

截形叶螨对阿维·哒螨灵的抗性遗传方式研究*

宋丽雯** 李维真 郭鸿儒 王森山 沈慧敏

(甘肃农业大学植物保护学院, 甘肃省农作物病虫害生物防治工程实验室, 兰州 730070)

摘要 【目的】明确截形叶螨 *Tetranychus truncatus* Ehara 对阿维·哒螨灵药剂的抗性遗传方式, 为今后合理使用药剂, 有效地制定害螨抗性治理策略提供一定的理论指导。【方法】通过杂交和回交试验, 确定截形叶螨抗阿维·哒螨灵种群的显性度 (D)、细胞质影响因子和遗传基因。【结果】所测得的截形叶螨抗性种群的杂交 F_1 代 ($SS\text{♀}\times RR\text{♂}$ 和 $RR\text{♀}\times SS\text{♂}$) 的显性度 D 值分别为 0.625 和 0.802, 均在 $0 < D < 1$ 范围内, 表明抗性都由不完全显性基因控制; 两个 D 值 (D_{SR} 和 D_{RS}) 95% 置信限有重叠, 并且经 t -检验, 两个 D 值不存在显著差异 ($P > 0.05$), 证明截形叶螨对阿维·哒螨灵的抗性遗传受母体或核外效应的影响不大, 其抗性基因在常染色体上; 回交 F_2 代两个种群的 (BC_{1SR} 和 BC_{1RS}) 的实际死亡率和期望值经 χ^2 检验, 均差异显著, 证实由多基因控制。【结论】不完全显性多基因控制的遗传方式产生的抗谱很宽, 抗性一旦产生则很难延缓其抗性的迅速发展, 因此田间应用该药剂时应交替轮换不同作用机制的药剂, 重点采用预防性抗性治理策略。

关键词 截形叶螨; 阿维·哒螨灵; 遗传方式; 显性度; 多基因

Inheritance of resistance to abamectin+pyridaben in *Tetranychus truncatus* Ehara

SONG Li-Wen** LI Wei-Zhen GUO Hong-Ru WANG Sen-Shan SHEN Hui-Min

(Biocontrol Engineering Laboratory of Crop Diseases and Pests of Gansu Province, College of Plant Protection, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract [Objectives] To clarify the inheritance of resistance to avermectin+pyridaben in *Tetranychus truncatus* Ehara. [Methods] Resistant (RR) and susceptible (SS) strains of *Tetranychus truncatus* Ehara were crossed and backcrossed to investigate the genes involved in resistance to avermectin+pyridaben, their dominance (D) and cytoplasmic factors involved in resistance. [Results] D values for F_1 females from $SS\text{♀}\times RR\text{♂}$ crosses and $RR\text{♀}\times SS\text{♂}$ crosses were in the range of $0 < D < 1$ (0.625 and 0.802, respectively), indicating incomplete dominance. The 95% confidence limits of these two D values overlap, indicating that there is no significant difference between D_{SR} and D_{RS} . This reveals that the gene responsible for resistance is located in the autosome. A Chi-square (χ^2) goodness-of-fit analysis indicated that mortality levels in F_2 females (BC_{1SR} and BC_{1RS}) were significantly different ($\chi^2 = 16.92$, $df = 9$, $P < 0.05$) from the expected values for multiple gene control. [Conclusion] The inheritance of resistance to abamectin+pyridaben in *T. truncatus* can easily cause a wide spectrum of resistance that is difficult to reduce. Consequently, abamectin+pyridaben should be used in rotation with the other insecticides to reduce selection for resistance to this combination of insecticides. It's important to implement a preventive resistance management strategy and measures to manage resistance to abamectin+pyridaben.

Key words *Tetranychus truncatus* (Ehara); abamectin+pyridaben; resistance inheritance; degrees of dominance; multiple genes

截形叶螨 *Tetranychus truncatus* Ehara 为蜱 (Tetranychidae) 害虫, 主要为害棉花、玉米、螨亚纲 (Acari), 蜱螨目 (Acarina), 叶螨科 蔬菜和花卉, 近年来随着甘肃河西地区玉米杂交

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金项目(31860503); 甘肃农业大学科技创新基金 (GAU-XKJS-2018-152)

