

粘虫对高效氯氟菊酯抗性机制的初步研究*

赵玉玉** 李伯辽 李梅梅 仵均祥*** 李怡萍***

(西北农林科技大学植物保护学院, 杨凌 712100)

摘要 【目的】通过粘虫高效氯氟菊酯抗性、敏感品系生化及分子机制研究,明确与抗药性产生相关的具体机制。【方法】采用室内生物测定、生化分析和分子技术,研究粘虫抗、感品系增效剂的增效作用、解毒酶活性变化及钠离子通道序列变化。【结果】增效剂胡椒基丁醚(PBO)和磷酸三苯酯(TPP)对高效氯氟菊酯的增效作用明显,抗敏增效比分别为5.50和3.40。粘虫高效氯氟菊酯抗性品系酯酶(EST)、谷胱甘肽S-转移酶(GSTs)和多功能氧化酶(MFOs)活性均高于敏感品系,其比活力分别为2.45、1.73和1.70,其中抗、感品系的酯酶和多功能氧化酶比活力差异都达到了显著水平($P<0.05$)。通过比较粘虫抗性和敏感品系钠离子通道基因S4-S6片段,未发现与击倒抗性有关的突变。【结论】酯酶和多功能氧化酶可能在粘虫对高效氯氟菊酯的抗性发展中起着重要的作用。

关键词 粘虫, 高效氯氟菊酯, 抗性机制, 解毒酶, 钠离子通道

Preliminary research on the resistance mechanism of *Mythimna separata* to beta-cypermethrin

ZHAO Yu-Yu** LI Bo-Liao LI Mei-Mei WU Jun-Xiang*** LI Yi-Ping***

(College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract 【Objectives】To identify the mechanism responsible for *beta*-cypermethrin resistance in the oriental armyworm. 【Methods】The detoxification enzyme activity and sequence alignment in *beta*-cypermethrin resistant and susceptible strains of the oriental armyworm were determined by bioassay, biochemical analysis and molecular technology. 【Results】The results of synergism tests show that triphenyl phosphate (TPP) and piperonyl buoxide (PBO) have an obvious synergistic effect, resulting in 5.50 and 3.40-fold synergist ratios, respectively. Detoxification enzymes tests show that the activity of esterase (EST), glutathione S-transferase (GSTs) and mixed function oxidase (MFOs) in the resistant strain were 2.45, 1.73 and 1.70 fold, respectively, that in the susceptible strain. However, only the difference in EST and MFO activity between strains was statistically significant ($P<0.05$). No mutations associated with knockdown resistance were identified by comparing the sodium channel gene S4-S6 fragment of resistant and susceptible strains. 【Conclusion】EST and MFO may play an important role in the development of *beta*-cypermethrin resistance in *M. separata*.

Key words *Mythimna separata* (Walker), *beta*-cypermethrin, resistance mechanism, detoxification enzymes, sodium channel

粘虫 *Mythimna separata* (Walker)作为我国主要粮食作物上迁飞性极强的害虫之一,因其具有突发性、暴食性和毁灭性,因此对于粘虫的防治多以农药防治为主,拟除虫菊酯类依赖其高效、低毒、低残留的特性而替代有机氯广泛应用

于农林及卫生害虫的防治,但是长期使用,已经使其对高效氯氟菊酯和高效氯氟氰菊酯产生了不同水平的抗药性(赵玉玉等,2017)。抗性机制的研究是害虫抗性治理的基础,研究表明对于拟除虫菊酯类抗性,主要包括两方面的机制,一

*资助项目 Supported projects: 公益性行业(农业)科研专项(201403031);国家“十三五”重点研发专项(2017YFD0201807)和陕西省农业科技创新转化项目

**第一作者 First author, E-mail: 335943314@qq.com

***共同通讯作者 Co-corresponding authors, E-mail: junxw@nwsuaf.edu.cn; liyiping@nwsuaf.edu.cn

收稿日期 Received: 2018-08-25, 接受日期 Accepted: 2018-09-21

是解毒代谢酶活性增强,其中以酯酶和多功能氧化酶为主(Lawrence and Casida, 1982);二是靶标位点钠离子通道上的氨基酸突变导致靶标蛋白与拟除虫菊酯类药剂的结合能力变弱或者改变钠离子通道电压门控的动作电位,从而产生抗性(Vais *et al.* 2000, 2003)。其中最重要的一个形式就是点突变导致的击倒抗性(kdr, knockdown resistance),目前已在多种昆虫中均有报道(Soderlund and Bloomquist, 1990)。研究发现一些击倒抗性和类似于击倒抗性的突变聚集于第二结构域的S5和S6跨膜区或者第一和第三结构域的S6跨膜区,其中S4-6区域是kdr突变的主要位点(Soderlund, 2005; Davies *et al.*, 2007; Dong, 2007)。

