麦二叉蚜对氟吡呋喃酮的抗性选育及细胞色素P450介导的抗药性机理分析

高 钰[1] 李路怡[1] 郑钧月[2] 吕景姝[1] 张 瑜[1] 邱立红[1*]

（1. 中国农业大学理学院应用化学系，北京 100193；2. 广东省科学院生态环境与土壤研究所，广州 510650）

摘要：为探究麦蚜对新型新烟碱类杀虫剂氟吡呋喃酮的抗性发展潜力及其分子机制，在室内对麦二叉蚜*Schizaphis graminum*进行抗性选育，通过增效剂试验和解毒酶活性测定初步解析其对氟吡呋喃酮的抗性生化机制，采用实时荧光定量PCR（real-time quantitative PCR，RT-qPCR）技术分析细胞色素P450（简称P450）基因的表达水平，并利用RNA干扰（RNA interference，RNAi）技术对上调表达的P450基因进行功能验证。结果显示：经氟吡呋喃酮连续汰选20代，麦二叉蚜的抗性倍数上升为26.06倍，达到中等抗性水平；该抗性种群对吡虫啉、噻虫嗪、高效氯氟氰菊酯、氰戊菊酯、联苯菊酯、溴氰虫酰胺、阿维菌素、虫螨腈均无明显交互抗性，但对溴氰菊酯存在低水平的交互抗性。P450酶抑制剂增效醚对氟吡呋喃酮具有明显的增效作用，而且与敏感种群相比，抗性种群P450酶活性显著升高。4个P450基因*CYP380C6*、*CYP4CJ1*、*CYP4C1*和*CYP4CJ5*在抗性种群中的表达量显著高于敏感种群；沉默这4个基因后，麦二叉蚜对氟吡呋喃酮的敏感性显著增加。表明P450酶活性增强及*CYP380C6*、*CYP4CJ1*、*CYP4C1*、*CYP4CJ5*基因过量表达是麦二叉蚜对氟吡呋喃酮产生代谢抗性的重要机制。

关键词：麦二叉蚜；氟吡呋喃酮；抗药性；细胞色素P450；RNA干扰

Resistance selection of spring-grain aphid *Schizaphis graminum* to flupyradifurone and cytochrome P450-mediated resistance mechanisms

Gao Yu[1] Li Luyi[1] Zheng Junyue[2] Lü Jingshu[1] Zhang Yu[1] Qiu Lihong[1*]

（1. Department of Applied Chemistry, College of Science, China Agricultural University, Beijing 100193, China;
2. Institute of Eco-environmental and Soil Sciences, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510650, Guangdong Province, China）

Abstract: To explore the potential for resistance development in spring-grain aphid *Schizaphis graminum* to the novel neonicotinoid insecticide flupyradifurone and its molecular mechanisms, laboratory resistance selection was performed. Synergist assays and detoxification enzyme activity assays were carried out to preliminarily explore the biochemical mechanism of resistance. Furthermore, real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was used to analyze the expression levels of cytochrome P450 (P450) genes, and the functions of upregulated P450 genes were further verified by RNA interference (RNAi). The results showed that after 20 generations of continuous selection with flupyradifurone, the resistance ratio of *S. graminum* increased to 26.06-fold, reaching a moderate resistance level. The resistant population showed no obvious cross-resistance to imidacloprid, thiamethoxam, lambda-cyhalothrin, fenvalerate, bifenthrin, cyantraniliprole, abamectin, and chlorfenapyr, but showed low-level cross-resistance to

基金项目：国家重点研发计划项目（2022YFD1400901）

* 通信作者（Author for correspondence），E-mail：lihongqiuyang@126.com

收稿日期：2025-11-12

deltamethrin. The P450 inhibitor piperonyl butoxide had a significant synergistic effect on flupyradifurone, and P450 activity significantly higher in the resistant population than in the susceptible population. The expression levels of four P450 genes, *CYP380C6*, *CYP4CJ1*, *CYP4C1* and *CYP4CJ5*, were significantly higher in the resistant population than in the susceptible population. After these four genes were silenced, the sensitivity of *S. graminum* to flupyradifurone increased significantly. These results indicate that the enhanced P450 activity and overexpression of *CYP380C6*, *CYP4CJ1*, *CYP4C1*, *CYP4CJ5* genes are important mechanisms underlying metabolic resistance to flupyradifurone in *S. graminum*.

Key words: *Schizaphis graminum*; flupyradifurone; insecticide resistance; cytochrome P450; RNA interference

麦蚜作为重要的农业害虫，可以通过刺吸植物汁液和传播病毒病给小麦生产造成重大损失（Gong et al.，2020）。其中麦二叉蚜 *Schizaphis graminum* 是小麦生产中的主要蚜虫之一（Blackman & Eastop，1984），在小麦生长前期聚集在叶片正面或背面、后期聚集在穗上刺吸汁液，使受害株生长缓慢，分蘖减少，千粒重下降，从而影响小麦的产量和品质（王美芳等，2006）。此外，麦二叉蚜分泌的蜜露覆盖在植株表面，严重影响小麦的呼吸作用和光合作用；蜜露还会引来蚂蚁共同为害作物，引起霉菌滋生进而诱发植物黑霉病或霉污病等（Boissot et al.，2016）；还可通过传播植物病毒对小麦造成损害，尤其是大麦黄矮病毒（barley yellow dwarf virus，BYDV）（陈劲等，2014），每年造成较大的经济损失。目前防治麦蚜主要依赖化学农药。新烟碱类杀虫剂因其对哺乳动物毒性较低，对昆虫神经系统有很好的选择性，被广泛用于防治蚜虫、叶蝉等刺吸式口器类害虫（陈一萍等，2023）。其中氟吡呋喃酮属于新型烟碱型乙酰胆碱受体竞争性调节剂，具有防治谱广、内吸性强、击倒速度快和药效持久等优点，对蚜虫、粉虱、木虱及叶蝉等害虫有良好的防治效果（Jeschke et al.，2015；Nauen et al.，2015）。但随着该杀虫剂的连续应用，近年来烟粉虱 *Bemisia tabaci*（Smith et al.，2016；Guo et al.，2020）、褐飞虱 *Nilaparvata lugens*（任志杰等，2020）和桃蚜 *Myzus persicae*（Bass et al.，2015）等刺吸式口器害虫对其产生了不同程度的抗性。

大量研究表明，解毒酶活性增强是害虫对杀虫剂产生抗性的重要原因之一（Feyereisen，1999；Puinean et al.，2010；Bass et al.，2014）。其中细胞色素P450（简称P450）是最重要的解毒酶之一，参与昆虫代谢一系列内源性化合物（脂肪酸和激素等）和外源有毒物质（植物次生物质和杀虫剂等），在害虫的杀虫剂抗性发展中发挥着至关重要的作用（Wu YQ et al.，2018；Ye et al.，2022）。P450基因表达量上调引起的新烟碱类杀虫剂代谢抗性在多种害虫中被报道。例如，*CYP6ER1* 过量表达使褐飞虱对吡虫啉和噻虫嗪产生抗性（Wu SF et al.，2018）；*CYP380C40* 过量表达使桃蚜对氟啶虫胺腈产生抗性（Pym et al.，2022）；*CYP6AY1* 和 *CYP6ER1* 过量表达使褐飞虱对吡虫啉产生抗性（Bass et al.，2011；Ding et al.，2013）；*CYP6CY1* 过量表达使荻草谷网蚜 *Sitobion miscanthi* 对吡虫啉产生抗性（Xiong et al.，2025）。

相较于其他蚜虫，麦二叉蚜抗药性分子机制的研究基础较薄弱，尤其是P450介导的代谢抗性缺乏系统性的基因鉴定与功能验证。本研究拟通过麦二叉蚜对氟吡呋喃酮的抗性选育，了解其抗性发展潜力，并通过增效剂试验和解毒酶活性测定初步解析其抗性的生化机制，进一步采用实时荧光定量PCR（real-time quantitative PCR，RT-qPCR）和RNA干扰（RNA interference，RNAi）技术，深入研究P450在麦二叉蚜抗性形成中的作用，以期揭示麦二叉蚜对氟吡呋喃酮的抗性形成机制，为氟吡呋喃酮的科学使用及麦二叉蚜的综合治理提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试昆虫和小麦：麦二叉蚜敏感种群由中国农业科学院植物保护研究所赠送，寄主植物为小麦，饲养条件为温度（23±1）℃、相对湿度（55±5）%、光照16 h/黑暗8 h，长期无杀虫剂接触史。供试小麦品种为济麦44，种子购自苏沪种业公司。将小麦种子播于长30 cm、宽20 cm、高10 cm的塑料盆中，于上述相同条件下培养，待幼苗生长至约10 cm高时，选取长势一致的供试。

杀虫剂：98%氟吡呋喃酮（flupyradifurone）原药，

北京勤诚亦信科技开发有限公司；95%溴氰虫酰胺（cyantraniliprole）原药、95%烯啶虫胺（nitenpyram）原药、97.3%联苯菊酯（bifenthrin）原药、93.0%高效氯氟氰菊酯（lambda-cyhalothrin）原药、98.0%阿维菌素（abamectin）原药，北京华戎生物激素厂；95%吡虫啉（imidacloprid）原药，浙江海正化工股份有限公司；98.5%噻虫嗪（thiamethoxam）原药，江苏绿叶农化有限公司；96.3%唑虫酰胺（tolfenpyrad）原药，山东海利尔化工有限公司；98%虫螨腈（chlorfenapyr）原药，广西利民药业股份有限公司；93.4%氰戊菊酯（fenvalerate）原药、98.0%溴氰菊酯（deltamethrin），江苏常州常隆化工有限公司。

