

桔小实蝇对敌百虫抗药性遗传分析

章玉苹^{1,2}, 曾 玲¹, 陆永跃¹, 梁广文¹

(1 华南农业大学 昆虫生态研究室, 广东 广州 510642; 2 广东省农业科学院 植物保护研究所, 广东 广州 510640)

摘要: 运用经典的杂交法, 采用剂量对数-死亡概率值回归分析法, 利用室内选育的抗性倍数为 65.96 的桔小实蝇抗敌百虫品系和敏感品系, 研究桔小实蝇对敌百虫的抗性形式遗传。结果表明, 杂交 F_1 代的显性度均在 0 ~ 1 的范围内, 说明桔小实蝇对敌百虫的抗性由不完全显性基因控制; 遗传因子数测定以及进一步的卡方检验可知 $\sum \chi^2_{F_2}$ 和 $\sum \chi^2_{BC_3}$ 值分别为 20.964 和 19.684, 均大于 $\chi^2_{0.05,9}$ (16.919), 表明桔小实蝇对敌百虫的抗性属多基因控制; 杂交后代其雌雄性比近似保持在 1:1, 说明桔小实蝇对敌百虫的抗性属常染色体控制。

关键词: 桔小实蝇; 敌百虫; 抗药性; 不完全显性; 遗传

中图分类号: Q965.9

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2008)01-0039-05

Genetic Analysis of *Bactrocera dorsalis* Resistance to Trichlorphon

ZHANG Yu-ping^{1,2}, ZENG Ling¹, LU Yong-yue¹, LIANG Guang-wen¹

(1 Lab of Insect Ecology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 Institute of Plant Protection, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The inheritance mode of *Bactrocera dorsalis* (Hendel) resistance to trichlorphon was evaluated by log dosage-probit mortality curves constructed from the response of adult to trichlorphon treatment. The insects used for study were taken from laboratory reared susceptible and resistant strains. The resistant strain exhibited over 65.96-fold of resistance to trichlorphon as compared with the susceptible strain. The results of genetic analysis indicated that the dominance degrees of F_1 generation were 0 to 1, which suggested that the major gene involved was incompletely dominant. The results from χ^2 analysis showed that the resistance of the insect to trichlorphon appeared to be controlled by two or more autosomal genes. The sex ration of F_1 generation was about 1:1, which showed that the resistant genetics to trichlorphon was autosomal.

Key words: *Bactrocera dorsalis*; trichlorphon; resistance; incomplete dominance; inheritance

昆虫产生抗药性的机理是由遗传因子决定的, 因此明确害虫种群抗药性的遗传特点是治理害虫抗药性的关键。20 世纪 50 年代国外就对昆虫的抗性形式遗传进行了研究, 国内则开始较晚, 较早报道的是淡色库蚊 *Culex pipiens* Pallens 对马拉硫磷抗药性的形式遗传规律^[1], 此后多种昆虫及螨类对不同药剂抗药性的形式遗传被研究和阐明, 如尼氏钝绥螨 *Amblyseius nicholsi* Ehara et lee^[2]、拟长毛钝绥螨 *Amblyseius pseudolongispinosus* Xin, Liang et ke、朱砂叶螨

Tetranychus cinnabarinus Bionduval^[3]、亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* Guenee、棉铃虫 *Heliothis armigera* (Huvner)^[4]、小菜蛾 *Plutella xylostella*^[5] 等。昆虫抗药性形式遗传方式研究主要体现在显性度、细胞质或染色体的影响以及遗传因子数上。桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis* (Hendel) 是热带和亚热带水果、蔬菜等的重要检疫性害虫, 目前危害严重, 造成的经济损失巨大。近年来桔小实蝇抗药性上升较为迅速, 2003 年至今, 该虫对敌百虫、高效氯氰菊酯、阿维菌素已

