

二斑叶螨对阿维菌素抗性的CAPS标记

徐丹丹 张友军 谢文 吴青君 王少丽*

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘要: 为了实现二斑叶螨 *Tetranychus urticae* Koch 对阿维菌素抗药性的快速检测, 本研究建立了一种叶螨对阿维菌素抗药性的快速分子检测技术, 即酶切扩增多态性序列 (cleaved amplified polymorphic sequences, CAPS) 标记技术, 检测二斑叶螨谷氨酸门控氯离子通道 (*GluCl3*) 基因片段上 G326E 的突变频率, 并采用琼脂浸叶法测定田间 5 个种群对阿维菌素的抗药性。结果表明, 北京密云、顺义、昌平、浙江宁波和海南吉阳 5 个种群对阿维菌素的抗性倍数分别达 1 155.63、1 317.10、844.19、314.95 和 1 799.69 倍, 均为极高抗性水平; CAPS 检测发现我国二斑叶螨抗性基因存在 G326E 位点突变, 但在供试的 5 个不同种群中突变频率变异很大, 其中北京昌平种群 G326E 突变频率高达 90.00%, 密云和顺义种群均为 26.67%, 浙江宁波种群为 5.00%, 而海南吉阳种群不存在该位点的突变。表明该 CAPS 标记还需与其它抗性机制或检测技术结合来实现叶螨对阿维菌素抗性的早期检测和预警。

关键词: 二斑叶螨; 阿维菌素; 谷氨酸门控氯离子通道; G326E 点突变

CAPS marker monitoring abamectin resistance in twospotted spider mite *Tetranychus urticae* Koch

Xu Dandan Zhang Youjun Xie Wen Wu Qingjun Wang Shaoli*

(Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: In order to reveal the abamectin resistance of twospotted spider mite *Tetranychus urticae* Koch, a molecular technique named cleaved amplified polymorphic sequences (CAPS) was established to detect the point mutation of G326E in glutamate-gated chloride channel 3 (*GluCl3*) gene from *T. urticae*. The abamectin resistance of the five *T. urticae* field populations was evaluated by the leaf-dip method. The results showed that the *T. urticae* populations from Miyun (MY-BJ), Shunyi (SY-BJ), Changping (CP-BJ) in Beijing, Ningbo in Zhejiang (NB-ZJ), and Jiyang in Hainan (JY-HN) all developed extremely high resistance to abamectin, with the resistance ratios of 1 155.63-fold, 1 317.10-fold, 844.19-fold, 314.95-fold and 1 799.69-fold, respectively. The results of CAPS detection revealed that G326E point mutation existed in *T. urticae* populations in China, but the mutation frequency differed greatly in the five tested field populations. The mutation frequency reached 90.00% for CP-BJ population and 26.67% for MY-BJ and SY-BJ populations, whereas 5.00% and 0.00% point mutation were observed in NB-ZJ and JY-HN populations, respectively. The results indicated that this CAPS marker in combination with other detection techniques would be helpful to monitor the abamectin resistance of *T. urticae*.

Key words: *Tetranychus urticae* Koch; abamectin resistance; glutamate-gated chloride channel; G326E point mutation

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFD0200500), 国家现代西甜瓜产业技术体系(CARS-25), 中国农业科学院科技创新工程协同创新任务(CAAS-XTX2016015)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: wangshaoli@caas.cn

收稿日期: 2017-11-27

二斑叶螨 *Tetranychus urticae* Koch 是果树、蔬菜及其它农作物上的世界性重大害螨,以成螨、若螨刺吸为害植物汁液,初期叶片变黄影响光合作用,严重时导致叶片枯死、落叶甚至整株枯死,给农作物健康生长及产品质量带来严重影响。