试剂及仪器：对硝基苯甲醚、98% 5-硝基尿嘧啶（5-nitrouracil，5-Nul），上海源叶生物科技有限公司；对硝基苯酚，上海麦克林生化科技股份有限公司；还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（nicotinamide adenine dinucleotide phosphate，NADPH）、Bradford蛋白浓度测定试剂盒，上海碧云天生物技术股份有限公司；98%磷酸三苯酯（triphenyl phosphate，TPP）、96%顺丁烯二酸二乙酯（diethyl maleate，DEM），上海阿拉丁生化科技有限公司；90%胡椒基丁醚（piperonyl butoxide，PBO），北京百灵威科技有限公司；动物组织总RNA提取试剂盒、FastKing cDNA第一链合成试剂盒、琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒、pLB零背景快速克隆试剂盒，北京天根生化科技有限公司；氨苄青霉素、荧光定量PCR试剂盒Hieff® qPCR SYBR Green Master Mix（Low Rox Plus），上海翌圣生物科技股份有限公司；dsRNA合成试剂盒T7 RiboMAX™ Express RNAi System，普洛麦格生物技术有限公司；Fast-T1感受态细胞，南京诺唯赞生物科技股份有限公司；增强型绿色荧光蛋白（enhanced green fluorescent protein，EGFP）载体由清华大学生物医学交叉研究院赠送；其余化学试剂均为国产分析纯。ABI7500荧光定量PCR仪，美国Applied Biosystem公司；AG-22331 PCR仪、Centrifuge-5427R台式高速离心机，德国Eppendorf公司；Multiskan-Mk3酶标仪，美国Thermo Scientific公司；DS-11 NanoDrop 2000超微量紫外可见分光光度计，美国Denovix公司；GK-330C^{+}凝胶成像分析系统，美国United-Bio公司；DYY-6C多功能电泳仪，北京六一仪器厂；RXZ-500D智能人工气候箱，宁波江南仪器厂；HZQ-F160振荡培养箱，太仓市实验设备厂。

Luria-Bertani（LB）固体培养基：胰蛋白胨10 g、酵母提取物5 g、NaCl 10 g及琼脂15 g，用ddH_2O定容至1 L，于121 ℃高压灭菌30 min，待冷却至约50~55 ℃，按终浓度100 μg/mL加入氨苄青霉素。

1.2　方法

1.2.1　氟吡呋喃酮对麦二叉蚜的毒力测定及抗性种群选育

采用浸渍法（Cui et al.，2016）测定氟吡呋喃酮对麦二叉蚜的毒力。剪取附着有麦二叉蚜敏感种群的新鲜小麦叶片，剔除有翅蚜和若蚜，使每片叶子上保留约30头大小均一的成蚜，备用。将氟吡呋喃酮原药用丙酮溶解并配制成6 000 mg/L的母液，再将母液用0.1%吐温80水溶液等比稀释至2.0、4.0、8.0、16.0和32.0 mg/L，各浓度药液体积均为50 mL。以含有5 mL丙酮的0.1%吐温80水溶液处理作为对照。将带有成蚜的小麦叶片分别浸入各浓度药液中5 s后取出，用吸水纸吸去叶片上多余的药液，放入垫有湿润滤纸的培养皿中，于温度（23±1）℃、相对湿度（55±5）%、光照16 h/黑暗8 h的人工气候箱中培养。每个浓度设置3个重复，每个重复至少30头。培养24 h后检查蚜虫死亡情况，并计算死亡率。用毛笔尖轻触虫体，以试虫足不动者视为死亡。

基于上述测定的氟吡呋喃酮对麦二叉蚜敏感种群的毒力进行抗性种群选育。采用浸渍法，以致死率为70%~80%的氟吡呋喃酮药液（浓度范围10~100 mg/L）处理麦二叉蚜，24 h后将存活的麦二叉蚜转移至新鲜未接触杀虫剂的麦苗上继续饲养，作为下一代选育的虫源。经逐代淘汰选育得到麦二叉蚜抗氟吡呋喃酮种群。汰选期间，每隔两代采用浸渍法测定氟吡呋喃酮对抗性种群的毒力，方法同上。利用SPSS 26.0软件计算氟吡呋喃酮对麦二叉蚜敏感种群和抗性种群的致死中浓度LC_{50}、相关系数以及95%置信限，并计算抗性倍数。抗性倍数=杀虫剂对抗性种群的LC_{50}/杀虫剂对敏感种群的LC_{50}。参照《小麦蚜虫抗药性监测技术规程》（NY/T 2726—2015），将抗性水平分为3级：5.0<抗性倍数≤10.0为低水平抗性；10.0<抗性倍数≤100.0为中等水平抗性；抗性倍数>100.0为高水平抗性。

1.2.2　麦二叉蚜抗性种群对不同杀虫剂的交互抗性测定

将待测杀虫剂原药用丙酮分别配制成3 000 mg/L的母液，试验前用0.1%吐温80水溶液分别稀释至所需浓度。其中吡虫啉浓度为2.5、5.0、10.0、20.0、40.0 mg/L；噻虫嗪浓度为1.0、2.0、4.0、10.0、20.0 mg/L；溴氰菊酯和高效氯氟氰菊酯浓度均为0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、10.0、20.0 mg/L；氰戊菊酯和联苯菊酯浓度为0.25、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 mg/L；溴氰虫酰胺浓度为5.0、10.0、20.0、40.0、80.0 mg/L；阿维菌素浓度为

2.0、4.0、8.0、16.0、32.0、64.0 mg/L；烯啶虫胺和唑虫酰胺浓度均为0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0 mg/L；虫螨腈浓度为0.5、1.0、5.0、10.0、20.0、40.0 mg/L。采用浸渍法分别测定上述杀虫剂对麦二叉蚜抗性种群和敏感种群的毒力，方法同1.2.1，分别计算敏感种群和抗性种群对各杀虫剂的LC_{50}，并计算交互抗性倍数。交互抗性倍数=杀虫剂对抗性种群的LC_{50}/杀虫剂对敏感种群的LC_{50}。

1.2.3 不同增效剂对氟吡呋喃酮的增效作用测定

将氟吡呋喃酮原药用丙酮配制成6 000 mg/L的母液，再用0.1%吐温80水溶液将其等比稀释为7个梯度浓度，分别为2.0、4.0、8.0、16.0、32.0、64.0和128.0 mg/L。各增效剂分别用丙酮配制成5 000 mg/L的母液，试验前用0.1%吐温80水溶液稀释至终浓度，其中P450酶抑制剂PBO、羧酸酯酶抑制剂TPP、谷胱甘肽*S*-转移酶抑制剂DEM均为100 mg/L，尿苷二磷酸糖基转移酶抑制剂5-Nul为400 mg/L。在测定时将相应增效剂与各稀释浓度的氟吡呋喃酮混合，终体积为50 mL。采用浸渍法测定其对麦二叉蚜敏感种群和抗性种群的毒力，方法同1.2.1。以分别含有相应浓度增效剂和1.07 mL丙酮的0.1%吐温80水溶液为对照。计算各处理对麦二叉蚜的LC_{50}，根据增效比评估各增效剂的增效作用，增效比=杀虫剂单用时LC_{50}/杀虫剂与增效剂混用时LC_{50}（Lv et al.，2022）。

1.2.4 麦二叉蚜不同种群的P450酶活性测定

挑取麦二叉蚜敏感种群和抗性种群无翅成蚜各0.1 g，分别加入适量缓冲液后用匀浆器在冰上将样品研磨充分，于4 ℃以15 000 *g*离心15 min，吸取上清酶液待测。以10 μL 0.05 mol/L对硝基苯甲醚为底物，加入100 μL酶液和100 μL NADPH，在1.5 mL离心管中于37 ℃孵育30 min，之后加入100 μL 1 mol/L盐酸和500 μL氯仿终止反应。将离心管在4 ℃、15 000 *g*离心3 min，静置10 min，小心吸取下层液体至新的无菌离心管中。加入0.5 mol/L NaOH溶液500 μL萃取产物，以15 000 *g*离心3 min，吸取上层液体300 μL于波长400 nm处测定吸光度值$A_{400\,nm}$。对照管中用等体积缓冲液替代酶液，其余试剂种类及用量与样品管一致。称取适量对硝基苯酚，用0.5 mol/L NaOH溶液配制成0、1.33、2.67、4.00、5.33、6.67、8.33 μmol/mL的系列标准溶液，以0.5 mol/L NaOH溶液为空白对照，于400 nm处测定各浓度标准溶液的吸光度值。以吸光度值为纵坐标、对硝基苯酚浓度为横坐标绘制标准曲线，拟合得到回归方程。根据回归方程，基于麦二叉蚜提取酶液的$A_{400\,nm}$计算反应体系中对硝基苯酚的生成量，同时使用Bradford蛋白浓度测定试剂盒测定上述提取酶液中的蛋白质含量，最终计算得到P450酶活性，P450酶活性=产物生成量/（蛋白质含量×反应时间）（Wang et al.，2014），即以每毫克蛋白每分钟催化生成对硝基苯酚的量表示P450酶活性。试验均设3次生物学重复。

