

二斑叶螨对阿维菌素不同抗性水平与解毒酶的关系分析

郝桂锋^{1,2,3}, 刘 迎^{2,3}, 伍春玲^{2,3}, 安兴奎^{2,3}, 陈 青^{2,3*}, 梁 晓^{2,3*}

1. 海南大学热带农林学院, 海南海口 570228; 2. 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所/农业农村部热带作物有害生物综合治理重点实验室/海南省热带作物病虫害生物防治工程技术研究中心, 海南海口 571101; 3. 中国热带农业科学院三亚研究院/海南省南繁生物安全与分子育种重点实验室, 海南三亚 572000

摘 要: 二斑叶螨是世界危险性有害生物。阿维菌素是二斑叶螨防治中使用最为广泛的杀螨剂之一, 其不合理施用导致的抗药性问题日益严重。探究二斑叶螨对阿维菌素的抗性机理, 可为延长药剂的使用寿命及制定综合防控策略提供理论依据。为此, 本研究首先开展了阿维菌素对二斑叶螨田间种群、实验室筛选的抗性种群、敏感种群的生物测定, 发现 3 个种群的 24 h 致死中浓度(LC_{50})分别为 7.19、2061.43、0.10 $\mu\text{g/mL}$, 48 h 的 LC_{50} 分别为 6.32、1971.55、0.09 $\mu\text{g/mL}$ 。以敏感种群的 LC_{50} 为基准, 田间种群和实验室抗性种群的抗性倍数超过 70 倍和 20 000 倍, 分别属于中等水平抗性和高水平抗性。对 LC_{50} 处理下存活二斑叶螨的解毒酶活性分析表明, 抗性种群的谷胱甘肽-S-转移酶(GSTs)和尿苷二磷酸糖基转移酶(UGTs)的活性最高, 田间种群次之, 并均显著高于敏感种群的酶活性, 与用药前相比, 用药处理后高抗种群和田间中抗种群的酶活性均随着处理时间的延长而提高, 而敏感种群的酶活性显著被抑制。采用荧光定量 PCR 比较上述解毒酶的编码基因表达量差异, 发现用药处理后, *GSTm09*、*GSTd10* 和 *UGT204a2*、*UGT201d3* 基因在高抗种群和田间中抗种群的表达量显著高于敏感种群, 并随着处理时间的延长, 抗性种群和敏感种群的解毒酶基因表达的差异倍数进一步增大。相关性分析表明, 解毒酶活性及其编码基因表达与阿维菌素的抗性水平呈显著正相关。本研究结果为深入挖掘二斑叶螨抗性靶标基因和研发抗性治理策略提供理论参考。

关键词: 二斑叶螨; 阿维菌素; 抗药性; 解毒酶; 相关性分析

中图分类号: S433.1 文献标志码: A

Analysis of the Relationship Between Abamectin Resistance Levels and Detoxification Enzymes of *Tetranychus urticae*

HAO Guifeng^{1,2,3}, LIU Ying^{2,3}, WU Chunling^{2,3}, AN Xingkui^{2,3}, CHEN Qing^{2,3*}, LIANG Xiao^{2,3*}

1. School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. Environment and Plant Protection Institute, China Academy of Tropical Agricultural Sciences / Key Laboratory of Integrated Pest Management on Tropical Crops, Ministry of Agriculture and Rural Affairs / Hainan Engineering Research Center for Biological Control of Tropical Crops Diseases and Insect Pests, Haikou, Hainan 571101, China; 3. Sanya Research Academy, Chinese Academy of Tropical Agriculture Science / Hainan Key Laboratory for Biosafety Monitoring and Molecular Breeding in Off-Season Reproduction Regions, Sanya, Hainan 572000, China

Abstract: *Tetranychus urticae* is a dangerous agricultural pest worldwide. Abamectin is a widely used acaricide in the prevention and control of *T. urticae*. However, the resistance caused by inappropriate application of acaricide has become an increasing challenge. Exploring the resistant mechanisms of *T. urticae* against abamectin can provide the theoretical basis for prolonging lifespan and perform a comprehensive prevention and control strategy. In this study, we conducted an abamectin bioassays on field population, laboratory-derived resistant-and sensitive populations. It was found that the 24 h median lethal concentration (LC_{50}) values of the three populations was 7.19 $\mu\text{g/mL}$, 2061.43 $\mu\text{g/mL}$ and 0.10 $\mu\text{g/mL}$, respectively, while the LC_{50} values of the 48 h was 6.32 $\mu\text{g/mL}$, 1971.55 $\mu\text{g/mL}$ and 0.09 $\mu\text{g/mL}$, re-

收稿日期 2024-10-10; 修回日期 2024-10-18

基金项目 2022 年三亚市科技创新专项 (No. 2022KJCX18); 国家木薯产业技术体系虫害防控岗位科学家专项 (No. CARS-11-HNCQ); 国家重点研发计划项目 (No. 2023YFD1600605)。

作者简介 郝桂锋 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 虫害绿色防控。*通信作者 (Corresponding author): 陈 青 (CHEN Qing), E-mail: chqingztq@163.com; 梁 晓 (LIANG Xiao), E-mail: liangxiaozju@126.com。

spectively. In addition, the resistance ratio of the field population and the laboratory resistant population exceeded 70-fold and 20 000-fold respectively, which belonged to the medium resistance level and the high resistance level. Detoxification enzyme activity of surviving *T. urticae* following exposure to LC_{50} treatment showed that the activity of glutathione S-transferase (GSTs) and uridine diphosphate glycosyltransferase (UGTs) in the resistant population was the highest, followed by the field populations, and both two population were significantly higher than those of sensitive population. In comparison, prior to the acaricide treatment, the enzyme activity of the highly resistant population and the medium resistant population increased over time, while the enzyme activity of the sensitive population were inhibited. Quantitative PCR was used to compare the expression differences of the coding gene of the above enzyme detoxification enzymes. It revealed that prior to the treatment, the expression level of *GSTm09*, *GSTd10*, *UGT204a2* and *UGT201d3* in the highly resistant population and the medium resistant population in the field was significantly higher than that in the sensitive population, and the difference in the expression of detoxification enzyme genes between the resistant population and the sensitive population increased further with the extension of treatment time. Correlation analysis showed that the detoxification enzyme activity and the expression of the coding genes were significantly positively correlated with the resistance level to abamectin. The study would provide a theoretical reference for in-depth exploration of *T. urticae* resistant target genes and the development of resistance management strategies.

