

· 原创性分子靶标与绿色农药分子设计 ·

## 杀虫剂的选择性与害虫抗药性

张懿熙 刘泽文\*

南京农业大学 植物保护学院/农业部病虫监测与治理重点开放实验室, 南京 210095

**[摘要]** 化学防治具有快速、高效、规模化等特点,是害虫防治的主要手段。但是,化学农药的不合理、过量使用会导致一系列的副作用,如农药残留、农产品品质下降、环境污染、威胁非靶标生物安全等。为了非靶标生物的安全,杀虫剂在创制过程中特别强调选择性这一特征,以减少对高等动物、作物、天敌、有益昆虫的危害。另一个严重威胁杀虫剂防治效果的问题来自于害虫的抗药性,抗药性会导致杀虫剂防效下降、使用量增加、负面影响加剧。昆虫抗药性机制来自于多个方面,目前研究比较透彻的是靶标不敏感性机制和代谢增强机制。杀虫剂靶标蛋白的氨基酸替换和表达量变化,均可影响杀虫剂与靶蛋白的亲合力,导致高水平抗性。因代谢抗性相关基因家族多、成员多,且参与代谢抗性的基因家族在不断增加,代谢抗性机制与代谢酶基因表达调控,将成为害虫抗药性机制研究的重点。因此,害虫抗药性研究拟重点围绕抗性基因鉴定、抗药性调控网络、基于抗药性的杀虫剂结构优化与设计等几个方面开展。

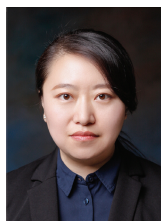
**[关键词]** 昆虫;杀虫剂;选择性;抗药性

预计到2050年全球人口将达到90亿,为了满足不断增长的人口对农产品的需求,人类所采取的一系列高产精耕细作措施为有害生物提供了适宜的发生环境。因此,有效的植物保护措施在保障粮食安全的过程中发挥了极为重要的作用。昆虫是农业有害生物中的一个重要类群,也是造成作物减产的主要因素之一。全球范围内每年用于防治农业害虫所投入的费用高达数十亿美元,有分析表明,如果不采取防治措施,由于昆虫危害造成的粮食减产将达到40%<sup>[1]</sup>。化学防治具有见效快、效果显著、使用方便、不受地区和季节限制等优势,适用于大面积防治,目前仍然是害虫防治的主要手段,然而化学杀虫剂的长期大量使用在控制有害生物、维护人类利益的同时,也导致了一系列严重问题。

长期的化学防治造成了很大的杀虫剂抗性选择压力,致使害虫对常用杀虫剂产生了不同程度的抗性,从而导致化学防治失效。自1914年首篇关于昆虫抗药性的报道以来,至今已有500多种昆虫对一种或多种常见杀虫剂产生了抗性<sup>[2]</sup>。以水稻害虫褐飞虱(*Nilaparvata lugens*)为例,2012—2016年对



**刘泽文** 南京农业大学教授,博士生导师,主要从事杀虫剂抗性与害虫化学防治研究,先后主持国家自然科学基金优秀青年科学基金项目1项、重点项目1项、面上项目4项、青年项目1项。



**张懿熙** 南京农业大学副教授,硕士生导师,主要从事杀虫剂毒理学研究,主持国家自然科学基金青年项目1项,参与国家自然科学基金重点项目1项。

我国不同地区褐飞虱抗药性水平监测结果表明,褐飞虱对吡虫啉、噻虫嗪、噻嗪酮、毒死蜱、吡蚜酮和丁烯氟虫腈等6种杀虫剂均产生了不同程度的抗性,其中,2016年褐飞虱对吡虫啉、噻虫嗪和噻嗪酮的抗性达到了200倍以上<sup>[3]</sup>。面对害虫抗药性问题,人们为了达到预期的防治效果,不得不增加用药量和防治次数,而防治次数和杀虫剂使用量的增加将进一步加重抗药性问题。

收稿日期:2020-03-30;修回日期:2020-05-22

\* 通信作者,Email: liuzewen@njau.edu.cn

昆虫对杀虫剂产生抗药性的机制主要有两种,即靶标敏感性下降和解毒代谢能力增强。杀虫剂与靶标的相互作用具有特异性,昆虫体内的杀虫剂靶标位点发生突变或靶标的组成发生变化均可能导致杀虫剂与靶标的亲和力降低和靶标对杀虫剂的敏感性降低,从而产生抗药性。另一方面,杀虫剂有效成分到达靶标的量只占进入体内总药量的很少部分,大部分都被解毒酶,如酯酶、细胞色素 P450、ABC 转运蛋白等降解或结合后贮存于脂肪体中或排出体外。这些酶的代谢能力增强能够使到达靶标的杀虫剂大幅度减少,提高昆虫对杀虫剂的耐受能力,产生抗药性。近年来,随着高通量测序技术的发展,测序成本逐年降低,越来越多的昆虫基因组和转录组被测序,为研究人员在全基因组尺度上阐明抗药性机制提供了大量的序列信息和数据。RNAi、CRISPR 等基因功能验证技术的不断进步,为靶标和代谢抗性基因鉴定、验证提供了技术基础。

化学杀虫剂在防治害虫的同时,可能会对蜘蛛、瓢虫、寄生蜂等害虫的天敌产生不利影响,导致其种群数量下降<sup>[4, 5]</sup>,破坏生态系统多样性<sup>[6]</sup>,致使生态调控失效,从而加重害虫暴发和为害。因此,明确害虫对杀虫剂的抗性机制以及杀虫剂对不同物种的选择性机制,对合理使用杀虫剂、延缓抗药性发生以及开发新杀虫剂具有重要意义。本文综述了近年来昆虫抗药性机制以及杀虫剂选择性机制方面的研究进展。

