

甜菜夜蛾抗高效氯氟氰菊酯近等基因系的构建

慕卫^{1,2}, 吴孔明^{1*}, 张文吉³, 郭予元¹

(1. 中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100094; 2. 山东农业大学植物保护学院, 山东泰安 271018;

3. 中国农业大学理学院, 北京 100094)

摘要: 将甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 抗性种群雄成虫与敏感种群雌成虫杂交, 杂交后代再自交后, 用高效氯氟氰菊酯杀死敏感和部分杂合个体的剂量(50 $\mu\text{g/mL}$)处理 4 龄幼虫, 对 1 天后存活的幼虫再用 250 $\mu\text{g/mL}$ 汰选, 将存活幼虫发育成的雄成虫与敏感种群的雌成虫回交, 再经自交和选育, 如此循环 6 次, 获得了甜菜夜蛾抗高效氯氟氰菊酯近等基因系。对该基因系构建过程中各代幼虫的抗性水平和相关生物学特性进行了监测和比较, 结果表明获得的抗高效氯氟氰菊酯近等基因系抗性种群的抗药性仍保持较高水平; 酯酶同工酶的电泳分析表明抗高效氯氟氰菊酯近等基因系抗性种群与敏感种群图谱相近, 而与亲本抗性种群之间存在明显差异。

关键词: 甜菜夜蛾; 高效氯氟氰菊酯; 近等基因系

中图分类号: Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2004)05-0591-04

Establishment of the near isogenic line strain resistant to lambda-cyhalothrin in *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae)

MU Wei^{1,2}, WU Kong-Ming^{1*}, ZHANG Wen-Ji³, GUO Yu-Yuan¹ (1. Institute of Plant Protection, China Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China; 2. College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China; 3. College of Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: The lambda-cyhalothrin resistant males and susceptible females in *Spodoptera exigua* were crossed in the laboratory. The 4th-instar larvae derived from the F_2 inbred progeny were treated with the dose of 50 $\mu\text{g/mL}$ of lambda-cyhalothrin, and survivors were taken into the second selection at the dose of 250 $\mu\text{g/mL}$ in the following day. The survival adults (σ) after the second selection were backcrossed with the susceptible adults (ρ), and their inbred progeny was selected with a similar method until the near isogenic line (NIL) strain resistant to lambda-cyhalothrin were established after the process was repeated 6 times. During the establishment process of the NIL strain, the resistance level and biological parameters in every generation were assayed. The results indicated that resistance level to lambda-cyhalothrin of NIL-RR (resistant strain) had no significant decrease compared to the parent resistant strain. Esterase analysis to the 4th-instar larvae of the susceptible, resistant and NIL-RR strains showed that the pattern of esterase band of NIL-RR was similar to that of parent susceptible strain, but significantly different with the parent resistant.

Key words: *Spodoptera exigua*; lambda-cyhalothrin; near isogenic line

20 世纪 90 年代以前, 甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 在我国尚属偶发性害虫, 近年来逐步上升为多种蔬菜和经济作物的重要害虫。化学农药的频繁使用已导致田间种群产生了较高水平的抗性。为防止类似棉铃虫因抗药性而大暴发局面的重演, 进行较深入的抗药性机理研究是非常必要的。抗药性近等基因系(near isogenic line, NIL)是进行抗性遗传分

析、相对适合度检测和抗性基因分子定位和克隆的重要材料, 在昆虫抗药性研究方面已经有所应用。Shanahan(1979)、Roush 和 Wolfenbarger(1985)及 White 和 Bell(1988)分别利用该方法证明铜绿蝇 *Lucilia cuprina* 对狄氏剂、烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 对灭多威、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 对马拉硫磷的抗性为单基因抗性。Mckenzie 等(1982)在对二嗪农抗性

基金项目: 科技部国家重点基础研究项目(G2000016200)

作者简介: 慕卫, 女, 1971 年生, 博士, 副教授, 研究方向为昆虫毒理学, E-mail: muwei@sdau.edu.cn

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: wkm@casscoe.net.cn

收稿日期 Received: 2003-12-29; 接受日期 Accepted: 2004-04-12

近等基因系适合度检测后发现,抗性种群适合度有了明显下降。Dong 和 Scott (1994)利用近等基因系证明德国蜚蠊 *Blattella germanica* 的 Kdr 型抗性与 *Para* 同源的 *Sc* 基因的改变有关。

本研究通过反复回交法将与甜菜夜蛾抗高效氯氟氰菊酯相关的基因转入不同来源的敏感种群,构建了抗药性近等基因系,监测了各回交后代的抗性水平,并比较了各种群的生物学特性和酯酶同工酶。

