

Q 型烟粉虱扬州种群 *cyp6cm1* 基因内含子抗性相关多态性检测及其 5'侧翼序列克隆*

袁林泽^{1,2**} 王少丽³ 王文龙² 杜予州² 张友军³ 王建军^{2***}

(1. 扬州市邗江区植物保护站, 扬州 225009; 2. 扬州大学园艺与植物保护学院, 扬州 225009;

3. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘要 【目的】烟粉虱 *Bemisia tabaci* (Gennadius) 已对包括有机磷类、拟除虫菊酯类、新烟碱类和昆虫生长调节剂等多种杀虫剂产生了不同程度的抗药性, 其中尤以对新烟碱类杀虫剂的抗性最为突出。本研究旨在克隆 Q 型烟粉虱扬州种群细胞色素 P450 基因 *cyp6cm1* 片段序列及其 5'侧翼序列。【方法】分别应用 PCR 和基因组步移技术克隆 *cyp6cm1* 基因片段序列及其 5'侧翼序列。【结果】*cyp6cm1* 基因片段序列包括 63 bp 的外显子片段和 826~829 bp 的内含子片段。多重序列比对发现, 在内含子第 195、230 和 242 等 3 个碱基处存在与新烟碱类杀虫剂抗性相关的单核苷酸多态性 (SNPs)。进一步利用基因组步移技术获得了长度为 962 bp 的 *cyp6cm1* 基因 5'侧翼序列, 利用 NNPP 在线分析软件预测转录起始位点为位于起始密码子上游 57 bp 处的碱基 A。ConSite 软件分析发现 *cyp6cm1* 基因 5'侧翼序列具有 XRE-AhR、CREB、Oct-1 和 Broad-complex-4 等多种转录因子结合位点。

关键词 烟粉虱, 细胞色素 P450, 内含子, 基因组步移

Detection of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the intron of *cyp6cm1* gene and cloning of its 5' flanking sequence in a Q-biotype *Bemisia tabaci* population from Yangzhou

YUAN Lin-Ze^{1,2**} WANG Shao-Li³ WANG Wen-Long² DU Yu-Zhou²
ZHANG You-Jun³ WANG Jian-Jun^{2***}

(1. Plant Protection Station of Hanjiang District, Yangzhou 225009, China; 2. College of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 3. Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract [Objectives] The whitefly, *Bemisia tabaci*, has developed resistance to a wide range of insecticides, including organophosphates, pyrethroids, insect growth regulators, and especially neonicotinoids. To understand the molecular mechanisms underlying neonicotinoid resistance, the genomic DNA fragment of the cytochrome P450 gene *cyp6cm1* and its 5' flanking sequence were cloned in Q-biotype *B. tabaci* from Yangzhou. [Methods] PCR and genome walking were used to isolate the genomic DNA fragment of the *cyp6cm1* gene and its flanking sequence. [Results] The genomic fragment of the *cyp6cm1* gene contained the last 63 bp of the first exon of the *cyp6cm1* gene together with the first 826-829 bp of the adjacent intron. Three single-nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with resistance to neonicotinoid insecticides were identified by multiple sequences alignment, these

* 资助项目 Supported projects: 公益性行业 (农业) 科研专项 (201303019, 200803005)

**第一作者 First author, E-mail: yuanlz1987@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: wangjj@yzu.edu.cn

收稿日期 Received: 2015-01-19, 接受日期 Accepted: 2015-01-19

were located at positions 195, 230 and 242 of the intron, respectively. In addition, the 962 bp 5' flanking sequence of *cyp6cm1* gene of Q-biotype *B. tabaci* was cloned by genome walking. NNPP online analysis software predicted the transcription initiation site as the nucleotide A, which is located 57 bp upstream of the initiation codon. ConSite software predicted several transcription factor binding sites in this region, including XRE-AhR, CREB, Oct-1 and Broad-complex-4.

Key words *Bemisia tabaci*, cytochrome P450, intron, genome walking

烟粉虱 *Bemisia tabaci* (Gennadius) 属同翅目 Homoptera、粉虱科 Aleyrodidae、小粉虱属 *Bemisia*, 是热带和亚热带地区危害多种农作物、蔬菜和观赏植物的主要害虫之一。根据其寄主范围、危害习性和传毒能力等方面的差异, 烟粉虱又可分为多种生物型。Boykin 等 (2007) 报道了烟粉虱至少有 10 种生物型。De Barro 等 (2011) 通过线粒体 DNA 分子标记, 以及不同生物型之间的杂交实验, 发现烟粉虱至少有 24 种生物型。至今, 已经确定烟粉虱至少有 28 种生物型 (Liu *et al.*, 2012), 其中 B 型和 Q 型是危害最为严重的两种生物型。褚栋等 (2005) 通过同源性分析首次在云南昆明市郊呈贡县斗南花卉市场发现 Q 型烟粉虱。Yang 等 (2013) 在 2011 年对我国 12 个省的 17 个烟粉虱种群进行了鉴定, 发现其中 15 个种群是 Q 型, 2 个种群为 Q 和 B 生物型混合种群。目前, Q 型烟粉虱的入侵范围已经扩大到全国 14 个省、市、自治区范围内的共 60 多个地区 (任顺祥等, 2011)。