1.2.5 P450基因的RT-qPCR验证

取10~20 mg麦二叉蚜敏感种群和抗性种群无翅成蚜，按照动物组织RNA试剂盒说明书提取其总RNA。使用超微量紫外可见分光光度计分析RNA样品的纯度和浓度，并通过1%琼脂糖凝胶电泳评估RNA的完整性。参照FastKing cDNA第一链合成试剂盒说明书，以1 μg总RNA为模板合成cDNA，于−20 ℃储存备用。基于本团队前期获得的麦二叉蚜转录组数据，筛选出在抗性种群中表达量显著上调的5个P450基因*CYP380C6*、*CYP4CJ1*、*CYP4C1*、*CYP4CJ5*及*CYP6CY9*进行验证。利用Primer Premier 6.0软件设计上述基因的扩增引物（表1），以制备的cDNA为模板，以*Rpl7*为内参基因（Zhang et al.，2016），对目的基因进行RT-qPCR扩增。本研究所有引物均委托浙江有康生物科技有限公司合成。20 μL反应体系：Hieff® qPCR SYBR Green Master Mix预混料10 μL、10 μmol/L正反向引物各0.4 μL、cDNA模板1 μL、RNase-Free ddH_2O 8.2 μL。反应程序：95 ℃孵育15 min；95 ℃变性10 s，60 ℃退火20 s，72 ℃延伸32 s，进行40个循环。每个处理设置3个生物重复和3个技术重复。采用$2^{-\triangle\triangle Ct}$方法计算基因的相对表达量（Livak & Schmittgen，2001）。

1.2.6 麦二叉蚜P450基因的克隆及测序分析

基于1.2.5结果对经验证上调表达的*CYP4C1*、*CYP4CJ1*、*CYP4CJ5*和*CYP380C6*这4个P450基因进行克隆和测序分析，以明确上调表达基因的特性及其在抗性和敏感种群中的表达差异。检索本团队前期获得的麦二叉蚜转录组数据，针对各基因的编码区序列利用Primer Premier 6.0软件设计特异性引物（表1）。采用1.2.5方法制备麦二叉蚜敏感种群和抗性种群的cDNA，以其为模板进行PCR扩增。25 μL反应体系：cDNA模板1.0 μL、*Taq*酶Mix 12.5 μL、上下游引物各1 μL、ddH_2O 9.5 μL。PCR反应程序：94 ℃预变性3 min；94 ℃变性30 s，55 ℃退火30 s，72 ℃延伸1 min，30个循环；72 ℃终延伸

5 min。将PCR扩增产物用1%琼脂糖凝胶电泳检测后切下目的条带，用琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒进行胶回收，利用pLB零背景快速克隆试剂盒将回收产物连接到克隆载体上，然后转入Fast-T1感受态细胞中，将转化后的菌液均匀涂布于含有100 μg/mL氨苄青霉素的LB固体培养基上，在37 ℃培养箱中倒置培养12~16 h，至单菌落长出后挑取阳性克隆，送杭州有康生物科技公司测序。利用DNAMAN 6.0软件对测序结果进行序列比对分析。

表1 本试验所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物 Primer	引物序列(5′−3′) Primer sequence (5′−3′)	用途 Usage
cyp4c1-qF	TAACAATGACAGTCGCGGGCA	检测基因的表达水平
cyp4c1-qR	CACGAACACATTGGAGCCCT	Detecting the expression level of genes
cyp6cy9-qF	GTACTCCACCGACGTGATCG	
cyp6cy9-qR	GCTCCTTGAAAATCGTGCGG	
cyp380c6-qF	AACCATAAGCAAGCCAGAA	
cyp380c6-qR	AGCCTTCACCTACAGTATTC	
cyp4cj1-qF	CGACCGAGACTCAACAAT	
cyp4cj1-qR	CGACCACCATAACCGATT	
cyp4cj5-qF	ATAGCGATAGAGAAGCAACT	
cyp4cj5-qR	CTACTGACTGTGGTGGAAT	
RpL7-qF	CCGAAAAGCTGTCATAATGAAGACC	
RpL7-qR	GGTGAAACCTTGTCTACTGTTACATCTTG	
cyp4cj1-cF	GTTATCAATTAGGCGATGCT	克隆基因的编码区全长
cyp4cj1-cR	GCTCTCATTATCAACTGTGT	Cloning the full-length coding regions
cyp4cj5-cF	CACCATCAGCCTTATTATACG	
cyp4cj5-cR	TACTCAGCCCTGCCTATG	
cyp4c1-cF	CGTCGCACACGATGTTTG	
cyp4c1-cR	GTCCGATCTTGCGTTCTC	
cyp380c6-cF	TTAGTCGTGGTTGGAACAT	
cyp380c6-cR	CTATCACAAATTGTCCTTCC	
cyp4cj1-iF	taatacgactcactatagggTCAACAATGGAAGACCTCAA	dsRNA合成 dsRNA synthesis
cyp4cj1-iR	taatacgactcactatagggGGCAAGTAATCCGCTCTC	
cyp4cj5-iF	taatacgactcactatagggAGAAGCAACTATGGCAGAT	
cyp4cj5-iR	taatacgactcactatagggGTTTGATGTCGGGTAATGAT	
cyp4c1-iF	taatacgactcactata gggAATGACGAAGGTGCTGATT	
cyp4c1-iR	taatacgactcactatagggACTGAACTTGTGCCGATT	
cyp380c6-iF	taatacgactcactatagggCGAATGACAAGTACCGAGTT	
cyp380c6-iR	taatacgactcactatagggCTGGAGTAATAAGACGACGAT	
EGFP-iF	taatacgactcactatagggGACGTAAACGGCCACAAGTT	
EGFP-iR	taatacgactcactatagggTGTTCTGCTGGTAGTGGTCG	

引物序列中的小写字母为T7启动子序列。Lowercase letters in the primer sequence represent the T7 promoter sequence.

1.2.7 *麦二叉蚜P450基因的生物信息学分析*

利用在线软件ProtParam（https://web.expasy.org/protparam/）分析1.2.6所获得的*CYP4C1*、*CYP4CJ1*、*CYP4CJ5*和*CYP380C6*基因编码的氨基酸序列，预测蛋白质的分子式、理论相对分子质量、理论等电点以及不稳定指数，并据此判断这些蛋白质的稳定性。通过在线软件TMHMM 2.0（https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0）和DeepTMHMM 1.0（https://dtu.biolib.com/DeepTMHMM/）预测蛋白质是否存在跨膜结构域。通过

在线软件SignalP 5.0（https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0）预测蛋白质是否存在信号肽及剪切位点。通过与NCBI数据库（https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast. cgi）中多种昆虫的P450氨基酸序列进行比对，下载相似度高的相关序列，利用MEGA 12.0软件采用邻接法构建系统发育树，参数设置1 000次重复。

1.2.8 沉默P450后麦二叉蚜对药剂的敏感性测定

为验证上调表达的P450基因在麦二叉蚜对氟吡呋喃酮抗性中的功能，通过RNAi技术分别敲低*CYP4CJ5*、*CYP4CJ1*、*CYP4C1*和*CYP380C6*基因在麦二叉蚜抗性种群（F_{18}代）体内的表达量。利用Primer Premier 6.0软件设计用于合成dsRNA的特异性引物（表1）。采用1.2.5方法制备麦二叉蚜抗性种群cDNA作为模板，对上述4个基因进行PCR扩增，获得用于体外合成其双链RNA（double-stranded RNA，dsRNA）的目的片段，扩增方法同1.2.6。使用琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒回收目的片段。以回收产物为模板，使用dsRNA合成试剂盒T7 RiboMAX™ Express RNAi System在体外合成dsRNA。将dsRNA和5%蔗糖溶液混合配制成200 ng/μL的饲喂液，以饲喂ds*EGFP*的麦二叉蚜抗性种群作为对照组。ds*EGFP*的合成模板为EGFP载体，采用与目的基因dsRNA相同的方法体外合成ds*EGFP*。取一个两端开口的长6 cm、内径3 cm的圆柱形玻璃管，将封口膜拉伸至尽可能地透薄，覆盖在玻璃管开口的一端，取配制好的饲喂液滴加200 μL在玻璃管封口端外侧封口膜上，再拉展一层封口膜覆盖在其上，使饲喂液均匀分布在两层封口膜中间。每管挑取饥饿6 h的100~200头麦二叉蚜抗性种群无翅成蚜，用双层纱布封住另一端开口，用皮筋绑好后放入培养箱饲养，饲养条件同1.1。每个处理3个生物学重复。48 h后取出存活的麦二叉蚜，采用1.2.5方法提取RNA并反转录合成cDNA后进行RT-qPCR测定目的基因的干扰效率；同时测定存活试虫对氟吡呋喃酮的敏感性，方法同1.2.1，氟吡呋喃酮的处理浓度选用抗性种群F_{18}代的LC_{50}（187 mg/L）。

1.3 数据分析

利用SPSS 26.0软件进行数据统计分析，应用独立样本*t*检验法进行差异显著性检验。利用GraphPad Prism 9.0软件绘图。

2 结果与分析

2.1 麦二叉蚜对氟吡呋喃酮的抗性选育

以麦二叉蚜敏感种群作为F_0代初始试虫，经氟吡呋喃酮汰选20代得到抗性倍数为26.06倍的抗性种群，达到中等抗性水平（表2）。在早期汰选世代（F_2~F_4代），氟吡呋喃酮对抗性种群的LC_{50}从12.627 mg/L迅速上升至61.523 mg/L，抗性倍数大幅增加，表明这一阶段抗性发展极为迅速；此后，虽然LC_{50}仍在持续升高，但抗性倍数增长幅度相对较小，说明抗性发展速度在不同阶段有所波动，并非始终保持一致的增长速率。

表2 麦二叉蚜对氟吡呋喃酮的抗性发展

Table 2 Development of resistance to flupyradifurone in *Schizaphis graminum*

汰选世代 Generation	LC_{50}/（mg/L）	95%置信限 95% confidence limits/（mg/L）	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient	抗性倍数 Resistance ratio
F_0	8.297	0.579−16.106	y=−1.53+1.66x	0.942	−
F_2	12.627	5.315−30.094	y=−1.12+1.02x	0.938	1.52
F_4	61.523	39.246−132.030	y=−1.83+1.03x	0.991	7.42
F_6	86.615	64.634−126.418	y=−3.18+1.64x	0.952	10.44
F_8	108.087	76.813−149.243	y=−2.13+1.05x	0.969	13.03
F_{10}	139.297	111.695−197.229	y=−2.63+1.23x	0.961	16.79
F_{12}	121.241	91.454−157.786	y=−2.02+0.99x	0.952	14.61
F_{14}	125.399	47.995−205.133	y=−2.91+1.41x	0.954	15.11
F_{16}	159.352	122.231−197.172	y=−4.17+1.89x	0.997	19.21
F_{18}	187.552	155.268−229.298	y=−4.30+1.90x	0.992	22.60
F_{20}	216.252	175.817−270.890	y=−3.78+1.62x	0.986	26.06

x为氟吡呋喃酮浓度的对数值，y为死亡率对应的概率单位值。x is the logarithm of the flupyradifurone concentration, and y is the corresponding probit value to mortality.