二斑叶螨由于体型微小、生活史短、世代重叠严重,田间化学药剂的频繁使用导致了其抗药性的出现。据报道,二斑叶螨田间种群已经对不同类型的杀虫剂均产生了不同程度的抗药性(van Leeuwen et al., 2010; Tang et al., 2014; 王玲等, 2015),其中对阿维菌素的抗药性最为明显,部分地区二斑叶螨种群抗性水平达上千倍(Tang et al., 2014),包括其卵期对阿维菌素的抗药性也显著升高(刘庆娟等, 2012)。靶标抗性是害虫对杀虫剂产生抗性的重要抗性机制,谷氨酸门控氯离子通道(glutamate-gated chloride channel, *GluCl*)是叶螨对阿维菌素产生抗药性的相关靶标抗性基因,抗性种群中 *GluCl* 基因第三跨膜区的 G314D 点突变是导致二斑叶螨对阿维菌素产生抗药性的重要分子机制(Kwon et al., 2010),该突变位点也存在于我国二斑叶螨田间种群,并且抗性基因频率很高,唐小凤等(2014)对北京二斑叶螨抗性种群检测时发现该位点抗性基因频率很高;Dermauw et al. (2012)在希腊的 1 个频繁喷施阿维菌素的温室月季二斑叶螨 MAR-AB 种群中发现, *GluCl* 家族的 *GluCl3* 基因上存在 G326E 位点突变,并证实了该突变也与二斑叶螨对阿维菌素产生抗药性有关。Tang et al. (2014)认为我国多地二斑叶螨田间种群对阿维菌素抗药性属高抗性或极高抗性水平,而田间种群是否也存在该位点的突变以及突变频率高低,对我国二斑叶螨田间种群抗性形成的贡献率等均不明确。

酶切扩增多态性序列(cleaved amplified polymorphic sequences, CAPS)标记是一种简单可靠的共显性分子标记技术,基于特异性引物扩增获得的 DNA 序列,采用特定限制性内切酶对 PCR 产物进行酶切,根据酶切产物在琼脂糖凝胶电泳上呈现的片段来进行鉴定,目前已在生物遗传多样性、不同物种分子鉴定以及抗性基因点突变快速检测等方面广泛应用(Bungartz et al., 2016; Liu et al., 2016; Miao et al., 2016)。为了实现对二斑叶螨田间种群抗药性的快速检测,本文克隆了抗性种群和敏感种群的 *GluCl3* 基因片段,在比较分析二者序列差异、抗性基因存在稳定点突变的基础上,建立了叶螨对阿维菌素抗药性的 CAPS 标记快速分子检测技术,以明确我

国二斑叶螨种群对阿维菌素抗性发展过程的基因变异,以期可以实现叶螨种群/个体抗药性的早期预警,有助于田间种群的抗药性治理和针对性的高效防控。

1 材料与方法

1.1 材料

供试虫源:本研究采用的二斑叶螨种群包括室内敏感种群和北京密云、顺义、昌平种群,海南吉阳种群和浙江宁波种群,其中敏感种群来自南京农业大学植物保护学院,自 2009 年在室内人工气候箱内采用海绵叶盘法,由碧丰品种的无虫菜豆苗叶片作为寄主进行继代饲养,期间未接触任何杀虫剂。菜豆种子催芽后播种到直径 10 cm 的营养钵中,置于温度 26~30℃ 的无虫温室内进行培养,二斑叶螨饲养条件为温度 26±1℃、相对湿度(60±5)%、光周期 L:D=16 h:8 h;5 个田间种群于 2017 年 4—7 月采集于各地田间园艺作物生长期,室内饲养 1 代后备用。5 个田间种群于 2017 年 5 至 7 月分别采集于北京密云、顺义、昌平、海南吉阳和浙江宁波的各地田间园艺作物上,室内饲养 1 代后备用。

