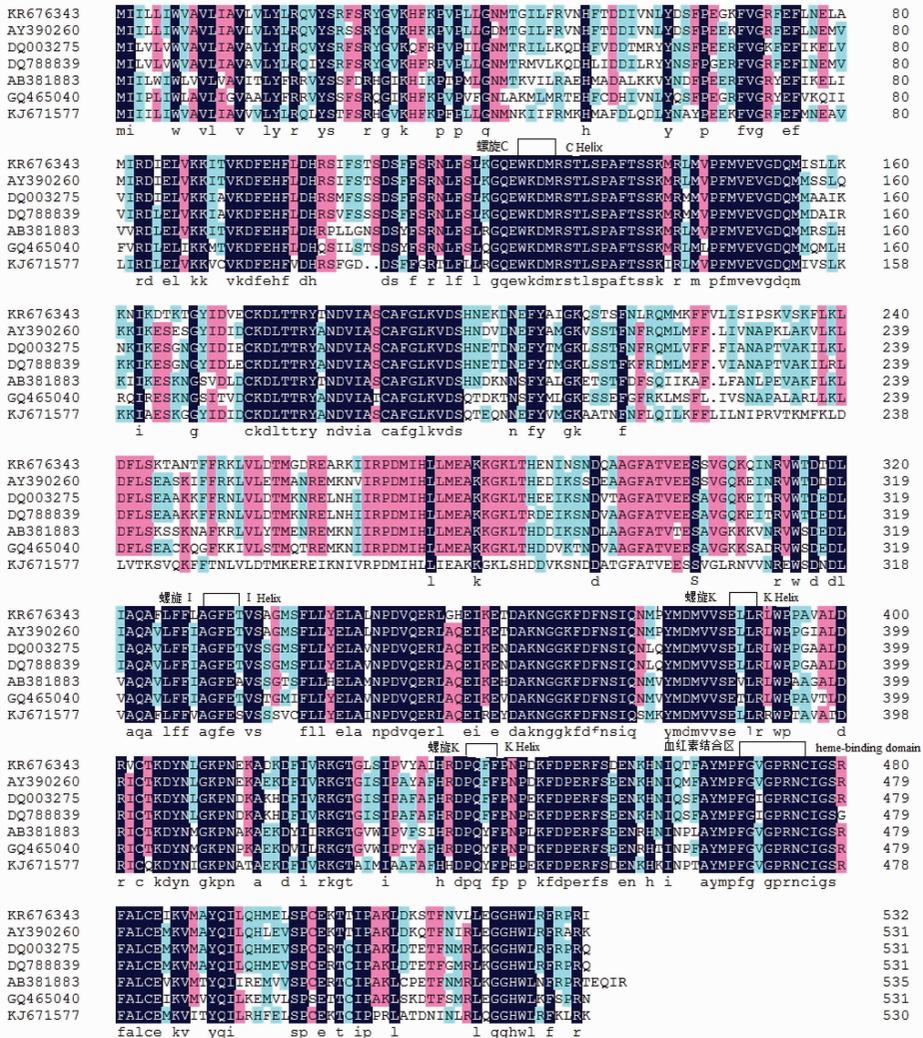
根据已登录 GenBank 的棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (AY371318) *CYP9A12* 和野桑蚕 *B. mandarina* (EF535806) *CYP9A22* 两种昆虫 *CYP9A* 基因的全序列设计甘蓝夜蛾 *CYP9A* 基因特异片段的简并引物 Mb9-F 和 Mb9-R(表 1)。以合成的 cDNA 为模板, 以 Mb9-F 和 Mb9-R 为引物扩增甘蓝夜蛾 *CYP9A* cDNA 序列片段。PCR 程序如下: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物后回收目的片段, 进行纯化后再克隆到 pEasy-T1 载体上, 转化至感受态细胞 DH5 $\alpha$  中, 氨苄筛选, 挑斑活化, 鉴定后选择阳性克隆菌斑送上海生工生物有限公司进行测序。按照得到的基因片段及试剂盒要求设计 RACE 嵌套引物 Mb9-3' RACE-Ro, Mb9-3' RACE-Ri, Mb9-5' RACE-Ro, Mb9-5' RACE-Ri(表 1), 根据 5' Full RACE Kit 说明进行 5' RACE 扩增, 根据 3' Full RACE Kit 说明进行 3' RACE 扩增。检测 RACE 产物并进行纯化、测序, 测序结果拼接。利用 Blastx 进行相似性比对, DNAMAN 翻译开放阅读



