

# 白背飞虱可能与吡蚜酮抗性相关的蛋白质组学\*

凌善锋<sup>1,2,3</sup>, 肖汉祥<sup>4</sup>, 简清梅<sup>1</sup>, Nhuan P. Nghiem<sup>2,3</sup>, 张润杰<sup>5</sup>, 李燕芳<sup>4</sup>

(1. 荆楚理工学院生物工程学院, 湖北 荆门 448000;

2. 美国农业部(USDA)东部研究中心(ERRC), 宾夕法尼亚州 费城 19038;

3. 堪萨斯州立大学, 堪萨斯州 曼哈顿 66506;

4. 广东省农业科学院植物保护研究所, 广东 广州 510640;

5. 中山大学有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 广东 广州 510275)

**摘要:** 运用双向电泳和质谱技术, 分析了白背飞虱吡蚜酮抗性相关的蛋白质。在所有的蛋白点中, 22个蛋白点被PMF成功识别。这些蛋白点展示了各种各样的细胞功能, 主要包括: ①碳水化合物转运和新陈代谢; ②蛋白质新陈代谢和分子伴侣; ③能量的产生和转化; ④转录和翻译; ⑤无机离子转运和新陈代谢; ⑥氨基酸转运和新陈代谢; ⑦脂质新陈代谢。绝大多数蛋白都没有报道与吡蚜酮抗性相关。

**关键词:** 白背飞虱; 吡蚜酮抗性; 双向电泳; 质谱

**中图分类号:** Q78; Q96 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579(2017)02-0022-04

## Proteomic analysis of insecticide resistance of *Sogatella furcifera* to pymetrozine

LING Shanfeng<sup>1,2,3</sup>, XIAO Hanxiang<sup>4</sup>, JIAN Qingmei<sup>1</sup>, Nhuan P. Nghiem<sup>2,3</sup>, ZHANG Runjie<sup>5</sup>, LI Yanfang<sup>4</sup>

(1. Jingchu University of Technology, Jingmen 448000, China;

2. The United States Department of Agriculture, ERRC, Philadelphia 19038, Pennsylvania, USA;

3. Kansas State University, Manhattan 66506, Kansas, USA;

4. Plant Protection Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Science, Guangzhou 510640, China;

5. State Key Laboratory for Biocontrol and Institute of Entomology, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

**Abstract:** In order to reveal the mechanism of pymetrozine resistance in *Sogatella furcifera* we performed the proteomic analysis using 2-D PAGE separation and MALDI-TOF MS. Of these spots, 22 proteins were identified by PMF. These proteins display various cellular functions, including: ① carbohydrate transport and metabolism; ② protein metabolism and chaperone; ③ energy production and conversion; ④ transcription and translation; ⑤ inorganic ion transport and metabolism; ⑥ amino acid transport and metabolism; and ⑦ lipid metabolism. Most of these proteins have not previously been reported to be relevant to pymetrozine resistance.

**Key words:** *Sogatella furcifera*; pymetrozine resistance; 2-D PAGE; MALDI-TOF MS

\* 收稿日期: 2016-05-16

基金项目: 湖北省教育厅省属高校青年教师出国留学项目(鄂教外函[2014]59号); 国家科技支撑计划项目(2016BAD19B07, 2012BAD19B03); 荆楚理工学院引进博士科研启动经费(2013BK05)

作者简介: 凌善锋(1971年生), 男; 研究方向: 昆虫生态学与害虫防治; E-mail: shanfeng86@163.com

白背飞虱是亚洲国家重要的迁飞性的水稻害虫，从 2005 年开始，白背飞虱的再猖獗在亚洲国家出现，包括中国、韩国、越南、日本、泰国，杀虫剂的抗性跟白背飞虱的爆发密切相关<sup>[1-3]</sup>。吡蚜酮，一种新型吡啶杂环类杀虫剂，药效优异，但是，在最近 5 年中，其抗药性不断发展。2011 年，江苏无锡和盐城灰飞虱田间种群对吡蚜酮发展为低水平抗性<sup>[4]</sup>。随后，褐飞虱对吡蚜酮的抗药性激增，其中 2012 对吡蚜酮达到 34.9 ~ 46.8 倍，达到中抗水平<sup>[5]</sup>。2012 年采集自湖北荆门的白背飞虱迁入种群有中等水平抗性 (RR = 16.07)，迁出种群和回迁种群对田间吡蚜酮农药有高水平抗性 (RR = 54.35, 51.60)<sup>[6]</sup>。湖北荆门白背飞虱种群对吡蚜酮的抗性在推进性激增。抗性治理迫在眉睫。

吡蚜酮抗性的增加主要是由于吡蚜酮频繁使用以及吡蚜酮和新烟碱类杀虫剂的交互抗性，这种现象在温室粉虱中已有报道<sup>[5]</sup>。在烟粉虱中吡蚜酮抗性的主要原因是细胞色素 P450 酶 CYP6CM1 超表达<sup>[7]</sup>。