Keywords: *Tetranychus urticae*; abamectin; resistance; detoxification enzyme; correlation analysis

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.02.014

二斑叶螨 (*Tetranychus urticae* Koch) 是全球性的植食性害螨^[1], 其寄主植物超过 1100 多种, 该螨主要集中在叶背刺吸汁液为害, 导致叶片黄化甚至大面积脱落, 造成的为害损失十分严重^[2]。当前二斑叶螨的防控仍依赖化学药剂, 但高频次、不合理使用农药所致的害螨抗性突出问题突出, 严重制约了二斑叶螨的高效绿色防控^[3]。

阿维菌素是大环内酯类杀螨剂^[4], 通过刺激害螨释放神经递质 γ -氨基丁酸, 致使神经系统过度刺激, 从而引起麻痹和死亡。该药剂对人畜及非靶标生物安全, 在农田环境中易降解, 自投入市场以来便迅速成为防治二斑叶螨的主流药剂之一。与其他杀螨剂相似, 二斑叶螨对阿维菌素的抗药性问题也日益突出。在我国及全球其他频繁使用阿维菌素进行二斑叶螨防治的区域, 均有产生不同抗性水平的田间害螨种群的相关报道^[5-7]。

二斑叶螨对阿维菌素抗性机制的研究已超过 20 a 的历史。抗性基因的点突变^[8], 解毒酶活性的提高^[9]及抗性基因的表达量变化^[10]等均被证实与二斑叶螨对阿维菌素的抗性形成机制有关, 其中解毒酶介导的抗性机制研究较为广泛。许多研究表明, 细胞色素 P450 酶 (CYP450s)^[11]、谷胱甘肽-S-转移酶 (GSTs)^[12-13]、尿苷二磷酸糖基转移酶 (UGTs)^[14-16]等活性的显著提高及其编码基因的过表达对抗性形成的贡献度较大。然而, 二斑叶螨解毒酶的表达水平是否与其抗性水平相关研究较少。

为明确二斑叶螨不同阿维菌素抗性水平与解

毒酶的相关性, 本研究首先开展了阿维菌素对不同抗性水平的 3 个二斑叶螨种群的生物测定, 明确阿维菌素对不同种群的活性, 进一步采用致死中浓度处理后, 比较不同种群二斑叶螨 GSTs、UGTs 酶活性和相关编码基因的表达量变化, 阐明抗性水平与解毒酶表达的相关性, 为二斑叶螨的抗性治理提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试二斑叶螨 阿维菌素敏感种群 (S) 和抗性种群 (R) 为实验室筛选种群, 由西南大学植物保护学院何林教授团队馈赠; 田间种群 (F) 采集自海南省儋州市国家木薯种质资源圃。3 个二斑叶螨种群的实验室饲养条件为: 温度 (26 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 (70 ± 5)%, 光周期 14 L/10 D^[17]。

1.1.2 供试药剂 95%阿维菌素原药购自山东金龙农资有限公司。

1.2 方法

1.2.1 二斑叶螨室内毒力测定及抗性水平分析 配制阿维菌素原药系列浓度用于二斑叶螨敏感种群 (1.00、0.75、0.50、0.15、0.05 $\mu\text{g/mL}$)、抗性种群 (3500、3000、2500、2000、1500 $\mu\text{g/mL}$)、田间种群 (80、40、20、10、5 $\mu\text{g/mL}$) 的室内毒力测定。药剂配制溶液及对照均为 4%二甲基甲酰胺水溶液 [含 0.1% (V/V) Tween-80]。采用实验室前期建立的叶片浸渍法进行毒力测定^[18], 将供试药剂小心倾倒在接有 30 头二斑叶螨雌成螨的皿

豆叶片上，让叶片充分浸渍在药液中 10 s，然后用镊子小心夹起叶片，沥干药液，将其置于(26±1)℃，相对湿度(70±5)%，光周期 14 L/10 D 的光照生化培养箱中，分别在 24、48 h 后检查死亡情况。用 0 号毛笔轻轻拨动螨体，若其足不动则判定为死亡^[19-20]。每个浓度及对照需处理 30 头二斑叶螨，3 个生物学重复。死亡率=(死亡螨数/供试螨数)×100%；校正死亡率=[(处理组死亡率-对照组死亡率)/(1-对照组死亡率)]×100%。计算 3 个种群害螨的致死中浓度(LC₅₀)，以敏感种群的 LC₅₀ 为基准，分别计算抗性种群和田间种群 LC₅₀ 与敏感种群 LC₅₀ 的比值，即抗性倍数(resistance ratio, RR)。抗性水平划分标准：RR≤5.0 为敏感状态，5.0<RR≤10.0 为低水平抗性，10.0<RR≤100.0 为中等水平抗性，RR>100.0 为高水平抗性。

1.2.2 二斑叶螨解毒酶活性测定 以敏感、抗性、田间 3 个二斑叶螨种群的阿维菌素 LC₅₀ 进行处理，方法同毒力测定，分别于药剂处理前(0 h)，处理 24 h 和 48 h 后收集存活二斑叶螨进行 UGTs、GSTs 酶活分析，每个时间点设置 3 个重复，每重复 50 头二斑叶螨。采用 1 mL PBS 缓冲液(0.01 mol/L, pH 7.4)，用电动匀浆器研磨二斑叶螨样品，并于 4℃，7500 r/min 离心 5 min，转移上清至新的 1.5 mL 离心管中，于-20℃保存待用。酶活性测定参照上海酶联公司的 UGTs、GSTs 酶活试剂盒的方法进行。

1.2.3 二斑叶螨解毒酶基因表达量分析 二斑叶螨的药剂处理方法参见 1.2.2。选择已报道的与阿维菌素抗性相关的二斑叶螨 GSTs 基因(*TuGSTm09*、*TuGSTd10*)或其近似种朱砂叶螨