1 材料与方法

1.1 甜菜夜蛾的饲养

采用慕卫等(2002)的方法。

1.2 敏感种群(SS)

来源参见慕卫等(2003),高效氯氟氰菊酯对该种群 4 龄幼虫的 LC_{50} 为 $0.510 \mu\text{g/mL}$ 。

1.3 抗性种群(RR)

经高效氯氟氰菊酯多代汰选,药剂对该种群 4 龄幼虫的 LC_{50} 为 $280.926 \mu\text{g/mL}$ 。

1.4 LC_{50} 测定方法

将高效氯氟氰菊酯乳油用自来水稀释成不同浓度,以 4 龄甜菜夜蛾幼虫(试虫重 $35 \sim 40 \text{ mg}$)供试。每浓度重复 3 次,每重复 48 头。将试虫在不同浓度药液中浸渍 2 s,然后放入装有人工饲料的 24 孔盒内正常饲养,以 48 h 死亡率按剂量分组进行统计分析(POLO 法)。

1.5 抗高效氯氟氰菊酯近等基因系的建立

将敏感与抗性种群甜菜夜蛾蛹单头放入养虫管中,羽化后辨别雌雄蛾,挑出敏感种群雌蛾和抗高效氯氟氰菊酯种群雄蛾各 20 头放入养虫笼中交配繁殖后代。杂交后代再自交,测定杂种一代(F_1)幼虫 LC_{50} ,由此确定杀死敏感和部分杂合个体的高效氯氟氰菊酯剂量($50 \mu\text{g/mL}$),用 $50 \mu\text{g/mL}$ 剂量处理 4 龄幼虫,一天后存活的幼虫再用 $250 \mu\text{g/mL}$ 剂量处理,将存活幼虫留种,一部分自交,检测 F_2 代抗性水平;另一部分羽化后挑出雄成虫与敏感种群雌成虫回交,称为回交一代(BC_1),羽化后自交得到 BC_1F_1 代,一部分幼虫用于毒力测定,其余用高效氯氟氰菊酯 $50 \mu\text{g/mL}$ 和 $250 \mu\text{g/mL}$ 剂量再进行 2 次汰选,羽化雄成虫与敏感种群雌成虫进行第 2 次回交。如此经自交-选育-回交-自交共循环 6 次,获得抗高效氯氟氰菊酯近等基因系。

1.6 各杂交世代生物学特性比较

分别记录甜菜夜蛾敏感种群、抗性种群及其杂

交、回交和自交汰选后代幼虫存活数、化蛹数和蛹重,计算化蛹率、平均蛹重和羽化率。

1.7 自交后代抗性个体的 3 种汰选方法比较

三种方法分别为:①自交后代用 $250 \mu\text{g/mL}$ 高效氯氟氰菊酯处理;②自交后代先用 $50 \mu\text{g/mL}$ 高效氯氟氰菊酯处理,存活的幼虫留种,下一代再自交,再用 $250 \mu\text{g/mL}$ 高效氯氟氰菊酯处理;③自交后代先用 $50 \mu\text{g/mL}$ 高效氯氟氰菊酯处理,一天后存活的幼虫再用 $250 \mu\text{g/mL}$ 高效氯氟氰菊酯处理。

将上述 3 种方法获得的存活幼虫记数并留种,计算化蛹率和羽化率。

1.8 酯酶同工酶电泳

采用聚丙烯酰胺凝胶垂直平板型电泳,分离胶浓度 7.5%,浓缩胶浓度 3%,酯酶染色参照 Devonshire(1975)的方法。

2 结果与分析

2.1 自交后代 3 种汰选方法比较

按照 1.7 节描述的方法,方法①处理的幼虫,存活率仅为 2.8%,不易保持种群的延续;方法②处理的幼虫存活率、化蛹率、蛹重和抗性水平都比较理想,但完成一次回交自交需要 3 代的时间,且工作量大;方法③既可以保证种群的延续和抗性水平又缩短了选育周期,因此本研究采用该方法获得甜菜夜蛾抗高效氯氟氰菊酯近等基因系(表 1)。

2.2 获得近等基因系过程中抗性水平及相关生物学特性的变化

本研究以高效氯氟氰菊酯敏感种群作为轮回亲本(recurrent parent)与抗性种群进行多次回交,由表 2 可知,该种群对高效氯氟氰菊酯高度敏感;而作为供体亲本(nonrecurrent parent)的抗性种群对高效氯氟氰菊酯表现为高度抗性。高效氯氟氰菊酯对自交汰选存活幼虫后代的毒力回归曲线 b 值大于 2,说明种群中个体之间抗性水平比较一致,即种群的异质性比较小,且选育后抗药性水平与供体亲本相比并未明显下降,表明获得的近等基因系中抗性基因没有丢失。