鉴于目前尚无粘虫对高效氯氰菊酯抗性机制研究的报道,因此作者在抗性筛选的基础上,进一步研究了粘虫对高效氯氰菊酯产生抗性的生化及分子机制,旨在为粘虫抗药性的治理及田间综合防治提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

敏感品系(S):2014年7月采自陕西省兴平市,在养虫室内不接触药剂的条件下继代饲养18代以上。

抗性品系(R):以山西太谷种群为初筛种群,利用高效氯氰菊酯在室内对其连续筛选6代后,其抗性上升35.2倍,作为本试验的抗性品系。

1.2 主要试剂

95.9%高效氯氰菊酯购自南京红太阳集团有限公司;98% α -乙酸萘酯(α -NA),95%胡椒基丁醚(PBO),98%磷酸三苯酯(TPP),96%丁烯二酸二乙酯(DEM)购自上海麦克林生化科技有限公司;十二烷基硫酸钠(SDS),乙二胺四乙酸二钠(Na_2EDTA)购自MP Biomedicals公司; α -萘酚,氢氧化钠购自天津博迪化工股份有限公司;固蓝B盐购自国药集团化学试剂有限公司;还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸

(NADPH)购自Solarbio公司;对硝基苯酚,97%对硝基苯甲醚购自上海迈瑞尔化学技术有限公司;还原型谷胱甘肽(GSH),1-氯-2,4-二硝基苯(CDNB),考马斯亮蓝G-250,牛血清白蛋白(BSA)购自Sigma公司;其他试剂为国产分析纯或化学纯。RNAiso Plus, PrimeScriptTM 1st Strand cDNA Synthesis Kit, pMD-19T Vector System, DNA纯化回收试剂盒等均为Takara公司产品。

1.3 增效剂试验

参照王圣印等(2012)的方法进行,先将酶抑制剂用丙酮稀释成10 g/L溶液,然后将高效氯氢菊酯稀释成系列浓度,取一定量配好的酶抑制剂与药液混合,只要保证每个浓度的药液中酶抑制剂的浓度均为0.1 g/L即可进行毒力测定,比较药剂单用和加入增效剂后的 LC_{50} 值,并计算出增效指数、抗敏增效比和相对增效系数来判断酶活性增强与抗药性之间的关系(何林, 2003; 沈一凡, 2014)。

$$\text{增效指数} = \frac{\text{单用药剂}\text{LC}_{50}}{(\text{药剂} + \text{增效剂})\text{LC}_{50}}$$

$$\text{抗敏增效比} = \frac{\text{增效剂对抗性种群的增效指数}}{\text{增效剂对敏感种群的增效指数}}$$

$$\text{相对增效系数 } r_0(\%) = (A - B) / C \times 100。$$

其中A=药剂对抗性种群的 LC_{50} -(药剂+增效剂)对抗性种群的 LC_{50} ,

B=药剂对敏感种群的 LC_{50} -(药剂+增效剂)对敏感种群的 LC_{50} ,

C=药剂对抗性种群的 LC_{50} 。

若 r_0 值明显大于0,则表示增效剂所抑制的酶与抗药性形成有关。

1.4 解毒酶活性测定

1.4.1 酯酶活性测定 取3龄粘虫幼虫3头,加入预冷的1 mL 0.04 mol/L pH7.0磷酸缓冲液,冰浴条件下充分匀浆,然后12 000 r/min、4 离心10 min,吸取上清液作为酶源冰浴备用。酯酶活性的测定参照Van Asperen(1962)的方法,略有修改。在每个试管中依次加入0.45 mL磷酸

缓冲液(0.04 mol/L pH7.0) 1.8 mL 3×10^{-4} mol/L α -NA 溶液, 50 μ L 稀释后的酶液。混匀后将试管于 30 $^{\circ}$ C 恒温水浴, 15 min 后加入 0.9 mL 显色液(1%固蓝 B 盐水溶液 5%十二烷基硫酸钠水溶液 = 2 : 5, 现配现用) 终止反应。将混合液置于室温静置 5 min, 用分光光度计测定 600 nm 处 OD 值, 对照处理在显色终止反应后补加酶液 50 μ L。根据 α -萘酚量和酶源蛋白质含量 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 计算酯酶比活力 ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ Pr.)。重复 3 次。

1.4.2 谷胱甘肽 S-转移酶活性测定 根据 Clark 等 (1984) 的方法, 并稍作修改。取样方法同 1.4.1, 加入预冷的 0.1 mol/L pH6.5 磷酸缓冲液 (含 1.0 mmol/L EDTA), 在冰浴条件下迅速充分匀浆。匀浆液于 4 $^{\circ}$ C、12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 分离上清液作酶液备用。以 1-氯-2, 4-二硝基苯 (CDNB) 为底物, 在试管中依次加入 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH6.5 磷酸缓冲液 3.16 mL、30 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 还原型谷胱甘肽 120 μ L、15 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CDNB 120 μ L、酶液 0.2 mL, 立即混匀, 在 340 nm 处测定 OD 值在 5 min 内的变化, 并计算反应速度 (A_{340}/min)。空白对照以 0.2 mL 磷酸缓冲液代替酶液。测定酶源蛋白质含量, 按照公式计算谷胱甘肽 S-转移酶比活力 ($\text{mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ Pr.)。重复 3 次。

