二斑叶螨对联苯菊酯抗药性的 PASA 快速检测技术建立与应用*

王 玲** 张友军 吴青君 谢 文 王少丽***

（中国农业科学院蔬菜花卉研究所 北京，100081）

摘 要 【目的】 二斑叶螨 *Tetranychus urticae* Koch 是世界性的重要农业害螨，其抗药性发展严重阻碍了对该螨的科学防控。为了实现田间二斑叶螨对菊酯类杀虫剂抗药性的早期快速检测，本研究拟建立二斑叶螨对联苯菊酯的特异性等位基因 PCR（PCR amplification of specific alleles，PASA）检测技术。**【方法】** 玻片浸渍法测定了联苯菊酯对二斑叶螨不同种群的毒力，克隆了二斑叶螨钠离子通道结构域 IIIS6 的 DNA 片段，基于该片段中包含的抗性和敏感种群中的点突变，建立了 PASA 检测技术，并应用于二斑叶螨不同种群中抗性基因 F1538I 点突变频率的检测。**【结果】** 与室内相对敏感种群相比，二斑叶螨北京通县和海南三亚种群均对联苯菊酯产生了抗药性，LC_{50} 分别为 1 982.6 mg/L 和 2 767.4 mg/L，抗性倍数分别为 6.0 倍和 8.4 倍；PASA 检测结果表明二斑叶螨室内相对敏感种群中存在杂合子个体，F1538I 点突变频率为 10.0%，而北京通县和海南三亚种群中该突变频率则分别达 50.0%和 53.3%。**【结论】** 建立的 PASA 技术可以快速检测二斑叶螨田间种群是否存在与击倒抗性相关的基因点突变，从而判断其对菊酯类杀虫剂的抗药性发展。

关键词 二斑叶螨，联苯菊酯，抗药性，特异性等位基因 PCR

Establishment and application of the PASA technique of resistance detection to bifenthrin resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)

WANG Ling** ZHANG You-Jun WU Qing-Jun XIE Wen WANG Shao-Li***

(Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract [Objectives] The two spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch, is an important agricultural pest. Pesticide resistance seriously impairs the ability to control this pest. We developed a PCR amplification of specific alleles (PASA) technique in order to detect resistance of *T. urticae* to pyrethroids. **[Methods]** The toxicities of bifenthrin to different *T. urticae* populations were determined using the slide-dip method. The DNA fragment in IIIS6 of the para-type sodium channel protein of *T. urticae* was cloned. A PASA technique was developed based on the point mutation of F1538I and was used to measure the point mutation frequencies of different *T. urticae* populations. **[Results]** Compared to a relatively susceptible strain, field populations collected from Tongxian, Beijing and Sanya, Hainan exhibited resistance to bifenthrin with the LC_{50} values of 1 982.6 mg/L and 2 767.4 mg/L, which are 6.0- and 8.4-fold respectively, higher than that of the susceptible strain. PASA genotyping results indicate that the F1538I mutation frequency was 10.0% in heterozygotes in the susceptible strain, whereas mutation frequencies as high as 50.0% and 53.3% were found in the Beijing and Hainan populations, respectively. **[Conclusion]** The PASA technique can be used to detect gene mutations in wild populations of *T. urticae* that are indicative

* 资助项目 Supported projects：国家“863”项目（2012AA101502）；公益性行业（农业）科研专项（201103020）和农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室项目

**第一作者 First author，E-mail：wanglingyh2014@126.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：wangshaoli@caas.cn

收稿日期 Received：2014-09-26，接受日期 Accepted：2014-11-15

of resistance to bifenthrin.

Key words　*Tetranychus urticae*, bifenthrin, insecticide resistance, PCR amplification of specific alleles

二斑叶螨 *Tetranychus urticae* Koch 属蛛形纲 Arachnida、真螨目 Acariformes、叶螨属 *Tetranychus*，是一种广泛分布于世界各地的重要农业害螨，其食性杂，寄主植物超过 1 000 种（Dermauw *et al.*，2013），可为害包括蔬菜、果树、棉花等在内的多种重要农作物，严重阻碍着农业生产的健康发展（van Leeuwen *et al.*，2010；洪晓月等，2013）。尽管在很多保护地内，二斑叶螨的生物防治被证实是很成功的（Opit *et al.*，2004，2009；徐学农等，2011），然而在我国，化学防治仍是其主要的防治手段。二斑叶螨因其繁殖力强、可孤雌生殖、发育历期短等特点极易产生抗药性，据报道二斑叶螨现已对传统的有机磷、菊酯类和氨基甲酸酯类杀虫剂以及新型的杀虫杀螨剂均产生了不同程度的抗药性（孟和生等，2001；van Leeuwen *et al.*，2010），而监测二斑叶螨对不同杀虫杀螨剂的抗性发展是该螨化学防控及其抗药性治理的前提。

