植物保护学报 Journal of Plant Protection，2023，50(5)：1202-1209 DOI：10.13802/j.cnki.zwbhxb.2023.2023811

珠江三角洲地区黄毛鼠抗药性的发生趋势及其*Vkorc1*基因多态性

姚丹丹 姜洪雪 林思亮 秦 姣* 冯志勇*

（广东省农业科学院植物保护研究所，农业农村部华南果蔬绿色防控重点实验室，
广东省植物保护新技术重点实验室，广州 510640）

摘要：为阐明珠江三角洲地区黄毛鼠*Rattus losea*对第1代抗凝血灭鼠剂的抗性发生趋势及其遗传机制，以杀鼠灵为标准药物，采用致死期食毒法对2017—2021年在广东省江门市捕获的165只黄毛鼠进行生理抗性检测，并测定每只试鼠的维生素K环氧化物还原酶复合物亚单位1（vitamin K epoxide reductase complex subunit 1，Vkorc1）的编码基因序列，分析其突变情况。结果显示，江门市黄毛鼠对第1代抗凝血灭鼠剂杀鼠灵的抗性率为27.03%~50.00%，在黄毛鼠*Vkorc1*基因中检测到6个不同的突变位点，包括2个错义突变位点Arg58Gly及Tyr139Cys和4个沉默突变位点Ala41Ala、Cys96Cys、Arg98Arg及Ala143Ala，突变率分别为87.27%、0.61%、1.21%、0.61%、1.21%和0.61%，其中Ala143Ala是在黄毛鼠中新发现的沉默突变位点。表明珠江三角洲地区黄毛鼠已对第1代抗凝血灭鼠剂产生了群体抗性并呈上升趋势，第58位的精氨酸突变成甘氨酸（Arg58Gly）是黄毛鼠抗性基因*Vkorc1*的主要突变位点。

关键词：珠江三角洲；黄毛鼠；抗性；抗凝血灭鼠剂；*Vkorc1*基因；杀鼠灵

Occurrence trend of rodenticide resistance and *Vkorc1* gene polymorphism in lesser ricefield rat *Rattus losea* in the Pearl River Delta

Yao Dandan Jiang Hongxue Lin Siliang Qin Jiao* Feng Zhiyong*

（Guangdong Provincial Key Laboratory of High Technology for Plant Protection; Key Laboratory of Green Prevention and Control on Fruits and Vegetables in South China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Plant Protection Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, Guangdong Province, China）

Abstract: To elucidate the occurrence trend of the resistance of lesser ricefield rat *Rattus losea* in the Pearl River Delta to the first-generation anticoagulant rodenticide and its genetic mechanism, by using warfarin as the standard drug, the physiological resistance of 165 *R. losea* captured in Jiangmen City, Guangdong Province from 2017 to 2021 was detected using the lethal feeding period method. In addition, the gene sequence of vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (Vkorc1) was determined for each rat tested, and the mutation status of *Vkorc1* gene was analyzed. The results showed that the resistance rate of *R. losea* in Jiangmen City to the first-generation anticoagulant rodenticide ranged from 27.03% to 50.00%. Six different mutation sites were detected in the *Vkorc1* gene of *R. losea*, including two missense mutations, Arg58Gly and Tyr139Cys, and four silent mutations, Ala41Ala, Cys96Cys, Arg98Arg, and Ala143Ala, with a mutation rate of 87.27%, 0.61%, 1.21%, 0.61%, 1.21% and 0.61%, respectively. Among them, Ala143Ala was a newly discovered silent mutation in *R. losea*. These results

基金项目：国家自然科学基金项目（32172435），广东省现代农业产业共性关键技术研发创新团队建设项目（2023KJ113）
* 通信作者（Authors for correspondence），E-mail：qjohy@163.com，13318854585@163.com
收稿日期：2023-05-31

indicated that *R. losea* in the Pearl River Delta has developed population resistance to the first-generation anticoagulant rodenticide with an increasing trend. The arginine at position 58 mutated to glycine (Arg58Gly) was the main mutation site of the resistance gene *Vkorc1* in *R. losea*.

Key words: Pearl River Delta; *Rattus losea*; resistance; anticoagulant rodenticide; *Vkorc1* gene; warfarin

鼠害治理是一项重要的防灾减灾工作，对于保障农业安全生产及城市健康发展意义重大（甄磊等，2022）。在现有的鼠害防控措施中，化学防治一直占据着重要地位，特别是针对突发性鼠害暴发（刘晓辉，2018）。20世纪50年代早期，抗凝血灭鼠剂杀鼠灵的出现是化学灭鼠中一个重要里程碑，此后陆续开发出一些高效、安全的抗凝血灭鼠剂品种，并成为世界各国的主要灭鼠剂，在控制日趋严重的鼠害中发挥着重要作用（董天义和阎丙申，1998）。但在长期的灭鼠实践中，其对抗凝血灭鼠剂逐渐产生了抗性。1958年，首次发现褐家鼠*Rattus norvegicus*对杀鼠灵和敌鼠产生了抗性（Boyle，1960）。之后，欧洲各国、美国、加拿大、日本和澳大利亚等国家也相继报道了抗性鼠群（Cowan et al.，2017；Goulois et al.，2017；Mooney et al.，2018）。1980年以来，随着抗凝血灭鼠剂在我国的广泛应用，害鼠对其的抗性日趋严重（董天义，2001；杜国义等，2019），在城镇和一些农区，小家鼠*Mus musculus*、褐家鼠和黄胸鼠*Rattus tanezumi*等家栖鼠类和黑线姬鼠*Apodemus agrarius*等野栖鼠类已对其产生了抗性，导致第1代抗凝血灭鼠剂的防治效果大幅下降（章进宝等，2001；高志祥等，2008；徐仁权等，2013）。

