小菜蛾 *CYP6BG1* 基因体外真核表达及其对氯虫苯甲酰胺的代谢

李秀霞[1,2]， 梁 沛[2*]， 高希武[2]

（1. 安徽农业大学植物保护学院，合肥 230026；2. 中国农业大学昆虫学系，北京 100193）

摘要 小菜蛾 *Plutella xylostella* 是为害十字花科作物的世界性重要害虫，对氯虫苯甲酰胺产生了严重抗性。已经明确小菜蛾 *CYP6BG1* 的过量表达与其对氯虫苯甲酰胺的抗性相关。本文进一步通过昆虫杆状病毒表达系统在 *Sf*9 细胞中表达了小菜蛾 CYP6BG1 和 NADPH-细胞色素 P450 还原酶（CPR）蛋白，并检测 *Sf*9 细胞表达 CYP6BG1 蛋白后对氯虫苯甲酰胺的敏感变化及氯虫苯甲酰胺经 CYP6BG1 蛋白代谢后对小菜蛾幼虫毒力的变化。结果显示：*Sf*9 细胞中与 CPR 共表达的 CYP6BG1 具有 7-乙氧基香豆素 *O*-脱乙基酶活性，且细胞对氯虫苯甲酰胺的敏感性显著下降。将表达的蛋白与不同浓度的氯虫苯甲酰胺孵育 24 h 后，对 3 龄小菜蛾幼虫致死率显著低于对照组。本研究结果间接表明 CYP6BG1 能够降解氯虫苯甲酰胺，从而增强小菜蛾对氯虫苯甲酰胺的抗性。

关键词 小菜蛾； 氯虫苯甲酰胺； *CYP6BG1*； 真核表达

中图分类号： S 481.1 **文献标识码：** A **DOI：** 10.16688/j.zwbh.2019669

Eukaryotic expression of *Plutella xylostella CYP6BG1 in vitro* and its metabolism ability to chlorantraniliprole

LI Xiuxia[1,2]， LIANG Pei[2*]， GAO Xiwu[2]

（1. *School of Plant Protection*, *Anhui Agricultural University*, *Hefei* 230026, *China*;
2. *Department of Entomology*, *China Agricultural University*, *Beijing* 100193, *China*）

Abstract *Plutella xylostella* is an important pest of cruciferous crops worldwide and has developed severe resistance to chlorantraniliprole. The overexpression of *CYP6BG1* has been proved to be involved in chlorantraniliprole resistance in *P. xylostella* previously. In this study, the CYP6BG1 protein and NADPH cytochrome P450 reductase (CPR) protein were co-expressed in *Sf*9 cell lines using the Bac-to-Bac baculovirus expression system. In addition, the toxicity of chlorantraniliprole to *Sf*9 cells expressing CYP6BG1 and CPR proteins was determined. The sensitivity of *P. xylostella* larvae to chlorantraniliprole was also tested after chlorantraniliprole was incubated with expressed CYP6BG1 and CPR proteins for 24 h. The results showed that the expressed CYP6BG1 had the *O*-deethylation activity to 7-ethoxycoumarin, and the toxicity of chlorantraniliprole to the *Sf*9 cells expressing CYP6BG1 and CPR was reduced. Moreover, the incubation with expressed CYP6BG1 protein reduced the toxicity of chlorantraniliprole to third-instar larvae of *P. xylostella*. These results provide further evidence that CYP6BG1 plays a role in the resistance of *P. xylostella* to chlorantraniliprole.

Key words *Plutella xylostella*; chlorantraniliprole; *CYP6BG1*; eukaryotic expression

小菜蛾是一种世界性害虫，主要为害十字花科作物，在中国由小菜蛾造成的经济损失每年约 7.7 亿美元[1]，全球达到 40 亿～50 亿美元[2]。氯虫苯甲酰胺是一种双酰胺类杀虫剂，主要作用于昆虫的鱼尼丁受体（ryanodine receptor，RyR），诱导钙离子失调，引起昆虫肌肉收缩并最终导致死亡[3-5]。自 2008 年 8 月在我国正式登记后，氯虫苯甲酰胺迅速被用于小菜蛾的防治[6]。由于对该药剂的过度依赖和不合理使用，小菜蛾很快对其产生了严重抗性。通过抗性监测发现广州增城田间小菜蛾种群对氯虫苯甲酰胺产生了 600～2 000 多倍的抗性[7-8]。随后 Guo 等[9-10]发现广东、云南等多个地区的小菜蛾种群对氯