收稿日期: 2007-04-09

作者简介: 章玉苹 (1974—), 女, 博士; 通讯作者: 曾 玲 (1949—), 女, 教授, E-mail: zengling@scau.edu.cn

基金项目: 广东省科技计划项目 (2002B2160203; 2004A20401002); 农业部项目 (农农植保字 [2006] 003 号); 广东省桔小实蝇为害控制专项 (粤财农 [2003] 97; [2004] 92; [2005] 358)

从敏感水平上升到了中抗甚至高抗水平^[6-7]。关于桔小实蝇抗药性形式遗传研究方面目前鲜见有相关的报道。明确桔小实蝇对不同药剂产生抗药性的遗传学基础,特别是明确其形式遗传方式,对在桔小实蝇治理中延缓其抗药性产生、延长药剂使用寿命以及对其抗性的诊断、监测和抗性治理等都具有重要意义。本文应用经典的回交法研究了桔小实蝇对敌百虫、高效氯氰菊酯和阿维菌素抗药性的形式遗传方式,包括显性度、细胞质或染色体的影响以及遗传因子数等,以期桔小实蝇的抗药性治理等提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试虫来源及饲养

敏感品系和抗性品系均采自广州市杨桃公园。室内不接触任何药剂下用香蕉饲养繁殖21代获得敏感品系(susceptible strain,简称SS)。抗性品系(resistant strain to trichlorophon of LC_{50} ,简称TrR₅₀)的获得方法:采集野外种群,用敌百虫原药稀释后以 LC_{50} 的浓度,采用点滴法对幼虫进行群体筛选,处理后的幼虫放入湿润沙中,待其化蛹;蛹羽化为成虫3~5 d时再以 LC_{50} 的浓度采用药膜法处理1 h后未死亡的虫继续饲养,筛选27代。饲养条件:温度25~28℃,相对湿度>60%,光周期16 h光:8 h暗。

1.2 供试药剂及仪器

$w=90\%$ 敌百虫原粉,江苏南通江山农药化工股份有限公司生产;微量点滴仪(0.04~0.05 μL),南京农业大学制。

1.3 生物测定方法

采用药膜法。将供试药剂用丙酮配制成母液,稀释成5~6个浓度。将5 mL药液倒入250 mL三角瓶中,摇动,当瓶壁上形成均匀药膜后,将药液倒掉。待丙酮挥发后把试虫引入三角瓶中,放入沾有 $\varphi=5\%$ 蜜糖水的棉球后,用纱布封住瓶口并用橡皮圈扎紧,倒立放置。设丙酮为对照。每个浓度处理10头,重复3次。24 h后检查死亡率,以将其翻身后30 s内不能翻转为死亡。对照组死亡率在10%以下为有效试验。试验数据用EXCEL处理。

1.4 抗药性遗传方式研究

1.4.1 杂交回交试验 取抗性品系(TrR₅₀)、敏感品系(SS)桔小实蝇羽化后尚未交配的成虫进行群体杂交。

正交:TrR₅₀♀×SS♂,得F₁代(RS);反交:TrR₅₀♂×SS♀,得F₁代(SR);自交F₂:F₁代自交得F₂代;回交BC:F₁代与亲本回交得到BC代,与抗性亲

本TrR₅₀回交得BC₁代(F₁♀×TrR₅₀♂)和BC₂代(F₁♂×TrR₅₀♀),与敏感亲本SS回交得BC₃代(F₁♀×SS♂)和BC₄代(F₁♂×SS♀)。

根据毒力回归方程进行统计分析^[8],分别以SS、TrR₅₀、RS、SR、F₂代和BC代不同浓度对数值为自变量,相对应的死亡率的概率值为应变量,计算出毒力回归方程(log concentration-probit equation,简称LC-P line)、致死中浓度(LC_{50})及其95%置信区间(95% confidence interval,简称95% CI)、相关系数(correlation index,简称R)等相关参数。抗性倍数(resistant multiple,简称Rm)按下式计算[以敏感品系(SS)为参照,并以 LC_{50} 的95%置信限是否有重叠作为判断不同种群间药剂敏感度差异是否显著的标准]:

$$\text{抗性倍数} = \frac{\text{供试种群的 } LC_{50}}{\text{敏感品系的 } LC_{50}}$$

1.4.2 显性度计算 抗性显性度(D)根据Stone^[9]提出的Falconer公式计算:

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

式中, X_1 、 X_2 、 X_3 分别为亲本对照品系(SS)、F₁代和亲本抗性品系(TrR₅₀)的 LC_{50} 值。当D=1时,抗性为完全显性;D=0时,为半显性;D=-1时,为完全隐性;0<D<1时,为不完全显性;-1<D<0时,为不完全隐性。

1.4.3 遗传因子数的确定 按Tsukamoto^[10]介绍的方法,对抗性遗传方式进行初步分析。假设桔小实蝇对药剂的抗性为单基因遗传,那么自交F₂与回交BC₃代的实测值与期望值的 LC_{50} 值的95%的置信区间应有明显的重合,即实测值与期望值之间无明显差异,且回交后代的毒力回归线在死亡率50%处、F₂代在死亡率25%或75%处会出现明显平坡,如果不出现明显平坡,表明抗性为2个或2个以上基因控制。

为了进一步证实初步分析的结果,用 χ^2 进行适合性检验。根据孟德尔关于1对等位基因的遗传规律,可以按照Georghiou^[11]的公式计算出BC代和F₂代在某个剂量的期望死亡率(E):

$$E_{BC} = (W_1 \text{ 或 } W_3) \times 0.5 + W_2 \times 0.5,$$

$$E_{F_2} = W_1 \times 0.25 + W_2 \times 0.5 + W_3 \times 0.25,$$

其中, W_1 、 W_2 、 W_3 分别表示SS、F₁、TrR₅₀在相应剂量的实际死亡率(由毒力回归方程求得)。

然后再根据Sokal和Rohlf^[12]的公式计算出对应于某个剂量的 χ^2 值:

$$\chi^2 = \frac{(F_1 - pq)^2}{pqn},$$

其中, F_1 为F₁代在某剂量的实际死亡虫数,p为期望死亡百分率, $q=1-p$,n为在此剂量的总测试虫

数. 最后对 BC 代和 F₂ 代的一系列期望值和观察值进行适合性检验,如果

$$\sum_{i=1}^n \chi_i^2 > \chi_{0.05}^2 (v = n - 1),$$

说明结果与期望不适合,抗性不是单基因遗传;反之表明结果与期望相符,抗性为单基因遗传.

2 结果与分析

2.1 敌百虫对桔小实蝇敏感亲本、抗性亲本、F₁ 代、F₂ 代及回交 BC 代的毒力

抗性倍数为 65.96 的 TrR₅₀ 品系与敏感品系 SS 杂交,正交 F₁ 代、反交 F₁ 代及合并 F₁ 代抗性倍数为

18.51、17.30 和 16.82,表明抗性已下降,且 95% 置信限绝大部分重合,说明 F₁ 代抗性没有明显差异;F₁ 与抗性亲本 TrR₅₀ 回交代 BC₁ 与 BC₂ 代抗性分别为 27.43、25.61 倍,且 95% 置信限绝大部分重合,因此与抗性亲本 TrR₅₀ 回交代抗性无明显差异,F₁ 与敏感亲本 SS 回交代 BC₃ 与 BC₄ 代抗性分别为 8.21 和 7.25 倍,且 95% 置信限绝大部分重合,因此与亲本 SS 回交代抗性无明显差异. 这些结果也表明杂交使亲本 TrR₅₀ 品系与 SS 品系间发生基因交流,TrR₅₀ 品系中的抗性基因被稀释,因此导致其频率下降 (表 1).

