应用昆虫学报 *Chinese Journal of Applied Entomology* 2011,48(2):421—425

昆虫抗药性测定与杀虫剂穿透生物学

杨 健 王 真 姚安庆*

(长江大学农学院 湖北 荆州 434105)

摘 要 论文阐明了杀虫剂穿透生物学的基本概念及其对昆虫抗药性测定的指导意义;论述了杀虫剂穿透生物学提出的背景及其与"田间毒理学"的关系,分析了在昆虫抗药性生物测定中存在的问题及其主要原因;提出了杀虫剂穿透生物学在昆虫抗药性测定中的应用原则。

关键词 杀虫剂,穿透生物学,抗药性测定

Insects resistance bioassay and insecticide penetration biology

YANG Jian WANG Zhen YAO An-Qing*

(Agricultural School of Yangtze University, Jingzhou, Hubei Provice 434025, China)

Abstract This paper sets out the basic concepts of pesticide penetration biology and the determination of insect resistance. The main problems of resistance in insect bioassays are discussed with reference to the principles of pesticide penetration biology.

Key words pesticide, penetration biology, resistance determination

杀虫剂穿透毒理是昆虫毒理学重要的研究领域之一,因为杀虫剂对昆虫的穿透是其发挥毒杀效果的前提(赵善欢,1993)。现代有机合成的杀虫剂大多具有一种以上进入昆虫体内的途径即作用方式,杀虫剂的生物测定尤其是在室内活性筛选的过程中一般是根据化合物本身所具有的作用方式而确定相应的测定方法,再根据试验结果判断化合物的生物活性。这种生物活性显然只是一个初步的实验室评估结论。如果要真正作为一个商品的杀虫剂的开发而言它必须在田间条件下进行药效的检定,也就是说最终考察一个化合物对某种靶标昆虫的生物活性必须由田间试验予以确定(徐汉虹,2008)。这首先是因为杀虫剂的使用总是在田间环境下进行的;其次,实验室测定的结果通常与田间条件下进行的试验结论不一定吻合,有时试验结果甚至可能出现完全相反的情形(吴益东等,1996)。这显然是因为药效事实上会受到实际的用药方式、药剂穿透形式、环境条件以及靶标昆虫在田间条件下的生物学行为的综合影响。昆虫抗药性也是一种在田间用药条件下有害昆虫形成的一种适应性变化,其形成速度和机制显然受制于药剂实际进入昆虫体内的穿透行为的影响。但国内外关于昆虫抗药性的研究与测定恰恰很少考虑药剂在田间条件下的穿透行为(唐振华,2000)。作者认为弄清楚两者间的关系对于正确理解昆虫抗药性的形成及制定相应的生物测定方法有着重要的理论和实践意义。首先作为抗性机理研究的供试材料源于实验室条件下药剂特定胁迫穿透模式汰选的人工抗性种群是否具有合理性(陈之浩等,2005);其次抗性测定的方法的选择需要遵循何种原则才能保证其测定结果最大限度地符合田间的实际抗性水平;再者实验室测定时设定的条件如何真实地反映田间情况下的药剂穿透速率的变化,这些问题正是"杀虫药剂的穿透生物学"需要回答的问题。所谓杀虫剂穿透生物学就是"关于杀虫剂在田间状态下的穿透途径及其速率与药剂的物理状态、昆虫行为学习性及其环境条件之间关系的科学"。提出"杀虫剂穿透生物学"的概念旨在强调抗性机制的研究及其抗性监测必须充分考虑抗药性与田间环境条件的联系,