2.2　氟吡呋喃酮抗性种群对不同杀虫剂的交互抗性

麦二叉蚜对氟吡呋喃酮产生中等水平抗性后，对溴氰菊酯的抗性倍数为5.83倍，存在低水平的交互抗性；对烯啶虫胺和唑虫酰胺可能存在负交互抗性；对吡虫啉、噻虫嗪、高效氯氟氰菊酯、氰戊菊酯、联苯菊酯、溴氰虫酰胺、阿维菌素、虫螨腈的敏感性并无明显变化，其抗性倍数分别为2.89倍、2.88倍、1.55倍、1.75倍、3.38倍、3.53倍、1.03倍和2.06倍，说明抗氟吡呋喃酮麦二叉蚜对上述8种杀虫剂无明显交互抗性（表3）。

表3　麦二叉蚜氟吡呋喃酮抗性种群对其他杀虫剂的交互抗性

Table 3　Cross-resistance of the flupyradifurone-resistant population of *Schizaphis graminum* to other insecticides

杀虫剂 Insecticide	种群 Population	LC_{50}/（mg/L）	95%置信限 95% confidence limits/（mg/L）	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient	交互抗性倍数 Cross-resistance ratio
噻虫嗪	SP	5.600	4.167−8.245	y=−0.90+1.20x	0.985	−
Thiamethoxam	RP	16.153	9.861−37.656	y=−1.01+0.83x	0.998	2.88
吡虫啉	SP	4.340	3.333−5.347	y=−1.31+2.03x	0.987	−
Imidacloprid	RP	12.548	10.021−15.753	y=−2.49+2.28x	0.977	2.89
溴氰菊酯	SP	0.792	0.615−0.961	y=0.17+1.81x	0.980	−
Deltamethrin	RP	4.619	3.607−5.958	y=−1.02+1.53x	0.997	5.83
高效氯氟氰菊酯	SP	0.911	0.005−1.707	y=0.04+0.92x	0.998	−
Lambda-cyhalothrin	RP	1.411	0.121−4.165	y=−0.22+1.29x	0.998	1.55
氰戊菊酯	SP	2.913	0.958−47.222	y=−0.50+1.35x	0.930	−
Fenvalerate	RP	5.094	3.544−8.245	y=−0.65+0.92x	0.956	1.75
联苯菊酯	SP	3.520	1.561−11.803	y=−0.49+0.93x	0.962	−
Bifenthrin	RP	11.897	5.598−55.243	y=−0.84+0.77x	0.932	3.38
溴氰虫酰胺	SP	32.256	18.177−62.326	y=−3.08+2.04x	0.956	−
Cyantraniliprole	RP	114.017	69.996−559.632	y=−2.34+1.14x	0.990	3.53
阿维菌素	SP	5.703	4.393−7.575	y=−1.13+1.50x	0.983	−
Abamectin	RP	5.868	0.905−9.639	y=−1.74+2.28x	0.979	1.03
烯啶虫胺	SP	8.306	5.769−12.580	y=−0.65+0.72x	0.965	−
Nitenpyram	RP	5.963	0.549−95.546	y=−0.57+0.77x	0.918	0.72
唑虫酰胺	SP	7.208	2.072−41.308	y=−0.94+1.19x	0.929	−
Tolfenpyrad	RP	4.871	1.306−14.953	y=−0.74+1.24x	0.949	0.66
虫螨腈	SP	6.091	3.582−10.086	y=−0.78+0.97x	0.974	−
Chlorfenapyr	RP	12.530	8.506−18.239	y=−1.34+1.20x	0.993	2.06

SP：敏感种群；RP：抗性种群。x为氟吡呋喃酮浓度的对数值，y为死亡率对应的概率单位值。SP: Susceptible population; RP: resistant population. x is the logarithm of the flupyradifurone concentration, and y is the corresponding probit to mortality.

2.3　不同增效剂对氟吡呋喃酮的增效作用

在测定氟吡呋喃酮对麦二叉蚜敏感种群的毒力时，P450酶抑制剂PBO表现出显著的增效作用，增效比为9.816；而TPP、DEM和5-Nul的增效作用均不明显，增效比分别为1.837、1.232和1.051，表明P450在麦二叉蚜对氟吡呋喃酮的代谢中发挥着重要作用（表4）。在测定氟吡呋喃酮对麦二叉蚜抗性种群的毒力时，PBO、TPP、DEM和5-Nul四种增效剂均表现出显著的增效作用，其增效比分别为69.826、6.349、12.514和5.745，表明P450、羧酸酯酶、谷胱甘肽*S*-转移酶和尿苷二磷酸糖基转移酶均可能参与了麦二叉蚜对氟吡呋喃酮抗性的形成，但PBO的增效作用远高于其他3种增效剂，而且其在抗性种群中的增效比显著高于敏感种群（表4），表明P450酶系在麦二叉蚜对氟吡呋喃酮的抗性形成中贡献更突出，推测P450酶活性增强是麦二叉蚜对氟吡呋喃酮产生抗性的重要原因。

2.4　麦二叉蚜不同种群中的P450酶活性

麦二叉蚜抗性种群的P450酶活性是敏感种群的1.96倍，显著高于敏感种群（图1），进一步证明P450酶活性增强是麦二叉蚜对氟吡呋喃酮产生抗性的重要原因。

表4 麦二叉蚜敏感与抗性种群中4种增效剂对氟吡呋喃酮的增效作用

Table 4 Synergistic effects of four synergists on flupyradifurone toxicity in susceptible and resistant populations of *Schizaphis graminum*

种群 Population	处理 Treatment	LC_{50}/（mg/L）	95%置信限 95% confidence limits/（mg/L）	回归方程 Regression equation	增效比 Synergism ratio
敏感种群 Susceptible population	氟吡呋喃酮 Flupyradifurone	11.554	9.114−16.240	y=−1.74+1.66x	−
	氟吡呋喃酮+PBO Flupyradifurone+PBO	1.177	0.519−2.029	y=−0.05+0.71x	9.816
	氟吡呋喃酮+TPP Flupyradifurone+TPP	6.288	3.948−9.870	y=−0.64+0.97x	1.837
	氟吡呋喃酮+DEM Flupyradifurone+DEM	9.371	7.110−12.369	y=−1.22+1.29x	1.232
	氟吡呋喃酮+5-Nul Flupyradifurone+5-Nul	10.991	6.455−55.593	y=−0.96+0.93x	1.051
抗性种群 Resistant population	氟吡呋喃酮 Flupyradifurone	216.252	175.817−270.890	y=−3.78+1.62x	−
	氟吡呋喃酮+PBO Flupyradifurone+PBO	3.097	0.832−6.333	y=−0.22+0.50x	69.826
	氟吡呋喃酮+TPP Flupyradifurone+TPP	34.063	24.558−47.622	y=−1.96+1.28x	6.349
	氟吡呋喃酮+DEM Flupyradifurone+DEM	17.281	9.544−28.709	y=−0.89+0.72x	12.514
	氟吡呋喃酮+5-Nul Flupyradifurone+5-Nul	37.644	23.808−64.205	y=−1.21+0.77x	5.745

PBO：胡椒基丁醚；TPP：磷酸三苯酯；DEM：顺丁烯二酸二乙酯；5-Nul：5-硝基尿嘧啶。x为氟吡呋喃酮浓度的对数值，y为死亡率对应的概率单位值。PBO: Piperonyl butoxide; TPP: triphenyl phosphate; DEM: diethyl maleate; 5-Nul: 5-nitrouracil。x is the logarithm of the flupyradifurone concentration, and y is the corresponding probit to mortality.

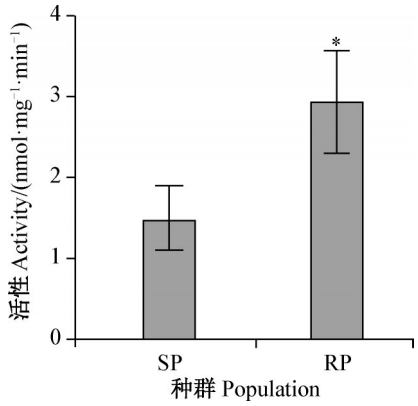


图1 麦二叉蚜敏感种群（SP）和抗性种群（RP）中细胞色素P450的活性

Fig. 1 Cytochrome P450 activity in susceptible (SP) and resistant populations (RP) of *Schizaphis graminum*

图中数据为平均数±标准差。*表示敏感种群与抗性种群之间经独立样本t检验法检验显著差异（P<0.05）。Data are mean±SD. * indicates a significant difference between the susceptible and resistant populations according to an independent-samples t test (P<0.05).

