

海南普通大蓟马对拟除虫菊酯药剂抗性监测及钠通道突变检测

袁琳琳, 潘雪莲, 陆容材, 陈龙威, 席羽, 吴少英*

(海南大学三亚南繁研究院, 三亚 572025)

摘要 普通大蓟马 *Megalurothrips usitatus* 在海南省对豇豆造成严重危害且抗药性逐渐增强。本研究测定了2019年至2021年海南省普通大蓟马对氯菊酯和甲氰菊酯的抗性。结果表明,海口、乐东和三亚3个地理种群对甲氰菊酯处于极高水平抗性,对氯菊酯处于高水平抗性,且抗性逐年增强。对普通大蓟马钠离子通道序列分析发现存在M283R突变,该突变位于钠离子通道同源结构域I。突变频率检测显示,2019年至2021年连续3年海口种群该突变位点的突变频率分别为1/30、1/30、3/30,有升高趋势。本研究发现海南省普通大蓟马从2019年到2021年对拟除虫菊酯类药剂的抗药性呈逐年上升趋势。

关键词 普通大蓟马; 钠离子通道; 突变; 拟除虫菊酯; 抗药性

中图分类号: S 433 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2022062

Detection of the resistance of *Megalurothrips usitatus* to pyrethroids and sodium channel mutation in Hainan

YUAN Linlin, PAN Xuelian, LU Rongcai, CHEN Longwei, XI Yu, WU Shaoying*

(Sanya Nanfan Research Institute of Hainan University, Sanya 572025, China)

Abstract *Megalurothrips usitatus* has caused serious damage to cowpeas in Hainan province and its resistance to insecticide is building up. This study investigated the resistance of *M. usitatus* to permethrin and fenpropathrin in Hainan province from 2019 to 2021. Haikou, Ledong and Sanya populations showed extremely high level of resistance to fenpropathrin and high level of resistance to permethrin, and the resistance enhanced year by year. The M283R mutation was found in the domain I of the sodium channel in *M. usitatus*. The frequencies of this mutation was 1/30, 1/30 and 3/30 in three Haikou populations collected from 2019 to 2021, respectively, with an increasing trend. In a word, this study found that the resistance of *M. usitatus* to pyrethroids in Hainan province enhanced year by year from 2019 to 2021.

Key words *Megalurothrips usitatus*; sodium channel; mutation; pyrethroids; insecticide resistance

豇豆是海南省主要的冬季蔬菜作物。据报道,海南省每年豇豆的种植面积可达2万 hm^2 左右^[1]。普通大蓟马 *Megalurothrips usitatus*, 也称豆大蓟马(蓟马科 Thripidae, 大蓟马属 *Megalurothrips*), 是海南省冬季瓜菜上的主要害虫。普通大蓟马主要通过取食、产卵造成直接危害,此外还可以通过传播植物病毒造成间接危害。直接危害主要是其利用锉吸式口器取食植物汁液,影响寄主植物的花、果实和生长点的生长,致使植物叶片卷曲皱缩,无法正常进

行光合作用,最终导致作物生长缓慢甚至停止生长。植物开花期受害最重,蓟马会在植物开花后迅速钻入花心为害,造成花蕊腐烂坏死甚至脱落^[2]。研究表明,普通大蓟马可以传播烟草线条病毒(tobacco streak virus, TSV)^[3-4]、花生芽坏死病毒(peanut bud necrosis virus, PBNV)^[5]等造成间接危害。普通大蓟马在海南省主要为害豇豆^[6],尤其在冬季蔬菜种植期间为害更为严重,对豇豆的品质和产量造成严重影响^[6-8]。

收稿日期: 2022-02-06

修订日期: 2022-02-20

基金项目: 海南省重点研发计划(ZDYF2021XDNY190);国家自然科学基金(31960539)

* 通信作者 E-mail: wsywsy6000@hainanu.edu.cn

海南省大面积种植豇豆供应冬季蔬菜的同时也给普通大蓟马营造了天然家园。伴随着杀虫剂的不断使用,在有效防治普通大蓟马的同时也致使其抗药性水平不断攀升,给田间防治带来了困难。2014年—2015年海南地区普通大蓟马对高效氯氰菊酯、甲氨基阿维菌素苯甲酸盐(甲维盐)、吡虫啉、乙基多杀菌素、阿维菌素和啉虫脒的抗性测定结果表明,三亚种群2014年对高效氯氰菊酯、甲维盐、吡虫啉,产生了低水平抗性,2015年对甲维盐、吡虫啉依然维持低水平抗性,同时又对乙基多杀菌素和啉虫脒产生了低水平抗性,对高效氯氰菊酯产生了中等水平抗性;澄迈种群2014年对甲维盐产生了低水平抗性,2015年对除甲维盐外的其他药剂仍然处于敏感状态;海口种群2014年和2015年对这6种药剂均处于敏感阶段^[9]。此外,研究者2014年测定了毒死蜱、阿维菌素、高效氯氰菊酯、甲维盐、吡虫啉和啉虫脒对海南省普通大蓟马的毒力,发现其中高效氯氰菊酯的 LC_{50} 为0.165 4 g/L^[8]。2017年三亚和澄迈的普通大蓟马种群对阿维菌素仍处于敏感状态,海口种群对高效氯氰菊酯、甲维盐、乙基多杀菌素、吡虫啉和啉虫脒等药剂产生了中等水平抗性^[10]。而到2019年,普通大蓟马海口种群对拟除虫菊酯类药剂的抗性倍数增加,其中高效氯氰菊酯的 LC_{50} 超过1 000 mg/L^[11]。