对烟粉虱的防治在很大程度上依赖化学杀虫剂, 由于杀虫剂的大量使用, 烟粉虱对有机磷、拟除虫菊酯、新烟碱类和昆虫生长调节剂等多种杀虫剂产生了抗药性, 其中以对吡虫啉为代表的烟碱类杀虫剂抗药性问题更为突出。国内外解毒酶抑制剂增效试验和离体解毒酶活性测定表明, 烟粉虱对新烟碱类杀虫剂的抗性与多功能氧化酶活性提高有关 (Nauen *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2009; Feng *et al.*, 2010; Basita *et al.*, 2013)。对烟粉虱细胞色素 P450 基因的克隆和 mRNA 表达水平分析发现, *cyp6cm1* 和 *cyp4c64* 等多个细胞色素 P450 基因的过量表达与烟粉虱对新烟碱类杀虫剂的抗性相关 (Karunker *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2013), 并且在 Q 型烟粉虱 *cyp6cm1*

基因第一内含子第 195、230 和 242 碱基处发现 3 个与吡虫啉抗性相关的单核苷酸多态性位点 (SNPs) (Karunker *et al.*, 2008)。本文通过 PCR 技术克隆了扬州地区 Q 型烟粉虱 *cyp6cm1* 基因第一内含子片段, 证实了扬州地区 Q 型烟粉虱也存在与新烟碱类杀虫剂抗性相关的 *cyp6cm1* 基因第一内含子 3 个单核苷酸多态性。此外, 还通过基因组步移技术克隆并分析了 *cyp6cm1* 基因 5'侧翼序列。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

Q 型烟粉虱田间种群于 2010 年采自扬州。与 B 型相对敏感种群相比, 扬州种群对吡虫啉和烯啶虫胺的抗性分别为 8.68 倍和 12.30 倍 (Yuan *et al.*, 2012)。

1.2 烟粉虱基因组 DNA 提取

单头烟粉虱成虫基因组 DNA 提取方法参照沈媛等 (2010)。随机选取 5 头个体用于提取基因组 DNA。多头烟粉虱基因组 DNA 提取参照宝生物工程 (大连) 有限公司基因组 DNA 提取试剂盒说明书。

1.3 *cyp6cm1* 基因内含子 PCR 扩增

参照 Karunker 等 (2008) 的报道, 分别合成烟粉虱细胞色素 P450 基因 *cyp6cm1* 特异性上游引物 P450-6-80-for (5'-TGGGTGATGA CATTGAATACG-3') 和特异性下游引物 P450-6-830-rev (5'-AGAGCATCTTCAATACCTTCATG G-3')。以单头烟粉虱基因组 DNA 为模板, 25 μ L PCR 反应体系中含: 15.5 μ L ddH₂O; 2.5 μ L 10 $\times$ reaction buffer; 2 μ L 25 mmol/L MgCl₂; 2 μ L 10

mmol/L dNTP ; 1 μ L 10 μ mol/L 上游/下游引物 ; 1 μ L 10 $\times$ Taq DNA 聚合酶 ; 1 μ L gDNA 模板。PCR 扩增条件为 : 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min ; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s , 60~51 $^{\circ}$ C (每个循环降低 1 度) 退火 30 s , 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min , 循环 10 次 ; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s , 50 $^{\circ}$ C 退火 30 s , 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min , 循环 27 次 ; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。反应产物置于 - 20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

1.4 基因组步移

具体方法参照按照宝生物工程 (大连) 有限公司 Genome Walking Kit 说明书。根据 *cyp6cm1* 基因 cDNA 序列 (GenBank 登录号 : EU344879) 分别设计 3 条特异性引物: CYP6CM1R1 (5'-CA TCGTGGATGGAGTCGCACTT-3') CYP6CM 1 R2 (5'-GTAGTTGGACATAACCTTGAGCG-3') 和 CYP6CM1R3 (5'-GGTAAAGT TCCAAAG AGC CCACG-3') , 与试剂盒中提供的 4 种简并引物 AP1、AP2、AP3、AP4 分别进行 3 轮巢式 PCR。