2.5 麦二叉蚜抗性、敏感种群中P450基因表达量

RT-qPCR检测结果证实，麦二叉蚜抗性种群中*CYP4CJ1*、*CYP380C6*、*CYP4C1*和*CYP4CJ5*的表达量均较敏感种群显著上调，分别为敏感种群的1.56倍、1.68倍、2.38倍和2.68倍，而*CYP6CY9*的表达量在抗性种群与敏感种群间无显著差异（图2）。该结果与麦二叉蚜抗性种群的P450酶活性升高现象相吻合，进一步表明P450基因的上调表达可能是介导麦二叉蚜对氟吡呋喃酮产生抗性的重要机制。

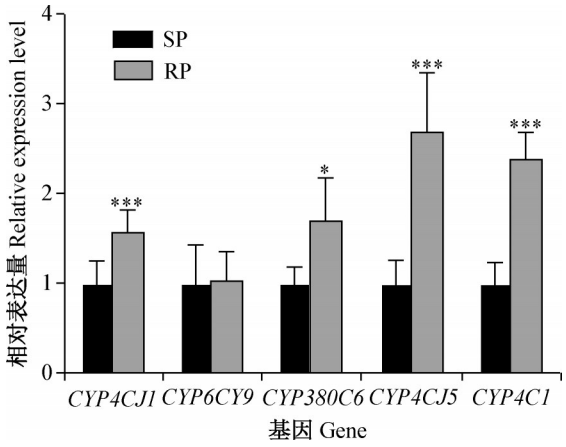


图2 麦二叉蚜敏感种群（SP）和抗性种群（RP）中细胞色素P450基因的相对表达量

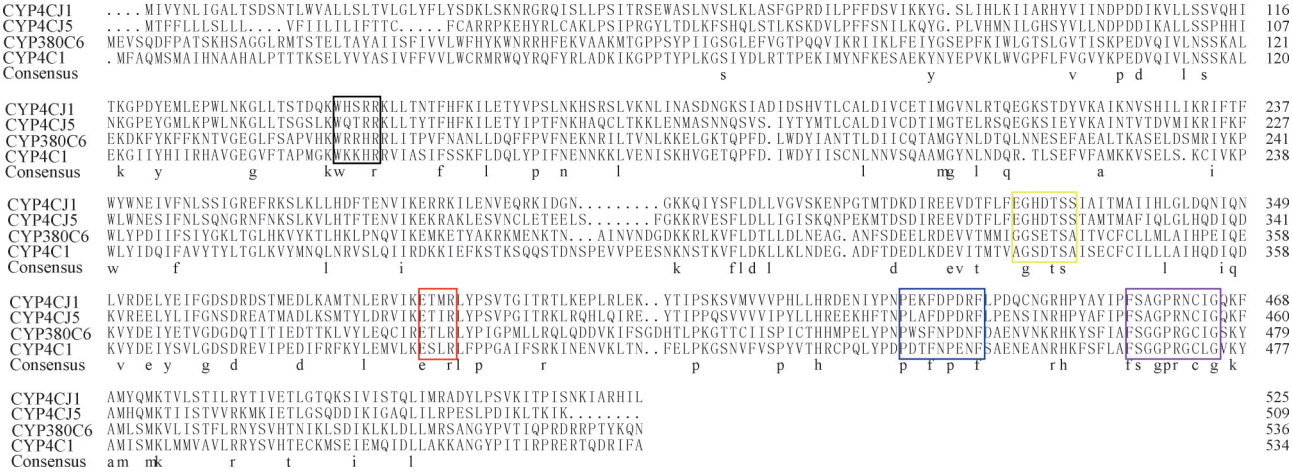
Fig. 2 Relative expression levels of cytochrome P450 genes in susceptible (SP) and resistant populations (RP) of *Schizaphis graminum*

图中数据为平均数±标准差。*和***表示敏感种群与抗性种群之间经独立样本t检验法检验显著差异（P<0.05和P<0.001）。Data are mean±SD. * or *** indicates a significant difference between the susceptible and resistant populations according to an independent-samples t test (P<0.05 or P<0.001).

2.6 麦二叉蚜P450基因克隆及生物信息学分析

分别以抗性、敏感种群麦二叉蚜cDNA为模板，通过PCR克隆上调表达的*CYP4C1*、*CYP4CJ1*、

*CYP4CJ5*和*CYP380C6*基因的编码区全长，分别为1 602、1 578、1 528和1 610 bp。生物信息学分析结果显示，预测的CYP4C1、CYP4CJ1、CYP4CJ5和CYP380C6蛋白质的分子式分别为$C_{2795}H_{4345}N_{725}O_{790}S_{26}$、$C_{2721}H_{4358}N_{728}O_{780}S_{17}$、$C_{2673}H_{4253}N_{703}O_{742}S_{23}$和$C_{2786}H_{4366}N_{726}O_{793}S_{22}$，分别编码533、526、509和536个氨基酸，分子量分别为61.58、60.30、58.85和61.43 kD，等电点分别为8.71、9.08、9.25和8.75。CYP4C1、CYP4CJ1、CYP4CJ5和CYP380C6蛋白质均具有P450蛋白的保守结构域：C-螺旋WxxxR结构域、血红素结合位点F/YxxGxRxCxG/A、K螺旋ExxR结构域、I螺旋(A/G)Gx(D/E)T(T/S)结构域和PxxFxPxxF结构域，属于典型的昆虫P450家族蛋白(图3)。氨基酸序列比对发现，敏感和抗性种群间CYP4C1、CYP4CJ1和CYP4CJ5不存在差异位点，但两种群间CYP380C6存在1个氨基酸差异位点(T381S)(图4)。经TMHMM 2.0和DeepTMHMM 1.0在线软件预测，CYP4C1在26~40位点处存在1个跨膜结构域，CYP4CJ1在15~34位点处存在1个跨膜结构域，CYP4CJ5在2~24位点处存在1个跨膜结构域，CYP380C6在20~39位点处存在1个跨膜结构域。Signal 5.0在线软件预测显示，CYP4C1、CYP4CJ1、CYP4CJ5和CYP380C6均不含信号肽。



黑色方框：C螺旋WxxxR结构域；红色方框：K螺旋ExxR结构域；蓝色方框：PxxFxPxxF结构域；紫色方框：血红素结合位点F/YxxGxRxCxG/A；黄色方框：I螺旋(A/G)Gx(D/E)T(T/S)结构域。Black box: Helix-C motif (WxxxR); red box: helix-K motif (ExxR); blue box: PxxFxPxxF motif; purple box: heme-binding motif (F/YxxGxRxCxG/A); yellow box: helix-I motif ((A/G)Gx(D/E)T(T/S)).

图3　麦二叉蚜CYP4CJ1、CYP4CJ5、CYP4C1、CYP380C6氨基酸序列保守结构域分析

Fig. 3　Conserved domain analysis of the amino acid sequences of CYP4CJ1, CYP4CJ5, CYP4C1 and CYP380C6 in *Schizaphis graminum*



图4　麦二叉蚜敏感种群(SP)和抗性种群(RP)*CYP380C6*基因编码区推导的氨基酸序列比对

Fig. 4　Alignment of deduced amino acid sequences encoded by the *CYP380C6* coding region in susceptible (SP) and resistant (RP) populations of *Schizaphis graminum*

基于P450氨基酸序列的系统进化树显示，麦二叉蚜CYP4C1与棉蚜*Aphis gossypii*的P450 4C1-like亲缘关系最近，氨基酸同源性为96.06%，其次是黄甘蔗蚜*Sipha flava*的亲缘关系较近，氨基酸同源性

为82.13%，与黄杉球蚜*Adelges cooleyi*和葡萄根瘤蚜*Daktulosphaira vitifoliae*的氨基酸同源性较低，分别为65.08%和62.05%（图5）。麦二叉蚜CYP4CJ1与禾谷缢管蚜*Rhopalosiphum padi*的P450 4C1-like亲缘关系最近，氨基酸同源性为98.86%，与麦双尾蚜*Diuraphis noxia*的P450 4C1-like亲缘关系较近，氨基酸同源性为87.26%（图5）。麦二叉蚜CYP4CJ5与豌豆蚜*Acyrthosiphon pisum*的P450 4C1-like亲缘关系最近，氨基酸同源性为89.16%，与大豆蚜*Aphis glycines*、麦双尾蚜、黄杉球蚜、黄甘蔗蚜的氨基酸同源性分别为89.57%、83.98%、73.47%、74.90%（图5）。麦二叉蚜CYP380C6与禾谷缢管蚜的CYP380C6亲缘关系最近，氨基酸同源性为97.01%，与高粱蚜*Melanaphis sacchari*、黄甘蔗蚜、棉蚜、花生蚜*Aphis craccivora*的亲缘关系较近，氨基酸同源性分别为89.78%、82.84%、81.87%和78.32%（图5）。