本文中，我们通过蛋白质组学技术分析了白背飞虱抗性，研究结果很可能有助于理解迁飞白背飞虱的抗性形成机制，有助于采取相应的抗性治理措施，这将具有较重要的科学意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 昆虫品系和杀虫剂

敏感品系：2015 年 9 月由荆门市农业病虫害测报站提供多年室内饲养的白背飞虱，经室内在不接触任何农药的条件继续饲养繁育而成，吡蚜酮的具体抗性是 1.00。

田间品系：2014 年 9 月，白背飞虱采自湖北荆门市稻田。

抗性品系：吡蚜酮 ( $w = 25\%$ ) 构自江苏凤山集团公司，吡蚜酮用丙酮和水稀释成双倍系列浓度，吡蚜酮抗性白背飞虱品系在实验室用吡蚜酮对田间品系连续筛选 7 代培育而成，对吡蚜酮的具体抗性是 33.33。

### 1.2 方法

双向电泳，胶内消化和质谱。

蛋白抽提和双向电泳按照 Sharma 等<sup>[8]</sup>进行，胶内消化和质谱按照 Ge 等<sup>[10]</sup>进行。每组蛋白质抽提方法改进的地方如下：52 头长翅型雌成虫用作白背飞虱的蛋白质样品抽提，称取 92 mg 雌成虫放在 1 mL 裂解液 (9 mol/L 尿素； $\varphi = 5\%$  CHAPS；

36 mmol/L Tris - HCl；3 mol/L 硫脲； $\varphi = 1\%$   $\beta$ -巯基乙醇；蛋白酶抑制剂鸡尾酒) 中，置于冰上，用研棒进行充分匀浆。然后在冰上超声，4 °C 13 600 r/min 离心 50 min，用 -20 °C 的冷丙酮沉淀蛋白 2.2 h 后，重新溶解在重泡胀缓冲液 (10 mol/L 尿素；3 mol/L 硫脲； $\varphi = 5\%$  CHAPS；90 mmol/L 二硫苏糖醇和  $w = 2\%$  两性电解质) 中，备用。蛋白浓度用 Bradford 方法进行测定<sup>[9]</sup>。

### 1.3 数据库搜索

蛋白点的数据库搜索的详细方法按照 Ge 等<sup>[10]</sup>进行。

## 2 结果

跟对照相比，抗性种群细胞的双向电泳图谱发生了明显的变化。一些蛋白点被明显诱导，很可能涉及到吡蚜酮抗性。图 1:(A) 和图 1:(B) 是吡蚜酮抗性种群和对照的双向电泳图谱，对于表达水平明显变化的点，我们用胰蛋白酶进行消化，质谱进行了分析，数据库 (包括昆虫、细菌、人) 搜索，他们的相对分子质量、等电点、细胞功能列在表 1。22 个吡蚜酮抗性相关的蛋白点被成功识别。我们认为细胞色素 P450 单加氧酶直接参与了吡蚜酮抗性，表 1 是鉴定出的重要的其它差异表达蛋白点，但是它们与抗药性的真正关系很难解释。

## 3 讨论

在所有的蛋白点中，22 个蛋白点被 PMF 成功识别。这些蛋白点展示了各种各样的细胞功能，主要包括：①碳水化合物转运和新陈代谢；②蛋白质新陈代谢和分子伴侣；③能量的产生和转化；④转录和翻译；⑤无机离子转运和新陈代谢；⑥氨基酸转运和新陈代谢；⑦脂质新陈代谢。绝大多数蛋白都没有报道与吡蚜酮抗性相关，它们与抗药性的真正可能关系需要进一步解释。

蛋白质组学技术 (双向电泳和质谱) 在稻飞虱抗性机理和农药毒理学方面研究较少。由氨基甲酸酯类杀虫剂 (BPMC) 中毒的褐飞虱的蛋白质组学分析结果表明：10 个蛋白点 (即 HSP 90、 $\beta$  微管蛋白、ATP 合成酶、肌动蛋白、原肌球蛋白、副肌球蛋白、钙网蛋白、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶等) 表达上升， $\beta$ -线粒体加工肽酶、二氢硫辛酰胺脱氢酶、烯醇化酶、酰基辅酶 A 脱氢酶表达下降<sup>[8]</sup>。管家蛋白如细胞色素 b、NADH 脱氢酶、延伸因子 EF、ATP 合成酶、肌球蛋白和微管蛋白等报道与稻飞虱抗性有关<sup>[9]</sup>。方琦<sup>[9]</sup>通过研究报

