北京林业大学学报
JOURNAL OF BEIJING FORESTRY UNIVERSITY

美国白蛾RyR对氯虫苯甲酰胺胁迫响应及分子对接分析

张承志 范程程 孙丽丽 曹传旺

Stress response and molecular docking analysis of ryanodine receptor (RyR) in *Hyphantria cunea* to chlorantraniliprole

Zhang Chengzhi, Fan Chengcheng, Sun Lili, Cao Chuanwang

引用本文:
张承志, 范程程, 孙丽丽, 曹传旺. 美国白蛾RyR对氯虫苯甲酰胺胁迫响应及分子对接分析[J]. 北京林业大学学报, 2024, 46(10):90–99. doi: 10.12171/j.1000–1522.20230275
Zhang Chengzhi, Fan Chengcheng, Sun Lili, Cao Chuanwang. Stress response and molecular docking analysis of ryanodine receptor (RyR) in *Hyphantria cunea* to chlorantraniliprole[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2024, 46(10):90–99. doi: 10.12171/j.1000–1522.20230275

在线阅读 View online: https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20230275

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

响应槲皮素诱导的美国白蛾GST基因鉴定及表达分析

Identification and expression analysis of GST genes in response to quercetin induction in *Hyphantria cunea*

北京林业大学学报, 2023, 45(11): 110–118. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20220181

蜡对美国白蛾的捕食行为观察和捕食能力评价

Observation of predation behavior and evaluation on predation capacity of *Arma chinensis* against *Hyphantria cunea*

北京林业大学学报, 2022, 44(1): 94–102. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20200299

舞毒蛾*LdOR2*基因克隆及对CO_2胁迫下的行为反应

Cloning of *LdOR2* gene in *Lymantria dispar* and its behavioral response to CO_2 stress

北京林业大学学报, 2021, 43(9): 101–110. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20210184

枣*CML*基因的分子特征及其抗寒性表达模式分析

Molecular characteristics of *CML* genes in Chinese jujube and their expression patterns in resistance to cold stress

北京林业大学学报, 2023, 45(3): 58–67. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20210334

杨树*HSF*家族基因生物信息学与胁迫应答表达分析

Bioinformatics and stress response expression analysis of poplar *HSF* family genes

北京林业大学学报, 2021, 43(2): 34–45. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20200159

木毒蛾氨肽酶N1基因克隆与表达分析

Cloning and expression analysis of *APN*1 gene from *Lymantria xylina*

北京林业大学学报, 2021, 43(9): 94–100. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20210186

DOI:10.12171/j.1000−1522.20230275

美国白蛾 RyR 对氯虫苯甲酰胺胁迫响应及分子对接分析

张承志 范程程 孙丽丽 曹传旺
（东北林业大学林学院，森林生态系统可持续经营教育部重点实验室，黑龙江 哈尔滨 150040）

摘要:【目的】阐明美国白蛾鱼尼丁受体（RyR）如何参与氯虫苯甲酰胺对美国白蛾的毒杀作用，并探究 RyR 与氯虫苯甲酰胺的分子对接模式，以期揭示美国白蛾 *RyR* 基因响应氯虫苯甲酰胺胁迫的分子机制。**【方法】**克隆获得美国白蛾 *RyR* 基因的完整 cDNA 序列，采用实时荧光定量 RT-PCR 技术分析 *RyR* 基因的时空表达模式以及在亚致死质量浓度氯虫苯甲酰胺胁迫下美国白蛾 *RyR* 基因的表达水平。通过 RNAi 技术沉默美国白蛾 *RyR* 基因，进而测定沉默体在氯虫苯甲酰胺胁迫下的存活率，探讨美国白蛾 *RyR* 基因对氯虫苯甲酰胺抗性的调控作用。利用 Discovery Studio 2019 Client 软件对氯虫苯甲酰胺与 RyR 受体进行分子对接，并通过结合能和可视化分析对接情况。**【结果】**（1）氯虫苯甲酰胺对美国白蛾 3 龄幼虫 72 h 的致死中质量浓度（LC_{50}）和亚致死质量浓度（LC_{30}）分别为 21.40、11.13 μg/L，显示出较高的生物活性。（2）在氯虫苯甲酰胺 LC_{30} 质量浓度（11.13 μg/L）处理下，美国白蛾 3 龄幼虫 *RyR* 基因的相对表达量随处理时间的延长表现为先升高后降低，处理 48 和 72 h 分别为对照组的 2.6 倍和 1.5 倍。（3）*HcRyR* 基因沉默体在氯虫苯甲酰胺 LC_{30} 胁迫下 72 h 时存活率为 73.33%，显著高于对照组的 46.66%，表明沉默 *RyR* 基因显著降低了美国白蛾 3 龄幼虫对氯虫苯甲酰胺的敏感性。（4）分子对接结果表明 RyR 与氯虫苯甲酰胺的结合能为−31.35 kJ/mol，两者间存在氢键与范德华力使其稳定结合。**【结论】**明确美国白蛾 *RyR* 基因对氯虫苯甲酰胺胁迫响应分子机制，为进一步认识美国白蛾 *RyR* 结构，并为靶向杀虫剂开发提供理论依据。

关键词：美国白蛾；鱼尼丁受体；氯虫苯甲酰胺；基因表达；RNAi；分子对接
中图分类号：S763.3 **文献标志码：**A **文章编号：**1000−1522(2024)10−0090−10
引文格式：张承志，范程程，孙丽丽，等. 美国白蛾 RyR 对氯虫苯甲酰胺胁迫响应及分子对接分析［J］. 北京林业大学学报，2024，46(10)：90−99. Zhang Chengzhi, Fan Chengcheng, Sun Lili, et al. Stress response and molecular docking analysis of ryanodine receptor (RyR) in *Hyphantria cunea* to chlorantraniliprole［J］. Journal of Beijing Forestry University, 2024, 46(10): 90−99.

Stress response and molecular docking analysis of ryanodine receptor (RyR) in *Hyphantria cunea* to chlorantraniliprole

Zhang Chengzhi Fan Chengcheng Sun Lili Cao Chuanwang
(College of Forestry, Key Laboratory of Sustainable Forest Ecosystem Management of Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China)

Abstract: ［**Objective**］ The ryanodine receptor (RyR) of *Hyphantria cunea* was involved in the toxic mechanism of chlorantraniliprole to *Hyphantria cunea*, and the molecular docking mode of RyR and chlorantraniliprole was explored. The study provided a theoretical basis for analyzing the molecular mechanism of *RyR* gene of *Hyphantria cunea* in response to chlorantraniliprole stress. ［**Method**］ The full-length cDNA of *RyR* gene was cloned from *Hyphantria cunea*. The temporal and spatial expression patterns

收稿日期: 2023−10−17 **修回日期:** 2024−03−18
基金项目: 国家重点研发计划（2021YFD1400300），国家自然科学基金项目（32071772）。
第一作者: 张承志。主要研究方向：昆虫生理生化与分子毒理学。Email: 893669400@qq.com 地址：150040 黑龙江省哈尔滨市和兴路 26 号东北林业大学林学院。
责任作者: 曹传旺，教授。主要研究方向：昆虫生理生化与分子毒理学。Email: chuanwangcao@nefu.edu.cn 地址：同上。
本刊网址: http://j.bjfu.edu.cn；http://journal.bjfu.edu.cn