广东省是国内使用抗凝血灭鼠剂较早的地区之一，先后在深圳（冯南贵等，1999）、湛江（张世炎等，2002）、广州（易建荣等，2004）、惠州（邹添明等，2005）和清远（易建荣等，2005）等市发现家栖鼠类对抗凝血灭鼠剂产生了抗性个体或者种群，其中湛江市的黄胸鼠抗性率高达33.3%，清远市城区捕获的小家鼠抗性率高达50.00%。黄毛鼠*Rattus losea*是广东省农田主要害鼠，占农区害鼠总数的50%以上，该鼠主要为害水稻、玉米、花生、番薯、瓜菜和水果等，农作物因鼠患减产10%~30%，防治后仍造成3%~5%的产量损失，对农业生产的影响极大（邱俊荣等，2007；林思亮等，2022）。同时，黄毛鼠也是重要的疫源动物，可传播多种疾病，是南方恙虫病、立克次体病和钩端螺旋体病的主要宿主，因此也需持续控制其为害和暴发。广东省江门市地处珠江三角洲地区，该地区鼠害防控措施主要是以抗凝血灭鼠剂为主的化学灭杀，由于抗凝血灭鼠剂的长期高频次使用，冯志勇等（2007）检测到江门市新会区黄毛鼠对第1代抗凝血灭鼠剂产生了抗性，抗性率达36.67%，导致灭鼠剂用量大幅增加而防控效果显著降低。为关注该地区黄毛鼠抗药性的发生发展，本研究通过致死期食毒（lethal feeding period，LFP）法对该地区黄毛鼠进行生理抗性检测，并结合维生素K环氧化物还原酶复合物亚单位1（vitamin K epoxide reductase complex subunit 1，Vkorc1）编码基因的突变检测，对鼠类抗药性机理及其关联进化进行深入研究，以期为进一步指导害鼠的抗药性监测和科学防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试鼠和饲料：黄毛鼠于2017—2021年捕自广东省江门市野外农田，在实验室单笼饲养，适应1周以上后对个体进行称重、性别鉴定和编号，选择健康、未孕、亚成年以上的个体供试。饲料为新鲜大米和稻谷，均购自当地市场，品种不限。

试剂和仪器：杀鼠灵，上海阿拉丁生化科技股份有限公司；动物组织DNA提取试剂盒、2×*Pro Taq*预混液，湖南艾科瑞生物工程有限公司；DNA Marker、上样缓冲液、Gold View核酸染料，生工生物工程（上海）股份有限公司；其余试剂均为国产分析纯。Centrifuge 5424 R高速台式冷冻离心机，德国Eppendorf公司；T100梯度PCR仪、Gel Doc XR+凝胶成像系统，美国Bio-Rad公司；DK-8D型电热恒温水槽，上海一恒科技有限公司；DYCP-31DN型琼脂糖水平电泳仪，北京六一生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 黄毛鼠的生理抗性检测

采用LFP法对黄毛鼠的生理抗性进行检测，按全国鼠类抗药性监测协作组统一方法进行无选择性摄食试验（董天义，2001）。取试鼠单笼饲养，每天供给充足的饮用水，试验前2 d供给无毒大米，每天称量消耗量并更换无毒大米，将第2天摄食量太少（不及全部试鼠平均消耗量的20%）的个体淘汰。同时，将杀鼠灵用适量的N，N-二甲基甲酰胺完全溶解，再与水互溶，然后与无毒大米按质量比0.002%充分混

合拌匀，晾干后作为毒饵备用。每只试鼠连续饱和饲喂0.002%杀鼠灵毒饵9 d，每天称量记录消耗量并更换毒饵，若食毒期内个体死亡，记录死亡个体的出血部位和死亡时间（指老鼠从开始食药到死亡所用的时长），对无出血表征的死亡鼠进行解剖，观察有无内出血。将食毒期结束后的剩余个体转移至干净鼠笼中，用稻谷饲养并观察21 d，记录试鼠的死亡情况并进行尸检，淘汰试验期间产仔的试鼠、无出血体征的死鼠及试验结束后摄入纯药量未达到10 mg/kg的存活鼠，试验期结束后存活且摄药剂量（老鼠在试验期间摄入的杀鼠灵纯药量）达到10 mg/kg的个体为抗性个体，反之在试验期间死亡的个体为敏感个体，计算抗性率（抗性鼠数量占供试鼠数量的比例）、致死剂量（敏感个体在试验期间摄入的杀鼠灵纯药量）和存活剂量（抗性个体在试验期间摄入的杀鼠灵纯药量），若抗性率不低于15%则认为该鼠已产生抗性种群（冯志勇等，2007）。2017年共检测了37只试鼠（16雌21雄），2018年共检测了56只试鼠（30雌26雄），2019年共检测了34只试鼠（15雌19雄），2021年共检测了38只试鼠（20雌18雄），2020年由于新型冠状病毒疫情未能采集到样本进行抗性检测试验。

1.2.2 黄毛鼠*Vkorc1*基因的扩增与测序

将1.2.1抗性检测后的死亡鼠和存活鼠分别取2~3个脚趾或尾尖保存于无水乙醇中备用。利用动物组织DNA提取试剂盒参照使用说明书提取每个样本的基因组DNA，于−20 ℃储存备用。由于*Vkorc1*基因含有3个外显子，根据GenBank中已发表的黄胸鼠*Vkorc1*基因序列（GenBank登录号FJ868832.1），针对分别位于229~423、1 231~1 340和2 184~2 386 bp处（FJ868832.1基因序列中的第1个核苷酸编号为（+）1）外显子设计3组引物Rl1-F/Rl1-R、Rl2-F/Rl2-R和Rl3-F/Rl3-R（表1），引物均由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。黄毛鼠*Vkorc1*基因第1组引物Rl1-F和Rl1-R扩增从（+）107至（+）711的核苷酸序列，第2组引物Rl2-F和Rl2-R扩增从（+）1 048至（+）1 512的核苷酸序列，第3组引物Rl3-F和Rl3-R扩增从（+）2 045至（+）2 682的核苷酸序列。所有*Vkorc1*基因的PCR扩增体系均为25 μL，包括基因组DNA模板1 μL、Pro *Taq* Master Mix 12.5 μL、ddH_2O 9.5 μL和上下游引物各1 μL。反应条件：95 ℃预变性5 min；95 ℃变性30 s，相应退火温度下（表1）退火30 s，72 ℃延伸40 s，循环35次；72 ℃终延伸5 min。PCR扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测后送生工生物工程（上海）股份有限公司进行测序。