的 UGTs 基因(*UGT204a2*、*UGT201d3*)(表 1)，分析阿维菌素以 LC₅₀ 处理前后对害螨基因表达水平的影响。RNA 提取参照范东哲等^[21]的昆虫组织 TRIzol 提取法，利用琼脂糖凝胶电泳、超微量紫外分光光度计(Thermo)检测其浓度纯度和完整性。取 1.0 μg 去除 gDNA 的 RNA 进行 cDNA 第一条链的合成，参照 ToloScript ALL-in-one RT EasyMix for qPCR (TOLOBIO，中国)。

cDNA 样品经 RNase-free ddH₂O 稀释 5 倍后作为 qPCR 的模板，以二斑叶螨 *Actin* 作为内参基因(表 1)。qPCR 反应体系的配制参照 2×Q3 SYBR qPCR Master Mix 试剂盒(TOLOBIO，中国)。qPCR 反应条件为：95℃预变性 30 s；95℃变性 10 s，60℃下退火 30 s，72℃延伸 20 s，40 次循环，使用 LightCycler[®]96 仪器(Roche，瑞士)程序采集扩增曲线和溶解曲线。以相同时间内敏感种群基因的表达量归一化设置为 1.0，阿维菌素处理后抗性种群、田间种群基因的表达量以敏感种群的相对倍数表示，采用 2^{-ΔΔCT} 方法^[22]进行 qPCR 结果分析，每个处理均设置 3 个生物学重复，每个生物学重复设置 3 个技术重复。

1.3 数据处理

利用 Excel 软件进行数据汇总与分析，采用 PoloPlus 软件计算二斑叶螨敏感种群、田间种群和抗性种群的毒力回归方程、LC₅₀ 以及其 95%置信限等相关毒力参数指标；使用统计学软件 DPS(V9.50)的 Turkey's 多重比较法分析不同种群在阿维菌素处理前后的解毒代谢酶活性及其编码基因的表达量差异。采用 Spearman 法分别分析二斑叶螨酶活及基因表达与对其抗性水平的相关性。

表 1 二斑叶螨解毒酶基因 qPCR 引物
Tab. 1 qPCR primer information of detoxification genes of *T. urticae*

基因名称 Gene name	参考文献 Reference	基因登录号 Gene ID	序列(5'-3') Sequence (5'-3')	退火温度 T _m /℃	产物大小 Product size/bp
<i>UGT204a2</i>	[15]	LOC107360696	F: TTTGATGATGATTGTGGAGGAG	57.4	165
			R: GATGATGGATTGGCTGAGAAC	56.8	165
<i>UGT201d3</i>	[14]	LOC107360034	F: CAAAAGACCGAGAAAGTTATGC	56.7	87
			R: CCTCAACACTTTTCAAGACGC	57.6	87
<i>TuGSTm09</i>	[13]	LOC107360607	F: CATTATCTGGCTCGTAAACAC	52.8	166
			R: AAGAATCCAAACCAAGTCG	52.3	166
<i>TuGSTd10</i>	[13]	LOC107368273	F: CCAGAGTTCCTCGCCATAAA	57.8	183
			R: TGAATCCCAATAAAGCCACC	57.5	183
<i>Actin</i>	[23]	LOC107371969	F: CCCTCCTTGTAAGTTTCTGCTCT	57.4	202
			R: ACTAACGATGGGTCTGGTCC	56.1	202

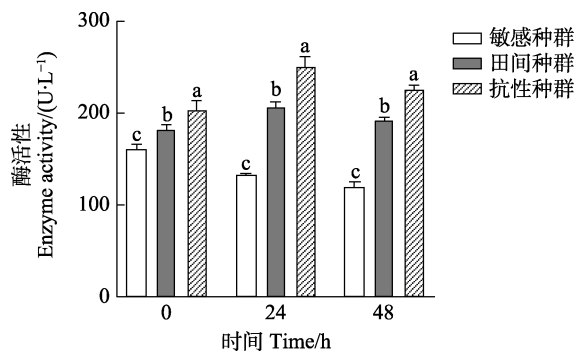
2 结果与分析

2.1 阿维菌素对不同种群二斑叶螨的毒力测定及抗性水平分析

表 2 结果表明,阿维菌素对不同二斑叶螨种群的毒力水平差异较大。室内筛选的敏感种群、抗性种群以及田间种群 24、48 h 的 LC_{50} 分别为 0.10、0.09 $\mu\text{g/mL}$, 2061.43、1971.55 $\mu\text{g/mL}$ 和 7.19、6.32 $\mu\text{g/mL}$ 。以敏感种群为基准,计算田间种群和抗性种群的抗性倍数,结果表明,田间种群的抗性倍数约为 70 倍,属于中等水平抗性,抗性种群的抗性倍数超过 20 000 倍,属于高水平抗性。

表 2 阿维菌素对二斑叶螨的室内毒力测定和抗性水平分析
Tab. 2 Bioassay and resistance level analysis of abamectin to *T. urticae*

害螨种群 Mite population	时间 Time/h	毒力方程 Regression equation	LC_{50} $/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	95%置信区间 95% confidence interval	χ^2	抗性倍数 Resistance ratio
敏感种群	24	$y=0.964x+5.953$	0.10	0.03~0.19	4.38	
	48	$y=1.107x+6.140$	0.09	0.03~0.16	4.36	
田间种群	24	$y=1.097x+4.046$	7.19	5.32~9.25	3.63	71.90
	48	$y=1.115x+4.082$	6.32	4.61~8.18	3.62	70.22
抗性种群	24	$y=2.615x-3.677$	2061.43	1731.84~2441.69	5.44	20 614.30
	48	$y=2.730x-3.995$	1971.55	1635.56~2332.15	5.79	21 906.11



不同小写字母表示相同时间内不同种群差异显著 ($P<0.05$)。
Different lowercase letters indicate significant difference between different populations at the same time ($P<0.05$).