表 1 本研究所用引物

Table 1 The primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')
dt-Adapter	GACTCGAGTTCGACATCGA(T)17
Mb9-F	GGTCAAGAATGGAAAGACATGCGNTC
Mb9-R	ATGGAGTTGAAGTCAACTCCGCCGT
Mb9-3'RACE-Ro	CAGAGTTTGGACTGACACCGACTCATGTC
Mb9-3'RACE-Ri	CAGGAGCGTCTGGGGCAGGAGATCAAG
Mb9-5'RACE-Ro	CGCAGGAGGCTATCACGTCGTTAG
Mb9-5'RACE-Ri	CCGACCTCCACATGAAAGGCACCATCAGACG
CYP9A-q-F	AAGATTTTATCGTCCGCAAAGG
CYP9A-q-R	GTCCAACACCGAAGGGCAT
$\beta$ -actin-F	CCAACGGCATCCACGAGACCA
$\beta$ -actin-R	TCGCGGATACCAGGGTACAT



蓝黑色背景表示一致性达到100%, 粉色背景表示一致性 $\geq 75\%$ , 淡蓝色背景表示一致性 $\geq 50\%$ 。螺旋C、螺旋K、螺旋I、血红素结合区在图中分别标出。GenBank登录号分别为甘蓝夜蛾(KR676343; AY390260); 棉铃虫(DQ003275); 美洲棉铃虫(DQ788839); 斜纹夜蛾(GQ465040); 草地贪夜蛾(KJ671577); 甜菜夜蛾(AB381883)

The dark blue shade indicates 100% identity, and the pink shade indicates  $\geq 75\%$  identity, while the light blue shade indicates  $\geq 50\%$  identity. C Helix, K Helix, I Helix and heme-binding region are marked, respectively. GenBank accession numbers are: *Mamestra brassicae* (KR676343; AY390260), *Helicoverpa armigera* (DQ003275), *Helicoverpa zea* (DQ788839), *Spodoptera litura* (GQ465040), *Spodoptera frugiperda* (KJ671577) and *Spodoptera exigua* (AB381883)

图 2 *CYP9A90* 与其他昆虫 *CYP9A* 氨基酸序列多重比对Fig. 2 Multiple alignment of the amino acid sequences of *CYP9A90* and other *CYP9As*

## 2 结果与分析

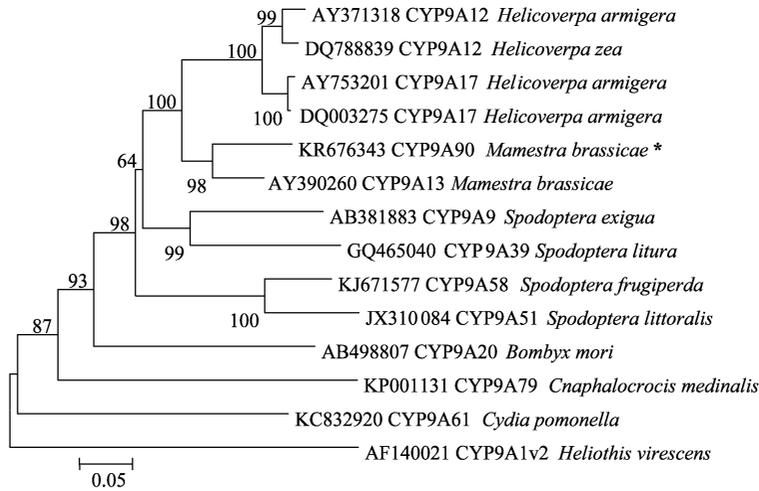
2.1 *CYP9A90* 基因的获得及序列分析

利用 RT-PCR 及 RACE 方法获得甘蓝夜蛾细胞色素 P450 基因 1 828 bp 的全长 cDNA 序列, 包括 1 个 125 bp 的 5'非编码区, 1 个 104 bp 的 3'非编码区和 1 个 1 599 bp 的开放阅读框。编码 532 个氨基酸。氨基酸序列中包括 P450 蛋白特征序列 FxxGxRxCxG (血红素结合区)(图 2)。通过 ExPaSy 在线生物软件获得其氨基酸序列的分子量约为 61.1 kDa, 等电点为 8.84。GenBank 登录号为 KR676343, 国际 P450 命名委员会命名为 *CYP9A90*。