收稿日期： 2019－12－02 **修订日期：** 2020－02－17
基金项目： 国家自然科学基金（31572023，31772186）；国家重点研发计划（2018YFD0201201）
* 通信作者 E-mail：liangcau@cau.edu.cn

虫苯甲酰胺均产生了数百倍的抗性。在国外，小菜蛾对氯虫苯甲酰胺的高水平抗性也有报道。据 Troczka 等[11]测定，在泰国、菲律宾小菜蛾对氯虫苯甲酰胺的抗性倍数分别大于 200 倍和 4 100 倍；而在巴西，小菜蛾对该药剂甚至产生了 27 793 倍的抗性[12]。

随着小菜蛾对氯虫苯甲酰胺抗性的不断加剧，其抗性机制也得到广泛研究。小菜蛾对氯虫苯甲酰胺产生高水平抗性主要是由 RyR 上的 G4946E 突变引起[11]，且突变频率与抗性水平正相关[9]。随后发现，RyR 上的另一个点突变 I4790M 也可以导致其与氯虫苯甲酰胺的结合能力下降，从而产生抗性[10]。此外，RyR 的 mRNA 表达量上调也与小菜蛾对氯虫苯甲酰胺的抗性相关，且其表达受 miRNA 的调控[13]。除了靶标抗性，解毒酶代谢能力增强是小菜蛾对氯虫苯甲酰胺产生抗性的另一个重要原因。研究发现细胞色素 P450 基因 *CYP321E1*[14]和尿苷二磷酸糖基转移酶（UDP glycosyltransferase，UGTs）基因 *UGT33AA4*[15]的过量表达参与了小菜蛾对氯虫苯甲酰胺的抗性。Li 等[16]发现 *CYP6BG1* 基因在多个小菜蛾抗性种群中过量表达，进一步通过 RNAi 和转 *CYP6BG1* 果蝇品系的构建间接证明了该基因的过表达与小菜蛾对氯虫苯甲酰胺的抗性相关。

昆虫杆状病毒表达系统是一个以昆虫杆状病毒为外源基因载体，以昆虫细胞为受体的表达系统。由于其能够对表达的基因进行翻译后加工，具有高效表达外源基因的能力，因此被广泛用于目标基因的表达和功能研究。自从人 β-干扰素被首次表达后，大量的外源基因已在杆状病毒表达系统中成功表达[17-18]。我们前期证明了 *CYP6BG1* 过表达与小菜蛾对氯虫苯甲酰胺的抗性相关，本研究利用昆虫杆状病毒表达系统表达了小菜蛾 CYP6BG1 蛋白并研究了其对氯虫苯甲酰胺的解毒代谢能力，以期为进一步阐明小菜蛾对该药剂的抗性机制提供直接证据。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫及细胞系

小菜蛾采自北京郊区的甘蓝地，在实验室饲养 10 年以上且不接触任何杀虫药剂。小菜蛾的饲养采用蛭石萝卜苗法[19]。饲养条件为（25 ± 1）℃，湿度为 70%～90%，光周期 L//D=16 h//8 h。*Sf*9 细胞系用 Sf-900 Ⅱ SFM 液体培养基（含 10%牛血清蛋白及 100 U/mL 青霉素和 0.1 mg/mL 链霉素）培养。细胞置于无 CO_2、（27± 1）℃的恒温培养箱中培养。

1.2　试剂

95%氯虫苯甲酰胺（chlorantraniliprole）原药购自杜邦公司（上海）。pFastBac Top His-N vetor 载体、DH10Bac™感受态细胞，AccuPrime™ Pfx DNA 聚合酶和 Cellfectin Ⅱ转染试剂购自 Invitrogen 公司。Sf-900 Ⅱ SFM 培养基、牛血清蛋白、双抗（青霉素/链霉素）购自 Gibco 公司，Dual-Glo®萤光素酶检测系统购自 Promega。其他试剂主要购自 TaKaRa 和上海生工生物公司。