$$\text{GSTs 活性} = \frac{\Delta OD_{340} \cdot v}{\varepsilon \cdot L \cdot V},$$

$$\text{GSTs 比活力} = \frac{\text{GSTs 活性}}{\text{每 mL 酶液中蛋白质的含量}}。$$

其中 ΔOD_{340} 为吸光度每分钟的变化值 ($\Delta OD_{340}/\text{min}$), v 为酶促反应体系 (mL), ε 为消光系数, 为 9.6 L/ ($\text{mmol} \cdot \text{cm}$), L 为比色皿的光程 (1 cm), V 为酶液体积 (mL)。

1.4.3 多功能氧化酶活性测定 取样方法同 1.4.1, 测定方法参考 Hansen 和 Hodgson (1971) 的方法, 并稍作改动。加入预冷的 0.1 mol/L pH7.8 磷酸缓冲液, 在冰浴条件下迅速充分匀浆。匀浆液于 4 $^{\circ}$ C、12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 分离上清液作酶液备用。反应总体积 3 mL 0.1 mol/L pH7.8 的磷酸缓冲液 0.8 mL、

0.5 mmol/L NADPH 200 μ L、4 mmol/L 对硝基苯甲醚 1 mL、酶液 1 mL。反应体系在 37 $^{\circ}$ C 振荡温育反应 30 min, 加入 1 mL 1 mol/L HCL 终止反应。再加入 5 mL 氯仿萃取, 在 3 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 15 min。取下层即氯仿层 3 mL 到另一试管, 加入 3 mL 0.5 mol/L NaOH 反萃取。取上层 NaOH 溶液在 400 nm 比色分析, 得到 OD 值, 以 0.5 mol/L NaOH 溶液为对照。以单位时间单位质量蛋白质产生的对硝基酚的摩尔数表示酶活性单位 ($\text{mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ Pr.)。重复 3 次。

1.4.4 蛋白质含量 参照考马斯亮蓝 G-250 法 (Bradford, 1976) 进行测定。

1.5 钠离子通道点突变检测

根据转录组中钠离子通道基因序列, 设计引物 M1F: CACTGTTGGAGTTGGGATTG; M1R: TATCCTGGTCGGCAGTTGGTGT, 以粘虫 3 龄幼虫为材料, 用 TRIZOL 法提取 RNA, 按 PrimeScriptTM 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒反转录为 cDNA, 以抗性品系和敏感种群的 cDNA 分别为模板进行 RT-PCR 扩增得到 S4-6 片段, 经 DNA 纯化回收试剂盒回收后, 然后连接转化进行阳性克隆鉴定后送交北京奥科鼎盛生物科技有限公司测序。

1.6 数据分析

利用 Polo plus 计算致死中浓度 (LC_{50} 值), 利用 SPSS20.0 的独立样本 t -检验分析比较抗性和敏感品系之间 3 种解毒酶比活力差异显著性。

2 结果与分析

2.1 增效剂对高效氯氰菊酯的增效作用

由表 1 可以看出, TPP 和 PBO 在敏感品系中的增效指数分别为 1.83 倍和 2.72 倍, 在抗性品系中的增效指数分别为 10.07 倍和 9.24 倍, 说明酯酶和多功能氧化酶参与了高效氯氰菊酯的代谢解毒。TPP 和 PBO 对高效氯氰菊酯的增效作用为抗敏增效比分别为 5.50 和 3.40, 增效系数分别为 78.41 和 72.93, 说明酯酶和多功能氧化酶也与粘虫对高效氯氰菊酯抗性的形成有重要

表 1 3 种增效剂在不同粘虫品系中对高效氯氰菊酯的增效作用

Table 1 Synergism of PBO, DEM and TPP to *beta*-cypermethrin against different strains of *Mythimna separata*

药剂 Chemical	品系 Strains	LC ₅₀ (mg·L ⁻¹) 95% CL	增效指数 RI	抗敏增效比 R/S	相对增效 系数 r ₀
高效氯氰菊酯 <i>Beta</i> -cypermethrin	R	8.036 (5.948-10.797)	—		
	S	2.063 (1.490-2.589)	—		
+PBO	R	0.870 (0.218-1.632)	9.24	3.40	72.93
	S	0.758 (0.001-1.562)	2.72		
+TPP	R	0.798 (0.056-1.590)	10.07	5.50	78.41
	S	1.126 (1.944-4.751)	1.83		
+DEM	R	6.807 (4.795-9.588)	1.18	1.57	23.83
	S	2.749 (3.236-6.624)	0.75		

的关系。而 DEM 在敏感品系中的增效指数为 0.75，在抗性品系中的增效指数为 1.18，抗敏增效比为 1.57，相对增效系数为 23.83。由此可见，谷胱甘肽 S-转移酶并未参与粘虫对高效氯氰菊酯抗性的形成。