试剂和仪器:1.8% 阿维菌素(abamectin)乳油,北京中农大生物技术股份有限公司;Taq DNA 聚合酶、2×*Es* Taq MasterMix(0.1 U Taq E/μL),北京康为试剂生物科技有限公司;基因组 DNA KAPA 试剂盒,北京普凯瑞生物科技有限公司;DNA 纯化试剂盒和限制性内切酶 *Hinf* I,北京友谊中联生物科技有限公司;其它试剂均为国产分析纯。智能型人工气候箱 RXZ-380C,宁波江南仪器厂;S1000 型 PCR 仪,美国 Bio-Rad 公司;SZX7 奥林巴斯体视显微镜,奥林巴斯(中国)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 二斑叶螨 *GluCl3* 基因的 PCR 扩增

利用基因组 DNA KAPA 试剂盒进行二斑叶螨 DNA 提取,具体操作过程按照试剂盒说明书进行,提取后的所有 DNA 样本均保存于-20℃ 冰箱中。

根据 GenBank 中已知的 *GluCl3* 基因序列,采用 Primer 5.0 软件设计引物,并由北京擎科生物工程有限公司合成,扩增包含该基因 G326E 位点的 DNA 片段。上游引物:5'-GATCCAAATGCTATTCCTGCC-3',下游引物:5'-GAGGGAAACCCATACCACAC-3'。20 μL PCR 扩增体系:0.1 U Taq E/μL 2×*Es* Mix 10 μL、DNA 模板 1 μL、10 μmol/L 上下游引物各 1 μL,最后用 ddH₂O 补充至 20 μL。PCR 扩增

程序为:95℃预变性 3 min;95℃变性 30 s,59℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,35 个循环;最后在 72℃延伸 2 min。反应完成后取 5 μ L 扩增产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测,并将获得的特异性条带委托北京擎科生物科技有限公司进行序列测定。得到序列后,通过 Nucleotide BLAST 程序搜索 NCBI 中的在线匹配序列进行比对。

1.2.2 二斑叶螨 CAPS 标记方法的建立

基于二斑叶螨 *GluCl3* 序列上的突变位点(Dermauw et al.,2012),用 Primer 5.0 在线软件对该片段的核苷酸序列进行限制性酶切位点分析,筛选出 *Hinf* I 限制性内切酶(酶切位点 G'AGTC)。并根据扩增产物酶切位点的分析建立了抗性与敏感二斑叶螨种群的 CAPS 标记技术,即对 PCR 扩增产物进行 *Hinf* I 的酶切反应,50 μ L PCR 产物的酶切体系:10 $\times$ NE Buffer 5 μ L、*Hinf* I 内切酶 1 μ L、PCR 产物 10 μ L,ddH₂O 补足至 50 μ L,37℃条件下保持 5~15 min。酶切产物用 2.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测,建立 CAPS 标记来区分所检测个体为纯合抗性、杂合抗性或者纯合敏感个体,为了保证 CAPS 标记方法的准确性,将所检测叶螨个体酶切前的 PCR 扩增产物同时进行测序验证。

1.2.3 田间种群的生物测定及突变频率的检测

参照 Ding et al.(2015)琼脂浸叶法进行二斑叶螨的生物测定,用打孔器将菜豆叶片打出直径为 2.5 cm 的圆形叶碟,根据预试验配制每个种群的最高浓度作为母液,然后逐级进行 2 倍梯度稀释,敏感种群浓度为 1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.03125 mg/L;北京密云种群、北京顺义种群浓度为 3 200、1 600、800、400、200、100 mg/L;北京昌平种群浓度为 1 800、900、450、225、112.5、56.25 mg/L;海南吉阳种群浓度为 2 000、1 000、500、250、125、62.5 mg/L;浙江宁波种群浓度为 1 000、500、250、125、62.5、31.25 mg/L,以清水处理作对照。将菜豆叶碟在配好的杀虫剂梯度浓度药液中浸药 10 s 中后,放在滤纸上晾干后,置于含 0.2% 凝固琼脂的塑料皿中。挑入健康的、大小一致的二斑叶螨雌成螨,每皿内放置 30 头。按浓度从低到高的顺序重复上述操作,每处理 4 次重复,并设不含药剂的 Triton 水溶液作空白对照。盖上有极细小孔的盖子后置于温度 26 $\pm$ 1℃、相对湿度(60 $\pm$ 5)%、光周期 L:D=16 h:8 h 的人工气候箱内培养。24 h 后在体视显微镜下检查记录二斑叶螨的死亡数和存活数,用毛笔尖轻触螨体,试虫仅有 1 只足动或者完全不动者视为死亡。采用 PoloPlus 2.0 软件对试验