1.3　昆虫蛋白表达载体的构建

根据 NCBI 中小菜蛾 *CYP6BG1*（Accession No. KX844829）和 P450 还原酶 *CPR*（Accession No. KJ767015.1）基因全长序列设计引物，引物序列见表 1。采用 Platinum Pfx DNA Polymerase 试剂盒扩增获得 *CYP6BG1* 和 *CPR* 基因全长的平末端 PCR 产物（含起始密码子和终止密码子）。并将其分别连接至昆虫细胞表达载体 pFastBac/NT-TOPO 中，然后将连接产物转化至 One Shot Mach1 Chemically Competent 大肠杆菌感受态细胞内。经 X-gal 和 IPTG 诱导后进行蓝白斑筛选。挑取白色菌落，于 37℃、225 r/min 的摇床上培养 4 h 后进行菌液 PCR 检测。用 pFast 上游通用引物（5′-AAATGATAACCATCTCGC-3′）和目的基因的下游引物扩增。选取含有阳性重组子的菌液，送生工生物工程（上海）股份有限公司测序。挑取测序结果比对正确的菌落于 37℃、225 r/min 培养过夜，用 AxyPrep 质粒 DNA 小量提取试剂盒分别提取鉴定正确的重组质粒 pFastBac/NT-TOPO-CYP6BG1 和 pFastBac/NT-TOPO-CPR。

1.4　昆虫重组质粒的转座及鉴定

将重组质粒 pFastBac/NT-TOPO-CYP6BG1 和 pFastBac/NT-TOPO-CPR 转染至 DH10Bac™感受态细胞中，利用含有 50 μg/mL 卡那霉素、7 μg/mL 庆大霉素、10 μg/mL 四环素、100 μg/mL X-gal、40 μg/mL IPTG 的平板进行培养筛选，挑取白色菌落进行 PCR 鉴定，PCR 鉴定采用 pUC/M13 载体通用引物进行扩增，引物序列见表 1。目的片段大小为 2 440 bp＋插入片段大小。将含有目的条带的 PCR 产物送生工生物工程（上海）股份有限公司进行测序。挑取测序结果比对正确的菌落于 LB 液体培养基（含 50 μg/mL 卡那霉素、7 μg/mL 庆大霉素和 10 μg/mL 四环素）中，37℃、225 r/min 条件下培养过夜。然后用 Promega 的 Pure Yield 质粒中提试剂盒提取无内毒素的质粒即重组子 Bacmid-CYP6BG1 和 Bacmid-CPR。质粒分装保存于－20℃冰箱备用。

表 1 PCR 扩增用引物

Table 1 Primers used for PCR amplification

基因或质粒 Gene or plasmid	上游引物(5′-3′) Forward primer	下游引物(5′-3′) Reverse primer
CYP6BG1	ATGTTGTATGCTGCTGCTCTG	CTAATTGGCGGTCTTCACG
CPR	AAGATGTCGGAGGACCTCG	TCTAGCTCCACACGTCGGC
pUC/M13	CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG	AGCGGATAACAATTTCACACAGG

1.5 重组蛋白的表达及检测

根据 Cellfectin-Ⅱ脂质体转染试剂盒的方法将重组子 Bacmid-CYP6BG1 和 Bacmid-CPR 分别转染 *Sf*9 细胞。在 27℃培养 72 h 或直至出现病毒感染迹象。将上层培养基移至相应的离心管中,500 g 离心 5 min 以去除细胞及大的碎片。上清液即为病毒液,为第 1 代病毒(P1),由于 P1 滴度低,通常要扩增至第 3 代病毒(P3),其滴度才能满足目的蛋白的表达。病毒扩增步骤为:在六孔板中加入 *Sf*9 细胞悬浮液,每孔 2×10^6 个细胞,室温贴壁 1 h 后每孔加入 100 μL P1 病毒液于 27℃下培养 48 h。然后收集上层细胞液,500 g 离心 5 min获得的上清液即为第 2 代病毒(P2),同样的方法继续扩增一代即为第 3 代病毒(P3)。P3 病毒液用锡箔纸包好,避光置于 4℃冰箱保存备用。由于 P450 蛋白只有在 CPR 存在时才具有活性,因此目的蛋白的表达需要将重组病毒 CYP6BG1 和 CPR 共同表达。即在 24 孔板中加入 *Sf*9 细胞悬浮液,每孔 6×10^5 个细胞,室温贴壁 30 min 后吸去培养基,加入300 μL新鲜的培养基,分别取 10 μL CYP6BG1 和 CPR 的 P3 病毒液加入培养板中,于 27℃培养箱中培养 24 h 后加入无菌的氯化血红素,使其终浓度为 3 μg/mL。继续培养 48 h,弃去培养基,细胞用 1×PBS 洗涤并收集细胞用于后续 P450 活性的测定。