电压门控钠离子通道(voltage-gated sodium channel,以下简称钠离子通道)存在于脊椎动物和无脊椎动物的神经系统内,是神经细胞传递电信号的重要通道。钠离子通道是河豚毒素、蝎毒素和蟾蜍毒素等动物源神经毒素的作用靶标^[12],同时也是拟除虫菊酯类杀虫剂和滴滴涕的主要作用靶标^[13]。此外,钠离子通道阻断杀虫剂(sodium channel blocker insecticides, SCBI)也可以作用于昆虫钠离子通道^[14-15]。

哺乳动物钠离子通道的 α 亚基由多个基因编码,而绝大多数昆虫的神经钠离子通道由1个基因编码。目前为止仅发现赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 和蚜虫的钠离子通道由2个基因编码^[16]。昆虫钠离子通道含有1个大型糖基化 α 亚基和1个与哺乳动物 β 亚基功能相同的Tip E蛋白,该Tip E蛋白可以提高钠离子通道的表达水平,利于后续钠离子通道的功能验证^[17-20]。 α 亚基由N端、C端和中间的4个同源结构域(Domain I、II、III、IV)组

成。钠离子通道的中央孔洞由4个结构域围绕形成,每个同源结构域由6个跨膜螺旋片段组成(S1~S6),其中S5和S6间的跨膜片段形成P环(P-loop),而决定钠离子通道离子选择性的D(天冬氨酸)、E(谷氨酸)、K(赖氨酸)、A(丙氨酸)4个氨基酸残基分别存在于4个同源结构域的P环上^[21]。4个同源结构域和不同的跨膜螺旋片段之间通过多肽链相互连接。一般情况下,钠离子通道有静息态、激活态和失活态3种状态^[22]。昆虫钠离子通道的开放受膜电位控制,所以被称为电压门控离子通道。而钠离子通道的门控是指在电刺激下通过钠离子通道蛋白构象的改变开启或关闭通道^[16]。

拟除虫菊酯类杀虫剂(pyrethroids)是天然除虫菊素的衍生物,共分为两类,一类是不含 α 氰基的I型拟除虫菊酯类杀虫剂,如氯菊酯、联苯菊酯等;一类是含有 α 氰基的II型拟除虫菊酯类杀虫剂,如溴氰菊酯、甲氰菊酯等。相关研究表明,I型拟除虫菊酯类杀虫剂作用于神经钠离子通道导致轴突重复放电,致使突触前神经纤维处于重复兴奋状态,从而扰乱突触功能。而II型拟除虫菊酯类杀虫剂的作用机理与I型不同,不产生重复放电,而是抑制动作电位的产生,引起膜电位的去极化,从而扰乱突触功能^[23]。因此尽管I型和II型拟除虫菊酯类杀虫剂均作用于昆虫神经钠离子通道,但两者对钠离子通道的作用方式和产生毒力的机制完全不同^[23-25]。

击倒抗性(knockdown resistance, kdr)是昆虫对拟除虫菊酯类杀虫剂产生抗性的重要机制^[26]。相关药理学试验已经证实击倒抗性的机理是钠离子通道的结构变化引起杀虫剂结合位点发生改变,使钠离子通道对拟除虫菊酯类药剂的敏感性降低^[27]。研究证实,拟除虫菊酯类杀虫剂在昆虫钠离子通道上的结合位点有两个,分别为结合位置对称而结合方向相反的Domain II L45-Domain II S5-Domain II S6-Domain III S6和Domain I L45-Domain I S5-Domain I S6-Domain II S6^[17, 28]。在过去近20年的研究中,与击倒抗性有关的钠离子通道突变是研究者关注的重点,研究也表明击倒抗性与钠离子通道氨基酸的突变有着密不可分的关系^[16],因此,我们可以通过测定昆虫钠离子通道中与击倒抗性密切相关的某一个单突变或一对双突变的突变频率来评价昆虫对菊酯类杀虫剂的抗性现状。

本文旨在通过连续 3 年的抗药性水平测定来揭示海南省普通大蓟马对拟除虫菊酯类药剂的抗性发展趋势,并通过普通大蓟马神经钠离子通道的克隆及突变位点分析来进行分子水平的鉴定,监测普通大蓟马对拟除虫菊酯药剂的抗性变化,为田间合理使用杀虫剂提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

2019 年至 2021 年在海南省海口市美兰区(东经 110.3°E,北纬 20.1°N)、乐东黎族自治县利国镇(东经 109.1°E,北纬 18.5°N)和三亚市崖城镇(东经 109.2°E,北纬 18.4°N)采集普通大蓟马田间种群,包括:海口种群(HK2019、HK2020、HK2021)、乐东种群(LD2019、LD2020、LD2021)和三亚种群(SY2019、SY2020、SY2021)。相对敏感品系(S)由海南大学植物保护学院范咏梅教授 2018 年馈赠,在实验室内使用未施用任何农药的豇豆‘夏宝 2 号’(广东省兴宁市兴研种子店),在光照培养箱(RXZ-380 BM,宁波扬辉仪器有限公司)中饲养,饲养条件为:温度(25±1)℃,相对湿度(70±5)%,光周期 L//D=16 h//8 h。将清洗干净并晾干的豇豆切成 8~10 cm 长的两端切口为实心、无孔洞的豇豆段,将豇豆段放入底部有吸水纸且瓶盖上有气孔的 500 mL 玻璃瓶中饲养。