of *RyR* gene and the expression level of *RyR* gene in *Hyphantria cunea* under sublethal concentration of chlorantraniliprole stress were analyzed by real-time fluorescence quantitative RT-PCR. The *RyR* gene of *Hyphantria cunea* was silenced by RNAi technology, and the survival rate of silencer under chlorantraniliprole stress was determined to explore the regulation of *RyR* gene of *Hyphantria cunea* on chlorantraniliprole resistance. The molecular docking of chlorantraniliprole and RyR was analyzed by Discovery Studio 2019 Client software. The docking situation was analyzed by binding energy and visualization. [**Result**] (1) The median lethal concentration (LC_{50}) and sub-lethal concentration (LC_{30}) of chlorantraniliprole were 21.40 μg/L and 11.13 μg/L for 72 h, respectively, indicating that chlorantraniliprole had high biological activity against the 3rd instar *Hyphantria cunea* larvae. (2) The relative expression of *RyR* gene in the 3rd instar *Hyphantria cunea* larvae increased firstly and then decreased with time under the treatment of chlorantraniliprole LC_{30} concentration (11.13 μg/L). The relative expression of *RyR* gene in 48 h and 72 h was 2.6- and 1.5-fold of that in control group, respectively. (3) The survival rate of *Hyphantria cunea* with *RyR* gene silencing was 73.33%, while that of control group with GFP gene silencing was 46.66% under LC_{30} stress of chlorantraniliprole at 72 h. Silencing *RyR* gene significantly reduced the sensitivity of 3rd instar *Hyphantria cunea* larvae to chlorantraniliprole. (4) Molecular docking showed that the binding energy of RyR and chlorantraniliprole was −31.35 kJ/mol, and there were hydrogen bonds and van der Waals force between them to make them stable. [**Conclusion**] These results clarify the molecular mechanism of *RyR* gene in response to chlorantraniliprole stress, and further understand the structure of RyR in *Hyphantria cunea* and provide a theoretical basis for the development of targeted insecticides.

Key words: *Hyphantria cunea*; ryanodine receptor (RyR); chlorantraniliprole; gene expression; RNAi; molecular docking

美国白蛾(*Hyphantria cunea*)是一种世界性检疫害虫，近年来对农林牧业造成了严重危害[1]。化学防治作为控制美国白蛾的主要手段，具有操作简便、防治迅速、效果显著等特点，是快速抑制其种群数量、减轻危害的重要方法，极大地减少了美国白蛾的扩散[2−3]。氯虫苯甲酰胺属于邻甲酰胺基苯甲酰胺类杀虫剂，它不仅对幼虫有持久的作用效果，而且具有杀卵活性，是用于鳞翅目(Lepidoptera)害虫防治的常用且效果显著的杀虫剂之一[4−7]。该杀虫剂以昆虫体内鱼尼丁受体(ryanodine receptor，RyR)为作用靶标，引起昆虫体内钙离子大量释放，导致昆虫肌肉非正常收缩、抽搐以及死亡[8]。RyR 是目前已知最大的离子通道蛋白之一，由 4 个相同亚基组成的钙离子通道蛋白，每个亚基约由 5 000 个氨基酸组成，主要分布于细胞的内质网和肌肉的肌质网表面，属于一类配体门控的钙离子释放通道，控制细胞内钙离子的释放[9−13]。鱼尼丁受体作为新型作用靶标的研究受到了广泛关注[14−16]。李康等[17]研究发现，双酰胺类杀虫剂通过作用于草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)机体中的 RyR，当杀虫剂进入昆虫体内并刺激 RyR 时，昆虫体腔中的钙离子被无限释放，细胞内外钙离子浓度失衡，引起神经肌肉调节功能衰弱，致使昆虫不自主地抽搐进而死亡。王少丽等[18]研究发现，甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)对氯虫苯甲酰胺的抗药性表现在幼虫阶段，且 *RyR* 基因的表达量变化与氯虫苯甲酰胺诱导有关。孙丽娜等[19]在对比氯虫苯甲酰胺抗性和敏感品系小菜蛾(*Plutella xylostella*)的研究中发现，抗性品系体内 *RyR* 基因表达量为敏感品系的 5.79 倍。刘亚萍[20]通过 RNAi 沉默赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*)体内 *RyR* 基因，发现其在后翅折叠及行动能力中发挥重要的调控作用。这些研究表明，*RyR* 基因已被证实是鳞翅目、双翅目等代表性昆虫中二酰胺类杀虫剂的作用靶标[8]，在昆虫的生长发育与对双酰胺类杀虫剂抗性调控中发挥重要作用。

分子对接是一种模拟蛋白质及配体间相互作用模式的方法，基于化合物几何结构匹配的锁钥学说和蛋白–配体识别过程的诱导契合学说，具有快速且成本低廉的优势[21]。具体内容包括蛋白质 3D 建模、配体小分子构象搜寻、二者结合位点的识别及对接结果的评估，它能够准确模拟蛋白质与小分子复合物的空间构型，常用于模拟昆虫蛋白与小分子化合物的结合，在昆虫代谢杀虫剂分子机制研究中发挥着重要作用[22−25]。然而，体外检测法、荧光竞争法等方法过于耗时且价格高昂，不能在短时间内分析大量蛋白与小分子对接结果[26−27]。杨耀[28]通过分析 3 种昆虫 RyR 的 3 个结合位点及结合自由能，发现白背飞虱(*Sogatella furcifera*)和马铃薯甲虫

(*Leptinrotarsa decemlineata*)RyR 的结合能力低于靶标昆虫烟青虫(*Helicoverpa assulta*)。高晓进等[29]通过分子对接发现花椒窄吉丁(*Agrilus zanthoxylumi*)感受蛋白 AzanCSP7 与其寄主挥发物可巴烯有较好的亲和力，表明 AzanCSP7 参与识别寄主挥发物的过程。分子对接技术已在多种昆虫中进行了分析研究，对筛选与验证新型绿色杀虫剂具有重要功能[23]。

研究表明氯虫苯甲酰胺对鳞翅目害虫具有显著的防治效果。此外，许多昆虫的 *RyR* 基因已被成功克隆[30]。然而，目前尚未有关于美国白蛾 *RyR* 基因在胁迫条件下表达情况及其分子功能的研究报道。因此，探讨美国白蛾的内在暴发灾变机制，寻找新的分子靶标，对于开发绿色防治技术具有重要意义。本研究旨在明确美国白蛾 *RyR* 基因对氯虫苯甲酰胺胁迫响应分子机制，并探究 RyR 与氯虫苯甲酰胺的分子对接模式。这将有助于深入理解美国白蛾 RyR 的结构，指导科学用药，并为靶向杀虫剂的研发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究材料

美国白蛾卵块与人工饲料购自中国林业科学研究院森林生态环境与自然保护研究所。使用 10% 甲醛溶液对卵块进行熏蒸消毒，然后在温度为(25 ± 1) ℃、湿度 60% ~ 70%、光周期为 16L∶8D(光照∶黑暗)的培养箱中孵化。幼虫用人工饲料饲喂，并每日更换新鲜干净的饲料。

1.2 研究方法

1.2.1 *HcRyR* 基因克隆与分析

选取美国白蛾的卵、幼虫(1 至 7 龄)、蛹(雌性和雄性)、成虫(雌性和雄性)进行发育阶段的表达分析，选取美国白蛾 7 龄第 1 天幼虫的头、表皮、前肠、中肠、后肠、卵巢、精巢、脂肪体、丝腺和马氏管进行组织表达分析。采用 RNeasy Mini 动物组织总 RNA 提取试剂盒(Qiagen)提取总 RNA，并以总 RNA 为模板，使用 TaKara 公司反转录试剂盒合成第一链 cDNA。接着，以合成的 cDNA 为模板，使用含有 T7 启动子的引物(表 1)进行 PCR 扩增。通过琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物，并使用 Omega E.Z.N.A. Gel Extraction Kit 试剂盒回收条带，然后将其连接到 pMD18-T 载体。将连接产物命名为 *RyR*/pMD18-T，并转化至大肠杆菌中。培养后，筛选阳性克隆，并送至上海生工有限公司进行 *RyR* 基因序列的测序验证。

使用 NCBI-ORF finder(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/)获取 *HcRYR* 的开放阅读框。使用在线工具 ProtParam(http://au.expasy.org/tools/protparam.html)预测蛋白分子量和等电点。使用 NCBI-BlastP(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLASTP/)进行同源性分析。使用 TMHMM2.0 Server(http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/)进行跨膜结构域分析。使用 BioEdit 软件进行多序列比对。使用 MEGA 7 软件的 Neighbor-Joining(N-J)程序构建系统发育树。