* 通讯作者,E-mail:yaq990@126.com

收稿日期:2010-05-19,接受日期:2010-12-02

尤其是与昆虫在自然条件下的生物学行为的关系。抗性的测定或监测方法必须建立在药剂穿透生物学理论的基础上才能还原昆虫抗药性发展的历程及其形成机制。

1 杀虫剂穿透生物学提出的背景及其理论渊源

害虫对化学药剂的抗药性历史不到 100 年，就已经有 600 多种害虫对 1 种或多种药剂产生了抗药性(唐振华，2000)，我国已有 45 种害虫产生抗药性，其中农业害虫 36 种(潘志萍和李敦松，2006)。昆虫抗药性的产生和发展是因为在化学药剂的选择压力下昆虫的表皮穿透性、生化代谢以及作用靶标变化的结果(王晨和颜忠诚，2009)。抗药性不仅导致化学防治的成本增加，也增加了农产品因有害生物危害的风险。预测和评估害虫的抗性及其风险是科学地制定抗性治理策略的前提和基础。迄今为止昆虫抗药性检测的方法主要采用生物检测法、神经电生理检测法、生物化学检测法、免疫学检测法、分子生物学检测法等(潘志萍和李敦松，2006)。其中生物检测法即生物测定法仍然是最经典、最基础的方法。就目前通行的抗性检测原理而言生物测定法就是根据“药剂作用方式和昆虫种类”建立标准的抗性检测方法，然后使用该方法建立一个敏感种群的毒力基线，并以此为依据对田间种群的毒力进行比较，从而确定其抗性的变化及其程度(潘志萍和李敦松，2006)。1956 年世界卫生组织召开了一系列的抗性测定方法的讨论会，并于 1970 年制定出标准的测定方法。联合国粮农组织也在 1969—1974 年先后发表了测定原理及 15 种农药抗性测定的试行方案(Busvine，1980)。据此我国也制定了 24 种重要农业害虫抗药性测定标准方法和试行方法(王晨和颜忠诚，2009)。但这些标准制定时考虑的依据均是“昆虫形态和药剂作用方式”两个因素，故对同一种害虫一般推荐了一个以上的测试方法及与之相应的测定虫龄。由于受到传统的毒力测定“量化和精准”概念的束缚，国内外推荐的测定标准大多采用了“点滴法”(王晨和颜忠诚，2009)。甚至象蚜虫这样小型的昆虫的抗性测定标准方法国内外亦推荐为经典的点滴法(刘泽文等，2003)。可以预期以这些纯室内测试方法得到的结果与田间实际情况的符合性必然较低。仅就点滴法而言其药剂存在的物理状态、药剂对昆虫的穿透方式与田间条件下即存在本质的区别。简单地说点滴法就是使药剂在有机溶液状态下单一穿透模式强制通过昆虫的胸部背板进入昆虫体内，而在田间条件下药剂显然是以水乳剂多半通过昆虫体壁的其他部位尤其是跗节或者包括消化道在内的综合穿透途径进入。显然昆虫的跗节或前跗节与胸、腹部体壁的构造是有很大差别的。昆虫的中肠来源于内胚层，与体壁的构造存在更大的差异(雷朝亮，2006)，这可能是导致现有的许多研究结果与生产实践表现出不一致性的主要原因。比如依据实验室测得的区分剂量在具体应用时总是要设计一个所谓的“系数”，即便如此这种“区分剂量”的监测结果也不如使用药剂田间推荐剂量直接作为“区分剂量”所得到的结论更符合田间的抗药性实际状况(赵建周等，1996)。基于传统研究方法认为穿透抗性只在极少条件下发生且并不是主要的抗性机理(姚洪渭等，2002；王芙蓉和吴薇，2009)，这显然与害虫抗性治理中广泛使用渗透剂以增加害虫对药剂的敏感性事实不相符合。因此从药剂穿透生物学的原理出发，设计符合杀虫剂在田间状态下对昆虫的穿透模式的生物测定方法，是保证抗性测定结果准确性的前提。