1.5 PCR 产物克隆和序列分析

PCR 扩增产物经纯化后克隆于 PMD20-T 载体 (宝生物工程 (大连) 有限公司) 上 , 选取阳性克隆送上海生工生物工程技术有限公司用通用引物进行序列测定。利用 Vector NTI 软件对 *cyp6cm1* 基因内含子序列进行序列比对。利用 NNPP 在线分析软件 (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) 预测 *cyp6cm1* 基因 5'-侧翼区的转录起始位点。利用 ConSite 在线分析软件 (<http://consite.genereg.net/cgi-bin/consite>) 预测 *cyp6cm1* 基因 5'-侧翼区各转录因子结合位点。

2 结果与分析

2.1 *cyp6cm1* 基因第一内含子单核苷酸多态性 (SNPs) 检测

以 Q 型烟粉虱扬州种群单头个体 gDNA 为模板 , 通过 PCR 扩增获得 *cyp6cm1* 基因片段序列 , 包含 63 bp 的外显子区及 826~829 bp 的内含子区。对 5 头个体 *cyp6cm1* 基因片段的多重序列比对分析发现 , 其中 4 头个体的 *cyp6cm1* 基因片段序列在第一内含子第 195、230 和 242

碱基处都存在 Karunker 等 (2008) 报道的与新烟碱类杀虫剂抗性相关的单核苷酸多态性位点 (图 1)。

2.2 *cyp6cm1* 基因 5'侧翼序列分析

进一步利用基因组步移技术获得了长度为 962 bp 的 *cyp6cm1* 基因 5'侧翼序列。利用 NNPP 在线分析软件预测转录起始位点为位于起始密码子上游 57 bp 处的碱基 A , 这与普遍发现的转录起始位点为 A 相一致。利用 ConSite 软件分析发现 , *cyp6cm1* 基因 5'-侧翼区序列具有多种转录因子结合位点 , 包括 1 个 XRE-AhR、2 个 CREB、1 个 Oct-1 和 6 个 Broad-complex-4 (图 2)。

3 讨论

新烟碱类杀虫剂具有卓越的内吸活性 , 同时具有触杀和胃毒作用 , 并且作用机制独特 , 对目前的多抗性害虫显示了优良的防效 , 对哺乳动物毒性则较低。然而 , 随着该类杀虫剂的广泛使用 , 抗药性问题也日益突出。自 Cahill 等 (1996) 首次报道西班牙南部 Almeria 地区烟粉虱田间种群对吡虫啉产生抗性以来 , 烟粉虱对新烟碱类杀虫剂抗性机制方面的研究越来越受到重视。Rauch 和 Nauen (2003) 在研究对新烟碱类杀虫剂产生较高交互抗性的 B 型和 Q 型烟粉虱抗性机制时发现 , 与相对敏感品系相比 , 在有 30 倍抗性的烟粉虱品系中细胞色素 P450 单加氧酶活性提高了 2~3 倍 , 在大于 1 000 倍抗性的烟粉虱品系中 , 细胞色素 P450 单加氧酶活性提高了 5~6 倍 , 而酯酶与谷胱甘肽 S-转移酶的活性在这些品系中没有明显变化 , 推测细胞色素 P450 单加氧酶活性提高是烟粉虱对吡虫啉、噻虫嗪等新烟碱类杀虫剂产生抗性的重要机制。Karunker 等 (2008) 通过荧光定量 PCR 对 9 个 B 型、Q 型烟粉虱田间品系 11 个细胞色素 P450 基因 mRNA 表达水平的检测发现 , 细胞色素 P450 基因 *cyp6cm1* 的过量表达与 B 型、Q 型烟粉虱对吡虫啉的抗性显著相关。进一步研究发现 , Q 型烟粉虱 *cyp6cm1* 基因第一内含子第 195、230 和 242 碱基处存在 3 个与吡虫啉抗性相关的单核苷酸多态性位点

