

Q 型烟粉虱 UDP-糖基转移酶 *UGT354A1* 基因克隆及其在噻虫嗪抗性中的作用*

杜田华^{1**} 危学高² 殷 城² 杨 静² 黄明娇²
桂连友¹ 杨 鑫² 张友军^{1,2***}

(1. 长江大学农学院昆虫研究所, 荆州 434025; 2. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘 要 【目的】UDP-糖基转移酶(UGTs)是昆虫主要的Ⅱ期解毒酶,可能参与昆虫抗药性的形成。本研究旨在探究Q型烟粉虱中UGT基因是否参与其对噻虫嗪的抗性。【方法】依据烟粉虱基因组数据库设计引物,克隆其*UGT354A1*基因的全长序列;采用qRT-PCR技术检测*UGT354A1*基因在烟粉虱不同发育阶段、不同组织部位以及抗敏品系中的表达量;通过RNA干扰试验,验证*UGT354A1*基因在烟粉虱噻虫嗪抗性中的作用。【结果】序列生物信息学分析发现,*UGT354A1*基因属于典型的昆虫UGTs,包括两个糖基供体(DBR1和DBR2)和一个保守特征性基序。qRT-PCR结果显示,*UGT354A1*基因在噻虫嗪抗性品系(THQR)中的表达量为敏感品系(THQS)的2.60倍,且噻虫嗪可显著诱导该基因的表达。在不同发育阶段和组织部位中,发现*UGT354A1*基因在烟粉虱若虫和成虫阶段及头部和胸部表达丰富。RNAi后,沉默*UGT354A1*基因能够显著增加噻虫嗪对Q型烟粉虱的毒杀作用。【结论】*UGT354A1*基因在Q型烟粉虱中对噻虫嗪具有重要的解毒作用,可能参与了抗性的形成。

关键词 Q型烟粉虱;UDP-糖基转移酶(UGTs);*UGT354A1*基因;基因克隆;RNAi;噻虫嗪抗性

Cloning of the *Bemisia tabaci* Q biotype UDP-glycosyltransferase *UGT354A1* gene and its role in thiamethoxam resistance

DU Tian-Hua^{1**} WEI Xue-Gao² YIN Cheng² YANG Jing² HUANG Ming-Jiao²
GUI Lian-You¹ YANG Xin² ZHANG You-Jun^{1,2***}

(1. Institute of Insect, College of Agriculture, Yangtze University, Jingzhou 434025, China;

2. Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract 【Objectives】To investigate whether the *Bemisia tabaci* (Q-biotype) UDP-glycosyltransferase (UGT) gene is involved in resistance to thiamethoxam. 【Methods】PCR primers were designed according to the genome database and the full-length sequence of the *UGT354A1* gene was cloned. Expression levels of the *UGT354A1* gene in different developmental stages and body parts, and in a thiamethoxam-resistant (THQR) and susceptible strain (THQS) were detected by q-PCR. The function of *UGT354A1* gene in the resistance of *B. tabaci* to thiamethoxam was verified by RNAi. 【Results】Sequence analysis shows that the *UGT354A1* gene has a conserved UGTs domain that is typical of insect UGTs. Compared with the susceptible strain, the *UGT354A1* gene was overexpressed (2.60-fold) in the thiamethoxam resistant strain. In addition, thiamethoxam could significantly induce the expression of the *UGT354A1* gene. The experiments of the expression levels of the *UGT354A1* gene in different developmental stages and body parts indicate that it is most highly expressed in nymphs and adults, and in the head and thorax. RNAi silencing of *UGT354A1* gene expression significantly reduced the resistance of *B. tabaci* to thiamethoxam. 【Conclusion】The *UGT354A1* gene is involved in the formation of thiamethoxam resistance in *B. tabaci*. The results improve the understanding of the role of UGTs in the evolution of insecticide resistance, and provide a

*资助项目 Supported projects: 国家重点研发计划(2019YFD1002100);北京市自然科学基金(6212031)

**第一作者 First author, E-mail: dutianhua01@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: zhangyoujun@caas.cn

收稿日期 Received: 2021-10-23; 接受日期 Accepted: 2021-12-28

theoretical basis for the comprehensive management of *B. tabaci*.

Key words *Bemisia tabaci*; UDP-glycosyltransferases (UGTs); *UGT354A1*; gene cloning; RNA interference; thiamethoxam-resistance

尿苷二磷酸-糖基转移酶 (UGTs) 是昆虫主要的 II 期代谢酶 (Jancova *et al.*, 2010; Ahn *et al.*, 2012), 通过糖基化作用参与多种亲脂外源性和内源性药物的生物转化、化解和消除有毒的外源性化合物 (Mackenzie *et al.*, 2005; Meech *et al.*, 2012; Bock, 2016)。研究表明, 昆虫 UGTs 对植物中有毒植物化学物质具有解毒代谢作用 (Hopkins and Kramer, 1992; Wang *et al.*, 1999), 此外, 昆虫可以通过调节自身 UGTs 基因的表达丰度应对杀虫剂的毒理作用, 在种群适应性进化中起到关键作用 (Bull and Whitten, 1972)。例如, UGTs 参与了昆虫对有机磷 (Bull and Whitten, 1972)、酰胺类杀虫剂 (Li *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2019)、拟除虫菊酯 (Zhou *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2020) 和新烟碱类杀虫剂 (Kaplanoglu *et al.*, 2017; Pan *et al.*, 2018; Tian *et al.*, 2019; Du *et al.*, 2021) 的抗性产生。有报道称, 在昆虫解毒代谢过程中, 杀虫剂可显著提高昆虫体内 UGT 活性 (Lee *et al.*, 2006; Tao *et al.*, 2012; Su *et al.*, 2018; Du *et al.*, 2021), 这对昆虫解毒代谢具有十分重要作用 (Heckel, 2014; Heidel-Fischer and Vogel, 2015)。例如, *UGT2B7* 和 *UGT2C1* 基因参与赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* PH₃ 抗性 (杜文蔚等, 2021)。UGT375A1 等基因的上调与柑橘木虱 *Diaphorina citri* 对吡虫啉的抗性有关 (Tian *et al.*, 2019)。UGT201D3 参与了朱砂叶螨 *Tetranychus cinnabarinus* 对阿维菌素的抗性产生 (Wang *et al.*, 2018), *UGT33J12* 基因与粘虫 *Mythimna separata* 对氯氟氰菊酯和氯虫苯甲酰胺 2 种杀虫剂的解毒代谢过程相关 (樊东等, 2021)。此外, 昆虫 UGTs 也参与多个生理过程, 包括嗅觉、色素沉着、消化以及生长发育 (Hopkins and Kramer, 1992; Bozzolan *et al.*, 2015)。