1.2 生物测定

95%甲氰菊酯原药(TC)和 97%氯菊酯原药(TC)购自北京颖泰嘉和有限公司。本研究使用的生物测定方法是在 TIBS(thrips insecticide bioassay system)法^[29]的基础上改进的叶管药膜法^[30]改良而来。首先根据预试验结果,用 0.1 mg/L 的 Triton X-100(美国 Sigma)将原药稀释成不同浓度。取不同稀释浓度的药液浸满 2 mL 离心管,3 h 后倒出药液,晾干备用。每个浓度 3 个重复。将无农药的豇

豆切成 1.5 cm 长的两端切口为实心、无孔洞的豇豆段,在不同浓度的药液中浸泡 15 s 后放在滤纸上晾干备用。以 0.1 mg/L 的 Triton X-100 处理的离心管和豇豆段作为空白对照。每个晾干的离心管中接入 30 头普通大蓟马成虫,并放入对应浓度处理的豇豆段,饲养条件同上。于处理后 48 h 统计普通大蓟马的死亡率。使用 Polo Plus 2.00 软件计算不同种群不同药剂的半致死浓度(LC₅₀,95%置信区间),计算抗性倍数,并根据 2020 年全国农业有害生物抗性监测结果及科学用药建议的相关标准^[31]进行抗性水平等级划分,按抗性倍数(RR)由高到低划分为:高水平抗性(RR>100.0)、中等水平抗性(10.0<RR≤100.0)、低水平抗性(5.0<RR≤10.0)、相对敏感(RR≤5.0)。

1.3 构建重组质粒

利用 TRIzol[®] Reagent(美国 Ambion)提取普通大蓟马成虫总 RNA,并用 PrimeScript[™] II 1st Strand cDNA Synthesis Kit(日本 TaKaRa)将 RNA 反转录为 cDNA。设计扩增普通大蓟马钠离子通道全长的引物 Mu-5 (F)/Mu-3 (R)(表 1),引物由生物工程(上海)股份有限公司合成。利用 Mu-5 (F)/Mu-3 (R)及 Phanta[®] Max Super-Fidelity DNA Polymerase(南京诺唯赞)扩增钠离子通道全长片段,获得的 PCR 产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测,使用 Cycle Pure Kit(美国 OMEGA)对扩增产物进行回收纯化。使用 Clone Express[®] II One Step Cloning Kit(南京诺唯赞)将回收产物连接到表达载体 PGH19 上获得重组质粒。重组质粒转入 XL-10-gold 感受态细胞(北京博迈德),在含 10 mg/mL 氨苄卡钠霉素的 LA 固体培养基上培养,待长出单克隆后通过饱和酚(北京索莱宝)进行阳性克隆的快速检测筛选。具体筛选方法为:50 μL 单克隆菌液与 50 μL 饱和酚以及 10 μL 的 6×loading buffer 振荡混合均匀,在 4℃条件下 12 000 r/min 离心 10 min,

表 1 普通大蓟马钠离子通道全长片段克隆及突变频率检测引物

Table 1 Primers for the full-length amplification and mutation frequency detection of sodium channels in <i>Megalurothrips usitatus</i>		
引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence	用途 Purpose
Mu-5(F)	TTGGCAGTCAATTCCCGGGGCCACCATGCCGAGTGTCGGGAGTCG	钠离子通道全长
Mu-3(R)	AGTCGTAACCCAGATCAAGCTTTCAGACATCCGCAAGGGCCGGAG	
Domain I-5(F)	ATCCTTGTCACCCGCTCTTCT	Domain I 区域突变频率检测
Domain I-3(R)	GATGGCGAGAATCAAATTGA	

取 25 μ L 上清液进行 1.0% 的凝胶电泳检测,条带长度正确的菌落即为阳性克隆。将筛选出的阳性克隆进行菌液培养,利用 Plasmid DNA Mini Kit(美国 OMEGA)提取重组质粒,并使用限制性内切酶 *Hind* III-HF(北京 NEB)进行酶切,验证质粒的正确性。最终获得的含全长钠离子通道的阳性质粒送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.4 基因突变频率检测

检测海口 HK2019、HK2020 和 HK2021 种群突变位点的突变频率。利用溶液型中/大量细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒(北京百泰克)提取单头普通大蓟马成虫的基因组 DNA。根据突变位点所在同源结构域 Domain I 设计引物 Domain I-5 (F)/Domain I-3 (R)[引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,表 1]。利用 Rapid Taq Master Mix(南京诺唯赞)扩增目的片段,反应体系及反应程序参照试剂盒说明书。PCR 扩增产物经过 Cycle Pure Kit(美国 OMEGA)回收纯化后使用 5 min TA/Blunt-Zero Cloning Kit(南京诺唯赞)连接到 T 载体获得重组质粒,重组质粒转入 Stbl-2 感受态细