通过对甜菜夜蛾各代蛹重和羽化率的比较可以看出,供体亲本的化蛹率、蛹重和羽化率均低于轮回亲本,各回交自交一代(BC_nF_1)的化蛹率与轮回亲本相比差异不显著,但却显著高于供体亲本,只是经汰选的后代化蛹率有所下降。回交次数越多,羽化率越接近敏感种群,这表明抗性基因的引入对甜菜夜

蛾的化蛹和羽化等发育过程基本没有影响。此外通过分析高效氯氟氰菊酯对各种群的 LC_{50} 的大小与平均蛹重的关系可以看出, LC_{50} 值大的, 即种群抗性水平高的, 平均蛹重小, 其大小与供体亲本的蛹重相当, 但明显低于轮回亲本的蛹重。

表 1 自交后代抗性个体不同汰选方法对种群抗性水平和部分生物学指标的影响

Table 1 Impact of inbred progeny selection method on resistance evolution and some biological characteristics in <i>Spodoptera exigua</i>				
方法 Methods	幼虫存活率(%) Larval survival rate	化蛹率(%) Pupation rate	平均蛹重(mg/头) Pupal weight (mg/head)	LC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
①	2.8	42.5	90.3	196.041(152.725 ~ 259.767)
②	34.7	79.3	102.4	101.689(61.922 ~ 162.671)
	38.1	77.8	103.6	287.611(234.525 ~ 359.274)
③	15.9	70.5	101.7	220.581(173.474 ~ 281.839)

注 Notes: 方法①、②和③描述详见正文 1.7 节①The inbred offspring larvae were treated with 250 $\mu\text{g/mL}$ of lambda-cyhalothrin; ②The inbred offspring larvae were treated first with 50 $\mu\text{g/mL}$ of lambda-cyhalothrin, the survivals were reared and their inbred offspring larvae were treated with 250 $\mu\text{g/mL}$ of lambda-cyhalothrin; ③The inbred offspring larvae were treated first with 50 $\mu\text{g/mL}$ of lambda-cyhalothrin, one day later the survival larvae were treated with 250 $\mu\text{g/mL}$ of lambda-cyhalothrin again.

