

# 干扰 *VmCarEs-6* 基因影响苜蓿斑蚜对高效氯氟氰菊酯的敏感性

郝浩阳<sup>1,2</sup> 朱凯辉<sup>2</sup> 牙森·沙力<sup>1\*</sup> 涂雄兵<sup>2\*</sup>

(1. 新疆农业大学农学院, 农林有害生物监测与安全防控重点实验室, 乌鲁木齐 830052; 2. 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193)

**摘要:** 为阐明 *VmCarEs-6* 基因在苜蓿斑蚜 *Theroaphis trifolii* 对高效氯氟氰菊酯抗性中的作用, 于室内测定高效氯氟氰菊酯对苜蓿斑蚜的毒力和高效氯氟氰菊酯不同致死浓度胁迫后苜蓿斑蚜体内 *VmCarEs-6* 基因的相对表达量, 以星状阳离子聚合物 (star polycation, SPc) 纳米材料作为载体将 ds-*VmCarEs-6* 导入到苜蓿斑蚜体内, 测定干扰效率和苜蓿斑蚜的存活率, 并测定干扰 *VmCarEs-6* 基因后高效氯氟氰菊酯对苜蓿斑蚜的室内毒力。结果表明: 随着高效氯氟氰菊酯浓度和处理时间的增加, 其对苜蓿斑蚜的致死效果越显著; 高效氯氟氰菊酯对苜蓿斑蚜的致死浓度 LC<sub>10</sub>、LC<sub>50</sub> 和 LC<sub>70</sub> 分别为 2.550、5.617 和 7.761 mg/L; LC<sub>10</sub>、LC<sub>50</sub> 和 LC<sub>70</sub> 高效氯氟氰菊酯处理 48 h 后, 苜蓿斑蚜体内 *VmCarEs-6* 基因的相对表达量均显著高于对照; 随着处理时间增加, ds-*VmCarEs-6* 的干扰效果越显著, ds-*VmCarEs-6* 处理 48 h 后, 苜蓿斑蚜体内 *VmCarEs-6* 基因的相对表达量较对照组极显著降低, 干扰效率为 73.30%; ds-*VmCarEs-6* 处理 6、12、24、36 和 48 h 后, 苜蓿斑蚜的存活率分别为 92.22%、88.89%、86.67%、83.33% 和 78.89%, 均与对照无显著差异; ds-*VmCarEs-6* 处理 48 h 后, 不同浓度高效氯氟氰菊酯处理的苜蓿斑蚜死亡率均较对照显著增加, 表明苜蓿斑蚜 *VmCarEs-6* 基因影响苜蓿斑蚜对高效氯氟氰菊酯的敏感性。

**关键词:** 苜蓿斑蚜; 高效氯氟氰菊酯; RNA 干扰; 毒力测定; 纳米材料

## Interference with the *VmCarEs-6* gene affects the sensitivity of spotted alfalfa aphid *Theroaphis trifolii* to lambda-cyhalothrin

Hao Haoyang<sup>1,2</sup> Zhu Kehui<sup>2</sup> Shali Yasen<sup>1\*</sup> Tu Xiongbing<sup>2\*</sup>

(1. Key Laboratory of Pest Monitoring and Safety Control of Crops and Forests, College of Agronomy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; 2. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

**Abstract:** To elucidate the role of *VmCarEs-6* gene in the resistance of the spotted alfalfa aphid *Theroaphis trifolii* to high-efficiency cypermethrin, the toxicity of high-efficiency cypermethrin to alfalfa aphids and the relative expression of *VmCarEs-6* gene in alfalfa aphids under different lethal concentrations of high-efficiency cypermethrin stress were measured indoors. Star polycation (SPc) nanomaterials were used as carriers to introduce ds-*VmCarEs-6* into spotted alfalfa aphids, and the interference efficiency and survival rate of alfalfa spotted aphids were determined. The indoor toxicity of lambda-cyhalothrin to spotted alfalfa aphids after interference with *VmCarEs-6* gene was also measured. The results showed that as the concentration and treatment time of lambda-cyhalothrin increased, its lethal ef-

基金项目: 国家现代农业产业技术体系(CARS-34)

\* 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: ysxjau@sina.com, txb1208@163.com

收稿日期: 2024-09-03

fect on spotted alfalfa aphids became more significant. The lethal concentrations ( $LC_{10}$ ,  $LC_{50}$ , and  $LC_{70}$ ) of lambda-cyhalothrin against alfalfa aphids were 2.550, 5.617, and 7.761 mg/L, respectively. After 48 h of treatment with lethal concentrations of  $LC_{10}$ ,  $LC_{50}$ , and  $LC_{70}$  of lambda-cyhalothrin, the relative expression levels of *VmCarEs-6* gene in spotted alfalfa aphids were significantly higher than those in the control group. As the processing time increased, the interference effect of ds*VmCarEs-6* became more significant. After 48 h of treatment with ds*VmCarEs-6*, the relative expression level of the *VmCarEs-6* gene in spotted alfalfa aphids was significantly reduced compared to the control group, with an interference efficiency of 73.30%; After treatment with ds*VmCarEs-6* at 6, 12, 24, 36, and 48, the survival rates of spotted alfalfa aphids were 92.22%, 88.89%, 86.67%, 83.33%, and 78.89%, respectively, with no significant difference compared to the control. However, After 48 hours of treatment with ds*VmCarEs-6*, the mortality rate in different concentrations of lambda-cyhalothrin treatment groups significantly increased compared with the control group (CK). These results indicate that the *VmCarEs-6* gene affects the sensitivity of alfalfa aphids to lambda-cyhalothrin.