1.2.3 *Vkorc1*基因突变位点的检测分析

应用DNAStar 5.01软件对1.2.2测序所得序列进行校对、拼接，对于序列中存在的杂合位点用简并碱基（R、Y、M、K、S、W）表示。以NCBI数据库中黄胸鼠的*Vkorc1*基因序列（GenBank登录号FJ868832.1）为参考序列，采用DNAMAN 4.0软件将测序得到的黄毛鼠*Vkorc1*基因序列与参考基因序列进行比对，同时以参考基因3个外显子编码序列（coding sequence，CDS）的起止位置为基准，界定黄毛鼠*Vkorc1*基因的外显子区段，筛选*Vkorc1*基因编码区的单核苷酸多态性位点，针对多态性位点中不同等位基因所呈现出的不同基因型，计算各个基因型的突变率（携带不同突变位点的个体在种群中的占比）。

表1 黄毛鼠*Vkorc1*基因编码区的特异性引物序列

Table 1 Specific primer sequences for the coding regions of *Vkorc1* of *Rattus losea*

引物名称 Primer name	引物序列（5′−3′） Primer sequence (5′−3′)	退火温度 Annealing temperature/℃	扩增片段大小 Amplified fragment size/bp
Rl1-F	CTGTCACGCCTAAGAATAACCA	56	600
Rl1-R	GCCATCCCAATCACCCTC		
Rl2-F	CTCGCACCAACTCCTGAAA	56	500
Rl2-R	GCCTCTGGCTACCTAAACCTA		
Rl3-F	GGTCCCAAGAATTATTGAACAG	52	650
Rl3-R	GAAGGCAGTAACACGGAAAG		

1.3 数据分析

应用SPSS 19.0软件对试验数据进行统计分析，采用独立样本*t*检验法分析抗性个体和敏感个体间摄药剂量差异的显著性，通过单因素方差分析法检测年度间抗性个体和敏感个体摄药剂量、死亡时间的差异显著性，对雌、雄鼠的存活频次进行χ^2检验。

2 结果与分析

2.1 黄毛鼠对第1代抗凝血灭鼠剂的抗性发生情况

2017年在37只黄毛鼠中检测出抗性鼠10只，

抗性率为27.03%（表2），其中16只雌鼠中有6只抗性鼠，21只雄鼠中有4只抗性鼠，抗性率分别为37.50%和19.05%，性别之间差异不显著（χ^2=1.568，*P*=0.274）。抗性个体的平均存活剂量为12.98 mg/kg，敏感个体的平均致死剂量为12.46 mg/kg，两者差异不显著（*t*=0.257，*P*=0.800）；敏感个体的平均死亡时间为9.73 d（表2）。

2018年在56只黄毛鼠中检测出抗性鼠17只，抗性率为30.36%（表2），其中30只雌鼠中有8只抗性鼠，26只雄鼠中有9只抗性鼠，抗性率分别为26.67%和34.62%，性别之间差异不显著（χ^2=0.416，*P*=0.519）。抗性个体的平均存活剂量为18.14 mg/kg，敏感个体的平均致死剂量为15.58 mg/kg，两者差异不显著（*t*=1.091，*P*=0.299）；敏感个体的平均死亡时间为10.22 d（表2）。

2019年在34只黄毛鼠中检测出抗性鼠15只，抗性率为44.12%（表2），其中15只雌鼠中有7只抗性鼠，19只雄鼠中有8只抗性鼠，抗性率分别为46.67%和42.11%，性别之间差异不显著（χ^2=0.071，*P*=0.790）。抗性个体的平均存活剂量为15.86 mg/kg，敏感个体的平均致死剂量为12.67 mg/kg，两者差异不显著（*t*=1.725，*P*=0.097）；敏感个体的平均死亡时间为11.27 d（表2）。

2021年在38只黄毛鼠中检测出抗性鼠19只，抗性率为50.00%（表2），其中20只雌鼠中有11只抗性鼠，18只雄鼠中有8只抗性鼠，抗性率分别为55.00%和44.44%，性别之间差异不显著（χ^2=0.422，*P*=0.516）。抗性个体的平均存活剂量为13.90 mg/kg，敏感个体的平均致死剂量为9.55 mg/kg，两者差异极显著（*t*=4.352，*P*<0.01）；敏感个体的平均死亡时间为7.69 d（表2）。

表2　黄毛鼠对第1代抗凝血灭鼠剂杀鼠灵的抗性发生情况

Table 2　Resistance occurrence of *Rattus losea* to the first-generation anticoagulants warfarin

年份 Year	样本数 No. of samples	抗性率 Resistance rate/%	平均体重 Average body weight/g	抗性个体的平均存活剂量 Average survival dose of resistant individual/（mg/kg）	敏感个体Sensitive individual	
					平均致死剂量 Average lethal dose/（mg/kg）	平均死亡时间 Average death time/d
2017	37	27.03	59.34±2.25	12.98±0.67	12.46±1.12	9.73±1.13
2018	56	30.36	78.16±3.63	18.14±0.87	15.58±2.17	10.22±2.63
2019	34	44.12	55.73±2.39	15.86±0.81	12.67±1.66	11.27±2.02
2021	38	50.00	95.14±3.35	13.90±0.61	9.55±0.80	7.69±0.54

图中数据为平均数±标准误；样本数为雌、雄合计数。Data in the figure are mean±SE; the number of samples includes both male and female counts.

