

不同家蝇种群拟除虫菊酯杀虫剂抗性 基因频率的比较研究

潘婧^{1,2}, 邱星辉^{1,2}

1 中国科学院动物研究所, 农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室, 北京 100101;

2 中国科学院大学, 北京 100049

摘要: 目的 家蝇是一种广泛分布的重要公共卫生害虫, 开展其遗传学、分子生物学的研究为认识和利用家蝇, 有效地控制蝇传疾病提供科学依据。方法 检测我国 5 个家蝇种群中拟除虫菊酯类杀虫剂抗性等位基因的频率, 通过分析在无杀虫剂选择条件下抗性等位基因频率的变化, 推测抗性等位基因适合度效应。结果 研究数据显示, 与拟除虫菊酯类代谢抗性相关联的细胞色素 P450 (*CYP6D1v1*) 抗性等位基因在广东、上海和北京家蝇种群中频率上升, 表明 *CYP6D1v1* 抗性等位基因不存在适合度代价; 而 *CYP6D1v1* 等位基因在起始频率很低的山东和吉林种群中消失, 可能是遗传漂变的结果。家蝇钠离子通道 (*Vssc*) 抗性等位基因 (*kdr-his*) 频率在广东、山东和吉林种群中下降, 而在上海和北京种群中则有所上升, 其中变化最大的是山东种群, *kdr-his* 基因频率由起始较高的 0.33 降至 0, 表明 *kdr-his* 等位基因的适合度因种群的不同而不同。进一步的序列分析表明, *kdr-his* 等位基因可以区分为不同的单倍型, 上述 *kdr-his* 基因频率的变化因种群而异, 可能是因为不同家蝇种群其钠离子通道基因单倍型有所不同。结论 不同的抗性基因或相同基因的不同单倍型具有不同的适合度, 提示家蝇抗药性检测和抗性治理要因因地制宜。

关键词: 家蝇; 抗药性; 拟除虫菊酯; 细胞色素 P450; 钠离子通道; 等位基因频率

中图分类号: R384.2; S481^{+.4} 文献标志码: A 文章编号: 1003-4692(2015)05-0443-04

DOI: 10.11853/j.issn.1003.4692.2015.05.003

Population-specific frequency change of pyrethroid resistance alleles in different *Musca domestica* populations in China

PAN Jing^{1,2}, QIU Xing-hui^{1,2}

1 State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Corresponding author: QIU Xing-hui, Email: qjuxh@ioz.ac.cn

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31172160), Natural Science Foundation of Beijing Municipal (No. 5142014) and the Major National Science and Technology Projects of China (No. 2012ZX10004219)

Abstract: Objective The housefly *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), possess significant health concerns for humans and animals. Research on genetics and molecular biology of this pest is helpful for developing an effective control strategy.

Methods Frequencies of pyrethroid resistance alleles were compared for five field-derived housefly populations collected across China over a three-years interval. **Results** Under the laboratory conditions without insecticide selection over almost 3 years, the frequencies of resistant allele (*CYP6D1v1*) increased in Guangdong, Shanghai, and Beijing populations, but declined in Shandong and Jilin populations that had low initial frequencies of *CYP6D1v1* allele. Guangdong, Shandong and Jilin populations experienced a significant decline in the frequency of voltage-sensitive sodium channel resistance allele (*kdr-his*). The most notable change was observed in Shandong population, in which *kdr-his* disappeared from the initial frequency of 0.33. From these observations, we concluded that *CYP6D1v1* may have fitness advantages and *kdr-his* allele has haplotype-variable fitness. **Conclusion** These findings reconfirm our previous suggestion that resistance management strategy should be customized for a given location.

Key words: *Musca domestica*; Insecticide resistance; Pyrethroid *CYP6DI*; Voltage - sensitive sodium channel; Allele frequency

基金项目: 国家自然科学基金(31172160); 北京市自然科学基金(5142014); 国家科技重大专项课题(2012ZX10004219)

作者简介: 潘婧, 女, 满族, 在读硕士, 主要从事家蝇抗药性研究, Email: pjwolf@126.com

通讯作者: 邱星辉, Email: qjuxh@ioz.ac.cn

网络出版时间: 2015-08-12 13:54 网络出版地址: http://epub.cnki.net/kns/oldnavi/n_CNKIPub.aspx?naviid=59&BaseID=ZMSK&NaviLink=