图 1 阿维菌素处理前后不同二斑叶螨种群 UGTs 酶活性差异分析

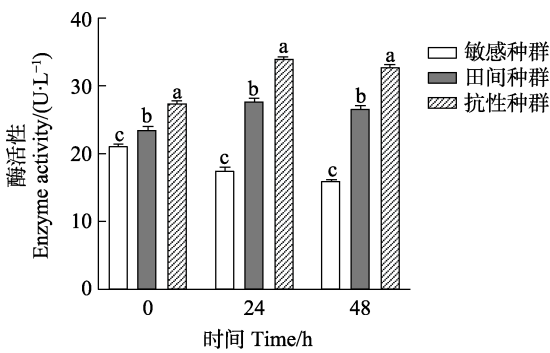
Fig. 1 Difference of UGTs enzyme activities among different *T. urticae* populations under abamectin treatment

2.3 阿维菌素处理后不同抗性水平二斑叶螨 GSTs 酶活性差异分析

阿维菌素处理前后,不同抗性水平二斑叶螨的 GSTs 活性存在显著差异(图 2)。用药处理前,抗性种群的 GSTs 酶活性显著高于田间种群,并且这二者的 GSTs 酶活也显著高于敏感种群。此外,用药处理 24 h 和 48 h 后,抗性种群和田间种群的 GSTs 酶活性较用药前显著提高 1.61、1.56

2.2 阿维菌素处理后不同抗性水平二斑叶螨 UGTs 酶活性差异分析

阿维菌素处理前后,不同抗性水平二斑叶螨的 UGTs 活性存在显著差异。用药处理前,抗性种群的 UGTs 酶活性显著高于田间种群,并且这二者的酶活性也显著高于敏感种群。此外,用药处理 24 h 和 48 h 后,抗性种群和田间种群的 UGTs 酶活性较用药前显著提高 1.58、1.42 倍和 1.29、1.20 倍,并且仍然表现出抗性种群 UGTs 酶活显著高于田间种群的趋势。与之相反,敏感种群用药处理 24 h 和 48 h 后,其 UGTs 酶活降低至用药前的 20.14%和 33.43% (图 1)。



不同小写字母表示相同时间内不同种群差异显著 ($P<0.05$)。
Different lowercase letters indicate significant difference between different populations at the same time ($P<0.05$).

图 2 阿维菌素处理前后不同二斑叶螨种群 GSTs 酶活性差异分析

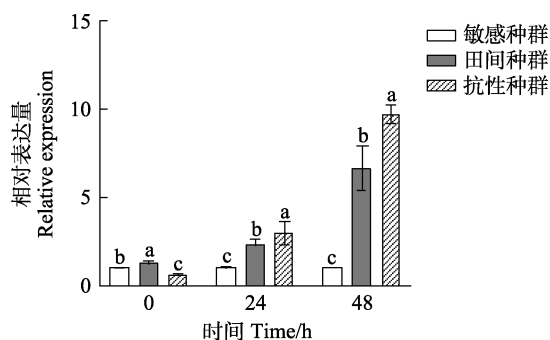
Fig. 2 Difference of GSTs enzyme activities among different *T. urticae* populations under abamectin treatment

倍和 1.29、1.20 倍,并且仍表现出抗性种群 GSTs 酶活显著高于田间种群的趋势。与之相反,敏感种群用药处理 24 h 和 48 h 后,其 GSTs 酶活性降低至用药前的 20.89%和 32.63%。

2.4 阿维菌素处理后不同二斑叶螨种群解毒基因 UGT204a2 表达量差异分析

阿维菌素处理前后,不同抗性水平二斑叶螨 UGT204a2 表达量存在显著差异(图 3)。用药处

理前,田间种群的 *UGT204a2* 表达量略高于敏感种群和抗性种群,分别为后二者的 1.28 倍和 2.01 倍。用药处理 24 h 和 48 h 后,田间种群和抗性种群的 *UGT204a2* 基因表达量显著高于敏感种群,前二者分别达到后者的 2.35、3.04 倍和 6.62、9.69 倍 ($P<0.05$),表明阿维菌素处理后, *UGT204a2* 在阿维菌素中抗、高抗的二斑叶螨种群中的表达量显著高于敏感种群。



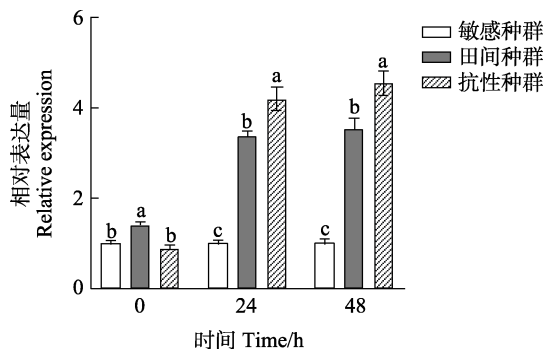
不同小写字母表示相同时间内不同种群差异显著 ($P<0.05$)。Different lowercase letters indicate significant difference between different populations at the same time ($P<0.05$).

图3 阿维菌素处理前后不同二斑叶螨种群 *UGT204a2* 基因表达量差异

Fig. 3 Difference of transcriptions of *UGT204a2* among different *T. urticae* populations under abamectin treatment

2.5 阿维菌素处理后不同种群 *UGT201d3* 解毒代谢基因的表达差异分析

阿维菌素处理前后,不同抗性水平二斑叶螨 *UGT201d3* 表达量存在显著差异(图4)。用药处理前,田间种群的 *UGT201d3* 表达量略高于敏感种群和抗性种群,分别为后二者的 1.40 倍和 1.63 倍。用药处理 24 h 和 48 h 后,田间种群和抗性种



不同小写字母表示相同时间内不同种群差异显著 ($P<0.05$)。Different lowercase letters indicate significant difference between different populations at the same time ($P<0.05$).

