

二斑叶螨对七种杀螨剂的抗药性测定及其机理研究^{*}

刘庆娟^{1, 2**} 刘永杰¹ 于毅^{2***} 周仙红² 马惠³

(1. 山东农业大学 泰安 271018; 2. 山东省农业科学院 山东省植物病毒学重点实验室 济南 250100; 3. 山东省棉花研究中心 济南 250100)

摘 要 室内测定了相对敏感种群(S)和抗性种群(R)对常用7种杀螨剂的敏感性,并测定了羧酸酯酶、谷胱甘肽S-转移酶和乙酰胆碱酯酶3种酶的比活力。结果表明:二斑叶螨 *Tetranychus urticae* Koch R种群已对甲氰菊酯和哒螨灵产生了抗性,抗性倍数分别为5.45和105.47。其中,甲氰菊酯对雌成螨的毒力最低(>3 000 mg/L),已远远超过田间推荐剂量,不宜继续使用。酶活测定结果表明:谷胱甘肽S-转移酶解毒活性的提高是二斑叶螨对甲氰菊酯产生抗性的原因之一;二斑叶螨对哒螨灵抗性的增强可能与羧酸酯酶有关。

关键词 二斑叶螨, 甲氰菊酯, 哒螨灵, 解毒酶

The study on resistance and its mechanism of *Tetranychus urticae* to several common insecticides

LIU Qing-Juan^{1, 2**} LIU Yong-Jie¹ YU Yi^{2***} ZHOU Xian-Hong² MA Hui³

(1. Shandong Agricultural University, Taian 271018, China; 2. Shandong Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory for Plant Virology of Shandong, Jinan 250100, China; 3. Cotton Research Center of Shandong, Jinan 250100, China)

Abstract The frequent use of pesticides to control the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* Koch has accelerated the development of resistance in this mite. We evaluated the relative susceptibility of susceptible (S) and resistant (R) strains of *T. urticae* to several common acaricides. The results indicate that the R strain was 5.45 more resistant to fenpropathrin, and 105.47 times more resistant to pyridaben, than the S strain. Fenpropathrin had the lowest toxicity to female mites. The resistance of *T. urticae* is closely related to the activities of detoxicant enzymes. Measurement of the CarE, AChE and GST activities of the two strains indicates that pyridaben resistance can be attributed to increased carboxylesterase activity, and that the main cause of resistance to fenpropathrin is increased glutathione S-transferase activity.

Key words *Tetranychus urticae*, pyridaben, fenpropathrin, detoxicant enzymes

二斑叶螨 *Tetranychus urticae* Koch 又称二点叶螨、白蜘蛛,属叶螨科叶螨属,是叶螨科中食性最广的物种,其寄主植物有800余种(Van Leeuwen *et al.*, 2010)。我国1990年以前仅局部零星发生(孟和生等,2001),但因其扩散速度快、繁殖率高、抗性增长快等特点使得防治极其困难,给农业生产带来了巨大的经济损失。近几年,利用天敌控制二斑叶螨的研究多有报道(王文娟和贺达汉,2006;胡展育等,2007;陈霞等,2008;孙月华等,

2009),但是生产实践中还是以化学防治为主,这就不可避免的使得二斑叶螨对多种药剂产生了抗药性。据国内有关资料报道(喻国泉和李冠雄,1997;赵卫东等,2001;王开运等,2002),二斑叶螨对有机磷类、氨基甲酸酯类、拟除虫菊酯类药剂均产生了不同程度的抗性,且害螨抗药性的增强与其体内解毒酶的活性密切相关。羧酸酯酶、谷胱甘肽S-转移酶是昆虫体内重要的解毒酶,乙酰胆碱酯酶是有机磷类杀虫剂和氨基甲酸酯类农药的

^{*} 资助项目:公益性行业(农业)科研专项“农药高效安全科学施用技术”(200903033)。

^{**} E-mail: linliuqingjuan@126.com

^{***} 通讯作者, E-mail: robertyuyi@163.com

收稿日期:2011-05-05,接受日期:2011-06-08

靶标酶。本文选取了生产中常用的 7 种杀(虫)螨剂对其进行毒力测定,并测定了羧酸酯酶、谷胱甘肽 S-转移酶和乙酰胆碱酯酶 3 种酶的比活力,为该螨的抗性发展水平及治理提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