2.2　黄毛鼠对第1代抗凝血灭鼠剂的抗性发生趋势

从2017—2021年广东省江门市农田黄毛鼠的抗药性发生情况来看，珠江三角洲地区黄毛鼠对第1代抗凝血灭鼠剂已形成了抗性种群，抗性率介于27.03%~50.00%之间，抗性率居高不下且呈上升趋势（表2），其中抗性率在2021年比2017年增加了84.98%。抗性个体的平均存活剂量介于12.98~18.14 mg/kg之间，年度间差异极显著（*F*=7.210，*df*=3，*P*<0.01）；敏感个体的平均致死剂量介于9.55~15.58 mg/kg之间，年度间差异不显著（*F*=2.643，*df*=3，*P*=0.058；图1）；敏感个体的平均死亡时间介于7.69~11.27 d之间，年度间差异不显著（*F*=1.041，*df*=3，*P*=0.383；图2）。

2.3　黄毛鼠*Vkorc1*基因外显子核苷酸多态性分析

2.3.1　黄毛鼠*Vkorc1*基因外显子序列

用3对引物对黄毛鼠*Vkorc1*基因的外显子区段进行扩增，全部个体均能成功扩增到大小分别约为600、500和650 bp的片段。鼠类*Vkorc1*基因外显子序列保守性很强，本研究测序得到了江门市黄毛鼠*Vkorc1*基因3个外显子的保守（一致）核苷酸序列；其中，第1外显子核苷酸序列为GTGTCTGGGCTGTACTGTCGACATGGGCACCACCTGGAGGAGCCCTGGACGTTTGCGACTTGCACTATGCCTCGCTGGCCTAGCCCTCTCACTGTACGCACTGCACGTGAAGGCGGCGCGCGCCCGCAATGAGGATTACCGCGCACTCTGCGACGTGGGCACGGCCATCAGCTGTTCCCGCGTCTTCTCCTCTCG（195 bp）；第2外显子核苷酸序列为GTGGGGCCGGGGCTTTGGGCTGGTGGAGCATGTGTTAGGAGCTGACAGCATCCTCAACCAATCCAACAGCATATTTGGTTGCATGTTCTACACCTTACAGCTGTTGTTAG（110 bp）；第3外显子核苷酸序列为GTTGCTTGAGAGGACG-

TTGGGCCTCTATCCTACTGATACTGAGTTCCCT-GGTGTCTGTCGCTGGTTCTCTGTACCTGGCCT-GGATCCTGTTCTTTGTCCTGTATGATTTCTGCAT-TGTTTGCATCACTACCTATGCCATCAATGCGGG-CCTGATGTTGCTTAGCTTCCAGAAGGTGCCAG-AACACAAGGTCAAAAAGCCCTGA(203 bp),共编码161个氨基酸。

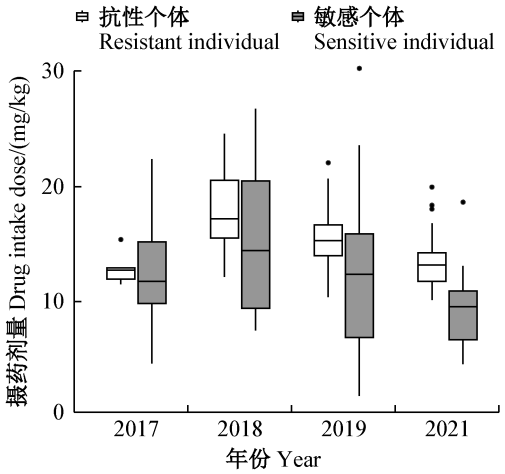

图1 黄毛鼠抗性个体和敏感个体摄药剂量的年度差异

Fig. 1 Annual differences in drug intake dose between resistant and sensitive *Rattus losea*

箱体外的点表示离群点。The points outside the box represent outliers.

2.3.2 *Vkorc1*基因外显子的核苷酸多态性

在2017—2021年收集的165只黄毛鼠样本中，在外显子中共检测到6个核苷酸突变位点，其中错义突变位点有2个，分别是第1外显子中的C194G(S)(Arg58Gly)和第3外显子中的A438R(Tyr139Cys)；有4个沉默突变位点，分别为第1外显子中的A145R(Ala41Ala)、第3外显子中的C310Y(Cys96Cys)、A316G(Arg98Arg)和G451R(Ala143Ala)。在错义突变位点中，第1外显子中的C194G(S)(Arg58Gly)的突变率最高，为87.27%，其纯合突变率为66.06%(C突变成G)，杂合突变率为21.21%(C突变成S)；第3外显子中的A438R(Tyr139Cys)的突变率最低，为0.61%，仅检测到1只黄毛鼠发生了该突变。4个沉默突变位点的突变率均很低，其中在2只个体(1.21%)中检测到A145R(Ala41Ala)，在1只个体(0.61%)中检测到C310Y(Cys96Cys)，在2只个体(1.21%)中检测到A316G(Arg98Arg)，在1只个体(0.61%)中检测到G451R(Ala143Ala)(表3~4)。