数据进行处理,计算杀螨剂的斜率和标准误、致死中浓度 LC₅₀ 值及其 95% 置信限等,并计算各田间种群的抗性倍数,抗性倍数=田间种群的 LC₅₀ 值/敏感种群的 LC₅₀ 值。

采用建立的 CAPS 标记方法对 5 个田间种群按照上述方法进行抗性基因突变频率的检测,每个种群检测 30 头,PCR 扩增产物同时通过序列测定进行验证。点突变的基因突变频率=[(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 结果与分析

2.1 二斑叶螨 *GluCl3* 基因片段扩增

对二斑叶螨敏感种群和田间种群进行 PCR 扩增,均获得 1 条单一条带,该条带大小为 370 bp。将敏感种群的 *GluCl3* 基因通过 BLAST 序列比对,与 *GluCl3* 基因的核苷酸序列完全一致,说明所扩增条带即为预期目的条带(图 1)。

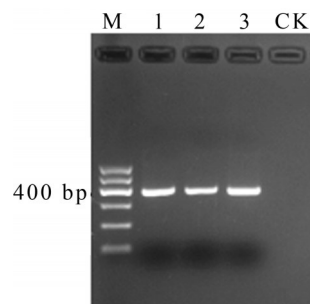


图 1 二斑叶螨 *GluCl3* 基因片段扩增

Fig. 1 Amplification of *GluCl3* gene in *Tetranychus urticae*

M: DNA marker I; 1: 敏感种群; 2~3: 田间种群; CK: 阴性对照。M: DNA marker I; 1: susceptible population; 2~3: field population; CK: negative control.

2.2 二斑叶螨抗性与敏感种群的 CAPS 标记方法

对 PCR 产物进行 *Hinf* I 酶切反应后,出现了 3 种情况,即出现 2 条条带,分别为 150 bp 和 220 bp,表明检测个体为敏感纯合个体(存在酶切位点);仅出现 1 条带,为 370 bp,说明为抗性纯合个体(不存在酶切位点);出现 3 条条带,分别为 370、220 和 150 bp,说明为抗性杂合个体(图 2)。

同时对敏感纯合、抗性纯合和抗性杂合的个体进行测序分析,发现敏感种群扩增片段第 44 位的甘氨酸在田间种群的相应位点突变为谷氨酸(图 3),抗性杂合个体在测序峰图 132 位点存在双峰现象,分别为 G/A,确认了酶切结果的可靠性。与 *GluCl3* 完整序列相比,说明在我国二斑叶螨田间种群中存

在G326E位点的突变,且具有纯合突变、杂合突变形式。

而海南吉阳种群中不存在该位点的点突变(表1)。

2.3 田间种群的生物测定及突变频率检测

北京密云、北京顺义、北京昌平、浙江宁波和海南吉阳5个二斑叶螨田间种群对阿维菌素的致死中浓度LC₅₀值分别为639.06、728.36、466.84、174.17和995.23 mg/L,与室内敏感种群相比,抗性倍数分别为1 155.63、1 317.10、844.19、314.95和1 799.69倍,达到高抗性或极高抗性水平(表1)。

采用CAPS标记方法对5个二斑叶螨田间种群进行检测,发现不同种群中该突变位点的抗性纯合子比例及总位点突变频率存在较大差异。其中北京昌平种群中,抗性纯合子比率达到80.00%,该位点突变频率则高达90.00%,而在北京密云和顺义种群中,位点突变频率均为26.67%,但密云种群中存在30.00%的抗性纯合子,而在北京顺义种群中则只有抗性杂合子存在。浙江宁波种群突变频率为5.00%,