1.2.2 *HcRyR* 基因发育阶段与组织表达分析

使用 SYBR SuperMix 试剂盒检测不同发育阶段和组织中 *HcRyR* 基因的表达量。使用 Primer 5.0 软件设计 *HcRyR* 基因定量引物，以及 *EF*1*α*、*RPL*13 内参引物(表 1)。实时荧光定量 RT-PCR 反应体系(总体积 20 μL)，包含 10 μL 2 × SYBR premix Ex Taq 酶、2 μL cDNA、1 μL Primer mix 和 7 μL ddH_2O。使用荧光定量仪器配备的 Opticon Monitor3 软件处理数据。

1.2.3 氯虫苯甲酰胺对美国白蛾毒力测定

采用饲料混药法进行毒性处理。选择健康、大小一致的美国白蛾 3 龄幼虫为试虫。将 96% 的氯虫苯甲酰胺原药均匀混入人工饲料中，配制成所需浓度的饲料饲喂美国白蛾 3 龄幼虫。每天更换新鲜的药液饲料。以含有等量丙酮的人工饲料为对照组。

表 1 本文引物序列

Tab. 1 List of primers used in this study

基因 Gene	正向引物序列(5′—3′) Forward primer sequence (5′−3′)	反向引物序列(5′—3′) Reverse primer sequence (5′−3′)	引物用途 Primer usage
HcRyR	TGGTCTTGAAACTCTTCAAGAG	CGTTGATCTTGTCTATGGCTTC	目的基因扩增 Amplification of target gene
HcRyR	TGGTCTTGAAACTCTTCAAGAG	CGTTGATCTTGTCTATGGCTTC	
*EF*1*α*	ATGAAATCTCTGTGACCGGGG	GCGGTGGTATCGACAAACGT	RT-qPCR
*RPL*13	GTTAGCTACACAGCTCCGTGG	GCAGCAGTTGGGGCTTTAGT	
ds*HcRyR*	taatacgactcactatagggGCCTTTGGTCCAAGATGATACT	taatacgactcactatagggATCCATAAGTCCATCCTTGCTG	合成dsRNA Synthesis of dsRNA
ds*GFP*	taatacgactcactatagggAGAAGAACTTTTCACTGG	taatacgactcactatagggTGAACGGATCCATCTTC	

注：小写字母表示T7启动子。Note: the lowercase letters indicate T7 promoters.

每个处理 10 头幼虫，每组试验重复 3 次，分别于 24、48、72 h 统计死亡率。用毛刷轻轻触碰虫体尾部，30 s 内不动视为死亡。

1.2.4　氯虫苯甲酰胺胁迫下 *HcRyR* 基因表达分析

根据氯虫苯甲酰胺对美国白蛾 3 龄幼虫 72 h 的毒力测定结果，采用亚致死质量浓度（LC_{30}）的氯虫苯甲酰胺对美国白蛾 3 龄幼虫进行处理。选择健康、活泼且大小一致的美国白蛾 3 龄幼虫，饥饿 3 h 后，分别放入含有丙酮和氯虫苯甲酰胺的人工饲料中。每个处理 30 头幼虫，重复 3 次。在处理 24、48、72 h 分别挑选活泼的幼虫，用液氮快速冷冻后保存于−80 ℃ 冰箱内，用于后续检测 *RyR* 基因的表达量。提取对照（丙酮处理）和亚致死质量浓度（LC_{30}）氯虫苯甲酰胺分别处理 24、48 和 72 h 的美国白蛾 3 龄幼虫的总 RNA，并定量 0.5 μg RNA 反转录合成 cDNA。将合成的 cDNA 稀释至 100 μL，用作实时荧光定量 RT-PCR 模板。

1.2.5　*RyR* 基因沉默分析

根据已获得的 *HcRyR* 基因序列，设计并合成 ds*HcRyR* 与 ds*GFP* 引物（表 1）。选择健康、活泼、同一天进入 3 龄的美国白蛾幼虫，并将其置于冰上。使用显微注射器（HAMILTON#489323）将 1.0 μL ds*HcRyR* 注射至幼虫腹部倒数第 2 节足间部位。每个处理注射 10 头幼虫，重复 3 次，对照组注射 ds*GFP*。在处理 24、48 和 72 h 后，分别挑取活泼的 3 龄幼虫，经液氮速冻后，保存于−80 ℃ 冰箱，用以检测 RNAi 基因的沉默效率。

1.2.6　*HcRyR* 基因沉默对氯虫苯甲酰胺胁迫下存活率的影响

选择健康、活泼且大小一致的美国白蛾 3 龄幼虫，并对它们进行 3 h 的饥饿处理，然后分别注射 ds*HcRyR* 与 ds*GFP*。注射后，饲喂混有 LC_{30} 氯虫苯甲酰胺的人工饲料，并测定注射 ds*HcRyR* 处理组与注射 ds*GFP* 对照组在氯虫苯甲酰胺胁迫下 24、48、72 h 的存活率。每个处理 10 头幼虫，重复 3 次，每 24 h 统计幼虫存活数。以毛笔轻触美国白蛾幼虫腹部无应激反应作为死亡标准。

1.2.7　美国白蛾 RyR 受体与氯虫苯甲酰胺分子对接

从 PubChem 数据库（https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/）获取氯虫苯甲酰胺配体小分子模型，编号为 No.11271640，并使用 Pymol 2.2.0 软件模拟其三维结构。利用 Swiss-Model 在线网站（https://www.swissmodel.expasy.org/）的模板搜索功能，搜索与美国白蛾 RyR 氨基酸序列一致性 ≥ 30%，且模板覆盖率超过 95% 的模板。然后选择排名第一的蛋白晶体结构作为建模模板，并使用 Bioedit 7.2.6 软件对美国白蛾 RyR 氨基酸序列进行多序列比对，分析 RyR 氨基酸序列的相似性，最后对美国白蛾 RyR 分子进行三维结构建模。蛋白同源建模的评价参照郭冰等[21]的分析方法，使用 Discovery Studio 2019 Client（DS 2019）软件中 Ramachandran Plot 程序对美国白蛾 RyR 蛋白同源建模进行评估。采用 Discovery Studio 2019 Client（DS 2019）软件的精准对接功能（CDOCK）将 RyR 受体模型和氯虫苯甲酰胺进行分子对接。

1.2.8　数据处理与分析

使用 Excel 整理数据，利用 Probit and Logit Analysis 软件计算致死中质量浓度（LC_{50}）和亚致死质量浓度（LC_{30}）及其 95% 置信区间。基因相对表达量通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行分析[31]，使用 SPSS Statistics 24.0（IBM）软件的 Duncan 法进行显著性差异分析（$P < 0.05$），并使用 GraphPad Prism 软件进行绘图。

2　结果与分析

2.1　*HcRyR* 基因特性分析

美国白蛾 *RyR* 基因的开放阅读框（ORF）长度为 15 481 bp，编码 5 160 个氨基酸。预测的蛋白分子量为 583.37 kDa，理论等电点为 5.41。跨膜结构域分析显示，HcRyR 蛋白含有 6 个跨膜结构域（图 1）。通过 NCBI 数据库，查找到 8 种与 HcRyR 蛋白同源性高（94.84% ~ 95.75%）的昆虫，并进行了进化分析。结果表明，美国白蛾 HcRyR 蛋白与烟草天蛾（*Manduca sexta*）的亲缘关系较近，聚为一支，但与谷实夜蛾（*Helicoverpa zea*）和棉铃虫（*Helicoverpa armigera*）的亲缘关系较远（图 2）。