**第一作者 First author, E-mail: songlw@gsau.edu.cn

收稿日期 Received: 2018-01-17; 接受日期 Accepted: 2018-05-09

制种业的迅速发展,已成为玉米生产中的优势种群,为害趋势加重,严重影响了甘肃制种玉米的产量和品质(何树文等,2017)。

在防治叶螨手段中,化学防治迄今仍是最有效的防治方法。Van Leeuwen 等(2015)经过统计分析指出叶螨已对大多数杀螨剂产生了抗性,成为最容易对农药产生抗性的节肢动物。而昆虫的抗药性是可以遗传的,这是生物进化过程中在外界环境压力下的进化与适应性,并且抗性增长的速度在药剂选择的条件下会受到抗性基因的影响,而抗性基因遗传常常表现出不同特性,如:遗传的显、隐性,核遗传和质遗传,单基因或多基因等。因此明确害虫(螨)对药剂的抗性遗传形式,对掌握抗性种群的发展速率,进行有效抗药性治理有重要的指导意义。

阿维·哒螨灵因兼具阿维菌素的持效性和哒螨灵的速效性,以及它们的协同增效作用使得杀虫杀螨谱扩大,药效提高(赵宝顺和李嘉诚,2003),目前在甘肃玉米制种田应用较为广泛,但前期研究发现,截形叶螨对阿维·哒螨灵产生抗性虽较慢,但抗性较稳定,一旦抗性产生不易衰退(宋丽雯等,2016);因此研究截形叶螨对该药剂的抗性遗传方式,可为延长阿维·哒螨灵制剂的使用寿命,有效制定截形叶螨的抗性治理策略提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试药剂

10%阿维·哒螨灵乳油(螨立停,上海沪联生物药业有限公司)。

1.2 供试昆虫

截形叶螨敏感品系:从没有施用任何农药的玉米田采集,在实验室内采用雌雄单系(一雌一雄在饲养台上饲养)繁殖饲养约2年,饲养期间不接触农药,以保证叶螨相对较高的敏感性。

抗性品系:由昆虫实验室前期抗性筛选得到,抗性指数(Resistant index, RI)为12.57。

1.3 生物测定

参照FAO(1980)推荐的玻片浸渍法(Slide-

dip method)。挑取截形叶螨雌成螨,用双面胶带将其背部贴在载玻片一端,每块玻片粘雌成螨30头。根据预试验结果将10%阿维·哒螨灵乳油稀释成7个浓度梯度,每一处理浓度设置3个重复,另以蒸馏水为对照。24 h后检查死亡率,用Finney 几率分析法求出阿维·哒螨灵对截形叶螨敏感种群(SS)、抗性种群(RR)的毒力回归式、坡度、 LC_{50} 和95%置信限,用 χ^2 进行检验。

1.4 杂交回交试验

参照何林等(2005)的方法,为保证进入杂交试验的都是未交配过的雌成螨,挑取抗性和敏感种群的第二雌若螨种群各200头,单独饲养,待第二若螨发育到雌成螨后,分别与抗性和敏感种群的雄螨进行配对杂交,即($R_{\text{♀}} \times S_{\text{♂}}$)和($S_{\text{♀}} \times R_{\text{♂}}$),得 F_1 代。然后挑取 F_1 代的 F_{1RS} 和 F_{1SR} 品系的第二雌若螨,待其发育到雌成螨后分别与亲本回交,得到 F_2 代,即 $BC(RS_{\text{♀}} \times R_{\text{♂}}$ 和 $SR_{\text{♀}} \times S_{\text{♂}}$)。然后测定亲本(RR和SS),杂交 F_1 代,回交 F_2 代(BC)的剂量对数-死亡率几率值线,根据毒力回归线进行统计分析。

1.5 显性度计算方法

根据Stone(1968)提出的抗性显性度(D)公式测定

$$D = \frac{2X_2 - X_1 - X_3}{X_1 - X_3}$$

其中 X_1 、 X_2 和 X_3 ,分别为亲本抗性种群、杂交 F_1 代RS(或SR)和亲本敏感种群SS的 LC_{50} 对数值。 $D=-1$ 时抗性基因为完全隐性; $-1 < D < 0$ 时抗性基因为不完全隐性; $0 < D < 1$ 时抗性基因为不完全显性; $D=1$ 时抗性基因为完全显性。

1.6 细胞质影响确定

确定母系遗传影响可以判断抗性基因是细胞核遗传还是细胞质遗传。通常杂交 F_1 代,除性染色体外,都具有相同的基因型。若 F_1 代的表现型(D值)存在差异,则表明受细胞质遗传因子或母体的影响(Maternal effects);若无明显差异时,抗性可归于染色体遗传因子。具体的显

