



湖北四个地区草地贪夜蛾田间种群的杀虫剂 敏感性及靶标突变检测

郭志敏, 邓晓倩, 李 静, 袁茂钧, 万 虎, 李建洪, 马康生*

(华中农业大学植物科学技术学院, 昆虫资源利用与害虫可持续治理湖北省重点实验室, 武汉 430070)

摘要: 【目的】测定湖北草地贪夜蛾田间种群对4种杀虫剂的敏感性,并对杀虫剂靶标 *Ace-1*, *VGSC* 和 *RyR* 的基因型和突变频率进行检测,以明确湖北草地贪夜蛾田间种群药剂敏感性现状,进而指导田间科学用药。【方法】采集湖北黄冈、武穴、咸宁和荆州4个地区玉米田中的草地贪夜蛾幼虫,采用浸叶法测定其对氯虫苯甲酰胺、乙基多杀菌素、茚虫威和甲维盐4种杀虫剂的敏感性;提取4个种群80个个体的单头总RNA合成cDNA,利用特异性引物进行PCR扩增,获得目的基因片段,根据序列比对和测序峰图分析,确定 *Ace-1*, *VGSC* 和 *RyR* 的基因型和靶标突变位点的突变频率。【结果】生测结果表明,湖北这4个田间种群的草地贪夜蛾幼虫对氯虫苯甲酰胺、乙基多杀菌素、茚虫威和甲维盐均比较敏感,敏感性从高到低依次为:甲维盐 > 乙基多杀菌素 > 氯虫苯甲酰胺 > 茚虫威。分子检测结果表明,湖北草地贪夜蛾这4个田间种群 *Ace-1* 基因在 A201S, G227A 和 F290V 位点均存在抗性杂合突变,且在 F290V 位点检测到抗性纯合突变,而 *VGSC* 和 *RyR* 两个基因均没有检测到靶标位点突变。【结论】湖北草地贪夜蛾4个田间种群对氯虫苯甲酰胺、乙基多杀菌素、茚虫威和甲维盐这4种杀虫剂均较敏感,但这4个草地贪夜蛾田间种群均携带有对有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂的抗性基因,存在潜在的抗性风险,田间防治建议少用或不用该类杀虫剂,同时需要进一步加强抗性监测工作。

关键词: 草地贪夜蛾; 药剂敏感性; *Ace-1*; *VGSC*; *RyR*; 基因型; 突变频率

中图分类号: Q965.9 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2020)05-0582-08

Detection of insecticide sensitivity and target site mutations in field populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in four regions of Hubei, central China

GUO Zhi-Min, DENG Xiao-Qian, LI Jing, YUAN Mao-Jun, WAN Hu, LI Jian-Hong, MA Kang-Sheng* (Hubei Insect Resources Utilization and Sustainable Pest Management Key Laboratory, College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: 【Aim】The aim of this study is to evaluate the sensitivity of field populations of the fall worm, *Spodoptera frugiperda*, in Hubei, central China to four insecticides, and to detect the genotype and mutation frequency of the insecticide target genes *Ace-1*, *VGSC* and *RyR*, so as to ascertain the insecticide sensitivity of field populations of *S. frugiperda* in Hubei and to provide guidance for scientific application of pesticides. 【Methods】The sensitivity of *S. frugiperda* larvae collected from corn fields in four regions, Huanggang, Wuxue, Xianning and Jingzhou of Hubei to four insecticides, chlorantraniliprole, spinetoram, indoxacarb and methylamino abamectin benzoate, was investigated using

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项基金(2662019QD052); 湖北省农业科技创新行动项目(NYKJ2019011)

作者简介: 郭志敏, 女, 1995年10月生, 河南新蔡人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫毒理学及分子生物学, E-mail: hzauguozhimin@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: kangshengma@mail.hzau.edu.cn

收稿日期 Received: 2020-01-14; 接受日期 Accepted: 2020-04-08

a standard leaf-dip bioassay. Eighty larvae from 4 regions were used for total RNA isolation and cDNA synthesis, and the target fragments were amplified by PCR using specific primers. Besides, the genotypes and target site mutation frequencies of *Ace-1*, *VGSC*, and *RyR* were determined by sequence alignment and sequencing chromatogram peak analysis. 【Results】 Toxicity assays showed that the four field populations of *S. frugiperda* larvae in Hubei were susceptible to all the tested insecticides, and the sensitivity of these populations to four insecticides was as follows: methylamino abamectin benzoate > spinetoram > chlorantraniliprole > indoxacarb. The sequencing results demonstrated that in the four field populations of *S. frugiperda* the resistant heterozygote of all three mutations of *Ace-1* (A201S, G227A, and F290V) was detected, while the resistant homozygote of F290V was detected. However, no site mutation in *VGSC* and *RyR* was detected in all the tested field populations of *S. frugiperda*. 【Conclusion】 Though the four field populations of *S. frugiperda* in Hubei are susceptible to the four tested insecticides (chlorantraniliprole, spinetoram, indoxacarb and methylamino abamectin benzoate), these field populations have already carried resistant genes conferring resistance to organophosphorus and carbamate insecticides and possess high resistance risk to these insecticides. Therefore, resistance monitoring needs to be strengthened.