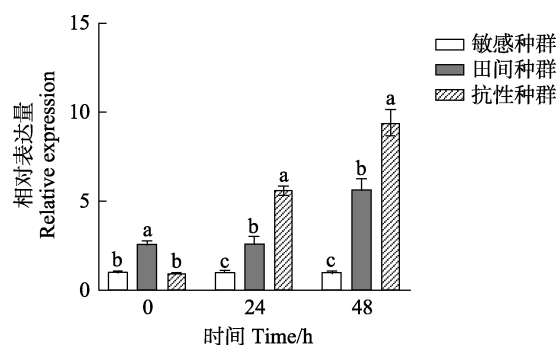
图4 阿维菌素处理前后不同二斑叶螨种群 *UGT201d3* 基因表达量差异

Fig. 4 The difference of transcriptions of *UGT201d3* among different *T. urticae* populations under abamectin treatment

群的 *UGT201d3* 基因表达量显著高于敏感种群,前二者分别达到后者的 3.35、4.20 倍和 3.53、4.54 倍 ($P<0.05$),表明阿维菌素处理后, *UGT201d3* 在阿维菌素中抗、高抗的二斑叶螨种群中的表达量显著高于敏感种群。

2.6 阿维菌素处理后不同种群 *TuGSTm09* 解毒代谢基因的表达差异分析

阿维菌素处理前后,不同抗性水平二斑叶螨 *TuGSTm09* 表达量存在显著差异(图5)。用药处理前,田间种群的 *TuGSTm09* 表达量略高于敏感种群和抗性种群,分别为后二者的 2.57 倍和 2.72 倍。用药处理 24 h 和 48 h 后,田间种群和抗性种群的 *TuGSTm09* 基因表达量显著高于敏感种群,前二者分别达到后者的 2.61、5.58 倍和 5.62、9.37 倍 ($P<0.05$),表明阿维菌素处理后, *TuGSTm09* 在阿维菌素中抗、高抗的二斑叶螨种群中的表达量显著高于敏感种群。



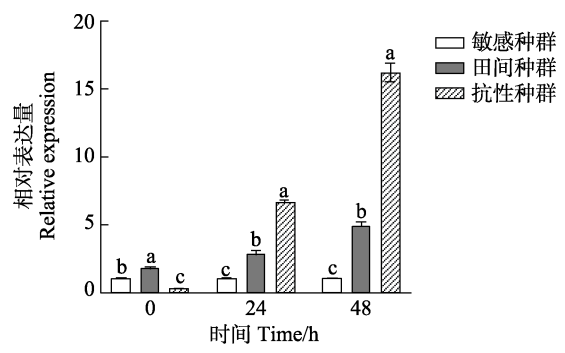
不同小写字母表示相同时间内不同种群差异显著 ($P<0.05$)。Different lowercase letters indicate significant difference between different populations at the same time ($P<0.05$).

图5 阿维菌素处理前后不同二斑叶螨种群 *TuGSTm09* 基因表达量差异

Fig. 5 Difference of transcriptions of *TuGSTm09* among different *T. urticae* populations under abamectin treatment

2.7 阿维菌素处理后不同种群 *TuGSTd10* 解毒代谢基因的表达差异分析

阿维菌素处理前后,不同抗性水平二斑叶螨 *TuGSTd10* 表达量存在显著差异(图6)。用药处理前,田间种群的 *TuGSTd10* 表达量略高于敏感种群和抗性种群,分别为后二者的 1.81 倍和 7.30 倍。用药处理 24 h 和 48 h 后,田间种群和抗性种群的 *TuGSTd10* 基因表达量显著高于敏感种群,前二者分别达到后者的 2.89、6.74 倍和 4.93、16.30 倍 ($P<0.05$),表明阿维菌素处理后, *TuGSTd10* 在阿维菌素中抗、高抗的二斑叶螨种群中的表达量显著高于敏感种群。



不同小写字母表示相同时间内不同种群差异显著 ($P<0.05$)。
Different lowercase letters indicate significant difference between different populations at the same time ($P<0.05$).

图 6 阿维菌素处理前后不同二斑叶螨种群 *TuGSTd10* 基因表达量差异

Fig. 6 The difference of transcriptions of *TuGSTd10* among different *T. urticae* populations under abamectin treatment

2.8 解毒酶基因表达与阿维菌素不同抗性水平的相关性分析

Spearman 相关性分析结果表明,阿维菌素 LC_{50} 进行处理时,存活二斑叶螨的 UGTs、GSTs 活性均与其抗性水平呈极显著正相关,相关系数分别为 0.9094 ($P=0.0007$)、0.9143 ($P=0.0006$); UGTs 酶的编码基因 *UGT204a2*、*UGT201d3* 表达量与阿维菌素抗性水平呈正相关,相关系数分别为 0.6848 ($P=0.1333$)、0.9650 ($P=0.0018$); GSTs 酶的编码基因 *TuGSTm09*、*TuGSTd10* 表达量与阿维菌素抗性水平呈显著正相关,相关系数分别为 0.8844 ($P=0.0193$)、0.8170 ($P=0.0472$) (表 3)。

表 3 解毒酶表达与二斑叶螨对阿维菌素抗性水平的相关性分析

Tab. 3 Correlation between detoxification enzyme expression and *T. urticae* resistance levels against abamectin

解毒酶 Detoxification enzyme	名称 Name	相关系数 Correlation coefficient	P 值 P value
酶活性	UGTs	0.9094**	0.0007
	GSTs	0.9143**	0.0006
编码基因转录水平	<i>UGT204a2</i>	0.6848	0.1333
	<i>UGT201d3</i>	0.9650**	0.0018
	<i>TuGSTm09</i>	0.8844*	0.0193
	<i>TuGSTd10</i>	0.8170*	0.0472

注: *表示显著相关 ($P<0.05$); **表示极显著相关 ($P<0.01$)。
Note: * indicates significant correlation ($P<0.05$); ** indicates extremely significant correlation ($P<0.01$).