烟粉虱 *Bemisia tabaci* 是一种世界性的重大蔬菜及园艺害虫, 其除直接刺吸植物韧皮部汁液

进行为害外, 还会传播植物病毒病, 并分泌蜜露诱发煤污病 (Bedford *et al.*, 1994; Navas-Castillo *et al.*, 2011; Bass *et al.*, 2015)。烟粉虱是典型的复合种, 其中 B 型烟粉虱 (MEAM1) 和 Q 型烟粉虱 (MED) 危害最为严重, 特别是 Q 型烟粉虱是全球范围内分布最广泛的生物型 (Horowitz *et al.*, 2003; 潘慧鹏等, 2010; De Barro *et al.*, 2011)。Q 型烟粉虱对杀虫剂产生抗性的速度快且抗性倍数高, 这被认为是许多地区 B 型烟粉虱被 Q 型取代的主要原因 (Zhang *et al.*, 2005; Luo *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2013; Horowitz *et al.*, 2020)。目前烟粉虱的防治主要依赖于化学防治, 随着杀虫剂长期不合理的使用, 烟粉虱长期进化过程中, 表现出较强的农药耐受性, 且耐受性日益增加, 几乎涉及到了整个的化学药剂类, 造成了作物产量下降和管理成本加重的巨大经济损失。

新烟碱类杀虫剂是目前防治烟粉虱最常用的一类杀虫剂之一, 其具有高效、广谱和对环境友好等特点 (Nauen *et al.*, 2008; Horowitz *et al.*, 2020), 但由于长期不合理使用, 导致烟粉虱对新烟碱类农药产生了高水平抗性。新烟碱类杀虫剂的作用机理是靶向抑制昆虫中枢神经系统中的烟碱型乙酰胆碱受体 (Nicotinic acetylcholine receptor, nAChRs), 从而阻断在中枢神经系统信号的正常传递, 最终导致昆虫麻痹进而死亡。近年研究发现, 细胞色素 P450 基因 (特别是 *CYP6CM1*)、谷胱甘肽-S-转移酶 (GSTs)、羧酸酯酶 (CarE) 和 UGTs (Du *et al.*, 2021) 等代谢基因的过表达与烟粉虱对新烟碱类药剂抗性的形成密切相关 (Karunker *et al.*, 2008, 2009; Feng *et al.*, 2010; Ilias *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2020, 2021; 杨峰山等, 2021)。前期对烟粉虱转录组数据进行分析发现 *UGT354A1* 在噻虫嗪抗性 Q 型烟粉虱种群中过量表达, 基于此, 本文以噻虫嗪抗性和敏感 Q 型烟粉虱为研究对象, 利用

RT-PCR 技术对烟粉虱 *UGT354A1* 进行克隆, 利用 qRT-PCR 技术分析并比较该基因在抗性烟粉虱不同部位和不同发育阶段, 以及在噻虫嗪诱导处理前后的抗性烟粉虱种群中的相对表达量, 利用 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术探究沉默该基因前后抗性烟粉虱对噻虫嗪的药剂敏感性变化, 研究结果将有助于更好地理解 UGT 在新烟碱类杀虫剂抗性进化中的作用, 并为烟粉虱的综合治理提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

Q 型烟粉虱噻虫嗪抗性种群 (THQR) 与敏感种群 (THQS) 来自于中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 噻虫嗪敏感种群为抗性种群在室内进行反向汰选得到, 寄主植物均为棉花。温室饲养条件为温度 25 °C, 相对湿度 70%, 光期 14L : 10D。其中噻虫嗪敏感种群长期无药剂接触史; 噻虫嗪抗性种群的抗性倍数约为敏感种群的 41 倍 (Du *et al.*, 2021)。

1.2 供试试剂及仪器

1.2.1 主要试剂 噻虫嗪原药 (95%, 上海源叶生物科技有限公司)、RNA 提取试剂 Trizol (赛默飞世尔科技有限公司)、反转录试剂 PrimeScript®RT reagent Kit(REAL TIME) (宝日医生物技术有限公司)、pEASY-T1 载体 (北京全式金生物技术有限公司) 和 DH5 α 感受态细胞。PCR 引物 (合成自北京擎科新业生物技术有限公司)、荧光定量试剂 SuperReal PreMix Plus(SYBR Green) (北京天根生化科技有限公司) 及 dsRNA 合成试剂盒 T7 RiboMAX Express RNAi system (普洛麦格生物技术有限公司)。其它实验室常用化学试剂 (分析纯) 均为市售。

1.2.2 主要仪器 PCR 仪 (Bio-Rad S1000)、荧光定量 PCR 仪 (ABI7500)、分光光度计 (Thermo Scientific Nanodrop 2000)、超纯水仪 (ZMQ55VOTI Mini Q)、移液器 (Eppendorf) 和高速离心机 (Sigma 3K15)。

1.3 噻虫嗪胁迫处理后烟粉虱不同龄期 and 不同部位样本的收集

不同龄期烟粉虱样品的收集: 收集烟粉虱抗性种群的卵 (每个生物学重复约 2 000 粒)、1-2 龄若虫 (每个生物学重复约 200 头)、3 龄若虫 (每个生物学重复约 100 头)、4 龄若虫 (每个生物学重复约 100 头) 和雌雄成虫 (每个生物学重复约 60 头)。每个样品 4 个生物学重复。

不同部位烟粉虱样品的收集: 在显微镜下解剖虫体, 分别收集成虫的头、胸和腹部 3 个体段。每个生物学重复分别 2 000、300 和 100 头, 每个样品 4 个生物学重复。

噻虫嗪胁迫处理后烟粉虱样本的收集: 对抗性品系 (THQR) (混合性别) 进行 25 mg/L 噻虫嗪处理 3、6 和 12 h 后, 分别采集成虫进行总 RNA 分离和 UGT 表达水平测定。每个样品 4 个生物学重复。

按照上述不同的取样方式, 收集样品, 液氮速冻, 置于 -80 °C 冻存, 备用。

1.4 基因的克隆及序列分析

采用 Trizol 法 (Trizol Reagent, 北京生化科技有限公司) 对烟粉虱样品进行 RNA 提取, 具体方法参照 RNA 提取试剂盒使用说明书。所提取的 RNA 经 Nanodrop2000 (Thermo Fisher, 美国) 检测其完整性、浓度和纯度后, 取 1 μ g 总 RNA 作为模板, 反转录合成 cDNA, 冻存于 -20 °C 备用。

基于烟粉虱基因组数据, 获得 *UGT354A1* 核苷酸序列。利用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性扩增引物 (表 1), 以烟粉虱 cDNA 为模板, 根据 Taq DNA 聚合酶试剂盒的说明书上的操作步骤进行常规 PCR, 反应体系: cDNA 1.0 μ L, Taq 酶 mix 12.5 μ L, Primers-F/R 0.5 mL, ddH₂O 10.5 μ L。PCR 反应程序: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。4 °C 保存。PCR 扩增产物, 经琼脂糖电泳检测后, 将目的条带切胶纯化, 而后连接到克隆载体 pEASY-T1 上, 转染到感受态细胞 *Trans*-T1 中, 蓝白斑筛