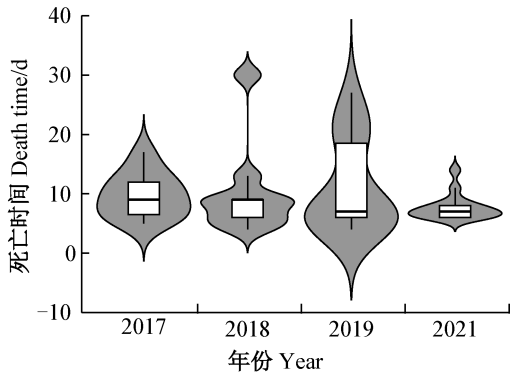

图2 黄毛鼠敏感个体死亡时间的年度差异

Fig. 2 Annual differences in the death time of sensitive *Rattus losea*

综合分析发现江门市黄毛鼠*Vkorc1*基因突变位点中与抗性相关的位点有2个，分别为第58位的精氨酸突变成甘氨酸(Arg58Gly)和第139位的酪氨酸突变成半胱氨酸(Tyr139Cys)，后者在黄毛鼠中的发生频率低，仅有1只黄毛鼠发生了该杂合突变，因此第58位的精氨酸突变成甘氨酸(Arg58Gly)是黄毛鼠抗性基因*Vkorc1*的主要突变位点。

表3 黄毛鼠*Vkorc1*基因编码区变异位点

Table 3 The mutation positions in the coding regions of *Vkorc1* gene in *Rattus losea*

外显子 Exon	单核苷酸多态性位点 Single nucleotide polymorphism locus	等位基因 Allele	基因型(突变率) Genotype (mutation rate)/%			氨基酸突变 Amino acid mutation
第1外显子	145	A/G	AA(98.79)	AG(1.21)	GG(0.00)	Ala41Ala
Exon 1	194	C/G	CC(12.73)	CG(21.21)	GG(66.06)	Arg58Gly
第3外显子	310	C/T	CC(99.39)	CT(0.61)	TT(0.00)	Cys96Cys
Exon 3	316	A/G	AA(98.79)	AG(0.00)	GG(1.21)	Arg98Arg
	438	A/G	AA(99.39)	AG(0.61)	GG(0.00)	Tyr139Cys
	451	G/A	GG(99.39)	GA(0.61)	AA(0.00)	Ala143Ala

3 讨论

在连续使用抗凝血类药物灭鼠的地区，毒饵可杀死大部分敏感个体而抗性个体生存下来并形成生理抗性，生理抗性又称为遗传抗性，是目前国内外抗性研究的重点。本研究通过生理抗性检测和*Vkorc1*

基因分子检测相结合的方法探索了珠江三角洲地区黄毛鼠种群对第1代抗凝血灭鼠剂的抗性发展及其遗传机制，发现广东省江门市黄毛鼠已对第1代抗凝血灭鼠剂产生了群体抗性，抗性率介于27.03%~50.00%之间，抗性个体的平均存活剂量介于12.98~18.14 mg/kg之间，敏感个体的平均致死剂量介于9.55~15.58 mg/kg之间，敏感个体的平均死亡时间介于7.69~11.27 d之间，表明近年来珠江三角洲地区黄毛鼠的抗药性呈现上升趋势，推测由以下原因造成：一是随着该地区作物种植结构的调整和农村城镇化的发展，鼠类的生存环境更加复杂，鼠害日趋严重，为了控制农作物鼠害，农民不断增加用药量和灭鼠次数，抗凝血灭鼠剂的使用频次升高，导致害鼠的耐药力逐年提高；二是缺乏有组织、有计划的统一灭鼠行动，没有专业的灭鼠队伍，缺少科学有效的灭鼠方法，多数时候由一家一户领取鼠药后自行投放，防控效果差，抗性个体在灭鼠过程中未得到有效杀灭，从而形成了抗性种群。

表4 黄毛鼠*Vkorc1*基因编码区的突变率

Table 4 The mutation frequencies in the coding regions of *Vkorc1* gene in *Rattus losea* %

年份 Year	样本数 No. of samples	位于第1外显子突变位点的突变率 Mutation rate at mutation site of exon 1			位于第3外显子突变位点的突变率 Mutation rate at mutation site of exon 3			
		C(194)G	C(194)S	A(145)R	C(310)Y	A(316)G	A(438)R	G(451)R
2017	37	72.97(27/37)	27.03(10/37)	0.00(0/37)	2.70(1/37)	0.00(0/37)	0.00(0/37)	0.00(0/37)
2018	56	55.36(31/56)	37.50(21/56)	0.00(0/56)	0.00(0/56)	0.00(0/56)	0.00(0/56)	1.79(1/56)
2019	34	82.35(28/34)	11.76(4/34)	5.88(2/34)	0.00(0/34)	5.88(2/34)	2.94(1/34)	0.00(0/34)
2021	38	60.53(23/38)	0.00(0/38)	0.00(0/38)	0.00(0/38)	0.00(0/38)	0.00(0/38)	0.00(0/38)
合计Total	165	66.06(109/165)	21.21(35/165)	1.21(2/165)	0.61(1/165)	1.21(2/165)	0.61(1/165)	0.61(1/165)

突变率后括号内的数据为具有突变位点的样本数/总样本数。Data in the bracket after mutation rate refers to the number of samples with mutation site/total number of samples.