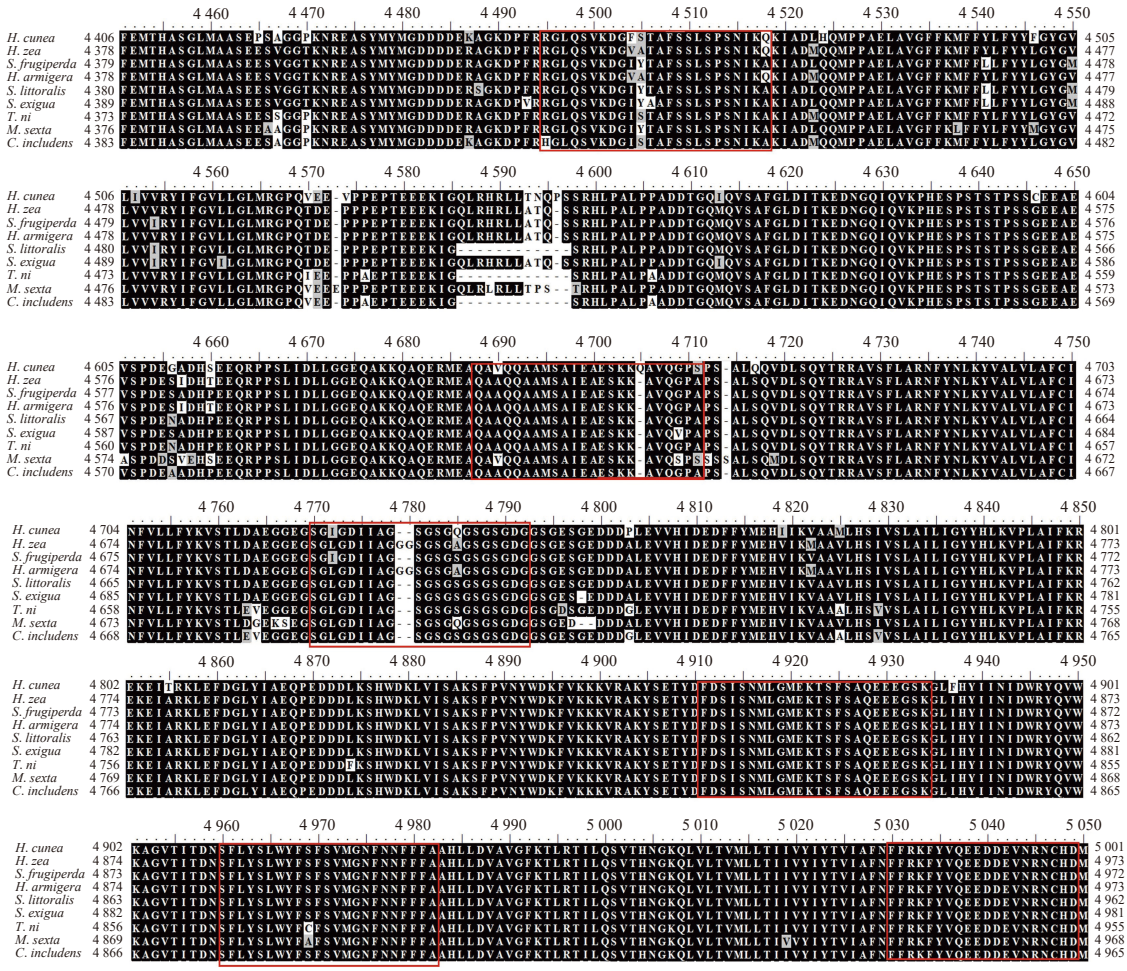
美国白蛾 4 龄和 7 龄幼虫阶段 *HcRyR* 基因相对表达量高，分别是 1 龄幼虫的 6.57 倍与 3.50 倍，其他幼虫阶段的表达水平范围为对照的 0.30 ~ 1.86 倍。在卵期、蛹期和成虫期的表达量较低，为对照的 0.01 ~ 0.04 倍（图 3A）。*HcRyR* 基因在各个组织的表达量均高于头部对照组，在中肠的表达量最高，为对照的 1 749.47 倍；其次为后肠与前肠，分别为对照的 1 371.98 倍与 1 343.95 倍。其他组织的表达水平范围为对照的 1.53 ~ 11.44 倍（图 3B）。

2.2　氯虫苯甲酰胺对美国白蛾毒力

氯虫苯甲酰胺对美国白蛾 3 龄幼虫的 72 h LC_{30} 和 LC_{50} 分别为 11.13 μg/L 和 21.40 μg/L，表现出较高的杀虫活性（表 2）。

2.3　氯虫苯甲酰胺胁迫下 *HcRyR* 基因表达水平

通过实时荧光定量 RT-PCR 技术分析 LC_{30} 亚致死质量浓度的氯虫苯甲酰胺处理美国白蛾 3 龄幼虫 72 h 后，*RyR* 基因的表达水平随时间增加表现为先上升后下降。氯虫苯甲酰胺处理 24 h 后，*RyR* 基



H. cunea.美国白蛾; *H. zea*.谷实夜蛾; *S. frugiperda*.草地贪夜蛾; *H. armigera*.棉铃虫; *S. littoralis*.海灰翅夜蛾; *S. exigua*.甜菜夜蛾; *T. ni*.粉纹夜蛾; *M. sexta*.烟草天蛾; *C. includens*.黄豆银纹夜蛾。红色框线表示跨膜结构域。*H. cunea*, *Hyphantria cunea*; *H. zea*, *Helicoverpa zea*; *S. frugiperda*, *Spodoptera frugiperda*; *H. armigera*, *Helicoverpa armigera*; *S. littoralis*, *Spodoptera littoralis*; *S. exigua*, *Spodoptera exigua*; *T. ni*, *Trichoplusia ni*; *M. sexta*, *Manduca sexta*; *C. includens*, *Chrysodeixis includens*. Red box lines represent transmembrane domains.

图 1 9 种昆虫 RyR 蛋白多序列比对

Fig. 1 Multiple sequence alignment of RyR proteins in nine insect species

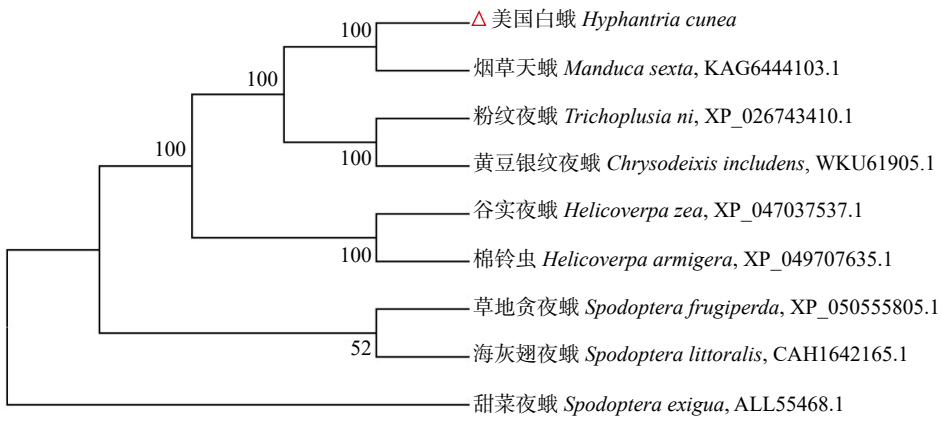


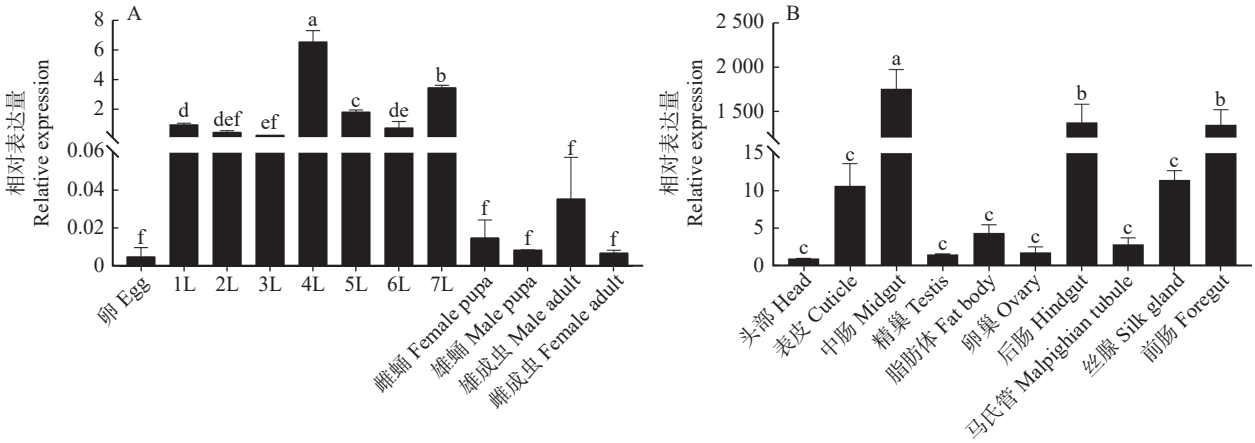
图 2 9 种昆虫 RyR 蛋白系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of RyR proteins in nine insect species