## 2.2 CYP9A90 基因与鳞翅目其他种昆虫 CYP 氨基酸序列比对

从 NCBI 数据库获取与甘蓝夜蛾 CYP9A90 相似性高的其他昆虫 CYP9A 氨基酸序列 16 条, 利用 DNAMAN 软件进行氨基酸序列比对, 结果发现, 甘蓝夜蛾 CYP9A90 与其他昆虫 CYP9A 亚家族的氨基酸序列同源性达 70% 以上, 其中与甘蓝夜蛾 (AY390260) 一致性最高, 达 86%, 与棉铃虫 (DQ003275)、美洲棉铃虫 (DQ788839)、斜纹夜蛾 (GQ465040)、甜菜夜蛾 (AB381883) 和草地贪夜蛾 (KJ671577) 的一致性分别为 79%、78%、72%、71% 和

70%; 这 7 种氨基酸序列均具有相似的螺旋 C、螺旋 K、氧结合区、血红素结合区 (图 2)。通过 MEGA5.0 软件 NJ 法构建鳞翅目不同昆虫的细胞色素 P450 系统发育进化树 (图 3)。结果表明, CYP9A90 推导出的氨基酸序列与同种的 CYP9A13 (AY390260) 关系最近, 与鳞翅目夜蛾科棉铃虫 (DQ003275)、美洲棉铃虫 (DQ788839) 亲缘关系较近, 与斜纹夜蛾 (GQ465040)、甜菜夜蛾 (AB381883) 和草地贪夜蛾 (KJ671577) 关系稍远; 与家蚕 (AB498807)、稻纵卷叶螟 (KP001131)、苹果蠹蛾 (KC832920) 等非夜蛾科昆虫的亲缘关系相对较远。



GenBank 登录号: 甘蓝夜蛾(KR676343; AY390260); 棉铃虫(DQ003275; AY753201; AY371318); 美洲棉铃虫(DQ788839); 斜纹夜蛾(GQ465040); 棉贪夜蛾(JX310084); 草地贪夜蛾(KJ671577); 甜菜夜蛾(AB381883); 家蚕(AB498807); 稻纵卷叶螟(KP001131); 苹果蠹蛾(KC832920); 烟芽夜蛾(AF140021)。\*本研究克隆的基因  
GenBank accession numbers: *Mamestra brassicae* (KR676343, AY390260), *Helicoverpa armigera* (DQ003275, AY753201 and AY371318), *Helicoverpa zea* (DQ788839), *Spodoptera litura* (GQ465040), *Spodoptera littoralis* (JX310084), *Spodoptera frugiperda* (KJ671577), *Spodoptera exigua* (AB381883), *Bombyx mori* (AB498807), *Cnaphalocrocis medinalis* (KP001131), *Cydia pomonella* (KC832920) and *Heliiothis virescens* (AF140021). \*CYP9A90 cloned in this study

图 3 昆虫 CYP9A 基因推导氨基酸的系统进化树构建

Fig. 3 Phylogenetic tree based on calculated amino acid sequences of CYP9A

## 2.3 CYP9A90 基因在不同组织中的表达

通过 real-time PCR 检测发现 CYP9A90 在甘蓝夜蛾 5 龄幼虫的 6 个不同组织内表达情况不同, 其中在脂肪体中表达最高, 其次是前肠、中肠和后肠, 而在马氏管和唾腺中没有检测到该基因的表达 (图 4)。脂肪体中该基因表达量分别是中肠、前肠和后肠的 4.48、6.54 和 98.1 倍。