鼠类可以通过多种分子途径产生抗药性，*Vkorc1*基因是香豆素类抗凝血灭鼠剂的靶基因，该基因上的氨基酸变异是鼠类产生抗性的主要原因（Pelz et al.，2005；2012；Ma et al.，2018）。本研究在黄毛鼠*Vkorc1*基因中共检测到6个不同的变异位点，包括2个错义突变位点（Arg58Gly和Tyr139Cys）和4个沉默突变位点（Ala41Ala、Cys96Cys、Arg98Arg和Ala143Ala）。Wang et al.（2008）首先在广东省江门市黄毛鼠中发现了Arg58Gly突变，90%以上的黄毛鼠携带此突变，这与本研究中Arg58Gly的突变率达87.27%的结果接近，而Wang et al.（2008）在广东省湛江市和Huang et al.（2022）在香港特别行政区捕获的黄毛鼠中则未检测到此突变，表明*Vkorc1*突变具有区域性差异，Arg58Gly可能是江门市黄毛鼠特有的突变位点。鉴于Ser57是VKORC1蛋白中高度保守的氨基酸，也是底物维生素K环氧化物潜在的结合位点，推测Arg58Gly通过影响VKOR与抗凝血灭鼠剂的结合效率而产生抗性（Rost et al.，2004；2005）。在鼠类种群中，*Vkorc1*基因携带第120、128或139位氨基酸突变可引起较强的杀鼠灵抗性（Meerburg et al.，2014；Jones et al.，2019），本研究发现黄毛鼠*Vkorc1*基因的Arg58Gly突变与其对第1代抗凝血灭鼠剂的抗性并非线性关系，生理抗性率的年度变化与该位点突变率的年度变化也不一致，推测可能是由于其他抗性机制如*Vkorc1*基因启动子（Yuan et al.，2005）、细胞色素氧化酶P450基因、*Calumenin*基因和遗传渗入等共同介导抗性的发生（Song et al.，2011；McGee et al.，2020）。因此，为更好地阐明鼠类的抗性遗传机制，宜分析*Vkorc1*基因与其他因素的联合作用，甚至考虑与抗性相关的维生素K补充途径等。

Tyr139是抗凝血灭鼠剂的结合位点，其变异可以导致鼠类对抗凝血灭鼠剂产生抗性，在所有的氨基酸突变中，经杀鼠灵处理后携带Tyr139位点变异的VKOR活性最高，该突变在欧洲已被广泛用作遗传标记筛选或监测抗药性啮齿动物（Rost et al.，2005；2009；Buckle，2013）。目前，已发现的139位氨基酸突变包括Tyr139Cys、Tyr139Ser和Tyr139Phe，这3种突变在挪威褐家鼠中均有发生（Jones et al.，2019），在小家鼠和黄胸鼠中主要表现为Tyr139Cys突变（Huang et al.，2011；Díaz & Kohn，2021），在屋顶鼠*Rattus rattus*中表现为Tyr139Phe突变（Tanaka et al.，2012；宋英等，2016）。本研究在黄毛鼠种群中检测到1只发生了Tyr139Cys杂合突变的个体，该鼠在生理抗性检测中致死剂量为21.49 mg/kg，死亡时间为27.00 d，显著高于敏感个体的平均致死剂量和

平均死亡时间，其耐药力显著增强。由于本次检测到的Tyr139Cys突变个体偏少，该变异位点在黄毛鼠种群中是否为偶发性还有待进一步研究。在检测到的突变率很低的4个沉默突变位点中，Ala143Ala是黄毛鼠中新发现的沉默突变位点，Ala143在黄胸鼠中可突变成Ala143Val，但它是一个功能性中性突变，并不影响VKOR活性，推测与啮齿动物的抗药性无关（Andru et al.，2013）。

综上所述，珠江三角洲地区黄毛鼠对第1代抗凝血灭鼠剂已产生抗性且抗性发生呈上升趋势，应及时开展抗性风险评估，因地制宜地开展鼠害的综合治理，同时后续将从不同地区采集黄毛鼠，从多维度对其抗药性作用机制进行深入解析，以期为开发鼠类抗药性监测的分子标记提供理论支持，为农业鼠害防控提供参考依据。

参 考 文 献（References）

Andru J, Cosson JF, Caliman JP, Benoit E. 2013. Coumatetralyl resistance of *Rattus tanezumi* infesting oil palm plantations in Indonesia. Ecotoxicology, 22(2): 377−386

Boyle CM. 1960. Case of apparent resistance of *Rattus norvegicus* Berkenhout to anticoagulant poisons. Nature, 188(4749): 517

Buckle A. 2013. Anticoagulant resistance in the United Kingdom and a new guideline for the management of resistant infestations of Norway rats (*Rattus norvegicus* Berk.). Pest Management Science, 69(3): 334−341

Cowan PE, Gleeson DM, Howitt RL, Ramón-Laca A, Esther A, Pelz HJ. 2017. *Vkorc1* sequencing suggests anticoagulant resistance in rats in New Zealand. Pest Management Science, 73(1): 262−266

Díaz JC, Kohn MH. 2020. A *Vkorc1*-based SNP survey of anticoagulant rodenticide resistance in the house mouse, Norway rat, and roof rat in the USA. Pest Management Science, 77(1): 234−242

Dong TY. 2001. Research on the application of anticoagulant rodenticide. Beijing: China Science and Technology Press (in Chinese) [董天义. 2001. 抗凝血灭鼠剂应用研究. 北京: 中国科学技术出版社]

Dong TY, Yan BS. 1998. Research progress of anticoagulant rodenticide. Journal of Medical Pest Control, 14(4): 61−67 (in Chinese) [董天义, 阎丙申. 1998. 抗凝血灭鼠剂研究进展. 医学动物防制, 14(4): 61−67]

Du GY, Yan D, Wang ZY, Gao SK. 2019. Advances in research on anticoagulant rodenticide resistance. Chinese Journal of Vector Biology and Control, 30(6): 725−728 (in Chinese) [杜国义, 闫东, 王治宇, 高少坤. 2019. 抗凝血杀鼠剂抗药性的研究进展. 中国媒介生物学及控制杂志, 30(6): 725−728]

Feng NG, Ou Y, Ou HB, Cen QQ, Liu SH. 1999. Surveillance on the resistance of *Rattus norvegicus* to anticoagulants in Shenzhen. Chinese Journal of Vector Biology and Control, 10(6): 465−466 (in Chinese) [冯南贵, 欧扬, 欧汉标, 岑清泉, 刘爽汉. 1999. 深圳市褐家鼠对抗凝血剂的抗药性监测. 中国媒介生物学及控制杂志, 10(6): 465−466]