	1	90
YZ1-CYP6CM1vQr-Q	(1) TGGGTGATGACATTGAATACGAAACTTTGAAGGAATTTAAATATGCCAACCAAGTTATTGATGGTGAGTTAAATCATCCCTATAGCCACG	
YZ3-CYP6CM1vQr-Q	(1) TGGGTGATGACATTGAATACGAAACTTTGAAGGAATTTAAATATGCCAACCAAGTTATTGATGGTGAGTTAAATCATCCCTATAGCCACG	
YZ2-CYP6CM1vQr-Q	(1) TGGGTGATGACATTGAATACGAAACTTTGAAGGAATTTAAATATGCCAACCAAGTTATTGATGGTGAGTTAAATCATCCCTATAGCCACG	
YZ4-CYP6CM1vQr-Q	(1) TGGGTGATGACATTGAATACGAAACTTTGAAGGAATTTAAATATGCCAACCAAGTTATTGATGGTGAGTTAAATCATCCCTATAGCCACG	
YZ5-CYP6CM1vQs-Q	(1) TGGGTGATGACATTGAATACGAAACTTTGAAGGAATTTAAATATGCCAACCAAGTTATTGATGGTGAGTTAAATCATCCCTATAGCCACG	
	91	180
YZ1-CYP6CM1vQr-Q	(91) ACACAATATTTTAAATGTGATATTTTTTAAACCGATCTATGGCCAACTGCAAAGAGACACCGAGAAATGACGAATTCACAACGAGCGCG	
YZ3-CYP6CM1vQr-Q	(91) ACACAATATTTTAAATGTGATATTTTTTAAACCGATCTATGGCCAACTGCAAAGAGACACCGAGAAATGACGAATTCACAACGAGCGCG	
YZ2-CYP6CM1vQr-Q	(91) ACACGATATTTTAAATGTGATATTTTTTAAACCGATCTATGGCCAACTGCAAAGAGACACCGAGAAATGACGAATTCACAACGAGCGCG	
YZ4-CYP6CM1vQr-Q	(91) ACACAATATTTTAAATGTGATATTTTTTAAACCGATCTATGGCCAACTGCAAAGAGACACCGAGAAATGACGAATTCACAACGAGCGCG	
YZ5-CYP6CM1vQs-Q	(91) ACACAATATTTTAAATGTGATATTTTTTAAATCGATCTATGGCCAACTGCAAAGAGACACCGAGAAATGACGAATTCACAACGAGCGCG	
	181	270
YZ1-CYP6CM1vQr-Q	(181) CACCACGGTGAGCGTGAATGCGTCAAGTATTCTCGAGCTCTGTAGGCGCAATCGCGCCGCGTGGTCACACTG CTTTGGCGCAATG	
YZ3-CYP6CM1vQr-Q	(181) CACCACGGTGAGCGTGAATGCGTCAAGTATTCTCGAGCTCTGTAGGCGCAATCGCGCCGCGTGGTCACACTG CTTTGGCGCAATG	
YZ2-CYP6CM1vQr-Q	(181) CACCACGGTGAGCGTGAATGCGTCAAGTATTCTCGAGCTCTGTAGGCGCAATCGCGCCGCGTGGTCACACTG CTTTGGCGCAATG	
YZ4-CYP6CM1vQr-Q	(181) CACCACGGTGAGCGTGAATGCGTCAAGTATTCTCGAGCTCTGTAGGCGCAATCGCGCCGCGTGGTCACACTG CTTTGGCGCAATG	
YZ5-CYP6CM1vQs-Q	(181) CACCACGGTGAGCGTGAATGCGTCAAGTATTCTCGAGCTCTGTAGGCGCAATCGCGCCGCGTGGTCACACTG ATTTGGCGCAATG	
	271	360
YZ1-CYP6CM1vQr-Q	(271) CGTCAAGTATTCCTACAGTCTT CTAGGCGCTTATAAGAGTTTCGCGCCAGCCACACTGTTTTGGTGC GATAATTCAGACTTGCAGGAGTT	
YZ3-CYP6CM1vQr-Q	(271) CGTCAAGTATTCCTACAGTCTT CTAGGCGCTTATAAGAGTTTCGCGCCAGCCACACTGTTTTGGTGC GATAATTCAGACTTGCAGGAGTT	
YZ2-CYP6CM1vQr-Q	(271) CGTCAAGTATTCCTACAGTCTT CTAGGCGCTTATAAGAGTTTCGCGCCAGCCACACTGTTTTGGTGC GATAATTCAGACTTGCAGGAGTT	
YZ4-CYP6CM1vQr-Q	(271) CGTCAAGTATTCCTACAGTCTT CTAGGCGCTTATAAGAGTTTCGCGCCAGCCACACTGTTTTGGTGC GATAATTCAGACTTGCAGGAGTT	
YZ5-CYP6CM1vQs-Q	(271) CGTCAAGTATTCCTACAGTCTT CTAGGCGCTTATAAGAGTTTCGCGCCAGCCACACTGTTTTGGTGC GATAATTCAGACTTGCAGGAGTT	
	361	450
YZ1-CYP6CM1vQr-Q	(361) ATCGTATTCACCAACATGATTTTGAAGATTCTGTACACTTTATATTTTCCATCATTTAAATATTTAAAAAATAAAAAATAAAAAAT	
YZ3-CYP6CM1vQr-Q	(361) ATCGTTTTCCAACCATGATTTTGAAGATTCTGTACACTTTATATTTTCCATCATTTAAATATTTAAAAAATAAAAAATAAAAAAT	
YZ2-CYP6CM1vQr-Q	(361) ATCGTTTTCCAACCATGATTTTGAAGATTCTGTACACTTTATATTTTCCATCATTTAAATATTTAAAAAATAAAAAATAAAAAAT	
YZ4-CYP6CM1vQr-Q	(361) ATCGTTTTCCAACCATGATTTTGAAGATTCTGTACACTTTATATTTTCCATCATTTAAATATTTAAAAAATAAAAAATAAAAAAT	
YZ5-CYP6CM1vQs-Q	(361) ATCGTTTTCCAACCATGATTTTGAAGATTCTGTACACTTTATATTTTCCATCATTTAAATATTTAAAAAATAAAAAATAAAAAAT	