家蝇 (*Musca domestica*) 是一种重要的疾病传媒。长期以来,家蝇的控制依赖于杀虫剂的使用,其中拟除虫菊酯类杀虫剂的使用最为广泛,使家蝇对其普遍产生了抗药性。通常认为,杀虫剂抗性等位基因在种群中的出现是昆虫适应杀虫剂选择压的结果,由此推测,抗性等位基因在无杀虫剂选择下具有适合度代价。抗性适合度是昆虫抗药性研究的一个核心内容,这方面的知识对于预测抗性的发生发展具有重要指导意义。有关家蝇对拟除虫菊酯类杀虫剂抗药性与家蝇适合度之间关系的研究很少,为此我们在检测了我国 5 个家蝇种群钠离子通道和细胞色素 P450 (*CYP6D1v1*) 抗性等位基因的分布与频率的基础上^[1],分析了在无杀虫剂选择压下抗性等位基因频率的变化,由此推测不同抗性等位基因的适合度效应,为家蝇抗药性风险防范和治理对策的制定提供参考。

1 材料与方法

1.1 家蝇 本研究涉及 5 个家蝇种群,于 2009 年分别采自广东、上海、山东、北京和吉林省(直辖市)^[1]。5 个种群均表现出对拟除虫菊酯类杀虫剂的抗性^[1-2]。各地种群分别在实验室条件下 25 °C 常规饲养,每代以 500~1000 只成虫传代,期间不接触任何杀虫剂。

1.2 主要仪器与设备 PCR 试剂盒和相关限制性 DNA 内切酶(TaKaRa 大连宝生物工程有限公司)、DNA Marker(天根生化科技有限公司)、琼脂糖(西班牙 Biowest 公司); PCR 仪(MyCycler™ thermal cyclor,美国 Bio-RAD 公司)、电泳仪(美国 Bio-RAD 公司)、凝胶紫外分析仪(美国 Bio-RAD 公司)。

1.3 家蝇拟除虫菊酯类杀虫剂抗性基因的基因型测定参考 Rinkevich 等^[3]的方法提取单只家蝇的基因组 DNA。每个种群样本数不少于 30 个。家蝇个体的细胞色素 P450 基因(*CYP6D1*)和钠离子通道基因的基因型分别采用 Qiu 等^[4]和 Rinkevich 等^[3]建立的限制性片段长度多态性聚合酶链反应(PCR-RFLP)方法进行测定。出于比较目的,本研究引用了 2009 年笔者所在实验室已发表的研究结果^[1]。

1.4 钠离子通道基因单倍型分析 参考 Rinkevich 等^[3]的方法,采用 PCR 扩增方法,扩增出包含抗性突变位点约 350 bp 的钠离子通道基因片段。PCR 产物经胶纯化后,与 pGEM 载体连接后,转化大肠埃希菌细胞。筛选出阳性克隆,送华大基因公司测序。根据测序结果和比对分析,区分出不同的单倍型。

2 结果

2.1 *CYP6D1v1* 抗性基因频率变化 如图 1 所示,

2012 年与 2009 年比较,广东、上海、北京家蝇种群 *CYP6D1v1* 抗性等位基因的频率升高,广东种群由起始的 0.22 上升到 0.68,北京和上海种群分别由 0.10 上升到 0.30 和 0.24。山东、吉林种群的 *CYP6D1v1* 等位基因频率分别由 0.01 和 0.04 下降至不可检测和 0.01。

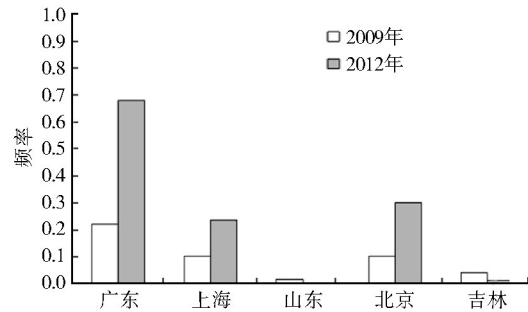
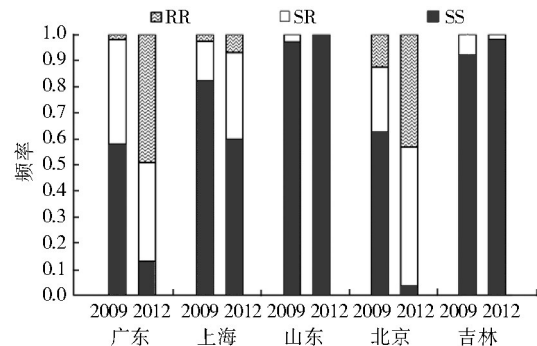