事实上赵善欢(1993)在研究杀虫剂的毒力与药效的关系时曾经提出“田间毒理学”的概念。指出：“在探讨杀虫剂田间的作用及实际药效时，仅以分子生物学、分子毒理学为基础来研究杀虫剂对昆虫个体生化、生理的影响及其作用机制是不够的，还必须研究田间各种生态因素及昆虫种群的结构与动态对杀虫剂田间药效的影响。并强调有些情况下杀虫剂的毒力需要在田间条件下进行测定”。显然很多年前科学家已经注意到昆虫毒理学的研究离不开田间条件下杀虫剂对靶标害虫种群生长发育的影响。作者可以理解为这正是“杀虫剂穿透生物学”在早期昆虫毒理学研究的初步表达。只是因为昆虫作为一种可以独立于寄主生存的有机个体，还由于实验室研究条件的可控制性等原因，昆虫毒理学包括杀虫剂抗药性的研究不如杀菌剂研究对于“寄主”的依存度受到足够的重视，以至于田间毒理学的概念并未受到广泛的关注。重新评价“田间毒理学”的意义并在此基础上阐明“杀虫剂穿透生物学”的理论对于指导昆虫抗药性研究的实践，是一件重要而且十分紧迫

的任务。

2　从杀虫剂穿透生物学视角讨论抗药性测定与防治效果间的关系

前已叙及所有关于昆虫抗药性的标准方法包括 WTO、FAO、IRAC 以及国内推荐的重要卫生与农业害虫的测定方法的制定依据是基于昆虫的形态和药剂的作用方式两个因素(潘志萍和李敦松,2006)。由于现代有机合成杀虫剂均具有良好的触杀活性,且点滴法被公认为最具有精确性和定量化的特点,故在国内外推荐用于农业害虫抗性测定的标准中优先考虑了该法。但是这一方法所依据的原理以及药剂的穿透方式恰恰与药剂实际使用时的状况差异最大。这就必然导致了抗性研究的结论往往与生产实践不能完全吻合。事实上在很多情况下室内生测夸大了抗药性的重要性。如用点滴法测定烟芽夜蛾对菊酯的抗药性超过 50 倍,但发现这一结论与田间防效降低的情形没有完全的关联性。更有甚者,用点滴法测定该虫对灭多威的抗性指数高达 850 倍以上,而田间防效仅从 64% 下降到 39% (Roush and Tabashnik,1993)。吴益东等(1996)用点滴法和浸叶法分别测定棉铃虫对两类药剂的抗药性,结果表明点滴法测得对氯氰菊酯的抗性倍数为 20.8 ~ 34.8 倍,而浸叶法为 2.0 ~ 18.7 倍;点滴法测得对灭多威的抗性倍数为 5.4 ~ 16.4 倍,而浸叶法为 1.4 ~ 6.5 倍;浸叶法测得对久效磷的抗性倍数为 11.3 ~ 70.1 倍,而点滴法测得的为 2.8 ~ 9.3 倍。从上述结果可知,浸叶法中对氯氰菊酯和灭多威的抗性倍数,总是小于相应种群在点滴法中的抗性倍数。而浸叶法中对久效磷的抗性倍数总是大于相应种群在点滴法中对久效磷的抗性倍数。与田间 3 类药剂的防治效果相比较,证明浸叶法所测结果更符合当地棉铃虫田间抗性水平。这个试验说明不同的测定方法所得到的抗性结果存在较大差异,同一种测定方法应用不同的药剂所得到的结果的符合性存在明显差异。吴益东等(1996)认为产生这种差异的原因是因为不同药剂的作用方式的差异以及两种测定方法中所用药剂的技术等级不同所致即点滴法使用的是原药而浸叶法使用的是制剂。但仔细分析发现,点滴法所测抗性水平从理论上说应该低于浸叶法而不是相反,因为点滴法使用的药剂是经过有机溶剂溶解后的稀释液更容易穿透昆虫的体壁;同时这一结果在氯氰菊酯、灭多威和久效磷之间存在相反的关系即测定方法与测定结果呈现较为复杂的关系。作者认为杀虫剂穿透生物学的改变才是导致这些结果的最本质的原因。实践还证明田间环境尤其是温度会改变药剂进入昆虫体内的方式或者昆虫自身的生理状态。例如赵建周等(1996)利用田间推荐剂量作为“区分剂量”研究小菜蛾对定虫隆的抗药性时发现其抗药性频率的增加发生于 6—10 月,10 月至翌年 6 月保持稳定。抗性个体频率的变化与当地田间药效的变化相一致。郭莹等(2004)在研究小菜蛾对毒死蜱与温度的关系时亦发现在 10 ~ 30℃ 范围内低温饲养的小菜蛾对试验药剂更敏感。这说明温度可能会改变药剂的穿透行为,或者说昆虫的抗药性实际上是一个动态的变化过程。也就是说杀虫剂穿透生物学还包括温度等外部条件对药剂穿透行为可能产生的影响。