	451	540
YZ1-CYP6CM1vQr-Q	(451) CACATAAAATCCGACCAATGTTCTCTCTGTATTTACATATTTGTTAATTGTTATAAGTAGAAGTATTGGAAGTGCATGTTCTCTAGATA	
YZ3-CYP6CM1vQr-Q	(449) CACATAAAATCCGACCAATGTTCTCTCTGTATTTACATATTTGTTAATTGTTATAAGTAGAAGTATTGGAAGTGCATGTTCTCTAGATA	
YZ2-CYP6CM1vQr-Q	(451) CACATAAAATCCGACCAATGTTCTCTCTGTATTTACATATTTGTTAATTGTTATAAGTAGAAGTATTGGAAGTGCATGTTCTCTAGATA	
YZ4-CYP6CM1vQr-Q	(450) CACATAAAATCCGACCAATGTTCTCTCTGTATTTACATATTTGTTAATTGTTATAAGTAGAAGTATTGGAAGTGCATGTTCTCTAGATA	
YZ5-CYP6CM1vQs-Q	(451) CACATAAAATCCGACCAATGTTCTCTCTGTATTTACATATTTGTTAATTGTTATAAGTAGAAGTATTGGAAGTGCATGTTCTCTAGATA	
	541	630
YZ1-CYP6CM1vQr-Q	(541) CTATGTGCTTACTTTTGGCGAAAAATATGGCGATCCGCTGAATTTTAGTAAAAAATACTGCTAACTATTTCTTTTATTAGGGAAGAAA	
YZ3-CYP6CM1vQr-Q	(539) CTATGTGCTTACTTTTGGCGAAAAATATGGCGATCCGCTGAATTTTAGTAAAAAATACTGCTAACTATTTCTTTTATTAGGGAAGAAA	
YZ2-CYP6CM1vQr-Q	(541) CTATGTGCTTACTTTTGGCGAAAAATATGGCGATCCGCTGAATTTTAGTAAAAAATACTGCTAACTATTTCTTTTATTAGGGAAGAAA	
YZ4-CYP6CM1vQr-Q	(540) CTATGTGCTTACTTTTGGCGAAAAATATGGCGATCCGCTGAATTTTAGTAAAAAATACTGCTAACTATTTCTTTTATTAGGGAAGAAA	
YZ5-CYP6CM1vQs-Q	(541) CTATGTGCTTACTTTTGGCGAAAAATATGGCGATCCGCTGAATTTTAGTAAAAAATACTGCTAACTATTTCTTTTATTAGGGAAGAAA	
	631	720
YZ1-CYP6CM1vQr-Q	(630) GTGTAACCACATAATTTAATAGTGTGTACACAATAAATTAAGATTGCAGGACCCGCGTACACTAAAGGAGCTAAATATATTCCTGCTT	
YZ3-CYP6CM1vQr-Q	(628) GTGTAACCACATAATTTAATAGTGTGTACACAATAAATTAAGATTGCAGGACCCGCGTACACTAAAGGAGCTAAATATATTCCTGCTT	
YZ2-CYP6CM1vQr-Q	(630) GTGTAACCACATAATTTAATAGTGTGTACACAATAAATTAAGATTGCAGGACCCGCGTACACTAAAGGAGCTAAATATATTCCTGCTT	
YZ4-CYP6CM1vQr-Q	(629) GTGTAACCACATAATTTAATAGTGTGTACACAATAAATTAAGATTGCAGGACCCGCGTACACTAAAGGAGCTAAATATATTCCTGCTT	
YZ5-CYP6CM1vQs-Q	(631) GTGTAACCACATAATTTAATAGTGTGTACACAATAAATTAAGATTGCAGGACCCGCGTACACTAAAGGAGCTAAATATATTCCTGCTT	
	721	810
YZ1-CYP6CM1vQr-Q	(720) TTACTCATCAACCACCATAAAGGCGAAATATAGCGTTGGCCTCCGAATTCAACTTTTGCTCGCTCGATTACATTGCTCATAGTGTCTTA	
YZ3-CYP6CM1vQr-Q	(718) TTACTCATCAACCACCATAAAGGCGAAATATAGCGTTGGCCTCCGAATTCAACTTTTGCTCGCTCGATTACATTGCTCATAGTGTCTTA	
YZ2-CYP6CM1vQr-Q	(720) TTACTCATCAACCACCATAAAGGCGAAATATAGCGTTGGCCTCCGAATTCAACTTTTGCTCGCTCGATTACATTGCTCATAGTGTCTTA	
YZ4-CYP6CM1vQr-Q	(719) TTACTCATCAACCACCATAAAGGCGAAATATAGCGTTGGCCTCCGAATTCAACTTTTGCTCGCTCGATTACATTGCTCATAGTGTCTTA	
YZ5-CYP6CM1vQs-Q	(721) TTACTCATCAACCACCATAAAGGCGAAATATAGCGTTGGCCTCCGAATTCAACTTTTGCTCGCTCGATTACATTGCTCATAGTGTCTTA	
	811	892
YZ1-CYP6CM1vQr-Q	(810) GAGTGGGATGTCTAAGATATTGTCTAAAAATTTAAGGTAAGTATTGTCTAAGTCCGAACCATGAAGGTATTGAAGATGCTCT	
YZ3-CYP6CM1vQr-Q	(808) GAGTGGGATGTCTAAGATATTGTCTAAAAATTTAAGGTAAGTATTGTCTAAGTCCGAACCATGAAGGTATTGAAGATGCTCT	
YZ2-CYP6CM1vQr-Q	(810) GAGTGGGATGTCTAAGATATTGTCTAAAAATTTAAGGTAAGTATTGTCTAAGTCCGAACCATGAAGGTATTGAAGATGCTCT	
YZ4-CYP6CM1vQr-Q	(809) GAGTGGGATGTCTAAGATATTGTCTAAAAATTTAAGGTAAGTATTGTCTAAGTCCGAACCATGAAGGTATTGAAGATGCTCT	
YZ5-CYP6CM1vQs-Q	(811) GAGTGGGATGTCTAAGATATTGTCTAAAAATTTAAGGTAAGTATTGTCTAAGTCCGAACCATGAAGGTATTGAAGATGCTCT	