表 1 本试验中所用引物
Table 1 Primers used in this study

基因 Gene	引物序列 Primer sequence	用途 Purpose	扩增效率 (%) Amplification efficiency (%)
<i>UGT354A1</i> -F	ATGAAATTGTTGATAATAATCATCACATC	基因克隆 Gene clone	
<i>UGT354A1</i> -R	CGTTTTCTTCTGCTTTGTTTTTG		
<i>UGT354A1</i> -qF	TTGTGGAAATACGAAGATGAGACG	荧光定量 PCR qRT-PCR	91
<i>UGT354A1</i> -qR	CCGTTGTAAAGTGACTCTTGTGTGC		
<i>UGT354A1</i> -dsF	taatacgactcactataggGCGTTGGCTACAGTCTCCTC	dsRNA 合成 RNAi	
<i>UGT354A1</i> -dsR	taatacgactcactataggGAAAGCCGTGAAACCCACTA		
<i>EF-1α</i> -F	TAGCCTTGTGCCAATTTCCG	荧光定量 PCR qRT-PCR	103
<i>EF-1α</i> -R	CCTTCAGCATTACCGTCC		
<i>RPL29</i> -F	TCGGAATATTACCGTGAG	荧光定量 PCR qRT-PCR	101
<i>RPL29</i> -R	GAACCTTGTGATCTACTCCTCTCGTG		

选后,挑取阳性克隆于 LB 液体培养基中,进行菌液 PCR 鉴定,而后将阳性克隆的菌液送到北京擎科生物技术有限公司进行测序,返回的序列与原序列进行比对分析,以获取 *UGT354A1* 基因的 cDNA 全长序列。

1.5 烟粉虱 *UGT354A1* 基因的系统进化分析

将克隆得到的 *UGT354A1* 基因全长序列推导出氨基酸序列,利用 NCBI(National Center for Biotechnology Information)数据库中的 blastp 模块进行氨基酸同源检索比对。从 NCBI 的 Protein 数据库和已发表文献中收集柑橘木虱、茶翅蜡 *Halyomorpha halys* 和赤拟谷盗 3 种昆虫 *UGT354A1* 的氨基酸序列,通过 MEGA 6.0 软件中的 Clustal W 程序对序列进行比对,并去除冗余序列,以获得对齐序列。

选取温室白粉虱 *Trialeurodes vaporariorum* (登录号: QPA18407.1)、柑橘木虱 (登录号: XP_017298417.1)、茶翅蜡 *Halyomorpha halys* (登录号: XP_014278601.2)、赤拟谷盗 (登录号: XP_008190471.1)、桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis* (登录号: XP_011210712.1)、小菜蛾 *Plutella xylostella* (登录号: AUC64290.1) 和蝇蛹金小蜂 *Nasonia vitripennis* (登录号: XP_016840218.1) 7 种昆虫的 *UGT354A1* 氨基酸序列,利用 MEGA 7.0 软件构建 Neighbor-Joining (NJ) 系统发育树。氨基酸替换模型设定为 p-distance, 空位/缺失数据

设定为 pairwise deletion, 自展值设定为 1 000 次。

1.6 烟粉虱 *UGT354A1* 基因表达量分析

依据克隆得到的 *UGT354A1* 基因全长序列,设计筛选特异性引物 *UGT354A1*-qF/qR (表 2), *liyongEF-1 α* 和 *RPL29* 为内参基因 (Yang *et al.*, 2017)。利用 SYBR Green I 染料试剂盒进行 qRT-PCR 来检测 *UGT354A1* 基因在烟粉虱各发育阶段和部位、噻虫嗪抗敏烟粉虱种群及噻虫嗪胁迫下不同时间的相对表达量, qRT-PCR 反应体系 (20 μ L): 2 $\times$ SuperReal PreMix Plus 10 μ L, 正反向引物 (10 μ mol/L) 各 0.6 μ L, cDNA 模板 1.0 μ L, 50 $\times$ ROX Reference Dye 0.4 μ L, RNase-Free ddH₂O 7.4 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 10 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。每个样品设置 3 次技术重复。结果根据目的基因和内参基因的 Ct 值, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法 (Livak and Schmittgen, 2001) 计算 *UGT354A1* 基因和内参基因的相对表达量。

1.7 烟粉虱 *UGT354A1* 基因表达沉默

根据 Yang 等 (2017) 方法, 采用饲喂法对烟粉虱 *UGT354A1* 基因表达进行沉默。使用 T7 RiboMAXTMExpress RNAi 系统 (Promega, WI, USA) 合成 dsRNA, 将 dsRNA 喂给 THQR 品系的成虫。dsRNA 用饲喂液 (5% 酵母提取物和 30% 蔗糖 (wt/vol)) 稀释至 0.5 μ g/ μ L, 注入饲养装置

中。取一个两端开口的圆柱形玻璃管(直径 20 mm×高度 50 mm),用双手将封口膜拉伸成透明薄膜,然后将其覆盖在玻璃管一端,用移液枪取 100 μ L 配制好的 dsRNA 饲喂液滴在封口膜外侧上,其后再将一层拉伸后封口膜覆盖在其上,确保 dsRNA 营养液均匀分布在两层封口膜中间。使烟粉虱从玻璃管的另一开口自然飞入试管,每个试管中放入约 40 头成虫,取完后用封口膜将开口端封住。然后将试管放入温度为 25 $^{\circ}$ C、光周期为 14L:10D 和湿度为 80% 的培养箱(Panasonic MLR-352H, Gunma, Japan)中。取食 48 h 后,收集部分试虫,液氮速冻后,立即提取 RNA,反转录为 cDNA 后,利用 qRT-PCR 分析 *UGT354A1* 基因的干扰效率。以绿色荧光蛋白(*EGFP*)作为对照。采用 RNAi 基因沉默技术对噻虫嗪抗性品系中的 *UGT354A1* 基因表达进行沉默,*UGT354A1* 基因表达沉默后,测定其成虫对噻虫嗪敏感性变化。

参照上述方法,收集用 dsRNA 喂食 48 h 后的成虫,转移到其他试管中进行生物测定。试验

分为 2 个不同浓度(50 mg/L 和 100 mg/L)的噻虫嗪处理组以及 1 组空白对照,观察烟粉虱死亡情况,每 6 h 记录一次成虫死亡率,每组 4 个生物学重复。

1.8 数据分析

所有试验数据均采用 SPSS 21.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) 进行统计分析。在分析之前,死亡率通过反正弦平方根变换进行变换。采用单因素方差分析(One-way ANOVA)分析不同发育阶段(卵、1-2 龄若虫、3 龄若虫、4 龄若虫和雌雄成虫)和不同身体部位(头、胸及腹)的基因相对表达量,平均数采用 Tukey's HSD 进行多重比较。使用 *t*-检验比较处理组和对照组基因表达水平和死亡率。