P450 活性测定方法参照 Stumpf 等[20]略有修改。即以 7-乙氧基香豆素为底物,在 96 孔板中每孔加入 40 μL 0.1 mol/L PBS(pH 7.4),1 μL 的40 mmol/L 7-乙氧基香豆素(丙酮溶解)及 50 μL 蛋白酶液。充分混匀后,加入 10 μL NADPH (10 mmol/L)。30℃反应 30 min,其中,每隔 10 min 置于摇床上振荡混匀。反应结束后加入 10 μL 氧化型谷胱甘肽(30 mmol/L 水溶液)和 10 μL 的谷胱甘肽还原酶(0.5 U)。室温放置 10 min以除去多余的 NADPH。10 min 后加入 120 μL 50%乙腈 TRIZMA-base 缓冲液(0.05 mol/L, pH 10)终止反应。在激发波长 390 nm、发射波长 465 nm 条件下测定荧光值。空白组在终止反应后补加酶液。以每孔测得的 OD 值为 P450 活性。为测定 CYP6BG1 和 CPR 以不同比例共同表达对酶活性的影响,将 CYP6BG1 的 P3 病毒液与 CPR P3 病毒液分别按1∶1、3∶1、5∶1、7∶1和 10∶1加入 *Sf*9 细胞中并按照上述方法测定所表达 P450 的活性。试验设置 3 个生物学重复。

1.6 *Sf*9 细胞对氯虫苯甲酰胺的敏感性测定

为了检测表达 CYP6BG1 蛋白的 *Sf*9 细胞对氯虫苯甲酰胺的敏感性变化,将不同浓度的氯虫苯甲酰胺溶液加入表达 CYP6BG1 蛋白的 *Sf*9 细胞中,检测其对细胞的毒性。采用 cell counting kit-8 (CCK-8)试剂盒检测氯虫苯甲酰胺对细胞的毒性。处理组 *Sf*9 细胞中加入 10 μL CYP6BG1/CPR (5∶1,*V*/*V*)的 P3 病毒液,对照组中不加病毒液。培养 24 h 后,分别加入 10 μL 浓度为 0、10、25 μg/mL 和 50 μg/mL 的氯虫苯甲酰胺溶液(溶剂为 DMSO),每个浓度 5 个重复,空白组加入 10 μL DMSO。继续培养 48 h 后,移除含药培养基并用新鲜培养基清洗 3 次。然后加入 100 μL 新鲜培养基。每孔加入 100 μL CCK-8 试剂,培养箱中放置 4 h 后,用酶标仪测定 450 nm 下的吸光度。细胞的相对活性=(处理组 OD_{450} −空白 OD_{450})/(对照 OD_{450} −空白 OD_{450})。对照组的相对活性为 1。

1.7 氯虫苯甲酰胺与 CYP6BG1 蛋白温育后对小菜蛾毒力的测定

在表达有 CYP6BG1 蛋白的细胞培养基中添加氯虫苯甲酰胺并孵育 24 h 后,处理小菜蛾幼虫,检测其对小菜蛾的毒力变化。首先将 P3 病毒液按照 CYP6BG1∶CPR=5∶1的比例侵染 *Sf*9 细胞24 h,然后加入无菌的氯化血红素,24 h 后加入不同浓度的氯虫苯甲酰胺溶液,再经过 24 h 后,将上层培养基转移至 50 mL 离心管中。补加 0.1% Triton X-100 至 40 mL 使氯虫苯甲酰胺的终浓度为 0.3、0.5 μg/mL和 0.7 μg/mL(假定氯虫苯甲酰胺未被 CYP6BG1 降解)。用该溶液浸泡甘蓝叶片 15 s,取出晾干后饲喂 3 龄初小菜蛾幼虫,96 h 后检查死亡率。设置两个对照,一组不含 *Sf*9 细胞只有培养基(对照 1),另一组按 CYP6BG1∶CPR=5∶1的比例侵染 *Sf*9 细胞,但 24 h 后不添加氯化血红素(对照 2),其他步骤与处理组一致。设置 3 个重复。