一般来说,杀虫剂喷洒在有害虫危害的寄主植物上后进入昆虫体内的途径一般可区分为 3 种复合模式:1. 药剂直接喷洒在昆虫体上后主要从昆虫体壁进入或消化道进入。某些活动性较弱的种类如蚜虫、螨类、蚧壳虫等,药剂多半是按此模式进入昆虫体内。触杀性较强的药剂主要是通过体壁进入,兼具触杀和内吸作用的药剂亦可能通过昆虫刺吸植物汁液而从消化道被摄入;2. 药剂喷洒在寄主植物上后昆虫在受药表面爬行时药剂主要从昆虫跗节或消化道进入。某些活动性较强的种类或夜蛾科幼虫药剂一般很难直接喷洒到昆虫体上,药剂多半是通过它们在受药表面的爬行而摄入药剂。对这些昆虫的抗性测定如采取点滴法进行则所得结论一般很难符合实际情况(吴益东等,1996);3. 药剂施用后主要通过渗透作用到达昆虫活动部位,通过昆虫消化道或体壁进入昆虫体内。钻蛀性昆虫如螟虫、实蝇类幼虫、潜叶蛾幼虫等的受药方式即主要是通过这种模式。对这些昆虫的抗性测定如采用点滴法则与实际情况相去更远。事实上在国内外推荐的抗药性测定标准中后两者模式恰恰首推的就是点滴法。基于杀虫剂穿透生物学的理论,要使抗性测定的结果比较符合田间药效的变化,在针对具体的杀虫剂品种及其测试对象时,抗性测定的方法必须尽可能模拟该药剂在田间条件下事实上对靶标害虫的穿透模式,同时在与大田相似的温度条件下进行测定

(郭莹等,2004)。比如,陈年春等(1996)采用点滴法、浸叶法和浸渍法研究拟除虫菊酯和有机磷杀虫剂对棉蚜的抗性测定,结果表明浸叶法测定效果最好,不仅具有重复性高、适应性好的优点,同时毒力曲线的 b 值最高。对溴氰菊酯的抗性测定结果表明点滴法与浸叶法比较更符合田间实际抗性水平。研究结果既说明浸叶法较符合田间条件下药剂对蚜虫的穿透模式,同时也再次证明了杀虫剂穿透生物学对于抗性测定方法的重要指导意义。需要强调的是评价一个具体的生测标准是否具有适用性最终必须考察其毒力曲线计算所得到的"区分剂量"(LD_{99})是否与田间防治效果具有一致性(赵建周等,1996)。这显然是过去大多数研究者并没有注意到的问题。

3 杀虫剂穿透生物学与抗性测定方法关系的理论阐明

杀虫剂穿透生物学的意义概括起来可以表现在两方面。一是指导杀虫剂应用时必须选择最符合其穿透途径的用药方法和时间;二是指导抗性测定时其测定原理必须尽可能符合药剂在田间状态下一般的穿透方式。针对过去国内外所推荐的害虫抗性测定标准所依据理论上的缺陷,基于前述理由有必要重新依据杀虫剂穿透生物学的理论对现有的测定方法进行全面地检验并重新制定出相应的标准。虽然中华人民共和国农业部为国内杀虫剂新品种登记的需要陆续制定了《农药室内生物测定试验准则 杀虫剂》(中华人民共和国农业部农药鉴定所,2006)。《准则》中推荐的方法包括点滴法、夹毒叶片法、锥形瓶法、连续浸液法、浸渍法、药膜法、喷雾法、人工饲料混药法、稻茎浸渍法、玻片浸渍法、浸叶法等。这些方法无疑考虑到了杀虫剂的大多数作用方式以及昆虫的生物学习性对生物测定方法的要求。但这些方法在推荐时基本上没有充分考虑田间条件下药剂的穿透生物学行为。为此我们需要进一步研究基于"杀虫剂穿透生物学"的基本原理对昆虫抗药性的测定或监测建立一批更为科学和标准的"试验准则"。具体来说,在研究一个具体的测试对象的测定标准时应重点考虑以下原则:

(1)测试对象的生物学特性。重点考虑昆虫测试虫态的活动特点如活动性强弱、昼夜节律等,取食习性如表面取食、潜叶或蛀茎取食等,口器类型如刺吸式或咀嚼式等生物学特性。

(2)昆虫主要危害世代的环境温度。根据已有的研究结果,昆虫生长发育的温度会影响其对药剂的敏感性。如在 10 ~ 30℃ 的范围内,低温饲养的小菜蛾比高温饲养的小菜蛾对药剂更为敏感(郭莹等,2004)。赵建周等(1996)也发现小菜蛾在一个年生活史中对杀虫剂的敏感性变化呈现一定的节律性。Sun(1947)发现在 25 ~ 35 ℃ 饲养的杂拟谷盗,在 25 ℃ 下熏蒸 35 ℃ 饲养者对 CS_2 更敏感(陈年春,1991)。这些研究证明昆虫发育的温度会对同一种杀虫剂的敏感性发生变化。所以抗性测定时必须考虑测定时控制的温湿度最好与实际情况相一致。

(3)药剂的处理方式。药剂的处理方式直接决定了药剂的穿透途径。比如点滴法处理昆虫时,药剂只能局部地通过胸部背板进入昆虫体内;药膜法处理时药剂可以从昆虫体壁的各部分进入;浸叶法和喷雾法处理时药剂可同时从体壁、消化道或气门进入。显然药剂不同的穿透途径到达作用靶标的难易和过程不同,药剂在穿透过程中药剂的主要代谢方式亦随之不同。据此推测昆虫在药剂的选择过程中形成的抗性机制也会发生相应的变化。因此在抗性测定过程中所采取的药剂处理方式如果与田间实际情况相去太远,所测定的结果就有可能不能真实地反映昆虫抗药性的实际水平。这就是前面已经论述过的某些测定方式与实际情况完全不相符合的主要原因。因此室内生物测定应该尽可能采用综合穿透模式而不是单一穿透模式的处理方法以确保药剂的穿透模式与田间条件下一致。

(4)药剂的物理状态。抗性测定不同于一般的毒力测定,其目的并不在于不同品种间生物活性的比较试验,而是要确定某种药剂使用一段时间后田间生物活性的变化情况。因此测定方法必须要与药剂的穿透生物学特点相适应,也就是要最大可能地模拟药剂实际的穿透模式。除处理方法要尽可能真实地再现其穿透模式外,还必须考虑药剂使用时的物理状态。对于主要的施药方式——喷雾法而言药剂均是以水乳剂的形式而存在的,因此大多数情况下点滴法、药膜法所使用的药剂的物理状态与田间情况下是完全不一致的。而药剂的物理状态势必直接影响其穿透途径。这就是为什么大多数的研究结果均证明浸叶法、喷