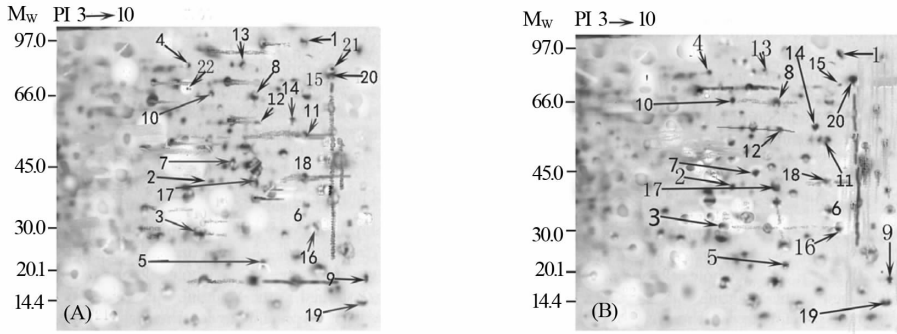


图 1 白背飞虱抗性种群 (B) 和敏感种群 (A) 双向电泳图谱

Fig. 1 Representative two-dimensional electrophoresis (2-DE) maps of the susceptible population (A) and pymetrozine resistance population (B) in *Sogatella furcifera*

箭头表示不同差异表达的蛋白, 识别的蛋白用不同的阿拉伯数字表示, 并且列在表 1 中

Arrows indicate differently expressed proteins that were detected. Numbers correlate with the protein identification listed in Table 1

表 1 白背飞虱抗性种群识别到的差异表达的蛋白点

Table 1 Proteins whose expression levels changed in pymetrozine resistance of *Sogatella furcifera*

Spot No	Identified protein (a) Function (b)	Theoretical pI (Mw) /10 <sup>3</sup>	Coverage/%	Expression level <sup>(c)</sup>
Carbohydrate transport and metabolism				
1	Phosphofructokinase	8.37 (86.723)	17	↑
2	Pyruvate kinase	4.63 (42.22)	23	↑
Protein metabolism and chaperone				
3	Peptidase-related protein	5.85 (28.216)	12	↓
4	heat shock protein, HSP20 family	4.13 (82.533)	15	↑
Signal transduction mechanisms				
5	Response regulator	6.49 (21.752)	9	↑
13	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1A	5.82 (84.636)	23	↓
21	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor	6.20 (72.156)	27	↓
22	serotonin transporter, isoform A	3.98 (68.126)	29	↓
Energy production and conversion				
6	Succinate dehydrogenase	7.84 (35.641)	18	↑
7	Succinyl CoA synthetase beta chain	5.47 (46.853)	14	↑
8	Malate dehydrogenase	6.20 (63.667)	13	↑
9	ferredoxin	9.71 (18.665)	16	↑
Transcription and translation				
10	translation initiation factor IF-2	4.70 / 66.125	27	↑
11	elongation factor Tu, mitochondrial-like isoform	17.72 / 54335	8	↓
Inorganic ion transport and metabolism				
15	calcium activated potassium channel	8.02 / 72.215	17	↑
20	cytochrome P450 monooxygenase	8.71 / 76.333	27	↑
12	Catalase	6.29 / 56.666	11	↑
Amino acid transport and metabolism				
14	putative glutamate dehydrogenase	7.37 / 57.829	9	↑
Lipid metabolism				
16	L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase precursor	8.07 / 29.913	22	↑
17	acyl CoA dehydrogenase	5.96 / 44.163	29	↑
18	β-ketoacyl ACP synthase Precursor	7.16 / 43.699	11	↓
19	Biotin carboxyl carrier protein	9.48 / 11.235	13	↑

(a) 在 MASCOT 数据库中, 识别到的差异表达的新蛋白点变化明显 ( $P < 0.05$ );  
Identified new protein scores in MASCOT database are all significant ( $P < 0.05$ )

(b) 蛋白质功能分类根据 NCBI's clusters of orthologous groups;  
Protein function classification is based on NCBI's clusters of orthologous groups

(c) 吡蚜酮抗性种群中, ↑ 和 ↓ 分别表示这些差异表达的新蛋白点上调和下调;  
The downward and upward arrows represent those spots which were newly appeared or increased respectively in pymetrozine resistance population