**Key words:** spotted alfalfa aphid; lambda-cyhalothrin; RNAi; toxicity testing; nanometer material

苜蓿斑蚜 *Theroaphis trifolii* 是严重影响苜蓿产量和品质的主要蚜虫种类之一(杨彩霞等, 2005)。目前蚜虫防治主要采取化学手段, 常见的杀虫剂主要包括有机磷类、氨基甲酸酯类和拟除虫菊酯类等, 这些杀虫剂对蚜虫均有较好的防效(牛婧玮等, 2015)。但大量使用杀虫剂不仅造成了一系列环境问题, 而且使蚜虫产生了抗药性(范元兰等, 2020)。因此, 寻找新的绿色防控方法迫在眉睫。

昆虫对杀虫剂产生抗性主要源于2种机制, 即降低其目标结构对杀虫剂的敏感性和增强其对杀虫剂的解毒代谢能力(陈澄宇等, 2016), 这2种机制均是杀虫剂通过改变目标昆虫体内酯酶基因的表达或某些靶基因的突变来实现的(Li et al., 2023)。羧酸酯酶(carboxylesterase, CarE)家族是昆虫适应环境胁迫的一种重要酯酶, 在昆虫体内扮演着重要角色, 它通过参与化学杀虫剂的代谢过程来降低农药对昆虫造成的氧化应激和毒杀效应(马国强等, 2020; 稅良勇等, 2024)。如受到甲氨基阿维菌素苯甲酸盐、高效氯氟氰菊酯和氯虫苯甲酰胺等杀虫剂胁迫后, 梨小食心虫 *Grapholita molesta*、东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis* 和褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 等昆虫体内 CarE 基因表达量会持续升高, 通过 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)CarE 基因的表达可以提高昆虫对杀虫剂的敏感性(Zhang et al., 2011); 沉默东亚飞蝗体内 *LmCarE9* 和 *LmCarE25* 基因或敲除褐飞虱体内的 *CarE17* 基因后, 昆虫对马拉硫磷或毒死蜱的抗性下降(Lu et al., 2022); 多种杀虫剂诱导后, 褐飞虱体内 CarE 基因的表达量上调, 从而对杀虫剂的抗性增强(Mao et al., 2021)。因此, 深入

探究 CarE 对杀虫剂胁迫的响应机制可为寻找新的杀虫剂靶点提供理论依据。

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是一种由双链 RNA(double strand RNA, dsRNA)或小干扰(small interfering RNA, siRNA)引发的生物学效应, 通过同源序列信使 RNA(messenger RNA, mRNA)的降解最终导致特异性基因转录后沉默(Mou et al., 2017; Peng et al., 2022)。近年来, RNAi 技术在昆虫学研究领域得到了广泛应用, 包括功能基因研究、害虫抗药性机制分析和害虫防治等方面(徐希宝等, 2015; Hafeez et al., 2019; 汪芳等, 2022)。实验室常用的 RNAi 处理方式主要为显微注射法和饲喂法。显微注射法适用于体型稍大的昆虫, 但该方法易损伤生物体, 操作难度高, 在农田中推广应用难度较大。饲喂法即将 dsRNA 导入到昆虫体内, 操作既简单, 又不会损伤生物体, 但 RNAi 效率较低(刘晓庆, 2023)。纳米材料因具有较大的表面积和高机械强度, 可以用作载体将杀虫剂负载在其表面。这种负载方式有助于控制杀虫剂的释放, 提高杀虫效果, 并减少农药对环境的污染等(张琨等, 2024)。将纳米材料作为 dsRNA 载体可以有效解决 dsRNA 和杀虫剂混合使用时外源施用难的问题(何承帅等, 2023)。因此, 本研究以星状阳离子聚合物(star polycation, SPc)纳米材料作为载体将 dsRNA 导入到昆虫体内, 以提高 dsRNA 的稳定性和进入目标生物组织或细胞的能力, 从而提高靶向递送效率。

为 RNAi 协同生物药剂防控害虫提供参考, 于室内测定高效氯氟氰菊酯对苜蓿斑蚜的毒力和高效氯氟氰菊酯不同致死浓度胁迫后苜蓿斑蚜体内 *Vm-*

*CarEs-6*基因的相对表达量,将SPc纳米材料作为载体将ds*VmCarEs-6*导入到苜蓿斑蚜体内,测定干扰效率和苜蓿斑蚜的存活率,并测定干扰*VmCarEs-6*基因后高效氯氟氰菊酯对苜蓿斑蚜的室内毒力,以期为后续深入探究苜蓿斑蚜对农药的抗性机制和为害虫防治提供新思路和方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试昆虫和植物:于2023年6月在河北省沧州市紫花苜蓿试验地采集苜蓿斑蚜,将其接至WL343紫花苜蓿上(古文鑫等,2024),置于温度( $25\pm2$ )℃、光周期16 L:8 D、相对湿度( $70\pm5$ )%的智能人工气候箱中培养,形成稳定的实验室种群,取无翅雌成蚜供试。苜蓿种子由北京正道种业有限公司提供。

农药和试剂:96.6%高效氯氟氰菊酯(lambda-cyhalothrin)原药,宁夏农林科学院植物保护研究所;SPc纳米材料,中国农业大学沈杰教授团队提供。TRIzol® RNA分离试剂、2×GS Tag PCR Mix高效DNA聚合酶、DNA凝胶回收纯化试剂盒,北京金沙生物科技有限公司;TS-GelRed核酸染料,北京擎科生物科技股份有限公司;DL2000 DNA Marker、Prime Script™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit,宝日医生物技术(北京)有限公司;Bseter® SYBR Green qPCR Master Mix实时荧光定量试剂盒,南京诺唯赞生物科技股份有限公司;T7 RiboMAX™ Express RNAi System,美国Promega公司;其他试剂均为国产分析纯。

仪器:PRX-350B智能人工气候箱,宁波赛福实验仪器有限公司;Q5实时荧光定量PCR仪,美国ABI公司;ETC-811东胜龙PCR仪,北京东胜创新生物科技有限公司;2x-2020D凝胶成像系统,上海知信实验仪器技术有限公司;WD-9403C紫外切胶仪,北京市六一仪器厂;NanoPhotometer-300微量分光光度计,德国IMPLEN公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 高效氯氟氰菊酯对苜蓿斑蚜室内毒力的测定