Key words: *Spodoptera frugiperda*; insecticide sensitivity; *Ace-1*; *VGSC*; *RyR*; genotype; mutation frequency

草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 属鳞翅目 (Lepidoptera) 夜蛾科 (Noctuidae), 是一种非常重要的农业害虫。该虫具有迁飞能力强、繁殖力高、暴发危害等特点, 是联合国粮农组织向全球预警的跨国界迁飞的重大害虫。草地贪夜蛾可为害玉米、水稻、小麦等 353 种植物 (Montezano *et al.*, 2018)。草地贪夜蛾自 2019 年 1 月 8 号侵入我国云南省普洱市江城后, 呈快速扩散蔓延趋势。2019 年间, 全国共有 26 个省(市、区) 1 538 个县(区、市) 发现草地贪夜蛾 (金涛等, 2020), 累计发生面积约 113 万 ha, 主要危害玉米 (98.1%), 危害之重、蔓延之广令人震惊。

化学农药在病虫害的防治中起着主要作用。在草地贪夜蛾的防控上, 化学农药以其高效、快速的特点成为防治杀手锏。在草地贪夜蛾的起源地美洲, 主要依赖传统有机磷、氨基甲酸酯和拟除虫菊酯类杀虫剂对草地贪夜蛾进行控制, 但是很快草地贪夜蛾对这些杀虫剂产生了不同程度的抗药性。1989 - 1990 年, 田间抗药性监测表明, 美国佛罗里达州北部地区的草地贪夜蛾种群对氟胺氰菊酯、甲基对硫磷和西维因分别产生了 216, 271 和 192 倍抗药性 (Yu, 1991), 同样, 中部和南部地区的草地贪夜蛾种群对上述 3 种杀虫剂也分别产生了高达 264, 517 和 507 倍抗性 (Yu, 1992)。随后 Bt 抗虫基因作物得到广泛应用, 然而随着草地贪夜蛾对 Bt 作物不断产生抗性, 导致在南美洲大部分地区仍需要使用大

量杀虫剂对草地贪夜蛾进行防控, 其中以使用双酰胺类、多杀菌素等新型化学杀虫剂为主 (Burtet *et al.*, 2017)。但 Gutiérrez-Moreno 等 (2019) 报道发现, 波多黎各的草地贪夜蛾田间种群已对双酰胺类杀虫剂氟虫双酰胺和氯虫苯甲酰胺分别产生了 500 倍和 160 倍的高水平抗性, 对乙基多杀菌素也产生了 14 倍的中等水平抗性, 但对甲维盐仍处于低水平抗性。

草地贪夜蛾对化学杀虫剂的抗药性机制是复杂且不断进化的, 其中代谢抗性和靶标抗性是主要的抗性机制。乙酰胆碱酯酶 (acetylcholine esterase, AChE) 基因 *Ace-1* 是有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂的作用靶标。Carvalho 等 (2013) 研究发现, 与敏感品系相比, 在巴西通过室内选育的草地贪夜蛾毒死蜱抗性品系的 *Ace-1* 基因在 A201S, G227A 和 F290V 位点均发生了点突变, 这些位点突变在其他昆虫中已被证实是对有机磷类杀虫剂产生抗性的重要原因。电压门控钠通道 (voltage-gated sodium channels, VGSC) 是拟除虫菊酯类杀虫剂的作用靶标, VGSC 基因 T929I, L932F 和 L1014F 位点突变被证实可引起 *kdr* 抗性, 且在小菜蛾 *Plutella xylostella* 中更可引起 super *kdr* 抗性。鱼尼丁受体 (ryanodine receptor, RyR) 是双酰胺类杀虫剂的作用靶标, RyR 基因点突变最早在小菜蛾中被报道是其对双酰胺类药剂产生抗性的主要机制, 随后在番茄潜叶蛾 *Tuta absoluta* 和二化螟 *Chilo suppressalis* 中也有相关报道

(Guo *et al.*, 2014; Roditakis *et al.*, 2015; Yao *et al.*, 2017)。在小菜蛾中, *RyR* 基因 G4946E 和 I4790M 位点的突变是其对氯虫苯甲酰胺产生抗性的重要机制(Guo *et al.*, 2014; Yan *et al.*, 2014)。Boaventura 等(2019)研究表明, *RyR* 基因 I4743M 和 G4891E 位点的突变是草地贪夜蛾对双酰胺类药剂产生抗性的主要机制。

尽管国外已报道草地贪夜蛾对有机磷类、氨基甲酸酯类、拟除虫菊酯类以及一些新型化学杀虫剂都产生了不同程度的抗性,但是由于草地贪夜蛾刚入侵我国,其对常见防治药剂的敏感性水平尚不知晓。因此,为明确湖北草地贪夜蛾田间种群的药剂敏感性现状,本研究根据农业农村部《农药管理条例》推荐的 25 种用于应急防控草地贪夜蛾的药剂(农业农村部, 2019),选择了湖北省草地贪夜蛾防治的 4 种主打药剂,对湖北草地贪夜蛾田间种群对这 4 种杀虫剂的敏感性进行测定,并利用分子检测

方法对有机磷类、氨基甲酸酯类、拟除虫菊酯类和双酰胺类药剂的作用靶标 *Ace-1*, *VGSC* 和 *RyR* 的点突变进行检测。研究结果可为湖北草地贪夜蛾防治药剂的选择提供参考,并对全国草地贪夜蛾的科学防控具有重要现实意义。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