因的相对表达量最低，为对照组相对表达量的 95%；氯虫苯甲酰胺处理 48 h 和 72 h 后，*RyR* 基因的相对表达量均表现为诱导上调，显著高于对照组，分别为对照组的 2.6 倍和 1.5 倍(图 4)。

2.4 *HcRyR* 基因沉默对氯虫苯甲酰胺胁迫的影响

与对照组 ds*GFP* 相比，注射 ds*HcRyR* 后 24、48 和 72 h，*HcRyR* 基因沉默效率分别为 29.71%、72.43% 和 61.98%(图 5)。



1L ~ 7L.1 ~ 7 龄幼虫。用 Duncan 方法分析差异显著性，不同小写字母表示不同处理组间差异显著性（$P < 0.05$）。1L−7L, 1st−7th instar larvae. Duncan's method is used to analyze the difference significance, and different lowercase letters indicate difference significance between different treatment groups ($P < 0.05$).

图 3　美国白蛾不同发育阶段（A）和组织（B）*HcRyR* 基因表达

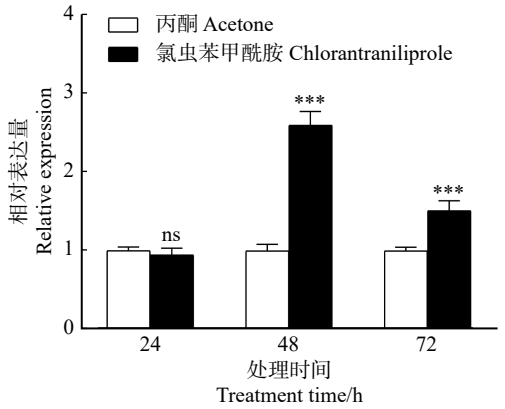
Fig. 3　*HcRyR* gene expression in different development stages (A) and tissues (B) of *H. cunea*

表 2　氯虫苯甲酰胺对美国白蛾 3 龄幼虫 72 h 毒力

Tab. 2　Toxicity of chlorantraniliprole on the 3rd instar *H. cunea* larvae treated for 72 h

毒力回归方程 Toxicity regression equation	LC_{30}(95% CI)/(μg·L^{-1})	LC_{50}(95% CI)/(μg·L^{-1})	R^2	χ^2	df
$Y = 1.85x + 8.09$	11.13 (7.90 ~ 15.68)	21.40 (16.28 ~ 28.12)	0.98	11.12	13

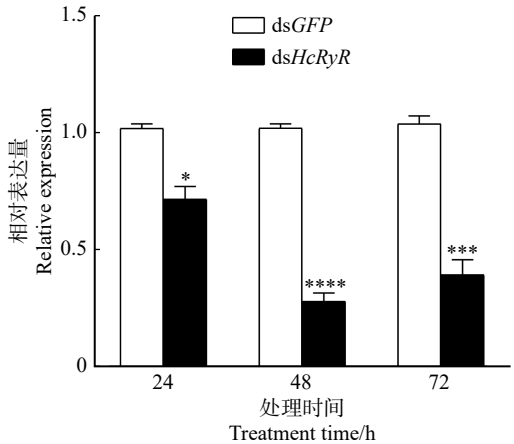
注：LC_{30}和LC_{50}分别为30%和50%死亡率时亚致死质量浓度；95% CI为95%置信区间；R^2为相关系数；χ^2为卡方值；df为自由度；卡方值小于 $\chi^2_{(13,0.05)} = 22.36$，故毒力回归方程与实际相符。Notes: LC_{30} and LC_{50} are sublethal concentration when mortality rates are 30% and 50% , respectively; 95% CI is 95% confidence interval; R^2 is the correlation coefficient; χ^2 is the chi-square value; df is degree of freedom; the chi-square value is less than $\chi^2_{(13,0.05)} = 22.36$, toxicity regression equation is consistent with the reality.



ns 表示差异不显著（$P > 0.05$）；***表示在 $P < 0.001$ 水平上差异极显著。下同。ns indicates difference is not significant ($P > 0.05$); *** indicates diference is extremely significant at $P < 0.001$ level. The same below.

图 4　氯虫苯甲酰胺胁迫下 *HcRyR* 基因表达水平

Fig. 4　Expression levels of *RyR* gene in *H. cunea* under chlorantraniliprole stress



*表示在 $P < 0.05$ 水平上差异显著；****表示在 $P < 0.000\ 1$ 水平上差异极显著。* indicates significant difference at $P < 0.05$ level; **** indicates extremely significant difference at $P < 0.000\ 1$ level.

图 5　美国白蛾 *RyR* 基因沉默效率

Fig. 5　*RyR* gene silencing efficiency of *H. cunea*

测定氯虫苯甲酰胺胁迫对 *HcRyR* 基因沉默美国白蛾 3 龄幼虫存活率的影响。结果表明：24 h 时对照组 ds*GFP* 的存活率为 73.33%，ds*HcRyR* 处理组存活率为 93.33%；48 h 时对照组 ds*GFP* 的存活率为 53.33%，ds*HcRyR* 处理组存活率为 83.33%；72 h 时对照组 ds*GFP* 的存活率为 46.66%，ds*HcRyR* 处理组存活率为 73.33%；3 个时间点 ds*HcRyR* 处理组存活率均高于对照组 ds*GFP*。*HcRyR* 沉默降低了美国白蛾 3 龄幼虫对氯虫苯甲酰胺的敏感性（图 6）。

2.5　*HcRyR* 同源建模结果评价及其与氯虫苯甲酰胺的分子对接分析

2.5.1　RyR 模型的 Ramachandran plot 评估

美国白蛾 RyR 与穴兔（*Oryctolagus cuniculus*）

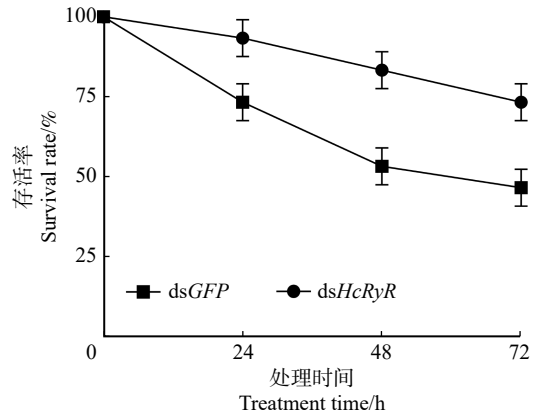


图 6 氯虫苯甲酰胺胁迫下 *HcRyR* 基因沉默对美国白蛾幼虫存活率影响

Fig. 6 Effects of chlorantraniliprole stress on survival rate of *H. cunea* with *HcRyR* gene silencing