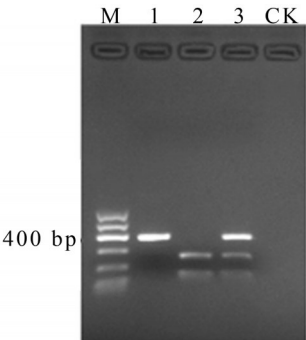


图2 二斑叶螨敏感种群和田间种群的 *GluCl3* 基因酶切结果
Fig. 2 Enzyme digestion of *GluCl3* genes from susceptible and filed populations of *Tetranychus urticae*

M: Marker I; 1: 抗性纯合个体; 2: 敏感纯合个体; 3: 抗性杂合个体; CK: 空白对照。M: Marker I; 1: resistant homozygotes; 2: susceptible homozygotes; 3: resistant heterozygotes; CK: negative control.

S1	DPNAIPARVSLGVTLLT	MTAQISGINASLPPVSYIKAIDVWTCVCLFFVF	GALLEFALVNYASRSDAHRAARKRAENQ	80
S2	DPNAIPARVSLGVTLLT	MTAQISGINASLPPVSYIKAIDVWTCVCLFFVF	GALLEFALVNYASRSDAHRAARKRAENQ	80
S3	DPNAIPARVSLGVTLLT	MTAQISGINASLPPVSYIKAIDVWTCVCLFFVF	GALLEFALVNYASRSDAHRAARKRAENQ	80
R1	DPNAIPARVSLGVTLLT	MTAQISGINASLPPVSYIKAIDVWTEVCLFFVF	GALLEFALVNYASRSDAHRAARKRAENQ	80
R2	DPNAIPARVSLGVTLLT	MTAQISGINASLPPVSYIKAIDVWTCVCLFFVF	GALLEFALVNYASRSDAHRAARKRAENQ	80
R3	DPNAIPARVSLGVTLLT	MTAQISGINASLPPVSYIKAIDVWTEVCLFFVF	GALLEFALVNYASRSDAHRAARKRAENQ	80

S1	QQQVQQVLGGGSAFGFTGGGGGGGGGG	GLNMGNPGYGMTGGGMGFP	127
S2	QQQVQQVLGGGSAFGFTGGGGGGGGGG	GLNMGNPGYGMTGGGMGFP	127
S3	QQQVQQVLGGGSAFGFTGGGGGGGGGG	GLNMGNPGYGMTGGGMGFP	127
R1	QQQVQQVLGGGSAFGFTGGGGGGGGGG	GLNMGNPGYGMTGGGMGFP	127
R2	QQQVQQVLGGGSAFGFTGGGGGGGGGG	GLNMGNPGYGMTGGGMGFP	127
R3	QQQVQQVLGGGSAFGFTGGGGGGGGGG	GLNMGNPGYGMTGGGMGFP	127

图3 二斑叶螨敏感种群和抗性种群中 *GluCl3* 基因片段的氨基酸序列比对

Fig.3 Comparisons of amino acids sequences of *GluCl3* fragments from susceptible and resistant populations of *Tetranychus urticae*
S1~S3: 敏感种群; R1~R3: 田间抗性种群。方框表示该位点的甘氨酸突变为谷氨酸。S1~S3: Susceptible population; R1~R3: resistant field population of *T. urticae*. The box indicates the mutation of glycine to glutamic acid in this position.