草地贪夜蛾田间种群分别采自湖北省黄冈市、武穴市、咸宁市和荆州市,具体采样信息见表 1。田间种群采集后带回实验室,经室内形态检查确定为草地贪夜蛾后,使用人工饲料饲养,选取第 1 代繁殖孵化后代的 3 龄初幼虫作为室内生物测定试验虫源。人工饲料主要成分为黄豆粉、玉米粉和酵母粉等。羽化后的成虫饲养在长 × 宽 × 高 = 30 cm × 30 cm × 30 cm 的养虫笼内,成虫用 10% 的蜂蜜水补充营养。

表 1 湖北省 4 个地区玉米田草地贪夜蛾田间种群采集信息
Table 1 Sampling data of *Spodoptera frugiperda* populations from corn fields in four regions of Hubei Province, central China

采样地区 Sampled regions	经纬度 Latitude and longitude	采集时间(年-月-日) Collection date (year-month-day)	样本虫态 Developmental stage of samples
武穴 Wuxue	115.55°E, 29.85°N	2019-7-14	3-4 龄幼虫 3rd-4th instar larva
荆州 Jingzhou	112.23°E, 30.33°N	2019-8-3	5-6 龄幼虫 5th-6th instar larva
咸宁 Xianning	113.90°E, 29.98°N	2019-9-12	4-6 龄幼虫 4th-6th instar larva
黄冈 Huanggang	114.88°E, 30.43°N	2019-9-17	3-6 龄幼虫 3rd-6th instar larva

1.2 供试药剂

60 g/L 乙基多杀菌素悬浮剂 (spinetoram SC) (美国陶氏益农公司); 95% 甲维盐 (methilamino abamectin benzoate) 原药 (内蒙古嘉宝仕生物科技股份有限公司); 98% 氯虫苯甲酰胺 (chlorantraniliprole) 原药 (山东潍坊润丰化工股份有限公司); 95% 茚虫威 (indoxacarb) 原药 (湖北威德刊化学科技有限公司)。

1.3 生物测定方法

参照 NY/T 1154.14-2008, 采用浸叶法进行生物测定。原药用丙酮与 N-N 二甲基甲酰胺的混合溶剂 (1:4, v/v) 配制成母液, 随后用含 0.1% (v/v) Triton X-100 的蒸馏水稀释 6~7 个浓度梯度。以含 0.1% (v/v) Triton X-100 的蒸馏水作对照。取幼嫩的玉米叶, 经过清洗晾干后, 剪成 8~9 cm 叶段, 浸渍药液中漂洗 10 s 后取出, 每个药液浸 24 段, 在室内干燥通风环境晾干后, 每段平均分为 3 小段, 置于底层铺有 2 mL 2% 琼脂凝胶的 12 孔细胞培养板中,

每孔 2~3 小段。挑选体表圆润, 行为活泼的经过 4 h 饥饿处理的 3 龄初幼虫, 投入十二孔板, 每孔 1 头, 使用两层宣纸封口并盖上培养板盖。将 12 孔板置于 25 ± 1°C、相对湿度 60%、光周期 16L:8D 的人工气候箱饲养。每处理重复 3 次。根据药剂作用特点于 24 h 检查乙基多杀菌素和氯虫苯甲酰胺结果, 48 h 检查茚虫威和甲维盐结果, 统计死亡率。试虫死亡判断标准: 使用毛笔尖轻触虫体, 不能正常爬行视为死亡。对照组死亡率在 10% 以下为有效试验。乙基多杀菌素制剂使用清水稀释, 设置清水作为对照。

1.4 总 RNA 提取及反转录

用 RNAiso Plus 试剂盒 (大连宝生物, 大连) 提取单头 3 龄草地贪夜蛾幼虫总 RNA, 用 NanoPhotometer 超微量分光光度计 (IMPLEN, 德国) 检测 RNA 的纯度及浓度, 并用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测提取 RNA 的完整性。

检测合格的总 RNA 用 PrimeScriptTM RT Reagent

Kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time)反转录试剂盒(大连宝生物,大连)反转录为 cDNA,置于 -20°C 冰箱保存备用。

1.5 靶标位点突变检测

根据报道的引物序列,扩增草地贪夜蛾 *Ace-1* 基因(GenBank 登录号: KC435023)和 *RyR* 基因(GenBank 登录号: MK805909.1)片段,并检测其靶标位点突变情况(Carvalho *et al.*, 2013; Boaventura *et al.*, 2019);利用 Primer Premier 5 软件设计针对草地贪夜蛾 *VGSC* 基因(GenBank 登录号: KC435025)位点突变的特异性引物,扩增 *VGSC* 基因片段检测其靶标位点突变情况。共检测草地贪夜蛾 80 头。引物序列见表 2。

表 2 靶标位点突变检测引物序列

Table 2 Primer sequences for detecting target

site mutations		
引物 Primers	引物序列(5'-3') Primer sequences	参考文献 References
Sf-Ace-1-F	TAAGAACGCTGCTGTGCATGC	Carvalho <i>et al.</i> ,
Sf-Ace-1-R	TGGCCTGTCTTCCAACATCA	2013
Sf-G4946-F	GTGATGGGCAACTTCAAC	
Sf-G4946-R	TTTTCCGTTATGCGTGAC	Boaventura <i>et al.</i> ,
Sf-I4790-F	CGAGGACTTCTTACATGG	2019
Sf-I4790-R	AATTTACGGCAATCTCC	
Sf-VGSC-F	TCACTGTTGCGTTCCTTTCC	本研究
Sf-VGSC-R	TCTGTGCCGAGTTCAGTTC	This study