3 讨论

不同用药水平下害虫害螨的抗药性水平差异

显著。黄保宏等^[24]研究发现,同种药剂对不同用药水平地区的黑缘红瓢虫 (*Chilocorus rubidus*) 成虫的毒力差异显著,其中氰戊菊酯和氟氯氰菊酯用药水平较低的种群的敏感性显著高于用药水平较高地区的种群。PU 等^[25]分析发现田间采集的小菜蛾 (*Plutella xylostella*) 种群对阿维菌素产生了超过 5000 倍的抗性,将该种群用阿维菌素进行 21 代的连续抗性筛选后抗性倍数进一步增强到 23 670 倍。刘贻聪等^[26]研究表明二斑叶螨北京密云种群 (MY-BJ)、山东潍坊种群 (WF-SD)、海南三亚种群 (SY-HN)、湖南长沙种群 (CS-HN) 对阿维菌素产生了极高水平的抗性,与敏感种群 (SS) 相比,MY-BJ 种群对阿维菌素的抗性达 1526.75 倍,WF-SD 种群对阿维菌素的抗性达 481.00 倍,SY-HN 种群对阿维菌素的抗性达 315.25 倍,CS-HN 种群对阿维菌素的抗性达 160.75 倍,推测抗性水平的差异可能与不同地区的用药水平及寄主种类有关。在阿维菌素对二斑叶螨的室内抗性筛选中,随着筛选轮次 (用药次数) 的增加,其抗性水平也呈现显著升高的趋势。例如,李瑞娟等^[27]研究发现阿维菌素对二斑叶螨敏感进行 9 轮的抗性筛选后,其抗性水平提高了 5.8 倍。在周兴隆^[28]的研究中,经过连续 59 代的抗性筛选后,二斑叶螨对阿维菌素的抗性水平提高了 658.44 倍。此外,随着田间用药水平的下降以及中断对室内抗性种群的药剂筛选时,害虫对药剂的抗性水平也表现出逐渐降低的趋势^[29-31]。本研究采用的二斑叶螨抗性种群经过了超过 100 代的抗性筛选,对阿维菌素产生了极高水平的抗性,采集的田间种群寄主来源为木薯,而在国内外实际生产中,木薯上阿维菌素及其他对害螨具有潜在交互抗性的杀螨剂的用药水平较低,抗性代价较小,因此田间种群为中抗水平。

害螨对阿维菌素的抗性与解毒酶活性的显著升高有关。ÇAĞATAY 等^[32]鉴定发现菜豆和黄瓜上采集的二斑叶螨田间种群对阿维菌素分别产生了 223、404 倍的抗性,细胞色素 P450 酶、GSTs、羧酸酯酶的活性相较敏感种群显著提高了 1.39~3.51 倍,推测这些酶活的升高与其抗性形成有关。赵卫东等^[33]研究指出,对阿维菌素产生抗性的田间二斑叶螨种群体内多功能氧化酶和 GSTs 活性与敏感种群相比均有所增加。高萍等^[34]通过比较对阿维菌素敏感的二斑叶螨种群和抗性种群的乙酰胆碱酯酶和 GSTs 活性发现,抗性

种群中这2个酶活性的升高导致其对阿维菌素的敏感性显著降低。此外,UGTs的活性升高也被证实与多种害螨,例如二斑叶螨^[6]、朱砂叶螨(*Tetranychus cinnabarinus*)^[14]、柑桔全爪螨(*Panonychus citri*)^[35]对阿维菌素的抗性有关。本研究也发现UGTs和GSTs酶活性与二斑叶螨对阿维菌素的抗性水平呈显著正相关,并且在阿维菌素处理前,中抗的田间种群和高抗的实验室抗性种群的酶活性均显著高于敏感种群,而药剂处理后,这2个酶活性在2个二斑叶螨抗性种群中进一步提高,而敏感种群中上述酶活显著降低,表明抗性二斑叶螨能够激活体内的解毒系统对阿维菌素进行代谢,而敏感种群因缺乏有效的解毒能力而致毒。

害螨对阿维菌素的抗性与解毒酶编码基因表达量的显著上调有关。针对抗性种群二斑叶螨中解毒酶编码基因的研究发现,P450^[24]以及GST^[13]的基因过表达导致二斑叶螨对阿维菌素的抗性升高。编码UGT酶UGT201D3基因在抗阿维菌素朱砂叶螨中显著上调表达,将该基因通过体外表达后,发现该酶蛋白能够体外代谢阿维菌素,证实UGT201D3与阿维菌素抗性形成相关^[14]。RIGA等^[23]发现二斑叶螨P450s基因CYP392A16在抗性品系中显著过表达,同时该基因编码的P450酶能够代谢阿维菌素,直接证实CYP392A16参与阿维菌素的抗性形成。杨顺义^[36]研究也发现,在二斑叶螨抗阿维菌素品系中,CYP392E7、TuGSTd16和TuCCE35基因相对表达量与敏感品系相比分别显著上调2.18、1.12、1.59倍,表明这些基因在转录水平的显著上调可能与阿维菌素的抗性形成有关。LIAO等^[37]在抗阿维菌素的柑橘全爪螨种群中鉴定到一个显著上调表达的GST酶编码基因GSTm5,将此基因沉默后能显著增加害螨对阿维菌素的敏感性。本研究中对阿维菌素中抗的田间种群的相关解毒酶基因如UGT204a2、UGT201d3、TuGSTm09、TuGSTd10表现出了最高的组成型表达水平,并且敏感种群中上述解毒酶基因的组成型表达与高抗种群持平甚至更高,表现出解毒酶的转录水平和蛋白水平不一致的情况,但药剂处理后,2个二斑叶螨抗性种群的基因表达均显著高于敏感种群,并且基因表达水平与抗性水平也呈显著正相关,说明抗性种群具有更强的诱导解毒酶活性的潜力。

本研究结果初步证了解毒酶UGTs和GSTs

活性及其编码基因UGT204a2、UGT201d3、TuGSTm09、TuGSTd10表达量与二斑叶螨对阿维菌素的抗性水平呈显著正相关,为深入挖掘二斑叶螨抗性靶标基因和研发抗性治理策略提供理论参考。