表 1 敌百虫对桔小实蝇抗敌百虫品系杂交后各品系的毒力

Tab. 1 The LC₅₀ of trichlorophon in different batch of TrR₅₀ strain of *Bactrocera dorsalis*

品系 strains	致死中浓度 ¹⁾ LC ₅₀ / (mg · L ⁻¹)	相关系数 R	抗性倍数 Rm
亲本 SS parent SS	1.587 2 (1.489 6 ~ 1.691 1)	0.990 5	1.00
亲本 TrR ₅₀ parent TrR ₅₀	104.695 4 (89.053 1 ~ 123.085 3)	0.928 7	65.96
正交 F ₁ quadrature F ₁	29.372 2 (22.257 1 ~ 38.762 0)	0.996 5	18.51
反交 F ₁ reciprocal cross F ₁	27.465 0 (21.402 5 ~ 35.244 8)	0.994 7	17.30
合并 F ₁ incorporate F1	26.691 6 (21.550 0 ~ 33.060 0)	0.987 9	16.82
F ₂ 实测值 real value of F ₂	30.043 4 (25.349 0 ~ 35.607 2)	0.952 8	18.93
F ₂ 期望值 expected value of F ₂	21.617 7 (16.401 5 ~ 28.492 8)	0.983 7	13.62
回交 BC ₁ back cross BC ₁	43.544 7 (35.837 4 ~ 52.909 4)	0.982 2	27.43
回交 BC ₂ back cross BC ₂	40.641 9 (32.893 9 ~ 50.214 9)	0.989 0	25.61
回交 BC ₃ 实测值 real value of BC ₃	13.032 4 (11.144 4 ~ 15.240 2)	0.991 8	8.21
回交 BC ₃ 期望值 expected value of BC ₃	4.804 4 (2.729 1 ~ 8.457 7)	0.962 5	3.03
回交 BC ₄ back cross BC ₄	11.500 9 (8.746 1 ~ 15.123 2)	0.982 8	7.25

1) 括号内数据为 95% 置信区间

2.2 显性度测定

根据表 1 中敌百虫的毒力结果,按显示度计算公式计算出正交显性度 D₁ = 0.393 2,反交显性度 D₂ = 0.361 1,合并的 F₁ 代显性度 D₃ = 0.347 5,三者均在 0 < D < 1 的范围内,说明桔小实蝇对敌百虫的抗性由不完全显性基因控制.

同时从图 1 与图 2 均可看出,敏感品系 (SS) 与抗性品系 (TrR₅₀) 斜率都比较高,杂交后代 F₁ 代的斜率则有所下降,说明两亲本的基因型较纯合,杂交后产生了杂合个体. 正交 F₁ 代、反交 F₁ 代及合并的 F₁ 代虽然位置有所不同 (LC₅₀ 值不同),但相对于敏感亲本 SS,都更靠近抗性亲本 TrR₅₀ (以 LC-P 线与死亡率几率值为 5 时的横线交点作比较),进一步说明桔小实蝇对敌百虫的抗性由不完全显性基因控制.

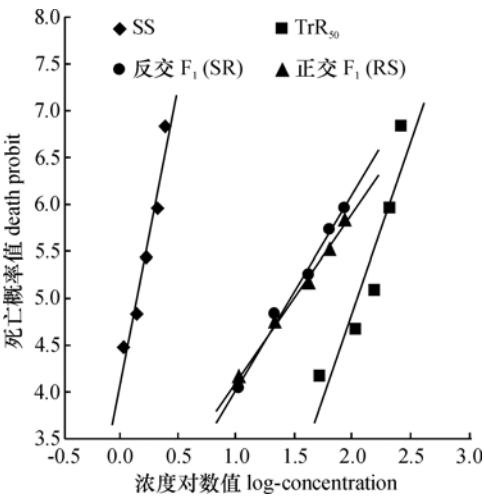


图 1 SS、TrR₅₀ 和杂交 F₁ 代的 LC-P 线
Fig. 1 LC-P lines for TrR₅₀, SS parents, reciprocal cross F₁ and quadrature F₁