Feng ZY, Yao DD, Huang LS, Chen YT, Qiu JR. 2007. Surveillance on the resistance of *Rattus rattoides* to the first-generation anticoagulants. Journal of Plant Protection, 34(4): 420−424 (in Chinese) [冯志勇, 姚丹丹, 黄立胜, 陈玉托, 邱俊荣. 2007. 黄毛鼠对第一代抗凝血灭鼠剂的抗药性监测. 植物保护学报, 34(4): 420−424]

Gao ZX, Shi DZ, Guo YW, Wu XP, Ji LL, Yang JG, Yuan ZQ. 2008. Testing of resistance of the striped field mouse of Beijing to warfarin. Chinese Journal of Vector Biology and Control, 19(2): 90−92 (in Chinese) [高志祥, 施大钊, 郭永旺, 吴新平, 嵇莉莉, 杨建国, 袁志强. 2008. 北京地区黑线姬鼠对杀鼠灵抗药性的测定. 中国媒介生物学及控制杂志, 19(2): 90−92]

Goulois J, Lambert V, Legros L, Benoit E, Lattard V. 2017. Adaptative evolution of the *Vkorc1* gene in *Mus musculus domesticus* is influenced by the selective pressure of anticoagulant rodenticides. Ecology and Evolution, 7(8): 2767−2776

Huang BH, Feng ZY, Yue LF, Yao DD, Gao ZX, Wang DW, Liu XH. 2011. Warfarin resistance test and polymorphism screening in the *VKORC1* gene in *Rattus flavipectus*. Journal of Pest Science, 84(1): 87−92

Huang EYY, Law STS, Nong WY, Yip HY, Uea-Anuwong T, Magouras I, Hui JHL. 2022. The screening for anticoagulant rodenticide gene *VKORC1* polymorphism in the rat *Rattus norvegicus*, *Rattus tanezumi* and *Rattus losea* in Hong Kong. Scientific Reports, 12: 12545

Jones C, Talavera M, Buckle A, Prescott C. 2019. Anticoagulant resistance in rats and mice in the UK: summary report with new data for 2019.//Report from the Campaign for Responsible Rodenticide Use (CRRU) UK for the Government Oversight Group. Reading, UK: Vertebrate Pests Unit, University of Reading, pp. 1−17

Lin SL, Huang LS, Lan ZS, Lai RF, Yao DD, Jiang HX, Feng ZY. 2022. Analysis of monitoring result of farmland rodents in Nanxiong City and Xinhui District, Guangdong Province. Guangdong Agricultural Sciences, 49(4): 74−80 (in Chinese) [林思亮, 黄立胜, 蓝子胜, 赖荣丰, 姚丹丹, 姜洪雪, 冯志勇. 2022. 广东南雄和新会农田鼠情监测结果分析. 广东农业科学, 49(4): 74−80]

Liu XH. 2018. Status and recent progress in rodenticide applications in China. Plant Protection, 44(5): 85−90 (in Chinese) [刘晓辉. 2018. 我国杀鼠剂应用现状及发展趋势. 植物保护, 44(5): 85−90]

Ma XH, Wang DW, Li N, Liu L, Tian L, Luo C, Cong L, Feng ZY, Liu XH, Song Y. 2018. Low warfarin resistance frequency in Norway rats in two cities in China after 30 years of usage of anticoagulant rodenticides. Pest Management Science, 74(11): 2555−2560

McGee CF, McGilloway DA, Buckle AP. 2020. Anticoagulant rodenticides and resistance development in rodent pest species: a comprehensive review. Journal of Stored Products Research, 88: 101688

Meerburg BG, van Gent-Pelzer MPE, Schoelitsz B, Esther A, van der Lee TAJ. 2014. Distribution of anticoagulant rodenticide resistance in *Rattus norvegicus* in the Netherlands according to *Vkorc1* mutations. Pest Management Science, 70(11): 1761−1766

Mooney J, Lynch MR, Prescott CV, Clegg T, Loughlin M, Hannon B, Moore C, Faulkner R. 2018. VKORC1 sequence variants associated with resistance to anticoagulant rodenticides in Irish populations of *Rattus norvegicus* and *Mus musculus domesticus*. Scientific Reports, 8: 4535

Pelz HJ, Rost S, Hünerberg M, Fregin A, Heiberg AC, Baert K, MacNicoll AD, Prescott CV, Walker AS, Oldenburg J, et al. 2005. The genetic basis of resistance to anticoagulants in rodents. Genetics, 170(4): 1839−1847

Pelz HJ, Rost S, Müller E, Esther A, Ulrich RG, Müller CR. 2012. Distribution and frequency of *Vkorc1* sequence variants conferring resistance to anticoagulants in *Mus musculus*. Pest Management Science, 68(2): 254−259

Qiu JR, Feng ZY, Sui JJ. 2007. Present situation and suggestions on agricultural rodent control in Guangdong Province. Management of Agricultural Science and Technology, 26(2): 44−46 (in Chinese) [邱俊荣, 冯志勇, 隋晶晶. 2007. 广东省农业鼠害治理的现状与建议. 农业科技管理, 26(2): 44−46]

Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V, Conzelmann E, Hörtnagel K, Pelz HJ, Lappegard K, Seifried E, Scharrer I, Tuddenham EGD, et al. 2004. Mutations in *Vkorc1* cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. Nature, 427(6974): 537−541

Rost S, Fregin A, Hünerberg M, Bevans CG, Müller CR, Oldenburg J. 2005. Site-directed mutagenesis of coumarin-type anticoagulant-sensitive VKORC11: evidence that highly conserved amino acids define structural requirements for enzymatic activity and inhibition by warfarin. Thrombosis and Haemostasis, 94(10): 780−786