联苯菊酯是一种菊酯类杀虫杀螨剂，具有快速的触杀、胃毒作用，杀虫谱广等特点，该类杀虫剂作用于昆虫神经系统的钠离子通道，延长钠离子通道开放时间，引起重复后放（王建军等，2002；唐振华等，2004）。菊酯类药剂在我国的使用历史较长，大量、单一和频繁使用，使包括二斑叶螨在内的多种害虫不可避免地产生了抗药性。王开运等（2002）报道山东地区二斑叶螨田间种群对菊酯类杀虫剂产生了抗药性；宫亚军等（2011）发现北京多个地区桃蚜 *Myzus persicae* Sulzer 种群对高效氯氰菊酯均已产生高水平抗性；此外，刘庆娟等（2012）发现二斑叶螨对菊酯类杀虫剂产生抗性后，体内谷胱甘肽-*S*-转移酶活性发生了显著变化。昆虫对菊酯类杀虫剂产生抗性后，除了解毒酶活性发生变化外，最常见的抗药性机制是神经靶标的敏感性下降，即击倒抗性（Knock down resistance，简称为 kdr）（Morin，2002；Defaix and Lapied 2005；Tan *et al.*，2005）。目前已经在多种昆虫中发现了与击倒抗性有关的钠离子通道基因发生点突变的报道（Soderlund and Knipple，2003；王利华和吴益东，2004；Dong，2007；John and Kathleen，2013）。研究发现，二斑叶螨对联苯菊酯的高抗性种群中发现靶标基因 kdr 的第 III 结构域中的 S6 跨膜片段中，出现了 F1538I 的点突变，该点突变被证实与菊酯类杀虫剂的抗药性密切相关（Tsagkarakou *et al.*，2009），随后在朱砂叶螨 *T. cinnabarinus* 对甲氰菊酯抗性品系中也证实了该点突变的存在，且该突变与朱砂叶螨对菊酯类杀虫剂抗药性密切相关（Xu *et al.*，2013）。田间二斑叶螨种群是否对菊酯类杀虫剂产生抗药性常依据室内生物测定结果进行判定，但是这种传统测定方法需要的试虫量很大，花费时间较长，且需要特定的测定技术和方法；检测抗药性相关基因是否存在点突变也常需要对该基因进行克隆，再进行序列测定及比对才能判定（Xu *et al.*，2013），或者采用定量测序法（Quantitative sequencing）（Kwon *et al.*，2014），但过程相对繁杂，耗时费力且花费成本较高；因此，开发简便易操作、成本低的抗药性早期快速检测技术对于及时明确二斑叶螨对菊酯类杀虫剂的抗药性具有非常重要的意义。

本试验基于二斑叶螨对菊酯类杀虫剂抗药性相关基因发生点突变的基础上（Tsagkarakou *et al.*，2009；Xu *et al.*，2013），选取二斑叶螨抗性和敏感种群中包含该基因点突变位点的特异性片段，采用特异性等位基因 PCR 技术（PCR amplification of specific alleles，PASA）分别对抗性和敏感种群中二斑叶螨个体进行特异性扩增，根据扩增条带的有无直接判别二斑叶螨个体（种群）的基因型（Huang *et al.*，2004；Zichova *et al.*，2010），由此简便、快速地实现对二斑叶

螨种群对联苯菊酯抗药性的高通量检测，为二斑叶螨的田间防治提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

二斑叶螨室内种群由南京农业大学植物保护学院洪晓月教授馈赠，自 2009 年在室内人工气候箱内采用海绵叶盘法（杨帅等，2013）饲养至今，由“碧丰”品种的无虫菜豆苗叶片作为寄主进行继代饲养，期间未接触任何杀虫剂，作为室内相对敏感种群进行生物测定和二斑叶螨 kdr 基因点突变频率的检测。饲养条件为（26±1）℃，光周期为 L∶D=16∶8。

二斑叶螨田间种群分别采集自北京通县的草莓寄主上及海南三亚的西瓜寄主上，室内饲养一代后进行生物测定和二斑叶螨 kdr 基因点突变频率的检测。

1.2 试剂和仪器

供试杀螨剂为 10%联苯菊酯乳油，美国富美实(FMC)公司产品。

二斑叶螨基因组 DNA 提取试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司，DNA 聚合酶为 2×Es *Taq* MasterMix (0.1 U *Taq* E/μL)购自北京奥赛博科技发展有限公司。所用引物由上海英竣生物工程公司合成，序列测序由北京擎科生物工程有限公司进行。

主要仪器为 RXZ-380C 智能人工气候箱，宁波江南仪器厂产品。伯乐 S1000 型 PCR 仪，美国 Bio-Rad 公司产品。

1.3 叶螨雌成螨的生物测定

二斑叶螨的室内毒力测定参照联合国粮农组织推荐的标准方法——玻片浸渍法（Slide-dip method）（FAO，1980）进行，具体操作过程参见唐小凤等 (2013)。试验数据采用 Probit 软件进行处理，计算杀螨剂的斜率和 SE 值、致死中浓度 LC_{50} 值及其 95%置信限等，计算各田间种群的抗性倍数（田间种群的 LC_{50} 值/敏感种群的 LC_{50} 值）。

1.4 叶螨基因组 DNA 提取及 PCR 扩增和序列测定

单头二斑叶螨雌成螨的基因组 DNA 提取方法采用北京百泰克有限公司的 DNA 提取试剂盒（溶液型），方法参照试剂盒说明书进行。根据已报道的二斑叶螨敏感与抗性种群中的 kdr 序列中的点突变位点（Tsagkarakou *et al.*，2009；Xu *et al.*，2013），设计包含此点突变的 kdr 片段的引物对：kdr-Fw：AAG TGG CAA CAT TCA AAG GTT，kdr-Rv：GAT GGC TTT CAT TGG TTT CTT，扩增室内和田间二斑叶螨种群的基因组 DNA。PCR 扩增体系为：2×Es Mix (0.1 U *Taq* E/μL)为 10 μL，DNA 模板为 1 μL，上游和下游引物（各为 10 μmol/L）分别加入 1 μL，最后用 ddH_2O 补充至 20 μL。PCR 扩增在 S1000 PCR 仪上进行，扩增程序为：首先 95℃预变性 3 min；然后进行 35 个循环（95℃变性 30 s，56℃退火 30 s，72℃延伸 1 min），最后在 72℃条件下延伸 10 min。取 PCR 产物 8 μL 在 1.2%琼脂糖凝胶电泳上检测。获得的特异性 PCR 产物经过 DNA 纯化试剂盒（Qiagen）纯化后，送北京擎科生物技术有限公司用上游和下游引物（kdr-Fw 和 kdr-Rv）进行双向序列测定。