2 结果与分析

2.1 烟粉虱 *UGT354A1* 基因序列分析

UGT354A1 基因的结构特征如图 1 所示。

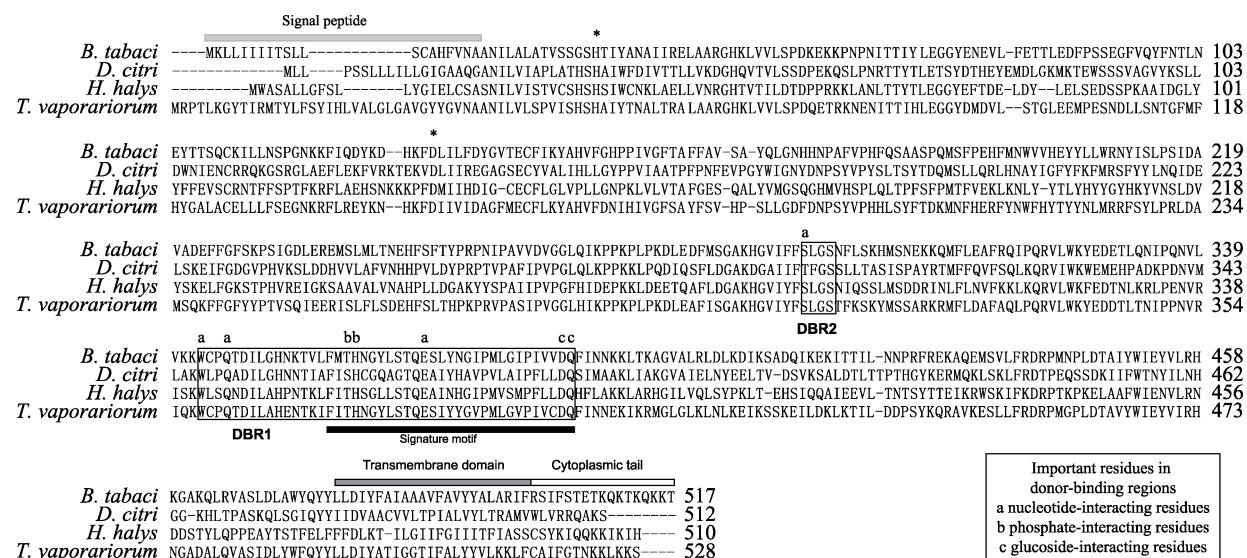


图 1 烟粉虱与其他昆虫 *UGT354A1* 基因的氨基酸序列比对

Fig. 1 Multiple alignment of amino acid sequences of *UGT354A1* in *Bemisia tabaci* and other insect species

灰色上划线为 N 端信号,黑色方框为主要的结构域,灰色和白色分别为 C 端半部分和细胞质尾部的跨膜结构域。* 代表两个重要的催化残基,即 H 和 D。序列下方的黑条表示两个配体结合区域(DBR1 和 DBR2),a, b, c 表示与糖基供体相互作用的几个残基。*B. tabaci*: 烟粉虱; *D. citri*: 柑橘木虱; *H. halys*: 茶翅蝽; *T. vaporariorum*: 温室白粉虱。

The n-terminal signal peptide is underlined in gray. The UGT signature motif is boxed. Gray and white represent the c-terminal half and the cytoplasmic tail transmembrane domains, respectively. * represents two important catalytic residues, namely H and D. The black bars below the sequence represent two donor binding regions (DBR1 and DBR2), and the letters (a, b, c) represent several residues that interact with the sugar donor.

UGT354A1 基因的全长 ORF 序列为 1 554 bp。该基因长度与基因组序列一致, 编码 517 个氨基酸。理论等电点 (pi) 为 8.67, 分子量 (Mw) 为 59.20 ku。序列生物信息分析在 N 端发现了 *UGT354A1* 的信号肽, 在 C 端发现两个疏水跨膜结构域, 包含疏水氨基酸残基。此外, 还预测到了其他重要的氨基酸序列, 包括两个糖基供体 (DBR1 和 DBR2) 和一个保守特征性基序, 属于典型的昆虫 UGT 基因 (图 1)。

2.2 烟粉虱 *UGT354A1* 基因氨基酸序列系统进化树构建

不同昆虫 UGT 蛋白的系统发育关系如图 2 所示。双翅目、半翅目、膜翅目、鳞翅目和鞘翅目的 UGT 蛋白序列在 5 种类群中表现出明显的聚类性。在半翅类 UGTs 分支中, 烟粉虱 UGT 与粉虱科物种温室白粉虱序列聚为一枝, 相似度最高。

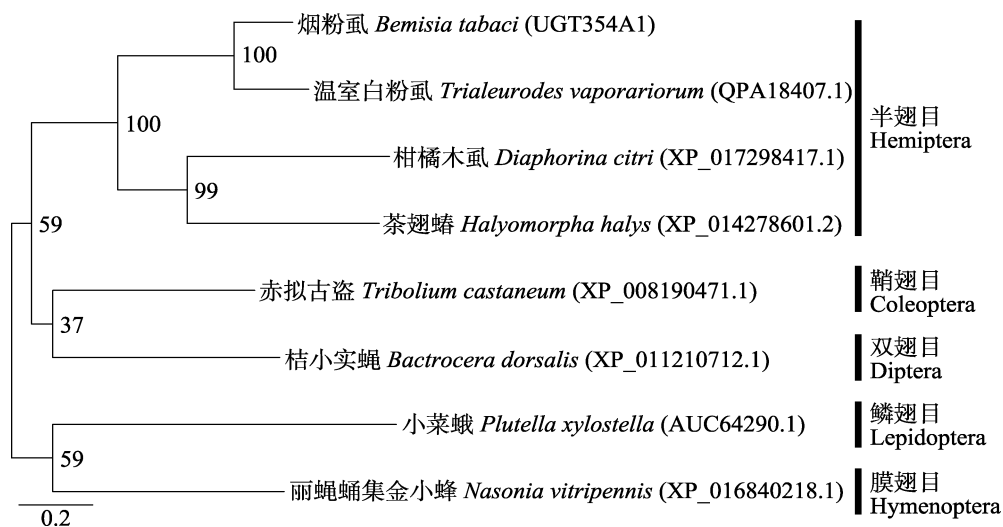


图 2 烟粉虱 *UGT354A1* 基因与其他昆虫的进化关系

Fig. 2 Phylogenetic analysis of *UGT354A1* sequence in *Bemisia tabaci* and other insects