表 2 甜菜夜蛾抗高效氯氟氰菊酯近等基因系的获得及相关生物学变化

Table 2 The establishment process of the near isogenic line strain of <i>Spodoptera exigua</i> resistant to lambda-cyhalothrin and its biological characteristics					
种群 Strain	斜率 Slope	LC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	化蛹率(%) Pupation rate	平均蛹重(mg/头) Pupal weight (mg/head)	羽化率 Emergence rate (%)
RR 种群 Resistant strain	2.692 $\pm$ 0.264	280.926 (240.431 ~ 339.720)	66.2 $\pm$ 4.1 e	98.4 $\pm$ 2.0 c	79.5 $\pm$ 3.3 e
SS 种群 Susceptible strain	2.185 $\pm$ 0.453	0.510 (0.315 ~ 0.723)	87.9 $\pm$ 3.2 ab	122.0 $\pm$ 1.7 a	96.7 $\pm$ 2.0 a
杂种一代 F_1	2.187 $\pm$ 0.64	18.443 (9.931 ~ 30.317)	92.6 $\pm$ 4.3 a	117.1 $\pm$ 3.2 a	93.5 $\pm$ 1.8 ab
抗性杂种二代 F_2	2.274 $\pm$ 0.231	287.611 (234.525 ~ 359.274)	73.9 $\pm$ 3.0 d	103.6 $\pm$ 2.2 bc	77.0 $\pm$ 2.7 e
回交一代自交一代 BC_1F_1	1.069 $\pm$ 0.210	13.14 (6.906 ~ 22.363)	86.0 $\pm$ 3.5 bc	106.9 $\pm$ 4.8 b	85.8 $\pm$ 3.4 cd
抗性回交一代自交二代 BC_1F_2	2.168 $\pm$ 0.316	196.041 (152.725 ~ 259.767)		99.4 $\pm$ 1.7 c	
回交二代自交一代 BC_2F_1	1.263 $\pm$ 0.286	22.571 (14.650 ~ 34.501)	81.4 $\pm$ 3.2 bc	107.2 $\pm$ 2.9 b	83.9 $\pm$ 1.7 d
抗性回交二代自交二代 BC_2F_2	2.374 $\pm$ 0.351	220.581 (173.474 ~ 281.839)		98.3 $\pm$ 2.1 c	
回交三代自交一代 BC_3F_1	1.567 $\pm$ 0.179	28.196 (21.534 ~ 35.827)	85.1 $\pm$ 2.2 bc	110.5 $\pm$ 2.5 b	87.9 $\pm$ 1.8 b
抗性回交三代自交二代 BC_3F_2	2.507 $\pm$ 0.327	228.300 (184.622 ~ 260.749)		94.7 $\pm$ 3.7 c	
回交四代自交一代 BC_4F_1	1.564 $\pm$ 0.276	18.165 (7.553 ~ 78.828)	83.2 $\pm$ 1.9 bc	109.8 $\pm$ 1.5 b	90.3 $\pm$ 3.1 bc
抗性回交四代自交二代 BC_4F_2	2.110 $\pm$ 0.338	242.070 (165.691 ~ 338.370)		96.8 $\pm$ 2.4 c	
回交五代自交一代 BC_5F_1	1.231 $\pm$ 0.072	14.804 (11.829 ~ 18.971)	83.7 $\pm$ 2.4 bc	110.7 $\pm$ 3.4 b	93.8 $\pm$ 1.8 ab
抗性回交五代自交二代 BC_5F_2	2.208 $\pm$ 0.522	253.700 (169.4 ~ 380.800)		99.4 $\pm$ 3.1 c	
回交六代自交一代 BC_6F_1	1.131 $\pm$ 0.266	14.835 (6.836 ~ 25.540)	85.9 $\pm$ 3.1 bc	115.2 $\pm$ 4.1 ab	93.1 $\pm$ 2.0 ab
抗性回交六代自交二代 BC_6F_2	2.337 $\pm$ 0.510	288.050 (214.462 ~ 411.521)	72.5 $\pm$ 3.3 d	97.7 $\pm$ 2.7 c	
抗性回交六代自交三代 BC_6F_3	2.981 $\pm$ 0.152	263.63 (227.506 ~ 320.493)	85.4 $\pm$ 4.6 bc	103.2 $\pm$ 3.9 bc	92.7 $\pm$ 2.3 ab
抗性回交六代自交四代 BC_6F_4	2.452 $\pm$ 0.304	249.235 (197.014 ~ 318.526)	83.3 $\pm$ 2.7 bc	101.9 $\pm$ 3.6 bc	90.5 $\pm$ 3.0 ab

表中数据为平均值 $\pm$ 标准误(mean $\pm$ SE), 数据后标有不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$, Duncan 新复极差法)。
The data in the table are mean $\pm$ SE and those followed by different letters differ significantly by Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).

2.3 甜菜夜蛾敏感亲本、抗性亲本和近等基因系抗性种群酯酶电泳图谱比较

由图 1 可知, 甜菜夜蛾近等基因系抗性种群(near isogenic line-RR)的酯酶谱带与敏感亲本(SS)的比较接近, 而与抗性亲本(RR)差异较大。在建立

抗性近等基因系过程中, 随着与敏感轮回亲本回交次数的增加, 回交后代的酯酶图谱逐渐与敏感种群的接近, 表明近等基因系抗性种群逐步获得了与敏感种群相同的遗传背景。

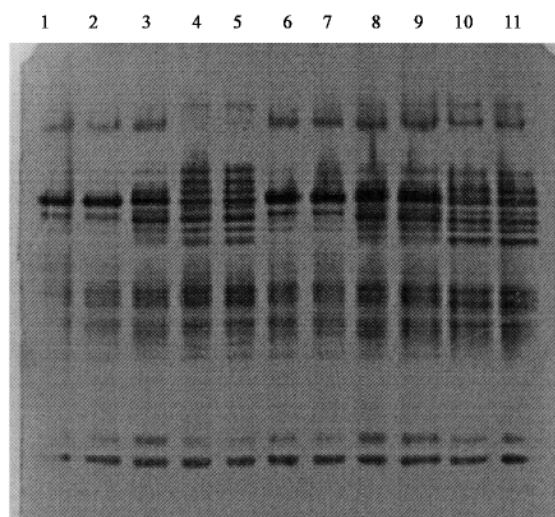


图 1 不同品系甜菜夜蛾幼虫的酯酶图谱

Fig. 1 Esterase pattern of *Spodoptera exigua* larvae of different strains

1, 2. SS 种群 Susceptible strain; 3, 8, 9. 抗性回交三代自交二代 BC_3F_2 ; 4, 5. RR 种群 Resistant strain; 6, 7. 近等基因系抗性种群 Near isogenic line-RR; 10, 11. 抗性回交一代自交二代 BC_1F_2 .