1.5 PASA 引物设计及抗性和敏感种群的点突变检测

对联苯菊酯抗性和敏感种群的 kdr 片段的测序结果采用 DNAMAN 进行序列分析和比较，在发生点突变的位点的上游设置 PASA 引物，抗性和敏感种群的检测用上游引物分别设计为：kdr-RF：5′-TTC ATC ATT TTT GGC TCT TCT A -3′和 kdr-SF：5′- TTC ATC ATT TTT GGC TCT TCT T -3′。kdr-RF 引物的 3′末端第一位核苷酸与突变后的核苷酸一致，而 kdr-SF 引物的 3′末端第一位核苷酸与突变前的核苷酸一致，此外，为了增加等位基因特异性 PCR 扩增的特异性，引物 kdr-RF 和 kdr-SF 的 3′末端的倒数第 3 位核苷酸引入错配碱基 C，见方框标注。

从二斑叶螨抗性、敏感种群中分别挑取 30 头个体进行 PASA 检测。PCR 扩增时和公用的

下游引物（kdr-Rv）配对进行扩增，kdr-RF 和 kdr-Rv 组成抗性引物对，kdr-SF 和 kdr-Rv 组成敏感引物对。抗性引物对和敏感引物对分别对二斑叶螨抗性种群和敏感种群进行 PCR 扩增，共 4 个组合。扩增体系如下：上下游引物（各为 10 μmol/L）分别加入 1 μL，DNA 模板 1 μL，2×Es Mix (0.1 U *Taq* E/μL)为 10 μL，最后加 ddH_2O 补足至 20 μL。扩增程序为：94℃预变性 3 min，随后进行 30 个循环（94℃变性 20 s，56℃退火 30 s，72℃延伸 30 s），最后在 72℃条件下延伸 3 min。取样 8 μL 在 1.2%琼脂糖凝胶电泳上检测不同种群二斑叶螨个体基因型的突变结果。同时在上述每个扩增组合中随机挑选 20 头二斑叶螨个体，对其 PCR 产物纯化后，采用上游和下游引物进行双向序列测定，将测序结果与电泳结果进行对比，验证扩增结果的准确度。

对于二斑叶螨田间种群，从各种群中随机挑取 30 头个体，采用上述抗性和敏感引物对及其扩增方法检测二斑叶螨的 kdr 基因型，再根据电泳条带的有无判断其基因型，计算各种群的 kdr 点突变频率。叶螨个体 F1538I 点突变的等位基因频率（%）=[（抗性纯合子个体数/检测总个体数）+（抗性杂合子个体数/检测总个体数/2）]×100。

2　结果与分析

2.1　二斑叶螨不同种群的生物测定

联苯菊酯对二斑叶螨不同种群的室内毒力测定结果表明，室内相对敏感种群对联苯菊酯的致死中浓度 LC_{50} 值为 330.3 mg/L，北京通州和海南三亚的二斑叶螨田间种群对联苯菊酯的 LC_{50} 值分别高达 1 982.6 mg/L 和 2 767.4 mg/L，与室内相对敏感种群相比，抗性倍数分别为 6.0 倍和 8.4 倍，为低抗性水平（表 1）。

2.2　二斑叶螨抗性和敏感种群 kdr 基因片段扩增及序列比对

采用扩增 kdr 的特异性引物对（kdr-Fw 和 kdr-Rv）扩增二斑叶螨敏感和抗性种群的基因组 DNA，均获得一条 292 bp 的特异性片段。

对联苯菊酯田间抗性和相对敏感种群的 kdr 基因片段进行测序，结果采用 DNAMAN 5.0 软件进行序列分析与比较，发现在该扩增片段中第 137 位核苷酸出现一个点突变，由敏感种群中的 T 突变为抗性种群中的 A（图 1），也就是二斑叶螨 kdr 全序列的开放阅读框（ORF）中的 4 614 位核苷酸发生了 T 到 A 的变化，该核苷酸点突变导致 kdr 基因的 ORF 的 1 538 位的氨基酸序列由苯丙氨酸（F）突变为异亮氨酸（I）。

2.3　抗性和敏感种群突变位点的检测

采用上述引物对（kdr-RF/kdr-SF 和 kdr-Rv）分别扩增抗性、敏感二斑叶螨种群，结果表明，用敏感引物对 kdr-SF+kdr-Rv 扩增敏感种群时，可以稳定出现一条 177 bp 的条带，而扩增抗性种群时，结果表明有部分叶螨个体出现该条带，部分个体则无带（为抗性纯合子）；而用抗性引物对 kdr-RF+kdr-Rv 扩增抗性种群时，大部分测试个体均出现一条 177 bp 的条带，而扩增敏感种群时只有少量个体出现条带（图 2）。进一步的测序结果也表明扩增的 177 bp 条带是上述 292 bp 中的一部分序列，也是预期扩增的条带；每个扩增组合中随机抽取 20 条扩增产物进行测序验证，发现测序结果与电泳结果揭示的测试叶螨