图 1 5 个家蝇种群 *CYP6D1v1* 基因的频率
Figure 1 Frequency of *CYP6D1v1* allele in five housefly populations

2.2 *CYP6D1* 个体基因型频率变化 各地区家蝇种群 *CYP6D1* 基因型频率见图 2。与 2009 年的数据比较,这些种群在实验室饲养 3 年后,*CYP6D1* 基因型频率发生了种群特异性变化。广东种群变化显著,抗性纯合子频率上升为 0.49,敏感纯合子频率下降至 0.13,而杂合子频率变异不大。上海种群家蝇也表现为抗性纯合子频率上升和敏感纯合子频率下降的变化趋势,只是杂合子频率增加了 1 倍。北京种群表现为敏感纯合子频率的显著下降,以及杂合子和抗性纯合子频率的成倍上升。而山东和吉林种群则表现为敏感纯合子频率增加,杂合子频率下降。



注: RR. 抗性纯合子; SR. 杂合子; SS. 敏感纯合子。

图 2 2009 和 2012 年 5 个家蝇种群 *CYP6D1* 基因型频率
Figure 2 Frequency of *CYP6D1* genotypes in five housefly populations

2.3 *kdr-his* 频率 5 个地区采集的家蝇 *kdr-his* 抗性等位基因频率见图 3。从图中可以看到,抗性等位基因频率增加的有上海和北京种群,其中上海种群由 0.04 上升到 0.10,北京种群由 0.05 上升到 0.08。其他 3 个种群(广东、山东和吉林种群)下降,特别引

人注意的是山东种群, *kdr-his* 基因频率由起始较高的 0.33 降至 0。

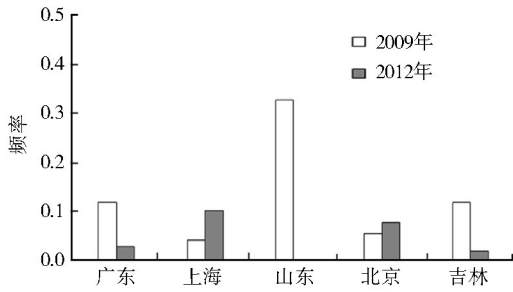
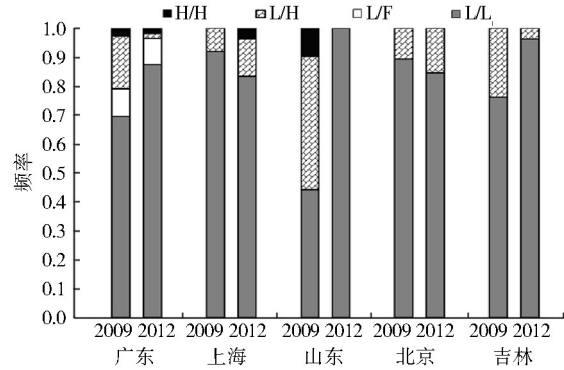


图 3 5 个家蝇种群 *kdr-his* 基因频率
Figure 3 Frequency of *kdr-his* allele in five housefly populations

2.4 钠离子通道个体基因型变化 在 5 个研究种群中, 只在广东种群检测到 *kdr* 抗性等位基因, 以杂合子基因型存在 (L/F), 其频率 3 年后无明显改变。在这些种群中, 广东、山东和吉林种群伴随着杂合子 (H/L) 频率的下降, 敏感纯合子 (L/L) 频率上升, 其中山东种群变化的程度大 (敏感纯合子 0.44 上升至 1.00, 杂合子消失)。相反, 北京和上海种群表现敏感纯合子频率下降而杂合子频率上升。抗性纯合子 (H/H) 在 2009 年只在广东和山东种群检测到, 其频

率至 2012 年有所下降, 但在 2012 年上海种群样品中也检测到抗性纯合子的存在, 频率上升 (图 4)。



注: H/H. 抗性纯合子; L/H. 杂合子; L/F. 杂合子; L/L. 敏感纯合子。
图 4 2009 和 2012 年 5 个家蝇种群钠离子通道基因型频率
Figure 4 Frequency of *Vssc* genotypes in five housefly populations