## 1 靶标敏感性下降导致的抗药性

靶标敏感性下降是昆虫对杀虫剂产生抗性的重要机制之一。研究表明,靶标敏感性下降的原因有两种:靶标发生突变导致自身的结构和功能特性发生变化,导致杀虫剂与靶标的结合能力下降;靶标表达量变化,导致多聚体靶标亚基组成变化,影响杀虫剂与靶标结合的亲和力。

### 1.1 突变导致的靶标敏感性下降

#### 1.1.1 单个氨基酸位点突变

杀虫剂作用靶标是害虫与杀虫剂相互作用过程中被赋予药物效应的特定分子,大多数杀虫剂的靶标是昆虫神经系统中重要的离子通道、受体或酶。已有大量研究表明杀虫剂与这些靶标(受体)的相互作用过程中,仅靶蛋白的单个氨基酸突变,就可能造成靶标对杀虫剂的敏感性下降。例如,在室内筛选获得的褐飞虱抗吡虫啉品系中,烟碱型乙酰胆碱受体(nicotinic acetylcholine receptor, nAChR)N1 $\alpha$ 1 和

N1 $\alpha$ 3 亚基 151 位的酪氨酸(Y)突变为丝氨酸(S)导致受体对吡虫啉和其他新烟碱类杀虫剂的亲和力降低,但不影响其与乙酰胆碱的结合能力,从而导致抗药性的产生<sup>[7, 8]</sup>。采集自法国南部的一个桃蚜(*Myzus persicae*)种群中,nAChR  $\beta$ 1 亚基 81 位的精氨酸(R)突变为苏氨酸(T)导致受体对吡虫啉的敏感性降低,是桃蚜对新烟碱类杀虫剂产生抗性的一个重要原因<sup>[9]</sup>。 $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)受体 RDL 亚基第 302 位氨基酸的突变导致果蝇(*Drosophila melanogaster*)、家蝇(*Musca domestica* L.)、按蚊、稻飞虱等昆虫对狄氏剂、氟虫腈等杀虫剂产生抗性<sup>[10-13]</sup>。鱼尼丁受体突变 G4946E 导致小菜蛾(*Plutella xylostella* L.)对氟虫双酰胺(Flubendiamide)产生高水平抗性<sup>[14]</sup>。击倒抗性(knockdown resistance, kdr)是昆虫对 DDT 和拟除虫菊酯类杀虫剂的主要抗性机制之一,由其靶标电压门控钠离子通道上的突变导致。自 1956 年首次在家蝇中报道以来,击倒抗性在各种重要的农业及卫生害虫中均有发现,至今已报道的 kdr 突变位点有 50 多个<sup>[15]</sup>。其中,有些突变位点在多个物种中均有报道。例如,L1014 位点的突变在家蝇、按蚊、库蚊、棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)、棉蚜(*Aphis gossypii* Glover)、桃蚜、德国小蠊(*Blattella germanica*)等物种中均有报道;烟粉虱(*Bemisia tabaci*)、温室白粉虱(*Trialeurodes vaporariorum*)、温带臭虫(*Cimex lectularis*)中均发现了 L925 位点的突变<sup>[15]</sup>。有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂是昆虫乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)的抑制剂,这两类杀虫剂通过磷酸化或氨基甲酰化抑制 AChE 的活性,从而造成 ACh 在突触处大量积累,突触后膜持续受到刺激,阻断了正常的神经传导,最终导致昆虫死亡<sup>[16]</sup>。1961 年 Smissaert 首次报道了 AChE 对农药的敏感性降低,此后在多种昆虫中,如小菜蛾、棉铃虫、果蝇、马铃薯甲虫(*Leptinotarsa decemlineata*)、家蝇、冈比亚按蚊(*Anopheles gambiae*)、棉蚜、二化螟(*Chilo suppressalis*)等,均发现了导致有机磷或氨基甲酸酯类杀虫剂抗性的 AChE 突变<sup>[17]</sup>。这些抗药性相关的突变位点大多发生在催化三联体、酰基口袋等 AChE 行使功能所必需的关键位点上,说明这些氨基酸在杀虫剂与靶标的相互作用过程中发挥着重要作用。

#### 1.1.2 多个氨基酸位点突变的协同作用

有报道表明,除了单个氨基酸位点突变造成的靶标敏感性下降外,靶标上同时存在多个突变能够

使昆虫获得更高水平的抗药性,或者弥补单个氨基酸突变所造成的适合度代价。其中,最典型的案例是昆虫对拟除虫菊酯的击倒抗性(kdr)和超击倒抗性(super-kdr)。对家蝇钠离子通道序列进行分析发现,1 014 位的亮氨酸突变为苯丙氨酸(L1014F)是导致 kdr 抗性的原因,另一个突变 M918T 导致 super-kdr<sup>[18]</sup>。M918T 突变伴随 L1014F 突变存在,在没有 L1014F 突变的家蝇种群中检测不到 M918T 突变<sup>[19]</sup>。最近的研究发现,在室内筛选的褐飞虱抗氟虫腓品系中,GABA 受体 RDL 亚基 A302S 突变频率达到 100%时,其对抗性的贡献度仅为 4.7 倍;相比之下,R300Q 和 A302S 突变同时存在对抗性的贡献度达到 97 倍以上。与 super-kdr 突变类似,R300Q 突变总是与 A302S 伴随存在。电生理研究结果表明,R300Q 在降低受体对氟虫腓的敏感性的同时,也影响了受体与 GABA 的结合,导致严重的适合度代价,而 A302S 能够弥补这种不足<sup>[20]</sup>。类似的,与单一突变 nAChE<sup>F331C</sup>相比,同时具有双突变 nAChE<sup>F331C/I332L</sup>的褐飞虱对毒死蜱的敏感性更低,且突变 I332L 能够在一定程度上弥补 F331C 对 nAChE1 生理功能的影响<sup>[21]</sup>。