2.2 粘虫抗性品系和敏感品系体内解毒酶比活力差异比较

由表 2 可以看出，粘虫敏感和抗性品系的 EST 比活力分别为 11.70 nmol·mg⁻¹·min⁻¹Pr 和 28.65 nmol·mg⁻¹·min⁻¹Pr，比值为 2.45，两者之间差异显著 ($P=0.012$)；对于 MFO，本研究仅测定了敏感品系和抗性品系中的多功能氧化酶-O-脱甲基的活性，其比活力之间的比值为 1.70，且两者之间存在极显著性差异 ($P<0.001$)，其比

活力分别为 0.33 nmol·mg⁻¹·min⁻¹Pr 和 0.56 nmol·mg⁻¹·min⁻¹Pr；而对于 GSTs 而言，虽然敏感品系和抗性品系的比活力分别为 4.09 nmol·mg⁻¹·min⁻¹Pr 和 7.09 nmol·mg⁻¹·min⁻¹Pr，且比值为 1.73，但是两者之间没有显著性差异 ($P=0.157$)。由此进一步说明酯酶和多功能氧化酶在高效氯氰菊酯抗性形成中起到了主要的作用，与谷胱甘肽 S-转移酶无关。

2.3 钠离子通道基因片段的比较

对粘虫钠离子通道基因的 S4-6 区域进行克隆，得到一个 493 bp 的核苷酸序列 (图 1)，将抗性品系和敏感品系克隆所得到的片段进行序列比对分析发现两者的核苷酸序列及编码的氨基酸序列完全相同 (图 2)，未发现在其他多

表 2 粘虫抗性品系与敏感品系 3 种解毒酶的比活力

Table 2 Activity of three kinds of detoxifying enzymes in the resistant strain (R) and the susceptible strain (S) of *Mythimna separata*

种群 Population	酯酶 Esterase		谷胱甘肽 S-转移酶 Glutathione S-transferase		多功能氧化酶 Mixed function oxidase	
	比活力 Specific activity (nmol·mg ⁻¹ ·min ⁻¹ Pr)	比值 Ratio	比活力 Specific activity (nmol·mg ⁻¹ ·min ⁻¹ Pr)	比值 Ratio	比活力 Specific activity (nmol·mg ⁻¹ ·min ⁻¹ Pr)	比值 Ratio
敏感种群 S Susceptible strains	11.70 ± 2.63	1	4.09 ± 0.47	1	0.33 ± 0.012	1
抗性种群 R Resistant strains	28.65 ± 2.83*	2.45	7.09 ± 1.66	1.73	0.56 ± 0.005**	1.70

表中数据为 mean±SE，*表示在 $P<0.05$ 水平上差异显著，**表示在 $P<0.01$ 水平上差异极显著；比值=抗性品系比活力/敏感品系比活力。

Data are mean±SE, and with * indicates significant difference at $P < 0.05$ while with ** indicates extramely significant difference at $P < 0.01$. Ratio = The activity of resistant strains / The activity of susceptible strains.

```

1 TCACTGTTGGAGTTGGGATTGGAAGGAGTTGAGGGTTTGTGAGTGTTCGTTTCCTTCGTTTGCTTCGAGTATTCAAATTGGCAAAGTCA
1 S L L E L G L E G V Q G L S V L R S F R L L R V F K L A K S

91 TGGCCGACACTTAATTTACTCATCTCCATAATGGGTAGGACAATGGGTGCCTTGGGCAACCTGACCTTCGTATTGTGCATCATTATTTTC
31 W P T L N L L I S I M G R T M G A L G N L T F V L C I I I F
M918 L925 T929

181 ATATTTGCGGTGATGGGTATGCAACTATTCGGGAAAAATTACGTGGATTACGTAGACCGTTTCCCGGACGGGGACCTCCCGCGATGGAAC
61 I F A V M G M Q L F G K N Y V D Y V D R F P D G D L P R W N

271 TTCACGGATTTCATGCACAGTTTCATGATTGTGTTCCGAGTACTCTGCGGAGAATGGATTGAGAGTATGTGGGACTGTATGTTGGTGGGA
91 F T D F M H S F M I V F R V L C G E W I E S M W D C M L V G

361 GATGTCTCTGTATACCCCTTCTTCTTGGCTACCGTCGTCATTGGTAATCTTGTGGTACTCAACCTTTTCTTGGCCCTGTTACTGTCCAAT
121 D V S C I P F F L A T V V I G N L V V L N L F L A L L L S N
L1014

451 TTCGGTTCATCGAGTTTGTGACACCAACTGCCGACCAGGATA
151 F G S S S L S T P T A D Q D