以单头幼虫 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增,反应体系($20\ \mu\text{L}$): $2\times$ 高保真 DNA 聚合酶 $10\ \mu\text{L}$, ddH₂O $7\ \mu\text{L}$, 正反向引物各 $1\ \mu\text{L}$, cDNA 模板 $1\ \mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: 95°C 预变性 3 min; 95°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 40 s, 35 个循环;最后 72°C 延伸 10 min。PCR 产物由 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,条带正确的 PCR 产物送北京擎科生物公司测序。

1.6 数据分析

使用 POLO Plus 2.0 软件处理生测数据。使用 Chromas 2.31 软件对测序峰图进行分析,核对 *Ace-1*, *VGSC* 和 *RyR* 编码蛋白在上述位置对应核苷酸是否发生点突变。用 Excel 记录统计每个幼虫个体的基因型以及每个种群的突变频率。靶标基因突变频率% = [(抗性纯合子个体数/检测总数) + (抗性杂合子个体数/检测总数/2)] $\times 100\%$ 。

2 结果

2.1 生物测定结果

4 种杀虫剂对采自湖北黄冈、武穴、咸宁和荆州 4 个地区草地贪夜蛾 3 龄初幼虫的室内毒力测定结果见表 3。结果表明,这 4 个种群对氯虫苯甲酰胺、乙基多杀菌素、甲维盐都较为敏感,其中对甲维盐最敏感,LC₅₀ 值为 $0.004\sim 0.014\ \text{mg/L}$;其次是对乙基多杀菌素,LC₅₀ 值为 $0.044\sim 0.184\ \text{mg/L}$ 。对湖北 4

表 3 4 种杀虫剂对湖北草地贪夜蛾田间种群 3 龄初幼虫的毒力

Table 3 Toxicity of four insecticides to the early 3rd instar larvae of field populations of *Spodoptera frugiperda* in Hubei

种群 Population	杀虫剂 Insecticide	斜率 \pm 标准误 Slope \pm SE	LC ₅₀ (95% CL) (mg/L)	卡方值 χ^2	自由度 df
武穴 Wuxue	乙基多杀菌素 Spinetoram	1.182 \pm 0.193	0.184 (0.099 - 0.293)	5.315	3
	氯虫苯甲酰胺 Chlorantraniliprole	0.518 \pm 0.103	10.180 (4.317 - 30.965)	1.539	3
	茚虫威 Indoxacarb	1.624 \pm 0.200	8.635 (5.844 - 12.530)	6.717	3
	甲维盐 Methylamino abamectin benzoate	2.942 \pm 0.635	0.014 (0.008 - 0.020)	1.388	4
咸宁 Xianning	乙基多杀菌素 Spinetoram	1.760 \pm 0.262	0.122 (0.058 - 0.196)	2.531	4
	氯虫苯甲酰胺 Chlorantraniliprole	0.637 \pm 0.133	28.907 (11.977 - 75.327)	2.418	3
	茚虫威 Indoxacarb	1.359 \pm 0.223	19.813 (12.779 - 31.784)	5.544	4
	甲维盐 Methylamino abamectin benzoate	1.914 \pm 0.276	0.004 (0.003 - 0.006)	1.476	4
黄冈 Huanggang	乙基多杀菌素 Spinetoram	1.182 \pm 0.193	0.044 (0.018 - 0.077)	10.633	5
	氯虫苯甲酰胺 Chlorantraniliprole	1.075 \pm 0.124	9.651 (5.545 - 15.651)	7.177	5
	茚虫威 Indoxacarb	1.307 \pm 0.308	135.824 (70.955 - 587.352)	2.475	3
	甲维盐 Methylamino abamectin benzoate	1.088 \pm 0.154	0.004 (0.002 - 0.006)	5.778	4
荆州 Jingzhou	乙基多杀菌素 Spinetoram	2.215 \pm 0.283	0.128 (0.097 - 0.173)	2.350	5
	氯虫苯甲酰胺 Chlorantraniliprole	0.817 \pm 0.110	12.231 (6.647 - 22.934)	3.396	4
	茚虫威 Indoxacarb	1.137 \pm 0.147	13.702 (7.441 - 25.531)	2.732	3
	甲维盐 Methylamino abamectin benzoate	2.875 \pm 0.508	0.009 (0.007 - 0.012)	6.924	5

CL: 置信限 Confidence limit. 选用饥饿 4 h 的 3 龄初幼虫,杀虫剂处理 24 h(乙基多杀菌素和氯虫苯甲酰胺)或 48 h(茚虫威和甲维盐)后检测死亡率。The early 3rd instar larvae subjected to starvation for 4 h were treated with insecticides, and the mortality rate was determined at 24 h (spinetoram and chlorantraniliprole) or 48 h (indoxacarb and methylamino abamectin benzoate) post treatment.