## 1.2 表达量变化导致的靶标敏感性下降

一般认为,靶标敏感性下降都是因为突变导致靶标的结构和特性发生了改变,然而对于由多个亚基组成的离子通道或受体,靶标本身的表达量发生变化也可能导致其对杀虫剂的敏感性下降,从而使昆虫产生抗药性。通过田间抗性种群和实验室敏感品系的比较发现,对新烟碱类杀虫剂产生抗性的家蝇体内 nAChR  $\alpha 2$  亚基的表达量显著低于敏感品系<sup>[22]</sup>。经吡虫啉、噻虫嗪或噻虫胺处理的豌豆蚜(*Acyrtosiphon pisum*)若虫体内,nAChR  $\alpha 10$  和  $\beta 1$  亚基的表达量增加, $\beta 2$  亚基的表达量下降<sup>[23]</sup>。在小菜蛾抗氟虫双酰胺品系中鱼尼丁受体的 mRNA 表达量下降了 2.9 倍<sup>[14]</sup>。这些研究虽然报道了抗性昆虫体内杀虫剂作用靶标的表达量发生了变化,但并未验证这种变化是否导致了抗药性。在褐飞虱对吡虫啉抗性机理研究中发现,乙酰胆碱受体  $\alpha 8$  亚基的表达量降低同样可以导致高水平抗性的产生<sup>[24]</sup>。乙酰胆碱受体是由五个亚基组成的聚合物,不同的亚基可以组成功能各异的受体。放射性配基结合试验的结果表明,褐飞虱体内存在两个吡虫啉结合位点,其中低亲和力位点由  $\alpha 1/\alpha 2/\beta 1$  组成,高亲和力位点由  $\alpha 3/\alpha 8/\beta 1$  亚基组成<sup>[25]</sup>。 $\alpha 8$  亚基的表达量降低可能改变受体的组成,影响受体与吡虫啉的亲

力,导致靶标敏感性下降,从而使得害虫产生抗药性<sup>[24]</sup>。

## 2 解毒代谢能力增强导致的抗药性

由细胞色素 P450(cytochrome P450, P450)、羧酸酯酶(carboxylesterase, CarE)、UDP-葡萄糖醛酸转移酶(UDP-glucuronosyltransferase, UGT)、谷胱甘肽-S-转移酶(Glutathione S-transferase, GST)等解毒酶和 ABC 转运蛋白(ATP binding cassette transporter)介导的有害生物抗药性机理是代谢抗性研究的重要内容。这些解毒酶和转运蛋白通过基因突变、扩增和上调表达参与几乎所有药剂的抗性。

### 2.1 解毒酶的上调表达

上调表达是 P450、CarE 和 GST 参与抗性的主要途径。研究表明,褐飞虱体内 CarE 表达量的提高是其对有机磷类杀虫剂产生较高抗性的主要原因<sup>[26]</sup>。昆虫 GST 在有机氯类、有机磷类和拟除虫菊酯类杀虫剂的解毒代谢中发挥了重要的作用。有研究表明,冈比亚按蚊抗 DDT 品系中多个 Epsilon 家族的 GST 基因表达量出现了上调,其中 GSTE2 具有较高的代谢 DDT 的活性<sup>[27]</sup>。在东亚飞蝗(*Locusta migratoria manilensis*)中干扰 GSTS3 基因导致若虫对西维因的敏感性上升,死亡率提高了 38.7%,说明该基因与西维因的抗性有关<sup>[28]</sup>。马铃薯甲虫经氯氟氰菊酯、氟虫腓或硫丹处理后,LdGSTe2a、LdGSTe2b、LdGSTo5 和 LdGSTt1 均出现了过量表达<sup>[29]</sup>。昆虫 P450 可通过羟基化、环氧化等作用代谢有机磷类、拟除虫菊酯类、新烟碱类等多种杀虫剂<sup>[30]</sup>。例如,冈比亚按蚊 CYP6M2 的过量表达导致对拟除虫菊酯的抗药性<sup>[31]</sup>。果蝇的 CYP6G1、家蝇的 CYP6D1、烟粉虱的 CYP6CM1、尖音库蚊(*Culex pipiens*)的 CYP6F1、致倦库蚊(*Culex quinquefasciatus*)的 CYP9M10,以及褐飞虱的 CYP6AY1 和 CYP6ER1 均被证明能够代谢吡虫啉<sup>[32-38]</sup>。值得注意的是,由于代谢底物的范围非常广泛,同一个 P450 可能参与了不同类型杀虫剂的代谢,从而导致不同类型的杀虫剂之间出现交互抗性。有报道表明,CYP6CM1 在烟粉虱对吡虫啉的抗性中具有重要作用,同时能够代谢吡蚜酮,与这两种杀虫剂的交互抗性有关<sup>[39]</sup>。近年来,随着高通量测序技术和新型基因功能验证技术的不断进步,代谢抗性基因的鉴定逐渐从一个或几个基因向多基因发展。基于褐飞虱基因组中的 P450 基因信息,通过比较吡虫啉抗性和敏感种群中褐飞虱全部 45 个