道了白背飞虱对田间农药马拉硫磷抗性的蛋白质组学基础: 酚氧化酶、烯醇化酶、磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶、肌钙蛋白、细胞色素氧化酶等是与白背飞虱对马拉硫磷的抗性相关的蛋白。其中, 酚氧化酶、烯醇化酶和磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶在抗性品系中的表达量高于敏感品系。所以, 白背飞虱对马拉硫磷的抗性机制不仅仅与其体内酯酶的扩增有关, 而是涉及诸多生理过程, 可能包括: 血淋巴黑化及凝结、糖酵解途径变化(磷酸戊糖途径开启, 糖异生发生)等, 这些生理机制共同协调控制抗性机制。酚氧化酶是导致白背飞虱血淋巴黑化与凝结的重要因子, 血淋巴黑化与凝结是白背飞虱防御有害物质农药入侵的有效手段, 是白背飞虱体液免疫的重要组成部分。一些跟生殖相关的新蛋白如精子发生相关蛋白 5、睾丸发育蛋白 NYD-SP6、精氨酸激酶、肌动蛋白 5C、卵黄蛋白、卵巢的丝氨酸蛋白酶 Nudel 被发现, 这 6 个新蛋白点均上调<sup>[10]</sup>。在我们的研究中, 在吡蚜酮抗性种群中, 16 个差异表达的新蛋白点上调, 6 个新蛋白点下调, 这将有助于理解迁飞白背飞虱的抗性形成机制, 有助于更新相应的抗性治理策略。第 20 个点鉴定为细胞色素 P450 单加氧酶, 细胞色素单加氧酶 (P450) 活性提高在一些杀虫剂抗性中起重要的作用, 如乙虫腈、吡虫啉、扑虱灵、杀虫双、拟除虫菊酯、氰戊菊酯、锐劲特<sup>[5,11]</sup>。

总而言之, 细胞色素 P450 单加氧酶在吡蚜酮去毒和抗性发展中起着关键的作用, 与多功能氧化酶的抑制剂的混合使用是白背飞虱种群敏感性恢复, 延缓吡蚜酮的抗性发展的重要方法。

## 参考文献:

[1] 张梅, 陈佳林, 周晓穗, 等. MSAP 在水稻害虫白背飞虱中的应用研究 [J]. 中山大学学报(自然科学版), 2015, 54(1): 98-102.  
ZHANG M, CHEN J, ZHOU X, et al. The application of MSAP in *Sogatella furcifera* (Horvath) [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2015, 54(1): 98-102.

[2] 梁梓强, 梁士可, 张梅, 等. 褐飞虱可溶性蛋白 SDS-PAGE 电泳分析 [J]. 中山大学学报(自然科学版), 2015, 54(6): 27-30.  
LIANG Z, LIANG S, ZHANG M, et al. Soluble Proteins in *Nilaparvata lugens* (Stål) by SDS-PAGE [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2015, 54

(6): 27-30.

- [3] TSUJIMOTO K, SUGI S, SANADAMORIMURA S, et al. A new method for monitoring the susceptibility of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae), to pymetrozine by combining topical application and measurement of offspring number [J]. Applied Entomology and Zoology, 2015, 51: 1-6.
- [4] BAN L, ZHANG S, HUANG Z, et al. Resistance monitoring and assessment of resistance risk to pymetrozine in *Laodelphax striatellus* (Hemiptera: Delphacidae) [J]. Journal of Economic Entomology, 2012, 105(6): 2129-2135.
- [5] ZHANG X, LIU X, ZHU F, et al. Field evolution of insecticide resistance in the brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål) in China [J]. Crop Protection, 2014, 58: 61-66.
- [6] 凌善锋, 张润杰. 白背飞虱迁入和迁出种群湖北荆门吡蚜酮抗性的最新监测 [J]. 中山大学学报(自然科学版), 2013, 52(5): 127-129.  
LING S, ZHANG R. New Pymetrozine resistance monitoring of the immigration and emigration population of *Sogatella furcifera* collected from the rice fields of Jingmen City, Hubei Province in 2012 [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2013, 52(5): 127-129.
- [7] NAUEN R, VONTAS J, KAUSSMANN M, et al. Pymetrozine is hydroxylated by CYP6CM1, a cytochrome P450 conferring neonicotinoid resistance in *Bemisia tabaci* [J]. Pest Management Science, 2013, 69: 457-461.
- [8] SHARMA R, KOMATSU S, NODA H. Proteomic analysis of brown planthopper: application to the study of carbamate toxicity [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2004, 34: 425-432.
- [9] 方琦. 白背飞虱抗药性相关的蛋白质组学研究 [D]. 杭州: 浙江大学农业与生物技术学院, 2006.  
FANG Q. Proteomic analysis of insecticide resistance of the white-backed planthopper, *Sogatella furcifera* (Horvath) [D]. Hangzhou: College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, 2006.
- [10] GE L Q, CHENG Y, WU J C, et al. Proteomic analysis of insecticide triazophos-induced mating-responsive proteins of *Nilaparvata lugens* Stål (Hemiptera: Delphacidae) [J]. Journal of Proteome Research, 2011, 10: 4597-4612.
- [11] XU L, WU M, HAN Z. Overexpression of multiple detoxification genes in deltamethrin resistant *Laodelphax striatellus* (Hemiptera: Delphacidae) in China [J]. PLoS One, 2013, 8: 1-16.