2.3 *UGT354A1* 在烟粉虱中的表达模式

根据荧光定量 PCR 结果分析 *UGT354A1* 在烟粉虱不同发育阶段和部位中的表达情况, *UGT354A1* 在烟粉虱生长发育的各个时期和部位均有表达, 且呈现出不同的表达模式 (图 3: A)。 *UGT354A1* 在卵期和蛹期的表达量随着发育日龄的增加而增加, 整个幼虫期的表达量均显著高于卵期, 且在 4 龄时表达量为最高 ($P<0.001$), 在成虫期中雄成虫的表达量和雌成虫没有差异 ($P>0.05$)。 *UGT354A1* 在烟粉虱成虫的不同部位的相对表达量存在显著差异, 其在头部和胸部表达量分别是腹部的 4.59 倍和 3.99 倍 ($P<0.001$) (图 3: B)。

2.4 噻虫嗪抗敏品系的 *UGT354A1* 表达量分析

荧光定量 PCR 结果分析发现, 与 Q 型烟粉

虱敏感种群 (THQS) 相比, 噻虫嗪抗性种群 (THQR) 的 *UGT354A1* 基因表达显著上调 ($P<0.01$) (图 4: A), 且表达量为敏感种群的 2.57 倍以上。用 25 mg/L 的噻虫嗪对 THQR 种群进行杀虫剂处理, 与对照组相比, 处理后 3、6 和 12 h, *UGT354A1* 的表达量分别增加了 1.27 倍 ($P>0.05$)、1.81 倍 ($P<0.01$) 和 1.80 倍 ($P<0.001$) (图 4: B)。

2.5 烟粉虱 *UGT354A1* 基因沉默对噻虫嗪敏感性的影响

RNAi 试验表明, 与饲喂 dsEGFP 对照处理相比, 饲喂 500 ng/μL dsRNA 处理烟粉虱 48 h 后 *UGT354A1* 的表达量降低了 38.2% ($P<0.001$) (图 5: A)。随后, 将饲喂 *UGT354A1* 的 dsRNA 的烟粉虱处理组用于后续的烟粉虱生物测定。结果显示, 在 50 mg/L 噻虫嗪处理后, ds*UGT354A1*

组在 6 h 的死亡率 (26.6%) 显著高于 *dsEGFP* 组 (15.2%), 12 h 的死亡率 (46.7%) 也显著高于 *dsEGFP* 组 (28.3%) ($P<0.05$) (图 5: B)。

同时, 100 mg/L 噻虫嗪处理 12 h 时, 与 *dsEGFP* 组相比, 成虫死亡率极显著升高 30.8% ($P<0.001$) (图 5: C)。

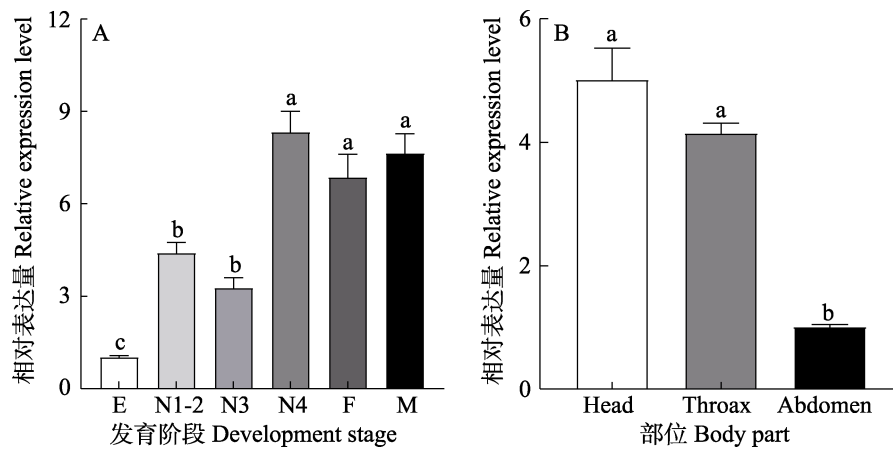


图 3 *UGT354A1* 基因在噻虫嗪抗性烟粉虱不同发育阶段 (A) 和不同部位 (B) 的相对表达量比较
Fig. 3 Comparison of relative expression level of *UGT354A1* among different development stages (A) and among different body parts (B) of thiamethoxam-resistant *Bemisia tabaci*

E: 卵; N1-2: 1-2 龄若虫; N3: 3 龄若虫; N4: 4 龄若虫; F: 雌成虫; M: 雄成虫;
Head: 头; Throat: 胸; Abdomen: 腹。

图中数据为平均值±标准差, 柱上标有不同小写字母表示 *UGT354A1* 表达差异显著 ($P<0.05$, Tukey 检验法)。

E: Eggs; N1-2: First- and second-instar nymph; N3: Third-instar nymph; N4: Fourth-instar nymph; F: Female adult; M: Male adult. Data are mean±SD, and histograms with different lowercase letters indicate significant differences expression of *UGT354A1* at the 0.05 level by Tukey test.

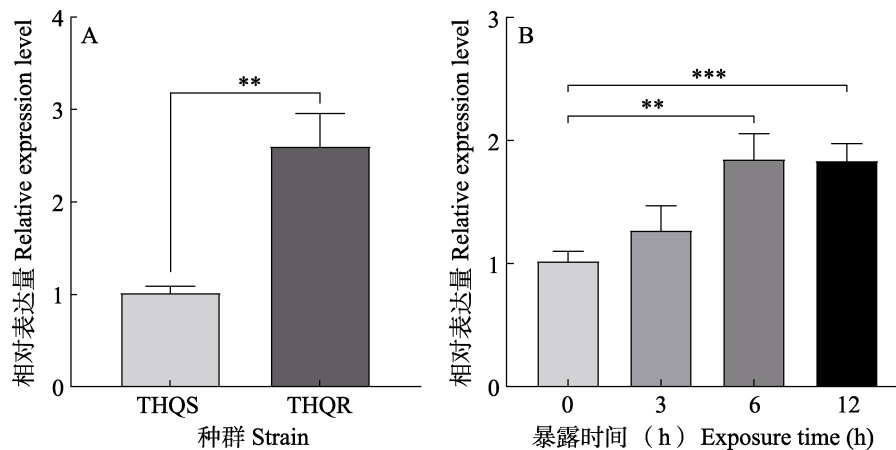


图 4 *UGT354A1* 基因在噻虫嗪抗 (THQR) 敏 (THQS) 种群中的在相对表达量比较 (A) 及其被噻虫嗪诱导后的相对表达量分析 (B)

Fig. 4 Comparison of relative expression level of *UGT354A1* between thiamethoxam-resistant (THQR) and thiamethoxam-susceptible (THQS) *Bemisia tabaci* strain (A) and analysis of the expression level variation of *UGT354A1* in thiamethoxam-induction (B)

数据为平均数±标准误差; **表示差异显著, $P<0.01$; ***表示差异极显著, $P<0.001$ 。下图同。

Values are mean±SE; **represents significant differences at the 0.01 probability level ($P<0.01$), ***represents extremely significant differences at the 0.001 probability level ($P<0.001$). The same below.