性度方差及 t -测验计算方法参照武予清和刘芹轩 (1994)。

$$V_{ar}(D) = \frac{4}{(X_1 - X_3)^2} \left[V_{ar}(X_2) + \frac{(X_2 - X_3)^2}{(X_1 - X_3)^2} V_{ar}(X_1) + \frac{(X_2 - X_1)^2}{(X_1 - X_3)^2} V_{ar}(X_3) \right]$$

1.7 单基因或多基因遗传的确定

主要依据回交后代 F_2 LD-P 线来确定截形叶螨对阿维·哒螨灵的抗性是由单基因还是多基因控制。基于孟德尔提出的单基因遗传规律, 提出单基因遗传的期望假设。在此假设下, 每个剂量处理下回交个体的响应频率可以由以下公式来计算 (Georgiou and Garber, 1965)。

$$BC_1(F_{1RS} \times RR), X_v = W(RS) \times 0.5 + W(RR) \times 0.5, \\ BC_1(F_{1SR} \times SS), X_v = W(SR) \times 0.5 + W(SS) \times 0.5.$$

其中 X_v 表示浓度为 Y 时 F_2 代的期望死亡率, W 为 RR 、 RS 或 SR 和 SS 基因型在对应浓度下的死亡率, 这些值可从相应的 LD-P 线上直接获得。根据这些值即可得到 F_2 代剂量-期望反应曲线 (即对一定药剂剂量下 F_2 代的期望死亡率作图)。

根据 Tsukamoto 的抗性遗传方式分析方法, 如果抗性是单基因遗传的, 则回交后代 BC 的剂量对数-死亡几率值曲线在死亡率为 50% 处、自

交 F_2 代在死亡率 25% 和 75% 处会出现明显的平坡; 如果没有出现明显的平坡, 表明抗性由两个或两个以上的基因控制 (王泽华等, 2011)。

然后根据下述公式进行适合性测验 (Preisler *et al.*, 1990):

$$\sum x^2 = \frac{(o - pn)^2}{pqn}$$

其中, O 为在某剂量下的实际死亡虫数, p 为期望百分率, $q = 1 - p$, n 为在此剂量下总的测试虫数, r 为剂量的组数 (本试验 $r=10$), 若 F_2 代实际 χ^2 值与期望 χ^2 值之间存在差异, 则说明实际死亡率与期望值不相符合, 抗性由多基因遗传因子控制, 反之则说明抗性是由单基因遗传因子控制。

2 结果与分析

2.1 截形叶螨亲本 (SS 和 RR), 杂交 F_1 代 (SR 和 RS) 及回交后代 (BC) 毒力测定结果

从表 1 可知, 截形叶螨敏感品系 (SS) 和抗阿维·哒螨灵品系 (RR) 的杂交 F_1 代和回交 F_2 代的抗性指数都不同程度的低于抗性品系 ($RI=12.57$), 说明抗性品系与敏感品系杂交后, 其子代及其回交后代的抗性基因频率有明显的降低, 但与敏感品系相比, 仍存在一定的抗性。

表 1 截形叶螨不同品系的抗性水平测定

Table 1 Resistance determination of different strains of *Tetranychus truncatus*

品系 Strain	回归方程 ($y =$) LC-P equation	相关系数 r Correlation efficient	LC ₅₀ (mg/L) 95% Confidence limits	抗性 (RI) Resistance index
SS	$y = 2.740 9x + 2.649 9$	0.996 7	7.2 (6.223 - 8.061)	1.0
RR	$y = 6.164 2x - 7.061 9$	0.978 9	90.53 (85.095 - 95.019)	12.57
SR (SS♀×RR♂)	$y = 3.634 2x - 1.715 6$	0.964 8	70.46 (63.448 - 76.465)	9.79
RS (RR♀×SS♂)	$y = 4.477 6x - 2.839 7$	0.982 2	56.34 (51.954 - 60.155)	7.83
BC(SR♀×SS♂)	$y = 3.236 5x + 0.170 9$	0.981 8	31.05 (27.465 - 34.173)	4.31
BC(RS♀×RR♂)	$y = 3.703 7x - 1.138 7$	0.968 2	45.44 (40.996 - 49.288)	6.31