P450 基因的表达量变化,结合 RNAi 和体外代谢鉴定了参与吡虫啉代谢的 4 个 P450 基因,并且发现这 4 个基因分别在抗性发展的不同阶段发挥作用<sup>[40]</sup>。棉铃虫 *CYP6AE* 基因簇包含 9 个首尾相连的 P450 基因,研究人员采用 CRISPR/Cas9 技术敲除了该基因簇,发现敲除品系对顺式氰戊菊酯和茚虫威的敏感性显著提高,对该基因簇中 9 个 P450 基因逐一进行离体表达,并分别检测对化合物的代谢活性,从而鉴定了该基因簇中参与解毒代谢的 5 个 P450 基因<sup>[41]</sup>。

最近研究发现,在经典的昆虫解毒酶(P450、GST、CarE)家族中,参与抗药性的亚家族和酶的数量不断刷新;同时,还不断发现新的参与抗药性的代谢酶家族,如 ABC 转运蛋白、UGT 等。已有不少报道认为,ABC 转运蛋白在害虫抗药性中起到关键作用,是害虫对化学杀虫剂和 Bt 毒素/转 Bt 作物抗性的重要代谢抗性机制,并认为对 ABC 转运蛋白基因的 RNAi 干扰可能成为害虫防治和抗药性治理的有效手段<sup>[42]</sup>。在稻飞虱抗药性研究中,发现多个 ABC 转运蛋白与灰飞虱对多种杀虫剂抗性有关<sup>[43]</sup>。近年来,UGT 也被认为可能在害虫抗药性中起重要作用,并已经被证实与害虫对多种类型杀虫剂抗性相关<sup>[44]</sup>。

## 2.2 解毒酶过量表达的调控机制

有研究表明,与抗药性相关的解毒酶和转运蛋白基因的过量表达受顺式作用元件、反式作用因子,以及顺式和反式作用因子的联合作用的控制,形成交叉调控网络,在这些抗药性相关基因表达调控中,一些转录因子起到关键作用。在抗拟除虫菊酯家蝇品系中,CYP6A1 和 CYP6D1 的过量表达的部分原因是 2 号染色体上负调控 loci 基因功能缺失造成的。对于 CYP6D1,被称为 Gfi-1 like 的蛋白可能就是负调控的阻遏物<sup>[45]</sup>。对于 CYP6A1,连锁分析表明其调控阻遏物基因座位于 2 号染色体重要位点 *aristapedia* 和 *carnation eye* 附近,这两个位点分别对应抗 DDT 和二嗪农的位点<sup>[46]</sup>。最近关于灰飞虱对溴氰菊酯抗药性的研究利用系列缺失和点突变技术进行荧光素报告基因分析发现,与敏感品系相比,抗性品系中存在 4 个突变位点,产生了三个新的转录因子结合位点(XBP-1、D1 及 Dfd)及 100bp 的插入片段,从而导致 CYP6FU1 基因的过量表达<sup>[47]</sup>。家蝇的 CYP6D1 和 CYP6D3,果蝇的 CYP6A2、CYP6A8 和 CYP12A4 启动子序列杂交比较证明了顺式启动元件上的突变、插入或缺失可能导致表达

量上调<sup>[2]</sup>。在转录因子方面,目前研究较多的是 CncC:Maf,该转录因子被证实在多种昆虫中参与 P450、GST、ABC 转运蛋白等解毒酶的调控<sup>[48]</sup>。在赤拟谷盗中,CncC 调控 CYP6BQ 亚家族基因的表达量,从而导致对溴氰菊酯的抗性<sup>[49]</sup>。在冈比亚按蚊中,通过 RNAi 敲除 Maf-S 导致 CYP6M2、GSTD1、GSTD3 表达量下调,害虫对 DDT 和拟除虫菊酯的敏感性上升<sup>[50]</sup>。

## 2.3 解毒酶的突变与基因复制

突变虽然能够增加酶的活性,进而增加其对外源化合物的代谢能力,但是其稳定性会下降,可能在解毒酶介导的抗药性中起到次要作用,相关文献报道不多。在铜绿蝇(*Lucilia cuprina*)和家蝇抗二嗪磷品系中,一对同源的酯酶基因 *LcαE7* 和 *MdαE7* 具有相同的突变位点 G137D,提高了酶对有机磷杀虫剂的水解速率<sup>[51]</sup>。在不同品系等位基因的检测中发现,果蝇 DDT 抗性品系中 CYP6X1、CYP6D1、CYP6D3 和 CYP6A2 中存在不同数目的氨基酸突变。其中,CYP6A2 中的 3 个氨基酸突变 R335S、L336V 和 V476L 靠近活性位点,能够增加其对 DDT 的代谢活性<sup>[52]</sup>。Zimmer 等从采集自亚洲不同国家的褐飞虱田间种群中分离获得了 2 个能够导致吡虫啉抗性的 CYP6ER1 变体(variation),二者携带相同的突变位点 T318S 和第 377 位附近的氨基酸缺失。在抗性褐飞虱中,CYP6ER1 发生了基因复制,同时携带了野生型和突变型拷贝,并且这两种拷贝的表达量存在显著差异<sup>[53]</sup>。以上研究结果表明,在同一物种中解毒酶可能通过突变、基因复制、表达量上调等多种方式共同介导抗药性的产生。

## 3 杀虫剂的选择性机制

杀虫剂的选择性是指这一杀虫剂能够致死某种害虫,但对非靶标生物如天敌、高等动物等相对无害,或对一些害虫有毒而对另一些害虫无毒。高选择性的杀虫剂能够在有效防治靶标害虫的同时保护天敌,维持生态系统多样性。杀虫剂的选择性机制主要有作用靶标的选择性和代谢差异的选择性。