采用带虫浸液法(袁家瑜等,2020)测定高效氯氟氰菊酯对苜蓿斑蚜的室内毒力。用丙酮将96.6%高效氯氟氰菊酯原药配制成母液,用蒸馏水将母液稀释为10.00、6.67、5.00、4.00和3.33 mg/L五个浓度。选择个体大小基本一致的无翅雌成蚜,于不同浓度的药液中浸入10 s后取出,用滤纸吸去虫体周围多余的药液,放入直径为90 mm的培养皿中饲养,

每个处理30头,重复3次,以清水处理作为对照,每12 h观察并记录试虫死亡情况,持续观察48 h。用毛笔轻触虫体,虫体无任何反应,则判断其死亡。利用SPSS 26.0软件中的Probit模块计算毒力方程及亚致死浓度LC<sub>10</sub>、LC<sub>50</sub>和致死浓度LC<sub>70</sub>(贾春生,2006)。

#### 1.2.2 *VmCarEs-6*基因对高效氯氟氰菊酯胁迫的响应

前期转录组测序分析(古文鑫等,2024)及实时荧光定量PCR(real-time fluorescence quantification PCR,qPCR)结果(张子旭等,2023)显示,*VmCarEs-6*基因在苜蓿斑蚜体内高表达。为确定苜蓿斑蚜体内*VmCarEs-6*基因是否会响应高效氯氟氰菊酯的胁迫,采用qPCR技术对高效氯氟氰菊酯致死浓度LC<sub>10</sub>、LC<sub>50</sub>和LC<sub>70</sub>胁迫后苜蓿斑蚜体内*VmCarEs-6*基因的相对表达量进行分析。

按照1.2.1方法配制LC<sub>10</sub>、LC<sub>50</sub>和LC<sub>70</sub>浓度的高效氯氟氰菊酯药液,以蒸馏水处理为对照,按照1.2.1方法处理试虫,每个处理90头试虫,重复3次,处理48 h后取样,每个处理取40~50头无翅雌成蚜,放入2 mL离心管中,用液氮速冻15 min后,于-80 ℃储存,备用。利用TRIzol® RNA分离试剂分别提取LC<sub>10</sub>、LC<sub>50</sub>、LC<sub>70</sub>高效氯氟氰菊酯处理及对照的苜蓿斑蚜总RNA,按照Prime Script™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit反转录试剂盒说明书合成cDNA(李增鑫,2021;李兴烨,2023)。利用Primer Express 5.0软件设计*VmCarEs-6*基因的特异性引物*VmCarEs-6-F/VmCarEs-6-R*(表1),所有引物均委托北京擎科生物科技股份有限公司合成。以苜蓿斑蚜β-actin(朱凯辉,2022)为内参基因(表1)进行qPCR。20 μL反应体系:上下游引物各0.4 μL、cDNA模板0.8 μL、SYBR Premix Ex Taq 10 μL,用ddH<sub>2</sub>O补足至20 μL。qPCR程序:95 ℃预变性5 min;95 ℃变性30 s,60 ℃退火1 min,72 ℃延伸30 s,循环40次。采用2<sup>-ΔΔCT</sup>法计算*VmCarEs-6*基因的相对表达量(李海超等,2023)。

#### 1.2.3 *VmCarEs-6*的干扰效率测定

在进行干扰效率试验时,样品必须是活虫,以排除对干扰效率的影响。为证明SPc是否造成苜蓿斑蚜死亡,对其进行了生物测定。根据*VmCarEs-6*的基因序列,利用e-RNAi软件(<https://www.dkfz.de/signaling/e-rnai-3/>)在线设计带有T7启动子序列的引物ds*VmCarEs-6-F/dsVmCarEs-6-R*(表1)。取25头苜蓿斑蚜雌成蚜,装入1.5 mL无RNA酶的离心管中,利用TRIzol® RNA分离试剂提取RNA,按照利

用Prime Script<sup>TM</sup> II 1st Strand cDNA Synthesis Kit反转录试剂盒所明书合成cDNA。以苜蓿斑蚜cDNA为模板,以dsVmCarEs-6-F/dsVmCarEs-6-R(表1)和dsGFP-F/dsGFP-R(表1)为引物扩增目的cDNA片段。50 μL反应体系:上下游引物各2 μL、cDNA模板2 μL、Hieff Canace<sup>®</sup> PCR Master Mix 25 μL,用ddH<sub>2</sub>O补足至50 μL。PCR程序:98 ℃预变性3 min;98 ℃变性30 s,41 ℃退火30 s,72 ℃延伸15 s,72 ℃终延伸2 min。取PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳和切胶回收后利用DNA胶回收试剂盒纯化,获得dsVmCarEs-6合成所需cDNA模板。使用dsGFP-F/dsGFP-R引物(表1)对PCR产物进行切胶回收,并将收回回来的目的基因产物作为模板,按照T7 RiboMAX<sup>™</sup> Express RNAi System试剂盒说明书合成dsGFP(范继巧等,2019;马国强等,2020)。根据前期预试验结果,将dsVmCarEs浓度设置为

300 ng/μL。用无RNA酶水将dsVmCarEs-6浓度稀释为300 ng/μL,分装到2.0 mL离心管中,-80 ℃保存备用;按照质量比1:1向离心管中加入SPc,混匀,于37 ℃温育30 min(刘晓庆,2023),获得SPc+dsVmCarEs-6溶液,同样方法获得SPc+dsGFP溶液(对照),各取2 mL用喷壶对苜蓿斑蚜无翅雌成蚜进行喷雾处理,每个处理110头,重复3次,处理后于室温下饲养,分别于6、12、24、36和48 h后观察和记录试虫的死亡情况,计算存活率。每个时间每个处理随机选择20头试虫,每个处理重复3次,收集样品提取总RNA,合成cDNA模板,方法同1.2.2。采用qPCR技术分析不同处理的苜蓿斑蚜体内VmCarEs-6基因的相对表达量,方法同1.2.2。根据基因相对表达量计算干扰效率,干扰效率=(对照组基因相对表达量-干扰组基因相对表达量)/对照组基因表达量×100%。

表1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	用途 Purpose
VmCarEs-6-F	ACCTTGGTTAGGAGTATGG	实时荧光定量PCR
VmCarEs-6-R	TTTCTGGAAGTTTGGCGT	Real-time quantitative fluorescence PCR
dsVmCarEs-6-F	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u> AAGGTTCACGGGTCTTCC	dsVmCarEs-6合成
dsVmCarEs-6-R	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u> AATCGAAGCCCCGGTAAACG	dsVmCarEs-6 synthesis
β-actin-F	ACTCCGGTGATGGTGTCTCT	内参基因
β-actin-R	GTCGGTCAAGTCACGCCA	Reference gene
dsGFP-F	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u> AAACGCCACAAGTT	dsGFP合成
dsGFP-R	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u> CGTGCTGCTTCATGTG	dsGFP synthesis

下划线为启动子。Underlined sequences are the promoters.

