

氟虫腈急性致死作用对中华稻蝗种群遗传结构的影响

李翠兰¹, 段毅豪², 卢芙萍^{1,3}, 郭亚平¹, 马恩波¹

(1.山西大学生命科学与技术学院, 山西 太原 030006; 2. 山西大学环境与资源学院, 山西 太原 030006; 3. 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所, 海南 儋州 571737)

摘要:采用急性毒性实验方法, 比较了氟虫腈处理后中华稻蝗多态基因座位(Ldh, Gpi, Pgm, Me)各基因型个体的死亡率差异。从平均每个基因座位的等位基因数($A=3.3$)、平均观察杂合度($H_o=0.387\sim0.404$)和平均期望杂合度($H_e=0.430\sim0.431$)三个参数可知, 中华稻蝗具有较高的遗传多样性, 适合用于对具有不同基因型的个体的致死性差异研究。用氟虫腈农药制剂($0.12\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)注射中华稻蝗 557 头, 48 h 后平均死亡率为 57%。将存活个体和死亡个体分别进行等位酶分析以确定每个个体的基因型。列联表 χ^2 检验结果表明, 氟虫腈对 Gpi、Pgm 和 Me 各基因型个体的选择呈现随机特征, 各基因型与死亡率未见显著相关($P>0.05$)。但在 Ldh 基因座位上, 各基因型个体的死亡率分别为 49% (Ldh-AA)、58% (Ldh-AB) 和 54% (Ldh-BB), 且 Ldh-AA 个体与 Ldh-AB 个体之间的基因型与死亡率存在显著相关($P<0.05$)。根据 Roger's 遗传距离所得的聚类分析, 氟虫腈的急性致死作用使中华稻蝗种群的遗传结构产生了一定的分化作用。

关键词:中华稻蝗; 氟虫腈; 等位酶; 基因型; 死亡率

中图分类号:S481.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2005)05-0919-05

Impacts of Fipronil Acute Lethality on Population Genetic Structure of *Oxya chinensis*

LI Cui-lan¹, DUAN Yi-hao², LU Fu-ping^{1,3}, GUO Ya-ping¹, MA En-bo¹

(1.Collage of Life Science and Technology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China;2. Collage of Environmental Science and Resources, Shanxi University, Taiyuan 030006, China;3. Environment and Plant Protection Institute, CATAS, Danzhou 571737, China)

Abstract: This study examined the relationship of allozyme genotype frequency to differential mortalities in grasshopper *Oxya chinensis*, a swarming pest with increasing outbreaks in China in the past ten years. The samples were taken from Jinyuan District, Taiyuan, China. This population has polymorphic loci at Ldh, Gpi, Pgm and Me as shown by horizontal starch gel electrophoresis. The genetic measures demonstrated the mean number of alleles per locus (A) of 3.3, the observed mean heterozygosity (H_o) of $0.387\sim0.404$ and the expected mean heterozygosity (H_e) of $0.430\sim0.431$. In this study a total of 557 *O. chinensis* individuals from Jinyuan District were injected with fipronil ($0.12\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) to abdomen to obtain a mortality of 57% after 48 hours. The allozyme analysis was then employed to determine the number of each genotype for both surviving and dead individuals. The mortality among the allozyme genotypes of *O. chinensis* was compared between surviving and dead groups of the grasshopper. Contingency table χ^2 tests showed fipronil displayed random lethal effects on each genotype of Gpi, Pgm and Me loci, without correlation between the genotype and mortality. However, at Ldh locus, the mortality of the individuals varied depending on genotype, i.e. 49% (Ldh-AA), 58% (Ldh-AB), 54% (Ldh-BB). The significant genotypic-dependent differentiation was observed between the Ldh-AA and Ldh-AB genotype ($P<0.05$). The cluster analysis based on Roger's genetic distance indicated that fipronil can cause genetic differentiation at population level in *O. chinensis*. These correlations are potentially applicable in moni-

toring the dynamic changes of population genetic structure and perhaps Ldh genotype frequency in a population of the grasshopper species can act as the potential resistant biomarker to pesticide fipronil. It also may be useful in determining resistant level and resistance distribution in *O. chinensis* population.