个种群氯虫苯甲酰胺的 LC_{50} 值为 9.651 ~ 28.907 mg/L,表现出较好的毒力效果。在这 4 种药剂中,茚虫威毒力效果较差, LC_{50} 值为 8.635 ~ 135.824 mg/L,其中武穴种群对茚虫威较为敏感, LC_{50} 值为 8.635 mg/L;茚虫威对黄冈种群表现出较差的毒力效果, LC_{50} 值为 135.824 mg/L。

2.2 Ace-1 基因型和突变频率分析

通过对 *Ace-1* 基因 PCR 扩增和测序共检测湖北 4 个田间种群 80 头幼虫,通过序列比对和峰图分析发现,*Ace-1* 基因中与有机磷抗性相关的 3 个突变位点(A201S, G227A 和 F290V)在湖北草地贪夜蛾田间种群中均能检测到,且 F290V 位点能够检测到抗

性纯合突变(图 1)。突变频率分析表明,A201S 和 G227A 位点只发生了抗性杂合突变,且发生频率较低,突变频率分别为 5.3% ~ 10.0% 和 5.3% ~ 36.8% 之间,纯合敏感型分别占比 94.7% ~ 100% 和 63.2% ~ 94.7% 之间;而 F290V 位点既存在抗性杂合突变,又存在抗性纯合突变,突变频率分别为 10.0% ~ 68.4% 和 15.0 ~ 65.0% 之间。种群分析表明,A201S 位点突变在 4 个种群中的抗性基因频率均较低,在咸宁和荆州种群中更是未检测到抗性突变,G227A 位点抗性基因频率在 2.7% ~ 11.1% 之间,而 F290V 位点抗性频率较高,在荆州种群中抗性基因频率甚至高达 60.5% (表 4)。

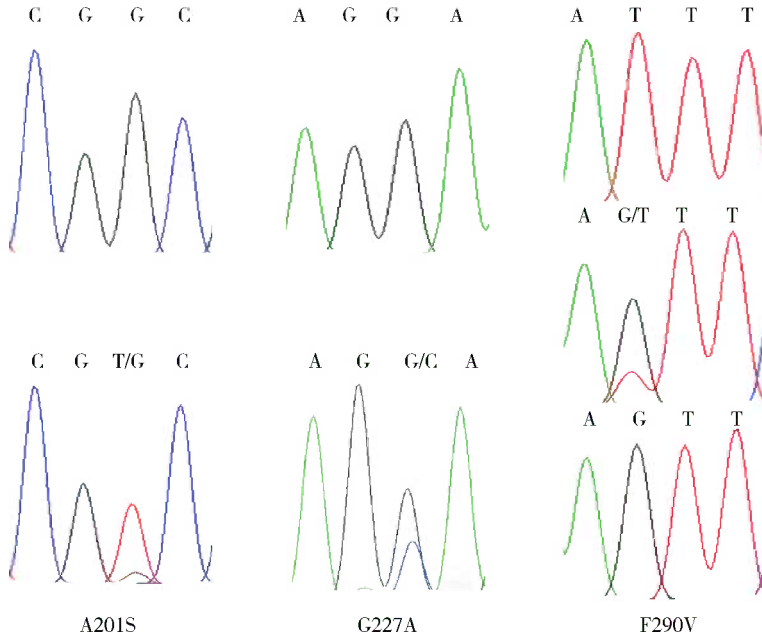


图 1 *Ace-1* 基因 A201S, G227A 和 F290V 位点测序峰图

Fig. 1 Sequencing chromatogram peaks of *Ace-1* in the sites of A201S, G227A and F290V

表 4 湖北 4 个田间种群草地贪夜蛾幼虫 *Ace-1* 靶位点 A201S, G227A 和 F290V 突变的基因型及抗性基因频率

Table 4 Genotypes and resistance gene frequencies of target site mutation of *Ace-1* at A201S, G227A and F290V of *Spodoptera frugiperda* larvae from four field populations in Hubei

种群 Population	试虫数 Number of test insects	A201S 位点基因型 (%)			抗性基因频率 (%)	G227A 位点基因型 (%)			抗性基因频率 (%)	F290V 位点基因型 (%)			抗性基因频率 (%)
		Genotypes at A201S			Resistance gene frequency	Genotypes at G227A			Resistance gene frequency	Genotypes at F290V			Resistance gene frequency
		SS	RS	RR		SS	RS	RR		SS	RS	RR	
武穴 Wuxue	20	94.7	5.3	0	2.7	63.2	36.8	0	5.3	45.0	55.0	0	27.5
咸宁 Xianning	20	100.0	0	0	0	80.0	20.0	0	11.1	25.0	10.0	65.0	7.0
黄冈 Huanggang	20	90.0	10.0	0	5.0	80.0	20.0	0	11.1	30.0	55.0	15.0	42.5
荆州 Jingzhou	20	100.0	0	0	0	94.7	5.3	0	2.7	5.3	68.4	26.3	60.5

SS: 敏感型纯合子 Susceptible homozygote; RS: 抗性杂合子 Resistant heterozygote; RR: 抗性纯合子 Resistant homozygote.

2.3 VGSC 和 RyR 基因型和突变频率分析

根据草地贪夜蛾 *VGSC* 基因序列 (GenBank 登录号: KC435025) 设计合成 *VGSC* 基因突变检测引物 Sf-VGSC-F 和 Sf-VGSC-R (引物序列见表 2); 参照 Boaventura 等 (2019) 的报道合成 *RyR* 基因突变检测

引物 Sf-G4946-F/Sf-G4946-R 和 Sf-I4790-F/Sf-I4790-R。对单头草地贪夜蛾 *VGSC* 和 *RyR* 基因进行 PCR 扩增, 目的片段长度为分别为 614, 108 和 144 bp。测序结果分析表明, 检测的 80 头样本 *VGSC* 和 *RyR* 基因均未出现靶标位点突变 (图 2)。