胞(上海唯地)中,使用含 10 mg/mL 氨苄卡钠霉素的 LA 液体培养基进行培养。菌液 PCR 筛选出阳性克隆后提取重组质粒,送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。每组样本各检测 30 头,计算突变频率。突变频率=每组含突变位点总样本数/每组检测总样本数 $\times$ 100%。

2 结果与分析

2.1 普通大蓟马抗药性检测结果

本研究测定了甲氰菊酯和氯菊酯两种拟除虫菊酯类药剂对相对敏感品系以及 9 个田间种群的毒力(表 2)。结果表明,对室内相对敏感品系,氯菊酯的 LC_{50} 为 1.4 mg/L,甲氰菊酯的 LC_{50} 为 1.9 mg/L。对田间种群,从 2019 年至 2021 年,海口、乐东和三亚种群对甲氰菊酯和氯菊酯的抗性均表现出不断增强的趋势,其中海口种群对氯菊酯的抗性 3 年间从 194.3 倍增加到 241.2 倍,一直处于高水平抗性;对甲氰菊酯的抗性处于超高水平,最高达 1 426.5 倍(HK2021);乐东种群,对氯菊酯的抗性 3 年来一直处于高水平,3 年抗性倍数从 204.8 倍增加到 314.3 倍,对甲氰菊酯的抗性 2021 年已达到 2 189.9 倍

表 2 普通大蓟马对氯菊酯和甲氰菊酯的抗性水平
Table 2 Resistance levels of *Megalurothrips usitatus* to permethrin and fenpropathrin

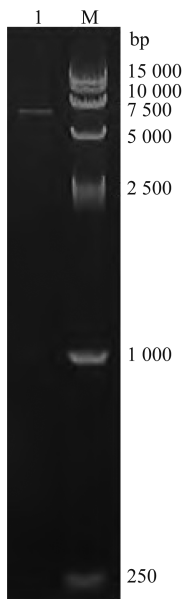
药剂 Insecticide	种群 Population	供试虫数/头 Number of insects tested	斜率 $\pm$ SE Slope $\pm$ SE	自由度 Degree of freedom	卡方 Chi-square	LC_{50} (95 %置信区间)/mg $\cdot$ L $^{-1}$ LC_{50} (95% confidence interval)	抗性倍数/倍 Resistance ratio
氯菊酯 permethrin	敏感种群(S)	480	1.3 $\pm$ 0.202	22	25.6	1.4 (0.968~1.8)	1.0
	HK2019	376	1.3 $\pm$ 0.107	16	30.2	268.4 (233.9~312.7)	194.3
	HK2020	376	1.3 $\pm$ 0.110	16	44.9	278.9 (243.1~325.0)	202.0
	HK2021	376	1.3 $\pm$ 0.104	16	49.1	333.0 (286.5~395.4)	241.2
	LD2019	420	1.3 $\pm$ 0.109	19	32.8	282.9 (246.1~330.5)	204.8
	LD2020	383	1.2 $\pm$ 0.106	16	45.9	300.4 (258.2~356.5)	217.5
	LD2021	420	1.1 $\pm$ 0.100	19	55.7	434.0 (359.6~544.5)	314.3
	SY2019	480	1.3 $\pm$ 0.107	22	47.7	320.5 (274.2~382.8)	232.1
	SY2020	376	0.775 $\pm$ 0.094	16	27.3	445.2 (304.6~725.9)	322.4
甲氰菊酯 fenpropathrin	敏感种群(S)	380	0.859 $\pm$ 0.094	16	23.2	534.2 (377.0~834.5)	386.9
	HK2019	480	3.5 $\pm$ 0.329	22	24.5	1.9 (1.6~2.5)	1.0
	HK2021	420	1.1 $\pm$ 0.126	19	25.5	1 551.1 (1 208.5~2 068.1)	833.0
	HK2020	480	1.4 $\pm$ 0.131	22	22.0	2 146.2 (1 740.1~2 697.8)	1 152.6
	HK2021	380	1.1 $\pm$ 0.192	16	25.5	2 656.2 (1 810.5~5 312.3)	1 426.5
	LD2019	420	1.6 $\pm$ 0.184	19	39.5	2 185.7 (1 406.4~2 992.2)	1 173.8
	LD2020	425	4.7 $\pm$ 0.719	19	38.7	3 610.7 (2 231.6~4 515.3)	1 939.2
	LD2021	386	0.617 $\pm$ 0.148	16	36.1	4 077.6 (3 102.8~31 379.5)	2 189.9
	SY2019	380	5.1 $\pm$ 0.721	16	28.9	3 938.4 (3 258.4~5 400.8)	2 115.2
	SY2020	360	6.0 $\pm$ 0.810	16	28.7	5 016.0 (4 376.8~6 460.6)	2 693.9
	SY2021	364	0.765 $\pm$ 0.164	16	23.3	5 786.2 (2 747.7~42 204.4)	3 107.5