#### 1.2.4 基因干扰后药剂对苜蓿斑蚜毒力的测定

按照1.2.3方法获得SPc+dsVmCarEs-6溶液,将其分别与LC<sub>10</sub>、LC<sub>50</sub>、LC<sub>70</sub>高效氯氟氰菊酯药液混合,混匀后喷施至无翅雌成蚜体表,方法同1.2.3;同时分别以喷施LC<sub>10</sub>、LC<sub>50</sub>、LC<sub>70</sub>高效氯氟氰菊酯药液为对照,每个处理每个浓度处理90头,重复3次,处理后于室温下饲养,分别于处理12、24、36和48 h后观察每个处理试虫的死亡情况,计算死亡率,方法同1.2.1。

#### 1.3 数据分析

采用Excel 2019和SPSS 26.0软件对试验数据进行分析处理,高效氯氟氰菊酯不同浓度处理后试虫的死亡率和体内VmCarEs-6基因相对表达量应用Duncan氏新复极差法进行差异显著性检验,干扰前

后试虫的存活率、体内VmCarEs-6基因相对表达量均采用t检验法进行差异显著性检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 高效氯氟氰菊酯对苜蓿斑蚜的室内毒力

同一处理时间,随着高效氯氟氰菊酯浓度的增加,其对苜蓿斑蚜的致死效果越显著;随着处理时间的增加,高效氯氟氰菊酯对苜蓿斑蚜的致死效果也越显著(表2)。10.00、6.67、5.00、4.00和3.33 mg/L浓度高效氯氟氰菊酯处理48 h后,苜蓿斑蚜的死亡率均最高,分别为78.89、65.56、47.78、24.45和18.89,均较对照显著增加( $P<0.05$ ,表2)。经计算,高效氯氟氰菊酯对苜蓿斑蚜的LC<sub>10</sub>、LC<sub>50</sub>和LC<sub>70</sub>分别为2.55、5.62和7.76 mg/L。

表2 高效氯氟氰菊酯不同处理时间后苜蓿斑蚜的死亡率

Table 2 Mortalities of spotted alfalfa aphids after different treatment times with high-efficiency lambda-cyhalothrin %

浓度 Concentration/(mg/L)	12 h	24 h	36 h	48 h
对照 CK	1.11±1.11 c	3.33±1.93 d	4.44±1.11 e	5.56±1.11 e
10.00	26.67±5.09 a	45.56±5.88 a	68.89±1.11 a	78.89±0.98 a
6.67	20.00±1.92 ab	43.33±8.39 a	55.55±4.01 b	65.56±4.44 b
5.00	16.67±3.85 b	34.44±2.94 ab	41.11±4.85 c	47.78±2.94 c
4.00	3.44±1.83 c	18.89±5.88 bc	22.22±4.01 d	24.45±4.01 d
3.33	5.56±2.94 c	10.00±3.85 c	12.22±2.94 de	18.89±7.23 d

表中数据为平均数±标准差。同列不同小写字母表示经Duncan氏新复极差法检验差异显著( $P<0.05$ )。Data are mean±SD. Different lowercase letters in the same column indicate significant difference by Duncan's new multiple range test ( $P<0.05$ )。

## 2.2 *VmCarEs-6*基因对高效氯氟氰菊酯胁迫的响应

LC<sub>10</sub>、LC<sub>50</sub>和LC<sub>70</sub>高效氯氟氰菊酯处理48 h后,苜蓿斑蚜体内*VmCarEs-6*基因的相对表达量均显著高于对照( $P<0.05$ ),其中致死浓度为LC<sub>50</sub>时,苜蓿斑蚜体内*VmCarEs-6*基因的相对表达量最高,为5.66倍(图1),表明苜蓿斑蚜体内*VmCarEs-6*基因能响应不同致死浓度高效氯氟氰菊酯的胁迫。

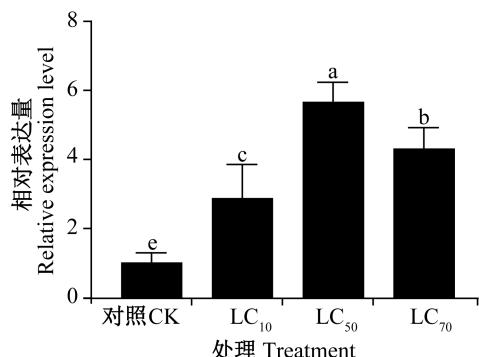


图1 高效氯氟氰菊酯致死浓度LC<sub>10</sub>、LC<sub>50</sub>和LC<sub>70</sub>处理后苜蓿斑蚜体内*VmCarEs-6*基因的相对表达量

Fig. 1 Relative expression levels of *VmCarEs-6* gene in the spotted alfalfa aphid after treatment with different lethal concentrations of lambda-cyhalothrin (LC<sub>10</sub>, LC<sub>50</sub> and LC<sub>70</sub>)

表中数据为平均数±标准差。不同小写字母表示经Duncan氏新复极差法检验差异显著( $P<0.05$ )。Data are mean±SD. Different lowercase letters indicate significant difference by Duncan's new multiple range test ( $P<0.05$ )。