Keywords: *Oxya chinensis*; fipronil; allozyme; genotype; mortality

氟虫腈(Fipronil)属于苯基吡唑类新型杀虫剂,对害虫具有强烈的触杀和胃毒作用,具有广谱、高效、长效、用量低、与现有常规杀虫剂无交互抗性、对人畜安全以及对作物有促生长作用等特点^[1,2],但对水生生物和蜜蜂毒性较高^[3,4]。近年来氟虫腈已用于水稻、蔬菜等农作物害虫和蝗虫的防治^[5-8],尤其在对其他杀虫剂已产生抗药性的情况下,作为替代品之一的氟虫腈更是得到了广泛的应用。近年来发现按蚊^[9]和家蝇^[10]对氟虫腈产生了一定程度的抗性。故在应用与推广中,如何有效利用氟虫腈,防止或延缓其抗药性的产生,使之在害虫综合防治中发挥较好的作用,是植保部门的一项重要课题。

抗药性是生物微进化现象,是昆虫种群内部遗传结构在杀虫剂的定向选择作用下持续变化的结果^[11]。等位酶分析方法以其简单、快速、经济和高效等优点,特别是能同时对多个样品、多个基因座位和多个等位基因进行检测,从而能够快速判断害虫种群遗传结构及其动态变化,为开发害虫抗药性监测指标提供了新的方法。但有关这方面的研究尚不多见。Maa 等发现小菜蛾(*Plutella xylostella*)对马拉硫磷的抗性与酯酶等位酶有关^[12]。乔传令等^[13]的研究也表明小菜蛾(*Plutella xylostella*)对阿维菌素杀虫剂的抗性与酯酶基因型的变异有关。但酯酶谱带复杂,难以判读,故需要开发其他稳定的等位酶标记用于害虫抗性水平的监测和评估。Guedes 等研究表明谷蠹(*Rhyzopertha dominica*)种群的遗传结构与有机磷杀虫剂的抗性比率呈明显的相关性^[14];我们实验室的研究也表明中华稻蝗 *Gpi* 基因型与农药敌百虫和阿维菌素的急性致死作用存在显著相关^[15,16];而 *Pgm* 基因型与农药氯氟氰菊酯和马拉硫磷的急性致死作用存在显著相关^[17,18]。

本文在本实验室以往研究的基础上^[15-18],以我国重要农业害虫中华稻蝗(*O. chinensis*)为研究对象,从中华稻蝗种群遗传结构出发,通过了解中华稻蝗等位酶基因型与氟虫腈急性致死作用的关系,探索将这种关系作为中华稻蝗对农药氟虫腈的抗性生物标记物(biomarker)的可能性,并对农药氟虫腈毒性是否会影响中华稻蝗种群遗传结构进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫及农药

中华稻蝗采自山西省太原市晋源区(E112°36′, N37°46′),室内适应性饲养 2 d 后,选择健壮、大小均匀的五龄若虫(试虫体重 $0.27 \text{ g} \pm 0.03 \text{ g}$)进行急性毒性实验。

供试农药:5%氟虫腈(Fipronil),由法国罗纳普朗克公司生产。

1.2 急性致死处理

根据本实验室所测得的中华稻蝗对氟虫腈的 $\text{LD}_{50}(0.12 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$ 值,将 5%氟虫腈农药药剂用双蒸水稀释 6 040 倍(终浓度为 $8.28 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),用微量注射器按 $0.12 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 剂量(注射体积为 $4 \mu\text{L} \cdot \text{头}^{-1}$)由腹部第一和第二体节间注入五龄若虫的体腔中。共处理试虫 557 头(试虫体重 $0.27 \text{ g} \pm 0.03 \text{ g}$),注射后 48 h 检查死亡率,以探针轻触虫体无明显反应为死亡标准。死亡个体与存活个体分别保存于 -80°C 冰箱内备用。

1.3 等位酶电泳技术

根据本实验室以往研究结果^[19],对有多态性的乳酸脱氢酶(LDH, EC 1.1.1.27)、6-磷酸葡萄糖异构酶(GPI, EC 5.3.1.9)、磷酸葡萄糖变位酶(PGM, EC 5.4.2.2)和苹果酸酶(ME, EC 1.1.1.40) 4 种等位酶进行分析,分析方法为水平切片淀粉凝胶电泳技术^[20-22]。淀粉凝胶浓度为 12.5%,电泳缓冲液为 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4(0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}, \text{pH}8.0)$,电泳缓冲液与制胶缓冲液的浓度之比为 9:1。

取每个个体的后足股节肌肉,置于预冷的 $20 \mu\text{L}$ 双蒸水内匀浆(冰浴下),浸入 $3 \text{ mm} \times 9 \text{ mm}$ 滤纸芯作为上样品。然后在 4°C 冰箱内恒压($11 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$)电泳 5 h,水平切片后用特异性染色方法进行染色^[20,21]。酶谱判读时,同一基因座位泳动最快的带记为 A,以后依次记为 B、C 等。