RyR(模板编号：4uw.1.C)氨基酸序列一致性最高，相似度为 51%。该模板符合 Swiss-model 同源模建序列一致性及模板覆盖率条件，基于该模板构建了美国白蛾 RyR 同源蛋白三维结构模型，并通过 Ramachandran plot 对模型进行评估：最优区域占比 84.3%，额外允许区域占比 10.2%，勉强允许区域占比 3.2%，不允许区域仅占比 2.2%，HcRyR 的全部氨基酸均位于合理区域，满足 Ramachandran plot 评估中合理区域占比(97.8%) > 90% 的条件，表明所构建美国白蛾 RyR 模型的氨基酸残基构象是合理的，可用于分子对接及分析预测。

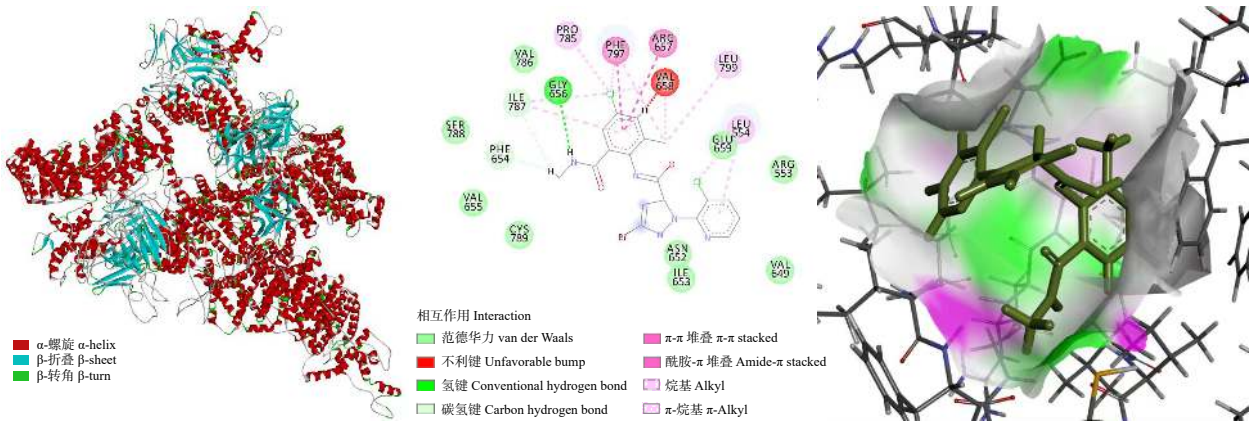
2.5.2 RyR 与氯虫苯甲酰胺的分子对接分析

分子对接结果显示 RyR 与氯虫苯甲酰胺的结合特性良好，结合能为−31.35 kJ/mol，表明两者间存在氢键与范德华力使其稳定结合。HcRyR 中的缬氨酸(VAL)786、丝氨酸(SER)788、VAL655、半胱氨酸(CYS)789、谷氨酸(GLU)659、精氨酸(ARG)553、天冬酰胺(ASN)652、异亮氨酸(ILE)653 和 VAL649 与氯虫苯甲酰胺通过范德华力结合。亮氨酸(LEU)554 通过 π-烷基作用与氯虫苯甲酰胺结合。脯氨酸(PRO)785 和 LEU799 通过烷基作用与氯虫苯甲酰胺结合。苯丙氨酸(PHE)797 和 ARG657 通过酰胺-π 堆叠作用与氯虫苯甲酰胺结合。VAL658 通过不利键与氯虫苯甲酰胺结合。甘氨酸(GLY)656 通过氢键与氯虫苯甲酰胺结合。ILE787、PHE654 和氯虫苯甲酰胺通过碳氢键结合。这些疏水性残基与氯虫苯甲酰胺的分子间作用力和氢键作用力是促进蛋白–配体结合的主要作用力(图 7)。

3 讨 论

美国白蛾因其食性杂、繁殖迅速、适应性强，已对我国农林业造成巨大的经济损失。此外，该物种已逐步产生抗药性。因此，寻找新的分子靶标，并开发绿色防治技术，对保护农林业具有重要意义[32]。通过对比美国白蛾与其他 8 种昆虫物种的 RyR 蛋白序列，并构建 RyR 蛋白系统进化树，可以为 *HcRyR* 的功能研究提供有效信息。

鱼尼丁受体基因已被证实是双酰胺类药剂的靶标[33]。双酰胺类药剂因其对鳞翅目昆虫的高效性，例如氯虫苯甲酰胺已被逐步推广应用于玉米螟(*Pyrausta nubilalis*)的田间防治[34]。美国白蛾 *RyR* 基因表达水平表现出明显的发育阶段特异性与组织特异性。同时，*HcRyR* 基因参与氯虫苯甲酰胺胁迫响应，表明该基因可作为氯虫苯甲酰胺的关键靶标基因。邓放等[35]发现，在氯虫苯甲酰胺抗性种群的菜青虫(*Pieris rapae*)中，*RyR* 基因的表达量是敏感种群的 6.32 倍。孙丽娜等[36]应用 qRT-PCR 技术证明，桃小食心虫(*Carposina sasakii*)*RyR* 基因在不同发育阶段表达存



a RyR与氯虫苯甲酰胺结合的三维结构 Three-dimensional structure of RyR binding to chlorantraniliprole

b RyR 与氯虫苯甲酰胺的分子间作用力 Molecular interactions between RyR and chlorantraniliprole

c 配体和蛋白末端口袋的详细结合模式 Detailed binding mode of the ligand with the protein distal pocket

图 7 美国白蛾 RyR 与氯虫苯甲酰胺的结合分析

Fig. 7 Binding patterns of RyR in *H. cunea* with chlorantraniliprole

在差异。曹晓炜[37]研究发现，与 WH-S 敏感品系相比，小菜蛾鱼尼丁受体 I4790M 基因编辑品系对双酰胺类杀虫剂的敏感性下降。Troczka 等[38]比较了氯虫苯甲酰胺抗性小菜蛾田间种群与敏感品系的鱼尼丁受体 cDNA 序列，推测基因突变是导致小菜蛾对氯虫苯甲酰胺产生高水平抗性的原因。孙丽娜等[39]采用 Illumina HiSeq™ 2000 高通量测序技术对苹小卷叶蛾(*Adoxophyes orana*)进行转录组测序，发现 *RyR* 基因在不同发育阶段的表达存在差异，并与有毒物质代谢相关通路有关。杨耀[28]通过 RNAi 技术明晰白背飞虱和马铃薯甲虫鱼尼丁受体是氯虫苯甲酰胺的作用靶标。本文结果表明，氯虫苯甲酰胺对美国白蛾 *RyR* 基因有显著诱导效应，但诱导水平存受时间的显著影响，这与邓放等[35]对菜青虫及孙丽娜等[36,39]对桃小食心虫和苹小卷叶蛾的研究结果一致。沉默 *HcRyR* 基因显著降低美国白蛾对氯虫苯甲酰胺的敏感性，这与杨耀[28]对白背飞虱、马铃薯甲虫和烟青虫的研究结果一致。鉴于昆虫鱼尼丁受体的重要作用，其表达基因的下调可能会影响昆虫的蜕皮、交配等行为[28]。因此，利用 RNAi 技术深入探究 *RyR* 基因在美国白蛾生长发育过程中的调控机制是有必要的。