## 2.4 溴氰菊酯对 CYP9A90 基因的诱导表达分析

### 2.4.1 室内毒力测定

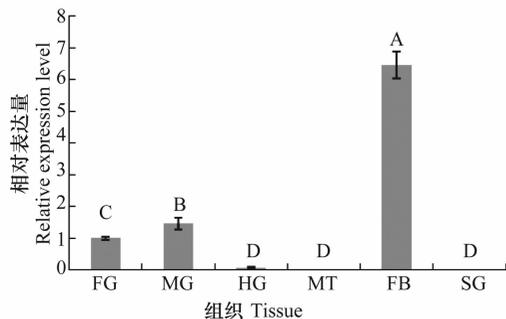
经点滴法测定, 溴氰菊酯对甘蓝夜蛾 5 龄幼虫的 LD<sub>10</sub>、LD<sub>30</sub> 和 LD<sub>50</sub> 分别为 0.152 (0.017 ~ 0.335)、0.448 (0.146 ~ 0.792) 和 0.943 (0.475 ~ 1.817) ng/g (表 2)。

### 2.4.2 低剂量溴氰菊酯对 CYP9A90 基因表达量的影响

为了验证溴氰菊酯对 CYP9A90 基因表达量的影响, 通过实时荧光定量技术对溴氰菊酯 LD<sub>10</sub>、LD<sub>30</sub> 和 LD<sub>50</sub> 剂量处理甘蓝夜蛾 5 龄幼虫不同时间 (3、6、12、24 和 48 h) 后 CYP9A90 基因的表达状况进行研究。LD<sub>30</sub> 和 LD<sub>50</sub> 诱导效果不理想, 与对照差异不显著, 数据在此没有列出。图 5 表示低剂量溴氰菊酯 LD<sub>10</sub> 作用后 CYP9A90 基因在一定时间范围内, 排除对照影响后, 各时间点数值均为正值, 表示该基因在各个时间点均被诱导, 但诱导量存在差异。6、24 和 48 h 表达量间差异不显著, 但这 3 个时间点与 3 h 和 12 h 时间点的表达量间存在显著差异, 分别是 3 h 和 12 h 的 1.40、1.43、1.31 倍和 4.07、4.13、3.80 倍。

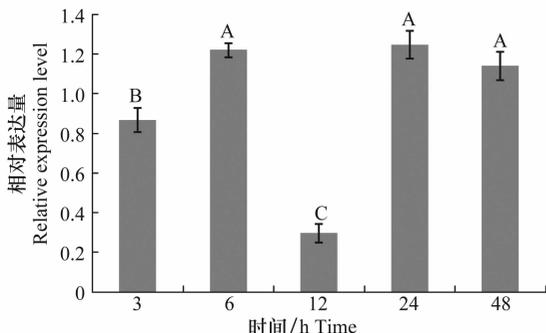
表 2 溴氰菊酯对甘蓝夜蛾 5 龄幼虫的毒力<sup>1)</sup>Table 2 Toxicity of deltamethrin on fifth-instar larvae of *Mamestra brassicae*

LD <sub>10</sub> (CI <sub>95</sub> )/ng · g <sup>-1</sup>	LD <sub>30</sub> (CI <sub>95</sub> )/ng · g <sup>-1</sup>	LD <sub>50</sub> (CI <sub>95</sub> )/ng · g <sup>-1</sup>	毒力回归方程 Toxicity regression equation	相关系数 <i>r</i> Correlation coefficient
0.152(0.017~0.335)	0.448(0.146~0.792)	0.943(0.475~1.817)	$y=1.978x-0.079$	0.989

1) CI<sub>95</sub>: 95%的置信限。CI<sub>95</sub>: 95% confidence interval.