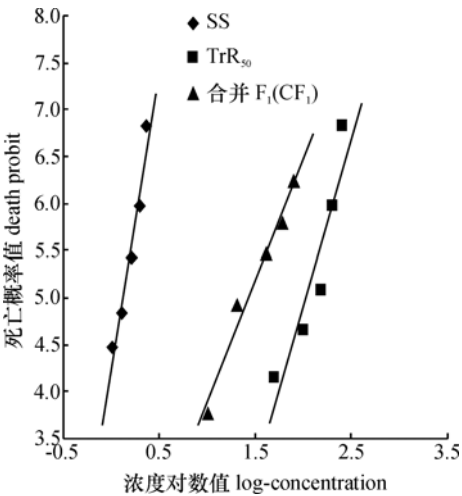


图2 SS、TrR₅₀与合并F₁代的LC-P线

Fig. 2 LC-P lines for TrR₅₀, SS parents and combined F₁

2.3 遗传因子数检验

随机抽取 300 头成虫检验,其雌雄性比近似保持在 1:1,因此进一步说明桔小实蝇对敌百虫的抗性属常染色体控制,与性染色体无关. 在遗传因子数检验研究中,若抗性为隐性遗传,则 F₁ 代与抗性亲本 TrR₅₀ 回交,若抗性为显性遗传,则 F₁ 代与敏感亲本 SS 回交^[13]. 由上述结论可知桔小实蝇对敌百虫的抗性属不完全显性,因此在遗传因子数的检验时,F₁ 代与敏感亲本 SS 回交,由于 F₁ 代与敏感亲本 SS 回交的 BC₃ 与 BC₄ 代 LC₅₀ 值 95% 置信限重叠,因此差异不显著,故以回交代 BC₃ 进行卡方检验.

假定桔小实蝇对敌百虫抗性为单基因遗传,则自交 F₂ 与回交代 BC₃ 的实测值与期望值的 LC₅₀ 值 95% 的置信区间应有明显的重合,且自交 F₂ 的 LC-P 线在死亡率 25% 或 75% 处会有明显的平台,回交 BC 的 LC-P 线在死亡率 50% 处也应有明显的平台.

而由表 1 可知,F₂ 代的实测值与期望值、回交代 BC₃ 实测值与期望值的 LC₅₀ 值 95% 置信区间几乎没有重合,这说明其实测值与期望值存在较大差异,此外由图 3、4 可知,BC₃ 和 F₂ 种群的实测值 LC-P 线与期望值曲线具有较大的差异,而且 F₂ 代的 LC-P 线在死亡率 25% 或 75% 处没有明显的平台,BC₃ 的 LC-P 线在死亡率 50% 处也没有明显的平台,故以上结果均否定桔小实蝇对敌百虫的抗性为单基因遗传假设.

进一步的适合性卡方检验(表 2、3),得到由合并的 F₁ 代自交的 F₂ 代卡方检测结果为 $\sum \chi^2_{F_2} = 20.964$,大于 $\chi^2_{0.05,9} (16.919)$;回交 $\sum \chi^2_{BC_3} = 19.684$,大于 $\chi^2_{0.05,9} (16.919)$,均表明桔小实蝇对敌百虫的抗药性为多基因遗传.