## 2.3 *VmCarEs-6*基因的干扰效率及苜蓿斑蚜的存活率

随着处理时间的增加,*VmCarEs-6*基因的干扰效果越显著。ds*VmCarEs-6*处理24 h和36 h后,苜蓿斑蚜体内*VmCarEs-6*基因的相对表达量较对照组显著降低( $P<0.05$ ),干扰效率分别为51.57%和59.63%;ds*VmCarEs-6*处理48 h后,苜蓿斑蚜体内*VmCarEs-6*基因的相对表达量较对照组极显著降低( $P<0.001$ ),干扰效率为73.30%(图2),表明该基因

干扰有效。ds*VmCarEs-6*处理6、12、24、36和48 h后,苜蓿斑蚜的存活率分别为92.22%、88.89%、86.67%、83.33%和78.89%,均与对照无显著差异(图3),表明取样时间对干扰效率无影响。

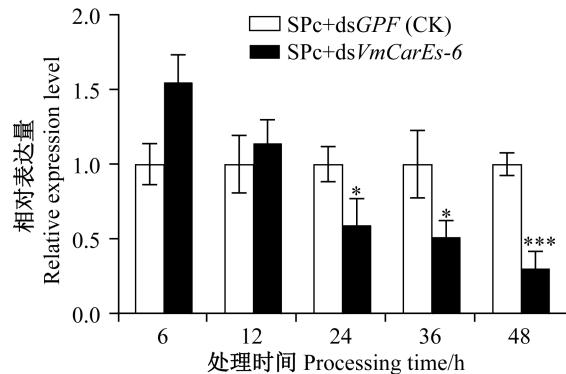


图2 *VmCarEs-6*基因干扰后苜蓿斑蚜体内*VmCarEs-6*基因的相对表达量

Fig. 2 Relative expression levels of *VmCarEs-6* gene in spotted alfalfa aphids after *VmCarEs-6* gene transformation

表中数据为平均数±标准差。\*, \*\*\*表示同时间2个处理经t检验法检验差异显著( $P<0.05$ 或 $P<0.001$ )。Data are mean±SD. \* or \*\*\* indicates significant difference between two treatments at the same time by t test ( $P<0.05$  or  $P<0.001$ )。

## 2.4 基因干扰后高效氯氟氰菊酯对苜蓿斑蚜的毒力

SPc+ds*VmCarEs-6*处理48 h后,高效氯氟氰菊酯致死浓度LC<sub>10</sub>、LC<sub>50</sub>和LC<sub>70</sub>对苜蓿斑蚜的毒力较对照显著增加( $P<0.05$ ),苜蓿斑蚜的死亡率分别为27.78%、66.67%和71.11%(图4),表明SPc纳米材料作为载体能将ds*VmCarEs-6*导入到苜蓿斑蚜体内,有利于*VmCarEs-6*的干扰,能显著提高高效氯氟氰菊酯对苜蓿斑蚜的致死率。

## 3 讨论

CarE是昆虫体内重要的多功能水解酶,参与昆虫对化学农药的代谢和隔离作用,有助于降低农药

对昆虫产生的免疫抑制和杀伤作用(Wang et al., 2020),其与细胞色素P450(cytochrome P450,CYP)解毒酶和谷胱甘肽-S-转移酶共称为昆虫的三大解毒酶系(税良勇等,2024),该类酶与相关基因也是探究昆虫抗药性问题的关键。本研究结果显示,苜蓿斑蚜CarE基因可对高效氯氟氰菊酯胁迫产生积极响应,即表达量显著上升。Yang(2016)研究结果显示,经高效氯氟氰菊酯处理后苹果蠹蛾 *Cydia pomonella* 体内的羧酸酯酶基因 *CpCE-1* 表达量显著上调,与本研究结果一致。但沈晓敏(2017)研究结果显示,经不同浓度甲氰菊酯处理后柑橘全爪螨 *Panonychus citri* 体内 6 个 CarE 基因的表达呈现不同的诱导效果,其中 3 个基因的表达量显著上升,与本研究结果有差异。魏朋(2019)研究结果显示,低剂量甲氰菊酯处理时,朱砂叶螨 *Tetranychus cinnabarinus* 抗性品系体内 CarE 基因表达量显著高于农药敏感品系。

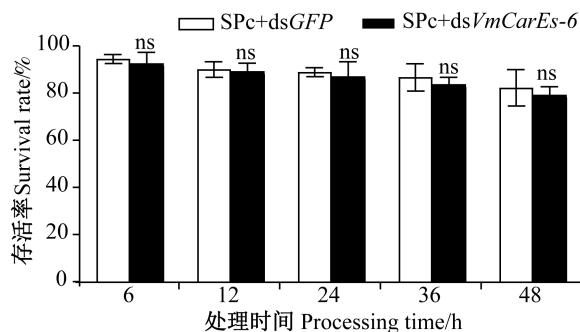


图3 干扰 *VmCarEs-6* 基因后苜蓿斑蚜的存活率

Fig. 3 Survival rates of spotted alfalfa aphids after interference with *VmCarEs-6* gene

表中数据为平均数±标准差。ns 表示同时间 2 个处理之间经 *t* 检验法检验差异不显著。Data are mean±SD. ns indicates no significant difference between two treatments at the same time by *t* test.

当接触到亚致死剂量杀虫剂后,昆虫体内会发生生理和生化方面的变化,这种由化学杀虫剂引起的亚致死效应是导致害虫抗药性和有害生物再次猖獗的主要原因。尹飞等(2023)研究结果显示,当小菜蛾 *Plutella xylostella* 接触到亚致死剂量杀虫剂后,其体内的多个 CYP 基因表达上调,将其体内 CYP 长期诱导后,小菜蛾对药剂产生抗性;欧善生(2012)和支昊宇等(2021)利用亚致死剂量氯虫苯甲酰胺诱导棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 和亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 体内解毒酶上调来代谢氯虫苯甲酰胺;全林发等(2017)用亚致死浓度高效氯氟氰菊酯处理桃小

食心虫 *Carposina sasakii* 后 CarE 活性显著上调。本研究利用亚致死浓度诱导苜蓿斑蚜后,苜蓿斑蚜体内 *VmCarEs-6* 基因表达显著上调,表明苜蓿斑蚜通过调节 CarE 活性来提高对高效氯氟氰菊酯的耐受性,从而提高了苜蓿斑蚜对高效氯氟氰菊酯的抗性。