3 讨论

在昆虫抗药性近等基因系的构建中需要注意三个方面的问题,一是遗传背景材料选择,二是供体抗性基因的纯化,三是防止抗药性基因丢失。其中,选择无抗药性基因的背景材料是基础。本研究所用敏感亲本是从较少用药的地区采集,在室内人工饲养 62 代,再经高效氯氟氰菊酯反复汰选得到的,对其他菊酯类杀虫剂也比较敏感(慕卫等, 2003)。当种群已经具备了较高的起始抗性基因频率,一旦被定向选择,便能够快速地被纯化并且抗性基因频率会趋于稳定(Gould *et al.*, 1995)。本实验所用供体亲本是将采自高用药水平地区的种群经高效氯氟氰菊酯多代汰选获得的,该种群在室内虽经过 8 代不接触药剂饲养,对高效氯氟氰菊酯抗性也没有明显衰退(另文发表),因此该抗性种群的获得为抗药性近等基因系的建立提供了很好的供体亲本材料。

由于昆虫抗药性通常是由多基因控制的,且抗性主效基因往往是不完全显性,因此在构建抗药性近等基因系过程中,有可能随着与敏感亲本不断回交,导致后代抗性频率的下降。程罗根等(1999)在获得抗杀螟丹和杀虫双近等基因系小菜蛾时采用的方法是每代回交后即用药剂汰选,结果是随着回交世代的增加,后代群体的抗性水平不断下降,回交到

12 代时对杀螟丹和杀虫双的抗性倍数分别从原来的 57.15 倍和 128.81 倍下降到 2.34 倍和 3.58 倍,证实了这种情况的存在。本研究采用的方法是回交一代后先自交一代,然后再用较大剂量药剂汰选,这样可以使后代维持较高的抗性水平,避免了抗性基因的丢失。

参考文献 (References)

- Cheng LG, Li FL, Wang YC, Chen ZH, 1999. Selection of near isogenic line strains of dimethoate-resistance and cartap-resistance in diamondback moth, *Plutella xylostella* L. *J. Nanjing Agric. Univ.*, 22(2): 28 - 31. [程罗根, 李凤良, 王荫长, 陈之浩, 1999. 抗杀虫双和抗杀螟丹小菜蛾近等基因系的培育. 南京农业大学学报, 22(2): 28 - 31]
- Devonshire AL, 1975. Studies of the carboxylesterase are cause of resistance to deltamethrin in *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 32(6): 240 - 246.
- Gould F, Anderson A, Reynolds A, Bumgarner L, Moar W, 1995. Selection and genetic analysis of a *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) strain with high levels of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *J. Econ. Entomol.*, 88(6): 1 545 - 1 559.
- Dong K, Scott JG, 1994. Linkage of kdr-type resistance and the para-homologous sodium channel gene in German cockroach (*Blattella germanica*). *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 24: 647 - 654.
- McKenzie JA, Whitten MJ, Adena MA, 1982. The effect of genetic background on the fitness of the diazinon resistance genotypes of the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Heredity*, 49(1): 1 - 9.
- Mu W, Wu KM, Zhang YJ, Guo YY, Zhang WJ, 2002. Studies on rearing technique of *Spodoptera exigua* (Hübner) on artificial diet. *Cotton Science*, 14(5): 287 - 290. [慕卫, 吴孔明, 张永军, 郭予元, 张文吉, 2002. 甜菜夜蛾的人工饲养技术. 棉花学报, 14(5): 287 - 290]
- Mu W, Wu KM, Guo YY, Zhang WJ, 2003. Susceptible baseline of *Spodoptera exigua* (Hübner) resistance to pyrethroid insecticides. *Acta Phytophylacica Sinica*, 30(2): 221 - 222. [慕卫, 吴孔明, 郭予元, 张文吉, 2003. 甜菜夜蛾对菊酯类杀虫剂敏感基线的建立. 植物保护学报, 30(2): 221 - 222]
- Roush RT, Wolfenbarger DA, 1985. Inheritance of resistance to methomyl in the tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.*, 78: 1 020 - 1 022.
- Shanahan GJ, 1979. Genetics of diazinon resistance in larva of *Lucilia cuprina* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae). *Bull. Entomol. Res.*, 69: 225 - 228.
- White NDG, Bell RJ, 1988. Inheritance of malathion resistance in a strain of *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) and effects of resistance genotypes on fecundity and larval survival in malathion-treated wheat. *J. Econ. Entomol.*, 81: 381 - 386.