供试药剂:阿维菌素 1.8% 乳油(浙江海正股份有限公司);甲维盐 1% 乳油(上海艾科思生物药业有限公司);噻螨酮 5% 乳油(江苏龙灯化学有限公司);哒螨灵 15% 乳油(上海升联化工有限公司);甲氰菊酯 20% 乳油(浙江威尔达化工有限公司);唑螨酯 5% 悬浮剂(济南中科绿色生物工程有限公司);除尽 10% 乳油(德国巴斯夫股份有限公司)。

供试虫源:二斑叶螨相对敏感种群(S),由中国农业科学院蔬菜所提供,在实验室多代饲养,可视为相对敏感种群。抗性种群(R)由中国农业科学院郑州果树所提供。

1.2 生物测定方法

参照 FAO 推荐的测定害螨抗药性的标准方法玻片浸渍法(FAO,1980;谭福杰,1987;孟和生等,2000)(slide-dip method)。用零号毛笔挑取健壮、生长一致的雌成螨,将其背部粘在贴有双面胶的载玻片上,不要粘住口器与螨足,每片粘 30 头。将其放入温度 25℃,湿度 80% 的光照培养箱中。4 h 后,用显微镜观察,剔除不活泼或死亡的螨体。然后把带螨玻片的一端浸入药液中,轻摇 5 s 后取出,吸干螨体周围多余的药液。放于温度 25℃,湿度 80%,光照 L:D = 16:8 的培养箱中。24 h 后记录死虫数(轻触螨体,螨足不动者为死亡)与活虫数。每处理重复 3 次,并用清水作为对照。对照组死亡率在 10% 以内为有效实验。

1.3 生化分析法

1.3.1 羧酸酯酶(CarE)比活力测定 参照 Van Asperen(1962)的方法,取 200 头二斑叶螨雌成螨,加入 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH = 7.0)2 mL,在玻璃匀浆器中冰浴条件下充分匀浆,匀浆液在高速冷冻离心机上以 10 000 r/min、4℃ 离心 15 min,取上清液,冰浴待用。取稀释后的不同体积酶液,以 3×10^{-4} mol/L α -醋酸萘酯(内含 1×10^{-4} mol/L 毒扁豆碱)为底物,加入不同体积的 0.04 mol/L 磷

酸缓冲液(pH = 7.0),在 30℃ 条件下水浴振荡 30 min 后,加入 1 mL DBLS(1% 固蓝 B 盐水溶液与 5% 十二烷基硫酸钠以 2:5 配制)终止反应,将混合液置于室温显色 30 min。测定 600 nm 处 OD 值,3 次重复,并用磷酸缓冲液代替酶液作为对照组。以酶量(mL)为自变量,OD 值为因变量作出回归式,做出酶活力曲线,根据标准曲线计算出每毫升酶生成的 α -萘酚量。酶源经蛋白质含量测定得出蛋白质含量(mg/L),计算出羧酸酯酶的比活力($\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{pr} \cdot 30 \text{ min}^{-1}$)。

1.3.2 乙酰胆碱酯酶(AChE)比活力测定 参照 Moores 等(1994)的方法,取二斑叶螨雌成螨 200 头,加入 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH = 7.0)2 mL 在冰浴条件下充分匀浆,匀浆液于 10 000 r/min、4℃ 离心 15 min,取上清液,冰浴待用。在试管中依次加入 2.2 mL pH = 7.4 的 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液,0.1 mL 磷酸缓冲液与 DTNB(1:2)混合液,0.4 mL 酶液。在旋涡混合器上混匀后于 27℃ 恒温水浴振荡反应 15 min,加入 0.5 mL 1×10^{-3} mol/L 毒扁豆碱,混匀后在分光光度计 412 nm 下测 OD 值,3 次重复,并用磷酸缓冲液代替酶液作为对照组。求出各 OD 值对应的硫代胆碱的量,根据蛋白质标准曲线查出酶源蛋白质含量,计算出乙酰胆碱酯酶的比活力($\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{pr} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$)。