FG: 前肠; MG: 中肠; HG: 后肠; MT: 马氏管; FB: 脂肪体; SG: 唾液腺。以后肠 *CYP9A90* 表达量为 1 计算不同组织中 *CYP9A90* 的相对表达量。误差线上方的字母代表不同组织中 *CYP9A90* 基因表达的差异显著性, 利用 HSD 检验法进行检测,  $P < 0.01$

FG: Foregut; MG: Midgut; HG: Hindgut; MT: Malpighian tubule; FB: Fat body; SG: Salivary gland. The relative expression levels of *CYP9A90* in various tissues were normalized to the level in the hindgut which has been ascribed an arbitrary value of 1. The statistical significances of difference in data were examined using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by HSD multiple range test. Different letters on the error bars indicate significant differences of *CYP9A90* among different tissues ( $P < 0.01$ )

图 4 *CYP9A90* 在甘蓝夜蛾不同组织中的表达Fig. 4 Expression pattern of *CYP9A90* in different tissues of *Mamestra brassicae*

误差线上方的字母代表溴氰菊酯处理后不同时间点 *CYP9A90* 基因表达的差异显著性, 利用 HSD 检验法进行检测,  $P < 0.01$

The statistical significances of difference in data were examined using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by HSD multiple range test. Different letters on the error bars indicate significant differences of *CYP9A90* among different time points after deltamethrin treatment ( $P < 0.01$ )

图 5 溴氰菊酯点滴后不同时间点 *CYP9A90* 的表达量Fig. 5 Expression of *CYP9A90* treated by deltamethrin at different time points

### 3 讨论

由于 P450 基因在昆虫组织器官表达的差异性, 使这些基因在昆虫体内表现的功能也不尽相同<sup>[21]</sup>。王伟等发现致倦库蚊 *CYP9J40* 基因在肌肉、消化道、卵巢、脑和胸部神经节均有明显表达, 表明了该

基因参与蚊虫对杀虫剂的抗性, 并且对雌虫发育有重要的影响<sup>[22]</sup>。郑笑笑等发现甜菜夜蛾 P450 基因的分布也具有一定的特异性: 主要分布在外源化合物进入体内所经过的主要入口的一些组织中, 这些组织是针对经口、皮进入的外源化合物的第一道防线<sup>[23]</sup>。赵华强等发现家蚕 *CYP9A22* 的 mRNA 转录表达具有组织特异性, 在中肠的表达量高于脂肪体<sup>[20]</sup>。*CYP4D46* 基因在脂肪体中的相对表达量较高, 说明 *CYP4D46* 可能与脂肪体的重要生理功能相关。本文研究的 *CYP9A90* 基因在 5 龄幼虫脂肪体中有最高表达, 这可能与脂肪体的功能密切相关。在昆虫体内, 脂肪体是最主要的代谢器官<sup>[24]</sup>, 因此推断本文研究的 *CYP9A90* 基因可能参与内源和外源物质的代谢, 也可能参与杀虫剂的解毒作用。随后的试验将利用 RNA 干扰等技术探讨该基因与杀虫剂杀虫活性的关系, 达到利用分子手段降低或延缓昆虫抗性甚至减少杀虫剂的目的。

外源物质不同剂量和作用时间对 P450 均产生不同的诱导效应, 当外源物质达到一定剂量并作用一定的时间后才会产生诱导作用<sup>[22]</sup>。溴氰菊酯是最重要的拟除虫菊酯类杀虫剂, 其使用范围很广<sup>[25]</sup>。目前, 越来越多的试验证明很多昆虫已对拟除虫菊酯类杀虫剂产生抗性, 而昆虫体内 P450 的参与是产生抗性的主要原因<sup>[26]</sup>。Pottelberge 等发现巴比妥、苯巴比妥和香叶醇对二斑叶螨 P450s 诱导作用表现出时间效应, 在药剂处理 1~4 h 内 P450s 酶活性迅速增加, 而 4~48 h 内其活性达到最大<sup>[27]</sup>。王学贵等发现氯虫苯甲酰胺诱导甜菜夜蛾, *CYP9A9* 基因上调表达表现出时间效应, 在 12 h 达到最大<sup>[10]</sup>。刘昌燕发现吡虫啉诱导大草蛉 P450 基因上调表达表现出时间效应, 在 16 h 达到最高峰<sup>[28]</sup>。在本研究中, *CYP9A90* 基因被诱导表达, 在 3 h 时就开始出现诱导效应, 至 48 h 时仍保持一定的诱导效应, 总体情况下, 各个时间点诱导表达量均为对照组的 2 倍左右, 但在 12 h 出现诱导表达量明显减少的现象, 与对照表达量间差异不显著。导致