表 1　二斑叶螨雌成螨对联苯菊酯的抗药性测定
Table 1　Resistance bioassay on female adults of *Tetranychus urticae* to bifenthrin

种群 Population	斜率（±标准误） Slope (± SE)	LC_{50} (mg/L) (95%置信区间) LC_{50} (mg/L) (95% CI)	抗性倍数 Resistance ratio
相对敏感 Relative susceptible strain	2.2 (± 0.1)	330.3 (269.8–400.2)	1.0
北京通县 Tongxian, Beijing	2.6 (± 0.2)	1 982.6 (1 384.8–2 693.5)	6.0
海南三亚 Sanya, Hainan	3.1 (± 0.2)	2 767.4 (2161.6–3 453.4)	8.4

```
                kdr-Fw
R1. seq   AAGTGGCAACATTCAAAGGTTGGACAATTATTATGGACCATGCAATTGATTCACGTGAGTCCATCAACAACCAGTTTATGAAAATAGTATTCTGATGTAC    100
R2. seq   AAGTGGCAACATTCAAAGGTTGGACAATTATTATGGACCATGCAATTGATTCACGTGAGTCCATCAACAACCAGTTTATGAAAATAGTATTCTGATGTAC    100
R3. seq   AAGTGGCAACATTCAAAGGTTGGACAATTATTATGGACCATGCAATTGATTCACGTGAGTCCATCAACAACCAGTTTATGAAAATAGTATTCTGATGTAC    100
S1. seq   AAGTGGCAACATTCAAAGGTTGGACAATTATTATGGACCATGCAATTGATTCACGTGAGTCCATCAACAACCAGTTTATGAAAATAGTATTCTGATGTAC    100
S2. seq   AAGTGGCAACATTCAAAGGTTGGACAATTATTATGGACCATGCAATTGATTCACGTGAGTCCATCAACAACCAGTTTATGAAAATAGTATTCTGATGTAC    100
S3. seq   AAGTGGCAACATTCAAAGGTTGGACAATTATTATGGACCATGCAATTGATTCACGTGAGTCCATCAACAACCAGTTTATGAAAATAGTATTCTGATGTAC    100
Consensusaagtggcaacattcaaaggttggacaattattatggaccatgcaattgattcacgtgagtccatcaacaaccagtttatgaaaatagtattctgatgtac
                          kdr-RF or kdr-SF
R1. seq   TTATATTTCGTATTTTTCATCATTTTTGGCTCTTTTATCACACTTAACCTGTTTATTGGAGTCATTATTGATAATTTTAATGAACAAAAAAAGAAAGGAG    200
R2. seq   TTATATTTCGTATTTTTCATCATTTTTGGCTCTTTTATCACACTTAACCTGTTTATTGGAGTCATTATTGATAATTTTAATGAACAAAAAAAGAAAGGAG    200
R3. seq   TTATATTTCGTATTTTTCATCATTTTTGGCTCTTTTATCACACTTAACCTGTTTATTGGAGTCATTATTGATAATTTTAATGAACAAAAAAAGAAAGGAG    200
S1. seq   TTATATTTCGTATTTTTCATCATTTTTGGCTCTTTTTTCACACTTAACCTGTTTATTGGAGTCATTATTGATAATTTTAATGAACAAAAAAAGAAAGGAG    200
S2. seq   TTATATTTCGTATTTTTCATCATTTTTGGCTCTTTTTTCACACTTAACCTGTTTATTGGAGTCATTATTGATAATTTTAATGAACAAAAAAAGAAAGGAG    200
S3. seq   TTATATTTCGTATTTTTCATCATTTTTGGCTCTTTTTTCACACTTAACCTGTTTATTGGAGTCATTATTGATAATTTTAATGAACAAAAAAAGAAAGGAG    200
Consensusttatatttcgtatttttcatcatttttggctctttt tcacacttaacctgtttattggagtcattattgataattttaatgaacaaaaaaagaaaggag

R1. seq   GTGGTTCCAGGGAGATGTTGATGACGGAAGATCAAAAAAAGTATCTCAATGCTATGAAAAAGATGGGATCAAAGAAACCAATGAAAGCCATC    292
R2. seq   GTGGTTCCAGGGAGATGTTGATGACGGAAGATCAAAAAAAGTATCTCAATGCTATGAAAAAGATGGGATCAAAGAAACCAATGAAAGCCATC    292
R3. seq   GTGGTTCCAGGGAGATGTTGATGACGGAAGATCAAAAAAAGTATCTCAATGCTATGAAAAAGATGGGATCAAAGAAACCAATGAAAGCCATC    292
S1. seq   GTGGTTCCAGGGAGATGTTGATGACGGAAGATCAAAAAAAGTATCTCAATGCTATGAAAAAGATGGGATCAAAGAAACCAATGAAAGCCATC    292
S2. seq   GTGGTTCCAGGGAGATGTTGATGACGGAAGATCAAAAAAAGTATCTCAATGCTATGAAAAAGATGGGATCAAAGAAACCAATGAAAGCCATC    292
S3. seq   GTGGTTCCAGGGAGATGTTGATGACGGAAGATCAAAAAAAGTATCTCAATGCTATGAAAAAGATGGGATCAAAGAAACCAATGAAAGCCATC kdr-Rv 292
Consensusgtggttccagggagatgttgatgacggaagatcaaaaaaagtatctcaatgctatgaaaaagatgggatcaaagaaaccaatgaaagccatc
```

图 1　抗性和敏感二斑叶螨中 kdr 基因片段的核苷酸序列比对

Fig. 1　Nucleotide sequence comparisons of kdr fragments from resistant and susceptible populations of *Tetranychus urticae*

R1~R3：二斑叶螨抗性种群不同个体的扩增片段序列；S1~S3：二斑叶螨敏感种群不同个体的扩增片段序列。竖向方框内为突变位点，横向方框内为扩增产物为 292 bp 的上游和下游引物，下划线标识为基因型检测所用的上游引物。

R1-R3: The fragment sequences of different individuals in the resistant population of *T. urticae*; S1-S3: The fragment sequences of different individuals in the susceptible population of *T. urticae*. The nucleotide in the vertical box is the point mutation. The sequences in the horizontal boxes are the forward and reverse primers named kdr-Fw and kdr-Rv, respectively. The sequence underlined is the forward primer for the genotype monitoring.