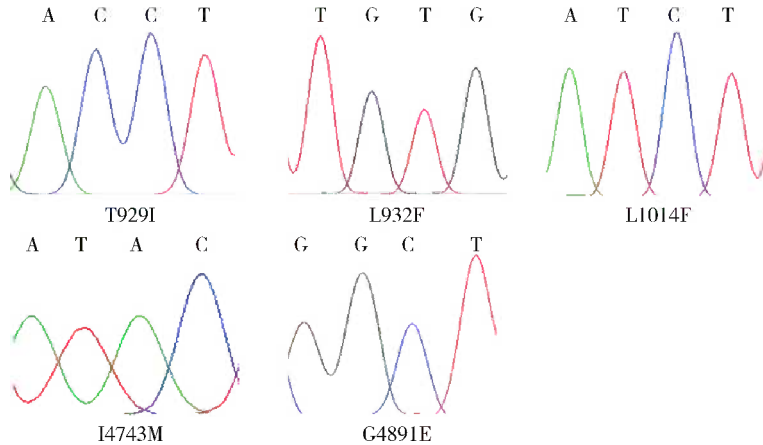


图 2 *VGSC* 基因 T929I, L932F 和 L1014F 位点以及 *RyR* 基因 I4743M 和 G4891E 位点测序峰图

Fig. 2 Sequencing chromatogram peaks of *VGSC* at the sites of T929I, L932F and L1014F, and *RyR* at the sites of I4743M and G4891E

3 讨论

草地贪夜蛾的入侵对我国玉米、小麦等粮食作物生产造成严重威胁, 对其进行有效防控至关重要 (徐丽娜等, 2019)。草地贪夜蛾作为一种暴发性害虫, 危害猖獗, 防控形势严峻, 化学农药在草地贪夜蛾防控中发挥着重要的作用。本研究通过生物测定明确了采自湖北黄冈、武穴、咸宁和荆州的草地贪夜蛾田间种群对氯虫苯甲酰胺、乙基多杀菌素、茚虫威和甲维盐的敏感性, 结果表明湖北草地贪夜蛾田间种群对这 4 种杀虫剂均较敏感。毒力水平: 甲维盐 > 乙基多杀菌素 > 氯虫苯甲酰胺 > 茚虫威。结果与赵胜园等 (2019) 的研究结果一致, 说明甲维盐、乙基多杀菌素等杀虫剂作为防治草地贪夜蛾的推荐药剂 (农业农村部, 2019) 可继续在湖北草地贪夜蛾防治中进行使用。

有机磷类和氨基甲酸酯类作为传统化学杀虫剂, 在国外是最早用于草地贪夜蛾防治的药剂。但由于长期不合理使用, 目前草地贪夜蛾已对多种有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂产生了不同程度的抗药性 (Carvalho *et al.*, 2013)。研究表明, *AChE* 基因点突变导致的对有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂的不敏感性是导致害虫抗性产生的主要原因 (Walsh *et al.*,

2001)。例如, 巴西草地贪夜蛾种群对有机磷杀虫剂产生抗药性与 *Ace-1* 基因 A201S, G227A 和 F290V 3 个位点突变有关 (Carvalho *et al.*, 2013)。而最新研究表明, 墨西哥草地贪夜蛾田间种群 *Ace-1* 基因同样发生了点突变, 但是只检测到了 A201S 和 F290V 突变, 并未检测到 G227A 突变 (Herrera-Mayorga *et al.*, 2019)。本研究通过对湖北草地贪夜蛾 4 个种群 80 头幼虫样本的检测发现, 这些样本中 *Ace-1* 基因不但在 A201S, G227A 和 F290V 3 个位点发生了抗性杂合突变, 在 F290V 位点还存在 15.0% ~ 65.0% 的抗性纯合突变。这一结果与 Herrera-Mayorga 等 (2019) 报道仅发现两个位点突变的结果稍有差异, 可能是由于抗性水平差异导致的。我们所测的草地贪夜蛾样本中 *Ace-1* 基因在 A201S, G227A 和 F290V 位点均发生突变, 该突变可降低其对有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂的敏感性, 因此, 在草地贪夜蛾田间防治时, 建议少用或不用这两类药剂, 避免更高水平抗性的产生。

拟除虫菊酯类农药在国外是继有机磷和氨基甲酸酯类农药之后, 使用最广泛的一类农药, 对草地贪夜蛾具有较好的防效, 在农业农村部公布的草地贪夜蛾应急防治用药名单中有高效氯氟氰菊酯、氟氯氰菊酯、甲氰菊酯等多种单剂和复配制剂。害虫对拟除虫菊酯类杀虫剂抗性的产生与靶点不敏感性有