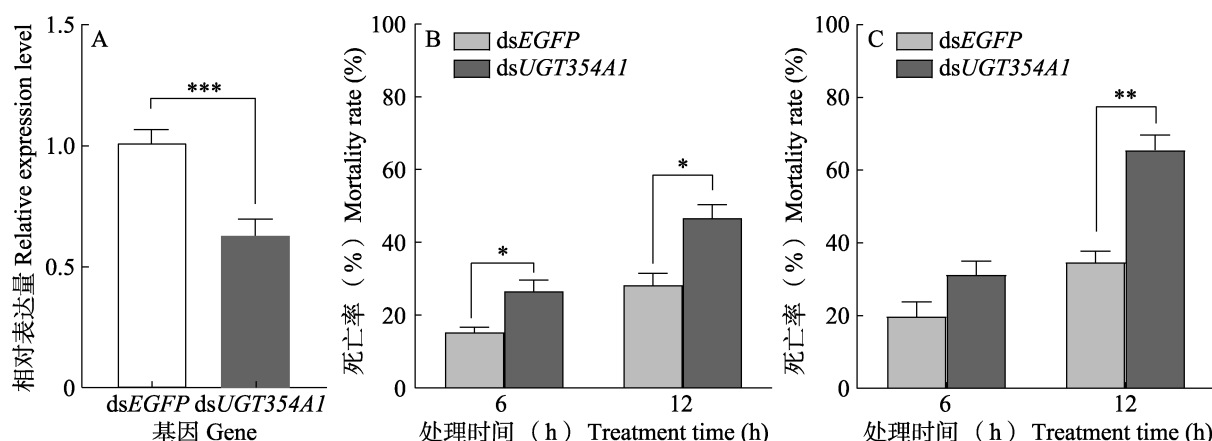


图 5 RNAi 对烟粉虱 *UGT354A1* 基因的相对表达量 (A) 和饲喂浓度为 50 mg/L (B) 及 100 mg/L (C) 的噻虫嗪抗性烟粉虱对噻虫嗪敏感性的影响

Fig. 5 Effect of RNAi on the relative expression level of *UGT354A1* (A) and the sensitivity of *Bemisia tabaci* MED to thiamethoxam in 100 mg/L (B) and 200 mg/L (C)

3 讨论

植食性昆虫可利用各种代谢解毒机制来保护自己免受外源性化合物的可能毒性 (Heidel-Fischer and Vogel, 2015)。其中, 害虫对农药的代谢抗性机制的研究大都集中在对 I 期代谢酶的研究上, 而对 UDP-糖基转移酶 (UGTs) 等 II 期代谢酶抗性机制的研究相对较少 (Li *et al.*, 2017; Pan *et al.*, 2018)。本研究克隆获得了烟粉虱 *UGT354A1* 基因的 cDNA 全长, 经序列相似性比对, 发现了两个重要的功能基序, 包括 N 端昔元底物结合域和 C 端 UDP 糖供体结合域。同时具有两个糖基供体结合位点 (DBR1 和 DBR2, 糖基供体和催化残基相互作用的重要残基)。在 N 端有信号肽序列, 在 C 端有疏水跨膜结构域。结果表明, 烟粉虱 *UGT354A1* 与其他昆虫 UGT 高度同源, 与同科物种温室白粉虱更相近。

在本研究中, 与相对敏感品系相比, 烟粉虱抗性品系 (THQR) 中 *UGT354A1* 显著过表达, 药剂诱导实验显示, 烟粉虱 *UGT354A1* 基因的表达量随着接触噻虫嗪时间的增加而增加。已有研究表明, UGTs 基因的过表达参与解毒抗性, Li 等 (2017) 发现, 抗性基因 *UGT2B17* 在小菜蛾氯虫苯甲酰胺抗性品系中的表达量明显高于敏感品系。Tian 等 (2019) 发现柑橘木虱的 14 个

UGT 基因在吡虫啉抗性种群中显著高表达。同样, 甜菜夜蛾经高效氯氟氰菊酯和氯虫苯甲酰胺等杀虫剂处理后, 其 UGT 基因能够被诱导, 表达水平均显著升高 (Hu *et al.*, 2017)。Pan 等 (2018) 发现 27 个 UGT 基因中有 22 个基因在噻虫嗪抗性棉蚜中明显上调, 部分上调的 UGT 基因参与了噻虫嗪的解毒。作为同种杀虫剂, 烟粉虱 *UGT354A1* 基因属于 *UGT354* 家族基因, 与蚜虫存在差异, 推测 UGT 基因在物种间对噻虫嗪杀虫剂的代谢具有特异性。另外, 烟粉虱体内 *UGT354A1* 基因相对表达量随着接触噻虫嗪时间的增加而逐渐升高, 表明该基因存在对噻虫嗪的响应机制。Guo 等 (2020) 在烟粉虱 MEAM1 基因组中鉴定了 76 个 UGT 基因, 其中包含 *UGT354* 家族基因。研究发现当通过饲喂 dsRNA 分别沉默 *UGT352A1*、*UGT352B1* 和 *UGT354A1* 时, B 型烟粉虱 (MEAM1) 的繁殖力降低, 推测这 3 个 UGT 基因可能参与烟粉虱的生殖调控。在本研究中, *UGT354A1* 在若虫期和成虫期中的表达量均高于卵期, 尤其在成虫期高表达, 推测该基因的表达模式可能与其取食量相关, *UGT354A1* 基因的高表达有助于噻虫嗪的代谢。此外, *UGT354A1* 基因在雌成虫高表达, 依据 Guo 等 (2020) 实验结果, 推测其可能参与 Q 型烟粉虱的生殖调控。*UGT354A1* 在烟粉虱成虫头部和胸部表达量显著高于腹部, 表明该基因可

能主要于头部和胸部发挥作用,这可能更有利于烟粉虱参与对噻虫嗪的解毒代谢。

为了确认 *UGT354A1* 基因在噻虫嗪抗药性中的功能,本文利用 RNAi 技术干扰降低抗性种群中的 *UGT354A1* 的基因表达,结果显示,*UGT354A1* 基因的表达丰度被显著下调,噻虫嗪对烟粉虱的致死率显著提高,烟粉虱对噻虫嗪敏感度显著上升,表明 *UGT354A1* 基因参与了烟粉虱对噻虫嗪抗性的产生。在其它昆虫抗药性研究中,也发现了类似的结果。例如, RNAi 下调柑橘木虱的 *UGT375A1*、*UGT383A1*、*UGT383B1* 和 *UGT384A1* 基因,显著增加了吡虫啉对柑橘木虱抗性群体的毒性 (Tian *et al.*, 2019)。在氯虫苯甲酰胺抗性二化螟种群中注射 dsRNA 可显著降低 *CsUGT40A1* 和 *CsUGT33AG3* 基因的表达,导致二化螟幼虫在氯虫苯甲酰胺处理后死亡率更高 (Zhao *et al.*, 2019)。同样, RNAi 抑制 *UGT344B4* 或 *UGT344C7* 基因的表达显著增加了抗性棉蚜种群对联苯菊酯的敏感性和对磺胺嘧啶的敏感性 (Chen *et al.*, 2020)。沉默赤拟谷盗 *UGT2B7* 和 *UGT2C1* 基因后,敏感和抗性种群的死亡率分别增加 30.7%-37.3% 和 24.0%-33.3% (杜文蔚等, 2021)。因此, *UGT354A1* 基因的过表达在烟粉虱对噻虫嗪的抗性中发挥了作用,进而推测昆虫 UGT 的代谢抗性机制可能是由抗性种群中 UGT 基因的过表达所介导的。