表1 二斑叶螨田间种群对阿维菌素的抗药性监测及 G326E 突变频率的检测

Table 1 Resistance monitoring of abamectin against <i>Tetranychus urticae</i> field populations and detection of G326E point mutation frequency in these populations					
种群 Population	斜率±标准误 Slope±SE	致死中浓度(95%置信区间) LC ₅₀ (mg/L) (95% fiducial limit)	抗性倍数 Resistance ratio	抗性纯合子比率 Resistant homozygote ratio (%)	突变频率 Mutation frequency (%)
敏感种群 Susceptible population	0.95±0.14	0.55(0.38,0.93) d	1.00	0.00	0.00
北京密云 Miyun District, Beijing City	1.35±0.16	639.06(487.08,835.78) ab	1 155.63	30.00	26.67
北京顺义 Shunyi District, Beijing City	1.81±0.22	728.36(556.41,916.81) ab	1 317.10	0.00	26.67
北京昌平 Changping District, Beijing City	1.51±0.18	466.84(364.24,595.12) b	844.19	80.00	90.00
海南吉阳 Jiyang District, Hainan Province	1.24±0.21	995.23(725.16,1 529.00) a	1 799.69	0.00	0.00
浙江宁波 Ningbo City, Zhejiang Province	1.48±0.15	174.17(135.21,220.43) c	314.95	0.00	5.00

表中不同小写字母表示置信区间不重叠。Different lowercase letters indicate no overlap of fiducial limits.

3 讨论

二斑叶螨的抗性发展严重,在生产中对该螨的预防和治理也极其困难(van Leeuwen et al., 2010)。化学防治是主要防控手段,通过生物测定筛选高效药剂是科学选药的第1步。传统的叶螨抗药性监测方法主要是玻片浸渍法、叶碟喷雾法、叶片残毒法等,这些方法不仅要求足够的供试虫量,根据药剂的作用特性至少需要24 h才能检查结果,而且无法判断出所检测个体的基因型(Vassiliou & Kitsis, 2013; Ding et al., 2015)。分子生物学检测方法包括随机扩增多态DNA (randomly amplified polymorphic DNA, RAPD)技术、等位基因特异性PCR (PCR amplification of specific alleles, PASA)技术等,但这些技术与PCR所用试剂密切相关,易发生污染,检测结果稳定性较低;最近建立的荧光定量qPCR检测技术,稳定性较强,但对仪器设备有特殊要求(Ilias et al., 2017),在应用中受到一定的限制。本研究基于二斑叶螨 *GluCl3* 基因上的G326E突变与阿维菌素抗性相关(Mermans et al., 2017)的报道,通过检测不同叶螨种群 *GluCl3* 基因并进行酶切位点分析,发现敏感种群中存在 *Hinf* I 酶切位点,而抗性种群中不存在该位点,通过对不同基因型的个体进行酶切,抗性纯合子得到1条370 bp左右的条带,敏感纯合子酶切成150 bp和220 bp左右的两条带,抗性杂合子则显示出150、220和370 bp左右的3条带。这种CAPS标记方法操作简便,通过PCR扩增出目标基因片段,采用限制性内切酶酶切后,即可根据酶切结果进行抗性和敏感性的判定,花费时间短,即使有少量害虫也可进行检测和预警,因此可以实现田间种群的高通量检测。

阿维菌素是防治螨类的重要杀螨剂,近年来害螨对其产生高抗性的报道很多。Brown et al. (2017)报道美国路易斯安那州的2个二斑叶螨种群对阿维菌素产生了630倍和1 415倍的抗性;刘庆娟等(2012)报道山东省寿光市二斑叶螨卵对阿维菌素产生了136.66倍的高抗性;唐小凤等(2014)采用玻片浸渍法检测到北京市二斑叶螨对阿维菌素产生了上千倍的抗性,与本研究采用琼脂浸叶法获得的结果一致。二斑叶螨对阿维菌素产生高抗性的机制涉及解毒酶活性的增强以及靶标位点基因的突变,如谷氨酸氯离子通道 *GluCl1* 基因上的G314D突变,其突变可导致二斑叶螨对阿维菌素产生高抗性(Kwon et al., 2010),而且随着阿维菌素抗性倍数升高,

G314D突变频率也升高(唐小凤等, 2014)。除了G314D突变,本研究也证实我国二斑叶螨田间种群 *GluCl3* 基因上还存在G326E突变,包含杂合和纯合突变个体。