1.3.3 谷胱甘肽 S-转移酶(GST)比活力测定

参照 Wu 和 Miyata(2005)的方法,取二斑叶螨雌成螨 200 头,将螨体置于 2 mL 的磷酸缓冲液(0.1 mol/L,pH 7.0)中,在冰浴条件下充分匀浆,匀浆液于 10 000 r/min、4℃ 离心 15 min,取上清液,冰浴待用。以 CDNB(1-氯-2,4-二硝基苯)为底物,在试管中依次加入 2.4 mL 的 66 mmol/L 磷酸缓冲液,0.3 mL 的 50 mmol/L 谷胱甘肽,0.2 mL 的酶液,0.1 mL 的 0.03 mol/L CDNB,立即混匀,在 27℃ 水浴条件下反应 5 min,340 nm 下测 OD 值,每处理重复 3 次,对照处理以磷酸缓冲液代替酶液。酶源经蛋白质含量测定,计算出谷胱甘肽转移酶的比活力($\text{OD} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{pr} \cdot \text{min}^{-1}$)。

1.3.4 酶源蛋白质含量测定 参照 Bradford(1976)的方法,记述的考马斯亮蓝 G-250 法。

1.3.5 羧酸酯酶最大反应速度($V_{\max}$)、米氏常数(K_m)的测定 同羧酸酯酶比活力的测定方法。其中, K_m 反映了酶与底物的亲和力, $V_{\max}$ 代表了酶的比活力。

1.4 数据统计与分析

生物测定结果采用 SPSS 软件求出毒力回归式、LC₅₀、95% 置信区间等,并用 Duncan's 多重比较进行酶活性和含量差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 7 种药剂对二斑叶螨不同种群雌成螨的毒力测定

对二斑叶螨相对敏感种群毒力最高的药剂是阿维菌素,LC₅₀ 为 0.048 mg/L; 其次是唑螨酯

(0.209 mg/L) > 甲维盐 (0.275 mg/L) > 哒螨灵 (8.051 mg/L) > 除尽 (35.081 mg/L) > 噻螨酮 (404.034 mg/L) > 甲氰菊酯 (563.813 mg/L)。二斑叶螨抗性种群对 7 种药剂的毒力由高到低依次为阿维菌素 > 甲维盐 > 唑螨酯 > 除尽 > 噻螨酮 > 哒螨灵 > 甲氰菊酯,其中,甲氰菊酯的毒力最低,LC₅₀ 为 3 073.679 mg/L。由表 1 和图 1 可以看出,与 S 种群相比,R 种群已对哒螨灵产生了较高的抗性,抗性倍数高达 105.47 倍;对甲氰菊酯也产生了一定的抗性,抗性倍数为 5.45 倍。

表 1 7 种药剂对二斑叶螨不同种群雌成螨的毒力
Table 1 Resistance of different strains of *Tetranychus urticae* to seven insecticides

药剂 Pesticide	种群 Strains	回归方程 Regression equation	LC ₅₀ (95% 置信区间) mg·L ⁻¹ LC ₅₀ (95% CL)/mg·L ⁻¹	X ²	抗性倍数 (R/S)
噻螨酮	S	y = 1.721x - 4.417	369.342 (208.294—585.376)	8.120	—
Hexythiazox	R	y = 1.952x - 5.087	404.034 (327.546—480.231)	1.357	1.09
甲维盐	S	y = 2.403x + 1.347	0.275 (0.038—0.729)	4.516	—
Emamectin benzoate	R	y = 2.482x + 1.003	0.349 (0.329—0.482)	2.819	1.27
阿维菌素	S	y = 2.914x + 3.833	0.048 (0.042—0.055)	0.323	—
Abamectin	R	y = 2.963x + 3.247	0.080 (0.043—0.147)	7.205	1.67
唑螨酯	S	y = 1.489x + 1.013	0.209 (0.158—0.284)	0.191	—
Fenproximate	R	y = 1.341x + 0.592	0.362 (0.278—0.490)	0.213	1.73
除尽	S	y = 1.214x - 1.876	35.081 (26.063—45.981)	4.862	—
Chlorfenapyr	R	y = 1.903x - 3.944	118.067 (91.280—147.046)	1.043	3.37
甲氰菊酯	S	y = 1.987x - 5.466	563.813 (462.989—665.653)	0.163	—
Fenpropathrin	R	y = 1.996x - 6.961	3 073.679 (2 612.575—3 639.201)	0.335	5.45
哒螨灵	S	y = 1.527x - 1.383	8.051 (6.268—10.767)	1.105	—
Pyridaben	R	y = 1.718x - 5.033	849.16 (671.914—1 090.637)	2.782	105.47