1.4 数据处理

1.4.1 种群遗传结构分析

将存活个体和死亡个体分别计数,其和为总个体数(即初始样本)。用 BIOSYS- II^[23]软件计算三个样本的等位基因频率、哈-温(H-W)平衡适合度、平均杂合

度(*H*)、固定指数(*F*)和 Roger' s 遗传距离(*D*),并根据 Roger' s 遗传距离(*D*)用非加权算术平均法(UPGMA)对存活组、死亡组和初始样本进行聚类分析。

1.4.2 基因型与死亡率之间的相关性检验

对中华稻蝗多态基因座位的各基因型与死亡率进行 2×2 列联表 χ^2 检验,以了解基因型与氟虫腈致死作用之间的相关关系。各多态基因座位上的每个基因型为一组,每组的个体数即为重复。各多态基因座位上存活或死亡数少于 5 的稀有基因型不计。

2 结果

2.1 氟虫腈处理后中华稻蝗存活组、死亡组及初始样本的遗传结构分析

氟虫腈处理后中华稻蝗存活组、死亡组及初始样本的等位基因频率、哈-温(*H-W*)平衡适合度、杂合度(*H*)和固定指数(*F*)见表 1。酶谱判读结果表明,本中华稻蝗种群中 *Ldh*、*Gpi*、*Pgm* 和 *Me* 均为多态基因座位,其中 *Ldh* 存在两个等位基因,而 *Gpi* 存在 3 个等位基因,*Pgm* 和 *Me* 有 4 个等位基因。且 *Ldh* 基因座位的基因型频率符合哈-温 (*H-W*) 平衡预期值,但 *Gpi*、*Pgm* 和 *Me* 的基因型频率显著偏离哈-温平衡预期值

(表 1),其中 *Gpi* 为杂合体过剩($F<0$),而 *Pgm* 和 *Me* 是由于杂合体缺乏($F>0$)。氟虫腈处理后中华稻蝗存活组,死亡组及初始样本在 4 个基因座位的种群遗传多样性见表 2。由表 2 可知,中华稻蝗种群在这 4 个基因座位上的多态性程度较高,体现在具有较高的平均每个基因座位的等位基因数($A=3.3$)、平均观察杂合度($H_o=0.387\sim0.404$) 和平均期望杂合度 ($H_e=0.430\sim0.431$), H_o 小于 H_e ,表明中华稻蝗种群出现了一定程度的杂合体缺乏现象,这可能是由于非随机交配、孤雌生殖等因素引起的,也可能存在不利于某些杂合体的自然选择。

Roger' s 遗传距离(*D*)在存活组与死亡组之间为 0.34,存活组与初始样本之间为 0.18,死亡组与初始样本之间为 0.16,根据 Roger' s 遗传距离(*D*) 用非加权算术平均法(UPGMA)对存活组、死亡组和初始样本所做聚类图见图 1。

2.2 氟虫腈处理后中华稻蝗各多态基因座位基因型频率与氟虫腈致死率的关系

用氟虫腈处理五龄若虫共 557 头,注射 48 h 后平均死亡率为 57%,*Ldh*、*Gpi*、*Pgm* 和 *Me* 基因座位上各基因型个体的死亡率及各基因型与死亡率的 2×2

表 1 氟虫腈处理后中华稻蝗存活组,死亡组及初始样本的等位基因频率、基因型频率的哈-温平衡预期值的卡方检验(*H-W*)、杂合度(*H*)和固定指数(*F*)

Table 1 Allele frequency, chi-square tests for Hardy-Weinberg expectations of genotype frequencies, heterozygosity (*H*) and fixation index (*F*) in alive, dead and initial samples of *O. chinensis* after injection with fipronil