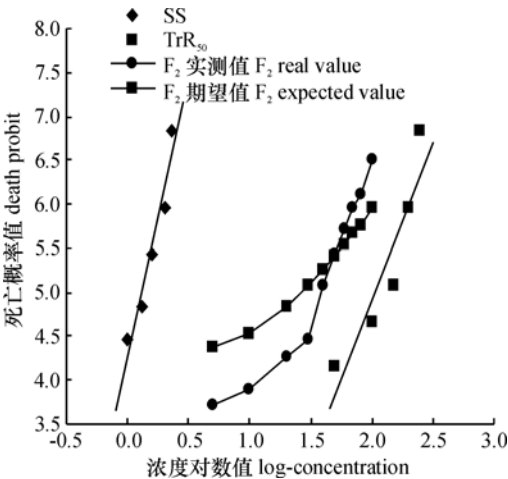


图3 亲本与 F₂ 的实测与期望 LC-P 线

Fig. 3 LC-P lines for parents, F₂ and expected F₂

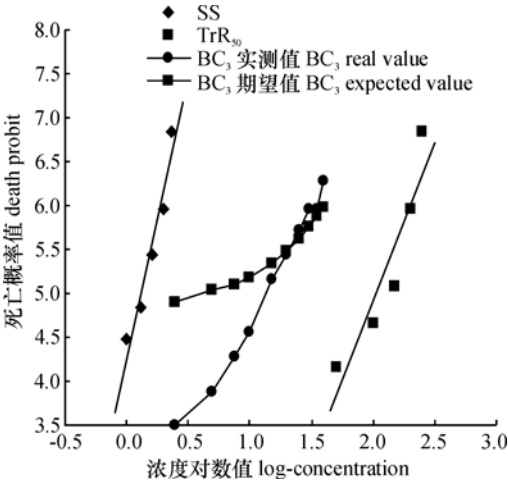


图4 亲本与 BC₃ 的实测及期望 LC-P 线

Fig. 4 LC-P lines for parents, BC₃ and expected BC₃

表 2 合并的 F₁ 代自交后代 F₂ 死亡率的 χ^2 检验

Tab. 2 Chi-square analysis of the mortality of combined F₁ selfcross treated with trichlorphon

$\rho_{\text{敌百虫trichlorphon/}}$ (mg · L ⁻¹)	供试虫数 insect number	实际死亡虫数	期望死亡率	χ^2
		real dead insect	expected death rate/%	
5	30	3	26.514 4	0.051
10	30	4	31.802 8	0.104
20	30	7	43.792 2	0.374
30	30	9	53.243 3	0.636
40	30	16	60.401 1	1.981
50	30	20	66.055 4	2.923
60	30	23	70.700 7	3.587
70	30	25	74.613 4	3.887
80	30	26	77.954 0	3.822
100	30	28	83.302 6	3.599

表 3 F_1 与亲本回交后代 BC_3 死亡率的 χ^2 检验Tab. 3 Chi-square analysis of the mortality of backcross BC_3 treated with trichlorophon

$\rho_{\text{敌百虫trichlorophon/}}$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	供试虫数 insect number	实际死亡虫数 real dead insect	期望死亡率 expected death rate/%	χ^2
2.5	30	2	45.728 1	0.025
5.0	30	4	51.505 8	0.117
7.5	30	7	53.887 2	0.378
10.0	30	10	56.799 7	0.778
15.0	30	17	62.976 1	2.185
20.0	30	20	68.668 8	2.807
25.0	30	23	73.540 2	3.373
30.0	30	25	77.600 8	3.571
35.0	30	25	80.957 3	3.172
40.0	30	27	83.729 9	3.277

3 讨论与结论

明确害虫对杀虫剂的抗性遗传方式对于害虫的抗性治理具有十分重要的意义,因此害虫抗药性遗传方式研究一直是昆虫毒理学研究中一项重要的内容^[14]。抗性遗传方式是选择抗性治理措施及了解抗性动态的基础。一般情况下,抗性为显性遗传时易产生抗性;抗性为隐性遗传时不易产生抗性,但产生抗性后,抗性比较稳定^[15]。由于桔小实蝇具有繁殖率高、世代重叠严重等特点,且近年来其防治措施主要以化学农药为主,不合理的使用化学药剂,使其对目前多种药剂产生了不同程度的抗药性。监测结果表明,目前桔小实蝇对敌百虫、高效氯氰菊酯和阿维菌素的抗性已由原来的敏感发展至低抗、再到中抗,甚至有的已达到高抗水平,因此桔小实蝇抗药性问题已不容忽视。