(LD2021),为超高水平抗性;三亚种群,对氯菊酯的抗性一直处于高水平,且3年内抗性倍数从232.1倍增加到386.9倍,对甲氰菊酯的抗性也处于超高水平,且至2021年抗性倍数达到了3107.5倍(SY2021)。研究结果表明,海口(HK)、乐东(LD)和三亚(SY)普通大蓟马种群中,三亚种群对拟除虫菊酯类药剂的抗性水平最高,乐东次之,海口种群的抗性水平最低但也呈高水平抗性,并且3地的抗性均呈现逐年上升的趋势。

2.2 普通大蓟马钠离子通道克隆及突变位点分析

2.2.1 钠离子通道全长基因的克隆

普通大蓟马钠离子通道基因全长6282 bp(图1),编码2094个氨基酸,其全长氨基酸序列已上传NCBI GenBank数据库并获得序列号MZ043856。获得普通大蓟马钠离子通道的基因全长后,根据其基本结构和氨基酸序列信息,使用SWISS-MODEL网站(<https://swissmodel.expasy.org/>)构建了普通大蓟马钠离子通道的3D模拟图(图2)。



M: DL15000 DNA 分子量标准; 1: 普通大蓟马钠离子通道全长基因。
M: DL15000 DNA marker; 1: Full-length sodium channel gene of *Megalurothrips usitatus*.

图1 普通大蓟马钠离子通道全长基因琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of full-length sodium channel gene of *Megalurothrips usitatus*

2.2.2 普通大蓟马钠离子通道蛋白突变位点分析

将海口HK2019种群与敏感品系钠离子通道氨基酸序列进行比对,结果显示HK2019的钠离子通

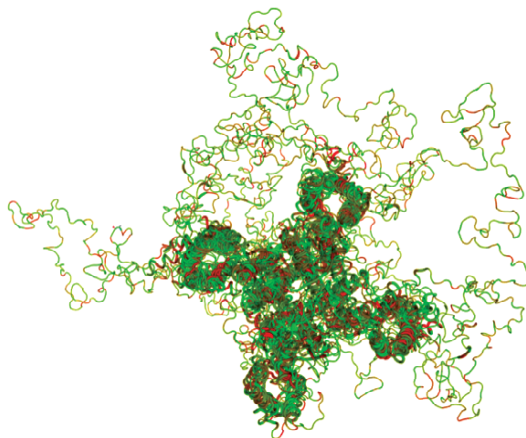


图2 普通大蓟马钠离子通道3D模拟图

Fig. 2 3D model of *Megalurothrips usitatus* sodium channel

道在Domain I区域S5位置上的第283个氨基酸的第二位核苷酸发生了突变,ATG变为AGG,使蛋氨酸(M)突变为精氨酸(R)(图3a),且M283R突变位点出现在拟除虫菊酯类药剂的结合区域Domain I-S5(图3b)。

2.2.3 普通大蓟马钠离子通道蛋白M283R突变位点的突变频率

本研究主要检测了普通大蓟马海口种群钠离子通道蛋白突变位点M283R的突变频率。对HK2019、HK2020、HK2021共3个种群中各30头单头虫体样本的Domain I阳性克隆进行测序和序列分析显示,普通大蓟马钠离子通道Domain I基因长840 bp(图4),编码280个氨基酸。HK2019、HK2020、HK2021种群各30头样本中产生突变的分别有1、1头和3头,M283R的突变频率分别为1/30、1/30和3/30,即3.3%、3.3%和10.0%(表3)。

3 结论与讨论

蓟马类害虫的为害方式主要是通过锉吸式口器吸食植物细胞汁液,导致植物光合能力降低^[32],而高温高湿的环境会加重这种损害^[33]。海南湿热的环境导致普通大蓟马的发生越发严重^[10]。当地农户使用化学杀虫剂来控制普通大蓟马的种群数量,导致其抗药性不断攀升。