雾法和浸渍法更适合抗性的生物测定的主要原因。

(5)寄主植物的生物学特点。大多数情况下杀虫剂的生物测定虽然不需要象杀菌剂需要经常考虑寄主植物对其生物活性的影响,但是在杀虫剂抗性测定过程中,寄主的生物学特点也会间接影响到药剂的测定结果。这主要是因为寄主植物的生物学特性会影响到药液雾滴的沉降方式以及对药剂的吸附性能,从而影响到药剂对昆虫体壁的穿透模式。如使用药膜法测定昆虫的抗性时,理论上来说药剂对昆虫的穿透模式与田间情形是相似的,但是使用滤纸或玻璃瓶制作的药膜与药剂在寄主植物上形成的药膜肯定是存在差别的。且不说药剂存在的物理状态本身就不一致。即使同是在实验室条件下进行的生物测定,滤纸药膜和玻璃瓶药膜事实上也是具有很多不同点的。比如药剂的成膜方式、药剂的吸附特点、昆虫与药膜的接触形式等都可能存在较大的差异。那么作为寄主植物其表面的构造特点更是与滤纸或玻璃瓶完全不同,它们表面的蜡质构造以及其上的突起或者毛、刺等物理结构会直接影响到药剂的吸附和释放行为,同时与滤纸或玻璃载体不同,昆虫还会通过口器直接对寄主进行取食等生物学行为。所有这些均会导致药剂的穿透模式出现较大差异从而影响到药剂的毒力变化。此外药剂在寄主植物表面的沉降方式与实验室药膜的制作情况也会有较大差异。因此在抗性测定时注意药剂处理方式外,也要考虑寄主植物的生物学特点,也就是说在较多的情况下抗性的测定必须引入寄主因素。这也是愈来愈多的研究者更倾向于使用浸叶法、喷雾法、叶蝶法等测定方法进行杀虫剂抗性测定的本质原因。

综上所述,杀虫剂的抗性测定的目的是检验药剂在田间条件下对昆虫生物活性变化的趋势及其程度,除需要考虑一般生物测定的基本原则外,以农药穿透生物学理论为指导建立一个符合杀虫剂在田间复合的而不是单一的穿透昆虫的模式的生物测定方法,是保证检测结果与生产实践尽可能吻合的一个非常重要的前提。

参考文献(References)

Bne JR, 1980. Recommended methods for measurement of pest resistance to Pesticides. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations,119—122.

陈年春,李永平,覃柳祥,杨志超, 1996. 棉蚜抗性测定方法的研究. 中国化工学会农药专业委员会第八届年会论文集. 124—127.

陈年春,1991. 农药生物测定技术. 北京:中国农业大学出版社. 44—49.

陈之浩,程罗根,张晓飞,李忠英, 2005. 小菜蛾抗药性分子遗传机理的探讨与分析. 植物保护学报,32(1):67—70.

郭莹,黄斌,赵景玮, 2004. 小菜蛾对毒死蜱的抗性与饲养温度关系的研究. 武夷科学, 12 (20):111—113.

Roush RT, Tabashnik BE,1993. 害虫的抗药性. 芮昌辉译,北京:化学工业出版社. 23—30.

雷朝亮, 2006. 昆虫学通论. 北京:中国农业出版社. 55—62.

刘泽文,韩召军,张玲春,王荫长, 2003. 解毒酶系在褐飞虱对马拉硫磷的抗性发展中的作用. 南京农业大学学报,26(1):24—28.

中华人民共和国农业部农药鉴定所,2006. NY/T 1154. 1-14 ~ 2006-2008,农药室内生物测定试验准则. 北京:中国农业出版社. 1—29.

潘志萍,李敦松, 2006. 昆虫抗药性监测与检测技术研究进展. 应用生态学报, 17(8):1539—1543.

唐振华, 2000. 我国昆虫抗药性研究的现状及展望. 昆虫知识, 37(2):97—101.

王晨,颜忠诚,2009. 昆虫的抗药性. 生物学通报, 44(8):10—12.

王芙蓉,吴薇,2009. 昆虫对杀虫剂的抗性机制概述. 陕西农业科学,2:109—111.

吴益东,沈晋良,陈进,林祥文,李爱玫, 1996. 用点滴法和浸叶法监测棉铃虫抗药性的比较. 植物保护, 22(5):3—6.

徐汉虹, 2008. 植物化学保护学(第 4 版). 北京:中国农业出版社. 332—349.

姚洪渭,叶恭银,程家安, 2002. 同翅目害虫抗药性研究进展. 浙江农业学报, 14(2):63—70.

赵建周,吴世昌,顾颜忠,朱国仁,剧正理, 1996. 小菜蛾抗药性治理对策研究. 中国农业科学,29(1):8—14.

赵善欢, 1993. 昆虫毒理学. 北京:中国农业出版社. 9—190.