2.2 显性度测定结果

根据 Falconer 公式计算得出杂交 F_1 代的显性度 D 值, 即 $D_{SR}=0.625$, $D_{RS}=0.802$, 二者均在 $0 < D < 1$ 范围内, 说明截形叶螨对阿维·哒

螨灵的抗性基因为不完全显性遗传。图 1 显示出 F_1 代 SR 和 RS 品系的 LC-P 线介于敏感品系和抗性品系之间, 并且偏向抗性品系, 进一步证实了抗性是由不完全显性基因控制。

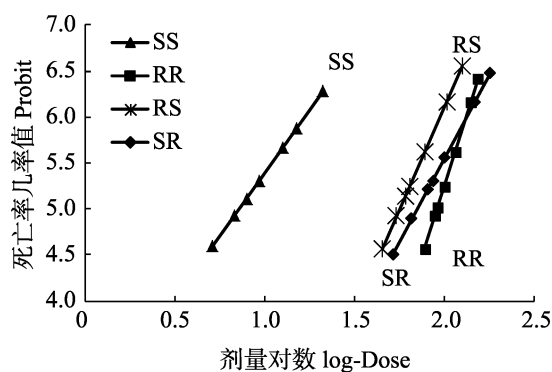


图 1 截形叶螨亲代 SS, 抗阿维·哒螨灵 RR 和杂交 F₁ 代 RS 和 SR 的剂量反应曲线

Fig. 1 LD-P lines of SS, RR and hybridization F₁ in *Tetranychus truncatus*

2.3 细胞质影响确定

根据显性度方差公式计算得出 $Var(D_{RS})=0.0116$, $Var(D_{SR})=0.0161$, 差异较小, 又根据 $SE=\sqrt{Var(D)}$, 可得 $SE_{SR}=\sqrt{0.0161}=0.127$, $SE_{RS}=\sqrt{0.0116}=0.107$ 。因为 D 值的 95% 置信限为 $D\pm 2SE$, 故 $D_{SR}\pm 2SE=[0.34, 0.62]$, $D_{RS}\pm 2SE=[0.51, 0.76]$, D_{RS} 和 D_{SR} 两 D 值的 95% 置信限有重叠部分, 表明杂交 F₁ 的 RS 和 SR 两品系差异不显著。进一步根据 t 测验结果显示: $t=1.061 < t_{0.05,4}=2.776$, 差异不显著, 表明截形叶螨对阿维·哒螨灵药剂的抗性遗传受母体效应的影响不大, 其抗性基因在常染色体上。

2.4 单基因或多基因遗传的确定

由图 2 和图 3 可以看出, 回交 F₂ 代的实际剂量-反应曲线 (BC) LD-P 死亡率在 50% 即几率值 5 处并无平坡出现; 实测的 LD-P 线与期望剂量-反应曲线 (BC-E) 的 LD-P 曲线差异较大, 因此可以初步断定截形叶螨两个抗性种群的抗性遗传是由多基因控制。

进行卡方 (χ^2) 适合性测验, 得到阿维·哒螨灵 RS $\times$ RR $\sum \chi^2 BC_1=60.6 > \chi^2_{0.05,9}=16.92$, SR $\times$ SS $\sum \chi^2 BC_2=79.27 > \chi^2_{0.05,9}=16.92$, 即 χ^2 检验符合多基因假设, 进一步证实了截形叶螨对阿维·哒螨灵的抗性遗传方式为多基因控制, 且为不完全显性。

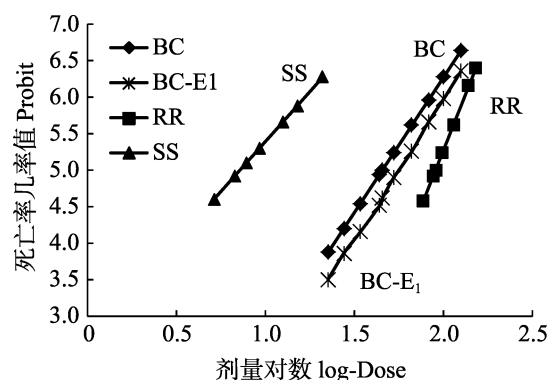


图 2 截形叶螨回交后代 BC₁(SR♀ $\times$ S♂) 实际剂量反应曲线, BC-E₁ 期望剂量反应曲线

Fig. 2 LD-P lines of Actual mortality (BC₁) and expected mortality (BC-E₁) for backcross BC_{1RS} of *Tetranychus truncatus*