2.5 *kdr-his* 单倍型分析 通过对广东、山东、北京和上海家蝇种群包含 *kdr-his* 等位突变的个体其钠离子通道基因片段的序列测定和比对分析, 鉴别出 3 种不同的单倍型。其中来源于广东种群的单倍型 (GD) 核苷酸序列变异最大, 而北京种群和上海种群具有相同的 *kdr-his* 单倍型 (图 5)。

```

GD      GATTGTGTTCCGAGTGCTGTGCGGAGAGTGGATCGAGTCCATGTGGGACTGTATGTATGT
SD      GATTGTGTTCCGAGTGCTGTGCGGAGAGTGGATCGAGTCCATGTGGGACTGCATGTATGT
BJ      GATTGTGTTCCGAGTGCTGTGCGGAGAGTGGATCGAGTCCATGTGGGACTGCATGTATGT
SH      GATTGTGTTCCGAGTGCTGTGCGGAGAGTGGATCGAGTCCATGTGGGACTGCATGTATGT
*****

GD      GGGCGATGTCAGCTGTATAACCTTCTTCTTGGCCACGGTCGTGATCGGCAATCATGTGGT
SD      GGGCGATGTCAGCTGTATAACCTTCTTCTTGGCCACGGTCGTGATCGGCAATCATGTGGT
BJ      GGGCGATGTCAGCTGTATAACCTTCTTCTTGGCCACGGTCGTGATCGGCAATCATGTGGT
SH      GGGCGATGTCAGCTGTATAACCTTCTTCTTGGCCACGGTCGTGATCGGCAATCATGTGGT
*****

GD      AAGTTGACGTGGCCGAAACTGCTCCCCCGCTCCCAGGATGGAGGCTTCTGATGACCAATT
SD      AAGTTGACGTGGCCGAAACTACTCCCCCGCTCCCAGGATGGAGGCTTCTGATGACCAATA
BJ      AAGTTGACGTGGCCGAAACTACTCCCCCGCTCCCAGGATGGAGGCTTCTGATGACCAATA
SH      AAGTTGACGTGGCCGAAACTACTCCCCCGCTCCCAGGATGGAGGCTTCTGATGACCAATA
*****

GD      AAAAAAATTAAATCAACCTCTCTCTTTCTCTCTCTCTCAACTTTATTCGGTCCATCC
SD      GATAAAATTTGACATTCATCTCTCTCTTTCTCTCTCTCTC--AACTTTATTCCTTCCCTCC
BJ      GATAAAATTTGACATTTATCTCTCTCTTTCTCTCTCTCTC--AACTTTATTCCTTCCATCC
SH      GATAAAATTTGACATTTATCTCTCTCTTTCTCTCTCTCTC--AACTTTATTCCTTCCATCC
*****

GD      TTTGCAGGTTCTTAATCTTTTCTTAGCTTTGCTTTTGTCCAACCTTCGG
SD      GTTGCAGGTTCTTAATCTTTTCTTAGCTTTGCTTTTGTCCAACCTTCGG
BJ      GTTGCAGGTTCTTAATCTTTTCTTAGCTTTGCTTTTGTCCAACCTTCGG
SH      GTTGCAGGTTCTTAATCTTTTCTTAGCTTTGCTTTTGTCCAACCTTCGG
*****
    
```

注: *表示各序列中该位点具有相同的核苷酸。

图 5 包含 *kdr-his* 抗性突变的钠离子通道单倍型序列比对

Figure 5 Alignment of fragment sequences of voltage-sensitive sodium channel gene containing the *kdr-his* mutation

3 讨论

现有的研究表明,家蝇对拟除虫菊酯的抗性有两个主要机制:靶标钠离子通道基因突变导致的杀虫剂不敏感性(靶标抗性)和细胞色素 P450 基因上调表达导致的杀虫剂代谢作用增强(代谢抗性)^[5]。钠离子通道是拟除虫菊酯杀虫剂的主要靶标,其关键氨基酸位点的突变可以改变其对杀虫剂的敏感性。在家蝇的钠离子通道基因中发现了 3 类抗性相关的突变,即 *kdr*(L1014F)、*kdr-his*(L1014H)和 *superr-kdr*(M918T+L1014F),其中 *kdr-his* 在我国家蝇中普遍分布且频率更高^[1]。细胞色素 P450 CYP6D1 的过量表达与家蝇对拟除虫菊酯类农药抗性相关,现只鉴定 CYP6D1 的一个抗性等位基因(*CYP6D1v1*),其显著特征是该基因的 5'-侧翼区存在一个 15 bp 的插入片段^[6-7],在亚洲、欧洲和美洲的家蝇种群中有分布^[5],在我国家蝇种群中也普遍存在^[1-2]。