本研究采用室内繁殖的桔小实蝇对敌百虫的抗性品系与敏感品系杂交、 F_1 代自交为 F_2 代及 F_1 代与亲本回交的方法对该虫抗药性遗传方式做了研究,结果表明,桔小实蝇对敌百虫的抗药性遗传方式属于多基因不完全显性遗传。这表明桔小实蝇对敌百虫的抗性为多个抗性机制综合形成的,相对复杂,且易产生抗性,这给抗药性的治理带来一定的困难。而目前由于新农药的开发速度远远低于老品种的淘汰速度,且开发成本很高,故保护现有农药品种,延长品种的使用寿命,对于降低应用成本非常重要,而桔小实蝇对敌百虫易产生抗药性,因此使用敌百虫类药剂时需要加以注意,不宜同类药剂或单剂连续

重复大量使用,否则抗药性将成为该类药剂使用的主要障碍。由于其抗性机制不是单一的,因此要从根本上解释桔小实蝇产生抗药性的原因,还必须借助现代分子生物学方法,从基因水平上作进一步探索研究。

参考文献:

- [1] 黎云根,唐振华. 抗马拉硫磷淡色库蚊的形式遗传研究[J]. 昆虫研究集刊,1982-1983,3:85-92.
- [2] 黄明度,熊锦君,杜桐源. 尼氏钝绥螨抗亚胺硫磷品系的筛选及遗传分析[J]. 昆虫学报,1987,30(2):133-139.
- [3] 吴孔明,刘芹轩. 朱砂叶螨对久效磷抗性的遗传分析[J]. 中国农业科学,1994,27(3):50-55.
- [4] 吴益东,沈晋良,尤子平. 棉铃虫对氰戊菊酯抗性遗传分析[J]. 昆虫学报,1995,38(1):20-23.
- [5] 李腾武,高希武,郑炳宗,等. 小菜蛾对阿维菌素的抗性遗传方式和相对适合度研究[J]. 昆虫学报,2000,43(3):255-263.
- [6] 潘志萍,曾玲,陆永跃. 华南地区桔小实蝇对几种农药的抗药性研究[J]. 华南农业大学学报,2005,26(4):23-26.
- [7] 章玉苹,曾玲,陆永跃,等. 华南地区桔小实蝇对几种农药的抗药性研究[J]. 华南农业大学学报,2007,28(3):23-26.
- [8] 武予清,刘芹轩. 植食叶螨抗药性遗传学研究的进展[J]. 遗传,1994,16(5):45-48.
- [9] STONE B F. A formula for determining degree of dominance in case of monofactorial inheritance to chemicals[J]. Bull Wld Org,1968,38: 91-98.
- [10] TSUKAMOTO M. The log dosage-probit mortality curve in genetic researches of insect resistant to insecticides[J]. Botyu-Kagaku, 1963, 28:91-98.
- [11] GEROGHIOU G P, GARBER M J. Studies on the inheritance of carbamate-resistance in the housefly (*Musca domestica* L.) [J]. Bull W H O,1965,32:181-186.
- [12] SOKAL, R R, ROHIF R L. Biometry [M]. 2nd ed. Freeman;San Francisco,1981.
- [13] ROUSH R T, MILLER G L. Considerations for the design of insecticide resistance monitoring programs [J]. J Econ Entomol, 1986,79:293-298.
- [14] 唐振华,吴士雄. 昆虫抗药性的遗传与进化[M]. 上海:上海科学技术文献出版社,2000.
- [15] 吕梅,沈晋良,郑周菲. 棉铃虫对丙溴磷抗性遗传特性及相对适合度研究[J]. 棉花学报,2004,16(6):333-337.

【责任编辑 周志红】