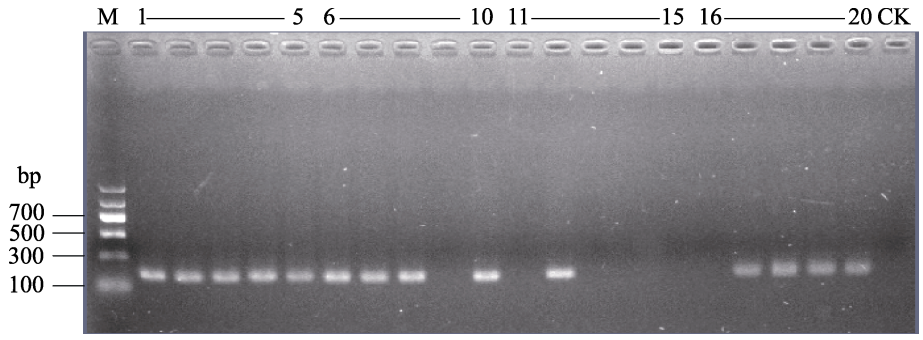

图 2　二斑叶螨抗性和敏感种群中 kdr 基因 F1538I 突变检测

Fig. 2　Detection of F1538I mutations in resistant and susceptible populations of *Tetranychus urticae*

M：标准分子量 Marker Ⅱ；1~5：敏感引物对 kdr-SF+ kdr-Rv 扩增二斑叶螨室内相对敏感种群；6~10：敏感引物对 kdr-SF+ kdr-Rv 扩增二斑叶螨抗性种群；11~15：抗性引物对 kdr-RF+ kdr-Rv 扩增二斑叶螨室内相对敏感种群；16~20：抗性引物对 kdr-RF+ kdr-Rv 扩增二斑叶螨抗性种群；CK：空白对照；敏感和抗性种群分别检验 30 头，此电泳图片中每个种群仅显示 5 头。

M: DNA Marker Ⅱ; 1-5: Amplifications for susceptible *T. urticae* strain using the susceptible specific primers of kdr-SF+kdr-Rv; 6-10: Amplifications for resistant *T. urticae* using the susceptible specific primers of kdr-SF+ kdr-Rv; 11-15: Amplifications for susceptible *T. urticae* strain using the resistant specific primers of kdr-RF+ kdr-Rv; 16-20: Amplifications for resistant *T. urticae* using the resistant specific primers of kdr-RF+ kdr-Rv; CK: Negative control; 30 individuals were detected for each combination and 5 ones were shown in this figure.

个体的基因型是一致的，说明上述设计的针对抗性和敏感种群的引物对和扩增条件都是可行而且稳定的，检测准确率达 100%，可以用于下一步不同种群的抗性基因频率检测。

从室内相对敏感二斑叶螨种群、北京通县和海南三亚田间种群中随机抽取 30 头叶螨样品，

采用抗性与敏感引物对分别进行 PCR 扩增，检测各种群中 kdr 基因的点突变频率。结果表明，室内相对敏感二斑叶螨种群中，大部分个体为 SS 敏感基因型，存在少量的 RS 杂合基因型个体，kdr 点突变频率为 10.0%；北京通州和海南三亚两个田间种群中，点突变频率则分别为 50.0%和 53.3%（表 2）。该结果也通过对扩增产物进行测序获得了验证。

3　结论与讨论

二斑叶螨是目前抗药性发展最严重的有害生物（van Leeuwen *et al*.，2010），因此生产上对该螨的预防和控制非常困难。菊酯类杀虫杀螨剂由于其快速击倒活性而在叶螨防治上得到广泛应用。王开运等（2002）发现山东烟台蔬菜棚内二斑叶螨种群已对菊酯类杀虫剂产生了抗药性，甲氰菊酯对该种群 LC_{50} 值为 1 430.5 mg/L；同时期甘肃兰州的二斑叶螨种群也对联苯菊酯和甲氰菊酯等均产生了抗药性（沈慧敏和杨宝生，2001）。本研究中，2009 年采集于田间的二斑叶螨种群，室内无药剂接触饲养至今，PCR 检测结果表明该种群中 kdr 抗性相关基因仍然含有 10.0%的突变杂合子，说明该二斑叶螨相对敏感种群从田间采集到实验室内饲养之前已对联苯菊酯产生了一定程度的抗药性，毒力测定结果显示该种群对联苯菊酯的致死中浓度 LC_{50} 值为 330.3 mg/L，说明该叶螨种群对联苯菊酯的敏感度很低，这与抗性杂合子的存在是相吻合的，与之前研究结果也是一致的（沈慧敏和杨宝生，2001；王开运等，2002）。北京和海南两种群中，kdr 抗性相关基因 F1538I 点突变频率分别为 50.0%和 53.3%，联苯菊酯对该两种群的 LC_{50} 值分别高达 1 982.6 mg/L 和 2 767.4 mg/L，说明较高的抗性倍数与点突变发生频率具有一定的正相关性。结合以前报道（沈慧敏和杨宝生，2001；王开运等，2002）及本研究中测试种群对联苯菊酯的较高的 LC_{50} 及抗性点突变的存在也表明，二斑叶螨对联苯菊酯及其他菊酯类杀虫杀螨剂的抗药性存在普遍，田间采用该类杀虫剂防治二斑叶螨应慎重。