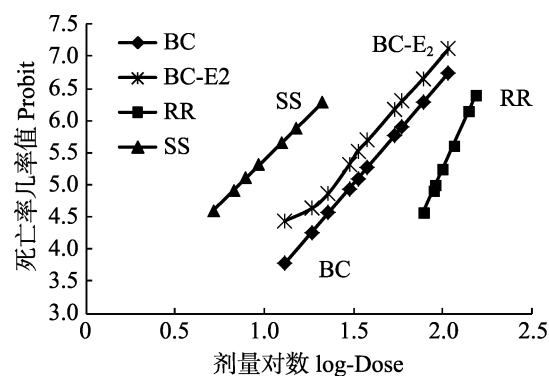


图 3 截形叶螨回交后代 BC₂(SR♀ $\times$ S♂) 实际剂量反应曲线, BC-E₂ 期望剂量反应曲线

Fig. 3 LD-P lines of Actual mortality (BC₂) and expected mortality (BC-E₂) for backcross BC_{1SR} of *Tetranychus truncatus*

3 结论与讨论

抗性遗传方式是选择抗性治理策略及了解抗性动态的基础。目前, 国内外关于叶螨对于许多杀虫杀螨剂的抗性遗传方式的研究, 多集中于二斑叶螨 *T. urticae* 和朱砂叶螨。如二斑叶螨对于 METI 抑制剂 (唑螨酯、哒螨灵、吡螨胺) 的抗性是显性或半显性遗传且不存在母系影响 (Van Pottelberge *et al.*, 2009), 还有一些常用杀虫杀螨剂如: 溴虫腈、四螨嗪、阿维菌素、甲氰菊酯和丁氟螨酯等药剂的抗性遗传方式也相继在二斑叶螨和朱砂叶螨中被报道 (Uesugi *et al.*, 2002; 何林等, 2005; He *et al.*, 2009; Ay and Kara, 2014; Ferreira *et al.*, 2015)。但对截形叶螨抗性遗传方式研究相应较少, 而同一杀虫剂的抗性遗

传方式在不同叶螨种群间存在差异,这在前期研究中已得到证实(刘芹轩和武予清,1994),也反映了抗性机理的复杂性,因此应进一步从分子角度研究抗性基因的表达产物和调控机制,从而为合理有效地制定害螨的抗性治理策略提供一定的理论依据。

哒螨灵是线粒体电子传递抑制剂(METI),主要抑制辅酶 Q_0 处电子传递(柏亚罗,2005)。阿维菌素是一种神经毒剂,其机理是作用于昆虫神经元突触或神经肌肉突触的GABAA受体,干扰昆虫体内神经末梢的信息传递(万玥和陆皞然,2017)。两种药剂的作用机制完全不同,杀螨高效,但长期单独使用容易引起抗性,因此阿维·哒螨灵药剂应时而生,因结合二种单剂的优点,现在大田应用较为广泛。但本研究结果显示,截形叶螨对阿维·哒螨灵的抗性遗传方式为不完全显性遗传,且为多基因控制。此种遗传方式理论上更有利于抗性的发展,且昆虫的抗性若为单因子遗传,则其抗性谱较窄,多基因控制在抗性发展前期阶段演化较慢,但产生的抗谱很宽,抗性一旦产生则很难延缓其抗性的迅速发展。鉴于此,针对截形叶螨对阿维·哒螨灵的抗性问题,采用预防性抗性治理策略尤为重要。建议在对此药剂无明显抗性的玉米地或其他作物田中,应限制药剂使用次数,并与完全不同作用机制的药剂轮用,以延缓截形叶螨的抗性演化,保持该药剂在截形叶螨防治过程中的有效性。

参考文献 (References)