```

图 1 IIS4-IIS6 区域的核苷酸和氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and amino acid sequences of the IIS4-IIS6 region of *MsNav*

```

S: SLLELGLEGVQGLSVLRSFRLLRVFKLAKSWPTLNLLISIMGRIMGALGN 50
R: SLLELGLEGVQGLSVLRSFRLLRVFKLAKSWPTLNLLISIMGRIMGALGN 50
SLLELGLEGVQGLSVLRSFRLLRVFKLAKSWPTLNLLISIMGRIMGALGN

S: LTFVLCIIIFIFAVMGMQLFGKNYVDYVDRFPDGLPRWNFTDFMHSMFI 100
R: LTFVLCIIIFIFAVMGMQLFGKNYVDYVDRFPDGLPRWNFTDFMHSMFI 100
LTFVLCIIIFIFAVMGMQLFGKNYVDYVDRFPDGLPRWNFTDFMHSMFI

S: VFRVLCGEWIESMWDCMLVGDVSCIPFFLATVVIGNLVVLNLFALLLSN 150
R: VFRVLCGEWIESMWDCMLVGDVSCIPFFLATVVIGNLVVLNLFALLLSN 150
VFRVLCGEWIESMWDCMLVGDVSCIPFFLATVVIGNLVVLNLFALLLSN

S: FGSSSLSTPTADQD 164
R: FGSSSLSTPTADQD 164
FGSSSLSTPTADQD

```

图 2 粘虫抗 (R)、感 (S) 品系 IIS4-IIS6 区域氨基酸序列比对

Fig. 2 Alignment of amino acid sequence of the IIS4-IIS6 region of resistant (R) and susceptible strains (S)

种昆虫 S4-6 区域验证得到的与击倒抗性相关的任何突变 (图 1)。

3 讨论

20 世纪 70 年代已有关于昆虫对拟除虫菊酯类杀虫剂产生抗性的报道 (Priester and Georgiou, 1979), 随着相关报道的日益增多, 其抗药性问题受到了越来越多的关注。昆虫对杀虫剂的抗性主要包括代谢抗性和靶标抗性。通过对昆虫对拟除虫菊酯类杀虫剂的代谢抗性进行研究, 发现酯酶和多功能氧化酶在代谢抗性中发挥了主要作用 (McCaffery, 1998)。目前已在许多昆虫中通过增效剂试验证明了这一观点, 如烟芽夜蛾 (Zhao *et al.*, 1996), 谷蠹 *Rhyzopertha*

dominica (Lorini and Galley, 2000), 烟粉虱 *Bemisia tabaci* (Kang *et al.*, 2006), 西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* (Thalavaisundaram *et al.*, 2008), 捕食性瓢虫 *Eriopis connexa* (Rodrigues *et al.*, 2014), 大豆蚜 *Aphis glycines* (Xi *et al.*, 2015) 等。Demkovich 等 (2015) 用增效剂 DEF 和 PBO 分别与高效氯氟菊酯混合处理脐橙螟 *Amyelois transitella*, 结果发现其对高效氯氟菊酯的敏感性显著升高; 侍甜等 (2012) 利用 3 种增效剂分别对甜菜夜蛾云南晋宁、上海奉贤和江苏六合田间种群进行了研究, 结果表明 PBO 在 3 个田间种群中的增效比分别为 4.5、10.9 和 58, DEF 的增效比为 31.3、21 和 245, 而 DEM 的增效比则为 0.5、0.7 和 1.8。以上结果均证明

酯酶和多功能氧化酶的活性增强是昆虫对高效氯氰菊酯产生抗性的主要原因,而与谷胱甘肽 *S*-转移酶无关。本研究通过利用 3 种增效剂与高效氯氰菊酯混合处理粘虫,结果显示 PBO、DEM 和 TPP 对高效氯氰菊酯的抗敏增效比分别为 3.40、1.57 和 5.50,说明酯酶和多功能氧化酶在粘虫对高效氯氰菊酯的抗性中起到了重要的作用。

左亚运(2015)通过解毒酶活性测定发现羧酸酯酶和多功能氧化酶活性增强是禾谷缢管蚜对高效氯氰菊酯产生抗性的主要原因。本研究通过酶活性测定,同样发现酯酶和多功能氧化酶参与了粘虫对高效氯氰菊酯抗性的形成,其抗性品系和敏感品系酯酶比活力比值为 2.45,两者之间存在显著差异;多功能氧化酶比活力之间存在极显著差异,比值为 1.70;而谷胱甘肽 *S*-转移酶比活力之间无显著差异。但是也有研究发现昆虫对拟除虫菊酯类杀虫剂的抗性与谷胱甘肽 *S*-转移酶活性增强有关,如赤拟古盗抗氯氰菊酯品系,其谷胱甘肽 *S*-转移酶活性升高了 4-6 倍(Reidy *et al.*, 1990)。对来自乌干达地区的不吉按蚊的抗性机理进行研究时,发现其抗性品系比敏感品系的谷胱甘肽 *S*-转移酶活性高 3.47 倍,且存在极显著差异(Morgan *et al.*, 2010)。这可能由于不同昆虫对拟除虫菊酯类的不同杀虫剂有不同的抗性机制。