在该时间点排除对照影响后,其诱导表达量明显低于其他各时间点的表达量,其原因可能是由于此时间节点昆虫体内特殊生理过程导致该基因表达量明显下降,其具体原因有待下一步试验验证。在低剂量(LD<sub>10</sub>)溴氰菊酯条件下 CYP9A90 基因被诱导表达;而在较高剂量 LD<sub>30</sub>、LD<sub>50</sub> 条件下,可能虫体受到溴氰菊酯的影响较大,不能及时对刺激做出反应,所以 CYP9A90 并没有表现出诱导作用(数据未列出)。因此,溴氰菊酯只能在一定的剂量范围内对该基因发挥诱导作用,剂量过高反而无诱导效果。但不同昆虫种类和不同 CYP 基因对溴氰菊酯的诱导可能存在不同的效应,东亚飞蝗 *Locusta migratoria* 的 CYP409A1 和 CYP408B1 均可被不同浓度(LD<sub>10</sub>、LD<sub>30</sub>和 LD<sub>50</sub>)的溴氰菊酯所诱导<sup>[29]</sup>,与本研究的 CYP9A90 只有在 LD<sub>10</sub> 剂量下被诱导存在一定区别。在棉铃虫的脂肪体中,只有低剂量溴氰菊酯诱导了 CYP6AE14、CYP6B2、CYP6B6、CYP9A14 的表达<sup>[30]</sup>,与本研究结果有类似之处。

P450 酶系是一个共同作用的代谢酶系,探究 P450 酶系中 CYP 基因的种类和功能将有助于更好地开展 P450 的系统研究工作。本试验以对甘蓝夜蛾 P450 基因家族的 CYP9A90 基因为切入点,克隆了 1 个新的 CYP9A 基因,研究了其在不同组织中的分布及表达量差异,明确了低剂量溴氰菊酯杀虫剂对其诱导反应,研究结果丰富了甘蓝夜蛾 P450 基因家族成员,为在甘蓝夜蛾体内系统研究 P450 解毒作用,降低或延缓甘蓝夜蛾抗药性奠定基础。

## 参考文献

- [1] Hodgson E. Microsomal monooxygenase[M]//Kurkut G A, Gillbert L I. Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology. Oxford: Pergamon Press, 1985:225-321.
- [2] Scott J G, Liu N. Insect cytochrome P450s: Thinking beyond detoxification[J]. Recent Advances in Insect Physiology Toxicology & Molecular Biology, 2008;117-124.
- [3] Schuler M A. P450s in plant-insect interactions[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2011, 1814(1): 36-45.
- [4] Feyereisen R. Insect CYP genes and P450 enzymes[M]//Gillbert L I. Insect molecular biology and biochemistry. Elsevier, Oxford, 2012: 236-295.
- [5] Li X, Schuler M A, Berenbaum M R. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics[J]. Annual Review of Entomology, 2007, 52(1): 231-253.
- [6] 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.
- [7] Bautista M A M, Tanaka T, Miyata T. Identification of permethrin-inducible cytochrome P450s from the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) and the possibility of involvement in permethrin resistance [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2007, 87(1): 85-93.
- [8] Nebert D W, Gonzalez F J. P450 genes: structure, evolution, and regulation [J]. Annual Review of Biochemistry, 1987, 56: 945-993.
- [9] 赵华强,宋丽莉,李兵,等. 野桑蚕细胞色素 P450 氧化酶活性测定及 CYP9 家族基因的诱导转录[J]. 浙江农业学报, 2010, 22(3): 287-291.
- [10] 王学贵,余慧灵,梁沛,等. 氯虫苯甲酰胺诱导甜菜夜蛾细胞色素 P450 基因上调表达[J]. 昆虫学报,2015, 58(3):281-287.
- [11] Lao Shuhua, Huang Xiaohui, Huang Haijian, et al. Genomic and transcriptomic insights into the cytochrome P450 monooxygenase gene repertoire in the rice pest brown planthopper, *Nilaparvata lugens* [J]. Genomics, 2015, 106(5): 301-309.
- [12] 张秀梅. 甘蓝夜蛾在青海省平安县的发生规律与防治措施[J]. 陕西农业科学, 2015(1): 35-38.
- [13] 张筱秀,连梅力,李唐,等. 山西中部地区甘蓝夜蛾发生规律及为害特点调查研究[J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2008, 28(4): 442-443.
- [14] 于荣荣. 飞蝗三个 P450 基因的分子特性及功能分析[D]. 太原: 山西大学, 2012.
- [15] Yang Y, Wu Y, Chen S, et al. The involvement of microsomal oxidases in pyrethroid resistance in *Helicoverpa armigera*, from Asia [J]. Insect Biochemistry & Molecular Biology, 2004, 34(8):763-773.
- [16] Yang Y, Chen S, Wu S, et al. Constitutive overexpression of multiple cytochrome P450 genes associated with pyrethroid resistance in *Helicoverpa armigera* [J]. Journal of Economic Entomology, 2006, 99(5): 1784-1789.
- [17] Yang Y, Yue L, Chen S, et al. Functional expression of *Helicoverpa armigera* CYP9A12 and CYP9A14 in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Pesticide Biochemistry & Physiology, 2008, 92(2):101-105.
- [18] Rose R L, Barbhuiya L, Roe R M, et al. Cytochrome P450-associated insecticide resistance and the development of biochemical diagnostic assays in *Heliothis virescens*[J]. Pesticide Biochemistry & Physiology, 1995, 51(3): 178-191.
- [19] Rose R L, Goh D, Thompson D M, et al. Cytochrome P450 (CYP)9A1, in *Heliothis virescens*: the first member of a new CYP, family[J]. Insect Biochemistry & Molecular Biology, 1997, 27(6): 605-615.
- [20] 赵华强,王东,李兵,等. 家蚕细胞色素 P450 基因 CYP9A22 的克隆及在中肠和脂肪体的诱导转录[J]. 蚕业科学, 2008, 34(4): 634-641.