美国白蛾 RyR 受体与氯虫苯甲酰胺具有较好的结合能力。结合自由能是评估配体与受体间相互作用强度与结合稳定性的关键指标。分子对接技术能够快速且直观地分析美国白蛾 RyR 与氯虫苯甲酰胺的结合情况，从而提高研究的针对性和准确性[40]。崔琳琳等[41]研究表明: 当蛋白质与小分子结合能 < 0 kJ/mol 时，它们能够自发结合; 当蛋白质与小分子结合能 ≤ −5 kJ/mol 时，则表明它们具有较好的结合能力。Gawande 等[42]通过分子对接技术分析了棉蚜(*Aphis gossypii*)GST 蛋白与单宁酸的结合能，证明了它们之间具有较强的结合能力。分子模拟技术，尽管在药物开发领域应用最为广泛，但随着计算机科学、统计力学等多种学科的发展，已成为研究昆虫代谢杀虫剂分子机制的重要工具[26]。氢键与范德华力是美国白蛾 RyR 受体与氯虫苯甲酰胺结合的关键作用力，该结果将为美国白蛾杀虫剂抗性机制的阐释与基于 RyR 受体结构的新型杀虫剂设计等方面发挥作用。然而，由于本研究采用的是计算机模拟预测的分子对接技术，其预测结果可能与基于 RyR 受体结构的新型杀虫剂设计试验结果存在差异，因此需要进一步验证。综上所述，本研究阐明了美国白蛾 RyR 受体对氯虫苯甲酰胺胁迫响应的分子机制，通过分子对接模拟两者间的作用模式，为后续科学用药、高效防治美国白蛾提供理论依据。

参　考　文　献

[1] 赵旭东, 耿薏舒, 郝德君, 等. 美国白蛾防控技术的研究进展及展望 [J]. 中国森林病虫, 2022, 41(5): 44−52.
Zhao X D, Geng Y S, Hao D J, et al. Research progress and prospect of control technology of *Hyphantria cunea*[J]. Forest Pest and Disease, 2022, 41(5): 44−52.

[2] 武亚敬, 于祎飞. 美国白蛾生物学特性及病原真菌防治研究进展 [J]. 河北林业科技, 2022(2): 45−49.
Wu Y J, Yu Y F. Research progress on biological characteristics of *Hyphantria cunea* and control of pathogenic fungi[J]. The Journal of Hebei Forestry Science and Technology, 2022(2): 45−49.

[3] 刘枫, 李群. 美国白蛾在中国发生情况、林间防治现状及展望 [J]. 沈阳农业大学学报, 2022, 53(5): 630−640.
Liu F, Li Q. Occurrence of *Hyphantria cunea* in China, status and prospct of forest control[J]. Journal of Shenyang Aricultural University, 2022, 53(5): 630−640.

[4] Selby T P, Lahm G P, Stevenson T M, et al. Discovery of cyantraniliprole, a potent and selective anthranilic diamide ryanodine receptor activator with cross-spectrum insecticidal activity[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2013, 23(23): 6341.

[5] 张琳, 张紫溪, 陈秀, 等. 双酰胺类农药生物活性、生态毒性及残留行为研究进展 [J]. 农药学学报, 2023, 25(2): 295−309.
Zhang L, Zhang Z X, Chen X, et al. Research progress on the biological activity, ecotoxicity, and residual behavior of bisamide pesticides[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2023, 25(2): 295−309.

[6] Wang M, Kong X P, Li H C, et al. Coprecipitation-based synchronous chlorantraniliprole encapsulation with chitosan: carrier-pesticide interactions and release behavior[J]. Pest Management Science, 2023, 79(10): 3757−3766.

[7] Teixeira L A, Andaloro J T. Diamide insecticides: global efforts to address insect resistance stewardship challenges[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2013, 106(3): 76−78.

[8] 郑雪松, 时立波, 茹李军, 等. 鱼尼丁受体及以其为靶标的杀虫剂 [J]. 现代农药, 2012, 11(3): 1−6.
Zheng X S, Shi L B, Ru L J, et al. Ryanodine receptor and insecticides targeting them[J]. Modern Agrochemicals, 2012, 11(3): 1−6.

[9] 谭海军, 童益利. 双酰胺类杀虫剂及其作用机制和在烟草上的应用 [J]. 生物灾害科学, 2020, 43(2): 131−137.
Tan H J, Tong Y L. Diamide insecticides and their mechanism of action and application in tobacco[J]. Biological Disaster Science, 2020, 43(2): 131−137.

[10] 李林珊, 谢伟彬, 郑占英, 等. 碳硫双手性邻苯二甲酰类鱼尼丁受体杀虫剂研究进展 [J]. 世界农药, 2022, 44(3): 21−25.
Li L S, Xie W B, Zheng Z Y, et al. Research progress on carbon sulfur two handed phthaloyl ryanodine receptor insecticides[J]. World Pesticide, 2022, 44(3): 21−25.

[11] 董良胜, 陆敬松, 杜莹, 等. 新型农药氯虫苯甲酰胺的合成研究

进展 [J]. 广州化工, 2017, 45(17): 20−22.
Dong L S, Lu J S, Du Y, et al. Research progress in the synthesis of a new pesticide chlorantraniliprole[J]. Guangzhou Chemical Industry, 2017, 45(17): 20−22.

[12] 刘熠, 王国胜. 鱼尼丁受体类新型杀虫剂氯虫酰胺的研究概述 [J]. 化学工程师, 2009, 23(12): 44−47.
Liu Y, Wang G S. Overview of the research on novel insecticide chlorantraniliprole insecticide based on ryanodine receptor[J]. Chemical Engineer, 2009, 23(12): 44−47.

[13] 唐振华, 陶黎明. 新型二酰胺类杀虫剂对鱼尼丁受体作用的分子机理 [J]. 昆虫学报, 2008, 51(6): 646−651.
Tang Z H, Tao L M. Molecular mechanism of the action of novel diamide insecticides on ryanodine receptor[J]. Acta Entomologica Sinica, 2008, 51(6): 646−651.

[14] 李秀霞, 梁沛, 高希武, 等. 昆虫对双酰胺类杀虫剂抗性机制研究进展 [J]. 植物保护学报, 2015, 42(4): 481−487.
Li X X, Liang P, Gao X W, et al. Research progress on the resistance mechanism of insects to diamide insecticides[J]. Journal of Plant Protection, 2015, 42(4): 481−487.

[15] 卢晶晶, 贾变桃, 安颢敏, 等. 4 种鱼尼丁受体杀虫剂对小菜蛾及半闭弯尾姬蜂的选择毒力 [J]. 山西农业大学学报 (自然科学版), 2019, 39(4): 58−62.
Lu J J, Jia B T, An H M, et al. Selective toxicity of four kinds of ryanodine receptor insecticides to diamondback moth and *Diadegma semiclausum*[J]. Journal of Shanxi Agricultural University (Natural Science Edition), 2019, 39(4): 58−62.

[16] Takeshima H, Nishi M, Iwabe N, et al. Isolation and characterization of a gene for a ryanodine receptor/calcium release channel in *Drosophilidae melanogaster*[J]. FEBS Letters, 1994, 337(1): 81−87.

[17] 李康, 王凯博, 陶丽红, 等. 草地贪夜蛾鱼尼丁受体与双酰胺类杀虫剂的结合模式及抗性风险分析 [J]. 农药学学报, 2021, 23(5): 856−868.
Li K, Wang K B, Tao L H, et al. Binding mode and resistance risk analysis of ryanodine receptor of *Spodoptera frugiperda* to diamide insecticides[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2021, 23(5): 856−868.

[18] 王少丽, 董钧锋, 李如美, 等. 甜菜夜蛾对氯虫苯甲酰胺抗性种群选育及鱼尼丁受体基因表达特征 [J]. 植物保护学报, 2015, 42(3): 425−431.
Wang S L, Dong J F, Li R M, et al. Breeding of *Spodoptera exigua* resistant population to chlorantraniliprole and the expression characteristics of ryanodine receptor genes[J]. Journal of Plant Protection, 2015, 42(3): 425−431.

[19] 孙丽娜, 杨代斌, 芮昌辉, 等. 氯虫苯甲酰胺对小菜蛾鱼尼丁受体基因 mRNA 表达量的影响 [J]. 农药学学报, 2012, 14(2): 136−142.
Sun L N, Yang D B, Rui C H, et al. The effect of chlorantraniliprole on the mRNA expression of ryanodine receptor gene in diamondback moth[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2012, 14(2): 136−142.