- Ay R, Kara FE, 2014. Toxicity, inheritance and biochemistry of clofentezine resistance in *Tetranychus urticae*. *Insect Science*, 18(10): 503–511.
- Bai YL, 2005. The various mechanism of acaricides. *Modern Agrochemicals*, 4(3): 27–30. [柏亚罗, 2005. 具有不同作用机理的杀螨剂. 现代农药, 4(3): 27–30.]
- FAO, 1980. Revised method for spider mites and their eggs (e. g. *Tetranychus* spp. and *Panonychus ulmi* Koch). *FAO Plant Production and Protection*, 21: 49–54.
- Ferreira CBS, Andrade FHN, Rodrigues ARS, Siqueira HAA, Gondim MGC, 2015. Resistance in field populations of *Tetranychus urticae* to acaricides and characterization of the inheritance of abamectin resistance. *Crop Protection*, 67(1): 77–83.
- Georgiou GP, Garber MJ, 1965. Studies on the inheritance of carbamate-resistance in the housefly (*Musca domestica*). *Bulletin of the World Health Organization*, 32(2): 181.
- He L, Gao X, Wang J, Zhao Z, Liu N, 2009. Genetic analysis of abamectin resistance in *Tetranychus cinnabarinus*. *Pesticide Biochemistry & Physiology*, 95(3): 147–151.
- He L, Zhao ZM, Cao XF, Deng XP, Wang JJ, 2005. Resistance selection of *Tetranychus cinnabarinus* to fenpropathrin and genetic analysis. *Scientia Agricultura Sinica*, 38(4): 719–724. [何林, 赵志模, 曹小芳, 邓新平, 王进军, 2005. 朱砂叶螨抗甲氰菊酯品系选育及遗传分析. 中国农业科学, 38(4): 719–724.]
- He SW, Zhang JC, Wang ZH, Gao YM, 2017. The formula study of avermectin-pyridaben microemulsion. *Gansu Agricultural Science and Technology*, (12): 58–60. [何树文, 张建朝, 王泽浩, 高宜明, 2017. 不同药剂处理对制种玉米叶螨的防效. 甘肃农业科技, (12): 58–60.]
- Liu QX, Wu YQ, 1994. Review on inheritance of pesticide resistance in phytophagous spider mites. *Hereditas*, 16(5): 45–48. [刘芹轩, 武予清, 1994. 植食叶螨抗药性遗传学研究的进展. 遗传, 16(5): 45–48.]
- Preisler HK, Hoy MA, Robertson JL, 1990. Statistical analysis of modes of inheritance for pesticide resistance. *Journal of Economic Entomology*, 83 (5): 1649–1655.
- Song LW, Li MW, Shen HM, 2016. Selection for pyridaben, avermectin and abamectin+pyridaben resistance in *Tetranychus truncatus* Ehara. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 53(1): 89–94. [宋丽雯, 李妙雯, 沈慧敏, 2016. 截形叶螨对哒螨灵、阿维菌素和阿维·哒螨灵的抗性选育和抗性稳定性研究. 应用昆虫学报, 53(1): 89–94.]
- Stone BF, 1968. A formula for determining degree of dominance in cases of monofactorial inheritance of resistance to chemicals. *Bulletin of the World Health Organization*, 38(2): 325.
- Uesugi R, Goka K, Osakabe M, 2002. Genetic basis of resistances to chlorfenapyr and etoxazole in the two-spotted spider mite (Acari: Tetranychidae). *Journal of Economic Entomology*, 95(6): 1267–1274.
- Van Leeuwen T, Tirry L, Yamamoto A, Nauen R, Dermauw W, 2015. The economic importance of acaricides in the control of phytophagous mites and an update on recent acaricide mode of action research. *Pesticide Biochemistry & Physiology*, 121(6): 12–21.
- Van Pottelberge S, Van Leeuwen T, Nauen R, Tirry L, 2009. Resistance mechanisms to mitochondrial electron transport inhibitors in a field-collected strain of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Bulletin of Entomological Research*, 99(1): 23–31.
- Wang Y, Lu HR, 2017. Patent overview of avermectin structural modification. *Statistics & Analysis*, 14(5): 21–37. [万玥, 陆皞然, 2017. 基于阿维菌素结构衍生的专利技术综述. 中国发明与专利, 14(5): 21–37.]
- Wang ZH, Wu QJ, Xu BY, Zhang YJ, 2011. Laboratory selection and inheritance mode of resistance to spinosad in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 48(3): 553–558. [王泽华, 吴青君, 徐宝云, 张友军, 2011. 西花蓟马对多杀菌素的抗性汰选和遗传方式. 应用昆虫学报, 48(3): 553–558.]
- Zhao BS, Li JC, 2003. The study on avermectin+pyridaben microemulsion. *Jiangsu Chemical Industry*, 21(2): 44–46. [赵宝顺, 李嘉诚, 2003. 阿维菌素-哒螨灵微乳剂的研究. 江苏化工, 21(2): 44–46.]