基因座位	Ldh			Gpi			Pgm			Me		
	存活组	死亡组	初始样本	存活组	死亡组	初始样本	存活组	死亡组	初始样本	存活组	死亡组	初始样本
N	(251)	(283)	(534)	(261)	(287)	(548)	(252)	(305)	(557)	(250)	(290)	(538)
A	0.777	0.733	0.754	0.211	0.247	0.230	0.054	0.066	0.060	0.462	0.488	0.478
B	0.223	0.267	0.246	0.711	0.690	0.700	0.837	0.867	0.854	0.200	0.197	0.199
C				0.079	0.063	0.070	0.103	0.066	0.083	0.324	0.305	0.315
D							0.006	0.002	0.004	0.014	0.010	0.008
H-W ^b	0.047	2.354	1.001	26.804**	24.252**	5.0842**	63.312**	69.683**	132.040**	134.148**	46.805**	85.564**
H ^c	0.343	0.428	0.388	0.540	0.544	0.542	0.190	0.161	0.174	0.476	0.486	0.483
F	0.012	-0.093	-0.044	-0.216	-0.183	-0.198	0.333	0.329	0.332	0.258	0.228	0.236

注:括号内的值为样本大小; 基因型频率的哈-温平衡预测值的卡方检验值 (* $P<0.05$; ** $P<0.01$); 杂合度 *H* 为直接观察值。

表 2 氟虫腈处理后中华稻蝗存活组,死亡组及初始样本在四个多态基因座位上的遗传多样性

Table 2 Genetic Variability at four polymorphic loci in alive, dead and initial samples of *O. chinensis* after injection with fipronil

样本	平均每个基因座位的样本大小	平均每个基因座位的等位基因数	平均杂合度	
			直接观察值	哈-温平衡预期值**
存活组	253.5 (2.5)	3.3 (0.5)	0.387 (0.077)	0.430(0.078)
死亡组	291.3 (4.8)	3.3 (0.5)	0.404 (0.085)	0.431(0.081)
初始样本I	544.3 (5.2)	3.3 (0.5)	0.397 (0.081)	0.430(0.078)

注:括号内的值为标准误差; * 当最常见的等位基因频率小于 95%时,即为多态基因座位;** 无偏差估计 (Nei, 1978)。

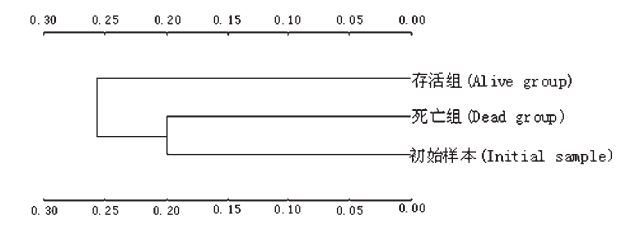


图 1 氟虫腈处理后中华稻蝗存活组、死亡组及初始样本之间的聚类分析(根据 Roger' s 遗传距离)

Figure 1 Cluster analysis using unweighed pair-group method with arithmetic averaging (UPGMA) based on Roger' s genetic distance for each *O. chinensis* groups treated with fipronil

表 3 氟虫腈处理后中华稻蝗 4 个基因座位不同基因型个体的死亡率比较

Table 3 Comparison of the mortalities of the individuals with different genotypes at four loci (Ldh, Gpi, Pgm and Me) of *O. chinensis* after injection with fipronil

等位酶基因型	4 个多态基因座位各基因型个体的死亡率			
	Ldh	Gpi	Pgm	Me
AA	0.49(299)a	0.69(16)		0.56(144)
AB	0.58(207)b	0.55(220)	0.59(41)	0.54(91)
AC				0.55(129)
BB	0.54(28)ab	0.51(235)	0.56(429)	0.54(46)
BC		0.47(77)	0.45(49)	0.48(31)
CC			0.40(20)	0.50(88)

注:* 括号内的值为样本大小;标有完全不同字母的死亡率之间有显著差异,如 a 和 b 之间有显著差异($P<0.05$);而 a (或 b)与 ab 之间无显著差异($P>0.05$)。

列联表 X^2 检验结果见表 3。

检验结果表明,经氟虫腈处理后的中华稻蝗,在 Gpi、Pgm 和 Me 3 个多态基因座位上,各基因型个体的死亡率无显著差异($P>0.05$),显示氟虫腈的致死作用对 Gpi、Pgm 和 Me 各基因型的选择是随机的;但在 Ldh 基因座位上,具有不同基因型个体的死亡率存在差异,分别为 49%(Ldh-AA)、54%(Ldh-BB) 和 58%(Ldh-AB) (表 3),且 Ldh-AA 与 Ldh-AB 在基因型和死亡率之间存在显著相关关系($P<0.05$)。表明氟虫腈的致死作用对 Ldh 基因座位的不同基因型呈现出非随机特征。