### 3.1 作用靶标的选择性

目前高选择性杀虫剂的开发更多的关注靶标的选择性,这种选择性来源于以下两种情况:

(1) 杀虫剂的作用靶标是昆虫特有的。这一类杀虫剂比较典型的是调节或干扰昆虫生长发育的昆虫生长调节剂,如作用于蜕皮激素受体的蜕皮激素类似物和双酰胺类杀虫剂、作用于保幼激素受体的

保幼激素类似物、昆虫几丁质合成抑制剂和昆虫几丁质酶抑制剂等<sup>[54]</sup>。

(2) 不同物种中作用靶标对杀虫剂的敏感性不同。杀虫剂作用靶标是害虫与杀虫剂互作过程中被赋予药物效应的特定分子,这些特定分子通常为生命活动中具有不可或缺的生物功能的离子通道、酶或结构蛋白。大量的研究表明,选择性杀虫剂与靶标的互作具有相互的特异性要求,靶标蛋白关键功能位点的氨基酸差异可能会造成不同物种或同一物种的不同群体对杀虫剂的敏感性出现巨大差异。因此,只有能够与害虫重要功能蛋白发生特异性互作的杀虫剂才会具备选择性和高活性。新烟碱类杀虫剂是昆虫烟碱型乙酰胆碱受体(nAChRs)的选择性激动剂,在哺乳动物和昆虫之间具有较高的选择性。通过放射性配基结合试验和电生理试验比较昆虫和哺乳动物 nAChRs 对不同新烟碱类杀虫剂的敏感性发现,烯啶虫胺对害虫 nAChRs 的亲合力( $IC_{50} = 14 \text{ nM}$ )是哺乳动物( $IC_{50} = 49\ 000 \text{ nM}$ )的 3 500 倍,是新烟碱类杀虫剂中选择性最高的;其次是噻虫胺,其选择毒力比(selectivity ratio)为 1 591。代表性新烟碱类杀虫剂吡虫啉对害虫 nAChRs 的亲合力( $IC_{50} = 4.3 \text{ nM}$ )是哺乳动物( $IC_{50} = 2\ 600 \text{ nM}$ )的 605 倍<sup>[55]</sup>。

随着人们对生态环境关注度的增加和综合防治的发展,杀虫剂对害虫及其天敌的选择性也得到了越来越多的关注。拟环纹豹蛛(*Pardosa pseudoannulata*)是稻田生态系统中重要捕食性天敌。室内生物测定结果表明,有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂对拟环纹豹蛛相对安全,恶唑磷、二嗪农、仲丁威和西维因对拟环纹豹蛛的  $LC_{50}$  分别为靶标害虫褐飞虱的 108 倍、31 倍、31 倍和 5.3 倍;新烟碱类杀虫剂吡虫啉对拟环纹豹蛛的  $LC_{50}$  是褐飞虱的 772 倍,具有相对较高的选择性<sup>[4]</sup>。通过分别比较褐飞虱和拟环纹豹蛛中两类杀虫剂的作用靶标 AChEs 和 nAChRs 的序列差异发现,位于靶标—杀虫剂结合位点上的一些关键氨基酸差异能够直接影响靶标与杀虫剂的结合能力,从而影响杀虫剂的选择性<sup>[56, 57]</sup>。

### 3.2 代谢差异的选择性

生物体对杀虫剂的代谢不同是造成选择毒性的的重要因素,代谢水平的差异很大程度上决定了杀虫剂在害虫和非靶标生物之间的选择性。羧酸酯酶、细胞色素 P450、谷胱甘肽转移酶、ABC 转运蛋白、UGT 葡萄糖醛酸转移酶等是生物体内重要的解毒

酶系,这些解毒酶基因的数量、丰富度和代谢活性都会影响生物体对杀虫剂的代谢能力,从而导致杀虫剂的选择毒性。拟除虫菊酯类杀虫剂在昆虫和哺乳动物之间具有较高的选择性。在哺乳动物中,拟除虫菊酯类杀虫剂的代谢途径有 2 个,分别为羧酸酯酶催化的水解反应和 P450 催化的氧化反应<sup>[58]</sup>。有研究表明,苜蓿烯菊酯对小鼠脑内毒力的  $LD_{50}$  为  $0.2 \text{ mg/kg}$  体重,而通过腹腔注射时  $LD_{50} > 1\ 000 \text{ mg/kg}$ 。在腹腔注射时使用羧酸酯酶的特异性抑制剂 DEF 或 P450 的特异性抑制剂 PBO 均能产生显著的增效作用,增效倍数分别达到 188 倍和 66 倍以上<sup>[59]</sup>。这一结果说明哺乳动物解毒酶能够快速水解拟除虫菊酯是其选择毒性的重要机制。

作为一种重要的传粉昆虫,蜜蜂(*Apis mellifera*)的种群崩溃综合症(colony collapse disorder)近年来得到了广泛关注。新烟碱类杀虫剂的使用是导致蜜蜂种群崩溃的因素之一,但是不同新烟碱类杀虫剂对蜜蜂的毒性差异较大。进一步分析发现,蜜蜂对带有硝基或硝基亚甲基结构的新烟碱类杀虫剂非常敏感,而带有氰基的新烟碱类杀虫剂对蜜蜂的毒性相对较低。这种毒力的差异可能是由于蜜蜂的 P450 能够氧化氰基,但是具体是哪一个 P450 参与了这一反应尚不明确<sup>[55]</sup>。