参考文献

- [1] 程立生. 中国朱砂叶螨各地理种群形态变异研究[J]. 热带作物学报, 1998, 19(1): 83-86.
CHENG L S. Morphological variations of different geographic populations of *Tetranychus cinnabarinus*[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 1998, 19(1): 83-86. (in Chinese)
- [2] DERMAUW W, WYBOUW N, ROMBAUTS S, MENTEN B, VONTAS J, GRBIC M, CLARK R M, FEYEREISEN R, VAN L T. A link between host plant adaptation and pesticide resistance in the polyphagous spider mite *Tetranychus urticae*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110: 113-122.
- [3] 李迁, 卢芙蓉, 陈青, 卢辉, 徐雪莲, 经福林, 李开绵, 叶剑秋. 木薯种质对朱砂叶螨的抗性评价[J]. 热带作物学报, 2015, 36(1): 143-151.
LI Q, LU F P, CHEN Q, LU H, XU X L, JING F L, LI K M, YE J Q. Evaluation of cassava germplasms for resistance to spider mite *Tetranychus cinnabarinus*[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2015, 36(1): 143-151. (in Chinese)
- [4] CHOI H Y, LIM H S, PARK K H, JUNHEON, KIM W G. Directed evolution of glycosyltransferase for enhanced efficiency of avermectin glucosylation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2021, 105: 4599-4607.
- [5] FERREIRA C B S, ANDRADE F H N, RODRIGUES A R S, SIQUEIRA H A A, GONDIM M G C. Resistance in field populations of *Tetranychus urticae* to acaricides and characterization of the inheritance of abamectin resistance[J]. Crop Protection, 2015, 67: 77-83.
- [6] XUE W, SNOECK S, NJIRU C, INAK E, DERMAUW W, VAN LEEUWEN T. Geographical distribution and molecular insights into abamectin and milbemectin cross-resistance in European field populations of *Tetranychus urticae*[J]. Pest Management Science, 2020, 76(8): 2569-2581.
- [7] ZHANG Y, XU D, ZHANG Y, WU Q, XIE W, GUO Z, WANG S. Frequencies and mechanisms of pesticide resistance in *Tetranychus urticae* field populations in China[J]. Insect Science, 2022, 29(3): 827-839.
- [8] KWON D H, YOON K S, CLARK J M, LEE S H. A point mutation in a glutamate-gated chloride channel confers abamectin resistance in the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch[J]. Insect Molecular Biology, 2010, 19(4):

- 583-591.
- [9] ADESANYA A W, LAVINE M D, MOURAL T W, LAVINE L C, ZHU F, WALSH D B. Mechanisms and management of acaricide resistance for *Tetranychus urticae* in agroecosystems[J]. Journal of Pest Science, 2021, 94: 639-663.
 - [10] XU D, ZHANG Y, ZHANG Y, WU Q, GUO Z, XIE W, ZHOU X, WANG S. Transcriptome profiling and functional analysis suggest that the constitutive overexpression of four cytochrome P450s confers resistance to abamectin in *Tetranychus urticae* from China[J]. Pest Management Science, 2021, 77(3): 1204-1213.
 - [11] PAPAPOSTOULOU K M, RIGA M, SAMANTSIDIS G R, SKOUFA E, BALABANIDOU V, VAN L T, VONTAS J. Over-expression in cis of the midgut P450 *CYP392A16* contributes to abamectin resistance in *Tetranychus urticae*[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2022, 142: 103709.
 - [12] DANESHIAN L, SCHLACHTER C, TIMMERS L F S M, RADFORD T, KAPINGIDZA B, DIAS T, LIESE J, SPEROTTO R A, GRBIC V, GRBIC M, CHRUSZCZ M. Delta class glutathione S-transferase (*TuGSTd01*) from the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* is inhibited by abamectin[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2021, 176: 104873.
 - [13] PAVLIDI N, TSELIU V, RIGA M, NAUEN R, VAN L T, LABROU N E, VONTAS J. Functional characterization of glutathione S-transferases associated with insecticide resistance in *Tetranychus urticae*[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2015, 121: 53-60.
 - [14] WANG M Y, LIU X Y, SHI L, LIU J L, SHEN G M, ZHANG P, LU W C, HE L. Functional analysis of *UGT201D3* associated with abamectin resistance in *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval)[J]. Insect Science, 2020, 27(2): 276-291.
 - [15] AHN S J, DERMAUW W, WYBOUW N, HECKEL D G, VAN L T. Bacterial origin of a diverse family of UDP-glycosyltransferase genes in the *Tetranychus urticae* genome[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2014, 50: 43-57.
 - [16] SNOECK S, PAVLIDI N, PIPINI D, VONTAS J, DERMAUW W, VAN L T. Substrate specificity and promiscuity of horizontally transferred UDP-glycosyltransferases in the generalist herbivore *Tetranychus urticae*[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2019, 109: 116-127.
 - [17] 沈慧敏, 张新虎. 二点叶螨对甲氰菊酯、氧乐果和四螨嗪抗药性的选育、衰退和恢复[J]. 昆虫学报, 2002, 45(3): 341-345.
 - SHEN H M, ZHANG X H. Selection, decline and recovery of *Tetranychus urticae* Koch resistance to fenprothrin, omethoate and clofentezine[J]. Acta Entomologica Sinica, 2002, 45(3): 341-345. (in Chinese)
 - [18] LIANG X, CHEN Q, WU C L, ZHAO H P. The joint toxicity of bifentazate and propargite mixture against *Tetranychus urticae* Koch[J]. International Journal of Acarology, 2018, 44(1): 35-40.
 - [19] 孟香清, 芮昌辉, 范贤林, 关宏伟. 三种增效剂对甜菜夜蛾防治的增效作用[J]. 农药学报, 2000, 2(4): 82-84.
 - MENG X Q, RUI C H, FAN X L, GUAN H W. Joint action of 3 synergists with 3 insecticides in *Spodoptera exigua* Hübner field populations[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2000, 2(4): 82-84. (in Chinese)
 - [20] SHEN H M. Resistance and cross-resistance of *Tetranychus* (Acari: Tetranychidae) to 14 insecticides and acaricides[J]. Systematic and Applied Acarology, 1999(4): 9-14.
 - [21] 范东哲, 陈青, 梁晓, 伍春玲, 刘迎, 窦宏双, 吴岩. 桃蚜取食对抗、感蚜辣椒品种水杨酸、茉莉酸信号途径的影响[J]. 热带作物学报, 2021, 42(10): 2972-2978.
 - FAN D Z, CHEN Q, LIANG X, WU C L, LIU Y, DOU H S, WU Y. *Myzus persicae* feeding effects salicylic acid and jasmonic acid signaling pathways in aphid-resistant and aphid-susceptible pepper cultivars[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2021, 42(10): 2972-2978. (in Chinese)
 - [22] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
 - [23] RIGA M, TSAKIRELI D, ILIAS A, MOROU E, MYRIDAKIS A, STEPHANOU E G, NAUEN R, DERMAUW W, VAN L T, PAINE M, VONTAS J. Abamectin is metabolized by *CYP392A16*, a cytochrome P450 associated with high levels of acaricide resistance in *Tetranychus urticae*[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2014, 46: 43-53.
 - [24] 黄保宏, 尤强生. 黑缘红瓢虫对 6 种杀虫剂的敏感性测定[J]. 昆虫知识, 2006(5): 648-652.
 - HUANG B H, YOU Q S. Evaluation of six insecticides susceptibility in *Chilocorus rubidus*[J]. Chinese Bulletin of Entomology, 2006(5): 648-652. (in Chinese)
 - [25] PU X, YANG Y, WU S, WU Y. Characterisation of abamectin resistance in a field-evolved multiresistant population of *Plutella xylostella*[J]. Pest Management Science: Formerly Pesticide Science, 2010, 66(4): 371-378.
 - [26] 刘贻聪, 王玲, 张友军, 谢文, 吴青君, 王少丽. 二斑叶螨田间种群对阿维菌素的抗性及相关基因表达分析[J]. 昆虫学报, 2016, 59(11): 1199-1205.
 - LIU Y C, WANG L, ZHANG Y J, XIE W, WU Q J, WANG S L. Abamectin resistance and expression of resistance-related genes in field populations of *Tetranychus urticae* in China[J]. Acta Entomologica Sinica, 2016, 59(11): 1199-1205. (in Chinese)