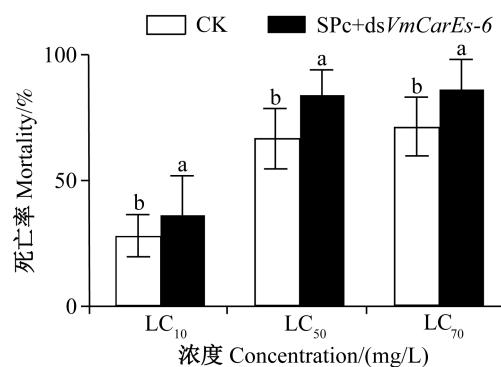


图4 高效氯氟氰菊酯不同致死浓度处理 48 h 后  
苜蓿斑蚜的死亡率

Fig. 4 Mortalities of spotted alfalfa aphids after 48 h of treatment with different lethal concentrations of lambda-cyhalothrin

表中数据为平均数±标准差。不同小写字母表示不同处理之间经 Duncan 氏新复极差法检验差异显著( $P<0.05$ )。Data are mean±SD. Different lowercase letters indicate significant difference among different treatments by Duncan's new multiple range test ( $P<0.05$ )。

干扰昆虫体内 CarE 基因表达,可以影响它们对拟除虫菊酯类杀虫剂的敏感性,从而增强杀虫剂的效果。刘艳(2020)采用 RNAi 技术干扰黏虫 *Mythimna separata* 体内 *MsCarE5* 基因后,黏虫对高效氯氟氰菊酯的敏感性显著增加,且高效氯氟氰菊酯对黏虫的杀虫活性显著提高 30%,这表明黏虫对菊酯类杀虫剂抗性与 *MsCarE5* 过度表达有关;王雅丽(2022)研究也表明, *PaCarE1* 基因在星豹蛛 *Pardosa astrigera* 代谢溴氰菊酯的过程中起着重要作用。本研究结果显示,高效氯氟氰菊酯可诱导苜蓿斑蚜体内 *VmCarEs-6* 基因上调,干扰该基因后,苜蓿斑蚜体内 *VmCarEs-6* 基因表达量显著降低,高效氯氟氰菊酯对苜蓿斑蚜的敏感性提高,表明该基因在苜蓿斑蚜抗高效氯氟氰菊酯方面发挥着重要作用。

本研究主要探讨了 *VmCarEs-6* 基因可能调控苜蓿斑蚜对高效氯氟氰菊酯代谢的作用,但对于该基因如何影响苜蓿斑蚜对高效氯氟氰菊酯敏感性的具体机制尚不清楚。下一步需深入研究该基因在苜蓿斑蚜体内的具体功能,以及它如何与高效氯氟氰菊酯相互作用;探讨该基因干扰后,苜蓿斑蚜体内解毒代谢途径、神经传导系统等方面的变化。