此外,在杀虫剂对害虫与天敌的选择性方面,目前的研究大都集中于靶标差异,代谢水平的选择性机制报道较少。

## 4 主要科学问题

### 4.1 抗性基因的鉴定

目前至少有 30 种农作物害虫对约 40 种不同类别的杀虫剂产生了不同程度的抗性,随着新药投入田间应用,抗药性发生发展的频率进一步加大,这方面的数据正在逐年增加。鉴定抗性基因对于明确有害生物抗药性机制,有针对性的设计和开发新农药具有重要意义。杀虫剂靶标基因的变异鉴定具有可预期性,而且由于靶标基因明确、数量少,鉴定和阐明机制相对容易。相对而言,代谢抗性相关基因由于家族多、成员多,且参与代谢抗性的基因家族在不断增加等原因,在鉴定和抗性机制研究方面更困难、更复杂,但也更重要。近年来,高通量测序技术、新型基因功能验证技术的不断进步,为靶标和代谢抗性基因鉴定、验证提供了技术基础,将推动专性抗性基因鉴定和抗药性调控网络机制的深入研究。

### 4.2 昆虫抗药性基因调控网络

由 P450s、CarEs、UGTs、GSTs 和 ABC 等解毒

酶和转运蛋白介导的有害生物抗药性机理是代谢抗性研究的重要内容。这些解毒酶和转运蛋白通过基因突变、扩增和上调表达参与几乎所有药剂的抗性。其中,上调表达是 P450s、CarEs 和 GSTs 参与抗性的主要途径。有研究表明,与抗药性相关的解毒酶和转运蛋白基因的过量表达受顺式作用因子、反式作用因子,以及顺式和反式作用因子的联合作用的控制,形成交叉调控网络。在这些抗药性相关基因表达调控中,一些转录因子起到关键作用,寻找关键转录因子变化的原因、变化规律和对靶基因调控机制,是阐明有害生物抗药性调控网络的关键。

#### 4.3 杀虫剂靶标结构生物学与选择性杀虫剂的开发

选择性杀虫剂与靶标的交互具有相互的特异性要求,靶标蛋白关键功能位点的氨基酸差异或杀虫剂结构上的改变都可能会造成二者之间亲和力的变化,从而导致不同物种或同一物种的不同群体对杀虫剂的敏感性出现巨大差异。因此,基于有害生物药敏性分子结构生物学,明确分子靶标的药敏性、抗药性位点和小分子化合物的活性基团,设计、合成具有亲和性高、选择性强的农药小分子,可以大幅提高绿色靶向农药创制的效率。然而,目前基于已知药剂靶标结构进行农药创制的探索未能取得满意进展的根本原因,是挖掘的新靶标及解析的靶标蛋白结构大多来源于非靶标生物的同源蛋白(模式昆虫或哺乳动物),而不是直接来源于害虫的靶标蛋白,即使设计的药剂分子与这种异源靶标有很高的结合能力,也与害虫的同源靶标不能发生亲和或亲和性很低。因此,研究重要害虫的杀虫剂作用靶标的结构生物学,能够为设计超高活性和选择性的新型农药分子提供靶标参数,是未来农药生物学研究和新型高选择性杀虫剂开发的方向。

#### 参 考 文 献

- [1] Khan MA, Khan Z, Ahmad W, et al. Insect pest resistance: an alternative approach for crop protection// Hakeem KR. Crop Production and Global Environmental Issues. Springer International Publishing, 2015: 257—282.
- [2] Gould F, Brown ZS, Kuzma J. Wicked evolution: Can we address the sociobiological dilemma of pesticide resistance? Science, 2018, 360(6390): 728—732.
- [3] Wu SF, Zeng B, Zheng C, et al. The evolution of insecticide resistance in the brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stal) of China in the period 2012-2016. Scientific Reports, 2018, 8(1): 4586.
- [4] Tanaka K, Endo S, Kazano H. Toxicity of insecticides to predators of rice planthoppers: Spiders, the mirid bug and the dryinid wasp. Applied Entomology and Zoology, 2000, 35(1): 177—187.
- [5] 王玺,贾京京,张一帆,等. 8种水稻田常用杀虫剂对2种天敌蜘蛛的室内安全性评价. 南京农业大学学报, 2013, (03): 53—58.
- [6] Pekar S. Spiders (Araneae) in the pesticide world: an ecotoxicological review. Pest Management Science, 2012, 68(11): 1438—1446.
- [7] Liu Z, Williamson MS, Lansdell SJ, et al. 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, 2005, 102(24): 8420—8425.
- [8] Liu Z, Williamson MS, Lansdell SJ, et al. A nicotinic acetylcholine receptor mutation (Y151S) causes reduced agonist potency to a range of neonicotinoid insecticides. Journal of Neurochemistry, 2006, 99(4): 1273—1281.
- [9] Bass C, Puinean AM, Andrews M, et al. Mutation of a nicotinic acetylcholine receptor beta subunit is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. BMC Neuroscience, 2011, 12.
- [10] Ffrench-Constant RH, Rocheleau TA, Steichen JC, et al. A point mutation in a *Drosophila* GABA receptor confers insecticide resistance. Nature, 1993, 363(6428): 449—451.
- [11] Gao JR, Kozaki T, Leichter CA, et al. The A302S mutation in *Rdl* that confers resistance to cyclodienes and limited cross-resistance to fipronil is undetectable in field populations of house flies from the USA. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2007, 88(1): 66—70.
- [12] Du W, Awolola TS, Howell P, et al. Independent mutations in the *Rdl* locus confer dieldrin resistance to *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis*. Insect Molecular Biology, 2005, 14(2): 179—183.
- [13] Nakao T, Naoi A, Kawahara N, et al. Mutation of the GABA receptor associated with fipronil resistance in the whitebacked planthopper, *Sogatella furcifera*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2010, 97(3): 262—266.
- [14] Yan HH, Xue CB, Li GY, et al. Flubendiamide resistance and Bi-PASA detection of ryanodine receptor G4946E mutation in the diamondback moth (*Plutella xylostella* L.). Pesticide Biochemistry and Physiology, 2014, 115(0): 73—77.
- [15] Dong K, Du Y, Rinkevich F, et al. Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2014, 50(0): 1—17.
- [16] Villatte F, Ziliani P, Marcel V, et al. A high number of mutations in insect acetylcholinesterase may provide insecticide resistance. Pesticide Biochemistry Physiology, 2000, 67(2): 95—102.
- [17] 李保玲. 褐飞虱在三唑磷诱导下的上调表达基因及其两种乙酰胆碱酯酶基因特性分析. 浙江大学博士论文, 2012.
- [18] Williamson MS, MartinezTorres D, Hick CA, et al. Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (*knockdown*) to pyrethroid insecticides. Molecular and General Genetics, 1996, 252(1—2): 51—60.
- [19] Soderlund DM, Knipple DC. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2003, 33(6): 563—577.