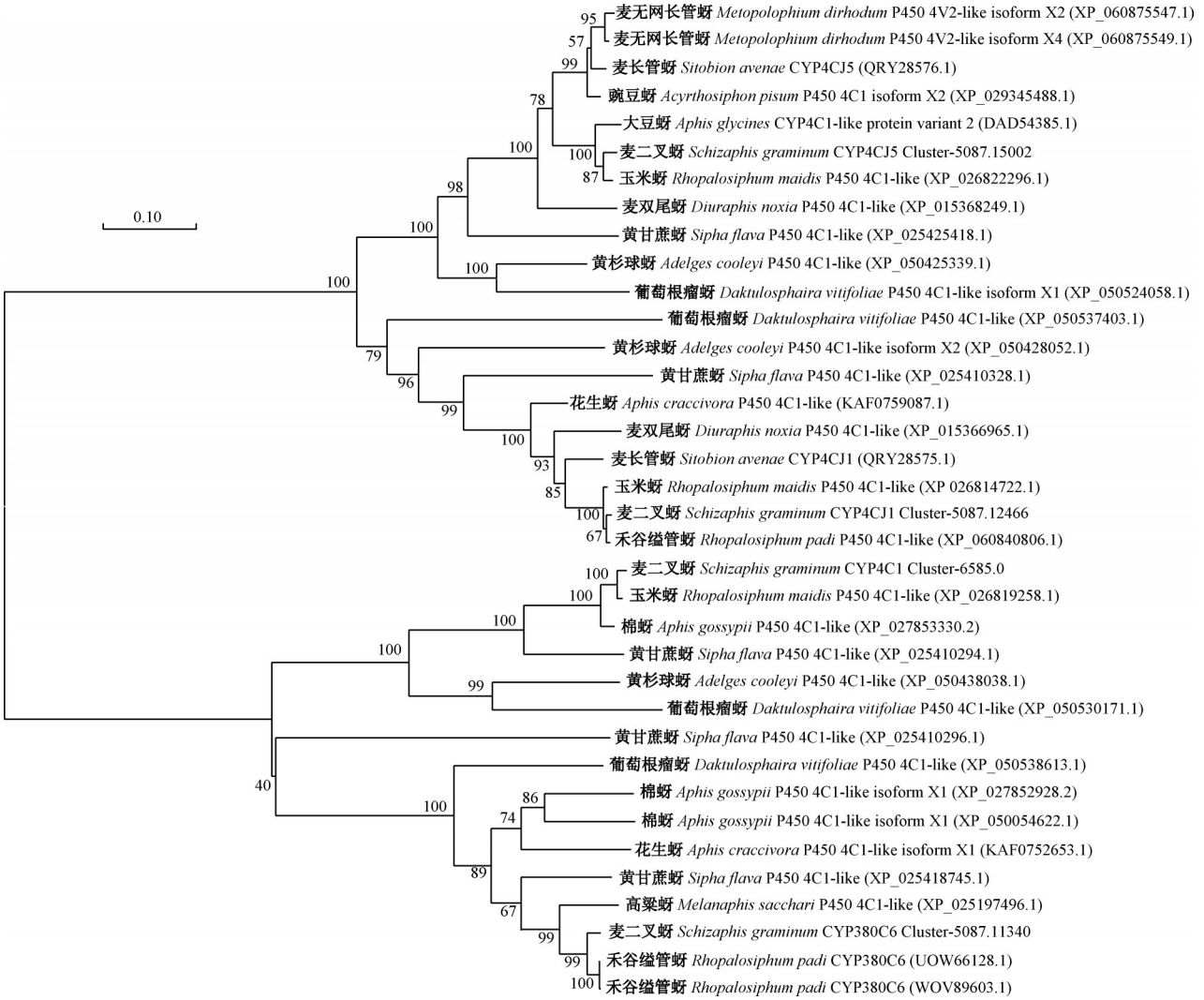


图5 基于氨基酸序列采用邻接法构建麦二叉蚜4个P450基因及其同源序列的系统发育树

Fig. 5 Neighbor-joining phylogenetic tree of four P450 proteins from *Schizaphis graminum* and their homologs based on amino acid sequences

2.7 RNAi对麦二叉蚜P450基因表达量及敏感性的影响

RNAi结果表明，以*CYP4CJ5*、*CYP4CJ1*、*CYP4C1*和*CYP380C6*基因的dsRNA饲喂液（200 ng/μL）分别饲喂麦二叉蚜抗性种群48 h后，*CYP4CJ5*、*CYP4CJ1*、*CYP4C1*和*CYP380C6*基因的相对表达量分别较饲喂ds*EGFP*的对照显著下降了29.31%、28.77%、23.03%和38.06%（图6-A~D）。

沉默*CYP4CJ5*、*CYP4CJ1*、*CYP4C1*和*CYP380C6*基因后，用187 mg/L氟吡呋喃酮（对F_{18}代抗性种群的LC_{50}）分别处理麦二叉蚜，其死亡率比饲喂ds*EGFP*的对照分别显著增加了17.19%、27.47%、25.13%和17.97%（图6-E~H），表明沉默P450基因后试虫对氟

吡呋喃酮的敏感性增强，进一步证明这4个P450基因上调表达介导麦二叉蚜对氟吡呋喃酮的抗性。

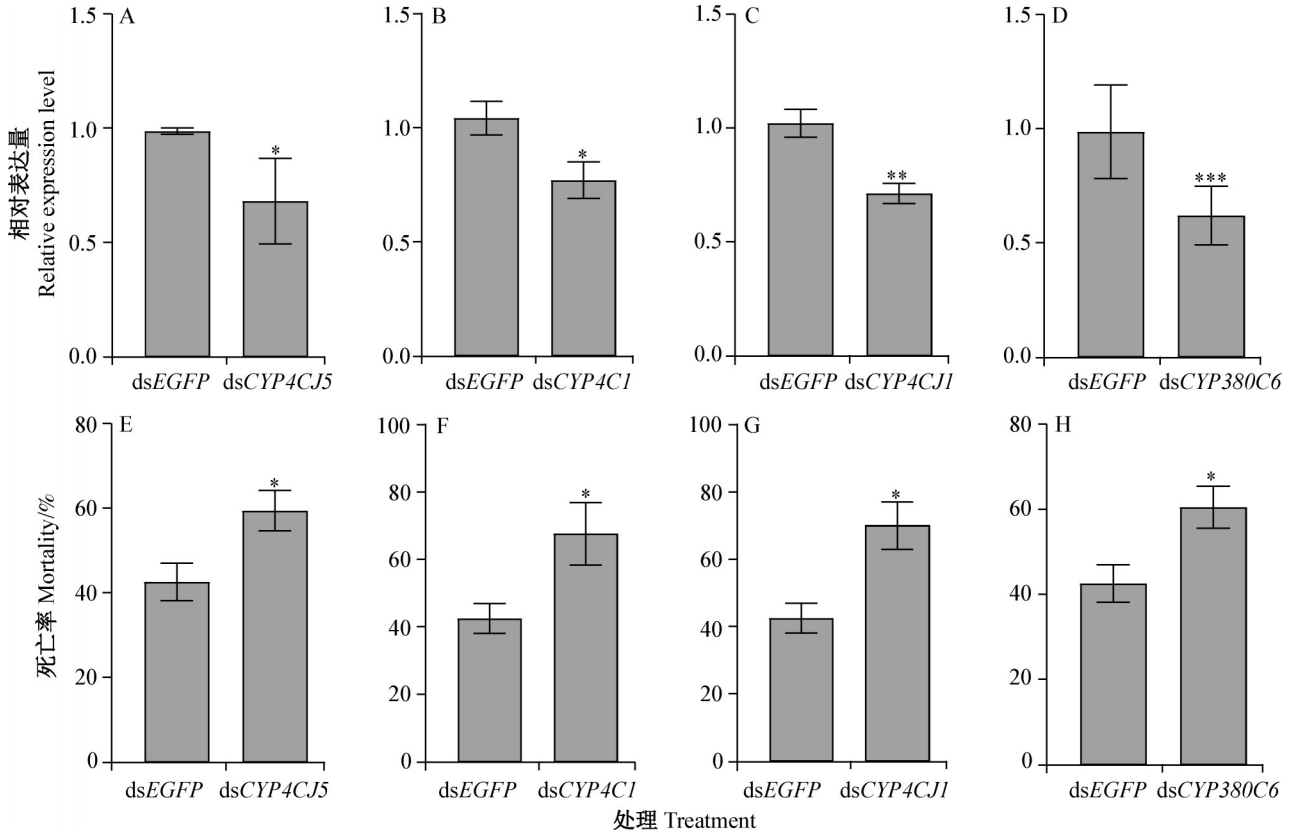


图6　饲喂dsRNA后麦二叉蚜细胞色素P450基因的相对表达水平（A~D）及LC_{50}氟吡呋喃酮处理后试虫的死亡率（E~H）

Fig. 6　Relative expression levels of cytochrome P450 genes after dsRNA feeding (A−D) and mortality of *Schizaphis graminum* treated with LC_{50} flupyradifurone following dsRNA feeding (E−H)

图中数据为平均数±标准差。*、**和***表示处理与对照之间经独立样本*t*检验法检验显著差异（$P<0.05$、$P<0.01$和$P<0.001$）。Data are mean±SD. *, ** and *** indicate significant differences between the treatment and control groups according to an independent-samples *t* test ($P<0.05$, $P<0.01$ or $P<0.001$).