关(Liu *et al.*, 1981; Yu, 1993; Tan and McCaffery, 1999)。拟除虫菊酯类杀虫剂的作用靶标是 VGSC, VGSC 基因发生突变引起的杀虫剂抗药性在桃蚜 *Myzus persicae*、棉蚜 *Aphis gossypii* 等多种昆虫中都有报道,如桃蚜 VGSC IIS6 跨膜区的 L1014F 和 M918T 位点突变是桃蚜对拟除虫菊酯类和 DDT 产生抗药性的主要原因(Martinez-Torres *et al.*, 1999; Bass *et al.*, 2014),而棉蚜 M918T 突变是其对多种拟除虫菊酯类杀虫剂产生抗药性的关键(Chen *et al.*, 2017)。已有报道发现草地贪夜蛾拟除虫菊酯抗性品系 VGSC 发生了 T929I, L932F 和 L1014F 位点突变,但突变频率相对较低(Carvalho *et al.*, 2013)。本研究通过对湖北 4 个草地贪夜蛾种群 VGSC 检测发现,80 头个体均不存在 VGSC 突变。但 Zhang 等(2019)对入侵我国 16 省份的 105 个草地贪夜蛾样品的 VGSC 突变检测发现, L932F 位点存在 45.5% 的杂合突变。这一结果的差异可能是由于检测种群的差异造成,本研究仅对湖北 4 个种群 80 个个体进行检测,而 Zhang 等(2019)的样本来源范围更大,且个体数也较多。根据本研究结果,建议在湖北草地贪夜蛾防控中可以继续使用农业部推荐的拟除虫菊酯类药剂进行田间防治。

双酰胺类农药是一类作用于昆虫的鱼尼丁受体的化学杀虫剂,对多种害虫都具有较好的防效,被广泛应用于各种鳞翅目害虫的化学防治中。但近年来,多种害虫对双酰胺类杀虫剂已产生了极高水平的抗药性(Wang and Wu, 2012; Guo *et al.*, 2014)。抗性机制研究表明鳞翅目害虫对双酰胺类杀虫剂的抗性机制与鱼尼丁受体靶标位点突变有关(Trocza *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2014; Nauen *et al.*, 2016)。例如,鱼尼丁受体基因 I4743M 位点发生了纯合突变的斜纹夜蛾 *Spodoptera exigua* 田间种群,对氯虫苯甲酰胺产生了高达 154 倍的高水平抗性(Zuo *et al.*, 2019)。在草地贪夜蛾中,其对双酰胺类农药产生抗药性的机制与 RyR I4743M 和 G4891E 位点突变有关(Boaventura *et al.*, 2019)。本研究在湖北草地贪夜蛾田间种群中并未检测到 RyR 靶标位点突变,这与生测结果中湖北草地贪夜蛾田间种群对氯虫苯甲酰胺敏感性较高的结果一致。值得注意的是,到目前为止,国内还没有报道发现草地贪夜蛾田间种群 RyR 存在靶标突变。因此,建议在草地贪夜蛾的田间防治过程中可继续使用双酰胺类杀虫剂。

化学杀虫剂在草地贪夜蛾的防治中扮演着重要作用。本研究结果明确了湖北草地贪夜蛾田间种群

对 4 种杀虫剂的敏感性现状,且明确了有机磷类、氨基甲酸酯类、拟除虫菊酯类和双酰胺类杀虫剂作用靶标的突变情况,研究结果对指导湖北草地贪夜蛾防治具有重要实践意义。

参考文献 (References)