着种植时间的增长,广西资源县的霜霉菌群体会快速融合、进化,对主栽品种产生更强的侵染能力。

本研究通过致病力测定与比较分析,明确了不同生态环境、种植结构对葡萄霜霉菌群体遗传结构影响显著,分析了河北昌黎和广西资源两地不同品种来源霜霉菌的遗传分化状况。但由于生态环境和种植结构的差异,本结果并不能完全代表其他地区群体特性,所以要得到我国各个地区不同寄主来源病原菌致病力分化情况仍需要进一步的试验来验证。

### 参考文献

[1] Wong F P, Burr H N, Wilcox W F. Heterothallism in *Plasmopara viticola* [J]. *Plant Pathology*, 2001, 50(4): 427 - 432.

[2] Gessler C, Pertot I, Perazzolli M. *Plasmopara viticola*: a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management [J]. *Phytopathologia Mediterranea*, 2011, 50(1): 43 - 44.

[3] 王忠跃. 中国葡萄病虫害与综合防控技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2009.

[4] 马延庆, 千琼丽, 刘长民, 等. 咸阳地区葡萄霜霉病的发生规律与气象条件关系分析[J]. *中外葡萄与葡萄酒*, 2008(5): 35 - 37.

[5] 董阳辉, 徐佩娟, 陈宝忠, 等. 葡萄霜霉病发生与防治技术[J]. *农业科技通讯*, 2011(4): 216 - 217.

[6] 李华, 郭明浩. 葡萄霜霉病预测模型及预警技术研究进展[J]. *中国农学通报*, 2005, 21(10): 313 - 316.

[7] Burruano S. The life-cycle of *Plasmopara viticola*, cause of downy mildew of vine [J]. *Mycologist*, 2000, 14(4): 179 - 182.

[8] 黄晓庆, 孔祥久, 孔繁芳, 等. 不同寄主来源的葡萄霜霉病菌致病

力测定及孢子囊大小比较[J]. *植物保护*, 2015, 41(3): 178 - 182.

[9] 刘新秀, 金恭玺, 李虎, 等. 葡萄种质资源抗霜霉病鉴定[J]. *新疆农业科学*, 2013, 50(5): 857 - 863.

[10] 王壮伟, 吴伟民, 王西成, 等. 江苏地区葡萄种质资源霜霉病抗性鉴定[J]. *江西农业学报*, 2015, 27(9): 41 - 44.