昆虫对拟除虫菊酯类的抗性机制除了解毒酶活性增强的代谢抗性外,还包括靶标敏感性降低的靶标抗性(沈晋良和吴益东,1995)。拟除虫菊酯类杀虫剂的主要作用靶标为电压门控钠离子通道。钠离子通道基因的点突变是导致其对杀虫剂敏感性下降的主要原因,这种现象又称为击倒抗性(Soderlund and Bloomquist, 1990; 王利华, 2007)。目前已在 40 多种昆虫中发现了 40 个与击倒抗性有关的氨基酸突变,但是仅有 14 个位点的突变经爪蟾卵母细胞功能表达实验验证,能够引起钠离子通道对菊酯类杀虫剂的亲和力降低(陈斌等, 2015)。其中最常见的击倒抗性点突变为 IIS6 区域的亮氨酸突变为苯丙氨酸、组氨酸或丝氨酸,即 L1014F/H/S, 该突变

在家蝇 *Musca domestica* (Miyazaki *et al.*, 1996; Williamson *et al.*, 1996)、德国小蠊(Liu *et al.*, 2000)、小菜蛾(Schuler *et al.*, 1998)、桃蚜(Martinez-Torres *et al.*, 1999)、烟芽夜蛾(Park and Taylor, 1997)、冈比亚按蚊(Martinez-Torres *et al.*, 1998; Ranson *et al.*, 2000)等昆虫早已报道。经爪蟾卵母细胞试验验证发现 L1014F/H 能够使黑腹果蝇、家蝇和德国小蠊钠离子通道对拟除虫菊酯类杀虫剂的敏感性降低 5-10 倍(Smith *et al.*, 1997; Vais *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2002; Tan *et al.*, 2002)。在一些高抗品系中,一般会发现 2-3 个另外的点突变与 L1014F 同时发生,如番茄斑潜蝇中 M918T+L1014F 和 T929I+L1014F 突变(Dong, 2007; Haddi *et al.*, 2012)。另外在钠离子通道其他区域也会有一些独特的突变,如德国小蠊 N 端 D58G、IS6-IIS1 区域 E434K+C764R 和 N 端 P1880L 的突变和棉铃虫中 IIS6-IVS1 上 D1549V + E1553G 突变可能均与对拟除虫菊酯类杀虫剂的高水平抗性有关(Head *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2000)。

目前尚无粘虫对高效氯氰菊酯靶标抗性的研究报道,因此,本研究分别从敏感品系和抗性种群中提取 RNA,合成 cDNA,扩增得到了钠离子通道 IIS4-6 的 493 bp 的核苷酸序列。序列比对分析表明,与敏感品系相比,粘虫抗性种群钠离子通道基因没有发生任何与击倒抗性有关的突变,这可能是由于所筛选出来的抗性种群对高效氯氰菊酯的抗性水平较低,也可能是在钠离子通道基因的其他片段发生了相关的突变。关于其分子机制还需要进行进一步的研究。

参考文献 (References)

- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(s1/2): 248-254.
- Clark AG, Dick GL, Smith JN, 1984. Kinetic studies on a glutathione *S*-transferase from the larvae of *Costelytra zealandica*. *Biochemical Journal*, 217(1): 51-58.
- Chen B, Xian PJ, Qiao L, Zhou Y, 2015. Research progress in