- [20] Zhang Y, Meng X, Yang Y, et al. Synergistic and compensatory effects of two point mutations conferring target-site resistance to fipronil in the insect GABA receptor RDL. *Scientific Reports*, 2016, 6: 32335.
- [21] Zhang Y, Yang B, Li J, et al. Point mutations in acetylcholinesterase 1 associated with chlorpyrifos resistance in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stal. *Insect Molecular Biology*, 2017, 26(4): 453—460.
- [22] Markussen MDK, Kristensen M. Low expression of nicotinic acetylcholine receptor subunit Md alpha 2 in neonicotinoid-resistant strains of *Musca domestica* L. *Pest Management Science*, 2010, 66(11): 1257—1262.
- [23] Taillebois E, Beloula A, Quincharde S, et al. Neonicotinoid blinding, toxicity and expression of nicotinic acetylcholine receptor subunits in the aphid *Acyrtosiphon pisum*. *PLoS One*, 2014, 9(5): e96669.
- [24] Zhang Y, Wang X, Yang B, et al. Reduction in mRNA and protein expression of a nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 8$  subunit is associated with resistance to imidacloprid in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Journal of Neurochemistry*, 2015, 135: 686—694.
- [25] Li J, Shao Y, Ding Z, et al. Native subunit composition of two insect nicotinic receptor subtypes with differing affinities for the insecticide imidacloprid. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, 40(1): 17—22.
- [26] Small GJ, Hemingway J. Molecular characterization of the amplified carboxylesterase gene associated with organophosphorus insecticide resistance in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect Molecular Biology*, 2001, 9(6): 647—653.
- [27] Ortelli F, Rossiter LC, Vontas J, et al. Heterologous expression of four glutathione transferase genes genetically linked to a major insecticide-resistance locus from the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochemical Journal*, 2003, 373: 957—963.
- [28] Qin G, Jia M, Liu T, et al. Heterologous expression and characterization of a sigma glutathione S-transferase involved in carbaryl detoxification from oriental migratory locust, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen). *Journal of Insect Physiology*, 2012, 58(2): 220—227.
- [29] Han JB, Li GQ, Wan PJ, et al. Identification of glutathione S-transferase genes in *Leptinotarsa decemlineata* and their expression patterns under stress of three insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2016, 133: 26—34.
- [30] Li X, Schuler MA, Berenbaum MR. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annual Review of Entomology*, 2007, 52: 231—253.
- [31] Stevenson BJ, Bibby J, Pignatelli P, et al. Cytochrome P450 6M2 from the malaria vector *Anopheles gambiae* metabolizes pyrethroids: Sequential metabolism of deltamethrin revealed. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2011, 41(7): 492—502.
- [32] Liu N, Scott JG. Increased transcription of CYP6D1 causes cytochrome P450-mediated insecticide resistance in house fly. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1998, 28(8): 531—535.
- [33] Karunker I, Benting J, Lueke B, et al. 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 and Molecular Biology*, 2008, 38(6): 634—644.
- [34] Gong MQ, Gu Y, Hu XB, et al. Cloning and overexpression of CYP6F1, a cytochrome P450 gene, from deltamethrin-resistant *Culex pipiens pallens*. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, 2005, 37(5): 317—326.
- [35] Hardstone M, Komagata O, Kasai S, et al. Use of isogenic strains indicates CYP9M10 is linked to permethrin resistance in *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Insect Molecular Biology*, 2010, 19(6): 717—726.
- [36] Bass C, Carvalho R, Oliphant L, et al. Overexpression of a cytochrome P450 monooxygenase, CYP6ER1, is associated with resistance to imidacloprid in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect Molecular Biology*, 2011, 20(6): 763—773.
- [37] Ding Z, Wen Y, Yang B, et al. Biochemical mechanisms of imidacloprid resistance in *Nilaparvata lugens*: over-expression of cytochrome P450 CYP6AY1. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2013, 43(11): 1021—1027.
- [38] Bao H, Gao H, Zhang Y, et al. The roles of CYP6AY1 and CYP6ER1 in imidacloprid resistance in the brown planthopper: Expression levels and detoxification efficiency. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2015.
- [39] Nauen R, Vontas J, Kaussmann M, et al. Pymetrozine is hydroxylated by CYP6CM1, a cytochrome P450 conferring neonicotinoid resistance in *Bemisia tabaci*. *Pest Management Science*, 2013, 69(4): 457—461.
- [40] Zhang Y, Yang Y, Sun H, et al. Metabolic imidacloprid resistance in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, relies on multiple P450 enzymes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2016, 79: 50—56.
- [41] Wang H, Shi Y, Wang L, et al. CYP6AE gene cluster knockout in *Helicoverpa armigera* reveals role in detoxification of phytochemicals and insecticides. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 4820—4820.
- [42] Guo Z, Kang S, Zhu X, et al. The novel ABC transporter ABCH1 is a potential target for RNAi-based insect pest control and resistance management. *Scientific Reports*, 2015, 5(1): 13728.
- [43] Sun H, Pu J, Chen F, et al. Multiple ATP-binding cassette transporters are involved in insecticide resistance in the small brown planthopper, *Laodelphax striatellus*. *Insect Molecular Biology*, 2017, 26(3): 343—355.
- [44] Li X, Shi H, Gao X, et al. Characterization of UDP-glucuronosyltransferase genes and their possible roles in multi-insecticide resistance in *Plutella xylostella* (L.). *Pest Management Science*, 2018, 74(3): 695—704.
- [45] Kasai S, Scott JG. Cytochrome P450s CYP6D3 and CYP6D1 are part of a P450 gene cluster on autosome 1 in the house fly. *Insect Molecular Biology*, 2001, 10(3): 191—196.
- [46] Sabourault C, Guzov VM, Koener JF, et al. Overproduction of a P450 that metabolizes diazinon is linked to a loss-of-function in the chromosome 2 ali-esterase (MdeltaE7) gene in resistant house flies. *Insect Molecular Biology*, 2002, 10(6): 609—618.