## 参考文献 (References)

- Chen CY, Shi XY, Gao XW. 2016. Mechanism of insect metabolic resistance to pyrethroid insecticides. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 18(5): 545–555 (in Chinese) [陈澄宇, 史雪岩, 高希武. 2016. 昆虫对拟除虫菊酯类杀虫剂的代谢抗性机制研究进展. 农药学学报, 18(5): 545–555]
- Fan JQ, Han PF, Gao Y, Liu ZF, Zhang PJ, Yang J, Fan RJ. 2019. Expression of the cytochrome P450 gene *AcCYP6CY14* and its role in imidacloprid resistance in *Aphis citricola*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 56(2): 298–306 (in Chinese) [范继巧, 韩鹏飞, 高越, 刘中芳, 张鹏九, 杨静, 范仁俊. 2019. 苹果黄蚜细胞色素P450基因*AcCYP6CY14*的表达及其在抵抗吡虫啉中的作用. 应用昆虫学报, 56(2): 298–306]
- Fan YL, Chen M, Wang QG, Zhang H, Qiu XQ. 2020. Research progress on plant aphids and their resistance. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 48(14): 33–44 (in Chinese) [范元兰, 陈敏, 王其刚, 张颢, 邱显钦. 2020. 植物蚜虫及其抗性研究进展. 江苏农业科学, 48(14): 33–44]
- Gu WX, Zhu KH, Liu CZ, Tu XB. 2024. Analysis of spotted alfalfa aphid *Therioaphis trifolii* salivary gland transcriptome differences based on feeding on susceptible and resistant varieties of *Medicago sativa*. *Journal of Plant Protection*, 51(4): 899–909 (in Chinese) [古文鑫, 朱凯辉, 刘长仲, 涂雄兵. 2024. 取食抗感品种紫花苜蓿的苜蓿斑蚜唾液腺转录组差异分析. 植物保护学报, 51(4): 899–909]
- Hafeez M, Liu SS, Yousaf HK, Jan S, Wang RL, Fernández-Grandon GM, Li XW, Gulzar A, Ali B, Rehman M, et al. 2020. RNA interference-mediated knockdown of a cytochrome P450 gene enhanced the toxicity of  $\alpha$ -cypermethrin in xanthotoxin-fed larvae of *Spodoptera exigua* (Hübner). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 162: 6–14
- He CS, Zhang H, Wu SF, Gao YH, Gao CF. 2023. Advance of nucleic acid pesticide delivery systems mediated by nanomaterial. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 25(6): 1179–1197 (in Chinese) [何承帅, 张辉, 吴顺凡, 高云昊, 高聪芬. 2023. 核酸农药纳米递送系统研究进展. 农药学学报, 25(6): 1179–1197]
- Jia CS. 2006. Calculating the LC<sub>50</sub> of insecticides with software SPSS. *Chinese Bulletin of Entomology*, 43(3): 414–417 (in Chinese) [贾春生. 2006. 利用SPSS软件计算杀虫剂的LC<sub>50</sub>. 昆虫知识, 43(3): 414–417]
- Li HC, Chu DD, Han XY, Yuan GH, Miao XX, Guan RB. 2023. Sequence analysis and RNAi of carboxylesterase gene *HaCarE* in cotton bollworm *Helicoverpa armigera*. *Journal of Plant Protection*, 50(3): 602–609 (in Chinese) [李海超, 楚冬冬, 韩心怡, 原国辉, 苗雪霞, 关若冰. 2023. 棉铃虫羧酸酯酶基因*HaCarE*序列分析及其RNAi效应. 植物保护学报, 50(3): 602–609]
- Li JY, Jia YJ, Zhang DY, Li Z, Zhang SD, Liu XX. 2023. Molecular identification of carboxylesterase genes and their potential roles in the insecticides susceptibility of *Grapholita molesta*. *Insect Molecular Biology*, 32(3): 305–315
- Li XY. 2023. Effect of heat acclimation on fitness and insecticide susceptibility of *Rhopalosiphum padi*. Master thesis. Shenyang: Shenyang Agricultural University (in Chinese) [李兴烨. 2023. 热驯化对禾谷缢管蚜适合度和杀虫剂敏感性的影响. 硕士学位论文. 沈阳: 沈阳农业大学]
- Li ZX. 2021. Study on detoxification and metabolism mechanism of *Myzus persicae* to imidacloprid, cyantraniliprole and trifumezopyrim. Master thesis. Wuhan: Huazhong Agricultural University (in Chinese) [李增鑫. 2021. 桃蚜对吡虫啉、溴氰虫酰胺和三氟苯嘧啶解毒机制的研究. 硕士学位论文. 武汉: 华中农业大学]
- Liu XQ. 2023. Functional studies on the metabolism of three insecticides by carboxylesterase of *Grapholita molesta*. Master thesis. Taigu: Shanxi Agricultural University (in Chinese) [刘晓庆. 2023. 梨小食心虫羧酸酯酶代谢三种杀虫剂的功能研究. 硕士学位论文. 太谷: 山西农业大学]
- Liu Y. 2020. Cloning and study on detoxification function of carboxylesterase genes from *Mythimna separata*. Master thesis. Harbin: Northeast Agricultural University (in Chinese) [刘艳. 2020. 黏虫羧酸酯酶基因的克隆及其解毒功能研究. 硕士学位论文. 哈尔滨: 东北农业大学]
- Lu K, Li YM, Xiao TX, Sun ZX. 2022. The metabolic resistance of *Nilaparvata lugens* to chlorpyrifos is mainly driven by the carboxylesterase CarE17. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 241: 113738
- Ma GQ, Gao JX, Lian MX. 2020. Identification of glutathione S-transferase (GST) gene family from *Xenocatantops humilis brachycerus* and its insecticide sensitivity. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 48(6): 99–105, 116 (in Chinese) [马国强, 高俊仙, 廉梅霞. 2020. 短角外斑腿蝗GST基因的鉴定及其杀虫剂敏感性. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 48(6): 99–105, 116]
- Mao KK, Ren ZJ, Li WH, Cai TW, Qin XY, Wan H, Jin BR, He S, Li JH. 2021. Carboxylesterase genes in nitenpyram-resistant brown planthoppers, *Nilaparvata lugens*. *Insect Science*, 28(4): 1049–1060
- Mou X, Yuan GR, Jiang HB, Liu Z, Wang JJ. 2017. Functional characterization of two acetylcholinesterase genes in the brown citrus aphid, *Aphis (Toxoptera) citricidus* (Kirkaldy), using heterologous expression and RNA interference. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 138: 76–83
- Niu JW, Zhang C, Li QY, Li HP, Diao QY. 2015. Character of carboxylesterase and effect of insecticides to care in *Aphis* sp. *Journal of Inner Mongolia Agricultural University (Natural Science Edition)*, 36(4): 23–28 (in Chinese) [牛婧玮, 张丛, 李清宇, 李海平, 刁青云. 2015. 枸杞蚜虫羧酸酯酶特性及杀虫剂对其的抑制作用. 内蒙古农业大学学报(自然科学版), 36(4): 23–28]
- Ou SS, Liang P, Song DL, Shi XY, Gao XW. 2012. Effects of sublethal dosage of chlorantraniliprole on development and detoxifying enzymes activity of *Helicoverpa armigera*. *Plant Protection*, 38(4): 1–8 (in Chinese) [欧善生, 梁沛, 宋敦伦, 史雪岩, 高希武. 2012. 氯虫苯甲酰胺亚致死剂量对棉铃虫生长发育和解毒酶活性的影响. 植物保护, 38(4): 1–8]