1.8 数据统计

采用 InStat v. 3.0 (GraphPad Software, San

Diego，CA，USA)软件进行数据分析，所得数据均用平均数±标准差表示，用 *t*-检验比较两组数据的差异显著性(α=0.05)，多组数据采用单因素方差分析并用 Tukey 法进行多重比较。

2　结果与分析

2.1　*Sf*9 细胞中表达的小菜蛾 CYP6BG1 酶的活性

未表达 CYP6BG1 蛋白的 *Sf*9 细胞，处理组和对照组的荧光强度无显著差异，而表达 CYP6BG1 蛋白的 *Sf*9 细胞，在 CYP6BG1/CPR 不同比例下，处理组的荧光强度均显著高于对照组(表 2)，说明处理组表达的 CYP6BG1 蛋白具有活性并代谢了 7-乙氧基香豆素。并且随着 CYP6BG1 所占比例升高，其活性增强，但是比例达到 10∶1的时候，其活性明显降低。因此，后续试验中 CYP6BG1 和 CPR 病毒比例固定为 5∶1。

表 2　不同 CYP6BG1 与 CPR 比例下表达蛋白的活性[1)]

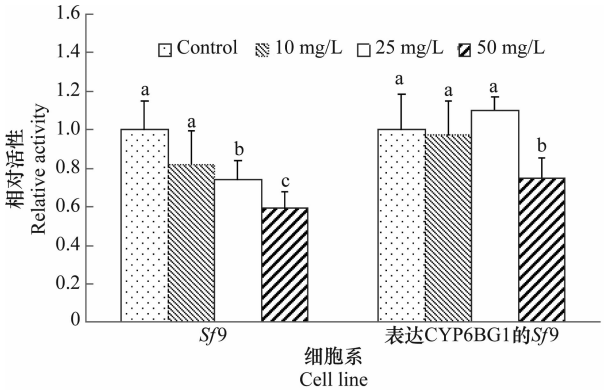
Table 2　Activities of expressed CYP6BG1/CPR proteins at different ratios

类别 Category	OD 值　OD value					
	*Sf*9 细胞 *Sf*9 cell	1∶1	3∶1	5∶1	7∶1	10∶1
对照组 Control	109.3±7.7	107.0±6.0	119.0±1.0	119.0±2.6	118.3±1.5	106.3±4.9
处理组 Treatment	114.7±9.3	207.3±11.6*	216.0±26.9*	238.3±17.2*	247.3±14.4*	175.0±12.9*

1) 表中不同比例表示表达 CYP6BG1 和 CPR 的 *Sf*9 细胞数量比。数据为在激发波长 390 nm，发射波长 465 nm 条件下测定的荧光值。* 表示同一列数据存在显著差异(*t*-检验，$P<0.05$)。
The ratios in the table represented the *Sf*9 cells expressing, CYP6BG1 and CPR at different ratios. The data are OD values determined at 465 nm with 390 nm as excitation wavelength. * indicates that the data in the same column are significantly different (*t*-test, $P<0.05$).

2.2　氯虫苯甲酰胺对表达 CYP6BG1 蛋白的 *Sf*9 细胞的毒性

与不表达 CYP6BG1 蛋白的对照组细胞相比，氯虫苯甲酰胺对表达 CYP6BG1 蛋白的 *Sf*9 细胞的毒性明显降低。如图 1 所示，用 25 μg/mL 和50 μg/mL 的氯虫苯甲酰胺处理后，未表达 CYP6BG1 蛋白的 *Sf*9 细胞的相对活性与对照相比分别下降了 26%和 41%。而用 25 μg/mL 的氯虫苯甲酰胺处理表达 CYP6BG1 蛋白的 *Sf*9 细胞，其相对活性与对照无明显差异。用 50 μg/mL的氯虫苯甲酰胺处理表达 CYP6BG1 蛋白的 *Sf*9 细胞后，其相对活性仅下降了 25%。



数据为3次重复的平均值±标准差。同一组中不同小写字母表示处理间差异显著(one-way ANOVA, $P<0.05$)。下同
The data are presented as means±SD of three independent replicates. Different lowercase letters in the same group indicate significant difference (one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test; $P<0.05$). The same below