本研究通过检测5个二斑叶螨田间种群,发现G326E位点也存在不同程度的突变。北京昌平种群G326E位点突变频率达到90.00%,抗性纯合子比率达到80.00%,结合唐小凤等(2014)发现北京昌平种群G314D的突变频率达到100%的结论,推测北京昌平的二斑叶螨种群对阿维菌素的高抗性主要与靶标基因G314D和G326E这2个位点的突变密切相关。北京密云的二斑叶螨种群对阿维菌素抗性超过1 000倍,G314D位点突变频率为100%(唐小凤等, 2014),而G326E位点突变频率为26.67%,推测该种群对阿维菌素产生高抗性主要由于G314D位点的突变,G326E位点可能起部分协同作用。北京顺义、浙江宁波和海南吉阳的二斑叶螨种群对阿维菌素也是高抗和极高抗性水平,但G326E位点的突变频率很低,分别为26.67%、5.00%和0.00%,说明三地叶螨种群的高抗性与G326E突变关系不大。值得注意的是,海南三亚吉阳的二斑叶螨种群达极高抗性水平,但G326E位点不存在突变,表明该地区叶螨种群的高抗性与该位点突变无关,表明以上3个二斑叶螨种群对阿维菌素产生高抗性与靶标基因位点的点突变关系均不密切,可能还存在其它更重要的抗性机制,如或其它位点突变有关,或与抗性种群的解毒酶机制相关,这在以往文献中也有类似报道(Kim et al., 2005; Kwon et al., 2010)。叶螨对阿维菌素抗药性还涉及到升高的 γ -氨基丁酸受体(γ -aminobutyric acid, GABA)(刘怡聪等, 2016),如Xu et al. (2017)发现给朱砂叶螨 *Tetranychus cinnabarinus* 敏感种群增加外源GABA含量时,该敏感种群对阿维菌素抗性也随之增加。

总之,田间叶螨种群对杀虫剂的抗性机制非常复杂,涉及靶标基因的点突变、解毒酶活性升高等,因此,抗药性检测技术还需结合其它机制或者检测技术才能更完善地实现害虫对杀虫剂的早期检测和预警。

致谢:蔬菜有害生物控制与优质栽培北京市重点实验室提供部分仪器设备,特此致谢!

参 考 文 献 (References)