2.2 二斑叶螨不同种群羧酸酯酶、谷胱甘肽 S - 转移酶和乙酰胆碱酯酶的比活力

由表 2 可以看出,R 种群 3 种解毒酶的比活力较 S 种群都有明显的提高,且差异性显著。其中,

二斑叶螨 R 种群羧酸酯酶的比活力 (1.9731 μmol·mg⁻¹pr·30min⁻¹) 是 S 种群 (1.1411 μmol·mg⁻¹pr·30min⁻¹) 的 1.73 倍。谷胱甘肽 S - 转移酶的比活力由 0.0673 OD·mg⁻¹pr·min⁻¹ (S) 提高到

表 2 二斑叶螨不同种群 CarE、GSTs、AChE 比活力
Table 2 Activities of CarE、GSTs and AChE in different *Tetranychus urticae* strains

种群 Strains	羧酸酯酶比活力 CarE activity (μmol·mg ⁻¹ pr·30min ⁻¹)	谷胱甘肽 S - 转移酶比活力 GSTs activity (OD·mg ⁻¹ pr·min ⁻¹)	乙酰胆碱酯酶比活力 AChE activity (μmol·mg ⁻¹ pr·15min ⁻¹)
S	1.1411	0.0673	22.1162
R	1.9731 *	0.1176 *	26.9240 *

注:表中同列数据后标 * 表示差异显著 (Duncan's, P < 0.05)。
Data marked with asterisks within the same column indicate significantly differert at 0.05 level by Duncan's multiple range test.