图 1　氯虫苯甲酰胺处理后表达和不表达 CYP6BG1 蛋白的 *Sf*9 细胞的相对活性

Fig. 1　Relative activities of different *Sf*9 cells after treated with different concentrations of chlorantraniliprole

2.3　CYP6BG1 蛋白对氯虫苯甲酰胺的代谢作用

将氯虫苯甲酰胺与表达的 CYP6BG1 蛋白温育 24 h 后处理 3 龄小菜蛾幼虫，与对照相比，小菜蛾的死亡率在不同浓度下均显著降低。如图 2 所示，对照 1(培养基)和对照 2(CYP6BG1/CPR)在不同浓度下的死亡率没有显著差异，对照 2 中小菜蛾的死亡率在 0.3、0.5 μg/mL 和 0.7 μg/mL 时分别为 29.2%、48.1%和 72.1%，而当氯虫苯甲酰胺与 CYP6BG1 蛋白温育 24 h 后处理小菜蛾，其死亡率分别为 12.9%、35.5%和 50.9%。

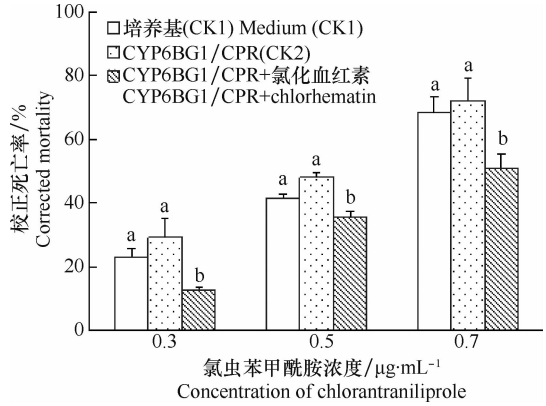


图 2　CYP6BG1 蛋白和氯虫苯甲酰胺温育液处理后 3 龄小菜蛾幼虫的死亡率

Fig. 2　Mortality of third-instar larvae of *Plutella xylostella* treated with the incubation solution of expressed CYP6BG1 and different concentrations of chlorantraniliprole

3 讨论

本文成功表达了具有 7-乙氧基香豆素 *O*-脱乙基活性的 CYP6BG1 蛋白，并且表达的蛋白与氯虫苯甲酰胺一起温育后，能够显著降低其对 *Sf*9 细胞的毒性和对小菜蛾幼虫的毒力，间接表明 CYP6BG1 蛋白可代谢氯虫苯甲酰胺。

在前期研究中，我们从基因水平上证明了 *CYP6BG1* 过表达与小菜蛾对氯虫苯甲酰胺的抗性相关。主要是通过 RNAi 和建立转 *CYP6BG1* 基因的果蝇品系，分别在小菜蛾幼虫体内降低 *CYP6BG1* 的表达和在黑腹果蝇体内增加 *CYP6BG1* 的表达，从正反两方面验证了该基因的过量表达导致了小菜蛾对氯虫苯甲酰胺的抗性[16]。并进一步明确了该基因的过量表达受到上游启动子的调控，并且发现 *CYP6BG1* 上游启动子序列在不同种群中存在差异，启动子序列的差异影响了 *CYP6BG1* 的转录水平，并且该基因的转录水平还受到转录因子 FTZ-F1 的调控[21]。本文进一步从蛋白水平揭示了 CYP6BG1 对氯虫苯甲酰胺的代谢作用。

为研究特定解毒酶基因编码的蛋白是否参与了对某种杀虫剂的代谢，通过异源表达该基因编码的蛋白并测定所表达蛋白对该药剂的代谢能力可提供直接证据。如在大肠杆菌中表达的家蝇 P450 CYP6A1 和 CYP12D1 重组蛋白能够代谢艾氏剂、七氯和二嗪农[22-23]；在酵母中表达的棉铃虫 CYP9A12 和 CYP9A14 蛋白对氰戊菊酯具有代谢活性[24]；在昆虫细胞中成功表达的油菜露尾甲 *Meligethes aeneus* 的 P450 蛋白 CYP6BQ23 能够将溴氰菊酯代谢成 4-羟基溴氰菊酯[25]。可见，虽然采用的表达系统不同，但都为证明相关 P450 基因在抗药性中的作用提供了直接证据。