3 讨论

昆虫对农药的抗性 与生物的遗传结构及其动态变化有关^{[1]、[4]}。利用种群遗传结构动态变化作为农药抗性的监测指标是害虫防治工作的一条新思路。尽管

目前只有对狄氏剂(dieldrin)具有抗性的按蚊和对氯菊酯(permethrin)具有抗性的家蝇对氟虫腈存在交互抗性的报道^[9、10],但为防止或延缓中华稻蝗对氟虫腈产生抗药性,有必要研究中华稻蝗对氟虫腈抗性的发生发展规律,以便延长氟虫腈的使用寿命。实验室研究是探讨害虫对氟虫腈抗性发生发展规律的第一步。以某些无脊椎动物和鱼类为受试动物,结果表明环境污染 物作为环境选择因子与等位酶基因型频率的改变有显著的相关关系^[24-27],这些工作为我们研究氟虫腈对中华稻蝗等位酶基因型的选择作用提供了很好的参考,其中的一些理论和方法可以作为借鉴。本研究结果表明:

(1)中华稻蝗 4 种等位酶(LDH、GPI、PGM、ME)具有很高的多态性和杂合性(见表 2),这与本实验室以往的研究结果相吻合^[19],且 4 个多态基因座位的稳定性高、活性强,酶谱分辨率高,使其成为研究酶多态性与环境因子、特别是人为环境因子(如农药)关系的理想生物物种。

(2) 中华稻蝗 Ldh 基因座位的基因型频率符合哈-温(H-W)平衡预期值,但 Gpi、Pgm 和 Me 的基因型频率显著偏离哈-温平衡预期值(表 1)。这种偏离具体原因不明,可能与中华稻蝗的繁殖方式、自然选择、生态环境条件及行为等适应性特征有关^[28、29]。

(3)存活组与死亡组之间的 Roger' s 遗传距离最大(0.34),其次为存活组与初始样本之间的(0.18),死亡组与初始样本之间的 Roger' s 遗传距离最小(0.16),表明氟虫腈的急性致死作用使中华稻蝗种群的遗传结构产生了一定的分化作用(图 1)。这一结果与 Guedes 等^[14]的结果具有可比性。表明中华稻蝗种群遗传结构动态变化有可能成为氟虫腈抗性的监测指标和评估依据。

(4) 本中华稻蝗种群 4 种等位酶(LDH、GPI、PGM、ME)基因型对氟虫腈的致死作用具有不同响应(response),表现为氟虫腈对 Gpi、Pgm 和 Me 基因座位各基因型个体的致死作用呈现随机特征,但对 Ldh 基因座位各基因型的致死作用却呈现出非随机效应,Ldh-AA 基因型个体的死亡率显著低于 Ldh-AB 基因型个体的死亡率(表 3) ($P<0.05$)。由于 Ldh 的基因型与氟虫腈致死作用在统计学上存在相关关系 ($P<0.05$),这种关系的确立有助于开发具有早期预警功能的抗性生物标记物(biomarker),以判断害虫种群的抗药性水平及其分布。但是,这种相关关系不应简单地等同为因果关系。一般认为,等位酶分析技术可作为潜在

的、与抗性有关的遗传标记^[25-27],进一步的工作应结合其他遗传标记结果和种群生态特征,并进行基因结构分析,探究更为确切的种群遗传结构与种群抗性进化之间的关系。因此,这方面的工作应该成为今后研究的一个方向。

参考文献:

- [1] 陈兆肃. 新一代特效杀虫剂-锐劲特[J]. 闽东农业科技, 1988, (3): 26, 25.
- [2] 张咏梅, 孙美玲. 锐劲特的应用及其安全性研究进展[J]. 医学动物防制, 2003, 19(9): 513-515.
- [3] 单正军, 王连生, 蔡道基, 等. 新型杀虫剂锐劲特农药对甲壳类水生生物影响研究[J]. 中国农业科学, 2002, 35(8): 949-952.
- [4] 郑海亮, 李任明, 刘 森. 无公害农药锐劲特在作物中的代谢、残留以及毒性和安全性[J]. 江西植保, 2003, 26(3): 139-141.
- [5] 韦永保, 祝春强, 熊延文, 等. 锐劲特在水稻主要害虫总体防治中的应用研究[J]. 昆虫知识, 2001, 38(5): 345-347.
- [6] 杨素钦, 高希武, 张子明. 锐劲特及其飞机防治蝗虫技术[J]. 农药科学与管理, 2001, 22(6): 19-20.
- [7] Liu Z B, Xu S Q, Wang H C, et al. Evaluation of Fipronil for grasshopper management in the pastoral area of Qinghai Province [J]. *Entomologia sinica*, 1999, 6(4): 362-369.
- [8] 王清文, 张建平, 邓志勇, 等. 锐劲特防治稻蝗试验[J]. 陕西农业科学, 1999, (3): 20-21.
- [9] Kolaczinski J, Curtis C. Laboratory evaluation of fipronil, a phenylpyrazole insecticide, against adult Anopheles(Diptera: Culcidae) and investigation of its possible cross-resistance with dieldrin in Anopheles Stephensi [J]. *Pest Manag Sci*, 2001, 57(1): 41-45.
- [10] Liu N, Yue X. Insecticide resistance and cross-resistance in the house fly (Diptera: Muscidae) [J]. *J Econ Entomol*, 2000, 93(4): 1269-1275.
- [11] 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. 283-323.
- [12] Maa W C, Liao S C. Culture-dependent variation in esterase isozymes and malathion susceptibility of Diamondback moth, *Plutella xylostella* L.[J]. *Zoological Studies*, 2000, 39(4): 375-386.
- [13] 乔传令, 王 靖, 邢建民. 不同地区小菜蛾种群的抗药性及酯酶同工酶的研究[J]. 农药学学报, 2000, 2(4): 33-39.
- [14] Guedes R N C, Kambhampati S, Dover B A. Allozyme variation among Brazilian and U.S. populations of *Rhyzopertha dominica* resistant to insecticides [J]. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 1997, 84:

49-57.

- [15] 李翠兰, 段毅豪, 卢芙萍, 等. 敌百虫对中华稻蝗磷酸葡萄糖异构酶基因型的致死性差异研究[J]. 农业环境科学学报, 2004, 23(2): 381-383.
- [16] 李翠兰, 段毅豪, 卢芙萍, 等. 中华稻蝗等位酶基因型与阿维菌素急性死亡率差异研究[J]. 遗传学报, 2004, 31(11): 1241-1247.
- [17] 李翠兰, 段毅豪, 卢芙萍, 等. 中华稻蝗等位酶基因型对杀虫剂氯氟氰菊酯致死性的响应[J]. 农业环境科学学报, 2004, 23(3): 444-447.
- [18] 卢芙萍, 李翠兰, 段毅豪, 等. 马拉硫磷对中华稻蝗种群遗传结构的作用[J]. 遗传, 26(5): 663-668.
- [19] Li C L, Duan Y H, Lu F P, et al. Genetic differentiation among four populations of Chinese rice grasshopper *Oxya chinensis* in China [J]. *Acta zoological sinica*, 2004, 50(2): 187-192.
- [20] 王中仁. 植物等位酶分析[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [21] Murphy R W, Sites J W, Butth D J, et al. Protein I: isozyme electrophoresis. in: Hillis D M, Moritz C, Mable B K, eds., *Molecular systematics* (2nd, edition) [M]. Sunderland, MA, USA: Sinauer Associaye, Inc.Publisher, 1996, 45-126.
- [22] Richardson B W, Sites J, Baverstock P R, et al. Allozyme electrophoresis[M]. Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich, Publishers, 1986.
- [23] Swofford D L, Selander R B. BIOSYS-1: a FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics[J]. *Journal of Heredity*, 1981, 72: 419-426.
- [24] Guttman S I. Population genetic structure and ecotoxicology[J]. *Environ Health Perspect*, 1994, 102 (Suppl. 12): 97-100.
- [25] Schlueter M A, Guttman S I, Oris J T, et al. Survival of copper-exposed juvenile fathead minnows (*Pimephales promelas*) differs among allozyme genotypes[J]. *Enviro Toxicol Chem*, 1995, 14(10): 1727-1734.
- [26] Duan Y H, Guttman S I, Oris J T, et al. Genotype and toxicity relationships among *Hyalella azteca*: I Acute exposure to metals or low pH[J]. *Enviro Toxicol Chem*, 2000, 19(5): 1414-1421.
- [27] Duan Y H, Guttman S I, Oris J T, et al. Genotype and toxicity relationships among *Hyalella azteca*: II. Acute exposure to fluoranthene-contaminated sediment [J]. *Enviro Toxicol Chem*, 2000, 19 (5): 1422-1426.
- [28] Hong Z D, Ando Y. Parthenogenesis in three species of genus *Oxya* Jap [J]. *J Applied Ent Zool*, 1998, 42 (2): 65-69.
- [29] Watt W B. Eggs, enzymes and evolution: Natural genetic variants change insect fecundity [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 10608-10612.