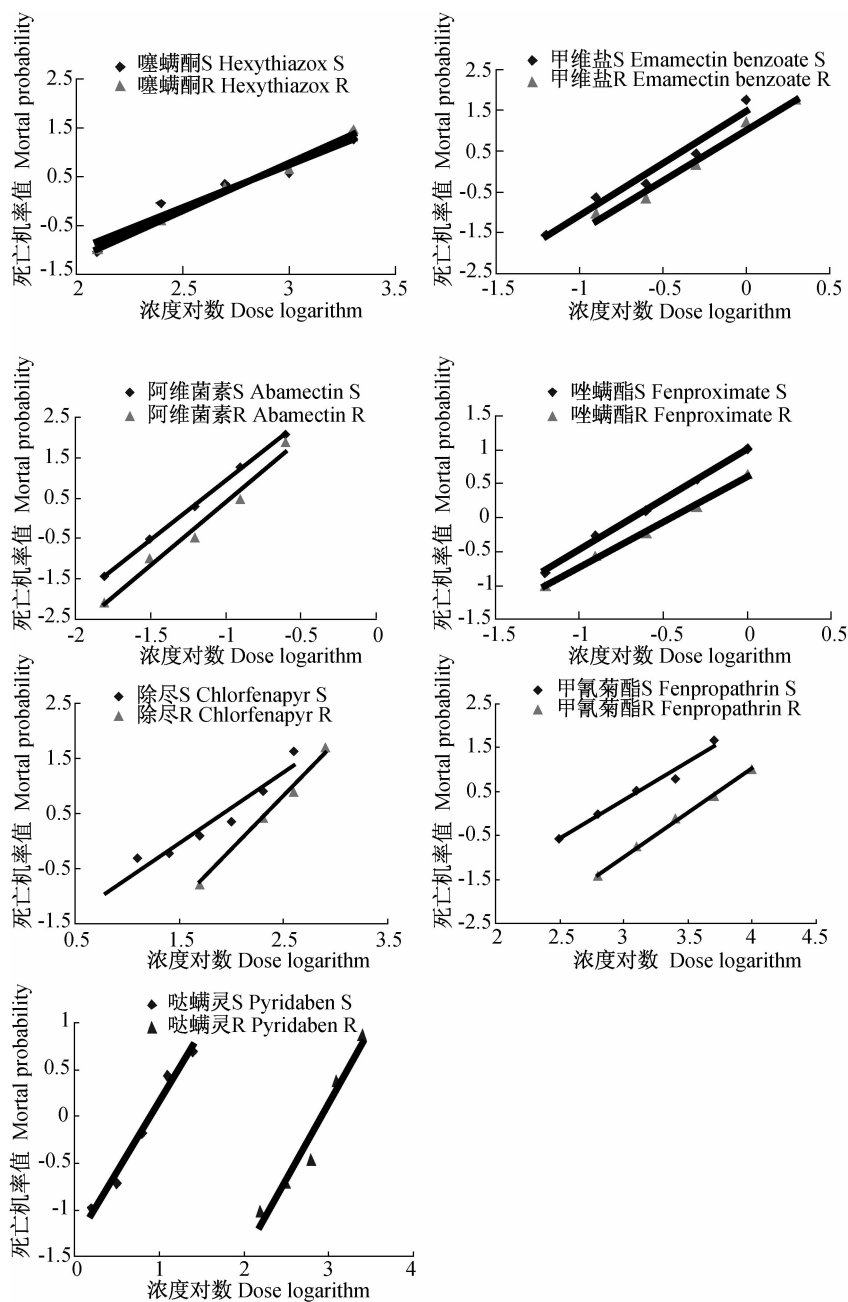


图 1 二斑叶螨不同种群对 7 种药剂的毒力回归线

Fig. 1 Toxicity line of different strains of *Tetranychus urticae* to seven insecticides

0.1176 OD·mg⁻¹pr·min⁻¹。乙酰胆碱酯酶的比活力是 S 种群的 1.22 倍,也有明显的升高。

2.3 二斑叶螨不同种群羧酸酯酶米氏常数 K_m 及最大反应速度 V_{max} 的测定

K_m 反映酶与底物的亲和力, K_m 值越小表示亲和力越高,反之, K_m 值越大,表示亲和力越低。 V_{max} 代表酶活力, V_{max} 越大说明酶浓度越高。由表 3 可以看出,R 种群的 K_m 为 0.220 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,是 S

种群的 0.12 倍,说明 R 种群羧酸酯酶的亲和力比 S 种群的高。但是,R 种群的 V_{max} 是 S 种群的 0.60 倍,羧酸酯酶的量与 S 种群相比却有所减少。

3 讨论

据报道,二斑叶螨对拟除虫菊酯类杀(虫)螨剂已产生高水平的抗性 (Van Leeuwen *et al.*, 2009; Van Pottelberge *et al.*, 2009)。通过本研究

表 3 二斑叶螨不同种群羧酸酯酶米氏常数 K_m 及最大反应速度 V_{max}
Table 3 K_m and V_{max} of CarE in different *Tetranychus urticae* strains

种群 Strains	K_m ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	R/S	V_{max} ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{pr} \cdot \text{min}^{-1}$)	R/S
S	1.8960	1.0	5.6211	1.0
R	0.2209	0.12	3.3670	0.60

可以发现,甲氰菊酯对二斑叶螨雌成螨的毒力已远远超过推荐剂量,且对三氯氟氰菊酯、氯氰菊酯有交互抗性,对苦皮藤生物碱、三唑锡和四螨嗪有轻微交互抗性(高新菊等,2010),已不宜继续使用。噻螨酮对雌成螨的活性很低,无实际应用价值,但是对二斑叶螨的卵、若螨均有较强的活性(张金勇等,2011),最好在卵孵化盛期使用。除尽、哒螨灵的毒力较低,可能是长期大量的使用这2种药剂防治二斑叶螨造成的。甲维盐、阿维菌素与哒螨酯相比其它几种药剂防治效果要好,可与其它作用方式的药剂轮换使用。

本研究中二斑叶螨 R 种群谷胱甘肽 S-转移酶的比活力是 S 种群的 1.75 倍,差异性显著,说明谷胱甘肽 S-转移酶解毒活性的提高是二斑叶螨对甲氰菊酯产生抗性的原因之一,高新菊和沈慧敏(2011)也有报道。羧酸酯酶的比活力是 S 种群的 1.73 倍,两者之间差异显著,这与赵卫东等(2003)等报道的二斑叶螨对哒螨灵的抗性与羧酸酯酶有关相一致。虽然 R 种群与 S 种群相比有所提高,但是,酶量却有所减少。可能是羧酸酯酶比活力的升高与酶量无关,而是酶的结构发生了变化,有待进一步的研究。

参考文献 (References)

Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.*, 72:248—254.