本文采用了昆虫杆状病毒表达系统成功表达了 CYP6BG1 蛋白，且具有 *O*-脱乙基活性；将该蛋白与氯虫苯甲酰胺温育后可显著降低其对 *Sf*9 细胞的毒性和对小菜蛾幼虫的毒力，间接表明该蛋白能够代谢氯虫苯甲酰胺，但遗憾的是并没有获得 CYP6BG1 能够代谢氯虫苯甲酰胺的直接证据。下一步可以提取具有活性的 CYP6BG1 蛋白，与氯虫苯甲酰胺温育后通过检测氯虫苯甲酰胺的代谢产物，明确其对氯虫苯甲酰胺的体外代谢能力，从而为明确 CYP6BG1 对氯虫苯甲酰胺的代谢作用提供直接证据。

参考文献

[1] LI Zhenyu, FENG Xia, LIU Shusheng, et al. Biology, ecology, and management of the diamondback moth in China [J]. Annual Review of Entomology, 2016, 61: 277-296.

[2] FURLONG M J, WRIGHT D J, DOSDALL L M. Diamondback moth ecology and management: problems, progress, and prospects [J]. Annual Review of Entomology, 2013, 58: 517-541.

[3] CORDOVA D, BENNER E A, SACHER M D, et al. Anthranilic diamides: A new class of insecticides with a novel mode of action, ryanodine receptor activation [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2006, 84(3): 196-214.

[4] LAHM G P, STEVENSON T M, SELBY T P, et al. Rynaxypyr (TM): A new insecticidal anthranilicdiamide that acts as a potent and selective ryanodine receptor activator [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2007, 17(22): 6274-6279.

[5] SATTELLE D B, CORDOVA D, CHEEK T R. Insect ryanodine receptors: molecular targets for novel pest control chemicals [J]. Invertebrate Neuroscience, 2008, 8(3): 107-119.

[6] 李秀霞，梁沛，高希武. 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.

[7] 胡珍娣，陈焕瑜，李振宇，等. 华南小菜蛾田间种群对氯虫苯甲酰胺已产生严重抗性[J]. 广东农业科学，2012(1)：79-81.

[8] WANG Xingliang, KHAKAME S K, YE Chao, et al. Characterisation of field-evolved resistance to chlorantraniliprole in the diamondback moth, *Plutella xylostella*, from China [J]. Pest Management Science, 2013, 69(5): 661-665.

[9] GUO Lei, WANG Yi, ZHOU Xuguo, et al. Functional analysis of a point mutation in the ryanodine receptor of *Plutella xylostella* (L.) associated with resistance to chlorantraniliprole [J]. Pest Management Science, 2014, 70(7): 1083-1089.

[10] GUO Lei, LIANG Pei, ZHOU Xuguo, et al. Novel mutations and mutation combinations of ryanodine receptor in a chlorantraniliprole resistant population of *Plutella xylostella* (L.) [J/OL]. Scientific Reports, 2014, 4: e06924. DOI: 10.1038/srep06924.

[11] 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.

[12] RIBEIRO L M S, WANDERLEY-TEIXEIRA V, FERREIRA H N, et al. Fitness costs associated with field-evolved resistance to chlorantraniliprole in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) [J]. Bulletin of Entomological Research, 2014, 104(1): 88-96.

[13] LI Xiuxia, GUO Lei, ZHOU Xuguo, et al. MiRNAs regulated overexpression of ryanodine receptor is involved in chlorantra-

niliprole resistance in *Plutella xylostella* (L.) [J/OL]. Scientific Report, 2015, 5: 14095. DOI: 10.1038/srep14095.

[14] HU Zhendi, FENG Xia, LIN Qingsheng, et al. Biochemical mechanism of chlorantraniliprole resistance in the diamondback moth, *Plutella xylostella* Linnaeus [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2014, 13(11): 2452-2459.

[15] LI Xiuxia, ZHU Bin, GAO Xiwu, et al. Over-expression of UDP-glycosyltransferase gene *UGT2B17* is involved in chlorantraniliprole resistance in *Plutella xylostella* (L.) [J]. Pest Management Science, 2017, 73(7): 1402-1409.

[16] LI Xiuxia, LI Ran, ZHU Bin, et al. Overexpression of cytochrome P450 *CYP6BG1* may contribute to chlorantraniliprole resistance in *Plutella xylostella* (L.) [J]. Pest Management Science, 2018, 74(6): 1386-1393.