图 1 Q 型烟粉虱扬州种群 *cyp6cm1* 等位基因序列比对Fig. 1 Alignment of *cyp6cm1* allele sequences of Q-biotype *Bemisia tabaci* from Yangzhou population

加底纹加黑碱基是与新烟碱类杀虫剂抗性相关的单核苷酸多态性位点。

Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with resistance to neonicotinoid insecticides are shown in bold and shaded.

```

-905   CATCGTGGATGGAGTCGCACTTTGGGATATATTGATTGATCTGCCATTTAAACCTATAGAAGAGGGTGTTCACAA
-830   CAAACGCCTTAATAATCGATTTCCTTACCACGGCTTCAAACGGGGAATAACATCGATAATCGATCATTACGCCTC
      Broad-complex-4
-755   GCAATTACTGTTTCGACAGGCGCAGGCTGTAAGTTTTCTGTAAATATGTTATGTAATACATGATTCAAGTGGACCG
      Broad-complex-4
-680   ACTAATCTGCACGCTCGTATTTTTCACCACTTCTCCTTATCTCGTCAACGCAGGGTAAACTTGTCAAAGGTGT
      CREB
-605   GCACTCGAAATGAACTAATACTGACCTGACTGCTGATCATCGCGTGACGTCCTTAATTATTCTTTGAACCGAGG
      XRE-AhR
-530   CGCAGCAGTATCTAAGTGAAACCTGCCTGCGTCGTAATGTGCGTGCCTGTTGTTTTTTCGGAGCTGTGGACGA
      Broad-complex-4
-455   ATTTTGGTGCACCGTTTCTCTGATAGAACCGTACCTCTATCAATCCAGATAAGGAACCAACAGACGGACGGAT
-380   AATATAGAATTGTCAGGTGTCCTAAATTTTGTGAGTTTCATCTTGAAAATTATACCTGGTGCTAGGAAGACTGAG
      Oct1 Broad-complex-4
-305   TACGACGATATCCTTGGTTTAAATTTGAACAAATATTGGAGAAAATGTGATAAAATTACCTAATTTGCTGAAAT
      Broad-complex-4
-230   ACATATGTTTAAATGGAATGCCGCCAAATGACGTCATAACGCGGCACATTTTCTCACTTTTAAATCTATTTT
      CREB
-155   CTCCAATTTCCCATGTGAGAAAAAAGTGTGAAAAATGCTGCGAACTCAGCTCATTAGGCACTCTCAGATGAAG
      Broad-complex-4
-80   CAATAAAATGTTTTTGTGCAAAATCTCCATAGTTTGGAAACATGTCTGCTTAAATTGGCACCTTGGCCGTTAGTC
      +1
-5   CACTCAAGCTAAGACGTTTGGATTTAATTGTGGATATCCTTTTGCAGATTTAACCGAGAGCAATGGAAGTGTGG
      M E L L
71   AAATAGTTAAGTCAGCCATGGACACTCACTCGTCTGCTGATTTTCTTGAGTGTGATGTTTACCTGCTCTACG
E I V K S A M D T H S V L L I F L S V M V Y L L Y
146   TTTACGGGACAAATCCACTACTGGAGCAAGCGAGGCGTCCCGTGCCAAAGCCCGCACAGAGCATCGTGCACA
V Y R D K F H Y W S K R G V P C Q S P A Q S I V R
221   CCTTCCGGCTTGTCTCCGAATGGACTCCTTCACCGACAACGTGCTACGGCGTGTACAAGGCCTTCGATGGACACC
T F R L V L R M D S F T D N C Y G V Y K A F D G H
296   CCTACGTGGGCTCTTTGGAACCTACC
P Y V G S L E L T