- Bass C, Puinean AM, Zimmer CT, Denholm I, Field LM, Foster SP, Gutbrod O, Nauen R, Slater R, Williamson MS, 2014. The evolution of insecticide resistance in the peach potato aphid, *Myzus persicae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 51: 41–51.
- Boaventura D, Bolzan A, Padovez FE, Okuma DM, Nauen R, 2019. Detection of a ryanodine receptor target-site mutation in diamide insecticide resistant fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Pest Manag. Sci.*, 76(1): 45–54.
- Burtet LM, Bernardi O, Melo AA, Pes MP, Strahl TT, Guedes JV, 2017. Managing fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), with Bt maize and insecticides in southern Brazil. *Pest Manag. Sci.*, 73(12): 2569–2577.
- Carvalho RA, Omoto C, Field LM, Williamson MS, Bass C, 2013. Investigating the molecular mechanisms of organophosphate and pyrethroid resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. *PLoS ONE*, 8(4): e62268.
- Chen XW, Tie MY, Chen AQ, Ma KS, Li F, Liang PZ, Liu Y, Song DL, Gao XW, 2017. Pyrethroid resistance associated with M918L mutation and detoxifying metabolism in *Aphis gossypii* from Bt cotton growing regions of China. *Pest Manag. Sci.*, 73(11): 2353–2359.
- Guo L, Wang Y, Zhou XG, Li ZY, Liu SZ, Liang P, Gao XW, 2014. Functional analysis of a point mutation in the ryanodine receptor of *Plutella xylostella* (L.) associated with resistance to chlorantraniliprole. *Pest Manag. Sci.*, 70: 1083–1089.
- Gutiérrez-Moreno R, Mota-Sánchez D, Blanco CA, Whalon ME, Terán-Santofimio H, Rodríguez-Maciél JC, DiFonzo C, 2019. Field-evolved resistance of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) to synthetic insecticides in Puerto Rico and Mexico. *J. Econ. Entomol.*, 112(2): 792–802.
- Herrera-Mayorga EV, Bello-Ruiz DG, Paredes-Sánchez FA, Segovia-Tagle V, García-Aguirre KK, Lara-Ramírez EE, Rivera G, 2019. Identification of SNP's in the *ace-1* gene of *Spodoptera frugiperda* associated with resistance to organophosphorus insecticide. *Southwest. Entomol.*, 43(4): 855–865.
- Jin T, Lin YY, Ma GC, Xiang KP, Chu XQ, Peng ZQ, Yi KX, 2020. Oviposition rhythms of *Spodoptera frugiperda* and its oviposition preferences to different medium. *Plant Prot.*, 46(3): 99–103. [金涛, 林玉英, 马光昌, 向凯萍, 楚小强, 彭正强, 易克贤, 2020. 草地贪夜蛾的产卵节律及其对不同介质的产卵选择性. 植物保护, 46(3): 99–103]
- Liu MY, Tzeng YJ, Sun CN, 1981. Diamondback moth resistance to several synthetic pyrethroids. *J. Econ. Entomol.*, 74(4): 393–396.
- 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 Mol. Biol.*, 8(3): 339–346.
- Ministry of Agriculture and Rural Affairs, 2019. Recommended list for emergency control of *Spodoptera frugiperda*. *Agric. Technol. Service*, 36(5): 108. [农业部, 2019. 草地贪夜蛾应急防治用药推荐名单. 农技服务, 36(5): 108]
- Montezano DG, Specht A, Sosa-Gómez DR, Sosa-Gomez DR, Roque-Specht VF, Sousa-Silva JC, Paula-Moraes SV, Peterson JA, Hunt TE, 2018. Host plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas. *Afr. Entomol.*, 26(2): 286–300.
- Nauen R, Steinbach D, 2016. Resistance to diamide insecticides in lepidopteran pests. In: Horowitz AR, Ishaaya I eds. *Advances in Insect Control and Resistance Management*. Springer Nature Switzerland AG, Basel. 219–240.
- Roditakis E, Vasakis E, Grispu M, Stavrakaki M, Nauen R, Gravouil M, Bassi A, 2015. First report of *Tuta absoluta* resistance to diamide insecticides. *J. Pest Sci.*, 88: 9–16.
- Tan JG, McCaffery AR, 1999. Expression and inheritance of nerve insensitivity resistance in larvae of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from China. *Pestic. Sci.*, 55(6): 617–625.
- Trocza B, Zimmer CT, Elias J, Schorn C, Bass C, Davies TG, Field LM, Williamson MS, Slater R, Nauen R, 2012. Resistance to diamide insecticides in diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) is associated with a mutation in the membrane-spanning domain of the ryanodine receptor. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 42(11): 873–880.
- Walsh SB, Dolden TA, Moores GD, Kristensen M, Lewis T, Devonshire AL, Williamson MS, 2001. Identification and characterization of mutations in housefly (*Musca domestica*) acetylcholinesterase involved in insecticide resistance. *Biochem. J.*, 359(Pt 1): 175–181.
- Wang X, Wu Y, 2012. High levels of resistance to chlorantraniliprole evolved in field populations of *Plutella xylostella*. *J. Econ. Entomol.*, 105(3): 1019–1023.
- Xu LN, Hu BJ, Su WH, Qi RD, Qiu K, Zheng ZY, Zhang QY, Zhou ZY, Qi SS, Hu F, Wang ZY, 2019. Fall armyworm damaging early sowing wheat in Anhui province. *Plant Prot.*, 45(6): 87–89. [徐丽娜, 胡本进, 苏卫华, 戚仁德, 邱坤, 郑兆阳, 张启勇, 周子燕, 戚士胜, 胡飞, 王振营, 2019. 安徽发现草地贪夜蛾为害早播小麦. 植物保护, 45(6): 87–89]
- Yan HH, Xue CB, Li GY, Zhao XL, Che XZ, Wang LL, 2014. Flubendiamide resistance and Bi-PASA detection of ryanodine receptor G4946E mutation in the diamondback moth (*Plutella xylostella* L.). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 115: 73–77.
- Yao R, Zhao DD, Zhang S, Zhou LQ, Wang X, Gao CF, Wu SF, 2017. Monitoring and mechanisms of insecticide resistance in *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae), with special reference to diamides. *Pest Manag. Sci.*, 73(6): 1169–1178.
- Yu SJ, 1991. Insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 39(1): 84–91.
- Yu SJ, 1992. Detection and biochemical characterization of insecticide resistance in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.*, 85(3): 675–682.
- Yu SJ, 1993. Inheritance of insecticide resistance and microsomal oxidases in the diamondback moth (Lepidoptera: Yponomeutidae). *J. Econ. Entomol.*, 86(3): 680–683.
- Zhang L, Liu B, Zheng WG, Liu CH, Zhang DD, Zhao SY, Xu PJ, Wilson K, Withers A, Jones CM, Smith JA, Chipabika G, Kachigamba DL, Nam K, d'Alencón E, Liu B, Liang XY, Jin MH, Wu C, Chakrabarty S, Yang XM, Jiang YY, Liu J, Liu XL, Quan WP, Wang GR, Fan W, Qian WQ, Wu KM, Xiao YT, 2019. High-depth resequencing reveals hybrid population and insecticide resistance characteristics of fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) invading China. *BioRxiv*, <http://dx.doi.org/10.1101/813154>.
- Zhao SY, Sun XX, Zhang HW, Yang XM, Wu KM, 2019. Laboratory test on the control efficacy of common chemical insecticides against *Spodoptera frugiperda*. *Plant Prot.*, 45(3): 10–14. [赵胜园, 孙小旭, 张浩文, 杨现明, 吴孔明, 2019. 常用化学杀虫剂对草地贪夜蛾防效的室内测定. 植物保护, 45(3): 10–14]
- Zuo YY, Ma HH, Lu WJ, Wang XL, Xu SW, Nauen R, Wu YD, Yang YH, 2019. Identification of the ryanodine receptor mutation I4743M and its contribution to diamide insecticide resistance in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Insect Sci.*, <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12695>.

(责任编辑: 赵利辉)