- [47] Pu J, Sun H, Wang J, et al. Multiple cis-acting elements involved in up-regulation of a cytochrome P450 gene conferring resistance to deltamethrin in small brown planthopper, *Laodelphax striatellus* (Fallen). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2016, 78: 20–28.
- [48] Wilding, CS. Regulating resistance: CncC;Maf, antioxidant response elements and the overexpression of detoxification genes in insecticide resistance. *Current Opinion in Insect Science*, 2018; S2214574517301177.
- [49] Kalsi M, Palli SR. Transcription factors, CncC and Maf, regulate expression of CYP6BQ genes responsible for deltamethrin resistance in *Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2015, 65: 47–56.
- [50] Ingham VA, Patricia P, Moore JD, et al. Simon W, Hilary R. The transcription factor Maf-S regulates metabolic resistance to insecticides in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 669.
- [51] Claudianos C, Russell RJ, Oakeshott JG. The same amino acid substitution in orthologous esterases confers organophosphate resistance on the house fly and a blowfly. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1999, 29(29): 675–686.
- [52] Amichot M, Tares S, Brun-Barale A, et al. Point mutations associated with insecticide resistance in the *Drosophila* cytochrome P450 CYP6A2 enable DDT metabolism. *European journal of biochemistry/FEBS*, 2004, 271: 1250–1257.
- [53] Zimmer CT, Garrood WT, Singh KS, et al. Neofunctionalization of duplicated P450 Genes drives the evolution of insecticide resistance in the Brown Planthopper. *Current Biology*, 2018, 28(2): 268–274.
- [54] Liu T, Chen L, Zhou Y, et al. Structure, catalysis, and inhibition of OfChi-h, the Lepidoptera-exclusive insect chitinase. *Journal of Biological Chemistry*, 2017, 292: 2080–2088.
- [55] Casida JE. Neonicotinoids and other insect nicotinic receptor competitive modulators: progress and prospects. *Annual Review of Entomology*, 2018, 63: 125–144.
- [56] Meng X, Zhang Y, Guo B, et al. Identification of key amino acid differences contributing to neonicotinoid sensitivity between two nAChR alpha subunits from *Pardosa pseudoannulata*. *Neuroscience Letters*, 2015, 584: 123–128.
- [57] Zhang Y, Shao Y, Jiang F, et al. Identification of two acetylcholinesterases in *Pardosa pseudoannulata* and the sensitivity to insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2014, 46: 25–30.
- [58] Kaneko H. Pyrethroids: mammalian metabolism and toxicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59: 2786–2791.
- [59] Soderlund DM. Resmethrin, the first modern pyrethroid insecticide. *Pest Management Science*, 2015, 71: 801–807.

## Mechanisms of Insecticide Resistance and Selectivity

Zhang Yixi    Liu Zewen\*

*Key Laboratory of Monitoring and Management of Crop Diseases and Pest Insects, Ministry of Agriculture / College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095*

**Abstract** Chemical control is one of the most important strategies for insect pest control. However, chemical insecticide application also has some negative effects, such as pesticide residue, environmental pollution and threatening non-target organisms. For the safety of non-target organisms, the selectivity is a benchmark in insecticide development. Another problem from chemical insecticide application is the insecticide resistances in insects, which reduce control effects, increase insecticide application amount and aggravate negative effects of insecticides. Insecticide resistance mechanisms include several aspects, among which the target insensitivity and detoxification enhancement are two main parts. Amino acid replacement and quantity changes in molecular targets reduce the affinity between insecticides and target proteins in insect, and cause high level resistance. Most insecticide detoxification related gene groups consist of multiple families and lots of members, which result in a complicated status to understand the detoxification enhancement mechanism and the expression regulation of resistance related genes. In summary, the important aspects in insecticide resistance researches will cover (but not limit to) the identification of resistance related genes in insects and their regulation net, and insecticide development based on insecticide resistance.

**Keywords** insect pest; insecticide; selectivity; resistance

(责任编辑 齐昆鹏 吴妹)

\* Corresponding Author, Email: liuzewen@njau.edu.cn