[20] 刘亚萍. 赤拟谷盗两种细胞内钙离子通道基因的克隆及 RNA 干扰研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2014.
Liu Y P. Cloning and RNA interference study of two intracellular calcium ion channel genes from *Tribolium castaneum*[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2014.

[21] 郭冰, 郝恩华, 王菁桢, 等. 入侵害虫松树蜂气味结合蛋白与其相关信息化学物质的分子对接 [J]. 植物保护学报, 2019, 46(5): 1004−1017.
Guo B, Hao E H, Wang J Z, et al. Molecular docking of odorant binding proteins and its related semiochemicals of *Sirex noctilio*, an invasive insect pest[J]. Journal of Plant Protection, 2019, 46(5): 1004−1017.

[22] 李敏, 郭美琪, 相伟芳, 等. 分子对接技术在昆虫化学感受研究中的应用进展 [J]. 植物保护, 2019, 45(5): 121−127.
Li M, Guo M Q, Xiang W F, et al. Research progress in molecular docking in insect chemosense[J]. Plant Protection, 2019, 45(5): 121−127.

[23] Liu Q J, Wang H, Li H L, et al. Impedance sensing and molecular modeling of an olfactory biosensor based on chemosensory proteins of honeybee[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2013, 40(1): 174−179.

[24] Li H L, Ni C X, Tan J, et al. Chemosensory proteins of the eastern honeybee, *Apis cerana*: identification, tissue distribution and olfactory related functional characterization[J]. Journal of Insect Physiology, 2016, 194−195: 11−19.

[25] 李红亮, 张林雅, 庄树林, 等. 中华蜜蜂普通气味结合蛋白 ASP2 的气味结合功能模式分析 [J]. 中国农业科学, 2013, 46(1): 154−161.
Li H L, Zhang L Y, Zhuang S L, et al. Interpretation of odorant binding function and mode of general odorant binding protein ASP2 in Chinese honeybee (*Apis cerana cerana*)[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2013, 46(1): 154−161.

[26] 杨雪清, 刘吉元, 张雅林. 分子模拟技术及其在苹果蠹蛾代谢杀虫剂分子机制研究中的应用进展 [J]. 生物安全学报, 2015, 24(4): 265−273.
Yang X Q, Liu J Y, Zhang Y L. Molecular simulation and its application progress on molecular metabolic mechanisms of insecticide in *Cydia pomonella*[J]. Journal of Biosafety, 2015, 24(4): 265−273.

[27] Wang Y L, Jin Y C, Chen Q, et al. Selectivity and ligand-based molecular modeling of an odorant-binding protein from the leaf beetle *Ambrostoma quadriimpressum* (Coleoptera: Chrysomelidae) in relation to habitat-related volatiles[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 15374.

[28] 杨耀. 三种昆虫鱼尼丁受体的克隆及其对氯虫苯甲酰胺敏感性差异的比较分析 [D]. 南京: 南京农业大学, 2017.
Yang Y. Cloning of three insect ryanodine receptors and comparative analysis of their sensitivity to chlorantraniliprole[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2017.

[29] 高晓进, 郭莉, 陈迪, 等. 花椒窄吉丁化学感受蛋白 AzanCSP7 的三维模型预测及其与寄主挥发物的分子对接 [J]. 农业生物技术学报, 2023, 31(6): 1238−1251.
Gao X J, Guo L, Chen D, et al. Three dimensional model

prediction of *Agrilus zanthoxylumi* chemoreceptor protein AzanCSP7 and its macromolecular docking with host volatiles[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2023, 31(6): 1238−1251.

[30] 刘少武, 呼健洋, 刘艳, 等. 2 种双酰胺类杀虫剂对 4 种鳞翅目害虫的生物活性 [J]. 农药, 2023, 62(8): 616−619.
Liu S W, Hu J Y, Liu Y, et al. Biological activities of two diamide insecticides against four Lepidoptera pests[J]. Agrochemicals, 2023, 62(8): 616−619.

[31] Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR[J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29(9): e45.

[32] 邱立新, 卢修亮, 林晓, 等. 我国美国白蛾防控历程与新时期策略探讨 [J]. 中国森林病虫, 2022, 41(6): 1−7.
Qiu L X, Lu X L, Lin X, et al. Discussion on the prevention and control course of *Hyphantria cunea* in China and strategies for the new era[J]. Forest Pest and Disease, 2022, 41(6): 1−7.

[33] Boaventura D, Bolzan A, Padovez F E, et al. Detection of a ryanodine receptor target-site mutation in diamide insecticide resistant fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*[J]. Pest Management Science, 2020, 76(1): 47−54.

[34] 赵丹丹, 周丽琪, 张帅, 等. 二化螟对双酰胺类杀虫剂的抗药性监测和交互抗性研究 [J]. 中国水稻科学, 2017, 31(3): 8.
Zhao D D, Zhou L Q, Zhang S, et al. Monitoring of resistance and study on interaction resistance of *Chilo suppressalis* to diamide insecticides[J]. Chinese Journal of Rice Science, 2017, 31(3): 8.

[35] 邓放, 周小毛. 氯虫苯甲酰胺对菜青虫鱼尼丁受体基因表达量的影响 [J]. 湖南农业科学, 2014, 334(7): 5−7.
Deng F, Zhou X M. Effect of chlorantraniliprole on gene expression of ryanodine receptor in *Pieris rapae*[J]. Hunan Agricultural Sciences, 2014, 334(7): 5−7.

[36] 孙丽娜, 张怀江, 闫文涛, 等. 桃小食心虫鱼尼丁受体基因克隆及表达模式分析 [J]. 中国农业科学, 2015, 48(10): 1971−1981.
Sun L N, Zhang H J, Yan W T, et al. Cloning and expression pattern analysis of ryanodine receptor gene in *Carposina sasakii*[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2015, 48(10): 1971−1981.

[37] 曹晓炜. 华东地区小菜蛾抗药性监测和鱼尼丁受体 I4790M 突变介导的氟虫双酰胺抗性研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2019.
CAO X W. Monitoring of resistance of Plutella xylostella to insecticides in East China and study on resistance to fipronil diamide mediated by I4790M mutation of ryanodine receptor[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2019.

[38] Troczka B, Zimmer C T, Elias J, et al. Resistance to diamide insecticides in diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) is associated with a mutation in the membrane-spanning domain of the ryanodine receptor[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2012, 42(11): 873−880.

[39] 孙丽娜, 张怀江, 刘孝贺, 等. 基于转录组的苹小卷叶蛾杀虫剂靶标及解毒代谢相关基因分析 [J]. 昆虫学报, 2020, 63(4): 470−481.
Sun L N, Zhang H J, Liu X H, et al. Transcriptome based analysis of insecticide targets and detoxification metabolism related genes of *Adoxophyes orana*[J]. Acta Entomologica Sinica, 2020, 63(4): 470−481.

[40] 杨欢, 郭冰, 郝恩华, 等. 禾谷缢管蚜气味降解酶鉴定及其与关键信息化学物质的分子对接 [J]. 植物保护学报, 2022, 49(4): 1119−1131.
Yang H, Guo B, Hao E H, et al. Identification of odor-degrading enzymes from *Rhopalosiphum padi* and their molecular docking with key information chemicals[J]. Journal of Plant Protection, 2022, 49(4): 1119−1131.

[41] 崔琳琳, 宋亚刚, 苗明三. 基于网络药理学和分子对接的陈皮干预 COVID-19 的可能机制 [J]. 中药药理与临床, 2020, 36(5): 28−33.
Cui L L, Song Y G, Miao M S. Possible mechanism of citri reticulatae pericarpium intervening on COVID-19 based on network pharmacology and molecular docking[J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2020, 36(5): 28−33.

[42] Gawande N D, Subashini S, Murugan M, et al. Molecular screening of insecticides with sigma glutathione S-transferases (GST) in cotton aphid *Aphis gossypii* using docking[J]. Bioinformation, 2014, 10(11): 679−683.

（责任编辑　范　娟
责任编委　骆有庆）