```

图 2 Q 型烟粉虱 *cyp6cm1* 基因 5'侧翼序列Fig. 2 The 5' flanking sequence of *cyp6cm1* gene of Q-biotype *Bemisia tabaci*

加底纹加黑碱基是推测的转录起始位点，加下划线序列是预测的转录因子结合位点。

The predicted transcription start site is shown in bold and shaded. The predicted transcription factor binding sites are underlined.

(SNPs)。本文对 Q 型烟粉虱扬州种群 5 头个体 *cyp6cm1* 基因片段的多重序列比对分析发现，其中 4 头个体的 *cyp6cm1* 基因片段序列在第一内含子第 195、230 和 242 碱基处也存在这 3 个单核苷酸多态性位点，表明细胞色素 P450 基因 *cyp6cm1* 的过量表达也是扬州种群对新烟碱类杀虫剂产生抗性的重要机制。

与其它真核生物基因一样，细胞色素 P450

基因具有多种特定的顺式作用元件，并主要分布于基因的 5'上游调控区，与相对应的各反式作用因子相互作用，共同完成对细胞色素 P450 基因转录的有效调控 (Li et al., 2007)。本文通过基因组步移技术克隆了长度为 965 bp 的 Q 型烟粉虱 *cyp6cm1* 基因 5'侧翼序列。序列分析表明，*cyp6cm1* 基因 5'侧翼序列具有 XRE-AhR、CREB、Oct-1 和 Broad-complex-4 等多种转录因子结合

位点。对北美黑凤蝶 *Palio polyxene* 的 *cyp6b1* 基因启动子的突变分析发现,外源化合物响应元件 XRE-AhR 在 *cyp6b1* 基因组成型和花椒毒素诱导型表达调控中起重要作用 (Brown *et al.*, 2005)。CREB 通过与 cAMP 反应元件 (CRE) 结合调控人和大鼠 *cyp19* 基因转录 (Carlone and Richards, 1997; Michael *et al.*, 1997)。Oct-1 能够抑制大鼠 *cyp1a1* 基因的表达 (Sterling and Bresnick, 1996)。Broad-complex-4 能够抑制在果蝇 S2 细胞中表达的家蝇 *cyp6d1* 基因被苯巴比妥诱导表达 (Lin *et al.*, 2011)。因此,本文在 *cyp6cm1* 基因 5'侧翼区鉴定的 XRE-AhR、CREB、Oct-1 和 Broad-complex-4 等转录因子结合位点可能与 *cyp6cm1* 基因的转录调控相关。今后有必要在此基础上进一步对 Q 型烟粉虱 *cyp6cm1* 基因的过量表达调控机制进行深入研究。

参考文献 (References)