比较我国不同种群基因频率的变化,可以看到在无杀虫剂选择下 3 年后,*CYP6D1v1* 基因频率在广东、上海、北京种群中大幅上升,而且敏感纯合子频率显著下降(图 1、2)。从中可以推测,*CYP6D1v1* 抗性等位基因不存在适合度代价,甚至表现出一定的适合度优势,这一结果与美国的研究结果相同^[8]。*CYP6D1v1* 在山东与吉林种群中消失可能不是因为适合度代价,而是由于其起始频率太低(图 1),在实验室长期传代过程中基因遗传漂变的结果。

kdr-his 的基因频率变化因种群的不同而有所不同,在广东、山东、吉林 3 个种群中下降,在上海和北京种群中上升(图 3),而敏感纯合子频率在广东、山东、吉林种群中上升,在上海和北京种群中下降(图 4)。基因频率变动表现出种群差异的原因可能是不同种群中钠离子通道基因虽然均存在 1014H(*kdr-his*)位点突变,但其他位点的核苷酸有所不同而形成不同的单倍型,且不同的单倍型具有不同的适合度,这一推测得到了序列比对结果的支持(图 5)。基因序列比对结果表明不同种群 *kdr-his* 等位基因可以进一步区分为不同的单倍型。频率上升的上海和北京种群拥有相同的 *kdr-his* 单倍型(BJ、SH),频率下降的单倍型为广东(GD)和山东(SD)种群。

综上所述,家蝇杀虫剂抗性的进化是复杂的,而且往往是种群特异性的。不同的野外家蝇种群其抗性等位基因类型和频率因种群遗传背景、当地使用的杀虫剂种类和强度的不同而有所不同。在一定环境条件下,抗性基因频率的变化受种群中各等位基因的相对适合度以及基因型(等位基因组合)的相对适合度制约,而且因环境的变化而变化^[8]。考虑到不同家蝇种群因等位基因组成和个体基因型不同,即使种群具有相同的抗性等位基因,其适合度表现也会因环境的不同而改变,因此抗性检测和抗性治理要因地制宜、因时制宜。

志谢 家蝇的采集得到广东省疾病预防控制中心(CDC)蔡松武、上海市 CDC 冷培恩、山东省 CDC 霍新北、吉林省 CDC 彭渤等的帮助,特此志谢

参考文献

- [1] Wang QM, Li M, Pan J, et al. Diversity and frequencies of genetic mutations involved in insecticide resistance in field populations of the house fly (*Musca domestica* L.) from China [J]. Pestic Biochem Physiol, 2012, 102(2): 153-159.
- [2] Gao Q, Li M, Sheng CF, et al. Multiple cytochrome P450s overexpressed in pyrethroid resistant house flies (*Musca domestica*) [J]. Pestic Biochem Physiol, 2012, 104(3): 252-260.
- [3] Rinkevich FD, Zhang L, Hamm RL, et al. Frequencies of the pyrethroid resistance alleles of *Vsse1* and *CYP6D1* in house flies from the eastern United States [J]. Insect Mol Biol, 2006, 15(2): 157-167.
- [4] Qiu XH, Pan J, Li M, et al. PCR-RFLP methods for detection of insecticide resistance - associated mutations in the house fly (*Musca domestica*) [J]. Pestic Biochem Physiol, 2012, 104(3): 201-205.
- [5] 邱星辉. 细胞色素 P450 在家蝇抗药性中的作用 [J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2014, 25(6): 591-593.
- [6] Scott JG, Liu NN, Wen ZM, et al. House-fly cytochrome P450 *CYP6D1*: 5' flanking sequences and comparison of alleles [J]. Gene, 1999, 226(2): 347-353.
- [7] Seifert J, Scott JG. The *CYP6D1v1* allele is associated with pyrethroid resistance in the house fly, *Musca domestica* [J]. Pestic Biochem Physiol, 2002, 72(1): 40-44.
- [8] Rinkevich FD, Leichter CA, Lazo TA, et al. Variable fitness costs for pyrethroid resistance alleles in the house fly, *Musca domestica*, in the absence of insecticide pressure [J]. Pestic Biochem Physiol, 2013, 105(3): 161-168.

收稿日期: 2015-06-11