- sodium channel gene mutations and their association with insecticide resistance of insects. *Acta Entomologica Sinica*, 58(10): 1116–1125. [陈斌, 鲜鹏杰, 乔梁, 周勇, 2015. 昆虫钠离子通道基因突变及其与杀虫剂抗性关系的研究进展. *昆虫学报*, 58(10): 1116–1125.]
- Davies TGE, Field LM, Usherwood PNR, Williamson MS, 2007. A comparative study of voltage-gated sodium channels in the Insecta: Implications for pyrethroid resistance in Anopheline and other Neopteran species. *Insect Molecular Biology*, 16(3): 361–375.
- Demkovich M, Siegel JP, Higbee BS, Berenbaum MR, 2015. Mechanism of resistance acquisition and potential associated fitness costs in, *Amyelois transitella*, (Lepidoptera: Pyralidae) exposed to pyrethroid insecticides. *Environmental Entomology*, 44(3): 855.
- Dong K, 2007. Insect sodium channels and insecticide resistance. *Invertebrate Neuroscience*, 7(1): 17–30.
- Hansen LG, Hodgson, 1971. Biochemical characteristics of insect microsomes. N- and O-demethylation. *Biochemical Pharmacology*, 20(7): 1569–1578.
- Haddi K, Berger M, Bielza P, Cifuentes D, Field LM, Gorman K, Rapisarda C, Williamson MS, Bass C, 2012. Identification of mutations associated with pyrethroid resistance in the voltage-gated sodium channel of the tomato leaf miner (*Tuta absoluta*). *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, 42(7): 506.
- Head DJ, McCaffery AR, Callaghan A, 1998. Novel mutations in the para-homologous sodium channel gene associated with phenotypic expression of nerve insensitivity resistance to pyrethroids in Heliothine Lepidoptera. *Insect Molecular Biology*, 7(2): 191.
- He L, 2003. Study on pesticide resistance mechanisms and resistant fitness of *Tetranychus cinnabarinus* (Boiduval). Doctor dissertation. Chongqing: Southwest Agricultural University. [何林, 2003. 朱砂叶螨 (*Tetranychus Cinnabarinus*) 抗药性机理及抗性适合度研究. 博士学位论文. 重庆: 西南农业大学.]
- Kang CY, Wu G, Miyata T, 2006. Synergism of enzyme inhibitors and mechanisms of insecticide resistance in *Bemisia tabaci*, (Gennadius) (Homalepyrididae). *Journal of Applied Entomology*, 130(6/7): 377–385.
- Lawrence LJ, Casida JE, 1982. Pyrethroid toxicology: mouse intracerebral structure-toxicity relationships. *Pesticide Biochemistry & Physiology*, 18(1): 9–14.
- Liu Z, Valles SM, Dong K, 2000. Novel point mutations in the German cockroach para sodium channel gene are associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30(10): 991–997.
- Liu Z, Tan J, Valles SM, Dong K, 2002. Synergistic interaction between two cockroach sodium channel mutations and a tobacco budworm sodium channel mutation in reducing channel sensitivity to a pyrethroid insecticide. *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, 32(4): 397–404.
- Lorini I, Galley DJ, 2000. Effect of the synergists piperonyl butoxide and def in deltamethrin resistance on strains of *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae). *Anais Da Sociedade Entomológica Do Brasil*, 29(4): 749–755.
- Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Bergé JB, Devonshire AL, Guillet P, Pasteur N, Pauron D, 1998. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Molecular Biology*, 7(2): 179–184.
- Martinez-Torres D, Foster SP, Field LM, Devonshire AL, Williamson MS, 1999. A sodium channel point mutation is associated with resistance to DDT and pyrethroid insecticides in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). *Insect Molecular Biology*, 8(3): 339.
- McCaffery AR, 1998. Resistance to insecticides in Heliothine Lepidoptera: a global view. *Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Sciences*, 353(1376): 1735.
- Miyazaki M, Ohyama K, Dunlap DY, Matsumura F, 1996. Cloning and sequencing of the para-type sodium channel gene from susceptible and kdr-resistant german cockroaches (*Blattella germanica*) and house fly (*Musca domestica*). *Molecular & General Genetics MGG*, 252(1/2): 61–68.
- Morgan JC, Irving H, Okedi LM, Steven A, Wondji CS, 2010. Pyrethroid resistance in an *Anopheles funestus* population from Uganda. *PLoS ONE*, 5(7): e11872.
- Park Y, Taylor MF, 1997. A novel mutation L1029H in sodium channel gene *hscp* associated with pyrethroid resistance for *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 27(1): 9–13.
- Ranson H, Jensen B, Vulule JM, Wang X, Hemingway J, Collins FH, 2000. Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect Molecular Biology*, 9(5): 491–497.
- Reidy GF, Rose HA, Visetson S, Murray M, 1990. Increased glutathione S-transferase activity and glutathione content in an insecticide-resistant strain of *Tribolium castaneum*. *Pesticide Biochemistry & Physiology*, 36(3): 269–276.
- Priester TM, Georgiou GP, 1979. Inheritance of resistance to permethrin in *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Journal of Economic Entomology*, 72(1): 124–127.
- Rodrigues ARS, Siqueira HAA, Torres JB, 2014. Enzymes mediating resistance to lambda-cyhalothrin in *Eriopsis connexa*, (Coleoptera: Coccinellidae). *Pesticide Biochemistry & Physiology*, 110(1): 36–43.