传统上评价叶螨对杀螨剂的抗药性发展程度是通过生物测定技术实现的。常见的叶螨生物测定方法有玻片浸渍法、叶碟喷雾法、叶片残留法等（Ay，2005；李定旭等，2006；唐小凤等，2014），但试虫微小操作技术不易掌握，且需要测试虫量很大（单个药剂需要试虫至少 700 头），药剂处理后至少 24 h 后才能观察测试结果，再通过与相对敏感种群的对比分析，才能够获知田间种群对药剂的抗药性水平，耗费时间也比较长。与之相比，PASA 检测技术的建立可以检测结果在一天内完成，大大缩短了抗药性检测时间，且能够根据抗性相关基因的突变频率来判断抗性发展的程度，因此常被应用于害虫抗药性的早期监测中，估测靶标害虫抗药性发展的程度（王利华和吴益东，2004；孙宏迪等，2011），连续的检测还可判断抗药性发展的速度；室内常根据基因突变频率建立其与抗药性的相关性，如李春晓等（2007）在对家蝇田间种群溴氰菊酯抗药性水平检测中发现 kdr 基因突变频率与其抗性水平存在显著的线性相关关系；高明等（2013）采用竞争性特异等位基因 PCR 方法检测了山东地区甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* Hübner 钠离子

表 2　二斑叶螨抗性和敏感种群 **kdr** 基因突变频率检测

Table 2　Detection of mutation frequency in resistant and susceptible populations of *Tetranychus urticae*

种群 Population	样本数 Sample	敏感纯合子 SS	抗性杂合子 RS	抗性纯合子 RR	抗性基因突变频率（%） Mutation frequency of resistant gene(%)
相对敏感 Relative susceptible strain	30	24	6	0	10.0
北京通县 Tongxian, Beijing	30	2	26	2	50.0
海南三亚 Sanya, Hainan	30	0	28	2	53.3

通道基因片段上的 L1014F 的突变频率，结果表明该突变频率与高效氯氰菊酯抗性程度呈线性正相关。阿维菌素是二斑叶螨防治中常用的杀虫杀螨剂，抗药性发展风险极高，PASA 检测发现北京密云和昌平地区二斑叶螨对阿维菌素的抗药性相关基因——谷氨酸门控的氯离子通道（GluCl）的点突变频率达到 100%，从而实现阿维菌素在测试地区应暂停使用防治二斑叶螨的早期预警（唐小凤等，2014）。本研究采用建立的 PASA 引物对分别检测二斑叶螨的田间抗性和室内相对敏感种群，当用敏感引物扩增敏感种群时，所有个体均可稳定出现一条 177 bp 的条带，而抗性引物扩增该敏感种群个体时如果出现该条带，则说明这部分个体属于 RS 杂合子基因型，无带则为 SS 基因型；当抗性引物扩增抗性种群时大部分测试个体均有条带，而敏感引物扩增时也会发现少量叶螨个体也出现该特异性条带，则说明这些个体是 RS 基因型，而抗性引物扩增有条带但敏感引物扩增无带者则属于 RR 基因型。通过上述方法对不同二斑叶螨种群进行检测和基因型判定，同时对扩增产物进行测序验证，说明建立的 PASA 引物的扩增结果可以很好地反映叶螨不同种群中的个体基因型，可用于田间叶螨种群 kdr 抗药性的早期检测和预警。

与基于点突变的直接测序法相比（Xu *et al.*，2013），特异性等位基因 PCR 技术（PASA）对害虫抗药性的早期检测技术具有快速、有效、灵敏度高、能够实现对大批样品的高通量检测等优点，对于监测二斑叶螨田间种群对联苯菊酯的抗性基因频率、及时调整二斑叶螨的防治策略、指导合理用药和延缓抗性发展具有重要作用。但要注意的是，该技术应在揭示明确害虫对杀虫剂产生抗性的点突变位点的基础上才能进行。因此，随着更多的害虫对杀虫剂的靶标机制的研究深入和阐述，可实现更多害虫对不同杀虫剂的早期快速检测和预警。但是，值得注意的是，田间害虫种群对杀虫剂抗药性机制比较复杂，解毒酶升高的生化机制通常与靶标抗性机制同时并存（van Leeuwen *et al.*，2010），害虫除了出现靶标受体的点突变，还可能同时存在解毒酶活性升高的现象，因此，测试种抗药性水平的高低需要同时考虑可能存在的导致抗药性产生的各种因素。

参考文献 (References)

Ay R, 2005. Determination of susceptibility and resistance of some greenhouse populations of *Tetranychus urticae* Koch to chlorpyrifos (Dursban 4) by the petri dish–Potter tower method. *J. Pest Sci.*, 78(3): 139–143.

Defaix A, Lapied B, 2005. Role of a novel maintained low-voltage-activated inward current permeable to sodium and calcium in pace making of insect neurosecretory neurons. *Invert. Neurosci.*, 5(3/4): 135–146.