近几年,海南省普通大蓟马对拟除虫菊酯类药剂的抗性水平测定结果显示,三亚种群对高效氯氰菊酯已经产生了中等水平抗性(17.06倍)^[10]。在我

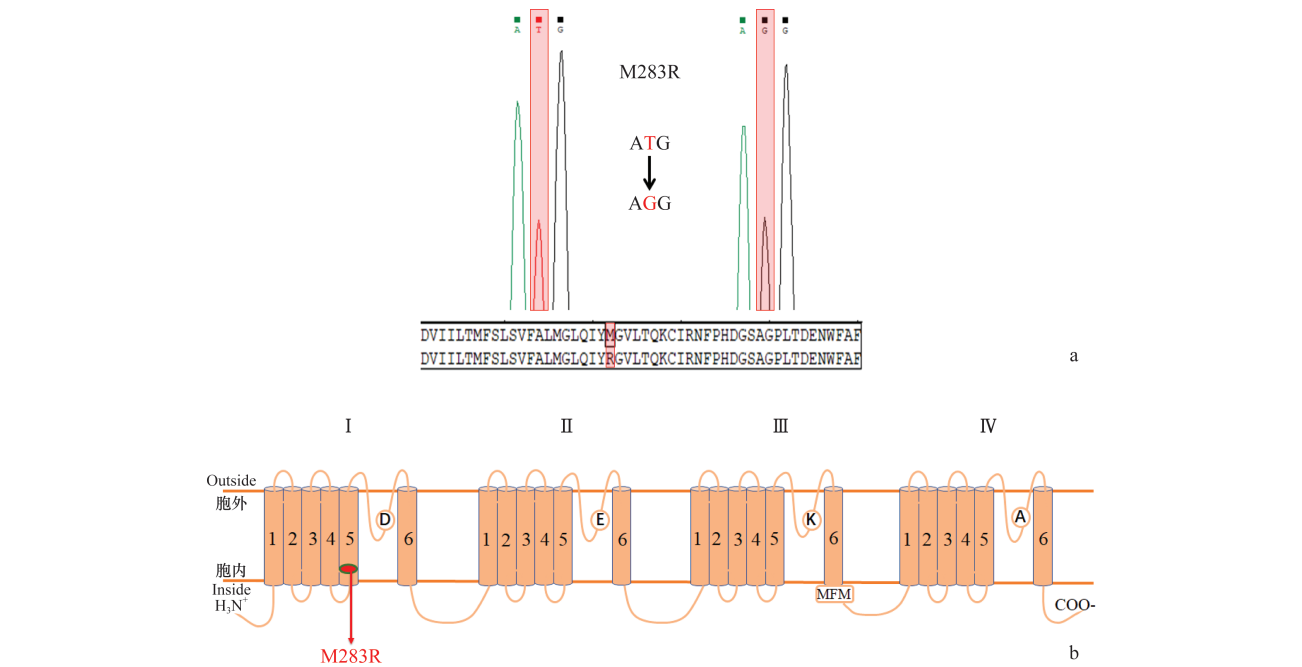


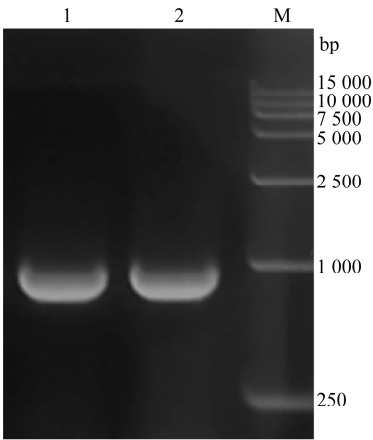
图 3 普通大蓟马钠离子通道 M283R 突变位点核苷酸峰值变化和氨基酸变化(a)及拓扑结构图(b)

Fig. 3 Nucleotide and amino acid changes at the M283R mutation site of *Megalurothrips usitatus* sodium channel (a) and topology structure (b)

表 3 普通大蓟马 M283R 突变位点突变频率

Table 3 Mutation frequencies of *Megalurothrips usitatus* M283R mutation site

种群 Population	年份 Year	核苷酸改变 Nucleotide alteration	突变 Mutation	突变位置 Mutation position	总样本量/头 Total sample size	突变样本/头 Number of mutated samples	突变频率/% Mutation frequency
HK2019	2019	T-G	M283R	Domain I-S5	30	1	3.3
HK2020	2020	T-G	M283R	Domain I-S5	30	1	3.3
HK2021	2021	T-G	M283R	Domain I-S5	30	3	10.0



M: DL15000 DNA 分子量标准; 1~2:普通大蓟马钠离子通道 Domain I 基因。
M: DL15000 DNA marker; 1 and 2: Sodium channel Domain I gene of *Megalurothrips usitatus*.

图 4 普通大蓟马钠离子通道 Domain I 基因
琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis image of sodium channel Domain I gene of *Megalurothrips usitatus*

们最新的研究结果中,海南省海口、乐东、三亚 3 个野外地种群对高效氯氟氰菊酯(414~1 128 倍)和溴氰菊酯(161~352 倍)表现出较高水平的抗性(尚未发表)。本研究的生物测定结果表明,2019 年至 2021 年 3 年内,海口、乐东、三亚的普通大蓟马种群对氯菊酯和甲氰菊酯均产生了高水平或极高水平的抗性,且抗性水平呈逐年上升趋势。并且三亚种群的抗药性在 3 个地理种群中最高,乐东种群较海口种群稍高。突变位点检测结果显示,本研究 3 个田间抗性种群中均发现有 M283R 突变位点存在,因该突变位点最先在海口种群 HK2019 中被发现,所以本文仅以 HK2019 为例进行钠离子通道的全长克隆及序列分析,并连续 3 年对海口种群(HK2019、HK2020 及 HK2021)发生该突变的频率进行检测。海口种群 M283R 突变位点 3 年的突变频率分别为 3.3%、3.3%和 10.0%,由不同种群抗性水平高低及发展趋势推测,乐东和三亚种群中 M283R 的突变

频率极有可能高于海口种群,甚至可能远远高于10%,实际突变频率是否真如推测所言,仍需大量分子试验的验证。

害虫产生抗药性的机制主要有3个方面,分别为解毒酶代谢增强^[34]、靶位点敏感性降低^[35]以及表皮穿透性降低^[36]。拟除虫菊酯类药剂是一种高效低毒的神经毒剂,几十年来一直被用于害虫防治。相关遗传学研究表明,普通大蓟马对氯氰菊酯等菊酯类杀虫剂产生抗药性可能与钠通道的突变有关^[37]。近几年,钠离子通道 Domain II 和 Domain III 的突变位点在许多昆虫中也相继被报道^[38]。在拟除虫菊酯长期的选择压力下,已经在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 中发现了 I260T 突变位点和 I265N 突变位点^[39],昆虫 Domain I 突变也与其对拟除虫菊酯抗性相关。