[17] YAMAJI H, MANABE T, KITAURA A, et al. Efficient production of recombinant protein in immobilized insect cell culture using serum-free basal media after baculovirus infection [J]. Biochemical Engineering Journal, 2006, 28(1): 67-72.

[18] ZHU Fang, PARTHASARATHY R, BAI Hua, et al. A brain-specific cytochrome P450 responsible for the majority of deltamethrin resistance in the QTC279 strain of *Tribolium castaneum* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(19): 8557-8562.

[19] 陈之浩，刘传秀，李凤良，等. 小菜蛾继代繁殖大量饲养方法研究初报[J]. 贵州农业科学，1990(4)：52-53.

[20] STUMPF N, NAUEN R. Cross-resistance, inheritance, and biochemistry of mitochondrial electron transport inhibitor-acaricide resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) [J]. Journal of Economic Entomology, 2001, 94(6): 1577-1583.

[21] LI Xiuxia, SHAN Chunyang, LI Fen, et al. Transcription factor FTZ-F1 and cis-acting elements mediate expression of *CYP6BG1* conferring resistance to chlorantraniliprole in *Plutella xylostella* [J]. Pest Management Science, 2019, 75(4): 1172-1180.

[22] ANDERSEN J F, UTERMOHLEN J G, FEYEREISEN R. Expression of house fly *CYP6A1* and NADPH-cytochrome P450 reductase in *Escherichia coli* and reconstitution of an insecticide metabolizing P450 system [J]. Biochemistry, 1994, 33(8): 2171-2177.

[23] GUZOV V M, UNNITHAN G C, CHERNOGOLOV A A, et al. *CYP12A1*, a mitochondrial cytochrome P450 from the housefly [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1998, 359(2): 231-240.

[24] YANG Yihua, YUE Lina, CHEN Song, et al. Functional expression of *Helicoverpa armigera* CYP9A12 and CYP9A14 in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2008, 92(2): 101-105.

[25] ZIMMER C T, BASS C, WILLIAMSON M S, et al. Molecular and functional characterization of *CYP6BQ23*, a cytochrome P450 conferring resistance to pyrethroids in European populations of pollen beetle, *Meligethes aeneus* [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2014, 45: 18-29.

（责任编辑：田　喆）

（上接 23 页）

[59] 徐心，许业帆，赵杰，等. 5 种杀菌剂防治桃细菌性穿孔病田间药效试验[J]. 上海农业科技，2017(1)：110.

[60] 赵杰，倪秀红. 迷迭香精油对几种植物病原菌的抑菌活性研究[J]. 北方园艺，2009(9)：33-35.

[61] 赵杰，周超英，顾振芳，等. 柠檬草精油对 9 种植物病原菌的抑菌活性[J]. 上海交通大学学报(农业科学版)，2011，29(4)：72-74.

[62] BIONDI E, DALLAI D, BRUNELLI A, et al. Use of a bacterial antagonist for the biological control of bacterial leaf/fruit spot of stone fruits [J]. IOBC/WPRS Bulletin, 2009, 43: 277-281.

[63] 李正. 几种药剂对桃细菌性穿孔病的防治效果试验报告[J]. 上海农业科技，2018(6)：128.

[64] ZACCARDELLI M, SACCARDI A, GAMBIN E, et al. *Xanthomonas* campestris pv. *pruni* bacteriophages on peach trees and their potential use for biological control [J]. Phytopathologia Mediterranea, 1992, 31(3): 133-140.

[65] 贺春娟，薛敏云. 氨基寡糖素对桃细菌性穿孔病的防治效果及增产作用研究[J]. 农药科学与管理，2014，35(10)：60-62.

[66] GIOVANARDI D, DALLAI D, DONDINI L, et al. Elicitation of resistance to bacterial canker of stone fruits by humic and fulvic acids (glucohumates): a cDNA-AFLP-dHPLC approach [J]. Scientia Horticulturae, 2016, 212: 183-192.

[67] 董思佳. 20%氟苄噁唑砜悬浮剂防治桃树细菌性穿孔病试验[J]. 北方果树，2017(6)：14-15.

[68] RUIZ C, NADAL A, MONTESINOS E, et al. Novel Rosaceae plant elicitor peptides as sustainable tools to control *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* in *Prunus* spp. [J]. Molecular Plant Pathology, 2018, 19(2): 418-431.

（责任编辑：田　喆）