Dermauw W, Wybouw N, Rombauts S, Menten B, Vontas J, Grbic M, 2013. A link between host plant adaptation and pesticide resistance in the polyphagous spider mite *Tetranychus urticae*. *PNAS*, 110(2): E113-E122.

Dong, K, 2007. Insect sodium channels and insecticide resistance. *Invert. Neurosci*., 7(1): 17–30.

FAO, 1980. Revised method for spider mites and their eggs (*Tetranychus* spp. and *Panonychus ulmi* Koch). *FAO Plant Production and Protection*, 21: 49–54.

Gao M, Shen RP, Zhang P, Mu W, 2013. Detection of beta-cypermethrin resistance in Shangdong populations of *Spodoptera exigua* by competitive. *Acta Phytophylacica Sinica*, 40(4): 363–368. [高明, 申瑞平, 张鹏, 慕卫, 2013. 竞争性特异等位基因 PCR 检测山东甜菜夜蛾对高效氯氰菊酯的抗性. 植物保护学报, 40(4): 363–368.]

Gong YJ, Wang ZH, Shi BC, Kang ZJ, Zhu L, Guo XJ, Liu JH, Wei SJ, 2011. Resistance status of *Myzus persicae* Sulzer (Hemiptera: Aphididea) populations to pesticide in Beijing. *Scientia Agricultura Sinica*, 44(21): 4385–4394. [宫亚军, 王泽华, 石宝才, 康总江, 朱亮, 郭晓军, 刘建华, 魏书军, 2011. 北京地区不同桃蚜种群的抗药性研究. 中国农业科学, 44(21): 4385–4394.]

Hong XY, Xue XF, Wang JJ, Dou W, Zhang YX, Chen HJ, Zhang JY, Qiu GS, Hu JH, Wang SL, Yu LC, Shen HM, Sun RH, Guo JJ, Wu WN, Guo MF, Zhang JP, Chen BX, Song ZW, Gui LY, 2013. Intrgrated control techniques for spider mites on important crops. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 50(2): 321–328. [洪晓月, 薛晓峰, 王进军, 豆威, 张艳璇, 陈汉杰, 张金勇, 仇贵生, 胡军华, 王少丽, 于丽辰, 沈慧敏, 孙瑞红, 郭建军, 吴伟南, 郭明昉, 张建萍, 陈炳旭, 宋子伟, 桂连友, 2013. 作物重要叶螨综合防控技术研究与示范推广. 应用昆虫学报,

50(2): 321–328.]

Huang J, Kristensen M, Qiao CL, Jespersen JB, 2004. Frequency of kdr gene in house fly field populations: correlation of pyrethroid resistance and kdr frequency. *J. Econ. Entomol.*, 97(3): 1036–1041.

John EC, Kathleen AD, 2013. Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annu. Rev. Entomol.*, 58: 99–117.

Kwon DH, Lee SW, Ahn JJ, Lee SH, 2014. Determination of acaricide resistance allele frequencies in field populations of *Tetranychus urticae* using quantitative sequencing. *Asia Pac. Entomol.*, 17(1): 99–103

Li CX, Zhang XL, Cao XM, Dong YD, Zhao TY, 2007. Identification of mutations in the sodium channel gene associated with knockdown resistance of *Musca domestica* by PASA technique. *Chin. J. Vector. Bio. & Control*, 18(3): 255–256. [李春晓, 张晓龙, 曹晓梅, 董言德, 赵彤言, 2007. 特异性等位基因PCR扩增技术检测家蝇击倒抗性相关钠通道的基因突变. 中国媒介生物学及控制杂志, 18(3): 255–256.]

Li DX, Tian J, Shen ZR, 2006. Sublethal effects of selected insecticides on the hawthorn spider mite, *Tetranychusviennensis*. *Acta Phytophylacica Sinica*, 33(2): 187–192. [李定旭, 田娟, 沈佐锐, 2006. 不同药剂对山楂叶螨的亚致死效应. 植物保护学报, 33(2): 187–192.]

Liu QJ, Liu YJ, Yu Y, Zhou XH, Ma H, 2012. The study on resistance and its mechanism of *Tetranychus urticae* to several common insecticides. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 49(2): 376–381. [刘庆娟, 刘永杰, 于毅, 周仙红, 马惠, 2012. 二斑叶螨对七种杀螨剂的抗药性测定及其机理研究. 应用昆虫学报, 49(2): 376–381.]

Meng HS, Wang KY, Jiang XY, Yi MQ, 2001. Occurrence characteristics of *Tetranychus urticae* and its control methods. *Entomological Knowledge*, 38(1): 52–54. [孟和生, 王开运, 姜兴印, 仪美芹, 2001. 二斑叶螨发生危害特点及防治对策. 昆虫知识, 38(1): 52–54.]

Morin S, Williamson MS, Goodsons J, Brown JK, Tabashnik BE, Dennehy TJ, 2002. Mutations in the *Bemisia tabaci* para sodium channel gene associated with resistance to a pyrethroid plus organophosphate mixture. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32(12): 1781–1791.

Opit GP, Nechols JR, Margolies DC, 2004. Biological control of twospotted spider mites, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae), using *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot (Acari: Phytoseidae) on ivy geranium: assessment of predator release ratios. *Biol. Control*, 29(3): 445–452.

Opit GP, Perret J, Holt K, Nechols JR, Margolies DC, Williams KA. 2009. Comparing chemical and biological control strategies for two spotted spider mites (Acari: Tetranychidae) in commercial greenhouse production of bedding plants. *J. Econ. Entomol.*, 102(1): 336–346.