- Basita M, Saeed S, Saleem MA, Sayyed AH, 2013. Can resistance in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) be overcome with mixtures of neonicotinoids and insect growth regulators? *Crop Prot.*, 44: 135–141.
- Boykin L M, Shatters R G, Rosell R C, McKenzie CL, Bagnall RA, De Barro P, Frohlich DR, 2007. Global relationships of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) revealed using Bayesian analysis of mitochondrial COI DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 44(3): 1306–1319.
- Brown RP, McDonnell CM, Berenbaum MR, Schuler MA, 2005. Regulation of an insect cytochrome P450 monooxygenase gene (CYP6B1) by aryl hydrocarbon and xanthotoxin response cascades. *Gene*, 358: 39–52.
- Cahill MR, Gorman K, Day S, Denholm I, Elbert A, Nauen R. 1996. Baseline determination and detection of resistance to imidacloprid in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Bull. Entomol. Res.*, 86(2): 343–349.
- Carlone DL, Richards JS, 1997. Functional interactions, phosphorylation, and levels of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-regulatory element binding protein and steroidogenic factor-1 mediate hormone-regulated and constitutive expression of aromatase in gonadal cells. *Mol. Endocrinol.*, 11(3):292–304.
- Chu D, Zhang YJ, Cong B, Xu BY, Wu QJ, 2005. Identification for Yunnan Q biotype. *Chinese Bulletin of Entomology*, 42(1): 54–56. [褚栋, 张友军, 丛斌, 徐宝云, 吴青君, 2005. 云南 Q 型烟粉虱种群的鉴定. *昆虫知识*, 42(1): 54–56.]
- De Barro PJ, Liu SS, Boykin LM, Dinsdale AB, 2011. *Bemisia tabaci*: A statement of species status. *Annu. Rev. Entomol.*, 56: 1–19.
- Feng YT, Wu QJ, Wang SI, Chang X, Xie W, Xu B, Zhang Y, 2010. Cross-resistance study and biochemical mechanisms of thiamethoxam resistance in B-biotype *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Pest Manag. Sci.*, 66(3): 313–318.
- Karunker I, Benting J, Lueke B, Ponge T, Nauen R, Roditakis E, Vontas J, Gorman K, Denholm I, Morin S, 2008. Overexpression of cytochrome P450 CYP6CM1 is associated with high resistance to imidacloprid in the B and Q biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera:Aleyrodidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38(6): 634–644.
- Lin G, Kozaki T, Scott J, 2011. Hormone receptor-like in 96 and Broad-Complex modulate phenobarbital induced transcription of cytochrome P450 CYP6D1 in *Drosophila* S2 cells. *Insect Mol. Biol.*, 20(1): 87–95.
- Liu S, Colvinb J, Paul J, 2012. Species concepts as applied to the whitefly *Bemisia tabaci* systematics: how many species are there? *Journal of Integrative Agriculture*, 11(2): 176–186.
- Li X, Schuler MA, Berenbaum MR, 2007. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu. Rev. Entomol.*, 52:231–253.
- Michael MD, Michael LF, Simpson ER, 1997. A CRE-like sequence that binds CREB and contributes to cAMP-dependent regulation of the proximal promoter of the human aromatase P450 (CYP19) gene. *Mol. Cell Endocrinol.*, 134(2): 147–156.
- Nauen R, Stumpf N, Elbert A, 2002. Toxicological and mechanistic studies on neonicotinoid cross-resistance in Q-type *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Pest Manag. Sci.*, 58(9): 868–875.
- Rauch N, Nauen R, 2003. Biochemical markers linked to neonicotinoid cross-resistance in *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 54(4): 165–176.
- Ren SX, Qiu BL, Ge F, Zang YJ, Du YZ, Chen XX, Guo JY, Lin KJ, Peng ZQ, Yao SL, Hu YH, Wang LD, Zhang WQ, 2011. Research progress of the monitoring, forecast and sustainable management of whitefly pests in China. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 48(1): 7–15. [任顺祥, 邱宝利, 戈峰, 张友军, 杜予州, 陈学新, 郭建英, 林克剑, 彭正强, 姚松林, 胡雅辉, 王联德, 张文庆, 2011. 粉虱类害虫的监测预警与可持续治理技术透视. *应用昆虫学报*, 48(1): 7–15.]
- Shen Y, Du YZ, Jin GH, Qiu BL, Zheng FS, Ren SX, 2010. Phylogenetic analysis of *Bemisia tabaci* non-B biotypes in partial

- areas in China based on 16S rDNA gene. *Acta Entomol. Sin.*, 53(1): 82–90. [沈媛, 杜予州, 金桂华, 邱宝利, 郑福山, 任顺祥, 2010. 基于 16S rDNA 基因的中国部分地区非 B 型烟粉虱系统发育关系分析. *昆虫学报*, 53(1): 82–90.]
- Sterling K, Bresnick E, 1996. Oct-1 transcription factor is a negative regulator of rat CYP1A1 expression via an octamer sequence in its negative regulatory element. *Mol. Pharmacol.*, 49(2): 329–337.
- Wang ZY, Yao M, Wu YD, 2009. Cross-resistance, inheritance and biochemical mechanisms of imidacloprid resistance in B-biotype *Bemisia tabaci*. *Pest Manag. Sci.*, 65(11): 1189–1194.
- Yang X, Xie W, Wang SL, Wu QJ, Pan HP, Li RM, Yang NN, Liu BM, Xu BY, Zhou X, Zhang YJ, 2013. Two cytochrome P450 genes are involved in imidacloprid resistance in field populations of the whitefly, *Bemisia tabaci*, in China. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 107(3): 343–350.
- Yuan L, Wang SL, Zhou JC, Du YZ, Zhang YJ, Wang JJ, 2012. Status of insecticide resistance and associated mutations in Q-biotype of whitefly, *Bemisia tabaci*, from eastern China. *Crop Prot.*, 31: 67–71.