FAO, 1980. Revised method for spider mites and their eggs. (e. g. *Tetranychus* spp. and *Panonychus ulmi* Koch). *FAO Plant Production and Protection*, 21:49—54.

Moores GD, Devine GJ, Devonshire AL, 1994. Insecticide-insensitive acetylcholinesterase can enhance esterase-based resistance in *Myzus persicae* and *Myzus nicotianae*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 49:114—120.

Van Asperen KA, 1962. Study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method. *J. Insect Physiol.*, 8:

401—416.

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 Biochem. Mol. Biol.*, 40:563—572.

Van Leeuwen T, Vontas J, Tsakarakou A, Tirry L, 2009. Mechanisms of acaricide resistance in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* // Ishaaya I, Horowitz RA, Rami A (eds.). *Biorational Control of Arthropod Pests: Application and Resistance Management*. The Netherlands, Springer. 347—393.

Van Pottelberge S, Van Leeuwen T, Nauen R, Tirry L, 2009. Resistance mechanisms to mitochondrial electron transport inhibitors in a field-collected strain of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Bull. Entomol. Res.*, 99(1):23—31.

Wu G, Miyata T, 2005. Susceptibilities to methamidophos and enzymatic characteristics in 18 species of pest insects and their natural enemies in crucifer vegetable crops. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 82:79—93.

陈霞, 张艳璇, 季洁, 林坚贞, 2008. 热带吸螨对二斑叶螨的捕食作用. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 37(4): 341—343.

高新菊, 沈慧敏, 2011. 二斑叶螨对甲氰菊酯的抗性选育及解毒酶活力变化. *昆虫学报*, 54(1):64—69.

高新菊, 谢谦, 杨顺义, 张志刚, 王文如, 沈慧敏, 2010. 抗甲氰菊酯二斑叶螨种群对 12 种杀螨剂的抗药性及交互抗性. *甘肃农业大学学报*, 45(2):114—120.

胡展育, 邹军锐, 熊继文, 2007. 尼氏钝绥螨对二斑叶螨的捕食作用. *安徽农业科学*, 35(15):4556—4557.

孟和生, 王开运, 姜兴印, 仪美芹, 2000. 桔全爪螨对对常用杀螨剂的抗药性测定. *农药*, 39(2):26—28.

孟和生, 王开运, 姜兴印, 仪美芹, 2001. 二斑叶螨发生危害特点及防治对策. *昆虫知识*, 38(1):52—54.

孙月华, 邹军锐, 王清, 刘月芳, 2009. 伪钝绥螨对二斑叶螨的捕食作用. *中国生物防治*, 25(3):196—199.

谭福杰, 1987. 农业害虫抗药性测定方法. *南京农业大学学报*, 4(增):107—122.

王开运, 赵卫东, 姜兴印, 王金花, 2002. 十种杀螨剂对二斑叶螨抗性种群不同发育阶段的毒力比较. *农药*, 41(3):

- 29—31.
- 王文娟, 贺达汉, 2006. 三种主要天敌对二斑叶螨 (*Tetranychus urticae* Koch) 的控制作用研究. 农业科学研究, 27(1):16—19.
- 喻国泉, 李冠雄, 1997. 几种杀螨剂对二斑叶螨的药效试验. 植物检疫, 11(4):207—211.
- 张金勇, 涂洪涛, 郭小辉, 陈汉杰, 2011. 多种杀螨剂对二斑叶螨不同发育阶段的毒力比较及安全性评价. 农药, 50(1):65—67.
- 赵卫东, 王开运, 姜兴印, 仪美芹, 2001. 二斑叶螨对常用杀螨剂的抗药性测定. 农药学学报, 3(3):86—88.
- 赵卫东, 王开运, 姜兴印, 仪美芹, 2003. 二斑叶螨对阿维菌素、哒螨灵和甲氰菊酯的抗性选育及其解毒酶活力变化. 昆虫学报, 46(6):88—92.