前期研究表明,细胞色素 P450,特别是 *CYP6CM1* 能够调控对新烟碱类药剂的解毒作用 (Yang *et al.*, 2020)。且大量关于烟粉虱噻虫嗪抗性的研究结果表明,烟粉虱对噻虫嗪的抗性形成机制复杂,田间种群抗性形成策略多样 (Horowitz *et al.*, 2020)。本研究明确了 *UGT354A1* 可能参与烟粉虱对噻虫嗪的抗药性,其在杀虫剂抗性中的作用机制仍有待于进一步研究。

参考文献 (References)

- Ahn SJ, Vogel H, Heckel DG, 2012. Comparative analysis of the UDP-glycosyltransferase multigene family in insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 42: 133–147.
- Bass C, Denholm I, Williamson MS, Nauen R, 2015. The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 121: 78–87.
- Bedford ID, Briddon RW, Brown JK, Rosell RC, Markham PG, 1994. Geminivirus transmission and biological characterisation of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographic regions. *Annals of Applied Biology*, 125: 311–325.
- Bock KW, 2016. The UDP-glycosyltransferase (UGT) superfamily expressed in humans, insects and plants: Animal-plant arms-race and co-evolution. *Biochem. Pharmacol.*, 99: 11–17.
- Bozzolan F, Siaussat D, Maria A, Durand N, Maïbèche-Coisne M, 2015. Antennal uridine diphosphate (udp)-glycosyltransferases in a pest insect: Diversity and putative function in odorant and xenobiotics clearance. *Insect Molecular Biology*, 23: 539–546.
- Bull DL, Whitten CJ, 1972. Factors influencing organophosphorus insecticide resistance in tobacco budworms. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 20: 561–564.
- Chen XW, Tang CY, Ma KS, Xia J, Song DL, Gao XW, 2020. Overexpression of UDP-glycosyltransferase potentially involved in insecticide resistance in *Aphis gossypii* Glover collected from Bt cotton fields in China. *Pest Management Science*, 76: 1371–1377.
- De Barro PJ, Liu SS, Boykin LM, Dinsdale AB, 2011. *Bemisia tabaci*: A statement of species status. *Annu. Rev. Entomol.*, 56: 1–19.
- Du TH, Fu BL, Wei XG, Yin C, Yang J, Huang MJ, Liang JJ, Gong PP, Liu SN, Xue H, Hu JY, Diao YC, Gui LY, Yang X, Zhang YJ, 2021. Knockdown of *UGT352A5* decreases the thiamethoxam resistance in *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Gennadius). *International Journal of Biological Macromolecules*, 186: 100–108.
- Du WW, Chen EH, Wang KX, Song W, Tang PA, 2021. Resistance between UDP-glucosyltransferase genes *UGT2B7* and *UGT2C1* and tribolium castaneum phosphine. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 36(4): 120–126. [杜文蔚, 陈二虎, 王康旭, 宋伟, 唐培安, 2021. 尿苷二磷酸-葡萄糖醛酸转移酶基因 *UGT2B7* 和 *UGT2C1* 与赤拟谷盗磷化氢抗性关系研究. 中国粮油学报, 36(4): 120–126.]
- Fan D, Wang JW, Si XY, Guo Q, Zhou LH, 2021. Sequence analysis of *UGT33J12* from *Mythimna separata* UGTs and its response to two insecticides. *Journal of Northeast Agricultural University*, 52(4): 20–28. [樊东, 王继伟, 司修洋, 郭奇, 周礼厚, 2021. 黏虫 UDP-葡萄糖基转移酶 *UGT33J12* 基因序列分析及对两种杀虫剂的响应. 东北农业大学学报, 52(4): 20–28.]
- Feng YT, Wu QJ, Wang SL, Chang XL, Xie W, Xu BY, Zhang Y, 2010. Cross-resistance study and biochemical mechanisms of thiamethoxam resistance in B-biotype *Bemisia tabaci* (Hemiptera:

- Aleyrodidae). *Pest Management Science*, 66: 313–318.
- Guo LT, Xie W, Yang ZZ, Xu JP, Zhang YJ, 2020. Genome-wide identification and expression analysis of UDP-glucuronosyl transferases in the whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22): 8492.
- Heckel DG, 2014. Insect detoxification and sequestration strategies. *Annual Plant Reviews*, 47: 77–114.
- Heidel-Fischer HM, Vogel H, 2015. Molecular mechanisms of insect adaptation to plant secondary compounds. *Current Opinion in Insect Science*, 8: 8–14.
- Hopkins TL, Kramer KJ, 1992. Insect cuticle sclerotization. *Annual Review of Entomology*, 37: 273–302.
- Horowitz AR, Denholm I, Gorman K, Cenis JL, Kontsedalov S, Ishaaya I, 2003. Biotype Q of *Bemisia tabaci* identified in Israel. *Phytoparasitica*, 31(1): 94–98.
- Horowitz AR, Ghanim M, Roditakis E, Nauen R, Ishaaya I, 2020. Insecticide resistance and its management in *Bemisia tabaci* species. *Journal of Pest Science*, 93: 893–910.
- Hu B, Zhang SH, Ren MM, Tian XR, Wei Q, Mburu DK, Su JY, 2017. The expression of *spodoptera exigua* P450 and UGT genes: Tissue specificity and response to insecticides. *Insect Science*, 26(2): 199–216.
- Ilias A, Lagnel J, Kapantaidaki DE, Roditakis E, Tsigenopoulos CS, Vontas J, 2015. Transcription analysis of neonicotinoid resistance in Mediterranean (MED) populations of *B. tabaci* reveal novel cytochrome P450s, but no nAChR mutations associated with the phenotype. *BMC Genomics*, 16: 939.
- Jancova P, Anzenbacher P, Anzenbacherova E, 2010. Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc. Czech. Repub.*, 154: 103–116.
- Kaplanoglu E, Chapman P, Scott IM, Donly C, 2017. Overexpression of a cytochrome P450 and a UDP-glycosyltransferase is associated with imidacloprid resistance in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Scientific Reports*, 7: 1762.
- Karunker I, Benting J, Lueke B, Ponge T, Nauen R, Roditakis E, Vontas J, Gorman K, Denholm I, Morin S, 2008. Over-expression of cytochrome P450 *CYP6CM1* is associated with high resistance to imidacloprid in the B and Q biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, 38: 634–644.
- Karunker I, Morou E, Nikou D, Nauen R, Sertchook R, Stevenson BJ, Paine MJI, Morin S, Vontas J, 2009. Structural model and functional characterization of the *Bemisia tabaci* *CYP6CM1vQ*, a cytochrome P450 associated with high levels of imidacloprid resistance. *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, 39: 697–706.
- Lee SW, Ohta K, Tashiro S, Shono T, 2006. Metabolic resistance mechanisms of the housefly (*Musca domestica*) resistant to pyraclofos. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 85: 76–83.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, 25: 402–408.
- Li XX, Zhu B, Gao XW, Liang P, 2017. Over-expression of UDP-glycosyltransferase gene *UGT2B17* is involved in chlorantraniliprole resistance in *Plutella xylostella* (L.). *Pest Management Science*, 73: 1402–1409.
- Luo C, Jones CM, Devine G, Zhang F, Denholm I, Gorman K, 2010. Insecticide resistance in *Bemisia tabaci* biotype Q (Hemiptera: Aleyrodidae) from China. *Crop Protection*, 29: 429–434.
- Mackenzie PI, Bock KW, Burchell B, Guillemette C, Nebert DW, 2005. Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily. *Pharmacogenetics & Genomics*, 15(10): 677–685.
- Meech R, Miners JO, Lewis BC and Mackenzie PI, 2012. The glycosidation of xenobiotics and endogenous compounds: Versatility and redundancy in the UDP glycosyltransferase superfamily. *Pharmacology & Therapeutics*, 134: 200–218.
- Nauen R, Jeschke P and Copping L, 2008. In focus: Neonicotinoid insecticides. *Pest Management Science*, 64: 1081–1081.
- Navas-Castillo J, Fiallo-Olivé E, Sánchez-Campos S, 2011. Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. *Annual Review of Phytopathology*, 49: 219–248.
- Pan YO, Tian FY, Wei X, Wu YW, Gao XW, Xi J, Shang QL, 2018. Thiamethoxam resistance in *Aphis gossypii* Glover relies on multiple UDP-glucuronosyltransferases. *Frontiers in Physiology*, 9: 322.
- Pan HP, Ge DQ, Wang SL, Wu QJ, Xu BY, Xie W, Zhang YJ, 2010. Replacement of B biotype *Bemisia tabaci* by Q biotype *B. tabaci* in some areas of Beijing and Hebei. *Plant Protection*, 36(6): 40–44. [潘慧鹏, 戈大庆, 王少丽, 吴青君, 徐宝云, 谢文, 张友军, 2010. 在北京和河北局部地区 Q 型烟粉虱取代了 B 型烟粉虱. 植物保护, 36(6): 40–44.]
- Su Q, Li SX, Shi CH, Zhang JM, Zhang GH, Jin ZY, Li CR, Wang WK, Zhang YJ, 2018. Implication of heat-shock protein 70 and UDP-glucuronosyltransferase in thiamethoxam-induced whitefly *Bemisia tabaci* thermotolerance. *Journal of Pest Science*, 91: 469–478.
- Tao XY, Xue XY, Huang YP, Chen XY, Mao YB, 2012. Gossypol-enhanced P450 gene pool contributes to cotton bollworm tolerance to a pyrethroid insecticide. *Molecular*

- Ecology*, 21: 4371–4385.
- Tian FJ, Wang ZB, Li CF, Liu JL, Zeng XN, 2019. UDP-glycosyltransferases are involved in imidacloprid resistance in the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Lividae). *Pesticide Biochemistry & Physiology*, 154: 23–31.
- Wang MY, Liu XY, Li S, Liu JL, Shen GM, Zhang P, Lu WC, He L, 2018. Functional analysis of *UGT201D3* associated with abamectin resistance in *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval). *Insect Science*, 27(2): 276–291.
- Wang Q, Hasan G, Pikielny CW, 1999. Preferential expression of biotransformation enzymes in the olfactory organs of *Drosophila melanogaster*, the antennae. *Journal of Biological Chemistry*, 274(15): 10309–10315.
- Yang NN, Xie W, Yang X, Wang SL, Wu QJ, Li RM, Pan HP, Liu BM, Shi XB, Fang Y, Xu BY, Zhou XG, Zhang YJ, 2013. Transcriptomic and proteomic responses of sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*, to thiamethoxam. *PLoS ONE*, 8(5): e61820.
- Yang FS, Yin C, Yang J, Wei XG, Du TH, Yang X, Wang SL, Zhang YJ, 2021. Cloning and expression profiles of cytochrome P450 *CYP6DV5* in *Bemisia tabaci* and its role in resistance of *B. tabaci* to thiamethoxam. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 23(1): 83–89. [杨峰山, 殷城, 杨静, 危学高, 杜田华, 杨鑫, 王少丽, 张友军, 2021. Q 型烟粉虱细胞色素 P450 *CYP6DV5* 基因克隆及其在烟粉虱对噻虫嗪抗性中的作用. 农药学报, 23(1): 83–89.]
- Yang X, Deng S, Wei XG, Yang J, 2020. MAPK-directed activation of the whitefly transcription factor CREB leads to P450-mediated imidacloprid resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(19): 201913603.
- Yang X, Xie W, Li RM, Zhou XM, Wang SL, Wu QJ, Yang NN, Xia JX, Yang ZZ, Guo LT, Ya TL, Zhang YJ, 2017. RNA interference-mediated knockdown of the hydroxyacid-oxoacid transhydrogenase gene decreases thiamethoxam resistance in adults of the whitefly *Bemisia tabaci*. *Scientific Reports*, 7: 41201.
- Yang X, Wei X, Yang J, Du TH, Yin C, Fu BL, Huang MJ, Liang JJ, Gong PP, Liu SN, Xie W, Guo ZJ, Wang SL, Wu QJ, Nauen R, Zhou XG, Bass C, Zhang YJ, 2021. Epitranscriptomic regulation of insecticide resistance. *Science Advances*, 7: eabe5903.
- Zhang LP, Zhang YJ, Zhang WJ, Wu QJ, Xu BY, Chu D, 2005. Analysis of genetic diversity among different geographical populations and determination of biotypes of *Bemisia tabaci* in China. *Journal of Applied Entomology*, 129(3): 121–128.
- Zhao J, Xu L, Sun Y, Song PP, Han ZJ, 2019. UDP-glycosyltransferase genes in the striped rice stem borer, *Chilo suppressalis* (Walker), and their contribution to chlorantraniliprole resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(5): 1064.
- Zhou Y, Fu WB, Si FL, Yan ZT, Zhang YJ, He QY, Chen B, 2019. UDP-glycosyltransferase genes and their association and mutations associated with pyrethroid resistance in *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae). *Malaria Journal*, 18: 62.