3　讨论

氟吡呋喃酮是一种低毒、高效、对蜜蜂安全、对环境友好的新型新烟碱类杀虫剂，自2014年上市以来被广泛应用于防治蚜虫、粉虱、叶蝉等刺吸式口器害虫（刘刚，2024）。但随着该杀虫剂的大范围推广应用，害虫对其的抗性问题也随之而来。在国内，采集自天津市东丽区和武汉市洪山区的烟粉虱对氟吡呋喃酮表现出低水平抗性（Guo et al.，2020）；采集自太原、西双版纳、萍乡和宁德等市（州）的桃蚜对氟吡呋喃酮产生了中等水平抗性（Tang et al.，2025）。在国外，从希腊烟草和桃上采集的桃蚜对氟吡呋喃酮表现出从低水平到高水平不同程度的抗性（Papadimitriou et al.，2022）。本研究采用氟吡呋喃酮对麦二叉蚜连续汰选20代，得到麦二叉蚜氟抗吡呋喃酮种群，抗性倍数为26.06倍，处于中等抗性水平，表明麦二叉蚜对氟吡呋喃酮的抗性具有发展的潜力，因此在田间使用该杀虫剂时应注意进行麦蚜抗药性监测与管理。

明确害虫对不同杀虫剂的交互抗性是抗性治理成功的关键，也是评估杀虫剂抗性风险的重要内容（中华人民共和国农业部，2017）。本研究结果表明，麦二叉蚜抗氟吡呋喃酮种群对吡虫啉、噻虫嗪、高效氯氟氰菊酯、氰戊菊酯、联苯菊酯、溴氰虫酰胺、阿维菌素、虫螨腈、烯啶虫胺和唑虫酰胺这10种杀虫剂均无交互抗性。这可能与氟吡呋喃酮与其他杀虫剂的化学结构不同有关，该杀虫剂为丁烯酸内酯类化合物，含有独特的二氟乙基取代基。Wang et al.（2020）报道烟粉虱抗氟吡呋喃酮种群对吡虫啉有中等水平的交互抗性，而对噻虫嗪、啶虫脒、烯啶虫胺和氟啶虫胺腈等其他新烟碱类杀虫剂没有交互抗性。因此，在田间使用氟吡呋喃酮防治麦二叉蚜时，

可以选择阿维菌素、虫螨腈、唑虫酰胺和烯啶虫胺等杀虫剂轮换或者交替使用，以有效防治麦二叉蚜，并延缓其抗药性的发展。

代谢抗性已被证明是导致害虫对不同杀虫剂产生抗性的重要原因（Kaleem Ullah et al.，2023）。昆虫体内能够代谢杀虫剂等外源物质的解毒酶系主要包括P450、羧酸酯酶、谷胱甘肽*S*-转移酶和ATP结合盒转运蛋白等（Berenbaum & Johnson，2015）。其中P450酶系在代谢抗性中常发挥核心作用，其可通过羟基化、环氧化等多种反应直接降解杀虫剂，从而降低药效（Feyereisen，2012；Nauen et al.，2022）。大量研究表明P450酶活性增强是多种害虫对新烟碱类杀虫剂产生抗性的关键机制。例如，Chen et al.（2020）研究表明，棉蚜抗呋虫胺种群中P450酶活性显著高于敏感种群。Ma et al.（2019）报道棉蚜对氟啶虫胺腈的抗性增强与其P450酶活性显著提高有关。Wang et al.（2018）和Zhang et al.（2020）亦分别报道禾谷缢管蚜和麦长管蚜*Sitobion avenae*抗吡虫啉种群中P450酶活性显著高于敏感种群，表明P450酶活性增强是试虫对吡虫啉产生抗性的重要原因之一。在本研究中，麦二叉蚜抗氟吡呋喃酮种群中P450酶抑制剂PBO对氟吡呋喃酮表现出明显的增效作用，并且P450酶活性显著高于敏感种群，初步表明P450在麦二叉蚜对氟吡呋喃酮的解毒代谢及抗性中发挥着重要作用。类似的结果在其他害虫中也有报道，如烟粉虱抗氟吡呋喃酮种群的P450酶活性是敏感种群的3.15倍，表明烟粉虱对氟吡呋喃酮的抗性与P450酶活性增强有关（Wang et al.，2020）。与敏感种群相比，温室白粉虱*Trialeurodes vaporariorum*抗氟吡呋喃酮种群的P450酶活性显著升高（Jin et al.，2023）。Tang et al.（2025）研究发现桃蚜抗氟吡呋喃酮种群的P450酶活性是敏感种群的1.74倍，推测P450酶活性升高是桃蚜对氟吡呋喃酮产生抗性的重要原因。综上，可以认为P450酶系与多种害虫对氟吡呋喃酮的抗性密切相关。

解毒代谢酶基因过量表达也是昆虫对杀虫剂产生抗性的核心分子机制。P450基因表达量上调引起的新烟碱类杀虫剂代谢抗性在多种害虫中被报道。例如，*CYP6A14-1*基因在麦长管蚜抗吡虫啉种群中显著上调，且沉默*CYP6A14-1*基因后麦长管蚜的死亡率显著升高（Zhang et al.，2020）。获草谷网蚜对吡虫啉产生抗性可能与*CYP6CY1*基因过量表达有关（Xiong et al.，2025）。在本研究中，麦二叉蚜抗性种群中*CYP4CJ1*、*CYP380C6*、*CYP4C1*、*CYP4CJ5*基因均显著上调表达，且沉默这4个基因后麦二叉蚜对氟吡呋喃酮的敏感性上升，LC_{50}氟吡呋喃酮处理下试虫死亡率也显著增加，证明*CYP4CJ5*、*CYP4CJ1*、*CYP4C1*和*CYP380C6*基因的过量表达引起了麦二叉蚜对氟吡呋喃酮的抗性。Tang et al.（2025）也发现沉默*CYP6CY36*和*CYP380C34*基因会显著增加桃蚜对氟吡呋喃酮的敏感性，表明P450基因过量表达是桃蚜对氟吡呋喃酮产生抗性的重要原因；Wang et al.（2020）则通过RNAi技术证明烟粉虱中*CYP6CX4*的过量表达与氟吡呋喃酮抗性有关；Jin et al.（2023）研究发现，与敏感种群相比，温室白粉虱抗氟吡呋喃酮种群中8个P450基因显著上调表达，表明P450基因可能参与温室白粉虱对氟吡呋喃酮的代谢抗性。

除P450基因过量表达外，本研究还发现CYP380C6在抗性种群中存在1个氨基酸突变（T381S），该突变是否影响蛋白质功能并参与麦二叉蚜对氟吡呋喃酮的抗性，还有待进一步研究明确。此外，增效剂试验结果显示，添加TPP、DEM与5-Nul也可增强氟吡呋喃酮对麦二叉蚜抗性种群的毒力，表明酯酶和谷胱甘肽*S*-转移酶等其他解毒酶系可能也参与了麦二叉蚜对氟吡呋喃酮的代谢过程，其在麦二叉蚜抗药性形成中的具体贡献后续值得深入探讨。目前，有许多研究表明害虫对新烟碱类杀虫剂产生靶标抗性主要是乙酰胆碱受体突变，包括Y151S、R81T和V101I等位点突变（Liu et al.，2005；Hirata et al.，2017；Xu et al.，2022），但尚不清楚麦二叉蚜对氟吡呋喃酮的抗性是否与靶标变化有关，未来应展开深入研究，以全面揭示麦二叉蚜对氟吡呋喃酮的抗性分子机制。

参 考 文 献（References）

Bass C, Carvalho RA, Oliphant L, Puinean AM, Field LM, Nauen R, Williamson MS, Moores G, Gorman K. 2011. Overexpression of a cytochrome P450 monooxygenase, *CYP6ER1*, is associated with resistance to imidacloprid in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. Insect Molecular Biology, 20(6): 763−773

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

Bass C, Puinean AM, Zimmer CT, Denholm I, Field LM, Foster SP, Gutbrod O, Nauen R, Slater R, Williamson MS. 2014. The evolution of insecticide resistance in the peach potato aphid, *Myzus persicae*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 51: 41−51

Berenbaum MR, Johnson RM. 2015. Xenobiotic detoxification pathways in honey bees. Current Opinion in Insect Science, 10: 51-58

Blackman RL, Eastop VF. 1984. Aphids on the world's crops: an identification guide. Chichester: John Wiley & Sons, pp. 344

Boissot N, Thomas S, Chovelon V, Lecoq H. 2016. NBS-LRR-mediated resistance triggered by aphids: viruses do not adapt: aphids adapt via different mechanisms. BMC Plant Biology, 16(1): 25

Chen AQ, Zhang HH, Shan TS, Shi XY, Gao XW. 2020. The overexpression of three cytochrome P450 genes *CYP6CY14*, *CYP6CY22* and *CYP6UN1* contributed to metabolic resistance to dinotefuran in melon/cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover. Pesticide Biochemistry and Physiology, 167: 104601

Chen J, Liu Z, Zhu SW. 2014. Progress in aphid-resistant genes and transgenic crop research. Biotechnology Bulletin, 30(10): 1−7 (in Chinese) [陈劲, 刘志, 朱生伟. 2014. 抗蚜基因及其转基因作物研究进展. 生物技术通报, 30(10): 1−7]

Chen YP, Wang ZD, Fu HT, Liao LP, Chen Y, Liu XF. 2023. Analytical methods and research progress of neonicotinoid insecticides. Fine Chemical Intermediates, 53(1): 1−9 (in Chinese) [陈一萍, 王志德, 傅洪涛, 廖丽萍, 陈颖, 刘小锋. 2023. 新烟碱类杀虫剂的研究进展与分析方法概述. 精细化工中间体, 53(1): 1−9]

Cui L, Qi HL, Yang DB, Yuan HZ, Rui CH. 2016. Cycloxaprid: a novel *cis*-nitromethylene neonicotinoid insecticide to control imidacloprid-resistant cotton aphid (*Aphis gossypii*). Pesticide Biochemistry and Physiology, 132: 96−101