Rost S, Pelz HJ, Menzel S, MacNicoll AD, León V, Song KJ, Jäkel T, Oldenburg J, Müller CR. 2009. Novel mutations in the *VKORC1* gene of wild rats and mice: a response to 50 years of selection pressure by warfarin? BMC Genetics, 10(1): 1−9

Song Y, Endepols S, Klemann N, Richter D, Matuschka FR, Shih CH, Nachman MW, Kohn MH. 2011. Adaptive introgression of anticoagulant rodent poison resistance by hybridization between old world mice. Current Biology, 21(15): 1296−1301

Song Y, Li N, Wang DW, Liu XH 2016. Genetic mechanism of resistance to anticoagulant rodent poison in rodents. Scientia Sinica (Vitae), 46(5): 619−626 (in Chinese) [宋英, 李宁, 王大伟, 刘晓辉. 2016. 鼠类对抗凝血类灭鼠剂抗药性的遗传机制. 中国科学(生命科学), 46(5): 619−626]

Tanaka KD, Kawai YK, Ikenaka Y, Harunari T, Tanikawa T, Ando S, Min HW, Okajima F, Fujita S, Ishizuka M. 2012. The genetic mechanisms of warfarin resistance in *Rattus rattus* found in the wild in Japan. Pesticide Biochemistry and Physiology, 103(2): 144−151

Wang JS, Feng ZY, Yao DD, Sui JJ, Zhong WQ, Li M, Dai JY. 2008. Warfarin resistance in *Rattus losea* in Guangdong Province, China. Pesticide Biochemistry and Physiology, 91(2): 90−95

Xu RQ, Liu HX, Zhang CZ, Leng PE, Xu JQ. 2013. Resistance of commensal rodents to anticoagulant rodenticide in Shanghai. Chinese Journal of Hygienic Insecticides & Equipments, 19(1): 20−25 (in Chinese) [徐仁权, 刘洪霞, 张春哲, 冷培恩, 徐劲秋. 2013. 上海地区家栖鼠对抗凝血杀鼠剂的抗药性现状调查. 中华卫生杀虫药械, 19(1): 20−25]

Yi JR, Huang YC, Wu J, Zhang SY, Cai SW, Duan JH, Yin WX, Lin LF. 2005. Study on the resistance of commensal rodents to anticoagulant rodenticide in Qingyuan, Guangdong. Chinese Journal of Vector Biology and Control, 16(4): 274−276 (in Chinese) [易建荣, 黄亿初, 吴军, 张世炎, 蔡松武, 段金花, 阴伟雄, 林立丰. 2005. 清远市家栖鼠对第一代抗凝血灭鼠剂抗药性研究. 中国媒介生物学及控制杂志, 16(4): 274−276]

Yi JR, Lin LF, Wu RC, He BX, Liang L, Duan JH, Zhang SY, Yin WX. 2004. Study on the resistance of commensal rodents to anticoagulant rodenticide in Guangzhou. Chinese Journal of Vector Biology and Control, 15(5): 357−359 (in Chinese) [易建荣, 林立丰, 伍任初, 何伯新, 梁练, 段金花, 张世炎, 阴伟雄. 2004. 广州市家栖鼠对第一代抗凝血灭鼠剂抗药性研究. 中国媒介生物学及控制杂志, 15(5): 357−359]

Yuan HY, Chen JJ, Lee MT, Wung JC, Chen YF, Charng MJ, Lu MJ, Hung CR, Wei CY, Chen CH, et al. 2005. A novel functional VKORC1 promoter polymorphism is associated with inter-individual and inter-ethnic differences in warfarin sensitivity. Human Molecular Genetics, 14(13): 1745−1751

Zhang JB, Sun J, Shi JF. 2001. Study on the resistance of two sorts of commensal rodents to warfarin in four areas of Jiangsu Province. Chinese Journal of Vector Biology and Control, 12(6): 407−408 (in Chinese) [章进宝, 孙俊, 石健峰. 2001. 江苏4地区两种家栖鼠对杀鼠灵的抗药性调查. 中国媒介生物学及控制杂志, 12(6): 407−408]

Zhang SY, Hu J, Liang L, Pan RW, Mo ZD, Cen QQ. 2002. Resistance of *Rattus flavipectus* and *Rattus norvegicus* to anticoagulant in Zhanjiang area. Chinese Journal of Vector Biology and Control, 13(1): 66−68 (in Chinese) [张世炎, 胡杰, 梁练, 盘瑞伟, 莫卓鼎, 岑清泉. 2002. 湛江地区黄胸鼠和褐家鼠对抗凝血剂的抗药性. 中国媒介生物学及控制杂志, 13(1): 66−68]

Zhen L, Guo YW, Qin M, Wang WH, Wang D. 2022. Assessment of potato damages caused by Gansu zokor *Eospalax cansus* using RGB images from unmanned aerial vehicle. Journal of Plant Protection, 49(6): 1697−1704 (in Chinese) [甄磊, 郭永旺, 秦萌, 王文慧, 王登. 2022. 基于无人机可见光图像估算甘肃鼢鼠对马铃薯的为害量. 植物保护学报, 49(6): 1697−1704]

Zou TM, Zhang CM, Huang FT, Liu HD, Yi JR, Liang L, Wei HX. 2005. Anticoagulant rodenticide resistance in commensal rodents in Huizhou. Journal of Tropical Medicine, 5(5): 663−665 (in Chinese) [邹添明, 张春明, 黄福涛, 刘海东, 易建荣, 梁练, 魏和兴. 2005. 惠州市家栖鼠对第一代抗凝血杀鼠剂抗药性研究. 热带医学杂志, 5(5): 663−665]

（责任编辑：李美娟）