Shen HM, Yang BS, 2001. Study on the resistance of *Tetranychus urticae* Koch to 16 insecticides and acaricides. *Acta Phytophylacica Sinica*, 28(4): 67–73. [沈慧敏, 杨宝生, 2001. 二点叶螨对16种杀虫、杀螨剂的抗药性. 植物保护学报, 28(4): 362–366.]

Soderlund DM, Knipple DC, 2003. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 33(6): 563–577.

Sun HD, Cao XM, Yang ZZ, 2011. Applications of PCR amplification of specific alleles (PASA) technique in the studies of insecticide resistance. *Chin. J. Hyg. Insect & Equip. Apr.*, 17(2): 141–144. [孙宏迪, 曹晓梅, 杨振洲, 2011. 特异性等位基因 PCR 技术在昆虫抗药性研究中的应用.中华卫生杀虫药械, 17(2): 141–144.]

Tang XF, Wang SL, Zhang YJ, Wu QJ, Xie W, 2014. Abamectin resistance of *Tetranychus urticae* and detectionfor resistance-related gene by PASA technique. *Acta Phytophylacica Sinica*, 41(1): 67–73. [唐小凤, 王少丽, 张友军, 吴青君, 谢文, 2014. 二斑叶螨对阿维菌素的抗药性及抗性基因的 PASA 检测技术. 植物保护学报, 41(1): 67–73.]

Tang XF, Zhang YJ, Wu QJ, Xie W, Cao Z, Wang SL, 2013. Toxicity of different acaricides and synergy of organosilicone surfactants to *Tetranychus urticae* Ehara. *Journal of Environmental Entomology*, 35(3): 322–327. [唐小凤, 张友军, 吴青君, 谢文, 曹增, 王少丽, 2013. 杀螨剂对截形叶螨的毒力及助剂对杀螨剂的增效作用研究. 环境昆虫学报, 35(3): 322–327.]

Tang ZH, Yuan JZ, Zhuang PJ, Tao LM, 2004. The structure of sodium channels and gene mutations associsted with knockdown resistance in insects. *Acta Entomologica Sinica*, 47(6): 830–836. [唐振华, 袁建忠, 庄佩君, 陶黎明, 2004. 昆虫钠离子通道的结构与击倒抗性有关的基因突变. 昆虫学报, 47(6): 830–836.]

Tan JG, Liu ZQ, Wang RW, Huang ZY, Chen AC, Gurevitz M, Dong K, 2005. Identification of amino acid residues in the insect sodium channel critical for pyrethroid binding. *Mol. Pharmacol.*, 67(2): 513–522.

Tsagkarakou A, van Leeuwen T, Khajehali J, Ilias A, Grispou M, Williamson MS, Tirry L, Vontas J, 2009. Identification of

pyrethroid resistance associated mutations in the para sodium channel of the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Insect Mol. Biol.*, 18(5): 583–593.

van Leeuwen T, Vontas J, Tsagkarakou A, Dermauw W, Tirry L, 2010. Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* and other important Acari: A review. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 40(8): 563–572.

Wang JJ, Han ZJ, Wang YC, 2002. Knockdown resistance and sodium channel. *Acta Entomologica Sinica*, 45(3): 391–396. [王建军, 韩召军, 王荫长, 2002. 击倒抗性和钠离子通道. 昆虫学报, 45(3): 391–396.]

Wang KY, Zhao WD, Jiang YX, Wang JH, 2002. The toxicity testing of resistance population of *Tetranychus urticae* Koch to several acaricides. *Pesticides*, 41(3): 29–31. [王开运, 赵卫东, 姜兴印, 王金花, 2002. 十种杀螨剂对二斑叶螨抗性种群不同发育阶段的毒力比较. 农药, 41(3): 29–31.]

Wang LH, Wu YD, 2004. A mutation on sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in *Bemisia tabaci* (Genna dius) and its detection. *Acta Entomologica Sinica*, 47(4): 449–453. [王利华, 吴益东, 2004. 与拟除虫菊酯抗性相关的烟粉虱纳通道基因突变及其检测. 昆虫学报, 47(4): 449–453.]

Xu XN, Borgemeister C, Poehling HM, 2011. Interactions of western flower thrips, two-spotted spider mites and the predatory mite *Amblyseius cucumeris* (Oudemans) on beans. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 48(3): 579–587. [徐学农, Borgemeister C , Poehling HM, 2011. 西方花蓟马、二斑叶螨与黄瓜新小绥螨的相互关系研究. 应用昆虫学报, 48(3): 579–587.]

Xu ZF, Shi L, Feng YN, He L, 2013. The molecular marker of kdr against fenpropathrin in *Tetranychus cinnabarinus*. *J. Econ. Entomol.*, 106(6): 2457–2466.

Yang S, Zhao BM, Li GY, Hu SL, Zhang JP, 2013. Effects of brief exposure to high temperature on *Tetranychusturkestani* and *T. truncates* (Acari: Tetranychidea). *Acta Entomologica Sinica*, 56(3): 276–285. [杨帅, 赵冰梅, 李广云, 胡素丽, 郭艳兰, 张建萍, 2013. 短时高温暴露对土耳其斯坦叶螨和截形叶螨的影响. 昆虫学报, 56(3): 276–285.]

Zichova T, Kocourek F, Salava J, Nadova K, Stara J, 2010. Detection of organophosphate and pyrethroid resistance alleles in Czech *Leptinotarsa decemlinerta* (Coleoptera: Chrysomelidae) populations by molecular methods. *Pest Manag. Sci.*, 66(8): 853–860.