- 1199-1205. (in Chinese)
- [27] 李瑞娟, 王开运, 姜兴印, 仪美芹. 抗梅岭霉素和阿维菌素二斑叶螨种群生命力和繁殖力的研究[J]. 农药学报, 2004, 6(1): 81-84.
- LI R J, WANG K Y, JIANG X Y, YI M Q. The studies on life vigor and fecundity of meilingmycin-and abamectin-resistance strain of *Tetranychus urticae* Koch[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2004, 6(1): 81-84. (in Chinese)
- [28] 周兴隆. 二斑叶螨对阿维菌素, 螺螨酯及甲氰菊酯的多重抗性研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2015.
- ZHOU X L. Study on the multiple resistance of abamectin, spiroticlofen and fenprothrin to *Tetranychus urticae*[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2015. (in Chinese)
- [29] 郑明奇, 张文吉. 不同抗性水平的家蝇在不同用药方式下抗性机制的演变[J]. 农药学报, 1999, 1(2): 36-41.
- ZHENG M Q, ZHANG W J. The evolution of the mechanism of resistance under different level of application of pesticides for house flies (*Musca domestica* L.) with different resistant level[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 1999, 1(2): 36-41. (in Chinese)
- [30] 胡珍娣, 冯夏, 包华理, 李振宇, 林庆胜, 周小毛, 尹飞, 陈焕瑜. 不同小菜蛾田间种群对氟啶脲的抗性动态[J]. 应用昆虫学报, 2016, 53(2): 292-297.
- HU Z D, FENG X, BAO H L, LI Z Y, LIN Q S, ZHOU X M, YIN F, CHEN H Y. Changes in resistance rates to chlorfluazuron in the diamondback moth, *Plutella xylostella*, in different fields[J]. Chinese Journal of Applied Entomology, 2016, 53(2): 292-297. (in Chinese)
- [31] STUMPF N, NAUEN R. Biochemical markers linked to abamectin resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae)[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2002, 72(2): 111-121.
- [32] ÇAĞATAY N S, MENAULT P, RIGA M, VONTAS J, AY R. Identification and characterization of abamectin resistance in *Tetranychus urticae* Koch populations from greenhouses in Turkey[J]. Crop Protection, 2018, 112: 112-117.
- [33] 赵卫东, 王开运, 姜兴印, 仪美芹. 二斑叶螨对常用杀螨剂的抗药性测定[J]. 农药学报, 2001, 3(3): 86-88.
- ZHAO W D, WANG K Y, JIANG X Y, YI M Q. The monitoring of resistance of *Tetranychus urticae* Koch to several insecticides[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2001, 3(3): 86-88. (in Chinese)
- [34] 高萍, 周玉书, 孟祥梅, 李忠洲, 朴静子. 抗阿维菌素的二斑叶螨解毒酶活力变化及其酯酶同工酶分析[J]. 沈阳农业大学学报, 2012, 43(5): 599-602.
- GAO P, ZHOU Y S, MENG X M, LI Z Z, PIAO J Z. Changes of detoxicant enzymes activities in resistant population of *Tetranychus urticae* Koch to abamectin and esterase isozymes analysis[J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2012, 43(5): 599-602. (in Chinese)
- [35] SHAO B, YU S, WANG S, LI S, DING L, LI M, CHENG L, PAN Q, CONG L, RAN C. A UDP-glycosyltransferase gene *PcUGT202A9* was associated with abamectin resistance in *Panonychus citri* (McGregor)[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 270: 132228.
- [36] 杨顺义. 二斑叶螨对阿维菌素和螺虫乙酯的抗性机理研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2014.
- YANG S Y. Study on resistance mechanism of *Tetranychus urticae* (Koch) to avermectin and spirotetramat[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2014. (in Chinese)
- [37] LIAO C Y, XIA W K, FENG Y C, LI G, LIU H, DOU W, WANG J J. Characterization and functional analysis of a novel glutathione S-transferase gene potentially associated with the abamectin resistance in *Panonychus citri* (McGregor)[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2016, 132: 72-80.