[11] 贺普超. 葡萄学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999: 23 - 24.

[12] 林玲, 黄羽, 卢江, 等. 南方湿热地区不同葡萄品种霜霉病抗性鉴定[J]. *西北农业学报*, 2013, 22(2): 136 - 140.

[13] Rouxel M, Mestre P, Comont G, et al. Phylogenetic and experimental evidence for host-specialized cryptic species in a biotrophic oomycete [J]. *New Phytologist*, 2013, 197(1): 251 - 263.

[14] 刘新秀, 张莉, 任毓忠, 等. 葡萄品种抗霜霉病不同鉴定方法的比较和相关性分析[J]. *新疆农业科学*, 2012, 49(7): 1244 - 1249.

[15] 农药田间药效试验准则(二)[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.

[16] Liu S M, Sykes S, Clingeleffer P R. A method using leafed single-node cuttings to evaluate downy mildew resistance in grapevine [J]. *Vitis Geilweilerhof*, 2003, 42(4): 173 - 180.

[17] Boso S, Kassemeyer H H. Different susceptibility of European grapevine cultivars for downy mildew [J]. *Vitis*, 2008, 47(1): 39 - 49.

[18] 毕秋艳, 马志强, 张小风, 等. 三省份葡萄霜霉菌致病型的划分[J]. *中国农业科技导报*, 2014(2): 50 - 58.

[19] 张眉, 辛相启, 吴斌, 等. 山东葡萄霜霉病菌致病力分化及亲缘关系研究[J]. *山东农业科学*, 2015(4): 95 - 99.

[20] 周婷婷. 新疆地区葡萄霜霉病菌致病性分化研究[D]. 石河子: 石河子大学, 2015.

[21] 刘旭, 梁曼, 王阳, 等. 不同地区葡萄霜霉病菌生物学特性及致病力研究[J]. *北方园艺*, 2013(6): 119 - 122.

(责任编辑: 田 喆)

(上接 60 页)

[21] Chung H, Sztal T, Pasricha S, et al. Characterization of *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 genes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(14): 5731 - 5736.

[22] 王炜, 陈少良, 崔峰. 致倦库蚊 GStE1 和 CYP9J40 的时空表达特点[J]. *应用昆虫学报*, 2014, 51(6): 1538 - 1544.

[23] 郑笑笑, 魏苹, 赵丽娜, 等. 甜菜夜蛾 P450 基因的克隆及组织特异性分析[J]. *杭州师范大学学报: 自然科学版*, 2012, 11(3): 198 - 204.

[24] Yang J, McCart C, Woods D J, et al. A *Drosophila* systems approach to xenobiotic metabolism [J]. *Physiological Genomics*, 2007, 30(3): 223 - 231.

[25] Gilbert L I, Iatrou K, Gill S S. *Comprehensive molecular insect science* [M]. Oxford: Elsevier, 2005.

[26] Wondji C S, Irving H, Morgan J, et al. Two duplicated P450 genes are associated with pyrethroid resistance in *Anopheles funestus*, a major malaria vector [J]. *Genome Research*, 2009, 19(3): 452

- 459.

[27] Pottelberge S V, Leeuwen T V, Amermaet K V, et al. Induction of cytochrome P450 monooxygenase activity in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*, and its influence on acaricide toxicity [J]. *Pesticide Biochemistry & Physiology*, 2008, 91(2): 128 - 133.

[28] 刘昌燕, 曾凡荣. 大草蛉 P450 基因 cDNA 片段的克隆及吡虫啉诱导表达[J]. *中国生物防治学报*, 2014, 30(3): 427 - 433.

[29] Guo Yanqiong, Zhang Jianzhen, Yu Rongrong, et al. Identification of two new cytochrome P450 genes and RNA interference to evaluate their roles in detoxification of commonly used insecticides in *Locusta migratoria* [J]. *Chemosphere*, 2012, 87(7): 709 - 717.

[30] Zhou Xiaojie, Sheng Chengfa, Li Mei, et al. Expression responses of nine cytochrome P450 genes to xenobiotics in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* [J]. *Pesticide Biochemistry & Physiology*, 2010, 97(3): 209 - 213.

(责任编辑: 田 喆)