Brown S, Kerns DL, Gore J, Lorenz G, Stewart S. 2017. Susceptibility

- of twospotted spider mites (*Tetranychus urticae*) to abamectin in Midsouth cotton. *Crop Protection*, 98: 179–183
- Bungartz A, Klaus M, Mathew B, Léon J, Naz AA. 2016. Development of new SNP derived cleaved amplified polymorphic sequence marker set and its successful utilization in the genetic analysis of seed color variation in barley. *Genomics*, 107(2/3): 100–107
- Dermauw W, Ilias A, Riga M, Tsagkarakou A, Grbić M, Tirry L, Van Leeuwen T, Vontas J. 2012. The cys-loop ligand-gated ion channel gene family of *Tetranychus urticae*: implications for acaricide toxicology and a novel mutation associated with abamectin resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 42(7): 455–465
- Ding TB, Zhong R, Jiang XZ, Liao CY, Xia WK, Liu B, Dou W, Wang JJ. 2015. Molecular characterisation of a sodium channel gene and identification of a Phe1538 to Ile mutation in citrus red mite, *Panonychus citri*. *Pest Management Science*, 71(2): 266–277
- Ilias A, Vassiliou VA, Vontas J, Tsagkarakou A. 2017. Molecular diagnostics for detecting pyrethroid and abamectin resistance mutations in *Tetranychus urticae*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 135: 9–14
- Kim HJ, Hawthorne DJ, Peters T, Dively GP, Clark JM. 2005. Application of DNA-based genotyping techniques for the detection of *kdr*-like pyrethroid resistance in field populations of Colorado potato beetle. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 81(2): 85–96
- Kwon DH, Yoon KS, Clark JM, Lee SH. 2010. A point mutation in a glutamate-gated chloride channel confers abamectin resistance in the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch. *Insect Molecular Biology*, 19(4): 583–591
- Liu GX, Ma HM, Xie HY, Xuan N, Picimbon JF. 2016. Sequence variation of *Bemisia tabaci chemosensory protein 2* in cryptic species B and Q: new DNA markers for whitefly recognition. *Gene*, 576(1): 284–291
- Liu QJ, Liu YJ, Zhou XH, Zhang AS, Li LL, Men XY, Zhang SC, Yu Y. 2012. Differences in the sensitivities of the eggs of four *Tetranychus urticae* geographical strains to ten acaricides. *Plant Protection*, 38(4): 178–180 (in Chinese) [刘庆娟, 刘永杰, 周仙红, 张安盛, 李丽莉, 门兴元, 张思聪, 于毅. 2012. 四个二斑叶螨地理种群卵对10种杀螨剂的敏感性差异. *植物保护*, 38(4): 178–180]
- Liu YC, Wang L, Zhang YJ, Xie W, Wu QJ, Wang SL. 2016. Abamectin resistance and expression of resistance-related genes in field populations of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) in China. *Acta Entomologica Sinica*, 59(11): 1199–1205 (in Chinese) [刘贻聪, 王玲, 张友军, 谢文, 吴青君, 王少丽. 2016. 二斑叶螨田间种群对阿维菌素的抗药性及抗性相关基因的表达量分析. *昆虫学报*, 59(11): 1199–1205]
- Mermans C, Dermauw W, Geibel S, Van Leeuwen T. 2017. A G326E substitution in the glutamate-gated chloride channel 3 (*GluCl3*) of the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* abolishes the agonistic activity of macrocyclic lactones. *Pest Management Science*, 73(12): 2413–2418
- Miao JQ, Cai M, Dong X, Liu L, Lin D, Zhang C, Pang ZL, Liu XL. 2016. Resistance assessment for oxathiapiprolin in *Phytophthora capsici* and the detection of a point mutation (G769W) in PcORP1 that confers resistance. *Frontiers in Microbiology*, 7: 615
- Tang XF, Wang SL, Zhang YJ, Wu QJ, Xie W. 2014. Abamectin resistance of *Tetranychus urticae* and detection for resistance-related gene by PASA technique. *Journal of Plant Protection*, 41(1): 67–73 (in Chinese) [唐小凤, 王少丽, 张友军, 吴青君, 谢文. 2014. 二斑叶螨对阿维菌素的抗药性及抗性基因的PASA检测技术. *植物保护学报*, 41(1): 67–73]
- Tang XF, Zhang YJ, Wu QJ, Xie W, Wang SL. 2014. Stage-specific expression of resistance to different acaricides in four field populations of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Journal of Economic Entomology*, 107(5): 1900–1907
- van Leeuwen T, Vontas J, Tsagkarakou A, Dermauw W, Tirry L. 2010. Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* and other important Acari: a review. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40(8): 563–572
- Vassiliou VA, Kitsis P. 2013. Acaricide resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) populations from Cyprus. *Journal of Economic Entomology*, 106(4): 1848–1854
- Wang L, Zhang YJ, Wu QJ, Xie W, Wang SL. 2015. Establishment and application of the PASA technique of resistance detection to bifenthrin resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Chinese Journal of Applied Entomology*, 52(2): 510–518 (in Chinese) [王玲, 张友军, 吴青君, 谢文, 王少丽. 2015. 二斑叶螨对联苯菊酯抗药性的PASA快速检测技术建立与应用. *应用昆虫学报*, 52(2): 510–518]
- Xu ZF, Liu YC, Wei P, Feng KY, Niu JZ, Shen GM, Lu WC, Xiao W, Wang JJ, Smagghe GJ, et al. 2017. High gamma-aminobutyric acid contents involved in abamectin resistance and predation, an interesting phenomenon in spider mites. *Frontiers in Physiology*, 8: 216

(责任编辑:王璇)