Ding ZP, Wen YC, Yang BJ, Zhang YX, Liu SH, Liu ZW, Han ZJ. 2013. Biochemical mechanisms of imidacloprid resistance in *Nilaparvata lugens*: over-expression of cytochrome P450 *CYP6AY1*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 43(11): 1021−1027

Feyereisen R. 1999. Insect P450 enzymes. Annual Review of Entomology, 44: 507−533

Feyereisen R. 2012. Insect CYP genes and P450 enzymes//Gibert LI. Insect molecular biology and biochemistry. Amsterdam: Elsevier, pp. 236−316

Gong PP, Li XN, Gao HF, Wang C, Li MY, Zhang YH, Li XR, Liu EL, Zhu X. 2021. Field evolved resistance to pyrethroids, neonicotinoids, organophosphates and macrolides in *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus) and *Sitobion avenae* (Fabricius) from China. Chemosphere, 269: 128747

Guo L, Lv HX, Tan D, Liang N, Guo CL, Chu D. 2020. Resistance to insecticides in the field and baseline susceptibility to cyclaniliprole of whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius) in China. Crop Protection, 130: 105065

Hirata K, Jouraku A, Kuwazaki S, Kanazawa J, Iwasa T. 2017. The R81T mutation in the nicotinic acetylcholine receptor of *Aphis gossypii* is associated with neonicotinoid insecticide resistance with differential effects for cyano- and nitro-substituted neonicotinoids. Pesticide Biochemistry and Physiology, 143: 57−65

Jeschke P, Nauen R, Gutbrod O, Beck ME, Matthiesen S, Haas M, Velten R. 2015. Flupyradifurone (Sivanto™) and its novel butenolide pharmacophore: structural considerations. Pesticide Biochemistry and Physiology, 121: 31−38

Jin YL, Liu YY, Gao YG, Zhao H, Xiao H, Li JQ, Wang LJ. 2023. Detoxification enzymes associated with flupyradifurone resistance in greenhouse whitefly. Journal of Applied Entomology, 147(8): 630−640

Kaleem Ullah RM, Gao FK, Sikandar A, Wu HY. 2023. Insights into the effects of insecticides on aphids (Hemiptera: Aphididae): resistance mechanisms and molecular basis. International Journal of Molecular Sciences, 24(7): 6750

Liu G. 2024. Research progress on registration and application of flupirone in China. Yantai Fruits, (4): 2−5 (in Chinese) [刘刚. 2024. 氟吡呋喃酮在我国登记及应用研究进展. 烟台果树, (4): 2−5]

Liu ZW, Williamson MS, Lansdell SJ, Denholm I, Han ZJ, Millar NS. 2005. A nicotinic acetylcholine receptor mutation conferring target-site resistance to imidacloprid in *Nilaparvata lugens* (brown planthopper). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102(24): 8420−8425

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(4): 402−408

Lv YT, Li JY, Yan KP, Ding YP, Gao XW, Bi R, Zhang H, Pan YO, Shang QL. 2022. Functional characterization of ABC transporters mediates multiple neonicotinoid resistance in a field population of *Aphis gossypii* Glover. Pesticide Biochemistry and Physiology, 188: 105264

Ma KS, Tang QL, Zhang BZ, Liang P, Wang BM, Gao XW. 2019. Overexpression of multiple cytochrome P450 genes associated with sulfoxaflor resistance in *Aphis gossypii* Glover. Pesticide Biochemistry and Physiology, 157: 204−210

Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. 2017. Guidelines on the risk assessment for pesticide resistance. Part 9: The risk assessment of aphid resistance to neonicotinoid insecticides (NY/T 1859.9—2017). Beijing: China Agriculture Press (in Chinese) [中华人民共和国农业部. 2017. 农药抗性风险评估第9部分: 蚜虫对新烟碱类杀虫剂抗性风险评估(NY/T 1859.9—2017). 北京: 中国农业出版社]

Nauen R, Bass C, Feyereisen R, Vontas J. 2022. The role of cytochrome P450s in insect toxicology and resistance. Annual Review of Entomology, 67: 105−124

Nauen R, Jeschke P, Velten R, Beck ME, Ebbinghaus-Kintscher U, Thielert W, Wölfel K, Haas M, Kunz K, Raupach G. 2015. Flupyradifurone: a brief profile of a new butenolide insecticide. Pest Management Science, 71(6): 850−862

Papadimitriou F, Folia M, Ilias A, Papapetrou P, Roditakis E, Bass C, Vontas J, T Margaritopoulos J. 2022. Flupyradifurone resistance in *Myzus persicae* populations from peach and tobacco in Greece. Pest Management Science, 78(1): 304−312

Puinean AM, Foster SP, Oliphant L, Denholm I, Field LM, Millar NS, Williamson MS, Bass C. 2010. Amplification of a cytochrome P450 gene is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. PLoS Genetics, 6(6): e1000999

Pym A, Umina PA, Reidy-Crofts J, Troczka BJ, Matthews A, Gardner J, Hunt BJ, van Rooyen AR, Edwards OR, Bass C. 2022. Overex-

pression of UDP-glucuronosyltransferase and cytochrome P450 enzymes confers resistance to sulfoxaflor in field populations of the aphid, *Myzus persicae*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 143: 103743

Ren ZJ, Gong PP, Xu PF, Wang Y, Li WH, Le W, Wan H, Li JH. 2020. Resistance detection of field populations of *Nilaparvata lugens* and *Sogatella furcifera* to flupyradifurone in 2017. Chinese Journal of Pesticide Science, 22(1): 176−181 (in Chinese) [任志杰, 龚培盼, 徐鹏飞, 王越, 李文浩, 乐伟, 万虎, 李建洪 . 2020. 2017年褐飞虱和白背飞虱田间种群对氟吡呋喃酮的抗性监测 . 农药学学报, 22(1): 176−181]

Smith HA, Nagle CA, MacVean CA, McKenzie CL. 2016. Susceptibility of *Bemisia tabaci* MEAM1 (Hemiptera: Aleyrodidae) to imidacloprid, thiamethoxam, dinotefuran and flupyradifurone in South Florida. Insects, 7(4): 57

Tang QL, Hu JF, Zheng CF, Zhang W, Bi J, He YP. 2025. Overexpression of *CYP6CY36* and *CYP380C34* contributes to metabolic resistance of *Myzus persicae* (Sulzer) to flupyradifurone. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 298: 110317

Wang K, Zhang M, Huang YN, Yang ZL, Su S, Chen MH. 2018. Characterisation of imidacloprid resistance in the bird cherry-oat aphid, *Rhopalosiphum padi*, a serious pest on wheat crops. Pest Management Science, 74(6): 1457−1465

Wang MF, Yuan GH, Chen JL, Lei ZS, Wu ZQ. 2006. Study on the occurrence and damage characteristics of wheat aphid and the identification of wheat aphid resistance. Journal of Henan Agricultural Sciences, 35(7): 58−60 (in Chinese) [王美芳, 原国辉, 陈巨莲, 雷振生, 吴政卿 . 2006. 麦蚜发生危害特点及小麦抗蚜性鉴定的研究 . 河南农业科学, 35(7): 58−60]

Wang R, Wang JD, Zhang JS, Che WN, Feng HL, Luo C. 2020. Characterization of flupyradifurone resistance in the whitefly *Bemisia tabaci* Mediterranean (Q biotype). Pest Management Science, 76(12): 4286−4292

Wang Y, Zhao S, Shi L, Xu ZF, He L. 2014. Resistance selection and biochemical mechanism of resistance against cyflumetofen in *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval). Pesticide Biochemistry and Physiology, 111: 24−30

Wu SF, Zeng B, Zheng C, Mu XC, Zhang Y, Hu J, Zhang S, Gao CF, Shen JL. 2018. The evolution of insecticide resistance in the brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål) of China in the period 2012—2016. Scientific Reports, 8: 4586

Wu YQ, Xu HF, Pan YO, Gao XW, Xi JH, Zhang JH, Shang QL. 2018. Expression profile changes of cytochrome P450 genes between thiamethoxam susceptible and resistant strains of *Aphis gossypii* Glover. Pesticide Biochemistry and Physiology, 149: 1−7

Xiong YS, Cui LL, Hu GL, Jiang YT, Lv YP, Zhang P, Zheng JS, Zhang BZ, Liu RQ. 2025. Overexpression of *CYP6CY1* is involved in imidacloprid resistance in *Sitobion miscanthi* (Takahashi) (Homoptera: Aphidae). Neotropical Entomology, 54(1): 23

Xu X, Ding Q, Wang X, Wang RJ, Ullah F, Gao XW, Song DL. 2022. V101I and R81T mutations in the nicotinic acetylcholine receptor *β*1 subunit are associated with neonicotinoid resistance in *Myzus persicae*. Pest Management Science, 78(4): 1500−1507

Ye M, Nayak B, Xiong L, Xie C, Dong Y, You MS, Yuchi ZG, You SJ. 2022. The role of insect cytochrome P450s in mediating insecticide resistance. Agriculture, 12(1): 53

Zhang BZ, Su X, Xie LF, Zhen CA, Hu GL, Jiang K, Huang ZY, Liu RQ, Gao YF, Chen XL, et al. 2020. Multiple detoxification genes confer imidacloprid resistance to *Sitobion avenae* Fabricius. Crop Protection, 128: 105014

Zhang YF, Deng F, Fan YL, Zhao ZW. 2016. Effects of carboxylesterase gene silence on wheat aphid *Sitobion avenae* (Fabricius). Journal of Asia-Pacific Entomology, 19(2): 341−345

（责任编辑：李美娟）