在蓟马类昆虫中已经报道了与拟除虫菊酯类药剂抗性相关的突变位点,例如在烟蓟马 *Thrips tabaci* 中已经确定了4个与拟除虫菊酯抗性相关的突变,包括两对氨基酸双突变 M918T/L1014F 和 M918L/V1010A^[40],并在日本烟蓟马钠离子通道中发现了与拟除虫菊酯抗性密切相关的 T929I 和 K1774N 双突变,并首次发现了两个单氨基酸突变位点 T929I 和 M918L^[41-43]。而西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* 通过钠离子通道的 L1014F 和 T929C 单突变位点获得了抗药性^[44],棕榈蓟马 *Thrips palmi* 也通过 M843I、A1231D 和 T945I 单突变获得了对拟除虫菊酯杀虫剂的抗药性^[45]。

本研究从田间普通大蓟马种群钠离子通道的 Domain I 中检测到一个新的突变位点 M283R,且在检测的样本中该突变为纯合突变。本研究发现的突变位点与黑腹果蝇中的两个突变位点在位置上相近,也位于拟除虫菊酯类药剂结合位点上,因此推测该突变位点与普通大蓟马对拟除虫菊酯类药剂产生抗性相关,但有待通过爪蟾卵母细胞表达系统和双电极电压钳技术进行验证。

参考文献

[1] 唐良德,梁延坡,韩云,等. 海南豇豆蓟马发生为害调查及蓝板监测技术研究[J]. 中国植保导刊, 2015, 35(3): 53-57.

[2] HUNTER W B, ULLMAN D E. Precibarial and cibarial chemosensilla in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera; Thripidae) [J]. International Journal of Insect Morphology and Embryology, 1994, 23

(2): 69-83.

[3] RAO R D V J P, REDDY A S, REDDY S V, et al. The host range of tobacco streak virus in India and transmission by thrips [J]. Annals of Applied Biology, 2015, 142(3): 365-368.

[4] SHUKLA S, KALYANI G, KULKARNI N, et al. Mechanism of transmission of tobacco streak virus by *Scirtothrips dorsalis*, *Frankliniella schultzei* and *Megalurothrips usitatus* in groundnut, *Arachis hypogaea* L. [J]. Journal of Oilseeds Research, 2005, 22(1): 215-217.

[5] SREEKANTH M, SREERAMULU M, PRASADA R R, et al. Occurrence and distribution of thrips population and peanut bud necrosis virus (PBNV) incidence on greengram (*Vigna radiata* L. Wilczek) in Andhra Pradesh [J]. Resources Management in Plant Protection, 2002, 11: 116-120.

[6] 范咏梅,童晓立,高良举,等. 普通大蓟马在海南豇豆上的空间分布型[J]. 环境昆虫学报, 2013, 35(6): 737-743.

[7] 邱海燕,刘奎,李鹏,等. 豆大蓟马的生物学特性研究[J]. 热带作物学报, 2014, 35(12): 2437-2441.

[8] 刘奎,唐良德,李鹏,等. 几种杀虫剂对豆大蓟马的毒力测定及复配增效作用[J]. 热带作物学报, 2014, 35(8): 1615-1618.

[9] 唐良德,赵海燕,付步礼,等. 海南地区豆大蓟马田间种群的抗药性监测[J]. 环境昆虫学报, 2016, 38(5): 1032-1037.

[10] 唐良德,赵海燕,付步礼,等. 海南普通大蓟马抗药性监测及对6种杀虫剂的敏感性[J]. 环境昆虫学报, 2018, 40(5): 1175-1181.

[11] 潘雪莲,杨磊,金海峰,等. 豆大蓟马在海南发生及防治的研究进展[J]. 热带生物学报, 2021, 12(4): 508-513.

[12] CESTELE S, CATTERALL W A. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels [J]. Biochimie, 2000, 82(9/10): 883-892.

[13] NARAHASHI T. Molecular and cellular approaches to neurotoxicology: past, present and future [R]//Neurotox'88: molecular basis of drug and pesticide action. New York: Elsevier, 1988.

[14] SALGADO A J, COUTINHO O P, REIS R L, et al. *In vivo* response to starch-based scaffolds designed for bone tissue engineering applications [J]. Journal of Biomedical Materials Research part A, 2007, 80(4): 983-989.

[15] SILVER K S, SONG Weizhong, NOMURA Y, et al. Mechanism of action of sodium channel blocker insecticides (SCBIs) on insect sodium channels [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2010, 97(2): 87-92.

[16] 陈梦丽. 基于钠离子通道突变体的拟除虫菊酯杀虫剂抗性的机理研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2017.

[17] DU Yuzhe, NOMURA Y, SATAR G, et al. Molecular evidence for dual pyrethroid-receptor sites on a mosquito sodium channel [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(29): 11785-11790.