- Peng C, Yin H, Liu Y, Mao XF, Liu ZY. 2022. RNAi mediated gene silencing of detoxification related genes in the *Ectropis obliqua*. *Genes*, 13(7): 1141
- Quan LF, Qiu GS, Sun LN, Li YY, Yan WT, Yue Q, Zhang HJ. 2017. Effect of sublethal concentration of beta-cypermethrin on activities of detoxifying enzymes in *Carposina sasakii* Matsumura (Lepidoptera: Carposinidae) adults. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 19(3): 316–323 (in Chinese) [全林发, 仇贵生, 孙丽娜, 李艳艳, 吴文涛, 岳强, 张怀江. 2017. 高效氯氟氰菊酯亚致死浓度对桃小食心虫成虫体内解毒酶活性的影响. 农药学学报, 19(3): 316–323]
- Shen XM. 2017. Characterization and functional analysis of carboxylesterases in the citrus red mite, *Panonychus citri* (McGregor) (Acar: Tetranychidae). Master thesis. Chongqing: Southwest University (in Chinese) [沈晓敏. 2017. 柑橘全爪羧酸酯酶对甲氰菊酯解毒功能的研究. 硕士学位论文. 重庆: 西南大学]
- Shui LY, Zhao ZY, Feng Y, Xie XQ, Yuan XQ, Mao XF, Liu ZY. 2024. Recombinant expression of carboxylesterase EoCarE592 of *Ectropis obliqua* (Lepidoptera: Geometridae) and determination of its ability to degrade pesticides. *Acta Entomologica Sinica*, 67(1): 48–57 (in Chinese) [税良勇, 赵忠伟, 冯印, 谢晓倩, 袁晓琴, 毛新芳, 刘忠渊. 2024. 茶尺蠖羧酸酯酶EoCarE592的重组表达及其对农药的降解能力测定. 昆虫学报, 67(1): 48–57]
- Wang BJ, Wu S, Chang X, Chen J, Ma JX, Wang P, Zhu GP. 2020. Characterization of a novel hyper-thermostable and chlorpyrifos-hydrolyzing carboxylesterase EstC: a representative of the new esterase family XIX. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 170: 104704
- Wang F, Dang C, Jin HX, Xiao S, Zhong FJ, Fang Q, Yao HW, Ye GY. 2022. Application of RNA interference technology in pest control and its safety. *Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences)*, 48(6): 683–691 (in Chinese) [汪芳, 党聪, 金虹霞, 肖山, 钟馥骏, 方琦, 姚洪渭, 叶恭银. 2022. RNA干扰技术在害虫防治中的应用及其安全性. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 48(6): 683–691]
- Wang YL. 2022. Genes identification and deltamethrin detoxification of carboxylesterase in *Pardosa astrigera*. Master thesis. Taigu: Shanxi Agricultural University (in Chinese) [王雅丽. 2022. 星豹蛛羧酸酯酶基因鉴定及对溴氰菊酯解毒功能的研究. 硕士学位论文. 太谷: 山西农业大学]
- Wei P. 2019. Identification and functional validation of carboxylesterase genes involved in acaricides resistance in *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval). PhD thesis. Chongqing: Southwest University (in Chinese) [魏朋. 2019. 朱砂叶螨抗药性相关羧酸酯酶基因鉴定及功能分析. 博士学位论文. 重庆: 西南大学]
- Xu XB, Zhang J, Rui CH. 2015. Effects of silencing GSTs genes on the susceptibility of *Helicoverpa armigera* to methoxyfenozide. *Plant Protection*, 41(2): 49–54 (in Chinese) [徐希宝, 张婧, 范昌辉. 2015. 沉默GSTs基因影响棉铃虫对甲氧虫酰肼的敏感性. 植物保护, 41(2): 49–54]
- Yang CX, Gao LY, Zhang R, Zhang ZK. 2005. The occurrence and comprehensive control of alfalfa aphids in Ningxia. *Ningxia Journal of Agriculture and Forest*, (2): 4–6, 3 (in Chinese) [杨彩霞, 高立原, 张蓉, 张治科. 宁夏苜蓿斑蚜的发生和综合防治. 宁夏农林科技, (2): 4–6, 3]
- Yang XQ. 2016. Gene expression analysis and enzyme assay reveal a potential role of the carboxylesterase gene *CpCE-1* from *Cydia pomonella* in detoxification of insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 129: 56–62
- Yin F, Xiao Y, Peng ZK, Li ZY. 2023. Regulation of the resistance of diamondback moth *Plutella xylostella* to chlorantraniliprole by four cytochrome P450 genes. *Journal of Plant Protection*, 50(5): 1193–1201 (in Chinese) [尹飞, 肖勇, 彭争科, 李振宇. 2023. 四种P450基因调控小菜蛾对氯虫苯甲酰胺的抗性. 植物保护学报, 50(5): 1193–1201]
- Yuan JY, Yang H, He HG. 2020. Effects of sublethal doses of thiamethoxazide on detoxifying enzymes of *Macrosiphum rosorum*. *Zhang Agrochemicals*, 59(3): 184–187 (in Chinese) [袁家瑜, 杨慧, 何恒果. 2020. 嘉虫嗪亚致死剂量对月季长管蚜解毒酶活性的影响. 农药, 59(3): 184–187]
- Zhang JZ, Zhang JQ, Yang ML, Jia QD, Guo YP, Ma EB, Zhu KY. 2011. Genomics-based approaches to screening carboxylesterase-like genes potentially involved in malathion resistance in oriental migratory locust (*Locusta migratoria manilensis*). *Pest Management Science*, 67(2): 183–190
- Zhang K, Guo SG, Chang ML, Yu MY, Kan YC, Li DD. 2024. RNA interference on four coding genes of the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae) through the nanocarrier-delivery system. *Acta Entomologica Sinica*, <https://link.cnki.net/urlid/11.1832.Q.20240426.1350.002> (in Chinese) [张琨, 郭士刚, 常美玲, 余明玉, 阚云超, 李丹丹. 2024. 纳米递送系统介导的蚜虫四个编码基因RNA干涉条件筛选. 昆虫学报, <https://link.cnki.net/urlid/11.1832.Q.20240426.1350.002>]
- Zhang ZX, Liu XC, Tang Y, Li K, Wang JH, Li YS. 2023. Silencing of the *CpABCG6* gene affects the sensitivity of codling moth to high-potency cypermethrin. *Journal of Xinjiang Agricultural University*, 46(3): 191–196 (in Chinese) [张子旭, 刘雪纯, 唐洋, 李坤, 王佳华, 李亦松. 2023. 沉默CpABCG6基因影响苹果蠹蛾对高效氯氟氰菊酯敏感性. 新疆农业大学学报, 46(3): 191–196]
- Zhi HY, Ding XH, Chen P, Ye ML, Yan YY, Jiang WH. 2021. Effects of chlorantraniliprole on activities of detoxification enzymes and growth and reproduction of *Ostrinia furnacalis*. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 44(1): 89–96 (in Chinese) [支昊宇, 丁新华, 陈萍, 叶茂林, 闫阳阳, 姜卫华. 2021. 氯虫苯甲酰胺对亚洲玉米螟解毒酶活性及生长发育的影响. 南京农业大学学报, 44(1): 89–96]
- Zhu KH. 2022. Identification of *Theroaphis trifolii* (Drepanosiphidae) salivary protein and molecular response of laccase-1 to insect-resistant substances. Master thesis. Shenyang: Shenyang Agricultural University (in Chinese) [朱凯辉. 2022. 苜蓿斑蚜唾液蛋白鉴定及漆酶-1对抗虫物质的分子响应. 硕士学位论文. 沈阳: 沈阳农业大学]

(责任编辑:张俊芳)