- Schuler TH, Martinez-Torres D, Thompson AJ, Denholm I, Devonshire AL, Duce IR, Williamson MS, 1998. Toxicological, electrophysiological, and molecular characterisation of knockdown resistance to pyrethroid insecticides in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *Pesticide Biochemistry & Physiology*, 59(3): 169–182.
- Smith TJ, Lee SH, Ingles PJ, Knipple DCM, Soderlund D, 1997. The L1014F point mutation in the house fly Vssc1 sodium channel confers knockdown resistance to Pyrethroids. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 27(10): 807–812.
- Shen JL, Wu YD, 1995. Resistance and Management of *Helicoverpa armigera*. Beijing: China Agriculture Press. 25–88. [沈晋良, 吴益东, 1995. 棉铃虫抗药性及其治理. 北京: 中国农业出版社. 25–88.]
- Shi T, Che WN, Wu YD, Yang YH, 2012. Metabolic mechanisms of resistance to emamectin and cypermethrin in field populations of *Spodoptera exigua*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 49(6): 1482–1489. [侍甜, 车午男, 吴益东, 杨亦桦, 2012. 甜菜夜蛾田间种群对甲氨基阿维菌素苯甲酸盐和高效氯氰菊酯的代谢抗性机制. 应用昆虫学报, 49(6): 1482–1489.]
- Shen YF, 2014. Study on resistance and enzyme activity changes of *Tetranychus urticae* Koch to abamectin. Master dissertation. Lanzhou: Gansu Agricultural University. [沈一凡, 2014. 二斑叶螨对阿维菌素的抗性及其酶活性变化研究. 硕士学位论文. 兰州: 甘肃农业大学.]
- Soderlund DM, 2005. Sodium channels// Gilbert LI, Iatrou K, Gill SS (eds.). *Comprehensive Insect Science Pharmacology*, Vol. 5. Amsterdam: Elsevier BV. 1–24.
- Soderlund DM, Bloomquist JR, 1990. Molecular mechanisms of insecticide resistance// Roush RT, Tabashnik BE (eds.). *Pesticide Resistance in Arthropods*. New York: Chapman and Hall. 58–96.
- Thalavaisundaram S, Herron GA, Clift AD, Rose H, 2008. Pyrethroid resistance in *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) and implications for its management in Australia. *Austral Entomology*, 47(1): 64–69.
- Tan J, Liu Z, Nomura Y, Goldin AL, Dong K, 2002. Alternative splicing of an insect sodium channel gene generates pharmacologically distinct sodium channels. *Journal of Neuroscience*, 22(13): 5300–5309.
- Vais H, Williamson MS, Goodson SJ, Devonshire AL, Warmke JW, Usherwood PN, Cohen CJ, 2000. Activation of Drosophila sodium channels promotes modification by deltamethrin reductions in affinity caused by knock-down resistance mutations. *The Journal of General Physiology*, 115(3): 305–318.
- Vais H, Atkinson S, Pluteanu F, Goodson SJ, Devonshire AL, Williamson MS, Usherwood PN, 2003. Mutations of the para sodium channel of drosophila melanogaster identify putative binding sites for pyrethroids. *Molecular Pharmacology*, 64(4): 914–922.
- Van Asperen K, 1962. A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method. *Journal of Insect Physiology*, 8(4): 401–416.
- Williamson MS, Martinez-Torres D, Hick CA, Devonshire AL, 1996. Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. *Molecular and General Genetics MGG*, 252(1/2): 51–60.
- Wang LH, 2007. Biochemical and molecular mechanisms of resistance to alpha-cypermethrin and abamectin in *Bemisia tabaci*. Master dissertation. Nanjing: Nanjing Agricultural University. [王利华, 2007. 烟粉虱对高效氯氰菊酯和阿维菌素抗性的生化和分子机理. 硕士学位论文. 南京: 南京农业大学.]
- Wang SY, Yu Y, Liu YJ, 2012. Cross-resistance and biochemical resistance mechanisms of emamectin-benzoate resistant population of *Frankliniella occidentalis*. *Acta Phytophylacica Sinica*, 39(2): 159–165. [王圣印, 于毅, 刘永杰, 2012. 西花蓟马抗甲氨基阿维菌素苯甲酸盐种群的交互抗性及其生化抗性机制. 植物保护学报, 39(2): 159–165.]
- Xi JH, Pan YO, Bi R, Gao XW, Chen XW, Peng TF, Zhang M, Zhang H, Hu XY, Shang QL, 2015. Elevated expression of esterase and cytochrome P450 are related with lambda-cyhalothrin resistance and lead to cross resistance in *Aphis glycines* Matsumura. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 118(2): 77–81.
- Zhao G, Rose RL, Hodgson E, Roe RM, 1996. Biochemical mechanisms and diagnostic microassays for pyrethroid, carbamate, and organophosphate insecticide resistance/cross-resistance in the tobacco budworm, *Heliothis virescens*. *Pesticide Biochemistry & Physiology*, 56(3): 183–195.
- Zhao Y, Park Y, Adams ME, 2000. Functional and evolutionary consequences of pyrethroid resistance mutations in S6 transmembrane segments of a voltage-gated sodium channel. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 278(3): 516–521.
- Zhao YY, Li S, Li Y P, Xu XL, Cheng WN, Wang Y, Wu JX, 2017. Insecticide resistance of field populations of *Mythimna separata* in Shaanxi and Shanxi province. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 19(2): 182–188. [赵玉玉, 李帅, 李怡萍, 许向利, 成卫宁, 王熠, 仵均祥, 2017. 中国陕晋两省部分地区粘虫田间种群的抗药性. 农药学报, 19(2): 182–188.]
- Zuo YY, 2015. Resistance monitoring and the resistance mechanism of *Phopalosiphum padi* (Linnaeus) to beta-cypermethrin. Master dissertation. Yangling: Northwest A&F University. [左亚运, 2015. 禾谷缢管蚜抗药性监测及其对高效氯氰菊酯的抗药性机理初步研究. 硕士学位论文. 杨凌: 西北农林科技大学.]