- [18] FENG Guo, DEAK P, KASBEKAR D P, et al. Cytogenetic and molecular localization of *tipE*: a gene affecting sodium channels in *Drosophila melanogaster* [J]. Genetics, 1995, 139 (4): 1679–1688.
- [19] LEE S H, YOON K S, WILLIAMSON M S, et al. Molecular analysis of *kdr*-like resistance in permethrin resistant strains of head lice, *Pediculus capitis* [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2000, 66(2): 130–143.
- [20] WARMKE J W, REENAN R A G, WANG Peiyi, et al. Functional expression of *Drosophila para* sodium channels modulation by the membrane protein TipE and toxin pharmacology [J]. General Physiology and Biophysics, 1997, 110(2): 119–133.
- [21] DONG Ke, DU Yuzhe, RINKEVICH F, et al. Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2014, 50(1): 1–17.
- [22] 高希武. 害虫抗药性分子机制与治理策略[M]. 北京: 中国农业出版社, 2012.
- [23] LUND A E, NARAHASHI T. Interaction of DDT with sodium channels in squid giant axon membranes [J]. Neuroscience, 1981, 6(11): 2253–2258.
- [24] NARAHASHI T. Nerve membrane ionic channels as the target of toxicants [J]. Archives of Toxicology, 1986, 9(6): 3–13.
- [25] GAMMON D W, BROWN M A, CASIDA J E. Two classes of pyrethroid action in the cockroach [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 1981, 15(2): 181–191.
- [26] SODERLUND D M. Molecular mechanisms of insecticides resistance [M]// Pesticide Resistance in Arthropods. Boston, USA: Springer, 1990.
- [27] SALGADO V L, IRVING S N, MILLER T A. The importance of nerve terminal depolarization in pyrethroid poisoning of insects [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 1983, 20 (2): 169–182.
- [28] DU Yuzhe, NOMURA Y, ZHOROV B S, et al. Rotational symmetry of two pyrethroid receptor sites in the mosquito sodium channel [J]. Molecular Pharmacology, 2015, 88(2): 273–280.
- [29] RUEDA A, SHELTON A M. Development of a bioassay system for monitoring susceptibility in *Thrips tabaci* [J]. Pest Management Science, 2003, 59(5): 553–558.
- [30] 王泽华, 侯文杰, 郝晨彦, 等. 北京地区西花蓟马田间种群的抗药性监测[J]. 应用昆虫学报, 2011, 48(3): 542–547.
- [31] 张帅. 2020 年全国农业有害生物抗药性监测结果及科学用药建议[J]. 中国植保导刊, 2021, 41(2): 71–78.
- [32] SHIPP J L, WANG K, BINNS M R. Economic injury levels for western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae) on greenhouse cucumber [J]. Journal of Economic Entomology, 2000, 93(6): 1732–1740.
- [33] HUAN Zhibo, XU Zhi, LUO Jinhui, et al. Monitoring and exposure assessment of pesticide residues in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) from five provinces of southern China [J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2016, 81: 260–267.
- [34] BROADBENT A B, PREE D J. Resistance to insecticides in populations of *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) from greenhouses in the Niagara Region of Ontario [J]. Canadian Entomologist, 1997, 129 (5): 907–913.
- [35] SODERLUND D M, KNIPPLE D C. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology Education, 2003, 33 (6): 563–577.
- [36] 付步礼, 曾东强, 刘奎, 等. 蓟马类害虫抗药性研究进展[J]. 农学报, 2014, 4(3): 28–34.
- [37] GHOSH A, JAGDALE S S, BASAVARAJ, et al. Genetics of *Thrips palmi* (Thysanoptera: Thripidae) [J]. Journal of Pest Science, 2020, 93(1): 27–39.
- [38] 吴少英, 段文波, 李芬, 等. 昆虫钠离子通道的研究进展[J]. 昆虫学报, 2021, 64(7): 862–874.
- [39] GAO Rong, DU Yuzhe, WANG Lingxin, et al. Sequence variations at I260 and A1731 contribute to persistent currents in *Drosophila* sodium channels [J]. Neuroscience, 2014, 268: 297–308.
- [40] RINKEVICH F D, DU Yuzhe, TOLINSKI J, et al. Distinct roles of the DmNav and DSC1 channels in the action of DDT and pyrethroids [J]. NeuroToxicology, 2015, 47: 99–106.
- [41] JOURAKU A, KUWAZAKI S, IIDA H, et al. T929I and K1774N mutation pair and M918L single mutation identified in the voltage-gated sodium channel gene of pyrethroid-resistant *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae) in Japan [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2019, 158: 77–87.
- [42] WU Meixiang, GOTOH H, WATERS T, et al. Identification of an alternative knockdown resistance (*kdr*)-like mutation, M918L, and a novel mutation, V1010A, in the *Thrips tabaci* voltage-gated sodium channel gene [J]. Pest Management Science, 2014, 70(6): 977–981.
- [43] AIZAWA M, WATANABE T, KUMANO A, et al. Cypermethrin resistance and reproductive types in onion thrips, *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae) [J]. Pest Management Science, 2016, 41(4): 167–170.
- [44] FORCIOLI D, FREY B, FREY J E. High nucleotide diversity in the para-like voltage-sensitive sodium channel gene sequence in the western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae) [J]. Journal of Economic Entomology, 2002, 95(4): 838–848.
- [45] BAO Wenxue, SONODA S. Resistance to cypermethrin in melon thrips, *Thrips palmi* (Thysanoptera: Thripidae): is conferred by reduced sensitivity of the sodium channel and CYP450-mediated detoxification [J]. Applied Entomology & Zoology, 2012, 47(4): 443–448.